

**Charakterisierung von PQQ-abhängigen  
Dehydrogenasen aus *Sphingomonas wittichii* RW1  
und Entwicklung eines enzymatischen Verfahrens  
für die Quantifizierung von PQQ**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt

von

**Jessica Zeiser**

aus Altötting

Bonn 2015



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

**Erstgutachter:** Prof. Dr. Uwe Deppenmeier

**Zweitgutachterin:** apl. Prof. Dr. Christiane Dahl

Tag der Promotion: 22. Oktober 2015

Erscheinungsjahr: 2015



Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Zeiser, J., Mühlenbeck, L. H., Schweiger, P., Deppenmeier, U.** (2014) Characterization of a periplasmic quinoprotein from *Sphingomonas wittichii* that functions as aldehyde dehydrogenase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (5), 2067-2079

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Familie der Sphingomonadaceae .....	1
1.2 Phylogenie und Eigenschaften des Bakteriums <i>S. wittichii</i> RW1 .....	2
1.3 Pyrrolochinolinchinon – der Cofaktor von Chinoproteinen .....	3
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	4
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>6</b>
2.1 Chemikalien, Enzyme, Kits und weitere Materialien.....	6
2.1.1 Chemikalien .....	6
2.1.2 Enzyme .....	6
2.1.3 Kits.....	6
2.1.4 Standards für die DNA- und Protein-Gelelektrophorese .....	6
2.2 Bioinformatische Tools, Datenbanken und Software.....	7
2.2.1 Bioinformatische Tools und Datenbanken.....	7
2.2.2 Softwareprogramme.....	8
2.3 Organismen, Plasmide, Primer und Vektoren .....	8
2.3.1 Organismen .....	8
2.3.2 Plasmide und Vektoren .....	9
2.3.3 Oligonukleotide.....	10
2.4 Molekularbiologische Methoden .....	11
2.4.1 Präparation von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA.....	11
2.4.2 Visualisierung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese.....	11
2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR - polymerase chain reaction) .....	11
2.4.4 Restriktionsverdau .....	13
2.4.5 Dephosphorylierung.....	13
2.4.6 Ligationen .....	13

2.4.7 Reinigung von Restriktionsansätzen und PCR-Produkten .....	13
2.4.8 Sequenzierung von DNA .....	13
2.5 Mikrobiologische Methoden.....	14
2.5.1 Kultivierung von Mikroorganismen .....	14
2.5.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ und <i>P. putida</i> KT2440 .....	14
2.5.1.2 Kultivierung von <i>S. wittichii</i> RW1 .....	14
2.5.1.3 Kultivierung von <i>G. oxydans</i> und <i>Ga. diazotrophicus</i> .....	15
2.5.1.4 Kultivierung von <i>H. denitrificans</i> X .....	16
2.5.2 Medienzusätze.....	17
2.5.3 Stammhaltung .....	17
2.5.4 Beobachtung des Wachstumsverlaufs einer Bakterienkultur und Erstellung von Wachstumskurven.....	17
2.5.5 Transformation von Bakterien .....	18
2.5.5.1 Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock.....	18
2.5.5.2 Transformation von <i>S. wittichii</i> RW1 durch Elektroporation .....	18
2.5.6 Heterologe Produktion von Proteinen in <i>E. coli</i> .....	19
2.5.7 Homologe Proteinproduktion in <i>S. wittichii</i> RW1 .....	19
2.5.8 Zellernte .....	20
2.5.9 Zellaufschluss mittels Ultraschall .....	20
2.5.10 Fraktionierung von Bakterienzellen in einzelne Kompartimente .....	20
2.5.10.1 Herstellung von Sphäroplasten – Periplasmapräparation.....	20
2.5.10.2 Trennung von Membran- und Cytoplasmafraktion – Membranpräparation .....	21
2.5.10.3 Überprüfung der Reinheit von Periplasma- und Cytoplasmafraktion.....	21
2.6 Proteinbiochemische Methoden .....	22
2.6.1 Strep-Tactin-Affinitätschromatographie.....	22
2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	22
2.6.3 Visualisierung von Proteinen .....	23

---

2.6.3.1	Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) .....	23
2.6.3.2	Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	24
2.6.3.3	Silberfärbung .....	25
2.6.3.4	Hämfärbung (Thomas <i>et al.</i> 1976) .....	26
2.6.3.5	Aktivitätsfärbung PQQ-abhängiger Proteine (Toyama <i>et al.</i> 1995) .....	26
2.6.3.6	Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen .....	27
2.7	Photometrische Enzymaktivitätstests .....	27
2.7.1	Bestimmung der Aktivität von Chinoproteinen mit DCPIP als artifiziellm Elektronenakzeptor .....	27
2.7.2	Messung der Aktivität von PQQ-abhängigen Enzymen mit Ferricyanid als Elektronenakzeptor .....	28
2.7.3	Messung der Aktivität von NAD(P)H-abhängigen Enzymen .....	29
2.7.4	Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen und kinetischen Parameter .....	29
2.7.5	<i>In-vitro</i> -Aktivierung von putativen PQQ-abhängigen Dehydrogenasen mit Ethylamin oder Ammonium-Ionen .....	30
2.7.6	Rekonstitution von Apoenzymen mit PQQ .....	30
2.7.7	Aufnahme von UV-VIS-Spektren und spektrophotometrische Analyse prosthetischer Gruppen .....	30
2.8	Entwicklung eines Verfahrens für die enzymatische Quantifizierung von PQQ .....	31
2.8.1	Enzymatische Bestimmung der PQQ-Konzentration .....	31
2.8.2	Vorbereitung von Probenmaterial für die Quantifizierung von PQQ .....	31
2.8.3	Enzymaktivitätstests im halbautomatischen Hochdurchsatzverfahren .....	31
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1	Identifizierung potentieller PQQ-abhängiger Dehydrogenasen von <i>S. wittichii</i> RW1 .....	34
3.2	Charakterisierung der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) Swit_4395 aus <i>S. wittichii</i> RW1 .....	37
3.2.1	Bioinformatische Analyse des Chinoproteins Swit_4395 .....	38



3.2.2 Klonierung des Gens <i>swit_4395</i> in den Überexpressionsvektor pBBR1p264_ <i>pelB</i> _Streplong .....	40
3.2.3 Heterologe und homologe Produktion des Proteins <i>Swit_4395</i> in <i>E. coli</i> und <i>S. wittichii</i> RW1 .....	41
3.2.4 Untersuchung des Substratspektrums des Enzyms <i>Swit_4395</i> .....	44
3.2.5 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen und der kinetischen Eigenschaften der ALDH <i>Swit_4395</i> .....	46
3.2.5.1 Bestimmung des Temperaturoptimums des Enzyms <i>Swit_4395</i> .....	47
3.2.5.2 Messung des pH-Optimums und der pH-Stabilität des Protein <i>Swit_4395</i> .....	48
3.2.5.3 Einfluss von Ionen und Inhibitoren auf die Aktivität des Enzyms <i>Swit_4395</i> .....	48
3.2.5.4 Kinetische Parameter des Enzyms <i>Swit_4395</i> für die Substrate Butanal und Glyoxal .....	50
3.2.6 Analyse der prosthetischen Gruppe PQQ des Proteins <i>Swit_4395</i> .....	50
3.2.7 Rekonstitution des Enzyms <i>Swit_4395</i> mit unterschiedlichen Kationen und seltenen Erden .....	53
3.2.8 Lokalisierung des Proteins <i>Swit_4395</i> .....	54
3.2.9 Native Konformation des Enzyms <i>Swit_4395</i> .....	55
3.2.10 Auswirkungen der homologen Produktion des Enzyms <i>Swit_4395</i> auf die Butanaltoleranz von <i>S. wittichii</i> RW1 .....	56
3.3 Quantitative Bestimmung von PQQ mittels des Enzyms <i>Swit_4395</i> .....	58
3.3.1 Entwicklung eines Standardverfahrens zur enzymatischen Quantifizierung von PQQ .....	58
3.3.2 Korrelation zwischen dem PQQ-Gehalt und der Enzymaktivität von <i>Swit_4395</i> .....	60
3.3.3 Quantitative Bestimmung von PQQ in biologischem Probenmaterial .....	62
3.3.3.1 Der Gehalt von PQQ in Obst, Gemüse und Getränken .....	62
3.3.3.2 Produktion von PQQ durch Gram-negative Bakterien .....	64
3.3.4 Lagerung und Stabilität des Enzyms <i>Swit_4395</i> .....	64

---

3.3.5 Entwicklung eines halbautomatischen Hochdurchsatzverfahrens zur quantitativen Bestimmung von PQQ in biologischem Probenmaterial .....	66
3.3.6 Produktionsmaßstab und Ergiebigkeit des Enzyms Swit_4395.....	67
3.4 Charakterisierung periplasmatischer ADHs aus <i>S. wittichii</i> .....	68
3.4.1 Bioinformatische Analyse der putativen Chinohämoproteine Swit_2227 und Swit_4160 .....	68
3.4.2 Homologe Produktion der Proteine Swit_2227 und Swit_4160 in <i>S. wittichii</i> RW1 und Aufreinigung mittels Affinitätstag .....	72
3.4.3 Nachweis der prosthetischen Gruppen in Swit_2227 und Swit_4160.....	74
3.4.4 Analyse des Substratspektrums und der optimalen Reaktionsbedingungen der Proteine Swit_2227 und Swit_4160.....	76
3.4.5 Aktivierung der Enzyme Swit_2227 und Swit_4160 durch Ethylamin und Ammonium-Ionen.....	78
3.5 Vergleich des katalytischen Potentials der Plasmamembranen von <i>G. oxydans</i> und <i>S. wittichii</i> und Analyse der membran-gebundenen Chinoproteine aus <i>S. wittichii</i> RW1.....	78
3.5.1 Oxidatives Potential membrangebundener Dehydrogenasen von <i>G. oxydans</i> 621H und <i>S. wittichii</i> RW1 .....	79
3.5.2 Bioinformatische Analyse der membrangebundenen Dehydrogenasen aus <i>S. wittichii</i> RW1 .....	83
3.5.2.1 Bioinformatische Untersuchungen der putativen membrangebundenen Sorbitol-Dehydrogenase Swit_1961 .....	83
3.5.2.2 Bioinformatische Analyse der potentiellen mGDH Swit_2024.....	85
3.5.2.3 Klonierung der beiden Gene <i>swit_1961</i> und <i>swit_2024</i> in Überexpressionsvektoren für <i>E. coli</i> und <i>S. wittichii</i> RW1 und Versuch der heterologen Überproduktion .....	85
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>87</b>
4.1 PQQ-abhängige Dehydrogenasen.....	87
4.1.1 Klassifizierung und Struktur von Chinoproteinen .....	87
4.1.2 Bedeutung von Chinoproteinen für die Biotechnologie .....	88

4.1.3 PQQ-Dehydrogenasen von <i>S. wittichii</i> RW1 .....	89
4.2 Charakterisierung der PQQ-abhängigen ALDH Swit_4395 .....	90
4.2.1 Bioinformatische Analyse des Proteins Swit_4395 .....	90
4.2.2 Heterologe und homologe Produktion des Proteins Swit_4395 .....	91
4.2.3 Eigenschaften des Enzyms Swit_4395 .....	93
4.2.4 Identifizierung von PQQ als prosthetischer Gruppe des Enzyms Swit_4395 .....	94
4.2.5 Rekonstitution von Chinoproteinen mit PQQ.....	95
4.2.5.1 Vorkommen von zweiwertigen Kationen in PQQ-abhängigen Dehydrogenasen .....	95
4.2.5.2 Rekonstitution der ALDH Swit_4395 mit Kationen und seltenen Erden .....	96
4.2.6 Periplasmatische Lokalisierung des Proteins Swit_4395 .....	97
4.2.7 Sequenz des Proteins Swit_4395 im Vergleich mit anderen Chinoproteinen .....	99
4.2.8 Effekte der homologen Produktion und physiologische Bedeutung des Enzyms Swit_4395 .....	101
4.2.9 Biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten des Enzyms Swit_4395 .....	102
4.2.10 Klassifizierung des Enzyms Swit_4395 innerhalb der Chinoproteine .....	103
4.3 PQQ .....	105
4.3.1 Physiologische und klinische Relevanz des Cofaktors PQQ.....	105
4.3.2 Qualitative und quantitative Nachweismethoden für PQQ.....	106
4.3.2.1 Enzymatische Nachweismethoden für PQQ .....	106
4.3.2.2 Nicht-enzymatische Bestimmungsmethoden für PQQ .....	107
4.3.2.3 Vorteile der Quantifizierung von PQQ mittels des Enzyms Swit_4395.....	108
4.3.3 Nachweis von PQQ in physiologischen Probenmaterial .....	108
4.3.3.1 Vorkommen von PQQ in Lebensmitteln.....	108
4.3.3.2 Produktion von PQQ durch Gram-negative Bakterien .....	110
4.4 Bakterielle Alkoholdehydrogenasen.....	111
4.4.1 PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenasen.....	111
4.4.2 Die putativen ADHs Swit_2227 und Swit_4160 aus <i>S. wittichii</i> RW1 .....	112

---

4.4.2.1 Bioinformatische Analyse und Struktur der Proteine Swit_2227 und Swit_4160.....	112
4.4.2.2 Homologe Expression der Gene <i>swit_2227</i> und <i>swit_4160</i> mittels eines induzierbaren Expressionssystems .....	114
4.4.2.3 Analyse der prosthetischen Gruppen in den Proteinen Swit_2227 und Swit_4160.....	115
4.4.2.4 Substratspektrum und Aktivierung der Enzyme Swit_2227 und Swit_4160.....	116
4.5 Katalytisches Potential membrangebundener Chinoproteine.....	118
4.5.1 Membrangebundene Chino(hämo)proteine – physiologische und biotechnologische Bedeutung .....	118
4.5.2 Vergleich der PQQ-abhängigen Membranaktivitäten von <i>S. wittichii</i> und <i>G. oxydans</i> .....	119
4.5.3 Rolle der Membranproteine Swit_1961 und Swit_2024 in <i>S. wittichii</i> .....	121
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>122</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>124</b>
<b>7. Danksagung .....</b>	<b>152</b>
<b>8. Publikationsliste .....</b>	<b>153</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Ccm	Cytochrom <i>c</i> maturation
CDD	Conserved Domain Databank
Cef	Cefoxitin
Cm	Chloramphenicol
COG	Cluster of orthologous groups of protein
CV	Colume Volume
Cyt	Cytochrom
Da	Dalton
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
DD	Dibenzo- <i>p</i> -dioxin
DHA	Dihydroxyaceton
dH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DSMO	Dimethylsulfoxid
E	Extinktion
EC	Enzyme Commission
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	Et alii / et aliae (und andere)
EtOH	Ethanol
EtOH-DH	Ethanol-Dehydrogenase

---

FAD	Flavinadenindinukleotid
GC	Gaschromatographie
GDH	Glukose-Dehydrogenase
GSDH	Glukose/Sorboson-Dehydrogenase
GSL	Glykosphingolipid
G6P	Glukose-6-phosphat
G6PDH	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kb	Kilobasenpaare
$K_{cat}/K_M$	Katalytische Effizienz
$K_D$	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo-Dalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
$K_M$	Michaelis-Konstante
Km	Kanamycin
KP-Puffer	Kalium-Phosphat-Puffer
LB	Luria Bertani
LC	Flüssigchromatographie
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (Mol/L)
mADH	Membrangebundene Alkohol-Dehydrogenase
mALDH	Membrangebundene Aldehyd-Dehydrogenase
MDH	Methanol-Dehydrogenase
mGDH	Membrangebundene Glukose-Dehydrogenase
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
mSLDH	Membrangebundene Sorbitol-Dehydrogenase
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid

## X Abkürzungsverzeichnis

---

NCBI	National Center of Biotechnology Information
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD <sub>600nm</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
6PG	6-Phosphoglukonat
6PGDH	6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase
PVA	Polyvinylalkohol
PVADH	Polyvinylalkohol-Dehydrogenase
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMS	Phenazinmethosulfat
PQQ	Pyrrlochinolinchinon
Q-10	Ubichinon 10
Rf	Retentionsfaktor
rH <sub>2</sub> O	Reinstwasser
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGDH	lösliche Glukose-Dehydrogenase
SLDH	Sorbitol-Dehydrogenase
SNDH	Sorboson-Dehydrogenase
Sm	Streptomycin
sp	Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBDR	TonB-abhängige Rezeptoren
T <sub>d</sub>	Verdopplungszeit
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THFA	Tetrahydrofurfurylalkohol
THFA-DH	Tetrahydrofurfurylalkohol-Dehydrogenase
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
TMBZ	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMH	Transmembranhelix

---

Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Trp	Tryptophan
U	Unit
UV	Ultraviolett
$V_{\max}$	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
YM	Hefe-Mannitol

## Aminosäuren

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





# 1. Einleitung

## 1.1 Die Familie der Sphingomonadaceae

*Sphingomonas (S.) wittichii* RW1 ist ein Proteobakterium aus der  $\alpha$ 4-Untergruppe (Yabuuchi *et al.* 1990), das in die Familie der Sphingomonadaceae einzuordnen ist, zu der mittlerweile 13 Gattungen zählen. Ursprünglich umfassten die Sphingomonadaceae nur die Gattungen *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* (Takeuchi *et al.* 2001) und *Sphingosinicella* (Maruyama *et al.* 2006). 16S rRNA Analysen zeigten jedoch, dass die Sphingomonadaceae aus deutlich mehr Gattungen bestehen.

Die Eigenschaften der Familie der Sphingomonadaceae wurden ausführlich von Yabuuchi und Kollegen (1990), sowie Kosako *et al.* (2000) beschrieben. Demnach nutzen alle Vertreter der Sphingomonadaceae Ubichinon 10 (Q-10) als Hauptchinon in der Atmungskette. In der äußeren Membran weisen sie anstatt Lipopolysacchariden (LPS) Glykosphingolipide (GSL) auf, wobei 2'-Hydroxymyristol Dihydrosphingosin 1-Glukuronsäure am prominentesten ist. Des Weiteren sind Sphingomonadaceae dafür bekannt, dass sie viele verschiedene Kohlenstoffquellen nutzen können und an dem Abbau von teilweise toxischen Substanzen beteiligt sind.

Aufgrund dessen, dass GSL kürzere Kohlenhydrate-Reste als LPS besitzen (Kaneko *et al.* 2000), ist die Zelloberfläche der Sphingomonadaceae hydrophober als bei anderen Gram-negativen Bakterien, was dazu führt, dass diese Organismen sensitiv gegenüber hydrophoben Antibiotika sind (Shakirova *et al.* 2008) und zum Abbau von stark hydrophoben polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen beitragen (Johnsen & Karlson 2005, 2007). In der Biotechnologie werden Sphingomonadaceae in der Bioremediation von Umweltschadstoffen und Xenobiotika (Basta *et al.* 2005), sowie bei der Produktion von extrazellulären Polymeren, wie Sphinganen (Gellan, Welan, Rhamsan) eingesetzt (Huang *et al.* 2009). Zudem synthetisieren Sphingomonadaceae verschiedene Exopolysaccharide, die als Geliermittel in der pharmazeutischen und der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt werden (Kosako *et al.* 2000).

Mit Ausnahme des humanpathogenen Organismus *Sphingomonas paucimobilis* (Baddour *et al.* 1985; Swann *et al.* 1985; Glupczynski *et al.* 1984), der nosokomiale Infektionen, wie die Peritonitis (Entzündung des Bauchfells) auslöst und dem pflanzenpathogenen

*Sphingobium suberifaciens*, der die Korkwurzelkrankheit verursacht (Bull *et al.* 2014) sind bisher keine pathogenen Organismen in der Gruppe der Sphingomonadaceae bekannt.

### 1.2 Phylogenie und Eigenschaften des Bakteriums *S. wittichii* RW1

*S. wittichii* RW1 wurde im Jahr 1992 von Wittich *et al.* aus Elbwasser stromabwärts von Hamburg (Deutschland), aufgrund seiner herausragenden Eigenschaft mit Dioxin-Verbindungen als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen, isoliert. Dieser Organismus ist strikt aerob, unbeweglich, hat eine Gram-negative Zellwand und kommt als Stäbchenbakterien mit einer Größe von einem bis drei Mikrometern vor. Natürlicherweise findet sich *S. wittichii* RW1 sowohl in aquatischen (Meere, Seen) als auch in terrestrischen Habitaten (Sedimente, Böden).

Seit dem Jahr 2010 ist die vollständige Genomsequenz von *S. wittichii* RW1 bekannt (Miller *et al.* 2010). Bei der Sequenzierung zeigte sich, dass *S. wittichii* RW1 über eine Genomgröße von 5.915.246 bp, unterteilt in ein zirkuläres Genom von 5.382.261 bp und zusätzlich zwei Megaplasmide (pSWIT01 und pSWIT02), verfügt. Hervorzuheben ist zudem, dass das Genom dieses  $\alpha$ -Proteobakteriums einen hohen GC-Gehalt von etwa 67 % aufweist. Auf dem Plasmid pSWIT01 (310.228 bp), das Ähnlichkeiten zu dem Plasmid pNL1 von *Novosphingobium aromaticivorans* (Romine *et al.* 1999) aufweist, befinden sich Gene, die für eine reverse Transkriptase und einen Typ VI Pilus kodieren. Demgegenüber sind auf dem Plasmid pSWIT02 (222.757 bp) alle Gene vorhanden, die für Enzyme des Dioxin-Metabolismus mit Ausnahme des Reduktase Proteins RedA2 und der 2,2',3-Trihydroxybiphenyl-Dioxygenase DbfD kodieren.

Zu den besonderen Eigenschaften von *S. wittichii* RW1 zählt seine Fähigkeit Dioxin-Verbindungen abzubauen, wobei das organische Rückgrat des Dibenzo-*p*-dioxins (DD) vollständig mineralisiert wird (Wilkes *et al.* 1996; Wittich *et al.* 1992). Dieser Umstand ist von besonderem Interesse, da polychlorierte DDs und Dibenzofurane starke Umweltschadstoffe sind, die als Abfallprodukte bei der Herstellung von Pestiziden, der Verbrennung von Halogen-haltigen Chemikalien und der Bleiche von Papier anfallen (Buser 1986; Czuczwa & Hites 1984; Owens *et al.* 1994). *S. wittichii* RW1 ist das erste bekannte Bakterium, das eine vollständige Biodegradation von DDs bewerkstelligt. Weiterhin ist *S. wittichii* RW1 in der Lage eine große Vielfalt an chlorierten Diarylethern zu transformieren, als alle anderen bisher bekannten Bakterienarten (Halden *et al.* 2005; Hong *et*

al. 2004; Wilkes *et al.* 1996). Außerdem konsumiert *S. wittichii* RW1 viele verschiedene schwer-wasserlösliche aromatische Kohlenwasserstoff-Verbindungen (Halden *et al.* 1999).

Die drei wichtigsten „Clusters of orthologous groups of proteins“ (COGs) von *S. wittichii* RW1 umfassen Dehydrogenasen mit unterschiedlichen Spezifitäten (COG1028), Phenylpropionat Dioxygenasen sowie verschiedene Ring-hydroxylierende Dioxygenasen (COG4638) und TonB-abhängige Rezeptoren (TBDRs; COG1629). TBDRs binden Zucker (Blanvillain *et al.* 2007), Alginate (Halden *et al.* 1999) sowie Eisen-haltige Siderophore und sind mit großer Wahrscheinlichkeit für deren Transport in das Periplasma zuständig.

### 1.3 Pyrrolochinolinchinon – der Cofaktor von Chinoproteinen

Das *ortho*-Chinon Pyrrolochinolinchinon (PQQ) ist eine nicht kovalent gebundene prosthetische Gruppe von Chinoproteinen in vielen Gram-negativen Bakterien, dessen Struktur in Abbildung 1.1 dargestellt ist.

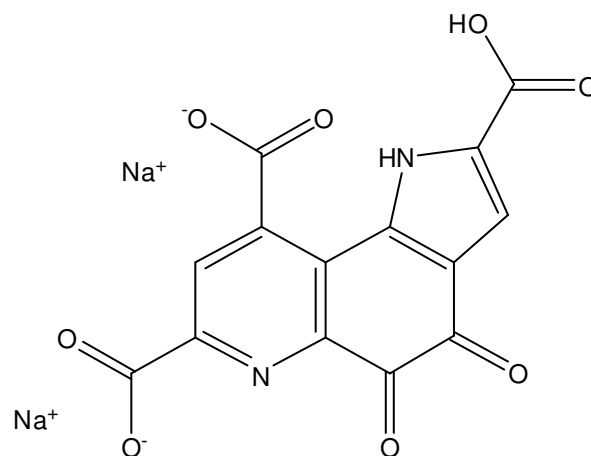


Abbildung 1.1: Struktur des Dinatriumsalzes von PQQ. Die Abbildung wurde mit dem Programm ChemDrawUltra11.0 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) erstellt.

PQQ wurde von Hauge (1964) in der Glukose-Dehydrogenase (GDH) des Mikroorganismus *Bacterium anitratum* entdeckt. Drei Jahre später wurde PQQ zum ersten Mal aus der Alkohol-Dehydrogenase (ADH) von *Pseudomonas* sp. M27 isoliert und zunächst Methoxatin genannt (Anthony & Zatman 1967). Als Cofaktor kommt PQQ ausschließlich in Chinoproteinen Gram-negativer Bakterien vor, die entweder membrangebunden oder periplasmatisch lokalisiert sind. Dabei stellt PQQ einen Redoxcarrier dar, der zwei Elektronen und zwei Protonen überträgt (Duine *et al.* 1980). Natürlicherweise kommt PQQ in geringen Konzentrationen in vielen Lebensmitteln vor, zudem sind etwa 130 Bakterienarten bekannt, die PQQ selbst synthetisieren können (Shen *et al.* 2012). Dazu gehören beispielsweise

*Gluconobacter (G.) oxydans* oder *Pseudomonas (P.) putida* KT2440. Zumeist besitzen diese Arten die Biosynthesegene *pqqA-E(F)*, die in einem Operon organisiert sind (Meulenbergh *et al.* 1992). Es kommt aber auch vor, dass *pqqF* vollständig fehlt (Goosen *et al.* 1989) oder von dem restlichen Operon separiert ist (Gliese *et al.* 2004; Shen *et al.* 2012). Bakterienarten, die nicht in der Lage sind PQQ zu synthetisieren, können ebenfalls PQQ-abhängige Chinoproteine in ihrem Genom kodiert haben und exprimieren diese auch. Beispiele dafür sind *Escherichia (E.) coli* (Southall *et al.* 2006) und *Sphingomonas* sp 113P3 (Hirota-Mamoto *et al.* 2006). Demnach nehmen diese Arten PQQ aus der Umgebung auf und bilden funktionale Holoproteine aus.

Neben seiner Funktion als prosthetische Gruppe von Chinoproteinen mehren sich die Anzeichen, dass PQQ eine Rolle in der Humanmedizin spielen könnte. Kasahara und Kato (2003) haben postuliert, dass es sich bei PQQ um ein neues Vitamin handelt. Diese These wurde jedoch zwei Jahre später widerlegt (Felton & Anthony 2005). Nichtsdestotrotz wird PQQ, auch in der Medizin, intensiv erforscht. In den letzten Jahren wurde PQQ unter anderem als wachstumsfördernder Faktor für Pflanzen (Choi *et al.* 2008), Neuroprotektor bei Ratten (Zhang *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2013), Tyrosin-Phosphatase 1B Inhibitor (Takada *et al.* 2012) und Stimulanzmittel der Epithelzellproliferation (Kimura *et al.* 2012) beschrieben.

Zudem zeigt PQQ eine antioxidantische Wirkung, fungiert aber unter bestimmten Umständen auch als Oxidant, was im Allgemeinen von der Konzentration abhängig ist (He *et al.* 2003).

### **1.4 Zielsetzung dieser Arbeit**

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue PQQ-abhängige Dehydrogenasen aus Gram-negativen Bakterien isoliert und charakterisiert werden. Dabei wurde im Speziellen auf das  $\alpha$ -Proteobakterium *S. wittichii* RW1 zurückgegriffen, da mit der Polyvinylalkohol-Dehydrogenase (PVADH) (Hirota-Mamoto *et al.* 2006) bisher erst ein Chinoproteine von Bakterien aus der Gattung *Sphingomonas* charakterisiert werden konnte. Chinoproteine können und werden bereits vielfältig in der Biotechnologie eingesetzt. Zu diesen Anwendungsmöglichkeiten gehören Biosensoren (D'Costa *et al.* 1986) und die Produktion von Essig (Matsushita *et al.* 1994) oder Pharmazeutika (Geerlof *et al.* 1994). Zudem bietet der Einsatz bakterieller Enzyme für die Synthese chemischer Komponenten erhebliche Vorteile. Die Nutzung bakterieller Enzyme stellt ein umweltfreundliches und erneuerbares System dar (Drauz & Waldmann 2002), bei dem die Aufreinigung der Produkte direkt aus dem Medium möglich ist, soweit periplasmatische oder membrangebundene Proteine eingesetzt werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurde das Genom von *S. wittichii* RW1 auf putative PQQ-abhängige Enzyme untersucht, von denen einige das Potential aufwiesen Vertreter neuer Enzymklassen darzustellen. Im Anschluss daran wurden einige der Gene, die für diese putativen Proteine kodieren, amplifiziert, in geeignete Überexpressionsvektoren kloniert, heterolog in *E. coli* oder homolog in *S. wittichii* exprimiert, sowie die korrespondierenden Proteine gereinigt und charakterisiert. Dabei handelte es sich um eine putative Glukose/Sorboson-Dehydrogenase (GSDH) (Swit\_4395), zwei potentielle ADH vom Typ II (Swit\_2227, Swit\_4160), sowie die vermuteten Membranproteine Swit\_1961 und Swit\_2024. Im Falle des Enzyms Swit\_4395 wurde anschließend eine biotechnologische Anwendungsmöglichkeit untersucht und eine Methode zur Quantifizierung von PQQ entwickelt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme, Kits und weitere Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anders angegeben von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und entsprachen einem Reinheitsgrad von pro analysis.

#### 2.1.2 Enzyme

Für Klonierungen wurden folgende Enzyme verwendet:

DreamTaq™ DNA Polymerase	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
FastAP Alkalische Phosphatase	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Phusion™ DNA Polymerase	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Restriktionsenzyme	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
T4 DNA-Ligase	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)

#### 2.1.3 Kits

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Kits für die molekulargenetischen Arbeiten genutzt.

GeneJet™ Gel Extraction Kit	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
GeneJet™ Genomic DNA Purification Kit	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
GeneJet™ PCR Purification Kit	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)

#### 2.1.4 Standards für die DNA- und Protein-Gelelektrophorese

Für die DNA- und Protein-Gelelektrophorese wurden folgende DNA- und Proteinleitern verwendet:

Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis	GE Healthcare (Solingen, Deutschland)
GeneRuler™ 1 kb DNA ladder	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
PageRuler™ Prestained Protein ladder	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
PageRuler™ Unstained Protein ladder	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)

## 2.2 Bioinformatische Tools, Datenbanken und Software

### 2.2.1 Bioinformatische Tools und Datenbanken

Gensequenzen und Primärstrukturen von Proteinen wurden den Datenbanken von KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>) und NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen. Der Vergleich von Proteinsequenzen mit bekannten Strukturen erfolgte mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), wofür das Programm BLASTP2.2.31+ von NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.* 1997) verwendet wurde. Mit Clustal Omega 2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) von EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute) wurden Sequenzalignments erstellt (Goujon *et al.* 2010; Sievers *et al.* 2011; McWilliam *et al.* 2013). Für die theoretische Berechnung des Molekulargewichts und der Stabilität eines Proteins wurden zwei ExPASy Internettools ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/); <http://web.expasy.org/protparam/>) verwendet. Die Vorhersage von Sekundärstrukturen erfolgte mittels der Psipred Protein Sequence Analysis Workbench (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Jones 1999; Buchan *et al.* 2013). Die Darstellung von Tertiärstrukturen und dreidimensionale Modellierung von Proteinen wurde mittels des Programms Cn3D-4.3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>) (Wang *et al.* 2000) bewerkstelligt. Die Analyse von konservierten Domänen in Proteinen erfolgte mittels der CDD-Suche (Conserved Domains Databank) von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (Marchler-Bauer & Bryant 2004; Marchler-Bauer *et al.* 2009; Marchler-Bauer *et al.* 2011; Marchler-Bauer *et al.* 2015). Für die Voraussage der Lokalisierung eines Proteins und potentieller Signalpeptide wurden der Webserver Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) (Käll *et al.* 2007, 2004), der TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) (Sonnhammer *et al.* 1998; Krogh *et al.* 2001), sowie der SignalP4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.* 2011) verwendet.



## 2.2.2 Softwareprogramme

Für die Analyse von Sequenzierungen wurde das Programm Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australien) verwendet. Die theoretische Planung von Klonierungen und Erstellung von Vektorkarten wurde mit der Software Clone Manager 9 (Scientific & Educational Software, Cary, North Carolina, USA) durchgeführt. Reaktionsgleichungen und chemische Strukturen wurden mittels des Programms ChemDraw Ultra 11.0 (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) dargestellt. Die Auswertung und Extrahierung von Daten, die mit einem Plattenlesegerät gewonnen wurden, erfolgte mit der Magellan<sup>TM</sup> Data Analysis Software (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz). Photometrische Daten eines Jasco V-600 Spektrophotometers wurden mit der Spectra Manager<sup>TM</sup> III Software (Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) ausgewertet.

## 2.3 Organismen, Plasmide, Primer und Vektoren

### 2.3.1 Organismen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind mit den Angaben zu ihrem Genotyp und den entsprechenden Referenzen in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Verwendete Organismen mit Genotyp und Referenz

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> NEB5 $\alpha$	Derivat von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ <i>fhuA2 D(argF-lacZ)U169 phoA</i> <i>glnV44 f80D(lacZ)M15 gyrA96</i> <i>recA1 relA1 endA1 thi-1</i> <i>hsdR17</i>	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>E. coli</i> K12	Wildtyp	DSM 498
<i>Gluconacetobacter (Ga.)</i> <i>diazotrophicus</i>	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	(Gillis <i>et al.</i> 1989) DSM 5601
<i>G. oxydans</i> $\Delta$ <i>hsdR</i>	Derivat von <i>G. oxydans</i> 621H (Deletion des Gens <i>gox2567</i> )	Bringer-Meyer, (Forschungszentrum Jülich GmbH, Deutschland)
<i>Hyphomicrobium (H.)</i> <i>denitrificans</i> X	Wildtyp, Cm <sup>R</sup>	DSM 1869
<i>P. putida</i> KT2440	Wildtyp, Cm <sup>R</sup>	DSM 6125
<i>S. wittichii</i> RW1	DSM 6014 Wildtyp, Sm <sup>R</sup>	(Wittich <i>et al.</i> 1992)

### 2.3.2 Plasmide und Vektoren

In Tabelle 2.2 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Vektoren aufgeführt.

Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide und Überexpressionsvektoren

Plasmid/Vektor	Beschreibung	Referenz
pAKS-IBA3	C-terminaler Strep-Tag II	IBA GmbH (Göttingen, Deutschland)
pBBR1-MCS-2	mob, rep, Km <sup>R</sup> , lacZ	(Kovach <i>et al.</i> 1995)
pBBR1_lacall_SL	Derivat von pBBR1-MCS-2 mit dem <i>lacI/lacP</i> Fragment aus <i>E. coli</i> BL21 und einer modifizierten Strep-Tag-Sequenz	(Brunke 2012)
pBBR1_lacall_swit_2227_SL	Derivat von pBBR1_lacall-SL mit dem Gen <i>swit_2227</i>	(Brunke 2013)
pBBR1_lacall_swit_4160_SL	Derivat von pBBR1_lacall-SL mit dem Gen <i>swit_4160</i>	(Brunke 2013)
pBBR1p264	Derivat von pBBR1-MCS-2 mit dem 5'UTR des Gens <i>gox0264</i>	(Kallnik <i>et al.</i> 2010)
pBBR1p264_SL	Derivat von pBBR1p264 mit einem modifizierten Strep-Tag (verlängerte Linkersequenz)	(Zeiser <i>et al.</i> 2014)
pBBR1p264_peIB_SL	Derivat von pBBR1p264_SL mit dem Signalpeptid <i>peIB</i> aus pET22(+)	(Zeiser <i>et al.</i> 2014)
pET22(+)		Novagen (Darmstadt, Deutschland)
pJZ1	pBBR1p264_peIB_swit_4395_Streplong	(Zeiser <i>et al.</i> 2014)
pBBR1p264_swit_1961_SL	Derivat von pBBR1p264_SL mit dem Gen <i>swit_1961</i>	diese Arbeit
pBBR1p264_swit_2024_SL	Derivat von pBBR1p264_SL mit dem Gen <i>swit_2024</i>	diese Arbeit

### 2.3.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen und sind in Tabelle 2.3 inklusive ihrer Sequenz und Restriktionsschnittstellen aufgelistet. Alle Oligonukleotide wurden in Reinstwasser (rH<sub>2</sub>O) gelöst, so dass sie in einer Konzentration von 100 pmol/μL vorlagen und bei - 20 °C gelagert.

Tabelle 2.3: Oligonukleotide mit Sequenz und Restriktionsschnittstellen (unterstrichen)

Bezeichnung	Sequenz 5' -> 3' Richtung	Restriktionsschnittstelle
dostrep2f	<u>TACGTAGGCGCGCCCGGTGGAGGTT</u> CAGCTTG GAGCCACCCGCAGT	<i>Sna</i> BI
dostrep2r	ACT <u>ATTAATCCGATTTAGAGCTT</u> GACGG	<i>Ase</i> I
pASK_rev	CGCAGTAGCGGTAAACG	---
pBBR1_f	ACTCACTATAGGGCGAATTG	---
pBBR1_r	CCCAGGCTTTACACTTTATG	---
pelB_for	ATCG <u>CTCGAGGTTTAACTTTAAGAAGGAG</u>	<i>Xho</i> I
pelB_rev	ATCGT <u>ACGTAGTTTAACTTTAAGAAGGAG</u>	<i>Sna</i> BI
Sw1961EcoRI-f	GATCGA <u>ATTCCATTCGAGGAGGGGCATGGT</u>	<i>Eco</i> RI
Sw1961SnaBI-r	CGTATACGT <u>ATTCGGGCAGGGCGTAGGCGA</u>	<i>Sna</i> BI
Sw2024f	CCAGA <u>ATTCAGAGGGAGCGGGCAAGATG</u>	<i>Eco</i> RI
Sw2024r	CGCT <u>ACGTAGGGGAGCGCATAGGCGACCA</u>	<i>Sna</i> BI
upstrepf	TAAC <u>GATCGGTGCGGGCCTCTTC</u>	<i>Pvu</i> I
upstrep2r	AGCTGAACCTCCACCGGGCGCGCCTACGTACA AGCGCGCAATTAACCCTC	---
4395_for	ATATACGT <u>AGCGCAGGCGCCGATCACG</u>	<i>Sna</i> BI
4395_rev	AT <u>GCGCGGCCCGCCCGGCATCAGCCG</u>	<i>Asc</i> I

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Präparation von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *S. wittichii* RW1 wurde mit Hilfe des GeneJet™ Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mittels des GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) ebenfalls nach Angaben des Herstellers.

### 2.4.2 Visualisierung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der elektrophoretischen Auftrennung geladener Moleküle, wie beispielsweise Nukleinsäuren, nach ihrer Größe. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandern DNA-Moleküle in einer Agarosematrix von der Kathode zu der Anode.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einprozentige Agarosegele, ein TAE-Puffersystem (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)) und 6 x Gelladepuffer (ROTI®-Load DNASTAIN1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Der Elektrophoreselauf wurde bei einer Spannung von 80 Volt für ungefähr eine Stunde durchgeführt.

Die Visualisierung der DNA in den Agarosegelen erfolgte anschließend durch Inkubation in einer dreifach konzentrierten GelRed-Lösung (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 3 x in Wasser, Biotium, Hayward, Kalifornien, USA). GelRed interkaliert in die DNA und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm. Die Stärke des Fluoreszenzsignals ist proportional zu der Menge an DNA in den Agarosegelen. Die Dokumentation der Gele erfolgte nach Sichtbarmachung der DNA in einem Transilluminator (Intas, Göttingen, Deutschland).

### 2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR - polymerase chain reaction)

Die PCR ist eine Methode um DNA *in vitro* zu amplifizieren (Mullis *et al.* 1986). Dabei werden kurze Oligonukleotide (20 bis 30 Nukleotide) als Startpunkte eingesetzt, um davon ausgehend die DNA mittels einer DNA-Polymerase zu vervielfältigen.

Eine PCR setzt sich aus mehreren Schritten (Denaturierung, Annealing, Elongation) zusammen, die bei unterschiedlichen Temperaturen zyklisch durchgeführt werden. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten, die bei Klonierungen eingesetzt werden sollten, wurden mittels der Phusion™ DNA-Polymerase durchgeführt. Diese besitzt eine 5'-3'-Korrekturlesefunktion und ist aufgrund ihrer geringen Fehlerrate dafür gut geeignet. Die PCR-Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, in einem Endvolumen von 20 µL in einem Thermocycler (MyCycler, Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Reaktionsansatz für eine PCR mit der Phusion™ DNA-Polymerase

Komponente	c(Stammlösung)	Endkonzentration	Volumen [µL]
DNA-Matrize			0,5
DMSO	100 %	3 %	0,6
Vorwärtsprimer	10 µM	0,5 µM	1
Rückwärtsprimer	10 µM	0,5 µM	1
dNTPs	25 mM	250 µM	0,2
Phusion™ HF Puffer	5 x	1 x	4
Phusion™ DNA-Polymerase	2 U/µL	0,5 U	0,25
rH <sub>2</sub> O			ad 20

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit hohen GC-Anteilen (~ 70 %) wurde ein modifizierter Reaktionsansatz verwendet (Spiess *et al.* 2004). Dieser enthielt 4 % DMSO sowie zusätzlich 6 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,1 M Trehalose. Die Dauer und die Temperaturen bei denen die einzelnen Schritte der PCR vorgenommen wurden, sind in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.5: Cycler-Programm einer PCR

PCR-Schritt	Zyklen [Anzahl]	Zeit [s]	Temperatur [°C]
Initiale Denaturierung	1	30	98
Denaturierung	28	10	98
Annealing		30	T <sub>M</sub> + 5
Elongation		15 – 30 s/kb	72
Finale Elongation	1	300	72

T<sub>M</sub>: Schmelzpunkt der Oligonukleotide

#### **2.4.4 Restriktionsverdau**

Ein Restriktionsverdau wird mit sogenannten Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Dabei handelt es sich um Enzyme, die in der Lage sind doppelsträngige DNA an definierten Erkennungssequenzen, den Restriktionsschnittstellen, zu schneiden und entweder glatte oder kohäsive Enden zu generieren.

Soweit nicht anders angegeben erfolgten die Restriktionsverdaue mit Restriktionsenzymen der Firma Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) in einem Endvolumen von 50  $\mu\text{L}$  bei 37 °C.

#### **2.4.5 Dephosphorylierung**

Die Dephosphorylierung dient der Vermeidung einer Religation von bereits geschnittenen DNA-Enden in Vektormolekülen. Dazu wurde eine FastAP Alkalische Phosphatase (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet, die den jeweiligen Restriktionsansätzen in etwa 30 Minuten vor dem Ende der vorgesehenen Inkubationszeit zugesetzt wurde.

#### **2.4.6 Ligationen**

Eine Ligation beschreibt die ATP-abhängige Verknüpfung des 3'-Hydroxyl-Endes von einem Nukleotid mit dem 5'-Phosphat-Ende eines anderen Nukleotids in doppelsträngiger DNA durch eine kovalente Phosphodiesterbindung.

Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Ligation von Plasmid-DNA mit PCR-Produkten in einem Endvolumen von 20  $\mu\text{L}$ . Die Ligationsreaktion wurde durch die T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) katalysiert und erfolgte in einem korrespondierenden Puffersystem nach Angaben des Herstellers.

#### **2.4.7 Reinigung von Restriktionsansätzen und PCR-Produkten**

Die Entfernung von unerwünschten oder störenden Rückständen, wie Enzymen, Oligonukleotiden oder Salzen aus PCR-Produkten oder Restriktionsansätzen erfolgte mittels des GeneJet™ PCR Purification Kits (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

#### **2.4.8 Sequenzierung von DNA**

Die Überprüfung der korrekten DNA-Sequenzen generierter Überexpressionsvektoren erfolgte mittels Sequenzierung der, die eingebrachten Gene enthaltenen, Plasmidabschnitte.

Sequenzierungen wurden im Rahmen dieser Arbeit von der StarSeq GmbH (Mainz, Deutschland) vorgenommen. Die Präparation der Sequenzierungsansätze entsprach dabei den Angaben der StarSeq GmbH für „U-mix“-Ansätze, inklusive entsprechender Oligonukleotide. Für die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse wurde das Programm Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd) verwendet.

## 2.5 Mikrobiologische Methoden

### 2.5.1 Kultivierung von Mikroorganismen

#### 2.5.1.1 Kultivierung von *E. coli* DH5 $\alpha$ und *P. putida* KT2440

*E. coli* und *P. putida* wurden grundsätzlich aerob in Luria Bertani (LB) Medium (Miller 1972) bei 30 °C angezogen. Die Anzucht erfolgte bis zu einem Volumen von 3 mL in 15 mL-Röhrchen auf einem Rundschtüttler (Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland) bei 180 rpm. Flüssigkulturen ab einem Volumen von 50 mL wurden in 250 mL-Schikanekolben bei 180 rpm in einem Schüttelinkubator (Schüttelinkubator Minitron, Infors GmbH, Einsbach, Deutschland) angezogen. Für die Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt und dieses anschließend autoklaviert. Soweit das Zusetzen von Antibiotika oder Medienzusätzen nötig war, wurden diese nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf mindestens 50 °C zugegeben.

#### LB-Medium (Miller 1972)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL

#### 2.5.1.2 Kultivierung von *S. wittichii* RW1

*S. wittichii* RW1 wurde aerob in LB-Medium (Miller 1972) oder in einem modifiziertem M9-Minimalmedium (Sambrook *et al.* 1989) bei 30 °C kultiviert. Die Produktion von Agarplatten und die Supplementierung mit Antibiotika oder Medienzusätzen erfolgten analog zu der Vorgehensweise für *E. coli*. Flüssigkulturen von *S. wittichii* RW1 wurden in der Regel in 50 mL-Röhrchen auf einem Rundschtüttler (Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instruments

GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland) bei 180 rpm kultiviert. Volumen ab 50 mL wurden in 250 mL- oder 500 mL-Schikanekolben in einem Schüttelinkubator (Schüttelinkubator Minitron, Infors GmbH, Einsbach, Deutschland), ebenfalls bei 180 rpm inkubiert.

#### **M9 Minimalmedium (modifiziert nach Sambrook *et al.* 1989)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL

Nach dem Autoklavieren wurden dem Minimalmedium 0,5 % (v/v) Ethanol, 1 mL einer Vitaminlösung (Wolin *et al.* 1963) und je 1 mL folgender Mineralsalzlösungen (steril) zugesetzt:

0,1 M	CaCl <sub>2</sub>
1 M	MgSO <sub>4</sub>
1 mM	FeNH <sub>4</sub> Citrat

#### **2.5.1.3 Kultivierung von *G. oxydans* und *Ga. diazotrophicus***

Die Anzucht von *G. oxydans* und *Ga. diazotrophicus* erfolgte aerob in Flüssigkulturen mit einem Volumen von 10 mL in 50 mL-Röhrchen oder von 500 mL in 2 L-Schikanekolben. Für beide Organismen wurde YM-Medium verwendet und die Inkubation wurde bei 30 °C und 180 rpm durchgeführt. Der Zusatz von Antibiotika erfolgte nach dem Autoklavieren.

#### **Hefe-Mannitol-Medium (YM-Medium)**

Mannitol	20 g
Hefeextrakt	6 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL



### **2.5.1.4 Kultivierung von *H. denitrificans* X**

Die Kultivierung von *H. denitrificans* X wurde aerob bei 30 °C und 180 rpm in 3 mL - Kulturen auf einem Rundschtüttler (Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland) durchgeführt. Es wurde das DSM-Medium 166 in Verbindung mit einer Spurenelement-Lösung für *Thiobacillus novellus* verwendet. Vor der Verwendung wurde das Medium autoklaviert und die Spurenelement-Lösung separat steril filtriert.

#### **DSM-Medium 166: Hyphomicrobium Strain X Medium**

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,55 g
Methylaminhydrochlorid	0,7 g
Spurenelement-Lösung	0,2 mL
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL

Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

#### **Spurenelement-Lösung (Vishniac & Santer 1957)**

Na <sub>2</sub> -EDTA	50 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	22 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	5,54 g
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	5,06 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,1 g
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	1,57 g
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,61 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL

Die Einstellung des pH-Wertes auf 6,0 erfolgte mit einer wässrigen Lösung von Kaliumhydroxid.

### 2.5.2 Medienzusätze

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2.6 aufgelisteten Antibiotika und Medienzusätze verwendet.

Tabelle 2.6: Antibiotika und Medienzusätze

Medienzusatz/Antibiotika	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	rH <sub>2</sub> O	1 M	10 mM
Cefoxitin (Cef)	rH <sub>2</sub> O	50 mg/mL	50 µg/mL
Chloramphenicol (Cm)	50 % Ethanol (EtOH)	25 mg/mL	25 µg/mL
Cm	50 % EtOH	50 mg/mL	50 µg/mL
Kanamycin (Km)	rH <sub>2</sub> O	50 mg/mL	50 µg/mL
Streptomycin (Sm)	rH <sub>2</sub> O	50 mg/mL	50 µg/mL
PQQ	rH <sub>2</sub> O	5 mM	5 µM
Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	rH <sub>2</sub> O	500 mM	1 mM

### 2.5.3 Stammhaltung

Die kurzfristige Stammhaltung von Bakterien erfolgte entweder in Flüssigkulturen oder auf Agarplatten bei 4 °C. Für die langfristige Stammhaltung wurden Kryokulturen angelegt und bei – 70 °C gelagert. Kryokulturen wurden aus jeweils 900 µL einer Bakterienkultur und 100 µL Dimethylsulfoxid (DMSO) oder je 800 µL Bakterienkultur und 200 µL Glycerin hergestellt und in 2 mL-Kryoröhrchen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gefüllt.

### 2.5.4 Beobachtung des Wachstumsverlaufs einer Bakterienkultur und Erstellung von Wachstumskurven

Das Wachstum von Bakterienflüssigkulturen wurde photometrisch verfolgt. Dazu wurde die optische Dichte (OD) einer Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Tischphotometer (HeliosEpsilon, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) vermessen. Es wurde jeweils ein Milliliter einer Flüssigkultur in einer Plastikkuvette mit einer Schichtdicke von einem Zentimeter gegen den Leerwert gemessen. Aufgrund einer höheren

Streuung wird diese Messung bei höheren Zelldichten ungenau. Aus diesem Grund wurden Bakterienkulturen ab einer  $OD_{600nm}$  von ungefähr 0,3 mit Medium verdünnt.

Die Erstellung von Wachstumskurven aus den gemessenen Werten erfolgte durch eine logarithmische Auftragung der  $OD_{600nm}$ -Werte gegen die Zeit. Die Berechnung der Wachstumsrate  $\mu$  und der Verdopplungszeit  $T_d$  beruhte auf den folgenden Formeln:

$$\text{Wachstumsrate } \mu = \frac{\ln(N_t/N_0)}{t - t_0} [\text{h}^{-1}, \text{min}^{-1}]$$

$$\text{Verdopplungszeit } T_d = \frac{\ln 2}{\mu} [\text{h}, \text{min}]$$

## 2.5.5 Transformation von Bakterien

### 2.5.5.1 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Transformation von *E. coli* mit NEB 5-alpha competent *E. coli*-Zellen (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) durchgeführt. Dazu wurde das „High Efficiency Transformation Protocol“ für diese Zellen verwendet. Abweichend von diesem Protokoll wurde anstatt mit jeweils 50  $\mu\text{L}$  kompetenter Zellen nur mit 10 - 25  $\mu\text{L}$  gearbeitet.

### 2.5.5.2 Transformation von *S. wittichii* RW1 durch Elektroporation

Im Gegensatz zu *E. coli* wurde die Transformation von *S. wittichii* RW1 nicht durch einen Hitzeschock (siehe Abschnitt 2.5.5.1), sondern durch Elektroporation vorgenommen.

Die Präparation elektrokompenter Zellen von *S. wittichii* RW1 erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Choi *et al.* (2006). Dazu wurden jeweils 50 mL LB-Medium (Miller 1972) mit *S. wittichii* RW1 beimpft und die Kultur bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,6 bis 0,8 bei 30 °C und 180 rpm auf einem Rundschtüttler (Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland) angezogen. Anschließend wurden jeweils vier Milliliter der Kultur geerntet (Raumtemperatur (RT), 13.000 rpm). Alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Die Zellpellets wurden zweimal mit je 1 mL einer 0,3 M Saccharoselösung (steril, 4 °C) gewaschen (Zentrifugation: 1 Minute, 13.000 rpm, 4 °C) und im Anschluss in 70  $\mu\text{L}$  0,3 M Saccharoselösung resuspendiert. Vor der Verwendung für die Elektroporation wurde den Zellen 75 % (v/v) Glycerin zugegeben, sodass eine Endkonzentration von 20 % (v/v) Glycerin erreicht wurde.

Die Transformation elektrokompetenter Zellen von *S. wittichii* RW1 mit Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten Methode von Choi *et al.* (2006). Hierbei wurden jeweils 100  $\mu$ L elektrokompetenter Zellen (siehe oben) mit jeweils 2  $\mu$ L Plasmid-DNA (entspricht 50 bis 100 ng DNA) vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Millimeter Elektrodendistanz überführt (my-Budget-1mm-Küvette, Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland). Anschließend wurde das Zell/Plasmid-Gemisch für vier bis fünf Millisekunden einem elektrischen Puls ausgesetzt. Dafür wurde ein Gene-Pulser II (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet, der auf 2,5 kV, 25  $\mu$ F und 200  $\Omega$  eingestellt war.

Nach dem Puls wurden die Zellen in je einen Milliliter LB-Medium (Miller 1972) überführt und für zwei Stunden bei 30 °C und 180 rpm regeneriert. Im Anschluss an die Regeneration wurden die Zellen zentrifugiert (2 Minuten, 13.000 rpm, RT), in 100  $\mu$ L Medium resuspendiert, auf LB-Agarplatten, mit entsprechenden Antibiotika, ausplattiert und für mehrere Tage bei 30 °C inkubiert.

### **2.5.6 Heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli***

Die heterologe Überproduktion von Proteinen in *E. coli* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, aerob in 100 mL-Kulturen. Dazu wurden 100 mL LB-Medium (siehe Abschnitt 2.5.1.1) in 250 mL-Schikanekolben einprozentig mit einer Vorkultur beimpft und bei 30 °C und 180 rpm auf einem Rundschüttler (Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland) inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden bis zu einer  $OD_{600nm} \sim 1,5$  angezogen und anschließend geerntet. Für die Plasmidstabilität von pBBR1-Derivaten wurde den Kulturen Kanamycin zugesetzt. Wenn die Produktion der Holoenzymform von Chinoproteinen gewünscht war, wurde das Medium zusätzlich mit 5  $\mu$ M PQQ und 10 mM  $CaCl_2$  supplementiert.

### **2.5.7 Homologe Proteinproduktion in *S. wittichii* RW1**

Die homologe Überproduktion in *S. wittichii* RW1 erfolgte in der Regel in 500 mL-Kulturen, die in einem 2 L-Schikanekolben angezogen wurden. Es wurde jeweils LB-Medium (siehe Abschnitt 2.5.1.1) zweiprozentig mit einer Vorkultur beimpft und anschließend bei 30 °C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator (Minitron, Infors GmbH, Einsbach, Deutschland) inkubiert. Da *S. wittichii* RW1 eine natürliche Streptomycin-Resistenz besitzt, wurde dem Medium 50  $\mu$ g/mL Streptomycin, sowie für die Plasmidstabilität 50  $\mu$ g/mL Kanamycin zugesetzt. Soweit ein Holoenzym produziert werden sollte, wurde dem Medium 5  $\mu$ M PQQ und 10 mM  $CaCl_2$  zugefügt. Die Bakterienkulturen wurden in der späten exponentiellen

Phase geerntet. Wurde anstatt eines konstitutiven Promotors ein Überexpressionsvektor mit einem Lac-Promotor verwendet, so wurde dieser nach Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,3 mit 1 mM IPTG induziert.

### 2.5.8 Zellernte

Puffer W 100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8

Die Ernte von Bakterienkulturen erfolgte mittels Zentrifugation (10 Minuten, 7.000 rpm, 4 °C) in einer Beckman J2-HS Zentrifuge (Rotor JA-14, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland). Anschließend wurde das Zellpellet gewogen um das Zellnassgewicht zu bestimmen und, soweit nicht anders angegeben, in 10 mL Puffer W resuspendiert. Zellpellets, die nicht sofort weiter verarbeitet wurden, wurden bei – 70 °C gelagert.

### 2.5.9 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die Zellyse erfolgte mittels Ultraschall in einem Branson Sonifier Cell Disrupter B15 (Heinemann Ultraschall und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) bei 4 °C. Die resuspendierten Zellpellets wurden dazu 1,5 Minuten pro mL bei halbmaximaler Leistung und einer Amplitude von 7 beschallt. Anschließend wurde das Lysat bei 14.000 rpm und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert (Beckman J2-HS Zentrifuge, Rotor JA-20, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) um Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile abzutrennen. Das nun klare Lysat wurde für die Strep-Tactin-Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 2.6.1) verwendet.

### 2.5.10 Fraktionierung von Bakterienzellen in einzelne Kompartimente

#### 2.5.10.1 Herstellung von Sphäroplasten – Periplasmapräparation

Resuspensionslösung 0,5 M Saccharose, 0,2 M Tris (pH 8), 0,5 mM EDTA,  
2 µg/mL Lysozym

TE Puffer 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA

Die Präparation von *S. wittichii* RW1 Sphäroplasten erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Thorstenson *et al.* (1997). Dazu wurden Zellen von *S. wittichii* in einem Volumen von 500 mL angezogen und bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 bis 1,2 geerntet (10 Minuten, 7.000 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wurde zwei Mal mit je 10 mL TE-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert (5 Minuten, 5.000 rpm, 4 °C). Je ein Gramm Zellen

(Zellnassgewicht) wurden anschließend in je 10 mL Resuspensionslösung resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurde der Ansatz zentrifugiert (10 Minuten, 5.000 rpm, 4 °C) und der Überstand abgenommen. Der Überstand, der die Periplasmafraktion enthielt, wurde entweder direkt für Aktivitätstests verwendet oder aliquotiert und bei – 70 °C gelagert. Das Pellet, das die Sphäroplasten enthielt, wurde vor der weiteren Fraktionierung drei Mal mit je 10 mL TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die reinen Sphäroplasten mittels Ultraschall aufgeschlossen und von Zelltrümmern befreit (siehe Abschnitt 2.5.9). Der dabei entstandene Sphäroplasten-Extrakt wurde für die Membranpräparation verwendet.

### **2.5.10.2 Trennung von Membran- und Cytoplasmafraktion – Membranpräparation**

Die Auftrennung der Sphäroplasten in eine Cytoplasma- und eine Membranfraktion erfolgte mittels Ultrazentrifugation (60 Minuten, 45.000 rpm, 4 °C) in einer Optima XL-100K Ultrazentrifuge (Rotor T385.I, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Im Anschluss an den Zentrifugationslauf wurde der Überstand abgenommen. Dieser entsprach der Cytoplasmafraktion. Das Pellet wurde einmal mit 40 mM Kaliumphosphat (KP)-Puffer (pH 8) gewaschen, anschließend in einem Milliliter davon resuspendiert und stellte die Membranfraktion dar. Beide Fraktionen wurden entweder direkt in Aktivitätstests eingesetzt oder aliquotiert und bei - 70 °C gelagert.

### **2.5.10.3 Überprüfung der Reinheit von Periplasma- und Cytoplasmafraktion**

Um Kontaminationen des Periplasmas mit Cytoplasma auszuschließen, wurden diese Fraktionen auf die Aktivität der Malat-Dehydrogenase (Malat-DH), der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6PGDH) hin untersucht. Dazu wurden Standardtestverfahren für NAD(P)/H-abhängige Enzyme verwendet.

## 2.6 Proteinbiochemische Methoden

### 2.6.1 Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Puffer E	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 2,5 mM D-Desthiobiotin, pH 8
Puffer R	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM 2-(4-Hydroxyphenylazo)- Benzoessäure (HABA), pH 8
Puffer W	100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8

Die Strep-Tactin-Affinitätschromatographie ist eine Methode für die Aufreinigung rekombinanter Proteine, die entweder C- oder N-Terminal mit einem Strep-Tag fusioniert wurden. Bei dem Strep-Tag handelt es sich um ein synthetisches Peptid aus acht Aminosäuren (WSHPQFEK), das sich durch eine hohe Affinität zu Strep-Tactin auszeichnet. Die reversible Bindung rekombinanter Proteine erfolgt bei dieser Methode an immobilisiertes Strep-Tactin in der Säulenmatrix. Eine Elution der gereinigten Proteine kann anschließend durch Zugabe von D-Desthiobiotin erreicht werden, wodurch die rekombinanten Proteine aufgrund der höheren Affinität von D-Desthiobiotin zu Strep-Tactin verdrängt werden. Ein großer Vorteil der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie ist, dass das Säulenmaterial nach einer Regeneration wieder verwendet werden kann. Dazu wird HABA im Überschuss zugegeben, so dass das reversibel gebundene D-Desthiobiotin ausgewaschen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden rekombinante Proteine aus klarem Zelllysate gereinigt. 5 mL-Polypropylensäulen (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden mit je 2 ml Strep-Tactin®Superflow® 50 % Lösung (IBA, Göttingen, Deutschland) befüllt und mit zehn Säulenvolumen (Column volume, CV) Puffer W äquilibriert. Anschließend wurde das Zelllysate auf die Säule gegeben und diese mit 20 CV Puffer W gewaschen. Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgte in der Regel mit 6 x 0,5 ml Puffer E. Elutionsfraktionen, in denen durch eine Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 2.6.2) Proteine nachgewiesen werden konnten, wurden zu je 50 bis 80 µL aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

### 2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration einer Lösung kann mittels eines Bradford-Assay (Bradford 1976) direkt photometrisch bestimmt werden. Diese Methode basiert darauf, dass der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue (Bestandteil des Bradford-Reagenzes) in zwei Formen vorliegt, die sich farblich unterscheiden (Reisner *et al.* 1975).

Für die exakte Bestimmung der Proteinkonzentration ist es notwendig eine Kalibrierkurve zu erstellen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 0, 0,125, 0,25, 0,5, 0,75 und 1 mg/mL verwendet. Jeweils 20 µL dieser Lösungen wurden mit jeweils 980 µL Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gemischt, zehn Minuten unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm im Photometer gemessen (Helios Epsilon, Scientific-Instruments, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) gemessen. Als Leerwert diente ein Ansatz, dem anstatt der Proteinlösung Wasser zugesetzt wurde.

Für alle Proteinproben wurde als Leerwert Puffer E mit Bradford-Reagenz verwendet.

## 2.6.3 Visualisierung von Proteinen

### 2.6.3.1 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)

Acrylamid-Lösung	Rotiphorese® Gel A-40 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
APS-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
Elektrodenpuffer	20 mM Tris, 190 mM Glycerin, 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat, pH 8,3
Ladepuffer	0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 50 % (v/v) Glycerin
Sammelgelpuffer	600 mM Tris, pH 6,8
SDS-Lösung	0,5 % (w/v) Natriumdodecylsulfat
Trenngelpuffer	1,8 M Tris, pH 8,8

Die diskontinuierliche SDS-PAGE ist eine Methode um Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einer Polyacrylamid-Matrix gelelektrophoretisch aufzutrennen. Um sicherzustellen, dass das Laufverhalten der Proteine ausschließlich auf ihre Größe zurückzuführen ist, erfolgt eine Reduktion der Disulfidbrücken durch Zugabe von β-Mercaptoethanol, sowie eine Denaturierung der Proteine durch Erhitzen. Letztlich führt die Anlagerung des SDS an die Proteine dazu, dass die Eigenladung der Proteine maskiert wird.

Für die Durchführung einer SDS-PAGE wurden die Proteinproben zuerst im Verhältnis 1:1 mit Ladepuffer versetzt und anschließend für zehn Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Proteinproben, sowie ein Größenstandard (siehe Abschnitt 2.1.4) wurden auf ein Polyacrylamidgel, bestehend aus einem 12,5 %-igen Trenngel und einem fünfprozentigen



Sammelgel (Tabelle 2.7) aufgetragen. Der Elektrophoreselauf erfolgte in einer Mini-Gel-Kammer (Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bei einer Stromstärke von 20 mA für ein bis zwei Stunden.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung eines 12,5 % Trenngels und eines 5 % Sammelgels für die SDS-PAGE

<b>Lösung</b>	<b>Trenngel (12,5 % )</b>	<b>Sammelgel (5 %)</b>
Acrylamid-Lösung	2 mL	250 µL
APS-Lösung	30 µL	30 µL
dH <sub>2</sub> O	1,8 mL	950 µL
Sammelgelpuffer	---	400 µL
SDS-Lösung	1,2 mL	400 µL
TEMED	5 µL	5 µL
Trenngelpuffer	1,2 mL	---

### 2.6.3.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Laufpuffer            25 mM Tris, 192 mM Glycin  
 Probenpuffer        62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 25 % (v/v) Glycerol,  
                           0,01 % Bromphenolblau

Die native PAGE dient dazu Proteine in ihrer nativen Konformation aufzutrennen um Oligomerstrukturen oder eine biologische Aktivität nachzuweisen. Dabei herrschen im Gegensatz zu der SDS-PAGE sowohl nicht-reduzierende als auch nicht-denaturierende Pufferbedingungen. Dementsprechend wird auf die Anwendung von SDS und reduzierenden Chemikalien verzichtet.

Innerhalb dieser Arbeit wurden für die native PAGE ausschließlich 4-20 % Mini PROTEAN<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup> Precast Gels (Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verwendet. Der Elektrophoreselauf erfolgte bei 4 °C in Laufpuffer für zwei Stunden bei 20 mA. Alle Proteinproben wurden zuvor im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer gemischt. Um die Abschätzung des Molekulargewichts zu gewährleisten, wurde zusätzlich ein Proteinstandard (Amersham high molecular weight calibration kit for native electrophoresis, GE Healthcare, Solingen, Deutschland) aufgetragen. Dieser Standard enthielt die Proteine Tyroglobulin

(669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Laktat-Dehydrogenase (140 kDa) und Albumin (66 kDa). Vor der Auftragung auf das Gel wurde der Proteinstandard 1:50 in Laufpuffer verdünnt und anschließend 1:1 mit Probenpuffer vermischt.

Im Anschluss an den Elektrophoreselauf wurde das Gel entweder einer Silberfärbung (siehe Abschnitt 2.6.3.3) oder einer Aktivitätsfärbung (siehe Abschnitt 2.6.3.4) unterzogen.

### 2.6.3.3 Silberfärbung

Entwicklerlösung	3 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,05 % Formaldehyd (37 % [v/v]), eine Spatelspitze Natriumthiosulfat
Fixierlösung	50 % Methanol, 12 % Essigsäure, 0,05 % Formaldehyd (37% [v/v])
Imprägnierlösung	0,01 % (w/v) Silbernitrat, 0,05 % Formaldehyd (37 % [v/v])
Thiosulfatlösung	0,02 % (w/v) Thiosulfat

Die Sichtbarmachung von Proteinen in Polyacrylamidgelen im Anschluss an eine SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.6.3.1) oder eine native PAGE (siehe Abschnitt 2.6.3.2) wurde mit einer Silberfärbung nach (Blum *et al.* 1987) durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Anlagerung von Silber-Ionen und deren anschließender Reduktion zu elementarem Silber. Der große Vorteil dieser Methode im Vergleich zu anderen Färbemethoden ist die hohe Sensitivität, die sich in einer Nachweisgrenze von 0,1 bis 1 ng Protein ausdrückt.

Für die Präzipitation der Proteine im Gel wurden die Polyarylamidgele nach dem Elektrophoreselauf für mindestens 20 Minuten in Fixierlösung inkubiert. Daraufhin folgten eine zehnminütige Inkubation in 50 % Methanol, sowie ein Waschschriff mit dH<sub>2</sub>O um Reste der Essigsäure zu entfernen. Um den Kontrast und die Sensitivität der Methode zu erhöhen wurden die Gele anschließend für eine Minute in Thiosulfatlösung inkubiert. Die Entfernung von überschüssigen Thiosulfat erfolgte durch zwei weitere einminütige Waschschriffe mit dH<sub>2</sub>O. Die Anlagerung der Silber-Ionen an die negativ geladenen Seitenketten der Proteine erfolgte anschließend durch Inkubation der Gele in Imprägnierlösung für 20 Minuten unter Lichtausschluss bei 4 °C. Abschließend wurden die Polyacrylamidgele in Entwicklerlösung inkubiert, wobei die Silber-Ionen durch Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert wurden. Im Gel präzipitierte Proteine wurden dadurch als schwarze Banden sichtbar. Für die Dokumentation wurden die Gele im Laufe der Reaktion mehrmals eingescannt.

#### **2.6.3.4 Hämfarbung (Thomas *et al.* 1976)**

Färbelösung        15 mL 6,3 mM TMBZ in Methanol, 35 mL 0,25 M Natriumacetat (pH 5)

Die Detektion kovalent gebundener Cytochrome (Cyt) von Proteinen wurde mittels Hämfarbung nach (Thomas *et al.* 1976) durchgeführt. Diese Methode basiert auf der intrinsischen Peroxidaseaktivität von Hämen, die Wasserstoffperoxid umsetzt und dabei 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMBZ) oxidiert. Im reduzierten Zustand ist TMBZ farblos, während es im oxidierten Zustand als Dimer vorliegt und eine blau-grüne Farbe aufweist.

Vor der Hämfarbung wurde eine SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.6.3.1) durchgeführt, allerdings wurden die Proben im Vorfeld nicht gekocht und mit nativem Ladepuffer (siehe Abschnitt 2.6.3.2) anstatt SDS-Ladepuffer versetzt. Im Anschluss an den Elektrophoreselauf wurde das Polyacrylamidgel für 30 Minuten (RT, dunkel) in 50 mL der Färbelösung inkubiert und anschließend die Peroxidaseaktivität mit 30 mM Wasserstoffperoxid gestartet. Im Falle, dass Häme kovalent an das jeweilige Protein gebunden waren, trat eine Blaufärbung der Proteinbande ein.

Die Gele konnten im Anschluss an die Hämfarbung noch einer Silberfärbung unterzogen werden.

#### **2.6.3.5 Aktivitätsfärbung PQQ-abhängiger Proteine (Toyama *et al.* 1995)**

Die Aktivitätsfärbung dient dazu die Enzymaktivität eines PQQ-abhängigen Proteins in seiner nativen Konformation nachzuweisen. Diese Art des Aktivitätsnachweises funktioniert analog zu einem DCPIP/PMS-Enzymtest (siehe Abschnitt 2.7.1) und wird nach einer nativen PAGE (siehe Abschnitt 2.6.3.2) durchgeführt. Je nach Protein wird das native Gel dazu bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln in einer Färbelösung inkubiert, die dem Ansatz für einen DCPIP/PMS-Enzymtest entspricht (siehe Abschnitt 2.7.1). Das Puffersystem und das Substrat sind abhängig von dem zu untersuchenden Protein. Die Konzentration von Phenazinmethosulfat (PMS) beträgt konstant 0,65 mM, während das Dichlorophenolindophenol (DCPIP) durch einige Kristalle Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) ersetzt wird. NBT liegt normalerweise oxidiert vor und weist eine gelbliche Färbung auf. Im Falle eines aktiven nativen Proteins wird NBT als artifizieller Elektronenakzeptor reduziert und färbt sich blau. Eine Blaufärbung der Proteinbanden im Gel weist demnach auf eine Aktivität des nativen Enzyms mit dem verwendeten Substrat hin.

### 2.6.3.6 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen

$$R_f = \frac{\text{Wanderungsstecke (Protein)}}{\text{Wanderungsstecke (Laufmittel)}}$$

Die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen beziehungsweise deren native Konformation erfolgte neben der Berechnung mit Internetprogrammen (siehe Abschnitt 2.2.1) durch eine Betrachtung in der SDS-PAGE oder der nativen PAGE. Dazu wurde sowohl die Wanderungsstecke des Laufmittels als auch des Proteins gemessen und daraus der Retentionsfaktor ( $R_f$ ) des entsprechenden Proteins berechnet. Die  $R_f$ -Werte der Proteine des jeweils verwendeten Größenstandards wurden für die Erstellung einer Kalibriergeraden gegen den dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen. Anschließend konnte aus der Geradengleichung das Molekulargewicht bestimmt werden.

## 2.7 Photometrische Enzymaktivitätstests

### 2.7.1 Bestimmung der Aktivität von Chinoproteinen mit DCPIP als artifiziellem Elektronenakzeptor

Die Messung der Aktivität von PQQ-abhängigen Enzymen erfolgte mit zwei unterschiedlichen Systemen. Zum einen mit Ferricyanid (siehe Abschnitt 2.7.2), zum anderen mit PMS und DCPIP als artifizielle Elektronenakzeptoren. Bei letzterem Aktivitätstest wurde die Reduktion von DCPIP, das den Endakzeptor darstellt, photometrisch mit einem Jasco V-600 Spektrophotometer (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland) verfolgt. PMS fungierte als intermediärer Elektronenakzeptor und wurde im Gegensatz zu DCPIP nicht verändert. Um während der Enzymreaktion eine konstante Temperatur zu gewährleisten, wurde ein Jasco ETC-717 Peltier-Thermostat (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland) verwendet. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mittels der Spectra Manager™ III Software (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland).

Die enzymatischen Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 1 mL in Plastikkuvetten (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten dabei, Puffer, 0,65 mM PMS, 0,1 mM DCPIP, 10 – 80 mM Substrat, sowie gereinigtes Enzym, Periplasma, Membranen oder Cytoplasma. Der Start der Reaktion erfolgte entweder

durch Zugabe des Enzyms oder des Substrates. Als Puffer wurden in der Regel 40 mM KP-Puffer oder 50 mM Tris-HCl-Puffer verwendet.

Das Absorptionsverhalten von DCPIP ist abhängig vom pH-Wert, daher wurde die Reduktion des DCPIP bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen. Bei pH 5 liegt das Absorptionsmaximum bei 520 nm, bei pH-Werten zwischen sechs und neun bei 600 nm. Zudem ändert sich der Extinktionskoeffizient (Armstrong 1964; Hölscher *et al.* 2007)

$$\text{pH 5} \quad \varepsilon(\text{DCPIP}) = 10,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{pH 6} \quad \varepsilon(\text{DCPIP}) = 17,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{pH 7} \quad \varepsilon(\text{DCPIP}) = 21,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{pH 8,5} \quad \varepsilon(\text{DCPIP}) = 21,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Die Berechnung der spezifischen Aktivität eines Enzyms erfolgte aus der Volumenaktivität und der Proteinkonzentration mittels des Lambert-Beer-Gesetzes:

$$\text{spezifische Aktivität [U/mg]} = \frac{\text{Volumenaktivität [U/mL]}}{\text{Proteinkonzentration [mg/mL]}}$$

$$\text{Volumenaktivität [U/mL]} = \frac{\Delta E/\text{min} * V}{d * \varepsilon * v}$$

$\Delta E/\text{min}$	Absorptionsänderung pro Minute
$d$	Schichtdicke der Küvette [cm]
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient [ $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]
$V$	Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes
$v$	Volumen des eingesetzten Enzyms

Eine Unit (U) wurde definiert, als die Enzymaktivität, die die Umsetzung von einem  $\mu\text{mol}$  DCPIP pro Minute katalysiert.

### **2.7.2 Messung der Aktivität von PQQ-abhängigen Enzymen mit Ferricyanid als Elektronenakzeptor**

Eine weitere Methode, die Enzymaktivität von PQQ-abhängigen Enzymen zu bestimmen, nutzt Kaliumhexacyanoferrat(III) (Ferricyanid) als artifiziellen Elektronenakzeptor. Dieser photometrische Enzymtest wurde analog zu dem Test mit DCPIP (siehe Abschnitt 2.7.1) bei

einer Wellenlänge von 420 nm durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt statt DCPIP und PMS 1 mM Ferricyanid ( $\epsilon = 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Friedrich *et al.* 1989)).

Bei der Berechnung der spezifischen Enzymaktivität wurde  $\Delta E/\text{min}$  durch zwei dividiert, da ein Mol Ferricyanid im Gegensatz zu DCPIP nur ein Elektron aufnehmen kann, bei der Oxidation eines Substrates durch eine Dehydrogenase aber zwei Elektronen frei werden.

Eine Unit (U) wurde in diesem Fall, als die Menge Enzym definiert, die notwendig ist, um ein  $\mu\text{mol}$  Ferricyanid pro Minute umzusetzen.

### **2.7.3 Messung der Aktivität von NAD(P)H-abhängigen Enzymen**

Enzymaktivitätstests mit NAD(P)H-abhängigen Enzymen wurden als Reinheitskontrolle von Periplasma- und Cytoplasmafraktionen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.5.10). Dazu wurden die Aktivitäten von drei cytoplasmatischen Enzymen (Malat-DH, G6PDH, 6PGDH) mit  $\text{NAD(P)}^+$  ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) als Elektronenakzeptor bei einer Wellenlänge von 340 nm und 25 °C gemessen. Die Reaktionsansätze hatten jeweils ein Endvolumen von 1 mL und enthielten 75 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 (Malat-DH) oder 80 mM Tris-HCl-Puffer pH 7 (G6PDH, 6PGDH), 250  $\mu\text{M}$   $\text{NAD(P)}^+$ , Periplasma oder Cytoplasma und Substrat (5 mM Malat, 2,5 mM G6P oder 6PG).

Die photometrische Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte analog zu der von PQQ-abhängigen Enzymen. Ein Unit (U) wurde dabei als die Menge Cytoplasma- oder Periplasmaprotein definiert, die benötigt werden, um ein  $\mu\text{mol}$   $\text{NAD(P)}^+$  pro Minute umzusetzen.

### **2.7.4 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen und kinetischen Parameter**

Für die Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen eines Enzyms mit seinem Substrat, wurde als erstes das pH-Optimum bestimmt. Dies erfolgte mittels einer modifizierten Methode nach Salusjärvi *et al.* (2004), wobei folgende kombinierte Puffersysteme verwendet wurden: 50 mM Natriumacetat (pH 4,5 – 6,5), 50 mM Kaliumphosphat (6,5 – 8,0) und Tris-HCl (pH 8,0 – 10,0).

Die Ermittlung der optimalen Temperatur, bei der eine Reaktion abläuft, wurde bei dem optimalen pH-Wert durchgeführt. Dazu wurde der Reaktionsansatz inklusive Enzym bei

Temperaturen zwischen 20 und 80 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet.

Der Einfluss von Inhibitoren oder Metallionen auf die Enzymaktivität wurde unter optimalen Reaktionsbedingungen untersucht. Im Vorfeld wurde das Enzym dazu in Anwesenheit definierter Konzentrationen an Metallionen oder Inhibitoren für 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Die Bestimmung der kinetischen Parameter, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) und die Michaeliskonstante ( $K_M$ ), erfolgte durch nicht-lineare Regression der Michaelis-Menten-Daten.

### **2.7.5 *In-vitro*-Aktivierung von putativen PQQ-abhängigen Dehydrogenasen mit Ethylamin oder Ammonium-Ionen**

Die Aktivierung von potentiellen ADHs mit Ammonium-Ionen oder Ethylamin erfolgte mittels photometrischen Enzymaktivitätstests unter Verwendung von DCPIP als künstlichem Elektronenakzeptor (siehe Abschnitt 2.7.1). Dazu wurden dem Reaktionsansatz entweder 50 mM Ethylamin (Toyama *et al.* 1995) oder 20 mM Ammoniumchlorid (Anthony 2004) zugesetzt.

### **2.7.6 Rekonstitution von Apoenzymen mit PQQ**

Die Rekonstitution der Apoenzymform von Chino(hämo)proteinen in die Holoenzymform erfolgte durch Inkubation des Enzyms mit 5  $\mu$ M PQQ und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  in 50 mM Tris-HCl-Puffer. Dazu wurde der Ansatz für bis zu zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In wenigen Fällen erfolgte stattdessen eine Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurde die Enzymaktivität mit DCPIP als artifiziellem Elektronenakzeptor bestimmt (siehe Abschnitt 2.7.1).

### **2.7.7 Aufnahme von UV-VIS-Spektren und spektrophotometrische Analyse prosthetischer Gruppen**

Die Identifizierung von Cytochromen in Chinohämaproteinen erfolgte zum einen spektrophotometrisch, zum anderen mittels einer Häm-spezifischen In-Gel-Färbung (siehe Abschnitt 2.6.3.4). Für die spektrophotometrische Detektion von Cytochromen wurden UV-VIS-Spektren im Bereich zwischen 300 und 600 nm mit einem V-650 UV-VIS Spektrophotometer (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland) aufgenommen. Dazu wurden jeweils 100  $\mu$ L Enzym in einer Quarzküvette (Mikro-Küvette,

Quarzglas Suprasil, 10 mm Schichtdicke, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) eingesetzt. Die erhaltenen Spektren wurden anschließend auf charakteristische Absorptionsmaxima von Hämen analysiert.

## **2.8 Entwicklung eines Verfahrens für die enzymatische Quantifizierung von PQQ**

### **2.8.1 Enzymatische Bestimmung der PQQ-Konzentration**

Die Quantifizierung von PQQ erfolgte mittels Rekonstitution der Apoenzymform des Enzyms Swit\_4395 und der anschließenden Messung der spezifischen Aktivität mit 30 mM Phenylglyoxal als Substrat und DCPIP als künstlichem Elektronenakzeptor bei 600 nm. Dazu wurde entweder eine definierte Menge an PQQ oder Probenmaterial mit 10 nM des Enzyms und 10 mM CaCl<sub>2</sub> in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8) gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Um PQQ in Probenmaterial quantifizieren zu können, musste eine Standardgerade erstellt werden. Dies erfolgte durch die Inkubation des Enzyms mit definierten Mengen an PQQ. Anschließend wurden die spezifischen Aktivitäten des Enzyms Swit\_4395 gegen die PQQ-Konzentration aufgetragen. Aus der Standardgeraden konnte im Anschluss die Konzentration an PQQ in den Proben berechnet werden.

### **2.8.2 Vorbereitung von Probenmaterial für die Quantifizierung von PQQ**

Biologisches Probenmaterial wurde soweit möglich unverdünnt in den Enzymtest eingesetzt. Feststoffe wurden mit Ausnahme von grünem Pfeffer und Kakao mit Hilfe einer Kaffeemühle (Moulinex, Alencon, Frankreich) zerkleinert. Grüner Pfeffer wurde in einem Mörser gemahlen und Kakaopulver nicht weiter behandelt. Von allen Feststoffen wurde jeweils ein Gramm in zehn Milliliter dH<sub>2</sub>O suspendiert.

Milchproben wurden für zehn Minuten bei 90 °C gekocht und anschließend zentrifugiert (1 Stunde, 14.000 rpm, RT). Saure Proben, wie Wein, Cola und Essig, wurden mit 0,5 M NaOH neutralisiert. Die Erzeugung von Kultur-Überständen erfolgte durch Zentrifugation (10 Minuten, 8.000 rpm, RT) von Bakterienkulturen.

### **2.8.3 Enzymaktivitätstests im halbautomatischen Hochdurchsatzverfahren**

Die Entwicklung eines halbautomatischen Hochdurchsatzverfahrens für die enzymatische Bestimmung von PQQ erfolgte in einem Volumen von 100 µL. Dazu wurden jeweils zwölf Reaktionsansätze in einer Mikrotiterplatte vorbereitet und die Absorptionsänderung von



DCPIP bei 600 nm mittels eines Infinite® 200 Pro Plattenlesegeräts (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) verfolgt. Die Reaktionsansätze entsprachen denen für einen Enzymtest mit PMS und DCPIP als artifiziellen Elektronenakzeptoren mit der achtfachen Konzentration an DCPIP (siehe Abschnitt 2.7.1). Der Start der Reaktion erfolgte hier durch Zugabe des Substrates. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Magellan™ Data Analysis Software (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) ausgewertet.

### 3. Ergebnisse

Die vollständige Entschlüsselung des Genoms des  $\alpha$ -Proteobakteriums *S. wittichii* RW1 (Miller *et al.* 2010) ermöglichte neue Ansatzpunkte in der Erforschung PQQ-abhängiger Enzyme. Eine Analyse des Genoms zeigte, dass es sich bei *S. wittichii* RW1 um denjenigen Organismus, von allen bisher sequenzierten, handelt, der die meisten Chinoproteine in seinem Genom kodiert. Die Anzahl und Struktur dieser potentiellen PQQ-Dehydrogenasen legte den Schluss nahe, dass einige dieser Proteine neue Enzymklassen begründen könnten.

Zudem bestand die Möglichkeit durch die Charakterisierung neuartiger Chinoproteine aus *S. wittichii* RW1 diese für biotechnologische Verfahren zugänglich zu machen. PQQ-abhängige Dehydrogenasen können dabei als Biosensoren oder bei der Enantiomer-spezifischen Oxidation chemischer Komponenten eingesetzt werden. Außerdem könnten manche dieser Enzyme für die Dekontamination toxischer Umweltschadstoffe, wie zum Beispiel chlorierte oder halogenierte Komponenten, Verwendung finden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt fünf putative Chinoproteine von *S. wittichii* RW1 eingehender untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Gene aus dem Genom von *S. wittichii* RW1 amplifiziert, in neuartige Expressionsvektoren kloniert und die Proteine anschließend entweder heterolog in *E. coli* oder homolog in *S. wittichii* RW1 produziert. Soweit möglich erfolgte daraufhin eine biologische Charakterisierung der rekombinanten Enzyme. Zudem wurde eine Methode für die biotechnologische Anwendung des Enzyms Swit\_4395 entwickelt.

### 3.1 Identifizierung potentieller PQQ-abhängiger Dehydrogenasen von *S. wittichii* RW1

Um diejenigen Gene von *S. wittichii* RW1 zu identifizieren, die für putative PQQ-abhängige Dehydrogenasen kodieren, wurde eine BLAST-Suche der Aminosäuresequenzen aller Gene von *S. wittichii* RW1 gegen bereits charakterisierte PQQ-abhängige Proteine durchgeführt. Dazu wurde ein Protein-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit Standardparametern und der nicht redundanten Proteinsequenz (nr) Datenbank durchgeführt, wobei nur Einträge für *S. wittichii* RW1 (taxid:392499) berücksichtigt wurden.

Anschließend wurden alle Treffer aussortiert, die zwar eine  $\beta$ -Propellerstruktur aufwiesen, aber keine PQQ-Bindestelle besaßen, dazu gehörten die Lipoprotein YfgL Serin/Threonin Kinasen und eukaryotische Translationsinitiations Faktor 2 $\alpha$  Kinasen (Felton & Anthony 2005). Nach diesem Selektionsprozess blieben insgesamt 14 Gene übrig, die wahrscheinlich für PQQ-abhängige Dehydrogenasen kodierten.

Eines dieser Proteine Swit\_1323 (YP\_001261826) aus dem Stamm *Sphingomonas* sp. 113P3 war bereits als PVADH charakterisiert (Hirota-Mamoto *et al.* 2006).

Der Abgleich der Sequenzen der restlichen Kandidaten zeigte, dass einige nur sehr geringe Homologien zu bereits bekannten Chinoproteinen aufwiesen ( $e > 2e-65$ ) (Tabelle 3.1). Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass es sich dabei um Proteine neuer Enzymklassen handelte, die möglicherweise neue Reaktionen, wie etwa die Oxidation chlorierter oder hydroxylierter organischer Substanzen, katalysieren könnten.

Tabelle 3.1: Verwendete charakterisierte PQQ-abhängige Dehydrogenasen für die Identifizierung von Chino(hämo)proteinen aus *S. wittichii* RW1

Annotation	Protein ID	Organismus	Homolog <i>S. wittichii</i>	e-Wert
EtOH-DH <sup>a</sup>	Q9Z4J7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO	Swit_0693	0.0
ADH <sup>b</sup>	O05542	<i>G. suboxydans</i> IFO 12528	Swit_0721	0.0
ADH <sup>b</sup>	O05542	<i>G. suboxydans</i> IFO 12528	Swit_1001	0.0
GDH <sup>c</sup>	P27175	<i>G. oxydans</i> 621H	Swit_1054	3e <sup>-134</sup>
PVADH <sup>d</sup>	P77931	<i>Pseudomonas</i> sp. VM15C	Swit_1323	6e <sup>-103</sup>
Aldose-DH Ylil <sup>e</sup>	P75804	<i>E. coli</i> K-12	Swit_1440	2e <sup>-64</sup>
ADH <sup>f</sup>	Q8GR64	<i>P. putida</i>	Swit_1441	1e <sup>-60</sup>
GDH <sup>g</sup>	P05465	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Swit_1900	2e <sup>-65</sup>
SLDH <sup>h</sup>	Q70JN9	<i>G. suboxydans</i> IFO 12528	Swit_1961	3e <sup>-175</sup>
Quinat/Shikimat-DH <sup>i</sup>	Q59086	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Swit_2024	0.0
EtOH-DH Typ 1 <sup>j</sup>	Q46444	<i>Comamonas testosteroni</i>	Swit_2227	6e <sup>-168</sup>
THFA-DH <sup>k</sup>	Q9KH03	<i>Ralstonia eutropha</i>	Swit_4160	3e <sup>-134</sup>
Aldose-DH Ylil <sup>e</sup>	P75804	<i>E. coli</i> K-12	Swit_4395	2e <sup>-65</sup>
EtOH-DH Typ 1 <sup>g</sup>	Q46444	<i>Comamonas testosteroni</i>	Swit_5136	0.0

<sup>a</sup> Chinoprotein Ethanol-Dehydrogenase (Keitel *et al.* 2000)

<sup>b</sup> Alkohol-Dehydrogenase (Kondo & Horinouchi, 1997)

<sup>c</sup> Glukose-Dehydrogenase (Cleton-Jansen *et al.* 1991)

<sup>d</sup> Polyvinylalkohol-Dehydrogenase (Shimao *et al.* 1996)

<sup>e</sup> lösliche Aldose-Dehydrogenase Ylil (Southall *et al.* 2006)

<sup>f</sup> Chinohämoprotein Alkohol-Dehydrogenase (Chen *et al.* 1999)

<sup>g</sup> Glukose-Dehydrogenase (Cleton-Jansen *et al.* 1988)

<sup>h</sup> Sorbitol-Dehydrogenase (Salusjärvi *et al.* 2004)

<sup>i</sup> Quinat-Shikimat-Dehydrogenase (Elsomore & Omston 1994)

<sup>j</sup> Chinohämoproteine Ethanol-Dehydrogenase Typ-1 (Stoorvogel *et al.* 1996)

<sup>k</sup> Tetrahydrofurfuryl-Dehydrogenase (Zarnt *et al.* 2001)

Alle putativen Chinoproteine aus *S. wittichii* RW1 hatten konservierte PQQ- und Ca<sup>2+</sup>-Bindestellen und wiesen entweder eine sechsfache oder eine achtfache  $\beta$ -Propellerstruktur auf, die typisch für PQQ-abhängige Proteine ist.

Zudem wurde mittels Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) (Käll *et al.* 2004, 2007) und SignalP4.1 (<http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.* 2011) eine Einteilung in periplasmatische und membrangebundene Dehydrogenasen vorgenommen, wobei das Vorhandensein eines Sec-abhängigen Signalpeptids beziehungsweise von Transmembranhelices (TMH) maßgeblich war. Für die Proteine Swit\_0693, Swit\_0721, Swit\_1001, Swit\_1323, Swit\_1440, Swit\_1900, Swit\_2227, Swit\_4160 und Swit\_4395 konnte mittels SignalP4.1 jeweils ein Signalpeptid detektiert werden. Der Unterscheidungswert (D-Score) für putative Signalpeptide für diese Proteine lag jeweils über dem Schwellenwert von 0,5 (Tabelle 3.2). Der D-Score für die Proteine Swit\_1054, Swit\_1441 und Swit\_5136 lag jeweils unter diesem Wert, weshalb mit SignalP4.1 keine exakte Aussage über das Vorhandensein eines Signalpeptids getroffen werden konnte. Für die beiden Proteine Swit\_1961 und Swit\_2024 konnten keine Signalpeptide identifiziert werden.

Tabelle 3.2: Voraussage putativer Signalpeptide und TMHs der Chinoproteine von *S. wittichii* mittels SignalP4.1 und Phobius

<b>Protein</b>	<b>Signalpeptid</b>	<b>Position [AS]</b>	<b>TMH<sup>a</sup></b>
Swit_0693	ja	1 – 26 <sup>b</sup>	nein
Swit_0721	ja	1 – 36 <sup>b</sup>	nein
Swit_1001	ja	1 – 31 <sup>b</sup>	nein
Swit_1054	ja	1 – 25 <sup>c</sup>	nein
Swit_1323	ja	1 – 24 <sup>b</sup>	nein
Swit_1440	ja	1 – 32 <sup>b</sup>	nein
Swit_1441	ja	1 – 32 <sup>c</sup>	nein
Swit_1900	ja	1 – 18 <sup>b</sup>	1
Swit_1961	nein		5
Swit_2024	nein		5
Swit_2227	ja	1 – 27 <sup>b</sup>	nein
Swit_4160	ja	1 – 24 <sup>b</sup>	nein
Swit_4395	ja	1 – 24 <sup>b</sup>	nein
Swit_5136	ja	1 – 20 <sup>c</sup>	nein

<sup>a</sup> Voraussage von TMHs mittels Phobius

<sup>b</sup> Signalpeptide, die mittels SignalP4.1 identifiziert wurden und einen D-Score von mehr als 0,5 aufwiesen

<sup>c</sup> Signalpeptide, die mit Phobius detektiert wurden und bei SignalP4.1 einen D-Score von weniger als 0,5 zeigten

Eine weiterführende Analyse der Proteine, für die mittels SignalP4.1 (<http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.* 2011) keine genaue Aussage getroffen werden konnte, wurde mit Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) (Käll *et al.* 2004, 2007) durchgeführt. In den beiden Proteinen Swit\_1961 und Swit\_2024 wurden dabei jeweils fünf TMHs gefunden. Aufgrund dessen wurden diese beiden Proteine als Membranproteine deklariert. In dem Protein Swit\_1900 konnte ebenfalls eine TMH identifiziert werden. Da diese jedoch im Bereich des C-Terminus gefunden und bereits ein Signalpeptid detektiert wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um ein periplasmatisches Protein handelte. Den putativen Proteinen Swit\_1054, Swit\_1441 und Swit\_5136 konnte mittels Phobius jeweils ein Sec-abhängiges Signalpeptid zugeordnet werden. Diese Signalpeptide erstreckten sich über die Aminosäuren 1-25, 1-32 und 1-20. Daher wurden auch diese drei Proteine als periplasmatisch angesehen.

## **3.2 Charakterisierung der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) Swit\_4395 aus *S. wittichii* RW1**

Nachdem die Analyse des Genoms von *S. wittichii* RW1 ergeben hatte, dass dieser Organismus insgesamt 14 putative PQQ-abhängige Dehydrogenasen besitzt, wurde mit der Klonierung und anschließenden Charakterisierung dieser Proteine begonnen. Ein aussichtsreicher Kandidat hierfür war das Protein Swit\_4395, das in den Datenbanken als PQQ-abhängige GSDH annotiert war. Nach einer erfolgreichen Amplifizierung des korrespondierenden Gens *swit\_4395*, wurde dieses in einen neu konstruierten Überexpressionsvektor mit einem Signalpeptid aus *E. coli*, einem Promotor aus *G. oxydans* 621H und einem modifizierten Strep-Tag kloniert. Im Anschluss erfolgten sowohl eine heterologe als auch eine homologe Produktion des rekombinanten Proteins und die Untersuchung der spezifischen Proteineigenschaften inklusive der enthaltenen prosthetischen Gruppen. Zuletzt wurden noch die Effekte einer homologen Produktion des Proteins Swit\_4395 auf den Organismus *S. wittichii* RW1 analysiert, sowie die native Konformation und die Lokalisierung des Enzyms in der Zelle bestimmt.

### 3.2.1 Bioinformatische Analyse des Chinoproteins Swit\_4395

Im Vorfeld der biologischen Charakterisierung sollten mittels einer bioinformatischen Analyse erste Erkenntnisse über die Struktur, Klassifikation, Lokalisierung und Funktion des Enzyms Swit\_4395 gewonnen werden.

Eine Untersuchung der konservierten Domänen der 377 Aminosäuren umfassenden Primärsequenz des Proteins Swit\_4395 mittels der CDD von NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) ergab die Zugehörigkeit zu der Superfamilie der löslichen Chinoproteine, die PQQ als prosthetische Gruppe nutzen. Zusätzlich konnte das Protein Swit\_4395 durch eine Suche mit der Proteindatenbank Interpro (<http://ebi.ac.uk/interpro/>) in die Familie der löslichen PQQ-abhängigen GSDH eingeteilt werden. Zu dieser Familie gehört auch die lösliche Glukose-Dehydrogenase (sGDH), deren Struktur aus einem sechs-blättrigen  $\beta$ -Propeller mit sechs viersträngigen  $\beta$ -Faltblättern (IPR11041) besteht. Eine Vorhersage der Sekundärstruktur des Proteins Swit\_4395 mittels Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) bestätigte das Vorhandensein von insgesamt 24  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (F40 – V45, W52 – F56, H61 – K67, R70 – S75, R80 – V84, A97 – G99, V101 – A103, L112 – A119, I126 – V134, T146 – A151, R163 – F166, L172 – M176, V195 – L198, V219 – Y222, G229 – D233, L238 – D240, K289 – W292, L301 – S305, A316 – A320, M325 – D330, A336 – Y342, I348 – Q353, V359 – D364 und R369 – P375). Zudem wurde eine  $\alpha$ -helikale Struktur am N-Terminus (R5 – T18) gefunden. Durch eine weiterführende Modellierung der putativen Tertiärstruktur (Abbildung 3.1) konnte auch die Struktur eines sechs-blättrigen  $\beta$ -Propellers als wahrscheinlich angenommen werden.

Eine BLAST-Suche nach homologen Proteinen mittels der nicht-redundanten Proteindatenbank von NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) ergab Homologien zu anderen putativen GSDHs von Organismen aus der Familie der Sphingomonadaceae, sowie *Xanthomonas*- und *Stenotrophomonas*-Arten, wobei die Identität Werte zwischen 57 und 59 % umfasste und die Ähnlichkeit Werte von 69 bis 72 %. Dazu zählten die GSDHs aus *Sphingomonas* sp KC8 (ZP\_09140235.1), *Sphingobium japonicum* (YP\_003545061.1) und *Sphingobium indicum* (ZP\_10221479.1), sowie aus *Xanthomonas sacchari* NCPPB 4393 (ZP\_09854496.1) und *Stenotrophomonas maltophilia* D457 (YP\_006183152.1).

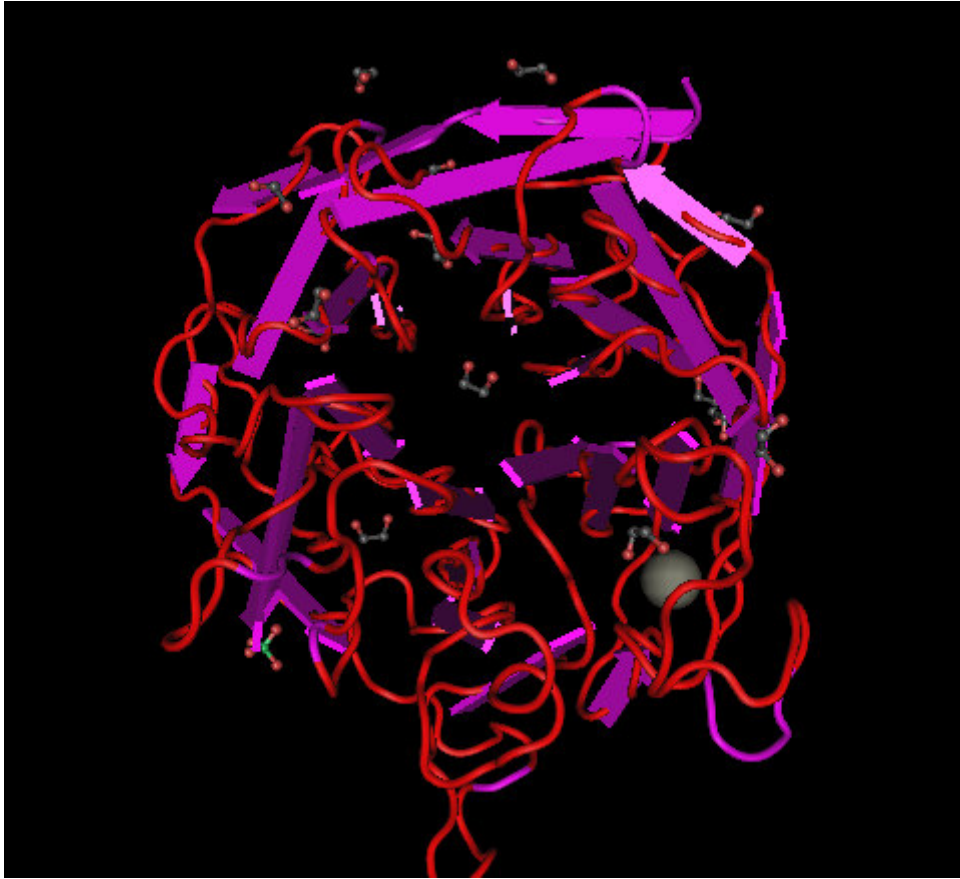


Abbildung 3.1: Modellierte Tertiärstruktur des Proteins Swit\_4395. Violett:  $\beta$ -Faltblattstrukturen, grauer Kreis:  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion. Für die Erstellung der Abbildung wurde das Programm Cn3D4.3.1 verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>) (Wang *et al.* 2000).

Eine weitere BLAST-Analyse gegen bereits charakterisierte Enzyme wurde mittels der SwissProt Datenbank durchgeführt. Dabei ergaben sich geringe Homologien (Identität: 30 – 38 %, Ähnlichkeit: 46 – 55 %) des Proteins Swit\_4395 gegenüber der GDH B (P13650) aus *A. calcoaceticus* (Cleton-Jansen *et al.* 1989) und der löslichen Aldose-Dehydrogenase Asd (P75804) aus *E. coli* (Southall *et al.* 2006).

Um die voraussichtliche Lokalisierung des Proteins Swit\_4395 in der Zelle zu bestimmen, wurde die Aminosäuresequenz auf mögliche Signalpeptide und Transmembrandomänen hin untersucht. Eine Analyse mittels des SignalP4.1 Servers (Petersen *et al.* 2011) ließ auf das Vorhandensein eines putativen Sec-abhängigen Signalpeptids im Bereich der Aminosäuren 1 bis 24 schließen. Zudem konnten mit dem TMHMM-Server (Sonnhammer *et al.* 1998; Krogh *et al.* 2001) keine TMHs gefunden werden.



Zusammengenommen konnte aus den Ergebnissen der bioinformatischen Analyse des Proteins Swit\_4395 geschlossen werden, dass es sich um ein periplasmatisches PQQ-abhängiges Chinoprotein aus der Familie der sGDH handelt.

### **3.2.2 Klonierung des Gens *swit\_4395* in den Überexpressionsvektor pBBR1p264\_ *pelB*\_Streplong**

Für die Überexpression des Gens *swit\_4395* wurde ein neuer Überexpressionsvektor, basierend auf dem Plasmid pBBR1p264 (Kallnik *et al.* 2010) konstruiert, der für einen modifizierten Strep-Tag mit einer verlängerten Linkersequenz kodieren sollte. Dazu wurde in einem ersten Schritt der Promotor p264 mit den Oligonukleotiden upstrepf (*PvuI*) und upstrep2r, sowie dem Plasmid pBBR1p264 als Matrize mittels PCR (siehe Abschnitt 2.4.3) amplifiziert. Parallel dazu wurde die Sequenz, die für den Strep-Tag II kodiert, aus dem Plasmid pASK-IBA3 (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland) mit den Oligonukleotiden dostrep2f und dpstrep2r (*AseI*) vervielfältigt. Die beiden Oligonukleotide upstrepf und dpstrep2f enthielten zudem Überhänge, die es ermöglichten, die beiden Fragmente in einer weiteren PCR miteinander zu fusionieren. Das Fusionsfragment, sowie das Plasmid pBBR1MCS-2 (Kovach *et al.* 1995) wurden anschließend mit den beiden Restriktionsendonukleasen *PvuI* und *AseI* verdaut, gereinigt und miteinander ligiert. Der Vektor pBBR1p264\_Streplong enthielt somit eine Promotorsequenz aus dem Essigsäurebakterium *G. oxydans* und eine kodierende Sequenz für einen Strep-Tag mit verlängerter Linkersequenz (APGGGSAWHPQFEK). Zudem war es nun möglich Gene stromabwärts der Promotorregion und im Leseraster vor den Strep-Tag zu klonieren und dabei die Restriktionsschnittstellen *SnaBI* und *AscI* zu verwenden.

In einem zweiten Schritt wurde eine Amplifizierung der Signalsequenz *pelB* mit dem Plasmid pET22(+) (Novagen, Darmstadt, Deutschland) als Matrize und den Oligonukleotiden PelB\_F (*XhoI*) und PelB\_R (*SnaBI*) mittels PCR durchgeführt. Das *pelB*-Fragment und der Vektor pBBR1p264\_Streplong wurden im Anschluss mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *SnaBI* geschnitten und mit der T4 DNA-Ligase verbunden. Der neue Überexpressionsvektor pBBR1p264\_ *pelB*\_Streplong enthielt nun zudem die Signalsequenz *pelB* aus *E. coli*.

Anschließend wurde mit dem GeneJet™ Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) genomische DNA von *S. wittichii* RW1 isoliert und als Matrize für die Amplifizierung des Gens *swit\_4395* (YP\_001264871), ohne die native Signalsequenz, eingesetzt. Dazu wurden die Oligonukleotide 4395\_for und 4395\_rev verwendet, die eine

*Sna*BI- beziehungsweise *Asc*I- Restriktionsschnittstelle aufwiesen. Nach der erfolgreichen Amplifizierung des Gens *swit\_4395*, wurden sowohl dieses, als auch der Vektor pBBR1p264\_*pelB*\_Streplong mit den Restriktionsendonukleasen *Sna*BI und *Asc*I geschnitten, die Fragmente gereinigt und anschließend miteinander ligiert. Der entstandene Überexpressionsvektor pBBR1p264\_*pelB*\_*swit\_4395*\_Streplong (Abbildung 3.2) wurde in pJZ1 umbenannt und mittels Hitzeschocktransformation (siehe Abschnitt 2.5.5.1) in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Zudem wurde der Vektor mittels Elektroporation (siehe Abschnitt 2.5.5.2) in den Stamm *S. wittichii* RW1 eingebracht.

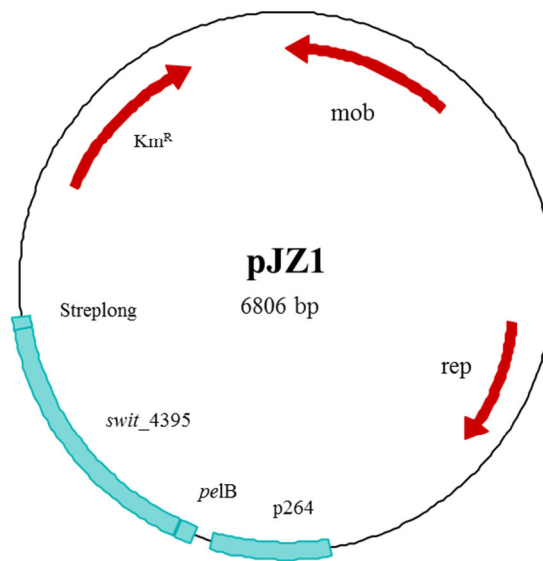


Abbildung 3.2: Plasmidkarte des Vektors pJZ1 mit dem Promotor p264, der Signalsequenz *pelB*, dem Gen *swit\_4395* und der kodierenden Sequenz für einen modifizierten Strep-Tag (Streplong).  $Km^R$ : Kanamycinresistenzkassette, *mob*: Mobilisierungsgen, *rep*: Replikationsursprung. Die Abbildung wurde mit der Software Clone Manager 9 (Scientific & Educational Software, Cary, North Carolina, USA) erstellt.

### 3.2.3 Heterologe und homologe Produktion des Proteins Swit\_4395 in *E. coli* und *S. wittichii* RW1

Die heterologe Überexpression des Proteins Swit\_4395 erfolgte in *E. coli* DH5 $\alpha$  (siehe Abschnitt 2.5.6). Standardmäßig wurden 100 mL-Kulturen in LB-Medium mit 50  $\mu$ g/mL Km, 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 5  $\mu$ M PQQ verwendet. Die homologe Überexpression wurde analog in *S. wittichii* RW1 durchgeführt, wobei zusätzlich 50  $\mu$ g/mL Sm zugesetzt wurden (siehe Abschnitt 2.5.7). Die Bakterienkulturen wurden bei 30 °C und unter Schütteln angezogen und

in der späten exponentiellen Phase geerntet. Anschließend erfolgte ein Ultraschallaufschluss und klares Lysat wurde für die Aufreinigung mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie verwendet (siehe Abschnitt 2.6.1). Eine Proteinbestimmung nach Bradford zeigte (siehe Abschnitt 2.6.2), dass sowohl bei der heterologen, als auch der homologen Produktion eine Ausbeute von drei Milligramm Protein pro Liter Kultur erzielt werden konnte. Die weitere Analyse des rekombinanten Proteins mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.6.3.1) zeigte eine distinkte Bande in Höhe von 40 kDa (Abbildung 3.3). Eine Berechnung der molaren Masse des Proteins Swit\_4395 aus der SDS-PAGE ergab einen Wert von 39,4 kDa. Dieses Ergebnis korreliert mit einer Berechnung anhand der Aminosäuresequenz ohne Signalpeptid, aber inklusive des verlängerten Strep-Tags (1555 kDa), was zu einer molaren Masse von 39,2 kDa führte.

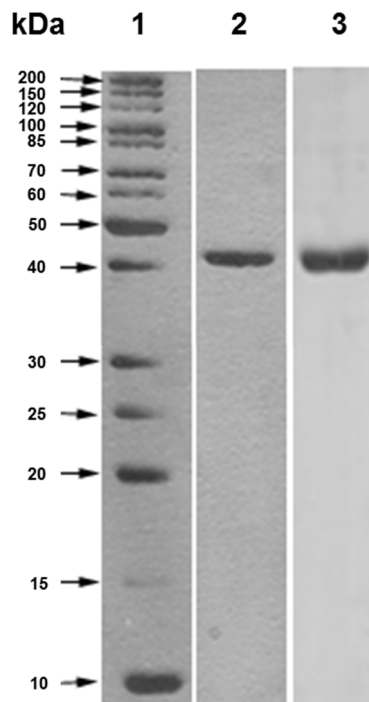


Abbildung 3.3: Gelelektrophoretische Auftrennung des rekombinanten Proteins Swit\_4395 nach heterologer beziehungsweise homologer Produktion und Aufreinigung mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE in einem 12,5 %-igen Sammelgel. Die Visualisierung der Proteine geschah durch eine Silberfärbung. Spur 1: PageRuler™ Unstained Protein ladder (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland), Spur 2: Swit\_4395 - heterolog produziert in *E. coli* DH5a. Spur 3: Swit\_4395 – homolog produziert in *S. wittichii* RW1

Diese Resultate wurden zudem durch Ergebnisse aus der Massenspektrometrie (Dr. Marc Sylvester, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) unterstützt, die eine Größe von 39329,82 Da für das Protein Swit\_4395 bestimmt hatte (Abbildung 3.4).

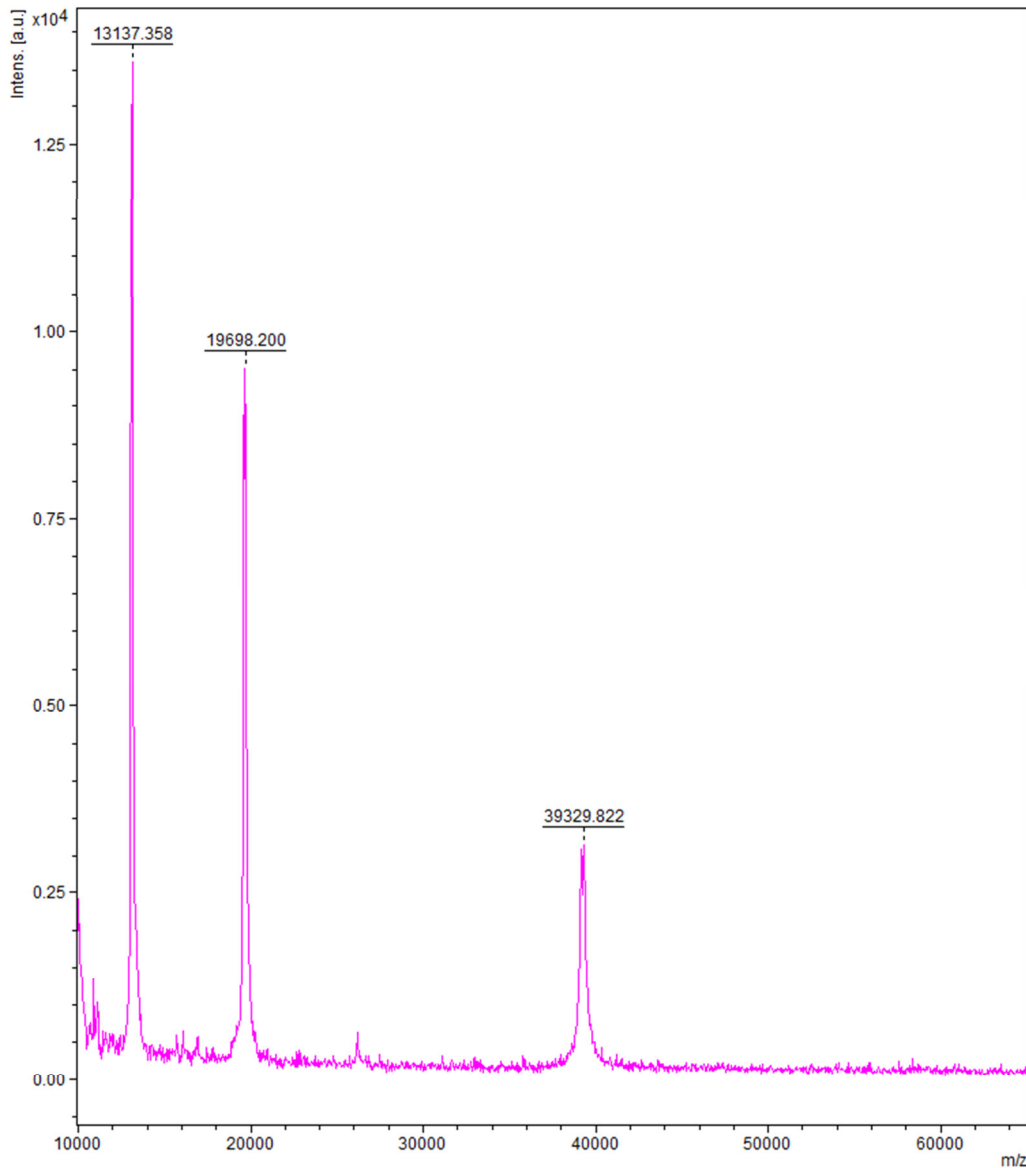


Abbildung 3.4: Massenspektrum einer Probe des Proteins Swit\_4395. Die Einheit der Intensität wurde willkürlich gewählt. Die Messung wurde von Dr. Marc Sylvester vom Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn durchgeführt.

Im Zuge der Untersuchungen mittels Massenspektrometrie wurde auch der Versuch einer N-Terminalen Sequenzierung unternommen um die Prozessierung des Proteins zu überprüfen. Die ermittelte molare Masse des Proteins Swit\_4395 ließ darauf schließen, dass N-Terminal ein Signalpeptid abgeschnitten wurde und das prozessierte Protein mit A22 oder Y23 als Start vorlag, wobei auch V24 möglich war.

### **3.2.4 Untersuchung des Substratspektrums des Enzyms Swit\_4395**

Die Ermittlung des Substratspektrums des Enzyms Swit\_4395 erfolgte mittels Enzymaktivitätstest bei 25 °C in 40 mM KP-Puffer, wobei Ferricyanid als artifizieller Elektronenakzeptor eingesetzt wurde (siehe Abschnitt 2.7.2). Neben Ferricyanid konnte auch DCPIP als artifizieller Elektronenakzeptor verwendet werden, allerdings führte das zu einer Verringerung der spezifischen Aktivitäten des Enzyms Swit\_4395 um 50 %, in einigen Fällen sogar um fast 75 %. Insgesamt wurden 142 verschiedene Substrate getestet, wobei mit 26 davon eine katalytische Aktivität festgestellt werden konnte.

Entsprechend der Annotation als GSDH zeigte das Enzym Swit\_4395 eine spezifische Aktivität mit L-Sorbose von  $180 \pm 20$  U/mg, sowie mit D-Glukose ( $50 \pm 10$  U/mg) und L-Sorbose ( $20 \pm 10$  U/mg). Demgegenüber wurden sehr viel höhere Enzymaktivitäten mit den aliphatischen Aldehyden Methanal ( $640 \pm 200$  U/mg), Ethanal ( $930 \pm 100$  U/mg), Propanal ( $1740 \pm 370$  U/mg), Butanal ( $2470 \pm 340$  U/mg), Pentanal ( $1450 \pm 40$  U/mg), Hexanal ( $680 \pm 40$  U/mg), 3-Methylbutanal ( $770 \pm 30$  U/mg) und 2-Methylpentanal ( $160 \pm 30$  U/mg) gemessen (Tabelle 3.3).

Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass das Enzym Swit\_4395 die beiden Hydroxyaldehyde 2-Hydroxyethanal ( $1060 \pm 230$  U/mg) und 2,3-Dihydroxypropanal ( $300 \pm 80$  U/mg) oxidiert, sowie die Ketoaldehyde Phenylglyoxal ( $1900 \pm 380$  U/mg) und 2-Oxopropanal (Methylglyoxal) ( $1690 \pm 60$  U/mg). Weiterhin konnte das Enzym Swit\_4395 die Dialdehyde Ethandial (Glyoxal) ( $1050 \pm 320$  U/mg) und 1,5-Pentandial ( $720 \pm 60$  U/mg) als Substrate nutzen, was ebenso mit Benzencarbaldehyd ( $920 \pm 250$  U/mg), 3-Phenylpropanal ( $750 \pm 200$  U/mg) und 3-Methylbenzaldehyd ( $1170 \pm 70$  U/mg) auf drei aromatische Aldehyde zutrifft (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Substratspektrum des Enzyms Swit\_4395

	<b>Substrat<sup>a</sup></b>	<b>Aktivität [U/mg]<sup>b</sup></b>
<b>Aliphatische Aldehyde</b>	Methanal (Formaldehyd)	640 ± 200
	Ethanal (Acetaldehyd)	930 ± 100
	Propanal (Propionaldehyd)	1740 ± 370
	Butanal (Butyraldehyd)	2470 ± 340
	Pentanal (Valeraldehyd)	1450 ± 40
	Hexanal (Hexanaldehyd)	680 ± 40
	3-Methylbutanal (Isovaleraldehyd)	770 ± 30
	2-Methylpentanal	160 ± 30
<b>Ketoaldehyde</b>	Phenylglyoxal	1900 ± 380
	2-Oxopropanal (Methylglyoxal)	1690 ± 60
<b>Aromatische Aldehyde</b>	Benzencarbaldehyd (Benzaldehyd)	920 ± 250
	3-Phenylpropanal (Hydrozimtaldehyd)	750 ± 200
	3-Methylbenzaldehyd ( <i>m</i> -Toluolaldehyd)	1170 ± 70
<b>Dialdehyde</b>	Ethandial (Glyoxal)	1050 ± 320
	1,5-Pentandial (Glutaraldehyd)	720 ± 60
	L-Sorboson	180 ± 20
<b>Hydroxyaldehyde</b>	2-Hydroxyethanal (Glycoaldehyd)	1060 ± 230
	2,3-Dihydroxypropanal (DL-Glyceraldehyd)	300 ± 80
<b>Aldosen/Ketosen</b>	D-Glukose	50 ± 10
	L-Sorbose	20 ± 10

<sup>a</sup> UIPAC-Bezeichnung, Trivialnamen in Klammern

<sup>b</sup> Mittelwerte der spezifischen Aktivitäten des Enzyms Swit\_4395 aus drei unabhängigen Enzympräparationen

Weniger als fünf Prozent der Aktivität des Substrates mit der höchsten spezifischen Aktivität, Butanal, wurde mit D-Fruktose, Heptanal, 2-Ketoglukonat, 2-Keto-D-Glukose, Maltose, Meso-Erythritol und Succinatsemialdehyd erzielt.

Zudem konnte keine Umsetzung von elf primären oder sekundären Alkoholen, sieben Diolen, einem Triol, vier zyklischen Alkoholen, fünf Zuckeralkoholen, vier Ketonen, sechs Zuckern, zwölf anderer Aldehyde und fünf weiterer Substrate beobachtet werden (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Substrate mit denen das Enzym Swit\_4395 weniger als 5 % der spezifischen Aktivität verglichen mit Butanal zeigte

<b>Primäre Alkohole</b>	1-Butanol, Ethanol, 1-Heptanol, 1-Hexanol, Methanol, 1-Octanol
<b>Sekundäre Alkohole</b>	2-Butanol, 2-Hexanol, 3-Hexanol, 3-Pentanol, 2-Propanol
<b>Dirole / Triole</b>	1,2-Butandiol, 1,3-Butandiol, 1,4-Butandiol, 2,3-Butandiol, 1,2-Hexandiol, 1,2,3-Hexantriol, 2,4-Pentandiol, 1,3-Propandiol
<b>Zuckeralkohole</b>	D-Arabitol, L-Arabitol, D-Mannitol, D-Ribitol, D-Sorbitol
<b>Zyklische Alkohole</b>	1,4-Cyclohexandiol, <i>cis/trans</i> -1,2-Cyclopentandiol, <i>cis/trans</i> -1,4-Cyclopentandiol, Myo-Inositol
<b>Ketone</b>	3-Buten-2-on, 3-Penten-2-on, 2,3-Pentandion, 1-Phenyl-1,2-propandion
<b>Zucker</b>	D-Galaktose, D-Mannose, D-Ribose, D-Ribulose, D-Tagatose, D-Xylose
<b>Aldehyde</b>	Cinnamaldehyd, Decylaldehyd, Dodecylaldehyd, 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyd, 2-Methylbenzaldehyd, Nonylaldehyd, Octylaldehyd, Phenylacetaldehyd, Salicylaldehyd, <i>o</i> -Toluolaldehyd, <i>p</i> -Toluolaldehyd, Undecylaldehyd
<b>Sonstige Substrate</b>	Acetoin, Glukonat, Glukonsäure- $\delta$ -lacton, Glukose-6-phosphat, 5-Ketoglukonat

Auffällig war zudem, dass die Oxidation von aliphatischen Aldehyden von der Anzahl der C-Atome abhängig war. Das Enzym Swit\_4395 oxidierte bevorzugt Aldehyde mittlerer Kettenlänge. Kurzkettige Aldehyde wurden weniger effektiv umgesetzt und die Oxidation langkettiger Aldehyde konnte nicht beobachtet werden.

Anhand des beschriebenen Substratspektrums wurde das Enzym Swit\_4395 als ALDH klassifiziert.

### 3.2.5 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen und der kinetischen Eigenschaften der ALDH Swit\_4395

Für die Charakterisierung des Enzyms Swit\_4395 mussten zuerst die optimalen Reaktionsbedingungen bestimmt werden. Dazu wurden die Temperatur- und pH-Optima, sowie der Einfluss unterschiedlicher Puffer und Inhibitoren untersucht. Zudem wurden Experimente mit den zwei artifiziellen Elektronenakzeptoren DCPIP und Ferricyanid

durchgeführt. Einleitende Untersuchungen zeigten, dass das Enzym Swit\_4395 mit Ferricyanid als Elektronenakzeptor bis zu dreimal höhere spezifische Aktivitäten zeigte, als mit DCPIP. Aus diesem Grund wurden soweit möglich alle Experimente mit Ferricyanid als künstlichen Elektronenakzeptor durchgeführt.

### 3.2.5.1 Bestimmung des Temperaturoptimums des Enzyms Swit\_4395

Die optimale Reaktionstemperatur für das Enzym Swit\_4395 wurde im Bereich zwischen 20 und 85 °C ermittelt. Dazu wurde die spezifische Aktivität des Enzyms mit 25 mM Butanal und Ferricyanid als Elektronenakzeptor bestimmt. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Reaktionstemperatur ist beispielhaft für eine Präparation in Abbildung 3.5 dargestellt. Das Temperaturoptimum lag bei 30 °C, was der optimalen Wachstumstemperatur von *S. wittichii* RW1 entsprach. Oberhalb von 30 °C sank die spezifische Aktivität des Enzyms Swit\_4395 nur langsam und erreichte bei einer Temperatur von 75 °C noch 50 % der Aktivität, die bei dem Temperaturoptimum erzielt werden konnte. Diese Ergebnisse ließen auf eine gewisse Thermostabilität des Enzyms Swit\_4395 schließen.

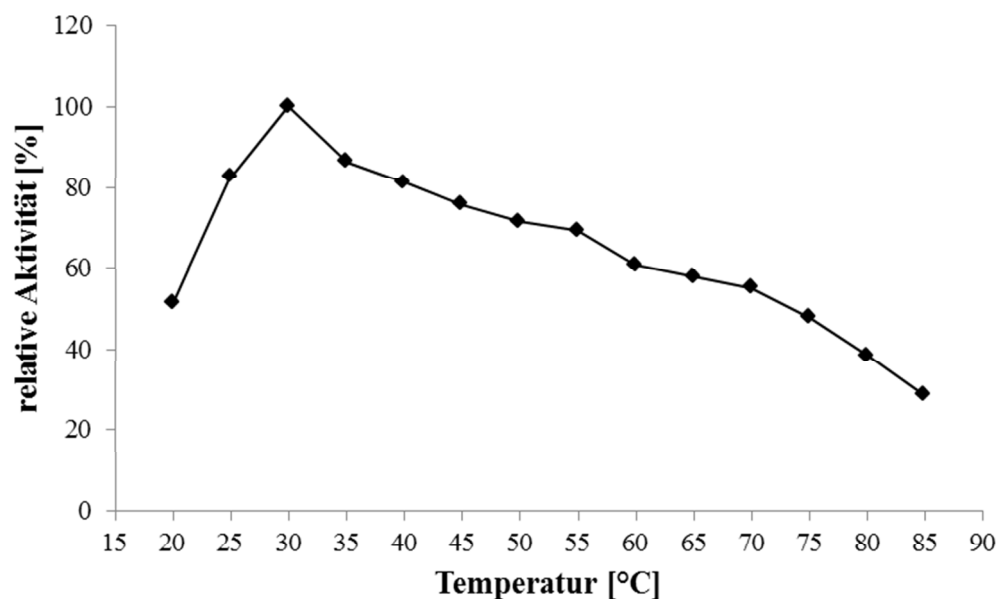


Abbildung 3.5: Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms Swit\_4395 von der Reaktionstemperatur. Beispielhaft dargestellt für eine Enzympräparation. Die spezifische Aktivität wurde mit 25 mM Butanal und 1 mM Ferricyanid bei pH 8 bestimmt. Die höchste Aktivität ( $2470 \pm 340$  U/mg) wurde auf 100 % gesetzt.



### 3.2.5.2 Messung des pH-Optimums und der pH-Stabilität des Protein Swit\_4395

Die Bestimmung des pH-Optimums des Enzyms Swit\_4395 wurde mit der Methode von Salusjärvi *et al.* (2004) (siehe Abschnitt 2.7.4) durchgeführt. Dazu wurde die spezifische Aktivität mit 25 mM Butanal und Ferricyanid bei unterschiedlichen pH-Werten zwischen 5 und 10 gemessen. Dabei zeigte sich ein breiter Optimumsbereich zwischen 8 und 10, wobei das Maximum bei pH 9,5 lag (Abbildung 3.6).

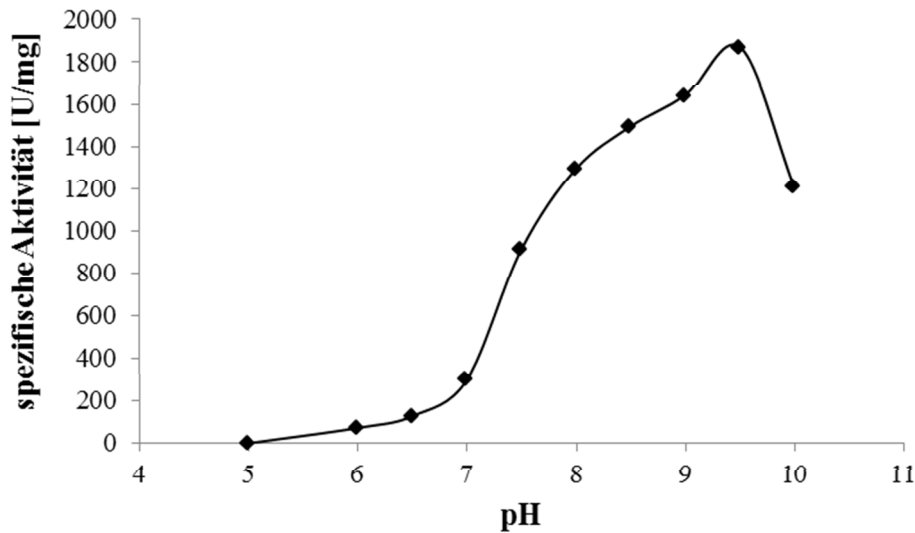


Abbildung 3.6: Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms Swit\_4395 von dem pH-Wert. Die spezifische Aktivität wurde jeweils mit 25 mM Butanal als Substrat und 1 mM Ferricyanid als Elektronenakzeptor bei 25 °C und unterschiedlichen pH-Werten im Bereich zwischen 5 und 10 gemessen. Dargestellt ist der Verlauf für eine Enzympräparation. Messungen zweier weiterer Enzympräparationen entsprachen den hier gezeigten Daten.

Da die Halbwertszeit des Enzyms Swit\_4395 bei dem pH-Optimum von 9,5 bei weniger als fünf Minuten lag, wurden alle folgenden Enzymtests bei pH 8 durchgeführt.

### 3.2.5.3 Einfluss von Ionen und Inhibitoren auf die Aktivität des Enzyms Swit\_4395

Der Effekt von Metallionen und Inhibitoren auf die Enzymaktivität von Swit\_4395 wurde untersucht, indem dem Reaktionsansatz jeweils 10 mM der Metallionen zugesetzt wurden. Anschließend wurde die spezifische Aktivität des Enzyms Swit\_4395 mit 25 mM Butanal und Ferricyanid als artifiziellen Elektronenakzeptor gemessen. Die Aktivität ohne Zusätze wurde auf 100 % festgelegt. Um die Auswirkungen des Komplexbildners EDTA zu bestimmen, wurde das Enzym im Vorfeld für zehn Minuten mit einem beziehungsweise zehn Millimolar

EDTA inkubiert. Es zeigte sich, dass das Vorhandensein von  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  und  $\text{MgCl}_2$  keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hatte (Abbildung 3.7). Zudem konnte durch Zugabe von  $5 \mu\text{M}$  PQQ kein Effekt erzielt werden, da das Enzym Swit\_4395 bereits vollständig mit PQQ beladen war. Nach der Inkubation mit  $1 \text{ mM}$  beziehungsweise  $10 \text{ mM}$  EDTA konnte eine Verringerung der Aktivität um  $25 \%$  respektive  $50 \%$  festgestellt werden. Diese Beobachtung war darauf zurückzuführen, dass EDTA Calcium-Ionen komplexiert und diese nicht mehr für den Einbau in das aktive Zentrum von Chinoproteinen zur Verfügung standen. Weiterhin wurde die Enzymaktivität von Swit\_4395 durch Zugabe von jeweils  $10 \text{ mM}$   $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  und  $\text{FeCl}_3$  vollständig inhibiert.

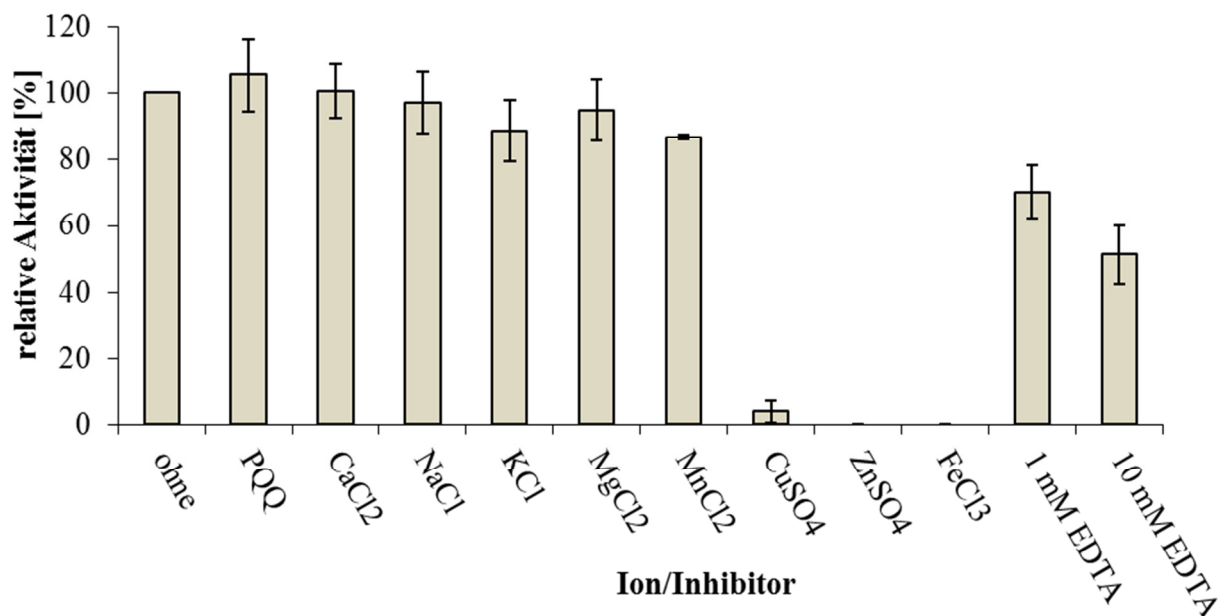


Abbildung 3.7: Einfluss von Metallionen und Inhibitoren auf die Aktivität des Enzyms Swit\_4395. Der Reaktionsansatz enthielt  $1 \text{ mM}$  Ferricanid,  $25 \text{ mM}$  Butanal,  $10 \text{ nM}$  Enzym und  $40 \text{ mM}$  KP-Puffer ( $\text{pH } 8$ ) in einem Volumen von  $1 \text{ mL}$ . Zusätzlich wurde dem Reaktionsansatz jeweils eine der folgenden Komponenten zugesetzt:  $5 \mu\text{M}$  PQQ,  $10 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $10 \text{ mM}$   $\text{NaCl}$ ,  $10 \text{ mM}$   $\text{KCl}$ ,  $10 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $10 \text{ mM}$   $\text{MnCl}_2$ ,  $10 \text{ mM}$   $\text{CuSO}_4$ ,  $10 \text{ mM}$   $\text{ZnSO}_4$ ,  $10 \text{ mM}$   $\text{FeCl}_3$ ,  $1 \text{ mM}$  EDTA oder  $10 \text{ mM}$  EDTA. Die Daten stellen Mittelwerte dreier unterschiedlicher Enzympräparationen dar, wobei die Aktivität ohne jegliche Zusätze jeweils auf  $100 \%$  gesetzt wurde.

### 3.2.5.4 Kinetische Parameter des Enzyms Swit\_4395 für die Substrate Butanal und Glyoxal

Die kinetischen Parameter des Enzyms Swit\_4395 für die beiden Substrate Butanal und 2-Oxopropanal (Glyoxal) wurde durch nicht-lineare Regression der Michaelis-Menten-Daten bestimmt. Dazu wurde die spezifische Aktivität des Enzyms mit unterschiedlichen Konzentrationen an Substrat im Bereich von 2,5 bis 25 mM (Butanal) beziehungsweise 2,5 bis 110 mM (2-Oxopropanal) gemessen und anschließend die  $V_{\max}$ ,  $K_M$  und die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ) berechnet.

Für das Substrat Butanal konnte eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von  $3970 \pm 200$  U/mg bestimmt werden. Die Butanalkonzentration bei der die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht wurde lag bei  $12,3 \pm 1,2$  mM und für die katalytische Effizienz wurde ein Wert von  $2,2 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  ermittelt (Tabelle 3.5). Die entsprechenden Werte für das Substrat 2-Oxopropanal lagen bei  $4210 \pm 211$  U/mg,  $65,8 \pm 6,3$  mM und  $4,3 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

Tabelle 3.5: Kinetische Parameter des Enzyms Swit\_4395 für Butanal und Glyoxal

Substrat	$V_{\max}$ [U/mg]	$K_M$ [mM]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\text{s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ]
Butanal	$3970 \pm 200$	$12,3 \pm 1,2$	$2,2 \times 10^5$
2-Oxopropanal	$4210 \pm 211$	$65,8 \pm 6,3$	$4,3 \times 10^4$

Da die katalytische Effizienz des Enzyms Swit\_4395 für das Substrat Butanal höher lag als die für 2-Oxopropanal, wurden die weiteren Versuche mit Butanal durchgeführt.

### 3.2.6 Analyse der prosthetischen Gruppe PQQ des Proteins Swit\_4395

Das Protein Swit\_4395 war als Chinoprotein annotiert, was bedeutet, dass die prosthetische Gruppe PQQ sein musste. Um diese These zu bestätigen wurden zunächst UV-VIS-Spektren von gereinigtem Protein und einem PQQ-Extrakt mit einem Spektrum von kommerziell erhältlichen PQQ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verglichen. Der PQQ-Extrakt wurde aus gereinigtem Protein mittels Methanol/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Extraktion (Duine & Frank 1981) gewonnen. Das UV-VIS-Spektrum des Proteins Swit\_4395 zeigte typische Absorptionsmaxima von Proteinen bei 220 nm und 280 nm, sowie ein Maximum bei ungefähr 340 nm (Abbildung 3.8 oben). Der PQQ-Extrakt (Abbildung 3.8 Mitte), sowie das kommerziell erhältliche PQQ (15  $\mu\text{M}$ ) hatten jeweils ein Absorptionsmaximum im Bereich von 340 nm und eines bei etwa 270 nm (Abbildung 3.8 unten).

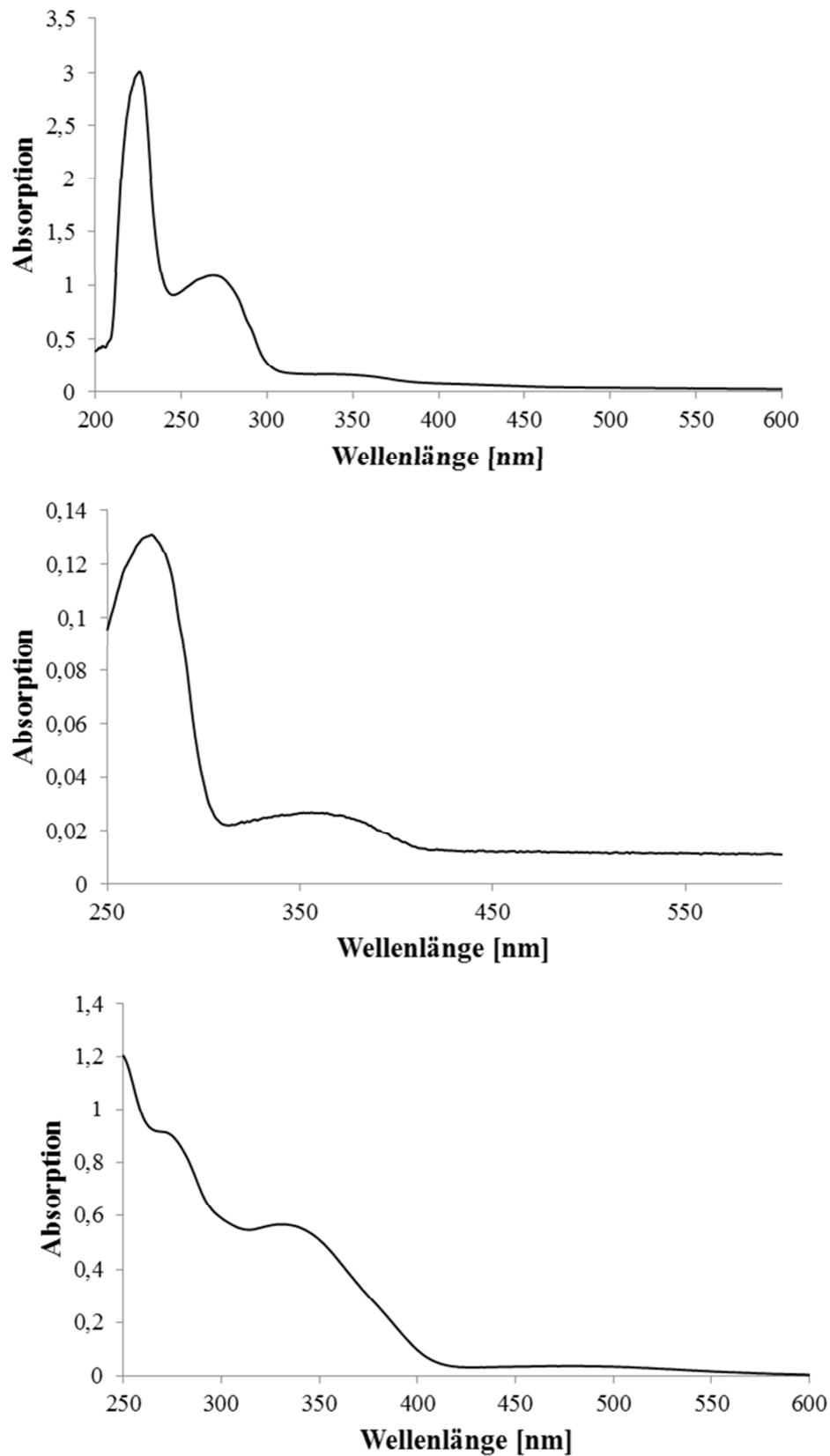


Abbildung 3.8: UV-VIS-Spektren von dem Enzym Swit\_4395 (oben), PQQ-Extrakt (Mitte) und 15 µM kommerziell erhältlichen PQQ (unten).

Eine Berechnung des PQQ-Gehalts in der oxidierten Form aus dem Spektrum des Proteins Swit\_4395 (Abbildung 3.8) ergab 0,95 Mol PQQ pro Mol Enzym. Aus dem Vergleich der UV-VIS-Spektren des PQQ-Extraktes und des kommerziell erhältlichen PQQ konnte ein Wert von 0,9 ermittelt werden. Diese Ergebnisse sprachen dafür, dass ein Mol des Enzyms Swit\_4395 ein Mol PQQ bindet.

Zudem wurden während der Titration der oxidierten Form des Enzyms Swit\_4395 mit Butanal unter anaeroben Bedingungen kontinuierlich Spektren aufgenommen. Dabei konnte die Anwesenheit von PQQ durch die zunehmende Erhöhung der Absorption bei 340 nm bestätigt werden (Abbildung 3.9).

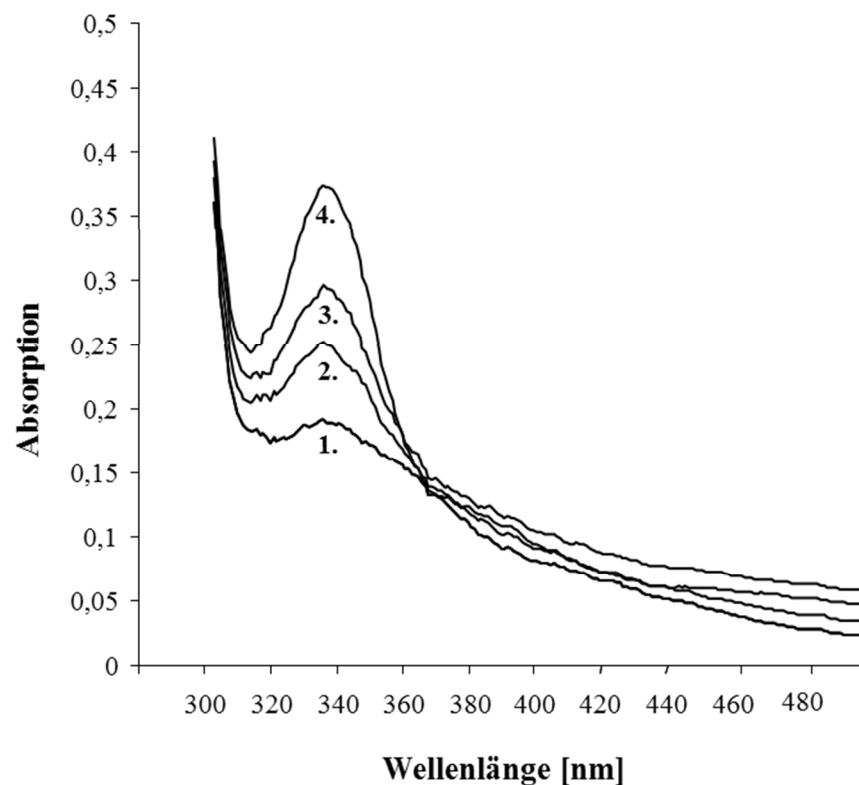


Abbildung 3.9: UV-VIS-Spektren des Enzyms Swit\_4395 während einer Titration mit Butanal. 150  $\mu\text{g}$  des Enzyms in 300  $\mu\text{L}$  KP-Puffer wurden unter anaeroben Bedingungen mit Butanal titriert und währenddessen kontinuierlich UV-VIS-Spektren aufgenommen. 1.) Spektrum ohne Zugabe von Butanal; 2.) Spektrum nach Zugabe von 1 nmol Butanal; 3.) Spektrum nach Zugabe von weiteren 1 nmol Butanal; 4.) Spektrum nach Zugabe von insgesamt 10 nmol Butanal

### 3.2.7 Rekonstitution des Enzyms Swit\_4395 mit unterschiedlichen Kationen und seltenen Erden

Neben der Analyse der prosthetischen Gruppe PQQ wurde untersucht wie sich die Verwendung unterschiedlicher zweiwertiger Kationen auf die Aktivität des Enzyms Swit\_4395 auswirkt. Dazu wurde die Rekonstitution des Apoenzyms zur Bildung des Holoenzym mit verschiedenen Ionen durchgeführt. Neben  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  wurden die zwei seltenen Erden Cerium ( $\text{Ce}^{3+}$ ) und Lanthanum ( $\text{La}^{3+}$ ) getestet. Zudem wurde eine Kontrolle ohne Ionen, nur mit PQQ im Ansatz, durchgeführt. Die Rekonstitution erfolgte jeweils bei Raumtemperatur für zehn Minuten in Puffer mit je 10 mM der Kationen und 5  $\mu\text{M}$  PQQ. Im Anschluss an die Rekonstitution wurde die spezifische Aktivität des Enzyms Swit\_4395 mit Phenylglyoxal als Substrat bestimmt. Dazu wurden drei verschiedene Enzympräparationen jeweils in Doppelbestimmung getestet. Die höchste spezifische Aktivität zeigte die ALDH Swit\_4395 nach einer Rekonstitution mit PQQ und  $\text{Ca}^{2+}$  mit einer mittleren Aktivität von  $1257 \pm 265$  U/mg. Mit  $\text{Mg}^{2+}$ - anstatt  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurde immer noch eine Aktivität von  $766 \pm 81$  U/mg festgestellt und selbst nach einer Rekonstitution ohne Kationen nur mit dem Cofaktor PQQ betrug die Aktivität im Mittel noch  $467 \pm 130$  U/mg. Mit Barium, Mangan, Cerium und Lanthanum jedoch zeigte Swit\_4395 jeweils nur noch Aktivitäten von  $226 \pm 156$ ,  $35 \pm 25$ ,  $27 \pm 16$  und  $32 \pm 16$  U/mg (Tabelle 3.6). Daraufhin wurde die Aktivität des Enzyms Swit\_4395 mit Calcium-Ionen auf 100 % festgelegt und alle anderen Aktivitäten dazu in Beziehung gesetzt. So konnte gezeigt werden, dass das Enzym Swit\_4395 mit Magnesium-Ionen immer noch zwei Drittel der maximalen Aktivität aufwies, sowie ohne Ionen eine Basisaktivität von einem Drittel der Gesamtaktivität vorhanden war. Dies ließ darauf schließen, dass der Ansatz nicht vollständig frei von Calcium-Ionen war und  $\text{Mg}^{2+}$  das  $\text{Ca}^{2+}$  teilweise ersetzen konnte. Mit Barium hingegen trat bereits eine Inhibierung des Enzyms auf etwa die Hälfte der Basisaktivität ein, während die katalytische Aktivität des Proteins mit Mangan, Cerium und Lanthanum vollständig inhibiert wurde.

Tabelle 3.6: Aktivität von Swit\_4395 nach Rekonstitution mit verschiedenen Metallionen

Ion	---	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ba}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	$\text{Ce}^{3+}$	$\text{La}^{3+}$
Aktivität [U/mg] <sup>a, b</sup>	$467 \pm 130$	$1257 \pm 265$	$766 \pm 81$	$226 \pm 156$	$35 \pm 25$	$27 \pm 16$	$32 \pm 16$

<sup>a</sup> Mittelwert der Aktivitäten von drei separaten Enzympräparationen.

<sup>b</sup> Die Rekonstitution erfolgte mit je 10 mM der Metallionen und 5  $\mu\text{M}$  PQQ in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8

### 3.2.8 Lokalisierung des Proteins Swit\_4395

Die bioinformatische Analyse des Proteins Swit\_4395 (siehe Abschnitt 3.2.1) deutete bereits das Vorhandensein eines Sec-abhängigen Signalpeptids und damit verbunden die Lokalisierung im Periplasma an. Für die experimentelle Überprüfung dieser Hypothese wurden Zellen von *S. wittichii* RW1 pJZ1, sowie *S. wittichii* RW1 pBBR1p264\_Streplong, als Kontrolle, vollständig in Cytoplasma, Membranen und Periplasma fraktioniert (siehe Abschnitt 2.5.10). Im Anschluss wurde die Aldehyd-oxidierende Aktivität in den drei Fraktionen gemessen. In Tabelle 3.7 ist dargestellt, dass in dem Stamm *S. wittichii* RW1 pBBR1p264\_Streplong, weder im Periplasma, noch im Cytoplasma oder der Membranfraktion eine nennenswerte katalytische Aktivität mit Butanal oder Ethanal festgestellt werden konnte. In dem Stamm *S. wittichii* RW1 pJZ1 konnte ausschließlich im Periplasma eine Oxidation von Aldehyden festgestellt werden. Dabei wies die Periplasmafraktion spezifische Aktivitäten von  $398 \pm 57$  U/mg mit Butanal und  $153 \pm 7$  U/mg mit Ethanal auf (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Aldehydoxidation in subzellulären Fraktionen von *S. wittichii* RW1

Stamm	Fraktion	Butanal [U/mg] <sup>a</sup>	Ethanal [U/mg] <sup>a</sup>
<i>S. wittichii</i> pJZ1	Periplasma	$398 \pm 57$	$153 \pm 7$
	Cytoplasma	0,8	ND
	Membran	ND	0,3
<i>S. wittichii</i> pBBR1p264_Streplong	Periplasma	ND	ND
	Cytoplasma	ND	0,1
	Membran	ND	0,3

ND: nicht detektiert

<sup>a</sup> Oxidation von Butanal beziehungsweise Ethanal mit DCPIP als Elektronenakzeptor

Um Kontaminationen des Periplasmas durch Cytoplasma auszuschließen wurden Standardtests für die Erfassung der Aktivität von drei cytoplasmatischen Enzymen sowohl in der Cytoplasmafraktion, als auch in der Periplasmafraktion durchgeführt (siehe Abschnitt 2.5.10.3). Dazu wurde die Aktivität der Malat-DH, der G6PDH und der 6PGDH gemessen (Tabelle 3.8). Die Aktivität der G6PDH und der 6PGDH konnte mit  $451$  mU/mg beziehungsweise  $450$  mU/mg zu 100 % dem Cytoplasma zugerechnet werden. Die Oxidation von Malat zu Oxalacetat durch die Malat-DH in dem Kontrollstamm und dem Expressionsstamm fand mit  $9,07$  U/mg beziehungsweise  $9,02$  U/mg zu 97 % im Cytoplasma

und mit jeweils 0,29 U/mg nur zu 3 % im Periplasma statt. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Periplasmafraktion frei von Bestandteilen des Cytoplasmas präpariert wurde.

Tabelle 3.8: Aktivität von drei cytoplasmatischen Dehydrogenasen im Cyto- und Periplasma von *S. wittichii*

Stamm	Fraktion	Malat-DH [%]	G6PDH [%]	6PGDH [%]
<i>S. wittichii</i> pJZ1	Periplasma	3	0	0
	Cytoplasma	97	100	100
<i>S. wittichii</i> pBBR1p264_SL	Periplasma	3	0	0
	Cytoplasma	97	100	100

### 3.2.9 Native Konformation des Enzyms Swit\_4395

Die Bestimmung der nativen Konformation des Proteins Swit\_4395 erfolgte mittels nativer PAGE (siehe Abschnitt 2.6.3.2). In einer anschließenden Silberfärbung konnte eine Bande in Höhe von 450 kDa, sowie eine weitere schwächerer Bande bei 330 kDa detektiert werden (Abbildung 3.10). Eine PQQ-spezifische Aktivitätsfärbung (Toyama *et al.* 1995) zeigte zudem, dass beide Polymere mit Butanal katalytisch aktiv waren (Abbildung 3.10).

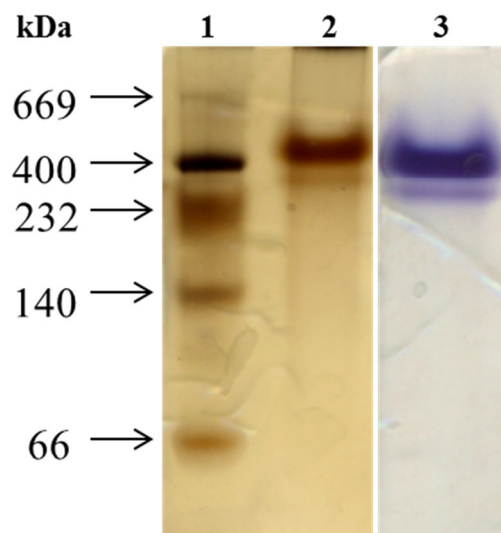


Abbildung 3.10: Native PAGE des Proteins Swit\_4395. Spur 1: HMW Native Marker (GE Healthcare, Solingen, Deutschland), Spur 2: Swit\_4395 nach einer Silberfärbung, Spur 3: Swit\_4395 nach einer Aktivitätsfärbung mit Butanal (siehe Abschnitt 2.6.3.4)



Diese Ergebnisse zeigten, dass das Protein Swit\_4395 in zwei nativen Konformationen vorlag und sowohl ein Homododekamer, als auch ein Homooktamer bildete.

### **3.2.10 Auswirkungen der homologen Produktion des Enzyms Swit\_4395 auf die Butanaltoleranz von *S. wittichii* RW1**

Das Enzym Swit\_4395 zeigte seine höchste spezifische Aktivität mit dem toxischen Aldehyd Butanal. Da die physiologische Funktion des Enzyms nicht bekannt war, wurde vermutet, dass es an der Detoxifizierung von Aldehyden beteiligt sein könnte. Daher wurde die Konzentration an Butanal im Wachstumsmedium bestimmt, bei der ein sichtbares Wachstum von *S. wittichii* RW1 noch zu beobachten war. Dazu wurden der Überexpressionsstamm *S. wittichii* RW1 pJZ1, sowie der Kontrollstamm *S. wittichii* RW1 pBBR1p264\_Streplong in LB-Medium mit 5  $\mu$ M PQQ und 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , sowie zusätzlich Butanalkonzentrationen zwischen 50  $\mu$ M und 100 mM kultiviert. Es zeigte sich, dass der Wildtyp-Stamm ein Wachstum bis zu 30 mM Butanal aufwies, während der Überexpressionsstamm noch 80 mM Butanal tolerierte.

In Anbetracht dieser Ergebnisse wurden Wachstumsexperimente mit beiden Stämmen und Konzentrationen an Butanal von 0, 5, 15 und 50 mM bei 30 °C durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Überexpressionsstamm bei allen Butanalkonzentrationen Wachstum zeigte, wobei die Lag-Phase mit 15 mM Butanal auf zehn Stunden und mit 50 mM Butanal auf 20 Stunden verlängert war (Abbildung 3.11). Der Kontrollstamm zeigte mit 50 mM Butanal kein messbares Wachstum mehr, zudem waren die Lag-Phasen bereits bei 5 und 15 mM Butanal mit 20 und 40 Stunden stark erhöht.

Bei einem Wachstum ohne den Einfluss von Butanal verhielten sich die Länge der Lag-Phase (drei Stunden), sowie die Verdopplungszeit (2,7 Stunden) der beiden Stämme identisch (

Tabelle 3.9). Demnach hatte die konstitutive Überexpression des Gens *swit\_4395* keinen Einfluss auf das Wachstum von *S. wittichii* RW1. Nach dem Erreichen der exponentiellen Phase zeigten zudem die Verdopplungszeiten der beiden Stämme mit 3,4 bis 3,7 Stunden sehr ähnliche Werte. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Expression des Gens *swit\_4395* in dem Kontrollstamm durch die Anwesenheit von Butanal induziert wurde und Butanal ebenso effizient abgebaut wurde, wie in dem Expressionsstamm.

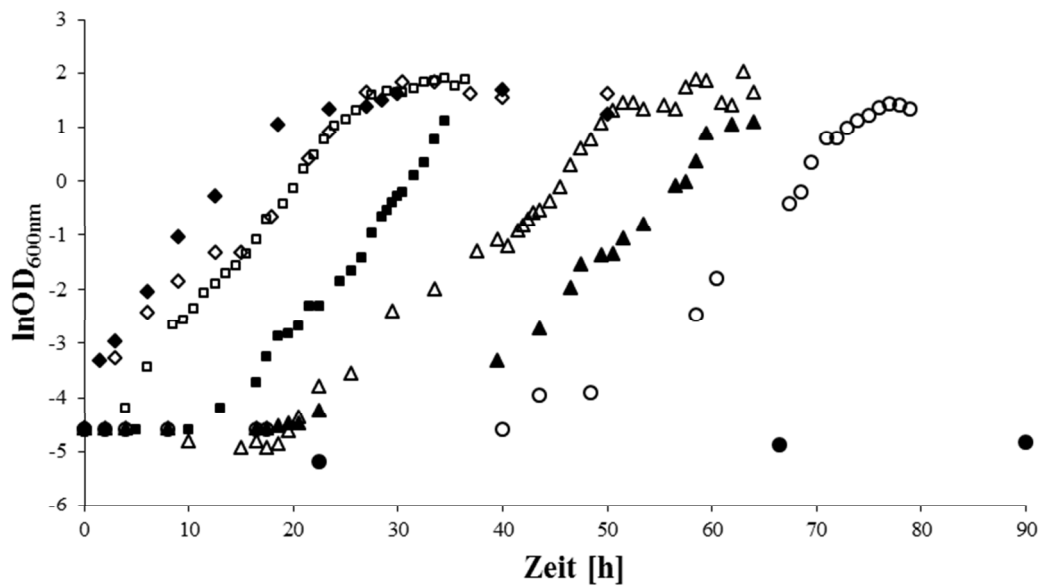


Abbildung 3.11: Wachstumsverlauf von *S. wittichii* mit unterschiedlichen Butanalkonzentrationen. ◆: 0 mM Butanal - *S. wittichii* pBBR1p264\_SL (Kontrollstamm), ◇: 0 mM Butanal *S. wittichii* pJZ1 (Überexpressionsstamm), ■: 5 mM Butanal – Kontrollstamm, □: 5 mM Butanal – Überexpressionsstamm, ▲: 15 mM Butanal – Kontrollstamm, △: 15 mM Butanal – Überexpressionsstamm, ●: 50 mM Butanal – Kontrollstamm, ○: 50 mM Butanal – Überexpressionsstamm

Tabelle 3.9: Dauer der Lag-Phase und Verdopplungszeiten von *S. wittichii* RW1 bei Wachstum mit unterschiedlichen Konzentrationen an Butanal

c(Butanal) [mM]	<i>S. wittichii</i> RW1 pJZ1		<i>S. wittichii</i> RW1 pBBR1p264_SL	
	Lag-Phase [h]	T <sub>d</sub> [h]	Lag-Phase [h]	T <sub>d</sub> [h]
0	3	2,7	3	2,7
5	4	3,3	20	3,4
15	10	3,4	40	3,6
50	20	3,7	---	---

### **3.3 Quantitative Bestimmung von PQQ mittels des Enzyms Swit\_4395**

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Charakterisierung neuer PQQ-abhängiger Enzyme aus *S. wittichii* RW1. Darüber hinaus sollten diese Enzyme auch biotechnologischen oder industriellen Anwendungsgebieten zugeführt werden. Im Zuge dessen und unter Ausnutzung der speziellen Rekonstitutionseigenschaften des Enzyms Swit\_4395 wurde eine standardisierte, halbautomatische Methode entwickelt, die die Detektion und Quantifizierung von PQQ in diversen biologischem Probenmaterial ermöglicht.

#### **3.3.1 Entwicklung eines Standardverfahrens zur enzymatischen Quantifizierung von PQQ**

Rekonstitution beschreibt im Allgemeinen die Herstellung der ursprünglichen Aktivität eines biologischen Systems. Im Falle von Enzymen stellt die Rekonstitution die Überführung der Apoenzymform in die Holoenzymform dar. Konkret für Chinoproteine bedeutet das, die Wiedererlangung der katalytischen Aktivität durch den Einbau von PQQ und divalenten Kationen in das aktive Zentrum. *S. wittichii* RW1 besitzt keine Gene für die Biosynthese von PQQ, daher werden Chinoproteine in *S. wittichii* RW1 grundsätzlich als Apoenzyme gebildet, soweit dem Wachstumsmedium nicht extern PQQ zugesetzt wird. Aufgrund der Tatsache, dass ein Mol des Enzyms Swit\_4395 ein Mol PQQ bindet (siehe Abschnitt 3.2.6) konnte davon ausgegangen werden, dass die Aktivität von der Menge des verfügbaren PQQs abhängig ist.

Um ein Standardverfahren für die quantitative Bestimmung von PQQ zu entwickeln, wurden einleitende Untersuchungen mit unterschiedlichen PQQ-Konzentrationen und Butanal oder Phenylglyoxal durchgeführt. Da Rekonstitutionen mit Calcium-Ionen in KP-Puffer nicht möglich waren, wurde das Puffersystem geändert und mit 50 mM Tris-HCl Puffer gearbeitet. Als artifizieller Elektronenakzeptor wurde DCPIP gewählt. Vorausgehende Tests zeigten, dass aufgrund der Toxizität von Butanal in höheren Konzentrationen ein anderes Substrat gewählt werden musste. Daher wurde auf Phenylglyoxal als Substrat ausgewichen. Der  $K_M$ -Wert für dieses Substrat lag bei  $7,34 \pm 1,67$  mM. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug  $2084 \pm 416$  U/mg. Um eine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch eine Substratlimitierung auszuschließen, wurden standardmäßig 30 mM Substrat eingesetzt. Zudem wurden in jedem Ansatz 10 nM Enzym verwendet.

Weiterhin mussten die optimalen Bedingungen für die Rekonstitution der Apoenzymform von Swit\_4395 bestimmt werden.

Wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, konnte die Ausbildung eines katalytisch aktiven Holoenzym Swit\_4395 in der Gegenwart von Calcium- und Magnesium-Ionen erreicht werden. Neben der Art und Konzentration des Kations spielte bei der Rekonstitution des Proteins Swit\_4395 die Inkubationstemperatur eine Rolle. Die Inkubationszeit hatte keinen Einfluss auf die Rekonstitution, da bereits nach wenigen Sekunden eine vollständige Restaurierung der Enzymaktivität erreicht wurde.

Je 10 nM des Proteins Swit\_4395 wurden mit 5  $\mu$ M PQQ und 10 mM CaCl<sub>2</sub> in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8) auf Eis oder bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 0,1, 2,5, 5, 7,5 und 10 Minuten wurde jeweils die spezifische Aktivität mit Phenylglyoxal und damit der Rekonstitutionserfolg gemessen.

Bei einer Rekonstitution bei Raumtemperatur erreichte das Enzym Swit\_4395 bereits nach 0,1 Minuten eine spezifische Aktivität von  $1116 \pm 231$  U/mg, was unter den gegebenen Bedingungen die maximale Aktivität darstellte. Bei fortdauernder Inkubation von 2,5, 5, 7,5 und 10 Minuten wurden ähnliche spezifische Aktivitäten von  $1116 \pm 98$ ,  $1242 \pm 145$ ,  $1168 \pm 145$  und  $1097 \pm 225$  U/mg gemessen. Dahingegen sank die spezifische Aktivität bei einer Inkubation auf Eis während der ersten 2,5 Minuten um  $\sim 25\%$  und lag noch bei  $851 \pm 126$  U/mg. Anschließend blieb die spezifische Aktivität relativ konstant und erreichte nach 5, 7,5 und 10 Minuten noch  $838 \pm 29$ ,  $853 \pm 79$  und  $832 \pm 88$  U/mg (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10: Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms Swit\_4395 von der Rekonstitutionszeit und -temperatur

Rekonstitutionszeit [min]	Aktivität von Swit_4395 [U/mg] nach Inkubation	
	bei Raumtemperatur	auf Eis
0,1	$1116 \pm 231$	$1116 \pm 231$
2,5	$1116 \pm 98$	$851 \pm 126$
5	$1242 \pm 145$	$838 \pm 29$
7,5	$1168 \pm 145$	$853 \pm 79$
10	$1097 \pm 225$	$832 \pm 88$

### 3.3.2 Korrelation zwischen dem PQQ-Gehalt und der Enzymaktivität von Swit\_4395

Für die lineare Korrelation zwischen dem Gehalt an PQQ und der Enzymaktivität von Swit\_4395 ist die Affinität zwischen Protein und Cofaktor von Bedeutung. Die Affinität zwischen einem Protein und seinem Liganden wird im Allgemeinen durch die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) ausgedrückt.  $K_D$  ist definiert als Quotient aus der Konzentration des Protein-Cofaktor-Komplexes und dem Produkt der Protein- und Cofaktorkonzentration. Je kleiner der Wert von  $K_D$ , desto größer ist die Affinität eines Enzyms zu seinem Liganden. Ein Mol des Proteins Swit\_4395 bindet 0,95 Mol PQQ (siehe Abschnitt 3.2.6), was rechnerisch zu einem  $K_D$ -Wert von 1,05 führt. Damit zeigte das Enzym Swit\_4395 eine hohe Affinität zu dem Cofaktor PQQ.

Ausgehend von diesen Berechnungen konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität von Swit\_4395 und der Konzentration an PQQ angenommen werden. Diese Hypothese sollte experimentell betätigt werden, wozu eine definierte Stoffmenge des Enzyms Swit\_4395, in seiner Apoform, mit unterschiedlichen Mengen an PQQ, im Bereich zwischen null und fünfzig nM rekonstituiert wurde. Standardmäßig wurden 10 nM Enzym in den Test eingesetzt.

Wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist, nahm die spezifische Aktivität des Enzyms Swit\_4395 mit steigender Menge an PQQ linear zu und erreichte bei 10 nM eine Sättigung. Der lineare Anstieg im Bereich zwischen null und zehn nM ermöglichte das Anlegen einer Ausgleichsgeraden und somit die Nutzung als Kalibriergerade.

Versuche die Sensitivität des Systems zu steigern, zeigten, dass auch im Bereich zwischen 0,05 nM und 0,5 nM PQQ noch ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration an PQQ und der Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.13). Das Detektionslimit lag bei 0,05 nM.

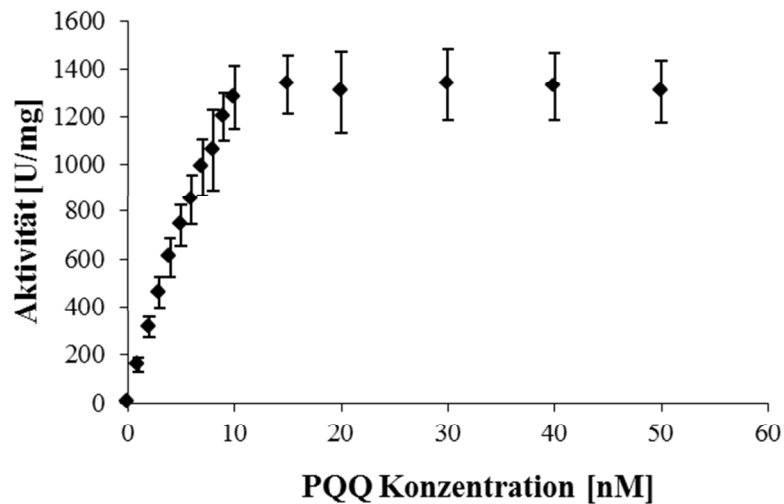


Abbildung 3.12: Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms Swit\_4395 von der Konzentration an PQQ. Je 10 nM Enzym wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an PQQ und jeweils 10 mM  $\text{CaCl}_2$  für fünf Minuten in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8) inkubiert und anschließend mit 30 mM Phenylglyoxal die spezifische Aktivität gemessen.

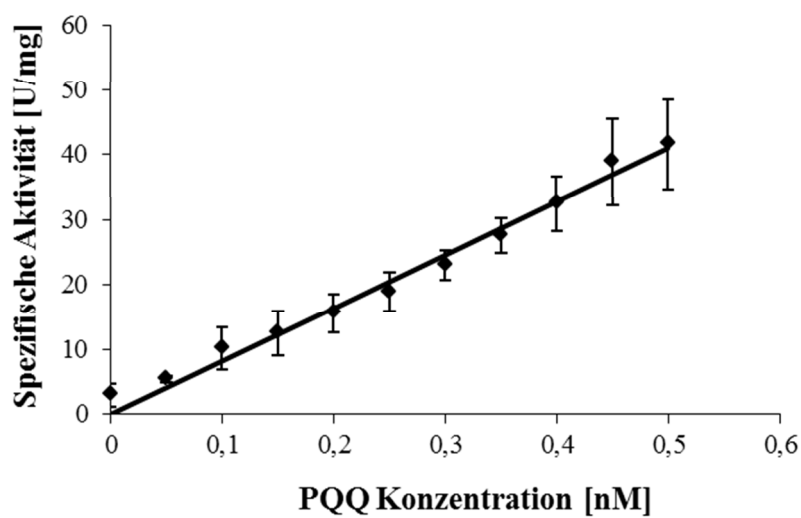


Abbildung 3.13: Einfluss der Konzentration an PQQ auf die Aktivität des Enzyms Swit\_4395 im Bereich des Detektionslimits für PQQ.

### 3.3.3 Quantitative Bestimmung von PQQ in biologischem Probenmaterial

Nachdem ein linearer Zusammenhang zwischen dem PQQ-Gehalt in einer Lösung und der spezifischen Enzymaktivität von Swit\_4395 festgestellt werden konnte, sollte die Methode an unterschiedlichem Probenmaterial getestet werden. Dazu wurden insgesamt 20 Lebensmittel getestet, wovon zwölf als Flüssigkeiten und acht als Feststoffe vorlagen. Weiterhin wurden die Kulturüberstände von vier PQQ-produzierenden Stämmen untersucht.

#### 3.3.3.1 Der Gehalt von PQQ in Obst, Gemüse und Getränken

Um PQQ in festen Lebensmitteln nachweisen zu können, wurde je ein Gramm des Materials mit einer elektrischen Kaffeemühle (Moulinex, Alencon, Frankreich) zerkleinert, in zehn Milliliter dH<sub>2</sub>O aufgenommen und für mehrere Minuten stark geschüttelt. Abweichend davon wurde der Pfeffer mit einem Mörser zerrieben und das Kakaopulver in nur einem Milliliter Wasser aufgenommen. Die Gemische wurden anschließend zentrifugiert und jeweils 50 µL in den Enzymtest eingesetzt. Flüssigkeiten wurden jeweils unverdünnt verwendet.

Alle Feststoffe zeigten hohe Konzentrationen an PQQ. In Tomaten, grünem Pfeffer und roter Chili wurden mit  $7,6 \pm 2,1$ ,  $8,2 \pm 2,3$  und  $9,6 \pm 3,5$  nmol/g bereits hohe Mengen an PQQ gefunden. Salat, Sellerie, Karotten und Birne hatten mit  $11,7 \pm 4,8$ ,  $16,6 \pm 2,7$ ,  $16,8 \pm 3,7$  und  $17,9 \pm 2,6$  nmol/g jeweils mehr als 10 nM PQQ. Die höchste Konzentration an PQQ in einem Lebensmittel wurde mit  $34,1 \pm 9,0$  nmol/g in Kakaopulver gefunden (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11: PQQ-Gehalt in festen Lebensmitteln

Probenmaterial	Konzentration an PQQ [nmol/g]
Birne	$17,9 \pm 2,6$
Eisbergsalat	$11,7 \pm 4,8$
Grüner Pfeffer	$8,2 \pm 2,3$
Kakao <sup>a</sup>	$34,1 \pm 9,0$
Karotte	$16,8 \pm 3,7$
Rote Chili	$9,6 \pm 3,5$
Staudensellerie	$16,6 \pm 2,7$
Tomate	$7,6 \pm 2,1$

<sup>a</sup> El Cebo Cacao organico (El Puente, Nordstemmen, Deutschland)

Bei den Flüssigkeiten konnten in Cola, Kirschsafte und Speiseessig relativ hohe Mengen an PQQ festgestellt werden. In Coca Cola fanden sich  $7,6 \pm 1,3$  nMol PQQ/L, in Kirschsafte  $5,9 \pm 1,2$  nMol/L und in Rotweinessig  $4,9 \pm 0,8$  nMol/L. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in alkoholischen Getränken, wie Wein und Bier mit  $6,0 \pm 1,3$  und  $2,0 \pm 0,8$  nMol/L, PQQ vorhanden ist. In Milchprodukten wie Kolostrum, H-Milch und Frischmilch wurden mit  $2,4 \pm 1,0$ ,  $1,2 \pm 0,5$  und  $1,1 \pm 0,3$  nMol/L geringe Konzentrationen an PQQ gefunden. Kleinere Mengen an PQQ konnten zudem in Tee, Fassbrause, sowie Kaffee bestimmt werden. Dabei wies Früchtetee mit  $1,6 \pm 0,5$  nMol/L etwas mehr PQQ auf, als Schwarztee mit  $1,3 \pm 0,3$  nMol/L. Fassbrause und Kaffee zeigten mit  $1,3 \pm 0,6$  und  $1,0 \pm 0,4$  nMol/L neben den Milchprodukten die geringsten Konzentrationen an PQQ von allen getesteten Substanzen (Tabelle 3.12).

Tabelle 3.12: Konzentration an PQQ in Flüssigkeiten

Probenmaterial	PQQ [nmol/L]	Probenmaterial	PQQ [nmol/L]
Bier <sup>a</sup>	$2,0 \pm 0,8$	H-Milch <sup>g</sup>	$1,2 \pm 0,5$
Cola <sup>b</sup>	$7,6 \pm 1,3$	Kaffee <sup>h</sup>	$1,0 \pm 0,4$
Essig <sup>c</sup>	$4,9 \pm 0,8$	Kirschsafte <sup>i</sup>	$5,9 \pm 1,2$
Fassbrause <sup>d</sup>	$1,3 \pm 0,6$	Kolostrum <sup>j</sup>	$2,4 \pm 1,0$
Frischmilch <sup>e</sup>	$1,1 \pm 0,3$	Schwarztee <sup>k</sup>	$1,3 \pm 0,3$
Früchtetee <sup>f</sup>	$1,6 \pm 0,5$	Wein <sup>l</sup>	$6,0 \pm 1,3$

<sup>a</sup> Reissdorf Kölsch (Privat-Brauerei Heinrich Reissdorf GmbH & Co KG, Köln, Deutschland)

<sup>b</sup> Coca Cola (The Coca-Cola Company, Atlanta, Georgia, USA)

<sup>c</sup> Rotwein Essig (Carl Kühne KG GmbH & Co., Hamburg, Deutschland)

<sup>d</sup> Fassbrause Zitrone (Bitburger Braugruppe GmbH, Bitburg, Deutschland)

<sup>e</sup> Eifel

<sup>f</sup> Früchtetee (Ulrich Walter GmbH/Lebensbaum, Diepholz, Deutschland)

<sup>g</sup> H-Milch, fettarm, 1,5 % Fett – ja! (Rewe Markt GmbH, Köln, Deutschland)

<sup>h</sup> Bio Café Esperanza (Gepa – The Fair Trade Company, Wuppertal, Deutschland)

<sup>i</sup> Happy Day Amarena Kirsche (Rauch Fruchtsäfte GmbH & Co oG, Rankweil, Österreich)

<sup>j</sup> Kolostrum-Extrakt, flüssig (allcura Naturheilmittel GmbH, Wertheim, Deutschland)

<sup>k</sup> Meßmer Earl Grey (Ostfriesische Tee Gesellschaft GmbH & Co. KG, Seevetal, Deutschland)

<sup>l</sup> Kairos trocken – 2010 (Weingut Hirth GmbH, Willsbach-Obersulm, Deutschland)



### 3.3.3.2 Produktion von PQQ durch Gram-negative Bakterien

Etliche Gram-negative Bakterienarten sind dafür bekannt PQQ zu produzieren und in das umgebende Medium abzugeben (Shen *et al.* 2012). Dazu gehören unter anderen *G. oxydans*, *P. putida*, *Ga. diazotrophicus* und *H. denitrificans*. Diese Stämme wurden auf geeigneten Medien ohne externe Zugabe von PQQ kultiviert (siehe Abschnitt 2.5.1) und die Konzentration an PQQ in dem Überständen der Kulturmedien gemessen. *E. coli* diente dabei als Negativkontrolle, da dieser Organismus keine PQQ-Synthesegene besitzt.

Erwartungsgemäß wurde in dem Kulturüberstand von *E. coli* K12 kein PQQ nachgewiesen. *G. oxydans* 621H, *Ga. diazotrophicus* und *P. putida* KT2440 produzierten mit  $5,8 \pm 1,5$ ,  $4,3 \pm 1,2$  und  $4,0 \pm 1,0$  nMol/L moderate Mengen an PQQ. *H. denitrificans* X hingegen gab  $60,9 \pm 3,4$  nMol PQQ pro Liter an das umgebende Medium ab (Tabelle 3.13).

Tabelle 3.13: PQQ-Gehalt im Medienüberstand bakterieller PQQ-Produzenten

Organismus	PQQ-Gehalt im Überstand [nMol/L]
<i>E. coli</i> K12	0
<i>Ga. diazotrophicus</i>	$4,3 \pm 1,2$
<i>G. oxydans</i> 621H	$5,8 \pm 1,5$
<i>H. denitrificans</i> X	$60,9 \pm 3,4$
<i>P. putida</i> KT2440	$4,0 \pm 1,0$

### 3.3.4 Lagerung und Stabilität des Enzyms Swit\_4395

Für die biotechnologische Anwendung von Proteinen ist es notwendig, dass die Enzyme sich einfach lagern lassen und dabei ihre katalytische Aktivität behalten. Für die Bestimmung der optimalen Lagerungsbedingungen wurde das Protein Swit\_4395 homolog in *S. wittichii* RW1 in seiner Apoform produziert und mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt (siehe Abschnitt 2.6.1). Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden vereinigt und zu je 10  $\mu$ L aliquotiert.

Die Ausgangsaktivität des Enzyms wurde mittels des Standardtestverfahrens ermittelt (siehe Abschnitt 3.3.1). Anschließend wurde jeweils eine ausreichende Anzahl an Aliquots bei  $-70$  und  $-20$  °C, sowie bei  $4$  °C gelagert. Eine weitere Charge wurde zuerst lyophilisiert und bei Raumtemperatur aufbewahrt. In den folgenden sechs Wochen wurde in regelmäßigen Abständen die verbliebene spezifische Aktivität des Enzyms bestimmt.

Die Ausgangsaktivität des Enzyms betrug  $1080 \pm 44$  U/mg. Die Lagerung bei Temperaturen von  $-70$  und  $-20$  °C hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die spezifische Aktivität des Enzyms Swit\_4395. Mit spezifischen Aktivitäten zwischen 1000 und 1100 U/mg bewegten sich die Werte über den gesamten Messzeitraum innerhalb der Standardabweichung (Abbildung 3.14). Dahingegen hatten sowohl die Aufbewahrung bei 4 °C, als auch die Gefriertrocknung einen negativen Effekt auf die Stabilität des Proteins. Nach drei Tagen bei 4 °C konnten mit  $817 \pm 18$  U/mg nur noch  $\sim 75$  % der Aktivität festgestellt werden, nach weiteren fünf Wochen betrug die Aktivität mit  $688 \pm 48$  U/mg noch etwas mehr als 60 %. Einen deutlich stärkeren negativen Effekt hatte jedoch die Gefriertrocknung und anschließende Lagerung des Proteins Swit\_4395 bei Raumtemperatur. Bereits nach drei Tagen zeigte das Enzym mit  $367 \pm 31$  U/mg eine um  $\frac{2}{3}$  verringerte Aktivität. Im weiteren Verlauf blieb die spezifische Aktivität des Enzyms allerdings konstant und es zeigte sich keine weitere Abnahme.

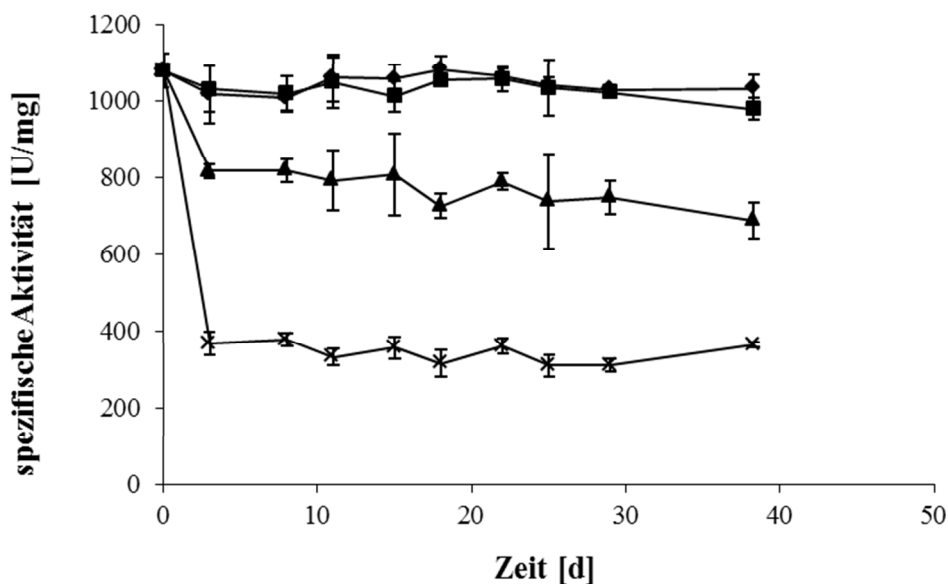


Abbildung 3.14: Grafische Darstellung der Stabilität des Enzyms Swit\_4395 über sechs Wochen. Aliquots des Enzyms wurden bei unterschiedlichen Bedingungen gelagert und in regelmäßigen Abständen die spezifische Aktivität mit DCPIP als Elektronenakzeptor und 30 mM Phenylglyoxal als Substrat bestimmt. ◆: Lagerung bei  $-70$  °C; ■: Lagerung bei  $-20$  °C; ▲: Lagerung bei 4 °C; x: Gefriergetrocknet und Lagerung bei Raumtemperatur.

### 3.3.5 Entwicklung eines halbautomatischen Hochdurchsatzverfahrens zur quantitativen Bestimmung von PQQ in biologischem Probenmaterial

Für die industrielle oder pharmazeutische Anwendung ist nicht nur die einfache Handhabung und Schnelligkeit einer Methode von Bedeutung, sondern auch die Anzahl paralleler Ansätze beziehungsweise die automatisierte Durchführung. Aufgrund dessen wurde ein Verfahren entwickelt, das es erlaubt mit Hilfe eines Plattenlesegeräts (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) mehrere Messungen parallel durchzuführen und die Absorptionsänderung zu verfolgen (Abbildung 3.15).

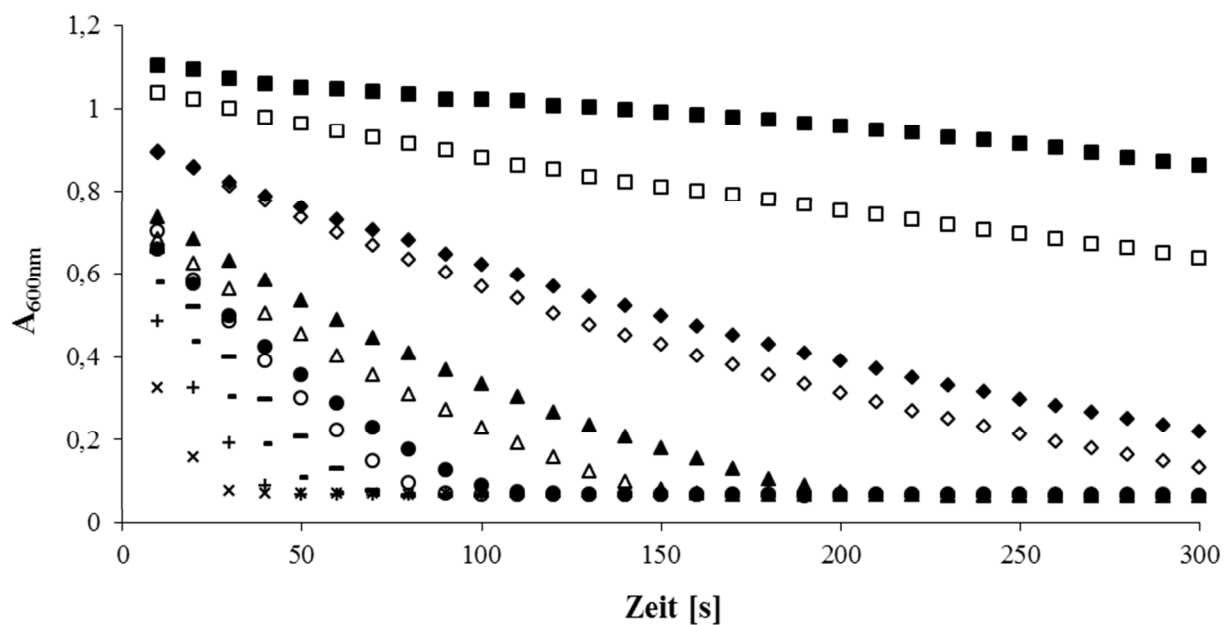


Abbildung 3.15: Parallele Aufnahme von zwölf Kinetiken mittels eines Plattenlesegeräts. Es wurden zwölf Testansätze in einer Mikrotiterplatte gleichzeitig in einem Infinite® 200 Pro Plattenlesegerät (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei 600 nm vermessen. Die Reaktionsansätze in einem Endvolumen von 100  $\mu$ L (siehe Abschnitt 2.8.3) enthielten neben KP-Puffer, PMS, DCPIP und Enzym zwischen 0 und 1,5 nM PQQ. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Phenylglyoxal gestartet. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Magellan™ Data Analysis Software (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz). ■: 0,0 nM PQQ; □: 0,1 nM PQQ; ◆: 0,2 nM PQQ; ◇: 0,3 nM PQQ; ▲: 0,4 nM PQQ; △: 0,5 nM PQQ; ●: 0,7 nM PQQ; ○: 0,9 nM PQQ; —: 1,0 nM PQQ; -: 1,1 nM PQQ; +: 1,3 nM PQQ; x: 1,5 nM PQQ

In diesem semiautomatischen Hochdurchsatzverfahren zeigte sich, dass eine gleichzeitige Messung verschiedener Proben möglich war. Ab einer PQQ-Konzentration von 0,4 nM wurde eine schnelle Abnahme der Absorption bei 600 nm erreicht und die Reaktion war nach spätestens 200 Sekunden abgelaufen. In dem Bereich oberhalb von 1,0 nM PQQ verliefen die Reaktionen sehr schnell und benötigten nicht einmal 60 Sekunden. Damit ist in dem Maßstab allerdings bereits ein Limit nach oben gesetzt. Reaktionen, die noch schneller sind, als die mit 1,5 nM PQQ sind in diesem Verfahren kaum mehr messbar. In dem Bereich zwischen 0 und 1,5 nM PQQ konnte mit diesem Verfahren jedoch ein linearer Zusammenhang zwischen der PQQ-Konzentration und der Enzymaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 3.16).

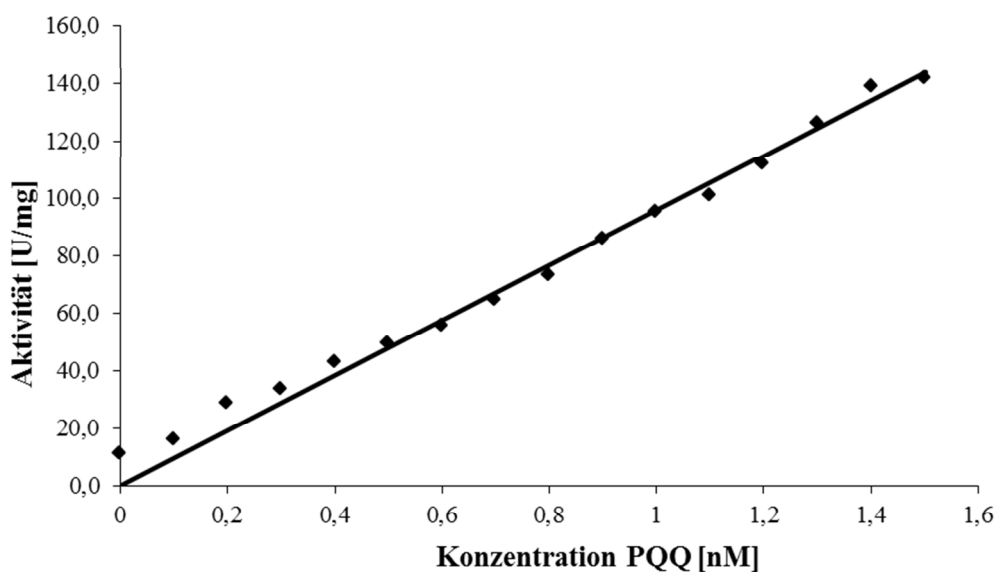


Abbildung 3.16: Linearer Zusammenhang zwischen der Aktivität des Enzyms Swit\_4395 und der PQQ-Konzentration im 100  $\mu$ L Maßstab. Die Abbildung zeigt die Daten einer ausgewählten Enzympräparation, die mittels eines Plattenlesegeräts gewonnen wurden.

Weitere Optimierungen dieses Verfahrens waren nicht mehr Gegenstand dieser Untersuchungen.

### 3.3.6 Produktionsmaßstab und Ergiebigkeit des Enzyms Swit\_4395

Neben den oben erwähnten Eigenschaften des Systems spielt auch die Ergiebigkeit eine große Rolle. Abgesehen davon, dass die Produktion von dem Enzym Swit\_4395, in seiner Apoform, weniger als einen Tag dauert, ist die Ergiebigkeit immens.

Die Anzahl der Messungen, die sich mit einer Apoenzympräparation (1,5 mg Protein) durchführen lassen, lag bei knapp 4000. Geht man davon aus, dass pro Testansatz 10 nM

Protein eingesetzt werden, werden 10 Gramm Zellen dafür benötigt, die aus einem Liter Kultur gewonnen werden können. Wird der Test im Hochdurchsatzverfahren und somit in einem Volumen von 100  $\mu\text{L}$  durchgeführt, können sogar fast 40.000 Messungen mit einer Präparation realisiert werden.

### **3.4 Charakterisierung periplasmatischer ADHs aus *S. wittichii***

Ein weiteres Augenmerk wurde auf die Identifizierung und Charakterisierung periplasmatischer ADHs gelegt. Eine Analyse des Genoms von *S. wittichii* RW1 hatte ergeben, dass dieser Organismus insgesamt sieben PQQ-abhängige ADHs besitzt (siehe Abschnitt 3.1).

ADHs sind dafür bekannt entweder primäre Alkohole zu Aldehyden oder sekundäre Alkohole zu Ketonen zu oxidieren. Diese Eigenschaft bietet vielfältige biotechnologische Anwendungen in der Produktion Enantiomer-reiner chemischer Verbindungen.

Von den sieben identifizierten ADHs aus *S. wittichii* RW1 wurden zwei Kandidaten aus der Gruppe der Chinohämoproteine ausgewählt und eingehender untersucht. Im Zuge dessen sollte außerdem ein induzierbares Promotorsystem für die homologe Expression in *S. wittichii* etabliert werden.

#### **3.4.1 Bioinformatische Analyse der putativen Chinohämoproteine Swit\_2227 und Swit\_4160**

Eine erste Einordnung der beiden Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160 erfolgte mittels einer ausführlichen bioinformatischen Analyse. Diese Untersuchungen sollten vorab Aufschluss über die Struktur, Lokalisierung, Cofaktoren und mögliche Enzymaktivitäten der beiden Enzyme erbringen.

Das Protein Swit\_2227 war als Chinohämoprotein Ethanol-Dehydrogenase Typ 1 (EC 1.1.9.1) annotiert. Seine Primärstruktur umfasste insgesamt 705 Aminosäuren, die charakteristische Bindedomänen von ADHII aufwiesen. Dabei waren 25 von 25 Aminosäuren des aktiven Zentrums, das die Cofaktoren PQQ und Calcium-Ionen bindet, sowie 48 von 48 Aminosäureresten des Tryptophan (Trp)-Docking Motivs konserviert. Weiterhin konnte eine Cytochrom *c* (Cyt *c*) Domäne im Bereich der Aminosäuren 516 bis 693 identifiziert werden, wobei das Häm kovalent an C329 und C332 gebunden wäre und H633 den axialen Liganden des Häm-Eisens darstellen würde. Die wahrscheinliche Tertiärstruktur des Proteins Swit\_2227 wurde als ein achtfacher  $\beta$ -Propeller vorausgesagt (Abbildung 3.17), was mittels

einer Berechnung der Sekundärstruktur mittels Psipred (Jones 1999; Buchan *et al.* 2013) untermauert werden konnte. Die Sekundärstruktur umfasste insgesamt 30  $\beta$ -Faltblätter (W64 – D67, V84 – V86, V89 – T93, V99 – D03, W111 – Y113, A135 – A137, V140 – A144, W149 – D154, E160 – L161, R181 – A183, N186 – I189, G200 – D206, L212 – A213, V259 – Y260, I266 – G270, S294 – D299, K305 – Y309, I326 – I330, R335 – Q342, G347 – D353, K394 – V396, L417 – P421, M427 – M431, I478 – D483, L509 – G513, L519 – D523, H531 – D534, M544 – I548, V551 – A558, R582 – R587) und sieben  $\alpha$ -Helices (W6 – L20, A24 – A27, A54 – A57, Q615 – G626, P651 – E651, H653 – L661, K679 – 693).

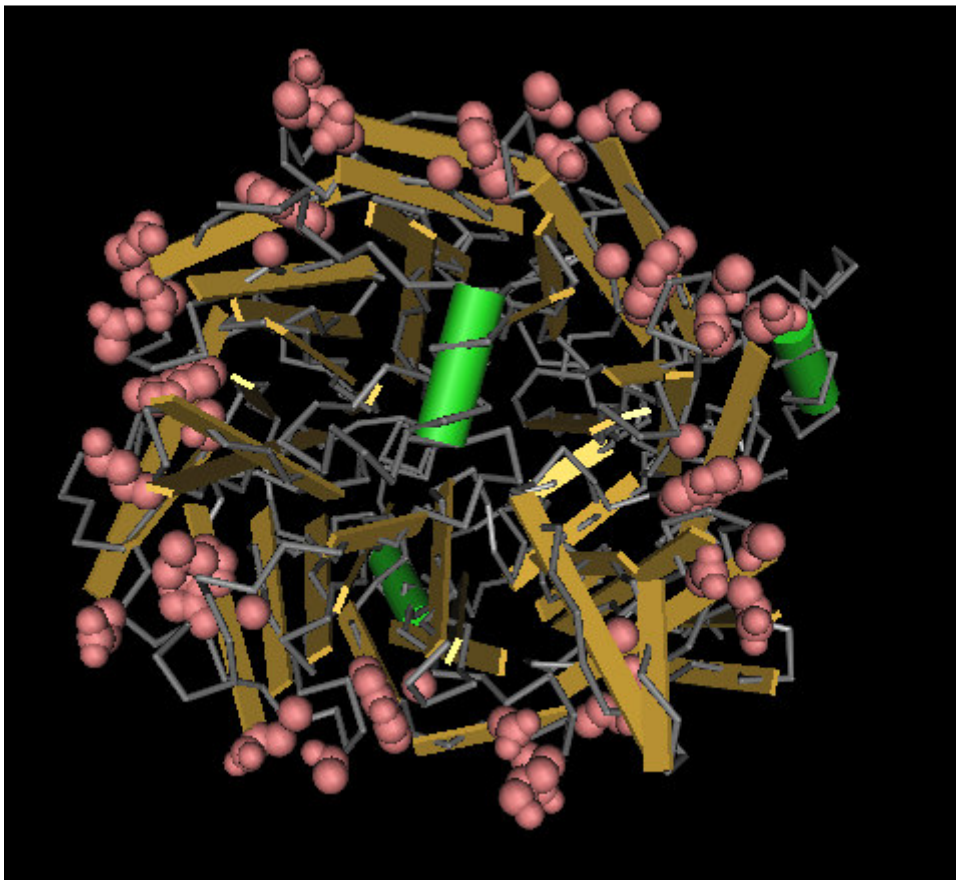


Abbildung 3.17: Modellierter Tertiärstruktur der putativen ADHII Swit\_2227. Gelbe Balken:  $\beta$ -Faltblattstrukturen, Grüne Zylinder:  $\alpha$ -Helices, rosa Kugeln: Trp-Docking Motiv. Die Abbildung wurde mit der Software Cn3D4.3.1 erstellt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>; Wang *et al.* 2000).

Die Lokalisierung des Enzyms Swit\_2227 innerhalb der Zelle sollte mit Hilfe der Serverprogramme SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; (Petersen *et al.* 2011), TMHMM2.0 (Sonnhammer *et al.* 1998; Krogh *et al.* 2001) und der Proteindatenbank Uniprot (<http://www.uniprot.org>) identifiziert werden. Hier konnte auf eine periplasmatische Lokalisierung geschlossen werden, da in der Struktur des Proteins keine

Transmembrandomänen gefunden wurden, aber ein Sec-abhängiges Signalpeptid vorhanden war. Abhängig von dem verwendeten Programm befindet sich die Schnittstelle für die Signalpeptidase entweder hinter der Aminosäure A27 (Petersen *et al.* 2011) oder G32 (Uniprot).

Eine BLAST-Suche mittels der SwissProt Datenbank ergab Homologien (38 – 48 % Identität, 52 – 60 % Ähnlichkeit) zu den ADHs IIG (Q4W6G0.1) und IIB (Q8GR64.1) aus *P. putida*, der Ethanol-Dehydrogenase Typ 1 aus *Comamonas (C.) testosteroni* (Q46444.1), sowie den Cyt *c*-abhängigen ADHs aus *Ga. europaeus* (Q44002.1) und *Ga. polyoxogenes* (P28036.1).

All diese Erkenntnisse ließen darauf schließen, dass es sich bei dem Protein Swit\_2227 um eine periplasmatische ADH vom Typ II handelt, die sowohl PQQ als auch ein C-terminales Häm *c* als prosthetische Gruppen besitzt.

Die Ergebnisse für das Protein Swit\_4160 waren größtenteils ähnlich oder identisch zu denen für das Protein Swit\_2227. Die Primärstruktur setzte sich hierbei aus 690 Aminosäuren zusammen. Wobei auch hier die Bindestellen für PQQ, Calcium-Ionen (9 von 9 konservierten Resten) und Cyt *c* konserviert waren. Die Cyt *c*-Domäne erstreckte sich über die Aminosäuren 595 bis 675, wobei als axialer Ligand des Häm-Eisens H613 und als Häm-Bindungspartner C609 und C612 identifiziert wurden. Das Trp-Docking Motiv war mit 48 von 48 konservierten Aminosäureresten ebenfalls vollständig vorhanden.

Die Voraussage der vermutlichen Sekundärstruktur mittels Psipred (Jones 1999; Buchan *et al.* 2013) ergab insgesamt sechs  $\alpha$ -Helices (S4 – M20, E54 – I57, A155 – W158, A594 – M602, Y635 – R643, E661 – Q682) und 35  $\beta$ -Faltblattstrukturen (G61 – L62, W64 – A66, I79 – V81, V84 – I88, I93 – D98, A107 – F108, K136 – T140, R145 – D150, R176 – G178, K181 – V184, G196 – D202, R208 – D213, L258 – I261, S286 – K291, Y297 – H300, V318 – M322, R327 – E334, G339 – D345, L351 – N353, A389 – V391, S405 – Y406, L412 – P416, E425 – I426, T440 – Y444, L455 – D459, A465 – R466, D468 – T469, L480 – T482, I486 – G490, L496 – R500, Q506 – L507, S509 – K511, V521 – I525, V528 – A535, R561 – L567). Als wahrscheinliche Tertiärstruktur wurde zudem ein 8-facher  $\beta$ -Propeller angenommen (Abbildung 3.18).

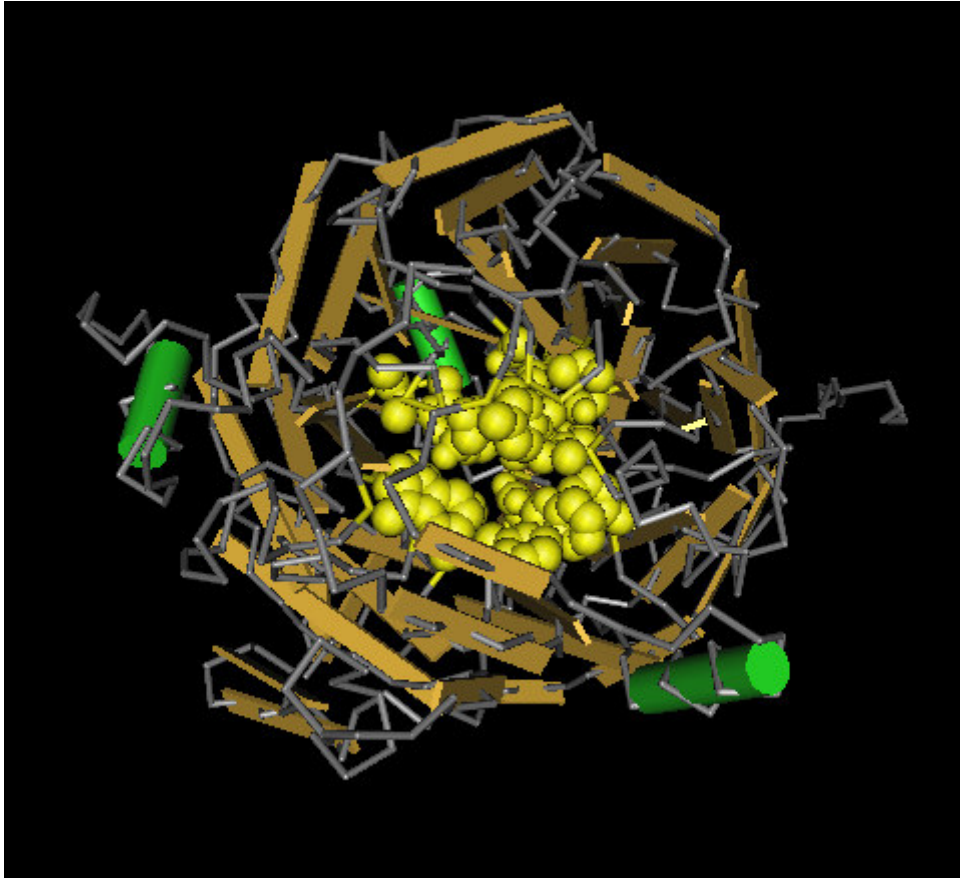


Abbildung 3.18: Wahrscheinliche Tertiärstruktur des Proteins Swit\_4160. Gelbe Balken:  $\beta$ -Faltblätter, grüne Zylinder:  $\alpha$ -Helices, gelbe Kugeln: aktives Zentrum. Die Abbildung wurde mittels des Programms Cn3D4.3.1 erstellt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>) (Wang *et al.* 2000).

Auch bei dem Protein Swit\_4160 wiesen das Fehlen von Transmembrandomänen und das Vorhandensein eines Sec-abhängigen Signalpeptids auf eine Lokalisierung im Periplasma hin. Das native Signalpeptid erstreckte sich entweder bis zu der Aminosäure A24 (Petersen *et al.* 2011) oder V25 (<http://www.unitprot.org>).

Der Vergleich der Sequenz des Proteins Swit\_4160 mit bereits charakterisierten Enzymen mittels BLAST ergab Homologien (36 – 40 % Identität, 49 – 54 % Ähnlichkeit) mit den Chinohämoproteinen ADHIIG (Q4W6G0.1) und ADHIIB (Q8GR64.1) aus *P. putida*, den ADHs [Cyt *c*] aus *Ga. europaeus* (Q44002.1) und *Ga. polyoxogenes* (P28036.1), sowie mit dem Chinohämoprotein Ethanol-Dehydrogenase Typ-1 aus *C. testosteroni* (Q46444.1).

Zusammenfassend konnte auch hier angenommen werden, dass das Enzym Swit\_4160 ein Chinohämoprotein aus der Gruppe der ADHII, mit einer Lokalisierung im Periplasma, war.



### 3.4.2 Homologe Produktion der Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160 in *S. wittichii* RW1 und Aufreinigung mittels Affinitätstag

Für die homologe Produktion der beiden Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160 wurden jeweils 500 mL LB-Medium einprozentig mit den Stämmen *S. wittichii* RW1 pBBR1\_lacall\_swit\_2227\_Streplong beziehungsweise pBBR1\_lacall\_swit\_4160\_Streplong (Abbildung 3.19) beimpft und bei 30 °C inkubiert. Da *S. wittichii* RW1 keine PQQ-Synthesegene besitzt, wurden dem Medium 5 µM PQQ und 10 mM CaCl<sub>2</sub> zugesetzt. Nach Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von ungefähr 0,3 wurde der Lac-Promotor durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und weiter inkubiert. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Phase geerntet, mittels Ultraschall aufgeschlossen und die Proteine anschließend mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt (siehe Abschnitt 2.6.1).

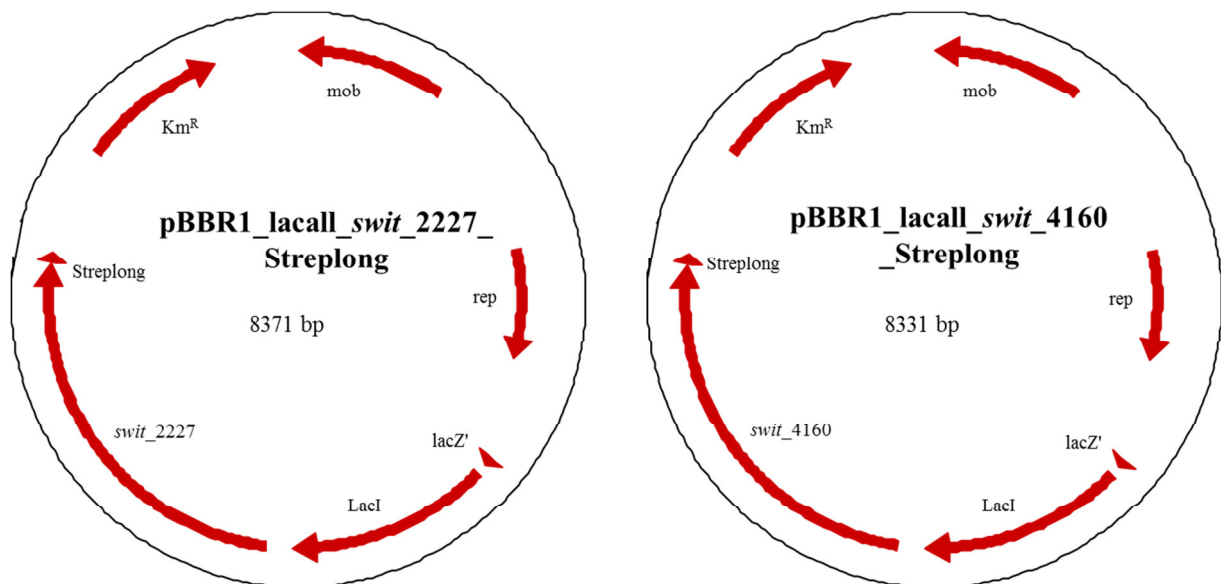


Abbildung 3.19: Plasmidkarten der beiden Überexpressionsvektoren pBBR1\_lacall\_swit\_2227\_Streplong (links) und pBBR1\_lacall\_swit\_4160\_Streplong (rechts). Km<sup>R</sup>: Kanamycinresistenzkassette; mob: Mobilisierungsgen; rep: Replikationsursprung; lacZ': β-Galaktosidase; LacI: Regulatorgen *lacI* inklusive des Promotors pLacI; Streplong: Strep-Tag II mit verlängerter Linkersequenz. Beide Plasmide wurden von Brunke (2013) kloniert. Die Plasmidkarten wurden mit dem Programm Clone Manager 9 (Scientific & Educational Software, Cary, North Carolina, USA) erstellt.

Die Proteinkonzentration wurde jeweils mittels Bradford-Assay (siehe Abschnitt 2.6.2) bestimmt. Dabei ergab sich für das Protein Swit\_2227 eine Ausbeute von 0,3 mg/L und für das Protein Swit\_4160 von 0,6 mg/L Kultur. Für die Reinheitskontrolle und die Bestätigung,

dass es sich um die gewünschten Proteine handelt, wurden beide in eine SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.6.3.1) eingesetzt. Das Protein Swit\_2227 konnte hierbei als distinkte Bande bei 78,9 kDa detektiert werden (Abbildung 3.20A). Dieses Ergebnis entsprach der rechnerischen Größe von 78039 Dalton inklusive 1555 Dalton für den verlängerten Strep-Tag. Zusätzlich zu einer deutlich ausgeprägten Bande bei 70,7 kDa zeigten sich für das Eluat des Proteins Swit\_4160 zwei schwächere Banden bei 46,8 kDa und 18,2 kDa, sowie diverse Signale zwischen 55 und 70 kDa in der SDS-PAGE (Abbildung 3.20B). Das Signal bei 70,7 kDa korrespondierte mit der theoretischen Größe des Proteins Swit\_4160 von 75536 Dalton inklusive des Affinitätstags. Bei den anderen Signalen handelte es sich vermutlich um Spaltprodukte des Proteins Swit\_4160.

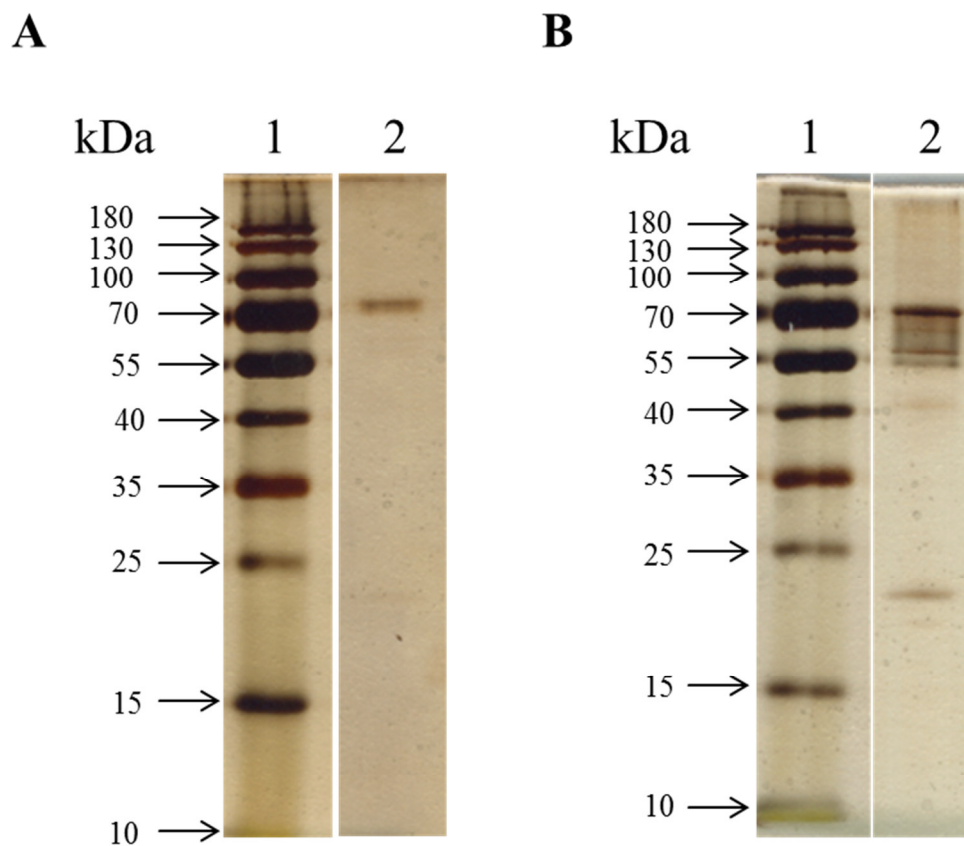


Abbildung 3.20: Gelelektrophoretische Auftrennung der Protein-Eluate von Swit\_2227 und Swit\_4160. Die Auftrennung der Eluate wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt. Die anschließende Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Silberfärbung. A) Swit\_2227 – Spur 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Spur 2: Swit\_2227; B) Swit\_4160 - Spur 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Spur 2: Swit\_4160

### 3.4.3 Nachweis der prosthetischen Gruppen in Swit\_2227 und Swit\_4160

Die bioinformatische Analyse hatte ergeben, dass die beiden Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160 sowohl PQQ als auch Häm *c* als prosthetische Gruppen aufweisen. Um diese These zu bestätigen, wurden UV-VIS-Spektren von beiden Enzymen im Bereich zwischen 200 und 700 nm aufgenommen (Abbildung 3.21). In beiden Spektren waren typische Absorptionsmaxima für Proteine bei 230 und 280 nm, sowie ein Maximum bei 420 nm zu erkennen, was auf die Inkorporation von Hämen hinwies. Ein PQQ-spezifischer Ausschlag bei 341 nm fehlte jedoch in beiden Fällen.

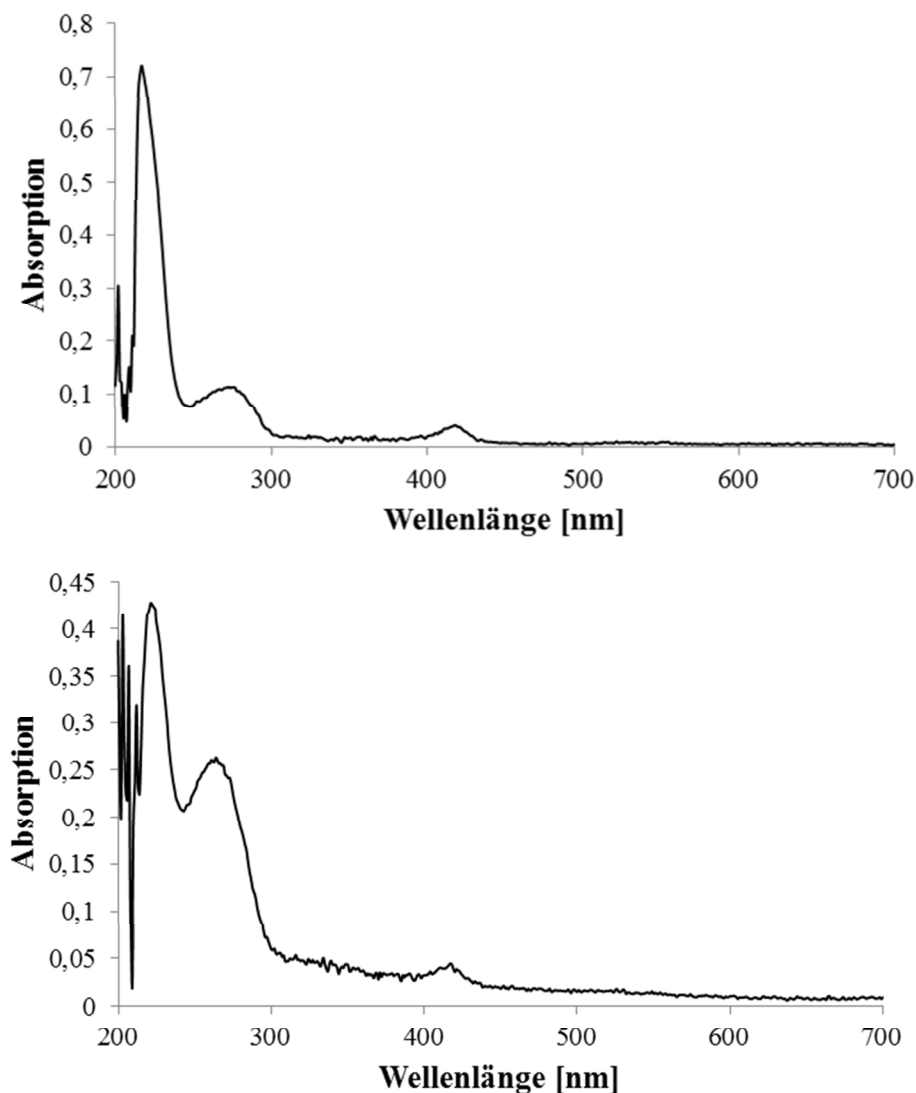


Abbildung 3.21: UV-VIS-Spektren der Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160. Die Spektren wurden mit einem Jasco V-600 Spektrophotometer im Bereich zwischen 200 und 700 nm aufgenommen. Oben: Swit\_2227, unten: Swit\_4160

Das Vorhandensein von Häm *c* konnte zudem durch eine Häm-spezifische Färbung im Anschluss an die SDS-PAGE bestätigt werden (Abbildung 3.22). Mit Ausnahme der kleineren Bande aus der Präparation des Proteins Swit\_4160 zeigten alle Signale, die bereits in der Silberfärbung zu sehen waren, eine deutliche Blaufärbung.

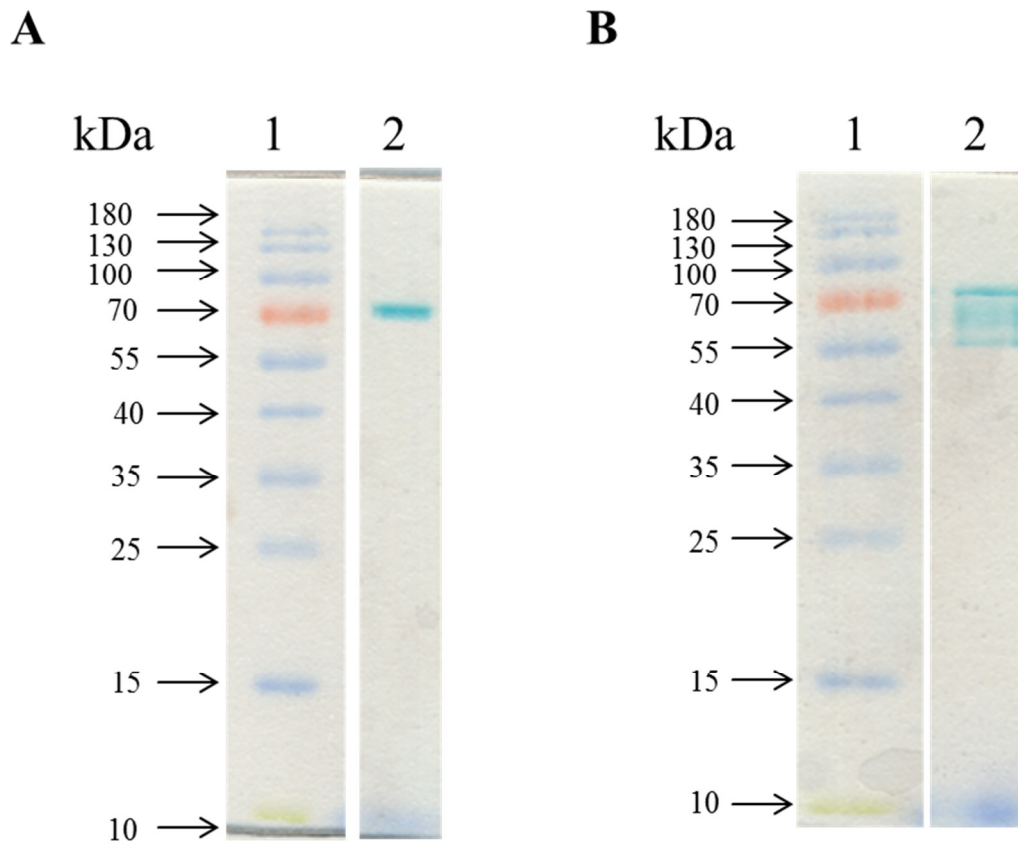


Abbildung 3.22: SDS-PAGE mit den Proteinen Swit\_2227 und Swit\_4160 nach einer Häm-spezifischen Färbung. A) Swit\_2227 - Spur 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Spur 2: Swit\_2227; B) Swit\_4160 - Spur 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Spur 2: Swit\_4160

Da die UV-VIS-Spektren keinen Aufschluss darüber gaben, ob die beiden Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160 PQQ gebunden hatten, wurde ein PQQ-spezifischer Test durchgeführt. Dafür wurden beide Enzyme durch Erhitzen (10 Minuten, 90 °C) denaturiert, zentrifugiert (13.000 rpm, 2 Minuten, RT) und der Überstand für die Rekonstitution des Enzyms\_4395 verwendet. Der anschließende enzymatische Test konnte zeigen, dass das Protein Swit\_2227 zu 98 % und das Protein Swit\_4160 zu 90,5 % mit PQQ beladen waren.

### **3.4.4 Analyse des Substratspektrums und der optimalen Reaktionsbedingungen der Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160**

Anhand der bioinformatischen Analyse wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den beiden Enzymen Swit\_2227 und Swit\_4160 um putative ADHII handelte. Ausgehend davon sollte das Substratspektrum der beiden Enzyme aufgeklärt werden.

Jedes Enzym wurde dazu einem Enzymtest unterzogen, wobei DCPIP als Elektronenakzeptor eingesetzt wurde. Als Puffersystem wurde 40 mM KP-Puffer (pH 8) gewählt und der Test bei Raumtemperatur durchgeführt.

Insgesamt wurden 107 Substrate unterschiedlicher Substanzklassen getestet. Darunter befanden sich zwölf primäre und sekundäre Alkohole, zwölf aliphatische Diole, ein Triol, zwei aromatische Alkohole, zwei derivatisierte Alkohole, sieben zyklische Alkohole, sechs chlorierte Alkohole, drei Hydroxyketone, sieben Polyole, elf Zucker, 27 Aldehyde und elf weitere Substrate (Tabelle 3.14). Zudem wurden alle proteinogenen Aminosäuren mit Ausnahme von Cystein getestet. Cystein wurde aufgrund seiner reduzierenden Eigenschaften nicht verwendet.

Da unter den gegebenen Bedingungen mit keinem der potentiellen Substrate eine Aktivität gefunden werden konnte, wurden im Anschluss die Reaktionsbedingungen variiert. Neben unterschiedlichen pH-Werten zwischen 6 und 9 wurden mit DCPIP und Ferricyanid auch zwei artifizielle Elektronenakzeptoren eingesetzt. Zudem wurden neben KP-Puffer ein MOPS- und ein Tris-HCl-Puffersystem getestet.

Jedoch konnte auch unter geänderten Reaktionsbedingungen keine katalytische Aktivität der beiden Enzyme Swit\_2227 und Swit\_4160 mit den oben genannten Substraten nachgewiesen werden.

Tabelle 3.14: Substrate mit denen die Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160 keine Aktivität zeigten. Eingeteilt nach Substanzklassen.

<b>Alkohole</b>	<b>Aromatische Alkohole</b>	<b>Triole</b>	<b>Aldehyde</b>
2-Butanol	3,4-Dimethoxybenzylalkohol (Veratylalkohol)	Glycerol	Benzencarbaldehyd
1-Dodecanol	2-Furanmethanol (THFA)		Butanal
Ethanol		<b>Zucker</b>	Decanal
1-Heptanol	Derivatisierte Alkohole	D-Fruktose	2,3-Dihydroxapropanal
1-Hexanol	2-Methyl-1,3-propandiol	D-Galaktose	Dodecanal
2-Hexanol	2-Phenyl-1,2-propandiol	D-Glukose	Ethandial
3-Hexanol		2-Keto-D-Glukose	Heptanal
Methanol	<b>Zyklische Alkohole</b>	D-Lyxose	Hexanal
3-Pentanol	1,4-Cyclohexandiol	D-Mannose	2-Hydroxybenzaldehyd
1-Propanol	<i>cis/trans</i> -1,2-Cyclohexandiol	D-Ribose	2-Hydroxyethanal
2-Propanol	<i>cis/trans</i> -1,3-Cyclohexandiol	D-Ribulose	2-Methylbenzaldehyd
1-Octanol	<i>cis</i> -1,2-Cyclopentandiol	D-Tagatose	3-Methylbenzaldehyd
	<i>trans</i> -1,2-Cyclopentandiol	D-Xylose	4-Methylbenzaldehyd
	<i>cis/trans</i> -1,3-Cyclopentandiol		2-Methylbutanal
<b>Dirole</b>	Myo-Inositol	<b>Sonstige</b>	2-Methylpentanal
1,2-Butandiol		Glukose-6-phosphat	2-Nitrobenzaldehyd
1,3-Butandiol		Hypoxanthin	Nonanal
1,4-Butandiol	<b>Chlorierte Alkohole</b>	2-Ketoglukonat	Octanal
1,2-Ethandiol	3,4-Dichlorbenzylalkohol	5-Ketoglukonat	2-Oxopropenal
1,2-Hexandiol	1,3-Dichlor-2-propanol	6-Phosphoglukonat	Pentanal
1,6-Hexandiol	2-Chlorbenzylalkohol	PVA	1,5-Pentandial
1,9-Nonandiol	3-Chlor-1-methoxy-2-propanol	Quinat	3-Phenyl-2-propenal
1,2-Pentandiol	1-(4-Chlor)phenylethanol	Shikimat	Phenylacetaldehyd
1,5-Pentandiol	3-Chlor-1,2-propandiol	Xanthin	Phenylglyoxal
2,4-Pentandiol			3-Phenylpropanal
1,2-Propandiol	<b>Polyole</b>		L-Sorboson
1,3-Propandiol	D-Arabitol		Undecanal
	L-Arabitol		
<b>Hydroxyketone</b>	D-Mannitol		
Acetoin	Meso-Erythritol		
Acetol	D-Ribitol		
Dihydroxyaceton	D-Sorbitol		
	D-Xylitol		

### **3.4.5 Aktivierung der Enzyme Swit\_2227 und Swit\_4160 durch Ethylamin und Ammonium-Ionen**

Es existieren Hinweise darauf, dass ADHs unter Umständen erst eine Aktivierung benötigen um ihre katalytische Aktivität entfalten zu können. Beispiele für Aktivatoren sind dabei Ethylamin (Toyama *et al.* 1995) und Ammonium-Ionen (Anthony 2004). Daher wurden zusätzlich Aktivierungsexperimente mit den beiden potentiellen ADHs Swit\_2227 und Swit\_4160 durchgeführt.

Zum einen wurden die beiden Enzyme dafür mit 50 mM Ethylamin in KP-Puffer (pH 9) inkubiert und anschließend mit DCPIP als Elektronenakzeptor die Absorptionsänderung bei 600 nm beobachtet. Auch hier konnte mit keinem der untersuchten Substrate (siehe oben) eine enzymatische Aktivität festgestellt werden.

Zum anderen wurden dem Reaktionsansatz 20 mM Ammoniumchlorid hinzugefügt. Dazu wurde 40 mM KP-Puffer (pH 9) verwendet und ebenfalls die Veränderung der Absorption von DCPIP bei 600 nm untersucht. Mit Ausnahme von 3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin) und Dihydroxyaceton (DHA) zeigte sich auch in diesem Fall kein Ergebnis. Für die beiden Hydroxyketone Acetoin und DHA wurden mit dem Enzym Swit\_2227 geringe Aktivitäten von 1,7 U/mg und 4,3 U/mg gemessen. Da eine Steigerung der Enzymmenge allerdings nicht zu einer Steigerung der Aktivität führte, musste hier von einem Artefakt ausgegangen werden.

## **3.5 Vergleich des katalytischen Potentials der Plasmamembranen von *G. oxydans* und *S. wittichii* und Analyse der membran-gebundenen Chinoproteine aus *S. wittichii* RW1**

Die beiden Organismen *S. wittichii* RW1 und *G. oxydans* 621H (Prust *et al.* 2005) gehören mit 14 beziehungsweise sieben PQQ-abhängigen Dehydrogenasen zu den Bakterienstämmen mit der größten Anzahl an Chinoproteinen. Einige davon sind in der Plasmamembran verankert. Um erste Hinweise darauf zu erlangen, welche Reaktion diese bisher nicht charakterisierten putativen Dehydrogenasen katalysieren, wurde das katalytische Potential von Membranen aus *S. wittichii* RW1 und *G. oxydans* 621H bestimmt und beide anschließend miteinander verglichen. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Oxidation von Alkoholen und Diolen gelegt, da die entsprechenden Produkte chemisch schwer zugänglich sind.

### 3.5.1 Oxidatives Potential membrangebundener Dehydrogenasen von *G. oxydans* 621H und *S. wittichii* RW1

Für die Präparation von Membranen von *G. oxydans* 621H wurde der Wildtypstamm in einer 500 mL-Kultur angezogen, in der exponentiellen Phase geerntet und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Im Anschluss daran erfolgte eine Membranpräparation durch Ultrazentrifugation (siehe Abschnitt 2.5.10.2). Die Isolierung der Membranen von *S. wittichii* RW1 erfolgte analog. *S. wittichii* RW1 kann im Gegensatz zu *G. oxydans* 621H jedoch nicht selbst PQQ synthetisieren, daher wurden dem Kulturmedium jeweils 5  $\mu$ M PQQ und 10 mM CaCl<sub>2</sub> zugesetzt. Für die spätere Berechnung der spezifischen Enzymaktivität wurde zudem die Proteinkonzentration der Membranen bestimmt. Die Gesamtproteinkonzentration lag im Falle von *G. oxydans* 621H bei 8,6 mg/mL und für *S. wittichii* RW1 bei 9,7 mg/mL.

Um ein ausreichendes Bild davon zu erhalten, welche Substrate durch Chinoproteine in den Membranen von *G. oxydans* 621H und *S. wittichii* RW1 umgesetzt werden, wurde ein PQQ-abhängiger Enzymtest mit DCPIP als artifiziellem Elektronenakzeptor durchgeführt (siehe Abschnitt 2.7.1).

Insgesamt wurde dabei die Oxidation von 58 verschiedenen Substraten untersucht. Darunter fielen 13 primäre und sekundäre Alkohole, 13 Diole, ein Triol, sechs zyklische Alkohole, sechs chlorierte Alkohole, drei derivatisierte Alkohole, acht Polyole, sowie sechs Monosaccharide. Mit Ausnahme von 1,9-Nonandiol (2,5 mM) wurden alle Substrate in einer Endkonzentration von 25 mM in den Enzymtest eingesetzt.

Vergleichsweise hohe Oxidationsraten der Membranen von *G. oxydans* 621H konnten mit den primären Alkoholen Ethanol (410 mU/mg), 1-Propanol (549 mU/mg), 1-Butanol (392 mU/mg), 1-Hexanol (392 mU/mg), 1-Heptanol (267 mU/mg) und 1-Octanol (103 mU/mg) gemessen werden. Die Membranaktivitäten von *G. oxydans* 621H mit den sekundären Alkoholen 2-Propanol, 2-Butanol und 3-Hexanol lagen mit 27 U/mg, 16 U/mg und 44 U/mg in einem Bereich, der unterhalb der Grenze lag, bei der von einer spezifischen Aktivität ausgegangen wurde. Eine Oxidation der aliphatischen Alkohole Methanol, 3-Pentanol, 2-Hexanol und 1-Dodecanol konnte nicht festgestellt werden.

Bei der Untersuchung der Oxidation von Diolen und Triolen zu Hydroxyketonen durch Membranen von *G. oxydans* 621H zeigte sich eine starke Präferenz von  $\beta$ -,  $\epsilon$ - und  $\theta$ -Diolen. Mit den Substraten 1,3-Propandiol, 1,6-Hexandiol und 1,9-Nonandiol konnten jeweils



Umsatzraten von 165, 114 und 128 mU/mg erzielt werden. Mit 1,3-Butandiol (89 mU/mg), 1,4-Butandiol (61 mU/mg) und 1,5-Pentandiol (58 mU/mg) wurden auch weitere Diole geringfügig umgesetzt. Deutlich niedrigere Oxidationsraten wurden zudem mit den Substraten 1,2-Propandiol, 1,2-Butandiol und 1,2-Pentandiol mit jeweils circa 30 mU/mg beobachtet. Weitere Diole mit denen keine Aktivität gemessen wurde, waren 1,2-Ethandiol, 2,3-Butandiol, 2,4-Pentandiol, 1,2-Hexandiol, sowie das Triol Glycerol. Mit Ausnahme von *cis*-1,2-Cyclopentandiol (80 mU/mg) und *cis/trans*-1,2-Cyclohexandiol (34 mU/mg) konnte zudem mit zyklischen Alkoholen, sowie chlorierten Alkoholen kein Effekt erzielt werden. Die Analyse von drei derivatisierten Alkoholen zeigte ebenfalls keine Aktivitäten.

Unter den analysierten Zuckern wurde mit D-Glukose (468 mU/mg), D-Fruktose (59 mU/mg), D-Xylose (48 mU/mg) und D-Galaktose (12 mU/mg) eine mehr oder weniger starke Oxidationsreaktion beobachtet. Zudem konnte unter basischen Reaktionsbedingungen mit keinem der verwendeten Polyole eine Änderung der Absorption festgestellt werden. Dies war darauf zurückzuführen, dass die membrangebundene PQQ-abhängige Polyol-Dehydrogenase von *G. oxydans* 621H nur bei sauren pH-Bedingungen (pH 5) aktiv ist.

Mit den Membranen von *S. wittichii* RW1 wurde analog vorgegangen und es konnte gezeigt werden, dass diese die  $\alpha$ -Diole 1,2-Butandiol (109 mU/mg), 2,3-Butandiol (106 mU/mg), 1,2-Pentandiol (133 mU/mg), 1,2-Hexandiol (101 mU/mg) und in gewissen Maße die  $\beta$ -Diole 1,3-Butandiol (45 mU/mg) und 2,4-Pentandiol (84 mU/mg) oxidieren. Mit den weiteren Diolen 1,2-Ethandiol, 1,3-Propandiol, 1,4-Butandiol, 1,5-Pentandiol, 1,6-Hexandiol und 1,9-Nonandiol konnte keine Änderung der Absorption von DCPIP festgestellt werden. Weiterhin wurde eine Oxidation der sekundären Alkohole 2-Butanol (35 mU/mg), 3-Pentanol (96 mU/mg) und 3-Hexanol (81 mU/mg) beobachtet, während mit allen anderen getesteten aliphatischen Alkoholen (Methanol, Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol, 1-Butanol, 1-Hexanol, 2-Hexanol, 1-Heptanol, 1-Octanol, 1-Dodecanol) keine Reaktion detektiert werden konnte. Das gleiche Ergebnis zeigte sich für die chlorierten Alkohole 3-Chlor-1-methoxy-2-propanol, 3-Chlor-1,2-propandiol, 3,4-Dichlorbenzylalkohol, 2-Chlorbenzylalkohol, 1,3-Dichlor-2-propanol und 1-(4-Chlor)phenylethanol. Im Gegensatz dazu wurden mit allen zyklischen Alkoholen vergleichsweise hohe Oxidationsreaktionen beobachtet. Die höchste spezifische Aktivität der Membranen wurde dabei mit *cis/trans*-1,2-Cyclohexandiol mit 143 mU/mg gemessen, gefolgt von 1,4-Cyclohexandiol mit 141 mU/mg, *cis*-1,2-Cyclopentandiol mit 136 mU/mg, *cis/trans*-1,3-Cyclohexandiol mit 107 mU/mg, *cis/trans*-1,3-Cyclopentandiol mit 83 mU/mg und *trans*-1,2-Cyclopentandiol mit 58 mU/mg. Zusätzlich wurde die Umsetzung

---

der Zuckeralkohole D-Mannitol (133 mU/mg), D-Ribitol (131 mU/mg), Meso-Erythritol (128 mU/mg), D-Arabitol (93 mU/mg) und L-Arabitol (21 mU/mg) zu den korrespondierenden Ketosen aufgezeigt.

Zudem konnte keine spezifische Aktivität der Membranpräparationen mit den Substraten 2-Methyl-1,3-propandiol, 2-Phenyl-1,2-propandiol und 3,4-Dimethoxybenzylalkohol, sowie mit Monosacchariden (D-Glukose, D-Fruktose, D-Xylose, D-Galaktose) gemessen werden.

Bei dem Vergleich der Membranaktivitäten von *G. oxydans* 621H und *S. wittichii* RW1 zeigte sich deutlich, dass Membranen von *S. wittichii* RW1 bevorzugt zyklische Alkohole und  $\alpha$ -Diolen oxidieren. Zudem konnte die Oxidation von sekundären Alkoholen zu Ketonen beobachtet werden. Im Vergleich dazu wurden von Membranen aus *G. oxydans* 621H eher  $\beta$ -,  $\varepsilon$ - und  $\theta$ -Diolen, sowie primäre Alkohole zu Aldehyden umgesetzt. Weiterhin konnte unter leicht basischen Reaktionsbedingungen festgestellt werden, dass Membranen von *S. wittichii* RW1 im Gegensatz zu denen von *G. oxydans* 621H Polyole zu Ketosen oxidieren (Tabelle 3.15).

Tabelle 3.15: Vergleich der PQQ-abhängigen Enzymaktivität der Membranen von *S. wittichii* und *G. oxydans*

	Substrat	Membranaktivität [mU/mg]	
		<i>S. wittichii</i>	<i>G. oxydans</i>
<b>primäre Alkohole</b>	1-Butanol	0	392
	Ethanol	0	410
	1-Heptanol	0	267
	1-Hexanol	0	392
	1-Propanol	0	549
	1-Octanol	0	103
<b>sekundäre Alkohole</b>	3-Hexanol	81	44
	3-Pentanol	96	0
<b><math>\alpha</math>-Diole</b>	1,2-Butandiol	109	29
	2,3-Butandiol	106	0
	1,2-Hexandiol	101	0
	1,2-Pentandiol	133	30
<b><math>\beta</math>-Diole</b>	1,3-Butandiol	45	89
	1,6-Hexandiol	0	114
	1,9-Nonandiol	0	128
	1,3-Propandiol	0	165
<b>zyklische Alkohole</b>	<i>cis/trans</i> -1,2-Cyclohexandiol	143	34
	<i>cis/trans</i> -1,3-Cyclohexandiol	107	0
	1,4-Cyclohexandiol	141	0
	<i>cis</i> -1,2-Cyclopentandiol	136	80
	<i>cis/trans</i> -1,3-Cyclopentandiol	83	0
<b>Zuckeralkohole</b>	D-Arabitol	93	0
	D-Mannitol	133	0
	Meso-Erythritol	128	0
	D-Ribitol	131	0

### 3.5.2 Bioinformatische Analyse der membrangebundenen Dehydrogenasen aus *S. wittichii* RW1

Im Genom von *S. wittichii* RW1 fanden sich zwei Gene, die für putative membrangebundene Chinoproteine kodieren und somit für die oben beschriebene Membranaktivität verantwortlich sein könnten. Die beiden Proteine Swit\_1961 und Swit\_2024 wurden eingehend bioinformatisch untersucht, um herauszufinden welches die genannten Oxidationsreaktionen durchführt.

#### 3.5.2.1 Bioinformatische Untersuchungen der putativen membrangebundenen Sorbitol-Dehydrogenase Swit\_1961

Zu den in Frage kommenden Kandidaten für die PQQ-abhängige Enzymaktivität von Membranen von *S. wittichii* RW1 gehört das Gen *swit\_1961*, das für eine 783 Aminosäuren umfassende putative membrangebundene Sorbitol-Dehydrogenase (mSLDH) kodiert.

Eine BLAST-Suche gegen die nicht-redundante Datenbank von NCBI ergab Homologien (49 bis 50 % Identität, 63 % Ähnlichkeit) zu GDHs aus Vertretern der Sphingomonadaceae (*Sphingomonas* sp KC8 (WP\_029624447.1), *Sphingobium* sp Ant17 (WP\_043150320.1), *Sphingobium* sp ba1 (WP\_037478676.1), *Sphingobium senophagum* (WP\_017180906.1)), sowie zu membrangebundenen Chinoproteinen der Glukose/Quinat/Shikimat-Familie (45 – 46 % Identität, 60 – 61 % Ähnlichkeit) aus *Sphingobium chlorophenicum* L-1 (AEG50875.1) und *Bordetella hinzii* L60 (KCB21051.1). Weiterhin wurde eine BLAST-Suche nach Homologen in *G. oxydans* durchgeführt. Dabei wurden Homologien (39 – 40 % Identität, 53 – 56 % Ähnlichkeit) zu der GDH von *G. oxydans* (WP\_041112911.1) und der Quinat/Shikimat-Dehydrogenase aus *G. oxydans* DSM3504 (AHK71324.1) gefunden.

Die Untersuchung der konservierten Domänen in dem Protein Swit\_1961 mittels der CDD-Suche (NCBI) und Interpro zeigte eine Zugehörigkeit zu der Unterfamilie der membrangebundenen PQQ-abhängigen GDHs (EC 1.1.5.2), sowie der Familie der Glukose/Quinat/Shikimat-Dehydrogenasen (EC 1.1.99.25). Zudem waren das aktive Zentrum von PQQ-bindenden Proteinen mit zehn von zehn Aminosäuren und das Trp-Docking Motiv mit 48 von 48 Aminosäureresten konserviert.

Als mögliche Tertiärstruktur wurde ein 8-facher  $\beta$ -Propeller aus insgesamt 32  $\beta$ -Faltblättern angenommen. Diese These konnte durch eine Analyse der Sekundärstruktur mittels Psipred bestätigt werden, die insgesamt 34  $\beta$ -Faltblattstrukturen identifizieren konnte (V36 – T39,

W193 – H197, A213 – V215, T218 – C222, A227 – I231, A241 – F242, T260 – Y261, A2743 – T278, R283 – D288, E303 – S305, A325 – V327, K330 – V333, G335 – V337, G348 – F353, L360 – W364, L400 – P404, S427 – D432, E438 – Q443, S459 – P464, L469 – Q475, Q481 – D486, E498 – R499, S567 – S569, I590 – N594, M600 – V605, I660 – D664, M670 – H674, S703 – V705, L710 – A714, F721 – D725, L731 – R736, M746 – S750, R755 – A762, Q775 – A780). Außerdem wurde die putative Tertiärstruktur modelliert (Abbildung 3.23), in der die Propellerstruktur deutlich wird.

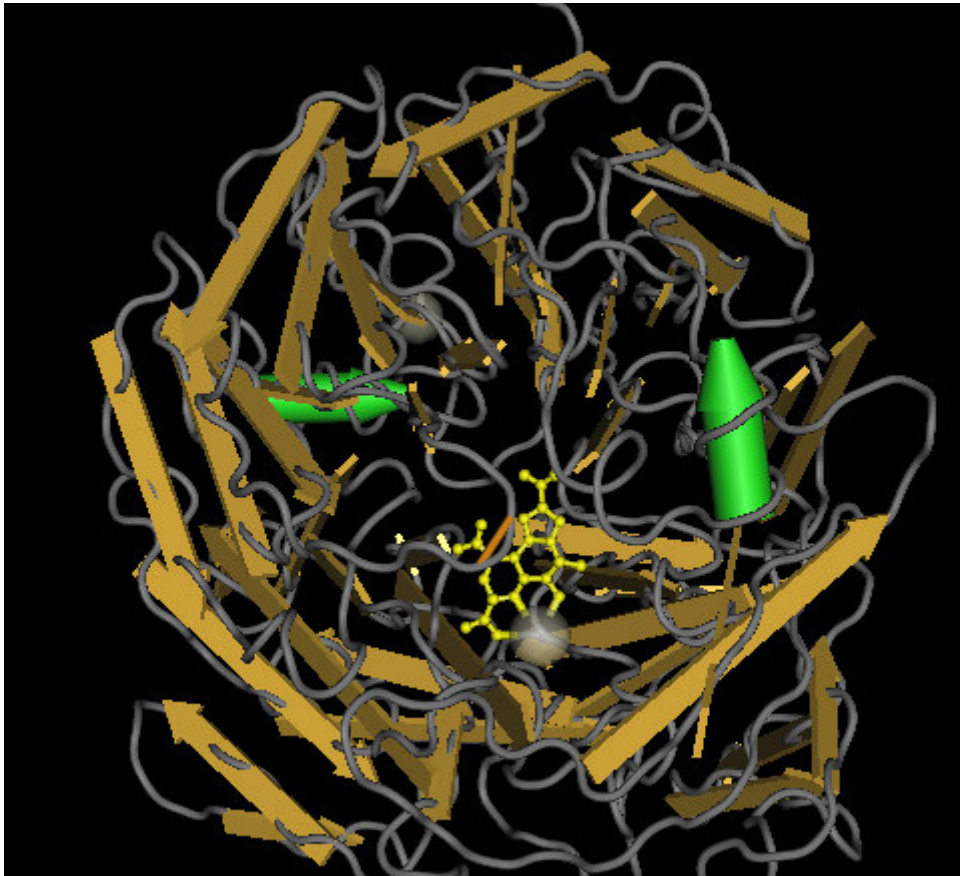


Abbildung 3.23: Modellierte Tertiärstruktur des Proteins Swit\_1961. Grüne Zylinder:  $\alpha$ -Helices; Gelbe Pfeile:  $\beta$ -Faltblattstrukturen; graue Kugeln:  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen; gelbe Struktur in der Mitte: PQQ im aktives Zentrum, koordiniert an ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion. Die Abbildung wurde mit der Software Cn3D4.3.1 angefertigt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>) (Wang *et al.* 2000).

Es konnte festgestellt werden, dass das Protein Swit\_1961 membrangebunden ist. Diese Schlussfolgerung beruht darauf, dass zum einen mit den gängigen Internetprogrammen (siehe Abschnitt 2.2.1) kein Sec-abhängiges Signalpeptid gefunden wurde. Zum anderen wurden fünf Transmembrandomänen (A18 – L38, T44 – W61, A68 – W84, G90 – L109, I121 – L139) mittels der Internettools TMHMM 2.0 Server und Phobius identifiziert.

Anhand der bioinformatischen Untersuchungen war davon auszugehen, dass es sich bei dem putativen Enzym Swit\_1961 um eine membrangebundene PQQ-abhängige GDH oder Glukose/Quinat/Shikimat-Dehydrogenase handelte. Die Ergebnisse, die mit den Membranen von *S. wittichii* RW1 erzielt wurden, widersprachen jedoch dieser Annahme und zeigten, dass automatische Annotationen nicht immer der Tatsache entsprechen.

### 3.5.2.2 Bioinformatische Analyse der potentiellen mGDH Swit\_2024

Die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse der, aus 784 Aminosäuren bestehenden, putativen mGDH Swit\_2024 entsprachen in weiten Teilen denen für das Protein Swit\_1961. Es konnte dieselbe Einteilung in die entsprechenden Enzymklassen vorgenommen, sowie die Tertiärstruktur aus einem 8-fachen Propeller bestätigt werden.

Die Berechnung der wahrscheinlichen Sekundärstruktur mittels Psipred (siehe Abschnitt 2.2.1) zeigte insgesamt 33  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Y38 – L40, V193 – H198, L215 – V217, T220 – C224, A229 – I230, A243 – F244, A256 – C258, G260 – H264, R276 – A280, R285 – D290, E305 – S307, A327 – I329, R332 – I335, G350 – D356, L362 – D367, L402 – P406, S429 – D434, E440 – Q445, S461 – P466, L471 – Q477, Q483 – D488, S569 – V571, N592 – N596, V641 – R642, S660 – D666, V672 – E676, T705 – V707, V713 – I715, A722 – D727, L733 – D737, M748 – S750, Q758 – A764, L777 – A782), sowie fünf  $\alpha$ -helikale Strukturen im Bereich des N-Terminus. Zudem wurde ebenso, wie bei dem Protein Swit\_1961, kein Signalpeptid, dafür aber fünf Transmembrandomänen gefunden (A20 – L42, A46 – W63, A70 – E87, G92 – W114, V121 – G143).

Bei den Homologien ergab sich ein nahezu identisches Bild, mit leicht erhöhten Identitätswerten.

### 3.5.2.3 Klonierung der beiden Gene *swit\_1961* und *swit\_2024* in Überexpressionsvektoren für *E. coli* und *S. wittichii* RW1 und Versuch der heterologen Überproduktion

Die Klonierung der beiden Gene *swit\_1961* und *swit\_2024* erfolgte ausgehend von genomischer DNA von *S. wittichii* RW1 mittels PCR. Da beide Gene mit 69,9 und 71,3 % sehr hohe GC-Anteile aufwiesen, wurde ein modifiziertes Protokoll (Spiess *et al.* 2004) verwendet. Dafür wurden die Oligonukleotidpaare Sw1961EcoRI-f/Sw1961SnaBI-r und Sw2024f/Sw2024r genutzt, wobei die Vorwärts-Primer jeweils eine *EcoRI*-Schnittstelle und die Rückwärts-Primer je eine *SnaBI*-Schnittstelle aufwiesen. Im Falle des Gens *swit\_1961*

konnte ein Fragment von ungefähr 2,5 kb amplifiziert werden (Abbildung 3.24), was der theoretischen Größe von 2384 bp entsprach. Das Gen *swit\_2024* konnte auch nach mehreren Versuchen mit modifizierten PCR-Protokollen nicht amplifiziert werden.

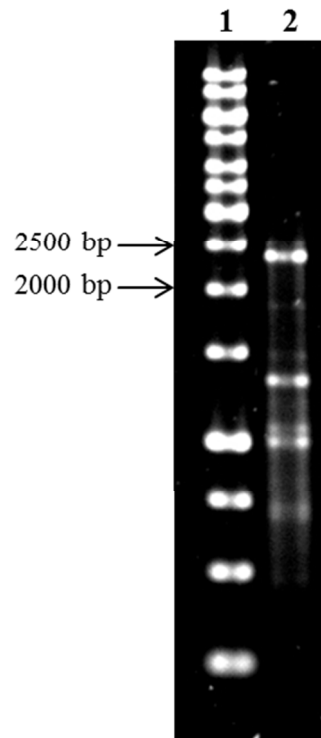


Abbildung 3.24: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR zur Amplifizierung des Gens *swit\_1961* mittels Agarosegelelektrophorese. Die PCR wurde mit den Oligonukleotiden Sw1961EcoRI-f und Sw1961SnaBI-r und genomischer DNA von *S. wittichii* RW1 als Matrize durchgeführt. Spur 1: GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland); Spur 2: PCR-Produkt der Amplifizierung des Gens *swit\_1961*

Im Anschluss wurde das Gen *swit\_1961* in den Vektor pBBR1p264\_Streplong kloniert und mittels Hitzeschock (siehe Abschnitt 2.5.5.1) in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert.

Der anschließende Versuch einer heterologen Überproduktion des Proteins Swit<sub>1961</sub> in *E. coli* erbrachte kein Ergebnis. Ebenso war es nicht möglich den Überexpressionsvektor in *S. wittichii* RW1 einzubringen.

Eine biologische Charakterisierung dieser beiden putativen Dehydrogenasen Swit<sub>1961</sub> und Swit<sub>2024</sub> war daher bisher nicht möglich und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

## 4. Diskussion

In der industriellen Biotechnologie gewinnt die Anwendung bakterieller Enzyme für die Herstellung von Chemikalien und Pharmazeutika, sowie für Sensorsysteme eine immer größere Bedeutung. Zu diesen bakteriellen Katalysatoren gehören auch vermehrt PQQ-abhängige Enzyme, die beispielsweise bereits für die Produktion von Essig (Matsushita *et al.* 2002) und als Glukose-Biosensoren (D'Costa *et al.* 1986) eingesetzt werden.

Durch die Entschlüsselung des Genoms des Bakteriums *S. wittichii* RW1 (Miller *et al.* 2010) rückte ein neuer Organismus in den Fokus der Erforschung katalytisch aktiver Chinoproteine. Die hohe Anzahl und die teilweise geringen Sequenzhomologien der PQQ-abhängigen Enzyme in diesem Organismus, ließen darauf hoffen, einige Vertreter neuer Enzymklassen zu entdecken, die für weiterführende Anwendungen nutzbar sind.

Um das Potential dieser unerforschten Dehydrogenasen auszuschöpfen, ist es notwendig diese zu identifizieren, durch geeignete Expressionssysteme und Reinigungsmethoden zugänglich zu machen, sowie anschließend biologisch zu charakterisieren.

Daran anknüpfend war die Zielsetzung dieser Arbeit die Identifizierung bakterieller PQQ-Dehydrogenasen aus dem  $\alpha$ -Proteobakterium *S. wittichii* RW1, deren Produktion in geeigneten Expressionstämmen, Reinigung sowie biologische Untersuchung ihrer Eigenschaften. Außerdem sollte eine biotechnologische Anwendung erreicht werden.

### 4.1 PQQ-abhängige Dehydrogenasen

Chinoproteine sind Enzyme, die PQQ als prosthetische Gruppe nutzen und werden auch als PQQ-abhängige Dehydrogenasen bezeichnet. Diese Enzyme kommen ausschließlich in dem periplasmatischen Raum oder an die Cytoplasmamembran gebunden, in einigen Gram-negativen Bakterien vor. Oftmals sind sie an der Oxidation von Polyolen, Zuckern oder Alkoholen beteiligt.

#### 4.1.1 Klassifizierung und Struktur von Chinoproteinen

Die Enzymklasse der Chinoproteine unterscheidet sich deutlich von NADH- oder FAD-abhängigen Enzymen und kann in zwei Gruppen eingeteilt werden (Yamada *et al.* 2003). In die erste Gruppe fallen Chinoproteine, die keine Cyt *c*-Domäne aufweisen und mit dem Chinon-Pool interagieren. Die zweite Gruppe beinhaltet Chinohämoproteine, die ein Cyt *c* kovalent gebunden haben. Letztere lassen sich nochmals in membrangebundene ADH Typ III



(ADHIII) und lösliche ADH Typ II (ADHII) unterteilen (siehe Abschnitt 4.4.1). Die erste Gruppe der Chinoproteine umfasst ebenfalls mehrere Unterklassen. Dazu gehören membrangebundene Proteine mit normalerweise fünf TMHs, wie beispielsweise die GDH (Cleton-Jansen *et al.* 1990; Yamada *et al.* 1993), die Quinat/Shikimat-Dehydrogenase (Elsemore & Ornston 1994) oder die Polyol-Dehydrogenase (Miyazaki *et al.* 2002), weiterhin periplasmatische lösliche Aldose-Dehydrogenasen und ADH Typ I (ADHI) (siehe Abschnitt 4.4.1) (Groen *et al.* 1984), sowie die Methanol-Dehydrogenase (MDH) (Anthony & Williams 2003), die mit Cyt *c* interagiert.

Die generelle Tertiärstruktur von PQQ-abhängigen Dehydrogenasen wurde zuerst für drei MDHs aus methylophilen Bakterien (Xia *et al.* 1992; Xia *et al.* 1996; Ghosh *et al.* 1995) aufgeklärt und später durch Ergebnisse für die ADHI aus *P. aeruginosa* (Keitel *et al.* 2000) und die ADHII aus *P. putida* HK5 (Chen *et al.* 1999) bestätigt. Die Struktur der  $\alpha$ -Untereinheit stellt dabei einen „Superbarrel“ dar, der wie ein Propeller geformt ist. Dieser „Superbarrel“ besteht aus acht viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die die Propellerblätter bilden und durch Trp-Docking Motive (Ghosh *et al.* 1995; Xia *et al.* 1996) zusammengehalten werden.

Abgesehen von der hydrophoben Region an dem N-Terminus von membrangebundenen Enzymen und der Cyt *c*-Bindestelle ähneln sich die Sequenzen der meisten Chinoproteine (Yamada *et al.* 2003). Daher war davon auszugehen, dass auch die Tertiärstrukturen vergleichbar sind. Eine Ausnahme davon ist die sGDH und Proteine, die zu dieser Klasse gehören, deren Primärstruktur sich von allen anderen Chinoproteinen unterscheiden und deren Tertiärstruktur eine Propellerstruktur bestehend aus nur sechs viersträngigen Propellerblättern bilden (Cleton-Jansen *et al.* 1988; Oubrie *et al.* 1999b).

Außerdem ist zu beachten, dass PQQ-abhängige Enzyme zweiwertige Kationen in Form von meist  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen oder  $\text{Mg}^{2+}$  für ihre katalytische Aktivität benötigen.

#### **4.1.2 Bedeutung von Chinoproteinen für die Biotechnologie**

Bereits in den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde die Bedeutung von PQQ-abhängigen Enzymen für biotechnologische Anwendungen erkannt und deren Erforschung kontinuierlich weiter verfolgt. Dabei werden Chinoproteine bereits in diversen Anwendungsgebieten genutzt, wozu die Bioremediation, die Biokonversion nützlicher Substrate oder die Entwicklung von Biosensoren gehören.

An der Bioremediation sind vor allem ADHII beteiligt, die xenobiotische Alkohole abbauen. Beispiele dafür sind die ADHII aus *P. putida* HK5 (Toyama *et al.* 1995), *R. eutropha* und *C. testosteroni* (Groen *et al.* 1986). Zudem spielen PQQ-abhängige Dehydrogenasen eine Rolle in der Landwirtschaft. Membrangebundene GDHs aus Bodenbakterien produzieren beispielsweise Säuren, die unlösliches Phosphat solubilisieren und für das Pflanzenwachstum zugänglich machen (Babu-Khan *et al.* 1995). Neben der Bioremediation kann auch die oxidative Fermentation mittels PQQ-abhängiger Enzyme, vor allem von Essigsäurebakterien, für die Biotechnologie genutzt werden. Dabei produzieren derartige Enzyme etwa Essigsäure aus Ethanol (Matsushita *et al.* 1994) oder L-Sorbose, die für die Synthese von Vitamin C benötigt wird. Weiterhin ist die Enantioselektivität vieler Chinoproteine eine nützliche Eigenschaft um beispielsweise Enantiomer-reine Stoffe für die pharmazeutische Industrie zu generieren. S-Solketal, ein Synthesebaustein für die Herstellung von Arzneimitteln, kann durch die ADHII von *C. testosteroni* gebildet werden (Geerlof *et al.* 1994) und R-Glycidol durch die ADHIII von Essigsäurebakterien (Machado *et al.* 2014). Aber auch in der Medizin finden PQQ-abhängige Enzyme Anwendung. Bereits vor 30 Jahren wurden PQQ-abhängige Biosensoren für Glukose entwickelt (D'Costa *et al.* 1986). Derartige Biosensoren werden mittlerweile auch als Teststreifen für Diabetiker eingesetzt (Heller 2008).

Das biotechnologische Potential von PQQ-abhängigen Enzymen ist allerdings noch lange nicht ausgereizt, da zahlreiche bisher nicht charakterisierte und sicherlich auch noch unentdeckte Chinoproteine existieren, die in Zukunft noch eine Rolle in der Biotechnologie spielen könnten.

#### **4.1.3 PQQ-Dehydrogenasen von *S. wittichii* RW1**

Essigsäurebakterien, wie *Gluconobacter* sp, sowie Bakterien aus der Gattung *Pseudomonas* sind bekannt dafür viele PQQ-abhängige Dehydrogenasen zu besitzen. *G. oxydans* beispielsweise ist auf einen Stoffwechsel mit Chinoproteinen spezialisiert und kodiert in seinem Genom sieben PQQ-abhängige Dehydrogenasen (Prust *et al.* 2005).

Die Untersuchung des Genoms von *S. wittichii* RW1 hat gezeigt, dass dieser Organismus Gene für insgesamt 14 Chinoproteine aufweist. Damit ist *S. wittichii* RW1 von allen Bakterien mit bereits vollständig sequenziertem Genom, dasjenige mit der größten Anzahl an putativen PQQ-abhängigen Enzymen.

Anhand vorausgegangener Strukturvergleiche und der generellen Klassifizierung von Chinoproteinen wurden das Protein Swit\_0693 als ADHI, die Proteine Swit\_0721,

Swit\_1001, Swit\_2227, Swit\_4160 und Swit\_5136 als ADHII und die beiden Proteine Swit\_1440 und Swit\_4395 als Aldose-Dehydrogenasen klassifiziert. Die beiden putativen Chinohämoproteine Swit\_1323 und Swit\_1441 weisen als Besonderheit statt einer C-terminalen eine N-terminale Cyt *c*-Bindestelle auf. Zudem zeigen die Sequenzen der zwei membrangebundenen Enzyme Swit\_1961 und Swit\_2024 nur geringe Homologien gegenüber anderen Membranproteinen. Das dritte Protein (Swit\_1900) von *S. wittichii* RW1, das eine TMH aufweist, zeigte die höchste Homologie zu der mGDH, muss mit nur einer TMH allerdings als periplasmatisch angesehen werden. Eine ebenso hohe Homologie zu der mGDH hatte das Protein Swit\_1054, das allerdings keine TMHs besitzt. All diese Ergebnisse, sowie die Tatsache, dass einige der 14 putativen Chinoproteine von *S. wittichii* RW1 nur geringe Homologien zu bereits charakterisierten PQQ-abhängigen Enzymen aufweisen, deuten darauf hin, dass diese potentiell zu neuen Enzymklassen gehören.

Die hohe Anzahl an PQQ-abhängigen Enzymen in dem Genom von *S. wittichii* RW1 mag ein wenig verwunderlich erscheinen, da dieser Organismus kein PQQ-Biosynthesecluster besitzt. Jedoch konnte bereits an der mGDH in *E. coli* gezeigt werden, dass das Fehlen von PQQ-Synthesegenen kein Hindernis für die Ausbildung von Chinoproteinen ist (Yamada *et al.* 2003).

## **4.2 Charakterisierung der PQQ-abhängigen ALDH Swit\_4395**

Im Anschluss an die Identifizierung aller PQQ-abhängigen Enzymen aus *S. wittichii* RW1 wurde damit begonnen, diese bioinformatisch zu untersuchen, die entsprechenden Gene in geeignete Überexpressionsvektoren zu klonieren, die Enzyme zu produzieren, sowie biologisch zu charakterisieren. Im Zuge dessen konnte das Gen *swit\_4395* in einen neuartigen Expressionsvektor kloniert und anschließend sowohl heterolog in *E. coli*, als auch homolog in *S. wittichii* RW1 exprimiert und das rekombinante Protein mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Zudem wurden die Eigenschaften des Enzyms Swit\_4395, seine prosthetischen Gruppen, die Lokalisierung in der Zelle, sowie die mutmaßliche physiologische Funktion analysiert.

### **4.2.1 Bioinformatische Analyse des Proteins Swit\_4395**

Um eine erste Einordnung des putativen Enzyms Swit\_4395 aus *S. wittichii* RW1 vorzunehmen, wurde eine Analyse mittels verschiedener bioinformatischer Programme vorgenommen. Dabei konnte das Enzym Swit\_4395 der Superfamilie der löslichen PQQ-abhängigen Chinoproteine zugeordnet werden. Zudem waren konservierte Domänen der

Familie der löslichen Chinoprotein GSDH vorhanden, die meist in Organismen, die keine PQQ-Synthesegene aufweisen, vorkommen (Pallanca & Smirnov 1999). Die Hypothese, dass es sich bei Swit\_4395 um ein Enzym handeln könnte, das L-Sorboson umsetzt, ließ auf eine mögliche biotechnologische Anwendung in der Produktion von Vitamin C (L-Ascorbinsäure) schließen. Die großtechnische Herstellung von Vitamin C basiert meist noch auf der Reichstein-Synthese (Reichstein & Grüssner 1934) bei der L-Ascorbinsäure über mehrere Schritte aus D-Glukose gewonnen wird. Mittlerweile sind etliche mikrobielle Enzyme bekannt, die dieses Verfahren vereinfachen könnten. Die Sorboson-Dehydrogenase (SNDH) aus *G. oxydans* T-100 beispielsweise produziert 2-Keto-Gulonsäure, die chemisch zu L-Ascorbinsäure umgesetzt werden kann (Saito *et al.* 1997). Zudem existieren sowohl NADP-abhängige (Loewus *et al.* 1990), als auch PQQ-abhängige (Miyazaki *et al.* 2006) SNDHs, die direkt aus L-Sorboson, in einer Ein-Schritt-Reaktion, Vitamin C herstellen können. Sollte sich das Enzym Swit\_4395 als effektive SNDH erweisen, wäre eine potentielle industrielle Anwendung gegeben.

Der Abgleich der Sequenz des Proteins Swit\_4395 mit Proteindatenbanken ergab außerdem Homologien zu zahlreichen GSDHs aus Sphingomonadaceae, wie *Sphingomonas* sp KC8, *Sphingobium japonicum* und *Sphingobium indicum*, sowie aus etlichen *Xanthomonas*- und *Stenotrophomonas*-Arten. Zudem konnten Homologien zu bereits charakterisierten Enzymen, wie der sGDH B aus *A. calcoaceticus* (Cleton-Jansen *et al.* 1989) und der löslichen Aldose-Dehydrogenase aus *E. coli* (Southall *et al.* 2006) festgestellt werden. Die weite Verbreitung homologer Proteine innerhalb dieser verwandter Organismen wies auf eine wichtige metabolische Funktion des Proteins Swit\_4395 hin.

Da Ergebnisse bioinformatischer Werkzeuge allerdings nicht zweifelsfrei Aufschluss über die tatsächliche Funktion eines Enzyms geben können, musste eine konkrete biologische Charakterisierung des putativen Enzyms Swit\_4395 vorgenommen werden.

#### **4.2.2 Heterologe und homologe Produktion des Proteins Swit\_4395**

Das Protein Swit\_4395 konnte erfolgreich sowohl heterolog in *E. coli*, als auch homolog in *S. wittichii* produziert und anschließend mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Mit Hilfe einer SDS-PAGE wurde die Größe des rekombinanten Proteins mit 39,4 kDa bestimmt, was sehr gut mit der theoretischen Größe inklusive des verlängerten Strep-Tag (1555 Da) und ohne natives Signalpeptid von 39,2 kDa, übereinstimmte. Eine Untersuchung mittels Massenspektrometrie bestätigte dieses Ergebnis mit einem

experimentell bestimmten Molekulargewicht von 39329,82 Da. Die Proteinausbeute lag sowohl in *E. coli*, als auch in *S. wittichii* RW1 bei 3 mg/L Kultur. In vergangenen Studien zur Proteinproduktion mit dem Promotor p264 wurden Ausbeuten von 14 mg/L in *E. coli* und 10 mg/L in *G. oxydans* für die cytoplasmatische Arabitol-Dehydrogenase von *G. oxydans* 621H erzielt (Kallnik *et al.* 2010). Die Verringerung der Ausbeute in *E. coli*, um den Faktor vier, lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass es sich bei Swit\_4395 um ein periplasmatisches Protein handelt. Das Sec-abhängige Transportsystem dürfte daher durch eine hohe Proteinproduktion, die auf die Verwendung eines starken Promotors zurückzuführen ist, überlastet gewesen sein. Die Ergebnisse für *S. wittichii* RW1 im Vergleich zu *G. oxydans* sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Promotor p264 ursprünglich aus *G. oxydans* stammt und dafür optimiert wurde.

Die Expression des Gens *swit\_4395* mittels des Überexpressionsvektors pJZ1 weist einige Besonderheiten auf. Basierend auf dem „broad-host-range“ Plasmid pBBR1-MCS-2 (Kovach *et al.* 1995) enthält der Vektor pJZ1 den Promotor p264 aus dem Essigsäurebakterium *G. oxydans* 621H (Kallnik *et al.* 2010), das Signalpeptid *pelB* aus *E. coli*, den modifizierten Strep-Tag mit verlängerter Linkersequenz (APGGGSAWSHPQFEK) und das Gen *swit\_4395* aus *S. wittichii* RW1. Somit ist es gelungen ein Chinoprotein mit Hilfe von Elementen aus drei verschiedenen Proteobakterien zu produzieren. Zudem war es das erste Mal überhaupt, dass ein Gen aus *S. wittichii* RW1 homolog exprimiert wurde.

Die Verwendung des starken Promotors p264 (Kallnik *et al.* 2010) konnte damit gerechtfertigt werden, dass es sich bei dem Protein Swit\_4395 um ein periplasmatisches Protein handelte. Wie auch bei cytoplasmatischen Proteinen sollten sich hohe Expressionsraten nicht negativ auf das Wachstum der Expressionsstämme beziehungsweise die Proteinfaltung auswirken. Im Gegensatz dazu wäre bei der Produktion membrangebundener Proteine ein schwächerer Promotor vorzuziehen, da eine starke Proteinproduktion zu einer Überlastung der Cytoplasmamembran und letztlich zum Zelltod führen kann. Zudem ist die Verwendung eines starken Promotors vorzuziehen, wenn hohe Proteinausbeuten erwünscht sind. Der Strep-Tag II (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland) eignet sich für die Aufreinigung von Metalloproteinen, Membranproteinen, sowie jeder anderen Art von Proteinen (Schmidt & Skerra 2007). Dennoch kann es vorkommen, dass sich der Affinitätstag negativ auf die Faltung beziehungsweise Funktion auswirkt. Daher wurde ein Strep-Tag mit einer verlängerten Verbindungssequenz konstruiert, der vor allem für Membranproteine und periplasmatische Proteine Vorteile bringen sollte. Hier wurde die Funktionstüchtigkeit des

Streplong getestet und es konnte gezeigt werden, dass die Aufreinigung des Proteins Swit\_4395 mittels des verlängerten Strep-Tags funktionierte. Vektoren mit der *pelB*-Signalsequenz (Studier & Moffatt 1986) sind vor allem dafür geeignet periplasmatische Proteine in *E. coli* zu produzieren (Sokolosky & Szoka 2013). Daher wurde die native Signalsequenz in dem Gen *swit\_4395* ausgetauscht. Die Sekretion des Proteins Swit\_4395 ins Periplasma war anschließend sowohl in *E. coli*, als auch in *S. wittichii* RW1 erfolgreich.

### 4.2.3 Eigenschaften des Enzyms Swit\_4395

Das Protein Swit\_4395 wurde heterolog in *E. coli* produziert, gereinigt und anschließend charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass das Enzym Swit\_4395 ein breites Spektrum an Aldehyden oxidiert. Andere charakterisierte ALDHs nutzen nur eine begrenzte Anzahl an Aldehyden als Substrate. Das Chinohämoprotein aus *Ga. diazotrophicus* ist in der Lage aliphatische Aldehyde wie Acetaldehyd, Propionaldehyd und Glutaraldehyd zu oxidieren (Gómez-Manzo *et al.* 2010). Im Gegensatz dazu setzt das Enzym Swit\_4395 aliphatische und aromatische Aldehyde, Ketoaldehyde, Hydroxyaldehyde, sowie Dialdehyde um. Auffällig war, dass unter den aliphatischen Aldehyden bevorzugt kurz- und mittelkettige Aldehyde mit einem bis sechs Kohlenstoffatomen oxidiert wurden. Diese Beobachtung wurde bereits mit der membrangebundenen ALDH (mADLH) gemacht, die Aldehyde mit Kettenlängen von C<sub>2</sub> bis C<sub>4</sub> oxidiert (Adachi *et al.* 1990). In einem weitaus geringeren Maß war das Enzym Swit\_4395 auch in der Lage Zucker und L-Sorbose zu oxidieren. Die Hypothese, dass es sich bei diesem Protein um eine GDH beziehungsweise SNDH handelt, konnte demnach nicht bestätigt werden.

Obwohl mit 2-Oxopropanal eine höhere maximale Geschwindigkeit erzielt werden konnte, muss Butanal als das präferierte Substrat angesehen werden, da mit Butanal eine höhere katalytische Effizienz zu beobachten war. Die spezifischen Aktivitäten lagen teilweise bei mehreren Tausend U pro Milligramm Protein, was eine äußerst schnelle und effektive Oxidation vermuten lässt. Die optimalen Reaktionsbedingungen für das Enzym Swit\_4395 lagen bei 30 °C, was dem Wachstumsoptimum von *S. wittichii* RW1 entspricht. Zudem zeigte sich ein relativ breites pH-Optimum im Bereich zwischen pH 8 und pH 10 mit einem Optimum bei 9,5.

Außerdem wurde der Einfluss von Metallionen und Inhibitoren auf die Aktivität des Enzyms Swit\_4395 getestet. Dafür wurde die Holoenzymform produziert, indem dem Wachstumsmedium extern PQQ zugegeben wurde. Die Zugabe von PQQ und CaCl<sub>2</sub> hatte

keinen Effekt auf die Aktivität des Enzyms, was darauf schließen ließ, dass das Enzym Swit\_4395 bereits vollständig mit den beiden Cofaktoren beladen war. Auch die Addition von Natrium-, Kalium- und Magnesium-Ionen hatte keinen signifikanten Einfluss. Im Gegensatz dazu wurde die Aktivität des Enzyms Swit\_4395 durch die Zugabe von CuSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub> oder ZnSO<sub>4</sub> vollständig inhibiert. Auch von anderen PQQ-anhängigen Enzymen ist bekannt, dass sie durch Schwermetalle in ihrer Aktivität gehemmt werden. So werden beispielsweise die MDHs von *Methylosinus* sp WI14 (Grosse *et al.* 1998) und *Methylocystis* sp GB25 (Grosse *et al.* 1997) vollständig durch Eisenionen und stark durch Kupfer-Ionen inhibiert. Zudem zeigt die L-Sorbose-Dehydrogenase aus *Ketogulonicigenium vulgare* (Miyazaki *et al.* 2006) eine komplette Hemmung durch Cu<sup>2+</sup> und die PVADH von *Pichia pastoris* einen teilweisen Aktivitätsverlust durch Zn<sup>2+</sup> (Jia *et al.* 2013). Weiterhin wurde die Aktivität des Enzyms Swit\_4395 durch Inkubation mit 1 mM beziehungsweise 10 mM EDTA um 25 % respektive 50 % gehemmt. EDTA ist ein Komplex-Bildner, der Chelatkomplexe mit Kationen bildet. Da Chinoproteine für ihre katalytische Aktivität divalente Kationen, im Falle von Swit\_4395 Ca<sup>2+</sup>, benötigen (siehe Abschnitt 4.2.5.2) lässt sich die Verringerung der Aktivität dadurch erklären, dass EDTA gebundenes Ca<sup>2+</sup> komplexiert und dieses dem Enzym Swit\_4395 nicht mehr zur Verfügung steht. Ähnliche Effekte von EDTA auf Ca<sup>2+</sup>abhängige Chinoproteine wurden bereits für die MDH aus *Paracoccus denitrificans* (Davidson *et al.* 1992) und die D-Arabitol-Dehydrogenase aus *G. suboxydans* (Adachi *et al.* 2001) beschrieben.

#### **4.2.4 Identifizierung von PQQ als prosthetischer Gruppe des Enzyms Swit\_4395**

Chinoproteine binden ein Mol PQQ pro Mol Enzym (Oubrie *et al.* 1999a; Anthony 2001; Gómez-Manzo *et al.* 2010). Die bioinformatische Analyse des Proteins Swit\_4395 hatte gezeigt, dass die Bindemotive für PQQ und Calcium-Ionen vorhanden waren (siehe Abschnitt 3.2.1). Der Nachweis, dass das Enzym Swit\_4395 PQQ als prosthetische Gruppe nutzt, sollte im Zuge dieser Arbeit experimentell erbracht werden.

Dazu wurden UV-VIS-Spektren des gereinigten Enzyms Swit\_4395, eines PQQ-Extraktes aus diesem Enzym, sowie von kommerziell erhältlichem PQQ miteinander verglichen. Das Spektrum des Proteins zeigte ein Protein-spezifisches Absorptionsmaximum bei 280 nm, sowie ein geringeres Maximum bei 340 nm, was ein Hinweis auf die Anwesenheit von PQQ ist (Mukai *et al.* 2011). Die Spektren des kommerziell erhältlichen PQQ und des PQQ-Extraktes waren nahezu identisch und wiesen Absorptionsmaxima bei 270 nm und bei 340 nm auf, wobei der Ausschlag bei 340 nm charakteristisch für PQQ ist (Duine *et al.* 1980; van der

Meer *et al.* 1987). Aus diesen UV-VIS-Spektren ließ sich anschließend der Beladungszustand des Proteins Swit\_4395 mit PQQ berechnen. Dabei ergaben sich für das Protein im oxidierten Zustand 0,95 Mol PQQ pro Mol Protein, sowie für den Extrakt 0,9 Mol PQQ pro Mol Protein. All diese Ergebnisse zusammengenommen, zeigen eindeutig, dass das Enzym Swit\_4395 PQQ als Cofaktor nutzt und ein Mol des Proteins ein Mol PQQ bindet. Diese Beobachtungen wurden auch bereits in vielen anderen Chinoproteinen wie beispielsweise der ALDH von *Ga. diazotrophicus* (Gómez-Manzo *et al.* 2010) der sGDH von *A. calcoaceticus* (Oubrie *et al.* 1999a) oder ADHs von Essigsäurebakterien gemacht.

Diese Ergebnisse zeigten erneut, dass das Vorhandensein eines PQQ-Biosyntheseclusters keine Voraussetzung für den Besitz und die Bildung PQQ-abhängiger Dehydrogenasen ist. Wie bereits die Charakterisierung der PQQ-abhängigen mGDH aus *E. coli* gezeigt hat (Cozier *et al.* 1999).

#### **4.2.5 Rekonstitution von Chinoproteinen mit PQQ**

Die Funktionalität von Chinoproteinen kann auch in Organismen, die PQQ nicht selbst synthetisieren können, sichergestellt werden. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen die Zugabe von geringen Mengen an PQQ in das Wachstumsmedium. Zum anderen die Rekonstitution des Apoenzyms mit PQQ. Beide Wege führen zu einer (fast) vollständigen (Wieder)Erlangung der Enzymaktivität.

##### **4.2.5.1 Vorkommen von zweiwertigen Kationen in PQQ-abhängigen Dehydrogenasen**

Für die katalytische Aktivität von Chinoproteinen ist nicht nur die prosthetische Gruppe PQQ von Bedeutung, sondern auch die Koordination von divalenten Metallionen an das aktive Zentrum. Fast alle Chinoproteinen nutzen  $\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen in ihrem katalytischen Zentrum (Goodwin & Anthony 1998). Jedoch sind auch PQQ-abhängige Enzyme bekannt, die mit Hilfe von  $\text{Mn}^{2+}$  oder  $\text{Sr}^{2+}$  rekonstituiert werden können, wie beispielsweise die MDH aus *Methylobacterium extorquens* (Goodwin *et al.* 1996). Zudem gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass MDHs vom XoxF-Typ seltene Erden (Cerium, Lanthanum) aus der Gruppe der Lanthanide anstelle von divalenten Metallionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  nutzen (Keltjens *et al.* 2014; Pol *et al.* 2014).

Die Rekonstitution von Chinoproteinen mit PQQ und Metallionen *in vitro* verläuft am effektivsten in Puffern mit Aminomethylpropanol oder Tris/HCl bei hohen pH-Werten (pH 9 – 10). Die Anwesenheit von Natrium-Ionen ist jedoch zu vermeiden, da 20 mM NaCl



den Einbau von Calcium-Ionen um 50 % reduzieren (Goodwin *et al.* 1996). Ebenso ist eine Rekonstitution in KP-Puffer nicht möglich, da Calcium und Phosphat ein unlösliches Salz bilden und das Calcium daher nicht für den Einbau in das Protein zur Verfügung steht. Zudem werden für eine Rekonstitution *in vitro* hohe Konzentrationen an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen benötigt.

*In vivo* hingegen erfolgt der Einbau von Metallionen in ein Chinoprotein im Periplasma bei einem physiologischen pH-Wert (pH 7) und bei geringen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Dieser Unterschied zwischen den Bedingungen für den Einbau von zweiwertigen Kationen lässt sich dadurch erklären, dass *in vivo* mehrere Enzyme beteiligt sind (Richardson & Anthony 1992). Dazu zählen die Proteine MxaA (periplasmatisch), MxaK (cytoplasmatisch), MxaL (membrangebunden) und mutmaßlich die beiden Enzyme MxaC und MxaD. Das Protein MxaA trägt eine Bindestelle für  $\text{Ca}^{2+}$  und sorgt wahrscheinlich dafür, lokal und temporär eine hohe Konzentration an Calcium-Ionen zu generieren (Morris *et al.* 1995).

Ursprünglich wurde angenommen, dass das Metallion im aktiven Zentrum von Chinoproteine an der Substratbindung beteiligt ist (Anthony *et al.* 1994; Zheng & Bruice 1997). Weitere Studien haben allerdings gezeigt, dass Calcium-Ionen die C5-O5-Bindung in PQQ polarisiert, was zu einer partiellen negativen Ladung an dem O5-Atom und zu einer partiellen positiven Ladung an dem C5-Atom führt (Zheng & Bruice 1997; Olsthoorn & Duine 1998; Oubrie *et al.* 1999a). Damit ist das C5-Atom das elektrophilste Atom im aktiven Zentrum von PQQ und der katalytische Effekt der divalenten Kationen die Polarisierung der C5-O5-Bindung, was die Reaktivität von C5 gegenüber Nucleophilen erhöht (Oubrie *et al.* 1999a).

#### **4.2.5.2 Rekonstitution der ALDH Swit\_4395 mit Kationen und seltenen Erden**

Die bioinformatische Analyse des Enzyms Swit\_4395 (siehe Abschnitt 3.2.1) hat gezeigt, dass die Bindestellen für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vorhanden waren. Diese Hypothese konnte durch eine Voraussage der Tertiärstruktur bestätigt werden. Um diese Ergebnisse experimentell zu verifizieren wurden Rekonstitutionsexperimente mit unterschiedlichen zweiwertigen Kationen und zwei Lanthaniden vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass das Enzym Swit\_4395 mit  $\text{Ca}^{2+}$  die höchste katalytische Aktivität erreichte. Mit  $\text{Mg}^{2+}$  anstatt  $\text{Ca}^{2+}$  wurden immer noch 40 % der maximalen Aktivität erlangt. Mangan-Ionen hingegen inhibierten das Enzym Swit\_4395 vollständig. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen alkalischen Phosphatasen PhoX aus *Prochlorococcus* und *Synechococcus*, die ebenfalls durch  $\text{Mn}^{2+}$  gehemmt werden und deren Aktivität teilweise durch Magnesium-Ionen rekonstituiert werden kann (Kathuria & Martiny 2011). Eine Rekonstitution mit  $\text{Ba}^{2+}$  war im Falle des Proteins

Swit\_4395 nicht möglich. Die spezifische Aktivität erreichte hier nur 50 % der Basisaktivität, die ohne die Zugabe von Metallionen auftrat, was eine Inhibierung des Enzyms Swit\_4395 darstellt. Studien mit der sGDH und der mGDH aus *A. calcoaceticus* (Matsushita *et al.* 1995) haben gezeigt, dass mit Barium- statt Calcium-Ionen nur geringe Aktivitäten von sieben bis zehn Prozent zu erreichen waren.

MDHs vom XoxF-Typ aus methylotrophen Bakterien nutzen die seltenen Erden Cerium und Lanthanum anstatt  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  in ihrem aktiven Zentrum (Pol *et al.* 2014). Der Versuch einer Rekonstitution des Enzyms Swit\_4395 mit den beiden seltenen Erden führte zu einem kompletten Verlust der katalytischen Aktivität. Abgesehen davon, dass XoxF-MDHs einer anderen Enzymklasse angehören und  $\text{Ca}^{2+}$  nicht als katalytischen Cofaktor nutzen können, besitzen sie ein verändertes aktives Zentrum, das eine Bindestelle für seltene Erden darstellt (Pol *et al.* 2014). Dabei wird das Metallion zusätzlich durch den Aminosäurerest D301 koordiniert und der Austausch eines Prolins (P259) durch einen Threoninrest führt zu einer Konformationsänderung, die den Asparaginrest N256 weiter von dem Metallion entfernt. Diese Merkmale sind in der Primärstruktur des Proteins Swit\_4395 nicht enthalten. Zudem ist von Lanthanum bekannt, dass es die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen neuronalen ATPase beeinträchtigt (Basu *et al.* 1982). Außerdem führt  $\text{La}^{3+}$  generell zu einer Inhibierung der Bindung von Calcium-Ionen an Proteine (Weiss 1974). Eine Erklärung für diesen inhibitorischen Effekt ist, dass  $\text{La}^{3+}$ , ebenso wie andere Lanthanide, dieselbe Größe wie  $\text{Ca}^{2+}$ , aber eine größere positive Ladung aufweist, was dazu führt, das Lanthanum spezifisch gebundenes Calcium ersetzt (Lettvin *et al.* 1964). Über Cerium(III) weiß man, dass es als  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonist wirkt und dieses in Biomolekülen austauscht (Jakupec *et al.* 2005).

Die Tatsache, dass die katalytische Aktivität des Enzyms Swit\_4395 davon abhängig war, bei welcher Temperatur die Rekonstitution vorgenommen wurde, lässt sich dadurch erklären, dass unterhalb von 15 °C eine dreimal höhere Aktivierungsenergie benötigt wird, um  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Enzym einzubauen (Richardson & Anthony 1992). Daher erreicht die maximale Aktivität des Enzyms Swit\_4395 nach einer Rekonstitution auf Eis nur etwa 75 % der Aktivität, die bei einer Rekonstitution bei Raumtemperatur erzielt werden konnte.

#### 4.2.6 Periplasmatische Lokalisierung des Proteins Swit\_4395

Die bioinformatische Analyse des Proteins Swit\_4395 hatte ein Sec-abhängiges Signalpeptid vorausgesagt, was auf eine Lokalisierung im Periplasma beziehungsweise an der Membran hinweist. Dieses native Signalpeptid wurde im Zuge der Klonierung des Vektors pJZ1 durch

die Signalsequenz der Pektat-Lyase B *pelB* ersetzt. Eine N-terminale Sequenzierung des prozessierten Proteins Swit\_4395 hatte ergeben, dass das Signalpeptid entweder nach der Aminosäure A22, Y23 oder V24 abgeschnitten wurde. Aufgrund dessen, dass die Signalpeptidase die Signalsequenz der Pektat-Lyase B nach der Aminosäure an Position 22 entfernt (Lei *et al.* 1987), kann davon ausgegangen werden, dass es sich in dem rekombinanten Protein Swit\_4395 bei A22 um den Schnittpunkt für die Signalpeptidase handelt.

Um die periplasmatische Lokalisierung des Proteins Swit\_4395 in *S. wittichii* RW1 zu bestätigen, wurden Lokalisierungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Zellen des Überexpressionsstammes und eines Kontrollstammes in Periplasma, Cytoplasma und Membranen fraktioniert und anschließend die Aldehyd-oxidierende Aktivität der einzelnen Kompartimente gemessen. In den Fraktionen des Kontrollstammes, sowie in den Cytoplasma- und Membranfraktionen des Überexpressionsstammes konnte keine Oxidation der beiden Aldehyde Butanal und Ethanal festgestellt werden. Dafür zeigte die Periplasmafraktion des Überexpressionsstammes hohe Oxidationsraten mit beiden Substraten. Daraus ließ sich schließen, dass das Enzym Swit\_4395 im Periplasma lokalisiert ist.

Kontaminationen der Membran- und Cytoplasmafraktionen konnten bereits dadurch ausgeschlossen werden, dass in diesen Kompartimenten keine Oxidation von Aldehyden beobachtet werden konnte. Um Verunreinigungen des Periplasmas mit Cytoplasma auszuschließen, wurde die Aktivität von drei cytoplasmatischen Enzymen im Periplasma und im Cytoplasma bestimmt. Die Malat-DH ist ein Bestandteil des Citratzyklus und oxidiert in Anwesenheit von NADH Oxalacetat reversibel zu Malat (Muccio *et al.* 2012). Die G6PDH und die 6PGDH sind Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs. Dabei oxidiert die G6PDH Glukose-6-phosphat zu 6-Phosphoglukon- $\delta$ -lacton und die 6PGDH 6-Phosphoglukonat zu Ribulose-5-phosphat.

Die Umsetzung von Oxalacetat zu Malat fand in beiden Stämmen zu 97 % in der Cytoplasma- und nur zu 3 % in der Periplasmafraktion statt. Die Oxidation von 6PG und G6P konnte jeweils zu 100 % dem Cytoplasma zugerechnet werden, woraus zu schließen war, dass keine Kontamination der Periplasmapräparation vorlag.

Daraus kann eindeutig gefolgert werden, dass es sich bei Swit\_4395 um ein Protein mit Lokalisierung im Periplasma handelt. Dieser Umstand war interessant, da die meisten bisher charakterisierten ALDHs, wie die ALDH aus *Acetobacter aceti* (Ameyama *et al.* 1981),

*Acetobacter polyoxogenes* (Fukaya *et al.* 1989), *Acetobacter rancens* (Hommel & Kleber 1990), *Ga. europaeus* (Turner *et al.* 1997) und *Ga. diazotrophicus* (Gómez-Manzo *et al.* 2010) membrangebunden sind.

#### **4.2.7 Sequenz des Proteins Swit\_4395 im Vergleich mit anderen Chinoproteinen**

Das Protein Swit\_4395 ist homolog zu anderen PQQ-abhängigen Dehydrogenasen, die eine sechsfache Propellerstruktur besitzen und es konnte gezeigt werden, dass es PQQ als prosthetische Gruppe nutzt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Proteins Swit\_4395 mit bekannten Sequenzen von anderen Chinoproteinen, wie der sGDH von *A. calcoaceticus* (Oubrie & Dijkstra 2000; Oubrie 2003) hat gezeigt, dass etliche Aminosäurereste, denen eine bestimmte Funktion in Chinoproteinen zugeschrieben wird, konserviert, andere jedoch substituiert sind oder ganz fehlen (Abbildung 4.1). Die sGDH von *A. calcoaceticus* benötigt  $\text{Ca}^{2+}$  für ihre katalytische Aktivität (Olsthoorn *et al.* 1997) und die Struktur der sGDH lässt darauf schließen, dass insgesamt drei Calcium-Ionen gebunden werden ( $\text{Ca}^{2+}$  I,  $\text{Ca}^{2+}$  II,  $\text{Ca}^{2+}$  III) (Oubrie *et al.* 1999a).

Zu den konservierten Aminosäureresten gehören die beiden Arginin-Reste R406 (R323; Aminosäuren von Swit\_4395 in Klammern) und R408 (R325), die in der sGDH von *A. calcoaceticus* Salzbrücken mit den Carboxylgruppen an den C2- und C9-Atomen von PQQ bilden. Zudem binden der Asparaginrest N229 (N202) und R228 (R201) die beiden *o*-Chinon Sauerstoffatome an den Positionen 4 und 5 von PQQ. In dem PQQ-Molekül stellen die Atome N6, O7A und O5 die Liganden für das  $\text{Ca}^{2+}$  I dar. Zu den Calciumliganden in der sGDH zählen die Sauerstoffatome der Carbonylgruppen in dem Glycinrest G247 (G220), sowie dem Prolinrest P298 (P221). Weitere konservierte Aminosäuren in den beiden Proteine sind der Calcium-Ligand D163, dessen Funktion in dem Protein Swit\_4395 durch den negativ geladenen Rest E154 ausgeführt wird, sowie die Aminosäurereste R228 (R201) und H144 (H135), wobei der Histidinrest direkt an der katalytischen Reaktion beteiligt ist. H144 fungiert als Base, die den Hybridtransfer vom Substrat durch die Aufnahme eines Protons von der Hydroxyl-Gruppe am C1-Atom der Glukose initiiert (Dewanti & Duine 2000). Weiterhin sind die Aminosäuren P212 (P185), die Glycinreste von Swit\_4395 an den Positionen 153, 169, 178, 199, 233 und 237, sowie E218, E226 und N228, die an der Calciumbindung beteiligt sind, konserviert. Außerdem sind die drei Aminosäurereste R228 (R201), P266 (P239) und W238 (W265) im aktiven Zentrum, sowie mit den Aminosäuren G226, E245,

E253, N255, Y263, V268, G270 und V318 die meisten, der an der Calcium II-Bindung beteiligten, Reste konserviert.

Im Gegensatz dazu ist der Lysinrest K377, der an der Bindung des PQQ durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem C7-Carboxylatom verantwortlich ist, nicht konserviert und stattdessen durch ein Serin (S298) ersetzt. Dieser Lysinrest wird allerdings nicht als essentiell angesehen, da auch andere Beispiele bekannt sind, in denen das Lysin durch ein Serin ausgetauscht ist (Oubrie 2003). Auch das Glutamin an Position 231, das eine Wasserstoffbrücke zu dem C2-Carboxylatom des PQQ ausbildet, ist in dem Protein Swit\_4395 durch ein Leucin (L204) substituiert. Da ein solcher Austausch auch in der sGDH des Bakteriums *Novosphingobium aromaticivorans* bekannt ist, wäre es möglich, dass es sich um ein Merkmal der Sphingomonadaceae handelt. Weiterhin sind die Aminosäurereste Q231, Q246, A350 und L376, die in der sGDH von *A. calcoaceticus* an der Bindung des PQQ beteiligt sind, in dem Protein Swit\_4395 durch die Aminosäuren L204, M219, S274 und L297 ausgetauscht. Die Aminosäurereste, die das  $\text{Ca}^{2+}$  III koordinieren D251, A269, Y271, D273, S275 und E309 fehlen in dem Protein Swit\_4395 sogar vollständig, weshalb davon auszugehen ist, dass kein drittes  $\text{Ca}^{2+}$  im aktiven Zentrum koordiniert ist.

Zudem fehlen in dem Protein Swit\_4395 die Aminosäurereste, die in der sGDH von *A. calcoaceticus* direkt mit Glukose interagieren. Glukose geht hydrophobe Interaktionen sowohl mit PQQ, als auch mit den Aminosäuren L169, Y343 und W346 ein. Außerdem bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem O2-Atom der Glukose, sowie Q76 und R143 und zusätzlich zwischen dem O1-Atom und H144, Q168 und R228 (Oubrie 2003). Diese Unterschiede erklären auch, warum sich die Substratspektren der sGDH von *A. calcoaceticus* und der ALDH Swit\_4395 von *S. wittichii* RW1 unterscheiden.



Abbildung 4.1: Alignment der Aminosäuresequenz des Proteins Swit\_4395 mit fünf homologen Proteinen, deren dreidimensionale Struktur bekannt ist. *Sph. wittichii*: Swit\_4395 aus *S. wittichii* RW1 (YP\_001264871); *E. coli*: sGDH aus *E. coli* K12 (gil114793985); *A. calcoaceticus*: sGDH aus *Acinetobacter calcoaceticus* (gil7245946); *T. thermophilus*: sGDH aus *Thermus thermophilus* (gil160285582); *P. aerophilum*: sGDH aus *Pyrobaculum aerophilum* (gil160285582); *S. coelicolor*: sGDH aus *Streptomyces coelicolor* (gil238828141); schwarze Dreiecke: katalytisches Zentrum und Aminosäuren, die an der PQQ-Bindung beteiligt sind. Grauer Hintergrund: konservierte Aminosäurereste. Die Abbildung wurde mit den Programmen Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk.Tools/msa/clustal>) und Jalview 2.8 (Waterhouse *et al.* 2009) erstellt.

### 4.2.8 Effekte der homologen Produktion und physiologische Bedeutung des Enzyms Swit\_4395

Im Anschluss an die Charakterisierung des Enzyms Swit\_4395 sollte der Effekt der homologen Produktion dieses Proteins in *S. wittichii* RW1 aufgeklärt werden. Mittels einer nativen PAGE konnte die native Konformation des Proteins bestimmt werden. Das Protein Swit\_4395 lag dabei sowohl als Homooktamer, als auch als Homododekamer vor und war katalytisch aktiv, was darauf hinwies, dass beide Formen PQQ gebunden hatten. Diese Beobachtung weicht von bisher beschriebenen PQQ-abhängigen ALDHs ab, was die These verstärkt, dass das Enzym Swit\_4395 zu einer neuen Enzymklasse gehört (siehe Abschnitt 4.2.10). Bekannte ALDHs aus *Methylobacillus glycogenes* (Adachi *et al.* 1990) bilden Homodimere und die ALDHs aus *Acetobacter cencens* (Hommel & Kleber 1990) und

*Ga. diazotrophicus* (Gómez-Manzo *et al.* 2010) liegen im nativen Zustand als Heterodimere vor.

Eine Überprüfung der Eigenschaften des Enzyms Swit\_4395 nach homologer Produktion zeigte dieselben Ergebnisse, wie nach einer heterologen Expression in *E. coli*.

Die Tatsache, dass das Enzym Swit\_4395 eine ALDH darstellt, könnte darauf hinweisen, dass die physiologische Funktion in der Detoxifizierung giftiger Aldehyde liegt. Diese Hypothese wurde dadurch bekräftigt, dass der Wildtyp von *S. wittichii* RW1 bis zu 30 mM Butanal toleriert und der Überexpressionsstamm *S. wittichii* RW1 pJZ1 sogar bis zu 80 mM Butanal. Wachstumsexperimente mit unterschiedlichen Konzentrationen an Butanal zeigten zudem, dass der Wildtypstamm mit 50 mM Butanal kein Wachstum mehr aufwies und die Lag-Phasen bereits mit 5 mM und 15 mM Butanal um den Faktor vier bis fünf im Vergleich zu dem Überexpressionsstamm verlängert waren. Die anschließenden Wachstumsraten waren jedoch vergleichbar. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass das Enzym Swit\_4395 an der Dekontamination toxischer Aldehyde beteiligt ist. Zum anderen wird deutlich, dass der Wildtypstamm nach Exposition mit Butanal innerhalb von drei Tagen Gene exprimiert, die an der Detoxifizierung beteiligt sind.

Neben dem Abbau von toxischen Aldehyden besteht auch die Möglichkeit, dass das Enzym Swit\_4395 eine ähnliche Funktion wie zwei Butanol-Dehydrogenasen aus *Pseudomonas (P). butanovora* (Vangnai *et al.* 2002) einnimmt. Diese Enzyme führen die Oxidation von Butanal zu Butansäure durch. Aufgrund dessen, dass *S. wittichii* RW1 aus der Elbe isoliert wurde (Wittich *et al.* 1992) könnte dieser Organismus phasenweise 1-Butanol aus industriellen Abwässern ausgesetzt gewesen sein. Zudem sind in dem Genom von *S. wittichii* RW1 zahlreiche periplasmatische ADHs kodiert. Daher lässt sich darüber spekulieren, dass eine dieser ADHs 1-Butanol zu Butanal oxidiert, während die ALDH Swit\_4395 Butanal wiederum zu Butyrat oxidiert, wobei Elektronen auf die Atmungskette übertragen werden.

#### **4.2.9 Biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten des Enzyms Swit\_4395**

ALDHs werden bereits bei der Produktion von Essigsäure aus Ethanol eingesetzt (Matsushita *et al.* 2002). Zudem können sie Aldehyde zu Carbonsäuren oxidieren. Carbonsäuren haben biotechnologisch gesehen ein großes Anwendungspotential als Geschmacks- und Duftstoffe, in Körperpflegeprodukten, als Hochleistungspolymere und in der pharmazeutischen Industrie (Maag 2007). Vor allem Propan- und Butansäure sind aufgrund ihres intensiven Geruchs und charakteristischen Geschmacks gute Kandidaten für den Einsatz als Aromastoffe (Schrader *et*

al. 2004). Bei der biochemischen Produktion dieser Carbonsäuren ist allerdings der Einsatz von toxischen Oxidantien (Chlorit, Jodat, Salpetersäure), sowie von katalytischen Ruthenium- oder Chromoxiden notwendig. Und die Verwendung dieser Komponenten führt zu schädlichen Abfallprodukten.

Daher ist die Verwendung von gereinigten Proteinen oder Ganzzellsystemen vorteilhaft. Dabei handelt es sich um umweltfreundliche erneuerbare Systeme, bei denen die Produktion im Gegensatz zu der organischen Synthese unter milden Konditionen durchgeführt werden kann (Vasic-Racki 2000; Drauz & Waldmann 2002).

Eine weitere Möglichkeit wäre die Produktion von Essigsäure aus Ethanol, die bereits mit einigen membrangebundenen ALDHs aus Essigsäurebakterien durchgeführt wird (Adachi *et al.* 1980; Ameyama *et al.* 1981b; Hommel & Kleber 1990). Ähnlich wie das Enzym Swit\_4395 weisen auch diese Enzyme hohe  $K_M$ -Werte für ihr präferiertes Substrat Acetaldehyd auf. Allerdings ist die hohe Aktivität vorteilhaft, wenn große Mengen eines Produkts erwünscht sind.

ALDHs können auch für die Gewinnung nachhaltiger Brennstoffe oder chemischer Rohstoffe durch die Synthese aliphatischer Ketone eingesetzt werden (Xiong *et al.* 2012). Zudem sind zwei Enzyme bekannt, die hohe  $K_M$ -Werte für Aldehyde aufweisen und 2-Methylpropanal zu Isobutyrat oxidieren. Dabei handelt es sich um die Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (PadA) aus *E. coli* (Ferrandez *et al.* 1997) und eine Semialdehyd-Dehydrogenase aus *Burkholderia ambifaria* (Watanabe *et al.* 2006). Ähnlich wie diese beiden Enzyme könnte das Protein Swit\_4395 aufgrund seiner hohen katalytischen Effizienz und Aktivität als Biokatalysator für die Produktion von Carbonsäuren verwendet werden.

Ein weiterer Vorteil für die biotechnologische Verwendung des Enzyms Swit\_4395 ist die Lokalisierung im Periplasma. Da die Reaktionsprodukte über Porine ins Medium abgegeben werden, können diese direkt daraus isoliert werden, was eine Lyse der Zellen entbehrlich macht.

#### **4.2.10 Klassifizierung des Enzyms Swit\_4395 innerhalb der Chinoproteine**

Ausgehend von der Einteilung von PQQ-abhängigen Enzymen (siehe Abschnitt 4.1.1) wurde das Enzym Swit\_4395 zu den löslichen periplasmatischen Chinoproteinen gezählt. Strukturell ist es mit der sGDH aus *A. calcoaceticus* (Dokter *et al.* 1986) und der Aldose-Dehydrogenase aus *E. coli* (Asd) (Southall *et al.* 2006) verwandt, die beide eine  $\beta$ -Propellerstruktur mit sechs



viersträngigen Propellerblättern aufweisen. Bei der sGDH handelt es sich um ein Homodimer (Dokter *et al.* 1986), das ausgehend von seiner Kristallstruktur ein PQQ und drei  $\text{Ca}^{2+}$  bindet (Oubrie & Dijkstra 2000) und eine Vielzahl von Mono- und Disacchariden oxidiert (Matsushita *et al.* 1989). Anders als bei diesen strukturell ähnlichen Enzymen oxidiert das Enzym Swit\_4395 jedoch Aldehyde.

ALDHs sind hinlänglich bekannt und können in zwei Klassen eingeteilt werden. Zum einen existieren lösliche ALDHs, die  $\text{NAD(P)}^+$ -abhängig sind, aliphatische und aromatische Aldehyde oxidieren und im Cytoplasma lokalisiert sind (EC 1.2.1.3, 1.2.1.4, 1.2.1.5). Zum anderen gibt es ALDHs, die nicht direkt mit  $\text{NAD(P)}^+$  interagieren. Dazu zählen ALDHs beziehungsweise Aldehyd-Oxidasen (EC 1.2.3.1), die Ähnlichkeiten zu der Xanthin-Dehydrogenase aufweisen und sowohl ein [2Fe-2S]-Cluster als auch eine FAD-Bindestelle und einen Molybdän-Molybdopterin-Dinukleotid-Komplex aufweisen. Außerdem existieren membrangebundene ALDHs aus Gram-negativen Bakterien, die Cytochrome binden, sowie Sauerstoff-sensitive Enzyme aus Archaeen mit Wolfram-Molybdopterin und Eisen-Schwefel-Cluster, die Elektronen auf Ferredoxin übertragen (EC 1.2.7.5). Von all diesen bekannten ALDHs unterscheidet sich das Enzym Swit\_4395 erheblich, da es im Periplasma lokalisiert ist, keine Homologien zu Xanthin-Dehydrogenasen aufweist, PQQ und kein Eisen-Schwefel-Cluster als prosthetische Gruppe nutzt, sowie bevorzugt kurz- und mittelkettige Aldehyde, sowie Dialdehyde oxidiert. Es existieren auch einige PQQ-abhängige ALDHs aus *Ga. diazotrophicus*, sowie einigen *Gluconobacter*- und *Acinetobacter*-Stämmen (Gómez-Manzo *et al.* 2010) die strukturell eher den Aldehyd-Oxidasen beziehungsweise Xanthin-Dehydrogenasen ähneln und FAD, Molybdän und [2Fe-2S]-Cluster als prosthetische Gruppen nutzen. Außerdem ist ein Chinohämoprotein aus *P. butanovora* bekannt, das neben primären und sekundären Alkoholen auch kurz- und mittelkettige Aldehyde oxidiert (Vangnai & Arp 2001). Anders als das Protein Swit\_4395 weist dieses jedoch eine achtfache Propellerstruktur auf.

In Anbetracht all dieser Unterschiede kann das Enzym Swit\_4395 als periplasmatische PQQ-abhängige ALDH klassifiziert werden, die eine neue Klasse von Chinoproteinen begründet.

## 4.3 PQQ

Das *ortho*-Chinon PQQ ist ein Cofaktor, der in zahlreichen bakteriellen Enzymen vorkommt. Neben Bakterien findet sich PQQ allerdings auch ubiquitär in Pflanzen, Tieren und höheren Vertebraten. Anfang des 21. Jahrhunderts wurde PQQ kontrovers als neues Vitamin diskutiert (Kasahara & Kato 2003; Felton & Anthony 2005). Nicht erst seit dieser Kontroverse wird PQQ eingehend erforscht und es scheint auch eine zunehmende klinische Relevanz gegeben zu sein.

### 4.3.1 Physiologische und klinische Relevanz des Cofaktors PQQ

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass es sich bei PQQ um einen bedeutenden Nährstoff für Tiere und wahrscheinlich auch Menschen handelt. So führt ein Mangel an PQQ beispielsweise zu brüchiger Haut, Hämorrhagie oder einer Erkrankung des Dickdarms (Divertikulitis) (Stites *et al.* 2000). Zudem wurden eine verringerte Fertilität, Defizite in der Immunantwort und eine Reduktion des Interleukin 2-Levels bei Mäusen beobachtet (Steinberg *et al.* 1994; Steinberg *et al.* 2003).

PQQ wird auch als Wachstumsfaktor nicht nur für Pflanzen (Choi *et al.* 2008), sondern auch für Tiere angesehen. Es konnte gezeigt werden, dass PQQ die neonatalen Überlebenschancen von Mäusen erhöht (Bauerly *et al.* 2006; Steinberg *et al.* 2003; Stites *et al.* 2000; Stites *et al.* 2006), sowie das Zellwachstum und die Proliferation von Fibroblasten verbessert (Kumazawa *et al.* 2007; Naito *et al.* 1993).

Eine große Bedeutung kommt PQQ außerdem als Schutz gegen Neurotoxizität zu. So verhindert PQQ die Methylquecksilber induzierte Neurotoxizität in PC12 Zellen (Zhang *et al.* 2006), sowie die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor vermittelte Neurotoxizität im Rückenmark (Zhang *et al.* 2009). Eine klinische Relevanz kommt PQQ auch in der Erforschung der Demenzerkrankungen Parkinson und Alzheimer zu. Beispielsweise kann PQQ die Aggregation von  $\beta$ -Amyloid verhindern, was eine Hauptursache der Alzheimer-Erkrankung ist (Hara *et al.* 2007) oder auf die Expression des Proteins DJ-1 Einfluss nehmen, dass bei einer Form der Parkinson-Erkrankung eine Rolle spielt (Nunome *et al.* 2008).

Zusätzlich zu der großen Bedeutung, die PQQ in neuronalen Prozessen von Säugetieren zukommt, wird PQQ mit der Signaltransduktion und der zellulären Antwort auf Stressfaktoren in Bakterien assoziiert. PQQ induziert, zum Beispiel, die periplasmatische Proteinkinase, die an der Biogenese der Zellmembran beteiligt ist (Wu *et al.* 2005; Charlson

*et al.* 2006) oder die Reparatur von Doppelstrangbrüchen („DSB repair“) in *E. coli* (Khairnar *et al.* 2007). Ebenso ist PQQ an der Ausbildung von Resistenzmechanismen gegen DNA-schädigende Substanzen beteiligt (Rajpurohit *et al.* 2008). In dem Bereich der Signaltransduktion konnte gezeigt werden, dass PQQ den Ras (Rat Sarcoma)-Signalweg in Fibroblasten von Mäusen aktiviert (Kumazawa *et al.* 2007) und Effekte auf das Wachstum von Schwann´schen Zellen und die Aktivierung des AKT-Signalwegs hat (He *et al.* 2010).

Neben diesen Effekten wurde PQQ, beziehungsweise PQQ-produzierende Bakterienstämme, bereits als Schutzmittel gegen die Blasenfleckenkrankheit bei Tomaten (Bashan & De-Bashan 2002) oder die Bakteriennassfäule bei Tabakpflanzen (Han *et al.* 2008) ins Gespräch gebracht. Zudem mehren sich die Hinweise darauf, dass Bakterien, die PQQ-abhängige Dehydrogenasen ausbilden, dafür eingesetzt werden können, unlösliche Komplexe von Phosphat und Metallionen durch Säurebildung aufzulösen und somit essentielles Phosphat Pflanzen zugänglich zu machen (Han *et al.* 2008; Liu *et al.* 1992).

Außerdem zeigt PQQ eine siebenfach erhöhte Aktivität als Antioxidant gegenüber Vitamin C, das bisher als das aktivste wasserlösliche Antioxidant angesehen wurde (Ouchi *et al.* 2009).

### **4.3.2 Qualitative und quantitative Nachweismethoden für PQQ**

Angesichts der zunehmenden klinischen und landwirtschaftlichen Bedeutung von PQQ ist es erforderlich diese Substanz nicht nur nachweisen, sondern auch quantifizieren zu können. Im Laufe der letzten 30 Jahre wurden dazu zahlreiche enzymatische und technische Methoden entwickelt.

#### **4.3.2.1 Enzymatische Nachweismethoden für PQQ**

Bisher existieren fünf rein enzymatische Testsysteme für den Nachweis beziehungsweise die Quantifizierung von PQQ, die alle auf PQQ-abhängigen GDHs von Bakterien basieren. Es wurden bereits Membranen von *E. coli* IFO 3301 (Ameyama *et al.* 1985) und *E. coli* ATCC 10798 (Geiger & Görisch 1987) verwendet. Bei beiden Methoden war die Präparation der Apoenzymform durch ein Waschen der Membranen mit EDTA, sowie eine Inkubation von bis zu zwei Stunden für die Holoenzymbildung, notwendig. Das Detektionslimit dieser Tests lag bei 6 nM (Ameyama *et al.* 1985) beziehungsweise 0,6 nM (Geiger & Görisch 1987). Damit war der letztgenannte Test der bisher sensitivste aller enzymatischen Nachweissysteme für PQQ. Neben Membranen von *E. coli* wurden auch membrangebundene GDHs aus *A. calcoaceticus* (Duine *et al.* 1979) und *P. aeruginosa* (Ameyama *et al.* 1981) sowie die

sGDH aus *P. aeruginosa* (Duine *et al.* 1983) für den Nachweis von PQQ verwendet. Da beide Organismen jeweils ein vollständiges PQQ-Synthesecluster in ihrem Genom aufweisen ist bei diesen Methoden entweder eine aufwendige Apoenzympräparation mit einer Dauer von mehreren Tagen (Duine *et al.* 1979; Duine *et al.* 1983) oder die Verwendung einer PQQ-defiziten Mutante (Ameyama *et al.* 1981) notwendig. Zudem sind beide Verfahren, die die membrangebundene Variante der GDH nutzen, keine quantitativen, sondern nur qualitative Nachweismethoden für PQQ. Die Methode, die die sGDH nutzt, weist zwar ein Detektionslimit von 2 nM PQQ auf, hat aber den großen Nachteil, dass sie sensitiv gegenüber Sauerstoff ist.

#### 4.3.2.2 Nicht-enzymatische Bestimmungsmethoden für PQQ

Neben den genannten rein enzymatischen Methoden für den Nachweis von PQQ, wurden viele andere Verfahren entwickelt, darunter zahlreiche Systeme, die auf der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) basieren. Dazu zählen die quantitative Detektion von katalytisch nicht aktiven PQQ nach einer Hexanol-Extraktion (van der Meer *et al.* 1989), die UV-spektrophotometrische Quantifizierung von PQQ-Aceton-Addukten (Kano *et al.* 1991), der elektrochemische Nachweis im Anschluss an ein HPLC-Verfahren (Bergethon 1990) und die kolometrische Detektion mittels einer Graphitelektrode in Kulturüberständen von *G. oxydans* (Otani *et al.* 1989), sowie eine Flüssigchromatographie mit UV-Detektion von an DNA-gebundenem PQQ. Weiterhin existieren einige Methoden, die sich die Gaschromatographie (GC) oder die Massenspektrometrie (MS) zu Nutze machen, wie die Isolierung und Identifizierung von PQQ mittels MS (Buffoni *et al.* 1992), der GC-MS-Nachweis von PQQ nach der Extraktion aus biologischen Probenmaterial (Kumazawa *et al.* 1992) oder die Detektion von PQQ und seinen Derivaten mittels LC/ESI-MSMS, einer kombinierten Methode aus HPLC und MS (Noji *et al.* 2007). Mittels der Kapillaronenelektrophorese lassen sich Oxazol-Derivate von PQQ (Esaka *et al.* 1993) oder PQQ in Kulturüberständen (Glatz *et al.* 2000) nachweisen. Weitere Methoden sind die Detektion von Enzym-gebundenen PQQ mit einem analytischen Redoxsystem (Paz *et al.* 1988) oder einem immunologischen Assay (Citro *et al.* 1989), das Hydrazin-Verfahren (Duine & Jongejan 1989), der Nachweis mittels Elektrospray (Mitchell *et al.* 1999), die Isolierung von PQQ-Derivaten (Smith *et al.* 2000), sowie die Quantifizierung von PQQ mittels einer mutierten sGDH (Durand *et al.* 2010), die an eine GC-Elektrode immobilisiert wird (Zhang *et al.* 2014).

### 4.3.2.3 Vorteile der Quantifizierung von PQQ mittels des Enzyms Swit\_4395

Die Quantifizierung von PQQ mittels des Enzyms Swit\_4395 ist eine neue, einfache und schnelle Methode, deren Vorteile im Vergleich mit anderen Systemen deutlich werden. Der große Vorteil gegenüber nicht enzymatischen Methoden, beispielsweise der HPLC oder GC-MS, ist, dass diese enzymatische Methode deutlich schneller ist und kein teures Equipment dafür benötigt wird. Im Gegensatz zu allen anderen bisherigen enzymatischen Methoden ist das System mit dem Protein Swit\_4395 das erste gereinigte System, das ein anderes Enzym als die PQQ-abhängige GDH nutzt. Zudem ist keine aufwendige und langwierige Apoenzympräparation, die bei anderen Methoden bis zu drei Tagen dauern kann (Duine *et al.* 1979; Duine *et al.* 1983; Ameyama *et al.* 1985) oder die Verwendung einer PQQ-defiziten Mutante (Ameyama *et al.* 1981) notwendig. Ein weiterer Vorteil ist die Schnelligkeit der Rekonstitutionsreaktion, die mit dem Enzym Swit\_4395 in wenigen Sekunden abläuft, während bei anderen Systemen eine Inkubation zwischen zehn Minuten (Ameyama *et al.* 1985) und zwei Stunden (Geiger & Görisch 1987) nötig ist. Mit einem Detektionslimit von 0,05 nM ist diese Methode auch zehnmal sensitiver als das bisher sensitivste enzymatische System mit einem Detektionslimit von 0,6 nM (Geiger & Görisch 1987).

Für die biotechnologische Anwendung ist es von Bedeutung, dass das Protein Swit\_4395 über längere Zeit bei – 20 °C und – 70 °C gelagert werden kann, ohne an Aktivität zu verlieren.

### 4.3.3 Nachweis von PQQ in physiologischen Probenmaterial

Nachdem PQQ zum ersten Mal in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts als Cofaktor in bakteriellen Enzymen entdeckt wurde (Hauge 1964), hat man PQQ nicht nur in Enzymen nachgewiesen. PQQ konnte auch in humaner Milch (Flückiger *et al.* 1993; Mitchell *et al.* 1999), Obst, Gemüse, Tee, alkoholischen Getränken und Soja-Produkten nachgewiesen werden (Kumazawa *et al.* 1995; Noji *et al.* 2007).

Um das hier entwickelte System für die Quantifizierung von PQQ zu testen, wurde versucht PQQ in zahlreichen Getränken und anderen Lebensmitteln nachzuweisen.

#### 4.3.3.1 Vorkommen von PQQ in Lebensmitteln

In Muttermilch konnten in der Vergangenheit mit 0,5 µM (Mitchell *et al.* 1999) und 0,1 µM (Flückiger *et al.* 1993) große Mengen an PQQ festgestellt werden, was auf eine gewisse Bedeutung in der Entwicklung von Neugeborenen hinweist. Dahingegen wurde in boviner

Milch nahezu kein PQQ gefunden (Duine *et al.* 1990). Mit dem Enzym Swit\_4395 wurde in Frischmilch von Rindern  $1,1 \pm 0,3$  nM, in H-Milch  $1,2 \pm 0,5$  nM und in Kolostrum, der Erstmilch von Rindern,  $2,4 \pm 0,1$  nM PQQ gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass es bezüglich des PQQ-Gehaltes einen großen Unterschied zwischen humaner und boviner Milch gibt.

Die Ergebnisse von Duine und Kollegen (1990) weichen allerdings in mehreren Aspekten vor allem von denen ab, die mit dem Enzym Swit\_4395 (in Klammern) gefunden wurden. Duine und Kollegen fanden, abhängig von der Marke, bis zu 20 nM PQQ in Essig ( $5,9 \pm 1,2$  nM), dafür aber kein PQQ in Wein ( $6,0 \pm 1,3$  nM) und nur sehr geringe Mengen von 50 pM in Bier ( $2,0 \pm 0,8$  nM). Andere Studien hingegen fanden PQQ-Mengen, die bei diesen Proben zum Teil deutlich über denen von Duine und Kollegen, sowie den Ergebnissen mit dem Enzym Swit\_4395 lagen. Noji und Kollegen (2007) fanden beispielsweise in Bier  $5,0 \pm 2,5$  nM PQQ und Kumazawa und Kollegen (1995) in Wein  $17,4 \pm 7,2$  nM PQQ. Letztere haben die bisher größten Mengen an PQQ in Lebensmitteln gemessen. Dabei wurden auch große Mengen PQQ in Cola  $60,3 \pm 9,5$  nM ( $7,6 \pm 1,3$  nM), Karotten  $50,9 \pm 8,5$  nM ( $16,8 \pm 3,7$  nM), Sellerie  $19,2 \pm 7,3$  nM ( $16,6 \pm 2,7$ ), grünem Pfeffer  $85,4 \pm 41,5$  nM ( $8,2 \pm 2,3$  nM) und Tomaten  $28,0 \pm 5,5$  nM ( $7,6 \pm 2,1$  nM) postuliert.

Zusätzlich wurden mit dem Enzym Swit\_4395 geringe Mengen an PQQ in Fassbrause ( $1,3 \pm 0,6$  nM), Schwarztee ( $1,3 \pm 0,3$  nM) und Kaffee ( $1,0 \pm 0,4$  nM) und etwas größere Mengen in Kirschsafte ( $5,9 \pm 1,2$  nM) festgestellt. Außerdem fanden sich hohe Konzentrationen an PQQ in roter Chili ( $9,6 \pm 3,5$  nM), Salat ( $11,7 \pm 4,8$  nM), Birnen ( $17,9 \pm 2,6$  nM) und Kakao ( $34,1 \pm 9,0$  nM).

Ein Vergleich der Ergebnisse von Kumazawa und Kollegen (1995) und Noji und Kollegen (2007) zeigt deutlich, dass eine enorme Abweichung zwischen den Mengen an PQQ, die in Lebensmitteln gefunden wurden, vorhanden ist. Im Gegensatz zu Kumazawa und Kollegen (in eckigen Klammern) fanden Noji und Kollegen kein PQQ in Tomaten [ $28,0 \pm 5,5$  nM] und mit  $21,2 \pm 6,7$  nM in Spinat [ $66,3 \pm 18,7$  nM],  $6,4 \pm 1,2$  nM in grünem Pfeffer [ $85,4 \pm 41,5$  nM],  $0,5 \pm 0,2$  nM in grünem Tee [ $89,6 \pm 39,1$  nM] und  $4,2 \pm 0,9$  nM in fermentierten Sojabohnen [ $184,7 \pm 94,8$  nM] nur vergleichsweise sehr geringe Mengen an PQQ.

Die hohe Varianz in den PQQ-Gehalten, die in biologischen Proben gefunden wurden, deutet an, dass es bisher keine verlässliche Methode gab, um PQQ in biologischem Material zu bestimmen. Zudem ist es wahrscheinlich, dass der Gehalt an PQQ in Lebensmitteln von der

Marke und individuellen Proben abhängt, was auch durch die hohen Standardabweichungen deutlich wird. Weitere Abweichungen kommen sicherlich dadurch zustande, dass einige Methoden PQQ-Derivate zu dem Gesamtgehalt an PQQ zählen und andere nicht. In der Anwesenheit organischer nukleophiler Komponenten wird PQQ schnell in Imidazolopyrrolochinolinchinon umgewandelt (Noji *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu wird bei der Methode von Kumazawa und Kollegen (1995) nicht zwischen PQQ und seinen Derivaten unterschieden.

Die hier beschriebene Methode der PQQ-Quantifizierung mit dem Enzym Swit\_4395 kann jedoch als sehr spezifisch für PQQ angesehen werden. Das Protein bindet ausschließlich PQQ als prosthetische Gruppe und ist daher sehr gut geeignet um PQQ genau zu quantifizieren.

#### **4.3.3.2 Produktion von PQQ durch Gram-negative Bakterien**

Das ubiquitäre Vorkommen von PQQ drängt die Frage nach seiner Herkunft auf. Naheliegend ist dabei die Produktion durch Bakterien. Es sind mehr als 100 Bakterienstämme bekannt, die ein *pqq*-Operon in ihrem Genom aufweisen und somit in der Lage sind PQQ zu synthetisieren (Shen *et al.* 2012). Neben vielen anderen zählen dazu auch *Ga. diazotrophicus*, *G. oxydans*, *H. denitrificans* und *P. putida*, während beispielweise *E. coli* und *S. wittichii* nicht in der Lage sind PQQ selbst zu produzieren. Dennoch besitzen diese Organismen PQQ-abhängige Dehydrogenasen und sind in der Lage funktionelle Holoenzyme zu bilden.

Im Zuge dieser Arbeit konnte in allen Kulturüberständen von PQQ-produzierenden Bakterienstämmen PQQ nachgewiesen werden. Dabei synthetisierte *H. denitrificans* mit 60 nmol pro Liter Kulturmedium ungefähr zehnmal mehr PQQ, als die drei anderen Organismen. Unter optimalen Bedingungen ist *H. denitrificans* angeblich sogar in der Lage bis zu 3 mmol PQQ pro Liter zu generieren (Urakami *et al.* 1992). In anderen Experimenten mit *Paracoccus denitrificans* und *G. suboxydans* konnten 200 nmol (Glatz *et al.* 2000) beziehungsweise 100 nmol PQQ pro Liter Kultur (Otani *et al.* 1989) festgestellt werden. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass *E. coli* bis zu 6 mmol PQQ pro Liter akkumuliert, wenn diesem Bakterium das PQQ-Synthesecluster von *G. oxydans* zur Verfügung gestellt wird (Yang *et al.* 2010). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die bisherigen Methoden PQQ zu quantifizieren noch recht ungenau waren. Auch wenn unter den gegebenen Umständen nicht diese exorbitanten Werte erreicht werden konnten, ist doch deutlich zu erkennen, dass Gram-negative Organismen, die ein *pqqA-E* Operon aufweisen, PQQ produzieren und in erheblichem Maße an ihre Umgebung abgeben. Die Tatsache, dass

Bakterien, die selbst kein PQQ-Synthesecenter besitzen, nicht nur Chinoproteine in ihrem Genom kodiert haben, sondern auch exprimieren, ist daher nicht weiter verwunderlich, da ausreichend PQQ zur Verfügung steht, das extern aufgenommen werden kann.

Die Tatsache, dass PQQ in einem großen Maßstab von Bakterien produziert wird, erklärt allerdings nicht das Vorkommen von PQQ in humanem Gewebe, wie der Milz, dem Pankreas oder der Lunge (Kumazawa *et al.* 1992). Der letzte Schritt der PQQ-Biosynthese wird durch die Oxidase PqqC durchgeführt. Diese Reaktion ist von molekularem Sauerstoff abhängig (Shen *et al.* 2012; Bonnot *et al.* 2013). Daher können Darmbakterien nicht die Quelle des PQQ im Menschen sein, weil im menschlichen Darm ein anaerobes Milieu vorherrscht. Naheliegender ist daher, dass PQQ von Menschen durch die Nahrung aufgenommen wird. Diese These lässt sich auch dadurch bestätigen, dass in zahlreichen Nahrungsmitteln PQQ gefunden werden konnte (siehe Abschnitt 4.3.3.1). Zudem besitzen viele mit Pflanzen assoziierte Mikroorganismen ein *pqqA-E(F)* Operon (Shen *et al.* 2012). Dazu gehören der Sojabohnen-Symbiont *Bradyrhizobium japonicum* (Meakin *et al.* 2006), das Bakterium *Burkholderia phymatum*, das auf Hülsenfrüchten vorkommt (Johnston *et al.* 2008), *Methylobacterium radiotolerans*, das auf *Cucurbita pepo* (Gartenkürbis) gefunden wurde (Eevers *et al.* 2015), der Tomaten-Symbiont *Pseudomonas syringae* und einige mehr. Diese Zusammenstellung liefert auch direkt einen starken Hinweis auf die Herkunft des PQQ in Pflanzen.

## 4.4 Bakterielle Alkoholdehydrogenasen

ADHs kommen ubiquitär in Menschen, Pflanzen, Hefen und auch Bakterien vor. Neben NAD(P)<sup>+</sup>-abhängigen ADHs, die eine bedeutende Rolle im Stoffwechsel von Säugetieren und Bakterien spielen, sind auch viele PQQ-abhängige ADHs bekannt. ADHs sind aber nicht nur für die Physiologie von Belang, sondern sie gewinnen auch eine immer größere Bedeutung in der Biotechnologie. So können sie in der Dekontamination von Schadstoffen, der Produktion nützlicher Materialien, der Biokonversion und der Bioremediation eingesetzt werden (Toyama *et al.* 2004).

### 4.4.1 PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenasen

Wie an der Aufstellung in Abschnitt 4.1.1 bereits zu erkennen ist, gibt es drei Typen PQQ-abhängiger ADHs: ADHI, ADHII und ADHIII. Die Enzymklasse der ADHI umfasst lösliche Proteine, die im Periplasma lokalisiert sind und kein Cyt *c* gebunden haben, wie beispielsweise die ADH aus *P. aeruginosa* (Groen *et al.* 1984). Die ADHII sind



periplasmatische, lösliche Enzyme, die als Monomere vorliegen und in der Regel am C-Terminus eine Cyt *c*-Domäne aufweisen. Dazu gehören unter anderem die ADHs aus *C. testosteroni* (de Jong *et al.* 1995) und *P. putida* HK5 (Toyama *et al.* 1995). Diese Chinohämoproteine katalysieren normalerweise die Oxidation von primären Alkoholen zu Aldehyden oder die Oxidation von sekundären Alkoholen zu Ketonen. Die Typ III ADHs sind membranständige Proteine und wurden lange ausschließlich in Essigsäurebakterien wie *Acetobacter* sp (Matsushita *et al.* 1994) und *Gluconobacter* sp (Matsushita *et al.* 1996) gefunden. Mittlerweile existieren erste Hinweise, dass ADHIII kein Alleinstellungsmerkmal von Essigsäurebakterien sind, da kürzlich ein Vertreter dieser Enzymklasse in dem  $\gamma$ -Proteobakterium *Frateuria aurantia* aus der Familie der Xanthomonadaceae gefunden wurde (Treck & Matsushita 2013). Strukturell umfassen Enzyme der ADHIII drei Untereinheiten, wobei die  $\alpha$ -Untereinheit der Primärstruktur von ADHII ähnelt und die  $\beta$ -Untereinheit drei Häme koordiniert und für die Verankerung in der Membran verantwortlich ist. Die  $\gamma$ -Untereinheit ist in jeden Fall deutlich kleiner, als die beiden anderen Untereinheiten und ihre Funktion ist bisher nicht bekannt (Anthony 2001). Neben den drei Typen an ADHs existieren noch die Chinoprotein MDHs, die als lösliche Enzyme im Periplasma von methylotrophen Bakterien vorkommen (Yamada *et al.* 2003).

#### **4.4.2 Die putativen ADHs Swit\_2227 und Swit\_4160 aus *S. wittichii* RW1**

Die Analyse des Genoms von *S. wittichii* RW1 hatte ergeben, dass die meisten Gene für PQQ-abhängige Enzyme, für ADHs kodieren. Darunter waren auch die beiden Gene *swit\_2227* und *swit\_4160*. Daraufhin wurden diese Gene eingehend bioinformatisch untersucht, in ein Expressionssystem mit induzierbaren Promotor kloniert und homolog in *S. wittichii* RW1 produziert. Anschließend wurden die prosthetischen Gruppen und das Substratspektrum der beiden rekombinanten Proteine untersucht.

##### **4.4.2.1 Bioinformatische Analyse und Struktur der Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160**

Die beiden Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160 waren als Chinohämoprotein Ethanol-Dehydrogenasen (EC 1.1.9.1) annotiert und zeigten Homologien zu anderen ADHs, wie beispielsweise zu den ADHIIG und ADHIIB aus *P. putida* HK5 (Toyama *et al.* 1995), der Ethanol-Dehydrogenase Typ 1 aus *C. testosteroni* (Stoorvogel *et al.* 1996) und den großen Untereinheiten der membrangebundenen Cyt *c*-abhängigen ADH aus *Komagataeibacter europaeus* und *Ga. polyoxogenes* (Tamaki *et al.* 1991).

Eine Untersuchung der Primärsequenz der beiden Proteine bezüglich konservierter Proteindomänen zeigte, dass das aktive Zentrum mit den Bindestellen für PQQ und Calcium-Ionen in den Proteinen Swit\_2227 und Swit\_4160 konserviert war (Toyama *et al.* 1995). Zusätzlich waren die Trp-Docking Motive vollständig vorhanden (Anthony & Ghosh 1998). Trp-Docking Motive sind Polypeptidbindestellen, die mit den einzelnen Propellerblättern der  $\beta$ -Sheets interagieren und weisen die gemeinsame Konsensussequenz A-X-[DN]-X-X-T-G-[DEK]-X-X-W auf (Ghosh *et al.* 1995), wobei X für eine beliebige Aminosäure steht und die eckigen Klammern diejenigen Aminosäuren anzeigen, die an dieser Position vorkommen können. Neben diesen Motiven fanden sich auch in beiden Proteinen Hinweise auf ihre Zugehörigkeit zu der Cyt *c*-Proteinfamilie (Mathews 1985). Dabei ist das Häm durch eine Thioesterbindung kovalent an zwei Cysteinreste gebunden und eine Konsensussequenz C-X-X-C-H vorhanden (Barker & Ferguson 1999). In dem Protein Swit\_2227 (Daten für Swit\_4160 in Klammern) erstreckt sich die Cyt *c*-Domäne über den Bereich der Aminosäuren 516 bis 633 (595 – 675), wobei die Cysteinreste C629 (C609) und C632 (C612) kovalent an das Häm gebunden sind und H633 (H613) als axialer Ligand des Häm-Eisens fungiert. In dem Protein Swit\_2227 fand sich zusätzlich noch eine Cyt *c*-Domäne, die ein konserviertes Strukturmerkmal von ADHII darstellt (Toyama *et al.* 2005).

Die Tertiärstruktur beider Proteine sollte aufgrund ihrer Einordnung als PQQ-abhängige ADHII einen achtfachen  $\beta$ -Propeller darstellen. In den Sekundärstrukturen der Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160 fanden sich 30 respektive 35 putative  $\beta$ -Faltblattstrukturen, sowie sieben beziehungsweise sechs  $\alpha$ -Helices (Jones 1999; Buchan *et al.* 2013). Eine weiterführende Modellierung der Tertiärstruktur (Wang *et al.* 2000) konnte bestätigen, dass es sich jeweils um Proteine mit einer achtfachen  $\beta$ -Propellerstruktur handelte, die typisch für PQQ-abhängige Enzyme ist (Anthony & Ghosh 1998). Zudem bildeten jeweils zwei der  $\alpha$ -Helices am C-terminalen Ende eine für Cyt *c*-abhängige Proteine typische Struktur.

Chinoproteine kommen nur im Periplasma beziehungsweise in der Cytoplasmamembran von Gram-negativen Bakterien vor. Da in der Sequenz der Protein Swit\_2227 und Swit\_4160 keine TMHs gefunden werden konnten, wurde davon ausgegangen, dass es sich um periplasmatische Enzyme handelt. Diese Hypothese wurde dadurch bestätigt, dass für beide Proteine ein Sec-abhängiges Signalpeptid am N-Terminus vorausgesagt wurde. Die Schnittstelle für die Signalpeptidase befindet sich in der Regel hinter kleinen neutralen Aminosäuren, wie Alanin, Glycin, Serin oder Cystein (Heijne 1983, 1985; Perlman & Halvorson 1983) oder hinter einem A-X-A-Motiv (Shen *et al.* 1991; Fikes *et al.* 1990). Daher

ist es wahrscheinlich, dass sich das native Signalpeptid des Proteins Swit\_4160 über die Aminosäuren 1-24 erstreckt und mit einem Alaninrest abschließt. Für das Protein Swit\_2227 ergeben sich demnach sogar drei Möglichkeiten. Die beiden Schnittstellen nach den Aminosäuren A27 und G32, die mit Internetprogrammen berechnet wurden (siehe Abschnitt 3.4.1), sind ebenso wahrscheinlich, wie ein Signalpeptid, das die Positionen 1 – 24 umschließt und mit den Aminosäuren A-P-A endet. Da es sich bei den beiden Proteinen Swit\_2227 und Swit\_4160 demnach um periplasmatische Enzyme handelt, diese jedoch Homologien zu Untereinheiten der membrangebundenen ADHs von *Ga. polyoxogenes* (Tamaki *et al.* 1991), *G. suboxydans* (Kondo & Horinouchi 1997) und *Acetobacter aceti* (Inoue *et al.* 1989) aufweisen, könnte es sich hier um Vertreter einer neuen Enzymklasse handeln.

#### **4.4.2.2 Homologe Expression der Gene *swit\_2227* und *swit\_4160* mittels eines induzierbaren Expressionssystems**

Die beiden Gene *swit\_2227* und *swit\_4160* lagen bereits, in einen Überexpressionsvektor mit einem verlängerten Strep-Tag (siehe Abschnitt 4.2.2) und einem induzierbaren Lac-Promotor kloniert, vor (Brunke 2013). Im Gegensatz zu anderen Vektoren wie beispielsweise pUC18/19 (Yanisch-Perron *et al.* 1985) waren in diesen Vektoren das vollständige *lacI/lacP*-Fragment aus *E. coli* BL21, das für LacI kodiert und die Promotoren pLacI und pLacZ enthält, vorhanden.

Die putativen ADHII Swit\_2227 und Swit\_4160 konnten homolog in *S. wittichii* RW1 produziert und anschließend mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dies war das erste Mal, dass es gelungen ist Gene homolog in *S. wittichii* RW1 mit Hilfe eines induzierbaren Promotorsystems zu exprimieren. Die Ausbeute, die mit dem Lac-System erzielt werden konnte lag mit 0,3 mg/L für das Protein Swit\_2227 beziehungsweise 0,6 mg/L für das Protein Swit\_4160 um die Faktoren zehn und fünf niedriger, als die, die mit einem konstitutiven Promotor erreicht werden konnte (Zeiser *et al.* 2014).

Viele Chinohämoproteine, die als ADHs charakterisiert wurden, weisen Molekulargewichte um die 70 kDa auf. Dazu gehören unter anderem die PVADH aus *Sphingomonas* sp 113P3 mit 68 kDa (Hirota-Mamoto *et al.* 2006), die 1-Butanol-Dehydrogenase aus *P. butanovora* mit 70,9 kDa (Vangnai *et al.* 2002), die beiden Enzyme ADHIIB und ADHIIG aus *P. putida* HK5 mit 69 kDa und 72 kDa (Toyama *et al.* 1995), aber auch die Lupanin-Hydroxylase aus *P. putida* mit 72 kDa (Hopper & Kaderbhai 2003).

In einer SDS-PAGE konnte verifiziert werden, dass es sich bei den beiden rekombinanten Proteinen um Swit\_2227 und Swit\_4160 handelte. Die Tatsache, dass in dem Eluat des Proteins Swit\_4160 weitere Signale zu sehen waren, ließ darauf schließen, dass es sich dabei um proteolytische Abbauprodukte handelte. Diese These wurde auch dadurch bestätigt, dass in den kleineren Fragmenten Häm detektiert werden konnten. Die Zugabe von Proteaseinhibitor während der Aufreinigung führte allerdings zu keinem anderen Ergebnis.

Mit der homologen Produktion der beiden Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160 konnte gezeigt werden, dass mittels eines induzierbaren Expressionssystems PQQ-abhängige Enzyme in *S. wittichii* RW1 synthetisiert werden können.

#### 4.4.2.3 Analyse der prosthetischen Gruppen in den Proteinen Swit\_2227 und Swit\_4160

Aufgrund der bioinformatischen Analyse war davon auszugehen, dass es sich bei den Enzymen Swit\_2227 und Swit\_4160 um Chinohämoproteine handelt. Daher war der Einbau der prosthetischen Gruppen PQQ und Häm *c* in die Proteine zu erwarten. Da *S. wittichii* RW1 in seinem Genom kein *pqq*-Operon, das für die Synthese von PQQ notwendig ist, aufweist, musste dem Wachstumsmedium extern PQQ zugeführt werden. Dahingegen war das *ccm* (Cytochrom *c* maturation) Gencluster für die Biosynthese von Hämen mit Ausnahme des Gens *ccmD* vollständig vorhanden (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Gene für die Biosynthese von Cyt *c* in *S. wittichii* RW1

<b><i>ccm</i>-Gen</b>	<b>Homolog in <i>S. wittichii</i> RW1</b>	<b>Genprodukt</b>
<i>ccmA</i>	<i>swit_1421</i>	Hämexporterprotein A
<i>ccmB</i>	<i>swit_1422</i>	Hämexporterprotein B
<i>ccmC</i>	<i>swit_3988</i>	Hämexporterprotein C
<i>ccmD</i>	fehlt	Hämexporterprotein D
<i>ccmE</i>	<i>swit_3989</i>	CcmE / CycJ Protein
<i>ccmF</i>	<i>swit_3990</i>	Cyt <i>c</i> Assembly Proteine
<i>ccmG</i>	<i>swit_3991</i>	Thiol-Disulfid Oxidoreduktase DsbE
<i>ccmH</i>	<i>swit_3992</i>	Cyt <i>c</i> Biogenese Protein

Das Fehlen des Genprodukts von *ccmD* sollte keine schwerwiegenden Auswirkungen auf die Synthese von Cytochromen haben, da es sich bei CcmD um ein kleines Protein handelt, dessen Funktion es ist, das Protein CcmE in der Membran zu stabilisieren (Goldman *et al.* 1998; Kranz *et al.* 1998).

Die UV-VIS-Spektren der beiden Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160 zeigten die Inkorporation von Häm *c*. Spektren von reduziertem Cyt *c* weisen im Allgemeinen drei Absorptionsmaxima auf. Dazu gehören die  $\gamma$ -Bande bei 415 nm, die  $\beta$ -Bande bei 520 nm und die  $\alpha$ -Bande bei 550 nm (Margoliash & Frohwirt 1959). In den reduzierten UV-VIS-Spektren der Proteine Swit\_2227 und Swit\_4160 waren jeweils charakteristische Soret-Banden bei 420 nm zu erkennen, was ein starker Hinweis auf das Vorhandensein von Cyt *c* ist. Diese These konnte durch eine Häm-spezifische Färbung (Thomas *et al.* 1976) bestätigt werden.

Die prosthetische Gruppe PQQ weist ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 341 nm auf (Duine *et al.* 1980; van der Meer *et al.* 1987). Daher konnte das Vorhandensein von PQQ in den Proteinen Swit\_2227 und Swit\_4160 mittels UV-VIS-Spektrometrie nicht verifiziert werden, da Absorptionsmaxima im Bereich von 340 nm fehlten. Eine Untersuchung des PQQ-Gehaltes mit der Apoenzymform von Swit\_4395 zeigte jedoch, dass beide Proteine zu jeweils mehr als 90 % mit PQQ beladen waren.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass es sich bei den beiden Enzymen Swit\_2227 und Swit\_4160 um Chinohämoproteine handelt, die definitiv sowohl PQQ, als auch Häm *c* inkorporiert hatten.

#### **4.4.2.4 Substratspektrum und Aktivierung der Enzyme Swit\_2227 und Swit\_4160**

ADHII weisen in der Regel ein breites Substratspektrum auf. Manche ADHII oxidieren primäre, sekundäre oder tertiäre Alkohole genauso, wie Diole, Polyole, heterozyklische Alkohole, Polyethylenglykol, THFA oder PVA (Matsushita *et al.* 2002). Es gibt aber auch ADHII, die sehr spezifisch für ein Substrat sind. So oxidiert die THFA-Dehydrogenase (Zarnt *et al.* 2001) praktisch jede Art von Alkoholen, während die PVADH (Shimao *et al.* 1996) spezifisch für PVA ist. Darüber hinaus existieren in ein und demselben Organismus verschiedene Typen von ADHII mit unterschiedlichen Substratspezifitäten. In *P. putida* HK5 beispielsweise oxidiert die ADHIIB langkettige und sekundäre Alkohole, während die ADHIIG Diole, aber weder primäre noch sekundäre Alkohole oxidiert (Toyama *et al.* 1995).

Die beiden putativen ADHs Swit\_2227 und Swit\_4160 wurden mit insgesamt 107 Substraten auf eine katalytische Aktivität hin getestet. Dabei wurde untersucht, ob die beiden Enzyme die Oxidation verschiedener primärer Alkohole zu Aldehyden, sekundärer Alkohole zu Ketonen, Diolen zu Hydroxyketonen, Polyolen zu Ketosen und Zuckern oder Aldehyden zu Carbonsäuren katalysieren. Weiterhin wurde auch die Umsetzung von zyklischen oder chlorierten Alkoholen, Hydroxyketonen, Aminosäuren oder die Oxidation von Glycerin zu Glyceraldehyd oder DHA untersucht.

ADHs können vor allem *in vitro* unterschiedliche Reaktionsbedingungen benötigen. In *P. putida* HK5 beispielsweise existieren insgesamt drei verschiedene ADHs, die bei verschiedenen pH-Werten aktiv sind (Toyama *et al.* 1995). Zudem zeigt die ADHI dieses Bakteriums nur mit den artifiziellen Elektronenakzeptoren DCPIP und PMS eine katalytische Aktivität, während die beiden ADHII Elektronen auf Ferricyanid und in einem geringeren Maß auf PMS/DCPIP übertragen können. Daher wurden die Reaktionsbedingungen für die Untersuchung der beiden putativen ADH Swit\_2227 und Swit\_4160 variiert, wobei sowohl zwei unterschiedliche artifizielle Elektronenakzeptoren (DCPIP, Ferricyanid), mehrere Puffersysteme (Kaliumphosphat, Tris-HCl, MOPS) und verschiedene pH-Werte zwischen 6 und 9 eingesetzt wurden. Dennoch konnte mit keinem der getesteten Substrate eine enzymatische Reaktion nachgewiesen werden.

Für PQQ-abhängige MDHs beziehungsweise ADHs wurde in der Literatur (Toyama *et al.* 1995; Anthony 2004; Takeda *et al.* 2014) bereits ausführlich beschrieben, dass diese *in vitro* gegebenenfalls einen Aktivator benötigen. Dabei werden sowohl Ammonium-Ionen (Anthony 2004) als auch Amine, wie Ethyl- und Methylamin (Toyama *et al.* 1995; Takeda *et al.* 2014) genannt. Der Grund aus dem Amine als Aktivator von Chinoproteinen fungieren, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Die aktivierende Funktion von Ammonium-Ionen jedoch wird darauf zurückgeführt, dass  $\text{NH}_4^+$  eine Salzbrücke mit dem zweiten Carbonylsauerstoffatom der konservierten Aminosäure E177 des aktiven Zentrums von Chinoproteinen bilden. Die Glutaminsäure an Position 177 koordiniert die Calcium-Ionen im aktiven Zentrum PQQ-abhängiger Enzyme. Dabei entzieht  $\text{NH}_4^+$  der Aminosäure die negative Ladung, wodurch sich die positive Ladung des Calcium-Ions erhöht und diese dadurch eine bessere Lewis-Säure darstellt (Hothi *et al.* 2003).

Aufgrund dieser Berichte wurden Aktivierungsexperimente mit den beiden putativen ADHII Swit\_2227 und Swit\_4160 durchgeführt. Dafür wurde versucht die beiden Enzyme mit Ammonium-Ionen beziehungsweise Ethylamin zu aktivieren. Für das Protein Swit\_4160

konnte kein Effekt erzielt werden. Das Enzym Swit\_2227 zeigte mit den beiden Hydroxyketonen 2-Hydroxy-3-butanon (Acetoin) und DHA Aktivitäten von 1,7 U/mg und 4,3 U/mg. Da durch eine Erhöhung der Enzymmenge keine Steigerung der Aktivität festzustellen war, kann hier nicht von spezifischen Enzymaktivitäten ausgegangen werden. Allerdings liefern diese Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass es sich bei den Proteinen Swit\_2227 und Swit\_4160 um Hydroxyketon-Dehydrogenasen handeln könnte. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die Enzyme *in vitro* tatsächlich nicht aktiv sind.

Trotz all dieser Experimente konnte für die beiden Enzyme Swit\_2227 und Swit\_4160 *in vitro* keine Funktion gefunden werden. Möglicherweise wurde der geeignete Aktivator nicht entdeckt. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass beide Enzyme eine sehr spezifische Aufgabe wahrnehmen und trotz der Fülle an Substraten, die getestet wurden, das physiologische Substrat nicht gefunden wurde. Dennoch lässt sich, mit Einschränkungen, behaupten, dass die beiden putativen ADHs Swit\_2227 und Swit\_4160 nicht an der Dekontamination von chlorierten Schadstoffen beteiligt sind, da auch mit keinem der getesteten chlorierten Alkohole eine Reaktion zu beobachten war.

## **4.5 Katalytisches Potential membrangebundener Chinoproteine**

Neben periplasmatischen Chinoproteinen existieren zahlreiche membrangebundene Chinoproteine, die wichtige metabolische Eigenschaften aufweisen. Auch im Genom von *S. wittichii* RW1 wurden potentielle PQQ-abhängige Membranproteine gefunden. Um das Potential einschätzen zu können, das von solchen Proteinen in *S. wittichii* RW1 ausgeht, wurden die PQQ-abhängigen Membranaktivitäten der beiden Bakterien *S. wittichii* RW1 und *G. oxydans* 621H bestimmt und miteinander verglichen. Außerdem wurden im Anschluss die entsprechenden Kandidaten in *S. wittichii* RW1 in Überexpressionssystem kloniert und versucht diese zu produzieren und zu charakterisieren um ihnen die festgestellten Aktivitäten zuzuordnen.

### **4.5.1 Membrangebundene Chino(hämo)proteine – physiologische und biotechnologische Bedeutung**

Verschiedene Typen membrangebundener PQQ-abhängiger Dehydrogenasen sind bekannt. Dazu zählen membrangebundene GDHs, ADHs, ALDHs, PVADHs (EC 1.1.99.23) und Glycerol-Dehydrogenasen (EC 1.1.99.20) (McIntire 1994). Chinoproteine wie die mGDH und die Aldose-Dehydrogenase weisen in der Regel nur eine Untereinheit auf, während

Chinohämoproteine wie die membrangebundene ALDH, die mADH oder die membrangebundene Fruktose-Dehydrogenase zwei oder drei Untereinheiten besitzen.

Insbesondere in Essigsäurebakterien wurden membrangebundene Chinoproteine eingehend untersucht. Physiologisch gesehen sind diese Enzyme vor allem an der Übertragung von Elektronen auf die Atmungskette und der Oxidation von Substraten im Periplasma beteiligt (Tkac *et al.* 2009). Die mADH von *Gluconobacter* sp beispielsweise überträgt Elektronen über Ubichinon auf die Atmungskette (Shinagawa *et al.* 1990; Matsushita *et al.* 1996) und dadurch letztendlich auf molekularen Sauerstoff, der in diesem Fall den terminalen Endakzeptor darstellt (De Ley *et al.* 1984). Neben der physiologischen Bedeutung membrangebundener Chinoproteine haben diese auch vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Biotechnologie. Dazu gehören unter anderem der Einsatz als Bioanode von Biobrennstoffzellen (Barton *et al.* 2004; Cooney *et al.* 2008), Biosensorsysteme (Matsushita *et al.* 1995; Tkáč *et al.* 2005; Svitel *et al.* 2006) oder die Verwendung in der Bioelektrokatalyse (Léger & Bertrand 2008; Shleev *et al.* 2005).

Zudem haben Membranproteine, wie auch periplasmatische Dehydrogenasen, den Vorteil, dass ihr aktives Zentrum im Periplasma liegt. Daher werden keine spezifischen Transporter benötigt, um die Substrate über die Cytoplasmamembran zu transportieren (Matsushita *et al.* 2002). Weiterhin sind sie teilweise in der Lage schädliche Komponenten zu oxidieren (Tkac *et al.* 2000), was eine große Bedeutung in der Biokonversion und Bioremediation spielt.

#### **4.5.2 Vergleich der PQQ-abhängigen Membranaktivitäten von *S. wittichii* und *G. oxydans***

Das Bakterium *G. oxydans* besitzt drei charakterisierte Gene, die für membrangebundene PQQ-Dehydrogenasen kodieren (Prust *et al.* 2005). Dazu zählen eine mGDH, eine mADH und eine mSLDH, wobei erstere D-Glukose zu Glukonat oxidiert und Elektronen auf Ubichinon überträgt, wodurch diese in die Atmungskette eingespeist werden (Meyer *et al.* 2013).

In dem Genom des  $\alpha$ -Proteobakteriums *S. wittichii* RW1 fanden sich zwei Gene für putative membrangebundene PQQ-abhängige Enzyme, die als mSLDH (Swit\_1961) und mGDH (Swit\_2024) annotiert waren. Für beide Proteine konnten mit entsprechenden Internetprogrammen jeweils fünf TMHs identifiziert werden (Krogh *et al.* 2001; Sonnhammer *et al.* 1998). Daraus wurde geschlussfolgert, dass es sich bei den Proteinen Swit\_1961 und Swit\_2024 tatsächlich um Membranproteine handelt.



Die Untersuchung konservierter Domänen der beiden Proteine hat gezeigt, dass jeweils sowohl eine Bindestelle für PQQ und Calcium-Ionen (Keitel *et al.* 2000), als auch ein Trp-Docking Motiv (Anthony & Ghosh 1998) konserviert vorlagen, was dafür sprach, dass es Chinoproteine waren. Zudem konnte durch die Analyse der Domänen eine Zugehörigkeit zu der Familie der Quinat/Shikimat-Dehydrogenasen (EC 1.1.99.25) beziehungsweise der Familie der membrangebundenen GDHs (EC 1.1.5.2) angenommen werden. Letztere sind in der Regel für die Oxidation von D-Glukose zu D-Glukono-1,5-lakton verantwortlich, mit der Atmungskette gekoppelt, nutzen Ubichinon als Elektronenakzeptor und weisen eine achtfache Propellerstruktur auf (Anthony 2004). Diese These wurde auch durch eine BLAST-Suche bestätigt, die Sequenzhomologien der beiden Proteine Swit\_1961 und Swit\_2024 mit mGDHs aus *A. calcoaceticus* (Cleton-Jansen *et al.* 1988) und *E. coli* (Cleton-Jansen *et al.* 1990), sowie der Quinat/Shikimat-Dehydrogenasen aus *Acinetobacter* sp ADP1 (Elsemore & Ornston 1994) identifizierte. Andererseits fanden sich auch einige Hinweise darauf, dass es sich um putative Glycerol- (EC 1.1.99.22) oder Polyol-Dehydrogenasen handeln könnte. So waren auch Homologien zu der PQQ-abhängigen Glycerol-Dehydrogenase von *Gluconobacter thailandensis* (Hoshino *et al.* 2003), sowie den periplasmatischen ADHIIG und ADHIIB aus *P. putida* HK5 (Toyama *et al.* 1995) erkennbar.

Diese Ergebnisse zeigten, dass eine bioinformatische Analyse die biologische Charakterisierung von Enzymen nicht ersetzen kann. Daher wurde der Versuch unternommen, die beiden Gene zu amplifizieren, in geeignete Überexpressionsvektoren zu klonieren, sowie anschließend zu produzieren und biologisch zu charakterisieren.

Die Charakterisierung der putativen membrangebundenen Dehydrogenase Swit\_2024 scheiterte bereits an der Amplifizierung des entsprechenden Gens. Dieses hat mit 71,3 % einen sehr hohen GC-Anteil. Hohe GC-Gehalte führen dazu, dass die Schmelztemperatur der DNA erhöht ist und lokale Bereiche in PCR-Matrizen, auf die diese Eigenschaft zutrifft, können als Terminationsstellen dienen (McDowell *et al.* 1998). Anders als das Gen *swit\_1961*, das mit 69,9 % einen ähnlich hohen GC-Gehalt aufweist, konnte das Gen *swit\_2024* auch nicht durch modifizierte PCR-Protokolle, die Trehalose (Spiess *et al.* 2004) oder Betain (Henke *et al.* 1997) nutzen, um die Schmelztemperatur der DNA zu senken, amplifiziert werden. Außerdem konnte keine biologische Charakterisierung des Proteins Swit\_1961 durchgeführt werden, da eine heterologe Produktion in *E. coli* fehlschlug und die Transformation des entsprechenden Überexpressionsvektors in *S. wittichii* RW1 bisher keinen Erfolg hatte.

Der Vergleich der PQQ-abhängigen enzymatischen Aktivitäten von Membranen von *S. wittichii* RW1 und *G. oxydans* 621H hat vor allem bei der Oxidation von Alkoholen Unterschiede ergeben. So hat sich gezeigt, dass Membranen von *G. oxydans* bevorzugt primäre Alkohole zu Aldehyden und  $\beta$ -,  $\epsilon$ -, sowie  $\theta$ -Dirole zu Hydroxyketonen oxidieren. Die Umsetzung von sekundären Alkoholen,  $\alpha$ -Diolen und zyklischen Alkoholen hingegen konnte nicht oder nur in geringen Maß beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde mit Membranen von *S. wittichii* RW1 die Oxidation von sekundären Alkoholen zu Ketonen, von  $\alpha$ -Diolen zu  $\alpha$ -Hydroxyketonen, von Zuckeralkoholen zu Ketosen und von zyklischen Alkoholen zu ihren korrespondierenden Ketonen festgestellt. Eine Umsetzung von primären Alkoholen dagegen fand nicht statt. In beiden Organismen finden sich demnach membrangebundene ADHs, deren Substratspektren sich deutlich voneinander unterscheiden.

#### **4.5.3 Rolle der Membranproteine Swit\_1961 und Swit\_2024 in *S. wittichii***

Es wurden bereits zahlreiche mADHs insbesondere aus Essigsäurebakterien isoliert und charakterisiert. Diese sind in der Regel Chinohämoproteine, die primäre Alkohole bei niedrigen pH-Werten oxidieren. Dazu gehört beispielsweise die mADH aus *Frateuria aurantia* LMG1558(T), die bevorzugt Ethanol, 1-Butanol und 1-Propanol bei einem pH-Wert von 4,5 umsetzt (Trcek & Matsushita 2013). Derartige membrangebundene Enzyme übertragen in der Regel Elektronen direkt auf den Chinonpool oder sind an der schnellen Oxidation von Ethanol über Acetaldehyd zu Essigsäure beteiligt (Matsushita *et al.* 1994). Damit korrespondieren die Ergebnisse, die mit den Membranen von *G. oxydans* erzielt werden konnten. Die Aktivität der Membranen von *S. wittichii* RW1 mit Alkoholen waren jedoch eher mit der löslichen ADHIIB aus *P. putida* HK5 vergleichbar (Toyama *et al.* 1995). Dieses Enzym weist Homologien zu den beiden putativen membrangebundenen Chinoproteinen aus *S. wittichii* RW1 auf und oxidiert ebenfalls sekundäre Alkohole und  $\beta$ -Dirole. Im Gegensatz zu den beiden Proteinen aus *S. wittichii* RW1 ist es jedoch im Periplasma lokalisiert und nutzt zusätzlich zu PQQ Häm *c* als prosthetische Gruppe. Davon ausgehend lässt sich darüber spekulieren, dass es sich bei den beiden putativen mADHs aus *S. wittichii* um Proteine einer neuen Enzymklasse handelt, die zwar membrangebunden sind, jedoch Reaktionen periplasmatischer ADHs katalysieren. Solche Enzyme könnten nicht nur physiologisch bei der Übertragung von Elektronen auf Q10, sondern auch in der Biotechnologie, eine Rolle spielen. Mögliche Anwendungen in der Biokonversion oder Bioremediation wären dabei die Detoxifizierung schädlicher Komponenten oder die Produktion Enantiomer-reiner Verbindungen für die Industrie (Toyama *et al.* 2004).

## 5. Zusammenfassung

Die Entschlüsselung des Genoms von *S. wittichii* RW1 eröffnete die Möglichkeit neuartige PQQ-abhängige Dehydrogenasen zu entdecken.

1. Es wurden alle potentiellen Chinoproteine aus *S. wittichii* RW1 bioinformatisch identifiziert. Dabei wurde ersichtlich, dass dieser Organismus über insgesamt 14 putative PQQ-abhängige Dehydrogenasen verfügt.

2. Von diesen 14 Genen wurde das Gen *swit\_4395* in einen neuartigen Expressionsvektor kloniert. Dieser enthielt neben dem Promotor p264 aus *G. oxydans* 621H, das Signalpeptid *pelB* aus *E. coli* und einen Strep-Tag mit verlängerter Linkersequenz.

3. Das rekombinante Protein Swit\_4395 wurde heterolog in *E. coli* und homolog in *S. wittichii* produziert und mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt. Es hatte eine Größe von 39,3 kDa und wurde als Aldehyd-Dehydrogenase charakterisiert. Das Substratspektrum erstreckte sich dabei über aliphatische und aromatische Aldehyde, Di-, Hydroxy- und Ketoaldehyde und Butanal stellte das Substrat mit der höchsten katalytischen Aktivität dar ( $V_{\max} = 3970 \pm 200$  U/mg,  $K_M = 12,3$  mM). Als prosthetische Gruppe konnte PQQ identifiziert werden, wobei je ein Mol Enzym ein Mol PQQ bindet. Die Rekonstitution der Apoenzymform von Swit\_4395 mit PQQ und  $\text{Ca}^{2+}$  konnte zudem erfolgreich durchgeführt werden.

4. Bei der homologen Produktion des Protein Swit\_4395 in *S. wittichii* konnte gezeigt werden, dass es sich um ein periplasmatisches Enzym handelt, das nativ als Homooktamer und Homododekamer vorkommt, wobei beide Formen katalytisch aktiv waren. Als Effekt der homologen Produktion konnte zudem eine erhöhte Toleranz gegenüber Butanal festgestellt werden, was darauf schließen ließ, dass es sich um ein Detoxifizierungs-System handelt.

5. In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine potentielle Anwendungsmöglichkeit für das Protein Swit\_4395 erprobt. Dazu wurde ein enzymatisches Verfahren für die Quantifizierung von PQQ entwickelt. Bei diesem Verfahren wurde die Apoenzymform mit definierten Mengen an PQQ oder Probenmaterial, sowie  $\text{CaCl}_2$  rekonstituiert und die enzymatische Aktivität mit Phenylglyoxal als Substrat und DCPIP als artifiziellen Elektronenakzeptor gemessen. Die Aktivität des Enzyms verläuft proportional zu dem Beladungszustand mit PQQ daher kann PQQ mit diesem System quantifiziert werden. Diese Methode ist enorm schnell, sensitiv und effizient, da die Rekonstitution innerhalb von Millisekunden abläuft und das

Detektionslimit mit 0,05 nM sehr niedrig liegt. Zudem lassen sich bis zu 40.000 Messungen mit einer Enzympräparation durchführen. Es war möglich PQQ sowohl in zahlreichen Lebensmitteln wie Obst, Gemüse und alkoholischen Getränken nachzuweisen, als auch in den Kulturüberständen von PQQ-produzierenden Bakterien, wie *G. oxydans*, *Ga. diazotrophicus*, *H. denitrificans* und *P. putida*.

6. Die Chinohämoproteine Swit\_2227 und Swit\_4160 konnten erfolgreich homolog in *S. wittichii* RW1 produziert werden, wobei zum ersten Mal in diesem Organismus ein induzierbares Expressionssystem mit dem Vektor pBBR1p264\_lacall\_Streplong eingesetzt wurde. In beiden Proteinen konnten die prosthetischen Gruppen PQQ und Häm *c* gefunden werden. Die physiologische Funktion der beiden Proteine ist noch ungeklärt, da mit über 100 verschiedenen Substraten keine Aktivität gemessen werden konnte.

7. In einem letzten Teil dieser Arbeit wurde das oxidative Potential der Membranen von *G. oxydans* mit dem von *S. wittichii* verglichen. Dabei zeigte sich, dass erstere bevorzugt primäre Alkohole und  $\beta$ -Dirole oxidieren. Im Gegensatz dazu wurden mit Membranen von *S. wittichii* eher sekundäre, sowie zyklische Alkohole,  $\alpha$ -Dirole und Polyole umgesetzt. Diese Ergebnisse zeigten, dass zumindest eine der beiden membrangebundenen PQQ-abhängigen Dehydrogenasen aus *S. wittichii* RW1 (Swit\_1961, Swit\_2024) eine ADH sein muss.

## 6. Literaturverzeichnis

**Adachi, O.; Fujii, Y.; Ghaly, M. F.; Toyama, H.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.** (2001): Membrane-bound quinoprotein D-arabitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257: a versatile enzyme for the oxidative fermentation of various ketoses. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **65** (12), 2755–2762.

**Adachi, O.; Matsushita, K.; Shinagawa, E.; Ameyama, M.** (1980): Crystallization and properties of NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus*. *Agricultural and Biological Chemistry* **44** (1), 155–164.

**Adachi, O.; Matsushita, K.; Shinagawa, E.; Ameyama, M.** (1990): Purification and properties of methanol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase from *Methylobacillus glycogenes*. *Agricultural and Biological Chemistry* **54** (12), 3123–3129.

**Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J.** (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25** (17), 3389–3402.

**Ameyama, M.; Matsushita, K.; Ohno, Y.; Shinagawa, E.; Adachi, O.** (1981): Existence of a novel prosthetic group, PQQ, in membrane-bound, electron transport chain-linked, primary dehydrogenases of oxidative bacteria. *FEBS Letters* **130** (2), 179–183.

**Ameyama, M.; Nonobe, M.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O.** (1985): Method of enzymatic determination of pyrroloquinoline quinone. *Analytical Biochemistry* **151** (2), 263–267.

**Ameyama, M.; Osada, K.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O.** (1981): Purification and characterization of aldehyde dehydrogenase of *Acetobacter aceti*. *Agricultural and Biological Chemistry* **45** (8), 1889–1890.

**Anthony, C.** (2001): Pyrroloquinoline quinone (PQQ) and quinoprotein enzymes. *Antioxidants and Redox Signaling* **3** (5), 757–774.

**Anthony, C.; Ghosh, M.** (1998): The structure and function of the PQQ-containing quinoprotein dehydrogenases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **69** (1), 1–21.

- Anthony, C.; Ghosh, M.; Blake, C. C.** (1994): The structure and function of methanol dehydrogenase and related quinoproteins containing pyrrolo-quinoline quinone. *The Biochemical Journal* **304** (3), 665–674.
- Anthony, C.; Zatman, L. J.** (1967): The microbial oxidation of methanol. The prosthetic group of the alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. M27: a new oxidoreductase prosthetic group. *The Biochemical Journal* **104** (3), 960–969.
- Anthony, C.** (2004): The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **428** (1), 2–9.
- Anthony, C.; Williams, P.** (2003): The structure and mechanism of methanol dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1647** (1-2), 18–23.
- Armstrong, J. M.** (1964): The molar extinction coefficient of 2,6-Dichlorophenol indophenol. *Biochimica et Biophysica Acta* **86**, 194–197.
- Babu-Khan, S.; Yeo, T. C.; Martin, W. L.; Duron, M. R.; Rogers, R. D.; Goldstein, A. H.** (1995): Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology* **61** (3), 972–978.
- Baddour, L. M.; Kraus, A. P.; Smalley, D. L.** (1985): Peritonitis due to *Pseudomonas paucimobilis* during ambulatory peritoneal dialysis. *Southern Medical Journal* **78** (3), 366.
- Barker, P. D.; Ferguson, S. J.** (1999): Still a puzzle: why is haem covalently attached in c-type cytochromes? *Structure* **7** (12), 281–290.
- Barton, S. C.; Gallaway, J.; Atanassov, P.** (2004): Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices. *Chemical Reviews* **104** (10), 4867–4886.
- Bashan, Y.; De-Bashan, L. E.** (2002): Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (6), 2637–2643.
- Basta, T.; Buerger, S.; Stolz, A.** (2005): Structural and replicative diversity of large plasmids from sphingomonads that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics. *Microbiology* **151** (6), 2025–2037.
- Basu, A.; Chakrabarty, K.; Chatterjee, G. C.** (1982): Neurotoxicity of lanthanum chloride in newborn chicks. *Toxicology Letters* **14** (1-2), 21–25.

- Bauerly, K. A.; Storms, D. H.; Harris, C. B.; Hajizadeh, S.; Sun, M. Y.; Cheung, C. P.; Satre, M. A.; Fascetti, A. J.; Tchapanian, E.; Rucker, R. B.** (2006): Pyrroloquinoline quinone nutritional status alters lysine metabolism and modulates mitochondrial DNA content in the mouse and rat. *Biochimica et Biophysica Acta* **1760** (11), 1741–1748.
- Bergethon, P. R.** (1990): Amperometric electrochemical detection of pyrroloquinoline quinone in high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* **186** (2), 324–327.
- Blanvillain, S.; Meyer, D.; Boulanger, A.; Lautier, M.; Guynet, C.; Denancé, N.; Vasse, J.; Lauber, E.; Arlat, M.** (2007): Plant carbohydrate scavenging through tonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PloS one* **2** (2), 224.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J.** (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8** 1987, 93–99.
- Bonnot, F.; Iavarone, A. T.; Klinman, J. P.** (2013): Multistep, eight-electron oxidation catalyzed by the cofactorless oxidase, PqqC: identification of chemical intermediates and their dependence on molecular oxygen. *Biochemistry* **52** (27), 4667–4675.
- Bradford, M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Brunke M.** (2012): Entwicklung von genetischen Expressionssystemen in *Gluconobacter oxydans*. Rheinische Friedrichs-Wilhelms-Universität, Bonn. Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie.
- Brunke M.** (2013): Entwicklung genetischer Werkzeuge in *G. oxydans* und *S. wittichii*. Rheinische Friedrichs-Wilhelms-Universität, Bonn. Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie.
- Buchan, D. W. A.; Minneci, F.; Nugent, T. C. O.; Bryson, K.; Jones, D. T.** (2013): Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research* **41**, 349-357.
- Buffoni, F.; Cambi, S.; Moneti, G.** (1992): Pyrroloquinoline quinone, a method for its isolation and identification by mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta* **1116** (3), 297–304.

- Bull, C. T.; Goldman, P. H.; Martin, K. J.** (2014): Novel primers and PCR protocols for the specific detection and quantification of *Sphingobium suberifaciens in situ*. *Molecular and Cellular Probes* **28** (5-6), 211–217.
- Buser, H. R.** (1986): Polybrominated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins: thermal reaction products of polybrominated diphenyl ether flame retardants. *Environmental Science and Technology* **20** (4), 404–408.
- Charlson, E. S.; Werner, J. N.; Misra, R.** (2006): Differential effects of yfgL mutation on *Escherichia coli* outer membrane proteins and lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology* **188** (20), 7186–7194.
- Chen, Z.; Baruch, P.; Mathews, F. S.; Matsushita, K.; Yamashita, T.; Toyama, H.; Adachi, O.** (1999): Crystallization and preliminary diffraction studies of two quinoprotein alcohol dehydrogenases (ADHs): a soluble monomeric ADH from *Pseudomonas putida* HK5 (ADH-IIB) and a heterotrimeric membrane-bound ADH from *Gluconobacter suboxydans* (ADH-GS). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **55** (11), 1933–1936.
- Choi, K.-H.; Kumar, A.; Schweizer, H. P.** (2006): A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of Microbiological Methods* **64** (3), 391–397.
- Choi, O.; Kim, J.; Kim, J.-G.; Jeong, Y.; Moon, J. S.; Park, C. S.; Hwang, I.** (2008): Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. *Plant Physiology* **146** (2), 657–668.
- Citro, G.; Verdina, A.; Galati, R.; Floris, G.; Sabatini, S.; Finazzi-Agrò, A.** (1989): Production of antibodies against the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *FEBS Letters* **247** (2), 201–204.
- Cleton-Jansen, A. M.; Goosen, N.; Fayet, O.; van de Putte, P.** (1990): Cloning, mapping, and sequencing of the gene encoding *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* **172** (11), 6308–6315.
- Cleton-Jansen, A. M.; Goosen, N.; Vink, K.; van de Putte, P.** (1989): Cloning, characterization and DNA sequencing of the gene encoding the Mr 50,000 quinoprotein



glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Molecular and General Genetics* **217** (2-3), 430–436.

**Cleton-Jansen, A. M.; Goosen, N.; Wenzel, T. J.; van de Putte, P.** (1988): Cloning of the gene encoding quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: evidence for the presence of a second enzyme. *Journal of Bacteriology* **170** (5), 2121–2125.

**Cooney, M. J.; Svoboda, V.; Lau, C.; Martin, G.; Minteer, S. D.** (2008): Enzyme catalysed biofuel cells. *Energy Environmental Science* **1** (3), 320.

**Cozier, G. E.; Salleh, R. A.; Anthony, C.** (1999): Characterization of the membrane quinoprotein glucose dehydrogenase from *Escherichia coli* and characterization of a site-directed mutant in which histidine-262 has been changed to tyrosine. *The Biochemical Journal* **340** (3), 639–647.

**Czuczwa, J. M.; Hites, R. A.** (1984): Environmental fate of combustion-generated polychlorinated dioxins and furans. *Environmental Science and Technology* **18** (6), 444–450.

**Davidson, V. L.; Wu, J.; Miller, B.; Jones, L. H.** (1992): Factors affecting the stability of methanol dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEMS Microbiology Letters* **73** (1-2), 53–58.

**D'Costa, E. J.; Higgins, I. J.; Turner, A. P.** (1986): Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor. *Biosensors* **2** (2), 71–87.

**de Jong, G. A.; Geerlof, A.; Stoorvogel, J.; Jongejan, J. A.; Vries, S. de; Duine, J. A.** (1995): Quinohaemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. Purification, characterization, and reconstitution of the apoenzyme with pyrroloquinoline quinone analogues. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **230** (3), 899–905.

**De Ley, J., Gillis, M.; Swings J.** (1984): The genus *Gluconobacter*. In: Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol 1, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 267–278.

**Dewanti, A. R.; Duine, J. A.** (2000): Ca<sup>2+</sup>-assisted, direct hydride transfer, and rate-determining tautomerization of C5-reduced PQQ to PQQH<sub>2</sub>, in the oxidation of beta-D-glucose by soluble, quinoprotein glucose dehydrogenase. *Biochemistry* **39** (31), 9384–9392.

- Dokter, P.; Frank, J.; Duine, J. A.** (1986): Purification and characterization of quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* L.M.D. 79.41. *The Biochemical Journal* **239** (1), 163–167.
- Drauz, K.; Waldmann H.** (eds) (2002): Enzyme catalysis in organic synthesis Vol 1-III, Wiley-VCH, Weinheim
- Duine, J. A.; Frank, J.** (1981): Quinoprotein alcohol dehydrogenase from a non-methylotroph, *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of General Microbiology* **122** (2), 201–209.
- Duine, J. A.; Frank, J.; Jongejan, J. A.** (1983): Detection and determination of pyrroloquinoline quinone, the coenzyme of quinoproteins. *Analytical Biochemistry* **133** (1), 239–243.
- Duine, J. A.; Frank, J.; van Zeeland, J. K.** (1979): Glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: a 'quinoprotein'. *FEBS Letters* **108** (2), 443–446.
- Duine, J. A.; Frank, J.; Verwiël, P. E.** (1980): Structure and activity of the prosthetic group of methanol dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **108** (1), 187–192.
- Duine, J. A.; Jongejan, J. A.** (1989): Quinoproteins, enzymes with pyrrolo-quinoline quinone as cofactor. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 403–426.
- Duine, J. A.; van der Meer, R. A.; Groen, B. W.** (1990): The cofactor pyrroloquinoline quinone. *Annual Review of Nutrition* **10**, 297–318.
- Durand, F.; Stines-Chaumeil, C.; Flexer, V.; Andre, I.; Mano, N.** (2010): Designing a highly active soluble PQQ-glucose dehydrogenase for efficient glucose biosensors and biofuel cells. *Biochemical Biophysical Research Communication* **402** (4), 750–754.
- Eevers, N.; Van Hamme, J. D.; Bottos, E. M.; Weyens, N.; Vangronsveld, J.** (2015): Draft genome sequence of *Methylobacterium radiotolerans*, a DDE-degrading and plant growth-promoting strain isolated from *Cucurbita pepo*. *Genome Announcements* **3** (3).
- Elsemore, D. A.; Ornston, L. N.** (1994): The *pca*-*pob* supraoperonic cluster of *Acinetobacter calcoaceticus* contains *quiA*, the structural gene for quinate-shikimate dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* **176** (24), 7659–7666.

- Esaka, Y.; Yamaguchi, Y.; Kano, K.; Goto, M.** (1993): Separation of amino acid-oxazole derivatives of the redox coenzyme pyrroloquinoline quinone by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **652** (1), 225–232.
- Felton, L. M.; Anthony, C.** (2005): Biochemistry: role of PQQ as a mammalian enzyme cofactor? *Nature* **433** (7025), 10.
- Ferrandez, A.; Prieto, M. A.; Garcia, J. L.; Diaz, E.** (1997): Molecular characterization of PadA, a phenylacetaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **406** (1-2), 23–27.
- Fikes, J. D.; Barkocy-Gallagher, G. A.; Klapper, D. G.; Bassford, P. J.** (1990): Maturation of *Escherichia coli* maltose-binding protein by signal peptidase I *in vivo*. Sequence requirements for efficient processing and demonstration of an alternate cleavage site. *Journal of Biological Chemistry* **265** (6), 3417–3423.
- Flückiger, R.; Paz, M.; Mah, J.; Bishop, A.; Gallop, P. M.** (1993): Characterization of the glycine-dependent redox-cycling activity in animal fluids and tissues using specific inhibitors and activators: evidence for presence of PQQ. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **196** (1), 61–68.
- Friedrich, T.; Hofhaus, G.; Ise, W.; Nehls, U.; Schmitz, B.; Weiss, H.** (1989): A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*. *European Journal of Biochemistry* **180** (1), 173–180.
- Fukaya, M.; Tayama, K.; Tamaki, T.; Tagami, H.; Okumura, H.; Kawamura, Y.; Beppu, T.** (1989): Cloning of the membrane-bound aldehyde dehydrogenase gene of *Acetobacter polyoxogenes* and improvement of acetic acid production by use of the cloned gene. *Applied and Environmental Microbiology* **55** (1), 171–176.
- Geerlof, A.; Jongejan, J. A.; van Dooren, T. J.; Racemakers-Franken, P. C.; van den Tweel, W. J.; Duine, J. A.** (1994): Factors relevant to the production of (R)-(+)-glycidol (2,3-epoxy-1-propanol) from racemic glycidol by enantioselective oxidation with *Acetobacter pasteurianus* ATCC 12874. *Enzyme and Microbial Technology* **16** (12), 1059–1063.
- Geiger, O.; Görisch, H.** (1987): Enzymatic determination of pyrroloquinoline quinone using crude membranes from *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry* **164** (2), 418–423.

**Ghosh, M.; Anthony, C.; Harlos, K.; Goodwin, M. G.; Blake, C.** (1995): The refined structure of the quinoprotein methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* at 1.94 Å. *Structure* **3** (2), 177–187.

**Gillis, M.; Kersters, K.; Hoste, B.; Janssens, D.; Kroppenstedt, R. M.; Stephan, M. P.; Teixeira, K. R. S.; Döbereiner, J., de Ley, J.** (1989): *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39** (3), 361–364.

**Glatz, Z.; Moravcova, M.; Janiczek, O.** (2000): Determination of pyrroloquinoline quinone by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications* **739** (1), 101–107.

**Gliese, N.; Khodaverdi, V.; Schobert, M.; Görisch, H.** (2004): AgmR controls transcription of a regulon with several operons essential for ethanol oxidation in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17933. *Microbiology* **150** (6), 1851–1857.

**Glupczynski, Y.; Hansen, W.; Dratwa, M.; Tielemans, C.; Wens, R.; Collart, F.; Yourassowsky, E.** (1984): *Pseudomonas paucimobilis* peritonitis in patients treated by peritoneal dialysis. *Journal of Clinical Microbiology* **20** (6), 1225–1226.

**Goldman, B. S.; Beck, D. L.; Monika, E. M.; Kranz, R. G.** (1998): Transmembrane heme delivery systems. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **95** (9), 5003–5008.

**Gómez-Manzo, S.; Chavez-Pacheco, J. L.; Contreras-Zentella, M.; Sosa-Torres, M. E.; Arreguín-Espinosa, R.; Pérez de la Mora, M.; Membrillo-Hernández, J.; Escamilla, J. E.** (2010): Molecular and catalytic properties of the aldehyde dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a quinochrome protein containing pyrroloquinoline quinone, cytochrome *b*, and cytochrome *c*. *Journal of Bacteriology* **192** (21), 5718–5724.

**Goodwin, M. G.; Avezoux, A.; Dales, S. L.; Anthony, C.** (1996): Reconstitution of the quinoprotein methanol dehydrogenase from inactive Ca(2+)-free enzyme with Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> or Ba<sup>2+</sup>. *The Biochemical Journal* **319** (3), 839–842.

**Goodwin, P. M.; Anthony, C.** (1998): The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Advances in Microbial Physiology* **40**, 1–80.

- Goosen, N.; Horsman, H. P.; Huinen, R. G.; Groot, A. de; van de Putte, P.** (1989): Genes involved in the biosynthesis of PQQ from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Antonie van Leeuwenhoek* **56** (1), 85–91.
- Goujon, M.; McWilliam, H.; Li, W.; Valentin, F.; Squizzato, S.; Paern, J.; Lopez, R.** (2010): A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* **38**, 695-699.
- Groen, B.; Frank, J. J. R.; Duine, J. A.** (1984): Quinoprotein alcohol dehydrogenase from ethanol-grown *Pseudomonas aeruginosa*. *The Biochemical Journal* **223** (3), 921–924.
- Groen, B. W.; van Kleef, M. A.; Duine, J. A.** (1986): Quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase apoenzyme from *Pseudomonas testosteroni*. *The Biochemical Journal* **234** (3), 611–615.
- Grosse, S.; Voigt, C.; Wendlandt, K. D.; Kleber, H. P.** (1998): Purification and properties of methanol dehydrogenase from *Methylosinus* sp. WI 14. *Journal of Basic Microbiology* **38** (3), 189–196.
- Grosse, S.; Wendlandt, K. D.; Kleber, H. P.** (1997): Purification and properties of methanol dehydrogenase from *Methylocystis* sp. GB 25. *Journal of Basic Microbiology* **37** (4), 269–279.
- Halden, R. U.; Halden, B. G.; Dwyer, D. F.** (1999): Removal of dibenzofuran, dibenzo-*p*-dioxin, and 2-chlorodibenzo-*p*-dioxin from soils inoculated with *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (5), 2246–2249.
- Halden, R. U.; Colquhoun, D. R.; Wisniewski, E. S.** (2005): Identification and phenotypic characterization of *Sphingomonas wittichii* strain RW1 by peptide mass fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (5), 2442–2451.
- Han, S. H.; Kim, C. H.; Lee, J. H.; Park, J. Y.; Cho, S. M.; Park, S. K.; Kim, K. Y.; Krishnan, H. B.; Kim, Y. C.** (2008): Inactivation of pqq genes of *Enterobacter intermedium* 60-2G reduces antifungal activity and induction of systemic resistance. *FEMS Microbiology Letters* **282** (1), 140–146.

- Hara, H.; Hiramatsu, H.; Adachi, T.** (2007): Pyrroloquinoline quinone is a potent neuroprotective nutrient against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurochemical Research* **32** (3), 489–495.
- Hauge, J. G.** (1964): Glucose dehydrogenase of *Bacterium anitratum*: an enzyme with a novel prosthetic group. *The Journal of Biological Chemistry* **239**, 3630–3639.
- He, B.; Liu, S.; Li, H.** (2010): The roles of PI3K/Akt pathway in proliferation of Schwann cells promoted by pyrroloquinoline quinone. *Chinese Journal of Plastic Surgery* **26** (1), 53–56.
- He, K.; Nukada, H.; Urakami, T.; Murphy, M. P.** (2003): Antioxidant and pro-oxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ): implications for its function in biological systems. *Biochemical Pharmacology* **65** (1), 67–74.
- Heijne, G. von** (1983): Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **133** (1), 17–21.
- Heijne, G. von** (1985): Signal sequences. The limits of variation. *Journal of Molecular Biology* **184** (1), 99–105.
- Heller, S. R.** (2008): Minimizing hypoglycemia while maintaining glycemic control in diabetes. *Diabetes* **57** (12), 3177–3183.
- Henke, W.; Herdel, K.; Jung, K.; Schnorr, D.; Loening, S. A.** (1997): Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Research* **25** (19), 3957–3958.
- Hirota-Mamoto, R.; Nagai, R.; Tachibana, S.; Yasuda, M.; Tani, A.; Kimbara, K.; Kawai, F.** (2006): Cloning and expression of the gene for periplasmic poly(vinyl alcohol) dehydrogenase from *Sphingomonas* sp. strain 113P3, a novel-type quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase. *Microbiology* **152** (7), 1941–1949.
- Hölscher, T.; Weinert-Sepalage, D.; Görisch, H.** (2007): Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. *Microbiology* **153** (2), 499–506.
- Hommel, R.; Kleber, H. P.** (1990): Selective and rapid solubilization of the microbial membrane enzyme aldehyde dehydrogenase. *Journal of Basic Microbiology* **30** (4), 297–300.

- Hong, H.; Nam, I.; Murugesan, K.; Kim, Y.; Chang, Y.** (2004): Biodegradation of dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, and chlorodibenzo-*p*-dioxins by *Pseudomonas veronii* PH-03. *Biodegradation* **15** (5), 303–313.
- Hopper, D. J.; Kaderbhai, M. A.** (2003): The quinoxaemoprotein lupanine hydroxylase from *Pseudomonas putida*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1647** (1-2), 110–115.
- Hoshino, T.; Sugisawa, T.; Shinjoh, M.; Tomiyama, N.; Miyazaki, T.** (2003): Membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255--enzymatic and genetic characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* **1647** (1-2), 278–288.
- Hothi, P.; Basran, J.; Sutcliffe, M. J.; Scrutton, N. S.** (2003): Effects of multiple ligand binding on kinetic isotope effects in PQQ-dependent methanol dehydrogenase. *Biochemistry* **42** (13), 3966–3978.
- Huang, H.; Liu, Y.; Liu, R.** (2009): *Sphingomonas* sp.: an important microbial resource for biopolymer synthesis. *Acta Microbiologica Sinica* **49** (5), 560–566.
- Inoue, T.; Sunagawa, M.; Mori, A.; Imai, C.; Fukuda, M.; Takagi, M.; Yano, K.** (1989): Cloning and sequencing of the gene encoding the 72-kilodalton dehydrogenase subunit of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *Journal of Bacteriology* **171** (6), 3115–3122.
- Jakupec, M. A.; Unfried, P.; Keppler, B. K.** (2005): Pharmacological properties of cerium compounds. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **153**, 101–111.
- Jia, D.; Li, J.; Liu, L.; Zhang, D.; Yang, Y.; Du, G.; Chen, J.** (2013): High-level expression, purification, and enzymatic characterization of truncated poly(vinyl alcohol) dehydrogenase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97** (3), 1113–1120.
- Johnsen, A. R.; Karlson, U.** (2005): PAH degradation capacity of soil microbial communities--does it depend on PAH exposure? *Microbial Ecology* **50** (4), 488–495.
- Johnsen, A. R.; Karlson, U.** (2007): Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76** (3), S. 533–543.
- Johnston, A. W. B.; Todd, J. D.; Sun, L.; Nikolaidou-Katsaridou, M. N.; Curson, A. R. J.; Rogers, R.** (2008): Molecular diversity of bacterial production of the climate-changing

gas, dimethyl sulphide, a molecule that impinges on local and global symbioses. *Journal of Experimental Botany* **59** (5), 1059–1067.

**Jones, D. T.** (1999): Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology* **292** (2), 195–202.

**Käll, L.; Krogh, A.; Sonnhammer, E. L. L.** (2004): A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of Molecular Biology* **338** (5), 1027–1036.

**Käll, L.; Krogh, A.; Sonnhammer, E. L. L.** (2007): Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server. *Nucleic Acids Research* **35**, 429-32.

**Kallnik, V.; Meyer, M.; Deppenmeier, U.; Schweiger, P.** (2010): Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Biotechnology* **150** (4), 460–465. .

**Kaneko, A.; Miyadai, H.; Danbara, H.; Kawahara, K.** (2000): Construction of mutants of *Sphingomonas paucimobilis* defective in terminal mannose in the glycosphingolipid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64** (6), 1298–1301.

**Kano, K.; Uno, B.; Kawasaki, C.; Horiki, K.; Kawai, S.** (1991): High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Pyrroloquinoline Quinone as Acetone Adduct. *Analytical Science* **7** (5), 737–739.

**Kasahara, T.; Kato, T.** (2003): Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature* **422** (6934), 832.

**Kathuria, S.; Martiny, A. C.** (2011): Prevalence of a calcium-based alkaline phosphatase associated with the marine cyanobacterium *Prochlorococcus* and other ocean bacteria. *Environmental Microbiology* **13** (1), 74–83.

**Keitel, T.; Diehl, A.; Knaute, T.; Stezowski, J. J.; Hohne, W.; Görisch, H.** (2000): X-ray structure of the quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: basis of substrate specificity. *Journal of Molecular Biology* **297** (4), 961–974.

**Keltjens, J. T.; Pol, A.; Reimann, J.; Op den Camp, H. J. M.** (2014): PQQ-dependent methanol dehydrogenases: rare-earth elements make a difference. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98** (14), 6163–6183.



- Khairnar, N. P.; Kamble, V. A.; Mangoli, S. H.; Apte, S. K.; Misra, H. S.** (2007): Involvement of a periplasmic protein kinase in DNA strand break repair and homologous recombination in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **65** (2), 294–304.
- Kimura, K.; Takada, M.; Ishii, T.; Tsuji-Naito, K.; Akagawa, M.** (2012): Pyrroloquinoline quinone stimulates epithelial cell proliferation by activating epidermal growth factor receptor through redox cycling. *Free Radical Biology and Medicine* **53** (6), 1239–1251.
- Kondo, K.; Horinouchi, S.** (1997): Characterization of the genes encoding the three-component membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurianus*. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (3), 1131–1138.
- Kosako, Y.; Yabuuchi, E.; Naka, T.; Fujiwara, N.; Kobayashi, K.** (2000): Proposal of Sphingomonadaceae fam. nov., consisting of *Sphingomonas* Yabuuchi *et al.* 1990, *Erythrobacter* Shiba and Shimidu 1982, *Erythromicrobium* Yurkov *et al.* 1994, *Porphyrobacter* Fuerst *et al.* 1993, *Zymomonas* Kluyver and van Niel 1936, and *Sandaracinobacter* Yurkov *et al.* 1997, with the type genus *Sphingomonas* Yabuuchi *et al.* 1990. *Microbiology and Immunology* **44** (7), 563–575.
- Kovach, M. E.; Elzer, P. H.; Hill, D. S.; Robertson, G. T.; Farris, M. A.; Roop, R. M.; Peterson, K. M.** (1995): Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166** (1), 175–176.
- Kranz, R.; Lill, R.; Goldman, B.; Bonnard, G.; Merchant, S.** (1998): Molecular mechanisms of cytochrome *c* biogenesis: three distinct systems. *Molecular Microbiology* **29** (2), 383–396.
- Krogh, A.; Larsson, B.; Heijne, G. von; Sonnhammer, E. L.** (2001): Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* **305** (3), 567–580.
- Kumazawa, T.; Sato, K.; Seno, H.; Ishii, A.; Suzuki, O.** (1995): Levels of pyrroloquinoline quinone in various foods. *The Biochemical Journal* **307** (2), 331–333.

- Kumazawa, T.; Seno, H.; Urakami, T.; Matsumoto, T.; Suzuki, O.** (1992): Trace levels of pyrroloquinoline quinone in human and rat samples detected by gas chromatography/mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta* **1156** (1), 62–66.
- Kumazawa, T.; Hiwasa, T.; Takiguchi, M.; Suzuki, O.; Sato, K.** (2007): Activation of Ras signaling pathways by pyrroloquinoline quinone in NIH3T3 mouse fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine* **19** (5), 765–770.
- Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259), 680–685.
- Léger, C.; Bertrand P.** (2008): Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanistic studies. *Chemical Reviews* **108** (7), 2379–2438.
- Lei, S. P.; Lin, H. C.; Wang, S. S.; Callaway, J.; Wilcox, G.** (1987): Characterization of the *Erwinia carotovora pelB* gene and its product pectate lyase. *Bacteriology* **169** (9), 4379–4383.
- Lettvin, J. Y.; Pickard, W. F.; McCulloch, W. S.; Pitts, W.** (1964): A theory of passive ion flux through axon membranes. *Nature* **202**, 338–339.
- Liu, S. T.; Lee, L. Y.; Tai, C. Y.; Hung, C. H.; Chang, Y. S.; Wolfram, J. H.; Rogers, R.; Goldstein, A. H.** (1992): Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *Journal of Bacteriology* **174** (18), 5814–5819.
- Loewus, M. W.; Bedgar, D. L.; Saito, K.; Loewus, F. A.** (1990): Conversion of l-Sorbosone to l-Ascorbic Acid by a NADP-Dependent Dehydrogenase in Bean and Spinach Leaf. *Plant Physiology* **94** (3), 1492–1495.
- Maag, H.** (2007): Prodrugs of carboxylic acids. In: Stella VJ, Borchardt RT, Hageman MJ, Reza Oliyai, Maag H, Tilley JW (eds): Prodrugs, V. New York, NY: Springer New York, 703–729.
- Machado, S. S.; Wandel, U.; Jongejan, J. A.; Straathof, A. J. J.; Duine, J. A.** (2014): Characterization of the anantioselective properties of the quinohemoprotein alcohol dehydrogenase of *Acetobacter pasteurianus* LMG 1635. 1. Different anantiomeric ratios of

whole cells and purified enzyme in the kinetic resolution of racemic Glycidol. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **63** (1), 10–20.

**Marchler-Bauer, A.; Anderson, J. B.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M. K.; DeWeese-Scott, C.; Fong, J. H.; Geer L. Y.; Geer R. C.; Gonzales N. R.; Gwadz M.; He S.; Hurwitz D. I.; Jackson J. D.; Ke Z.; Lanczycki C. J.; Liebert C. A.; Liu C.; Lu F.; Lu S.; Marchler G. H.; Mullokandov M.; Song J. S.; Tasneem A.; Thanki N.; Yamashita R. A.; Zhang D.; Zhang N.; Bryant S. H.** (2009): CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research* **37** , 205-10.

**Marchler-Bauer, A.; Bryant, S. H.** (2004): CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research* **32**, 327-31.

**Marchler-Bauer, A.; Derbyshire, M. K.; Gonzales, N. R.; Lu, S.; Chitsaz, F.; Geer, L. Y.; He J.; Gwadz M.; Hurwitz D. I.; Lanczycki C. J.; Lu F.; Marchler G. H.; Song J. S.; Thanki N.; Wang Z.; Yamashita R. A.; Zhang D.; Zheng C.; Bryant S. H.** (2015): CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research* **43** , 222-6.

**Marchler-Bauer, A.; Lu, S.; Anderson, J. B.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M. K.; DeWeese-Scott, C.; Fong J. H.; Geer L. Y.; Geer R. C.; Gonzales N. R.; Gwadz M.; Hurwitz D. I.; Jackson J. D.; Ke Z.; Lanczycki C. J.; Lu F.; Marchler G. H.; Mullokandov M.; Omelchenko M. V.; Robertson C. L.; Song J. S.; Thanki N.; Yamashita R. A.; Zhang D.; Zhang N.; Zheng C.; Bryant S. H.** (2011): CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research* **39** , 225-9.

**Margoliash, E.; Frohwirt, N.** (1959): Spectrum of horse-heart cytochrome c. *Biochemical Journal* **71** (3), 570–572.

**Maruyama, T.; Park, H.; Ozawa, K.; Tanaka, Y.; Sumino, T.; Hamana, K.; Hiraishi, A.; Kato, K.** (2006): *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. nov., sp. nov., a microcystin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56** (1), 5–89.

**Mathews, F. S.** (1985): The structure, function and evolution of cytochromes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **45** (1), 1–56.

**Matsushita, K.; Shinagawa, E.; Adachi, O.; Ameyama, M.** (1989): Quinoprotein D-glucose dehydrogenases in *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79.41: purification and

characterization of the membrane-bound enzyme distinct from the soluble enzyme. *Antonie van Leeuwenhoek* **56** (1), 63–72.

**Matsushita, K.; Toyama, H.; Adachi, O.** (1994): Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **36**, 247–301.

**Matsushita, K.; Toyama, H.; Yamada, M.; Adachi, O.** (2002): Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58** (1), 13–22.

**Matsushita, K.; Yakushi, T.; Takaki, Y.; Toyama, H.; Adachi, O.** (1995): Generation mechanism and purification of an inactive form convertible *in vivo* to the active form of quinoprotein alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter suboxydans*. *Journal of Bacteriology* **177** (22), 6552–6559.

**Matsushita, K.; Yakushi, T.; Toyama, H.; Shinagawa, E.; Adachi, O.** (1996): Function of multiple heme *c* moieties in intramolecular electron transport and ubiquinone reduction in the quinohemoprotein alcohol dehydrogenase-cytochrome *c* complex of *Gluconobacter suboxydans*. *The Journal of Biological Chemistry* **271** (9), 4850–4857.

**McDowell, D. G.; Burns, N. A.; Parkes, H. C.** (1998): Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Research* **26** (14), 340–3347.

**McIntire, W. S.** (1994): Quinoproteins. *FASEB Journal* **8** (8), 513–521.

**McWilliam, H.; Li, W.; Uludag, M.; Squizzato, S.; Park, Y. M.; Buso, N.; Cowley, A. P.; Lopez, R.** (2013): Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* **41**, 597-600.

**Meakin, G. E.; Jepson, B. J. N.; Richardson, D. J.; Bedmar, E. J.; Delgado, M. J.** (2006): The role of *Bradyrhizobium japonicum* nitric oxide reductase in nitric oxide detoxification in soya bean root nodules. *Biochemical Society Transactions* **34** (1), 195–196.

**Meulenbergh, J. J.; Sellink, E.; Riegman, N. H.; Postma, P. W.** (1992): Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* pqq operon. *Molecular and General Genetics* **232** (2), 284–294.

- Meyer, M.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U.** (2013): Effects of membrane-bound glucose dehydrogenase overproduction on the respiratory chain of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97** (8), 3457–3466.
- Miller, J. H.** (1972): Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miller, T. R.; Delcher, A. L.; Salzberg, S. L.; Saunders, E.; Detter, J. C.; Halden, R. U.** (2010): Genome sequence of the dioxin-mineralizing bacterium *Sphingomonas wittichii* RW1. *Journal of Bacteriology* **192** (22), 6101–6102.
- Mitchell, A. E.; Jones, A. D.; Mercer, R. S.; Rucker, R. B.** (1999): Characterization of pyrroloquinoline quinone amino acid derivatives by electrospray ionization mass spectrometry and detection in human milk. *Analytical Biochemistry* **269** (2), 317–325.
- Miyazaki, T.; Sugisawa, T.; Hoshino, T.** (2006): Pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases from *Ketogulonicigenium vulgare* catalyze the direct conversion of L-sorbosone to L-ascorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (2), 1487–1495.
- Miyazaki, T.; Tomiyama, N.; Shinjoh, M.; Hoshino, T.** (2002): Molecular cloning and functional expression of D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IF03255, which requires pyrroloquinoline quinone and hydrophobic protein SldB for activity development in *E. coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **66** (2), 262–270.
- Morris, C. J.; Kim, Y. M.; Perkins, K. E.; Lidstrom, M. E.** (1995): Identification and nucleotide sequences of *mxmA*, *mxuC*, *mxuK*, *mxuL*, and *mxuD* genes from *Methylobacterium extorquens* AM1. *Journal of Bacteriology* **177** (23), 6825–6831.
- Muccio, C.; Guida, V.; Di Petrillo, A.; Severino, V.; Di Maro, A.** (2012): A novel malate dehydrogenase from *Ceratonia siliqua* L. seeds with potential biotechnological applications. *The Protein Journal* **31** (8), 667–673.
- Mukai, K.; Ouchi, A.; Nakano, M.** (2011): Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by Pyrroloquinolinequinol (PQQH(2), a reduced form of Pyrroloquinolinequinone) in micellar solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59** (5), 1705–1712.

- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H.** (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51** (1), 263–273.
- Naito, Y.; Kumazawa, T.; Kino, I.; Suzuki, O.** (1993): Effects of pyrroloquinoline quinone (PQQ) and PQQ-oxazole on DNA synthesis of cultured human fibroblasts. *Life Science* **52** (24), 1909–1915.
- Noji, N.; Nakamura, T.; Kitahata, N.; Taguchi, K.; Kudo, T.; Yoshida, S.; Tsujimoto, M.; Sujiyama, T.; Asami, T.** (2007): Simple and sensitive method for pyrroloquinoline quinone (PQQ) analysis in various foods using liquid chromatography/electrospray-ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55** (18), 7258–7263.
- Nunome, K.; Miyazaki, S.; Nakano, M.; Iguchi-Arigo, S.; Ariga, H.** (2008): Pyrroloquinoline quinone prevents oxidative stress-induced neuronal death probably through changes in oxidative status of DJ-1. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **31** (7), 1321–1326.
- Olsthoorn, A. J.; Duine, J. A.** (1998): On the mechanism and specificity of soluble, quinoprotein glucose dehydrogenase in the oxidation of aldose sugars. *Biochemistry* **37** (39), 13854–13861.
- Olsthoorn, A. J.; Otsuki, T.; Duine, J. A.** (1997):  $\text{Ca}^{2+}$  and its substitutes have two different binding sites and roles in soluble, quinoprotein (pyrroloquinoline-quinone-containing) glucose dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry* **247** (2), 659–665.
- Otani, M.; Umezawa, C.; Sano, K.** (1989): High-performance liquid chromatographic determination of pyrroloquinoline quinone with electrochemical detection and its application to bacterial samples. *Journal of Chromatography A* **483**, 448–453.
- Oubrie, A.; Dijkstra, B. W.** (2000): Structural requirements of pyrroloquinoline quinone dependent enzymatic reactions. *Protein Science* **9** (7), 1265–1273.
- Oubrie, A.; Rozeboom, H. J.; Dijkstra, B. W.** (1999a): Active-site structure of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase complexed with methylhydrazine: a covalent cofactor-inhibitor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** (21), 11787–11791.

- Oubrie, A.; Rozeboom, H. J.; Kalk, K. H.; Duine, J. A.; Dijkstra, B. W.** (1999b): The 1.7 Å crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* reveals a novel internal conserved sequence repeat. *Journal of Molecular Biology* **289** (2), 319–333.
- Oubrie, A.** (2003): Structure and mechanism of soluble glucose dehydrogenase and other PQQ-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1647** (1-2), 143–151.
- Ouchi, A.; Nakano, M.; Nagaoka, S.; Mukai, K.** (2009): Kinetic study of the antioxidant activity of pyrroloquinolinequinol (PQQH(2), a reduced form of pyrroloquinolinequinone) in micellar solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57** (2), 450–456.
- Owens, J. W.; Swanson, S. M.; Birkholz, D. A.** (1994): Environmental monitoring of bleached kraft pulp mill chlorophenolic compounds in a northern Canadian river system. *Chemosphere* **29** (1), 89–109.
- Pallanca, J. E.; Smirnoff, N.** (1999): Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of D-glucosone, L-sorbosone, and L-galactono-1,4-lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiology* **120** (2), 453–462.
- Paz, M. A.; Gallop, P. M.; Torrelío, B. M.; Flückiger, R.** (1988): The amplified detection of free and bound methoxatin (PQQ) with nitroblue tetrazolium redox reactions: insights into the PQQ-locus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **154** (3), 1330–1337.
- Perlman, D.; Halvorson, H. O.** (1983): A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *Journal of Molecular Biology* **167** (2), 391–409.
- Petersen, T. N.; Brunak, S.; Heijne, G.von; Nielsen, H.** (2011): SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* **8** (10), 785–786.
- Pol, A.; Barends, T. R. M.; Dietl, A.; Khadem, A. F.; Eygensteyn, J.; Jetten, M. S. M.; Op den Camp, H. J. M.** (2014): Rare earth metals are essential for methanotrophic life in volcanic mudpots. *Environmental Microbiology* **16** (1), 255–264.
- Prust, C.; Hoffmeister, M.; Liesegang, H.; Wiezer, A.; Fricke, W. F.; Ehrenreich, A.; Gottschalk, G.; Deppenmeier, U.** (2005): Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature Biotechnology* **23** (2), 195–200.

- Rajpurohit, Y. S.; Gopalakrishnan, R.; Misra, H. S.** (2008): Involvement of a protein kinase activity inducer in DNA double strand break repair and radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Journal of Bacteriology* **190** (11), 3948–3954.
- Reichstein, T.; Grüssner, A.** (1934): Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helvetica Chimica Acta* **17** (1), 311–328.
- Reisner, A. H.; Nemes, P.; Bucholtz, C.** (1975): The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **64** (2), 509–516.
- Richardson, I. W.; Anthony, C.** (1992): Characterization of mutant forms of the quinoprotein methanol dehydrogenase lacking an essential calcium ion. *The Biochemical Journal* **287** (3), 709–715.
- Romine, M. F.; Stillwell, L. C.; Wong, K. K.; Thurston, S. J.; Sisk, E. C.; Sensen, C.; Gaasterland, T.; Fredrickson, J. K.; Saffer, J. D.** (1999): Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *Journal of Bacteriology* **181** (5), 1585–1602.
- Saito, Y.; Ishii, Y.; Hayashi, H.; Imao, Y.; Akashi, T.; Yoshikawa, K.; Noguchi, Y.; Soeda, S.; Yoshida, M.; Niwa, M.; Hosada, J.; Shimomura, K.** (1997): Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbose dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-L-gulonate, a precursor of L-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxydans* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (2), 454–460.
- Salusjärvi, T.; Povelainen, M.; Hvorslev, N.; Eneyskaya, E. V.; Kulminskaya, A. A.; Shabalin, K. A.; Neustroev, K. N.; Kalkkinen, N.; Miasnikov, A. N.** (2004): Cloning of a gluconate/polyol dehydrogenase gene from *Gluconobacter suboxydans* IFO 12528, characterisation of the enzyme and its use for the production of 5-ketogluconate in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65** (3), 306–314.
- Sambrook J.; Fritsch E. F.; Maniatis T.** (1989): *Molecular Cloning: Vol 3. A Laboratory Manual: Appendixes*. Second. U.S.A.: CSH Laboratory Press.
- Schmidt, T. G. M.; Skerra, A.** (2007): The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature Protocols* **2** (6), 1528–1535.



- Schrader, J.; Etschmann, M. M. W.; Sell, D.; Hilmer, J. M.; Rabenhorst, J.** (2004): Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds--current industrial processes and future prospects. *Biotechnology Letters* **26** (6), 463–472.
- Shakirova, L.; Auzina, L.; Grube, M.; Zikmanis, P. S.** (2008): Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of bacteria *Zymomonas mobilis* after exposures to ethanol, freezing or freeze-drying. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **35** (10), 1175–1180.
- Shen, L. M.; Lee, J. I.; Cheng, S. Y.; Jutte, H.; Kuhn, A.; Dalbey, R. E.** (1991): Use of site-directed mutagenesis to define the limits of sequence variation tolerated for processing of the M13 procoat protein by the *Escherichia coli* leader peptidase. *Biochemistry* **30** (51), 11775–11781.
- Shen, Y.; Bonnot, F.; Imsand, E. M.; RoseFigura, J. M.; Sjölander, K.; Klinman, J. P.** (2012): Distribution and properties of the genes encoding the biosynthesis of the bacterial cofactor, pyrroloquinoline quinone. *Biochemistry* **51** (11), 2265–2275.
- Shimao, M.; Tamogami, T.; Nishi, K.; Harayama, S.** (1996): Cloning and characterization of the gene encoding pyrroloquinoline quinone-dependent poly(vinyl alcohol) dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain VM15C. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **60** (7), 1056–1062.
- Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O.; Ameyama, M.** (1990): Evidence for electron transfer via ubiquinone between quinoproteins D-glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*. *Journal of Biochemistry* **107** (6), 863–867.
- Shleev, S.; Tkac, J.; Christenson, A.; Ruzgas, T.; Yaropolov, A. I.; Whittaker, J. W.; Lo, G.** (2005): Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* **20** (12), 2517–2554.
- Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G.** (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* **7**, 39.
- Smith, A. R.; Kirchhoff, J. R.; Zhang, Z.; Tillekeratne, L. M.; Hudson, R. A.** (2000): Separation of the enzyme cofactor pyrroloquinoline quinone and three isomeric analogues by

capillary electrophoresis with ion-pairing media. *Journal of Chromatography A* **876** (1-2), 193–199.

**Sockolosky, J. T.; Szoka, F. C.** (2013): Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. *Protein Expression and Purification* **87** (2), 129–135.

**Sonnhammer, E. L.; Heijne, G. von; Krogh, A.** (1998): A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings / ... International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology; ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* **6**, 175–182.

**Southall, S. M.; Doel, J. J.; Richardson, D. J.; Oubrie, A.** (2006): Soluble aldose sugar dehydrogenase from *Escherichia coli*: a highly exposed active site conferring broad substrate specificity. *The Journal of Biological Chemistry* **281** (41), 30650–30659.

**Spiess, A.; Mueller, N.; Ivell, R.** (2004): Trehalose is a potent PCR enhancer: lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of taq polymerase by the disaccharide trehalose. *Clinical Chemistry* **50** (7), 1256–1259.

**Steinberg, F. M.; Gershwin, M. E.; Rucker, R. B.** (1994): Dietary pyrroloquinoline quinone: growth and immune response in BALB/c mice. *The Journal of Nutrition* **124** (5), 744–753.

**Steinberg, F.; Stites, T.E.; Anderson, P.; Storms, D.; Chan, I.; Eghbali, S.; Rucker, R.**(2003): Pyrroloquinoline quinone improves growth and reproductive performance in mice fed chemically defined diets. *Experimental Biology and Medicine* **228** (2), 160–166.

**Stites, T. E.; Mitchell, A. E.; Rucker, R. B.** (2000): Physiological importance of quinoenzymes and the O-quinone family of cofactors. *The Journal of Nutrition* **130** (4), 719–727.

**Stites, T.; Storms, D.; Bauerly, K.; Mah, J.; Harris, C.; Fascetti, A.; Rogers, Q.; Tchapanian, E.; Satre, M.; Rucker, R. B.** (2006): Pyrroloquinoline quinone modulates mitochondrial quantity and function in mice. *The Journal of Nutrition* **136** (2), 390–396.

**Stoorvogel, J.; Kraayveld, D. E.; Van Sluis, C. A.; Jongejan, J. A.; Vries, S. de; Duine, J. A.** (1996): Characterization of the gene encoding quinohaemoprotein ethanol dehydrogenase of *Comamonas testosteroni*. *European Journal of Biochemistry* **235** (3), 690–698.

- Studier, F. W.; Moffatt, B. A.** (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *The Journal of Molecular Biology* **189** (1), 113–130.
- Svitel, J.; Tkáč, J.; V., Igor; N., M.; Stefuca, V.; Bucko, M.; Gemeiner, P.** (2006): *Gluconobacter* in biosensors: applications of whole cells and enzymes isolated from *Gluconobacter* and *Acetobacter* to biosensor construction. *Biotechnology Letters* **28** (24), 2003–2010.
- Swann, R. A.; Foulkes, S. J.; Holmes, B.; Young, J. B.; Mitchell, R. G.; Reeders, S. T.** (1985): "Agrobacterium yellow group" and *Pseudomonas paucimobilis* causing peritonitis in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Journal of Clinical Pathology* **38** (11), 1293–1299.
- Takada, M.; Sumi, M.; Maeda, A.; Watanabe, F.; Kamiya, T.; Ishii, T.; Nakano, M.; Akagawa, M.** (2012): Pyrroloquinoline quinone, a novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor, activates insulin signaling in C2C12 myotubes and improves impaired glucose tolerance in diabetic KK-A(y) mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **428** (2), 315–320.
- Takeda, K.; Ishida, T.; Igarashi, K.; Samejima, M.; Nakamura, N.; Ohno, H.** (2014): Effect of amines as activators on the alcohol-oxidizing activity of pyrroloquinoline quinone-dependent quinoprotein alcohol dehydrogenase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **78** (7), 1195–1198.
- Takeuchi, M.; Hamana, K.; Hiraishi, A.** (2001): Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51** (4), 1405–1417.
- Tamaki, T.; Fukaya, M.; Takemura, H.; Tayama, K.; Okumura, H.; Kawamura, Y.; Nishiyama, M.; Horinouchi, S.; Beppu, T.** (1991): Cloning and sequencing of the gene cluster encoding two subunits of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1088** (2), 292–300.
- Thomas, P. E.; Ryan, D.; Levin, W.** (1976): An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **75** (1), 168–176.

- Thorstenson, Y. R.; Zhang, Y.; Olson, P. S.; Mascarenhas, D.** (1997): Leaderless polypeptides efficiently extracted from whole cells by osmotic shock. *Journal of Bacteriology* **179** (17), 5333–5339.
- Thurner, C.; Vela, C.; Thöny-Meyer, L.; Meile, L.; Teuber, M.** (1997): Biochemical and genetic characterization of the acetaldehyde dehydrogenase complex from *Acetobacter europaeus*. *Archives of Microbiology* **168** (2), 81–91.
- Tkac, J.; Sturdik, E.; Gemeiner, P.** (2000): Novel glucose non-interference biosensor for lactose detection based on galactose oxidase-peroxidase with and without co-immobilised beta-galactosidase. *Analyst* **125** (7), 1285–1289.
- Tkac, J.; Svitel, J.; Vostiar, I.; Navratil, M.; Gemeiner, P.** (2009): Membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter* sp.: interfacial electrochemistry and direct bioelectrocatalysis. *Bioelectrochemistry* **76** (1-2), S. 53–62.
- Tkac, J.; Štefuca, V.; Gemeiner, P.** (2005): Biosensors with immobilised microbial cells using amperometric and thermal detection principles. In: Nedović, V.; Willaert, R. (eds): Applications of Cell Immobilisation Biotechnology, 8B. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 549–566.
- Toyama, H.; Fujii, A.; Matsushita, K.; Shinagawa, E.; Ameyama, M.; Adachi, O.** (1995): Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenases are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. *Journal of Bacteriology* **177** (9), 2442–2450.
- Toyama, H.; Chen, Z.; Fukumoto, M.; Adachi, O.; Matsushita, K.; Mathews, F. S.** (2005): Molecular cloning and structural analysis of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase ADH-IIG from *Pseudomonas putida* HK5. *Journal of Molecular Biology* **352** (1), 91–104.
- Toyama, H.; Mathews, F. S.; Adachi, O.; Matsushita, K.** (2004): Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **428** (1), 10–21.
- Trcek, J.; Matsushita, K.** (2013): A unique enzyme of acetic acid bacteria, PQQ-dependent alcohol dehydrogenase, is also present in *Frateuria aurantia*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97** (16), 7369–7376.

- Urakami, T.; Yashima, K.; Kobayashi, H.; Yoshida, A.; Ito-Yoshida, C.** (1992): Production of pyrroloquinoline quinone by using methanol-utilizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **58** (12), 3970–3976.
- van der Meer, R. A.; Jongejan, J. A.; Duine, J. A.** (1987): Phenylhydrazine as probe for cofactor identification in amine oxidoreductases. Evidence for PQQ as the cofactor in methylamine dehydrogenase. *FEBS Letters* **221** (2), 299–304.
- van der Meer, R. A.; Mulder, A. C.; Jongejan, J. A.; Duine, J. A.** (1989): Determination of PQQ in quinoproteins with covalently bound cofactor and in PQQ-derivatives. *FEBS Letters* **254** (1-2), 99–105.
- Vangnai, A. S.; Arp, D. J.** (2001): An inducible 1-butanol dehydrogenase, a quinohaemoprotein, is involved in the oxidation of butane by "*Pseudomonas butanovora*". *Microbiology* **147** (3), 745–756.
- Vangnai, A. S.; Arp, D. J.; Sayavedra-Soto, L. A.** (2002): Two distinct alcohol dehydrogenases participate in butane metabolism by *Pseudomonas butanovora*. *Journal of Bacteriology* **184** (7), 1916–1924.
- Vasic-Racki D.** (2000) In: Industrial biotransformation. Liese A., Seelbad K., Wandrey C. (eds), Wiley-VCH, Weinheim.
- Vishniac, W.; Santer, M.** (1957): The thiobacilli. *Bacteriological Reviews* **21** (3), 195–213.
- Wang, Y.; Geer, L. Y.; Chappey, C.; Kans, J. A.; Bryant, S. H.** (2000): Cn3D: sequence and structure views for Entrez. *Trends in Biochemical Sciences* **25** (6), 300–302.
- Watanabe, S.; Kodaki, T.; Makino, K.** (2006): A novel alpha-ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase: evolutionary insight into an alternative pathway of bacterial L-arabinose metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **281** (39), 28876–28888.
- Waterhouse, A. M.; Procter, J. B.; Martin, D. M. A.; Clamp, M.; Barton, G. J.** (2009): Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25** (9), 1189–1191.
- Weiss, G. B.** (1974): Cellular Pharmacology of Lanthanum. *Annual Review of Pharmacology* **14** (1), 343–354.

- Wilkes, H.; Wittich, R.; Timmis, K. N.; Fortnagel, P.; Francke, W.** (1996): Degradation of chlorinated Dibenzofurans and Dibenzo-*p*-Dioxins by *Sphingomonas* sp. Strain RW1. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (2), 367–371.
- Wittich, R. M.; Wilkes, H.; Sinnwell, V.; Francke, W.; Fortnagel, P.** (1992): Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Applied and Environmental Microbiology* **58** (3), 1005–1010.
- Wolin M. J.; Wolin, E. A.; Wolfe, R. S.** (1963): ATP-dependent formation of methane from Methylcobalamin by extracts of *Methanobacillus omelianskii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **12**, 464–468.
- Wu, T.; Malinverni, J.; Ruiz, N.; Kim, S.; Silhavy, T. J.; Kahne, D.** (2005): Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* **121** (2), 235–245.
- Xia, Z.; Dai, W.; Zhang, Y.; White, S. A.; Boyd, G. D.; Mathews, F. S.** (1996): Determination of the gene sequence and the three-dimensional structure at 2.4 angstroms resolution of methanol dehydrogenase from *Methylophilus* W3A1. *Journal of Molecular Biology* **259** (3), 480–501.
- Xia, Z. X.; Dai, W. W.; Xiong, J. P.; Hao, Z. P.; Davidson, V. L.; White, S.; Mathews, F. S.** (1992): The three-dimensional structures of methanol dehydrogenase from two methylotrophic bacteria at 2.6-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry* **267** (31), 22289–22297.
- Xiong, M.; Deng, J.; Woodruff, A. P.; Zhu, M.; Zhou, J.; Park, S. W.; Li, H.; Fu, Y.; Zhang, K.** (2012): A bio-catalytic approach to aliphatic ketones. *Scientific Reports* **2**, 311.
- Yabuuchi, E.; Yano, I.; Oyaizu, H.; Hashimoto, Y.; Ezaki, T.; Yamamoto, H.** (1990): Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiology and Immunology* **34** (2), 99–119.
- Yamada, M.; Sumi, K.; Matsushita, K.; Adachi, O.; Yamada, Y.** (1993): Topological analysis of quinoprotein glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* and its ubiquinone-binding site. *The Journal of Biological Chemistry* **268** (17), 12812–12817.

- Yamada, M.; Elias, M. D.; Matsushita, K.; Migita, C. T.; Adachi, O.** (2003): *Escherichia coli* PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase: its structure comparison with other quinoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1647** (1-2), 185–192.
- Yang, X.; Zhong, G.; Lin, J.; Mao, D.; Wei, D.** (2010): Pyrroloquinoline quinone biosynthesis in *Escherichia coli* through expression of the *Gluconobacter oxydans* *pqq*ABCDE gene cluster. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **37** (6), 575–580.
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J.** (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33** (1), 103–119.
- Zarnt, G.; Schrader, T.; Andreesen, J. R.** (2001): Catalytic and molecular properties of the quinohemoprotein tetrahydrofurfuryl alcohol dehydrogenase from *Ralstonia eutropha* strain Bo. *Journal of Bacteriology* **183** (6), 1954–1960.
- Zeiser, J.; Mühlenbeck, L. H.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U.** (2014): Characterization of a periplasmic quinoprotein from *Sphingomonas wittichii* that functions as aldehyde dehydrogenase. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98** (5), 2067–2079.
- Zhang, L.; Liu, J.; Cheng, C.; Yuan, Y.; Yu, B.; Shen, A.; Yan, M.** (2012): The neuroprotective effect of pyrroloquinoline quinone on traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* **29** (5), 51–864.
- Zhang, L.; Miranda-Castro, R.; Stines-Chaumeil, C.; Mano, N.; Xu, G.; Mavré, F.; Limoges, B.** (2014): Heterogeneous reconstitution of the PQQ-dependent glucose dehydrogenase immobilized on an electrode: a sensitive strategy for PQQ detection down to picomolar levels. *Analytical Chemistry* **86** (4), 2257–2267.
- Zhang, P.; Xu, Y.; Li, L.; Jiang, Q.; Wang, M.; Jin, L.** (2009): *In vitro* protective effects of pyrroloquinoline quinone on methylmercury-induced neurotoxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **27** (1), 103–110.
- Zhang, Q.; Ding, M.; Cao, Z.; Zhang, J.; Ding, F.; Ke, K.** (2013): Pyrroloquinoline quinone protects rat brain cortex against acute glutamate-induced neurotoxicity. *Neurochemical Research* **38** (8), 1661–1671.

**Zhang, Y.; Feustel, P. J.; Kimelberg, H. K.** (2006): Neuroprotection by pyrroloquinoline quinone (PQQ) in reversible middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Brain Research* **1094** (1), 200–206.

**Zheng, Y. J.; Bruice, T. C.** (1997): Conformation of coenzyme pyrroloquinoline quinone and role of  $\text{Ca}^{2+}$  in the catalytic mechanism of quinoprotein methanol dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** (22), 11881–11886.



## 7. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Deppenmeier für die Vergabe des interessanten Themas und die Betreuung während der letzten drei Jahre bedanken.

Ebenso vielen Dank an apl Prof. Dr. Christiane Dahl für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großer Dank geht natürlich an die aktuellen und auch ehemaligen Mitglieder der AG Deppenmeier, die mich immer unterstützt und die Zeit, die ich hier im Institut zubringen durfte zu etwas Besonderem gemacht haben. An erster Stelle ist hier unser aller Ruhepol Dipl.-Biol. Elisabeth Schwab zu nennen, ohne die längst nicht alles so reibungslos verlaufen würde. Mein ganz herzlicher Dank geht natürlich an die Kolleginnen und den Kollegen aus dem „Swox“-Labor. Dr. Maria Meyer, M. Sc. Anna Siemen und M. Sc. Konrad Kosciowski war's mit aich ☺!

Nicht zu vergessen sind auch die lieben Kolleginnen aus dem „Schlamm“-Labor, auch wenn ihr oft meine Nase beleidigt habt, vielen lieben Dank, dass ihr dagewesen seid: Dr. Steffie Berger, Dipl.-Biol. Sarah Refai, M. Sc. Lena Kröniger, M. Sc. Nageena Zahid.

Und auch einen ganz lieben Dank an all unsere ehemaligen Doktoren, die meinen Weg unterschiedlich lange begleitet haben. Allen voran Dr. Cornelia Welte und Dr. Christian Krätzer. Weiterhin Dr. Verena Kallnik, Dr. Kati Waßmann und Dr. Paul Schweiger.

Der gesamte AG Dahl danke ich für viele Jahre gemeinsame Kaffeepause und die ein oder andere Adoption.

Weiterhin möchte ich Tobias Koch (AG Dahl) für die Bereitstellung von *Hyphomicrobium denitrificans* X und Dr. Marc Sylvester (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) für die Durchführung der Massenspektrometrie danken.

Last but not least danke ich den gegenwärtigen und vergangenen Mitarbeitern des Ifmb mit denen ich das Vergnügen hatte zusammenzuarbeiten. Euch verdanke ich eine wundervolle Arbeitsatmosphäre und etliche lustige Erinnerungen an gemeinsame Stammtische.

## 8. Publikationsliste

### Veröffentlichungen

**Schweiger, P., Gross, H., Zeiser, J., Deppenmeier, U.** (2013) Asymmetric reduction of diketones by two *Gluconobacter oxydans* oxidoreductases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (8), 3475-3484

**Zeiser, J., Mühlenbeck, L. H., Schweiger, P., Deppenmeier, U.** (2014) Characterization of a periplasmic quinoprotein from *Sphingomonas wittichii* that functions as aldehyde dehydrogenase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (5), 2067-2079

### Konferenzbeiträge

**Zeiser, J., Mühlenbeck, L. H., Deppenmeier, U.** (2013) Characterization of a novel PQQ-dependent aldehyde-dehydrogenase from *Sphingomonas wittichii* RW1. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 2013 in Bremen