

**Reinigung und Charakterisierung der Cyclodextrin
Glycosyltransferase (CGTase) aus dem thermoalkaliphilen
Bakterium *Anaerobranca gottschalkii***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Catharina Maria Dönges

aus Ludwigshafen am Rhein

Köln, 2004

Berichtersteller:

Prof. Dr. R. Sterner

Prof. Dr. H. W. Klein

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 20.01.2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Enzym Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase): Herkunft, Aufbau und Reaktionsmechanismus	1
1.2	Eigenschaften von Cyclodextrinen	5
1.3	Industrielle Anwendungen von Cyclodextrinen	8
1.3.1	Pharmazeutische Anwendung	9
1.3.2	Anwendungen in der Nahrungsmittelindustrie	10
1.3.3	Anwendungen in der Textil- und Waschmittelindustrie	10
1.4	Herstellung von Cyclodextrinen	10
1.5	Methoden der Thermostabilisierung von Proteinen	11
1.6	Die CGTase aus <i>Anaerobranca gottschalkii</i>	13
1.7	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Bakterienstämme	15
2.1.1.1	<i>E. coli</i> JM109 (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)	15
2.1.1.2	<i>E. coli</i> DH5 α (Hanahan, 1983)	15
2.1.1.3	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (Studier & Moffatt, 1986)	15
2.1.1.4	<i>Anaerobranca gottschalkii</i> sp. nov. LBS3 ^T	15
2.1.2	Vektoren	15
2.1.2.1	pET-Vektoren (Novagen) zur Genexpression in <i>Escherichia coli</i>	15
2.1.2.2	pUC19 (Fermentas)	17
2.1.3	Oligodesoxyribonukleotide (Primer)	18
2.1.3.1	Primer zur Amplifizierung des <i>cgtase</i> -Gens aus <i>A. gottschalkii</i>	18
2.1.3.2	Primer zur Stabilisierung der CGTase aus <i>A. gottschalkii</i>	18
2.1.3.3	Primer zur Sequenzierung des <i>cgtase</i> -Gens	18
2.1.4	Längenstandards	19
2.1.4.1	DNA-Längenstandards	19
2.1.4.1.1	SmartLadder (Eurogentec)	19
2.1.4.1.2	Gene Ruler TM 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas)	20
2.1.4.2	Protein-Längenstandards	20

2.1.4.2.1	Low Molecular Weight Marker (Amersham Pharmacia)	20
2.1.4.2.2	Rainbow™ coloured protein molecular weight markers (Amersham Biosciences)	20
2.1.5	Enzyme	21
2.1.6	Chemikalien	21
2.1.7	Geräte und Materialien	22
2.1.8	Nährmedien	26
2.1.8.1	Medien für <i>E. coli</i>	26
2.1.8.2	Medium für <i>A. gottschalkii</i>	26
2.1.8.3	Agarplatten	27
2.1.9	Lösungen und Puffer	27
2.1.10	Software	32
2.1.10.1	Geräte-Software zur Analyse von Messergebnissen	32
2.1.10.2	Software zur Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	32
2.2	Mikrobiologische Methoden	34
2.2.1	Abtötung von Mikroorganismen	34
2.2.2	Sterilfiltration von Lösungen	34
2.2.3	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> Stämmen	34
2.2.4	Anzucht und Ernte von <i>Anaerobranca gottschalkii</i>	35
2.2.5	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	36
2.2.5.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen zur Elektroporation (Dower <i>et al.</i> , 1988)	36
2.2.5.2	Vorbereitung von DNA für die Elektroporation	36
2.2.5.3	Transformation von elektrokompentenen <i>E. coli</i> -Zellen	36
2.2.5.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Inoue <i>et al.</i> , 1990)	37
2.2.5.5	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	37
2.2.6	Stempeltechnik	38
2.3	Molekularbiologische Methoden	38
2.3.1	Bestimmung der DNA-Konzentration	38
2.3.2	Isolierung und Reinigung von DNA	39
2.3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi-Präparation)	39
2.3.2.2	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>A. gottschalkii</i>	39

2.3.2.3	Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen	40
2.3.2.3.1	Fällung von DNA mit Ethanol	40
2.3.2.3.2	Fällung von DNA mit Isopropanol	40
2.3.2.4	Agarosegelelektrophorese	41
2.3.3	Enzymatische Manipulation von doppelsträngiger DNA	41
2.3.3.1	Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren	41
2.3.3.2	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	41
2.3.3.3	Ligation von DNA-Enden	42
2.3.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
2.3.3.5	Insert-Screening	44
2.3.3.6	Einführung von Punktmutationen in Gene	44
2.3.3.6.1	Splicing by Overlap Extension (SOE) PCR	44
2.3.3.6.2	Error Prone PCR	45
2.3.3.7	DNA - Sequenzierung	46
2.4	Proteinchemische Methoden	47
2.4.1	Expression und Anreicherung von Proteinen	47
2.4.1.1	Protein-Produktion im analytischen Maßstab („Probe-expression“)	47
2.4.1.2	Protein-Produktion im präparativen Maßstab	47
2.4.2	Proteinreinigung	48
2.4.2.1	Anionenaustauschchromatographie	48
2.4.2.2	Affinitätschromatographie	49
2.4.2.2.1	His-Tag	49
2.4.2.2.2	α -CD-Affinitätschromatographie	50
2.4.2.3	Hydroxylapatit-Chromatographie	51
2.4.2.4	Proteinfällung mit Ammoniumsulfat	52
2.4.2.5	Präparative Gelfiltration	53
2.4.2.6	Dialyse von Proteinlösungen	53
2.4.2.7	Einkonzentrierung von Proteinlösungen	54
2.4.2.8	Lagerung von Proteinen	54
2.5	Analytische Methoden	54
2.5.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	54
2.5.1.1	Der Bradfordtest	54
2.5.1.2	UV-Absorption	55
2.5.2	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
2.5.3	Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Native PAGE)	57

2.5.4	Western Blot Analyse und Entwicklung mit alkalischer Phosphatase	58
2.5.5	Trypsinspaltung	59
2.5.6	Analytische Gelfiltration	60
2.5.7	Dynamische Lichtstreuung	60
2.5.8	Fluoreszenz-Messungen	61
2.5.9	Circular Dichroismus (CD)-Messungen	62
2.5.10	Differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC)	64
2.5.11	<i>Steady state</i> - Enzymkinetik	64
2.5.11.1	Diskontinuierliche Messung der Cyclisierungsaktivität	64
2.5.11.2	Kontinuierliche Messung der Cyclisierungsaktivität	66
2.5.11.3	Messung des Produktspektrums	67
2.5.11.4	Messung des Stärkeabbaus im Reaktionsansatz (Iod-Test)	68
2.5.12	Messung des Stärke-Abbaus im Plattentest	69
2.5.13	Thermische Inaktivierung	70
3	Ergebnisse und Diskussion	71
3.1	Vergleich der CGTase aus <i>A. gottschalkii</i> mit bekannten CGTasen	71
3.1.1	Modellierung der 3D-Struktur der CGTase mit SwissModel	72
3.2	Herstellung und Charakterisierung der rekombinanten CGTase aus <i>A. gottschalkii</i>	72
3.2.1	Ermittlung der Signalsequenz der sekretorischen CGTase	72
3.2.2	Isolierung des <i>cgtase</i> Gens aus <i>A. gottschalkii</i> und Klonierung in den pUC19-Vektor	73
3.2.3	Klonierung des <i>cgtase</i> Gens mit und ohne His-Tag in pET-Vektoren	73
3.2.4	Produktion der CGTase mit His-Tag	74
3.2.5	Produktion der CGTase ohne His-Tag	79
3.2.6	Zusammenfassung und Diskussion der Herstellung der CGTase	81
3.2.7	Charakterisierung der CGTase	83
3.2.7.1	Analytische Gelfiltration in Anwesenheit von β -CD	83
3.2.7.2	Spektroskopische Untersuchungen der Sekundär- und Tertiärstruktur	84
3.2.7.3	Untersuchungen zur Stabilität der CGTase	85
3.2.7.3.1	DSC-Messungen	86
3.2.7.3.2	Thermische Inaktivierung	88

3.2.7.4	Die Cyclisierungsaktivität der CGTase (β -CD Produktion)	91
3.2.7.5	Produktspektrum der CGTase	92
3.2.8	Zusammenfassung und Diskussion zur Charakterisierung der CGTase	97
3.3	Thermische Stabilisierung der CGTase durch Zufallsmutagenese und Screening	98
3.3.1	Einführung einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle in die Mitte des <i>cgtase</i> -Gens	99
3.3.2	Erzeugung eines Pools an mutagenisierten CGTase-Varianten	100
3.3.3	Herstellung einer Bank von <i>cgtase</i> -Genvarianten in pET24a (Bankgröße und Anzahl/Verteilung der Mutationen)	100
3.3.4	Etablierung eines Screening-Verfahrens zur Isolierung thermisch stabilisierter CGTase-Varianten	101
3.3.5	Screening von stabilisierten Varianten	103
3.3.6	Lage der Mutationen im Protein	105
3.3.7	Charakterisierung der isolierten Varianten	106
3.3.7.1	Untersuchungen zur Thermostabilität der Varianten	106
3.3.7.1.1	DSC-Messungen	106
3.3.7.1.2	Kinetik der thermischen Inaktivierung	108
3.3.7.2	Cyclisierungsaktivität der Varianten (β -CD Produktion)	110
3.3.7.3	Expressionslevel in der Zelle – Western Blot Analysen	111
3.3.8	Zusammenfassung und Diskussion zur thermischen Stabilisierung der CGTase	113
4	Abschließende Diskussion	116
5	Literatur:	124
6	Anhang	139
6.1	Abkürzungsverzeichnis	139
6.1.1	Allgemeine Abkürzungen	139
6.2	Aminosäuresequenz-Alignment der CGTase mit MaxHom	143
6.3	Modellierung der CGTase-Struktur mit Swiss-Model	147
6.4	Proteinchemische Eigenschaften der CGTase-Varianten	152
6.5	Kalibrierungskurve für den Phenolphthalein- β -CD-Komplex	152
7	Kurzzusammenfassung	153

Inhaltsverzeichnis

8	Abstract	155
9	Lebenslauf	159

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Modellierter Struktur der CGTase aus <i>A. gottschalkii</i> (Programm SwissModel, Peitsch, 1995; 1996; Guex & Peitsch, 1997).	2
Abbildung 1.2: Reaktionsmechanismus von CGTasen (nach Uitdehaag <i>et al.</i> , 1999)	3
Abbildung 1.3: Katalysierte Reaktionen der CGTase (nach van der Veen <i>et al.</i> , 2000c)	4
Abbildung 1.4: Strukturen von α -, β - und γ -Cyclodextrinen aus Larsen (2002).	6
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des pET24a-Vektors	16
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des pET28a-Vektors	17
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des pUC19-Vektors	18
Abbildung 3.1: Übersicht über Reinigung I der CGTase mit N-terminalem His-Tag.	75
Abbildung 3.2: A: Modellierter Struktur der CGTase aus <i>A. gottschalkii</i> (Programm SwissModel, Peitsch, 1995; 1996; Guex & Peitsch, 1997).	76
Abbildung 3.3: Übersicht über die Reinigung II der CGTase mit N-terminalem His-Tag.	77
Abbildung 3.4: Übersicht über die Reinigung III der CGTase mit N-terminalem His-Tag.	79
Abbildung 3.5: Übersicht über die Reinigung der CGTase ohne His-Tag.	80
Abbildung 3.6: Analytische Gelfiltration der CGTase mit und ohne β -CD	83
Abbildung 3.7: Fern-UV (A) und Nah-UV (B) CD-Spektren der CGTase.	84
Abbildung 3.8: Fluoreszenzemissionsspektren der CGTase	85
Abbildung 3.9: Die CGTase aus <i>A. gottschalkii</i> wird durch Ca^{2+} -Ionen gegen thermische Denaturierung stabilisiert.	87
Abbildung 3.10: Thermische Inaktivierung bei 70 °C der wildtypischen CGTase.	89

- Abbildung 3.11: Thermische Inaktivierung bei 62 °C (grau) und 65 °C (schwarz) der wildtypischen CGTase. 90
- Abbildung 3.12: β -CD Produktion der CGTase in Abhängigkeit der Temperatur (A) und des pH-Wertes (B). 91
- Abbildung 3.13: CD-Produktion und Stärkeabbau durch 0,01 mg/ml (A) und 0,02 mg/ml (B) CGTase 93
- Abbildung 3.14: CD-Produktion und Stärkeabbau mit 5 % (A) und 20 % (B) Paselli SA2-Stärke als Substrat. 94
- Abbildung 3.15: CD-Produktion und Stärkeabbau bei 50 °C (A), 60 °C (B), 65 °C (C). 95
- Abbildung 3.16: CD-Produktion bei 50 °C (A) bzw. 70 °C (B). 96
- Abbildung 3.17: CD-Produktion und Stärkeabbau bei pH 7,0 (A), 8,5 (B) und 9,5 (C). 96
- Abbildung 3.18: Einführung einer *EcoRI*-Schnittstelle in die Mitte des *cgtase*-Gens 99
- Abbildung 3.19: Screening-Verfahren zur Isolierung von thermisch stabilisierten Varianten. 104
- Abbildung 3.20: Die durch Screening isolierten CGTase Varianten sind thermolabiler als das wildtypische Enzym, werden aber ebenso wie dieses durch Ca^{2+} -Ionen stabilisiert. 107
- Abbildung 3.21: Thermische Inaktivierung bei 70 °C der durch Screening isolierten CGTasen und des wildtypischen Enzyms. 109
- Abbildung 3.22: β -CD-Produktion der durch Screening isolierten CGTase Varianten und des wildtypischen Enzyms. Dargestellt sind der zeitliche Verlauf der β -CD-Produktion aus 0,5 % Stärke durch die wildtypische CGTase (A) und Hof1 (B), sowie die nach ca. 60 min ermittelte Konzentration an β -CD für alle Varianten mit 0,5 % (C) bzw. 5 % (D) Stärke als Substrat. 111
- Abbildung 3.23: SDS-PAGE (12,5% Acrylamid; A) und Western-Blot (B) der gereinigten CGTase Varianten (1: Hof1, 5: Hof5, 6: Hof6) und der wildtypischen CGTase (W). 113

Abbildung 6.1: Kalibrierungskurve für die Konzentrationsbestimmung von β -CD mit Hilfe von Phenolphthalein für die diskontinuierliche Messung der Cyclisierungs-aktivität (2.5.11.1). 152

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Eigenschaften von α -, β - und γ -Cyclodextrinen (aus Brewster & Loftsson, 2002)	8
Tabelle 2.1:	Der SmartLadder DNA Standard	19
Tabelle 2.2:	Der <i>Low Molecular Weight</i> -Längenstandard	20
Tabelle 2.3:	<i>RainbowTM coloured protein molecular weight markers, high molecular weight range</i>	20
Tabelle 2.4:	Getestete Reaktionsbedingungen bei der <i>Error Prone</i> PCR46	
Tabelle 2.5:	Methode zur Reinigung von Proteinen mit der MonoQ Säule (SV: 20 ml)	49
Tabelle 2.6:	Methode zur Reinigung von Proteinen mit der Nickel-Chelat Säule (SV: 7,854 ml)	50
Tabelle 2.7:	Methode zur Reinigung von Proteinen mit der α -CD Säule (SV: 13,069 ml)	51
Tabelle 2.8:	Methode zur Reinigung von Proteinen mit der Hydroxylapatit-Säule (SV: 37,165 ml)	52
Tabelle 2.9:	Zusammensetzung eines SDS-Polyacryamidgels.	56
Tabelle 2.10:	Zusammensetzung eines nativen Polyacrylamidgels.	57
Tabelle 3.1:	Natur und Lokalisation der Aminosäureaustausche der durch Screening aus der 5'-Bank isolierten CGTase Varianten.	105
Tabelle 3.2:	Die mittels DSC ermittelten T_m -Werte der durch Screening isolierten CGTase Varianten.	107
Tabelle 6.1:	Proteinchemische Eigenschaften der wildtypischen CGTase und ihrer Varianten.	152

Formelverzeichnis

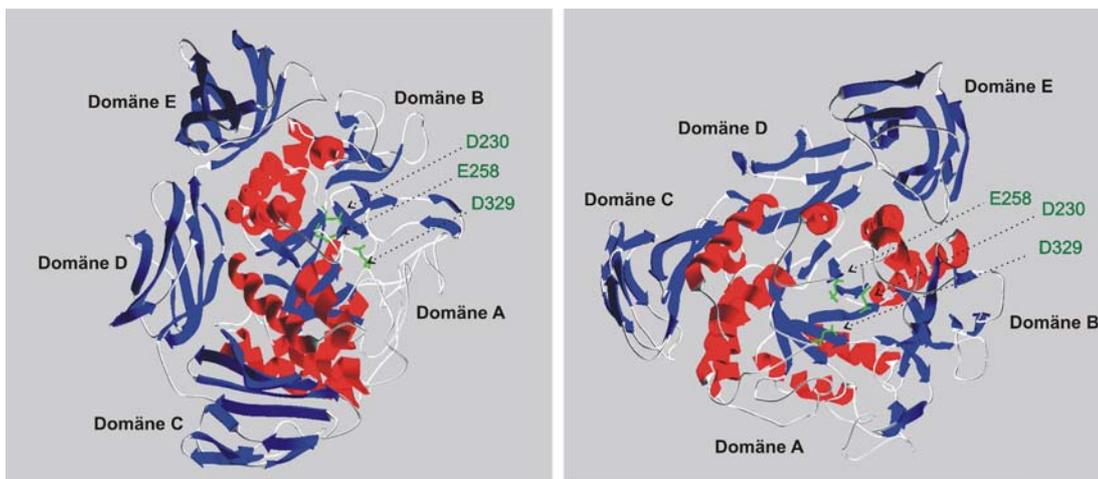
Gleichung 1:	Berechnung der Transformationseffizienz von <i>E. coli</i> -Zellen	37
Gleichung 2:	Bestimmung der DNA-Konzentration anhand der Absorption bei 260 nm	39
Gleichung 3:	Berechnung der Schmelztemperatur eines Primers.	43
Gleichung 4:	Berechnung der <i>Annealing</i> -Temperatur in einer PCR-Reaktion.	43
Gleichung 5:	Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten eines Proteins aus der Aminosäuresequenz (Pace <i>et al.</i> , 1995)	55
Gleichung 6:	Das Lambert-Beer'sche Gesetz	55
Gleichung 7:	Berechnung der durchschnittlichen Elliptizität pro Aminosäure aus fern-UV CD-Spektren	63
Schema 1:	Cyclodextrin-Komplexbildung	7
Schema 2:	Mechanismus der irreversiblen thermischen Inaktivierung von Proteinen nach Tomazic und Klivanov (1988)	70

1 Einleitung

1.1 Das Enzym Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase): Herkunft, Aufbau und Reaktionsmechanismus

Kohlenhydrate erfüllen in der Zelle wichtige Funktionen als Strukturgeber, Energiespeicher und in der Signalweitergabe. Diese enorme Vielfalt wird von einer großen Anzahl an Enzymen gewährleistet, die Mono-, Di- und Polysaccharide auf-, ab- und umbauen. Glycosyl-Transfer-Reaktionen spielen hierbei eine wichtige Rolle. Durch eine nukleophile Substitution am Kohlenstoff des anomeren Zentrums des Zuckers findet die Reaktion entweder unter Beibehaltung (*retention*) oder unter Umkehrung (*inversion*) der Konfiguration statt (Sinnott, 1990). Daraus resultiert die Einteilung der verantwortlichen Enzyme in *retaining* und *inverting enzymes*. Das *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB; <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcfn>, 1984) gliedert Enzyme aufgrund ihres Reaktionstyps und der Substratspezifität. Glycosyl-Transferasen (GT; EC 2.4.x.y.) katalysieren den Transfer von Zuckergruppen von aktivierten Donormolekülen auf spezifische Akzeptormoleküle, die selbst keine Kohlenhydrate sein müssen, unter Bildung einer glykosidischen Bindung. Im Gegensatz dazu katalysieren Glycosyl-Hydrolasen (GH; EC 3.2.1.x) die Spaltung von glykosidischen Bindungen (Campbell *et al.*, 1997), welche eine allgemeine Säure-katalysierte Reaktion darstellt. An dieser Reaktion sind entweder zwei oder drei Aminosäuren beteiligt. Die Reaktion schließt mit der invertierten (axial → äquatorial oder äquatorial → axial) oder beibehaltenen (axial → axial oder äquatorial → äquatorial) Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms des hydrolysierten Zuckers ab (Sinnott, 1990). Eine sequenzbasierte (z.T. auch strukturelle) Unterteilung der Enzyme wurde Anfang der 90er Jahre von Henrissat *et al.* (1991; 1993) eingeführt und eine aktuelle Übersicht findet sich auf dem *Carbohydrate-Active Enzymes Server* (CAZy; <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>). Im letzten Jahr konnten 87 GH- und 56 GT-Familien unterschieden werden, deren Mitglieder eine hohe Sequenzähnlichkeit und die gleiche dreidimensionale Struktur aufweisen, sich jedoch in ihren Substratspezifitäten und Reaktionsmechanismen unterscheiden können (Davies & Henrissat, 2002).

Cyclodextrin Glycosyltransferasen bzw. Glucanotransferasen (CGTasen) gehören laut CAZy zur GH-Familie der α -Amylasen (GH 13), zu denen sie eine hohe Sequenz- und Strukturähnlichkeit aufweisen. Im Vergleich zu α -Amylasen weisen CGTasen jedoch zwei zusätzliche Domänen auf (siehe unten). Phylogenetische Studien zeigten, dass α -Amylasen eine größere Verbreitung in Prokaryoten, Eukaryoten und Archaeen und eine größere Diversifikation der Sequenz aufweisen als CGTasen. Trotzdem besitzen CGTasen aufgrund eines formal anderen Reaktionsmechanismus eine andere EC-Nummer als α -Amylasen. CGTasen werden den Transferasen (EC 2.4.1.x) zugeordnet, α -Amylasen gehören zu den Hydrolasen (EC 3.2.1.x; del-Rio *et al.*, 1997). Die EC Nummer für CGTasen lautet 2.4.1.19, die für α -Amylasen 3.2.1.1 (MacGregor *et al.*, 2001).



A

B

Abbildung 1.1: Modellierte Struktur der CGTase aus *A. gottschalkii* (Programm SwissModel, Peitsch, 1995; 1996; Guex & Peitsch, 1997).

A: Seitenansicht des $(\beta/\alpha)_8$ -Barrels (Domäne A).

B: Aufsicht auf das $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel.

Die mutmaßlichen katalytisch essentiellen Aminosäuren sind grün markiert.

CGTasen sind ca. 75 kDa große Proteine (Abbildung 1.1), die aus 5 Domänen (A-E) bestehen (Klein & Schulz, 1991; MacGregor *et al.*, 2001; Janeček *et al.*, 2003). In α -Amylasen findet man nur die Domänen A-C, während D und E fehlen. Domäne A besitzt die $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel-Faltung (Wierenga, 2001), in die Domäne B zwischen β -Strang 3 und α -Helix 3 inseriert ist. Domäne B besteht aus zwei antiparallelen β -Faltblättern und einer α -Helix und beherbergt zusammen mit dem $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel das aktive Zentrum der CGTasen. Die Variation der Enzymspezifität innerhalb der GH

13 Familie (α -Amylase, CGTase, Maltotetrahydrolase, Glucan Branching Enzym, Glucan Debranching Enzym u.a.) beruht wahrscheinlich auf der divergenten Evolution der Sekundärstruktur der Domäne B (Janeček *et al.*, 1997; MacGregor *et al.*, 2001). Die Domänen C, D und E bestehen jeweils aus mehreren β -Strängen, wobei Domäne C dem Faltungstyp β -Sandwich mit einem *Greek keys Motiv* entspricht und Domäne D ein Immunglobulin-Faltungsmuster aufweist (Klein & Schulz, 1991; Jespersen *et al.*, 1991). Die Domänen C und E enthalten außerdem *raw starch binding domains (SBD)*, auch *maltose binding sites (MBS)* genannt, und sind somit für die Substratbindung verantwortlich (Penninga *et al.*, 1996). Die Funktion der Domäne D ist unbekannt (Jespersen *et al.*, 1991; Janeček *et al.*, 2003).

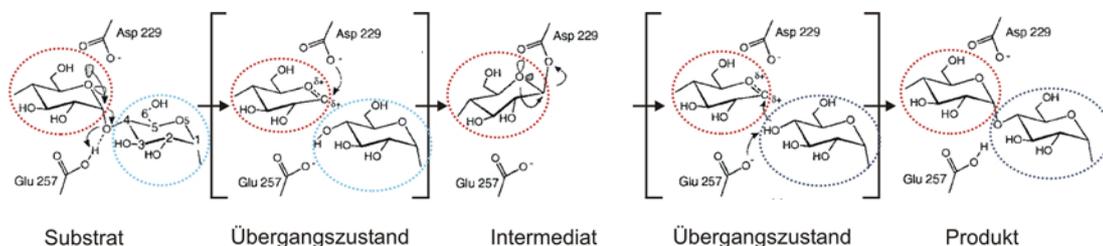


Abbildung 1.2: Reaktionsmechanismus von CGTasen (nach Uitdehaag *et al.*, 1999)

Die Nummerierung der katalytisch wirksamen Glutamat- und Aspartatreste bezieht sich auf das Enzym von *Bacillus circulans* strain 251. Rot eingerahmt: Donorgruppe; hellblau eingerahmt: Abgangsgruppe; dunkelblau eingerahmt: Akzeptorgruppe.

Enzyme der GH 13 Familie, also auch CGTasen und α -Amylasen, hydrolysieren glycosidische Bindungen über den α -*retaining* Mechanismus (axial \rightarrow axial), der in einem zweistufigen Prozess verläuft (*double displacement process*, Abbildung 1.2). Im Falle der CGTase wird im ersten Schritt die $\alpha(1-4)$ -glycosidische Bindung im Substrat Stärke gespalten. Es entsteht ein Intermediat mit einer kovalenten $\beta(1-4)$ -Verknüpfung zwischen Enzym und dem C1-Atom des Zuckers (Mosi *et al.*, 1997), und die Abgangsgruppe verlässt das aktive Zentrum. Im zweiten Schritt wird die Bindung zwischen Enzym und Intermediat wieder gespalten und eine $\alpha(1-4)$ -glycosidische Bindung zu einem Akzeptormolekül geknüpft (Uitdehaag *et al.*, 1999). In beiden Schritten kommt ein Oxocarbenium-Übergangszustand vor, in dem der aktivierte Zucker planar und positiv geladen ist (Tanaka *et al.*, 1994). Als Akzeptor kann ein Wassermolekül (Hydrolyse; α -Amylase-Reaktion) oder eine Hydroxylgruppe am C4-Atom eines weiteren Zuckers dienen (Disproportionierung; Abbildung 1.3). Nur bei CGTasen kann dies

zusätzlich das nicht-reduzierende Ende des Intermediates selbst sein, so dass ein Ringschluss der Zuckerkette erfolgt und ein Cyclodextrin (CD) gebildet wird (Cyclisierung). Die Spaltung von Cyclodextrinen und deren Transfer zu einem linearen Akzeptorsubstrat durch CGTasen nennt man Coupling (van der Veen *et al.*, 2000c).

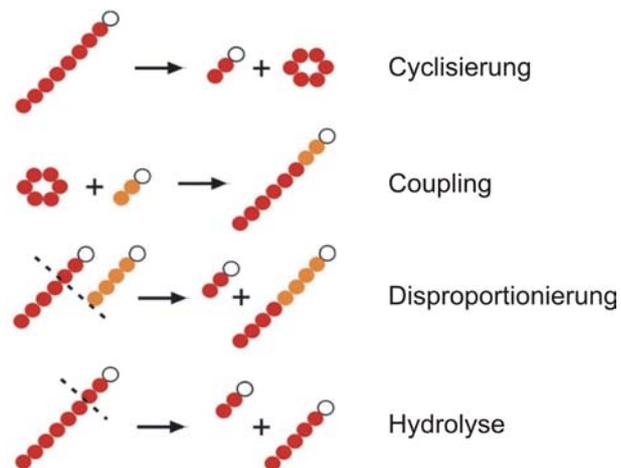


Abbildung 1.3: Katalysierte Reaktionen der CGTase (nach van der Veen *et al.*, 2000c)

Die Monosaccharideinheiten sind als Kreise dargestellt, wobei die Einheit mit dem reduzierenden Ende weiß markiert ist.

Aufgrund von Sequenzvergleichen und Mutationsanalysen können aktive Reste, die an diesem Mechanismus beteiligt sind, vorhergesagt werden (Henrissat, 1991; Henrissat & Bairoch, 1993). Im Falle von Enzymen der GH 13 Familie sind dies drei saure katalytische Reste, die am C-Terminus von β -4, β -5 und β -7 des $(\beta/\alpha)_8$ -Barrels (Domäne A) lokalisiert sind (Nagano *et al.*, 2001).

Der katalytische Rest in β -5 ist ein Glutamat (Glu) und fungiert als allgemeine Säure, die im ersten Schritt das glycosidische Sauerstoffatom protoniert. Im zweiten Schritt deprotoniert das gleiche Glutamat die angreifende OH-Gruppe. Als Nukleophil dient das Aspartat (Asp) in β -4, welches das partiell positiv geladene C1-Atom angreift und durch eine kovalente Verknüpfung mit ihm das Intermediat bildet (Uitdehaag *et al.*, 1999; Abbildung 1.2). Der dritte saure Rest (Asp in β -7) stabilisiert die Bindung des Substrates. CGTasen besitzen mehrere Glucose-Bindestellen zur Komplexierung einer Amylosekette im aktiven Zentrum, wobei die Bindestellen vor und nach der gespaltenen $\alpha(1-4)$ -glycosidischen Bindung -1 und +1 benannt werden, d.h. die Donorbindestellen erhalten negative und die Akzeptorbindestellen positive Ziffern (van der Veen *et al.*, 2000a). Die Länge der gebundenen

Amylosekette kann variieren. Glucoseketten aus neun Molekülen werden von den Bindestellen -7 bis $+2$ gebunden, so dass bei einer Zyklisierung ein β -CD aus sieben Glucosemolekülen entsteht. Die anderen beiden Haupttypen von Cyclodextrinen enthalten sechs (α -CD) bzw. acht (γ -CD) Glucoseeinheiten. Die Glucosemoleküle bilden Wasserstoffbrücken zu Aminosäuren der Bindestellen aus, die nur teilweise konserviert sind und nur bedingt zur Produktspezifität der CGTasen beitragen (van der Veen *et al.*, 2000b).

Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen α -Amylasen und CGTasen (Janeček *et al.*, 1995) finden sich auch in Sequenzalignments (Binder *et al.*, 1986), die Ende der 80er Jahre von MacGregor & Svensson (1989) für Sekundärstruktur-Vorhersagen verwendet wurden. Schon damals ließen sich vier konservierte Regionen in der Nähe des aktiven Zentrums von α -Amylasen und CGTasen detektieren, die durch Strukturanalysen (Klein & Schulz, 1991) und weitere Sequenzvergleiche (Jespersen *et al.*, 1993; Svensson, 1994; Nielsen & Borchert, 2000) bestätigt wurden. Die vier konservierten Regionen (I bis IV) beinhalten die sauren aktiven Reste und eine Calcium-Bindestelle. In Region I liegen die konservierten Aminosäuren der Calcium-Bindestelle I. Die Regionen II, III und IV sind am C-terminalen Ende des $(\beta/\alpha)_8$ -Barrels lokalisiert, wobei Region II zur Calcium-Bindestelle I beiträgt und auch bei der Substratbindung eine Rolle spielt. In Region III befindet sich das katalytische Glutamat und in Region IV liegt das ebenfalls an der Substratbindung beteiligte Aspartat aus $\beta 7$. CGTasen besitzen eine zweite Calcium-Bindestelle, die in α -Amylasen nicht vorkommt (Klein & Schulz, 1991) und außerhalb der Regionen I-IV lokalisiert ist.

1.2 Eigenschaften von Cyclodextrinen

Cyclodextrine, die Hauptprodukte der CGTasen, sind zyklische α -1,4-glykosidisch verbundene Oligosaccharide, bestehend aus α -D-Glucopyranose-Molekülen mit einer 4C_1 -Sesselkonformation, die einem abgeschnittenen Konus ähneln (Loftsson & Brewster, 1996; Bender, 1986). Die (O(6)-H)-Hydroxylgruppen der Glucosemoleküle zeigen hierbei zum schmalen Ende des Konus, während die (O(2)-H)- und (O(3)-H)-Hydroxylgruppen zur breiteren Seite hin orientiert sind (Abbildung 1.4). Die Wasserstoffatome der C-H-Gruppen und die Sauerstoffatome des Pyranoserings und der glycosidischen Bindung (O(4); O(5)) zeigen ins Innere

des Konus. Es kommt zur Ausbildung einer hydrophoben Innenseite und einer hydrophilen Außenseite, so dass Cyclodextrine wasserlösliche Moleküle darstellen, die kleinere hydrophobe Moleküle (Gastmoleküle) in ihrem Inneren beherbergen können. Weiterhin werden zwischen den Hydroxylgruppen benachbarter Glucosemoleküle Wasserstoffbrücken (O(3)-H...O(2)-H oder O(3)-...H-O(2)) ausgebildet, die zur Rigidität des Cyclodextrinmoleküls beitragen.

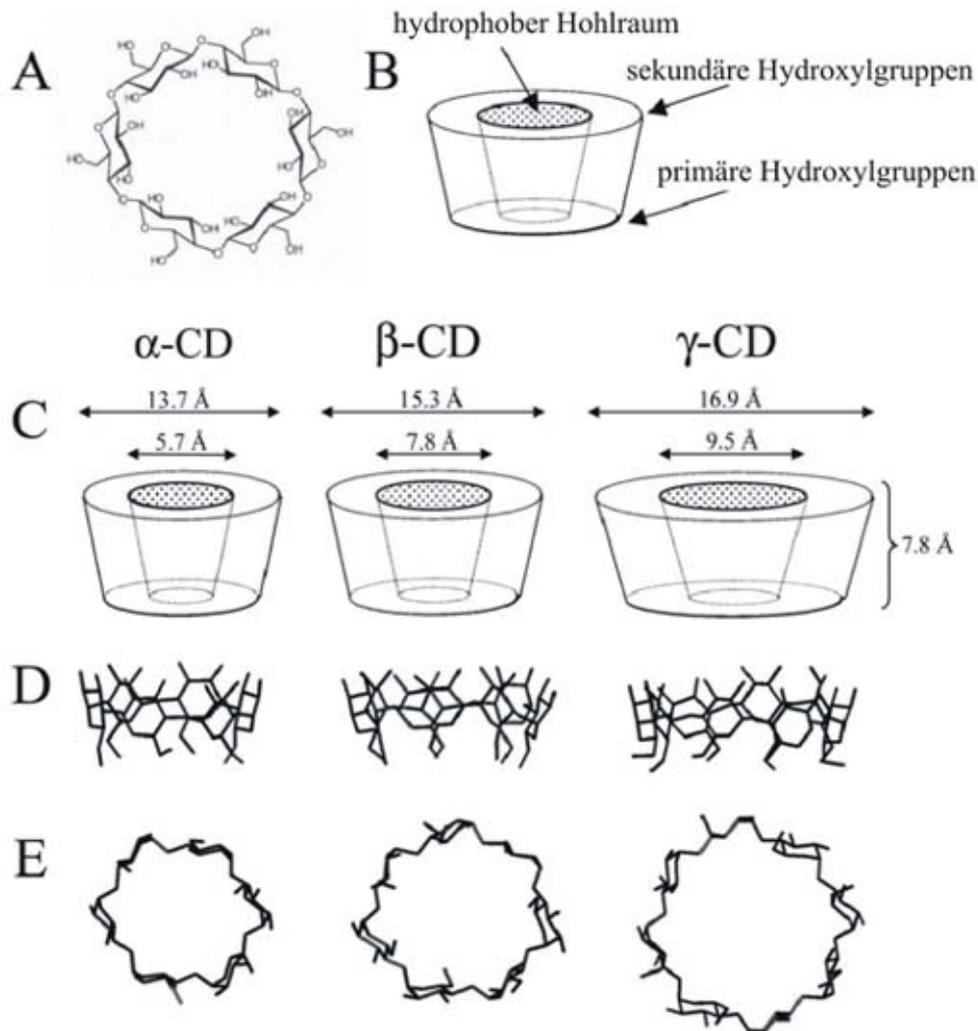


Abbildung 1.4: Strukturen von α -, β - und γ -Cyclodextrinen aus Larsen (2002).

A: Schematische Darstellung von α -Cyclodextrin (Aufsicht auf den Hohlraum von der breiten Seite des Kegels; vgl. B).

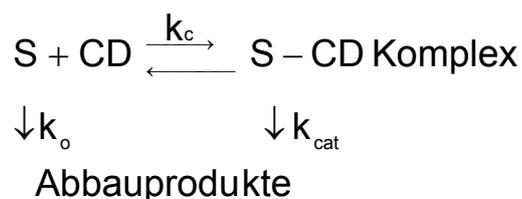
B: Graphische Illustration eines Cyclodextrins (Seitenansicht). Ein hohler, abgeschnittener Kegel als Cyclodextrin, dessen Hydroxylgruppen der C6-Atome die schmale Seite krönen, während die Hydroxylgruppen an den C2- und C3-Atomen auf der breiten Seite liegen.

C: Ungefähre molekulare Dimensionen der α -, β - und γ -Cyclodextrine.

D: Seitenansicht der α -, β - und γ -Cyclodextrine.

E: α -, β - und γ -Cyclodextrine in der Aufsicht auf die breite Seite des Kegels (entsprechend A). Die Figuren wurden mit dem Programm MOLMOL erstellt.

Die wasserlöslichen Komplexe aus Cyclodextrinen (Wirt) und Gastmolekülen werden ohne kovalente Bindungen gebildet, so dass ein dynamisches Gleichgewicht zwischen freien (Gast/Wirt-) Molekülen und dem Komplex vorliegt (Schema 1). Die Stabilität der Komplexe, quantifiziert über die Assoziationskonstante K_c , ist u. a. abhängig von van der Waals und hydrophoben Wechselwirkungen, sowie vom Lösungsmittel. Durch die Komplexbildung können Eigenschaften der Gastmoleküle verändert werden, z.B. kann die Wasserlöslichkeit und die Stabilität erhöht werden. Die Gastmoleküle können im Komplex vor dem Abbau geschützt werden, in dem labile funktionelle Gruppen im Inneren der Cyclodextrine vor Hydrolyse, Oxidation, Isomerisierung und anderen chemischen Veränderungen abgeschirmt werden. Durch die Komplexbildung kann aber auch ein Abbau beschleunigt werden, wenn enzymatische Katalyse durch die Cyclodextrine ermöglicht wird (Bender, 1986).



S: freies Gastmolekül

CD: freies Cyclodextrinmolekül

S-CD: Gast-Cyclodextrin 1:1 Komplex

k_c : Assoziationskonstante für die Bildung des Komplexes

k_o : Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung des Abbaus des freien Gastmoleküls

k_{cat} : Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung des Abbaus des komplexierten Gastmoleküls

Schema 1: Cyclodextrin-Komplexbildung

Je nach Anzahl an Glucosemolekülen in den Cyclodextrinen lassen sich unterschiedlich große Gastmoleküle einschließen. Am häufigsten kommen α -, β - und γ -CD vor, die sechs, sieben bzw. acht Glucose-Moleküle enthalten (Tabelle 1.1). Cyclodextrine mit weniger als sechs Glucose-Moleküle können aufgrund sterischer Faktoren nicht gebildet werden. Jedoch kommen auch Cyclodextrine mit bis zu 60 Glucosemolekülen vor (Terada *et al.*, 1997; Koizumi *et al.*, 1999).

Tabelle 1.1: Eigenschaften von α -, β - und γ -Cyclodextrinen (aus Brewster & Loftsson, 2002)

Eigenschaften	α -CD	β -CD	γ -CD
Anzahl der Glucoseeinheiten	6	7	8
M_R (g/mol)	972	1135	1297
Hohlraum-Durchmesser (Å)	5	6,2	7,9
Hohlraum-Volumen (Å ³)	176	346	510
Höhe (Å)	7,9	7,9	7,9
Wasserlöslichkeit (% w/v) bei 25 °C	14,5	1,85	23,2
H ₂ O-Molekül pro Hohlraum	6	11	17
pK _A bei 25 °C	12,33	12,20	12,08

M_R : relatives Molekulargewicht

β -CD zeigt mit 1,85 % (w/v) eine vergleichsweise geringe Wasserlöslichkeit bei 25 °C gegenüber α - und γ -CD mit 14,5 und 23,2 % (w/v). Dies beruht wahrscheinlich auf der optimalen Verteilung der sekundären Hydroxylgruppen in β -CD, die durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen eine Hydratisierung verhindern (Brewster & Loftsson, 2002). Für einige industrielle Anwendungen wurden β -Cyclodextrin-Derivate mit erhöhter Löslichkeit synthetisiert, u.a. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) und Sulfobutylether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD). Dabei wurden die Hydroxylgruppen der Cyclodextrine alkyliert oder hydroxyalkyliert, so dass anstelle der kristallinen Struktur eine amorphe Mischung aus Isomeren verschiedener Alkylierungsgrade entstand, was im Falle von HP β CD eine Löslichkeit von bis zu 60 % (w/v) bewirkt (Loftsson & Brewster, 1996).

1.3 Industrielle Anwendungen von Cyclodextrinen

Die Komplexierung von Gastmolekülen ist der Grund für die vielfältigen industriellen Anwendungen von Cyclodextrinen, z.B. in der pharmazeutischen, Nahrungsmittel-, Textil-, Kosmetik-, Waschmittel- und landwirtschaftlichen Industrie (Krulwich & Guffanti, 1989; Horikoshi, 1996). Toxizitätsanalysen zeigten, dass β -CD bedenkenlos eingesetzt werden kann (Buschmann *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang ist β -CD auf die *Generally Regarded as Safe (GRAS) List* der *US Food and Drug*

Administration (FDA) gesetzt worden (Szejtli, 1996) und ist auch in Deutschland seit dem 13. November 2000 als Nahrungsergänzungsmittel (E459) zugelassen (Bürgerliches Gesetzbuch).

1.3.1 Pharmazeutische Anwendung

Das Problem bei vielen Medikamenten ist deren Applikation und Transport zum Wirkungsort im menschlichen Körper, wobei besonders die Blut-Hirn-Schranke eine nur schwer zu überwindende Barriere darstellt. Medikamente, die im Gehirn wirken sollen, werden deshalb oft als *chemical delivery system* (CDS) durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert, wobei das pharmakologisch aktive Agenz kovalent mit einem lipophilen Carrier verbunden ist. Der hydrophobe Charakter des CDS, sowie dessen oxidative und hydrolytische Instabilität erleichtern die Abdissoziation des Agenz im Gehirn, erniedrigen gleichzeitig jedoch die Wasserlöslichkeit und Halbwertszeit des CDS auf dem Weg vom Applikationsort zur Blut-Hirn-Schranke. Die Komplexierung des CDS mit Cyclodextrinen (HP β CD; SBE- β -CD) erhöht die Wasserlöslichkeit und Stabilität. Zum Beispiel wird Estradiol (E2) bei Alzheimer, Schlaganfall und Fettleibigkeit eingesetzt und gelangt als Konjugat mit dem CDS 1-Methyl-1,4-dihydrionicotinate über die Blut-Hirn-Schranke. Das wasserunlösliche CDS wurde bisher in DMSO gelöst, konnte so aber nicht in der gewünschten Dosierung eingesetzt werden. In Anwesenheit von 43 % (w/v) HP β CD erhöht sich die Wasserlöslichkeit von 62 ng/ml auf 21 mg/ml und gleichzeitig erniedrigt sich die Oxidierungsrate schon in Anwesenheit von 5 % (w/v) HP β CD um 90 % (Brewster & Loftsson, 2002). Untersuchungen mit Azidothymidin (AZT, oder Zidovudin), das gegen die AIDS Enzephalopathie eingesetzt wird, zeigen ebenfalls eine stark verbesserte Löslichkeit von AZT-CDS durch HP β CD (Brewster & Loftsson, 2002). Weitere Beispiele für die Stabilisierung und Erhöhung der Wasserlöslichkeit von Medikamenten durch Cyclodextrine sind Daunorubicin, Doxorubicin und Mitomycin C, die in der Chemotherapie zur Bekämpfung von Tumoren eingesetzt werden (Bekers *et al.*, 1990; 1991).

Ende 2002 berichtete Sparr über den Einsatz von Cyclodextrinen zur Komplexierung von Relaxantien, die für die Muskelentspannung während einer Operation eingesetzt werden. Demnach verlieren die Relaxantien nach der Operation durch die Komplexierung mit Cyclodextrinen schneller ihre Wirkung, so dass sich die Erholung der erschlafften Muskulatur nach größeren Operationen beschleunigt (Sparr, 2002).

1.3.2 Anwendungen in der Nahrungsmittelindustrie

Die Wacker-Chemie GmbH produziert und vermarktet Cyclodextrine, Cyclodextrin-Derivate und Cyclodextrin-Komplexe, die nicht nur in der Nahrungsmittelindustrie sondern auch in der Kosmetik und Körperpflege eingesetzt werden. Cyclodextrine werden auch zur Maskierung von unerwünschten Geschmacksbestandteilen in Nutraceutical-Produkten eingesetzt. Weiterhin bietet Wacker durch Cyclodextrine stabilisierte Marineöle unter dem Namen OmegaDry® an (<http://www.wacker.com>).

1.3.3 Anwendungen in der Textil- und Waschmittelindustrie

Die Firma Procter & Gamble entwickelte Mitte der 90er Jahre Febreze®, das seit 1998 in den USA und seit Juli 1999 in Deutschland auf dem Markt ist. Febreze® ist ein Textilerfrischer, der auf einer Cyclodextrin-Lösung basierend durch Aufsprühen Gerüche entfernt. Die für den Geruch verantwortlichen Moleküle verlieren durch die Komplexierung mit Cyclodextrinen ihre Duftnote. „Febreze enthält viele geruchsaflösende Wirkstoffe aus natürlichen Rohstoffen wie Glukosebausteine aus Maisstärke“ (<http://www.febreze.de>). Procter & Gamble werben damit, dass Febreze® auch gesundheitlich sicher für Mensch und Tier sei.

Auch die kovalente Fixierung von Cyclodextrinen über einen Linker an Baumwollfasern von Kleidung, Gardinen und Bettwäsche wird z.T. schon durchgeführt (Buschmann *et al.*, 2001; Buschmann, 2002). Ziel ist die reversible Komplexierung von Geruchsstoffen (Aromastoffe, Parfum oder Schweiß) und damit das lange geruchsfreie T-Shirt oder die Verbreitung von angenehmen bzw. gesundheitsfördernden Gerüchen im Büro bzw. Schlafzimmer. Vermarktet werden Cyclodextrin-verbundene Textilien schon in Form von duftenden Teddybären von der Firma Bärenwelt aus Moers.

1.4 Herstellung von Cyclodextrinen

Cyclodextrine werden enzymatisch durch CGTasen aus dem Substrat Stärke synthetisiert. Es gibt zwei industrielle Verfahren zur Herstellung von Cyclodextrinen (Hedges, 1992; Biber *et al.*, 2002). Bei den *Solvent*-Prozessen werden organische Komplexierungsmittel eingesetzt, die das Produktverhältnis zwischen α -, β - und γ -CD so verschieben, dass nur ein Cyclodextrintyp gebildet wird. Der Nachteil der Solvent-Prozesse liegt in der teuren und umweltbelastenden Aufreinigung der Cyclodextrine nach der

Produktion aufgrund der organischen Komplettierungsmittel. Bei den *Non-Solvent* Prozessen werden keine Komplettierungsmittel zugegeben, dafür werden die Cyclodextrine in den Verhältnissen produziert, die charakteristisch für die verwendete CGTase und abhängig von den Reaktionsbedingungen sind. Die Cyclodextrin-Herstellung beginnt mit der Verflüssigung des Substrates Stärke (20-30 % (w/v)) mit Hilfe von α -Amylase, Säuren (z.B. HCl) oder durch mechanische Zersetzung bei hohen Temperaturen. Eine häufig angewendete Kombination ist das *jet-cooking*: Erhitzen der Reaktionslösung auf 105-110 °C für 5 min, Abkühlung auf 95 °C für 90 min, Inaktivierung der α -Amylase durch Erhitzen und/oder Überdruck. In einigen Fällen werden auch schon thermostabile CGTasen zur Stärkeverflüssigung eingesetzt (Biber *et al.*, 2002). Für die enzymatische Reaktion mit CGTasen muss die Reaktionslösung nach dem *jet-cooking* auf eine Temperatur zwischen 20 und 75 °C abgekühlt werden. Nach der Produktion werden die Cyclodextrine mit verschiedenen Verfahren aufgereinigt. Um die Herstellung von Cyclodextrinen zu vereinfachen und kostengünstiger zu gestalten, werden CGTasen benötigt, die thermostabil sind (Niehaus *et al.*, 1999; Horikoshi, 1996) und möglichst nur eine Sorte von Cyclodextrinen produzieren. Thermostabile CGTasen können entweder aus „heißen“ Biotopen gewonnen oder mittels Proteindesign hergestellt werden. Natürlich vorkommende CGTasen aus halophilen und mesophilen Organismen besitzen die niedrigsten Temperaturoptima von 50-60 °C (Abelyan *et al.*, 2002). CGTasen aus thermophilen und alkaliphilen Organismen hingegen besitzen ein Temperaturoptimum zwischen 60 °C und 65 °C. Das höchste Temperaturoptimum von 75 °C wurde für die CGTasen aus den alkaliphilen Organismen *Bacillus alcalophilus* B-3101 und *Thermoactinomyces vulgaris* Tac-5354 gefunden (Abelyan *et al.*, 2002).

1.5 Methoden der Thermostabilisierung von Proteinen

Die Thermostabilität von monomeren Proteinen beruht auf dem Zusammenwirken mehrerer stabilisierender Effekte, wie z.B. optimierte Abschirmung von hydrophoben Proteinbereichen vom hydrophilen Lösungsmittel, verbesserte Stabilität einzelner Sekundärstrukturelemente, eine erhöhte Anzahl an Wasserstoffbrücken und Salzbrücken (-Netzwerken), verkürzte Schleifen an der Proteinoberfläche und fixierte Enden der Peptidketten (Sterner & Liebl, 2001; Vielle & Zeikus, 2001). Eine Erhöhung der Hydrophobizität durch den Austausch von kleinen Aminosäuren durch

größere aromatische Reste im Proteininneren und die Verringerung von oxidierbaren Aminosäuren (z.B. Methionin und Cystein) an der Proteinoberfläche erhöhen ebenfalls die Thermostabilität von Proteinen (Xu *et al.*, 2003). Um Proteine zu stabilisieren, d.h. Verringerung von Denaturierung und/oder Degradierung der Proteine (Daniel & Cowan, 2000; Vielle & Zeikus, 2001), müssen die oben genannten stabilisierenden Effekte durch einzelne Aminosäureaustausche eingeführt werden. Da aber die strukturellen Grundlagen der erhöhten Thermostabilität von Proteinen aus hyperthermophilen gegenüber Proteinen aus mesophilen Organismen sehr vielschichtig sind, können diese anhand von Sequenz- und Strukturvergleichen nicht zuverlässig identifiziert werden (Lehmann *et al.*, 2000; Lo Leggio *et al.*, 1999; Haney *et al.*, 1999; Cambillau & Claverie, 2000; Suvd *et al.*, 2001). Der gezielte Austausch einzelner Aminosäuren durch rationales Design als Methode zur thermischen Stabilisierung von Proteinen war deshalb nur in wenigen Fällen erfolgreich (Declerck *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 1999; Shih & Kirsch, 1995). Hingegen konnten mehrfach Proteine durch gerichtete Evolution (*directed evolution*) thermisch stabilisiert werden (Arnold *et al.*, 1999; Uchiyama *et al.*, 2000).

Das Verfahren der gerichteten Evolution ist an die natürliche Evolution von Proteinen angelehnt, bei der durch zufällig auftretende Mutationen, deren Rekombination und anschließende Selektion nur solche Varianten bestehen, die dem Organismus einen Überlebensvorteil verschaffen. Im Labor wird durch Zufallsmutagenese (*Error Prone PCR* oder *DNA-shuffling*) eine große Anzahl an Genvarianten, die jeweils mehrere Mutationen tragen, hergestellt (Leung *et al.*, 1989; Stemmer, 1994a; 1994b). Aus derartigen Genbanken können Varianten mit gewünschten Eigenschaften durch *in vivo* Selektion isoliert werden (Hilvert *et al.*, 2002). Ist eine Selektion nicht möglich, müssen alle Varianten einzeln untersucht werden („Screening“; Daniel, 2002). Eine Begrenzung beider Auswahlverfahren liegt in der möglichen Anzahl untersuchter Varianten, die im Falle der Selektion - abhängig von der Ligations- und Transformationseffizienz der klonierten Varianten - zwischen 10^9 bis 10^{11} liegt. Das Screening-Verfahren ist arbeits- und zeitaufwändiger, weswegen je nach Grad der Automatisierung (*high-throughput Screening*) nur zwischen 10^4 bis 10^6 Varianten untersucht werden können (Zhao & Arnold, 1997). Insgesamt gilt, dass die Wahrscheinlichkeit zur Isolierung von Proteinen mit selten auftretenden Verbesserungen oder neuen Eigenschaften mit der Zahl der untersuchten Varianten ansteigt.

Die Stabilisierung eines Proteins um mehrere Grad Celcius ist oft vom Zusammenwirken mehrerer Mutationen abhängig (kumulativer Effekt; Declerck *et al.*, 2003), weshalb die Mutationen von gescreenten thermostabileren Varianten kombiniert bzw. mehrere aufbauende Mutagenese- und Screeningrunden durchgeführt werden (Zhao & Arnold, 1999; Arnold *et al.*, 1999; Lehmann & Wyss, 2001).

1.6 Die CGTase aus *Anaerobranca gottschalkii*

Anaerobranca gottschalkii sp. nov. LBS3 (DSMZ Stamm-Nummer 9380; Prowe, 1996; Prowe *et al.*, 1996; Prowe & Antranikian, 2001) ist ein gram-positives, sporenbildendes, anaerobes und thermoalkaliphiles Bakterium mit optimalem Wachstum bei 50 °C und pH 9.5. *A. gottschalkii* wurde Mitte der 90er Jahre aus einem *hot lake inlet* am See Bogoria in Kenia isoliert und gehört einer neuen Gruppe der gram-positiven Clostridium-Bacillus Gattung an. Um bei einem alkalischen pH und erhöhten Temperaturen wachsen zu können, nutzt *A. gottschalkii* die Substratphosphorylierung als Energiequelle. Das elektrochemische Potential der Cytoplasmamembran wird über eine Na⁺-ATPase aufgebaut. Die Aufnahme von Aminosäuren ist Na⁺-abhängig, so dass die Energietransduktion wiederum abhängig von einem Natrium-Zyklus ist. Die Verdopplungsrate beträgt unter optimalen Bedingungen 48 min. *A. gottschalkii* besitzt eine für gram-positive Bakterien untypisch dünne Zellwand und zeigt bei der Teilung eine besonders flache Struktur im Bereich der Zellteilung. Der Stamm wächst heterotroph auf einer Vielzahl von Mono- und Polysacchariden sowie auf komplexen Substraten (Hefeextrakt, Pepton, Trypton) und exprimiert die Gene der zuckerumwandelnden Proteine α -Amylase, CGTase und Pullulanase, die sekretiert werden, sowie das cytosolische Protein Debranching Enzym. In ersten Untersuchungen wurden die beiden sekretorischen Proteine CGTase und α -Amylase zunächst aus dem Kulturüberstand von *A. gottschalkii* gewonnen (Prowe, 1996). Die CGTase wurde über Anionen-Austauschchromatographie von der α -Amylase getrennt. Bei ersten Aktivitätsanalysen zeigte sich, dass die CGTase ein Temperaturoptimum von 65 °C aufweist.

1.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung und die thermische Stabilisierung der rekombinanten CGTase aus *A. gottschalkii*. Zu diesem Zweck sollte zunächst das *cgtase* Gen aus genomischer DNA isoliert und in *E. coli* heterolog exprimiert werden. Anschließend sollte die CGTase aus dem Zellextrakt des Wirtes gereinigt, sowie proteinchemisch und enzymologisch charakterisiert werden.

Dabei sollte vor allem geklärt werden (i) bei welcher Temperatur und nach welcher Inkubationszeit die CGTase thermisch denaturiert, (ii) unter welchen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Substratkonzentration) die CGTase optimale katalytische Aktivität zeigt, (iii) ob und durch welche Faktoren die CGTase extrinsisch stabilisiert wird und (iv) unter welchen Bedingungen sie welche Cyclodextrine vorwiegend produziert. Des Weiteren sollte ein Screening-Verfahren etabliert werden, um damit die thermische Stabilität der CGTase zu erhöhen und so ihren Einsatz in der industriellen Herstellung von Cyclodextrinen zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

2.1.1.1 *E. coli* JM109 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

[F', *traD36*, *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q, $\Delta(lacZ)M15/\Delta(lac-proAB)$, *glnV44*, *e14*⁻, *gyrA96*, *recA1*, *relA1*, *endA1*, *thi*, *hsdR17*]

2.1.1.2 *E. coli* DH5 α (Hanahan, 1983)

[F', *endA1*, *hsdR17* (*r_k⁻m_k⁻*), *supE44*, *thi1*, *gyrA* (Nal^r), *relA1*, $\Delta(lacZYA-argF)$ U169, $\Phi80/lacZ\Delta M15$]

2.1.1.3 *E. coli* BL21(DE3) (Studier & Moffatt, 1986)

hsdS, *gal*[λcl , *ts857*, *cmd1*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*]

In *E. coli* BL21(DE3) codon+ werden tRNA-Gene von einem zusätzlichen Plasmid coexprimiert, welche Anticodone zu in *E. coli* seltenen Codonen enthalten (Arginin: AGG und AGA; Isoleucin: AUA; Leucin: CUA). Das Plasmid enthält die Antibiotikaresistenz für Chloramphenicol.

2.1.1.4 *Anaerobranca gottschalkii* sp. nov. LBS3^T (Prowe, 1996; Prowe *et al.*, 1996; Prowe & Antranikian, 2001)

Anaerobranca gottschalkii sp. nov. LBS3 (DSMZ Stamm-Nummer 9380) ist ein gram-positives, sporenbildendes, anaerobes und thermoalkaliphiles Bakterium mit optimalen Wachstumsbedingungen bei 50 °C und pH 9.5.

2.1.2 Vektoren

2.1.2.1 pET-Vektoren (Novagen) zur Genexpression in *Escherichia coli*

Gene in pET-Vektoren (Novagen, Madison, Wisconsin, USA) werden von der T7-RNA-Polymerase transkribiert (Studier *et al.*, 1990). So können sie nur in *E. coli* Stämmen exprimiert werden, die eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens besitzen, z.B. *E. coli* BL21(DE3). Die Expression der T7-RNA-Polymerase erfolgt unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotor-

Operators und wird durch Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Die Expression des in den pET-Vektor einklonierten Gens erfolgt über einen T7-Promotor und ist in den meisten pET-Vektoren ebenso über einen Lac-Operator reguliert. Das dazu erforderliche lac-Repressor-Gen (*lacI*) ist plasmidkodiert und wird konstitutiv exprimiert. Als Replikationsursprung (*ori*) besitzen die pET-Vektoren einen *origin of replication* von pBR322.

Der Vektor pET24a (Abbildung 2.1) enthält als Selektionsmarker für die Plasmidaufnahme das Kanamycinnucleotidyltransferase-Gen (*kan*). Das in die *Multiple Cloning Site* klonierte Gen kann 3'-seitig mit der Sequenz für einen Hexahistidin-Tag versehen werden, der wegen des Fehlens einer Proteaseschnittstelle posttranslational nicht entfernt werden kann.

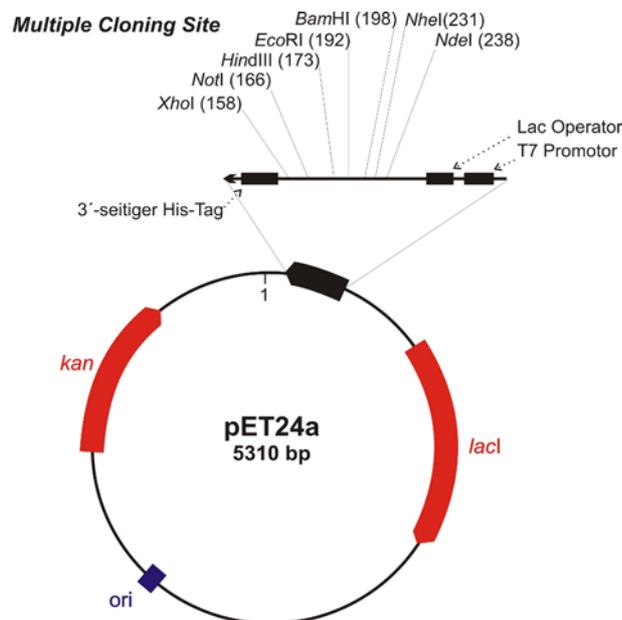


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des pET24a-Vektors

Der Vektor pET28a (Abbildung 2.2) enthält als Selektionsmarker ebenfalls das Kanamycinnucleotidyltransferase-Gen. Hier kann das in die *Multiple Cloning Site* klonierte Gen 5'- oder 3'-seitig mit einer Sequenz für einen Hexahistidin-Schwanz versehen werden. Der N-terminale His-Tag lässt sich über eine codierte Thrombinschnittstelle vollständig entfernen. Der C-terminale His-Tag kann ebenso wie im Falle von pET24a nicht entfernt werden.

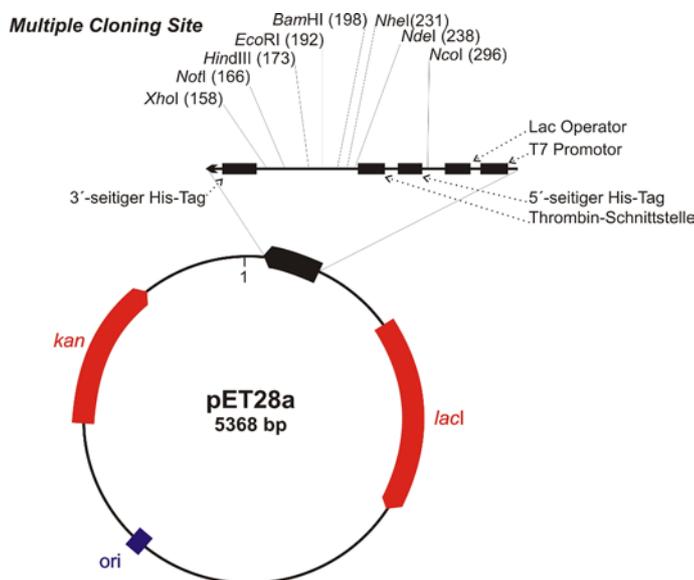


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des pET28a-Vektors

2.1.2.2 pUC19 (Fermentas)

pUC-Vektoren sind Klonierungsplasmide mit Bestandteilen der pBR322- und M13mp19-Vektoren (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Als Replikationsursprung (ori) besitzt der pUC19-Vektor (Abbildung 2.3) einen abgewandelten pMB1 *origin of replication* von pBR322, so dass bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C etwa 75 und bei 42 °C mehr als 200 Vektorkopien pro Zelle vorkommen (Lin-Chao *et al.*, 1992). Die Selektion auf Plasmidaufnahme erfolgt über Ampicillin-Resistenz, die durch die Expression des β -Lactamase-Gens (*bla*) ausgeprägt wird. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors liegt stromaufwärts vom Genfragment der β -Galactosidase (*lacZ*), so dass durch die Klonierung eines Gens die Expression des β -Galactosidase-Gens durch Leserasterverschiebung verhindert wird. Bakterien mit pUC-Vektoren ohne Insert produzieren eine funktionsfähige β -Galactosidase, die aus X-Gal einen blauen Farbstoff synthetisiert, der die Zellen anfärbt. Bakterien mit pUC-Vektoren, die ein Geninsert tragen, sind dagegen wegen des Fehlens einer funktionellen β -Galactosidase farblos.

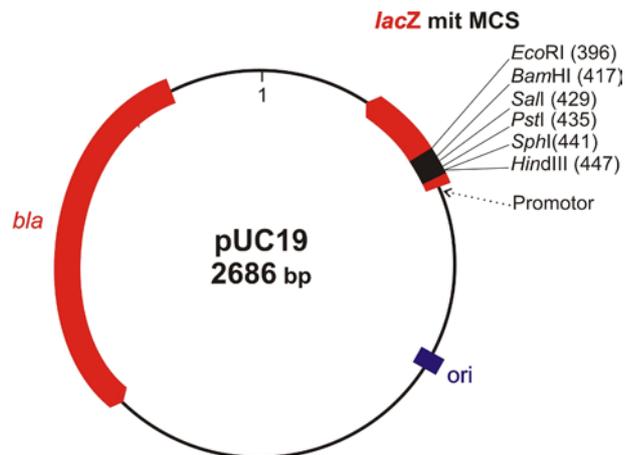


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des pUC19-Vektors

2.1.3 Oligodesoxyribonukleotide (Primer)

Bei Mutationsprimern sind diejenigen Basen, die von der Originalsequenz abweichen, fett gedruckt. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

2.1.3.1 Primer zur Amplifizierung des *cgtase*-Gens aus *A. gottschalkii*

5'-*HindIII*_CGTase_pUC19: 5'- TTT TAA GCT TAT GAC TCA AAA TTC
ACT AGA A -3'

3'-*EcoRI*_CGTase_pUC19: 5'- CGG AAT TCT TAC CAT TCA AAA TAA
ATT GT -3'

5'-*NheI*_CGTaseoS: 5'- CAT CTA GCT AGC ACT CAA AAT TCA CTA -
3'

3'-*HindIII*_CGTaseoS: 5'- CCC CCA AGC TTT TAC CAT TCA AAA TA -
3'

2.1.3.2 Primer zur Stabilisierung der CGTase aus *A. gottschalkii*

5'-CGTaseinnen*EcoRI*: 5'- TAT TAG ACT TTG AAT TCG CTC AAA CTA
CAC G -3'

3'-CGTaseinnen*EcoRI*: 5'- CGT GTA GTT TGA GCG AAT TCA AAG TCT
AAT A -3'

2.1.3.3 Primer zur Sequenzierung des *cgtase*-Gens

T7 Promotor: 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'

T7 Terminator: 5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'
 pUC5_Seq: 5'- AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA -3'
 pUC3_Seq: 5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC -3'
 5'-SOE-CGTase: 5'- GAA TAT GAT CCT AAT TAT TAT C -3'
 3'-SOE-CGTase: 5'- GAT AAT AAT TAG GAT CAT ATT C -3'
 5'-CGTaseSequ350: 5'- TTG GAT TTC TTC ACC AGT A -3'
 5'-CGTaseSequ1500: 5'- GAC GGA TTG TTA TCA GGT AA -3'
 3'-CGTaseaußenEcoRI: 5'-GCA TGT CAT ATA AGT CAA AC -3'

2.1.4 Längenstandards

2.1.4.1 DNA-Längenstandards

2.1.4.1.1 SmartLadder (*Eurogentec*)

Die SmartLadder dient sowohl als Längenstandard zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten als auch zur Abschätzung von DNA-Mengen im Gel, da die Marker-Fragmente in definierter Menge vorliegen (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Der SmartLadder DNA Standard

Bandengröße (bp)	ng/Bande*
10000	100
8000	80
6000	60
5000	50
4000	40
3000	30
2500	25
2000	20
1500	15
1000	100
800	80
600	60
400	40
200	20

*: bei Auftrag von 5 µl Standard; bp: Basenpaare

2.1.4.1.2 Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas)

Bandengrößen [bp]: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80

2.1.4.2 Protein-Längenstandards

2.1.4.2.1 Low Molecular Weight Marker (Amersham Pharmacia)

Der *Low Molecular Weight* Marker dient sowohl als Längenstandard zur Größenbestimmung von Proteinen als auch zur Abschätzung von Proteinmengen im Gel, da die Proteine in definierter Menge vorliegen (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Der *Low Molecular Weight*-Längenstandard

Protein	M _R [g/mol]	µg/Bande*
Phosphorylase b	97000	67
Albumin	66000	83
Ovalbumin	45000	147
Carboanhydrase	30000	83
Trypsininhibitor	20100	80
α-Lactalbumin	14400	116

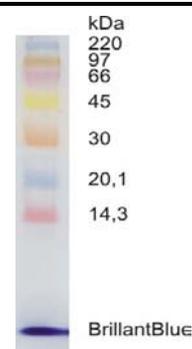
M_R: relatives Molekulargewicht; *: bei Auftrag von 3 µl Standard

2.1.4.2.2 Rainbow™ coloured protein molecular weight markers (Amersham Biosciences)

Der *Rainbow™ coloured protein molecular weight marker* kann aufgrund der Verschiedenfarbigkeit der Banden sowohl auf SDS-Gelen als auch geblottet auf PVDF-Membranen verwendet werden.

Tabelle 2.3: *Rainbow™ coloured protein molecular weight markers, high molecular weight range*

Protein	M _R [g/mol]	Farbe
Myosin	220000	blau
Phosphorylase b	97000	braun
<i>Bovine serum albumin</i>	66000	rot
Ovalbumin	45000	gelb
Carbonic anhydrase	30000	orange
Trypsininhibitor	20100	blau
Lysozym	14300	magenta



M_R: relatives Molekulargewicht

2.1.5 Enzyme

Benzonase: Merck Eurolabs (Lohmar)

DNAseI: Invitrogen (Karlsruhe)

Lysozym: Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)

Monoclonal Anti-Rabbit IgG (γ -Chain specific) Clone RG-96, Alkaline Phosphatase Conjugate: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

Pwo-DNA-Polymerase: Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

Ready-MixTM REDTaqTM PCR Reaction Mix with MgCl₂: Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Restriktionsendonukleasen: MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) oder New England Biolabs (Bad Schwalbach)

T4-DNA-Ligase: Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

Taq-DNA-Polymerase: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

Trypsin *from bovine pancreas, salt-free, non-sterile*: Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)

2.1.6 Chemikalien

Alle für molekularbiologische Arbeiten benötigten Chemikalien besaßen den größtmöglichen Reinheitsgrad. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von Biorad Laboratories (München), Biozym (Hess. Oldendorf), Boehringer Mannheim (Mannheim), Difco (Dreieich), Fluka (Neu-Ulm), Gerbu Biotechnik GmbH (Gailberg), Heirler Cenovis GmbH (Radolfzell), ICN Biomedicals GmbH (Eschwege), KMF Laborchemie Handels GmbH (Sankt Augustin), Merck Eurolabs (Lohmar), National Diagnostics (Simerville, NJ, USA), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Oxoid (Wesel), Riedel-de-Haen GmbH (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth GmbH & Co (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

Paselli-Stärke SA2 (teilweise hydrolysierte Kartoffelstärke mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 50): freundliche Gabe von Dr. Stefan Krause von Avebe Deutschland GmbH (Meerbusch).

spezifischer *primärer* Peptid-Antikörper gegen CGTase aus *A. gottschalkii*: in Zusammenarbeit mit Angela Vollstedt, AG Prof. Freudl, Forschungszentrum Jülich; hergestellt von Eurogentec (Herstal, Belgien).

2.1.7 Geräte und Materialien

Absorptionsspektrophotometer:

Zweistrahl-UV/VIS-Spektralphotometer Cary Bio 100 (Varian Inc., Palo Alto, Californien, USA)

Blotting Apparatur:

Hoefer SemiPhor semi-dry transfer unit, Modell TE70 (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Fransisco, CA, USA)

Brutschrank:

Heraeus B6060 (Kendro, Hanau)

CD-Spektropolarimeter:

Jasco J-715 Spektropolarimeter (Jasco, Cremalla, Italien)

Chromatographieranlagen:

BioCAD SPRINT Perfusion Chromatography System (Perkin Elmer, Weiterstadt)

FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

LaChrom HPLC; Autosampler L-7200; Pumpe L-7100; *Column Oven* L-7350; *Interface* D-7000; LaChrom RI-Detector L-7490 (Merck-Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)

Dampfsterilisator:

Varioklav Dampfsterilisator Typ 500 (H&P Labortechnik, München)

Dialyseschläuche:

Visking, Typ 36/32 (Roth, Karlsruhe)

Spektra/Por[®], 12-14000 MWCO, Breite 1 cm, 1,5 cm oder 2,5 cm (Roth, Karlsruhe)

Differentielle Scanning Kalorimetrie:

VP-DSC Microcalorimeter (Micro Cal[™] Inc, Northhampton, MA, USA)

Dynamische Lichtstreuung:

Festwinkel DLS Photometer DynaPro 801 (ProteinSolutions, Charlottesville, VA, USA)

Elektrophorese:

Hoefer-Elektrophoresekammer Mighty Small II und Multi Gel Caster Gelgießstand (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Power-Supply EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Elektroporation:

Elektroporator 2510 (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg)

Elektroporationsküvetten, 2 mm Elektrodenabstand (Molecular Bioproducts, San Diego, Californien, USA, bzw. Peqlab Biotechnologies, GmbH, Erlangen, bzw. Fischer Scientific, Schwerte)

Filtration:

Filtereinheiten Millex FG13; Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage (Millipore, Eschborn)

Filtermembran, 0,025 µm Porengröße, Ø 13 mm (Millipore, Eschborn)

Membranfilter ME24, 0,2 µm Porengröße, Ø 47 mm (Schleicher & Schuell, Dassel)

Sartorius Minisart NML Sterilfilter 0,22 µm (Sartorius, Göttingen)

Spritzenfilter, 0,22 µm Porengröße (Fisherbrand, Schwerte)

Ultrafree®-MC Millipore, Low Protein Binding Durapore® Membran, 0,22 µm, Ø 10 mm (Millipore, Eschborn)

Fluoreszenzspektrophotometer:

Fluoreszenz-Spektrometer Cary Eclipse (Varian, Inc., Palo Alto, Californien, USA)

Geldokumentation:

Imager Gel Doc 1000 mit Gel Doc 1000 White Light Source und Single Wavelength Mini-Transilluminator (BioRAD, Hercules, USA)

UV-Leuchttisch N90 MW 310nm (Konrad Benda, Wiesloch)

Kits:

Epoxy-aktivierte Sepharose 6B (Amersham Bioscience, Freiburg)

NucleoBond® AX DNA-Extraction Kit (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)

NucleoBond® buffer set III (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

Kühlschrank:

Heraeus Hera freeze (Kendro Laboratory Products, Hanau)

Küvetten:

Kunststoffküvetten: ½ Mikroküvetten (Ratiolab, Dreieich)

Quarzküvetten (Helma, Mühlheim)

Magnetrührer (beheizbar): Ika RCT *basic*: Ika-Labortechnik (Stauffen)

Mikroliterpipetten:

Pipetman® P20, P200, P1000 (Gilson, Medical Electronics, Frankreich)

Mikrowelle:

Micromat 191 (AEG, Nürnberg)

PCR-Gerät:

T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen)

pH-Meter:

pH-Meter (inoLab WTW, Weilheim)

Proteinkonzentrierung:

Centricon-YM-10-, Centriprep-YM-10-Centrifugal Filter Devices (Millipore, Eschborn)

Amicon 30 Ultra Centrifugal Filter Devices (Millipore, Eschborn)

Proteinumpufferung:

NAP-5-, NAP-10-, NAP-25-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Schüttelinkubatoren:

Innova 4000, 4400, 4430 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen)

Rocking Platform (Biometra, Göttingen)

Rollschüttler RM5 Assistent 348 (Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim)

Thermoblock V2.0 (O. Waase, Göttingen)

Ultraschall Desintegrator: Branson Digital Sonifier, Model 250 D (Heinemann, Schwäbisch Gmünd)

Vortexer:

Reax Top (Heidolph, Kelheim)

Vakuumpumpe ME 2C (Vacuubrand, Wertheim)

Waagen:

Scaltec SBA 52-Laborwaage, Scaltec SBA 33-Feinwaage (Scaltec Instruments, Heiligenstadt)

Wasserbad:

Wasserbad 1012 (GFL, Burgwedel)

Zentrifugen:

Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Hamburg)

Heraeus Biofuge *pico*, Heraeus Biofuge *fresco* (Schütt Labortechnik, Göttingen)

Sorvall RC-5C; Rotortypen SS34 und GSA (Sorvall, Bad Nauheim)

sonstige Geräte:

Baumwolltücher steril für Transferständer (NeoLAB, Heidelberg)

Einwegspritzen: 2 ml, 50 ml (Henke-Sass, Wolf, Tuttingen)

Hamilton-Spritze: 10 μ l, 25 μ l, 100 μ l, 500 μ l, 1 ml, 2,5 ml (Hamilton Micromesure AG, Bonaduz, Schweiz)

Handschuhe: Latex-Handschuhe Gentle Skin (Kimberley-Clark, Roswell, USA); Nitril-Untersuchungshandschuhe: Kimberley-Clark, Zaventem, Belgien)

Glaswaren (Schott, Mainz bzw. Fisher Scientific, Schwerte bzw. Novoglas, Bern, Schweiz)

Munktell Filter Papier Grade 1F 200x250 mm (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)

Parafilm „M“ Laboratory Film (Amersham National Can, Chicago, USA)

Pasteur-Pipetten (Hirschmann, Eberstadt)

PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml (Peqlab, Erlangen)

Petrischalen (Greiner, Nürtingen)

PVDF Western Blotting Membran 15x15 cm (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml; Röhrchen 15 ml, 50 ml; Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl (Roth, Karlsruhe)

Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel: 2 ml (Sarstedt, Nümbrecht)

2.1.8 Nährmedien

2.1.8.1 Medien für *E. coli*

LB (Luria-Bertani; Sambrook *et al.*, 1989)

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 1 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) NaCl

LB-Stärke

LB + 0,5 % (w/v) Kartoffel-Stärke

2.1.8.2 Medium für *A. gottschalkii*

10-mal Medium für 200 L Fermentation

0,1 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,04 % (w/v) NH_4Cl ; 0,01 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0,05 % (w/v) K_2HPO_4 ; 0,01 % (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005 % (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1 % (w/v) NaCl; 0,025 % (w/v) Trypton (Difco); 0,025 % (w/v) Hefe-Extrakt (Gibco); 0,001 % (w/v) FeCl_3 ; 0,1 % (v/v) Spurenelemente-Mix; 0,1 % (v/v) Resazurin-Lösung; 0,5 % (w/v) Kartoffelstärke (Fluka); nach dem Auflösen und Begasen mit N_2 hinzufügen von 0,05 % (w/v) Cystein*HCl; nach dem Autoklavieren hinzufügen von autoklaviertem 0,22 % (w/v) NaHCO_3 ; 0,22 % (w/v) Na_2CO_3 . Für die Vorkultur der Fermentation wurde ein 1-mal Medium verwendet.

Resazurin-Lösung

0,1 % (w/v) Resazurin

Spurenelemente-Mix

0,15 % (w/v) *Nitrilotriacetic acid* in Wasser lösen und den pH-Wert mit KOH auf 6,5 einstellen; 0,3 % (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 % (w/v) $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 % (w/v) NaCl; 0,01 % (w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0152 % (w/v) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,01 % (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,018 % (w/v) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,002 % (w/v) $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,001 % (w/v) H_3BO_3 ; 0,001 % (w/v) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,0025 % (w/v) $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,00003 % (w/v) $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

2.1.8.3 Agarplatten

Sollten Agarplatten mit entsprechendem Medium hergestellt werden, wurde 1,5% Bacto-Agar vor dem Autoklavieren zugefügt. Antibiotika wurden in 1:1000 bzw. 1:5000 Verdünnung der entsprechenden Stammlösung nach dem Autoklavieren in das handwarme Medium gegeben.

2.1.9 Lösungen und Puffer

Die Fertigung von Puffern und Lösungen, die nicht von Firmen bezogen wurden, ist im folgenden beschrieben. Soweit nicht anders vermerkt, wurden wässrige Lösungen hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert. Als Wasser wurde stets MILLIPORE - Wasser verwendet.

Agarose

1 % (w/v) Agarose in 0,5 % (w/v) TBE aufgekocht und bei 55 °C gelagert

Ammoniumacetat-Stammlösung

7 M Ammoniumacetat

Ampicillin-Stammlösung

150 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert

Ammoniumperoxodisulfid (APS)-Stammlösung

10 % (w/v) APS, bei -20°C gelagert

Bromo-Chloro-Indolylphosphat (BCIP)-Stammlösung

1 Tablette BCIP (Sigma) in 1 ml Dimethylformamid (DMF) zu einer Endkonzentration von 25 mg/ml gelöst und bei -20°C gelagert

Blot-Puffer (Tris-Glyzin-Puffer)

250 mM Tris; 1,92 M Glyzin

Blot-Block-Puffer

50 mM Tris, 150 mM NaCl, Zugabe von 5 % (w/v) Mager-Milchpulver kurz vor Verwendung

Calciumchlorid-Stammlösung

1 M CaCl₂

Chloramphenicol-Stammlösung (5000x)

100 mg/ml Chloramphenicol in 96 % (v/v) Ethanol gelöst

Cyclodextrin (CD)-Stammlösungen (0,1 %)

0,1 % (w/v) α -, β - oder γ -Cyclodextrin in Wasser gelöst und sterilfiltriert

 β -CD-Stammlösung (2 %)

2 % (w/v) β -CD in Wasser durch Erwärmen gelöst und sterilfiltriert

dNTP-Stammlösung

je 100 mM dNTP (N = A, C, G oder T) wurden gemischt und mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,0 auf eine Konzentration von 10 mM verdünnt und in kleinen Aliquots bei -20 °C gelagert

EDTA-Stammlösung

250 mM Na-EDTA unter Zugabe von NaOH gelöst und dabei pH-Wert auf 8,0 eingestellt.

Entwicklungslösung

330 μ l NBT-Stammlösung; 66 μ l BCIP-Stammlösung in 10 ml Entwicklungspuffer, frisch und lichtgeschützt hergestellt

Entwicklungspuffer

100 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 25 mM MgCl₂; pH 9,5

Ethanol reinst

96 % (v/v) oder 70 % (v/v) Ethanol

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid (EtBr)

Glycerin

87 % (v/v) Glycerin bzw. 10 % (v/v) Glycerin

**Iod-Färbestammlösung für Stärkenachweis nach Boyer & Preiss (1978)
(2.5.11.4)**

0,26 g I₂ und 2,6 g KI in 10 ml MILLIPORE-Wasser gelöst und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert

Iod-Färbelösung (2.5.11.4)

0,5 ml Iod-Färbestammlösung; 0,5 ml 1 M HCl ad 130 ml MILLIPORE-Wasser, frisch hergestellt; da Iod flüchtig ist, wurde das Gefäß zwischenzeitlich mit Parafilm verschlossen.

IPTG-Stammlösung

1 M IPTG, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert

Kaliumphosphat-Puffer (KP)

je 1 M K₂HPO₄ und 1 M KH₂PO₄ in Wasser gelöst und durch Mischen auf den gewünschten pH eingestellt.

Kanamycin-Stammlösung (1000x)

75 mg/ml Kanamycin-Sulfat in Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Lugol'sche Lösung (2.5.12)

0,33 % (w/v) I₂; 0,66 % (w/v) KI in Wasser gelöst und lichtgeschützt im Abzug gelagert.

Magnesiumchlorid-Stammlösung

1 M MgCl₂

Manganchlorid-Stammlösung

10 mM MnCl₂

Methylorange-Stammlösung

3 mM Methylorange in Wasser gelöst, sterilfiltriert

Natriumazid-Stammlösung

1 M NaN_3

NaCl-Stammlösung

3 M NaCl

Native PAGE Laufpuffer (5x)

250 mM Tris; 1,92 M Glyzin

Native PAGE Probenpuffer (2x)

60 % (w/v) Saccharose; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Native PAGE Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

Native PAGE Trenngelpuffer

3 M Tris/HCl, pH 8,8

Natriumcarbonat-Stammlösung

0,2 M Na_2CO_3

Nitroblau-Tetrazolium (NBT)-Stammlösung

1 Tablette NBT (Sigma) in 1 ml Wasser zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml gelöst und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert

NBT/BCIP *ready-to-use-tablets*

1 Tablette NBT/BCIP (Sigma) in 10 ml Wasser zur sofortigen Verwendung lichtgeschützt gelöst

Paselli-Stärke SA2

1 %, 5 % oder 10 % (w/v) Paselli-Stärke in Wasser gelöst, sterilfiltriert

Phenolphthalein-Stammlösung

3,75 mM Phenolphthalein in 96 % (v/v) Ethanol gelöst

Phenolphthalein-Aktivitätsfärbelösung

2 ml Phenolphthalein-Stammlösung in 100 ml 0,2 M Na_2CO_3 , frisch hergestellt.

Protease-Inhibitor-Cocktail

1 Tablette cOmplete (Roche) in 50 ml Puffer zur sofortigen Verwendung gelöst.

Saccharose-Farbmarker

60 % (w/v) Saccharose; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF in 1x TBE

SDS-PAGE-Färbelösung

0,2 % (w/v) *Coomassie Brilliant Blue* G250 und R250; 50 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Eisessig; sterilfiltriert und lichtgeschützt bei RT gelagert.

SDS-PAGE-Laufpuffer (1x)

25 mM Tris; 0,1 % (w/v) SDS; 0,2 M Glyzin

SDS-PAGE-Probenpuffer (2x)

10 % (v/v) Glycerin; 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 2 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 1,25 M Tris/HCl, pH 6,8

SDS-PAGE-Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl; 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,8

SDS-PAGE-Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl; 0,4 % (w/v) SDS; pH 8,8

5x TBE-Puffer

89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA

TFB I Lösung

100 mM RbCl (oder KCl); 50 mM $MnCl_2$; 30 mM KoAc; 10 mM $CaCl_2$; 15 % (v/v) Glycerin, pH mit Essigsäure auf 5,8 – 6,2 eingestellt

TFB II Lösung

10 mM MOBS (oder Tris/HCl); 10 mM RbCl (oder KCl); 75 mM $CaCl_2$; 15 % (v/v) Glycerin; pH mit KOH auf 7,0 eingestellt

Tris/HCl-Puffer

je 1 M Tris/HCl wurde auf den gewünschten pH bei RT eingestellt. Für Messungen bei höheren Temperaturen wurde ein $\Delta pK_a/^\circ\text{C}$ von $-0,03$ angenommen (Stoll & Blanchard, 1990)

Trypsin-Stammlösung

0,5 mg/ml Trypsin in Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

WesternBlot (WB)-Puffer

100 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 2,5 mM MgCl_2 ; 0,5 % (v/v) Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate; Trade mark of ICI Americas); pH 7,5

2.1.10 Software

Corel Draw, Version 9.0, Corel Corporation

Sigma-Plot, Version 5, SPSS Inc. 1986-1999: zur Erstellung von Graphen

2.1.10.1 Geräte-Software zur Analyse von Messergebnissen

BioCAD Perfusion Chromatography Workstation, Version 3.01, Perseptive Biosystems

Cary Eclipse, Version 1.0 (75), Varian Australia Pty Ltd, 1999/2000

Cary Win UV, Version 2.0 (25), Varian Australia Pty Ltd, 1999

Dynamics, Graphical Size Analysis Software, ProteinSolutions

ImagIR - Softwarepaket, Version 2.21, LI-COR

Origin, MicroCal Software

2.1.10.2 Software zur Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Chromas, Version 1.45, McCarthy 1996-1998

PredictProtein: <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>; (phd@maple.bioc.columbia.edu; Rost, 1996)

SignalP V 1.1: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-1.1/> (Nielsen *et al.*, 1997): zur Ermittlung von Signalsequenzen zur Sekretion von Proteinen

SwissModel, Version 36.0003: <http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html> (Peitsch, 1995; 1996; Guex & Peitsch, 1997): Das Programm SwissModel arbeitet in fünf Schritten und verwendet dabei verschiedene schon etablierte Programme. Im ersten Schritt werden geeignete Vorlagen bzw. Muster für die eingegebene Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms BLASTP2 (Altschul *et al.*, 1990) in der Datenbank ExNRL-3D gesucht. Das Programm SIM (Huang & Miller, 1991) filtert die Sequenzen mit Sequenzidentitäten größer als 25 % und erkennt Domänen, die auch auf Grundlage nicht-verwandter Template modelliert werden können. Im dritten und vierten Schritt werden für die gefundenen Sequenzen die zugehörigen Strukturdateien (.pdb) aus der ExpDB-Datenbank geladen. Mit Hilfe von ProModII (Peitsch, 1995; 1996; Guex & Peitsch, 1997; Guex *et al.*, 2000; Schwede *et al.*, 2000) werden anhand dieser Strukturdaten 3D-Modelle für die eingegebene Aminosäuresequenz erzeugt. Hierbei werden zunächst die 3D-Strukturen superpositioniert und ein multiples Alignment mit der eingegebenen Aminosäuresequenz erstellt. Anschließend wird ein Gerüst (*framework*) für diese Sequenz angefertigt, fehlende Schleifen werden ersetzt und das Polypeptidketten-Rückgrat vervollständigt und korrigiert. Danach wird die Lage der Seitenketten korrigiert und neu aufgebaut. Zuletzt wird die Qualität der modellierten Struktur und die Packung überprüft. Im letzten Schritt wird mittels Gromos96' (van Gunsteren *et al.*, 1996) eine Energieminimierung aller Modelle durchgeführt. Die Zuverlässigkeit des Programms kann mit Aminosäuresequenzen bekannter Struktur überprüft werden. Die Urheber des Programms machen darauf aufmerksam, dass die Genauigkeit ansteigt, je höher die Sequenzidentität zu Proteinen mit bekannter Struktur ist. So zeigen 79 % aller modellierter Strukturen, die auf einer Sequenzidentität zwischen 50 und 59 % beruhen, nur Abweichungen kleiner als 3 Å *relative mean square deviation* (rmsd) von ihrer wahren Struktur. Bei einer Sequenzidentität zwischen 60 und 69 % weichen 85 % der modellierten Strukturen nicht mehr als 3 Å von ihrer wirklichen Struktur ab. Die auftretenden Abweichungen treten im Allgemeinen nicht in den Strukturanteilen auf, die das Protein mit den Vorlagen teilt, sondern in den nicht-konservierten Schleifen, die in den Templaten fehlen. Bei einer Sequenzidentität von 50 % unterscheidet sich demnach die modellierte Struktur im Bezug auf gemeinsame Strukturanteile mit weniger als 1 Å rmsd von den Vorlagen. Außerdem ist die Wahl der Template von entscheidender Bedeutung. So können gebundene Liganden oder Co-Faktoren die

Modellierung stark beeinflussen. Auch der Alignment-Algorithmus, auf dem die Modellierung beruht, kann fehlerbehaftet sein. Diese Fehler wirken sich aber erst drastisch bei einer Sequenzidentität kleiner als 40 % aus.

SwissPDBviewer, Version 3.07b, <http://www.expasy.ch/spdbv/>: zur Darstellung von Strukturdaten (pdb).

POVRay for Windows Version 1999, <http://www.povray.org>: zur Erstellung von Grafiken aus pdb Dateien.

Wisconsin Package, GCG Version 10.2, Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, 1982-2001: zur Bearbeitung von DNA und Proteinsequenzen inkl. Pileup zur Erstellung von sequenzbasierten Alignments.

Gentle: von Magnus Manske 2003, <http://gentle.magnusmanske.de>: zur Erstellung von Plasmidkarten.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Abtötung von Mikroorganismen

Zur Sterilisation von Lösungen und Medien und zur Abtötung von *E. coli* Kulturen wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Ebenso wurden zu sterilisierende Glas- und Metallgeräte behandelt, die vor Gebrauch jedoch i.d.R. im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet wurden. Alternativ wurden Zentrifugenbecher und Baumwolltücher mindestens 30 min mit 2 % (v/v) Helipur inkubiert, bevor sie gewaschen und getrocknet wurden.

2.2.2 Sterilfiltration von Lösungen

Lösungen, die nicht durch Autoklavieren sterilisiert werden konnten, wurden durch einen Minisart NML Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert, wodurch die Mikroorganismen aus der Lösung entfernt wurden. Ebenso konnten so Lösungen für den Gebrauch an den chromatographischen Anlagen entgast und von Partikeln befreit werden.

2.2.3 Anzucht und Lagerung von *E. coli* Stämmen

E. coli-Stämme wurden bei 37 °C unter Schütteln in Medium angezogen, dem bei plasmidtragenden Bakterien das entsprechende Antibiotikum zugegeben wurde (Ampicillin 150 µg/ml, Chloramphenicol 20 µg/ml,

Kanamycin 75 µg/ml). Die Anzucht von *E. coli* erfolgte wenn nicht anders angegeben in LB-Medium. Kulturvolumina bis zu 5 ml wurden in einem 15 ml Kulturröhrchen geschüttelt, für Volumina bis zu 50 ml wurden 100 ml Erlenmeyerkolben und für Volumina von 1 L wurden 3 L Erlenmeyerkolben mit oder ohne Schikane verwendet. Die Röhrchen und Kolben wurden bei 250 Upm bzw. 150 Upm (im Falle der 3 L Kolben) geschüttelt. Das Wachstum der Zellen wurde durch Trübungsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen Medium verfolgt. Sollten Einzelkolonien erhalten werden, wurde auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die dauerhafte Lagerung von *E. coli*-Stämmen erfolgte als Glycerinkultur bei -80 °C. Dazu wurde ein Aliquot einer Übernachtskultur 1:1 in einem sterilen Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel in 87 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Zur Anzucht von *E. coli*-Kulturen wurde ein kleines Aliquot der Glycerinkultur steril entnommen und das vorbereitete Medium damit inokuliert.

2.2.4 Anzucht und Ernte von *Anaerobranca gottschalkii*

Die Anzucht und Ernte von *A. gottschalkii* fand an der Technischen Universität Hamburg-Harburg mit Unterstützung von Professor G. Antranikian und in Zusammenarbeit mit Matthias Pump von Biotex und Costanzo Bertoldo vom Institut für Technische Mikrobiologie statt. Die Anzucht von *A. gottschalkii* erfolgte anaerob bei 50 °C unter Schütteln (150 Upm) bzw. Rühren in Medium für *A. gottschalkii*. Für die Fermentation in 200 L Medium wurden *A. gottschalkii*-Zellen anaerob in zwei mal 50 ml *A. gottschalkii*-Medium inokuliert und über Nacht bei 50 °C und pH 9,5 inkubiert. Mit diesen Vorkulturen wurden je 1 L Medium angeimpft und weitere 24 h bei 50 °C und pH 9,5 inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 20 L Medium in einem Fermenter auf eine OD_{600} von 0,02 angeimpft. Nach 8-stündiger Inkubation bei 50 °C und pH 9,5 wurden die 20 L Zellsuspension in einen 200 L Fermenter überführt, so dass das Medium eine OD_{600} von 0,0145 aufwies. Bei der Zellernte nach 16 h Inkubation (50 °C, pH blieb konstant bei 9,5) betrug die optische Dichte 0,16. Die Zellen wurden pelletiert (Durchflusszentrifuge: Beckman Centrifuge J2-HS, Continuous Flow JCF-2 Rotor; 39900 g, 10 °C).

2.2.5 Transformation von *E. coli*-Zellen

2.2.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen zur Elektroporation (Dower *et al.*, 1988)

Diese Methode diente zur Herstellung besonders kompetenter Zellen, die zur Transformation mit plasmidkodierten Genbanken und anschließendem Screenen verwendet wurden. Mit einer 50 ml Übernachtskultur wurden 500 ml LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 150 Upm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Zellen für 30 min auf Eis gestellt, anschließend auf Aliquots von 50 ml aufgeteilt und zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 10 min, 4000 Upm und 4 °C). Es folgten zwei Waschschriffe durch Resuspension in je 50 bzw. 20 ml eiskaltem MILLIPORE-Wasser mit anschließender Inkubation für 15 min und erneuter Zentrifugation. Beim dritten Waschschriff wurden alle Pellets zusammen in 10 ml eiskaltem MILLIPORE-Wasser resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und wiederum zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Diese wurden entweder sofort zur Transformation eingesetzt oder bei –80 °C gelagert.

2.2.5.2 Vorbereitung von DNA für die Elektroporation

Bei einer Elektroporation ist es unerlässlich, dass die DNA-Lösung, die zur Transformation dient, keine Ionen enthält, da diese beim elektrischen Puls in der Küvette einen Kurzschluss auslösen würden. Deshalb wurde die DNA-Lösung, sofern sie in einem salzhaltigen Puffer vorlag, auf Nitrozellulosefilter (Millipore) aufgebracht und gegen 10 % (v/v) Glycerin für 1 h dialysiert.

2.2.5.3 Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

Zur Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) wurden 100 µl elektrokompetente Zellen (2.2.5.1) 5 min mit maximal 20 µl salzfreier DNA auf Eis inkubiert und anschließend in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Im Elektroporator (Eppendorf-Nehteler-Hinz) wurden die Zellen einem Stromimpuls (2500 V, 25 µF, 200 W) ausgesetzt und sofort danach in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen. Um die Resistenzgene der transformierten Plasmid-DNA zu exprimieren, wurden die Zellen 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert (Kur). Anschließend wurden die Zellen in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 100 µl der frisch hergestellten Zellen mit einer definierten Menge an Vektor (in der Regel 10 ng) transformiert. Die Zellen wurden nach der Kur in drei verschiedenen Verdünnungen auf LB-Agar ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien auf einer der drei Platten gezählt und die Transformationseffizienz nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Kolonien auf der Platte} * \text{Verdünnungsfaktor}}{\mu\text{g zugegebener DNA}} = \text{Transformationseffizienz}$$

Gleichung 1: Berechnung der Transformationseffizienz von *E. coli*-Zellen

2.2.5.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (Inoue *et al.*, 1990)

Mit einer 50 ml über Nacht Kultur wurde 1 L LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 150 Upm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Zellen für 15 min auf Eis gestellt und anschließend auf Aliquots von 50 ml aufgeteilt und zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 10 min, 4000 Upm und 4 °C). Das Zellpellet wurde auf Eis gehalten und in 100 ml TFB I Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, das Zellpellet in 5 ml TFB II Lösung aufgenommen und in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden entweder sofort zur Transformation eingesetzt oder bei –80 °C gelagert.

2.2.5.5 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurden 100 µl chemisch kompetente Zellen (2.2.5.4) auf Eis aufgetaut und die zur Transformation dienende DNA wurde in einem Volumen von maximal 20 µl zugesetzt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 45 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, kurz auf Eis abgekühlt und dann 900 µl LB-Medium zugegeben. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend Aliquots auf Selektivagar ausplattiert. Transformanten konnten nach Inkubation über Nacht bei 37 °C detektiert werden. Die Transformationseffizienz wurde wie unter (2.2.5.3) beschrieben bestimmt.

2.2.6 Stempeltechnik

Die Stempeltechnik wurde verwendet, um Replikplatten von LB-Agarplatten mit *E. coli*-Transformanten (Mutterplatten) zu erhalten. *E. coli*-Zellen wurden mit Plasmid-DNA transformiert (2.2.5.3) und das ausplattierte Aliquot so verdünnt, dass auf den Mutterplatten zwischen 200 und 250 Einzelkolonien wuchsen. Die Mutterplatten wurden 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend ein Negativ-Abdruck auf ein steriles Baumwolltuch, welches auf ein Stativ geklemmt war, so aufgebracht, dass eine am Rand befindliche Markierung der Platte mit einer Markierung auf dem Stativ übereinstimmte. Anschließend wurde eine unbewachsene LB-Agarplatte (Replikplatte) mit Stärke (2.1.8.1) auf das Baumwolltuch gelegt und so ein Positivabdruck gewonnen. Hierbei lag die Markierung der Agarplatte wieder über der Markierung des Stativs. Es konnten bis zu drei Positivabdrücke von einem Negativabdruck gewonnen werden. Die frisch angeimpfte Agarplatte wurde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Einzelkolonien einen Durchmesser von bis zu 1 mm erreichten. Um Baumwolltücher wieder verwenden zu können, wurden sie in 2 % (v/v) Helipur für mindestens 30 min inkubiert, wodurch anhaftende Mikroorganismen abgetötet wurden. Anschließend wurden die Baumwolltücher in der Waschmaschine mit herkömmlichen Waschmitteln gewaschen und im Trockner getrocknet, bevor sie in Packpapier eingeschlagen und in 10er Paketen autoklaviert wurden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung lässt sich aus der Absorption bei 260 nm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmen. Gemessen wurde gegen Wasser in einer Quarzküvette (Schichtdicke: 1 cm). Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 bei einem spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0,1\%}A_{260}$ von $20 \text{ cm}^2\text{mg}^{-1}$ einer Konzentration von $50 \mu\text{g dsDNA/ml}$. In der Regel wurde eine 50-fache Verdünnung der DNA-Lösung in einem Endvolumen von 0,2 ml hergestellt. Das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Lösung. Bei proteinfreien Proben ist der Quotient größer als 1,8. Für die Messung wurde ein Spektrum von 230 nm bis 350 nm Wellenlänge mit dem Cary Bio 100 Spektralphotometer (Varian) aufgenommen. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach

$$c_{\text{dsDNA}} (\mu\text{g/ml}) = (A_{260} \cdot 50 \cdot V)$$

c: Konzentration

A_{260} : Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm

V: Verdünnungsfaktor

Gleichung 2: Bestimmung der DNA-Konzentration anhand der Absorption bei 260 nm

Eine grobe Abschätzung der DNA-Konzentration konnte auch durch Vergleich der Bandenintensität nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA im Agarosegel mit den Banden der *SmartLadder* (Eurogentec) erfolgen.

2.3.2 Isolierung und Reinigung von DNA

2.3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi-Präparation)

Die Isolierung von DNA in präparativen Mengen (50-150 μg) erfolgte mit dem Nucleobond AX DNA-Extraction Kit (Machery-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers. Es wurde die Säule AX-100 verwendet. Die von der Säule eluierte DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und zentrifugiert (Heraeus Biofuge *fresco*, 1 h, 13000 Upm und 4 °C). Anschließend wurde das Pellet mit 50 μl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 3 min, 13000 Upm und RT) und in 50 μl Wasser aufgenommen. Die Güte der Präparation wurde durch die Aufnahme eines DNA-Spektrums überprüft (2.3.1). Zur Herstellung einer Genbank wurde nicht wie im Herstellerprotokoll angegeben eine 50 ml *E. coli*-Übernachtskultur für die Anzucht von Zellen verwendet, sondern Kolonien von einer 33x38 cm Agarplatte abgeschabt. Hierzu wurde ein steriler Spatel verwendet und die Zellmasse vor der Weiterverarbeitung nach Herstellerangaben zunächst in 10 ml Resuspensionspuffer S1 des Kits aufgenommen und auf fünf bis sechs Aliquots aufgeteilt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 10 min, 4000 Upm, 4 °C) pelletiert und die Isolierung der Plasmid-DNA nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei für jedes Aliquot eine Säule verwendet wurde.

2.3.2.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus *A. gottschalkii*

Zur Isolierung der chromosomalen DNA von *A. gottschalkii* wurde ein Aliquot des Zellpellets (ca. 1 g) aus der 200 L-Fermentation von *A. gottschalkii*, die an der TU Hamburg-Harburg unter Anleitung von Matthias Pump

durchgeführt wurde (2.2.4), verwendet. Die Zellen wurden in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM CaCl₂ resuspendiert und auf vier Aliquots aufgeteilt. Die Isolierung der chromosomalen DNA erfolgte mit dem Nucleobond[®] *buffer set* III (Machery-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers. Es wurde je eine Säule AXG-20 pro Aliquot verwendet. Die in G3-Puffer resuspendierten Zellen wurden mit 20 µl Lysozym und 25 µl Proteinase K 20 min bei 37 °C inkubiert. Die von der Säule eluierte DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und zentrifugiert (Heraeus Biofuge *fresco*, 1 h, 13000 Upm und 4 °C). Anschließend wurde das Pellet mit 50 µl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 3 min, 13000 Upm und RT) und in 50 µl Wasser aufgenommen. Die Güte der Präparation wurde durch die Aufnahme eines DNA-Spektrums überprüft (2.3.1).

2.3.2.3 Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen

2.3.2.3.1 Fällung von DNA mit Ethanol

In der Regel wurde DNA aus wässrigen Lösungen mit Ethanol gefällt. Hierdurch können u.a. Kontaminationen wie Salze und freie Nukleotide entfernt werden. Die DNA wurde mit 1/10 Volumen 7 M Ammoniumacetat Lösung und 3 Volumen 96 %igem (v/v) Ethanol, je nach Menge zwischen 5 und 30 min, bei –20 °C gefällt und danach abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 10 min, 13000 Upm und RT). Das Pellet wurde mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und zentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 5 min, 13000 Upm und RT). Der Überstand wurde anschließend vollständig abgenommen und die Reaktionsgefäße zum Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur offen stehen gelassen, bis sich das Ethanol vollständig verflüchtigt hatte. Die DNA wurde in Wasser gelöst.

2.3.2.3.2 Fällung von DNA mit Isopropanol

DNA kann auch mit Isopropanol gefällt werden. Bei der Verwendung von Isopropanol wird die Kopräzipitation von Salzen vermindert. Diese Methode wurde bei der Präparation von Plasmid-DNA in präparativen Mengen benutzt (2.3.2.1). Dabei wurde die Probe mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und sofort zentrifugiert (Heraeus Biofuge *fresco*, 1 h, 13000 Upm und 4 °C). Wie nach der Ethanolfällung wurde anschließend mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen (2.3.2.3.1).

2.3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von doppelsträngiger DNA wurde in Gelen mit 1 % (w/v) Agarose in 0,5x TBE-Puffer durchgeführt. Die Agarose wurde in einem handelsüblichen Mikrowellengerät gekocht, mit 0,5 µg/ml (Endkonzentration) Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. Die Proben wurden mit mindestens 1/5 Volumen Saccharose-Farbmarker versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Als Längenstandard wurde die *SmartLadder* (Eurogentec) oder die *Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder* (MBI Fermentas) verwendet (2.1.4.1). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 190 V durchgeführt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm sichtbar gemacht und gegebenenfalls für eine Reinigung mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. So gewonnene DNA-Fragmente wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll gereinigt und anschließend in 30 µl 1 mM Tris/HCl, pH 8,5 aufgenommen.

2.3.3 Enzymatische Manipulation von doppelsträngiger DNA

2.3.3.1 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren

Bei der Klonierung verwendet man Restriktionsendonukleasen, die der enzymatischen Spaltung von doppelsträngiger DNA dienen, wobei *blunt ends* (stumpfe Enden) oder *sticky ends* (überhängende Enden) entstehen können. Die *single strand* Nukleotide der überhängenden Enden hybridisieren mit komplementierenden Enden und werden mittels Ligase miteinander verknüpft. Die *blunt ends* können ohne Hybridisierung miteinander verknüpft werden. In der vorliegenden Arbeit wurde nur über *sticky ends* kloniert.

2.3.3.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom jeweiligen Hersteller des Enzyms empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen gespalten. Für analytische Zwecke wurden i.d.R. 300 bis 500 ng DNA mit etwa 2 U Enzym gespalten. Sollten DNA-Fragmente präparativ verdaut werden, wurden 1 bis 10 µg DNA und mindestens 20 U Enzym verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug bei analytischem Verdau 10 bis 20 µl, bei präparativen Restriktionen wurde ein Ansatz von mindestens 10 µl pro µl Enzym verwendet. Sollte ein DNA-Fragment mit zwei Enzymen gespalten

werden, so wurde ein geeigneter Puffer gewählt, in dem beide Enzyme volle Aktivität besaßen; traf dies nicht zu, so wurde nacheinander verdaut, wobei nach der ersten Restriktion eine Ethanol-fällung durchgeführt (2.3.2.3.1) oder das QIAquick PCR *Purification Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben zur DNA Reinigung verwendet wurde. Die gewünschten Reaktionsprodukte wurden mittels Agarosegelelektrophorese getrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert (2.3.2.4).

2.3.3.3 Ligation von DNA-Enden

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Produkt wurde das DNA-Insertfragment in einem drei- bis fünffachen molaren Überschuss zum Vektorfragment zugesetzt. Sowohl das Vektorfragment als auch das Insertfragment wurden zuvor mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus einem Agarosegel gereinigt (2.3.2.4). Die Ligation erfolgte in T4 DNA-Ligase-Puffer (Roche) mit 2 U T4 DNA-Ligase (Roche) i.d.R. für 2 h bei 4 °C mit anschließender Inkubation für 16 h bei 16 °C in einem Gesamtvolumen von 20 µl.

2.3.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Sie ermöglicht die selektive Vervielfachung des DNA-Templats auch aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus. Die Reaktion basiert auf der Anlagerung (*Annealing*) und Verlängerung (*Extension*) zweier Primer, die auf gegenüberliegenden Strängen in entgegengesetzter Richtung die Zielregion in einer Doppelstrang-DNA flankieren. Die Reaktion besteht aus aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen, die jeweils durch drei Phasen unterschiedlicher Temperatur charakterisiert sind. In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird die Doppelstrang-DNA durch Erhitzen aufgeschmolzen und somit in Einzelstrang-DNA überführt. Durch das anschließende Absenken der Temperatur in der *Annealing*-Phase kommt es zur Hybridisierung der Primer an die komplementären Zielregionen der denaturierten Matrizen-DNA. In der Extensions-Phase werden bei höherer Temperatur die Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase komplementär zur Matrize verlängert. In den aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen kommt es zu einer exponentiellen Akkumulation der durch die beiden Primer flankierten DNA-Sequenz. Die PCR-Bedingungen

wurden je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz und dem GC-Gehalt der jeweiligen spezifischen Primer definiert. Die Reaktionen wurden in 100 µl Gesamtvolumen durchgeführt und enthielten folgende Komponenten: 1-50 ng Matrizen-DNA (bei Verwendung von chromosomaler DNA bis zu 1 µg), 50 pmol eines jeden Primers, 200 µM jeden dNTPs, 10 % (v/v) DNA-Polymerase-Puffer (10x), 2 mM MgCl₂ und 1 U DNA-Polymerase. Wahlweise wurde das Ready-Mix™ REDTaq™ PCR Reaction Mix mit MgCl₂ (Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben verwendet. Sollten Gene möglichst ohne Fehler synthetisiert werden, wurde die *Pwo*-DNA-Polymerase benutzt, die eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und somit *Proofreading*-Aktivität besitzt. Für Kontroll-PCR Reaktionen wie z.B. *Insertscreens* und mutagenen PCR Reaktionen wurde *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Nach einer anfänglichen Denaturierung für 2 min bei 95 °C wurde der eigentliche Reaktionszyklus gestartet. Die Denaturierung erfolgte i.d.R. für 45 s bei 95 °C, das Primer-*Annealing* für 45 s bei der für das verwendete Primerpaar optimalen Temperatur (siehe unten) und die *Elongation* für 1 min/kb bei 72 °C. Es wurden jeweils 35 Zyklen durchgeführt. Es folgte eine abschließende Elongation für 10 min bei 72 °C. Durch das Abkühlen auf 4 °C wurde die PCR beendet.

Die Schmelztemperatur T_M eines Primers wurde nach einer empirischen Formel, die sowohl den relativen molaren GC-Gehalt (% GC) als auch die Länge der Primer n berücksichtigt, berechnet:

$$T_M = 69,3 + 0,41 \cdot (\%GC) - \frac{650}{n}$$

T_M : Schmelztemperatur [°C]

%GC: relativer molarer GC-Gehalt

n : Anzahl der Basen im Primer

Gleichung 3: Berechnung der Schmelztemperatur eines Primers.

Die T_M -Werte lagen i.d.R. zwischen 50 und 65 °C. Die *Annealing*-Temperatur T_A wurde i.d.R. über Gleichung 4 berechnet:

$$T_A = \left[\frac{T_{M1} + T_{M2}}{2} \right] - 3 \text{ °C}$$

T_A : Annealing-Temperatur [°C]

T_{M1} ; T_{M2} : Schmelztemperaturen der beiden Primer

Gleichung 4: Berechnung der *Annealing*-Temperatur in einer PCR-Reaktion.

Das PCR-Produkt wurde durch Agarosegelelektrophorese (2.3.2.4) analysiert. In Fällen, in denen die Abtrennung der Matrizen-DNA nicht notwendig war, wurde das PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll gereinigt. Andernfalls wurde das PCR-Produkt aus dem Gel extrahiert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll gereinigt. Die DNA-Fragmente lagen anschließend in 30 µl 1 mM Tris/HCl, pH 8.5 vor.

2.3.3.5 Insert-Screening

Zur schnellen Überprüfung des Erfolgs einer Klonierung wurden die nach einer Transformation erhaltenen Kolonien wie folgt behandelt: Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde der Kolonie etwas Zellmaterial entnommen, auf eine neue Agarplatte mit Zahlenraster überführt und der Rest der Zellmasse, die an der Pipettenspitze haften blieb, an die Innenwand eines PCR-Reaktionsgefäßes gestrichen. Um die Zellen aufzuschließen und somit das Plasmid für die PCR freizulegen, wurde das PCR-Reaktionsgefäß in einem herkömmlichen Mikrowellengerät für 1 min erhitzt und anschließend der PCR-Ansatz zugefügt. Der Ansatz enthielt i.d.R. Primer, die *upstream* und *downstream* der *Multiple Cloning Site* des Plasmids lagen (T7 Promotor/T7 Terminator für pET-Vektoren und 5'-pUC/3'-pUC für den pUC19 Vektor). Nach erfolgter PCR wurde die Größe des gewonnenen PCR Produkts durch Agarosegelelektrophorese (2.3.2.4) bestimmt.

2.3.3.6 Einführung von Punktmutationen in Gene

2.3.3.6.1 Splicing by Overlap Extension (SOE) PCR

Die SOE-PCR ist eine Form der DNA-Manipulation, mit der sich auf den Grundlagen der PCR (2.3.3.4) gerichtet Punktmutationen einführen lassen. In einer ersten PCR werden zwei sich überlappende Megaprimer hergestellt, die in einer zweiten PCR als Matrize und Primer zugleich dienen. Zur Herstellung des ersten Megaprimer wird ein DNA-Fragment mit einem das Gen stromaufwärts flankierenden und einem die Mutation enthaltenden Primer (Mutationsprimer) amplifiziert. Für den zweiten Megaprimer wird das DNA-Fragment mit dem komplementären Mutationsprimer und einem das Gen stromabwärts flankierenden Primer amplifiziert. Der überlappende Bereich der beiden Megaprimer enthält dann die Mutation. Wird der Mutationsprimer so definiert, dass eine Restriktionsschnittstelle wegfällt oder eine neue entsteht, wird die Identifizierung von Klonen mit

mutationstragender Sequenz erleichtert. In der zweiten PCR wird das Gesamtlängenfragment mit stromauf- und abwärts liegenden Primern und den beiden Megaprimern amplifiziert.

2.3.3.6.2 Error Prone PCR

Zur Zufallsmutagenese eines Gens wurde die *Error Prone* PCR Methode gewählt (Leung *et al.*, 1989). Als Grundlage dient eine PCR (2.3.3.4) unter Bedingungen, die den zufälligen Einbau falscher Nukleotide begünstigen. Darunter fällt die Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase, die keine *Proofreading* Aktivität besitzt, was im Schnitt zu einer Mutation pro 1000 eingebauter Nukleotide führt. Zusätzlich wird die Wahrscheinlichkeit eines Fehleinbaus durch die Verwendung ungleicher Konzentrationen der verschiedenen Desoxynukleotide, einer erhöhten $MgCl_2$ -Konzentration, sowie dem Zusatz von $MnCl_2$ gesteigert (Beckman *et al.*, 1985; Leung *et al.*, 1989). Durch die gewählten Bedingungen kann nicht nur die Spezifität, sondern auch die Produktivität der DNA-Polymerase beeinträchtigt werden. Daher wurden, ausgehend vom Ansatz einer konventionellen PCR (2.3.3.4), sechs Reaktionsbedingungen getestet (Tabelle 2.4). Mit der im Labor für andere Zufallsmutagenese-Projekte etablierten Reaktionsbedingung 1 (persönliche Mitteilung von Satoshi Akanuma) wurde kein Amplifikationsprodukt erhalten. In allen weiteren Versuchen wurde die $MgCl_2$ -Konzentration im Vergleich zur konventionellen PCR von 2 auf 7 mM erhöht. Die $MnCl_2$ -Konzentration wurde in den Reaktionsbedingungen 2 bis 4 variiert (0,1, 0,3 bzw. 0,5 mM $MnCl_2$) und 3-mal mehr dGTP als die restlichen Desoxyribonukleotide eingesetzt. Bei den Reaktionsbedingungen 2 bis 4 sinkt die Menge an Produkt mit steigender $MnCl_2$ -Konzentration, so dass bei den weiteren Versuchen nur 0,1 mM $MnCl_2$ eingesetzt wurde. Die Verdopplung der Primer-Konzentration (Reaktionsbedingung 5 und 6) bzw. die Erhöhung der *Taq*-DNA-Polymerase-Konzentration (Reaktionsbedingung 6) führte zu einer Steigerung der Produktmenge. Die Reaktionsbedingungen 5 und 6 unterscheiden sich im Verhältnis der Desoxynukleotide und führten jeweils zu Mutationsraten von drei bis vier Nukleotidaustauschen pro 1000.

Tabelle 2.4: Getestete Reaktionsbedingungen bei der *Error Prone* PCR

Spalte PCR: Bedingungen der konventionellen PCR; Spalten 1. bis 6.: getestete Reaktionsbedingungen bei der *Error Prone* PCR. (Gesamtvolumen: 100 µl)

	PCR	1	2	3	4	5	6
MgCl ₂ [mM]	2	1.5	7	7	7	7	7
MnCl ₂ [mM]	-	0.3	0.1	0.3	0.5	0.1	0.1
dNTPs [mM]	0.2	0.04	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
dGTP [mM]	-	0.2	1	1	1	1	-
dCTP [mM]	-	-	-	-	-	-	1
dTTP [mM]	-	-	-	-	-	-	1
Primer [pmol]	50	20	50	50	50	100	100
Matrize [ng]	1-50	1	10	10	10	10	10
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase [U]	1	1	1	1	1	1	5

Findet eine Fehlpaarung in den ersten Zyklen der PCR statt, kann diese Mutation durch die exponentielle Vermehrung der Fragmente im PCR-Produkt überrepräsentiert sein und so die Vielfältigkeit der Genbank vermindern. Um dies zu vermeiden, wurde ein 100 µl Ansatz in fünf bis zehn Aliquots aufgeteilt. Nach erfolgter PCR wurden die Aliquots eines Ansatzes wieder vereinigt und der Erfolg der PCR mittels Agarosegelelektrophorese (2.3.2.4) überprüft. Die DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel extrahiert und zur Klonierung in einen geeigneten Vektor mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (2.3.3.2).

2.3.3.7 DNA - Sequenzierung

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenzen von Genen wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte durch Auftragssequenzierung des Service Labors des Zentrums für Molekulare Medizin Köln sequenziert. Hier wurde das Kettenabbruch-Verfahren von Sanger *et al.* (1977) verwendet. Es wurden verschiedene fluoreszenzstoffmarkierte 2',3'-Didesoxynukleotide in der *Thermal Cycle Sequencing* Reaktion (Sears *et al.*, 1992; Slatko, 1994) eingesetzt, so dass es in der polymerasekatalysierten Strangsynthese zu zufälligen, 3'-terminal fluoreszenzmarkierten Einzelstrang-Abbruchfragmenten kam. Die erhaltenen Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das endständige Nukleotid anhand seiner Fluoreszenz-

eigenschaften detektiert. Als Matrize wurden 500-1000 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die Primermenge im Ansatz betrug 10 pmol. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit dem GCG Wisconsin Package.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Expression und Anreicherung von Proteinen

2.4.1.1 Protein-Produktion im analytischen Maßstab („Probe-expression“)

Um zu untersuchen, ob sich die klonierten Gene überexprimieren lassen, wurden „Probeexpressionen“ durchgeführt. Alle zu exprimierenden Gene lagen in Vektoren der pET-Serie (Novagen) vor, und standen somit unter Kontrolle des T7 Promotor- und *lac* Operator-Systems (2.1.2.1). Mit einer frisch transformierten *E. coli* BL21(DE3) bzw. *E. coli* BL21(DE3) *codon+* Kolonie wurden 5 ml LB Medium mit Kanamycin bzw. Kanamycin plus Chloramphenicol bei 37 °C über Nacht inokuliert. Mit dieser Kultur wurden weitere 20 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt. Daraufhin wurde der Ansatz auf zwei Kolben verteilt und in der einen Hälfte die Expression mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert, die andere ohne Zugabe von IPTG belassen. Nach Wachstum über Nacht wurden die Zellen durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 10 min, 4000 Upm und 4 °C) pelletiert und in 1 ml Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 5 mM CaCl₂) resuspendiert. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einem Ultraschall Desintegrator (Branson Digital Sonifier, Amplitude 25 %, 1 min auf Eis) aufgeschlossen. Von den Suspensionen wurden Aliquots von 100 µl (Pellet/*crude extract* oder löslicher Zellextrakt; P/C) entnommen. Alle Aliquots wurden pelletiert (Heraeus Biofuge *pico*, 5 min, 13000 Upm, 4 °C). Der Überstand von P/C wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt (*crude extract*; C) und das Pellet im entsprechenden Volumen Aufschlusspuffer resuspendiert (Pellet; P). Alle Proben wurden über SDS-PAGE (2.5.2) analysiert.

2.4.1.2 Protein-Produktion im präparativen Maßstab

Mit einer frisch transformierten *E. coli* BL21(DE3) bzw. *E. coli* BL21(DE3) *codon+* Kolonie wurden 50 ml LB Medium mit Kanamycin bzw. Kanamycin

plus Chloramphenicol bei 37 °C über Nacht inokuliert. Je 1 L LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika im 3 L-Erlenmeyer-Schikanekolben wurde mit der Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Zeigte die Probeexpression (2.4.1.1) an, dass eine Induktion mit IPTG notwendig war, wurde beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach Wachstum über Nacht erfolgte die Zellernte (Zentrifugation mit Sorvall RC-5B, Rotor HFA 12500, 10 min, 4000 Upm und 4 °C). Das Pellet wurde in 10-20 ml Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 5 mM CaCl₂) resuspendiert und die Zellen durch Sonifikation (Branson Digital Sonifier, Amplitude 50 %, dreimal 2 min, mit jeweils 2 min Pause) auf Eis aufgeschlossen. Um Nukleinsäuren zu fragmentieren, wurden 4 µl Benzonase-Stammlösung (25 U/µl) zugegeben und die Suspension für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde ein Aliquot von 100 µl für die spätere Analyse mittels SDS-PAGE (2.5.2) abgenommen (Pellet/*crude extract* oder löslicher Zellextrakt, P/C). Der Rest wurde ein- bis zweimal zentrifugiert (Sorvall RC-5C, Rotor HFA 22500, 30-45 min, 15000 Upm und 4 °C), wobei der Überstand jeweils in ein neues Röhrchen überführt wurde.

2.4.2 Proteinreinigung

Wurde für die Protein-Reinigung eine Chromatographie an der Perfusionschromatographie Anlage (BioCAD SPRINT Perfusion Chromatography System, Perkin Elmer) durchgeführt (2.4.2.1 - 2.4.2.3), erfolgte die Detektion der eluierenden Proteine über Absorptionsmessungen bei den Wellenlängen 280 nm und 260 nm. Die Elution der präparativen Gelfiltration an der FPLC-Anlage (2.4.2.5) wurde nur über die Absorption bei 280 nm verfolgt. Anhand der Elutionsprofile wurden einzelne Proben ausgewählt, die mit dem Bradford Assay (2.5.1.1) überprüft und ggf. mittels SDS-PAGE (2.5.2) weiter analysiert wurden.

2.4.2.1 Anionenaustauschchromatographie

Bei der Anionenaustauschchromatographie werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungen getrennt. Verwendet wurde eine MonoQ Säule (Pharmacia, MonoQ HR 16/10, Partikelgröße 10 µm, Säulenvolumen SV 20 ml). Hier ist an eine hydrophile Polyether-Matrix eine quartäre Ammoniumverbindung gekoppelt, die für die Eigenschaft der Säule als starker Anionentauscher verantwortlich ist. Die Proteine binden entsprechend

ihrer Ladung unterschiedlich stark und eluieren im Gradienten bei verschiedenen Salzkonzentrationen. Die Anionenaustauschchromatographie wurde an einer Perfusionschromatographie Anlage (BioCAD SPRINT Perfusion Chromatography System, Perkin Elmer) durchgeführt. Die MonoQ Säule wurde mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,6 äquilibriert, die Probe aufgetragen und bis zum Absinken der Absorptionsintensität auf Null mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,6 gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem NaCl Gradienten, anschließend wurde die Säule mit Hochsalz gereinigt und mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,6 regeneriert (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Methode zur Reinigung von Proteinen mit der MonoQ Säule (SV: 20 ml)

Flussrate	2 ml/min
Äquilibrieren	1,5 SV 10 mM Tris/HCl, pH 8,6
Laden	50-100 ml Probe
Waschen	2 SV 10 mM Tris/HCl, pH 8,6
Eluieren	12 SV linearer Gradient von 0-1,2 M NaCl in 10 mM Tris/HCl, pH 8,6
Reinigen	1 SV 1,5 M NaCl in 10 mM Tris/HCl, pH 8,6
Regenerieren	2 SV 10 mM Tris/HCl, pH 8,6

2.4.2.2 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie basiert auf der spezifischen, reversiblen Wechselwirkung von Proteinen mit an der Säulenmatrix gebundenen chemischen Gruppen. Die Elution erfolgt durch kompetitive Verdrängung des Proteins vom immobilisierten Liganden. Die Chromatographien wurden jeweils an einer Perfusionschromatographie-Anlage (BioCAD SPRINT Perfusion Chromatography System, Perkin Elmer) durchgeführt.

2.4.2.2.1 His-Tag

Nickel-Chelat-Säulen eignen sich für die Reinigung von Proteinen, die mit einem Hexahistidin-Tag fusioniert vorliegen, wobei die an die Säulenmatrix gebundenen Nickel-Ionen Koordinationsstellen für Histidine zur Verfügung stellen. Die Elution erfolgt durch einen Imidazolgradienten, wobei das Imidazol um die vom Protein besetzten Bindestellen der Säule konkurriert. Verwendet wurde eine Poros 20 MC Säule (10 mm Ø, Säulenvolumen SV 7,854 ml). Die Säule wurde vor jedem Lauf neu mit Nickelionen gelabelt. Hierzu wurden noch vorhandene Nickelionen mit 0,5 M EDTA entfernt und

mehrere Säulenvolumina mit 0,3 M NaCl gespült. Nach dem Auftrag von 0,2 M NiCl₂ wurde die Säule wiederum mit mehreren Säulenvolumina 0,3 M NaCl gespült und anschließend mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,6, 0,3 M NaCl äquilibriert. Die Probe wurde aufgetragen und bis zum Absinken der Absorptionsintensität auf Null mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,6, 0,3 M NaCl gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0,5 M Imidazol. Danach wurde die Säule mit 0,5 M Imidazol gereinigt und mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,6, 0,3 M NaCl regeneriert (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Methode zur Reinigung von Proteinen mit der Nickel-Chelat Säule (SV: 7,854 ml)

Äquilibrieren	1 SV 10 mM Tris/HCl, pH 8,6, 0,3 M NaCl Flussrate: 4 ml/min
Laden	50-100 ml Probe Flussrate: 2 ml/min
Waschen	20 SV 10 mM Tris/HCl, pH 8,6, 0,3 M NaCl Flussrate: 10 ml/min
Eluieren	10 SV linearer Gradient von 0-0,5 M Imidazol in 10 mM Tris/HCl, pH 8,6, 0,3 M NaCl Flussrate: 2 ml/min
Reinigen	1 SV 0,5 M Imidazol in 10 mM Tris/HCl, pH 8,6, 0,3 M NaCl
Regenerieren	2 SV 10 mM Tris/HCl, pH 8,6, 0,3 M NaCl

2.4.2.2.2 α -CD-Affinitätschromatographie

Bei der α -CD-Affinitätschromatographie wurde als spezifischer Ligand das Reaktionsprodukt α -CD genutzt, um das CGTase-Protein zu reinigen. Eine Epoxy-aktivierte Sepharose 6B-Matrix (Amersham Biosciences) wurde nach Herstellerangaben mit α -CD gekoppelt. Die Chromatographie wurde mit der selbstgepackten α -CD-Säule (16 mm \varnothing , 65 mm Höhe, Säulenvolumen SV 13,069 ml, Amersham) an der Perfusionschromatographie Anlage (BioCAD SPRINT Perfusion Chromatography System, Perkin Elmer) durchgeführt. Die α -CD Säule wurde mit 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl₂ äquilibriert, die Probe aufgetragen und bis zum Absinken der Absorptionsintensität auf Null mit 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl₂ gewaschen. Die Elution erfolgte durch 1 %iges (w/v) β -CD in 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl₂. Anschließend wurde die Säule mit 1,5 M NaCl gereinigt und mit 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl₂ regeneriert (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Methode zur Reinigung von Proteinen mit der α -CD Säule (SV: 13,069 ml)

Flussrate	0,5 ml/min
Äquilibrieren	1 SV 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl ₂
Laden	30-100 ml Probe
Waschen	5 SV 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl ₂
Eluieren	1,5 SV 1 % (w/v) β -CD in 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl ₂
Reinigen	1 SV 1,5 M NaCl in 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl ₂
Regenerieren	3 SV 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl ₂

2.4.2.3 Hydroxylapatit-Chromatographie

Hydroxylapatit besteht aus kristallinem Calciumphosphat ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), an dessen nicht-poröser Oberfläche sowohl Amino- als auch die Carboxygruppen von Proteinen adsorbieren. Die positiv geladenen Aminogruppen interagieren hierbei mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Säulenmatrix über unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen. Die negativen Carboxygruppen werden dagegen von den Calciumionen komplexiert. Die Trennung beruht demnach auf dem unterschiedlich basischen bzw. sauren Charakter von Proteinen. Durch Zugabe von CaCl₂ bzw. MgCl₂ kann z.B. die Bindung von basischen Proteinen herabgesetzt werden, da die negative Ladung der Phosphatgruppen der Säulenmatrix durch die zweiwertigen Kationen neutralisiert wird. Verwendet wurde eine selbstgepackte Säule (26 mm \varnothing , 70 mm Höhe, Säulenvolumen SV 37,165 ml, Amersham). Die Chromatographie wurde an einer Perfusionschromatographie-Anlage (BioCAD SPRINT Perfusion Chromatography System, Perkin Elmer) durchgeführt. Die Hydroxylapatit-Säule wurde mit 5 mM KP, pH 8,0 äquilibriert, die Probe aufgetragen und bis zum Absinken der Absorptionsintensität auf Null mit 5 mM KP, pH 8,0 gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 5 bis 300 mM KP, pH 8,0. Anschließend wurde die Säule mit 0,5 M KP, pH 8,0 gereinigt und mit 5 mM KP, pH 8,0 regeneriert (Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: Methode zur Reinigung von Proteinen mit der Hydroxylapatit-Säule (SV: 37,165 ml)

Flussrate	1,5 ml/min
Äquilibrieren	1 SV 5 mM KP, pH 8,0
Laden	20 ml Probe
Waschen	5 SV 5 mM KP, pH 8,0
Eluieren	10 SV Gradient von 5-300 mM KP, pH 8,0
Reinigen	1 SV 0,5 M KP, pH 8,0
Regenerieren	2 SV 5 mM KP, pH 8,0

2.4.2.4 Proteinfällung mit Ammoniumsulfat

Die Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat beruht auf den antichaotropen Eigenschaften des Salzes, die die hydrophoben Effekte in der Lösung vergrößern, so dass die Proteine (reversibel) aggregieren und präzipitieren. Bei einer fraktionierten Fällung, d.h. portionsweiser Zugabe des Salzes, wird das Protein möglichst schonend präzipitiert und kann von Verunreinigungen abgetrennt werden. Die Aussalzung erfolgte durch schrittweise Zugabe von Ammoniumsulfat mit einem Löffel zu 20-25 ml Proteinlösung unter Rühren bei RT bis zu einer Endkonzentration von 80 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nach jeder Zugabe wurde 30 min gerührt und ein Aliquot von 20 μl entnommen, um den Erfolg der Fällung zu dokumentieren. Die entnommenen Aliquots wurden nach der Fällung scharf abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *fresco*, 30 min, 13000 Upm und 4 °C), der Überstand verworfen und die Pellets in 20 μl SDS Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.5.2). Dabei zeigte sich, dass das Protein mit steigender Ammoniumsulfatkonzentration präzipitiert, eine vollständige Fällung wird erst mit 80 % (w/v) Ammoniumsulfat erreicht. Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung führte allerdings nicht zur Abtrennung der Proteinbanden zwischen 14 und 70 kDa, d.h. sie zeigten das gleiche Präzipitationsverhalten wie das Protein der Hauptbande (zwischen 66 und 97 kDa, Abbildung 3.1). Die 80 %ige Ammoniumsulfat-Proteinlösung wurde ebenfalls scharf abzentrifugiert (Sorvall RC-5B, Rotor HFA12500, 2-mal 20 min, 12000 Upm und 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml 10 mM Tris/HCl, pH 9,2 resuspendiert. Um Ammoniumsulfat zu entfernen und das Protein wieder in Lösung zu bringen, wurde gegen 10 mM Tris/HCl, pH 9,2 dialysiert (2.4.2.6).

2.4.2.5 Präparative Gelfiltration

Falls erforderlich wurde als letzter Schritt einer Proteinreinigung eine Gelfiltration in präparativem Maßstab durchgeführt. Bei der Gelfiltration werden Moleküle aufgrund ihrer Größe und des daraus resultierenden Permeationsverhaltens in einem porösen Trägermaterial aufgetrennt. Größere Moleküle können nicht in die Poren der Matrix eindringen und eluieren demnach sehr schnell. Kleinere Moleküle dringen in die Poren ein und erfahren dadurch eine Retention. Verwendet wurde eine präparative Gelfiltrationssäule (HiLoad 26/60 Superdex 75 pg, Säulenvolumen SV 320 ml, Pharmacia). Die Probe durfte ein Volumen von 13 ml, entsprechend 5 % des SV, nicht überschreiten und wurde daher mit Hilfe von Amicon 30 Konzentratoren (Millipore) nach Herstellerangaben vor der Chromatographie einkonzentriert. Der Proteinlösung wurde NaCl zu einer Endkonzentration von 0,3 M zugegeben und scharf abzentrifugiert (Sorvall RC-5B, Rotor HFA12500, 45 min, 15000 Upm und 4 °C), um Schwebeteilchen zu entfernen. Die Probe wurde in den *Superloop* der FPLC Anlage (Amersham Pharmacia Biotech) eingeführt und von dort auf die Säule geladen. Diese wurde zuvor mit 1 SV 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 5 mM CaCl₂, 0,3 M NaCl äquilibriert. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml/min (max. Rückdruck: 0,3 MPa) mit 450-480 ml 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 5 mM CaCl₂, 0,3 M NaCl. Fraktionen mit einem Volumen von 5 ml wurden ab 50 ml Elutionsvolumen bis zum Ende des Laufs gesammelt. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden gegen 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 5 mM CaCl₂ bei 4 °C dialysiert (2.4.2.6), ggf. mit Amicon 30 Konzentratoren (Millipore) einkonzentriert (2.4.2.7) und anschließend in flüssigem Stickstoff eingetroppt und bei -80 °C gelagert (2.4.2.8).

Die Gelfiltration wurde auch analytisch zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts sowie des Oligomerisierungszustandes verwendet (2.5.6).

2.4.2.6 Dialyse von Proteinlösungen

War ein Pufferwechsel zwischen Reinigungsschritten notwendig, wurden die Proteinlösungen gegen einen mindestens 100-fachen Volumenüberschuss an gewünschtem Puffer für mindestens 4 h bei 4 °C im Dialyseschlauch (Spektropor 2, Ausschlussgröße 12000-14000) dialysiert, wobei der Puffer zwei- bis dreimal gewechselt wurde. Die Probe wurde anschließend abzentrifugiert (Sorvall RC-5C, Rotor HFA 22500, 30 min, 15000 Upm und 4 °C). Nur bei Verwendung eines Tris/HCl-Puffers mit einem pH-Wert > 8,5

(bei 25 °C) wurde bei RT dialysiert, da das CGTase-Protein unter diesen Bedingungen bei 4 °C ausfiel.

2.4.2.7 Einkonzentrierung von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden über Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices (Porengröße 30000 Da) nach Angaben des Herstellers auf ca. 1 bis 5 ml einkonzentriert.

2.4.2.8 Lagerung von Proteinen

Die konzentrierten Proteine wurden in flüssigen Stickstoff getropft und die gefrorenen Kügelchen bei –80 °C gelagert. Eine kurzfristige Lagerung (über Nacht) erfolgte auf Eis bei 4 °C.

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.5.1.1 Der Bradfordtest

Der Bradfordtest ist ein Verfahren zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts in wässrigen Lösungen. Er beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren *Coomassie Brilliant Blue* G250-Lösung bei Bindung des Farbstoffs an Proteine von 465 auf 595 nm verschiebt (Bradford, 1976). Es handelt sich um eine unspezifische Bindung des Farbstoffs vorwiegend an kationische, nichtpolare und hydrophobe Seitenketten. Die Intensitätszunahme der Farbreaktion ist über einen Bereich von 0,2-1,4 mg Protein pro ml Lösung annähernd linear. Es wurde ein Protein-Assay Kit von Bio-Rad verwendet. Dabei wurden 200 µl des *Coomassie Brilliant Blue* G250-Lösung mit 800 µl der Proteinlösung vermischt und nach ca. 5 min die Absorption der Lösung bei 595 nm gemessen. Als Referenz diente mit 200 µl *Coomassie Brilliant Blue* G250-Lösung versetzter Puffer. Eine Kalibrierungskurve wurde mit bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt. Es ist zu beachten, dass der Assay durch SDS (>0,1 %) und starke Basen beeinflusst werden kann. Das Ergebnis ist jedoch auch abhängig von der Aminosäure-zusammensetzung des Proteins, so dass die aus der BSA-Kalibrierungskurve abgeleiteten Proteinkonzentrationen immer nur einen Anhaltspunkt darstellen. In kleinem Maßstab diente der Bradfordtest zur Analyse der Elutionsfraktionen von

Chromatographien. Hierbei wurden nur 2 μl *Coomassie Brilliant Blue G250*-Lösung mit 8 μl Elutionsfraktionslösung gemischt und die Anwesenheit von Proteinen in der Fraktion durch die Blaufärbung festgestellt.

2.5.1.2 UV-Absorption

Ultraviolettes (UV) Licht wird von den aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, sowie von Disulfidbrücken (Cystinen) in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 300 nm unterschiedlich stark absorbiert. Aus der Aminosäuresequenz kann nach Pace *et al.* (1995) der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{280} errechnet werden (Gleichung 5).

$$\epsilon_{280} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) = \sum \text{Trp} * 5500 + \sum \text{Tyr} * 1490 + \sum \text{Cystine} * 125$$

ϵ_{280} : molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

Gleichung 5: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten eines Proteins aus der Aminosäuresequenz (Pace *et al.*, 1995)

Damit kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei 280 nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) bestimmt werden (Gleichung 6).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad \Rightarrow \quad c = \frac{A}{\epsilon \cdot d}$$

A: Absorption

c: Konzentration [M]

d: Schichtdicke [cm]

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

Gleichung 6: Das Lambert-Beer'sche Gesetz

Absorption bei Wellenlängen größer als etwa 305 nm geht auf Lichtstreuung zurück, um die die gemessene Absorption bei 280 nm durch lineare Extrapolation ggf. korrigiert wurde. Im Anhang (6.4) sind die molaren Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten Proteine zusammengestellt.

2.5.2 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine werden durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und negativ geladen. Dabei bindet SDS an das Protein gewöhnlich in einem Verhältnis von einem Molekül SDS pro 1,4 Aminosäureresten. Die Eigenladung des Proteins kann neben der Negativladung des mit SDS komplexierten Proteins vernachlässigt werden, so dass SDS-beladene Proteine identische Ladungs-Masse-Verhältnisse zeigen. Die Auftrennung beruht daher allein auf dem Siebeffekt des Polyacrylamidgels, wobei die Proteine mit Geschwindigkeiten wandern, die dem Logarithmus ihrer Massen umgekehrt proportional sind (Laemmli, 1970). Durch Vergleich mit dem ebenfalls auf das Gel aufgetragenen Proteinlängenstandard kann das Molekulargewicht eines Proteins abgeschätzt werden. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA in 0,075 cm dicken Gelen durchgeführt. Die verwendete Polyacrylamidkonzentration betrug 12,5 % (w/v). Bei der Herstellung der Gele wurde eine Gießapparatur (Multi Gel Caster) verwendet, mit der 12-13 Gele gleichzeitig gegossen werden konnten. Für die Fertigung wurde nach dem Rezept aus Tabelle 2.9 vorgegangen. Zur Lagerung der fertigen Gele wurden diese in mit SDS-PAGE-Laufpuffer getränkte Papiertücher geschlagen und bei 4 °C bis zu 14 Tage aufbewahrt.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels.

	Sammelgel (6 %)	Trenngel (12,5 %)
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	4,4 ml	27,1 ml
Sammelgel-/Trenngelpuffer	6,8 ml	14,8 ml
Wasser	15,2 ml	23,0 ml
10 % (w/v) APS	100 µl	130 µl
TEMED	22,0 µl	32,5 µl

Die fertigen Gele wurden in eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresekammer (Hofer) gesetzt und mit den zu untersuchenden Proben (bis zu 20 µl pro Tasche) beladen. Die Proben wurden vor dem Auftrag 1:1 mit 2-mal SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 100 °C erhitzt und abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 1 min, 13000 Upm und RT). Als Längenstandard diente der *low molecular weight* Längenstandard (Pharmacia; 2.1.4.2.1). Als Laufpuffer diente SDS-PAGE-Laufpuffer. Nach

der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit einer *Coomassie Brilliant Blue* G250 und R250-Färbung sichtbar gemacht. Hierzu wurde das Gel 10 bis 30 min in SDS-PAGE-Färbelösung geschwenkt und anschließend in Wasser in der Mikrowelle (3-mal 2 min, 900 W) entfärbt. Sollten die Gele auf eine Membran geblottet werden (2.5.4), wurde auf die vorherige Anfärbung mit *Coomassie Brilliant Blue* verzichtet.

2.5.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Native PAGE)

Bei einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese hängt die Geschwindigkeit, mit der ein nativ gefaltetes Protein durch ein elektrisches Feld wandert, von seiner Nettoladung, Größe und Form ab. Somit können kovalente Modifikationen und Konformationsänderungen das Laufverhalten im Gel beeinträchtigen und somit detektiert werden. Dagegen ist, im Gegensatz zur SDS-PAGE, die Abschätzung von Molekulargewichten über Proteinlängenstandards nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde für die native PAGE ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet. Ähnlich der SDS-PAGE wurden die Proteine zunächst in einem Sammelgel konzentriert, bevor sie im Trenngel aufgetrennt wurden.

Tabelle 2.10: Zusammensetzung eines nativen Polyacrylamidgels.

	Sammelgel (5 %)	Trenngel (8,5 %)
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	1,6 ml	2,8 ml
Sammelgel-/Trenngelpuffer	2,5 ml	1,8 ml
60 % Saccharose	--	1,2 ml
Wasser	5,6 ml	4,2 ml
10 % (w/v) APS	12,5 µl	10,4 µl
TEMED	10,0 µl	2,2 µl

Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA in 0,075 cm dicken Gelen durchgeführt. Die verwendete Polyacrylamidkonzentration betrug 8,5 %. Bei der Herstellung der Gele wurde wie bei der SDS-PAGE (2.5.2) verfahren, allerdings wurde das Rezept aus Tabelle 2.10 verwendet. Die fertigen Gele wurden in eine auf 4 °C gekühlte Polyacrylamidgelelektrophoresekammer (Hofer) gesetzt und mit den zu untersuchenden Proben (bis zu 20 µl pro Tasche) beladen. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit 2-mal nativem PAGE-Probenpuffer versetzt. Als Laufpuffer diente nativer PAGE-Laufpuffer. Nach der Elektrophorese wurden

die aufgetrennten Proteine mit einer *Coomassie Brilliant Blue* G250 R250-Färbung sichtbar gemacht. Hierzu wurde das Gel 10 bis 30 min in SDS-PAGE-Färbelösung geschwenkt und anschließend in Wasser in der Mikrowelle (3-mal 2 min, 900 W) entfärbt. Sollten die Gele auf eine Membran geblottet werden (2.5.4), wurde auf die vorherige Anfärbung mit *Coomassie Brilliant Blue* verzichtet.

2.5.4 Western Blot Analyse und Entwicklung mit alkalischer Phosphatase

Der immunologische Nachweis einzelner Proteine erfolgte nach dem Elektroblobverfahren von Towbin *et al.* (1979), wobei die semi-dry-Blotting Methode mit kontinuierlichem Puffersystem nach Kyhse-Andersen (1984) und Tovey & Baldo (1987) angewendet wurde. Die über SDS-PAGE oder native PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Elektroblobverfahren unter Verwendung einer Hoefer SemiPhor semi-dry transfer unit (Modell TE70; Hoefer Pharmacia Biotech Inc.; Blotting-Kammer) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Western Blotting Membran (Roche Diagnostics GmbH) übertragen. Dabei wurden zunächst 10-12 Lagen in Blot-Puffer getränkte Munktell-Filterpapiere als Unterlage auf die untere Graphitplatte (Anode) der Blotting-Kammer gelegt und Luftblasen mit einer Glaspipette durch Glattstreichen entfernt. Die auf die Gelgröße zurechtgeschnittene PVDF-Membran wurde kurz in Methanol aktiviert, in MILLIPORE-Wasser 2-3 min geschwenkt, mit Blot-Puffer 2-3 min equilibriert und auf die Munktell-Filterpapiere gelegt. Anschließend wurde auf die PVDF-Membran das SDS-Gel bzw. das native Gel gelegt und mit einem Bleistift eine Markierung vorgenommen, sowie ggf. die Höhe der Markerbanden des *RainbowTM coloured protein molecular weight marker* auf der Membran gekennzeichnet. Nachdem mit der oberen Graphitplatte (Kathode) die Blotting-Kammer geschlossen wurde, erfolgte der Blot bei 100 mA (~2 mA pro cm² Gel) für 20 min.

Zur Anfärbung der geblotteten CGTase wurde ein *primärer* Peptid-Antikörper aus Kaninchen und ein *sekundärer* Anti-Rabbit-IgG Antikörper, der als Konjugat mit dem Enzym alkalische Phosphatase (Blake *et al.*, 1984) vorlag, verwendet. Der *primäre* Peptid-Antikörper wurde von der Firma Eurogentec (Herstal, Belgien) hergestellt. Für die Immunisierung von Kaninchen wurden zwei Peptide der CGTase (H₂N-CNG DPY NRK PMS SFD Q-CONH₂; H₂N-TDR FLD GDK YNN PTC-CONH₂) synthetisiert und an den Träger Keyhole

Limpet Haemocyanin gekoppelt. Der *sekundäre* Antikörper wurde von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen.

Zur Blotentwicklung wurde die Membran in ein 50 ml Falcon-Röhrchen so überführt, dass die Protein-behaftete Seite innen zu liegen kam. Während der Inkubationszeiten wurde das Röhrchen auf eine Rolling-Plattform gelegt, damit der jeweilige Puffer kontinuierlich über die Membran floss. Zunächst wurde die Membran 1 h bei RT mit 50 ml Blot-Block-Puffer abgeblockt, um unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper mit der Membran zu verhindern. Anschließend wurde dreimal mit WesternBlot (WB)-Puffer gewaschen (40-50 ml, 10-15 min, RT) und die Membran mit dem *primären* Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung inkubiert (10 µl *primärer* Antikörper in 10 ml WB-Puffer, 1 h, RT oder über Nacht, 4 °C). Nach dreimaligem Waschen mit WB-Puffer (40-50 ml, 10 min, RT) wurde die Membran mit dem *sekundären* Antikörper in einer 1:10000 Verdünnung inkubiert (1 µl *sekundärer* Antikörper in 10 ml WB-Puffer, 1 h, RT). Danach wurde die Membran fünfmal mit WB-Puffer gewaschen (40-50 ml, mind. 5 min, RT) und für 5 min mit 10 ml Entwicklungspuffer bei RT äquilibriert. Die Entwicklungslösung wurde immer frisch in einer verschließbaren Aluminiumschale hergestellt. Bromo-Chloro-Indolylphosphat (BCIP) wird von der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert und danach durch das Oxidationsmittel Nitroblau-Tetrazolium (NBT) in einen blauen Indigofarbstoff überführt. Das NBT selbst reagiert dabei ebenfalls zu einem blauen Farbstoff und wirkt somit farbverstärkend. Beide Farbstoffe sind wasser- und lipidunlöslich und werden als blauer Niederschlag auf der Membran sichtbar. Mit einer Pinzette wurde die Membran aus dem Röhrchen genommen und sehr kurz ohne Schwenkbewegung in die Entwicklungslösung getaucht. Die enzymatische Reaktion wurde durch schnelles Eintauchen in 3 L demineralisiertes Wasser aufgrund der hohen Verdünnung der Entwicklungslösung unterbrochen. Sollte die Entwicklung irreversibel abgestoppt werden, wurde die Membran in 3 % (v/v) Trichloressigsäure getaucht. Abschließend wurde die Membran lichtgeschützt getrocknet und gescannt.

2.5.5 Trypsinspaltung

Die Stabilität und Flexibilität von Proteinen kann über ihre Stabilität gegenüber Proteasen getestet werden (Hubbard, 1998). In dieser Arbeit wurde die Serinprotease Trypsin verwendet, die Peptidbindungen spezifisch

C-terminal von Lysin und Arginin spaltet. Die Reaktionen wurden in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 5 mM CaCl₂ bei RT mit einem Trypsin/Substrat-Verhältnis von 1:100 (w/w) durchgeführt und nach 90 min durch Zugabe eines identischen Volumens an 2-mal SDS-PAGE-Probenpuffer und fünfminütiges Erhitzen auf 100 °C abgestoppt. Das Ergebnis wurde anschließend über SDS-PAGE analysiert (2.5.2).

2.5.6 Analytische Gelfiltration

Bei der analytischen Gelfiltration werden Moleküle aufgrund ihrer Größe und des daraus resultierenden Permeationsverhaltens in einem porösen Trägermaterial aufgetrennt. Größere Moleküle können nicht in die Poren der Matrix eindringen und eluieren schneller als kleinere Moleküle, die in die Poren eindringen und dadurch eine Retention erfahren. Bei globulären Proteinen besteht bei konstanter Flussrate ein linearer Zusammenhang zwischen der Elutionszeit und dem Logarithmus des Molekulargewichtes. So kann mit Hilfe einer Kalibrierungsgeraden von der Elutionszeit auf das apparente Molekulargewicht eines monomeren Proteins bzw. den Assoziationszustand eines oligomeren Proteins geschlossen werden. Weicht die Gestalt des Proteins von der globulären Form ab, so können sich jedoch erhebliche Differenzen zum tatsächlichen Molekulargewicht ergeben. Anhand des Elutionsprofils lässt sich außerdem die Homogenität einer Proteinlösung analysieren: Je symmetrischer der Elutionspeak, desto homogener die Lösung. Es wurde eine analytische Superdex[®]75-Säule HR10/30 (Pharmacia) mit einem Säulenvolumen von 24 ml an einer BioCAD[™] Sprint-Anlage (Perseptive Biosystems) verwendet. Die Säulenmatrix besteht aus Agarosepartikeln mit kovalent gebundenen Dextranmolekülen. Die Säule wurde mit 50 mM KP, pH 7,5, 0,3 M KCl äquilibriert und zunächst mit Proteinen bekannten Molekulargewichts kalibriert. Es wurden 200 µl einer 0,1 mg/ml konzentrierten Proteinlösung über den Auftragsloop auf die Säule injiziert. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0,4 ml/min und einem maximalen Rückdruck von 1,7 MPa, und wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Eluierte Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (2.5.2).

2.5.7 Dynamische Lichtstreuung

Bei der dynamischen Lichtstreuung (DLS) wird die relative Bewegung von Makromolekülen in Bezug zum Lösungsmittel gemessen. In dieser Arbeit

wurde DLS hauptsächlich verwendet, um die Monodispersität von Proteinlösungen, d.h. ihre Einheitlichkeit bezüglich Größe und Assoziationsgrad, zu testen. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Kristallisierbarkeit eines Proteins. Unter bestimmten Annahmen, welche vor allem eine sphärische Form des Moleküls voraussetzen, ist mittels DLS aber auch eine relativ verlässliche Abschätzung des Molekulargewichts globulärer Proteine möglich.

Bei der Messung wird Laserlicht auf eine Proteinlösung gerichtet und die Intensität des resultierenden Streulichtes mittels Photodetektor in einem oder mehreren Winkeln aufgenommen. Verursacht durch die Brown'sche Molekularbewegung schwanken die Streuintensitäten mit der Zeit, wobei die Intensitätsfluktuationen von der Mobilität eines Proteinmoleküls abhängen. Größere oder asymmetrische Proteine, die sich langsamer bewegen, zeigen langsamere Fluktuationen als kleine oder globuläre Proteine. Aus dem zeitlichen Verlauf der Molekularbewegung wird der Diffusionskoeffizient bzw. die Verteilung von Diffusionskoeffizienten ermittelt. Mittels Stokes-Einstein-Beziehung können daraus wiederum die hydrodynamischen Radien der diffundierenden Teilchen berechnet werden. Aus dem hydrodynamischen Radius eines Partikels in Lösung lässt sich abschließend das Molekulargewicht ableiten. Es wurde das DLS Photometer DynaPro 801 (ProteinSolutions) verwendet. Um die Proteinlösung von Staubpartikeln und größeren Aggregaten zu befreien, wurde sie vor Einfüllen in die Küvette filtriert (Ultrafree®-MC Millipore-Filter, 0,2 µm). Es wurden 20 Einzelmessungen mit 15 µl einer 1,5-4,5 mg/ml konzentrierten Proteinlösung durchgeführt und gemittelt. Die Auswertung erfolgte unter der Annahme einer monomodalen Verteilung (nur eine Partikelgröße in Lösung) mit dem Programm Dynamics. Eine monomodale Verteilung der Messwerte liegt laut Herstellerangaben dann vor, wenn der Polydispersitäts-Parameter kleiner als 20 % des hydrodynamischen Radius und die Basislinie $\leq 1,005$ ist, sowie der Fehler (*sum of square*-Wert, SOS-Wert) zwischen 0,5 und 5 liegt. Unter diesen Bedingungen liegen also in der Versuchslösung nur Teilchen einer Größe vor. Die Lösung ist homogen.

2.5.8 Fluoreszenz-Messungen

Absorbiert ein Molekül Licht bestimmter Wellenlänge, so wird es von einem energetischen Grundzustand in einen angeregten Zustand transferiert. Die Rückkehr in den Grundzustand kann u.a. durch die Emission eines Photons

geschehen. Dieser Vorgang ist als Fluoreszenz messbar. Die Energie eines emittierten Photons ist geringer als die eines absorbierten, was einer Verschiebung zu größerer Wellenlänge, also einer Rotverschiebung entspricht. Die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen beruht auf der aromatischen Aminosäure Tryptophan und zu einem wesentlich geringeren Anteil auf Tyrosin, die beide Licht bei einer Wellenlänge von etwa 280 nm maximal absorbieren. Die Fluoreszenzemission wird zwischen 300 nm und ca. 400 nm gemessen. Nach Anregung bei 295 nm ist die Fluoreszenzemission ausschließlich auf Tryptophan zurückzuführen, da Tyrosin bei dieser Wellenlänge praktisch nicht absorbiert. Die Fluoreszenz von Tryptophan zeigt eine Abhängigkeit von der Polarität der Umgebung. Eine polare Umgebung hat ein Maximum bei ca. 350 nm zur Folge, gegenüber einem Maximum bei 320 bis 330 nm in unpolarer Umgebung. Über die Messung von Fluoreszenzspektren kann also eine Aussage über die Umgebung eines Tryptophans in einem Protein gemacht werden. Daraus wiederum kann auf den Faltungszustand bzw. eine intakte Tertiärstruktur eines Proteins geschlossen werden (Schmid, 1997). Die Messungen wurden am Fluoreszenz Spektrophotometer Cary Eclipse (Varian) durchgeführt. In einer vierseitig geschliffenen Quarzküvette wurde die Proteinlösung, zur Verhinderung des inneren Filtereffekts, auf eine Konzentration von maximal 0,2 μ M in 10 mM Tris/HCl, pH 9,2, 1 mM CaCl₂, verdünnt. Die Fluoreszenz wurde bei 25 °C und einer Wellenlänge von 280 nm (Tryptophan- und Tyrosinfluoreszenz) bzw. 295 nm (nur Tryptophanfluoreszenz) angeregt und das emittierte Signal in einem Bereich von 300 bis 450 nm aufgenommen (Scangeschwindigkeit: 600 nm/min; Photomultiplierspannung: 600 V; Excitation slit: 10 nm; Emission slit: 5 nm). Es wurden je 10 Messungen gemittelt. Ein Pufferspektrum diente als Nullwert.

2.5.9 Circular Dichroismus (CD)-Messungen

Die CD-Spektroskopie beruht auf der Wechselwirkung von zirkular polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen. In linear polarisiertem Licht bewegt sich das elektromagnetische Feld wellenförmig senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Linear polarisiertes Licht besteht im Prinzip aus zwei zirkular polarisierten Komponenten, deren elektromagnetisches Feld helixartig um die Ausbreitungsrichtung rotiert. Dem Umlaufsinn entsprechend werden sie als rechts- bzw. linkszirkular polarisiert bezeichnet. Bei der CD-Spektroskopie wird die unterschiedliche Absorption des rechts- bzw.

linkszirkular polarisierten Lichts durch ein optisch aktives Molekül ausgenutzt. Es wird die Differenz der Absorptionskoeffizienten der beiden Komponenten gemessen und als Elliptizität angegeben. Da alle Aminosäuren außer Glyzin ein chirales Zentrum besitzen, eignet sich die CD-Spektroskopie besonders zur Strukturanalyse von Proteinen (Schmid, 1997). Spektren im Bereich von 185 nm bis 250 nm (fern-UV-CD-Spektroskopie) beruhen auf der Absorption der Peptidbindungen, die sehr empfindlich von der Konformation der Bindungen abhängt. Entsprechend unterscheiden sich die fern-UV-CD Spektren von α -Helix, β -Faltblatt und Zufallsknäuel deutlich voneinander (Johnson, 1990), weswegen fern-UV-CD Spektren Aussagen über die Sekundärstruktur eines Proteins ermöglichen. Im nah-UV Bereich (250 bis 310 nm) basiert das Spektrum auf der Absorption aromatischer Aminosäuren, insbesondere der Tryptophane. Ein ausgeprägtes nah-UV-CD-Spektrum belegt, dass die Tryptophanreste sich in einer asymmetrischen Umgebung befinden und ist somit ein sehr empfindlicher Nachweis für eine definierte Tertiärstruktur. Die CD-Messungen wurden an einem Jasco J-715 Spektralpolarimeter bei 22 °C durchgeführt. Die Schichtdicke der Küvette betrug 0,1 cm oder 0,5 cm. Das CD-Signal, gemessen als Elliptizität Φ_{obs} , wurde in Abständen von 0,1 nm aufgenommen (Scan-Geschwindigkeit 50 nm/min. Mittelwertbildung aus 10 Spektren). Die Werte wurden in molare Elliptizität Φ umgewandelt, welche die Elliptizität einer 1 dmol/cm³ Lösung bei einer Schichtdicke von 1 cm in mGrad beschreibt. Die Werte im fern-UV CD werden oft als Φ_{MRW} angegeben, was der durchschnittlichen molaren Elliptizität pro Aminosäurerest entspricht. Die Umrechnung erfolgte nach folgender Formel (Gleichung 7; Schmid, 1997):

$$\Theta_{\text{MRW}} = \frac{\Theta_{\text{obs}} * \text{MRW}}{c * d * 10} = \frac{\Theta_{\text{obs}} * M_{\text{R}}}{c * d * N_{\text{A}} * 10}$$

Θ_{MRW} : durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure [Grad * cm²/dmol]

Θ_{obs} : gemessene Elliptizität [mGrad]

MRW: mittleres Molekulargewicht der Aminosäuren [g/mol]

c: Konzentration der Proteinlösung [mg/ml]

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

M_{R} : Molekulargewicht des Proteins [g/mol]

N_{A} : Anzahl der Aminosäuren im Protein

Gleichung 7: Berechnung der durchschnittlichen Elliptizität pro Aminosäure aus fern-UV CD-Spektren

2.5.10 Differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC)

Bei der Differentiellen Scanning Kalorimetrie werden Proben elektrisch mit einer vorgegebenen Heizrate schrittweise erwärmt. Dabei werden eine Probenzelle (Protein gelöst in Puffer) und eine Referenzzelle (nur Puffer) simultan aufgeheizt. Vollzieht sich in der Messzelle eine temperaturinduzierte Reaktion, führt dies zu einer minimalen Temperaturdifferenz ΔT . Ein solches Temperaturungleichgewicht zwischen Mess- und Referenzzelle wird von dem Gerät erkannt und durch Variation des Heizstromes (ΔI) ausgeglichen. Durch Registrierung von ΔI lässt sich somit auf die Wärmekapazität C_p (kcal/mol/K) bei der jeweiligen Temperatur schließen, wobei es sich um die Energie handelt, die zur Erwärmung einer Proteinlösung um 1 K bei konstantem Druck notwendig ist. DSC kann Aufschluss geben über den Schmelzpunkt T_m von Proteinen (Temperatur, bei der der Anteil von ungefaltetem Protein (A_U) gleich dem Anteil von gefaltetem Protein (A_F) ist, so dass gilt: $K = 1$ und $\Delta G_{FU} = 0$), sowie, im Falle der Reversibilität der Auffaltung, über die Enthalpieänderung (ΔH) bei der thermischen Denaturierung und die Anreicherung von Auffaltungsintermediaten. Die DSC-Messungen wurden an einem VP-DSC Microcalorimeter mit Scanraten zwischen 0,1 und 1 °C/min durchgeführt und der Verlauf von C_p mit der Temperatur registriert. In der Meßzelle befand sich 1 mg/ml Protein in 50 mM Tris/HCl, pH 9,35 bei 25 °C (entsprechend pH 8,0 bei 70 °C; Stoll & Blanchard, 1990). Der Einfluss von Ca^{2+} -Ionen auf die Stabilität der Proteine wurde untersucht, in dem entweder 5 mM $CaCl_2$ oder 20 mM EDTA zugegeben wurde oder die Proteinlösung gegen Ca^{2+} -freies 50 mM Tris/HCl, pH 9,35 bei 25 °C (siehe oben) bei RT dialysiert wurde (2.4.2.6). In der Referenzzelle befand sich die jeweils identische Lösung ohne Protein.

2.5.11 *Steady state* - Enzymkinetik

Die Cyclisierungsaktivität (Cyclodextrin-Produktion aus Stärke) der CGTase wurde unter Fließgleichgewichtsbedingungen (*steady-state*) kontinuierlich und diskontinuierlich bei verschiedenen Temperaturen, pH-Werten, Substrat- und Enzymkonzentrationen gemessen.

2.5.11.1 Diskontinuierliche Messung der Cyclisierungsaktivität

Bei einer diskontinuierlichen Aktivitätsmessung werden einem Reaktionsansatz Aliquots zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, die

Reaktion darin abgestoppt und die gebildete Konzentration an Produkten bestimmt. Bei Auftragung der Produktkonzentration gegen die Zeit entspricht die Steigung der Anfangsgeschwindigkeit v_i bei den gegebenen Reaktionsbedingungen.

Die diskontinuierliche Messung der Cyclisierungsaktivität erfolgte mit Paselli-Stärke SA2 (teilweise hydrolysierte Kartoffelstärke mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 50, Avebe) als Substrat, wobei die Menge an gebildetem Cyclodextrin mit Hilfe von Phenolphthalein ermittelt wurde. Die von Vikmon (1982) veröffentlichte Methode wurde nach Abwandlungen von Hans Leemhuis (Universität Groningen, persönliche Mitteilung) an die pH-Bedingungen der CGTase aus *A. gottschalkii* angepasst. Phenolphthalein ist ein violetter Farbstoff, der relativ spezifisch mit β -Cyclodextrin (β -CD) eine Einschlussverbindung bildet (Mäkelä *et al.*, 1988), wodurch seine Absorption bei 552 nm herabgesetzt wird. In einem Reaktionsvolumen von 1 ml wurden 0,5 oder 5 % (w/v) Paselli Stärke SA2 bei verschiedenen Temperaturen in 10 mM Tris/HCl in Anwesenheit von 5 mM CaCl_2 eingesetzt. Der pH-Wert wurde bei 25 °C so eingestellt, dass er bei allen Messtemperaturen bei 8,5 lag. Dabei wurde ein $\Delta\text{pK}_a/^\circ\text{C}$ von $-0,03$ angenommen (Stoll und Blanchard, 1990). Die Stärke wurde durch Erwärmung auf 50 °C in Lösung gebracht und anschließend 10 min vor Enzymzugabe bei der jeweiligen Messtemperatur (50, 55, 60, 65, 70, 75 oder 80 °C) äquilibriert und ein Aliquot von 100 μl entnommen (Zeitpunkt: t_0). Nach der Zugabe des Enzyms und vor und nach der Entnahme von je 100 μl zu verschiedenen Zeitpunkten (1 bis 60 min) wurde der Reaktionsansatz durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Die 100 μl Aliquots wurden mit 900 μl Phenolphthalein-Aktivitätsfärbelösung vereinigt und die Absorption sofort bei einer Wellenlänge von 552 nm und RT gemessen. Mit Hilfe bekannter Mengen an β -CD wurde für jede Messung eine Kalibrierungskurve erstellt. Dazu wurden Lösungen mit β -CD-Konzentrationen von 0-700 μM in Anwesenheit von 0,5 oder 5 % (w/v) Paselli-Stärke SA2 und 10 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl_2 hergestellt, je 100 μl mit 900 μl Phenolphthalein-Aktivitätsfärbelösung gemischt und die Absorption sofort bei einer Wellenlänge von 552 nm und RT gemessen. Die Absorptionsdifferenz zu 0 μM β -CD wurde gegen die β -Konzentration [μM] aufgetragen. In einem Bereich von 0 bis 50 μg β -CD/ml (entspricht 44 μM) ist das Verhältnis der Konzentration zur Absorption linear. In dem Konzentrationsbereich zwischen

50 μM und 1 mM β -CD ergibt sich eine Sättigungskurve, die im Programm SigmaPlot durch einen hyperbolischen Fit ($f=a*x/(b+x)$) zufriedenstellend angeglichen werden konnte (Anhang 6.5).

2.5.11.2 Kontinuierliche Messung der Cyclisierungsaktivität

Bei einer kontinuierlichen Aktivitätsmessung kann die zeitliche Zunahme von Produkt direkt durch spektroskopische Methoden verfolgt und aus der gemessenen Steigung unmittelbar die Anfangsgeschwindigkeit v_i ermittelt werden.

Die kontinuierliche Messung der Cyclisierungsaktivität erfolgte wiederum mit Paselli-Stärke SA2 als Substrat, wobei die Menge an gebildetem CD mit Hilfe von Methylorange detektiert wurde. Methylorange bildet ähnlich wie Phenolphthalein eine Einschlussverbindung mit Cyclodextrinen, ist aber weniger spezifisch für deren Größe. Mäkelä *et al.* (1988) fanden folgende relative Affinitäten von Methylorange für α -, β - und γ -CD: 214, 100 und 86. Methylorange ist ein gelb-oranger Farbstoff, dessen Absorptionsintensität bei 546 nm durch Komplexbildung mit Cyclodextrinen abnimmt. Nach Mäkelä & Korpela (1988) ist es nur dann möglich, die genaue Cyclodextrin-Menge zu kalkulieren, wenn das Produktspektrum der CGTase im untersuchten Reaktionszeitraum bekannt ist. Überwiegt die Produktion einer Cyclodextrinspezies, muß für dieses CD eine eigene Kalibrierung vorgenommen werden. Werden die unterschiedlichen CDs in vergleichbaren Mengen hergestellt, muss dies rechnerisch berücksichtigt werden oder eine Kalibrierung für die CD-Mischung erstellt werden. Wegen dieser Komplikationen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur relative Reaktionsgeschwindigkeiten ($\Delta A_{546}/\Delta t$) miteinander verglichen. Die Messungen erfolgten bei 40 °C in einem Gesamtvolumen von 1 ml 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 (40 °C), 5 mM CaCl_2 . Folgende Bestandteile wurden für eine Messung vorgelegt: 0,3 mM Methylorange und 0,5 % (w/v) Paselli Stärke SA2 (vorher bei 50 °C in Lösung gebracht). Die Messungen wurden an einem Absorptionsspektrophotometer Cary Bio 100 (Varian) in einer Quarzküvette durchgeführt. Der Start der Messung erfolgte, nachdem sich eine konstante Temperatur und eine konstante Basislinie eingestellt hatte, durch Zugabe von 10 μl bis 140 μl einer 0,2 μM oder 0,4 μM Enzymlösung der jeweiligen CGTase-Variante. Die zeitliche Änderung der Absorption bei 546 nm wurde verfolgt und die relative Anfangsgeschwindigkeit aus der Steigung im Zeitraum zwischen 5 und 10 min ermittelt.

2.5.11.3 Messung des Produktspektrums

Die Messungen zum Produktspektrum wurden am Institut für Technische Mikrobiologie der Technischen Universität Hamburg-Harburg in Zusammenarbeit mit Volker Thiemann (AG Prof. Antranikian) durchgeführt.

Die Reaktionsprodukte der CGTase-Varianten wurden durch eine Aminex HPX-42A Säule (Säulenvolumen: 300x7,8 mm; Bio-Rad) an einer LaChrom HPLC (Merck-Hitachi) aufgetrennt und über ein Refraktometer analysiert. Die Aminex HPX-42A Säule besteht aus Polystyrene-divinylbenzene und Silber und trennt Zuckermoleküle durch Verwendung von einfachen isokratischen mobilen Phasen (Wasser) auf. Die jeweils gebildeten Mengen an α -, β - und γ -CD wurden mit Hilfe einer Eichreihe quantifiziert.

In einem Reaktionsvolumen von 10 ml wurden 5 % bzw. 20 % (w/v) Paselli-Stärke SA2 in 10 mM Tris/HCl, 5 mM CaCl_2 bei der jeweiligen Messtemperatur für 10 min vorgewärmt. Vor Zugabe des Enzyms wurde ein Aliquot von 1 ml entnommen (Zeitpunkt t_0 : 0 min). Nach Zugabe von 100 μl bzw. 200 μl CGTase mit einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ml (entsprechend 12,8 μM) wurde nach 5, 10, 30, 60, 120 und 240 min wiederum je 1 ml entnommen und die CGTase durch Erhitzen (100 °C, mind. 10 min) inaktiviert. 500 μl der Aliquots wurden mit 0,375 U α -Glucosidase bei 37 °C für 20 min inkubiert, um Maltose abzubauen. Da Maltose mit der gleichen Retentionszeit wie γ -CD eluiert, würde die γ -CD-Produktion ansonsten überschätzt. Die α -Glucosidase wurde anschließend durch Erhitzen (100 °C, 20 min) inaktiviert. Aliquots mit mehr als 5 % Stärke (Ausgangskonzentration) wurden nach dem Abkühlen abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 15 min, 13000 Upm und RT), um unlösliche Stärke abzutrennen. Für die Analyse des Produktspektrums wurden zunächst je 200 μl der Aliquots in ein Glasröhrchen pipettiert, woraus für einen HPLC-Lauf je 30 μl entnommen wurden. Die Probenentnahme erfolgte automatisiert, wobei die ersten 10 μl in der Spritze verworfen, die zweiten 10 μl auf die Aminex HPX-42A Säule injiziert und die dritten 10 μl ebenfalls verworfen wurden. Danach wurde die Spritze mit Wasser gespült, um eine Verunreinigung der nächsten Probe zu verhindern. Die Elution erfolgte mit Wasser bei einer Flussrate von 0,6 ml/min und 80 °C, wobei ein Säulenlauf 30 min dauerte. Mit dem Autosampler konnten bis zu 100 Proben automatisch in einer Serie auf die Säule injiziert werden. Vor Beginn jeder Serie wurden Eichreihen mit bekannten Konzentrationen eines Gemisches

aus α -, β - und γ -CD (je 1 mM, 2,5 mM, 5 mM und 10 mM) erstellt. Die Retentionszeiten der α -, β - und γ -CD betragen ca. 9,8 min, 18,6 min und 12,9 min. Die Eichreihen wurden am Ende der Serie mit den gleichen Proben überprüft. Die Peakflächen der Elutionsfraktionen wurden mit dem Kalkulationsprogramm der HPLC integriert, wobei die Basislinien der Peaks manuell angepasst wurden. Die 0 min-Proben zeigten jeweils kleine Elutionspeaks bei 9,99 min und 13,13 min (entspricht α - und γ -CD), die von den gemessenen α - und γ -CD-Elutionspeaks abgezogen wurden. Je nach Reaktionsdauer und somit einhergehender CD-Produktion, wurden die Aliquots verdünnt, damit die über die HPLC analysierten Cyclodextrinmengen im Bereich der Eichgeraden zu liegen kamen. Die nach den verschiedenen Reaktionszeiten vorliegenden α -, β - und γ -CD-Konzentrationen wurden anhand der jeweiligen Eichgeraden ermittelt.

2.5.11.4 Messung des Stärkeabbaus im Reaktionsansatz (Iod-Test)

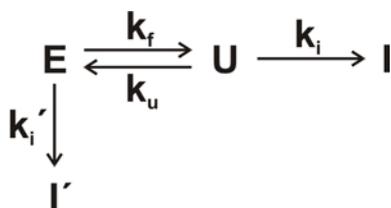
Bei den Messungen zum Produktspektrum (2.5.11.3), die mit 5 % Stärke als Substrat durchgeführt wurden, wurde in den entnommenen Aliquots zusätzlich die Konzentrationen an restlicher Stärke bestimmt. Bei Reaktionen mit 20 % Stärke war dies nicht möglich, da die Stärke bei Konzentrationen über 10 % bei RT unlöslich vorliegt. Der Nachweis des Stärkeabbaus erfolgte mit einer Variation des von Boyer & Preiss (1978) publizierten Iod-Tests, der die Bestimmung des Stärkegehalts von wässrigen Lösungen erlaubt. Das Verfahren beruht darauf, dass sich Iod in die helixartige Struktur des Stärkepolymers einlagert und dadurch seine Absorption in einem Wellenlängenbereich von 400-800 nm zunimmt. Zu 5 μ l zu untersuchender Probe wurden 995 μ l frisch angesetzter Iod-Färbelösung gegeben, gemischt und ein Absorptionsspektrum von 400-800 nm aufgenommen. Zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden wurde eine Verdünnungsreihe einer 5 %igen (w/v) Stärkelösung (Paselli SA2) in 10 mM Tris/HCl, pH 8.5 (50 °C), 5 mM CaCl₂ erstellt (1:2, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30), wovon jeweils 5 μ l mit 995 μ l Iod-Färbelösung versetzt und photometrisch zwischen 400 und 800 nm analysiert wurden. Die Kalibrierungsgerade wurde mit den Absorptionswerten bei 660 nm erstellt. Von dieser Kalibrierungsgeraden wurden die Stärkekonzentrationen (in % Stärke) in den Aliquots der Reaktionen abgeleitet.

2.5.12 Messung des Stärke-Abbaus im Plattentest

Stärke besteht aus bis zu 500 Glucoseeinheiten, die im Polysaccharid schraubig angeordnet sind. Stärke bildet mit Iod, das in der Lugol'schen Lösung (I_2 , KI) enthalten ist, eine dunkelviolette Einschlussverbindung, wobei sich das Iod in die Stärkespirale einlagert. Niedermolekulare Zucker wie Glucose, Maltose oder Saccharose ergeben keine Färbung. Mit Hilfe der Stempeltechnik (2.2.6) wurden Replikplatten (Inkubationsplatten) von auf LB-Agarplatten (Mutterplatten) gewachsenen *E. coli*-Transformanten erstellt. Als Medium der Inkubationsplatten wurde LB-Stärke (0,5 % (w/v) Kartoffel-Stärke) verwendet. Die Inkubationsplatten wurden bei einer Aktivitätstemperatur, die bei der Etablierung des Screening-Verfahrens zur Isolierung thermisch stabilisierte CGTase Varianten (3.3.4) ermittelt wurde, für 1 bis 4 h inkubiert und anschließend mit 3 ml Lugol'scher Lösung überschichtet, kurz geschwenkt und überschüssige Lösung entfernt. Über Durchlicht wurde die Platte analysiert. Wurde Stärke durch die *in vivo* synthetisierte CGTase abgebaut, entstand um die *E. coli*-Kolonie ein weißer Hof, dessen Breite je nach Aktivität und Inkubationsdauer variiert. Wurde keine aktive CGTase von der *E. coli*-Kolonie hergestellt, war nur ein kleiner gelb-weißer Kolonie-Rand zu erkennen, der Rest der Platte war blau bis blau-schwarz gefärbt.

2.5.13 Thermische Inaktivierung

Die irreversible Inaktivierung eines Enzyms kann auf der Aggregation der denaturierten Polypeptidkette beruhen. Dabei populiert sich der irreversibel aufgefaltete Zustand I mit der Geschwindigkeitskonstanten k_i ausgehend von dem reversibel aufgefalteten Zustand U. Alternativ kann, z.B. durch die Modifikation katalytisch essentieller Aminosäuren, eine irreversible Inaktivierung auch direkt vom gefalteten Zustand aus mit der Geschwindigkeitskonstanten k_i' erfolgen:



Schema 2: Mechanismus der irreversiblen thermischen Inaktivierung von Proteinen nach Tomazic und Klibanov (1988)

E: nativ gefaltetes, aktives Enzym. U: thermisch aufgefaltetes, inaktives Protein. I bzw. I': irreversibel inaktiviertes Protein. k: Geschwindigkeitskonstanten für die reversible Auffaltung (k_f) und Rückfaltung (k_u) sowie für die irreversible Inaktivierung ausgehend von U (k_i) bzw. E (k_i').

Aus dem zeitlichen Verlauf der Abnahme der Konzentration an aktivem Enzym E wird die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} als operationelles Maß für die thermische Stabilität ermittelt: $E = E_0 \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t)$, wobei E_0 die Konzentration an aktivem Enzym vor Beginn der Inkubation darstellt und $k_{obs} = (k_u \cdot k_i) / (k_f + k_i)$ oder $k_{obs} = k_i'$. E ist selbst experimentell nur schwer bestimmbar, jedoch zu der gemessenen Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion direkt proportional. Daher wurde k_{obs} aus der Steigung ermittelt, die sich bei der logarithmischen Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit $V_i (\Delta A_{546} / \text{min})$ gegen t ergibt. Aus k_{obs} kann die Halbwertszeit $t_{1/2}$ des Proteins bei einer bestimmten Temperatur berechnet werden: $t_{1/2} = \ln 2 / k_{obs}$. Zur Messung der Kinetik der Inaktivierung wurden 100 μl der CGTase in einer Konzentration von 200 nM in 100 mM Tris/HCl, pH 9,2 (25 °C), 1 mM CaCl_2 bei 70 °C und 80 °C inkubiert, nach 1, 5, 10 und 15 min Aliquots entnommen und die Restaktivität mit dem kontinuierlichen Test (2.5.11.2) bei 40 °C und mit 0,1 bzw. 0,5 % Paselli-Stärke SA2 als Substrat vermessen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Vergleich der CGTase aus *A. gottschalkii* mit bekannten CGTasen

Bei der Sequenzierung des Genoms von *A. gottschalkii* durch die Firma Epidauros wurde das Gen der CGTase gefunden und annotiert. Um die Aminosäuresequenz der CGTase näher zu untersuchen, wurde diese mit Hilfe des Programms PredictProtein analysiert. Dabei wurde unter anderem das Programm MaxHom für die Suche nach Genen bzw. Proteinen verwendet, welche eine signifikante Sequenzähnlichkeit zur CGTase aufweisen. Das Programm MaxHom (Sander & Schneider, 1991) erstellt ein Aminosäure-Sequenzalignment (Anhang 6.2) graphisch in drei Schritten. Zunächst wird mit dem Programm BLASTP (Altschul, 1991) die Proteindatenbank SWISS-PROT (Version 41 (02/2003) mit 122 564 Proteinen) durchsucht. Anschließend werden die gefundenen Sequenzen schrittweise geladen. Bei der Superpositionierung wird ein Profil der Sequenzen mittels einer *standard dynamic programming method* erstellt. Dieses Profil wird in einem letzten Schritt überarbeitet (Anhang 6.2). Das so erstellte Aminosäure-Sequenzalignment zeigt, dass die CGTase aus *A. gottschalkii* mit 13 CGTasen und 2 α -Amylasen aus den Bakteriengattungen *Clostridium* und *Bacillus* Sequenzähnlichkeiten zwischen 54,2 % und 60,4 % aufweist.

Obwohl keine Mutationsanalysen zur Identifizierung der katalytisch aktiven Reste der CGTase aus *A. gottschalkii* durchgeführt wurden, konnten sie mit Hilfe des Aminosäuresequenzalignments identifiziert werden. Enzyme der GH 13 Familie besitzen drei saure katalytische Reste, die am C-Terminus von β -4, β -5 und β -7 des $(\beta/\alpha)_8$ -Barrels (Domäne A) lokalisiert sind (Nagano *et al.*, 2001). Weiterhin konnten vier konservierte Regionen in der Nähe des aktiven Zentrums von α -Amylasen und CGTasen detektiert werden. In dem Aminosäure-Sequenzalignment von MaxHom und in der Modellierung der 3D-Struktur der CGTase (3.1.1) konnten die drei sauren Reste D230 (β -4), E258 (β -5), D329 (β -7) und die konservierten Bereiche in der CGTase aus *A. gottschalkii* nachgewiesen werden (Anhang 6.2). Graphisch hervorgehoben sind sie in Anhang 6.3.

3.1.1 Modellierung der 3D-Struktur der CGTase mit SwissModel

Die Sequenzähnlichkeiten (Binder *et al.*, 1986; MacGregor & Svensson, 1989; Nielsen & Borchert, 2000) und auch die Ähnlichkeit der dreidimensionalen Struktur von CGTasen (Henrissat & Couthino, 2001) machten die Modellierung der Struktur der CGTase aus *A. gottschalkii* mit dem Programm SwissModel (Peitsch, 1995; 1996; Guex & Peitsch, 1997; 2.1.10.2) möglich. Die Aminosäuresequenz der CGTase aus *A. gottschalkii* wurde ohne die Sequenz für das N-terminale Sekretionssignal bei SwissModel eingereicht. Die Sequenz enthielt 687 Aminosäuren. Es wurden 125 Strukturen mit einer Sequenzidentität zwischen 25 % und 66 % gefunden. Dabei stellte sich heraus, dass das Protein unfragmentiert als eine Region modelliert werden konnte. Für die Modellierung der CGTase-Struktur aus *A. gottschalkii* wurden fünf Template (1a47_.pdb; 1ciu_.pdb; 1cyg_.pdb; 1i75B.pdb; 1i75A.pdb; Anhang 6.3), die eine Sequenzidentität von 57 - 66 % aufwiesen, in das Programm ProModII geladen. Nach der Berechnung wurde die Struktur AAAa08LNv.pdb (Abbildung 1.1) erhalten, die für weitere Analysen mit dem Programm SwissPDB-Viewer zur Verfügung stand. Die Sekundärstrukturelemente sind in Anhang 6.3 dargestellt. Aufgrund der möglichen Abweichungen der modellierten Struktur von der wahren Proteinstruktur können diese Daten nicht als Grundlage für rationales Proteindesign verwendet werden. Die Qualität des erhaltenen Modells der CGTase ist aber für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angestellten Überlegungen ausreichend.

3.2 Herstellung und Charakterisierung der rekombinanten CGTase aus *A. gottschalkii*

3.2.1 Ermittlung der Signalsequenz der sekretorischen CGTase

Die CGTase aus *A. gottschalkii* ist ein sekretorisches Protein, das mit Hilfe einer N-terminalen Signalsequenz durch die Cytoplasmamembran aus der Zelle transportiert wird, wobei das Signalpeptid abgespalten wird (Prowe, 1996). Um die CGTase nach heterologer Expression in *E. coli* aus dem Zellextrakt gewinnen zu können, sollte das Gen ohne Signalsequenz kloniert werden. Dazu musste zunächst der Übergang vom Signalpeptid zur maternalen Sequenz identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde die Sequenz der Aminosäuren der vollständigen CGTase mit dem Programm

SignalP (Version 1.1; Nielsen *et al.*, 1997) analysiert, welches ein Alignment mit sekretorischen Proteinen aus Eukaryoten, sowie gram(+)- und gram(-)-Bakterien erstellt. Auf der Basis dieser Analyse wurde der Übergang vom Signalpeptid zur maternalen CGTase zwischen Alanin 34 und Threonin 35 vorhergesagt.

3.2.2 Isolierung des cgtase Gens aus *A. gottschalkii* und Klonierung in den pUC19-Vektor

Ein Aliquot (ca. 1 g) der bei der Fermentation (2.2.4) erhaltenen Zellmasse wurde zur Isolierung genomischer DNA (2.3.2.2) verwendet. Diese wurde anschließend durch Zugabe von je 10 Units der Restriktionsendonukleasen *NcoI*, *EcoRI* und *NotI*, die nicht im *cgtase* Gen schneiden, fragmentiert (*EcoRI*-Puffer, 80 min, 37 °C) und nach der Hitzeinaktivierung der Enzyme (70 °C, 20 min) bei -20 °C gelagert. In einer PCR-Reaktion zur Amplifizierung des *cgtase* Gens diente diese DNA als Templat. Das mit den Oligonukleotiden 5'-*HindIII*_CGTase_pUC19 und 3'-*EcoRI*_CGTase_pUC19 amplifizierte Fragment wurde mit Hilfe der eingeführten *HindIII*- und *EcoRI*-Schnittstellen in den pUC19-Vektor ligiert. Mit den Ligationsprodukten wurden *E. coli* JM109-Zellen transformiert (2.2.5.5), auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Von mehreren der gewachsenen Kolonien wurde pUC19_*cgtase*oS Plasmid isoliert und der Einbau des Inserts mittels Insert-Screening (2.3.3.5) und Sequenzierung (2.3.3.7) verifiziert, wobei die Primer 5'-pUC, 3'-pUC, 5'-SOE-CGTase, 3'-SOE-CGTase, 5'-CGTaseSequ350 und 5'-CGTaseSequ1500 verwendet wurden.

3.2.3 Klonierung des cgtase Gens mit und ohne His-Tag in pET-Vektoren

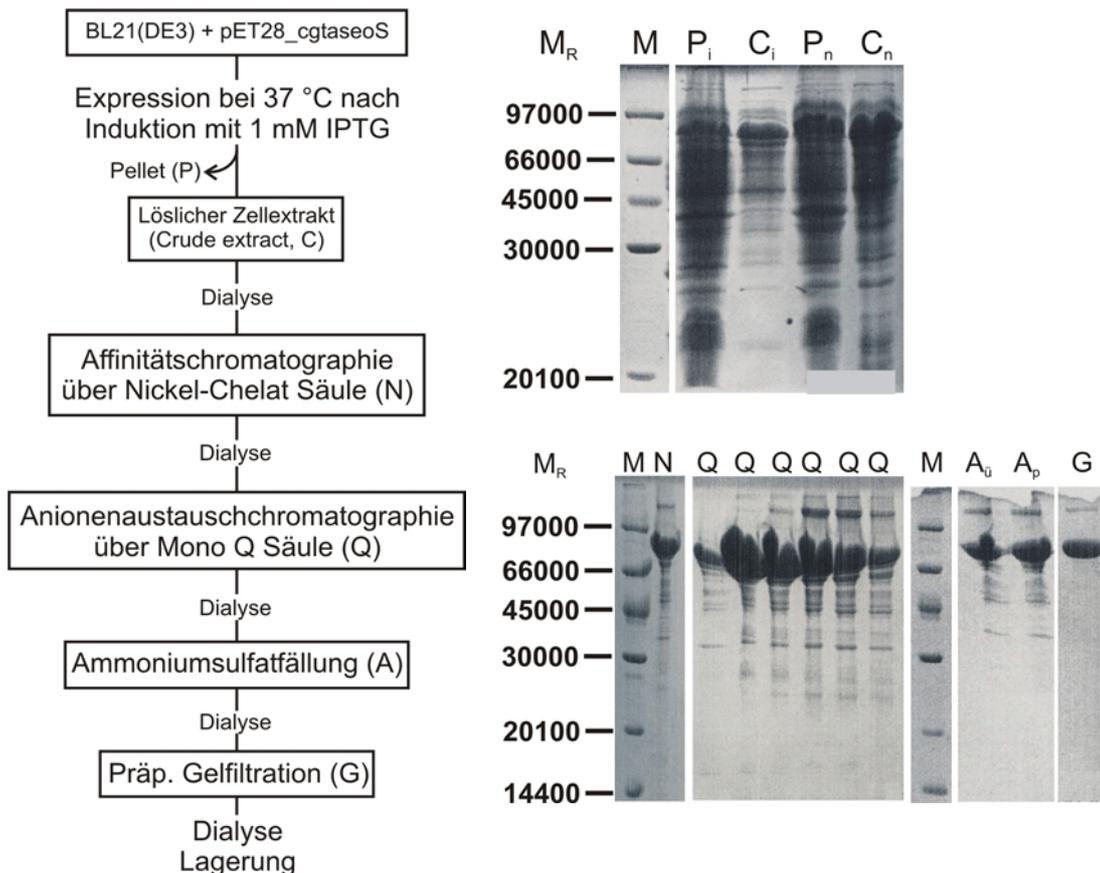
Für eine Überexpression wurde das *cgtase* Gen von dem pUC19-Vektor in den pET28a-Vektor umklont. Dazu wurde eine PCR-Reaktion mit den Primern 5'-*NheI*-CGTaseoS und 3'-*HindIII*-CGTaseoS und dem Plasmid pUC19_*cgtase*oS als Templat durchgeführt und das Amplifikationsprodukt über die neu eingeführten *NheI*- und *HindIII*-Schnittstellen mit dem Vektor pET28a ligiert. Das resultierende Konstrukt (pET28a_*cgtase*oS) kodierte für ein Fusionsprotein aus sechs N-terminalen Histidinen, einer Thrombinschnittstelle und der (Signalpeptid-freien) CGTase. Nach Transformation von *E. coli* DH5 α -Zellen (2.2.5.5) mit den Ligationsprodukten und der Inkubation

bei 37 °C auf LB-Agarplatten mit Kanamycin wurde aus mehreren der gewachsenen Kolonien pET28a_cgtaseoS DNA isoliert und der Einbau des Inserts mittels Insert-Screenings (2.3.3.5) und Sequenzierung (2.3.3.7) unter Verwendung der Primer T7 Promotor, T7 Terminator, 5'-SOE-CGTase, 3'-SOE-CGTase, 5'-CGTaseSequ350 und 5'-CGTaseSequ1500 verifiziert.

Um die CGTase auch ohne His-Tag herstellen und reinigen zu können, wurde das cgtase Gen aus pET28a_cgtaseoS unter Verwendung von *NheI* und *HindIII* herausgeschnitten und mit dem pET24a-Vektor ligiert. In dem resultierenden Konstrukt (pET24a_cgtaseoS) liegt das ATG-Startcodon unmittelbar 5'-seitig der *NheI*-Schnittstelle, wodurch an Position zwei und drei zusätzliche Codone für Alanin und Serin eingebaut wurden, die der *NheI*-Schnittstelle entsprechen. Nach der Transformation von *E.coli* DH5 α -Zellen mit den Ligationsprodukten und der Inkubation bei 37 °C auf LB-Agarplatten mit Kanamycin wurde aus mehreren der gewachsenen Kolonien pET24a_cgtaseoS DNA isoliert und der Einbau des Inserts mittels Insert-Screenings (2.3.3.5) und Sequenzierung (2.3.3.7) unter Verwendung der Primer T7 Promotor, T7 Terminator, 5'-SOE-CGTase, 3'-SOE-CGTase, 5'-CGTaseSequ350 und 5'-CGTaseSequ1500 verifiziert.

3.2.4 Produktion der CGTase mit His-Tag

Nach Transformation von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit dem Vektor pET28a_cgtaseoS zeigte eine Probeexpression bei 37 °C (2.4.1.1), dass zur Proteinproduktion zwar keine Induktion mit IPTG notwendig war, der Anteil an löslichem Protein im Zellextrakt aber dadurch gesteigert wurde. Nach der heterologen Expression des cgtase-Gens im präparativen Maßstab mit Induktion wurden mehrere Anreicherungsschritte durchgeführt, um das Protein aus dem löslichen Teil des Zellextraktes in möglichst reiner Form zu gewinnen (Abbildung 3.1 A). Die Proteinlösungen wurden dabei vor dem Auftrag auf eine Säule jeweils gegen den entsprechenden Äquilibrierungspuffer dialysiert (2.4.2.6).

**A****B****Abbildung 3.1: Übersicht über Reinigung I der CGTase mit N-terminalem His-Tag.**

Die Anreicherung erfolgte aus dem löslichen Zellextrakt von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die mit pET28a_cgtaseoS transformiert worden waren.

A: Flussdiagramm der Anreicherung.

Die Ausbeute betrug ca. 2,1 mg CGTase pro g Nassgewicht. Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 10 mM Tris/HCl, pH 9,2.

B: Dokumentation der Anreicherung mittels SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid).

M_R : relatives Molekulargewicht (g/mol); M: *low molecular weight marker*; P_i bzw. P_n : unlöslicher Teil des Zellextraktes nach bzw. ohne Induktion mit 1 mM IPTG. C_i bzw. C_n : löslicher Teil des Zellextraktes nach bzw. ohne Induktion mit 1 mM IPTG. N: nach Elution von der Nickel-Chelat-Säule; Q: verschiedene Fraktionen nach Elution von der MonoQ-Säule; A_u : Überstand nach Ammoniumsulfatfällung; A_p : Pellet nach Ammoniumsulfatfällung; G: nach Elution von präparativer Gelfiltrationssäule.

Das heterolog produzierte CGTase-Protein zeigte in der SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht zwischen 66 und 97 kDa (Abbildung 3.1 B), während das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht 78351,59 Da beträgt (Anhang 6.4). Seine Anreicherung aus dem löslichen Zellextrakt durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (N; 2.4.2.2.1) konnte durch Anionenaustauschchromatographie mittels MonoQ-Säule (Q; 2.4.2.1) nicht verbessert werden. Dies gelang jedoch durch eine nach Einkonzentrierung mittels Ammoniumsulfatfällung (A; 2.4.2.4) durchgeführte

präparative Gelfiltration (G; 2.4.2.5). Bis auf eine schwache Bande, die einem Molekulargewicht größer 97 kDa entspricht, sind keine Verunreinigungen im SDS-Gel zu erkennen (Reinigung I, Abbildung 3.1 B). Obwohl der N-terminal fusionierte His-Tag aufgrund seiner angenommenen Lage an der Oberfläche der CGTase (Abbildung 3.2 A) deren Aktivität und Stabilität nicht beeinflussen sollte, wurde er mittels proteolytischer Spaltung unter Verwendung der Thrombinschnittstelle entfernt. Dafür wurde Trypsin verwendet, welches wesentlich billiger und effizienter als Thrombin ist und, wie Kontrollexperimente zeigten, die CGTase selbst nicht spaltet (Abbildung 3.2 B).

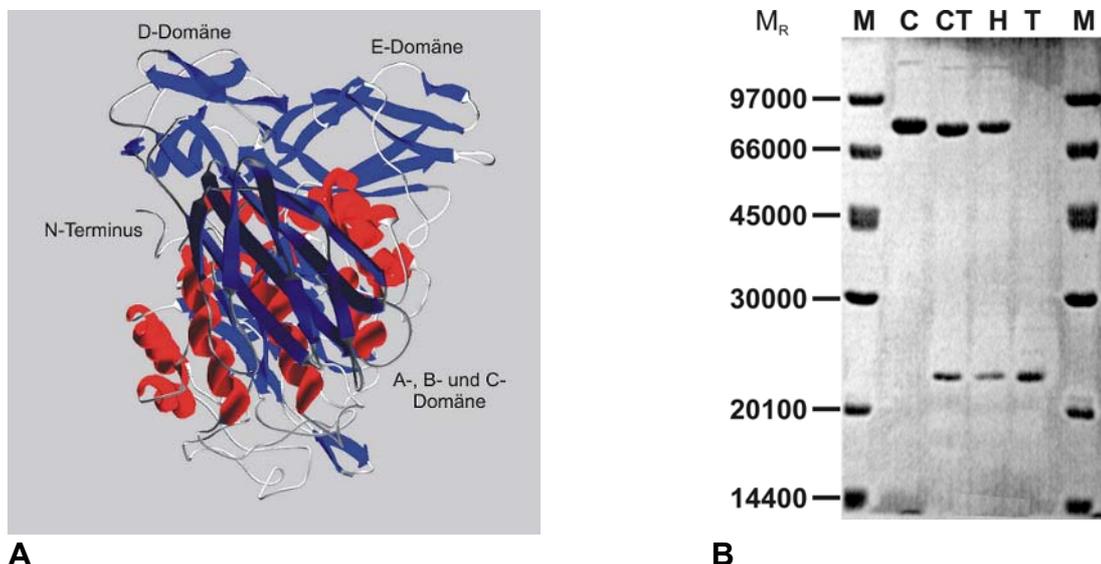


Abbildung 3.2: A: Modellierter Struktur der CGTase aus *A. gottschalkii* (Programm SwissModel, Peitsch, 1995; 1996; Guex & Peitsch, 1997).

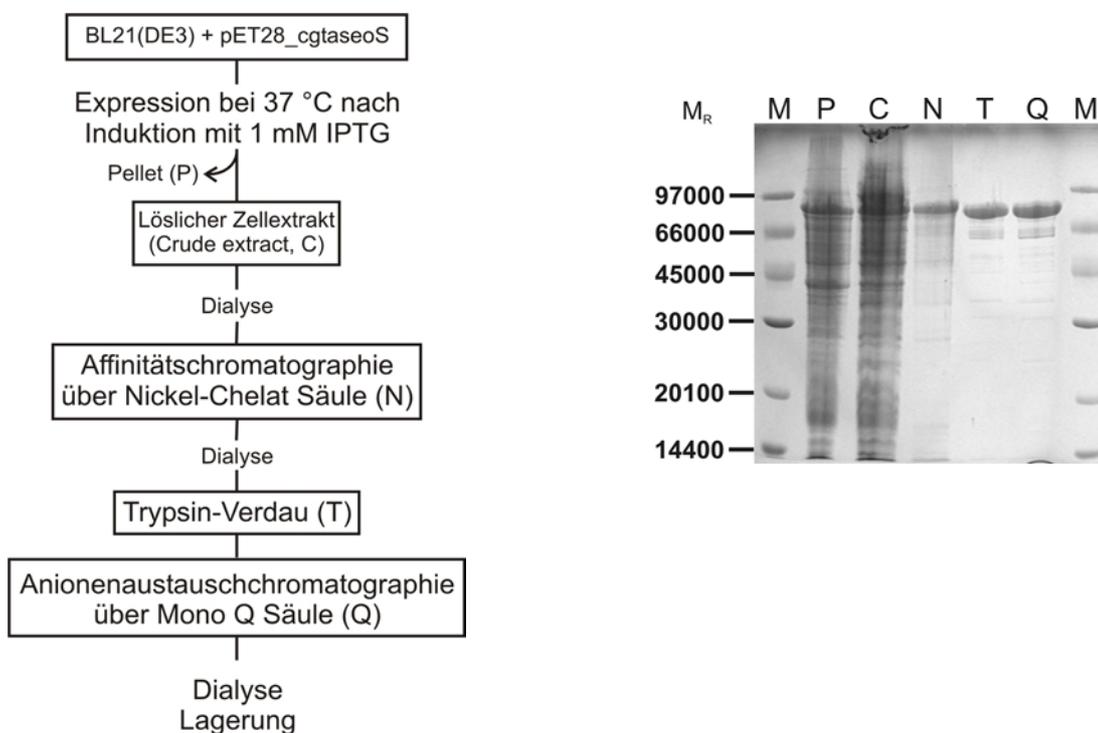
Seitenansicht mit Lage des frei zugänglichen N-Terminus der CGTase.

B: Abspaltung des N-terminalen His-Tags der gereinigten CGTase mittels Trypsin, analysiert durch SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid)

M: low molecular weight marker; C: 10 µg CGTase; CT: 10 µg CGTase + 1 µg Trypsin; H: 10 µg CGTase + 1 µg Trypsin + 600 mM Harnstoff; T: 1 µg Trypsin ($M_R = 23,8$ kDa). Die Inkubation erfolgte für 90 min bei RT in 1 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 in Anwesenheit von 5 mM CaCl_2 .

In einer weiteren Reinigung (II) wurde die Proteinlösung deshalb bereits nach der Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie mit Trypsin verdaut, um anschließend den abgespaltenen His-Tag und die Protease mittels MonoQ-Säule abzutrennen (Abbildung 3.3 A). Die präparative Gelfiltration wurde aufgrund des abnormen Permeationsverhaltens der CGTase (3.2.7.1, Abbildung 3.6) vorübergehend eingestellt. Wie Abbildung 3.3 B zeigte, konnte die CGTase mit diesem Verfahren allerdings nicht zur Homogenität

gereinigt werden, da nach der Abspaltung des His-Tags mittels Trypsin Verunreinigungsbanden zwischen 70 und 14 kDa auftraten, die über die MonoQ-Säule nicht abgetrennt werden konnten (Abbildung 3.3 B).



A

B

Abbildung 3.3: Übersicht über die Reinigung II der CGTase mit N-terminalem His-Tag. Die Anreicherung erfolgte wiederum aus dem löslichen Zellextrakt von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die mit pET28a_cgtaseoS transformiert worden waren.

A: Flussdiagramm der Anreicherung.

Die Ausbeute betrug 7,3 mg CGTase pro g Nassgewicht. Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 10 mM Tris/HCl, pH 9,2, 1 mM CaCl_2 .

B: Dokumentation der Anreicherung mittels SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid).

M_R : relatives Molekulargewicht (g/mol); M: *low molecular weight marker*; P: unlöslicher Teil des Zellextraktes nach Induktion mit 1 mM IPTG. C: löslicher Teil des Zellextraktes nach Induktion mit 1 mM IPTG. N: Fraktion mit CGTase nach Elution von der Nickel-Chelat-Säule; T: nach Trypsin-Verdau; Q: Fraktion mit CGTase nach Elution von der MonoQ-Säule.

Da es möglich erschien, dass die am Ende der Reinigung noch vorhandenen, zusätzlichen Proteinbanden in der SDS-PAGE Abbauprodukte der CGTase (und nicht Wirtsproteine aus *E. coli*) darstellen, wurde das Protein vor und nach dem Trypsin-Verdau in Anwesenheit von Protease-Inhibitoren (cøplete-Tabletten) gereinigt. Die cøplete-Tabletten enthalten einen Protease-Inhibitorenmix und EDTA, wodurch die häufigsten tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Proteasen inhibiert werden. Die Ergebnisse der Reinigungen mit und ohne Inhibitoren waren jedoch identisch, weswegen proteolytischer Abbau der CGTase während der Reinigung als

unwahrscheinlich anzusehen ist. Um ausschließen zu können, dass es sich bei den zusätzlichen Banden um Artefakte der SDS-PAGE handelt, wurde eine zusätzliche SDS-PAGE durchgeführt, bei der die Lösung mit CGTase vor der Auftragung wie üblich erhitzt (2.5.2), bzw. nicht erhitzt wurde. Die CGTase zeigte zwar ein unterschiedliches Laufverhalten, allerdings waren in beiden Fällen mehrere Banden zu erkennen. Weiterhin wurde die Homogenität der gereinigten CGTase mittels analytischer Gelfiltration (2.5.6) und dynamischer Lichtstreuung (2.5.7) analysiert. Das Elutionsprofil der analytischen Gelfiltration zeigte einen kleinen und flachen Peak, der kurz vor dem Hauptpeak eluierte (vgl. Abbildung 3.6), in der SDS-PAGE jedoch ebenfalls der CGTase entsprach. Die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung (2.5.7) deuten auf eine monodisperse Proteinlösung hin, d.h. es lag in Bezug auf Größe und Form nur eine Sorte von Protein vor. So betrug der Polydispersitätsparameter 15,8 % des Radius. Die Baseline und der SOS-Wert lagen mit 1,0012 bzw. 0,9415 unter den Schwellenwerten für Polydispersität von 1,005 bzw. 5,0. Das ermittelte Molekulargewicht von ca. 65 kDa lag etwas unterhalb des aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewichts von 78351,59 Da.

Laut analytischer Gelfiltration und dynamischer Lichtstreuung lag die CGTase also als sauberes und homogenes Protein vor, wonach es sich bei den zusätzlichen Banden bei der SDS-PAGE tatsächlich um Gelartefakte gehandelt haben könnte.

Nichtsdestoweniger wurde eine weitere Reinigungsstrategie (Reinigung III) getestet, wobei die Affinitätschromatographie statt mit Nickel-Chelat mit dem an einer Sepharose 6B-Matrix immobilisierten Produkt α -Cyclodextrin (2.4.2.2.2) durchgeführt wurde, gefolgt von einem weiteren Chromatographieschritt unter Verwendung von Hydroxylapatit (2.4.2.3; Abbildung 3.4 A). Die Verwendung der α -CD-Säule erbrachte zwar eine hervorragende Konzentrierung der CGTase, die zusätzlichen Banden in der SDS-PAGE konnten aber nicht entfernt werden (Abbildung 3.4 B). Die Tatsache, dass die α -CD-Säule spezifisch für Proteine mit der Fähigkeit zur Bindung zyklischer Zucker ist (CGTasen, Cyclodextrinasen (Hashimoto *et al.*, 2001), Pullulanasen und α -Amylasen (Hamilton *et al.*, 2000)), spricht dafür, dass es sich bei den zusätzlichen Banden nicht um Verunreinigungen durch Wirtsproteine aus *E. coli* handelt. Stattdessen sind diese Banden entweder Abbauprodukte der CGTase oder Gelartefakte, wie bereits im vorherigen

Absatz besprochen. Die anschließende Hydroxylapatit-Säule erbrachte keinen weiteren Reinigungseffekt, da das Protein zwar an die Säule band, jedoch über einen breiten Bereich des angelegten KP-Gradienten eluierte.

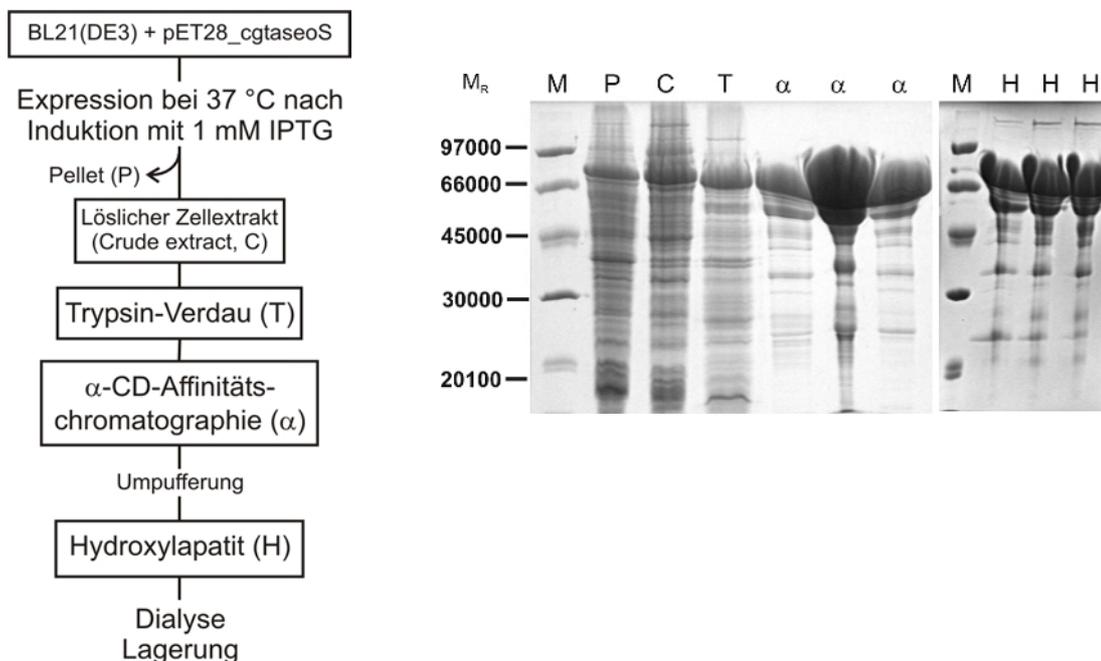


Abbildung 3.4: Übersicht über die Reinigung III der CGTase mit N-terminalem His-Tag. Die Anreicherung erfolgte wiederum aus dem löslichen Zellextrakt von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die mit pET28a_cgtaseoS transformiert worden waren.

A: Flussdiagramm der Anreicherung.

Die Ausbeute betrug ca. 5 mg CGTase pro g Nassgewicht. Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 5 mM CaCl_2 .

B: Dokumentation der Anreicherung mittels SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid).

M_R : relatives Molekulargewicht (g/mol); M: *low molecular weight marker*; P: unlöslicher Teil des Zellextraktes nach Induktion mit 1 mM IPTG. C: löslicher Teil des Zellextraktes nach Induktion mit 1 mM IPTG. T: nach Trypsin-Verdau; α : verschiedene Fraktionen nach Elution von der α -CD-Säule H: verschiedene Fraktionen nach Elution von der Hydroxylapatitsäule.

3.2.5 Produktion der CGTase ohne His-Tag

Durch die Verwendung der α -CD-Säule war die Reinigung über Nickel-Chelat Affinitätschromatographie nicht mehr notwendig, weshalb die CGTase ohne His-Tag mit Hilfe des Plasmides pET24a_cgtaseoS (3.2.3) in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen hergestellt wurde.

Bei einer Probeexpression zeigte sich, dass – ähnlich wie bei der Herstellung der CGTase mit His-Tag (3.2.4) – zur Proteinproduktion zwar keine Induktion mit IPTG notwendig war, der Anteil an löslichem Protein aber dadurch z.T.

gesteigert wurde. Die heterologe Expression des *cgtase* Gens im präparativen Maßstab erfolgte demnach je nach Ergebnis der vorherigen Probeexpression durch Induktion mit 1 mM IPTG oder ohne Zugabe von 1 mM IPTG. Die Reinigung mittels α -CD-Affinitätschromatographie und präparativer Gelfiltration ist in Abbildung 3.5 A und B dokumentiert.

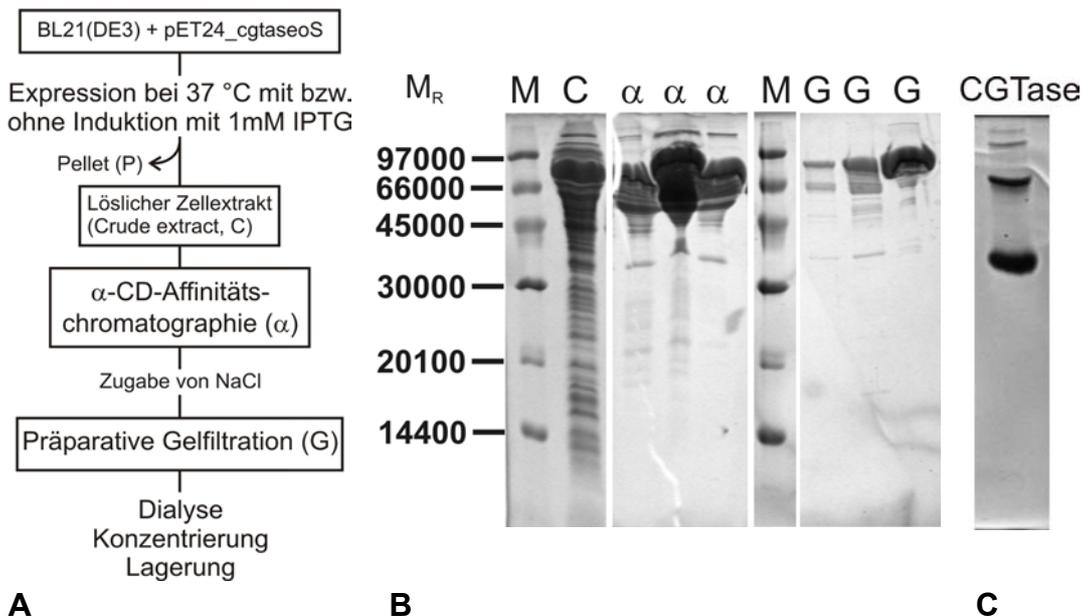


Abbildung 3.5: Übersicht über die Reinigung der CGTase ohne His-Tag.

Die Anreicherung erfolgte aus dem löslichen Zellextrakt von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die mit pET24a_cgtaseoS transformiert worden waren.

A: Flussdiagramm der Anreicherung.

Die Ausbeute betrug 16,5 mg CGTase pro g Nassgewicht. Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 5 mM CaCl_2 .

B: Dokumentation der Anreicherung mittels SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid).

M_R : relatives Molekulargewicht (g/mol); M: *low molecular weight marker*; C: löslicher Teil des Zellextraktes ohne Induktion; α : verschiedene Fraktionen nach Elution von der α -CD-Säule; G: verschiedene Fraktionen nach Elution von der präparativen Gelfiltrationssäule. C: native PAGE der gereinigten CGTase.

Obwohl die α -CD-Säule zu einer deutlichen Anreicherung der CGTase führte, zeigen sich auch hier in der SDS-PAGE wiederum zusätzliche Proteinbanden mit apparenten Molekulargewichten zwischen ca. 14 und 70 kDa, die auch durch Gelfiltration nicht zu entfernen waren (Abbildung 3.5 B). Zur Überprüfung der Homogenität der CGTase wurde in diesem Fall native PAGE durchgeführt. Dabei konnten neben einer Haupt- und einer relativ deutlichen Nebenbande noch zwei schwächere Banden identifiziert werden (Abbildung 3.5 C).

3.2.6 Zusammenfassung und Diskussion der Herstellung der CGTase

Die CGTase wurde nach heterologer Genexpression in *E. coli* durch eine Kombination verschiedener chromatographischer Verfahren aus dem löslichen Zellextrakt angereichert. Dem rekombinant hergestellten Protein fehlte sein N-terminales Signalpeptid. Stattdessen enthielt es nach Expression von pET28a_cgtaseoS einen N-terminalen His-Tag, der später mit Hilfe einer Thrombinschnittstelle abgetrennt wurde. Die Ausbeute lag zwischen ca. 2 und 7 mg CGTase pro g Nassgewicht. Erfolgte die Expression mit Hilfe von pET24a_cgtaseoS fehlte der His-Tag. In diesem Fall betrug die Ausbeute der Reinigung 16,5 mg pro g Nassgewicht.

Die gängigen Verfahren, die in der Literatur für die Reinigung von CGTasen beschrieben werden, beruhen vorwiegend auf der Sekretion des Proteins in den Kulturüberstand von *Bacillus*-Arten (van der Veen *et al.*, 2001; Leemhuis *et al.*, 2003). Schmid (1989) berichtet von der Sekretion ins Periplasma bei der heterologen Expression in einem *E. coli*-Stamm und Wind *et al.* (1998) verwendete einen *E. coli*-Stamm, der cytoplasmatische Proteine ins Medium sekretiert. Da die heterologe Expression des cgtase-Gens von *A. gottschalkii* in den löslichen Teil des Cytoplasmas von *E. coli*-Zellen erfolgreich war, bestand keine Notwendigkeit auf Expressionssysteme von *Bacillus*-Arten oder von mutierten *E. coli*-Stämmen zu wechseln.

Trotz einer Reihe unterschiedlicher Reinigungsansätze konnte die CGTase nach Maßgabe der SDS-PAGE nicht bis zur Homogenität angereichert werden. Bei den zusätzlichen Banden handelt es sich vermutlich nicht um Wirtsproteine, sondern entweder um proteolytische Abbauprodukte oder SDS-PAGE-Artefakte. Für ersteres spricht die Heterogenität des gereinigten Proteins auch in der nativen PAGE (Abbildung 3.5 C), für letzteres seine weitgehende Homogenität nach Maßgabe von analytischer Gelfiltration und dynamischer Lichtstreuung (3.2.4). Gegen proteolytischen Abbau sprechen auch die Reinigungsergebnisse in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren (3.2.4).

Bei in der Literatur beschriebenen Anreicherungen von CGTasen wurden Affinitätschromatographie über Nickel-Chelat-Säule und Cyclodextrin-Säule, Anionenaustauschchromatographie, hydrophobe Interaktionschromatographie und Gelfiltration verwendet (Wind *et al.*, 1998; Tachibana *et al.*, 1999; van der Veen *et al.*, 2001; Volkova *et al.*, 2000; 2001; Takada *et al.*,

2003). Alternativ wurden CGTasen mit Ammoniumsulfat in Anwesenheit von Stärke bzw. Cyclodextrinen aus dem Kulturüberstand gereinigt (Martins & Hatti-Kaul, 2002; Abelyan *et al.*, 2002).

Zwar werden die mit diesen Verfahren gewonnenen CGTasen in der Regel als „rein“ bezeichnet, jedoch haben SDS-Gele angereicherter CGTase aus *Bacillus* sp. 1070 (Volkova *et al.*, 2000; 2001) ein ähnliches Aussehen wie das in Abbildung 3.1 B dokumentierte SDS-Gel angereicherter CGTase aus *A. gottschalkii*. Die zusätzlichen Banden konnten auch hier weder durch hydrophobe Interaktionschromatographie und Metall-Chelat-Affinitäts- bzw. Anionenaustauschchromatographie (Volkova *et al.*, 2001) noch durch Affinitätschromatographie mittels α - bzw. β -CD-Sepharose vollständig entfernt werden (Volkova *et al.*, 2000). Bei der Analyse mit Isoelektrischer Fokussierung (IEF) konnten zwei Proteinbanden mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten identifiziert werden, die beide Cyclisierungsaktivität besaßen. Ebenfalls mehrere Banden fanden sich bei der Analyse einer gereinigten CGTase aus *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 mittels SDS-PAGE und IEF, wobei es sich vermutlich um Abbauprodukte der CGTase handelte (Wind *et al.*, 1995). Dagegen erklären Yamamoto *et al.* (1999) das Auftreten von mehreren Banden im SDS-Gel nach der Reinigung der CGTase aus *Thermococcus* sp. B1001 mit der unvollständigen Hitzedenaturierung vor dem Auftrag. Tachibana *et al.* (1999) berichten von einer gereinigten CGTase aus dem hyperthermophilen Archaeon *Thermococcus* sp., die, je nach Denaturierungsgrad, ein unterschiedliches Laufverhalten in der SDS-PAGE aufweist, jedoch im Gegensatz zur CGTase aus *A. gottschalkii* in der nativen PAGE homogen erschien. Ähnliches gilt für die CGTase aus dem alkalophilen Bakterium *Bacillus* sp. 1011, das ebenfalls nur bis zu einer 90 %igen Reinheit angereichert werden konnte (Nakamura *et al.*, 1992). Hellmann *et al.* (1992) berichten von der Reinigung einer CGTase aus *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* (ATCC 21783), die sie mit und ohne Sekretionssignal synthetisieren und über Rückfaltung und α -CD-Sepharose CL 6B Säule reinigen. Nach der Rückfaltung waren in der SDS-PAGE ähnliche Banden zu erkennen, wie in der vorliegenden Arbeit, die allerdings durch die Affinitätschromatographie fast vollständig entfernt werden konnten.

Da es also mehrere CGTasen aus unterschiedlichen Organismen gibt, die durch verschiedenste Methoden nicht zur 100 %igen Reinheit angereichert werden können, wurde in der vorliegenden Arbeit auf weitere

Reinigungsversuche verzichtet. Die Charakterisierung der CGTase aus *A. gottschalkii* erfolgte mit einer Proteinlösung zu mindestens 95 % Reinheit.

3.2.7 Charakterisierung der CGTase

3.2.7.1 Analytische Gelfiltration in Anwesenheit von β -CD

Zunächst wurde versucht, mittels analytischer Gelfiltration (2.5.6) das Molekulargewicht bzw. den Assoziationszustand der CGTase zu bestimmen. In Abwesenheit des Produktes β -CD war ein nicht ganz symmetrischer Elutionspeak zu erkennen (Abbildung 3.6). Die Elutionszeit entsprach einem apparenten Molekulargewicht von deutlich kleiner als 14 kDa, während die monomere CGTase ein kalkuliertes Molekulargewicht von 78,35 kDa besitzt. Vermutlich wird die Elution der CGTase so stark verzögert, weil ihre Maltose-Bindestellen in Domäne C und E an die Säulenmatrix aus Agarosepartikeln mit kovalent gebundenen Dextranmolekülen binden. (Agarose ist ein Galaktose-Polymer, dessen Verknüpfungen zwischen 1-4 und 1-3 alternieren. Dextran ist ein β -1,6-Glucan mit einigen Glucoseketten, die über 1,3-, 1,4- und auch 1,2-glykosidischen Bindungen mit der Hauptkette verbunden sind.) Für diese Hypothese spricht, dass die Elution der CGTase nach Zusatz von 0,5 % β -CD zum Laufpuffer deutlich früher erfolgte (Abbildung 3.6), vermutlich weil β -CD mit der Säulenmatrix um die Maltose-Bindestellen der CGTase konkurrierte.

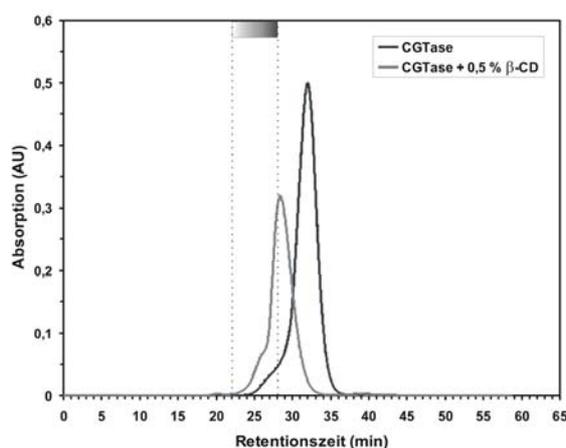


Abbildung 3.6: Analytische Gelfiltration der CGTase mit und ohne β -CD

Bedingungen: Superdex 75 HR 10/30 Säule (SV: 24 ml); Elutionspuffer: 50 mM KP, 0,3 M KCl, pH 7,5, ohne β -CD (schwarz) bzw. in Anwesenheit von 0,5 % β -CD (grau); Es wurden jeweils 200 μ l Proteinlösung mit 15 nmol CGTase aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0,4 ml/min bei 25 °C und wurde über die Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Der Balken markiert die Retentionszeiten der Kalibrierungsproteine von 67000 Da (heller Bereich) bis 13700 Da (dunkler Bereich).

3.2.7.2 Spektroskopische Untersuchungen der Sekundär- und Tertiärstruktur

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur wurde ein CD-Spektrum im fern-UV-Bereich (180-250 nm) aufgenommen (2.5.9). Das Spektrum weist ein Minimum im Bereich von etwa 207 nm auf (Abbildung 3.7 A), was auf einen größeren Anteil an β -Strängen als an α -Helices hindeutet (Johnson, 1990). Auch spricht die Schulter im Bereich von 230 nm für die Beeinflussung des fern-UV CD-Spektrums durch Tryptophanreste, welche nur bei Proteinen mit vielen Tryptophanresten und relativ geringen Anteilen an α -Helices beobachtet wird (Woody, 1994). Tatsächlich enthält die CGTase aus *A. gottschalkii* 14 Tryptophane und weist α -Helices nur in den Domänen A und B auf, während im Rest des Proteins β -Stränge dominieren (Anhang 6.3 und Abbildung 1.1).

Zusätzlich wurde ein nah-UV CD-Spektrum (250-310 nm) der CGTase aufgenommen, welches durch die asymmetrische Umgebung der aromatischen Aminosäuren im Inneren des Proteins dominiert wird und deshalb ein empfindliches Maß für die Tertiärstruktur darstellt (2.5.9). Neben ihren 14 Tryptophanresten enthält die CGTase aus *A. gottschalkii* 44 Tyrosine und 37 Phenylalanine. Das Spektrum ist klar strukturiert und weist mehrere ausgeprägte Minima und Maxima auf (Abbildung 3.7 B), was für eine wohldefinierte Tertiärstruktur der gereinigten CGTase spricht (Schmid, 1997).

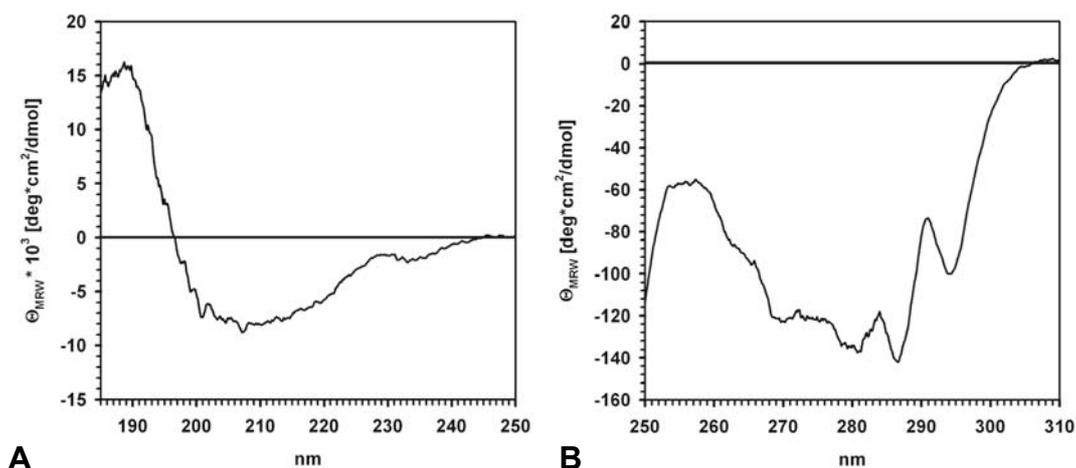


Abbildung 3.7: Fern-UV (A) und Nah-UV (B) CD-Spektren der CGTase.

Die Spektren wurden in 10 mM KP, pH 8,0 bei 21 °C aufgenommen. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 0,077 mg/ml (fern-UV Spektrum) und 7,55 mg/ml (nah-UV Spektrum). Die Schichtdicke der Küvette betrug 0,1 cm. Die gezeigten Spektren sind das Mittel aus 10 Einzelspektren. Θ_{MRW} : durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure [Grad * cm^2/dmol] (Gleichung 7).

Eine weitere Analyse der Tertiärstruktur erfolgte durch die Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren, welche nach Anregung bei 280 nm bzw. 295 nm durch die 14 Tryptophanreste dominiert bzw. ausschließlich durch diese verursacht wird (2.5.8). Die Emissionsmaxima nach Anregung bei 280 und 295 nm liegen bei 342 bzw. 343 nm (Abbildung 3.8). Das bedeutet, dass ein großer Teil der Tryptophanreste nur wenig vom Lösungsmittel abgeschirmt und deshalb vermutlich an der Oberfläche der CGTase lokalisiert ist (Schmid, 1997).

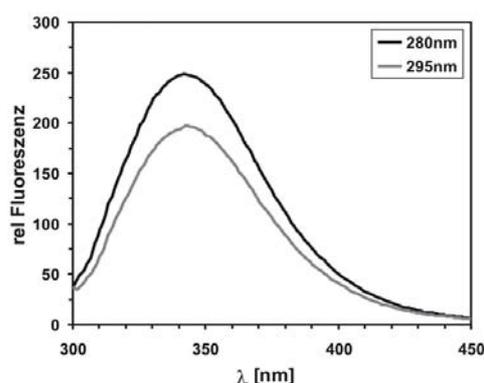


Abbildung 3.8: Fluoreszenzemissionsspektren der CGTase

Die Spektren wurden nach Anregung bei 280 bzw. 295 nm in 10 mM Tris/HCl, pH 9,2, 1 mM CaCl_2 bei 25 °C aufgenommen. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug 200 nM. Das Emissionsmaximum liegt bei 342 (nach Anregung bei 280 nm) bzw. 343 nm (nach Anregung bei 295 nm).

3.2.7.3 Untersuchungen zur Stabilität der CGTase

Die thermodynamische Stabilität eines Proteins ist definiert als die Differenz der freien Energie (ΔG_{FU}) zwischen gefaltetem (F) und ungefaltetem (U) Protein und kann nur dann experimentell zuverlässig bestimmt werden, wenn (i) der Übergang von F nach U reversibel ist und (ii) ohne Population von Intermediaten erfolgt (*two-state model*). Ist nur eine dieser Bedingungen nicht erfüllt, lässt sich ΔG_{FU} nicht zuverlässig bestimmen und die Stabilität nur operationell quantifizieren (siehe unten). Induziert wird die Auffaltung entweder bei einer gegebenen Temperatur (isothermisch), durch Inkubation des Proteins in Detergenzien wie Guanidiniumchlorid (GdmCl) oder Harnstoff oder durch Erwärmung (Pace & Scholtz, 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die thermische Auffaltung der CGTase mittels differentieller Scanning-Kalorimetrie (DSC; 2.5.10) untersucht. Da sich dabei herausstellte, dass die Denaturierung irreversibel und damit eine thermodynamische

Auswertung nicht möglich war, wurde zusätzlich die Kinetik der thermischen Denaturierung über den Verlust der enzymatischen Aktivität verfolgt. Aus den DSC-Messungen wurde die Schmelztemperatur T_m , d.h. die Temperatur, bei der die Hälfte des Proteins denaturiert vorliegt, festgestellt und aus den Kinetiken der irreversiblen Inaktivierung die Halbwertszeit $t_{1/2}$, d.h. die Zeit bis zur Denaturierung der Hälfte des Proteins bei gegebener Temperatur, als Maß für die Thermostabilität der CGTase ermittelt.

3.2.7.3.1 DSC-Messungen

Die DSC-Messungen wurden zunächst mit Scanraten von 0,1 °C, 0,5 °C und 1 °C pro Minute durchgeführt. Offensichtlich war die Scanrate von 1 °C/min zu schnell für die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen F und U bei den jeweiligen Temperaturen, da hier der T_m -Wert (67,5 °C) deutlich höher lag als bei den Scanraten von 0,5 °C und 0,1 °C (66,5 °C und 66,3 °C). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Messungen mit einer Scanrate von 0,1 °C/min durchgeführt. Als Puffer wurden 10 mM KP bzw. 50 mM Tris/HCl verwendet. Dabei änderte sich im Phosphatpuffer der bei 25 °C eingestellte pH-Wert von 8,0 wegen des sehr geringen Temperaturgangs ($\Delta pK_a / ^\circ C = -0,0028 / ^\circ C$; Stoll & Blanchard, 1990) kaum, während der pH-Wert im Falle von Tris-Puffer von 8,0 bei 25 °C auf ca. 6,5 bei 80 °C absank ($\Delta pK_a = -0,028 / ^\circ C$; Stoll & Blanchard, 1990). Trotzdem waren die T_m -Werte in beiden Puffern mit 66,5 °C bzw. 66,3 °C nahezu identisch. Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass die CGTasen aus *Bacillus agaradhaerens* und *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 durch Ca^{2+} -Ionen aktiviert bzw. stabilisiert werden (Martins & Hatti-Kaul, 2002; Rashid *et al.*, 2002). CGTasen besitzen zwei Calcium-Bindestellen, von denen eine auch in α -Amylasen konserviert ist. Diese Bindestelle besteht aus Aminosäuren der konservierten Regionen I und II (1.1), die zweite Bindestelle ist nur in CGTasen konserviert und wird von den Aminosäuren D29, D31, N34, N35, G54 und D56 gebildet. Um zu untersuchen, ob Ca^{2+} -Ionen die CGTase aus *A. gottschalkii* stabilisieren, wurden DSC-Messungen in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 (bei 70 °C) in Anwesenheit von 5 mM $CaCl_2$, ohne Zugabe von $CaCl_2$ bzw. nach Zugabe von 20 mM EDTA durchgeführt. Dabei sank der T_m -Wert sukzessive von ca. 69 °C auf 66 °C und 60 °C (Abbildung 3.9). Diese Ergebnisse zeigen, dass (i) die CGTase durch Ca^{2+} -Ionen gegen thermische Denaturierung stabilisiert wird und (ii) die Bindung der Ionen an die CGTase mit hoher Affinität erfolgen muss, da ihre vollständige Entfernung die Komplexbildung durch EDTA

erfordert. Tatsächlich wurden für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an α -Amylasen extrem niedrige Dissoziationskonstanten zwischen 44 nM und 5 μM gemessen (Nielsen & Borchert, 2000). Auffallend ist, dass mit abnehmender Konzentration an CaCl_2 nicht nur der T_m -Wert sinkt, sondern auch der Auffaltungspeak zunehmend flacher wird, d.h. die Kooperativität der Denaturierung abnimmt. Dies bedeutet, dass Ca^{2+} -Ionen nicht nur zu einer Stabilisierung der CGTase führen, sondern auch die Kompaktheit ihrer Struktur erhöhen. Die unsymmetrische Form der Auffaltungskurve deutet darauf hin, dass die thermische Denaturierung der CGTase nicht mit dem *two-state* Modell beschrieben werden kann, sondern Auffaltungsintermediate auftreten (Abbildung 3.9). Tatsächlich ergab die Deconvolution des Auffaltungspeaks in Anwesenheit von 20 mM EDTA (Programm: Origin, MicroCal Software), dass der gesamte Übergang in fünf Teilschritte zerlegt werden kann und somit mindestens vier Intermediate populiert sein müssen (Abbildung 3.9, Innere Graphik).

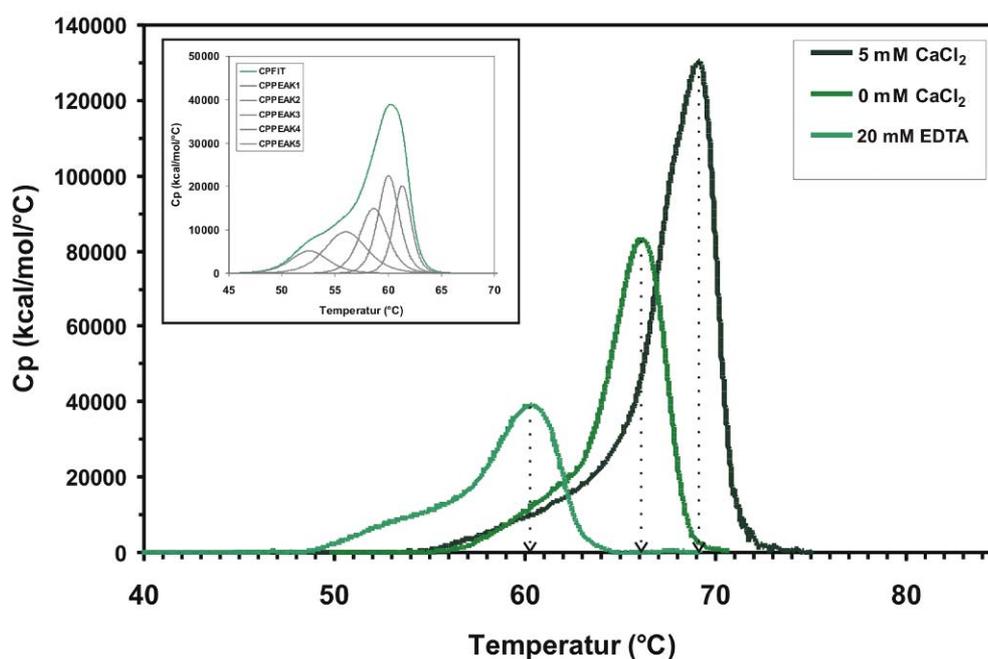


Abbildung 3.9: Die CGTase aus *A. gottschalkii* wird durch Ca^{2+} -Ionen gegen thermische Denaturierung stabilisiert.

DSC Messungen nach Zugabe von 5 mM CaCl_2 (dunkelgrün), ohne Zugabe von CaCl_2 (grün) und nach Zugabe von 20 mM EDTA (mintfarben) ergaben T_m -Werte von 69 °C, 66 °C und 60 °C. Es wurden jeweils 1 mg/ml CGTase in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 (bei 70 °C) mit einer Scangeschwindigkeit von 0,1 °C/min erhitzt.

Innere Graphik: Die Deconvolution der Messung in Anwesenheit von 20 mM EDTA ergibt fünf Einzelpeaks.

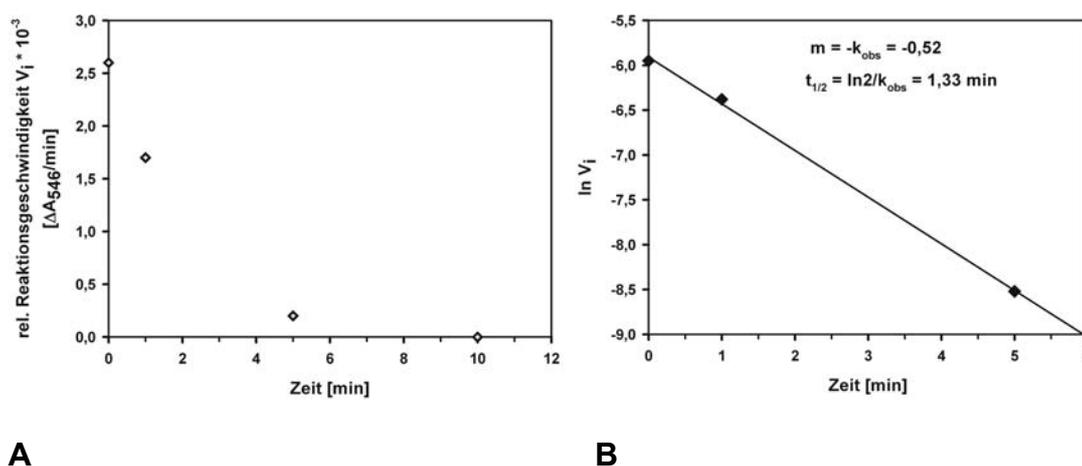
Die einfachste Interpretation dieses Ergebnisses ist, dass die fünf Teilschritte der sukzessiven Denaturierung der fünf Domänen A-E der CGTase entsprechen. Entsprechend wurde die Deconvolution der Auffaltungskurve der α -Amylase aus *Pyrococcus furiosus* in drei Teilschritte im Sinne einer sukzessiven Auffaltung der drei Domänen dieses Proteins interpretiert (Laderman *et al.*, 1993). Um die Richtigkeit dieser Interpretation überprüfen zu können, müsste jedoch die Auffaltung der isolierten Domänen einzeln untersucht und die dabei auftretenden Auffaltungspeaks mit den Deconvolutionspeaks des Gesamtproteins verglichen werden. Diese Untersuchungsmethode ist abhängig davon, dass sich die isolierten Domänen zu stabilen Proteinen falten. Für das Zwei-Domänen-Protein Xylanase A aus *Streptomyces lividans* konnte durch den Vergleich der Auffaltungen der isolierten Domänen und des nativen Proteins mittels DSC gezeigt werden, dass die Domänen separat nacheinander auffalten (Roberge *et al.*, 2003).

Nach Abkühlung der Lösungen wurde die CGTase jeweils erneut erhitzt. Bei diesen zweiten Scans wurde jedoch in keinem Fall ein Auffaltungspike beobachtet. Dies bedeutet, dass die thermische Denaturierung der CGTase unter den gegebenen Bedingungen irreversibel verläuft und deshalb eine thermodynamische Analyse der Auffaltung nicht möglich ist.

3.2.7.3.2 Thermische Inaktivierung

Die DSC-Messungen wurden durch Untersuchungen zur Kinetik der irreversiblen Inaktivierung ergänzt. Zu diesem Zweck wurde die CGTase in Anwesenheit von 5 mM CaCl_2 bei 80 °C, 70 °C, 65 °C und 62 °C inkubiert und nach verschiedenen Zeiten die verbliebene Aktivität mittels des kontinuierlichen Tests bei 40 °C quantifiziert (2.5.11.2 und 2.5.13). Bei 80 °C war bereits nach einer Inkubation von einer Minute keine katalytische Aktivität mehr nachweisbar. Bei 70 °C konnte eine Halbwertszeit $t_{1/2}$ von ca. 1,3 min ermittelt werden, jedoch war auch bei dieser Temperatur innerhalb von 10 min die katalytische Aktivität vollständig erloschen (Abbildung 3.10). Dagegen lagen bei der DSC-Messung in Anwesenheit von 5 mM CaCl_2 bei 70 °C noch etwa 50 % der CGTase in nativer Konformation vor (Abbildung 3.9), obwohl bei der verwendeten Scanrate von 0,1 °C/min die Erwärmung von 69 °C auf 71 °C ca. 20 min in Anspruch nahm. Dies bedeutet, dass die Inaktivierung der CGTase nicht an den Verlust der nativen Konformation gebunden ist, sondern über einen davon prinzipiell unabhängigen

Mechanismus verlaufen kann. Dabei könnte es sich zum Beispiel um chemische Modifizierungen in der Nähe des aktiven Zentrums handeln (Schema 2 in 2.5.13).



A **B**
Abbildung 3.10: Thermische Inaktivierung bei 70 °C der wildtypischen CGTase.
A: Auftragung der relativen Katalyserate V_i [$\Delta A_{546}/\text{min}$] gegen die Inkubationszeit
B: Bestimmung der Halbwertszeit $t_{1/2}$ aus dem exponentiellen Abfall von V_i mit der Zeit.

100 μl CGTase (0,2 μM) in 100 mM Tris/HCl, pH 9,2 (25 °C), 1 mM CaCl_2 wurden für 1, 5, 10 und 15 min bei 70 °C inkubiert und anschließend in Eiswasser abgekühlt. Nach Zentrifugation wurden 10 μl des Überstandes in den kontinuierlichen Aktivitätstest eingesetzt, wobei 1 ml Reaktionsansatz 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 (bei 40 °C), 5 mM CaCl_2 , 0,3 mM Methylorange und 0,1 % Paselli SA2-Stärke enthielten. Die Absorption wurde für 15 min bei 546 nm verfolgt.

Als chemische Modifikationen kommen z.B. die Desaminierungen von Asparagin-Resten in Frage, wobei L-Aspartyl- oder L-Isoaspartylreste entstehen (Ahern & Klibanov, 1988) oder die Spaltung von Peptidbindungen C-terminal von Asparaginen (Hensel *et al.*, 1992). Weiterhin können in Anwesenheit von reduzierenden Zuckern diese mit Aminogruppen über die Maillard-Reaktion Schiff'sche Basen produzieren (Ahern & Klibanov, 1988). Die beiden einzigen hierfür in Frage kommenden Asparagin-Reste dienen der Bindung von Glucose-Molekülen in den Donorbindestellen -3 und -6 (1.1) und sind konserviert. Ein Austausch des Asparaginrestes in -3 gegen Glutamin führte in *Bacillus* sp. I-5 zur Reduzierung des Stärkeabbaus um 42 % (Kim *et al.*, 1997). Da die Donorbindestelle -3 im Zuge einer Cyclisierungsreaktion Konformationsänderungen unterworfen ist (Uitdehaag *et al.*, 2000), erscheint es möglich, dass durch eine Deamidierung der Asparagin-Reste in -3 (und -6) zum einen die Substratbindung und zum anderen die Cyclisierungsreaktion beeinträchtigt wird.

Besonders auffallend ist, dass nach Inkubation bei 62 °C und 65 °C die Aktivität innerhalb von 30 bzw. 10 min auf 50 % des Ausgangswertes absank, um danach für lange Zeit mehr oder weniger konstant (Abbildung 3.11) und auch nach 20-stündiger Inkubation noch nachweisbar zu bleiben (in Abbildung 3.11 nicht gezeigt).

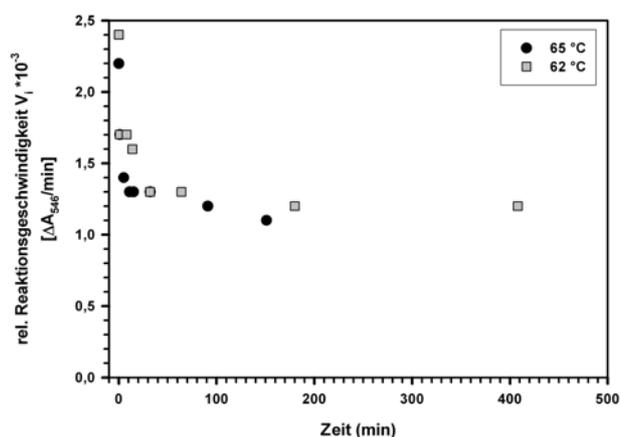


Abbildung 3.11: Thermische Inaktivierung bei 62 °C (grau) und 65 °C (schwarz) der wildtypischen CGTase.

Auftragung der relativen Katalyserate V_i [$\Delta A_{546}/\text{min}$] gegen die Inkubationszeit. 100 μl CGTase (0,2 μM) in 100 mM Tris/HCl, pH 9,2 (25 °C), 1 mM CaCl_2 wurden für 1, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 180 und 400 min bei 62 °C bzw. 65 °C inkubiert und anschließend in Eiswasser abgekühlt. Nach Zentrifugation wurden 10 μl des Überstandes in den kontinuierlichen Aktivitätstest eingesetzt, wobei 1 ml Reaktionsansatz 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 (bei 40 °C), 5 mM CaCl_2 , 0,3 mM Methylorange und 0,1 % Paselli SA2-Stärke enthielten. Die Absorption wurde für 15 min bei 546 nm verfolgt.

Bei der thermischen Inaktivierung der α -Amylase aus *Bacillus licheniformis* sank die Aktivität ebenfalls anfänglich rasch auf ca. 50 % ab, um danach für mehrere Stunden unverändert zu bleiben. Die zugrunde liegenden Mechanismen wurden jedoch weder untersucht noch diskutiert (Fitter *et al.*, 2001). Da der Verlust der Aktivität um 50 % ähnlich hoch ist wie der Aktivitätsverlust von 42 % durch den Aminosäureaustausch Asn gegen Gln in Bindestelle –3 der CGTase aus *Bacillus* sp. I-5 (siehe oben, Kim *et al.*, 1997), könnte die chemische Modifizierung des Asparaginrestes in Bindestelle –3 der CGTase aus *A. gottschalkii* eine mögliche Ursache für den raschen 50 %igen Aktivitätsverlust sein. Die chemisch modifizierte CGTase würde demnach im weiteren Verlauf der Inkubation bei 62 °C bzw. 65 °C nicht messbar inaktiviert oder denaturiert werden.

3.2.7.4 Die Cyclisierungsaktivität der CGTase (β -CD Produktion)

Die β -Cyclodextrin Produktion der CGTase wurde mit 5 % Paselli SA2-Stärke als Substrat bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten mit und ohne CaCl_2 -Zugabe verfolgt (2.5.11.1).

Zunächst wurde die katalytische Aktivität der CGTase bei verschiedenen Temperaturen zwischen 50 °C und 70 °C, jeweils bei einem pH-Wert von 8,5, verfolgt (Abbildung 3.12 A). Dabei war die β -CD Produktion innerhalb der ersten 10 min bei den verschiedenen Temperaturen recht ähnlich (Abbildung 3.12 A), während nach 30 min die Menge an gebildetem β -CD mit der Zunahme der Temperatur zwischen 50 °C und 67 °C anstieg. Bei 70 °C brach die Produktion bereits nach 10 min ab, bei 67 °C nach 30 min.

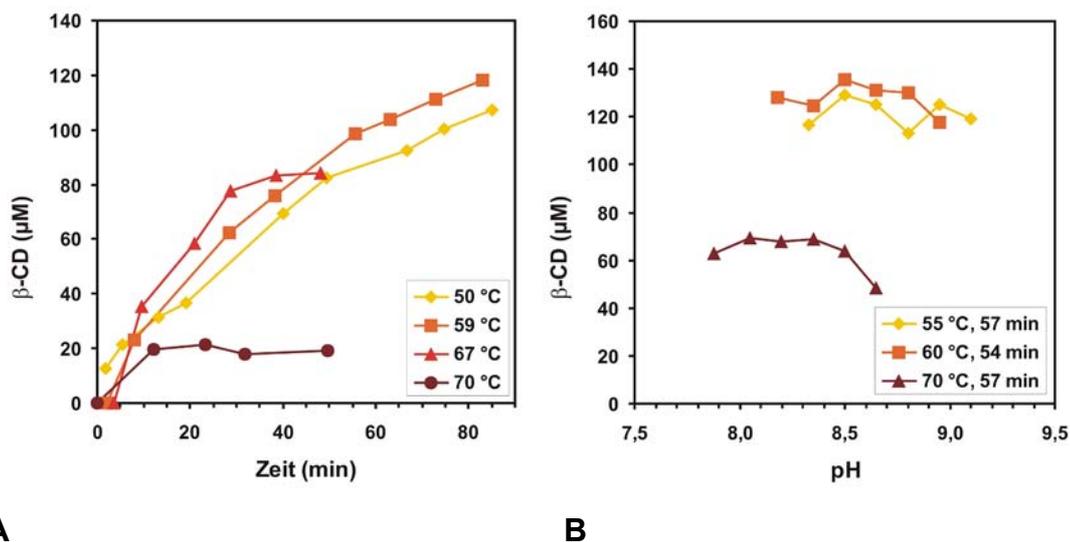


Abbildung 3.12: β -CD Produktion der CGTase in Abhängigkeit der Temperatur (A) und des pH-Wertes (B).

Es wurden 0,6 nM (A) bzw. 1,6 nM (B) CGTase in einem 1 ml Reaktionsansatz (10 mM Tris/HCl, pH 8,5 (A) bzw. pH zwischen 7,0 und 9,5 (B)) mit 5 % Paselli SA2-Stärke bei den angegebenen Temperaturen im Wasserbad inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Menge an gebildetem β -CD durch Komplexbildung mit Phenolphthalein spektroskopisch analysiert (2.5.11.1).

Die Ergebnisse der DSC-Messungen (Abbildung 3.9) und der Kinetik der thermischen Inaktivierung (Annahme 3.2.7.3.2) legen nahe, dass die Stagnation der β -CD Produktion bei 67 °C bzw. 70 °C auf die thermische Inaktivierung der CGTase zurückzuführen ist. Untersuchungen an der CGTase aus *Bacillus firmus* strain no. 37 ergaben ähnliche Ergebnisse, wobei hier die γ -CD Produktion bei 70 °C nach 4 h abbrach (Matioli *et al.*,

2001). Dies macht deutlich, dass bei der Ermittlung der optimalen Produktionstemperatur von Cyclodextrinen ein Kompromiss gefunden werden muss zwischen dem Anstieg der Katalyserate mit zunehmender Temperatur und der thermischen Inaktivierung der CGTase.

Die Analyse der Cyclisierungsaktivität auf ihre pH-Abhängigkeit zeigte, dass die β -CD-Produktion über einen pH-Bereich von 7,8 bis 9,1 nicht wesentlich vom pH-Wert beeinflusst wird (Abbildung 3.12 B). Dies gilt für alle gemessenen Temperaturen und wurde auch bei der CGTase aus *Bacillus macerans* IFO 3490 beobachtet (Tonkova, 1998).

3.2.7.5 Produktspektrum der CGTase

Das Produktspektrum der CGTase wurde bei verschiedenen Enzymkonzentrationen, Stärkekonzentrationen, pH-Werten und Temperaturen analysiert. Die synthetisierten α -, β - und γ -Cyclodextrine wurden über HPLC getrennt und ihre Elution über ein Refraktometer detektiert (2.5.11.3). Die jeweils gebildeten Mengen an α -, β - und γ -CD wurden mit Hilfe einer Eichreihe quantifiziert. Parallel wurde der Abbau der Stärke über einen Iod-Test verfolgt (2.5.11.4) und die Mengen an gebildetem α -, β - und γ -CD und an restlicher Stärke gegen die Inkubationszeiten aufgetragen.

Bei einem pH-Wert von 8,5, einer Temperatur von 50 °C und einer Ausgangskonzentration von 5 % Paselli SA2-Stärke wird bei Verdopplung der Enzymkonzentration wie erwartet bereits nach der Hälfte der Zeit die Stärke vollständig abgebaut (60 min gegenüber 120 min) und das Maximum an gebildeten Produkten erreicht (120 min gegenüber 240 min). Unabhängig von der Enzymkonzentration, erhöht sich mit zunehmender Inkubationszeit der Anteil von β -CD an der Gesamtproduktion, während der Anteil an α -CD, der zu Beginn dominiert, entsprechend zurückgeht. Der Anteil an γ -CD ist bei allen Inkubationszeiten am geringsten und erreicht maximal 10 %.

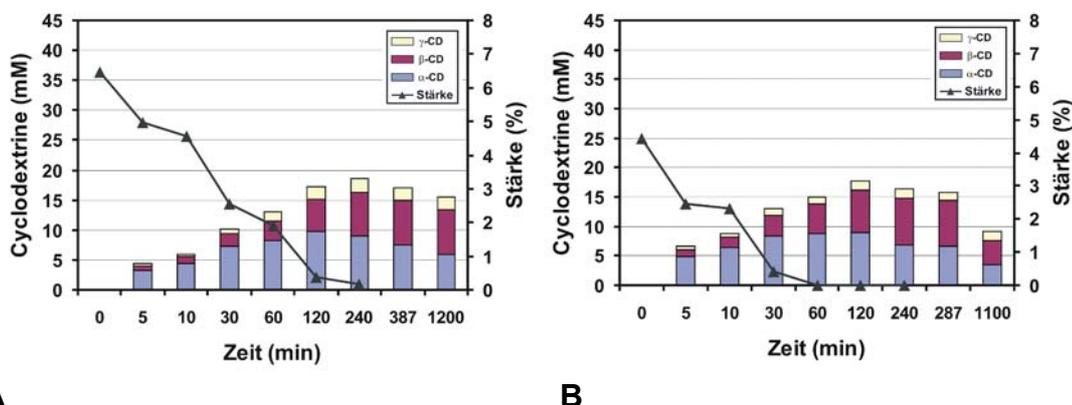
**A****B**

Abbildung 3.13: CD-Produktion und Stärkeabbau durch 0,01 mg/ml (A) und 0,02 mg/ml (B) CGTase

Bedingungen: 10 ml 5 % Paselli SA2-Stärke in 10 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl₂, 50 °C.

Auffallend ist, dass sich im Falle der doppelten Enzymkonzentration auch nach vollständigem Stärkeabbau, der nach 60 min erreicht ist, die Gesamtmenge an gebildetem Cyclodextrin noch weiter erhöht. Dies wurde schon bei anderen CGTasen beobachtet und mit der Disproportionierung (1.1 und Abbildung 1.3) von kurzen Zuckerketten (2-6 Glucosebausteine, Maltotriose bis Maltopentose) zu längeren Oligomeren erklärt, die dann wiederum zu Cyclodextrinen umgewandelt werden können (Matioli *et al.*, 2002; Mäkelä & Korpela, 1988). Sowohl bei einfacher als auch bei doppelter Enzymmenge kommt es nach dem Erreichen des Produktmaximums zum Abbau von Cyclodextrinen, der im Falle von α -CD stärker ausgeprägt ist als im Falle von β - und γ -CD. Dieser Abbau wird durch Verdopplung der Enzymmenge deutlich beschleunigt. Der Abbau der Cyclodextrine kann auf die Coupling-Aktivität der CGTase (1.1 und Abbildung 1.3) und/oder auf Produktinhibition zurückgehen, wie sie von Matioli *et al.* (2002) bei der CGTase aus *Bacillus firmus* strain no. 37 für β - und γ -CD beobachtet wurde.

In Abbildung 3.14 ist der Einfluss der Substratkonzentration (A: 5 %; B: 20 % Paselli SA2-Stärke) auf die CD-Produktion dargestellt.

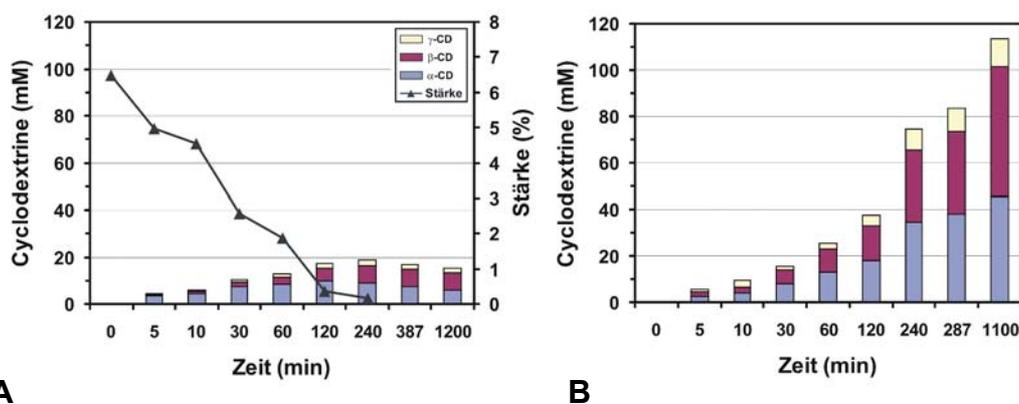
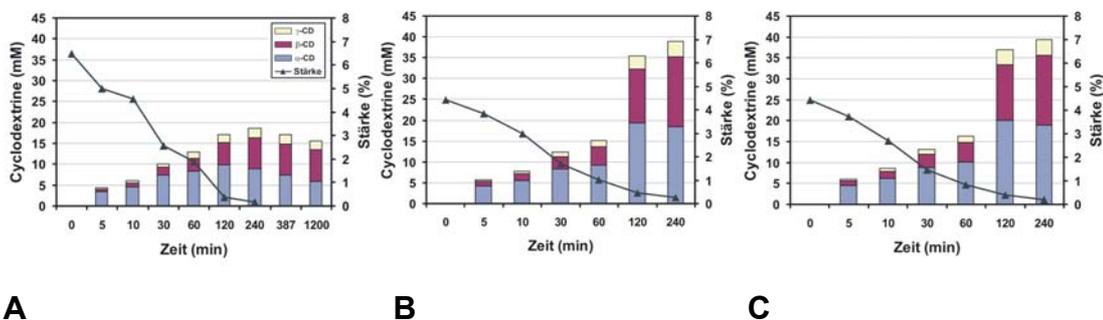


Abbildung 3.14: CD-Produktion und Stärkeabbau mit 5 % (A) und 20 % (B) Paselli SA2-Stärke als Substrat.

Bedingungen: 10 ml 0,01 mg/ml CGTase in 10 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl₂, 50 °C.

Bei einem pH-Wert von 8,5 und einer Temperatur von 50 °C erzeugten 0,01 mg/ml CGTase mit 5 % Stärke als Substrat innerhalb von 240 min 18 mM Cyclodextrine, während im gleichen Zeitraum mit 20 % Stärke als Substrat 74 mM Cyclodextrine hergestellt wurden. Dies bedeutet, dass ein vierfaches Angebot an Substrat auch zu einer vierfachen Menge an Produkt geführt hat. Auch steigt mit 20 % Stärke als Substrat die Menge an CD bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 1100 min an, während mit 5 % Stärke die Produktmenge nach einem Maximum bei 240 min wieder zurückgeht. Bis zu dem Zeitpunkt 240 min ist hier das Substrat Stärke vollständig abgebaut. Bei der Messung mit 20 % Stärke als Substrat können Substratabbau und Produktbildung allerdings nicht korreliert werden, da aus technischen Gründen die Stärke-Konzentrationen nicht mit dem Iod-Test analysiert werden konnten (2.5.11.4). Wie schon in Abbildung 3.13 gezeigt, nahm auch in dieser Versuchsreihe der Anteil an β-CD im Laufe der Inkubation auf Kosten von α-CD zu. Auch war der Anteil an γ-CD wiederum am geringsten, und zwar bei beiden Stärkekonzentrationen.

In Abbildung 3.15 ist die Temperaturabhängigkeit (A: 50 °C, B: 60 °C, C: 65 °C) der CD-Produktion dargestellt.



A

B

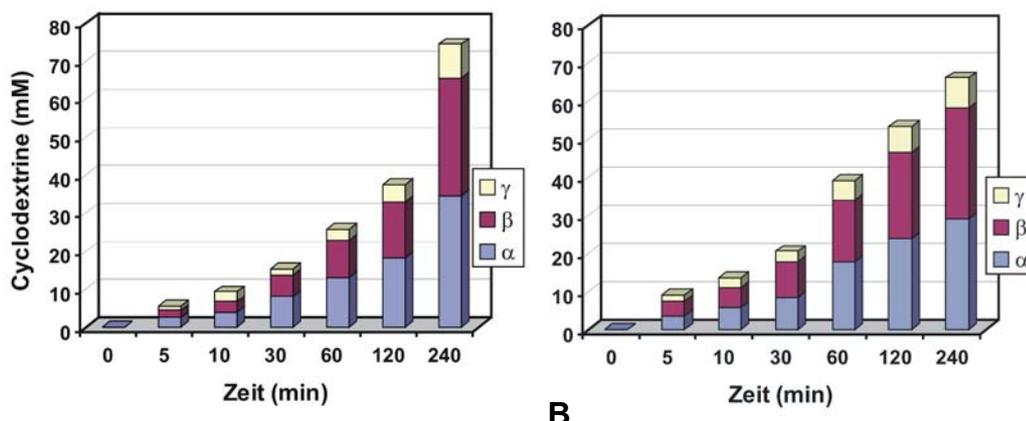
C

Abbildung 3.15: CD-Produktion und Stärkeabbau bei 50 °C (A), 60 °C (B), 65 °C (C).

Bedingungen: 10 ml 5 % Paselli SA2-Stärke in 10 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl₂, 0,01 mg/ml CGTase.

Bei einem pH-Wert von 8,5 und einer Ausgangskonzentration von 5 % Stärke wird in der ersten Phase der Inkubation hauptsächlich α -CD gebildet, dessen Anteil dann im weiteren Verlauf zugunsten von β -CD zurückgeht. Nicht zu erklären ist der sprunghafte Anstieg der CD-Produktion zwischen 60 und 120 min, der nur bei 60 °C und 65 °C zu beobachten ist. Während jedoch bei 50 °C die Anteile von α - und β -CD nach 240 min nahezu identisch sind, überwiegt nach dieser Zeit bei 60 °C und 65 °C immer noch α -CD. Das Substrat ist bei allen drei Temperaturen nach 240 min vollständig umgesetzt. Bei 60 °C und 65 °C liegen jedoch nach dieser Zeit wesentlich höhere Konzentrationen an Cyclodextrinen vor (ca. 6 mM) als bei 50 °C (ca. 3,5 mM).

In Abbildung 3.16 werden die Ergebnisse bei 50 °C und 70 °C verglichen. Da bei der 70 °C Messung wegen der thermischen Denaturierung der CGTase die β -CD Produktion in Anwesenheit von 5 % Stärke bereits nach 10 min stagnierte (Abbildung 3.12), wurden für diese Messungen 20 % Paselli SA2-Stärke als Substrat eingesetzt.



A

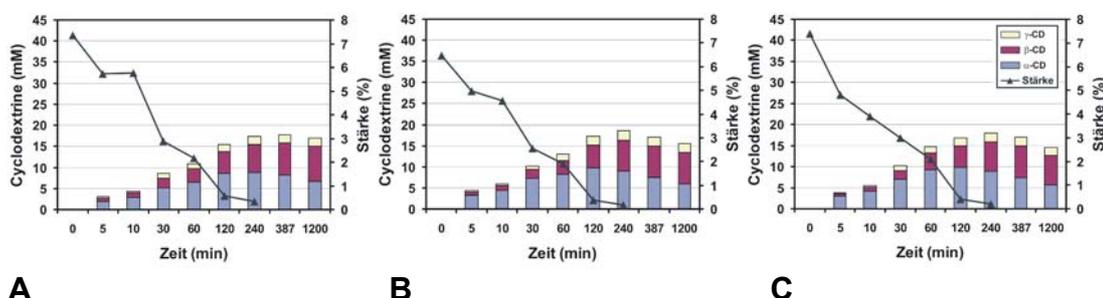
B

Abbildung 3.16: CD-Produktion bei 50 °C (A) bzw. 70 °C (B).

Bedingungen: 10 ml 20 % Paselli SA2-Stärke und 0,01 mg/ml CGTase in 10 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl₂.

Tatsächlich führte dies zu einem kontinuierlichen Anstieg der CD-Konzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum von 240 min hinweg (Abbildung 3.16 B). Dies deutet darauf hin, dass die CGTase durch Stärke stabilisiert wird, wobei zumindest zwei unterschiedliche Mechanismen in Frage kommen. Zum einen könnte die CGTase in spezifischer Weise durch die Bindung seines Substrates Stärke stabilisiert werden, zum anderen unspezifisch durch den so genannten *molecular crowding effect*. Danach nehmen Proteine in Gegenwart hoher Konzentrationen gelöster Stoffe, wie sie im Cytoplasma von Zellen angetroffen werden, eine kompaktere und damit stabilere Faltung ein (Sasahara *et al.*, 2003).

In Abbildung 3.17 wird der Einfluss des pH-Wertes (A: 7,0; B: 8,5; C: 9,5) auf die Produktbildung und den Substratabbau dargestellt.



A

B

C

Abbildung 3.17: CD-Produktion und Stärkeabbau bei pH 7,0 (A), 8,5 (B) und 9,5 (C).

Bedingungen: 10 ml 5 % Paselli SA2-Stärke und 0,01 mg/ml CGTase in 10 mM Tris/HCl, 5 mM CaCl₂, 50 °C.

Unabhängig vom pH-Wert, wird bei einer Temperatur von 50 °C und in Anwesenheit von 5 % Stärke das Maximum an erzeugten Cyclodextrinen zeitgleich mit dem Abbau des gesamten Substrates nach 240 min erreicht. Wie in allen bisherigen Messreihen wird zunächst hauptsächlich α -CD gebildet, dessen Anteil aber im Verlauf der Messung bei allen pH-Werten auf Kosten des Anteils an β -CD abnimmt. Den geringsten Anteil macht wiederum γ -CD aus. Auffallend ist, dass die Geschwindigkeiten der Bildung und des Abbaus der Cyclodextrine mit dem pH-Wert leicht ansteigen. Die Gesamtmenge an gebildeten Cyclodextrinen und die relativen Anteile an α -, β - und γ -CD hängen dagegen nur unwesentlich vom pH-Wert ab, während für die CGTase aus *Bacillus firmus* strain no. 37 eine deutliche pH-Abhängigkeit der Produktspezifität beobachtet wurde (Matioli *et al.*, 2001). Dabei lagen die optimalen Bedingungen für die γ -CD Produktion bei 70 °C und pH 8,0, die für die β -CD Herstellung bei 65 °C und pH 6,0.

3.2.8 Zusammenfassung und Diskussion zur Charakterisierung der CGTase

Die gereinigte CGTase wurde mittels hydrodynamischer und spektroskopischer Methoden strukturell charakterisiert. Des Weiteren wurde ihre thermische Stabilität mittels differentieller *scanning calorimetry* und irreversibler thermischer Inaktivierung getestet, sowie die Kinetik des Substratabbaus und der Produktbildung mittels Enzymkinetik unter Fließgleichgewichtsbedingungen gemessen.

Das Elutionsvolumen bei der analytischen Gelfiltration entsprach einem Protein mit einem Molekulargewicht von weniger als 14 kDa, während die monomere CGTase ein Molekulargewicht von 78 kDa aufweist. Es konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass die Elution der CGTase durch die Wechselwirkung seiner Maltose-Bindestellen mit Dextranmolekülen der Säulenmatrix verzögert wird. Aus diesem Grund konnte der Oligomerisierungszustand auf der Basis der analytischen Gelfiltration nicht zweifelsfrei geklärt werden. Die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung (3.2.4) sprechen jedoch dafür, dass das Protein als Monomer vorliegt, ebenso wie fast alle der bisher untersuchten CGTasen. Eine Ausnahme bildet lediglich die CGTase aus *Bacillus macerans*, die als Dimer beschrieben wurde (Takano *et al.*, 1986). Die spektroskopische Analyse mittels Circular dichroismus und Fluoreszenzspektroskopie belegte eindeutig,

dass die gereinigte CGTase aus definierten Sekundärstrukturelementen besteht und eine native Tertiärstruktur aufweist. Die DSC-Messungen zeigten, dass die Denaturierung der CGTase bereits ab 50 °C einsetzt, in Gegenwart von 5 mM Ca^{2+} -Ionen der Schmelzpunkt jedoch auf annähernd 70 °C ansteigt. Die thermische Inaktivierung der CGTase scheint über einen von der Denaturierung unabhängigen Mechanismus zu verlaufen, eventuell erfolgt sie über eine chemische Modifizierung von Asparaginresten in der Nähe des aktiven Zentrums. Zur Messung der katalytischen Aktivität der CGTase wurde in einem diskontinuierlichen Test der zeitliche Verlauf der Bildung von β -Cyclodextrin verfolgt, wobei, vermutlich wegen der thermischen Labilität des Enzyms, zwischen 50 °C und 60 °C eine größere Menge an Produkt gebildet wurde als bei 70 °C. In weiteren Untersuchungen wurde der zeitliche Verlauf des Stärkeabbaus und des Produktspektrums an α -, β - und γ -CD in Abhängigkeit von Enzym- und Substratkonzentration, Temperatur und pH-Wert verfolgt. Dabei stellte sich heraus, dass nach längeren Inkubationszeiten bei allen Versuchsbedingungen vergleichbare Mengen an α - und β -CD produziert wurden, jedoch deutlich weniger γ -CD. Auffallend war, dass auch nach dem vollständigen Abbau der Stärke noch eine Nettosynthese von Cyclodextrinen erfolgte, was vermutlich auf die Disproportionierung von kurzen Zuckerketten zurückgeht. Da in Anwesenheit von 20 % Stärke die Cyclodextrinproduktion bei 70 °C über einen wesentlich längeren Zeitraum erfolgte als in Anwesenheit von 5 % Stärke, scheint die CGTase außer durch Ca^{2+} -Ionen auch durch ihr Substrat stabilisiert zu werden.

3.3 Thermische Stabilisierung der CGTase durch Zufallsmutagenese und Screening

Bei der industriellen Herstellung von Cyclodextrinen muss zunächst die Stärke bei 95 °C durch thermostabile Amylasen teilweise hydrolysiert werden, bevor nach einer Abkühlung auf 20-75 °C CGTasen wirksam werden können. Dieser aufwändige und teure Prozess soll durch den Einsatz von thermostabilen CGTasen vereinfacht werden. Zu diesem Zweck sollte die bereits relativ robuste CGTase aus *A. gottschalkii* mittels gerichteter Evolution, d.h. durch eine Kombination aus Zufallsmutagenese und Screening, weiter stabilisiert werden.

3.3.1 Einführung einer *EcoRI*-Schnittstelle in die Mitte des *cgtase*-Gens

Da das *cgtase*-Gen 2066 bp umfasst und molekularbiologische Arbeiten mit solch großen DNA-Fragmenten oft ineffizient verlaufen, wurde das Gen in zwei Hälften aufgeteilt, die separat mutagenisiert und kloniert werden konnten. Die 5'-Hälfte entspricht den Domänen A (bis zur Mitte der α -Helix 6) und B, die 3'-Hälfte entspricht dem C-terminalen Teil von Domäne A (ab der Mitte von α -Helix 6) und den Domänen C, D und E (Abbildung 1.1). Zur Unterteilung des Gens wurde durch den Nukleotidaustausch T873C des Gens eine *EcoRI*-Schnittstelle mittels SOE-PCR (2.3.3.6.1) eingeführt, wobei die Primerpaare T7 Promotor/3'-CGTaseinnen*EcoRI* zur Amplifikation des 5'-terminalen und die Primerpaare 5'-CGTaseinnen*EcoRI*/T7 Terminator zur Amplifikation des 3'-terminalen Fragmentes verwendet wurden (Abbildung 3.18 A). Als Template der PCR-Reaktionen, die mit dem *Ready-MixTM REDTaqTM PCR Reaction Mix with MgCl₂* (Sigma-Aldrich) durchgeführt wurden, diente jeweils das Plasmid pET24a_*cgtase*oS. Die überlappenden PCR-Produkte wurden über Agarosegele gereinigt (2.3.2.4) und als Template einer weiteren PCR eingesetzt, bei der die beiden außenstehenden Primer T7 Promotor und T7 Terminator verwendet wurden (Abbildung 3.18 A).



Abbildung 3.18: Einführung einer *EcoRI*-Schnittstelle in die Mitte des *cgtase*-Gens

A: SOE-PCR.

B: klonierter Vektor pET24a_*cgtase*_EcoRI

T7P: T7 Promotor. T7T: T7 Terminator

Das dabei amplifizierte Fragment, das dem gesamten *cgtase*-Gen plus eingeführter *EcoRI*-Schnittstelle entspricht, wurde nach Restriktionsverdau mit *NheI* und *HindIII* mit dem Vektor pET24a ligiert. Nach Transformation von *E. coli* DH5 α -Zellen (2.2.5.5) mit den Ligationsprodukten und der Inkubation bei 37 °C auf LB-Agarplatten mit Kanamycin wurde aus mehreren der

gewachsenen Kolonien pET24a_cgtase_EcoRI Plasmid (Abbildung 3.18 B) isoliert und der Erfolg der Klonierung mittels Insert-Screening (2.3.3.5) und DNA-Sequenzierung (2.3.3.7) unter Verwendung der Primer T7 Promotor, T7 Terminator, 5'-SOE-CGTase, 3'-SOE-CGTase, 5'-CGTaseSequ350 und 5'-CGTaseSequ1500 verifiziert.

3.3.2 Erzeugung eines Pools an mutagenisierten CGTase-Varianten

Das Plasmid pET24a_cgtase_EcoRI diente als Matrize für die Erzeugung von cgtase-Genvarianten, wobei die 5'-terminale und die 3'-terminale Hälfte des cgtase-Gens separat mittels *Error Prone* PCR (2.3.3.6.2) amplifiziert wurden. Dazu wurden für die 5'-Hälfte die Primer T7 Promotor und 3'-CGTaseinnenEcoRI und für die 3'-Hälfte die Primer 5'-CGTaseinnenEcoRI und T7 Terminator verwendet (Abbildung 3.18 A). In einer Reihe von Experimenten (2.3.3.6.2) wurden Bedingungen ermittelt, die den gewünschten Einbau von drei bis vier Mutationen pro Genhälfte sicherstellten. Diese Bedingungen sind in Tabelle 2.4 für die 5'-Hälfte (Reaktion 6) und die 3'-Hälfte (Reaktion 5) aufgelistet. Des Weiteren wurden die 100 µl der beiden PCR-Ansätze zur Durchführung der Reaktionen jeweils auf fünf Aliquots zu 20 µl aufgeteilt. Dies sollte verhindern, dass in den ersten Amplifikationsrunden auftretende Mutationen sich in allen Produkten akkumulieren. Nach Abschluß der PCR wurden die Aliquots wieder vereinigt.

3.3.3 Herstellung einer Bank von cgtase-Genvarianten in pET24a (Bankgröße und Anzahl/Verteilung der Mutationen)

Die beiden mutagenisierten und gereinigten Amplifikationsprodukte der 5'- und 3'-Hälfte wurden über die Schnittstellen *NheI/EcoRI* (5'-Hälfte) und *EcoRI/HindIII* (3'-Hälfte) jeweils mit pET24a_cgtase_EcoRI ligiert, der nur die andere, nicht mutagenisierte Hälfte enthielt. Somit lag eine mutagenisierte 5'-Hälfte mit einer wildtypischen 3'-Hälfte bzw. eine mutagenisierte 3'-Hälfte mit einer wildtypischen 5'-Hälfte des cgtase-Gens fusioniert im Vektor vor. Für beide Hälften wurden jeweils sechs Ligationen mit insgesamt 2,5 µg bzw. 4,4 µg DNA durchgeführt, die anschließend jeweils vereinigt wurden. Zur Erstellung von Genbanken wurden hochkompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert, wobei beide Ligationsansätze auf je sechs Transformationsansätze verteilt wurden, um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erhalten. Ausplattiert wurde jeweils der gesamte

unverdünnte Transformationsansatz auf eine 33 x 38 cm LB-Agarplatte mit Kanamycin und zusätzlich, zur Abschätzung der Größe der Genbanken, jeweils ein Aliquot in einer 1:1000 Verdünnung auf eine kleine (\varnothing 10 cm) LB-Agarplatte mit Kanamycin. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht waren auf den Kontrollplatten der mutagenisierten 5'- bzw. 3'-Hälften 23 bzw. 220 sichtbare Kolonien herangewachsen, woraus auf die Existenz von $1,2 \cdot 10^6$ bzw. $1,1 \cdot 10^7$ unabhängiger Klone hochgerechnet wurde. (Die Transformationseffizienz wurde durch eine parallele Transformation der Zellen mit dem Plasmid pET24a_cgtaseoS zu $8,4 \cdot 10^8$ Transformanten pro μg DNA ermittelt.) Ein Insert-Screening (2.3.3.5) ergab, dass in der 5'-Bank 100 % und in der 3'-Bank 90 % der Plasmide ein cgtase-Gen enthielten. Somit ergab sich, dass die 5'-Bank $1,2 \cdot 10^6$ unabhängige Klone enthält. Die 3'-Bank ist mit $9,8 \cdot 10^6$ unabhängigen Klonen um etwa den Faktor zehn größer. Die stichprobenartige Sequenzierung von jeweils vier Klonen aus den beiden Banken ergab den Einbau von drei bis vier Nukleotidaustauschen, die zufällig über die mutagenisierte Hälfte verteilt waren. Die auf den 33 x 38 cm LB-Agarplatten gewachsenen Kolonien wurden abgeschabt und die Plasmid-DNA der 5'-Bank und der 3'-Bank isoliert (2.3.2.1).

3.3.4 Etablierung eines Screening-Verfahrens zur Isolierung thermisch stabilisierter CGTase-Varianten

Bei der Thermostabilisierung von Proteinen mittels gerichteter Evolution ist eine Selektion bei erhöhten Temperaturen aufgrund fehlender Expressionssysteme in hyperthermophilen Organismen nicht möglich, weshalb hier Screeningsysteme zum Einsatz kommen müssen.

Zunächst musste ein derartiges Screeningverfahren zur Isolierung thermisch stabilisierte CGTase Varianten etabliert werden. Dieses beruht darauf, dass sich auf Agarplatten mit Stärke die katalytische Aktivität von CGTasen durch Hofbildung rund um aufgetropfte Enzymlösung oder um Bakterienkolonien mit Enzym nachweisen lässt. Als Farbindikatoren eignen sich Lugol'sche Lösung (KI-I₂-Lösung; Takano *et al.*, 1986), Amylopektin-Azur (Schmid, 1989; Nitschke *et al.*, 1990) oder Cibachron Rot B (Bertoldo & Antranikian, 2001). In dieser Arbeit wurde Lugol'sche Lösung verwendet (2.5.12). In einer Reihe von Kontrollexperimenten wurde der Einfluss der Induktion der Expression des cgtase-Gens mittels IPTG, der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur auf die Hofbildung untersucht.

Zunächst wurde Plasmid-DNA mit dem wildtypischen *cgtase*-Gen (pET28a_cgtaseoS) bzw. leerer Vektor (pET28a) getestet. Kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurden mit je 10 ng Plasmid-DNA transformiert und in einer 1:10 bzw. 1:100 Verdünnung auf einer LB-Agarplatte mit Kanamycin ausgestrichen („Mutterplatte“). Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C waren ca. 250 Kolonien auf der 1:10 und ca. 50 Kolonien auf der 1:100 Mutterplatte gewachsen. Nach dem Überstempeln (2.2.6) der gewachsenen Kolonien auf eine LB-Agarplatte, die 0,5 % (w/v) Kartoffelstärke, Kanamycin und 1 mM IPTG enthielt, wurde diese Platte bei 37 °C so lange inkubiert, bis einzelne Kolonien sichtbar wurden (Replikaplatte: „Inkubationsplatte“). Dies dauerte zwischen 4 und 6 h. Zur Lyse der *E. coli*-Wirtszellen und zum Abbau der Stärke durch die CGTase wurden die Inkubationsplatten 4 h auf 55 °C erwärmt, wobei nach einer Stunde der Plattendeckel angehoben wurde, um Kondenswasser entweichen zu lassen. Um Kolonien mit wildtypischem *cgtase*-Gen bildeten sich bereits ohne Anfärbung mit Lugol'scher Lösung erkennbare Höfe aus. Kolonien mit dem Leervektor (pET28a) zeigten hingegen keine Hofbildung. Dies bedeutet, dass – wie beabsichtigt – unter den gegebenen Bedingungen der Abbau der Stärke an das Vorliegen der CGTase gekoppelt ist.

Danach wurde ermittelt, ab welcher Temperatur und Inkubationsdauer die Denaturierung der wildtypischen CGTase zum Verlust der Hofbildung führt und ob IPTG zur Synthese der CGTase-Proteine benötigt wird. Dazu wurde je eine Kolonie der Mutterplatten mit *E. coli* BL21(DE3)-pET28a_cgtaseoS bzw. *E. coli* BL21(DE3)-pET28a Zellen (Kontrolle) gepickt. Beide Kolonien wurden achtmal, jeweils auf einer Hälfte der selben LB-Agarplatte mit 0,5 % (w/v) Kartoffelstärke und Kanamycin (ohne IPTG), durch mehrmaliges Aufsetzen der Pipettenspitze angeimpft. Diese Inkubationsplatten wurden so lange auf 37 °C gehalten, bis Einzelkolonien sichtbar wurden. Dann wurde je eine Inkubationsplatte für 1 h bzw. 5 h auf 55, 60, 70 und 80 °C erwärmt, anschließend auf RT abgekühlt und mit Lugol'scher Lösung angefärbt. Diejenigen *E. coli* BL21(DE3)-pET28a_cgtaseoS Kolonien, die bei 55 und 60 °C inkubiert wurden, zeigten nach 5 h größere Höfe als nach 1 h. Dies bedeutet, dass die CGTase auch ohne Zugabe von IPTG synthetisiert wurde und bei diesen Temperaturen nur sehr langsam denaturiert und deshalb über lange Zeit katalytisch aktiv bleibt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten der DSC-Messungen und der Kinetik der thermischen Inaktivierung, wonach die CGTase in Anwesenheit von 5 mM CaCl₂ einen T_m-Wert von 69 °C aufweist (3.2.7.3.1) und nach Inkubation bei 62 °C auch

nach mehreren Stunden noch ca. 50 % ihrer Ausgangsaktivität zeigt (3.2.7.3.2). Diejenigen *E. coli* BL21(DE3)-pET28a_cgtase Kolonien, die bei 70 und 80 °C inkubiert wurden, umgab ein schmaler heller Rand, dessen Größe sich zwischen 1 h und 5 h Inkubationszeit nicht veränderte. Vermutlich denaturiert die CGTase bei diesen Temperaturen so rasch (3.2.7.3.1; 3.2.7.3.2), dass sie keine wesentliche Aktivität entfalten kann. Die beobachteten kleinen Höfe könnten darauf zurückzuführen sein, dass einige wenige Zellen bereits vor der Erhitzung auf 70 °C bzw. 80 °C platzen und so eine geringe Menge an CGTase freigesetzt wird. Die zur Kontrolle ausgestrichenen *E. coli* BL21(DE3)-pET28a Zellen zeigten bei keiner der verwendeten Inkubationstemperaturen Hofbildung. Diese Ergebnisse belegen, dass die wildtypische CGTase bereits bei einer einstündigen Inkubation bei 70 °C zu keiner eindeutigen Hofbildung mehr führt. Deshalb wurden diese Bedingungen gewählt, um auf stabilisierte CGTase Varianten zu screenen. Das Screening-Verfahren wurde allerdings aufgrund der beobachteten kleinen Höfe bei Inkubationen bei 70 °C und 80 °C noch modifiziert. Nach der Inkubation bei 70 °C für 1 h wurde noch eine „Aktivitäts-Inkubation“ bei 50 °C angeschlossen, in der „überlebende“ CGTase Stärke in einem Umfang abbauen konnten, die eine vergrößerte Hofbildung ermöglichte. Die beobachteten kleinen Höfe der 70 °C und 80 °C Inkubation konnten so von einer Hofbildung aufgrund von aktiven CGTase-Proteinen nach Hitzeinaktivierung unterschieden werden.

Um die stabilisierende Wirkung von Stärke für die CGTase (3.2.7.5) beim Screening zu verhindern, wurde versucht, die LB-Agarplatten erst nach der Inkubation bei 70 °C mit konzentrierter Kartoffelstärkelösung zu überschichten bzw. zu besprühen. In beiden Fällen wurden die gewachsenen Kolonien dabei allerdings abgeschwemmt, so dass das Screening in Anwesenheit von Stärke durchgeführt werden musste.

3.3.5 Screening von stabilisierten Varianten

Die erstellten 5'- und 3'-CGTase-Banken wurden auf stabilisierte Varianten gescreent. Dazu wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit je 10 ng Plasmid-DNA der 5'- bzw. 3'-Bank transformiert und in Verdünnungen, die 200-250 Einzelkolonien entsprachen, auf 15 bzw. 19 LB-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert. Dies bedeutet, dass ca. 3500 CGTase Varianten aus der 5'- und ca. 4500 CGTase Varianten aus der 3'-Bank gescreent wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die gewachsenen Kolonien auf LB-

Agarplatten mit 0,5 % (w/v) Kartoffelstärke und Kanamycin gestempelt (2.2.6), und die Platten bei 37 °C so lange inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar waren. Zum Screenen auf stabilisierte CGTase Varianten wurden die Platten für 1 h bei 70 °C inkubiert und anschließend, zur Entfaltung der katalytischen Restaktivität, für 4 h bei 50 °C. Anschließend wurden die Platten zur Anfärbung der nicht umgesetzten Stärke mit Lugol'scher Lösung überschichtet (2.5.12; Abbildung 3.19).

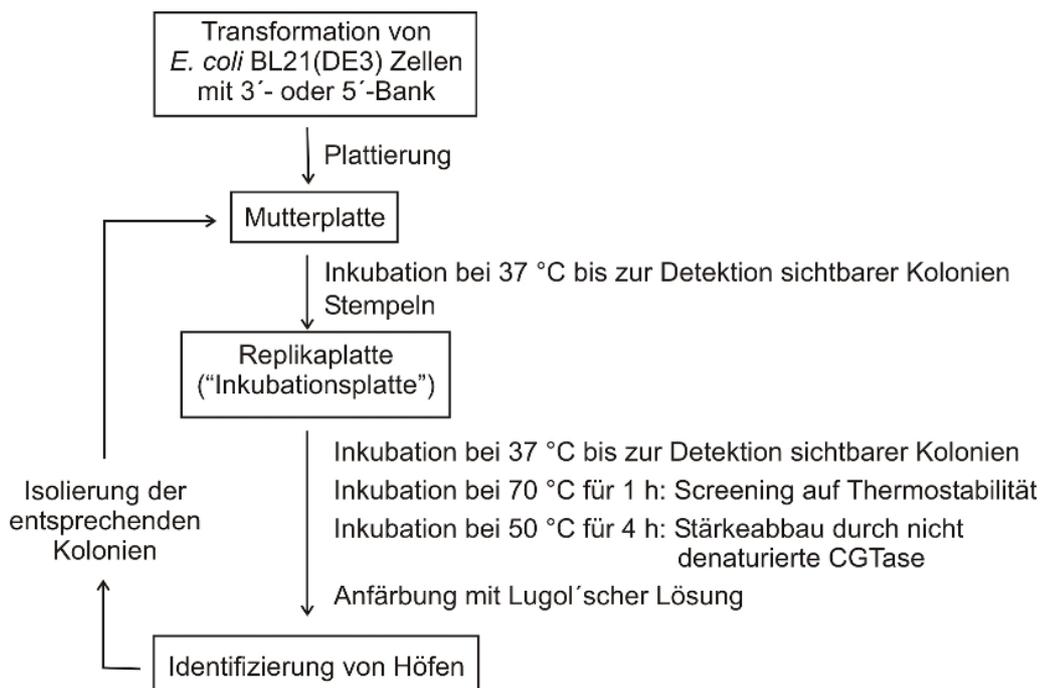


Abbildung 3.19: Screening-Verfahren zur Isolierung von thermisch stabilisierten Varianten.

Während bei keiner der Kolonien der 3'-Bank ein Hof identifiziert werden konnte, hatten sich um sieben der Kolonien der 5'-Bank deutliche Höfe ausgebildet. Die entsprechenden Kolonien wurden von der Mutterplatte gepickt, auf einer neuen LB-Agarplatte mit Kanamycin ausgestrichen, parallel in 3 ml LB-Medium mit Kanamycin inokuliert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Während die neu angeimpfte Agarplatte zur Sicherung diente und bei 4 °C gelagert wurde, wurde die Flüssigkultur zum Anlegen einer Glycerinkultur und zum Animpfen von 50 ml LB-Medium mit Kanamycin verwendet, um daraus Plasmid-DNA zu isolieren. (2.3.2.1). Von dieser Plasmid-DNA wurde das Insert mit dem mutagenisierten *cgtase*-Gen sequenziert, wozu die Primer T7 Promotor und 3'-CGTaseaußen*EcoRI* verwendet wurden.

3.3.6 Lage der Mutationen im Protein

Von den sieben aus der 5'-Bank isolierten Klonen, trugen diejenigen mit den Nummern 2 und 4 keine Mutationen bzw. nur zwei stille Mutationen, die keinen Aminosäureaustausch zur Folge hatten (Tabelle 3.1). Die Klone 1, 3 und 7 enthielten identische Mutationen, von denen sich die der Klone 5 und 6 unterschieden. Die Sequenzierung des gesamten Gens (T7 Promotor; T7 Terminator; 5'-SOE-CGTase; 3'-SOE-CGTase; 5'-CGTaseSequ350; 5'-CGTaseSequ1500) erbrachte keine weiteren Mutationen.

Auf der Basis des in Abbildung 1.1 dargestellten Modells, wurde die Lage der durch die Mutationen verursachten Aminosäureaustausche in der Struktur der CGTase lokalisiert. In Tabelle 3.1 ist das Ergebnis zusammengestellt. Die Lokalisation der Aminosäureaustausche und die Diskussion der daraus folgenden Auswirkungen kann nur mit Vorbehalt geschehen, da die Struktur des CGTase-Proteins nur als Model vorliegt (3.1.1).

Tabelle 3.1: Natur und Lokalisation der Aminosäureaustausche der durch Screening aus der 5'-Bank isolierten CGTase Varianten.

bp: Nukleotidaustausch (Die Nummerierung der Nukleotide bezieht sich auf das cgtase-Gen ohne Signalsequenz.). AS: Aminosäureaustausch (Die Nummerierung der Aminosäuren beruht auf dem Aminosäuresequenz-Alignment von SwissModel (6.3).).

Klon	bp	AS	Lage im Protein
Hof1 (3, 7)	T374G A685G T716C A738T	N116K D220G A230 G238	Domäne A: Anfang 2. α -Helix, an der Seite des Barrels, Oberfläche Domäne A: Ende 3. α -Helix, N-terminales Ende des Barrels, Oberfläche
Hof5	T573C G717A	F183L V231I	Domäne B: Oberfläche Domäne A: nach 4. β -Strang, in konservierter Region II
Hof6	T61A A215T	V12E K63N	Domäne A: vor 1. β -Strang, N-terminales Ende des Barrels, ragt zu Domäne D Domäne A: in 1. α -Helix, Oberfläche
Hof2	----	----	
Hof4	T209A T572C	I61 D182	----

3.3.7 Charakterisierung der isolierten Varianten

Im weiteren wurden nur die CGTasen der Klone 1, 5 und 6 (Hof1; Hof5 und Hof6) durch heterologe Genexpression in *E. coli* hergestellt, gereinigt und mit der wildtypischen CGTase verglichen. Dabei wurde die Thermostabilität und die katalytische Aktivität bei hohen Temperaturen mittels DSC, irreversibler thermischer Inaktivierung und diskontinuierlicher Messung der Cyclisierungsaktivität (β -CD-Produktion) untersucht. Wie das wildtypische *cgtase*-Gen wurden auch die *cgtase*-Varianten in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen von den Plasmiden pET24a_*cgtase_hof1*, *_hof5* und *_hof6* aus exprimiert, wobei auf Induktion durch IPTG je nach Ergebnis der Probeexpression (2.4.1.1) verzichtet wurde. Die Reinigung der Varianten erfolgte wie für die wildtypische CGTase ohne His-Tag beschrieben (3.2.5 und Abbildung 3.5 A) mittels α -CD-Affinitätschromatographie und präparativer Gelfiltration. Im SDS-Gel zeigten die Varianten das gleiche Verhalten wie die wildtypische CGTase (3.2.4).

3.3.7.1 Untersuchungen zur Thermostabilität der Varianten

3.3.7.1.1 DSC-Messungen

Zur Charakterisierung ihrer Thermostabilität wurden die isolierten CGTase-Varianten mittels DSC charakterisiert, wobei die Bedingungen wie bei der wildtypischen CGTase gewählt wurden (3.2.7.3.1; Scanrate: 0,1 °C/min, Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 bei 70 °C, 5 mM CaCl₂ oder 0 mM CaCl₂ oder 20 mM EDTA). Entgegen den Erwartungen waren die Varianten thermolabiler als die wildtypische CGTase, wurden aber ebenso wie diese durch Ca²⁺-Ionen stabilisiert (Abbildung 3.20).

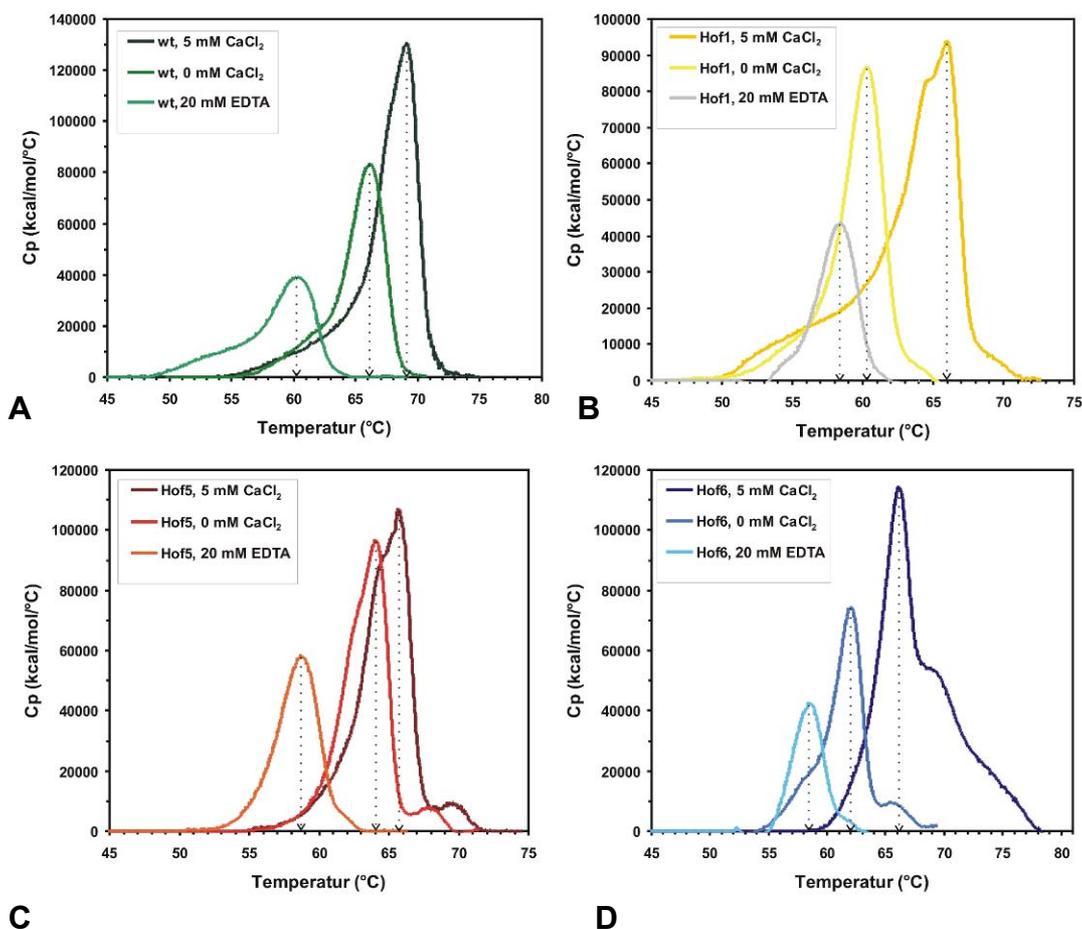


Abbildung 3.20: Die durch Screening isolierten CGTase Varianten sind thermolabiler als das wildtypische Enzym, werden aber ebenso wie dieses durch Ca²⁺-Ionen stabilisiert.

Die DSC-Messungen der wildtypischen CGTase (A), von Hof1 (B), Hof5 (C) und Hof6 (D) erfolgten nach Zugabe von 5 mM CaCl₂, ohne Zugabe von CaCl₂ und nach Zugabe von 20 mM EDTA.

Es wurden jeweils 1 mg/ml CGTase in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 (bei 70 °C) mit einer Scangeschwindigkeit von 0,1 °C/min erhitzt.

Die T_m-Werte der Varianten und der wildtypischen CGTase bei den verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen sind in Tabelle 3.2 zusammengestellt.

Tabelle 3.2: Die mittels DSC ermittelten T_m-Werte der durch Screening isolierten CGTase Varianten.

Die Bedingungen der Messungen finden sich in der Legende zu Abbildung 3.20.

	Wildtyp	Hof1	Hof5	Hof6
5 mM CaCl₂	69 °C	66 °C	65,5 °C	66 °C
0 mM CaCl₂	66 °C	60 °C	64 °C	62 °C
20 mM EDTA	60 °C	58 °C	59 °C	58,5 °C

Die durch 5 mM CaCl₂ induzierten Erhöhungen des T_m-Wertes im Vergleich zur vollständigen Abwesenheit von CaCl₂ (20 mM EDTA) sind mit 9 °C (wildtypische CGTase), 8 °C (Hof1), 6,5 °C (Hof5) und 7,5 °C (Hof6) vergleichbar groß. Jedoch ist der Unterschied zwischen der Anwesenheit von restlichen Ca²⁺-Ionen (keine Zugabe von CaCl₂) und ihrer vollständigen Abwesenheit (20 mM EDTA) im wildtypischen Enzym (6 °C) stärker ausgeprägt als für Hof5 (5 °C), Hof6 (3,5 °C) und Hof1 (2 °C). Dies deutet darauf hin, dass Ca²⁺-Ionen mit höherer Affinität an die wildtypische CGTase binden als an die isolierten Varianten. Die Auffaltungskurven der isolierten CGTase Varianten sind sehr unsymmetrisch, wobei sich in Anwesenheit von CaCl₂ sogar noch zusätzliche Intermediate anzuhäufen scheinen. Die Deconvolution der Kurven ergab, dass sie sich aus drei bis sechs Einzelpeaks zusammensetzen, d.h. eine Korrelation mit der 5-Domänen Struktur der CGTase ist nicht möglich.

3.3.7.1.2 Kinetik der thermischen Inaktivierung

Die Kinetik der thermischen Inaktivierung der CGTase Varianten wurde bei 70 °C unter vergleichbaren Bedingungen wie für das wildtypische Enzym durchgeführt (3.2.7.3.2). Jedoch wurde den Proben 0,5 % Stärke zugesetzt, um die Verhältnisse den Screeningbedingungen anzugleichen (3.3.5). Die Restaktivität nach den verschiedenen Inkubationszeiten wurde wiederum mit dem kontinuierlichen Test bei 40 °C und mit 0,5 % Paselli SA2-Stärke als Substrat vermessen (2.5.11.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.21 zusammengestellt.

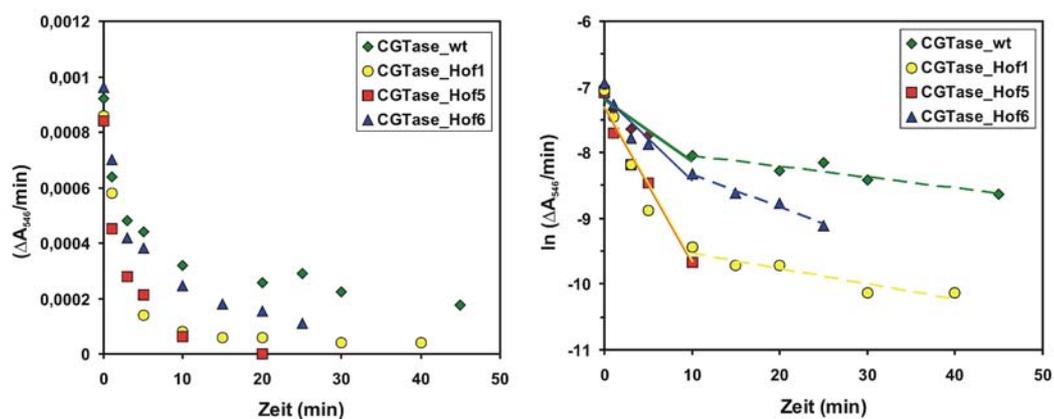
**A****B**

Abbildung 3.21: Thermische Inaktivierung bei 70 °C der durch Screening isolierten CGTasen und des wildtypischen Enzyms.

A: Auftragung der relativen Katalyserate V_i [ΔA₅₄₆/min] gegen die Inkubationszeit.

B: Bestimmung der Halbwertszeit $t_{1/2}$ aus dem exponentiellen Abfall von V_i mit der Zeit.

100 μl der verschiedenen CGTasen (0,2 μM) in 100 mM Tris/HCl, pH 9,2 (25 °C), 5 mM CaCl₂, 0,5 % Paselli SA2-Stärke wurden für 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 und 60 min bei 70 °C inkubiert und anschließend in Eiswasser abgekühlt. Nach Zentrifugation wurden zwischen 10 μl und 90 μl der Proteinlösung in den kontinuierlichen Aktivitätstest eingesetzt, wobei 1 ml Reaktionsansatz 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 (bei 40 °C), 5 mM CaCl₂, 0,3 mM Methylorange und 0,5 % Paselli SA2-Stärke enthielten. Die Absorption wurde 15 min bei 546 nm gemessen.

Auffallend ist, dass es sich bei dem Abfall der Aktivität mit der Zeit nicht um einen monoexponentiellen Prozess handelt, da der Aktivitätsverlust innerhalb der ersten 10 min wesentlich schneller vonstatten geht als danach. Für die erste Phase ergaben sich Halbwertszeiten von 2,9 min (Hof1 und Hof5), 5,4 min (Hof6) und 7,4 min (wildtypisches Enzym). Für die zweite Phase ergaben sich die Halbwertszeiten von 29,9 min (Hof1), 13,8 min (Hof6) und 41,5 min (wildtypisches Enzym). Bei Hof5 war bei dieser Temperatur innerhalb von 20 min die katalytische Aktivität vollständig erloschen. Ähnlich wie bei den DSC-Messungen (3.3.7.1.1) erwiesen sich die isolierten Varianten als thermolabiler als das wildtypische Enzym. Da die Halbwertszeit der wildtypischen CGTase bei 70 °C in Abwesenheit von Stärke nur 1,3 min beträgt (Abbildung 3.10), scheint das Substrat zu einer beträchtlichen Stabilisierung zu führen, wie schon bei den Messungen der katalytischen Aktivität bei 70 °C festgestellt wurde (3.2.7.5). Bei der thermischen Inaktivierung der wildtypischen CGTase ohne Stärke konnte nach Inkubation bei 62 °C und 65 °C eine ähnliche Beobachtung gemacht werden (3.2.7.3.2), wobei die Aktivität hier zunächst rasch auf 50 % des Ausgangswertes sank und danach konstant blieb.

3.3.7.2 Cyclisierungsaktivität der Varianten (β -CD Produktion)

Die Ergebnisse der thermischen Denaturierung mittels DSC und der thermischen Inaktivierung zeigten, dass die Varianten Hof1, Hof5 und Hof6 instabiler sind als das Wildtyp-Protein. Es stellt sich damit die Frage, warum diese Varianten beim Screening auf erhöhte Thermostabilität isoliert wurden. Eine Möglichkeit ist, dass sie eine sehr viel höhere katalytische Aktivität als die wildtypische CGTase aufweisen und dadurch ihre niedrigere Stabilität mehr als kompensiert wird. Zur Klärung dieser Frage wurden Aktivitätstests durchgeführt, deren Reaktionsbedingungen denen auf der Screeningplatte nachempfunden wurden. Die Produktion von β -CD wurde mit dem diskontinuierlichen Test (2.5.11.1) in Anwesenheit von 0,5 % bzw. 5 % Stärke in 10 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl_2 zwischen 50 °C und 80 °C analysiert. In Abbildung 3.22 sind beispielhaft für die wildtypische CGTase (A) und für Hof1 (B) der zeitliche Verlauf der β -CD Produktion dargestellt. Weiterhin ist in Abbildung 3.22 für alle Varianten die innerhalb von ca. 60 min produzierte Menge an β -CD mit 0,5 % (C) bzw. 5 % (D) Stärke als Substrat bei den verschiedenen Messtemperaturen aufgetragen.

Die wichtigsten Ergebnisse sind: (i) Hof5 und Hof6 produzieren bei allen Temperaturen innerhalb von 60 min weniger β -CD als die wildtypische CGTase und Hof1. (ii) Mit 0,5 % Stärke als Substrat wird das meiste β -CD durch Hof1 produziert, mit 5 % Stärke als Substrat dagegen durch wildtypische CGTase. (iii) Mit 0,5 % Stärke als Substrat wird das Maximum an produziertem β -CD bei 60 °C (Hof1) erreicht, mit 5 % Stärke bei 65 °C (wildtypische CGTase). Dies bedeutet, dass bestenfalls die Isolierung von Hof1 im Screeningverfahren (Inkubation für 1 h bei 70 °C in Anwesenheit von 0,5 % Stärke als Substrat) durch eine erhöhte katalytische Aktivität erklärt werden könnte. Hof5 und Hof6 sind dagegen nicht nur thermolabiler als wildtypische CGTase, sondern auch katalytisch weniger aktiv.

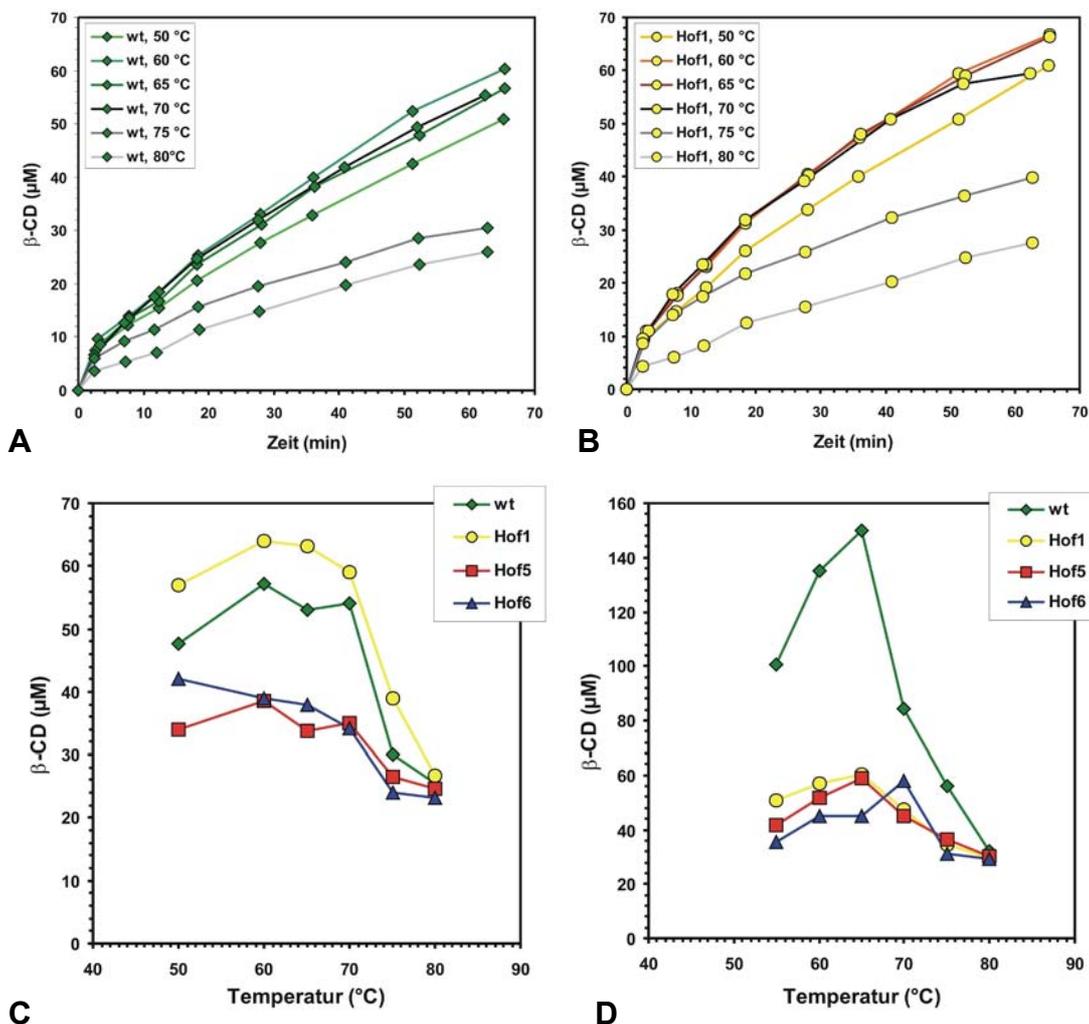


Abbildung 3.22: β -CD-Produktion der durch Screening isolierten CGTase Varianten und des wildtypischen Enzyms. Dargestellt sind der zeitliche Verlauf der β -CD-Produktion aus 0,5 % Stärke durch die wildtypische CGTase (A) und Hof1 (B), sowie die nach ca. 60 min ermittelte Konzentration an β -CD für alle Varianten mit 0,5 % (C) bzw. 5 % (D) Stärke als Substrat.

Es wurden jeweils 14 nM CGTase in einen Reaktionsansatz von 1 ml in 10 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM CaCl_2 eingesetzt und bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Cyclodextrin-Menge durch Komplexbildung mit Phenolphthalein spektroskopisch analysiert (2.5.11.1).

3.3.7.3 Expressionslevel in der Zelle – Western Blot Analysen

Die isolierten CGTase Varianten zeigten weder eine höhere Thermostabilität noch eine höhere katalytische Aktivität bei 70 °C als die wildtypische CGTase. Eine alternative Erklärung für die durch diese Varianten induzierte Hofbildung im Screeningverfahren ist, dass sie in den *E. coli*-Wirtszellen

stärker überproduziert werden als die wildtypische CGTase und dadurch ihre geringere Stabilität und katalytische Aktivität überkompensiert werden.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit den Plasmiden pET24a_cgtase_EcoRI (wildtypisches Gen), pET24a_cgtase_hof1, pET24a_cgtase_hof5, pET24a_cgtase_hof6 und pET24a (ohne cgtase-Gen) transformiert, auf LB-Medium mit Kanamycin plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von jeder Variante wurden jeweils fünf Kolonien gepickt und damit 5 ml LB-Medium mit Kanamycin und 0,5 % Stärke inokuliert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Zellsuspensionen der verschiedenen Varianten so verdünnt, dass 5 ml jeweils eine OD₆₀₀ von 1,5 aufwiesen. Die Zellernte, der Zellaufschluss und die Zentrifugation erfolgten wie in 2.4.1.1 beschrieben. Der unlösliche Teil des Zellextraktes wurde jeweils verworfen, während der lösliche Teil mit 10x SDS-Probenpuffer versetzt und Aliquots von je 20 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf eine PVDF-Membran geblottet (2.5.4) und der Blot mit einem *primären* Peptid-Antikörper gegen die CGTase und einem mit alkalischer Phosphatase konjugierten *sekundären* Anti-Rabbit-IgG Antikörper versetzt. Bei der Entwicklung färbte sich jedoch keine dem Molekulargewicht der CGTase (3.2.4) entsprechende Bande an. Stattdessen waren auf den Western-Blots drei bis vier Banden zu sehen, die jedoch bei der Negativkontrolle (pET24 ohne cgtase-Gen) ebenfalls auftraten. Die ebenfalls auf dem SDS-Gel aufgetragene und geblottete wildtypische CGTase sowie die CGTase-Varianten (Positivkontrollen) wurden dagegen angefärbt, wobei auch die zusätzlichen kleineren Banden ein Signal lieferten (Abbildung 3.23). Wurde nur der zweite Antikörper bei der Anfärbung verwendet, wurden keine Banden angefärbt, wodurch eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers ausgeschlossen werden konnte.

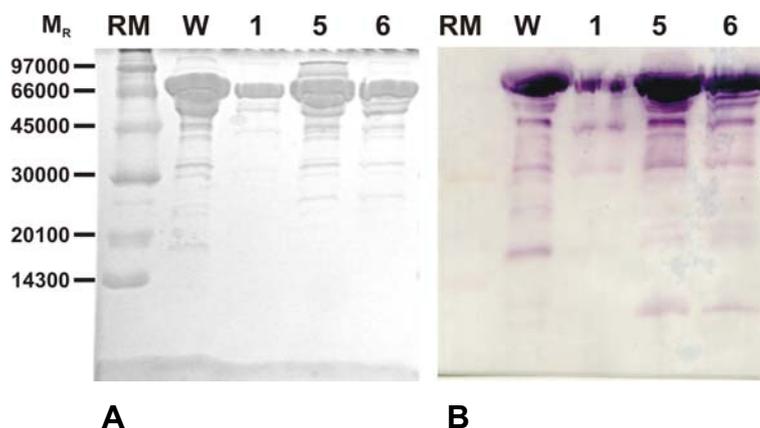


Abbildung 3.23: SDS-PAGE (12,5% Acrylamid; A) und Western-Blot (B) der gereinigten CGTase Varianten (1: Hof1, 5: Hof5, 6: Hof6) und der wildtypischen CGTase (W).

Das SDS-Gel wurde auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einem *primären* Anti-CGTase Antikörper behandelt. Die Proteinbanden wurden über einen *sekundären* Anti-Rabbit-IgG Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase sichtbar gemacht (2.5.4). M_R: relatives Molekulargewicht (g/mol), RM: *rainbow™ coloured protein molecular weight marker*.

Um zu zeigen, dass die im löslichen Zellextrakt enthaltenen Proteine tatsächlich vollständig geblottet wurden, wurde zum einen das SDS-Gel mit *Coomassie Brilliant Blue G250* angefärbt, zum anderen die PVDF-Membran mit Amido-Schwarz. Wie erwartet, zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine schwache blaue Hintergrundfärbung, während auf der PVDF-Membran zahlreiche Proteinbanden zu erkennen waren.

Die Ergebnisse zeigen, dass grundsätzlich Proteine aus dem löslichen Zellextrakt und gereinigte CGTase mit der verwendeten Methode erfolgreich geblottet werden können, jedoch ein Nachweis der CGTase im löslichen Zellextrakt nicht möglich war. Somit konnte auch nicht entschieden werden, ob die isolierten CGTase Varianten und die wildtypische CGTase in unterschiedlichen Mengen in den *E. coli* Wirtszellen vorlagen.

3.3.8 Zusammenfassung und Diskussion zur thermischen Stabilisierung der CGTase

Es wurde versucht, die Thermostabilität der CGTase aus *A. gottschalkii* durch gerichtete Evolution zu stabilisieren. Zunächst wurde das *cgtase* Gen über eine eingefügte *EcoRI* Schnittstelle in eine 5'- und eine 3'-Hälfte unterteilt. Beide Hälften wurden getrennt mittels *Error Prone PCR* einer Zufallsmutagenese unterworfen und dann jeweils mit der anderen, nicht mutagenisierten Hälfte im Vektor pET24a fusioniert. Nach Transformation

von kompetenten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen und Ausplattieren auf LB-Medium mit Kanamycin entstanden so eine 5'-Bank (mutagenisierte 5'-Hälfte fusioniert mit nicht mutagenisierter 3'-Hälfte) und eine 3'-Bank (nicht mutagenisierte 5'-Hälfte fusioniert mit mutagenisierter 3'-Hälfte), die ca. 10^6 (5'-Bank) bzw. ca. 10^7 (3'-Bank) unabhängige Klone umfassten. Stichprobenartige Sequenzierungen ergaben, dass in den mutagenisierten Hälften jeweils drei bis vier Nukleotide ausgetauscht waren, entsprechen zwei bis drei Aminosäureaustauschen.

Bevor die Banken auf stabilisierte CGTase Varianten durchsucht werden konnten, musste zunächst ein Screeningverfahren etabliert werden. Zu diesem Zweck wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pET24a Vektor mit wildtypischem *cgtase* Gen (pET24a_cgtaseoS) bzw. mit Vektor ohne Insert transformiert, auf LB-Platten mit Kanamycin ausplattiert und bei 37 °C inkubiert („Mutterplatten“). Nach dem Erscheinen sichtbarer Kolonien wurden diese auf LB-Platten mit Kanamycin plus 0,5 % Stärke überstempelt und ebenfalls bei 37 °C inkubiert („Inkubationsplatten“). Nach dem Erscheinen sichtbarer Kolonien, wurden die Platten auf 55 °C erhitzt. Dadurch wurden die *E. coli*-Zellen lysiert und die CGTase freigesetzt. Nach Überschichten mit Lugol'scher Lösung bildeten sich um die Kolonien mit pET24a_cgtaseoS durch den CGTase-vermittelten Abbau der Stärke deutliche Höfe, die bei Kolonien mit pET24a ohne Insert nicht auftraten. Wurden die Inkubationsplatten dagegen auf 70 °C oder 80 °C erhitzt, dann bildeten sich wegen der thermischen Denaturierung der wildtypischen CGTase (3.2.7.3.1) keine Höfe. Dies belegt, dass dieses Screeningverfahren zur Isolierung thermisch stabilisierter CGTase-Varianten im Prinzip geeignet ist.

Mit dem beschriebenen Verfahren wurden die 5'- und die 3'-Bank durch Inkubation bei 70 °C nach thermisch stabilisierten CGTase Varianten durchsucht. Während aus der 3'-Bank kein Klon isoliert werden konnte, wurden aus der 5'-Bank sieben Klone isoliert, von denen einer (Hof2) keine und einer (Hof4) nur stille Mutationen aufwies. Von den restlichen fünf Klonen wiesen drei (Hof1, 3 und 7) identische Aminosäureaustausche auf. Die Aminosäureaustausche von Hof5 und Hof6 unterschieden sich untereinander und von denen von Hof1, 3 und 7. Die CGTase Varianten von Hof1, 5 und 6 wurde durch heterologe Genexpression in *E. coli* hergestellt, gereinigt und im Vergleich zur wildtypischen CGTase mittels DSC und thermischer Inaktivierung charakterisiert. Unerwarteter Weise lagen die T_m -Werte und die Halbwertszeiten der thermischen Inaktivierung der isolierten

Varianten unterhalb der Werte der wildtypischen CGTase. Alle Varianten wurden ebenso wie die wildtypische CGTase sowohl durch Ca^{2+} -Ionen als durch das Substrat Stärke stabilisiert.

Da die CGTase-Varianten entgegen den Erwartungen gegenüber der wildtypischen CGTase keine thermische Stabilisierung aufwiesen, wurde nach alternativen Erklärungen für ihre Isolierung im Screening-Verfahren gesucht. Naheliegend waren hier eine erhöhte katalytische Aktivität bei 70 °C oder eine stärkere Überexpression. Bei Messungen der katalytischen Aktivität zeigte jedoch nur Hof1 bei 70 °C eine gegenüber dem wildtypischen Enzym leicht erhöhte β -CD Produktion, während Hof5 und 6 weniger aktiv waren. Ein Vergleich der intrazellulären Konzentration der verschiedenen CGTase Varianten mit dem wildtypischen Enzym gelang nicht, da keines der Enzyme im Western-Blot nachgewiesen werden konnte. Dabei stellte sich die Frage, ob das untersuchte Kulturvolumen oder die Zelldichte zu gering war, um detektierbares Protein zu produzieren. Bei Probeexpressionen der CGTase (2.4.1.1) werden in 20 ml Medium, also im doppelten Volumen im Vergleich zu den Expressionslevelanalysen, ähnliche Zelldichten bei der Zellernte erreicht, d.h. die Proteinmenge sollte sich nur um 50 % unterscheiden, so dass das untersuchte Volumen und die Zelldichte als ausreichend bezeichnet werden kann. Obwohl die Aliquots der löslichen Zellextrakte im Falle der Expressionslevelanalysen mit 10x SDS-Probenpuffer versetzt wurden im Vergleich zu Probeexpressionen, bei denen 2x SDS-Probenpuffer verwendet wurde, und damit eine höhere Konzentration der Zellextraktlösung durch SDS-PAGE analysiert wurde, reichte die produzierte CGTase-Menge nicht aus, um über *Coomassie-Brilliant Blue* G250 oder Western-Blot detektiert zu werden.

Damit konnte die Ursache für die Isolierung der Höfe1, 5 und 6 im Screeningverfahren bisher nicht geklärt werden.

4 Abschließende Diskussion

Cyclodextrine besitzen ein bedeutendes Marktpotential aufgrund zahlreicher Anwendungsmöglichkeiten in der pharmazeutischen, Nahrungsmittel-, Textil-, Kosmetik-, Waschmittel- und landwirtschaftlichen Industrie (Krulwich & Guffanti, 1989; Horikoshi, 1996). Die industrielle Produktion von Cyclodextrinen durch das Enzym CGTase ist allerdings technisch aufwändig und teuer (Biwer *et al.*, 2002), da (i) das Substrat Stärke bei hohen Temperaturen verflüssigt werden muss, die verwendeten CGTasen wegen ihrer Labilität allerdings oft nur bei niedrigeren Temperaturen eingesetzt werden können und (ii) CGTasen Gemische von Cyclodextrinen unterschiedlicher Größe synthetisieren, die nach der Produktion getrennt werden müssen. Obwohl bereits einige CGTasen aus thermophilen Mikroorganismen wie *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 (Wind *et al.*, 1995), *Thermoanaerobacter* sp. (Niehaus *et al.*, 1999), *Bacillus alcalophilus* B-3101 und *Thermoactinomyces vulgaris* Tac-5354 (Abelyan *et al.*, 2002) mit Temperaturoptima von bis zu 90 °C (Biwer *et al.*, 2002) bekannt sind, besteht weiterhin ein großer Bedarf an CGTasen mit hoher Stabilität und optimierten Produktspektren.

Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die CGTase aus dem kürzlich isolierten thermoalkaliphilen Bakterium *A. gottschalkii* (Prowe *et al.*, 1996, Prowe & Antranikian, 2001) durch heterologe Genexpression in *E. coli* in rekombinanter Form hergestellt, charakterisiert und mittels eines neu entwickelten Screeningverfahrens thermisch stabilisiert werden.

Diese CGTase war bereits früher in nativer Form aus dem Kulturüberstand von *A. gottschalkii* nach Einkonzentrierung des Mediums und Umpufferung über eine Q-Sepharose-Säule (Anionenaustauschchromatographie) von der ebenfalls sekretierten α -Amylase getrennt und angereichert worden (Prowe, 1996). Anschließend wurden ihre Hydrolyse- und Cyclisierungsaktivitäten verglichen, sowie das pH- und Temperaturoptimum bestimmt (Prowe, 1996).

Um die CGTase rekombinant herstellen und anreichern zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das Gen (ohne die Signalsequenz für die Sekretion) aus genomischer DNA isoliert und zum einen in den pET28a-Vektor kloniert, in dem es mit der Sequenz für einen N-terminalen His-Tag fusioniert vorlag, und zum anderen in den pET24a-Vektor ohne N-terminalen His-Tag.

Obwohl praktisch alle, für CGTasen gängigen Chromatographieverfahren in unterschiedlicher Kombination angewendet wurden, konnte die CGTase nach Maßgabe der SDS-PAGE nicht zur Homogenität angereichert werden. So zeigten die CGTase-enthaltenden Elutionsfraktionen neben einer Hauptbande zwischen 70 und 97 kDa mehrere Nebenbanden zwischen 14 und 70 kDa (Abbildung 3.1 B). Eine unvollständige Abtrennung der Wirtsproteine aus *E. coli* muss als unwahrscheinlich gelten, da bei der sehr spezifischen Affinitätschromatographie mit immobilisiertem α -CD das gleiche Bandenmuster auftrat (Abbildung 3.5 B). Außerdem wurden in einem Western-Blot alle Banden durch einen spezifischen Anti-CGTase Antikörper erkannt (Abbildung 3.23). Gegen eine Verunreinigung mit Wirtsproteinen spricht auch, dass die native, aus *A. gottschalkii* hergestellte CGTase im SDS-Gel ein ähnliches Bandenmuster zeigte (Prowe, 1996). Die Hauptbande befand sich dort allerdings nicht wie in der vorliegenden Arbeit zwischen 70 und 97 kDa, sondern bei 66 kDa. Bei einer Aktivitätsfärbung eines SDS-Gels mit nativer CGTase zeigte nur diese Hauptbande „amylolytische“ Aktivität. Daraus wurde geschlossen, dass die zusätzlichen Banden inaktive Proteinfragmente der CGTase darstellen, die durch proteolytischen Abbau entstanden sein könnten (Prowe, 1996).

Die Frage, ob es sich bei den zusätzlichen Banden der rekombinant hergestellten CGTase ebenfalls um proteolytische Abbauprodukte oder stattdessen um Gelartefakte handelt, konnte trotz des Einsatzes von nativer PAGE, dynamischer Lichtstreuung, analytischer Gelfiltration, sowie der Reinigung in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren nicht abschließend beantwortet werden. Einerseits weist das Auftreten von vier distinkten Banden in der nativen PAGE auf proteolytische Abbauprodukte hin. Andererseits sprechen die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung und der analytischen Gelfiltration für eine monodisperse bzw. homogene Proteinlösung und stützen damit die Annahme, dass es sich bei den zusätzlichen Banden um Gelartefakte handelt. Dafür spricht auch, dass die Banden auch bei Reinigungen in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren auftraten. Außerdem deutet das Ergebnis des Trypsin-Verdau der CGTase mit N-terminalem His-Tag darauf hin, dass die CGTase relativ unempfindlich gegenüber Proteasen ist (3.2.4).

Auch in der Literatur wird in einigen Fällen von CGTasen berichtet, die nur auf 90-95 % angereichert werden konnten, wobei die Ursachen für die

unvollständige Reinigung meist nicht diskutiert werden (Hellmann *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1992; Volkova *et al.*, 2000; 2001). In anderen Arbeiten werden die zusätzlichen Banden als (katalytisch aktive!) Abbauprodukte (Wind *et al.*, 1995) oder als Artefakte gedeutet, die auf die unvollständige Denaturierung vor der SDS-PAGE zurückgehen sollen (Tachibana *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1999).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die rekombinante CGTase nach Maßgabe der SDS-PAGE zu etwa 95 % angereichert werden. Dies erschien hinreichend, um das Enzym mittels hydrodynamischer und spektroskopischer Methoden strukturell zu charakterisieren und im Rahmen von Fließgleichgewichtsmessungen die Kinetik der Produktbildung und des Stärkeabbaus zu quantifizieren. Die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration deuten darauf hin, dass das Protein über seine Zuckerbindestellen mit der Säulenmatrix interagiert und sich dadurch die Elution verzögert, weshalb keine zuverlässigen Aussagen über Molekulargewicht und Oligomerisierungszustand möglich waren. Dies gelang jedoch mittels dynamischer Lichtstreuung, wonach die CGTase als monomeres Protein vorliegt. Dies deckt sich mit Ergebnissen bekannter CGTasen, die bis auf die dimere CGTase aus *Bacillus macerans* (Takano *et al.*, 1986), ebenfalls Monomere sind. Die spektroskopische Analyse der CGTase durch Circular dichroismus und Fluoreszenzemissionsspektroskopie belegte eindeutig, dass die gereinigte CGTase aus definierten Sekundärstrukturelementen besteht und eine native Tertiärstruktur aufweist.

Vor dem Versuch zur thermischen Stabilisierung der rekombinanten CGTase wurden folgende Fragen untersucht: (i) Bei welcher Temperatur bzw. nach welcher Inkubationszeit erfolgt die thermische Denaturierung der CGTase? (ii) Wird die CGTase extrinsisch stabilisiert und was sind die verantwortlichen Faktoren? (iii) Unter welchen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Substratkonzentration) zeigt die CGTase optimale katalytische Aktivität? (iv) Unter welchen Bedingungen werden welche Cyclodextrine vorwiegend produziert?

Um diese Fragen zu beantworten, wurde die thermische Stabilität der rekombinanten CGTase mittels differentieller *scanning calorimetry* und irreversibler Inaktivierung untersucht, sowie die Kinetik des Substratabbaus und der Produktbildung mittels Enzymkinetik unter Fließgleichgewichtsbedingungen gemessen.

Da CGTasen zwei Calciumbindestellen besitzen, von denen eine auch in α -Amylasen konserviert ist, wurden die DSC-Messungen in Anwesenheit von 5 mM CaCl_2 , ohne Zugabe von CaCl_2 bzw. nach Zugabe von 20 mM EDTA durchgeführt. Die Denaturierung der CGTase setzte bereits ab 50 °C ein und war irreversibel. In Gegenwart von 5 mM Ca^{2+} -Ionen lag der Schmelzpunkt bei annähernd 70 °C, ohne Zugabe von CaCl_2 dagegen nur bei 66 °C. Die Entfernung von Ca^{2+} -Ionen durch Dialyse erfolgte nur unvollständig, da der Schmelzpunkt nach Zugabe von EDTA weiter auf 60 °C sank. Diese Ergebnisse zeigen, dass (i) die CGTase durch Ca^{2+} -Ionen gegen thermische Denaturierung stabilisiert wird und (ii) die Bindung der Ionen an die CGTase mit hoher Affinität erfolgen muss, da ihre quantitative Entfernung die Komplexbildung durch EDTA erfordert. Tatsächlich wurden für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an α -Amylasen extrem niedrige Dissoziationskonstanten zwischen 44 nM und 5 pM gemessen (Nielsen & Borchert, 2000). Die Deconvolution der Auffaltungskurven in fünf Teilschritte legt die sukzessive Denaturierung der fünf Domänen A-E der CGTase nahe. Entsprechendes wird von Laderman *et al.* (1993) für die Auffaltungskurve der α -Amylase aus *Pyrococcus furiosus* postuliert, deren drei Teilschritte einer sukzessiven Auffaltung der drei Domänen dieses Proteins entspricht.

Bei Untersuchungen zur Kinetik der irreversiblen Inaktivierung bei 70 °C wurde in Anwesenheit von 5 mM CaCl_2 eine Halbwertszeit von ca. 1,3 min ermittelt, womit bereits nach 10 min keine katalytische Aktivität mehr nachweisbar war. Stellt man dieses Ergebnis in Beziehung zu den DSC-Messungen, wo trotz langsamer Aufheizung bei 70 °C noch ca. 50 % der CGTase in nativem Zustand vorlagen (Abbildung 3.9), muss man davon ausgehen, dass die Inaktivierung der CGTase auch ohne vorherige Entfaltung des Enzyms erfolgen kann (Schema 2 in 2.5.13). Obwohl der zugrunde liegende Mechanismus der Inaktivierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, spricht die Entkoppelung von Auffaltung und Inaktivierung für chemische Modifikationen in der Nähe des aktiven Zentrums. Denkbar wäre z.B. die Spaltung der Peptidbindung C-terminal von Asparaginresten oder deren Desaminierung zu Aspartaten (Hensel *et al.*, 1992; Ahern & Klibanov, 1988). Dafür spricht, dass sich an den Donorstellen -3 und -6 für die Substratbindung der CGTase zwei konservierte Asparaginreste befinden und der Austausch des Asparagins an Position -3 gegen Glutamin in der CGTase aus *Bacillus* sp. I-5 zu einer drastischen Reduzierung des Stärkeabbaus führte (Kim *et al.*, 1997).

In weiteren Untersuchungen wurde der zeitliche Verlauf des Produktspektrums und des Stärkeabbaus in Abhängigkeit von Enzym- und Substratkonzentration, Temperatur und pH-Wert verfolgt. Dabei wurde bei allen Versuchsbedingungen anfänglich hauptsächlich α -CD und nach längeren Inkubationszeiten vergleichbare Mengen an α - und β -CD gefunden, während die Menge an produziertem γ -CD gleichbleibend niedrig war. In ähnlicher Weise bildete die native CGTase zunächst ebenfalls hauptsächlich α -CD, während nach längerer Inkubationszeit α - und β -CD zu gleichen Anteilen gefunden wurden (Prowe, 1996). Auffallend ist, dass nach dem vollständigen Stärkeabbau die Gesamtmenge an gebildetem Cyclodextrin noch weiter anstieg. Dies wurde schon bei anderen CGTasen beobachtet und mit der Disproportionierungsreaktion erklärt, bei der kurze Zuckerketten (zwei bis sechs Glucosebausteine) zu längeren Oligomeren umgesetzt werden, die dann über die Cyclisierungsreaktion zu Cyclodextrinen umgewandelt werden können (Mäkelä & Korpela, 1988; Matioli *et al.*, 2002). Allerdings kommt es im weiteren Verlauf zum Abbau von Cyclodextrinen, der im Falle von α -CD stärker ausgeprägt ist als im Falle von β - und γ -CD. Dieser Abbau wird durch Verdopplung der Enzymmenge deutlich beschleunigt und könnte auf die Coupling-Aktivität der CGTase zurückgehen (Abbildung 1.3). Jedoch ließ sich im Elutionsprofil der HPLC-Messungen kein zusätzlicher Peak nachweisen, der dem Produkt dieser Reaktion entsprechen könnte.

Die Messung der Produktbildung in Abhängigkeit der Temperatur bestätigte, dass bei 50 °C, 60 °C und 65 °C innerhalb der ersten 60 min hauptsächlich α -CD hergestellt wurde. Während jedoch bei 50 °C die Anteile von α - und β -CD nach 240 min nahezu identisch waren, überwog nach dieser Zeit bei 60 °C und 65 °C immer noch α -CD. Insgesamt hängt das Produktspektrum also in bescheidenem Maße von der Inkubationstemperatur ab. Ähnliches wurde auch schon für andere CGTasen beobachtet und mit unterschiedlichen Aktivierungsenergien bei der α -, β - und γ -CD-Herstellung erklärt (Matioli *et al.*, 2001; 2002).

Bei einer Messung bei 70 °C wurde die Substratkonzentration von 5 auf 20 % erhöht. Tatsächlich führte dies zu einem kontinuierlichen Anstieg der CD-Konzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum von 240 min hinweg. Vergleicht man diese Ergebnisse mit der β -CD Produktion im diskontinuierlichen Test, bei der die CGTase bei 70 °C in Anwesenheit von 5 % Stärke nach 10 min ihre Aktivität einstellte, wird der stabilisierende

Einfluss des Substrates auf die CGTase offensichtlich. Als Ursache dafür kommen zumindest zwei unterschiedliche Mechanismen in Frage. Zum einen könnte die CGTase unspezifisch durch den so genannten *molecular crowding effect* stabilisiert werden. Danach nehmen Proteine in Gegenwart hoher Konzentrationen gelöster Stoffe, wie sie im Cytoplasma von Zellen angetroffen werden, eine kompaktere und damit stabilere Faltung ein (Sasahara *et al.*, 2003). Eine alternative Möglichkeit ist die spezifische Stabilisierung durch die Bindung der Stärke an das aktive Zentrum. Es wurde oben spekuliert, dass die thermische Inaktivierung der CGTase auf die kovalente Modifizierung von an der Substratbindung beteiligten Asparaginresten an Position -3 und -6 zurückgeht. Da beide diskutierten Modifizierungen (Hydrolyse der Peptidbindung, Desaminierung) an den freien Zugang von Wasser gebunden sind, erscheint eine Schutzwirkung der Stärke durch Abschirmung der Asparagine vom Lösungsmittel plausibel.

Die Messung der Produktbildung zwischen pH 7,0 und 9,5 zeigte, dass die Geschwindigkeiten der Bildung und des Abbaus der Cyclodextrine mit dem pH-Wert leicht ansteigen. Die Gesamtmenge an gebildeten Cyclodextrinen und die relativen Anteile an α -, β - und γ -CD hängen dagegen nur unwesentlich vom pH-Wert ab. Im Vergleich dazu, lag die höchste Cyclisierungsaktivität bei der nativen CGTase zwischen pH 5 und 7, während sie zwischen pH 7 und 9,5 auf 50 % absank. Da die Aktivitätsmessung in Anwesenheit von 0,5 % löslicher Stärke in einem Britton & Robinson-Universalpuffer bei 65 °C für 30 min erfolgte, liegen Unterschiede in den Reaktionsbedingungen vor, die für die gegensätzlichen Daten verantwortlich sein könnten.

Mit diesen Ergebnissen können die anfangs gestellten Fragen wie folgt beantwortet werden: (i) Die thermische Auffaltung der CGTase ist ein komplizierter Prozess, der mehrere Teilschritte beinhaltet und in Anwesenheit von 5 mM CaCl_2 bei 55 °C beginnt und bei ca. 73 °C abgeschlossen ist (Abbildung 3.9). Die thermische Inaktivierung ist nicht an die Auffaltung der CGTase gebunden und führt in Anwesenheit von 5 % Stärke zu einem vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität bei 70 °C innerhalb von 10 min (Abbildung 3.12). (ii) Die CGTase wird durch Ca^{2+} -Ionen und ihr Substrat Stärke extrinsisch stabilisiert. (iii) Die CGTase zeigt in dem gemessenen pH-Bereich (7,0 bis 9,5) eine leicht ansteigende Aktivität und in Anwesenheit von 5 % Stärke ein Temperaturoptimum zwischen 60

und 65 °C. In Anwesenheit von 20 % Stärke kommt es zur Bildung einer wesentlich größeren Menge an Cyclodextrinen, wobei kaum Unterschiede zwischen 50 °C und 70 °C zu beobachten sind. (iv) Zu Beginn der Reaktion wird bei allen untersuchten Bedingungen hauptsächlich α -CD gebildet, während nach längerer Inkubationszeit α - und β -CD in vergleichbaren Mengen vorliegen. Der Anteil an γ -CD ist bei allen untersuchten Bedingungen am geringsten.

Aufbauend auf den bei der Charakterisierung ermittelten Eigenschaften der CGTase, sollte das Enzym thermisch stabilisiert werden. Da die für die Thermostabilität von Proteinen verantwortlichen Faktoren vielfältig und nur schwer gezielt zu verändern sind (Sterner & Liebl, 2001, Vielle & Zeikus, 2001), sollte die Stabilität der CGTase mittels gerichteter Evolution, d.h. durch eine Kombination aus Zufallsmutagenese und Screening, erhöht werden. Dazu wurden mittels *Error Prone* PCR in *E. coli*-Wirtszellen zwei *cgtase*-Genbanken hergestellt, wobei in der 5'-Bank die mutagenisierte 5'-Hälfte mit der unveränderten 3'-Hälfte und in der 3'-Bank die mutagenisierte 3'-Hälfte mit der unveränderten 5'-Hälfte fusioniert wurden. Desweiteren wurde ein Screeningverfahren entwickelt, das darauf beruhte, dass thermisch stabile und damit katalytisch aktive CGTase auf Stärke-haltigen LB-Agarplatten durch Hofbildung nach Anfärbung mit Iod-haltiger Lösung detektiert werden kann.

Beim Screening (70 °C, 60 min) in Anwesenheit von 0,5 % Stärke wurden ca. 3500 CGTase Varianten der 5'-Bank und ca. 4500 Varianten der 3'-Bank getestet. Dabei konnte keine CGTase Variante aus der 3'-Bank, jedoch mehrere Varianten aus der 5'-Bank isoliert werden. Diese Varianten wurden gereinigt und im Hinblick auf Thermostabilität und katalytische Aktivität charakterisiert.

Unerwarteter Weise zeigten alle isolierten Varianten einen niedrigeren Schmelzpunkt und kürzere Halbwertszeiten der thermischen Inaktivierung bei 70 °C als die wildtypische CGTase.

Es stellte sich somit die Frage, warum die Varianten trotz erniedrigter intrinsischer Stabilität im Screening bei 70 °C isoliert wurden. Als mögliche Erklärungen kamen in Frage: (i) eine erhöhte katalytische Aktivität, (ii) eine erhöhte Proteinmenge in der Zelle, eventuell hervorgerufen durch eine verbesserte Expression (iii) eine wirksame Stabilisierung durch extrinsische Stabilisatoren.

Die erste Möglichkeit konnte durch die Untersuchungen zur Cyclisierungsaktivität bei hohen Temperaturen nahezu ausgeschlossen werden. Ob jedoch die Aktivitäten der Disproportionierung, des Coupling und der Hydrolyse durch die Aminosäureaustausche verbessert wurden und so zum Abbau der Stärke auf der Inkubationsplatte führten, wurde nicht untersucht und kann somit nicht ausgeschlossen werden. Ob im Screening die Menge an intrazellulärer CGTase bei den isolierten Varianten gegenüber der wildtypischen CGTase erhöht war, konnte aus technischen Gründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Ob die isolierten CGTasen durch extrinsische Faktoren wie das Substrat Stärke oder Ca^{2+} -Ionen in stärkerem Maße als die wildtypische CGTase stabilisiert werden, wurde bisher nicht untersucht.

Es muss deshalb im Moment unklar bleiben, warum die CGTase Varianten im Rahmen des Screening isoliert wurden. Um die Screening-Bedingungen besser kontrollieren zu können, sollten deshalb in Zukunft anstelle von LB-Stärke-Platten Nylon-Membranen zur Inkubation der *E. coli*-Kolonien verwendet werden. Kürzlich wurde ein entsprechendes Verfahren vorgestellt, mit dem eine *maltogenic* Amylase aus einem *Thermus* Stamm stabilisiert wurde (Kim *et al.*, 2003). Nach der Hitzeinkubation der auf einer Hybond-N Nylonmembran immobilisierten Kolonien wurde die Membran auf eine LB-Stärke-Platte gelegt und bei der optimalen Aktivitätstemperatur für 12 h inkubiert. Durch Anfärbung der nicht abgebauten Stärke mit einer Iod-Kalium-Lösung wurden stabilisierte Varianten über ihre Fähigkeit zur Hofbildung isoliert. Durch die Verwendung der Nylonmembran im Gegensatz zur LB-Stärkeplatte während der Hitzeinkubation können stabilisierende Effekte der Bestandteile der Agarplatte vermieden werden, wodurch eine bessere Kontrolle der Versuchsbedingungen erreicht wird.

5 Literatur:

- Abelyan, V. A., Balayan, A. M., Manukyan, L. S., Afyan, K. B., Meliksetyan, V. S., Andreasyan, N. A. und Markosyan, A. A.** (2002) Characteristics of Cyclodextrin Production using Cyclodextrin Glucanotransferases from various groups of microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology* 38 (6): 527-535.
- Ahern, T. J. und Klibanov, A. M.** (1988) Analysis of Processes Causing Thermal Inactivation of Enzymes. *Methods of Biochemical Analysis* 33: 91-127.
- Altschul, S. F.** (1991) Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective. *J. Mol. Biol.* 219: 555-565.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Arnold, F. H., Giver, L., Gershenson, A., Zhao, H. und Miyazaki, K.** (1999) Directed evolution of mesophilic enzymes into their thermophilic counterparts. *Ann. N Y Acad. Sci.* 870: 400-403.
- Beckman, R. A., Mildvan, A. S. und Loeb, L. A.** (1985) On the Fidelity of DNA Replication: Manganese Mutagenesis in vitro. *Biochemistry* 24: 5810-5817.
- Bekers, O., Beijnen, J. H., Otagiri, M., Bult, A. und Underberg, W. J. M.** (1990) Inclusion complexation of doxorubicin and daunorubicin with cyclodextrins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8 (8-12): 671-674.
- Bekers, O., Beijnen, J. H., Klein Tank, M. J. T., Bult, A. und Underberg, W. J. M.** (1991) Effect of cyclodextrins on the chemical stability of mitomycins in alkaline solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9 (10-12): 1055-1060.
- Bender, H.** (1986) Production, Characterization, and Application of Cyclodextrins. *Adv. Biotechnol. Proc.* 6: 31-71.

- Bertoldo, C. und Antranikian, G.** (2001) Amylolytic Enzymes from Hyperthermophiles. *Methods in Enzymology* 330: 269-289.
- Bürgerliches Gesetzbuch:** Erste Verordnung zur Änderung zuzusatzstoffrechtlicher Vorschriften vom 13.11.2000 (BGB1,I, S. 1520), Anlage 4, Teil B.
- Binder, F., Huber, O. und Bock, A.** (1986) Cyclodextrin-glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1: cloning, nucleotide sequence and expression. *Gene* 47 (2-3): 269-77.
- Biwer, A., Antranikian, G. und Heinzle, E.** (2002) Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 609-617.
- Blake, M. S., Johnston, K. H. und Russell-Jones, G. J.** (1984) A rapid sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* 136, 175-179.
- Boyer, C. D. und Preiss, J.** (1978) Multiple forms of starch branching enzyme of maize: evidence for independent genetic control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80 (1): 169-75.
- 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.
- Brewster, M. E.** (1991) in D. Duchene (ed.), *New Trends in Cyclodextrins and Derivatives*, Editions de Santé, Paris, Seite 313.
- Brewster, M. E. und Loftsson, T.** (2002) The use of chemically modified cyclodextrins in the development of formulations for chemical delivery systems. *Pharmazie* 57 (2): 94-101.
- Buschmann, H.-J.** (2002) Aprilfrische Bären. *Spektrum der Wissenschaft* 2: 87.
- Buschmann, H.-J., Knittel, D. und Schollmeyer, E.** (2001) New Textile Applications of Cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 40: 169-172.
- Cambillau, C. und Claverie, J.-M.** (2000) Structural and genomic correlates of hyperthermostability. *J. Biol. Chem.* 276 (42): 32383-32386.

- Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V. und Henrissat, B.** (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 326: 929-39.
- Daniel, R.** (2002) Construction of Environmental Libraries for Functional Screening of Enzyme Activity. *In* Brakmann, S. & Johnsson, K., editors, Directed Molecular Evolution of Proteins, chapter 4, pp. 63-78, Wiley VCH Weinheim.
- Daniel, R. M. und Cowan, D. A.** (2000) Biomolecular stability and life at high temperatures. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 250-264.
- Davies, G. J. und Henrissat, B.** (2002) Structural enzymology of carbohydrate-active enzymes: implications for the post-genomic era. *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2): 291-7.
- Declerck, N., Machius, M., Joyet, P., Wiegand, G., Huber, R. und Gaillardin, C.** (2003) Hyperthermostabilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase and modulation of its stability over a 50 °C temperature range. *Prot. Engineering* 16 (4): 287-293.
- del-Rio, G., Morett, E. und Soberon, X.** (1997) Did cyclodextrin glycosyltransferases evolve from alpha-amylases? *FEBS Lett.* 416 (2): 221-4.
- Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W.** (1988). High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145.
- Fitter, J., Herrmann, R., Dencher, N. A., Blume, A. und Hauss, T.** (2001) Activity and stability of a thermostable α -amylase compared to its mesophilic homologue: mechanisms of thermal adaptation. *Biochemistry* 40 (35): 10723-31.
- Guex, N. und Peitsch, M. C.** (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Guex, N., Diemand, A. und Peitsch, M. C.** (2000) Protein modelling for all. *TIBS* 24: 364-67.

- Hamilton, L. M., Kelly, C. T. und Fogarty, W. M.** (2000) Review: cyclodextrins and their interaction with amylolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 26 (8): 561-567.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Haney, P. J., Badger, J. H., Buldak, G. L., Reich, C. I., Woese, C. R. und Olsen, G. J.** (1999) Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic *Methanococcus* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96 (7): 3578-83.
- Hashimoto, Y., Yamamoto, T., Fujiwara, S., Takagi, M. und Imanaka, T.** (2001) Extracellular synthesis, specific recognition, and intracellular degradation of cyclomaltodextrins by the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain B1001. *J. Bacteriol.* 183 (17): 5050-7.
- Hedges, A.** (1992) Cyclodextrin: Production, properties, and applications. Starch hydrolysis products. Schenk, F. und Habeda, R., editors, pp. 319-333, *VCH Publisher, New York*.
- Hellman, J., Paavilainen, S. und Mäntsälä, P.** (1992) Expression in *E. coli* and purification of intracellular proteins by fusion to cyclomaltodextrin glucanotransferase. *J. Biotechnol.* 26 (2-3): 275-88.
- Henrissat, B.** (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-16.
- Henrissat, B. und Bairoch, A.** (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781-8.
- Henrissat, B. und Coutinho, P. M.** (2001) Classification of Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases from Hyperthermophiles. *Methods in Enzymology* 330: 183-201.
- Hensel, R., Jakob, I., Scheer, H. und Lottspeich, F.** (1992) Proteins from hyperthermophilic archaea: stability towards covalent modification of the peptide chain. *Biochem. Soc. Symp.* 58: 127-33.
- Hilvert, D., Taylor, S. V. und Kast, T.** (2002) Using Evolutionary Strategies to Investigate the Structure and Function of Chorismate Mutases. In Brakmann, S. & Johnsson, K., editors, Directed Molecular Evolution of Proteins, chapter 3, pp. 29-62, *Wiley VCH Weinheim*.

- Horikoshi, K.** (1996) Alkaliphiles – from an industrial point of view. *FEMS Microbio. Reviews* 18: 259-270.
- Huang, X. und Miller, M.** (1991) A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* 12: 337-367.
- Hubbard, S. J.** (1998) The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1382: 191-206.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Janeček, S., MacGregor, E. A. und Svensson, B.** (1995) Characteristic differences in the primary structure allow discrimination of cyclodextrin glucanotransferases from α -amylases. *Biochem. J.* 305: 685-686.
- Janeček, S., Svensson, B. und Henrissat, B.** (1997) Domain Evolution in the α -Amylase Family. *J. Mol. Evol.* 45: 322-331.
- Janeček, S., Svensson, B. und MacGregor, E. A.** (2003) Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the alpha-amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. *Eur. J. Biochem.* 270 (4): 635-45.
- Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Henrissat, B., Sierks, M. R. und Svensson, B.** (1993) Starch- and Glycogen-Debranching and Branching Enzymes: Prediction of Structural Features of the Catalytic $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel Domain and Evolutionary Relationship to Other Amylolytic Enzymes. *J. Protein Chem.* 12 (6): 791-805.
- Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Sierks, M. R. und Svensson, B.** (1991) Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem. J.* 280: 51-55.
- Johnson, W. C., Jr.** (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins*, 7 (3): 205-14.
- Kim, Y. H., Bae, K. H., Kim, T. J., Park, K. H., Lee, H. S. und Byun, S. M.** (1997) Effect on product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase by site-directed mutagenesis. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41 (2): 227-34.

- Kim, Y.-W., Choi, J.-H., Kim, J.-W., Park, C., Kim, J.-W., Cha, H., Lee, S.-B., Oh, B.-H., Moon, T.-W. und Park, K.-H.** (2003) Directed evolution of *Thermus* Maltogenic Amylase toward enhanced thermal resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8): 4866-4874.
- Klein, G. und Schulz, G. E.** (1991) Structure of Cyclodextrin Glycosyltransferase refined at 2.0 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 217: 737-750.
- Koizumi, K., Sanbe, H., Kubota, Y., Terada, Y. und Takaha, T.** (1999) Isolation and characterization of cyclic α -(1 \rightarrow 4)-glucans having degrees of polymerization 9-31 and their quantitative analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatography A* 852: 407-416.
- Krulwich, T. A. und Guffanti, A. A.** (1989) Alkalophilic Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 435-63.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-209.
- Laderman, K. A., Davis, B. R., Krutzsch, H. C., Lewis, M. S., Griko, Y. V., Privalov, P. L. und Anfinsen, C. B.** (1993) The purification and characterization of an extremely thermostable α -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* 268 (32): 24394-401.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larsen, K. L.** (2002) Large Cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 43: 1-13.
- Leemhuis, H., Dijkstra, B. W. und Dijkhuizen, L.** (2003) *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* cyclodextrin glycosyltransferase. Mechanism and kinetics of inhibition by acarbose and cyclodextrins. *Eur. J. Biochem.* 270 (1): 155-62.
- Lehmann, M., Pasamontes, L., Lassen, S. F. und Wyss, M.** (2000) The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1543 (2): 408-415.

- Lehmann, M. und Wyss, M.** (2001) Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (4): 371-5.
- Leung, D. W., Chen, E. und Goeddel, D. V.** (1989) A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1 (1): 11-15.
- Lin-Chao, S., Chen, W.-T. und Wong, T.-T.** (1992) High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Mol. Microbiol.* 6 (22): 3385-3393
- Loftsson, T. und Brewster, M. E.** (1996) Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. *J. Pharm. Sci.* 85 (10): 1017-1025.
- Lo Leggio, L., Kalogiannis, S., Bhat, M. K. und Pickersgill, R. W.** (1999) High resolution structure and sequence of *T. aurantiacus* xylanase I: implications for the evolution of thermostability in family 10 xylanases and enzymes with $\beta\alpha$ -barrel architecture. *Proteins* 36 (3): 295-306.
- MacGregor, E. A., Janeček, S. und Svensson, B.** (2001) Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1546 (1): 1-20.
- MacGregor, E. A. und Svensson, B.** (1989) A super-secondary structure predicted to be common to several α -1,4-D-glucan-cleaving enzymes. *Biochem. J.* 259: 145-152.
- Mäkelä, M. J., Korpela, T. K., Puisto, J. und Laakso, S. V.** (1988) Nonchromatographic Cyclodextrin Assays: Evaluation of Sensitivity, Specificity, and Conversion Mixture Applications. *J. Agric. Food Chem.* 36: 83-88.
- Mäkelä, M. J. und Korpela, T. K.** (1988) Determination of the catalytic activity of cyclomaltodextrin glucanotransferase by maltotriose-methylorange assay. *J. Biochem. Biophys. Methods* 15: 307-318.
- Martins, R. F. und Hatti-Kaul, R.** (2002) A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterisation. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 116-124.

- Matioli, G., Zanin, G. M. und De Moraes, F. F.** (2001) Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* strain no. 37. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91-93: 643-54.
- Matioli, G., Zanin, G. M. und De Moraes, F. F.** (2002) Influence of substrate and product concentrations on the production of cyclodextrins by CGTase of *Bacillus firmus*, strain no. 37. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100: 947-61.
- Mosi, R., He, S., Uitdehaag, J., Dijkstra, B. W. und Withers, S. G.** (1997) Trapping and characterization of the reaction intermediate in cyclodextrin glycosyltransferase by use of activated substrates and a mutant enzyme. *Biochemistry* 36 (32): 9927-34.
- Nagano, N., Porter, C. T. und Thornton, J. M.** (2001) The $(\beta\alpha)_8$ glycosidases: sequence and structure analyses suggest distant evolutionary relationships. *Protein Eng.* 14 (11): 845-55.
- Nakamura, A., Haga, K., Ogawa, S., Kuwano, K., Kimura, K. und Yamane, K.** (1992) Functional relationships between cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* and alpha-amylases. Site-directed mutagenesis of the conserved two Asp and one Glu residues. *FEBS Lett.* 296 (1): 37-40.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M. und Antranikian, G.** (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 711-729.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G.** (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10 (1): 1-6.
- Nielsen, J. E. und Borchert, T. V.** (2000) Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochim. Biophys. Acta* 1543 (2): 253-274.
- Nitschke, L., Heeger, K., Bender, H. und Schulz, G. E.** (1990) Molecular cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the beta-cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Bacillus circulans* strain no. 8. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33 (5): 542-6.
- Pace, C. N. und Scholtz, J. M.** (1997) Measuring the conformational stability of a protein. In: Creighton, T. E., *editors*, Protein structure – a practical approach, pp. 299-321, Oxford University Press, Oxford, New York.

- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. und Gray, T.** (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4: 2411-2423.
- Peitsch, M. C.** (1995) Protein modelling by E-Mail. *Bio/Technology* 13: 658-660.
- Peitsch, M. C.** (1996) ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 274-279
- Penninga, D., van der Veen, B. A., Knegt, R. M., van Hijum, S. A., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Dijkstra, B. W. und Dijkhuizen, L.** (1996) The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. *J. Biol. Chem.* 271 (51): 32777-84.
- Prowe, S. G.** (1996) Characterization of extracellular amyolytic enzymes and sodium coupled energy transduction of a newly isolated thermoalkaliphilic bacterium, *Thermoalcalibacter bogoriae*. Dissertation der Technischen Universität Hamburg-Harburg.
- Prowe, S. G., van de Vossenberg, J. L. C. M., Driessen, A. J. M., Antranikian, G. und Konings, W. N.** (1996) Sodium-Coupled Energy Transduction in the Newly Isolated Thermoalkaliphilic Strain LBS3. *J. Bacteriology* 178 (44): 4099-4104.
- Prowe, S. G. und Antranikian, G.** (2001) *Anaerobranca gottschalkii* sp. nov., a novel thermoalkaliphilic bacterium that grows anaerobically at high pH and temperature. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 51: 457-465.
- Rashid, N., Cornista, J., Ezaki, S., Fukui, T., Atomi, H. und Imanaka, T.** (2002) Characterization of an archaeal cyclodextrin glucanotransferase with a novel C-terminal domain. *J. Bacteriol.* 184 (3): 777-84.
- Roberge, M., Lewis, R. N., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D., Dupont, C. und McElhaney, R. N.** (2003) Differential Scanning Calorimetric, Circular Dichroism, and Fourier Transform Infrared Spectroscopic Characterization of the Thermal Unfolding of Xylanase A from *Streptomyces lividans*. *Proteins* 50 (2): 341-54.
- Rost, B.** (1996) *Methods in Enzymology*, 266:525-539.

- Sambrook, J., Fritsch, E. E. und Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbour.*
- Sander, C. und Schneider, R.** (1991) Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* 9 (1): 56-68.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chaindetermining inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sasahara, K., McPhie, P. und Minton, A. P.** (2003) Effect of dextran on protein stability and conformation attributed to macromolecular crowding. *J. Mol. Biol.* 326 (4): 1227-37.
- Schmid, F. X.** (1997) Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. *In* Creighton, T. E., *editors*, Protein Structure: A practical approach. chapter 11, pp. 259-295, *IRL Press, Oxford*, 2ed.
- Schmid, G.** (1989) Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends in Biotechnology TIBTECH* 7: 244-248.
- Schwede, T., Diemand, A., Guex, N. und Peitsch, M. C.** (2000) Protein structure computing in the genomic era. *Research in Microbiology* 151: 107.
- Sears, L. E., Moran, L. S., Kissinger, C., Creasey, T., Perry-O'Keefe, H., Roskey, M., Sutherland, E. und Slatko, B. E.** (1992) CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR(exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* 13: 626-633.
- Shih, P. und Kirsch, J. F.** (1995) Design and structural analysis of an engineered thermostable chicken lysozyme. *Protein Sci.* 4 (10): 2063-72.
- Sinnott, M. J.** (1990) Catalytic Mechanisms of Enzymic Glycosyl Transfer. *Chem. Rev.* 90: 1171-1202.
- Slatko, B. E.** (1994) Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Methods Mol. Biol.* 31: 35-45.
- Sparr, H. J.** (2002) Cyclodextrine. Ein neues Konzept zur Antagonisierung von Muskelrelaxanzien. *Anaesthesist* 51: 929-930.

- Stemmer, W. P.** (1994a) DNA Shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 25: 10747-10751.
- Stemmer, W. P.** (1994b) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370: 389-391.
- Sterner, R. und Liebl, W.** (2001) Thermophilic adaptation of Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36 (1): 39-106.
- Stoll, V. S. und Blanchard, J. S.** (1990) Buffers: principles and practice. *Methods Enzymol.* 182: 24-38.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W.** (1990) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89.
- Suvd, D., Fujimoto, Z., Takase, K., Matsumura, M. und Mizuno, H.** (2001) Crystal Structure of *Bacillus stearothermophilus* α -Amylase: Possible Factors Determining the Thermostability. *J. Biochem.* 129 (3): 461-468.
- Svensson, B.** (1994) Protein engineering in the α -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Molecular Biology* 15: 141-157.
- Szejtli, J.** (1996) Cyclodextrin News 10, 1 (see Fed. Reg. 61 (164) Docket No. 96G-0324).
- Tachibana, Y., Kuramura, A., Shirasaka, N., Suzuki, Y., Yamamoto, T., Fujiwara, S., Takagi, M. und Imanaka, T.** (1999) Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomalto-dextrin glucanotransferase from a newly isolated hyperthermophilic archaeon, a *Thermococcus* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (5): 1991-7.
- Takada, M., Nakagawa, Y. und Yamamoto, M.** (2003) Biochemical and Genetic Analyses of a novel γ -Cyclodextrin Glucanotransferase from an Alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364. *J. Biochem.* 133: 317-324.

- Takano, T., Fukuda, M., Monma, M., Kobayashi, S., Kainuma, K. und Yamane, K.** (1986) Molecular cloning, DNA nucleotide sequencing, and expression in *Bacillus subtilis* cells of the *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene. *J. Bacteriol.* 166 (3): 1118-22.
- Tanaka, Y., Tao, W., Blanchard, J. S. und Hehre, E. J.** (1994) Transition State Structure for the Hydrolysis of α -D-Glucopyranosyl Fluoride by Retaining and Inverting Reactions of Glycosylases. *J. Biol. Chem.* 269 (51): 32306-32312.
- Terada, Y., Yanase, M., Takata, H., Takaha, T. und Okada, S.** (1997) Cyclodextrins are not the major cyclic alpha-1,4-glycans produced by the initial action of cyclodextrin glucanotransferase on amylose. *J. Biol. Chem.* 272 (25): 15729-33.
- Tomazic, S. J. und Klibanov, A. M.** (1988) Why Is One *Bacillus* α -Amylase More Resistant against Irreversible Thermoinactivation Than Another? *J. Biol. Chem.* 263 (7): 3092-3096.
- Tonkova, A.** (1998) Bacterial cyclodextrin glycosyltransferase. *Enzyme and Microbial Technology* 22: 678-686.
- Tovey, E. R., Ford, S. A. und Baldo, B. A.** (1987) Protein blotting on nitrocellulose: some important aspects of the resolution and detection of antigens in complex extracts. *J. Biochem. Biophys. Methods* 14 (1): 1-17.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (9): 4350-4.
- Uchiyama, H., Inaoka, T., Ohkuma-Soyejima, T., Togame, H., Shibana, Y., Yoshimoto, T. und Kokubo, T.** (2000) Directed evolution to improve the thermostability of prolyl endopeptidase. *J. Biochem.* 128 (3): 441-7.
- Uitdehaag, J. C., Mosi, R., Kalk, K. H., van der Veen, B. A., Dijkhuizen, L., Withers, S. G. und Dijkstra, B. W.** (1999) X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the alpha-amylase family. *Nat. Struct. Biol.* 6 (5): 432-6.

- Uitdehaag, J. C., van Alebeek, G. J., van der Veen, B. A., Dijkhuizen, L. und Dijkstra, B. W.** (2000) Structures of maltohexaose and maltoheptaose bound at the donor sites of cyclodextrin glycosyltransferase give insight into the mechanisms of transglycosylation activity and cyclodextrin size specificity. *Biochemistry* 39 (26): 7772-80.
- van der Veen, B. A., Leemhuis, H., Kralj, S., Uitdehaag, J. C., Dijkstra, B. W. und Dijkhuizen, L.** (2001) Hydrophobic amino acid residues in the acceptor binding site are main determinants for reaction mechanism and specificity of cyclodextrin-glycosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 276 (48): 44557-62.
- van der Veen, B. A., Uitdehaag, J. C., Dijkstra, B. W. und Dijkhuizen, L.** (2000a) Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 1543 (2): 336-360.
- van der Veen, B. A., Uitdehaag, J. C., Penninga, D., van Alebeek, G. J., Smith, L. M., Dijkstra, B. W. und Dijkhuizen, L.** (2000b) Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α -cyclodextrin production. *J. Mol. Biol.* 296 (4): 1027-38.
- van der Veen, B. A., van Alebeek, G. J., Uitdehaag, J. C., Dijkstra, B. W. und Dijkhuizen, L.** (2000c) The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. *Eur. J. Biochem.* 267 (3): 658-65
- van Gunsteren, W. F., Billeter, S. R., Eising, A. A., Hünenberger, P. H., Krüger, P., Mark, A. E., Scott, W. R. P. und Tironi, I. G.** (1996) in Biomolecular simulation: the GROMOS96 manual and user guide. *Vdf Hochschulverlag ETHZ.*
- Vielle, C. und Zeikus, G. J.** (2001) Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65 (1): 1-43.
- Vikmon, M.** (1982) In Szejtli, J., editors, *First International Symposium on Cyclodextrins Budapest*, pp. 69-74, D. Reidel Publishing, Dordrecht.

- Volkova, D. A., Lopatin, S. A. und Varlamov, V. P.** (2000) One-step affinity purification of cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus* sp. 1070. *Biocatalysis-2000: Fundamentals & Applications*. 41 (6) 67-69.
- Volkova, D. A., Lopatin, S. A., Gracheva, I. M. und Varlamov, V. P.** (2001) Preparation of High-Purity Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus* sp. 1070. *Applied Biochemistry and Microbiology* 37 (2): 138-141.
- Westermeier, R.** (1997) Electrophoresis in Practice – a guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations. section I chapter 4, pp. 59-70 und section II Method 8, pp. 187-194, *Wiley VCH Weinheim*
- Wierenga, R. K.** (2001) The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett.* 492 (3): 193-8.
- Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A. M., Lambeir, A.-M. und Wierenga, R. K.** (1999) Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Engineering* 12 (3): 243-250.
- Wind, R. D., Liebl, W., Buitelaar, R. M., Penninga, D., Spreinat, A., Dijkhuizen, L. und Bahl, H.** (1995) Cyclodextrin formation by the thermostable α -amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (4): 1257-65.
- Wind, R. D., Uitdehaag, J. C., Buitelaar, R. M., Dijkstra, B. W. und Dijkhuizen, L.** (1998) Engineering of cyclodextrin product specificity and pH optima of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. *J. Biol. Chem.* 273 (10): 5771-9.
- Woody, R. W.** (1994) Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. *Eur. Biophys. J.* 23 (4): 253-62.

- Xu, Z., Liu, Y., Yang, Y., Jiang, W., Arnold, E. und Ding, J.** (2003) Crystal Structure of D-Hydantoinase from *Burkholderia pickettii* at a resolution of 2.7 Angstroms: Insights into the Molecular Basis of Enzyme Thermostability. *Journal of Bacteriology* 185 (14): 4038-4049.
- Yamamoto, T., Shiraki, K., Fujiwara, S., Takagi, M., Fukui, K. und Imanaka, T.** (1999) In vitro heat effect on functional and conformational changes of cyclodextrin glucanotransferase from hyperthermophilic archaea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265 (1): 57-61.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strain: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Zhao, H. und Arnold, F. H.** (1997) Combinatorial protein design: strategies for screening protein libraries. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (4): 480-5.
- Zhao, H. und Arnold, F. H.** (1999) Directed Evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein Engineering* 12: 47-53.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

6.1.1 Allgemeine Abkürzungen

% GC	relativer molarer GC-Gehalt
∅	Durchmesser
λ	Wellenlänge [nm]
η	Viskosität der Lösung
ε ₂₈₀	molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [1/M cm]
α-CD	Cyclodextrin mit 6 Glucose-Moleküle
β-CD	Cyclodextrin mit 7 Glucose-Moleküle
γ-CD	Cyclodextrin mit 8 Glucose-Moleküle
ΔG _{FU}	Energiedifferenz zwischen gefaltetem (F) und ungefaltetem (U) Protein, thermodynamische Stabilität
ΔI	Heizstrom
Θ _{MRW}	durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure [Grad*cm ² /dmol]
Θ _{obs}	gemessene Elliptizität [mGrad]
(v/v)	volume per volume
(w/v)	weight per volume
°C	Grad Celcius
μg	Mikrogramm (1*10 ⁻⁶ g)
μl	Mikroliter (1*10 ⁻⁶ l)
A	Adenosin, oder Absorption
Å	Angström
<i>A. gottschalkii</i>	<i>Anaerobranca gottschalkii</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfid
A _x	Absorption bei einer Wellenlänge x nm
AZT	Azidothymidin oder Zidovudin
BCIP	Bromo-Chloro-Indolyphosphat
bla	β-Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin, oder crude extract (löslicher Zellextrakt)
c	Konzentration

CD	Cyclodextrin, oder Circular Dichroismus
CDS	chemical delivery system
CGTase	Cyclodextrin Glycosyltransferase, Cyclodextrin Glucanotransferase
Cp	Wärmekapazität
C-terminal	Carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
Da	Dalton
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide (N = A, C, G oder T)
DSC	Differentielle Scanning Kalorimetrie
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzyme Commission Number
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und weitere (Autoren)
EtBr	Ethidiumbromid
F	gefaltetes Protein oder Verdünnungsfaktor
inkl.	inklusive
FDA	Liste der <i>US Food and Drug Administration</i>
F _N	Anteil gefaltetes Protein
FPLC	fast performance liquid chromatography
F _U	Anteil ungefaltetes Protein
g	Gramm
G	Guanin
GH	Glycosylhydrolasen
GRAS	<i>Generally Regarded as Safe</i>
GT	Glycosyltransferasen
h	Stunde
HPβCD	2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin
HPLC	high performance liquid chromatography
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
K	Kelvin, oder Gleichgewichtskonstante

K_{av}	Verteilungskoeffizient
k_B	Boltzmann – Konstante
K_C	Gleichgewichtskonstante des Komplexes
k_{cat}	Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung des Abbaus des komplexierten Gastmoleküls
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	kiloDalton, $1 \cdot 10^3$ g/mol
k_o	Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung des Abbaus des freien Gastmoleküls
KP	Kaliumphosphat-Puffer
k_u, k_f	Geschwindigkeitskonstanten für die Auf- und Rückfaltung von Proteinen
L	Liter
LB	Luria-Bertani
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
M_R	relatives Molekulargewicht (g/mol)
MRW	mittleres Molekulargewicht der Aminosäuren [g/mol]
MWCO	relatives Molekulargewicht (g/mol)
n	Anzahl der Basen im Primer
N_A	Anzahl der Aminosäuren im Protein
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
ng	Nanogramm ($1 \cdot 10^{-9}$ g)
N-terminal	Aminotermiales Ende einer Polypeptidkette
OD_{600}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ori	origin of replication, Replikationsursprung
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Maß für die H^+ -Konzentration in einer Lösung
pK_A	Der pK-Wert einer Säure ist gleich dem pH-Wert, bei dem die Säure zur Hälfte dissoziiert ist.
pmol	pico mol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
S	freies Gastmolekül
s	Sekunde
SBE- β -CD	Sulfobutylether- β -cyclodextrin

S-CD	Gast-Cyclodextrin 1:1 Komplex
SDS	<i>sodium dodecylsulfat</i> oder Natriumdodecylsulfat
SOE	<i>Splicing by Overlap Extension</i>
T	absolute Temperatur, Thymidin
t_0	Zeitpunkt $t = 0$
T_A	Annealing-Temperatur [°C]
TBE	Puffer aus Tris, Borsäure und EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFB	Puffername
T_M	Schmelztemperatur [°C]
U	Units, oder Anteil ungefaltetes Protein
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
V_0	Ausschlussvolumen der Säule
V_e	Elutionsvolumen des Proteins
v_i	Anfangsgeschwindigkeit
VP-DSC	Differentielle _scanning calorimetry
V_t	Totalvolumen der Säule
W	Watt
WB	WesternBlot

6.2 Aminosäuresequenz-Alignment der CGTase mit MaxHom

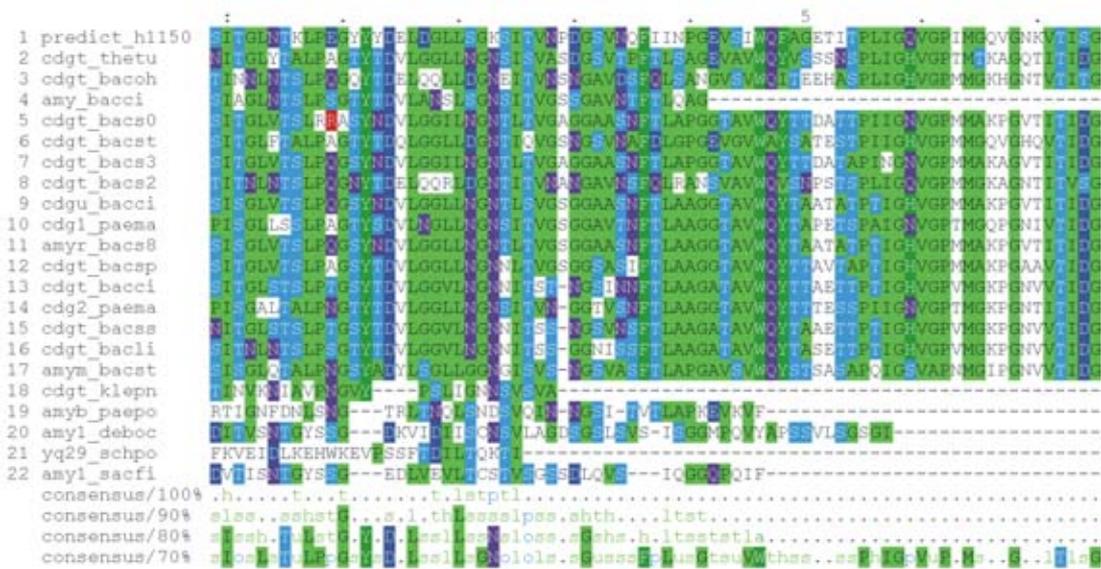
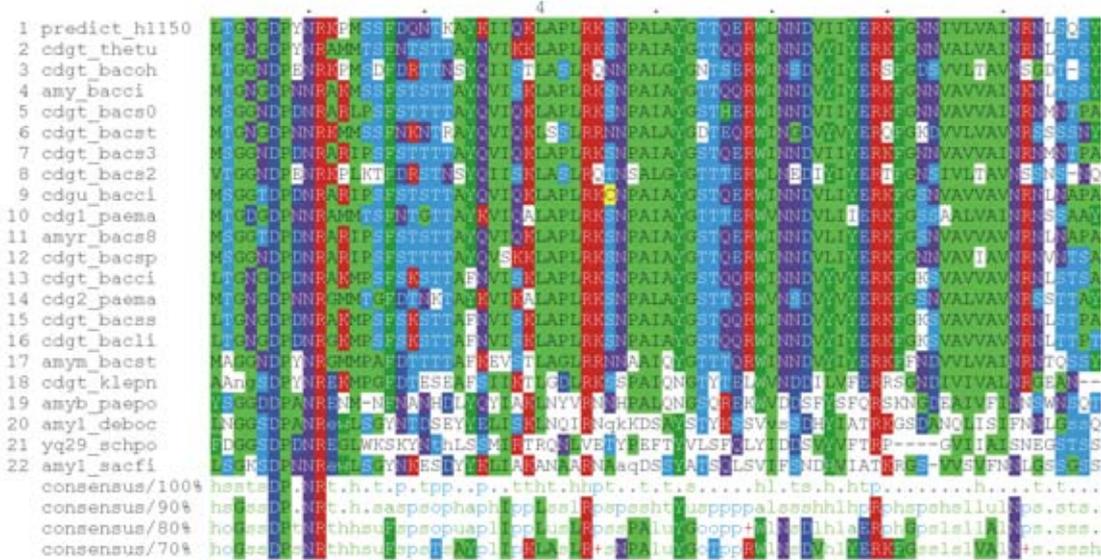
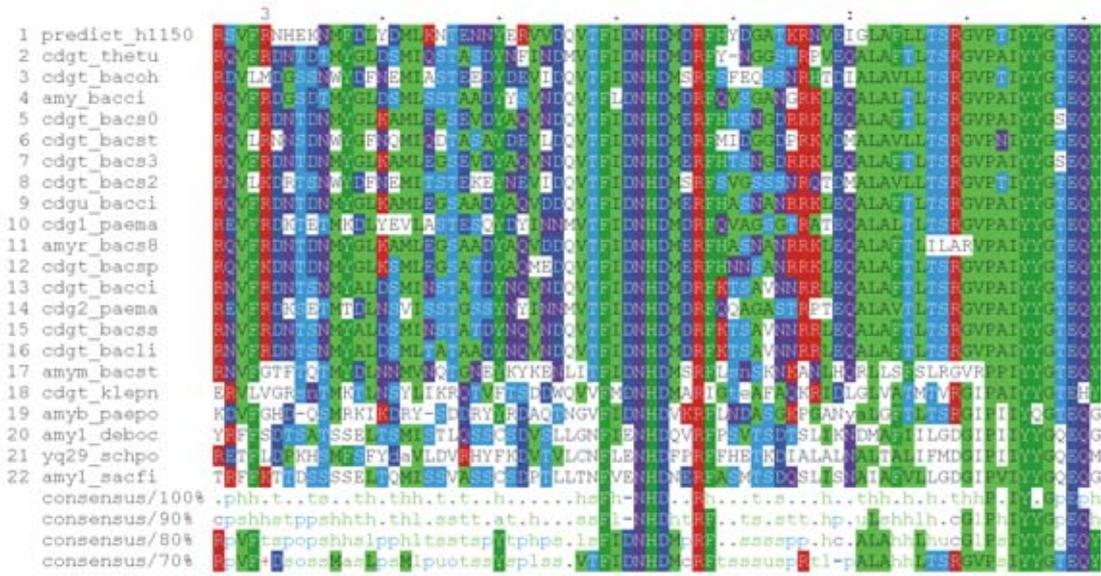
Proteine und ihre Herkunft

- predict_h1150: CGTase ohne Sekretionssignal aus *A. gottschalkii*
- cdgt_thetu: CGTase precursor aus *Thermoanaerobacter thermosulfurogenes* (*Clostridium thermosulfurogenes*)
- cdgt_bacoh: CGTase precursor aus *Bacillus ohbensis*
- amy_bacci: Alpha-amylase precursor aus *Bacillus circulans*
- cdgt_bacs0: CGTase precursor aus *Bacillus* sp. (strain 1011)
- cdgt_bacst: CGTase precursor aus *Bacillus stearothermophilus*
- cdgt_bacs3: CGTase precursor aus *Bacillus* sp. (strain 38-2)
- cdgt_bacs2: CGTase precursor aus *Bacillus* sp. (strain 1-1)
- cdgu_bacci: CGTase precursor aus *Bacillus circulans*
- cdg1_paema: CGTase precursor aus *Paenibacillus macerans* (*Bacillus macerans*)
- amyr_bacs8: CGTase precursor aus *Bacillus* sp. B1018
- cdgt_bacsp: CGTase precursor aus *Bacillus* sp. (strain 17-1)
- cdgt_bacci: CGTase precursor aus *Bacillus circulans*
- cdg2_paema: CGTase precursor aus *Paenibacillus macerans* (*Bacillus macerans*)
- cdgt_bacss: CGTase precursor aus *Bacillus* sp. (strain 6.6.3)
- cdgt_bacli: CGTase precursor aus *Bacillus licheniformis*
- amym_bacst: Maltogenic alpha-amylase precursor aus *Bacillus stearothermophilus*
- cdgt_klepn: CGTase precursor aus *Klebsiella oxytoca*
- amyb_paepo: Alpha-amylase aus *Paenibacillus polymyxa* (*Bacillus polymyxa*)
- amy1_deboc: Alpha-amylase 1 precursor aus *Debaryomyces occidentalis* (Yeast; *Schwanniomyces occidentalis*)
- yq29_schpo: Hypothetical protein C11E10.09c in chromosome III aus *Schizosaccharomyces pombe* (Fission yeast)
- amyl_sacfi: Alpha-amylase precursor aus *Saccharomycopsis fibuligera* (Yeast).

1 predict_h1150 QKEDGGLDGMGSLAIWSSPVENLVALEQFETS YHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
2 cdgt_thetu NKNDGGLTGMGVTAIWSQPVENLVALELDSQTSYHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
3 cdgt_bacoh DKNDGGLTGLGTALWISQPVENLVALESEYTSYHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
4 amy_bacci NKNDGGLTGMGI TALWISQPVENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
5 cdgt_bacs0 NKNDGGLTGMGI TALWISQPVENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
6 cdgt_bacs1 NKNDGGLTGMGI TALWISQPVENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
7 cdgt_bacs3 NKNDGGLTGMGI TALWISQPVENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
8 cdgt_bacs2 DKNDGGLTGLGTALWISQPVENLVALESEYTSYHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
9 cdgu_bacci NKNDGGLTGMGVTAIWSQPVENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
10 cdgl_paema DKNDGGLTGMGVTAIWSQPVENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
11 amyr_bacs8 NKNDGGLTGMGVTAIWSQPVENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
12 cdgt_bacsp NKNDGGLTGMGVTAIWSQPVENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
13 cdgt_bacci NKNDGGLTGMGI TALWISQPVENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
14 cdg2_paema NKNDGGLTGMGI TALWISQPVENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
15 cdgt_bacs5 NKNDGGLTGMGI TALWISQPVENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
16 cdgt_bacli NKNDGGLTGMGI TALWISQPVENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
17 amym_bacst QKL--DYLKGLVITLSPVLNLDLTLGDTNTG YHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
18 cdgt_klepn NKL--DYLKGLVITLSPVLNLDLTLGDTNTG YHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
19 amy_b_paepo NKL--DYLKGLVITLSPVLNLDLTLGDTNTG YHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
20 amy1_debec DKL--DYLKGLVITLSPVLNLDLTLGDTNTG YHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
21 va29_schpo RNL--DYLKGLVITLSPVLNLDLTLGDTNTG YHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF

1 predict_h1150 NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
2 cdgt_thetu NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
3 cdgt_bacoh NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
4 amy_bacci NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
5 cdgt_bacs0 NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
6 cdgt_bacs1 NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
7 cdgt_bacs3 NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
8 cdgt_bacs2 NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
9 cdgu_bacci NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
10 cdgl_paema NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
11 amyr_bacs8 NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
12 cdgt_bacsp NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
13 cdgt_bacci NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
14 cdg2_paema NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
15 cdgt_bacs5 NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
16 cdgt_bacli NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
17 amym_bacst NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
18 cdgt_klepn NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
19 amy_b_paepo NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
20 amy1_debec NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
21 yq29_schpo NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
22 amy1_sacfi NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
consensus/100% .NR.s.....tt.ht.....t.....t.....s.....t.....h.....p.....s.....
consensus/90% NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
consensus/80% NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF
consensus/70% NHTSPASEVNNNYEDENLVALENYNNTAVHG YW RDKFRNNFFFDLDFDRFETIAVAANEHDKVVIIDF

1 predict_h1150 SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
2 cdgt_thetu SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
3 cdgt_bacoh SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
4 amy_bacci SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
5 cdgt_bacs0 SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
6 cdgt_bacs1 SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
7 cdgt_bacs3 SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
8 cdgt_bacs2 SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
9 cdgu_bacci SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
10 cdgl_paema SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
11 amyr_bacs8 SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
12 cdgt_bacsp SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
13 cdgt_bacci SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
14 cdg2_paema SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
15 cdgt_bacs5 SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
16 cdgt_bacli SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
17 amym_bacst SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
18 cdgt_klepn SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
19 amy_b_paepo SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
20 amy1_debec SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
21 yq29_schpo SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
22 amy1_sacfi SIKRMLDGMGDLGRLDAVKHMLPLGKSEVDTIYNHMPVRFGEVNYLKHDEVDENYHFNNSGMSLIDDFEFAVIT
consensus/100%hculhshhshh.....ph.....tsha.hshs.s.....s.t.....p.....th.sa.h...h
consensus/90%hculhshhshh.....ph.....tsha.hshs.s.....s.t.....p.....th.sa.h...h
consensus/80%hculhshhshh.....ph.....tsha.hshs.s.....s.t.....p.....th.sa.h...h
consensus/70%hculhshhshh.....ph.....tsha.hshs.s.....s.t.....p.....th.sa.h...h



6.3 Modellierung der CGTase-Struktur mit Swiss-Model

Die Modellierung der CGTase-Struktur basierte auf den Koordinaten der folgenden Protein Datenbank- Einträge:

- 1a47.pdb Eintrag vom 11.02.1998
Glycosidase
CGTase *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 I
komplexiert mit einem Maltohexaose Inhibitor
X-Ray diffraction
Auflösung: 2.56 Angström
- 1ciu.pdb Eintrag vom 23.10.1995
Glycosidase
Thermostabile CGTase aus *Thermoanaerobacterium
thermosulfurigenes* EM1 bei pH 8.0
X-Ray diffraction
Auflösung: 2.3 Angström
- 1cyg.pdb Eintrag vom 3.02.1993
Glycosyltransferase
Auflösung: 2.5 Angström
- 1i75.pdb Eintrag vom 8.03.2001
Transferase

Crystal structure of cyclodextrin glucanotransferase from
alkalophilic *Bacillus* sp. #1011 complexed with 1-deocynojirimycin

X-Ray diffraction
Auflösung: 2.00 Angström

Sekundärstrukturelemente der CGTase aus *A. gottschalkii* (TARGET, die ersten sechs Aminosäuren fehlen) aufgrund des Aminosäuresequenz-Alignments von SwissModel:

s: β -Strang

h: α -Helix

*: identische Aminosäuren

•: ähnliche Aminosäuren

fettgedruckt: hochkonserviert in α -Amylase-Familie (Svensson, 1994)

rot hinterlegt: an Katalyse beteiligt (Svensson, 1994)

unterstrichen: Aminosäuren der vier konservierten Regionen I – IV (Svensson, 1994)

Hof1; Hof5; Hof6

E

TARGET	1	HIKEHTS	VNNQVNYATD	VIYQIVTDRF	LDGDKYNNPT	CENLYSEDGA
1a47_	1	A--SDTAVSN	VVNYSTDVIY	QIVTDRFVDG	NTSNNPTGDL	YDPHTSLKK
1ciu_	1	A--SDTAVSN	VVNYSTDVIY	QIVTDRFVDG	NTSNNPTGDL	YDPHTSLKK
lcyg_	1	AGNLN	KVNFTSDVY	QIVVDRFVDG	NTSNNPSGAL	FSSGCTNLRK
1i75B	1	A--PDTSVSN	KQNFSTDVIY	QIFTDREFSDG	NPANNPTGAA	FDGSCTNLRL
1i75A	1	A--PDTSVSN	KQNFSTDVIY	QIFTDREFSDG	NPANNPTGAA	FDGSCTNLRL
		.	*	*
TARGET			sss	ss		
1a47_			sss	ss		
1ciu_			sss	ss		
lcyg_			sss	ss		
1i75B			sss	ss	hh	
1i75A			sss	ss	hh	

N

TARGET	48	DLRKYLGGDW	RGIIQKIEDG	YLPDMGISAI	WISSPVENIY	AVHPQFGTSY
1a47_	49	YFGGDWQGII	NKINDGYLTG	MGVTAIWISQ	PVENIYAVLP	DSTFGGSTSY
1ciu_	49	YFGGDWQGII	NKINDGYLTG	MGVTAIWISQ	PVENIYAVLP	DSTFGGSTSY
lcyg_	46	YCGGDWQGII	NKINDGYLTD	MGVTAIWISQ	PVENVFSVMN	DA--SGSASY
1i75B	49	YCGGDWQGII	NKINDGYLTG	MGITAIWISQ	PVENIYSVIN	Y-SGVNNTAY
1i75A	49	YCGGDWQGII	NKINDGYLTG	MGITAIWISQ	PVENIYSVIN	Y-SGVNNTAY
		*	**
TARGET		hhhh	hhhh	hhh	sssss	ss s sss
1a47_		hhhh	hhhh	hhh	sssss	ss s sss
1ciu_		hhhhh	hhh	hhhh	sssss	ss s sss
lcyg_		hhhh	hhh	hhhh	sssss	sssss
1i75B		hhhhh	hhh	hhhh	sssss	ss s sss
1i75A		hhhh	hhh	hhhh	sssss	ss s sss

K

Region I

TARGET	98	HGYWARDFKR	NNPFFGLDND	FRELIAVANE	HDIKVIIDFA	PNHTSPAENV
1a47_	99	HGYWARDFKR	TNPYFGSFTD	FQNLINTAHA	HNIKVIIDFA	PNHTSPASET
1ciu_	99	HGYWARDFKR	TNPYFGSFTD	FQNLINTAHA	HNIKVIIDFA	PNHTSPASET
lcyg_	94	HGYWARDFKK	PNPFFGTLSD	FQRLVDAAHA	KGIKVIIDFA	PNHTSPASET
1i75B	98	HGYWARDFKK	TNPAYGTMQD	FKNLIDTAHA	HNIKVIIDFA	PNHTSPASSD
1i75A	98	HGYWARDFKK	TNPAYGTMQD	FKNLIDTAHA	HNIKVIIDFA	PNHTSPASSD
		*****.	**.*	*.*.*	*****	*****
TARGET		sss	s ss	hhh	hhhhhhhhh	sssss
1a47_		sss	s ss	hhh	hhhhhhhhh h	sssss
1ciu_		sss	s ss	hhh	hhhhhhhhh h	sssss
lcyg_		sss	s ss	hhh	hhhhhhhhh h	sssss
1i75B		sss	s ss	hhh	hhhhhhhhh	sssss
1i75A		sss	s ss	hhh	hhhhhhhhh	sssss

TARGET	148	NPNYAEDGNL	YNNGEFVASY	SNDLNEIFYH	FGGTDFSTYE	DSIYRNLFDL
1a47_	149	DPTYAENGRL	YDNGTLLGGY	TNDTNGYFHH	YGGTDFSSYE	DGIYRNLFDL
lciu_	149	DPTYAENGRL	YDNGTLLGGY	TNDTNGYFHH	YGGTDFSSYE	DGIYRNLFDL
lcyg_	144	NPSYMENGR	YDNGTLLGGY	TNDANMYFHH	NGGTTFSSLE	DGIYRNLFDL
1i75B	148	DPSFAENGRL	YDNGNLLGGY	TNDTQNLFHH	YGGTDFSTIE	NGIYKNLYDL
1i75A	148	DPSFAENGRL	YDNGNLLGGY	TNDTQNLFHH	YGGTDFSTIE	NGIYKNLYDL
		. * . * . * *	* . * * *	. * * * . * *	* * * * * . *	. . * * . * * . * *
TARGET			s ss sss	sss	hh hhhh	ss
1a47_			s ss sss	sss	hh	ss
lciu_			s ss sss	sss	hh	ss
lcyg_			s ss sss	sss	hh	ss
1i75B			s ss sss	sss	hh hhhh	ss
1i75A			s ss sss	sss	hh hhhh	ss

Region II

TARGET	198	AGLNLNNNFV	DQYLRDSIKF	WLDLGV ^G VDGIR	V ^I DAVKHMPLG	WQKSFVDTIY
1a47_	199	ADLNQQNSTI	DSYLKSAIKV	WLDMGIDGIR	LDAVKHMPFG	WQKNFMSIL
lciu_	199	ADLNQQNSTI	DSYLKSAIKV	WLDMGIDGIR	LDAVKHMPFG	WQKNFMSIL
lcyg_	194	ADLNHQNPVI	DRYLKDAVKM	WIDMGIDGIR	MDAVKHMPFG	WQKSLMDEID
1i75B	198	ADLNHNNSV	DVYLKDAIKM	WLDLGV ^G VDGIR	VDAVKHMPFG	WQKSFMATIN
1i75A	198	ADLNHNNSV	DVYLKDAIKM	WLDLGV ^G VDGIR	VDAVKHMPFG	WQKSFMATIN
		* * * . * . .	* * * *	* . * . * . * * * *	. * * * * * * . *	* * * *
TARGET		ssss	hhh hhhhhhhhhh	hhh sss ss	hh hhhhhhhhhh	
1a47_		ssss	hhh hhhhhhhhhh	hhh sss ss	hh hhhhhhhhhh	
lciu_		ssss	hhh hhhhhhhhhh	hhh sss ss	hh hhhhhhhhhh	
lcyg_		ssss	hhh hhhhhhhhhh	hhh sss ss	h hhhhhhhhhh	
1i75B		ssss	hhh hhhhhhhhhh	hhh sss ss	hh hhhhhhhhhh	
1i75A		ssss	hhh hhhhhhhhhh	hhh sss ss	hh hhhhhhhhhh	

Region III

TARGET	248	NHKPV ^I VTFGE	WYLGKDEYDP	NYYHFANNSG	MSLLDFEFAQ	TTRSVFRNHE
1a47_	249	SYRPV ^I VTFGE	WFLGTNEIDV	NNTYFANESG	MSLLDFRFSQ	KVRQVFRDNT
lciu_	249	SYRPV ^I VTFGE	WFLGTNEIDV	NNTYFANESG	MSLLDFRFSQ	KVRQVFRDNT
lcyg_	244	NYRPV ^I VTFGE	WFLSENEVDA	NNHYFANESG	MSLLDFRFGQ	KLRQVLRNNS
1i75B	248	NYKPV ^I VTFGE	WFLGVNEISP	EYHQFANESG	MSLLDFRFAQ	KARQVFRDNT
1i75A	248	NYKPV ^I VTFGE	WFLGVNEISP	EYHQFANESG	MSLLDFRFAQ	KARQVFRDNT
		. . * * * * *	* *	. * * * . * *	* * * * * . *	* * * *
TARGET		hh sssss	h hhhhhhh	sss hhhh	hhhhh	hhhhh
1a47_		hh sssss	h hhhhhhh	sss hhhh	hhhhh	hhhhh
lciu_		hh sssss	h hhhhhhh	sss hhhh	hhhhh	hhhhh
lcyg_		hh sssss	h hhhhhhh	sss hhhh	hhhhh	hhhhh
1i75B		sssss	hhhhh	sss hhhh	hhhhh	hhhhh
1i75A		sssss	h hhhhhhh	sss hhhh	hhhhh	hhhhh

Region IV

TARGET	298	KNMFDLYDML	KNTENNYERV	VDQVTFIDNH	D ^I MDRFHYDG-	ATKRNVEIGL
1a47_	299	DTMYGLDSMI	QSTASYNF	NDMVTFIDNH	D ^I MDRF-YNG-	GSTRPVEQAL
lciu_	299	DTMYGLDSMI	QSTASYNF	NDMVTFIDNH	D ^I MDRF-YNG-	GSTRPVEQAL
lcyg_	294	DNWYGFNQMI	QDTASAYDEV	LDQVTFIDNH	D ^I MDRF-MIDG	GDPRKVDMAL
1i75B	298	DNMYGLKAML	EGSEVDYAQV	NDQVTFIDNH	D ^I MERF-HTSN	GDRRKLEQAL
1i75A	298	DNMYGLKAML	EGSEVDYAQV	NDQVTFIDNH	D ^I MERF-HTSN	GDRRKLEQAL
		. . * . . *	. * * * * * *	* * * * *	. * . . . *	
TARGET		hhhhhhh	hhhhh	sss	hhhhh	hhhhh
1a47_		hhhhhhh	hhhhh	sss	hhhhh	hhhhh
lciu_		hhhhhhh	hhhhh	sss	hhhhh	hhhhh
lcyg_		hhhhhhh	hhhhh	sss	hhhhh	hhhhh
1i75B		hhhhhhh	hhhhh	sss	hhhhh	hhhhh
1i75A		hhhhhhh	hhhhh	sss	hhhhh	hhhhh

TARGET	347	AFLTTSRGVP	TIYYGTEQYL	TGNGDPYNRK	PMSSFDQNTK	AYKIIQKLAP
la47_	347	AFLTTSRGVP	AIYYGTEQYM	TGNGDPYNRA	MMTSFNTSTT	AYNVIKKLAP
lcIU_	347	AFLTTSRGVP	AIYYGTEQYM	TGNGDPYNRA	MMTSFNTSTT	AYNVIKKLAP
lcyg_	343	AFLTTSRGVP	NIYYGTEQYM	TGNGDPNKR	MMSSFNKNTR	AYQVIQKLSS
li75B	347	AFLTTSRGVP	AIYYGSEQYM	SGGNDPDNRA	RLPSFSTTTT	AYQVIQKLAP
li75A	347	AFLTTSRGVP	AIYYGSEQYM	SGGNDPDNRA	RLPSFSTTTT	AYQVIQKLAP
		*	*****	****.***.	. * ** *	. ** . * ** * . *
TARGET		hhhhh	ss ssss			h hhhhhhhhhh
la47_		hhhhh	ss ssss			h hhhhhhhhhh
lcIU_		hhhhh	ss ssss			h hhhhhhhhhh
lcyg_		hhhhh	ss ssss			h hhhhhhhhhh
li75B		hhhhh	ss ssss			h hhhhhhhhhh
li75A		hhhhh	ss ssss			h hhhhhhhhhh
TARGET	397	LRKSNPALAY	GTTQERWLN	DVYIYERKFG	NNIVLVAINR	NLSQSYSITG
la47_	397	LRKSNPAIAY	GTTQQRWINN	DVYIYERKFG	NNVALVAINR	NLSTSYNITG
lcIU_	397	LRKSNPAIAY	GTTQQRWINN	DVYIYERKFG	NNVALVAINR	NLSTSYNITG
lcyg_	393	LRRNNPALAY	GDTEQRWING	DVYVYERQFG	KDVVLVAVNR	SSSSNYSITG
li75B	397	LRKSNPAIAY	GSTHERWINN	DVYIYERKFG	NNVAVVAINR	NMNTPASITG
li75A	397	LRKSNPAIAY	GSTHERWINN	DVYIYERKFG	NNVAVVAINR	NMNTPASITG
		...*	* * ..**.*	** .*** **	... **.****
TARGET		hhh	hhh	ssssssss	ssssssss	ssssssss
la47_		hhh	hhh	ssssssss	ssssssss	ssssssss
lcIU_		h	hhh	ssssssss	ssssssss	ssssssss
lcyg_		hhh	hhh	ssssssss	ssssssss	ssssssss
li75B		hhh	hhh	ssssssss	ssssssss	ssssssss
li75A		hhh	hhh	ssssssss	ssssssss	ssssssss
TARGET	447	LNTKLPEGY	YDELGLLNG	KSITVNPDGS	VNQFIINPGE	VSIWQFAGET
la47_	447	LYTALPAGTY	TDVLGGLNG	NSISVADGS	VTPFTLSAGE	VAVWQYVSSS
lcIU_	447	LYTALPAGTY	TDVLGGLNG	NSISVADGS	VTPFTLSAGE	VAVWQYVSSS
lcyg_	443	LFTALPAGTY	TDQLGGLLDG	NTIQVGSNGS	VNAFDLGPGE	VGWWAYSATE
li75B	447	LVTSLPRGSY	NDVLGGILNG	NLTTLVAGGA	ASNFTLAPGG	TAVWQYTT-D
li75A	447	LVTSLPRGSY	NDVLGGILNG	NLTTLVAGGA	ASNFTLAPGG	TAVWQYTT-D
		* * * * *	* * * . * . *	... * . *	* * * * *	..* . .
TARGET		sss	sss	ssss	ss ss sss	s ssssss
la47_		sss	sss	ssss	ss ss sss	s ssssss
lcIU_		sss	sss	ssss	ss ss sss	s ssssss
lcyg_		sss	sss ss	ssssss	ss ss sss	s ssssss
li75B		sss	sss	ssss	ss ss sss	s ssssss
li75A		sss	sss	ssss	ss ss sss	s ssssss
TARGET	497	I-T-PLIGQV	GPIMGQVGNK	VTISGVGFGD	KKGTVNFGEI	DA---TIISW
la47_	497	N-S-PLIGHV	GPTMTKAGQT	ITIDGRGFGT	TSGQVLFGST	AG---TIVSW
lcIU_	497	N-S-PLIGHV	GPTMTKAGQT	ITIDGRGFGT	TSGQVLFGST	AG---TIVSW
lcyg_	493	--STPIIGHV	GPMMGQVGHQ	VTIDGEGFGT	NTGTVKFGTT	AA---NVVSW
li75B	496	ATT-PIIGNV	GPMMAKPGVT	ITIDGRGFGS	GKGTVYFGTT	AVTGADIVAW
li75A	496	A-TTPIIGNV	GPMMAKPGVT	ITIDGRGFGS	GKGTVYFGTT	AVTGADIVAW
		. * . * . *	** * *	. * * * * *	* * * *	... *
TARGET		ssssss	s sss	ss sssssss	ssss	ss
la47_		ssssss	s sss	ss sssssss	ssss s ss	sssss
lcIU_		ssssss	s sss	ss sssssss	ssss s ss	sssss
lcyg_		ssssss	s sss	ss sssssss	sss s ss	sssss
li75B		ssssss	s sss	ss sssssss	ssss s ss	sssss
li75A		ssssss	s sss	ss sssssss	ssss s ss	sssss

6.4 Proteinchemische Eigenschaften der CGTase-Varianten

Tabelle 6.1: Proteinchemische Eigenschaften der wildtypischen CGTase und ihrer Varianten.

M_R : relatives Molekulargewicht (berechnet nach der Aminosäurezusammensetzung). ϵ_{280} : molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm (2.5.1.2; Pace *et al.*, 1995). AS: Anzahl der Aminosäuren

	M_R [g/mol]	ϵ_{280} [$M^{-1}cm^{-1}$]	AS
CGTase	78351,59	142560	687
Hof1	78307,64	142560	687
Hof5	78331,60	142560	687
Hof6	78367,51	142560	687

6.5 Kalibrierungskurve für den Phenolphthalein- β -CD-Komplex

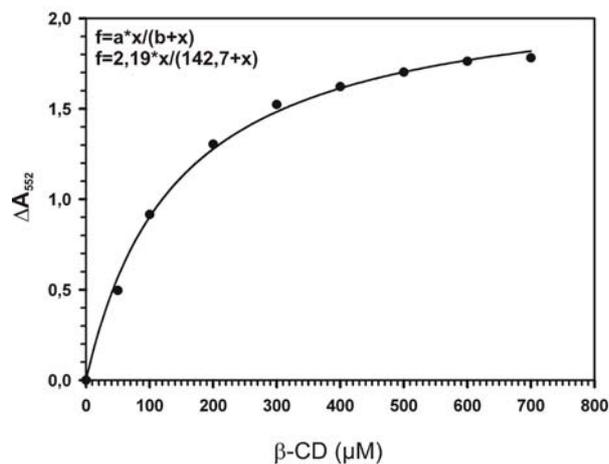


Abbildung 6.1: Kalibrierungskurve für die Konzentrationsbestimmung von β -CD mit Hilfe von Phenolphthalein für die diskontinuierliche Messung der Cyclisierungsaktivität (2.5.11.1).

100 μl β -CD Lösung (β -CD-Konzentrationen von 0-700 μM in Anwesenheit von 0,5 % oder 5 % (w/v) Paselli-Stärke SA2 und 10 mM Tris/HCl, pH 8.5, 5 mM $CaCl_2$) wurden mit 900 μl Phenolphthalein-Aktivitätsfärbelösung gemischt und die Absorption sofort bei einer Wellenlänge von 552 nm und RT gemessen. Die Absorptionsdifferenz zu 0 μM β -CD wurde gegen die β -Konzentration (μM) aufgetragen. In einem Bereich von 0 bis 50 μg β -CD/ml (entspricht 44 μM) ist das Verhältnis der Konzentration zur Absorption linear. In dem Konzentrationsbereich von 0 bis 1 mM entspricht das Verhältnis einer Kurve, die mit Hilfe des Programms SigmaPlot mit der hyperbolischen Formel ($f = a \cdot x / (b + x)$) interpoliert wurde.

7 Kurzzusammenfassung

Cyclodextrine (CD) sind zyklische Oligosaccharide aus sechs bis acht Glucoseeinheiten (α -, β - und γ -CD), die durch Cyclodextrin Glycosyltransferasen (CGTasen) aus Stärke und anderen Polysacchariden synthetisiert werden. Zur Herstellung von Cyclodextrinen, die in ihrem Inneren Gastmoleküle komplexieren können und deshalb vielfältige industrielle Anwendung finden, werden thermostabile CGTasen benötigt. In diesem Zusammenhang wurde die CGTase aus dem thermoalkaliphilen Bakterium *Anaerobranca gottschalkii* hergestellt und charakterisiert, sowie Versuche zu ihrer Stabilisierung mittels gerichteter Evolution unternommen.

Das *cgtase* Gen wurde mittels PCR aus genomischer DNA isoliert und in *Escherichia coli* heterolog exprimiert. Die CGTase wurde anschließend aus dem löslichen Zellextrakt über verschiedene chromatographische Methoden bis zu einer Reinheit von etwa 95 % angereichert. Die Charakterisierung mittels hydrodynamischer und spektroskopischer Methoden zeigte, dass es sich um ein monomeres Protein mit definierten Sekundärstrukturelementen und einer nativen Tertiärstruktur handelt. Die Stabilität der CGTase wurde mittels differentieller *scanning calorimetry* und irreversibler thermischer Inaktivierung getestet. Dabei zeigte sich, dass das Enzym durch sein Substrat Stärke und Ca^{2+} -Ionen extrinsisch stabilisiert wird. Eine genauere Analyse der Ergebnisse deutet darauf hin, dass die thermische Inaktivierung der CGTase auch ohne vorherige Denaturierung des Proteins erfolgen kann, weshalb als Ursache der Inaktivierung eine chemische Modifizierung des aktiven Zentrums plausibel erscheint.

Steady-state enzymkinetische Messungen der katalytischen Aktivität bei unterschiedlichen Enzym- und Substratkonzentrationen, Temperaturen und pH-Werten ergaben, dass bei allen untersuchten Reaktionsbedingungen zunächst hauptsächlich α -CD gebildet wird. Nach längeren Inkubationszeiten finden sich dagegen vergleichbare Mengen an α - und β -CD, jedoch stets deutlich weniger γ -CD.

Zur thermischen Stabilisierung der CGTase wurden durch *Error Prone* PCR zwei Genbanken erstellt, wobei jeweils eine mutagenisierte Hälfte des *cgtase* Gens mit einer unveränderten Hälfte fusioniert war. Die Genbanken wurden im Rahmen eines neu entwickelten Screeningverfahrens auf stabilisierte CGTasen durchsucht. Dabei wurden mehrere CGTase Varianten isoliert und

gereinigt. Ihre Charakterisierung zeigte jedoch, dass sie – aus bisher unverständlichen Gründen – weniger stabil als die wildtypische CGTase waren.

8 Abstract

Cyclodextrins (CD) are cyclic oligosaccharides consisting of 6-8 glucose units (α -, β - und γ -CD), which are synthesized by glycosyl transferases from starch and other polysaccharides. For the production of cyclodextrins, which can complex guest molecules in their interior, thermostable CGTases are required. Along these lines, the CGTase from the thermoalkaliphile bacterium *Anaerobranca gottschalkii* was produced and characterised. Moreover, it was attempted to increase its stability by directed evolution.

The *cgtase* gene was isolated from genomic DNA by PCR, and heterologously expressed in *Escherichia coli*. Using different chromatographic procedures, the CGTase was enriched from the soluble fraction of the cell extract to about 95 % purity. The characterisation by hydrodynamic and spectroscopic methods showed that the enzyme is a monomer with native secondary elements and a well defined tertiary structure. The stability of the CGTase was investigated by differential scanning calorimetry and irreversible thermal inactivation. It was shown that the enzyme is stabilized extrinsically by its substrate starch and Ca^{2+} -ions. A closer analysis of the results suggests that the inactivation of the CGTase does not require the previous denaturation of the protein and, as a consequence, might be due to the chemical modification of the active site. Steady-state enzyme kinetic measurements of the catalytic activity at various enzyme and substrate concentrations, temperatures and pH values showed that α -CD is the main initial reaction product, independent of the applied conditions. After prolonged incubation, however, comparable amounts of α - and β -CD are found, which are much larger than the produced amounts of γ -CD.

In order to thermally stabilise the CGTase, two gene banks were produced by error prone PCR. In each of the two banks, a mutagenised half of the *cgtase* gene was fused to a native half. The gene banks were searched for stabilised CGTases, using a newly established screening assay. Several CGTases were isolated and purified. Their characterisation showed, however, that all of them were less stable than wild type CGTase, for reasons unclear so far.

An dieser Stelle gilt mein Dank allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sterner herzlich für das in mich gesetzte Vertrauen bei der Bearbeitung des interessanten und exotischen Themas bedanken. Ich danke für die stete Bereitschaft zur Diskussion, die fachliche Unterstützung und die Möglichkeit der Teilnahme an interessanten Tagungen und Seminaren.

Herrn Prof. Dr. H. W. Klein danke ich für die Übernahme des Koreferats und das Interesse an meiner Arbeit, die mir in Form von vielen wissenschaftlichen Informationen zuteil wurde.

Ich möchte mich bei all meinen Kooperationspartnern des DBU-Verbundprojektes bedanken. Prof. Dr. G. Antranikian ermöglichte mir die Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe und die Teilnahme an vielen informativen Seminaren. In diesem Zusammenhang möchte ich mich besonders bei Volker Thiemann bedanken, mit seiner Hilfe habe ich einige Hürden überwunden. Prof. Dr. W. Liebl ermöglichte mir ebenfalls die Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe. Prof. Dr. R. Freudl und Angela Vollstedt möchte ich für den materiellen und wissenschaftlichen Informationsaustausch danken.

Dr. H. Leemhuis möchte ich für wertvolle Informationen zu den Aktivitätstests der CGTase danken.

Für die Benutzung der CD-, DSC- und DLS-Geräte und die Beantwortung von Fragen bezüglich der Nutzung danke ich Herrn Prof. Dr. D. Schomburg und seinen Mitarbeitern.

Der Arbeitsgruppe Klein und allen anderen Mitarbeitern der „Otto-Fischers“ danke ich für die herzliche Aufnahme unserer Arbeitsgruppe in Köln und ein angenehmes Arbeitsklima, das den gegenseitigen materiellen, technischen und wissenschaftlichen Austausch selbstverständlich machte.

Mein besonderer Dank geht an meine Kolleginnen und Kollegen der „AG Sterner“, Andreas Ivens (vielen Dank für die Einführung in das Thema und die vielen liebevollen Aufmunterungen), Stefan Hettwer (vielen Dank für die nachbarliche Unterstützung am Computer), Birte Höcker (vielen Dank für das gemeinsame Diplom- und Doktoranden-Dasein), Miriam Deuss, Sonja Leopoldseder und Simona Cerrone (Vielen Dank für das Interesse, die Aufmunterungen, das Korrekturlesen und die netten Kaffeepausen), Michaela Häger (Vielen Dank für interessante Diskussionen), Jörg Claren

(vielen Dank für die Herausforderung, das Korrekturlesen und das immerwährende Lächeln), Natalie Heuer und Manal Bosnali (vielen Dank für die gute Zusammenarbeit) sowie Silke Beismann-Driemeyer, Martina Henn-Sax, Vera Boege, Silke Allekotte, Nina Mohrlüder, den Gastforschern Gavin Murphy und Satoshi Akanuma für ein gutes Miteinander und das Gefühl wirklich zusammen zu arbeiten.

Meinen Eltern und meinen Freunden möchte ich mich für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihrer Unterstützung in allen Lebenslagen danken.

Meinem Verlobten Stephan Dönges danke ich für seine stets offenen Ohren, seine Geduld und seine liebevollen Aufmunterungen.

Ich danke Jesus Christus, meinem Herrn und Gott für seine Liebe zu mir, die vielen aufmunternden Zeichen und den vielen Menschen, die er mir gesandt hat, um mein Leben reicher werden zu lassen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Reinhard Sterner betreut worden.

9 Lebenslauf

Catharina Maria Dönges, geborene Jürgens, geboren am 24.02.1974 in Ludwigshafen am Rhein

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand verheiratet

Schulbildung

1980-1984 Grundschule Nord in Schifferstadt

1984-1993 Gymnasium im Paul von Denis Schulzentrum in Schifferstadt

Juni 1993 Abitur

Hochschulausbildung

1993-1996 Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken

September 1996 Vordiplom in Biologie

1996-2000 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen

Februar 1999 Diplomprüfungen in Genetik (Hauptfach), Immunologie, Organische Chemie

März 1999-März 2000 Diplomarbeit bei Priv.-Doz. Dr. R. Sterner am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie. Thema der Arbeit: Änderung des Substratspektrums der 5'-ProFAR-Isomerase aus *Thermotoga maritima* durch gerichtete Evolution

März 2000 Diplom in Biologie

Juli 2000-August 2003 Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation bei Prof. Dr. R. Sterner am Institut für Biochemie der Albertus-Magnus Universität zu Köln