

**Untersuchungen zur Erweiterung
des Substratspektrums von
*Gluconobacter oxydans***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Konrad Kosciow

aus

Köln

Bonn 2017

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier

2. Gutachterin: PD Dr. Christiane Dahl

Tag der Promotion: 15.12.2017

Erscheinungsjahr: 2018

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Kosciow, K.; Zahid, N.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2014): Production of a periplasmic trehalase in *Gluconobacter oxydans* and growth on trehalose. *Journal of Biotechnology* 189, S. 27-35.

Kosciow, K.; Domin, C.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2016): Extracellular targeting of an active endoxylanase by a TolB negative mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 43 (7), 989-999.

Büchs, J.; Deppenmeier, U.; Bott, M.; Kiefler, I.; Kosciow, K.; Herweg, E.; Siemen, A. (2017): Methods of producing 5-ketofructose. *Europäisches Patentregister* (EP17175730.5).

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| Abkürzungsverzeichnis | VIII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Essigsäurebakterium <i>Gluconobacter oxydans</i> und seine physiologischen Eigenschaften | 1 |
| 1.2 Biotechnologische und industrielle Anwendungen von <i>G. oxydans</i> | 2 |
| 1.3 Stammoptimierungen von <i>G. oxydans</i> | 3 |
| 1.4 Problematik und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit | 5 |
| 2 Material und Methoden | 8 |
| 2.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme | 8 |
| 2.1.1 Antibiotika und Zusätze | 8 |
| 2.1.2 Kits | 8 |
| 2.1.3 Marker für DNA- und Protein-Gel-Elektrophorese | 9 |
| 2.1.4 Software und Programme | 9 |
| 2.2 Mikrobiologische Methoden | 10 |
| 2.2.1 Organismen, Medien und Kulturbedingungen | 10 |
| 2.2.1.1 Organismen | 10 |
| 2.2.1.2 Medien und Anzuchtbedingungen | 11 |
| 2.2.2 Stammerhaltung | 12 |
| 2.2.3 Bestimmung von Wachstum und Wachstumsparametern | 13 |
| 2.2.3.1 Messung der optischen Dichte | 13 |
| 2.2.3.2 Bestimmung der Wachstumsrate μ und der Verdopplungszeit t_d | 13 |
| 2.3 Molekularbiologische Methoden | 13 |
| 2.3.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA | 13 |
| 2.3.2 Vektoren und Oligonukleotide | 14 |
| 2.3.2.1 Vektoren | 14 |
| 2.3.2.2 Oligonukleotide | 17 |
| 2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 20 |
| 2.3.3.1 PCR für die Gen-Amplifizierung | 21 |
| 2.3.3.2 Kolonie-PCR | 21 |
| 2.3.3.3 Quantitative RT-PCR | 22 |
| 2.3.4 Agarosegelelektrophorese | 23 |
| 2.3.5 Restriktionsverdau | 24 |
| 2.3.6 Ligation | 24 |
| 2.3.7 Sequenzierung | 25 |
| 2.3.8 Transformation in <i>E. coli</i> DH5 α mittels Hitzeschock | 25 |
| 2.3.9 Transformation in <i>G. oxydans</i> mittels Elektroporation | 26 |
| 2.3.10 Triparentale Konjugation | 26 |
| 2.4 Proteinbiochemische Methoden | 27 |
| 2.4.1 Produktion und Reinigung von Proteinen | 27 |
| 2.4.1.1 Heterologe Produktion von Proteinen in <i>G. oxydans</i> und <i>E. coli</i> | 27 |
| 2.4.1.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall | 27 |
| 2.4.1.3 Zellfraktionierung | 27 |
| 2.4.1.4 Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie | 28 |
| 2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung | 28 |
| 2.4.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford | 28 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.4.2.2 | Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test..... | 29 |
| 2.4.3 | Visualisierung von Proteinen..... | 29 |
| 2.4.3.1 | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 29 |
| 2.4.3.2 | Silberfärbung..... | 30 |
| 2.4.3.3 | Westernblot..... | 31 |
| 2.4.3.4 | Gelfiltration mittels FPLC (fast protein liquid chromatography)..... | 32 |
| 2.4.4 | Nachweis von Enzymaktivitäten..... | 33 |
| 2.4.4.1 | DNSA-Test zur quantitativen Bestimmung reduzierender Zucker..... | 33 |
| 2.4.4.2 | HPLC: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie..... | 34 |
| 2.4.4.3 | Berechnung von Enzymaktivitäten..... | 34 |
| 2.4.4.4 | Enzymatische Reinheitskontrolle nach Zellfraktionierung..... | 35 |
| 2.4.4.5 | Enzymatischer Nachweis von 2-Ketoglukonat..... | 35 |
| 2.4.4.6 | Enzymatischer Nachweis von alkalischer Phosphatase..... | 36 |
| 2.4.4.7 | Enzymatischer Nachweis von Endoxylanasen und Endoglukanasen..... | 37 |
| 3 | Ergebnisse..... | 38 |
| 3.1 | Entwicklung eines geeigneten Expressionssystems für die effiziente Produktion periplasmatischer Hydrolasen..... | 38 |
| 3.2 | Erweiterung des Substratspektrums von <i>G. oxydans</i> um das Modelldisaccharid Trehalose..... | 43 |
| 3.2.1 | Die Wahl einer geeigneten Trehalase..... | 43 |
| 3.2.2 | Konstruktion eines <i>treA</i> -beinhaltenden Expressionssystems..... | 44 |
| 3.2.3 | Lokalisation der heterolog produzierten Trehalase in <i>G. oxydans</i> pBBR1p264-SP <i>pelB-treA</i> | 46 |
| 3.2.4 | <i>In vitro</i> – Aktivitätstest der periplasmatischen Trehalase TreA, produziert von <i>G. oxydans</i> pBBR1p264-SP <i>pelB-treA</i> | 48 |
| 3.2.5 | Wachstumsverhalten einer <i>treA</i> exprimierenden Mutante von <i>G. oxydans</i> | 49 |
| 3.2.6 | Analyse des Produktspektrums bei einem Wachstum von <i>G. oxydans</i> pBBR1p264-SP <i>pelB-treA</i> mit Trehalose als Kohlenstoffquelle..... | 51 |
| 3.3 | Erstellung einer Deletionsmutante von <i>G. oxydans</i> für die effiziente Produktion von Exoenzymen..... | 52 |
| 3.3.1 | Entwicklung einer geeigneten Strategie basierend auf bioinformatischen Analysen.. | 53 |
| 3.3.2 | Konstruktion der Mutante <i>G. oxydans</i> Δ <i>tolB</i> | 54 |
| 3.3.3 | Phänotypische Charakterisierung von <i>G. oxydans</i> Δ <i>tolB</i> | 57 |
| 3.3.4 | Nachweis der Sekretion einer periplasmatischen Ribonuklease durch <i>G. oxydans</i> Δ <i>tolB</i> | 59 |
| 3.3.5 | Nachweis der Sekretion des heterolog produzierten Reporterenzym PhoA durch <i>G. oxydans</i> Δ <i>tolB</i> | 61 |
| 3.4 | Erweiterung des Substratspektrums von <i>G. oxydans</i> um das nachhaltige Disaccharid Saccharose..... | 63 |
| 3.4.1 | Identifikation einer geeigneten Sucrase..... | 63 |
| 3.4.2 | Konstruktion eines <i>sacC</i> -beinhaltenden Expressionssystems..... | 64 |
| 3.4.3 | <i>In vitro</i> -Analyse der mit <i>G. oxydans</i> heterolog produzierten und aufgereinigten Sucrase SacC..... | 66 |
| 3.4.4 | Wachstumsverhalten einer Sucrase-produzierenden Mutante von <i>G. oxydans</i> | 68 |
| 3.5 | Erweiterung des Substratspektrums von <i>G. oxydans</i> um das erste Polysaccharid: Xylan..... | 71 |
| 3.5.1 | Auswahl geeigneter Xylan-spaltender Enzyme..... | 71 |
| 3.5.2 | Klonierungsstrategie von <i>cex</i> , <i>xylI</i> und <i>xynA</i> | 72 |
| 3.5.3 | Nachweis der heterologen Expression, Produktion und Translokation der Endoxylanasen in <i>G. oxydans</i> und <i>G. oxydans</i> Δ <i>tolB</i> | 73 |
| 3.5.4 | Hydrolyse von Xylan durch intakte Zellen von <i>G. oxydans</i> Δ <i>tolB</i> <i>xynA</i> | 76 |
| 3.5.5 | Klonierungsstrategie von <i>xynB</i> und <i>xsa</i> | 77 |
| 3.5.6 | Produktion der beiden Xylosidasen in <i>G. oxydans</i> | 78 |
| 3.5.7 | Nachweis der XynB-Aktivität an intakten Zellen..... | 80 |
| 3.5.8 | Klonierungsstrategie eines Expressionssystems für die simultane Produktion von XynA und XynB in <i>G. oxydans</i> | 81 |
| 3.5.9 | Nachweis der Lokalisation der Aktivität von XynB und XynA in <i>G. oxydans</i> Δ <i>tolB</i> p264 <i>xynBA</i> | 83 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.6 | Erweiterung des Substratspektrums von <i>G. oxydans</i> um das zweite Polysaccharid: Cellulose | 84 |
| 3.6.1 | Die Wahl verschiedener prokaryotischer Cellulose-spaltender Enzyme | 85 |
| 3.6.2 | Klonierungsstrategie von <i>bglX</i> und <i>bglB</i> sowie <i>boGH3A</i> und <i>boGH3B</i> | 85 |
| 3.6.3 | Nachweis einer erfolgreichen heterologen Produktion der β -Glukosidasen in <i>G. oxydans</i> | 87 |
| 3.6.4 | Klonierungsstrategie von <i>celY</i> , <i>eglS</i> und <i>cbhA</i> | 90 |
| 3.6.5 | Nachweis der Aktivität sowie Lokalisierung der heterolog produzierten Cellulasen <i>CelY</i> , <i>EglS</i> und <i>CbhA</i> | 91 |
| 3.7 | Erweiterung des Substratspektrums von <i>G. oxydans</i> um das kostengünstige Disaccharid Laktose | 93 |
| 3.7.1 | Klonierungsstrategie von <i>boGH2A</i> , <i>amuc_0771</i> , <i>amuc_0824</i> und <i>amuc_1686</i> | 94 |
| 3.7.2 | Aktivitätsnachweis der β -Galaktosidase <i>BoGH2A</i> | 95 |
| 3.7.3 | Lokalisation der <i>A. muciniphila</i> -stämmigen putativen β -Galaktosidasen in <i>G. oxydans</i> | 97 |
| 3.8 | Charakterisierung von vier neuartigen putativen Galaktosidasen des Darmbakteriums <i>Akkermansia muciniphila</i> | 100 |
| 3.8.1 | Der Organismus <i>A. muciniphila</i> | 100 |
| 3.8.1.1 | Das Vorhandensein periplasmatischer oder sekretierter β -Galaktosidasen in <i>A. muciniphila</i> | 101 |
| 3.8.2 | Das Enzym <i>Amuc_1686</i> | 103 |
| 3.8.2.1 | Bioinformatische Analyse | 103 |
| 3.8.2.2 | Klonierung, Produktion und Aufreinigung von <i>Amuc_1686</i> | 105 |
| 3.8.2.3 | Proteinbiochemische Eigenschaften und Enzymkinetiken | 107 |
| 3.8.2.4 | Bioinformatische Charakterisierung der C-terminalen Region von <i>Amuc_1686</i> .. | 110 |
| 3.8.2.5 | Die Konstruktion einer Variante von <i>Amuc_1686</i> ohne C-terminale Discoidin- Domäne und der Einfluss verschiedener Phospholipide auf die Enzymaktivität von <i>Amuc_1686</i> | 113 |
| 3.8.3 | Charakterisierung der Enzyme <i>Amuc_0771</i> , <i>Amuc_0824</i> und <i>Amuc_1666</i> | 116 |
| 3.8.3.1 | Bioinformatische Analyse der Enzyme | 116 |
| 3.8.3.2 | Klonierungsstrategie für die Produktion von <i>Amuc_0771</i> , <i>Amuc_0824</i> und <i>Amuc_1666</i> sowie Visualisierung der Proteine | 119 |
| 3.8.3.3 | Charakterisierung der kinetischen Parameter von <i>Amuc_0771</i> | 121 |
| 3.8.3.4 | Charakterisierung der kinetischen Parameter von <i>Amuc_1666</i> | 123 |
| 3.8.3.5 | Charakterisierung der kinetischen Parameter von <i>Amuc_0824</i> | 126 |
| 3.8.3.6 | Bioinformatische Analyse der C-terminalen Region von <i>Amuc_0824</i> und <i>Amuc_1666</i> im Vergleich zu <i>Amuc_1686</i> | 129 |
| 4 | Diskussion | 130 |
| 4.1 | Entwicklung eines Expressionssystems für die Produktion periplasmatischer Hydrolasen | 130 |
| 4.1.1 | Strategien zur Erweiterung des Substratspektrums | 130 |
| 4.1.2 | Signalsequenzen als Vermittler bakterieller Proteintranslokation | 132 |
| 4.1.3 | Geeignete Signalsequenzen für die Translokation heterolog produzierter Proteine in <i>G. oxydans</i> | 134 |
| 4.2 | Erweiterung der nutzbaren Substrate um das Modelldisaccharid Trehalose | 137 |
| 4.2.1 | Die periplasmatische Trehalase <i>TreA</i> und ihr cytoplasmatisches Pendant <i>TreF</i> | 137 |
| 4.2.2 | Expression, Produktion und Translokation von <i>TreA</i> in <i>G. oxydans</i> | 138 |
| 4.2.3 | Produktanalyse bei einem Wachstum von <i>G. oxydans treA</i> mit Trehalose als C-Quelle | 139 |
| 4.3 | Strategie für die Produktion sekretierter Hydrolasen in <i>G. oxydans</i> | 142 |
| 4.3.1 | Natürliche Sekretionswege in Gram-negativen Bakterien | 142 |
| 4.3.2 | Die Wahl einer geeigneten Strategie zur Überbrückung der äußeren Membran in <i>G. oxydans</i> | 144 |
| 4.3.3 | Phänotypische Untersuchung der Mutante <i>G. oxydans $\Delta tolB$</i> | 146 |
| 4.4 | Saccharose, Raffinose und Laktose als Wachstumssubstrate für <i>G. oxydans</i> | 148 |
| 4.4.1 | Die Verwertung von Saccharose durch den Wildtyp <i>G. oxydans</i> 621H | 148 |
| 4.4.2 | Die Erweiterung des Substratspektrums um Saccharose und Raffinose | 149 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.4.3 | Laktose als potentielles Substrat für <i>G. oxydans</i> | 153 |
| 4.5 | Erweiterung des Substratspektrums von <i>G. oxydans</i> um Polysaccharide | 156 |
| 4.5.1 | Die Endohydrolyse des Polysaccharids Xylan durch <i>G. oxydans</i> | 157 |
| 4.5.2 | Die Produktion einer β -Xylosidase als zweiter Schritt auf dem Weg zur vollständigen Xylan-Hydrolyse durch <i>G. oxydans</i> | 160 |
| 4.5.3 | Die simultane Produktion von XynA und XynB in einem Ein-Stamm-System | 161 |
| 4.5.4 | Die heterologe Produktion aktiver cellulolytischer Enzyme in <i>G. oxydans</i> im Hinblick auf die Nutzbarkeit von Cellulose..... | 163 |
| 4.6 | Die Charakterisierung von Amuc_0771, Amuc_0824, Amuc_1666 und Amuc_1686 aus <i>Akkermansia muciniphila</i> | 167 |
| 4.6.1 | Das Mucin-spaltende Darmbakterium <i>Akkermansia muciniphila</i> | 167 |
| 4.6.2 | Biochemische Eigenschaften der β -Galaktosidase Amuc_1686 | 169 |
| 4.6.3 | Bioinformatische Einordnung des Enzyms Amuc_1686 | 171 |
| 4.6.4 | Die außergewöhnliche C-terminale Domäne von Amuc_1686 | 171 |
| 4.6.5 | Die Discoidin-Domäne von Amuc_1686: Möglicherweise ein Hinweis auf die mutualistische Beziehung zwischen Wirt und Bakterium? | 173 |
| 4.6.6 | Charakterisierung der drei weiteren β -Galaktosidasen Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1666 | 175 |
| 5 | Zusammenfassung | 181 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 181 |
| 7 | Danksagung | 206 |
| 8 | Publikationsliste | 208 |
| 9 | Eidesstattliche Erklärung..... | 209 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCIP | 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| Cef | Cefoxitin |
| CMC | Carboxymethylcellulose |
| dH ₂ O | demineralisiertes Wasser |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| <i>et al.</i> | <i>et alii/et aliae</i> (und andere) |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| HABA | 2-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| Kan | Kanamycin |
| kb | Kilo-Basenpaare |
| KbE | Kolonie-bildende Einheit |
| kDa | Kilo-Dalton |
| KEGG | Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes |
| K _M | Michaelis-Konstante |
| l | Liter |
| LB | Lysogeny Broth |
| M | molar [mol l ⁻¹] |
| Mb | Mega-Basenpaare |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------|---|
| mDH | membrangebundene Dehydrogenase |
| min | Minute |
| NAD | Nikotinamidadenindinukleotid |
| NADP | Nikotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NawaRo | Nachwachsende Rohstoffe |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| OD _{600nm} | optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm |
| ORF | offener Leserahmen |
| PA | Phosphatidylsäure |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PE | Phosphatidylethanolamin |
| PG | Phosphatidylglycerol |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| PS | Phosphatidyserin |
| RBB | Remazol-Brilliant-Blau |
| RI | Brechungsindex |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sp. | Spezies |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan |
| U | Unit |
| UV | ultraviolett |
| V _{max} | maximale Reaktionsgeschwindigkeit |
| (v/v) | Volumen pro Volumen |
| (w/v) | Gewicht pro Volumen |
| YC | Hefe-Cellobiose |
| YG | Hefe-Glukose |
| YM | Hefe-Mannitol |
| YL | Hefe-Laktose |
| YR | Hefe-Raffinose |
| YS | Hefe-Saccharose |

1 Einleitung

1.1 Das Essigsäurebakterium *Gluconobacter oxydans* und seine physiologischen Eigenschaften

Bei *Gluconobacter (G.) oxydans* handelt es sich um ein Gram-negatives stäbchenförmiges Bakterium (Abb.1) aus der Familie der Acetobacteriaceae und somit um einen Vertreter der α -Proteobakterien. Dieser Organismus wächst unter aeroben Bedingungen und ist an hohe Zuckerkonzentrationen (Sievers und Swings 2005) und niedrige pH-Werte (Deppenmeier *et al.* 2002) adaptiert. Dabei handelt es sich um eine ideale Anpassung an sein natürliches Habitat, die Oberflächen von Blüten und Früchten (Gupta *et al.* 2001).

Physiologisch zeichnet sich die Gattung *Gluconobacter* durch die Fähigkeit aus, eine Vielzahl von Alkoholen, Zuckern und Zuckerverbindungen unvollständig zu oxidieren. Dabei entstehen vor allem Aldehyde, Ketone und organische Säuren, die nahezu vollständig in das umgebende Medium abgegeben werden (De Ley *et al.* 1984). Diese Reaktionen werden hauptsächlich von in die Atmungskette eingebundenen Dehydrogenasen katalysiert (Deppenmeier *et al.* 2002). So besitzt *G. oxydans* beispielsweise für die Verwertung des Monosaccharids Glukose die Fähigkeit, dieses entweder cytoplasmatisch durch den Pentosephosphatweg (Sievers und Swings 2005) beziehungsweise den Entner-Doudoroff-Weg (Entner und Doudoroff 1952; Kersters und Ley 1968) zu verstoffwechseln oder im Periplasma schrittweise zu Glukonat und weiter zu 2- und 5-Ketoglukonat zu oxidieren. *In vivo* stellt die periplasmatische Oxidation den bevorzugten Stoffwechselweg dar (Deppenmeier *et al.* 2002). Das zentrale Enzym dieser Oxidationsreaktion wird dabei durch *gox0265* kodiert. Bei diesem Protein handelt es sich um eine membrangebundene Pyrrolochinolinchinon (PQQ)-abhängige Glukosedehydrogenase (Matsushita *et al.* 1994). Eine Vielzahl weiterer membrangebundener Enzyme mit teilweise noch unbekanntem Substratspektrum ermöglichen *G. oxydans* die schrittweise stereospezifische und regiospezifische Oxidation weiterer Zucker und Zuckeralkohole im Periplasma. Da der Organismus die Substrate nicht vollständig zu Wasser und Kohlenstoffdioxid oxidiert, verwendet man hier den Begriff der unvollständigen Oxidation (De Ley *et al.* 1984). Weiterhin fehlen *G. oxydans* die zentralen Stoffwechsellzyme Succinatdehydrogenase und Succinyl-CoA-Synthetase, weshalb auch der Tricarbonsäurezyklus unvollständig vorliegt (Prust *et al.* 2005; Richhardt *et al.* 2013).

Durch die vollständige Sequenzierung des Genoms von *G. oxydans* 621H (Prust *et al.* 2005) wurden tiefere Einblicke in den komplexen Metabolismus sowie das Verständnis der vielfältigen Stoffwechselwege ermöglicht. Zusätzlich erleichterte die Genomsequenz die Suche nach Sequenzen, die biotechnologisch und industriell interessante Enzyme kodieren. *G. oxydans* 621H besitzt ein Chromosom mit einer Größe von 2.702.173 bp bei einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 60,8 %. Zusätzlich wurden fünf Plasmide pGOX1-5 (163,3 kb, 26,6 kb, 14,6 kb, 13,2 kb, 2,7 kb) identifiziert (Prust *et al.* 2005). Mithilfe dieser Sequenzdaten konnte insgesamt eine Anzahl von 2664 möglichen

Protein-kodierenden offenen Leserahmen (ORFs) gefunden werden, wobei wiederum 341 der ORFs vermutlich ausschließlich in *G. oxydans* vorkommen (Prust *et al.* 2005).

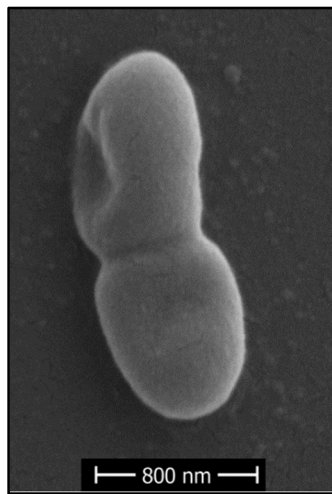


Abbildung 1: Elektronenrastermikroskopische Aufnahme von *Gluconobacter oxydans*. Erstellt mit freundlicher Unterstützung von H. J. Ensikat, NEES-Institut für Biodiversität der Pflanzen, Universität Bonn, Deutschland.

1.2 Biotechnologische und industrielle Anwendungen von *G. oxydans*

Die schnelle periplasmatische Oxidation verschiedenster Substrate und die Vielzahl teils noch uncharakterisierter Oxidoreduktasen machen *G. oxydans* zu einem biotechnologisch äußerst interessanten Organismus. Die natürliche Anreicherung der korrespondierenden Produkte im Medium und die Anpassung an verschiedene Umweltfaktoren, wie hohe Zuckerkonzentrationen und niedrige pH-Werte, spielen aus industrieller Sicht eine entscheidende Rolle. *G. oxydans* wird für die Herstellung von geschmacksgebenden Zusätzen (Rabenhorst *et al.* 2001) und Lebensmitteln (z.B. Bionade® und Kombucha) genutzt. Auch für die Produktion von 6-Amino-L-Sorbose für die Synthese des Antidiabetikums Miglitol (Schedel, 2000) und die Produktion von L-Sorbose als Vorstufe von Vitamin C (Reichstein und Grüssner, 1934; Hancock, 2009) wird der Organismus eingesetzt.

Eine weitere Anwendung von *Gluconobacter sp.* ist die Produktion des Bräunungsmittels Dihydroxyaceton aus Glycerin (Holst *et al.* 1982; Hekmat *et al.* 2003; Zhou *et al.* 2016) sowie die Umsetzung von Glukose zu Glukonsäure im industriellen Maßstab (De Muynck *et al.* 2007; Deppenmeier *et al.* 2002). Glukonat, das Anion der Glukonsäure, gehört weltweit zu den wichtigsten chemischen Verbindungen, die als Basis für verschiedene Medikamente dienen. Glukonat chelatiert eine Vielzahl von Kationen, wobei die dabei entstehenden Salze Anwendungen in unterschiedlichsten, oft pharmazeutischen, Bereichen finden.

So wird Glukonat in Form von Chlorhexidindiglukonat z.B. in der Zahnmedizin eingesetzt, da auf diese Weise die Wasserlöslichkeit des Antiseptikums Chlorhexidin deutlich erhöht wird (Løe und Schiøtt, 1970). Ebenfalls für die Erhöhung der Wasserlöslichkeit des eigentlichen Wirkstoffs findet Glukonat

Verwendung als intravenöses Malariatherapeutikum Chininglukonat (Miller *et al.* 1989). Weitere Beispiele dieser Art sind Eisenglukonat für die Behandlung von Anämie (Reznikoff und Goebel, 1937), Kalziumglukonat zur Behandlung von Verätzungen durch Fluorwasserstoffsäure und daraus resultierenden schlecht heilenden Nekrosen (Thomas *et al.* 2009), sowie Zinkglukonat zur Behandlung von Durchfall-bedingter Dehydration (Bhandari *et al.* 2002). Unter geeigneten physiologischen Bedingungen oxidiert *G. oxydans* die aus der Glukose-Oxidation entstandene Glukonsäure periplasmatisch weiter zu den Feinchemikalien 2- und 5-Ketoglukonat (Olijve und Kok 1979b; Weenk *et al.* 1984). Diese finden unter anderem Verwendung als Entwicklersubstanzen, Stabilisatoren und milde Antioxidantien in technischen, pharmazeutischen und lebensmitteltechnischen Bereichen (Pfeifer *et al.* 1958).

Die biologische Synthese durch *G. oxydans* hat gegenüber der chemischen Synthese neben den geringen Produktionskosten auch den großen Vorteil, dass aufgrund der Stereoselektivität der eingesetzten Enzyme eine hohe Reinheit bezogen auf die Stereokonfiguration der Produkte gewährleistet werden kann. Eine kostspielige und aufwändige Reinigung der Produkte ist somit nicht notwendig. In den letzten Jahren kamen viele weitere Anwendungsgebiete von *G. oxydans* hinzu, darunter die Verwendung von einzelnen Enzymen, aufgereinigten Membranen oder ganzen Zellen als sensorische Systeme für die Detektion von Zuckern, Alkoholen und Polyolen (Macauley *et al.* 2001; Bertóková *et al.* 2015; Schenk Mayerová *et al.* 2015), die bioelektrokatalytische Oxidation von Ethanol (Reshetilov *et al.* 2015) sowie die Hochleistungsbiokatalyse von Xylose zu Xylonsäure (Zhou *et al.* 2015a).

1.3 Stammoptimierungen von *G. oxydans*

Aufgrund der hochinteressanten physiologischen Eigenschaften und der vielfältigen biotechnologischen und industriellen Anwendungen steht *G. oxydans* im Fokus vieler molekularbiologischer Arbeiten aus dem Bereich der metabolischen Stammoptimierung. Durch die vollständige Sequenzierung des Genoms von *G. oxydans* 621H (Prust *et al.* 2005) wurden nicht nur vertiefte Einblicke in den Stoffwechsel und die enzymatische Ausstattung gewährt, sondern auch eine Optimierung des Stamms auf genetischer Ebene ermöglicht. Einer der ersten wichtigen Schritte für die gentechnische Zugänglichkeit und Charakterisierung putativer Proteine war die Entwicklung eines homologen Expressionssystems basierend auf dem Klonierungsvektor pBBR1MCS-2, welcher sich unter anderem durch eine geringe Größe, ein breites Wirtsspektrum und eine erweiterte multiple Klonierungsstelle auszeichnet (Kovach *et al.* 1994; Kovach *et al.* 1995). Durch Insertion der Promotorregionen der Gene *gox0452*, *gox0384* oder *gox0264*, die in *G. oxydans* die ribosomalen Proteine L13, S12 und L35 kodieren, wurden drei geeignete Expressionssysteme konstruiert. Diese eignen sich sowohl für die heterologe als auch homologe Überexpression von Genen und die Produktion der korrespondierenden Proteine in *G. oxydans* (Kallnik *et al.* 2010). Es handelt sich hierbei um konstitutive Promotoren unterschiedlicher Stärke, sodass je nach Notwendigkeit die Expressionsrate gezielt durch Wahl des geeignetsten Promotors reguliert werden kann. Zum Beispiel wurde mithilfe dieses Systems durch homologe Überexpression einer vorhandenen membrangebundenen Dehydrogenase, Gox0265, die

periplasmatische Umsetzung von Glukose zu Glukonsäure um ein Vielfaches gesteigert (Meyer *et al.* 2013). Zudem wurde die Charakterisierung neuartiger periplasmatischer Dehydrogenasen ermöglicht (Zeiser *et al.* 2014). Ein völlig anderes Ziel der Stammoptimierung, für das der Vektor pBBR1p384 als Expressionssystem diente, war das Erreichen hoher Zelldichten für eine gesteigerte Produktausbeute. Dies sollte durch die heterologe Expression der Succinyl-CoA-Synthetase und des Succinatdehydrogenase-Komplexes erfolgen, wodurch der Tricarbonsäurezyklus in *G. oxydans* geschlossen und so eine vollständige Oxidation von Pyruvat ermöglicht werden sollte. Der Anteil an cytoplasmatischer Oxidation gegenüber der unvollständigen Substratoxidation im Periplasma ließe sich dadurch deutlich erhöhen, was zu einer gesteigerten Zellausbeute führen würde (Richhardt *et al.* 2012; Kiefler *et al.* 2015).

Die Konstruktion der ersten Deletionsmutanten von *G. oxydans* erfolgte mittels Insertion von Antibiotikaresistenzkassetten in das zu deletierende Gen. Dadurch wurde die phänotypische Charakterisierung unbekannter Stoffwechselprozesse in diesem Organismus ermöglicht (Hölscher und Görisch, 2006; Hölscher *et al.* 2007). Da die Erstellung von Multideletionsmutanten mit diesem System nicht möglich ist, wurde der Schwerpunkt auf die Entwicklung eines markerlosen Deletionssystems gelegt (Keller *et al.* 2009; Peters *et al.* 2013a; Mientus *et al.* 2017). Die ersten erfolgreichen Ergebnisse konnten durch eine Gegenselektion mit Hilfe der Uracil-Phosphoribosyltransferase, kodiert durch das *upp*-Gen, erreicht werden. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von 5-Fluorouracil zu 5-Fluorouridinmonophosphat. Diese Verbindung wird wiederum zum toxischen 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat umgewandelt und inhibiert so die Replikation durch Blockierung der Thymidylatsynthase (Keller *et al.* 2009; Peters *et al.* 2013a). Das *upp*-Gen wird bei dieser Form der markerlosen Deletion über das Vektorgerüst des Deletionsplasmids in *G. oxydans* eingefügt. Mithilfe dieses Systems wurde die erfolgreiche Erstellung von Multideletionsmutanten von *G. oxydans* ermöglicht (Mientus *et al.* 2017).

Ein großer Nachteil dieser Methode ist, dass für die eigentlich gewünschte Deletion ausschließlich Stämme von *G. oxydans* verwendet werden können, in denen zuvor bereits das nativ vorhandene *upp*-Gen deletiert wurde. Um dieses Problem zu lösen, wurde ein optimiertes System für *G. oxydans* basierend auf der Gegenselektion mittels heterolog exprimierter Cytosin-Deaminase (CodA) und Cytosin-Permease (CodB) aus *Escherichia (E.) coli* entwickelt (Kostner *et al.* 2013). Dabei katalysiert CodA die Umsetzung von nicht-toxischem 5-Fluorocytosin zu 5-Fluorouracil. Diese Verbindung wird anschließend mittels einer in *Gluconobacter* nativ vorhandenen Uracil-Phosphoribosyltransferase zur toxischen Verbindung 5-Fluorouridinmonophosphat umgesetzt. Mit dieser Methode wurde es ermöglicht, in jeden Stamm von *G. oxydans* erfolgreich markerlose Deletionen einzuführen. Durch die gezielte Erstellung von Multideletionen können die physiologischen Eigenschaften sowie die katalysierten Reaktionen unbekannter Enzyme *in vivo* charakterisiert werden. So gelang es Peters *et al.* über die nacheinander durchgeführte Deletion aller membrangebunden Dehydrogenasen (mDH) eine Vielzahl der bisher noch unbeschriebenen Enzyme zu charakterisieren (Peters *et al.* 2013b). Dabei entstand die Multideletionsmutante BP9, der alle nativen mDHs fehlen und die sich daher ideal für die homologe Produktion unbekannter Dehydrogenasen und Messungen der Enzymaktivitäten an ganzen Zellen eignet. Das CodAB-System wurde außerdem erfolgreich für die Analyse der Adaption von *G. oxydans* an osmotischen Stress eingesetzt (Zahid *et al.* 2015).

1.4 Problematik und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Vielzahl von biotechnologischen und industriellen Anwendungen mit *G. oxydans* führt dazu, dass der Organismus stetigen Arbeiten zur Stammoptimierung unterliegt. Diese befassen sich entweder mit der Verbesserung bestehender biokatalytischer Umsetzungsraten (Meyer *et al.* 2013), der Optimierung des intrazellulären Stoffwechsels zur Erhöhung von Biomassen (Kiefler *et al.* 2015) oder der Charakterisierung völlig neuer enzymatischer Eigenschaften für die Produktion neuartiger Verbindungen (Schweiger *et al.* 2008; Schweiger *et al.* 2010; Mientus *et al.* 2017).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einem bislang weitgehend unbearbeiteten Bereich der Stammoptimierung von *G. oxydans*, der Erweiterung des Substratspektrums. Der Organismus ist zwar optimal an die unvollständige Oxidation einer Vielzahl von Monosacchariden, Alkoholen und Polyolen in hohen Konzentrationen angepasst, er ist jedoch nicht in der Lage Disaccharide zu nutzen. Zwar gelangen Disaccharide über Porine der äußeren Membran in das Periplasma, werden aber aufgrund von fehlenden Importsystemen nicht ins Cytoplasma geschleust. Auch fehlen geeignete periplasmatische Hydrolasen, die die Umsetzung von Disacchariden zu Monosacchariden mit anschließender unvollständiger Oxidation über membrangebundene Dehydrogenasen ermöglichen könnten (Abb. 2). Im Fall von Polysacchariden kommt hinzu, dass es sich bei diesen Verbindungen um große Moleküle handelt, die nicht in der Lage sind, die äußere Membran zu passieren. Zusätzlich fehlt ein geeignetes Set an hydrolytischen Exoenzymen (Kosciow *et al.* 2016).

Die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* zur Umsetzung von Di-, Oligo- und Polysacchariden ist aus unterschiedlichen Gründen wünschenswert. So wäre es beispielsweise möglich, durch den Einsatz eines *G. oxydans*-Stamms, der die Fähigkeit besitzt Saccharose oder Laktose zu spalten, die Produktionskosten von Glukonat oder Ketoglukonat erheblich zu senken. Der Grund dafür ist der deutlich geringere Marktpreis dieser Disaccharide im Vergleich zu reiner Glukose. Dies hängt vor allem mit der weniger aufwendigen industriellen Gewinnung von Saccharose und Laktose zusammen. Auch im Hinblick auf nachhaltige Prozessentwicklungen und die direkte Verwendung nachwachsender Rohstoffe wäre die Nutzbarkeit dieser Disaccharide ein großer Fortschritt. So könnte beispielsweise Saccharose direkt in Form von homogenisierter Zuckerrübe, die einen Trockenmasseanteil an Saccharose von 75 % besitzt, als Substrat verwendet werden (Wyse 1979).

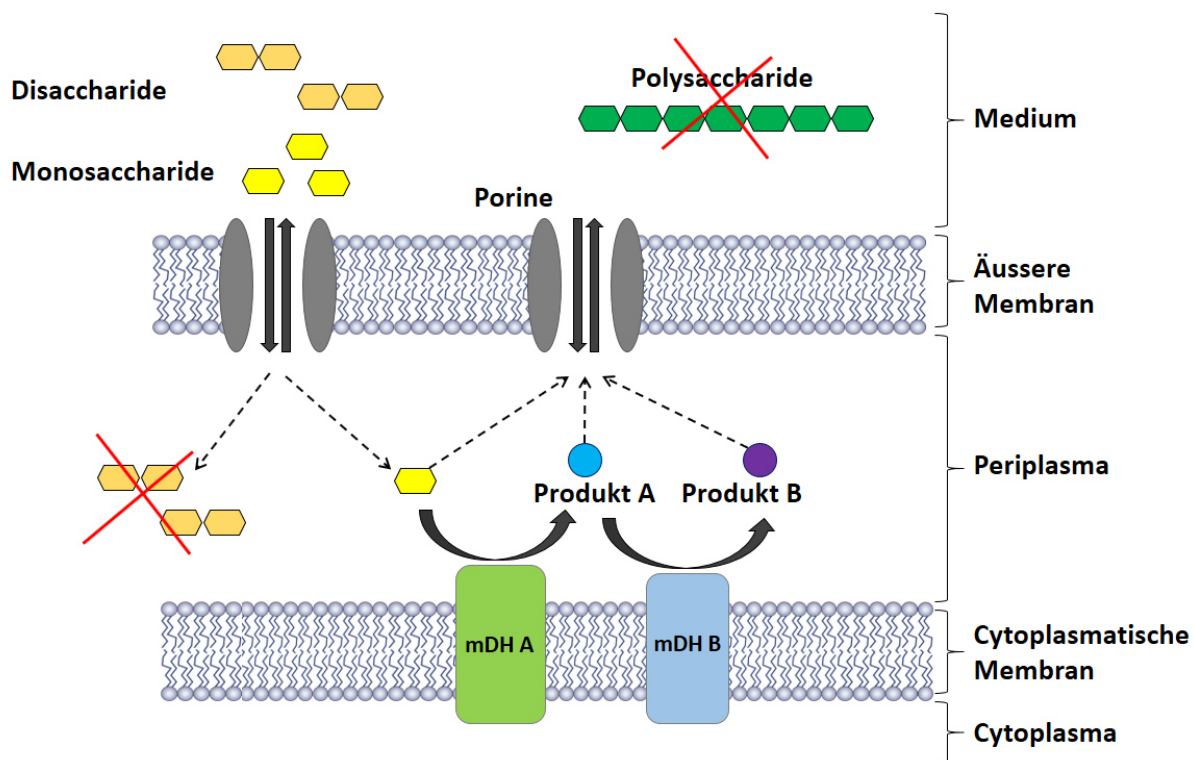


Abbildung 2: Die Problematik des limitierten Substratspektrums von *G. oxydans*. Sowohl Monosaccharide als auch Disaccharide können frei über die Porine der äußeren Membran in das Periplasma gelangen. Während Monosaccharide über membrangebundene Dehydrogenasen unvollständig oxidiert und wieder ins Medium abgegeben werden können, verbleiben Disaccharide aufgrund fehlender enzymatischer Ausstattung weitgehend ungespalten. Bedingt durch ihre Größe, verbleiben Polysaccharide außerhalb der äußeren Membran und auch hier fehlt ein geeignetes Set an extrazellulären Hydrolasen. mDH = membrangebundene Dehydrogenase.

Eine Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um Polysaccharide würde im Hinblick auf die Nutzbarkeit von nachwachsenden Rohstoffen für die Produktion von Feinchemikalien eine weitere deutliche Optimierung der biotechnologischen Anwendungen darstellen. Die *in vivo*-Hydrolyse des Substrats Cellulose, einem Glukose-Polymer, würde z.B. die industriellen Produktionskosten für interessante Oxidationsprodukte der Glukose wie Glukonat oder Ketoglukonat erheblich senken. Die Hydrolyse von Xylan wäre ebenfalls wünschenswert, da dieses Molekül als Hauptbestandteil von Hemicellulose das zweithäufigste Biopolymer der Erde darstellt (Saha 2003; Mamman *et al.* 2008). Die *in vivo*-Spaltung dieses Polymers durch *G. oxydans* würde zur Produktion des wichtigen Substrats Xylose führen, welche wiederum durch diesen Organismus unvollständig im Periplasma zu Xylonsäure oxidiert wird (Buchert und Viikari 1988; Zhou *et al.* 2015). Xylonsäure gehört zu den 30 wichtigsten Feinchemikalien weltweit (Liu *et al.* 2012), die ihre Anwendungen in vielen Bereichen der Lebensmitteltechnik, Pharmazie und Landwirtschaft findet (Niu *et al.* 2003; Tomoda *et al.* 2003; Chun *et al.* 2006; Pujos und Jijakli 2014). Eine unvollständige enzymatische Hydrolyse von Xylan zu Xylooligosacchariden (XOs) wäre ebenfalls denkbar. Diese Verbindungen besitzen vielversprechende Anwendungen im Nicht-Lebensmittel und Lebensmittelbereich (Vazquez *et al.* 2000). Für diese Bereiche ist *G. oxydans* als sicher eingestuft Organismus (GRAS) als optimaler Produzent geeignet.

1 Einleitung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, *Gluconobacter oxydans* 621H soweit zu optimieren, dass eine erweiterte Substratnutzung ermöglicht wird. Unter Nutzung eines zuvor erstellten Expressionssystems für die effiziente Produktion periplasmatischer Proteine in diesem Organismus, sollte zunächst ein Wachstum von *G. oxydans* auf dem Modelldisaccharid Trehalose ermöglicht werden. Anschließend galt es, dieses System auf die beiden kostengünstigen Substrate Saccharose und Laktose zu übertragen. Durch die Erstellung einer geeigneten Mutante sollte *G. oxydans* 621H ferner die Fähigkeit erhalten, Exoenzyme über das Periplasma hinaus in den Kulturüberstand zu sekretieren. Durch die Kombination dieser sekretorischen Mutante und dem Expressionssystem für die Produktion periplasmatischer Proteine sollte abschließend in dieser Arbeit die Erweiterung des Substratspektrums um Polysaccharide erreicht werden. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der vollständigen und partiellen Hydrolyse von Cellulose und Xylan.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Reagenzien von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), VWR (Darmstadt, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland). Spezielle Zuckerverbindungen, sowie Lipide wurden von den Firmen Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) und Megazyme (Bray, Irland) bezogen.

Restriktionsendonukleasen, alkalische Phosphatase, T4 DNA-Ligase, DNase I, Taq-DNA-Polymerase, Phusion-DNA-Polymerase und PCR-Reagenzien wurden von den Firmen Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) und New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) geliefert.

2.1.1 Antibiotika und Zusätze

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und Zusätze dienten der Selektion, dem Schutz vor Kontamination oder der Induktion regulierbarer Promotorsysteme und sind in Tab.1 aufgeführt.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Antibiotikazusätze.

| Antibiotikum | Lösungsmittel | Endkonzentration im Medium ($\mu\text{g ml}^{-1}$) |
|--------------------|-------------------|--|
| Cefoxitin | rH ₂ O | 50 |
| Kanamycin | rH ₂ O | 50 |
| Ampicillin | rH ₂ O | 100 |
| Anhydrotetrazyklin | rH ₂ O | 0,2 |

2.1.2 Kits

Mittels des GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) wurden Plasmide aus der entsprechenden Kultur isoliert. Dieses Verfahren beruht auf der alkalischen Zellyse und der Bindung der DNA an eine Silica-Membran. Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden jeweils 4 ml einer über Nacht inkubierten Kultur bei 13.000 rpm pelletiert, die Vorgehensweise der Präparation wurde nach Herstelleranleitung durchgeführt.

Chromosomale DNA wurde mittels GeneJET Genomic DNA Purification Kit der Firma Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) isoliert.

Tabelle 2: Verwendete Kits.

| Name | Verwendung | Firma und Sitz |
|---------------------------------------|----------------------------------|--|
| GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit | Aufreinigung von genomischer DNA | Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |
| GeneJET™ PCR Purification Kit | Aufreinigung von DNA-Fragmenten | Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |
| GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit | Aufreinigung von Plasmiden | Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |

2.1.3 Marker für DNA- und Protein-Gel-Elektrophorese

Die in dieser Arbeit verwendeten Marker sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Marker.

| Name | Firma und Sitz |
|-------------------------------------|--|
| GeneRuler 1 kb DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |
| GeneRuler Low Range DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |
| PageRuler Prestained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |

2.1.4 Software und Internetprogramme

Die in dieser Arbeit verwendete Software sowie die genutzten Internetprogramme sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Software und Programme.

| Name | Verwendung | Hersteller/Quelle |
|-------------------|---|---|
| Chimera 1.10.2 | Programm zur Proteinmodellierung | Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco / (Pettersen <i>et al.</i> 2004) |
| Chromas Lite 2.1 | Überprüfung von Sequenzierungen | Technelysium Pty Ltd |
| Citavi 5 | Zitierprogramm | Swiss Academic Software |
| Clone Manager 9.2 | Erstellung von Plasmidkarten und Bearbeitung von DNA-Sequenzen <i>in silico</i> | Sci-Ed Software |
| ClustalΩ | Vergleich von DNA- und Aminosäuresequenzen | European Bioinformatics Institute EMBL-EBI / (Larkin <i>et al.</i> 2007; Goujon <i>et al.</i> 2010) |

| | | |
|-----------------------|--|--|
| GraphPad Prism 7 | Programm zur Berechnung von Enzymaktivitäten | GraphPad Software, La Jolla California USA |
| Kazusa | Codon Usage Datenbank | European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK |
| KEGG | Informationen zu Genen und Proteinen | Kanehisa Laboratories |
| Microsoft Office 2016 | Erstellung von Tabellen, Diagrammen, Text | Microsoft |
| NCBI BLAST | Vergleich von DNA- und Aminosäuresequenzen | National Center for Biotechnology Information |
| Pfam | Analyse von Proteindomänen | European Bioinformatics Institute EMBL-EBI / (Sigrist <i>et al.</i> 2012) |
| Phobius | Identifizierung von Signalpeptiden | Stockholm Bioinformatics Center / (Käll <i>et al.</i> 2004) |
| Phyre2 | Berechnung von Proteinstrukturen | Structural Bioinformatics Group / (Kelley <i>et al.</i> 2015) |
| Primer3 | Erstellung der Oligonukleotide für die RT-qPCR | (Koressaar und Remm 2007; Untergasser <i>et al.</i> 2012) |
| Prosite | Analyse von Proteindomänen | Swiss Institute of Bioinformatics / (Sigrist <i>et al.</i> 2012) |
| ProtParam | Informationen zu Proteinen | Swiss Institute of Bioinformatics / (Gasteiger <i>et al.</i> 2005) |
| SignalP 4.1 | Identifizierung von Signalpeptiden | Center for biological sequence analysis / (Petersen <i>et al.</i> 2011) |
| TMHMM 2.0 | Identifizierung von Transmembrandomänen | Center for biological sequence analysis / (Krogh <i>et al.</i> 2001) |
| Uniprot | Informationen zu Genen und Proteinen | European Bioinformatics Institute, Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource |

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Organismen, Medien und Kulturbedingungen

2.2.1.1 Organismen

In dieser Arbeit wurden die in Tab. 5 beschriebenen Organismen für die Vektorkonstruktion, Proteinproduktion sowie Stammoptimierung verwendet.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Organismen.

| Stamm | Beschreibung | Quelle |
|---|-------------------|----------------------------|
| <i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835 | Wildtyp | Derrien <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H (DSM 2343) | Wildtyp, Ce^{R} | De Ley <i>et al.</i> 1984 |

| | | |
|---|---|---|
| <i>Gluconobacter oxydans</i> Δ hsdR | Derivat von <i>G. oxydans</i> 621H (Deletion von <i>gox2567</i>) | Dr. Stephanie Bringer-Meyer, Forschungszentrum Jülich |
| <i>Gluconobacter oxydans</i> Δ tolB | Derivat von <i>G. oxydans</i> Δ hsdR (Deletion von <i>gox1687</i>) | Kosciow <i>et al.</i> 2016 |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 α (DSM 6897) | F ⁻ , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, ϕ 80d, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk⁺</i>), <i>thi-1</i> , λ ⁻ , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> | Hanahan 1983 |
| <i>Escherichia coli</i> NEB 5-alpha | Derivat von <i>E. coli</i> DH5 α <i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> ϕ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> | New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland |
| <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) | F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB-mB-), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3) | Novagen, Madison, USA |
| <i>Escherichia coli</i> K12 HB101 pRK2013 | <i>supE44</i> , Δ <i>lac</i> U169(Φ <i>lacZ</i> Δ M15), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , pRK2013 (KmR oriColE1 RK2-Mob+ RK2-Tra+). | Bio-Rad, München, Deutschland |

2.2.1.2 Medien und Anzuchtbedingungen

Die Sterilisation aller aufgeführten Medien erfolgte durch Autoklavieren für 20 Minuten bei 121 °C mit nachträglicher Zugabe der benötigten Antibiotika. Zur Herstellung von Agarplatten wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zu dem jeweiligen Medium hinzugefügt.

Akkermansia (A.) muciniphila wurde anaerob in Pepton-Hefe-Glukose-Medium (PYG) angezogen. Die Kultivierung erfolgte in Volumina zwischen 50 und 500 ml.

PYG-Medium (Pepton-Hefe-Glukose-Medium)

| | |
|---------------------------------|-------------|
| Trypton | 5,0 g |
| Pepton | 5,0 g |
| Hefeextrakt | 10,0 g |
| Fleischextrakt | 5,0 g |
| Glukose | 5,0 g |
| K ₂ HPO ₄ | 2,0 g |
| Tween 80 | 1,0 ml |
| Cystein-HCl x H ₂ O | 0,5 g |
| Salzlösung (s.u.) | 40,0 ml |
| dH ₂ O | auf 1000 ml |

Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml Häminlösung und 0,2 ml Vitamin K1-Lösung hinzugefügt. Zur Erstellung der Häminlösung wurden 50 mg Hämin in 1 ml 1 N NaOH gelöst und auf 100 ml mit dH₂O aufgefüllt. Die Vitamin K1-Lösung wurde durch Lösen von 0,1 ml Vitamin K1 in 20 ml 95 % Ethanol mit anschließender Sterilfiltration erstellt. Die Begasung des Mediums erfolgte mit einem N₂/CO₂-Gemisch.

Salzlösung

| | |
|--|-------------|
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,25 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 1,0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1,0 g |
| NaHCO ₃ | 10,0 g |
| NaCl | 2,0 g |
| dH ₂ O | auf 1000 ml |

Gluconobacter (G.) oxydans wurde aerob bei 30 °C und 180 rpm in Hefe-Mannitol-Medium (YM) kultiviert. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde dem Medium Cefoxitin zugegeben. Je nach Volumen erfolgte die Kultivierung in 50 ml-Kunststoffröhrchen oder in Schikanekolben. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *G. oxydans* 621H Δ *hsdR* eignet sich besonders für die Pasmidübertragung, da in diesem eine Restriktionsendonuklease, kodiert durch *gox2567*, deletiert ist.

YM-Medium (Hefe-Mannitol-Medium)

| | |
|-------------------|-------------|
| Hefeextrakt | 6,0 g |
| Mannitol | 20,0 g |
| dH ₂ O | auf 1000 ml |

Alternativ wurde *G. oxydans* für Wachstumsversuche auch in Hefe-Trehalose-Medium (YT), Hefe-Saccharose-Medium (YS), Hefe-Laktose-Medium (YL) und Hefe-Raffinose-Medium (YR) kultiviert. Dazu wurde dieselbe Konzentration der C-Quelle eingesetzt wie in YM-Standardmedium. Zur Pufferung des pH-Werts wurde ein 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 verwendet.

Escherichia (E.) coli wurde in LB-Medium (Lysogeny Broth) aerob bei 37 °C und 180 rpm kultiviert (Lennox 1955). Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden in erster Linie für die Klonierung der verschiedenen Konstrukte und deren Vervielfältigung nach Transformation eingesetzt. Der Produktionsstamm *E. coli* BL21 hingegen diente der heterologen Produktion von Proteinen.

LB-Medium (Lysogeny Broth)

| | |
|-------------------|-------------|
| Trypton | 10,0 g |
| Hefeextrakt | 5,0 g |
| NaCl | 5,0 g |
| dH ₂ O | auf 1000 ml |

2.2.2 Stammerhaltung

Die kurzfristige Lagerung aller verwendeten Stämme erfolgte in Flüssigkultur oder auf Agarplatten bei 4 °C. Für die langfristige Lagerung wurden 900 μ l einer Übernachtskultur mit 100 μ l DMSO versetzt und bei - 70 °C in Kryoröhrchen (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingefroren.

2.2.3 Bestimmung von Wachstum und Wachstumsparametern

2.2.3.1 Messung der optischen Dichte

Der Wachstumsverlauf einer Bakterienkultur wurde in dieser Arbeit photometrisch bestimmt. Dazu wurde zu dem gewünschten Zeitpunkt 1 ml der Kultur in eine Plastikkuvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gefüllt und die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm durchgeführt. Es wurde diese Wellenlänge gewählt, da hier nahezu ausschließlich Streuung und keine Absorption stattfindet. Als Leerwert wurde das jeweilige Medium verwendet. Um Mehrfachstreuungen und somit eine Verfälschung der Ergebnisse auszuschließen, wurde ab einer OD_{600nm} von 0,3 mit Medium verdünnt.

2.2.3.2 Bestimmung der Wachstumsrate μ und der Verdopplungszeit t_d

Zur Berechnung der Wachstumsrate μ wurde zunächst über die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm zu verschiedenen Zeitpunkten eine Wachstumskurve erstellt. Über die logarithmische Auftragung dieser Absorptionen gegen die Zeit ließ sich die exponentielle Wachstumsphase einer Kultur erkennen, deren Steigung die Wachstumsrate μ wiedergibt. Diese berechnet sich nach Formel 1. Anhand der Wachstumsrate ließ sich die Verdopplungszeit t_d der Bakterienkultur berechnen (Formel 2).

Formel 1: Berechnung der Wachstumsrate μ . N_0 und N_t geben einen früheren und einen späteren Wert der OD_{600nm} in der exponentiellen Wachstumsphase an; t und t_0 die entsprechenden Zeitpunkte.

$$\text{Wachstumsrate } (\mu) = \frac{\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{(t - t_0)}$$

Formel 2: Berechnung der Verdopplungszeit t_d . μ gibt hierbei die Wachstumsrate an.

$$\text{Verdopplungszeit } (t_d) = \frac{\ln 2}{\mu}$$

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von isolierter DNA wurde photometrisch mit einem Jasco V-600 Spectrophotometer (Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) bestimmt (Sambrook und Russel 2001). Dazu wurde 1 μ l DNA mit 99 μ l dH₂O verdünnt und in einer 100 μ l Quarzküvette die Absorption bei 260 nm (A_{260}) gegen dH₂O als Leerwert gemessen. Die Konzentration der DNA wurde mit Formel 3 berechnet. Alternativ wurde die Konzentration mittels Nanodrop-BioSpectrometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der DNA wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm berechnet. Auf diese Weise war der Nachweis von Verunreinigungen durch

Proteine, die aufgrund aromatischer Aminosäuren ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen, möglich.

Formel 3: Berechnung der DNA-Konzentration in $\mu\text{g ml}^{-1}$.

$$\frac{\text{DNA } (\mu\text{g})}{\text{ml}} = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

2.3.2 Vektoren und Oligonukleotide

2.3.2.1 Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Vektoren sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Vektoren.

| Vektor | Beschreibung | Quelle |
|----------------------------|---|----------------------------|
| pBBR1MCS-2 | <i>mob, rep, Kan^R, lacZ</i> | Kovach <i>et al.</i> 1995 |
| pBBR1p264 | pBBR1MCS-2 Derivat mit der Promotorregion des Gens <i>gox0265</i> | Kallnik <i>et al.</i> 2010 |
| pBBR1p452 | pBBR1MCS-2 Derivat mit der Promotorregion des Gens <i>gox0452</i> | Kallnik <i>et al.</i> 2010 |
| pBBR1p264-Streplong | pBBR1p264 Derivat mit modifiziertem Strep-Tag (verlängerte Linkersequenz) | Zeiser <i>et al.</i> 2014 |
| pBBR1p264-SPpeIB-Streplong | Derivat von pBBR1p264-Streplong mit der Signalsequenz der Pektatlyase B | Zeiser <i>et al.</i> 2014 |
| pBBR1p264-SPpeIB-phoA | Derivat von pBBR1p264-SPpeIB-Streplong, welches die Sequenz des Gens <i>phoA</i> (b0383) aus <i>E. coli</i> trägt | Kosciow <i>et al.</i> 2014 |
| pBBR1p452-SPpeIB-phoA | Derivat von pBBR1p452-SPpeIB-Streplong, welches die Sequenz des Gens <i>phoA</i> (b0383) aus <i>E. coli</i> trägt | Kosciow <i>et al.</i> 2014 |
| pBBR1p264-SPpeIB-treA | Derivat von pBBR1p264-SPpeIB-Streplong, welches die Sequenz des Gens <i>treA</i> (b1197) aus <i>E. coli</i> trägt | Kosciow <i>et al.</i> 2014 |
| pBBR1p452-SPpeIB-treA | Derivat von pBBR1p452-SPpeIB-Streplong, welches die Sequenz des Gens <i>treA</i> (b1197) aus <i>E. coli</i> trägt | Kosciow <i>et al.</i> 2014 |

| | | |
|---|---|----------------------------|
| pBBR1p264-NoSP- <i>treA</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>treA</i> (b1197) aus <i>E. coli</i> ohne native Signalsequenz trägt | Kosciow <i>et al.</i> 2014 |
| pKOS6b | Vektor für markerlose Deletion, welcher die Sequenzen der Gene <i>codA</i> und <i>codB</i> trägt | Kostner <i>et al.</i> 2013 |
| pKOS6b-UpDogox1687 | Derivat von pKOS6b, welches die flankierenden Regionen des Gens <i>gox1687</i> trägt | Kosciow <i>et al.</i> 2016 |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-sacC</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>sacC</i> (ZMO0375) aus <i>Zymomonas mobilis</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-cex</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>cex</i> (P07986) aus <i>Cellulomonas fimi</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-xyII</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>xyII</i> (P49942) aus <i>Bacteroides ovatus</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-xynA</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>xynA</i> (BSU18840) aus <i>Bacillus subtilis</i> trägt | Kosciow <i>et al.</i> 2016 |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-xsa</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>xsa</i> (P49943) aus <i>Bacteroides ovatus</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-xynB</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>xynB</i> (BSU17580) aus <i>Bacillus subtilis</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-xynB_SPpeIB-xynA</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-xynA</i> , welches zusätzlich die Sequenz des Gens <i>xynB</i> (BSU17580) aus <i>Bacillus subtilis</i> trägt | Diese Arbeit |
| BBR1ptetall- <i>SPpeIB-xynB_SPpeIB-xynA</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-xynB_SPpeIB-xynA</i> , beim dem der Promotor <i>p264</i> durch die Promotorsequenz <i>ptetall</i> ausgetauscht wurde | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-bglX</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>bglX</i> (b2132) aus <i>E. coli</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-bglB</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>bglB</i> (P22505) aus <i>Paenibacillus polymyxa</i> trägt | Diese Arbeit |

| | | |
|------------------------------------|---|--------------|
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-boGH3A</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>boGH3A</i> (BACOVA_02644) aus <i>Bacteroides ovatus</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-boGH3B</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>boGH3B</i> (BACOVA_02659) aus <i>Bacteroides ovatus</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-cbhA</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>cbhA</i> (Celf_1925) aus <i>Cellulomonas fimi</i> | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-eglS</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>eglS</i> (BSU18130) aus <i>Bacillus subtilis</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-celY</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>celY</i> (P27032) aus <i>Erwinia chrysanthemi</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPnat-amuc_0824</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>amuc_0824</i> (Amuc_0824) aus <i>Akkermansia muciniphila</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-amuc_0824</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>amuc_0824</i> (Amuc_0824) aus <i>Akkermansia muciniphila</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPnat-amuc_1686</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>amuc_1686</i> (Amuc_1686) aus <i>Akkermansia muciniphila</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-amuc_1686</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>amuc_1686</i> (Amuc_1686) aus <i>Akkermansia muciniphila</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPnat-amuc_0771</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>amuc_0771</i> (Amuc_0771) aus <i>Akkermansia muciniphila</i> trägt | Diese Arbeit |
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-amuc_0771</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>amuc_0771</i> (Amuc_0771) aus <i>Akkermansia muciniphila</i> trägt | Diese Arbeit |

| | | |
|----------------------------------|---|-------------------|
| pBBR1p264- <i>SPpeIB-boGH2A</i> | Derivat von pBBR1p264- <i>SPpeIB-Streplong</i> , welches die Sequenz des Gens <i>boGH2A</i> (BACOVA_02645) aus <i>Bacteroides ovatus</i> trägt | Diese Arbeit |
| pASK-IBA5 | AHT-induzierbarer Expressionsvektor, welcher die Fusion eines N-terminalen Strep-Tags ermöglicht sowie eine Ampicillinresistenzkassette trägt | IBA life sciences |
| pASK5- <i>SPnat-amuc1686</i> | Derivat von pASK-IBA5, welches die Sequenz des Gens <i>amuc_1686</i> (Amuc_1686) aus <i>Akkermansia muciniphila</i> trägt | Diese Arbeit |
| pASK5- <i>NoSP-amuc1686</i> | Derivat von pASK-IBA5, welches die Sequenz des Gens <i>amuc_1686</i> (Amuc_1686) aus <i>Akkermansia muciniphila</i> ohne native Signalsequenz trägt | Diese Arbeit |
| pASK5- <i>NoSP-amuc1686short</i> | Derivat von pASK-IBA5, welches die Sequenz des Gens <i>amuc_1686</i> (Amuc_1686) aus <i>Akkermansia muciniphila</i> ohne native Signalsequenz und ohne c-terminale Discoidin-Domäne trägt | Diese Arbeit |
| pASK5- <i>NoSP-amuc0771</i> | Derivat von pASK-IBA5, welches die Sequenz des Gens <i>amuc_0771</i> (Amuc_0771) aus <i>Akkermansia muciniphila</i> ohne native Signalsequenz trägt | Diese Arbeit |
| pASK5- <i>NoSP-amuc1666</i> | Derivat von pASK-IBA5, welches die Sequenz des Gens <i>amuc_1666</i> (Amuc_1666) aus <i>Akkermansia muciniphila</i> ohne native Signalsequenz trägt | Diese Arbeit |

2.3.2.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide für Klonierungen und Sequenzierungen sowie der Erstellung von Deletionsmutanten wurden manuell entworfen und durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung in Tab. 7 dargestellt.

Tabelle 7: Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide. Vorhandene Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

| Oligonukleotid | Sequenz | Restriktionsschnittstelle |
|----------------|--|---------------------------|
| treA.fw | GGTGT <u>ACGTAG</u> AAGAAACACCGGTAACAC | <i>Sna</i> BI |
| treA.rev | AGTAGG <u>CGCGCC</u> AGGTGTGGGTTGTGCCT | <i>Asc</i> I |

2 Material und Methoden

| | | |
|------------------|--|----------------|
| treA-NoSP.fw | GGTGCTCGAGGAAGAAACACCGGTAACAC | <i>XhoI</i> |
| XynA.fw | ATATTACGTAGCTAGCACAGACTACTGGC | <i>SnaBI</i> |
| XynA.rev | ATATGGCGCGCCCCACACTGTTACGTTAG | <i>Ascl</i> |
| pKOS6b1687.fw | TCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGAC | - |
| pKOS6b1687.rev | ATGATTACGAATTCGAGCTCGGT | - |
| Uppox1687_3.fw | ATAGAAGCTTAGATGGAATTCGAGCAGGC A | <i>HindIII</i> |
| Uppox1687.rev | TGAAAGCGCGGAGCCTGACCGAGACTTCC TCGTGGATTAC | - |
| Downgox1687.fw | GTAATCCACGAGGAAGTCTCGGTCAGGCT CCGCGCTTTCA | - |
| Downgox1687.rev | TAGTTCTAGAATCATCCCAGTCCGT | <i>XbaI</i> |
| codA.F | TGTGGAGGCTAACAGTGTCTG | - |
| codA.R | GATAATCAGGTTGGCGCTGT | - |
| p264SP.f | GTGCAGAGTCTCTGCAGGAT | - |
| pASK_R | CGCAGTAAGCGGTAAACG | - |
| SacC.fw | GCTATACGTATTTAATTTAATGCCAGTC | <i>SnaBI</i> |
| SacC.rev | ATATGGCGCGCCTTTTGGCAGATCC | <i>Ascl</i> |
| Cex.fw | CTATTACGTAGCGACCACGCTCAAGGA | <i>SnaBI</i> |
| Cex.rev | ATTAGGCGCGCCGCCGACCGTGCAGG | <i>Ascl</i> |
| xyll.fw | ATTATACGTAAAAGATGGAAGTTCGCT | <i>SnaBI</i> |
| xyll.rev | ATTAGGCGCGCCTTTTGTTCAGCCT | <i>Ascl</i> |
| XynA.fw | ATATTACGTAGCTAGCACAGACTACTGGC | <i>SnaBI</i> |
| XynA.rev | ATATGGCGCGCCCCACACTGTTACGTTAG | <i>Ascl</i> |
| xsA.fw | ACCATACGTAAAAACAGAAAAAAGATATT | <i>SnaBI</i> |
| xsA.rev | ATTAGGCGCGCCTTCATCTTTCCCTC | <i>Ascl</i> |
| XynB.fw | ATATTACGTAAAGATTACCAATCCCGTAC | <i>SnaBI</i> |
| Xynb.rev | ATATGGCGCGCCTTTTTCTTTATAACGAA | <i>Ascl</i> |
| XynBfusion.fw | ATACGAATTCATGAAATACCTGCTGC | <i>EcoRI</i> |
| XynBfusion.rev | ATACCTCGAGTATTATTTTCGAACTGC | <i>XhoI</i> |
| tetall_fr_p264.f | ATTAGAGCTCTCCATTCGCCATTCA | <i>SacI</i> |
| tetall_fr_p264.r | AGTAGAATTCCTACTTTTCTCTATCACTG | <i>EcoRI</i> |
| bgxA2.fw | ATTATACGTAGTACAACAGGCCGTGCTCG | <i>SnaBI</i> |
| bgxA2.rev | TAATGGCGCGCCGTGAGGCAGGCCATAA | <i>Ascl</i> |

2 Material und Methoden

| | | |
|-------------------|---|-----------------|
| BoGH3B.fw | ATTAT <u>ACGTACAGACTGCCTCTCCTGTCA</u> | <i>SnaBI</i> |
| BoGH3B.rev | ATTAG <u>GCGCGCCTTTGTGGAGCGTATTC</u> | <i>Ascl</i> |
| BoGH3A.fw | ATTAT <u>ACGTACAAGACAAAGAACAAAC</u> | <i>SnaBI</i> |
| BoGH3A.rev | ATTAG <u>GCGCGCCTTGAATATATTCGAATG</u> | <i>Ascl</i> |
| BoGH2a-native.fw | ATT <u>ACTCGAGATGATGATTGGTAAACTAA</u> | <i>XhoI</i> |
| BoGH2a-2.fw | ATTAT <u>ACGTATGCCTGGCATTGGGAGG</u> | <i>SnaBI</i> |
| BoGH2A.rev | ATTAG <u>GCGCGCCCAATTCCTCTGCCGAAA</u> | <i>Ascl</i> |
| EglS.fw | ATATT <u>ACGTAGCAGGGACAAAAACGCCAG</u> | <i>SnaBI</i> |
| EglS.rev | ATAT <u>GCGCGCCATTTGGTTCTGTTCCCC</u> | <i>Ascl</i> |
| BglB-polymyxa.fw | CTATT <u>ACGTAAGCGAGAATACCTTTATAT</u> | <i>SnaBI</i> |
| BglB-polymyxa.rev | ATAT <u>GCGCGCCAAACCCGTTCTTCG</u> | <i>Ascl</i> |
| CbhA.fw | ATATT <u>ACGTAGCGCCCGTCCACGTGACA</u> | <i>SnaBI</i> |
| CbhA.rev | ATAT <u>GCGCGCCGCCGAGCGTGCAGGCG</u> A | <i>Ascl</i> |
| celY.f | TACTT <u>ACGTAGCGAACGGCTGGGAA</u> | <i>SnaBI</i> |
| celY.rev | TACT <u>GCGCGCCTTTACCGCGCGCAA</u> | <i>Ascl</i> |
| Amuc_0824neu.f | ATGGTAT <u>ACGTAAAATGAGAACGACCAGAT</u> CCTGGCTTTT | <i>SnaBI</i> |
| Amuc0824.re | ATGGTAG <u>GCGCGCCAGCGCTTTTCTTAAC</u> GGGAATGATATCCAGT | <i>Ascl</i> |
| Amuc0771-nat.fw | ATT <u>ACTCGAGATGATGAAGCAATATGG</u> | <i>XhoI</i> |
| Amuc0771-1.fw | ATTAT <u>ACGTAGGCCCTGAGGCTGTCCA</u> | <i>SnaBI</i> |
| Amuc0771.rev | ATTAG <u>GCGCGCCCACTGGTTGTCCAGGT</u> | <i>Ascl</i> |
| Amuc1686-nat.fw | ATT <u>ACTCGAGATGAAATTATCCTTT</u> | <i>XhoI</i> |
| Amuc1686-1.fw | ATTA <u>AGCGCTGCTGCTCCCATGCCTTT</u> | <i>Eco47III</i> |
| Amuc1686.rev | ATTAG <u>GCGCGCCCTTGGCAGGCTTGAAC</u> | <i>Ascl</i> |
| RNAamuc0302.fw | GACATTTACCAAGTCATCAAGAAG | - |
| RNAamuc0302.re | ACCTTCTTGCCGAAAGCAAC | - |
| RNAamuc1417.fw | AGTATGACTCCACGCAGG | - |
| RNAamuc1417.re | ATTCCAGAACGACGTCCAC | - |
| RNAamuc0824.fw | AGCCGGATTACGACGTAAAG | - |
| RNAamuc0824.re | AATTCTTGTTGGAAGGCTCC | - |
| RNAamuc1686.fw | TTGTTCCCGCCATGAATTC | - |
| RNAamuc1686.rev | GTTGAAACCTTCCGTA CTGC | - |

| | | |
|-------------------|--|-------|
| RNAamuc0771.fw | CCCAGCTTGAAAACGAATAC | - |
| RNAamuc0771.rev | CACGCCTTTCAGAAAATGTT | - |
| RNAamuc1666.fw | CAAATTTTCCATGACTCCGG | - |
| RNAamuc1666.rev | ATGGATAGGGAACATTCGTG | - |
| pask1686short.fw | ATTAGAGCTCTAAATTATCCTTTTTCTCC | SacI |
| pask1686short.rev | ATTA <u>CTCGAG</u> TTAATGGGGGCCGTTGTCA | XhoI |
| A0771NoSPpask5.f | ATTAG <u>AATTC</u> AGGCCCTGAGGCTGTC | EcoRI |
| A0771NoSPpask5.r | ATTA <u>CTCGAG</u> TTACCACTGGTTGTCCA | XhoI |
| A1666NoSPpask5.f | ATTAG <u>AATTC</u> ACTTCCCCTGCTGGGG | EcoRI |
| Pask_NatSP1666.r | ATTA <u>CTCGAG</u> TTATTGGGTAATGATATTC | XhoI |

2.3.3 Polymerase-Kettentreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zur *in vitro*-Amplifizierung definierter DNA-Sequenzen (Mullis *et al.* 1986), welche prinzipiell auf den drei sich zyklisch wiederholenden Schritten Denaturierung, Anlagerung und Elongation beruht. Bei 98 °C findet die Denaturierung statt und sorgt durch Aufhebung der Wasserstoffbrückenbindung für eine Trennung der doppelsträngigen Matrizen-DNA in zwei komplementäre Einzelstrang-DNA-Fragmente. Im zweiten Schritt findet eine Anlagerung (Annealing) der verwendeten Oligonukleotide bei einer für diese spezifischen Annealing-Temperatur an die Einzelstränge der Matrizen-DNA statt. Es entstehen Doppelstrang-Bereiche mit freiem 3'-OH-Ende. Durch den Elongationschritt werden freie Nukleotide komplementär an das freie 3'-OH-Ende durch eine hitzestabile Polymerase angelagert. Es entsteht ein neuer doppelsträngiger DNA-Strang.

Mit jedem Zyklus wird die Menge des gewünschten DNA-Fragments verdoppelt, was zu einer exponentiellen Vermehrung des Amplifikats führt. Für eine erfolgreiche PCR ist die Wahl geeigneter Oligonukleotide von großer Bedeutung, die die exakte Kenntnis der zu amplifizierenden Sequenz voraussetzt. Die Schmelztemperatur (T_m) der beiden verwendeten Oligonukleotide sollte dabei annähernd gleich sein. Die optimale Annealingtemperatur T_A [°C] sollte im Fall der DreamTaq™ DNA-Polymerase etwa 2 - 5 °C unter der niedrigeren Schmelztemperatur liegen, im Fall der Phusion® DNA-Polymerase etwa 2 - 5 °C über der höheren Schmelztemperatur. Die Anzahl der Basen sollte dabei etwa zwischen 18 und 28 liegen. In dieser Arbeit wurde die Phusion® DNA-Polymerase für Klonierungen verwendet. Der Vorteil dieser Polymerase ist die bis zu 50-fach geringere Fehlerrate gegenüber der DreamTaq™ DNA-Polymerase und eine 6-fach niedrigere Fehlerrate im Vergleich zur *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*. Die Phusion® DNA-Polymerase besitzt eine 3'-5'-Proof reading-Exonukleaseaktivität und eine deutlich erhöhte Geschwindigkeit gegenüber den anderen beiden Polymerasen. Während die DreamTaq™ DNA-Polymerase eine Arbeitsgeschwindigkeit von etwa 1000 bp min⁻¹ besitzt, ist mit der Phusion® DNA-Polymerase eine Elongation mit einer Geschwindigkeit von etwa 1000 bp 15 s⁻¹ möglich.

2.3.3.1 PCR für die Gen-Amplifizierung

Zur Amplifizierung von Genen für die Erstellung von Expressionssystemen wurde die Phusion® DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet und die notwendige genomische DNA als Matrize eingesetzt.

Die Annealingtemperatur T_A [°C] ist abhängig von den verwendeten Oligonukleotiden und die Elongationszeit von der Länge des zu amplifizierenden Fragments.

Für die Weiterverwendung der amplifizierten Fragmente, beispielsweise für Restriktionsverdaue, wurden diese mittels GeneJET™ PCR Purification Kit (Tab. 3) aufgereinigt.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:

| | µl Reaktionsansatz⁻¹ |
|---|--|
| DNA-Matrize | 1 |
| Vorwärtsoligonukleotid (10 pM µl ⁻¹) | 1 |
| Rückwärtsoligonukleotid (10 pM µl ⁻¹) | 1 |
| dNTP-Mix (25 mM) | 0,5 |
| 5x Phusion® HF-Puffer | 10 |
| DMSO | 2 |
| Phusion® DNA-Polymerase (2 U/µl) | 0,5 |
| rH ₂ O | 34 |
| Gesamt | 20 µl |

PCR-Bedingungen:

| | | |
|----------------------|----------|---|
| Initialdenaturierung | 98 °C | 1 min |
| Denaturierung | 98 °C | 10 s |
| Annealing | T_A °C | 45 s |
| Elongation | 72 °C | 15-30 s kb ⁻¹ , zyklische Wiederholung ab Denaturierung: 33 x |
| Endelongation | 72 °C | 5 min |
| Lagerung | 12 °C | |

2.3.3.2 Kolonie-PCR

Mit der Kolonie-PCR lässt sich das Vorhandensein eines DNA-Fragments in einer Kolonie basierend auf der klassischen PCR (2.3.4) überprüfen. Hierzu wurde eine nach der Transformation entstandene Kolonie als Matrize eingesetzt, wobei die verwendeten Oligonukleotide bei Vorhandensein des gewünschten DNA-Fragments eine Amplifizierung ermöglichten. Zusätzlich wurde Zellmaterial der entsprechenden Kolonie in 100 µl Medium resuspendiert, sodass nach bestätigter, erfolgreicher Transformation mit dieser Suspension weitergearbeitet werden konnte. Bei dieser Art der PCR wurde die DreamTaq™ DNA-Polymerase verwendet, da die erhöhte Fehlerrate für die einfache Überprüfung nicht relevant war.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:

| | µl Reaktionsansatz⁻¹ |
|--|--|
| DNA-Matrize (Kolonie in rH ₂ O resuspendiert) | 5 µl |
| Vorwärtsoligonukleotid (10 pM µl ⁻¹) | 1 |
| Rückwärtsoligonukleotid (10 pM µl ⁻¹) | 1 |
| dNTP-Mix (25 mM) | 0,2 |
| 10 x DreamTaq™ Green Buffer | 2,5 |
| DMSO | 1,25 |
| DreamTaq™ DNA Polymerase (2,5 U µl ⁻¹) | 0,25 |
| rH ₂ O | 15,6 |
| Gesamt | 26,8 µl |

PCR-Bedingungen:

| | | |
|----------------------|-------------------|---|
| Initialdenaturierung | 95 °C | 1 min |
| Denaturierung | 95 °C | 30 s |
| Annealing | T _A °C | 45 s |
| Elongation | 72 °C | 1 min kb ⁻¹ , zyklische Wiederholung ab Denaturierung: 30 x |
| Endelongation | 72 °C | 5 min |
| Lagerung | 12 °C | |

2.3.3.3 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR diente in dieser Arbeit der relativen Bestimmung der mRNA eines Zielgens im Vergleich zu einem Referenzgen. Verwendet wurde dabei der iCycler (Bio-Rad, München), sowie das SYBR-Green RT-PCR Kit der Firma Quiagen (Hilden, Deutschland). Für die Erstellung geeigneter Oligonukleotide wurde das Programm Primer3 (Koressaar und Remm 2007; Untergasser *et al.* 2012) verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, dass diese Oligonukleotide eine ähnliche Schmelztemperatur, sowie die entstehenden Amplifikate eine Länge von etwa 150 bp aufwiesen. Als Referenzgene dienen in dieser Arbeit die kodierende Region des 50S ribosomalen Proteins L23, sowie der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, da beide konstitutiv exprimiert werden. Als Kontrolle wurden Reaktionsansätze ohne RNA und Reaktionsansätze ohne reverse Transkriptase angesetzt, zusätzlich wurde die mittels Kit präparierte RNA mit Hilfe einer Kontroll-PCR und Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Reinheit überprüft. Die Programmierung des iCyclers beinhaltete zusätzlich einen Schritt für die reverse Transkription in cDNA und einen finalen Schritt für die Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate. Jeder Reaktionsansatz enthielt insgesamt 2,5 µl RNA mit einer Konzentration von 100 ng µl⁻¹.

| Oligonukleotid-Mix | | Master-Mix | |
|---|---------------------------------|--|---------------------------------|
| | µl Reaktion⁻¹ | | µl Reaktion⁻¹ |
| Vorwärtsoligonukleotid (5 pmol µl ⁻¹) | 5 | 2 x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master-Mix | 12,25 |
| Rückwärtsoligonukleotid (5 pmol µl ⁻¹) | 5 | QuantiTect-RT-Mix | 0,25 |
| Gesamt | 10 | Gesamt | 12,5 |

Bedingungen:

| | | |
|----------------------------|-------------------|---|
| Reverse Transkription | 50 °C | 30 min |
| Aktivierung der Polymerase | 95 °C | 15 min |
| Denaturierung | 95 °C | 15 s |
| Annealing | T _A °C | 30 s |
| Elongation | 72 °C | 30 s, Wiederholung ab Denaturierung: 40 x |
| Schmelzkurve | 35 - 95 °C | 10 s C ^{o-1} |

Mit der Geräte-zugehörigen Software konnten die entsprechenden Crossing-Point-Werte (Cp-Werte), also die Überschreitung des zuvor eingestellten Schwellenwerts des Fluoreszenz-Signals, bestimmt werden. Aus diesen Werten ließ sich die Differenz zwischen Ziel- und Referenzgen ($\Delta C_p = C_{pZielgen} - C_{pReferenzgen}$) bestimmen und so eine Aussage über die relative Hoch- beziehungsweise Runterregulation des Zielgens im Vergleich zum Referenzgen unter verschiedenen Bedingungen treffen. Die relative Transkriptabundanz ließ sich durch die Bestimmung des Werts $2^{-\Delta C_p}$ berechnen.

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um eine Methode zur Längenbestimmung linearer doppelsträngiger DNA anhand eines definierten Nukleinsäure-Markers.

Das Prinzip basiert auf der Wanderung geladener Moleküle, hier der negativ geladenen DNA, in einem elektrischen Feld. Die Laufgeschwindigkeit von DNA-Fragmenten verhält sich dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Größe des Fragments. Somit wandern kleine Moleküle schneller durch das Gel als große Moleküle. Die Wandereigenschaft wird darüber hinaus durch einen weiteren Faktor, die Porengröße des Agarose-Gels, bestimmt. Diese wird durch die eingesetzte Konzentration an Agarose beeinflusst. Je höher die Konzentration ist, umso kleiner sind die Poren und desto langsamer wandern die DNA-Fragmente.

30 ml 1 x TAE-Puffer wurden mit 1 % Agarose aufgekocht und in die Gelelektrophorese-Kammer gefüllt. Die aufzutragenden DNA-Proben wurden mit 6 X Ladepuffer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) versetzt und in die Taschen des erstarrten und mit 1 X TAE-Puffer überschichteten Gels gefüllt. Die Kammer wurde so an eine Anode und Kathode angeschlossen, dass eine Wanderung der negativ geladenen DNA zur Anode im Agarosegel bei einer Spannung von 85 - 95 V möglich war. Für die Sichtbarmachung der Banden wurde das Gel mit 3 x GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain gefärbt. Der

dabei entstehende Komplex leuchtet bei Anregung mit Licht im UV-Bereich (254 nm), wobei die Intensität proportional zur DNA-Menge zunimmt. Anhand des eingesetzten Markers (GeneRuler 1 kb DNA ladder; Tab. 3) war es möglich die Fragmentgrößen abzuschätzen. Das Ergebnis konnte fotografisch festgehalten werden.

Für die Untersuchung kurzer Fragmente (< 250 bp) wurde für das Gel 2 % Agarose in 1 % TAE-Puffer eingewogen. Dadurch entstand ein feinmaschigeres Molekularsieb, sodass eine optimierte Auftrennung im Bereich kleiner Fragmente erfolgen konnte. Als Marker wurde die GeneRuler Low Range DNA-Ladder (Tab. 3) verwendet und das Gel bei 60 V für 1,5 Stunden laufen gelassen.

| Zusammensetzung des Gels | | 50 X TAE-Puffer | |
|---------------------------------|-----|------------------------|-------------|
| TAE-Puffer | 1 X | Tris | 242 g |
| Agarose | 1 % | EDTA (0,05 M) | 100 ml |
| | | Essigsäure (1 M) | 57,4 ml |
| | | dH ₂ O | auf 1000 ml |

2.3.5 Restriktionsverdau

Unter einem Restriktionsverdau versteht man die Modifikation von DNA mithilfe von Restriktionsendonukleasen, welche die Phosphodiesterbindung des DNA-Doppelstrangs an einer jeweils spezifischen Erkennungssequenz spalten. Auf diese Weise entstehen entweder glatte Enden oder durch versetztes Schneiden kohäsive Enden mit Nukleotid-Überhängen. Der Verdau wurde nach Herstellerangabe durchgeführt und die optimalen Bedingungen wurden zuvor mithilfe des Internetwerkzeugs Double-Digest (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) ermittelt. Alle Reaktionsansätze dieser Arbeit wurden in einem Volumen von 25 - 50 µl durchgeführt, das Puffersystem wurde der jeweiligen Restriktionsendonukleasen entsprechend angepasst und es wurde insgesamt für 1 - 4 Stunden inkubiert. Gegebenenfalls wurde 30 min vor Ende der Inkubation die Reaktion verstärkt, indem zusätzlich 50 % der Anfangsenzymmenge hinzugegeben wurden.

Für die Weiterverwendung der geschnittenen Fragmente, beispielsweise für Ligationen, wurden diese mit dem GeneJET™ PCR Purification Kit (Tab. 2) aufgereinigt.

Um die Wahrscheinlichkeit einer Religation der Vektorgerüste zu verringern, wurde 30 min vor Ende des Restriktionsverdaus die alkalische Phosphatase FastAP (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) eingesetzt, welche das DNA-Rückgrat an seinem 5'-Ende dephosphoryliert.

2.3.6 Ligation

Nach der Aufreinigung der modifizierten DNA-Fragmente und Vektor-Gerüste nach dem Restriktionsverdau (Tab. 2), konnten diese mithilfe des Enzyms T4 DNA-Ligase ligiert werden. Das Enzym katalysiert die kovalente Bindung zwischen dem 3'-OH-Ende und dem 5'-Phosphatende des DNA-Rückgrats unter ATP-Verbrauch. Dies war möglich, da die während des Verdaus entstandenen Schnittenden des DNA-Fragments und des Vektors miteinander kompatibel waren.

Zusammensetzung des Ligationsansatzes:

| | µl Ansatz⁻¹ |
|--|-------------------------------|
| DNA-Fragment (verdaut und aufgereinigt) | 12 µl |
| Vektor-Gerüst (verdaut und aufgereinigt) | 4 µl |
| PEG 4000 | 1 µl |
| 10 x T4 Ligase Puffer | 2 µl |
| T4 Ligase (5 U µl ⁻¹) | 1 µl |
| Gesamt | 20 µl |

Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C.

2.3.7 Sequenzierung

Sequenzierungen wurde von der StarSEQ GmbH (Mainz, Deutschland) durchgeführt.

Zusammensetzung des Sequenzieransatzes:

| | µl Ansatz⁻¹ |
|------------------------------------|-------------------------------|
| DNA | 1 |
| Primer (10 pmol µl ⁻¹) | 1 |
| rH ₂ O | 5 |
| Gesamt | 7 µl |

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

2.3.8 Transformation in *E. coli* DH5α mittels Hitzeschock

Die Transformation dient dem Plasmid-Transfer in kompetente Bakterienzellen und erfolgte in dieser Arbeit im Fall von *E. coli* DH5α durch einen Hitzeschock.

Vor der Transformation wurde die Hitze-sensitive Ligase im Ligationsansatz durch Inkubation für 5 min bei 65 °C inaktiviert. Anschließend wurden 10 µl kompetente *E. coli* DH5α-Zellen (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) mit 2-10 µl Ligationsansatz zusammengeführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C mit anschließender Inkubation für 5 min auf Eis. Über die Permeabilisierung der Membran wurden die Plasmide aufgenommen. 1 ml LB-Medium wurde hinzugegeben und nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C wurden 100 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit Kanamycin aufgetragen. Zusätzlich wurden die übrigen 900 µl abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen in 100 µl Medium resuspendiert und ebenfalls auf LB-Agarplatten mit Kanamycin aufgetragen. Die Platten wurden über Nacht zusammen mit geeigneten Kontrollen bei 37 °C inkubiert.

2.3.9 Transformation in *G. oxydans* mittels Elektroporation

Anders als bei *E. coli*, erfolgte die Transformation von *G. oxydans* mittels Elektroporation (modifiziert nach Mostafa *et al.* 2002 und Choi *et al.* 2006). 50 ml YM-Flüssigmedium wurden zuvor 1,5 %ig mit einer Vorkultur mit hoher Zelldichte inokuliert. Diese Hauptkultur wurde bis zu einer OD_{600nm} von 0,8 - 0,9 kultiviert. 4 ml Kultur wurden anschließend für 5 min bei 13000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wurde zweimal mit 1 ml 1 mM HEPES (steril, kalt) gewaschen (13000 x g, 2 min, 4 °C). Anschließend wurde das Pellet in 40 µl 1 mM HEPES resuspendiert und mit 10 µl 75 % Glycerol (steril, kalt) versetzt. Es erfolgte eine Zugabe von 2 - 4 µl des zu transformierenden Plasmids (50 – 100 ng). Die Suspension wurde luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette (Elektrodistanz 1 mm; Bio-Budget Technologies, Krefeld, Deutschland) überführt und für 4 – 5 ms bei einer Pulskontrolle von 200 Ω einer Spannung von 2,2 kV ausgesetzt. Für die Regeneration der Zellen wurden diese in ein 15 ml Falcon überführt, mit 1 ml EP-Medium versetzt und über Nacht bei 30 °C und 180 rpm regeneriert. Anschließend wurden 100 µl der Zellen auf eine YM-Agarplatte mit Cefoxitin und Kanamycin ausplattiert. Die übrigen 900 µl der Kultur wurden zentrifugiert, die Zellen in 100 µl Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert.

EP-Medium (Elektroporationsmedium)

| | |
|--|-------------|
| Mannitol | 80 g |
| Hefeextrakt | 15 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 2,5 g |
| Glycerol | 0,5 g |
| CaCl ₂ | 1,5 g |
| dH ₂ O | auf 1000 ml |

Der gewünschte pH-Wert von 6 wurde mit HCl eingestellt. MgSO₄ und CaCl₂ wurden 100-fach konzentriert angesetzt, sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

2.3.10 Triparentale Konjugation

Neben der Elektroporation stellte in dieser Arbeit die triparentale Konjugation eine Möglichkeit zur Einschleusung von Vektoren in *G. oxydans* und *G. oxydans* Δ*tolB* dar. Bei dieser Form der Übertragung wird der Helferstamm *E. coli* K12 HB101 pRK2013 verwendet. Dieser Stamm besitzt ein selbstübertragbares Plasmid, welches die notwendigen *tra*-Gene kodiert, durch die *in trans* die Übertragung des mobilisierbaren Vektors aus *E. coli* DH5α in den gewünschten Rezipienten möglich ist.

E. coli K12 HB101 pRK2013 und *E. coli* DH5α, welcher das zu übertragende Plasmid trug, wurden bis zu einer OD_{600nm} von 0,8 und der *G. oxydans* – Rezipientenstamm bis zu einer OD_{600nm} von 2,0 kultiviert. Je 1 ml der Kulturen wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml YM-Medium + 10 mM NaCl gewaschen. Nach Zentrifugation bei 8000 rpm für 5 min wurde der Überstand verworfen, es erfolgte eine erneute Resuspension in 1 ml YM-Medium + 10 mM NaCl. Je 200 µl wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und resuspendiert. 200 µl dieser Suspension wurden anschließend auf einen Zellulosefilter aufgetragen, der auf einer YM-Medium + 10 mM NaCl-Agarplatte auflag. Es erfolgte eine Inkubation

über Nacht bei 30 °C. Der Filter wurde in ein steriles Röhrchen überführt und mit 1 ml YM-Medium überschichtet, sodass ein Resuspendieren der Zellen erfolgte. Die Zellsuspension wurde bei 8000 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Residualvolumen resuspendiert und auf YM-Agarplatten, welche Cefoxitin und Kanamycin enthielten, aufgetragen und bis zur sichtbaren Bildung von Kolonien bei 30 °C inkubiert. Für schwierige Vektorübertragungen wurden die Agarplatte, auf der der Filter auflag, ohne Filter für drei weitere Tage bei RT inkubiert, der entstandenen Zellrasen entnommen und in 1 ml YM-Medium resuspendiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 8000 rpm für 2 min und ein Ausplattieren des Pellets auf YM-Agarplatten mit Cefoxitin und Kanamycin.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Produktion und Reinigung von Proteinen

2.4.1.1 Heterologe Produktion von Proteinen in *G. oxydans* und *E. coli*

Für die heterologe Expression und Produktion von Proteinen wurden die unter Tab. 6 genannten Vektoren verwendet. Die auf dem pBBR1-Vektor basierenden Expressionssysteme wurden sowohl für die Produktion in *E. coli* DH5 α und *E. coli* BL21, als auch *G. oxydans* verwendet. Alle pASK-IBA5-basierten Systeme dienen ausschließlich der induzierbaren Proteinproduktion in *E. coli* BL21. Diese Produktion erfolgte, sofern nicht anders angegeben, unter Standardbedingungen für den jeweiligen Organismus in einem Kulturvolumen von einem Liter. Die Zellernte erfolgte in der späten exponentiellen Phase bei einer OD_{600nm} von 0,8 – 1,5.

2.4.1.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Für den Aufschluss von Zellen wurden diese in 10 ml Puffer W (100 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl pH 8) resuspendiert und es wurden 5 μ l Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Zellyse mittels Ultraschall (Branson Sonifier Cell Disruptor und Branson Ultra Sonics Konverter, Danbury, USA), wobei ein Zeitintervall von 20 min und eine Amplitude von 50 % gewählt wurden. Zum Schutz der Proteine erfolgte währenddessen eine Kühlung des Lysats (Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württ, Deutschland). Zur Entfernung verbliebener intakter Zellen erfolgte eine Klärung des Lysats durch Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 x g für 10 min.

2.4.1.3 Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung wurde in dieser Arbeit für die Trennung des extrazellulären Raums, der Periplasmafraktion und der Cytoplasmafraktion voneinander angewandt, um auf diese Weise die Lokalisation sowie die Aktivitätsverteilung von Enzymen innerhalb der Kompartimente zu analysieren. Für die Fraktionierung wurde eine Hauptkultur in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet (8000 rpm, 20 min, RT) und der Kulturüberstand entnommen. Diese Fraktion entsprach dem extrazellulären Raum. Das Zellpellet wurde anschließend mit Medium gewaschen. Um die Verteilung der Gesamtaktivität berechnen zu können, war die Kenntnis über die exakten Volumina der Kompartimente notwendig. Die periplasmatische Fraktion wurde nach einer modifizierten Methode nach

Tsukada und Perlman 1972 gewonnen, beruhend auf dem Prinzip des osmotischen Schocks. Dazu wurde das Zellpellet bei RT für 20 min in 25 mM Tris-HCl-Puffer pH 6,8 resuspendiert, welcher zusätzlich 0,5 mM EDTA und 20 % Saccharose enthält. Es erfolgte ein Zentrifugieren der Zellen und Resuspendieren in 50 ml eiskalter 5 mM MgCl₂-Lösung. Zusätzlich wurde aufgrund des Zellmembranlysisierenden Effekts 6,25 µg ml⁻¹ Polymyxin B hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis wurden die verbliebenen Sphäroplasten für 30 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Die Periplasmafraktion der Zellen befand sich nun im Überstand. Die Sphäroplasten selbst, welche die Cytoplasmafraktion enthielten, wurden mittels Ultraschall lysiert und durch Zentrifugation geklärt (2.4.1.2).

2.4.1.4 Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Diese Methode basiert auf der Bindung an rekombinant produzierte Proteine fusionierten Strep-Tags an immobilisiertes Streptactin, was die Aufreinigung dieser Proteine ermöglicht. Beim Strep-Tag handelt es sich um ein künstliches Oligopeptid mit der Aminosäuresequenz WSHQFEK, welche eine starke Affinität zum Streptactin-Säulenmaterial (immobilisiertes Strep-Tactin) besitzt. In dieser Arbeit wurde im Fall der pBBR1-basierten Expressionssysteme eine verlängerte Strep-Tag-Sequenz verwendet, da so die Wahrscheinlichkeit einer suboptimalen Aufreinigung durch Einfaltung des Tags verringert ist (Zeiser *et al.* 2014). Für die Aufreinigung der Strep-Tag-fusionierten Proteine wurde das per Zentrifugation geklärte Zelllysats in eine Polypropylensäule (Quiagen, Hilden, Deutschland) gefüllt, welche ein Säulenbett bestehend aus 1 ml Streptactin-Sepharose (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland) enthält. Alle verwendeten Puffer wurden zum Schutz der Proteine gekühlt und die Aufreinigung erfolgte bei 4 °C. Nach Zugabe des Lysats erfolgte eine Inkubation für 5 min. Anschließend wurde die Säule mit 3 x 5 Säulenbettvolumina (CV) Puffer W (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8) gewaschen und die Zielproteine wurden nachfolgend durch Zugabe von 5 x 0,5 CV Puffer E (Puffer W + 2,5 mM D-Desthiobiotin) von der Säule eluiert. Die Regeneration der Säule erfolgte durch Zugabe von 3 x 5 CV Puffer R (Puffer W + 1 mM HABA).

Die Aufreinigung von Strep-Tag-fusionierten Exoproteinen aus den Kulturüberständen erfolgte direkt durch kontrollierte Gabe des gesamten Überstandes über eine affinitätschromatographische Säule. Alternativ wurden diese Exoproteine durch Einengen des Kulturüberstands mittels Vivaspin-Membranfiltrationsröhrchen mit einer Ausschlussgröße von 3000 Da (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) und anschließender Affinitätschromatographie aufgereinigt.

2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

2.4.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford 1976

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde in dieser Arbeit hauptsächlich nach Bradford 1976 durchgeführt. Dieser Test beruht auf der Eigenschaft des Bestandteils Coomassie Brilliant Blue G-250, bei niedrigen pH-Werten Komplexbindungen mit hydrophoben und kationischen Proteinseitenketten eingehen zu können. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum dieses Triphenylmethanfarbstoffs beim Übergang zur anionischen Form von 470 nm nach 595 nm und kann bei dieser Wellenlänge gemessen werden. Die Absorptionsintensität ist proportional zur Anzahl unpolarer und kationischer

Seitenketten und somit weitgehend proportional zur Proteinkonzentration. Anhand der gemessenen Absorption bei 595 nm und der von der Kalibriergeraden abgeleiteten Geradengleichung lässt sich die Proteinkonzentration der Probe ermitteln. Für die Erstellung einer Kalibriergeraden wurden Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Rinderserumalbumin (BSA) zwischen 0 und 1 mg ml⁻¹ erstellt, im Verhältnis 1:50 mit Bradford-Reagenz versetzt und 10 min unter Lichtausschluss inkubiert. Es erfolgte eine Messung der Proben bei 595 nm gegen den Leerwert, bei dem die Probe durch Puffer W ersetzt wurde. Nach Auftragung der Absorptionswerte gegen die korrespondierende BSA-Konzentration ließ sich eine Geradengleichung ermitteln. Die Änderung der Absorption bei 595 nm wurde in 1 ml Kunststoffküvetten mittels Photometer (Helios-Epsilon der Firma Thermo Scientific, Waltman, USA) gemessen.

2.4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test

Der BCA-Test basiert auf der Proteinbestimmung mittels Biuret-Methode (Gornall *et al.* 1949; Itzhaki und Gill 1964). Bei dieser bilden sich in Anwesenheit von Proteinen violette Komplexe aus einwertigen Kupferionen und Bicinchoninsäure (BCA). Für die photometrische Messung bei 550 nm wurde das Plattenlesegerät Nano Quant infinite M200 der Firma Tecan (Crailsheim, Deutschland) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in Mikrotiterplatten mit einem BCA Protein Assay Kit (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangabe. Analog zur Proteinbestimmung nach Bradford wurde zur Berechnung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test zunächst eine Kalibriergerade auf Grundlage definierter BSA-Konzentrationen angelegt.

2.4.3 Visualisierung von Proteinen

2.4.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung linearisierter und denaturierter Proteine auf Grundlage des Molekulargewichts wurde die SDS-PAGE nach Laemmli 1970 durchgeführt. Bei dieser Methode lagert sich das Detergens SDS an die aufzutrennenden Proteine an und bewirkt einen negativen Ladungsangleich. Nach Anlegen einer Spannung findet eine Migration der Proteine durch die Gelmatrix in Richtung Anode statt, wobei kleine Proteine eine höhere Laufgeschwindigkeit zeigen als große Proteine. Mithilfe eines Markers ist auf diese Weise eine Abschätzung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine möglich. In dem verwendeten diskontinuierlichen Gel betrug die Acrylkonzentration des Sammelgels 5 % und die des Trenngels 12,5 %. Ammoniumpersulfat diente als Polymerisationsinitiator für die Gelbildung und TEMED fungierte als Katalysator der Reaktion. Vor der Beladung des Gels wurden die Proben 1:1 mit Ladepuffer (0,05 % β -Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau, 50 % Glycerin) versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Als Marker diente die PageRuler Prestained Protein ladder (Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland). Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Gelkammern (Bio-Rad, München, Deutschland). Dabei wurde für den Lauf durch das Sammelgel eine Spannung von 60 V und die Auftrennung durch das Trenngel eine Spannung von 90 V angelegt.

| | 12,5 % Trenngel | 5 % Sammelgel |
|--------------------|-----------------|---------------|
| Acrylamidlösung | | |
| Rotiphorese Gel 40 | 2 ml | 250 µl |
| Trenngelpuffer | 1,2 ml | - |
| Sammelgelpuffer | - | 400 µl |
| SDS-Lösung (0,5 %) | 1,2 ml | 400 µl |
| rH ₂ O | 1,6 ml | 950 µl |
| TEMED | 5 µl | 5 µl |
| APS-Lösung (10 %) | 30 µl | 30 µl |

Trenngelpuffer

Tris Base 22,77 g
 rH₂O auf 100 ml
 Es erfolgte eine Einstellung des pH-Werts auf 8,8 durch HCl-Zugabe.

Sammelgelpuffer

Tris Base 7,57 g
 rH₂O auf 100 ml
 Es erfolgte eine Einstellung des pH-Werts auf 6,8 durch HCl-Zugabe.

0,5 % SDS-Lösung

SDS 0,5 g
 rH₂O auf 100 ml

10 % APS-Lösung

APS 0,1 g
 rH₂O auf 1 ml

1x Elektrodenpuffer

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

Ladepuffer

Sammelgelpuffer 2,0 ml
 1 % Bromphenolblau in Ethanol 0,1 ml
 2-Mercaptoethanol 0,5 ml
 Glycerin 5,0 ml
 rH₂O auf 10 ml

2.4.3.2 Silberfärbung

Eine Möglichkeit der Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen ist die Silberfärbung, modifiziert nach Blum *et al.* 1987. Das Grundprinzip dieser Methode beruht auf der Anlagerung von Silberionen an Proteine und einer anschließenden Reduktion der Ionen zu elementarem Silber. Im Vergleich zu anderen Färbemethoden zeichnet sich die Silberfärbung durch eine besonders hohe Sensitivität mit einer Nachweisgrenze von etwa 0,1 ng bis 1 ng aus. Für die Färbung wurde das SDS-Gel zunächst für 20 min in Fixierlösung zur Präzipitation der Proteine inkubiert und anschließend 10 min mit 50 % Methanol überschichtet. Es folgte ein Waschen des Gels für 10 min mit rH₂O sowie eine Inkubation für 1 min in Thiosulfatlösung zur Sensitivitäts- und Kontrasterhöhung. Nach zwei weiteren Waschschritten für 1 min mit rH₂O wurde die Imprägnierung des Gels für 20 min im Dunkeln bei 4 °C mit Imprägnierlösung durchgeführt. Dabei findet eine Anlagerung der Silberionen an die negativ

2 Material und Methoden

geladenen Seitenketten der Proteine statt. Anschließend wurde das Gel mit Entwicklerlösung überschichtet um eine Reduzierung der Silberionen zu elementarem Silber durch Formaldehyd zu ermöglichen. Die Reaktion wurde mit Stopplösung gestoppt und das Ergebnis photographisch festgehalten.

Fixierlösung

| | |
|--------------------|-------------|
| Methanol | 500 ml |
| Essigsäure (100 %) | 120 ml |
| Formaldehyd (37 %) | 0,5 ml |
| rH ₂ O | auf 1000 ml |

50 % Methanol

| | |
|-------------------|-----------|
| Methanol | 25 ml |
| rH ₂ O | auf 50 ml |

0,02 % Thiosulfatlösung

| | |
|--|-----------|
| Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O | 0,01 g |
| rH ₂ O | auf 50 ml |

Imprägnierlösung

| | |
|--------------------|-----------|
| AgNO ₃ | 0,1 g |
| Formaldehyd (37 %) | 0,037 ml |
| rH ₂ O | auf 50 ml |

Entwicklerlösung

| | |
|--|-----------|
| Na ₂ CO ₃ | 3 g |
| Formaldehyd (37 %) | 0,025 ml |
| Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O | 0,004 g |
| rH ₂ O | auf 50 ml |

Stopplösung

| | |
|-------------------|-----------|
| Eisessig | 2,5 ml |
| rH ₂ O | auf 50 ml |

2.4.3.3 Westernblot

Der Westernblot oder Immunoblot (Towbin *et al.* 1979) dient dem indirekten Nachweis von Proteinen. Hierzu werden diese zunächst im elektrischen Feld von einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend erfolgt eine Visualisierung der Proteine durch Zugabe von Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörpern, deren Epitop der Strep-Tag der rekombinanten und auf der Membran immobilisierten Proteine ist. Durch die Zugabe des Chromogens 4-Chloro-1-naphthol und Wasserstoffperoxid entsteht mithilfe der Peroxidase das farbige Oxidationsprodukt 4-Chloro-1-naphthon, das die Lokalisation der Strep-Tag-fusionierten Proteine auf der Nitrozellulosemembran ermöglicht. Verwendet wurde ein Mini-Semidry-Blot (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) und eine 4,5 µM Nitrocellulosemembran der Firma Bio-Rad (München, Deutschland). Der Proteintransfer erfolgte für 40 Minuten bei 15 V.

Towbinpuffer

| | |
|-------------------|------------|
| Tris Base | 1,52 g |
| Glycin | 7,2 g |
| Methanol | 100 ml |
| dH ₂ O | auf 500 ml |
| pH-Wert 8,3 | |

Die Membran wurde nach dem Transfer der Proteine in 20 ml Blockierlösung für 1 h inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken und so Hintergrundreaktionen zu minimieren. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen der Membran für 5 min mit 20 ml PBS-Tweenpuffer und eine Inkubation für 1 h in 20 ml PBS-Tweenpuffer, welcher 5 µl *StrepMAB-Classic* enthielt (IBA, Göttingen). Es folgten zwei Waschschrte mit 20 ml PBS-Tweenpuffer und zwei Waschschrte mit 20 ml PBS-Puffer für je 1 min. Abschließend wurde die Membran mit 20 ml PBS-Puffer, 20 µl Wasserstoffperoxid-Lösung sowie 200 µl Substratlösung überschichtet und bis zur sichtbaren Reaktion im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline)

| | |
|----------------------------------|---------|
| NaCl | 8 g |
| KCl | 0,2 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 0,256 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2g |
| dH ₂ O | auf 1 l |
| pH-Wert 7,4 | |

PBS-Blockierlösung

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

PBS-Tween-Puffer

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

Chloronaphthollösung

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

Wasserstoffperoxidlösung

30 % (v/v) H₂O₂

2.4.3.4 Gelfiltration mittels FPLC (fast protein liquid chromatography)

Die Gelfiltration stellt eine geeignete Methode dar, um Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Dabei findet eine Migration dieser durch eine Säulenmatrix bestehend aus Dextran und Agarose statt, wobei kleine Proteine durch die vorhandenen Poren der Matrix eine Retention erfahren und somit langsamer eluieren als größere Proteine. In dieser Arbeit wurde eine 120 ml (V_i) Superdex200 Säule (GE

Healthcare, München) sowie ein ÄktaPurifier System verwendet. Als Laufmittel diente ein 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7, welcher zusätzlich 150 mM NaCl enthielt. Die Flussrate lag bei allen Läufen bei $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, die Fraktionsgröße betrug 1 ml und das Volumen der Probenschleife 2 ml. Über die Gerätespezifische Software Unicorn konnte der Absorptionsverlauf bei 280 nm aufgezeichnet werden. Anhand einer Kalibriergeraden und des K_{AV} -Werts konnte anschließend das native Molekulargewicht des Proteins bestimmt werden. Der K_{AV} -Wert berechnet sich nach Formel 4.

Formel 4: Berechnung des K_{AV} -Werts. V_e stellt das Elutionsvolumen dar, V_0 das Leervolumen und V_t das Totalvolumen der Säule.

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

2.4.4 Nachweis von Enzymaktivitäten

2.4.4.1 DNSA-Test zur quantitativen Bestimmung reduzierender Zucker

Die Hydrolyse von Polysacchariden, Oligosacchariden und Disacchariden ist häufig mit der Zunahme von reduzierenden Aldehydgruppen im Reaktionsansatz verbunden. In Anwesenheit von Phenol und Na_2SO_3 wird 3,5-Dinitrosalizylsäure durch diese reduzierenden Enden zu 3-Amino-5-nitrosalizylsäure reduziert, was wiederum bei einer hohen Temperatur zu einer Farbreaktion von gelb über orange nach braun führt (Sumner und Graham 1921). Dieser Farbumschlag kann bei einer Wellenlänge von 640 nm quantifiziert werden und verhält sich in der Intensität proportional zur Menge reduzierender Zucker. Anhand einer zuvor erstellten Kalibriergeraden mit einer bekannten Konzentration des entstehenden Zuckers lassen sich somit mit dem DNSA-Test Rückschlüsse auf hydrolytische Enzymaktivitäten mit natürlichen Substraten ziehen.

In dieser Arbeit wurde für die Untersuchung von TreA und SacC ein Reaktionsansatz mit an die jeweiligen Enzyme angepassten und in den entsprechenden Kapiteln beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Zur Bestimmung der Konzentration an reduzierenden Zuckern wurde nach bestimmten Zeitintervallen jeweils 50 μl aus dem Reaktionsansatz entnommen und 1:10 mit rH_2O verdünnt. Diese 500 μl wurden mit 500 μl DNSA-Reagenz in einem Eppendorfgefäß für 12 min bei 100°C erhitzt und anschließend für 15 min auf Eis gekühlt. Es erfolgt eine photometrische Bestimmung der Absorption bei 640 nm.

DNSA-Reagenz

| | |
|---|---------|
| Dinitrosalizylsäure | 10 g |
| Phenol | 2 ml |
| Na_2SO_3 | 0,5 g |
| Kalium-Natrium-Tartrat | 200 g |
| NaOH | 10 g |
| dH_2O | auf 1 l |
| Lagerung bei 4°C unter Lichtausschluss | |

2.4.4.2 HPLC: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

In dieser Arbeit wurde sowohl die enzymatische Hydrolyse von natürlichen Substraten als auch die bei Wachstumsexperimenten entstehenden Produktspektren mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Diese Analyse erfolgte durch eine HPLC-Anlage der Firma Knauer (Berlin, Deutschland) unter Verwendung einer Aminex-HPX87H-Säule (300 x 7,8 mm) der Firma Bio-Rad (München, Deutschland). Sowohl die geklärten Kulturüberstände als auch Proben der enzymatischen Reaktionsansätze wurden vor der Applikation mit dem Laufmittel verdünnt und zentrifugiert. Als Laufmittel diente 5 mM H₂SO₄, die Flussrate betrug 0,3 ml min⁻¹ und die Messung erfolgte bei Raumtemperatur oder 65 °C. Für die Zuordnung der entsprechenden Signale wurden zuvor Standards in bekannter Konzentration eingesetzt und über diese eine Kalibriergerade erstellt.

2.4.4.3 Berechnung von Enzymaktivitäten

Sofern nicht anders angegeben, werden in dieser Arbeit Aktivitäten in Units (U) ausgedrückt, wobei 1 U der Umsetzung von 1 µmol Substrat min⁻¹ entspricht. Die Volumenaktivität (U ml⁻¹) innerhalb eines Reaktionsansatzes wurde entsprechend nach Lambert-Beer berechnet und ist in Formel 5 dargestellt.

Formel 5: Berechnung der Volumenaktivität U ml⁻¹. ΔE min⁻¹ entspricht der Extinktionsänderung pro Minute, d der Schichtdicke (cm), ε dem Extinktionskoeffizienten (mM⁻¹ cm⁻¹), V dem Gesamtvolumen (ml) und v dem Volumen der Enzymlösung (ml).

$$U \text{ ml}^{-1} = \frac{\Delta E \text{ min}^{-1} * V}{d * \epsilon * v}$$

Für die Berechnung der spezifischen Aktivität wurde dieser Wert durch die Proteinkonzentration (mg ml⁻¹) geteilt, sodass die Aktivität die Umsetzung von 1 µmol Substrat pro Minute und mg Enzym beschreibt (U min⁻¹ mg⁻¹). Die Wechselzahl K_{cat} beschreibt die Substratumsetzung pro Enzym und Sekunde und lässt sich mit Formel 6 berechnen.

Formel 6: Berechnung der Wechselzahl K_{cat} (s⁻¹) und der katalytischen Effizienz K_{cat} K_M⁻¹ (s⁻¹ mM⁻¹). Um die Wechselzahl zu erhalten, muss zunächst die spezifische Aktivität in µmol pro Sekunde und mg Protein berechnet werden. Durch Dividieren dieses Werts durch die Stoffmenge eines Milligramms des eingesetzten Proteins erhält man den Wert K_{cat} (s⁻¹).

$$K_{cat} (s^{-1}) = \frac{\left(\frac{\text{Spezifische Aktivität in } \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}}{60} \right)}{\text{Enzyms in } \mu\text{mol mg}^{-1}}$$

Die katalytische Effizienz K_{cat} K_M⁻¹ (s⁻¹ mM⁻¹) ergibt sich durch Division der Wechselzahl durch den zuvor bestimmten K_M-Wert. Der K_M-Wert gibt die Substratkonzentration an, bei der ein Enzym die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Je höher die Wechselzahl K_{cat} und je niedriger der K_M-Wert eines Enzyms ist, umso größer ist die katalytische Effizienz.

2.4.4.4 Enzymatische Reinheitskontrolle nach Zellfraktionierung

Die enzymatische Reinheitskontrolle der verschiedenen Zellkompartimente nach der Zellfraktionierung von *G. oxydans* erfolgte durch Messung der Aktivitätsverteilung des nativ im Cytoplasma lokalisierten Enzyms Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Gox0145) und der periplasmatischen sauren Phosphatasen (Gox0994 und Gox1076). Die Detektion der Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase erfolgte bei RT und 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) mit einem Jasco V-600 Spektrophotometer (Jasco, Gross-Umstadt, Germany). Die Daten wurden mithilfe der Spectra Manager III Software ausgewertet. Auch im Fall der sauren Phosphatase wurde dieser Geräteaufbau verwendet, jedoch wurde die Abspaltung von *p*-Nitrophenol vom chromogenen Substrat *p*-Nitrophenylphosphat photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm detektiert.

Nachweis Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase:

| Zusatz | μl | Finale Konzentration |
|--------------------------------|---------------|----------------------|
| NADP ⁺ (25 mM) | 10 | 0,25 mM |
| Glukose-6-Phosphat (0,5 M) | 5 | 2,5 mM |
| Zellfraktion | 10 | |
| Tris-HCl-Puffer pH 7,5 (50 mM) | 975 | |
| Gesamt: | 1000 | |

Nachweis saure Phosphatase

| Zusatz | μl | Finale Konzentration |
|---------------------------------------|---------------|----------------------|
| <i>p</i> -Nitrophenylphosphat (50 mM) | 100 | 5 mM |
| Zellfraktion | 100 | |
| Tris-HCl-Puffer pH 5,8 (50 mM) | 800 | |
| Gesamt: | 1000 | |

2.4.4.5 Enzymatischer Nachweis von 2-Ketoglukonat

In dieser Arbeit wurde das Produktspektrum bei einem Wachstum verschiedener Stämme mit unterschiedlichen Sacchariden als Substrat mittels HPLC analysiert. Für einen zusätzlichen enzymatischen Nachweis der Bildung von 2-Ketoglukonat wurde ein Testsystem basierend auf der 2-Ketoglukonat-Reduktase aus *G. oxydans*, kodiert durch *gox0417*, angewendet (Rauch *et al.* 2010). Die Abnahme von NADPH wurde bei RT und 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) gemessen.

Nachweis 2-Ketoglukonat:

| Zusatz | µl | Finale Konzentration |
|--|-------------|-------------------------|
| Gox0417 (0,5 mg ml ⁻¹) | 5 | 2,5 µg ml ⁻¹ |
| NADPH (25 mM) | 5 | 250 µM |
| Probe | 10 | |
| Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,5 (40 mM) | 980 | |
| Gesamt: | 1000 | |

2.4.4.6 Enzymatischer Nachweis von alkalischer Phosphatase

Das Prinzip dieser Methode ist angelehnt an den β-Galaktosidase-Test nach Miller 1972 und modifiziert nach Brickman und Beckwith 1975. Der Test beruht auf der Hydrolyse von *para*-Nitrophenylphosphat (*p*-NPP) zu *para*-Nitrophenol und anorganischem Phosphat durch die alkalische Phosphatase. Bei dieser Reaktion erfolgt einen Farbumschlag von farblos zu gelb, welcher aus der Bildung von *para*-Nitrophenol resultiert. Die Intensität der Gelbfärbung kann bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden und ist proportional zur umgesetzten Substratmenge.

Die alkalische Phosphatase liegt im Cytoplasma aufgrund der reduzierenden Bedingungen in einem inaktiven Zustand vor und nimmt erst im Periplasma eine aktive Konformation an (Hoffman und Wright 1985; Michaelis *et al.* 1983; Manoil und Beckwith 1985). Aus diesem Grund eignete sich das Enzym in dieser Arbeit als Reporterenzym, durch das eine Aussage über die Translokationseffizienz der verschiedenen Signalpeptide getroffen werden konnte.

Für die Aktivitätsmessung erfolgte zunächst eine Inkubation der Kultur bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 – 1. Anschließend wurden 100 µl dieser Kultur mit 900 µl 1 M Tris-HCl-Puffer pH 8 versetzt und die Reaktion mit dem Substrat *p*-NPP mit einer finalen Konzentration von 1 mM gestartet. Es erfolgte eine Inkubation bis zu einem sichtbaren Farbumschlag bei 30 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl 1 M K₂HPO₄ gestoppt und der Reaktionsansatz zur Entfernung der Zellen für zwei Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Als Leerwert diente der gleiche Reaktionsansatz, bei dem jedoch die Stopplösung vor dem Substrat hinzugefügt wurde.

Die Kalkulation der Miller-Einheiten (Miller 1972), definiert als umgesetztes Substrat pro Milliliter pro Minute bezogen auf die spezifische Zellmasse, erfolgte mithilfe von Formel 7 (Brickman und Beckwith 1975, modifiziert).

Der Nachweis einer Hydrolyse von chromogenen Nitrophenol-gekoppelten Zuckerderivaten erfolgte in dieser Arbeit photometrisch bei 405 nm und 30 °C.

Formel 7: Berechnung von Miller-Einheiten (MU).

$$Miller - Einheiten (MU) = \frac{(A_{405nm} * 1000)}{(OD_{600nm} * Zellvolumen (ml) * Zeit (min))}$$

2.4.4.7 Enzymatischer Nachweis von Endoxylanasen und Endoglukanasen

Um die enzymatische Aktivität von Endoxylanasen nachzuweisen, wurde ein Enzymtest basierend auf der Hydrolyse von Remazol-Brilliant-Blau gekoppeltem Birken-Xylan durchgeführt (Biely *et al.* 1988; Kosciow *et al.* 2016). Dazu wurden 250 µl der Zellkultur, einer Zellfraktion oder der aufgereinigten Proteine mit 250 µl 0,1 M Natriumacetat-Puffer pH 6,8 versetzt, welcher zusätzlich 11,5 mg ml⁻¹ RBB-Xylan enthielt. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Ethanol gestoppt und der Reaktionsansatz bei 13.000 x g für 2 min zentrifugiert. Über die Zunahme der Absorption des Überstandes bei 595 nm konnte auf eine hydrolytische Aktivität geschlossen werden, da sich die verkürzten, kovalent an RBB gekoppelten Xylan-Fragmente zunehmend schlechter durch den Entzug der Hydrathülle bei Ethanolzugabe ausfällen ließen.

Der Nachweis der Endoglukanase-Aktivität erfolgte analog dazu mit Remazol-Brilliant-Blau -gekoppelter Carboxymethylcellulose (Megazyme, Bray, Irland) als Substrat. 0,2 ml Enzymlösung oder Kultur wurden mit 0,2 ml Substratlösung versetzt und über einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml Präzipitatlösung wurde die Reaktion gestoppt und hochmolekulare Azo-CM-Cellulose mittels Zentrifugation bei 13.000 x g für 2 min präzipitiert. Wie auch im Fall von RBB-Xylan, ließ sich hier über eine Zunahme der Absorption des Überstandes bei 595 nm eine Aussage über die Aktivität der Endoglukanasen treffen.

Substratlösung:

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Azo-CM-Cellulose | 1 g |
| Natriumacetat-Puffer pH 6,8 (0,1 M) | 80 ml |
| Einrühren unter Wärmezufuhr, | |
| Lagerung bei 4 °C | |

Präzipitatlösung:

| | |
|-------------------------|----------------|
| Natriumacetat-Trihydrat | 40 g |
| Zink-Acetat | 4 g |
| dH ₂ O | 200 ml |
| pH 5 einstellen mit HCl | |
| Ethanol (95 %) | 800 ml |
| Gesamt: | 1000 ml |

3 Ergebnisse

Gluconobacter oxydans ist aufgrund seiner interessanten physiologischen Eigenschaften und der vielfältigen biotechnologischen und industriellen Einsatzmöglichkeiten ein Mikroorganismus, der im Fokus vieler molekularbiologischer Stammoptimierungen steht. Der Hauptteil dieser Optimierungsarbeiten befasst sich mit der Umsatzratensteigerung bestehender enzymatischer Prozesse (Meyer *et al.* 2013), der Biomassesteigerung durch Manipulation des intrazellulären Stoffwechsels (Kiefler *et al.* 2015) oder der Charakterisierung und Optimierung bisher unbekannter enzymatischer Eigenschaften für die Produktion neuartiger Verbindungen (Schweiger *et al.* 2008; Schweiger *et al.* 2010; Mientus *et al.* 2017).

Die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* stand bisher weitgehend im Hintergrund. Dabei stellt die selektive Anpassung des Organismus an die unvollständige Oxidation von Monosacchariden aus biotechnologischer und industrieller Sicht eine entscheidende Limitation dar. Durch diese Substratselektivität ist die direkte Nutzung von kostengünstigen und ressourcenschonenden Rohstoffen sowie die Entwicklung neuer Produktionsverfahren nicht möglich. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, *G. oxydans* die enzymatische Hydrolyse neuer Substrate zu ermöglichen. Der Schwerpunkt sollte dabei auf Di- und Polysacchariden liegen.

3.1 Entwicklung eines geeigneten Expressionssystems für die effiziente Produktion periplasmatischer Hydrolasen

Als ersten Schritt bei der Entwicklung eines Systems zur Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* galt es, die Nutzung von einfachen, kurzkettigen Zuckern zu ermöglichen. Das Molekulargewicht dieser Verbindungen musste dabei unterhalb der Ausschlussgröße der Pore der äußeren Membran liegen, um eine freie Diffusion der Substrate aus dem Medium in den periplasmatischen Raum zu ermöglichen (Nakae 1976; Welte *et al.* 1995). Es sind keine Transportsysteme für die Aufnahme von Di- und Oligosacchariden in *G. oxydans* bekannt, daher wurde die heterologe Produktion von verschiedenen Hydrolasen mit anschließender Sec-Transportweg-abhängiger Translokation in das Periplasma als geeignete Strategie für die Nutzung neuer Substrate durch den Organismus identifiziert. Der Sec-abhängige Proteintransport stellt bei Gram-negativen Bakterien einen von zwei weit verbreiteten Systemen für die Proteintranslokation über die Cytoplasmamembran dar. Der zweite Protein-Translokationsweg ist der Tat-abhängige Proteintransport. Proteine werden bei der Sec-Translokation im ungefalteten Zustand unter Begleitung spezifischer Targetingfaktoren mittels ATP-Verbrauch durch die Membran geschleust (Schatz und Beckwith 1990; Wickner *et al.* 1991). Für die Interaktion mit dem entsprechenden Transportprotein, der Translokase SecA, ist eine Signalsequenz am N-Terminus des zu translozierenden Proteins notwendig. Obwohl diese N-terminale Signalsequenz in der genauen Aminosäurezusammensetzung von Protein zu Protein variiert, besitzt sie einen konservierten Grundaufbau. Sec-Transport-vermittelnde

Signalsequenzen bestehen aus drei charakteristischen Bereichen, die als N-, H- und C-Region bezeichnet werden (Heijne 1985; Fekkes und Driessen 1999). Die N-Region ist mit einer Länge von 1 - 5 Aminosäuren kurz und zeichnet sich durch das Vorhandensein einer positiven Gesamtladung aus, welche für die Interaktion mit der Translokase SecA notwendig ist. Der mittlere Bereich, auch H-Region genannt, besitzt eine durchschnittliche Länge von 7 - 15 Aminosäuren und wird durch eine hohe Anzahl hydrophober Aminosäuren charakterisiert. Das Motiv für die Signalpeptidase zur Abspaltung der Signalsequenz nach erfolgreicher Translokation ins Periplasma findet sich im dritten Bereich, der C-Region. Es konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der Proteintranslokation *in vivo* von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. So kann ein polarer N-Bereich sowie eine stark hydrophobe H-Region den Proteintransport über die Cytoplasmamembran optimieren. Saure Aminosäuren im N-Bereich sowie eine fehlende Hydrophobizität in der H-Region hingegen setzen die Translokationsgeschwindigkeit stark herab (Vlasuk *et al.* 1983; Lehnhardt *et al.* 1988; Bosch *et al.* 1989; Puziss *et al.* 1989; Chou und Kendall 1990). Neben der Zusammensetzung der Primärsequenz hängt die Effizienz des Signalpeptids jedoch auch von der Art des zu translozierenden Proteins und dem jeweiligen Produktionsorganismus ab, sodass eine universelle Aussage über die Translokationseffizienz eines Signalpeptids nicht möglich ist (Heggeset *et al.* 2013).

Zur Konstruktion eines geeigneten Expressionssystems für die Produktion periplasmatischer Hydrolasen in *G. oxydans* wurden als Basis die beiden Vektoren pBBR1p264 und pBBR1p452 verwendet. Mit diesen Plasmiden konnte bereits eine erfolgreiche homo- und heterologe Produktion verschiedener Proteine im Cytoplasma von *G. oxydans* gezeigt werden (Kallnik *et al.* 2010; Meyer *et al.* 2013; Zeiser *et al.* 2014). Um eine Sec-abhängige Translokation der heterologen Hydrolasen in *G. oxydans* zu gewährleisten, erfolgte zunächst eine bioinformatische Analyse aller putativen Proteinkodierenden Regionen des Genoms dieses Organismus, einschließlich der fünf Plasmide pGox1-5 mittels SignalP 4.1 und Phobius (Käll *et al.* 2004; Petersen *et al.* 2011). Ziel war dabei die Identifizierung aller Sec-abhängigen Signalsequenzen für die Erstellung einer Signalpeptid-Bibliothek. Da diese Signalsequenzen aus *G. oxydans* stammten, war davon auszugehen, dass die Sequenzen auch bei der heterologen Proteinproduktion durch den Zielorganismus erkannt werden. Insgesamt wurden 240 potentielle Signalsequenzen identifiziert (Kosciow *et al.* 2014). Von diesen wurden sechs ausgewählt, von denen die vorhergesagte Proteinfunktion auf eine native periplasmatische Lokalisation hindeutete. Ein weiteres Kriterium für die Auswahl der Signalpeptide war eine Aminosäurezusammensetzung, die durch einen möglichst polaren N-Bereich sowie einen stark hydrophoben H-Bereich gekennzeichnet war. Durch diese Art der Signalsequenzwahl wurde das Risiko einer Nichterkennung des Signalpeptids durch *G. oxydans* ausgeschlossen. Zusätzlich wurde die Wahrscheinlichkeit einer verminderten Exportrate aufgrund einer ungünstigen Aminosäuresequenz minimiert.

Die Wahl fiel auf die Signalsequenzen von Gox0605, Gox0748, Gox0854, Gox0952, Gox2077 und Gox2219 (Kosciow *et al.* 2014). Neben diesen *G. oxydans*-spezifischen Sequenzen wurde auch das Signalpeptid der Pektatlyase B aus *Erwinia carotovora* ausgewählt, da sich dieses zuvor bei der Sekretion einer Vielzahl von Proteinen als geeignet erwies (Choi und Lee 2004; Mergulhao *et al.* 2005; Zeiser *et al.* 2014).

Das letzte bestehende und unvorhersehbare Risiko für die erfolgreiche heterologe Produktion periplasmatischer Hydrolasen war die mögliche Inkompatibilität zwischen der Signalsequenz und dem Zielprotein. Da die ideale Kombination nur durch experimentelle Analyse identifiziert werden kann, wurde das Expressionssystem so konzipiert, dass durch einen einfachen Klonierungsschritt sowohl das Zielgen als auch die Signalsequenz austauschbar waren (Abb. 3, Kosciow *et al.* 2014).

Bei der Amplifizierung der Signalsequenzen wurde in allen Fällen die native Ribosomenbindestelle an die für *G. oxydans* idealen Ribosomenbindestellen AGGAGG, AGGGGG, GGGGGG oder GGGAGG angepasst. Zusätzlich wurde ein idealer Abstand zum Startkodon von 7-12 Basen gewählt (Shine und Dalgarno 1974). Die optimierten Signalsequenzen konnten anschließend unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *SacI* stromabwärts der starken oder moderaten konstitutiven Promotorregion von pBBR1p264 und pBBR1p452 kloniert werden (Kosciow *et al.* 2014; Abb. 3). Stromabwärts der Signalsequenzen wurde das Gen *phoA* kloniert, welches die alkalische Phosphatase PhoA aus *E. coli* kodiert. Dieses Enzym diente als Reporter für die Analyse der Translokationseffizienz des jeweiligen Signalpeptids (Kosciow *et al.* 2014; Abb. 3). Die entstandenen Konstrukte wurden anschließend mittels Transformation in *E. coli* und *G. oxydans* eingebracht.

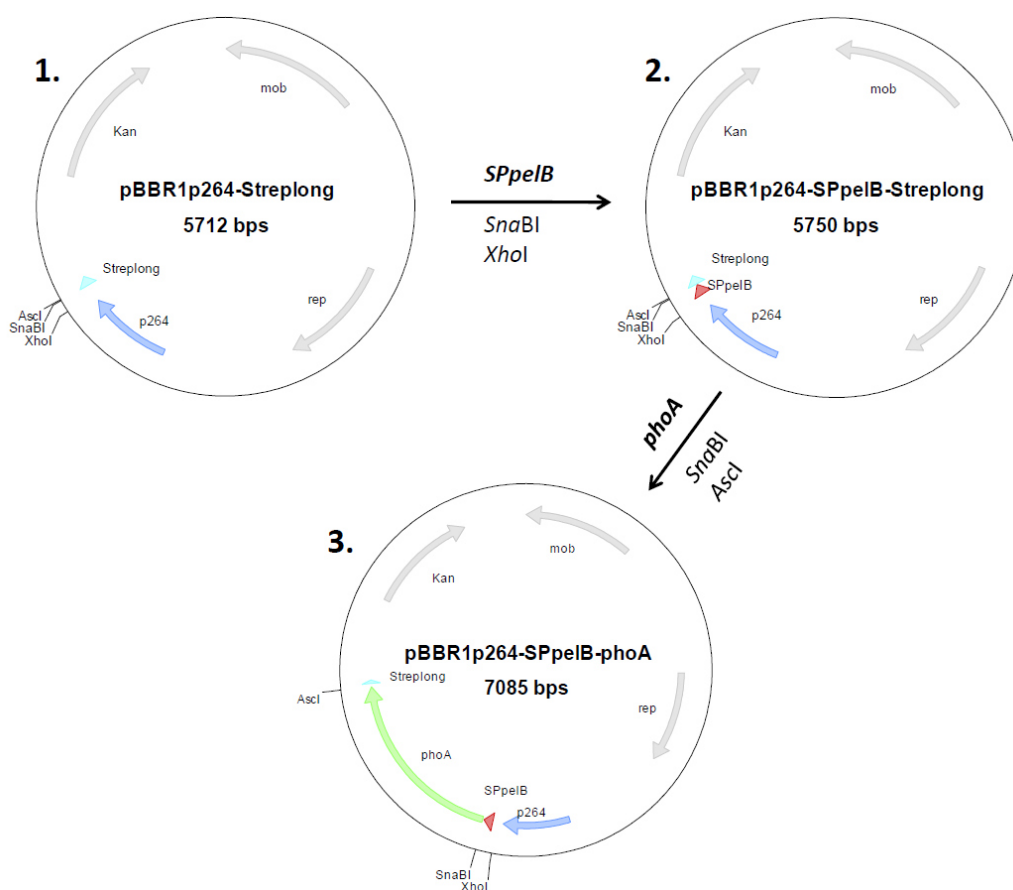


Abbildung 3: Strategie für die Generierung eines geeigneten Expressionssystems. Beim verwendeten Expressionssystem war sowohl die Signalsequenz (hier die Signalsequenz von *peIB*) als auch das stromabwärts liegende Gen (hier *phoA*) über einen einfachen Klonierungsschritt über die Schnittstellen *SnaBI/XhoI* und *SnaBI/AscI* austauschbar. Kan: Kanamycinresistenzkassette; rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion vom Gen *gox0264*; mob: Mobilisierungsgen; Streplong: Strep-Tag mit elongierter Linkerregion (Zeiser *et al.* 2014). Abbildung modifiziert nach Kosciow *et al.* 2014.

Beim Enzym PhoA handelt es sich um ein Reporterenzym, welches im Cytoplasma aufgrund der dort vorliegenden reduzierenden Bedingungen keine aktive dimere Konformation annehmen kann. So lässt sich nur im Fall einer erfolgreichen Translokation des Enzyms in das Periplasma eine Aktivität an intakten Zellen messen (Michaelis *et al.* 1983; Manoil und Beckwith 1985; Hoffman und Wright 1985; Boulanger und Kantrowitz 2003). Das chromogene, artifizielle Substrat von PhoA, *p*-Nitrophenylphosphat, kann aufgrund seiner niedrigen molekularen Masse durch die Porine der äußeren Membran diffundieren und so im Periplasma enzymatisch gespalten werden. Die daraus resultierende Farbreaktion ermöglicht anschließend eine Analyse der Effizienz der Proteintranslokation. Diese Effizienz lässt sich in Form von Miller-Einheiten ausdrücken (Tab. 8) und quantitativ vergleichen (Miller 1972; Brickman und Beckwith 1975). Die Translokationseffizienz hängt einerseits von der Sequenz des Signalpeptids ab, aber auch vom Expressionsorganismus und dem zu translozierenden Protein (Heggeset *et al.* 2013). Daher sind die mit dem Reporterenzym PhoA bestimmten Translokationseffizienzen nicht zwangsläufig auch auf andere Proteine übertragbar. Das Vorhandensein einer Signalsequenz-Bibliothek bietet somit Optimierungsmöglichkeiten im Hinblick auf eine bessere Proteintranslokation von künftig produzierten periplasmatischen Hydrolasen in *G. oxydans*.

Die Messungen der Translokationseffizienzen mittels PhoA-Nachweis erfolgten zunächst in *E. coli* DH5 α , um eine Funktionalität der erstellten Expressionssysteme zu überprüfen. Dabei zeigte der Vektor pBBR1p264-SP*pelB-phoA* mit 469 ± 137 Miller-Einheiten (MU) die stärkste gemessene PhoA-Aktivität an intakten Zellen, gefolgt von pBBR1p264_SP*gox2219-phoA* mit 449 ± 104 MU. Eine deutlich geringere Aktivität wurde mit dem SP*gox0952*-enthaltenden System gemessen (55 ± 4 MU), gefolgt durch den Expressionsvektor, der die Signalsequenz von Gox0605 beinhaltet (38 ± 4 MU). Bei allen übrigen Konstrukten, welche den starken Promotor p264 aufwiesen, war die gemessene Aktivität mit weniger als 10 MU sehr niedrig (Tab. 8) und lag im Bereich der Negativkontrolle pBBR1p264-*phoA.strep*. Dieses Plasmid wies keine Signalsequenz auf. Von den pBBR1p452-basierten Expressionssystemen, die die moderate Promotorregion beinhalteten, waren pBBR1p452_SP*gox2219-phoA* und pBBR1p452-SP*pelB-phoA* die einzigen Konstrukte, mit denen eine signifikante periplasmatische PhoA-Aktivität in *E. coli* gemessen werden konnte.

Nachdem in *E. coli* gezeigt wurde, dass die verschiedenen Expressionssysteme funktionierten und für die Translokation rekombinanter Proteine geeignet waren, sollte nun die Überprüfung dieser Vektoren im Zielorganismus *G. oxydans* erfolgen. Mit dem starken konstitutiven Promotor p264 wurde die höchste periplasmatische PhoA-Aktivität mit dem Konstrukt pBBR1p264-SP*pelB-phoA* erreicht. Diese lag bei 1518 ± 584 MU, was auf eine sehr gute Translokationseffizienz der PelB-Signalsequenz in *G. oxydans* hindeutete. Etwas niedrigere Aktivitäten konnten mit den Expressionssystemen pBBR1p264_SP*gox2219-phoA* (962 ± 237 MU) und pBBR1p264_SP*gox2077-phoA* (582 ± 90 MU) gemessen werden. Auch durch die Signalsequenzen von Gox0605 und Gox0748 wurden signifikante PhoA-Aktivitäten von 527 ± 51 MU und 345 ± 33 MU nachgewiesen. Die geringste Aktivität der p264-tragenden Vektoren wurde durch die Fusion von PhoA an die Signalsequenz von Gox0952 erreicht (237 ± 36 MU). Von allen Vektoren mit moderatem Promotor p452 wurde, wie auch bei den p264-tragenden Konstrukten, die höchste periplasmatische Aktivität durch die PelB-Signalsequenz vermittelt und lag bei 1214 ± 128 MU. Mit dem Expressionssystem pBBR1p452_SP*gox2219-phoA* lag die

gemessene Aktivität bei 509 ± 27 MU, mit pBBR1p264_SPgox2077_phoA bei 172 ± 39 MU und bei pBBR1p452_SPgox0854_phoA bei 41 ± 10 MU (Tab. 8)

Tabelle 8: Analyse der Translokationseffizienzen, gemessen über die PhoA-Aktivität in *G. oxydans*. Verwendet wurden sechs verschiedene Signalpeptide aus *G. oxydans* 621H und ein Signalpeptid aus *Erwinia carotovora*. Als Promotoren dienten in allen Fällen entweder p264 oder p452 (Kallnik *et al.* 2010). Als Negativkontrolle wurden beide Expressionssysteme mit *phoA*, jedoch ohne Signalsequenz verwendet (Modifiziert nach Kosciow *et al.* 2014).

| Expressionssystem | Annotation (Ursprung der Signalsequenz) | <i>E. coli</i> (MU) | <i>G. oxydans</i> 621H (MU) |
|--------------------------|---|---------------------|-----------------------------|
| pBBR1p264-SPpeIB-phoA | Pektatlyase B aus <i>E. carotovora</i> | 469 ± 137 | 1518 ± 584 |
| pBBR1p452-SPpeIB-phoA | Pektatlyase B aus <i>E. carotovora</i> | 30 ± 4 | 1214 ± 128 |
| pBBR1p264_phoA.strep | Keine Signalsequenz | 3 ± 1 | n.d |
| pBBR1p452_phoA.strep | Keine Signalsequenz | 10 ± 2 | 5 ± 3 |
| pBBR1p264_SPgox0605_phoA | γ -Glutamyltranspeptidase | 38 ± 4 | 527 ± 51 |
| pBBR1p264_SPgox2219_phoA | Ribose-ABC-Transporter-Bindeprotein | 449 ± 104 | 962 ± 237 |
| pBBR1p264_SPgox2077_phoA | Eisen-Siderophor-Rezeptor | 3 ± 1 | 582 ± 90 |
| pBBR1p264_SPgox0952_phoA | Flagellares Protein FlgA | 55 ± 14 | 237 ± 36 |
| pBBR1p264_SPgox0748_phoA | Aldose-1-Epimerase | 8 ± 3 | 345 ± 33 |
| pBBR1p452_SPgox2219_phoA | Ribose-ABC-Transporter-Bindeprotein | 30 ± 3 | 509 ± 27 |
| pBBR1p452_SPgox2077_phoA | Eisen-Siderophor-Rezeptor | 4 ± 1 | 172 ± 39 |
| pBBR1p452_SPgox0854_phoA | D-Sorbitoldehydrogenase Untereinheit SldA | 5 ± 2 | 41 ± 10 |

Mit der Entwicklung dieser Vektoren wurde zum ersten Mal ein Expressionssystem für *G. oxydans* konstruiert, mit dem für das Reporterenzym PhoA über Fusion an ein Signalpeptid eine effiziente Produktion sowie anschließende Translokation über den Sec-abhängigen Transportweg in das Periplasma ermöglicht wurde. Die Entwicklung dieses Systems stellte die Basis für die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* dar. Das Expressionssystem sollte dazu in folgenden Experimenten durch Austausch des Reporterenzym durch die gewünschte Hydrolase angepasst werden. Die spezifische Translokationseffizienz konnte darüber hinaus durch Variation der Signalsequenz durch ein anderes Signalpeptid aus der erstellten Bibliothek (Tab. 8) optimiert werden. Da in diesen Experimenten die Kombination aus starkem Promotor p264 und der Signalsequenz von PeIB die besten Translokationseffizienzen für das Protein PhoA zeigten, stellte der Vektor pBBR1p264-SPpeIB-phoA das Grundgerüst für alle weiteren Arbeiten dar.

3.2 Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um das Modelldisaccharid Trehalose

Nachdem ein geeignetes Expressionssystem für die heterologe Produktion periplasmatischer Enzyme erfolgreich generiert werden konnte, sollte dieses System genutzt werden um die Umsetzung eines neuen Substrats *in vivo* zu ermöglichen. Als erstes Modelldisaccharid wurde Trehalose ausgewählt. Dieser Zucker besteht aus zwei Glukoseeinheiten, die über eine α,α -1,1-glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Trehalose gelangt aufgrund des niedrigen Molekulargewichts von 342 Da mittels freier Diffusion durch die Porine der äußeren Membran in das Periplasma von *G. oxydans*. Die Unfähigkeit von *G. oxydans* diesen Zucker direkt als Energie- oder Kohlenstoffquelle nutzen zu können, deutete auf ein fehlendes Importsystem in das Cytoplasma sowie nicht vorhandene Trehalose-hydrolysierende Enzyme hin. Auch konnte mithilfe von gewaschenen Membranen gezeigt werden, dass Trehalose, anders als beispielsweise Glukose, nicht von membrangebundenen Dehydrogenasen oxidiert wird (Kosciow *et al.* 2014).

3.2.1 Die Wahl einer geeigneten Trehalase

Um *G. oxydans* 621H die periplasmatische Spaltung des Modelldisaccharids Trehalose zu ermöglichen, wurde ein Enzym benötigt, welches die hydrolytische Spaltung α -glykosidischer Verbindungen katalysiert und für das eine Aktivität mit Trehalose als Substrat bereits nachgewiesen wurde. Zusätzlich sollten die biochemischen Eigenschaften des Enzyms an die physiologischen Anforderungen von *G. oxydans* angepasst sein. Diese Eigenschaften sollten bei einer Expression und Produktion das Erreichen effizienter Umsatzraten ermöglichen. Eine weitere Anforderung an das Enzym war eine periplasmatische oder extrazelluläre Lokalisation im Wirtsorganismus. Durch diese Lokalisation wäre gewährleistet, dass bei einer erfolgreichen Translokation mit dem artifiziellen Expressionssystem in *G. oxydans* das Enzym seine Aktivität trotz der unterschiedlichen physiologischen Bedingungen im Periplasma bewahrt und eine aktive Konformation einnimmt. Ein wesentlicher physiologischer Unterschied zwischen Cytoplasma und Periplasma ist beispielsweise der pH-Wert. Während dieser intrazellulär konstant vorliegt (in *E. coli* bei pH 7,2 bis 7,8), ist er im periplasmatischen und extrazellulären Bereich großen Schwankungen ausgesetzt, abhängig von den dort akkumulierten Stoffwechselprodukten (Wilks und Slonczewski 2007). Daher muss im Fall von periplasmatischen und extrazellulären Proteinen eine gewisse pH-Stabilität vorhanden sein. Auch sorgen die unterschiedlichen reduzierenden Bedingungen zwischen Cytoplasma und Periplasma oftmals für starke Faltungsunterschiede (Derman und Beckwith 1991). Im Fall von natürlicherweise cytoplasmatischen Proteinen kann somit bei einer Translokation in das Periplasma nicht von einer korrekten Faltung ausgegangen werden.

In dieser Arbeit wurde die periplasmatische Trehalase TreA (Abb. 4) aus *E. coli* K12, kodiert durch *treA* (b1197), aus der Familie 37 der Glykosidhydrolasen (GH37) ausgewählt (Boos *et al.* 1987). Dieses Enzym besitzt unprozessiert ein Molekulargewicht von 63 kDa und nativ eine monomere Konformation, was eine korrekte Faltung nach erfolgreicher Sec-abhängiger Translokation erleichtert. Die Primärstruktur besteht aus 565 Aminosäuren (AS), wobei eine bioinformatische Analyse mit den

Programmen SignalP (Nielsen *et al.* 1997; Petersen *et al.* 2011) und Phobius (Käll *et al.* 2004) die ersten 30 AS als Sec-abhängiges Signalpeptid identifizierte. Das Gen *treA* wird von *E. coli* erst bei hoher Osmolarität des Außenmediums verstärkt exprimiert, somit ist TreA ideal an hohe Substratkonzentrationen angepasst (Boos *et al.* 1987; Repoila und Gutierrez 1991). Diese Tatsache schließt eine mögliche Substratinhibierung des durch *G. oxydans* heterolog produzierten Enzyms aufgrund einer zu hohen Trehalosekonzentration aus. Die aus der Literatur bekannte spezifische Aktivität liegt für TreA mit Trehalose als Substrat bei einem pH-Wert von 7,2 bei 66,4 U mg⁻¹ und der K_m-Wert bei 0,78 mM (Boos *et al.* 1987; Tourinho-dos-Santos *et al.* 1994). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass das pH-Optimum im leicht sauren Bereich bei etwa 5,5 und das Temperatur-Optimum bei 30 °C liegen (Tourinho-dos-Santos *et al.* 1994). Beide Werte entsprechen den physiologischen Ansprüchen von *G. oxydans*. Bezogen auf die abiotischen Faktoren war somit eine gute katalytische Effizienz bei Wachstumsexperimenten *in vivo* zu erwarten.

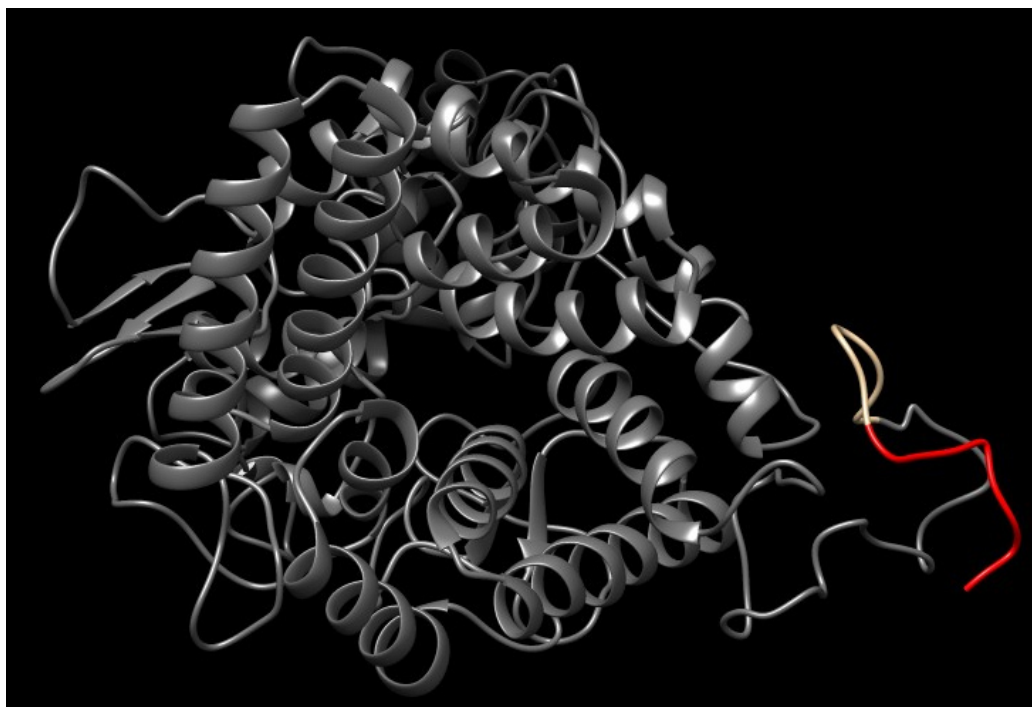


Abbildung 4: Die periplasmatische Trehalase TreA aus *E. coli*. TreA gehört zur Glykosidhydrolase-Familie 37 und liegt nativ als monomeres Enzym vor. Rot gekennzeichnet ist der C-terminal angefügte Strep-Tag, welcher über eine verlängerte Linkerregion (hellgrau) an das Enzym gekoppelt wurde (Zeiser *et al.* 2014; Kosciow *et al.* 2014). Das Modell wurde mittels Phyre2 und UCSF Chimera erstellt (Pettersen *et al.* 2004; Kelley *et al.* 2015).

3.2.2 Konstruktion eines *treA*-beinhaltenden Expressionssystems

Die periplasmatische Trehalase TreA aus *E. coli* K12 trägt in nativer unprozessierter Form ein Signalpeptid, das die Translokation über den Sec-abhängigen Transportweg in das Periplasma ermöglicht. Von dieser nativen Signalsequenz, welche die ersten 30 AS des N-Terminus von TreA ausmacht, war nicht bekannt, ob sie nach heterologer Produktion durch *G. oxydans* erkannt wird. Aus diesem Grund wurden für die Amplifizierung des entsprechenden Gens die Oligonukleotide so gewählt,

dass die N-terminale Signalsequenz von TreA entfernt wurde. Es wurden über das Vorwärts-Oligonukleotid stromaufwärts des Gens eine *Sna*BI-Schnittstelle und stromabwärts über das Rückwärts-Oligonukleotid eine *Asc*I-Schnittstelle eingebracht. Die errechnete Länge des zu erwartenden PCR-Produkts betrug 1627 bp und ein Fragment mit einer entsprechenden Größe konnte erfolgreich amplifiziert werden (Abb. 5 A). Im nächsten Schritt wurden sowohl das aufgereinigte PCR-Amplifikat als auch die beiden Vektoren pBBR1p264-*SPpe*lB-*pho*A und pBBR1p452-*SPpe*lB-*pho*A mit den Restriktionsendonukleasen *Asc*I und *Sna*BI geschnitten. So wurde über die entstandenen kompatiblen Enden eine Ligation der beiden Fragmente, sowie ein Austausch des Reportergens *pho*A durch das Gen *tre*A ermöglicht (Abb. 5 B).

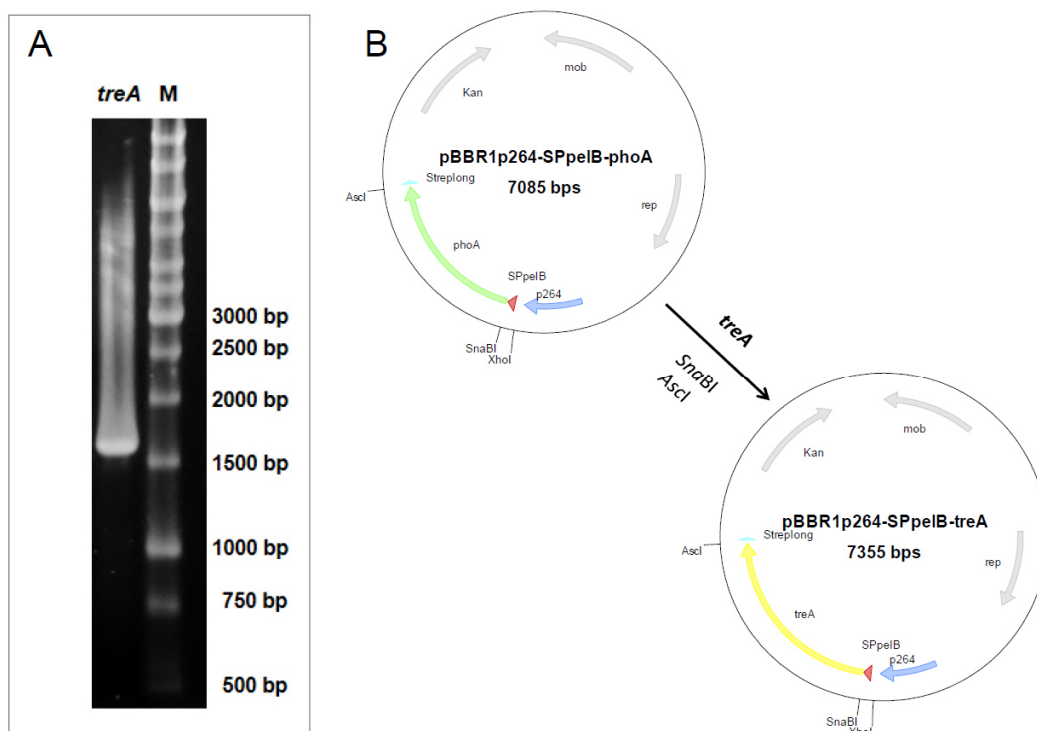


Abbildung 5: Klonierungsstrategie für das Trehalase-kodierende Gen *treA*. **A:** Gelbild des mittels PCR amplifizierten Gens *treA*. Bei der PCR wurde als Hybridisierungstemperatur T_A [°C] = 68 °C gewählt. Das entstandene PCR-Produkt wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die erwartete Fragmentgröße betrug 1627 bp. M: 1 kb Marker **B:** Erstellung des Expressionssystems für *treA*. Das Reportergen *phoA* wurde über einen einfachen Klonierungsschritt über die Schnittstelle *Sna*BI/*Asc*I durch *treA* ersetzt. Kan: Kanamycinresistenzkassette; rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion vom Gen *gox0264*; mob: Mobilisierungsgen; Streplong: Strep-Tag mit elongierter Linkerregion (Zeiser *et al.* 2014). Abbildung modifiziert nach Kosciow *et al.* 2014.

Nach der Ligation konnte eine Transformation der Konstrukte in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen durchgeführt und anschließend die entstandenen Kolonien mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des *treA*-Gens untersucht werden. Eine Sequenzierung bestätigte die erfolgreiche Transformation der gewünschten Plasmide. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte vorrangig mit dem Expressionsvektor pBBR1p264-*SPpe*lB-*treA*, der den starken konstitutiven Promotor p264 trug, gearbeitet werden. Der Vektor pBBR1p452-*SPpe*lB-*treA*, welcher den moderaten Promotor p452 beinhaltete, diente als Alternative im Fall einer Überlastung des Sec-abhängigen

Translokationsmechanismus durch den starken Promotor. Die fertigen Konstrukte wurden mittels Elektroporation in *G. oxydans* 621H $\Delta hsdR$ (nachfolgend bezeichnet als *G. oxydans*) transformiert.

3.2.3 Lokalisation der heterolog produzierten Trehalase TreA in *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB*-*treA*

Das Expressionssystem, welches für die heterologe Produktion und Translokation der periplasmatischen Trehalase TreA in *G. oxydans* optimiert wurde, konnte erfolgreich in den Zielorganismus eingebracht werden (Abschnitt 3.2.2). Um die Produktion von TreA und die Translokation des Enzyms über den Sec-abhängigen Transportweg zu überprüfen, wurden Lokalisationsexperimente mit *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB*-*treA* durchgeführt. Dazu wurde dieser Stamm in Flüssigmedium mit Mannitol als C-Quelle kultiviert und die Zellsuspension in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Es erfolgte eine Fraktionierung der Zellen. Die Präparation der periplasmatischen Fraktion wurde nach Tsukada und Perlman 1972 durchgeführt und nach Kosciow *et al.* 2014 modifiziert.

Um eine geeignete Negativkontrolle zu erhalten, wurde analog zur Mutante *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB*-*treA* ein Stamm konstruiert (Abb. 6), der nur das Gen *treA* ohne Signalsequenz kodierte. Diese Mutante sollte somit zur Produktion von TreA befähigt sein, jedoch nicht zur Sec-abhängigen Translokation dieses Proteins in das Periplasma. Fortlaufend wird dieser Stamm als *G. oxydans* pBBR1p264-NoSP-*treA* bezeichnet (Kosciow *et al.* 2014). Auch mit diesem Stamm wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt.

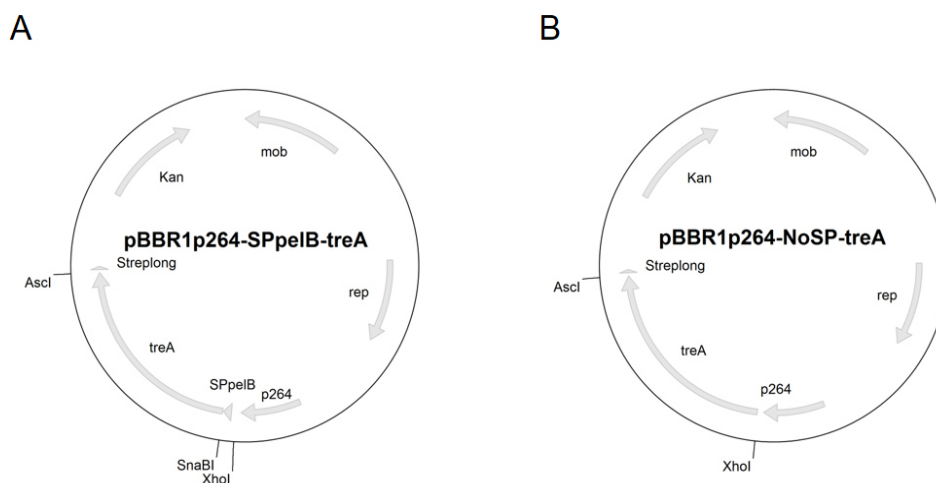


Abbildung 6: Verwendete Expressionssysteme für den Lokalisationsnachweis von TreA in *G. oxydans*. **A:** Vektor pBBR1p264-SP*pelB*-*treA* mit der Signalsequenz von *pelB*. **B:** Vektor pBBR1p264-*treA* ohne Signalsequenz (Negativkontrolle). Kan: Kanamycinresistenzkassette; rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion vom Gen *gox0264*; mob: Mobilisierungsgen; Streplong: Strep-Tag mit elongierter Linkerregion.

Nach Fraktionierung von *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB*-*treA* wurde ein optischer Nachweis von TreA mittels Westernblot nach vorheriger SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Für diesen Nachweis wurden

5 µg Gesamtprotein aus der periplasmatischen Fraktion und 5 µg Gesamtprotein aus der cytoplasmatischen Fraktion dieses Stamms aufgetragen (Abb. 7 A). Anschließend erfolgte eine Visualisierung der heterolog produzierten Trehalase über den C-terminalen Strep-Tag mittels einer Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase und des chromogenen Substrats 4-Chloro-1-Naphtol (Kosciow *et al.* 2014). Es ist deutlich erkennbar, dass die Trehalase TreA durch den Stamm *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB-treA* erfolgreich produziert und in das Periplasma transloziert wurde. In der Cytoplasmafraktion war ebenfalls eine Proteinbande auf Höhe des für TreA erwarteten Molekulargewichts erkennbar, jedoch mit einer deutlich geringeren Intensität als im Fall der periplasmatischen Fraktion. Dieser schwache Nachweis von TreA im Cytoplasma resultierte wahrscheinlich aus der Visualisierung erfolgreich produzierter, aber noch nicht in das Periplasma translozierter Proteine. Zusätzlich wurde eine Silberfärbung nach vorheriger SDS-PAGE durchgeführt, bei der 5 µg des Gesamtproteins der periplasmatischen Fraktion von *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB-treA* und 5 µg des Gesamtproteins der periplasmatischen Fraktion des Kontrollstammes mit *treA* ohne Signalsequenz aufgetragen wurden (Abb. 7 B). Im Fall der Negativkontrolle konnte nur eine sehr schwache Proteinbande auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts für TreA von 61 kDa nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war die Trehalase, welche mit Signalsequenz produziert wurde, in der Periplasmafraktion von *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB-treA* als sehr intensive Bande erkennbar (Kosciow *et al.* 2014).

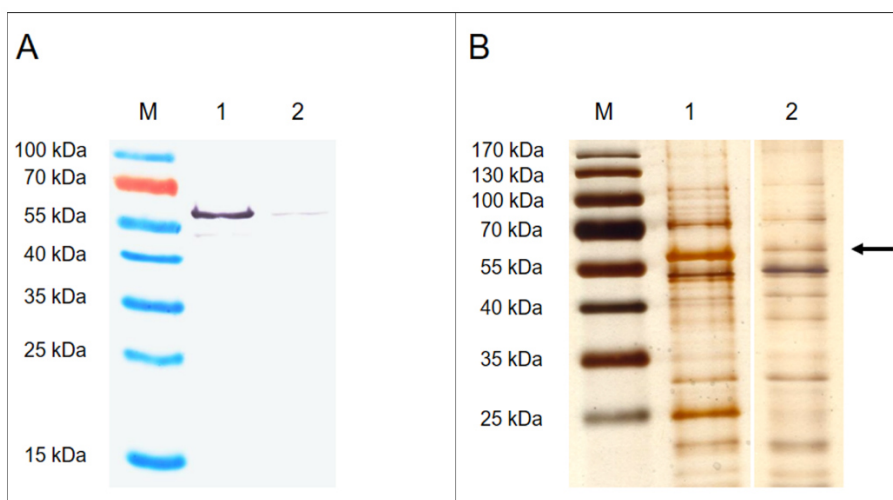


Abbildung 7: Lokalisationsnachweis von TreA in *G. oxydans*. **A:** Nachweis von TreA mittels Westernblot in der periplasmatischen (1) und cytoplasmatischen (2) Fraktion von *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB-treA*. Von beiden Fraktionen wurde 5 µg des Gesamtproteins aufgetragen **B:** Silberfärbung einer SDS-PAGE, bei der jeweils 5 µg des Gesamtproteins der periplasmatischen Fraktion des *treA*-exprimierenden Stammes *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB-treA* (1) und 5 µg des Gesamtproteins der Periplasmafraktion des Kontrollstammes *G. oxydans* pBBR1p264-NoSP-*treA* (2) aufgetragen wurden. Der schwarze Pfeil markiert die erwartete Position von TreA. M: Marker. Modifiziert nach Kosciow *et al.* 2014.

Dieses Ergebnis bestätigte neben der erfolgreichen Sec-vermittelten Translokation von TreA in das Periplasma von *G. oxydans* auch die Funktionalität des konstruierten Expressionssystems, welches für die Erweiterung des Substratspektrums verwendet werden sollte.

3.2.4 *In vitro* - Aktivitätstest der periplasmatischen Trehalase TreA, produziert von *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB-treA*

In Kapitel 3.2.3 konnte gezeigt werden, dass die Mutante *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB-treA* dazu fähig war, die Trehalase TreA heterolog zu produzieren und in das Periplasma zu translozieren. Damit konnte eine Funktionalität des entwickelten und in 3.1 beschriebenen Expressionssystems für die Produktion periplasmatischer Hydrolasen in *G. oxydans* bestätigt werden. Durch *in vitro* Enzymaktivitätstests sollte nun überprüft werden, ob die durch *G. oxydans* produzierte *E. coli*-stämmige Trehalase katalytisch aktiv im Periplasma vorlag. Dazu wurde erneut der *treA*-exprimierende Stamm von *G. oxydans* unter Standardbedingungen angezogen, in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet und fraktioniert. Anschließend wurden verschiedene Mengen Gesamtprotein (0 - 30 µg) der periplasmatischen sowie cytoplasmatischen Zellfraktion in einen Trehalase-Aktivitätstest eingesetzt. Dieser Reaktionsansatz beinhaltete neben einem 30 mM pH 6 Kaliumphosphatpuffersystem eine Konzentration von 100 mM Trehalose und wurde bei einer an die Physiologie von *G. oxydans* angepassten Temperatur von 30 °C durchgeführt. Diese Aktivitätstests dienten als Vorexperimente für die Analyse der Reaktionsgeschwindigkeiten der produzierten Trehalasen in nachfolgend durchgeführten *in vivo*-Experimenten. Die bei der hydrolytischen Spaltung von Trehalose durch TreA entstehenden Glukose-Monomere können, da es sich bei Glukose um einen reduzierenden Zucker handelt, mithilfe eines 3,5-Dinitrosalicylsäure-Test über eine Kalibriergleichung bestimmt werden. Der durchgeführte Test ist an Sumner und Graham 1921 sowie Horlacher *et al.* 1996 angelehnt und wurde modifiziert nach Kosciow *et al.* 2014.

Mithilfe dieses Tests konnte gezeigt werden, dass bei ansteigender Menge periplasmatischen Gesamtproteins (5 – 30 µg) die hydrolytische Aktivität, bezogen auf Trehalose, von 0,05 µmol min⁻¹ ml⁻¹ auf 0,37 µmol min⁻¹ ml⁻¹ (Abb. 8, Insert) gesteigert wurde. Da der Wildtyp von *G. oxydans* keine Trehalose-hydrolysierenden Enzyme besitzt, war die nachgewiesene Hydrolyse durch periplasmatisches Gesamtprotein aus *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB-treA* ausschließlich auf TreA zurückzuführen.

Die errechnete spezifische Aktivität lag im Fall der periplasmatischen Proteinfraction bei 6,2 ± 0,7 µmol Trehalose, die pro Minute und mg Gesamtprotein umgesetzt wurde. Im Gegensatz dazu lag die spezifische Aktivität der cytoplasmatischen Proteinfraction etwa eine Zehnerpotenz niedriger bei 0,5 ± 0,2 µmol min⁻¹ mg⁻¹ (Kosciow *et al.* 2014, Abb. 8). Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Translokation der ungefalteten Trehalasen über den Sec-abhängigen Proteintransportweg in *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB-treA* effizient funktionierte und im Periplasma die Faltung dieser Proteine in eine aktive Konformation erfolgte.

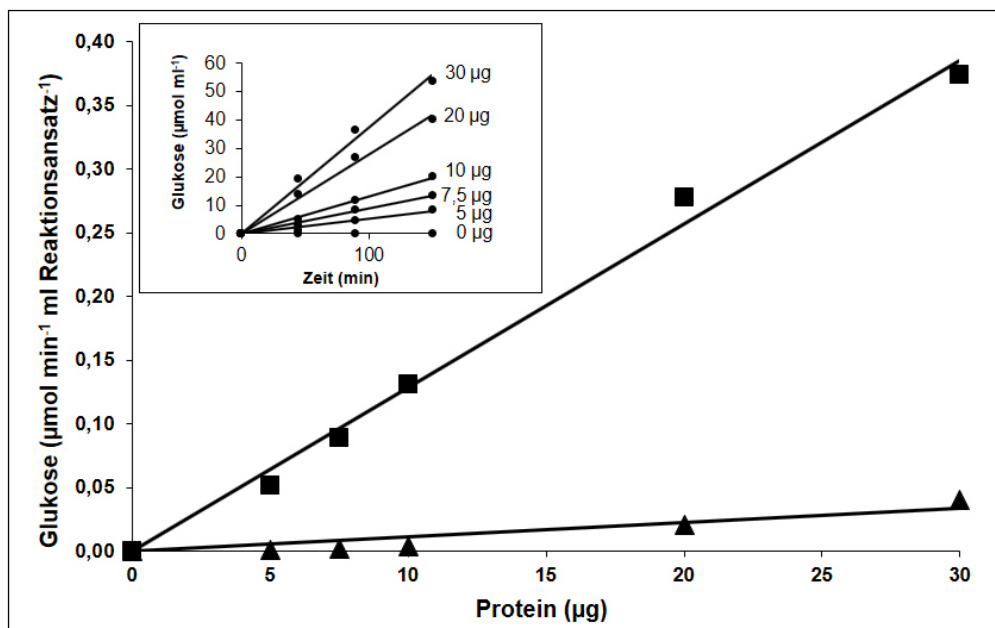


Abbildung 8: Enzymaktivität von TreA im Periplasma und Cytoplasma von *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB-treA*: Aktivität von TreA in μmol gebildete Glukose pro Minute und ml Reaktionsansatz bei unterschiedlicher Mengen eingesetzter periplasmatischer (■) und cytoplasmatischer (▲) Gesamtproteine. **Insert:** Bildung von Glukose in μmol pro ml Reaktionsansatz über die Zeit. 0 – 30 μg periplasmatische Gesamtproteine wurden eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestand aus 780 μl 30 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6, 200 μl Trehalose-Lösung (0,5 M) sowie 20 μl Periplasma bzw. Cytoplasma mit der angegebenen Proteinkonzentration (Kosciow *et al.* 2014).

Eine fehlerhafte Fraktionierung und eine damit verbundene mögliche Kontamination der periplasmatischen Fraktion durch Cytoplasma und umgekehrt eine Kontamination der cytoplasmatischen Fraktion mit Periplasma konnte durch die Analyse von Markerenzymen ausgeschlossen werden. Das cytoplasmatische Markerenzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, kodiert durch *gox0145*, und das periplasmatische Markerenzym, die saure Phosphatase, kodiert durch *gox1076* oder *gox0994*, wurden mit einem Anteil von über 90 % in der jeweils zu erwartenden Fraktion detektiert (Kosciow *et al.* 2014).

3.2.5 Wachstumsverhalten einer *treA* exprimierenden Mutante von *G. oxydans*

Durch *in vitro* - Reaktionstests konnte gezeigt werden, dass *G. oxydans* durch den Vektor pBBR1p264-SP*pelB-treA* dazu befähigt wurde, eine im Periplasma aktive Trehalase zu produzieren. Vor dem Hintergrund der gewünschten Erweiterung des Substratspektrums sollte nachfolgend überprüft werden, ob *G. oxydans* unter Standardbedingungen durch das konstruierte Vektorsystem die Fähigkeit besaß, Trehalose als einzige Kohlenstoffquelle nutzen zu können. Dazu wurde zunächst das Wachstumsverhalten von *G. oxydans* mit dem Ursprungsvektor pBBR1p264, *G. oxydans* mit dem Vektor pBBR1p264-NoSP-*treA* ohne Signalsequenz und *G. oxydans* mit vollständigem Vektor pBBR1p264-SP*pelB-treA* in Flüssigkultur analysiert. Das Medium enthielt neben 50 mM Mannitol ein 100 mM Kaliumphosphatpuffer-System pH 6,8 (Abb. 9). *G. oxydans* kann Mannitol natürlicherweise als

C- und Energiequelle nutzen, indem der Organismus diese Verbindung entweder periplasmatisch über die Sorbitoldehydrogenase SldAB, kodiert durch *gox0854* und *gox0855*, unvollständig oxidiert oder das Substrat direkt in den Pentosephosphatweg einschleust und intrazellulär verstoffwechselt (Richhardt *et al.* 2012).

Alle drei Stämme zeigten mit Mannitol als Substrat eine ähnliche Verdopplungszeit von etwa 3,8 h (Kosciow *et al.* 2014). Der pH-Wert sank dabei leicht aufgrund der Bildung von Acetat ab, welches über den zentralen Stoffwechsel aus Pyruvat über Acetaldehyd synthetisiert wird (Richhardt *et al.* 2012). Im Fall von 50 mM Glukose anstelle von Mannitol als Substrat wurde eine ähnliche Verdopplungszeit erreicht, wobei der pH-Wert aufgrund starker Glukonsäurebildung deutlich schneller und stärker abfiel. Die finale optische Dichte der Kulturen bei 600 nm betrug in diesen Experimenten etwa 1,0 (Weenk *et al.* 1984; Kosciow *et al.* 2014).

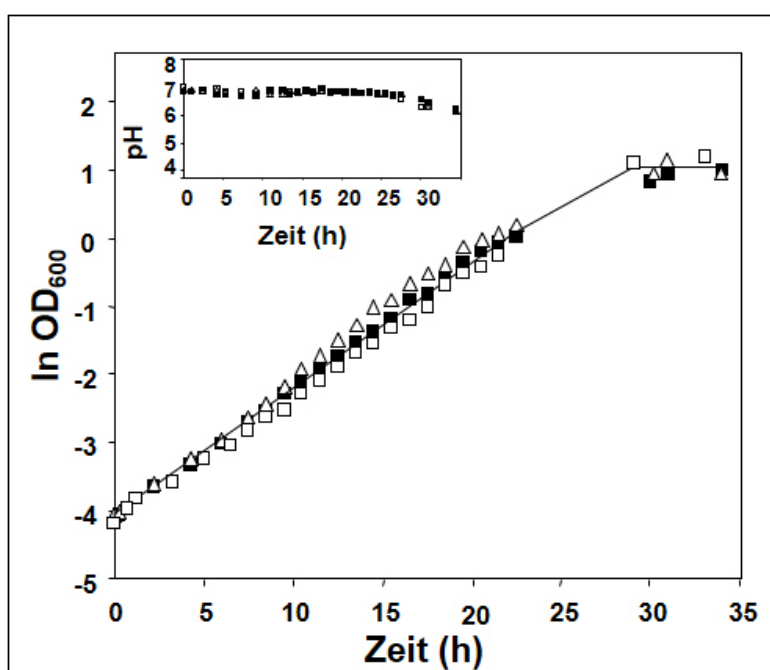


Abbildung 9: Wachstumsverhalten verschiedener *G. oxydans*-Stämme mit 50 mM Mannitol als Kohlenstoffquelle. Logarithmisch dargestellte Zunahme der Zelldichte von *G. oxydans* pBBR1p264 (Δ), *G. oxydans* pBBR1p264-NoSP-*treA* (\square) und *G. oxydans* pBBR1p264-SP*peIB-treA* (\blacksquare) über die Zeit. **Insert:** Darstellung des pH-Wert-Profiles der korrespondierenden Stämme bei einem Wachstum mit Mannitol als C-Quelle über die Zeit. Zusätzlich enthielt das Medium 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8. Modifiziert nach Kosciow *et al.* 2014.

Anschließend wurden diese Wachstumsexperimente erneut durchgeführt, wobei 50 mM Trehalose das Substrat Mannitol als einzige C-Quelle ersetzte (Abb. 10). Der Stamm *G. oxydans* pBBR1p264-SP*peIB-treA* wies dabei die Fähigkeit auf, Trehalose zu hydrolysieren und die daraus resultierende Glukose als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können. Der Stamm erreichte eine Verdopplungszeit von 4,2 h und eine finale OD_{600nm} von 1,7. Im Vergleich dazu erreichten sowohl *G. oxydans* pBBR1p264 als auch der Stamm, der *treA* ohne Signalsequenz exprimiert, eine geringe finale OD_{600nm} von 0,15. Über Kontrollexperimente mittels DNS-Test konnte eine Verunreinigung der eingesetzten Trehalose mit bis zu 1 mM Glukose nachgewiesen werden. *G. oxydans*, welcher ausschließlich mit 1 mM Glukose als

C-Quelle angezogen wurde, erreichte ebenfalls eine OD_{600nm} von 0,15. Somit war das geringe Wachstum beider Kontrollstämme mit Trehalose als Substrat ausschließlich auf eine Verunreinigung durch das Monosaccharid Glukose zurückzuführen (Kosciow *et al.* 2014).

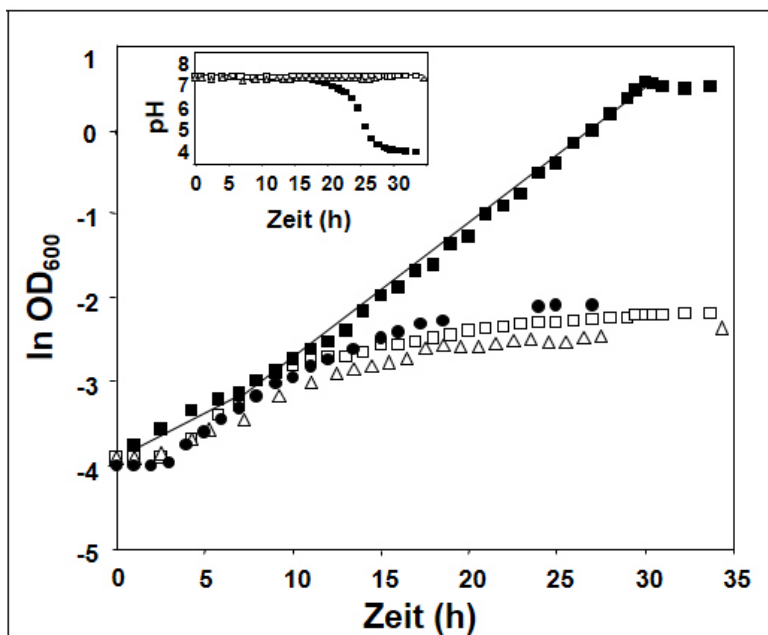


Abbildung 10: Wachstumsverhalten verschiedener *G. oxydans*-Stämme mit 50 mM Trehalose als Kohlenstoffquelle. Zunahme der Zelldichte von *G. oxydans* pBBR1p264 (Δ), *G. oxydans* pBBR1p264-NoSP-*treA* (\square) und *G. oxydans* pBBR1p264-SP*peIB-treA* (\blacksquare) in logarithmischer Darstellung über die Zeit. Zusätzlich ist das Wachstumsverhalten von *G. oxydans* pBBR1p264 mit 1 mM Glukose als Substrat dargestellt (\bullet) **Insert:** Darstellung des pH-Wert-Profiles der korrespondierenden Stämme bei einem Wachstum mit Trehalose als C-Quelle über die Zeit. Zusätzlich enthielt das Medium 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8. Modifiziert nach Kosciow *et al.* 2014.

3.2.6 Analyse des Produktspektrums bei einem Wachstum von *G. oxydans* pBBR1p264-SP*peIB-treA* mit Trehalose als Kohlenstoffquelle

Während des Wachstums des *treA* exprimierenden *G. oxydans*-Stamms mit Trehalose als Substrat wurden kontinuierlich zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die Substratumsetzung sowie Produktbildung mittels HPLC analysiert. Während der exponentiellen Wachstumsphase sank die Trehalose-Konzentration im Medium von 50 mM auf 7 mM innerhalb der ersten 30 h ab (Abb. 11), bedingt durch die hydrolytische Aktivität der heterolog produzierten periplasmatischen Trehalase TreA.

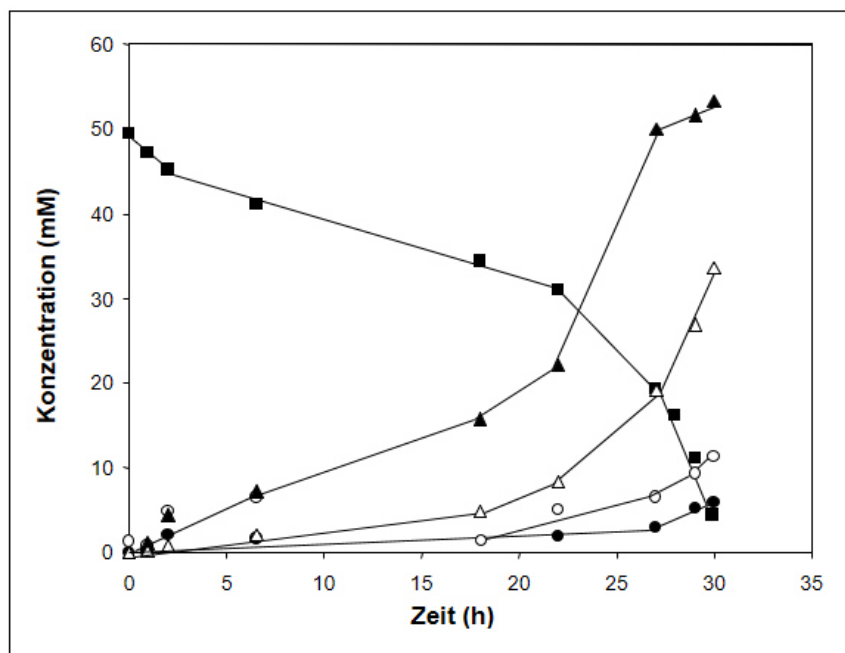


Abbildung 11: Substrat- und Produktspektrum des *treA* exprimierenden Stamms von *G. oxydans* bei einem Wachstum mit 50 mM Trehalose. Trehalose (■), Acetat (▲), 5-Ketoglukonat (Δ), Glukose (○), Glukonat (●). Zusätzlich enthielt das Medium 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 (Kosciow *et al.* 2014).

Durch diese enzymatische Spaltung von Trehalose entstand das eigentliche durch *G. oxydans* nutzbare Substrat, Glukose. Basierend auf Produktanalysen von *G. oxydans* bei einem Wachstum mit Glukose als C-Quelle wurde eine starke Produktion von Glukonat erwartet (Olijve und Kok 1979a, 1979b). Der Stamm *G. oxydans* pBBR1p264-SP*peIB-treA* bildete jedoch hauptsächlich Acetat und 5-Ketoglukonat. Diese Verbindungen wurden im Medium bis zu einer Konzentration von 53 mM (Acetat) und 34 mM (5-Ketoglukonat) akkumuliert (Abb. 11). Glukose und Glukonat konnten in einer geringen Konzentration von 2 – 5 mM nachgewiesen werden, die sich nach Eintritt in die stationäre Phase auf 10 mM (Glukose) und 5 mM (Glukonat) erhöhte. Die Konzentration an 2-Ketoglukonat lag durchgehend unterhalb des Detektionslimits (Kosciow *et al.* 2014).

3.3 Erstellung einer Deletionsmutante von *G. oxydans* für die effiziente Produktion von Exoenzymen

In Kapitel 3.2 konnte anhand des Modelldisaccharids Trehalose gezeigt werden, dass mit dem entwickelten Expressionssystem eine Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* auf Disaccharide möglich ist. Eine Erweiterung des Spektrums um Polysaccharide wäre im Hinblick auf die Nutzbarkeit von nachwachsenden Rohstoffen für die Produktion von Feinchemikalien ein weiterer wichtiger Schritt für die Stammoptimierung. Wie in Abb. 2 schematisch gezeigt, stellt die äußere Membran einen wichtigen Faktor dar, der die Hydrolyse von Polysacchariden durch *G. oxydans* verhindert. Es ist bekannt, dass in diesem Organismus häufig beschriebene Exportsysteme für den direkten Proteintransport durch die cytoplasmatische und äußere Membran entweder vollständig fehlen oder unvollständig vorliegen (Prust *et al.* 2005). Mit dem pBBR1p264-basierten Expressionssystem

lassen sich zwar geeignete heterolog produzierte Proteine in das Periplasma translozieren, jedoch bildet die äußere Membran eine unüberwindbare Barriere zwischen den Polysacchariden und den periplasmatischen Hydrolasen (Kosciow *et al.* 2014; Kosciow *et al.* 2016). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit nach einer Möglichkeit gesucht, die äußere Membran zu destabilisieren und für den unspezifischen Export periplasmatischer Proteine zu permeabilisieren.

3.3.1 Entwicklung einer geeigneten Strategie basierend auf bioinformatischen Analysen

Es sind verschiedene Methoden für die induzierte Proteinsekretion in Gram-negativen Organismen bekannt. Zu diesen gehört die Zugabe von Glycin und Triton-X zum Kulturmedium (Yang *et al.* 1998), die Erstellung von Sekretionsmutanten mittels zufälliger Mutagenese (Lopes *et al.* 1972; Weigand und Rothfield 1976; Lazzaroni und Portalier 1979) oder die Koexpression einer Cutinase zur Hydrolyse von Phospholipiden und einer damit einhergehenden erhöhten Membranpermeabilität (Wu *et al.* 2015). Eine weitere in *E. coli* erfolgreich eingesetzte Strategie ist die gezielte Deletion von Membranprotein-kodierenden Genen wie *tolA*, *tolB*, *tolQRA*, *rfa*, *pal* oder *lpp*. Die korrespondierenden Proteine sind unter anderem für die Stabilisierung und korrekte Integration der äußeren Membran zuständig (Lazzaroni *et al.* 1999). Die gezielte Deletion sollte auch in der vorliegenden Arbeit als Strategie zur Destabilisierung der äußeren Membran von *G. oxydans* angewendet werden. Ziel war es dabei, eine Mutante von *G. oxydans* zu erhalten, die aufgrund einer instabilen äußeren Membran periplasmatische Proteine in den Kulturüberstand sekretiert. Im Fall von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die effizientesten Deletionen durch $\Delta tolA$, $\Delta tolB$, Δpal erreicht wurden. Die Deletion von *tolA* oder *tolB* resultierte dabei in einer Diffusion von 100 % der nativ produzierten alkalischen Phosphatasen aus dem Periplasma in den Kulturüberstand, im Fall einer Deletion von *pal* lag die Sekretion bei 93 % (Lazzaroni *et al.* 1999). Analysen mittels NCBI BLASTp (Altschul *et al.* 1990) ergaben für TolB aus *E. coli* ein homologes Protein in *G. oxydans* 621H mit einer Identität von 28 % bei einer Sequenzabdeckung von 86 %, kodiert durch *gox1687* (Tab. 9). Im Fall von TolA besaß das am stärksten homologe Protein aus *G. oxydans* eine Identität von 41 % bei einer geringen Sequenzabdeckung von 14 % (*Gox2497*). Der homologe Partner des Pal-Proteins in *G. oxydans*, kodiert durch *gox1688*, zeigte hingegen eine hohe Identität von 42 % bei einer Übereinstimmung mit 57 % der Sequenz.

Tabelle 9: Analyse geeigneter Zielgene für die Erstellung einer Deletionsmutante von *G. oxydans*. Dargestellt sind Gene aus *G. oxydans* 621H, deren Deletion in einer Proteinsekretierenden Mutante des Stamms resultieren könnte.

| Gen aus <i>E. coli</i> K12 | Homologes Gen in <i>G. oxydans</i> 621H | Identität der Sequenz (%) | Abdeckung der Sequenz (%) |
|----------------------------|---|---------------------------|---------------------------|
| <i>tolA</i> | <i>gox2497</i> | 41 | 14 |
| <i>tolB</i> | <i>gox1687</i> | 28 | 86 |
| <i>pal</i> | <i>gox1688</i> | 42 | 57 |

Basierend auf der Sequenzabdeckung der homologen Proteine aus *G. oxydans* stellte sich *tolB* als geeignetes Ziel für die Deletion zur Erstellung einer Mutante mit instabiler äußeren Membran heraus.

3.3.2 Konstruktion der Mutante *G. oxydans* $\Delta tolB$

Nachdem sich das Gen *tolB* (*gox1687*) als geeignetes Ziel für die Erstellung einer sekretorischen Deletionsmutante herausgestellt hatte, galt es im nächsten Schritt die Deletion in *G. oxydans* durchzuführen. Dies sollte nach der unter 1.3 beschriebenen Methode der CodAB-basierten markerlosen Deletion (Kostner *et al.* 2013) erfolgen. Dazu wurde zunächst ein Fragment von 900 bp oberhalb von *gox1687* (Abb. 12 A) und ein Fragment von 1000 bp unterhalb dieses Gens (Abb. 12 B) mithilfe der Oligonukleotide Upgox1687_3.fw/ Upgox1687.rev und Downgox1687.fw/ Downgox1687.rev amplifiziert und anschließend beide Fragmente in aufgereinigter Form als Matrize für eine Fusions-PCR verwendet (Abb. 12 C). Bei diesem Schritt wurden über die Oligonukleotide Upgox1687_3.fw/ Downgox1687.rev die Schnittstellen *HindIII* und *XbaI* hinzugefügt, die eine Ligation in den für die markerlose Deletion benötigten Vektor pKOS6b ermöglichten (Kostner *et al.* 2013; Kosciow *et al.* 2016). Da zwischen *gox1687* und dem stromabwärts liegenden Gen *gox1688*, welches ein putatives Peptidoglykan-assoziiertes Lipoprotein kodiert, eine nicht-kodierende Region von 487 bp liegt, konnte eine vollständige Deletion von *gox1687* verfolgt werden, ohne dabei die Promotorregion von *gox1688* zu deletieren.

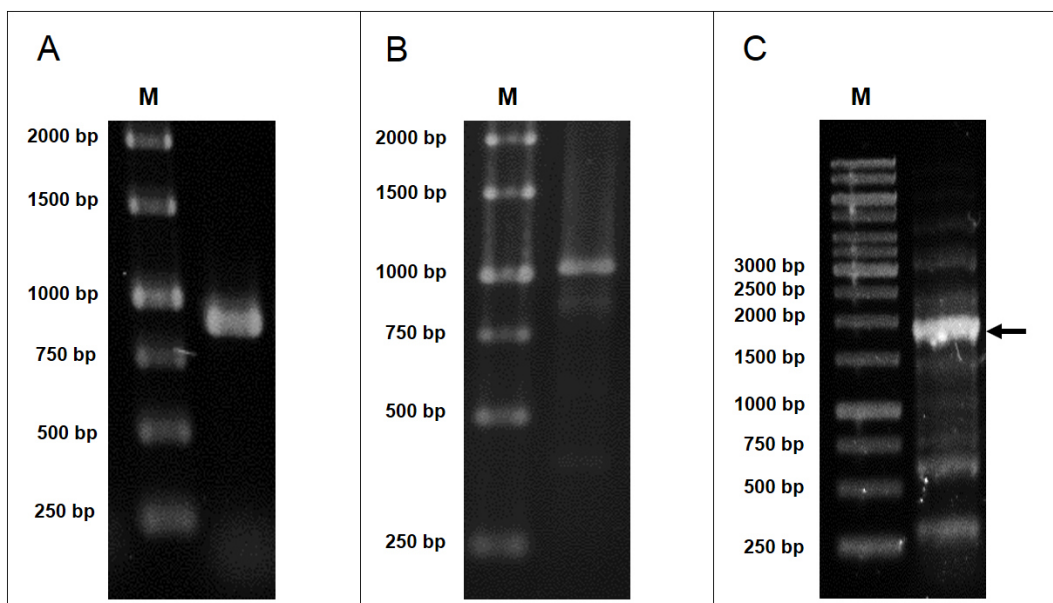


Abbildung 12: PCR-Fragmente, die für die Erstellung des Vektors pKOS6b-UpDogox1687 benötigt wurden. A: Mit den Oligonukleotiden Upgox1687_3.fw/ Upgox1687.rev amplifizierte Region stromaufwärts von *gox1687* (900 bp). **B:** Mit den Oligonukleotiden Downgox1687.fw/ Downgox1687.rev amplifizierte Region unterhalb von *gox1687* (1000 bp). **C:** Fusionsprodukt, erhalten durch eine Amplifizierung mit den Oligonukleotiden Upgox1687_3.fw/ Downgox1687.rev. Der schwarze Pfeil markiert das gewünschte Fragment mit einer Größe von 1900 bp. M: 1 kb Marker.

Das daraus resultierende Plasmid pKOS6b-UpDogox1687 (Abb. 13) wurde zunächst in kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transferiert, vervielfältigt und anschließend mittels Elektroporation in *G. oxydans* eingebracht.

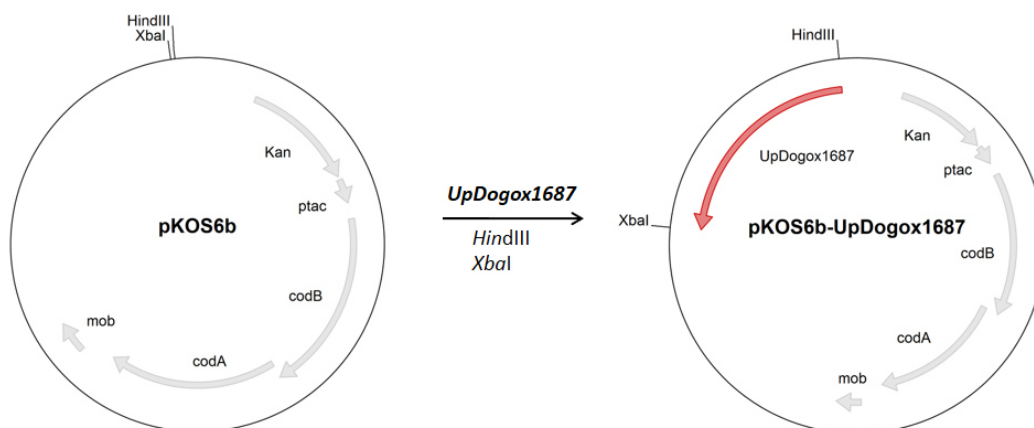


Abbildung 13: Die Erstellung des für die markerlose Deletion von *gox1687* notwendigen Vektors pKOS6b-UpDogox1687. Das Fusionsprodukt der an *gox1687* grenzenden Regionen wurde über die Schnittstellen *HindIII* und *XbaI* in den Vektor pKOS6b kloniert. Kan: Kanamycinresistenzkassette; rep: Replikationsursprung; *ptac*: tac-Promotor; *mob*: Mobilisierungsgen; *codA*: Cytosin-Deaminase; *codB*: Cytosin-Permease.

Der Vektor pKOS6b-UpDogox1687 ist nicht replizierbar in *G. oxydans*, sodass ausschließlich Zellen auf Kanamycin-haltigem Medium wachsen konnten, die den Vektor über eine erste homologe Rekombination (Abb. 14) vollständig in das Genom integriert hatten.

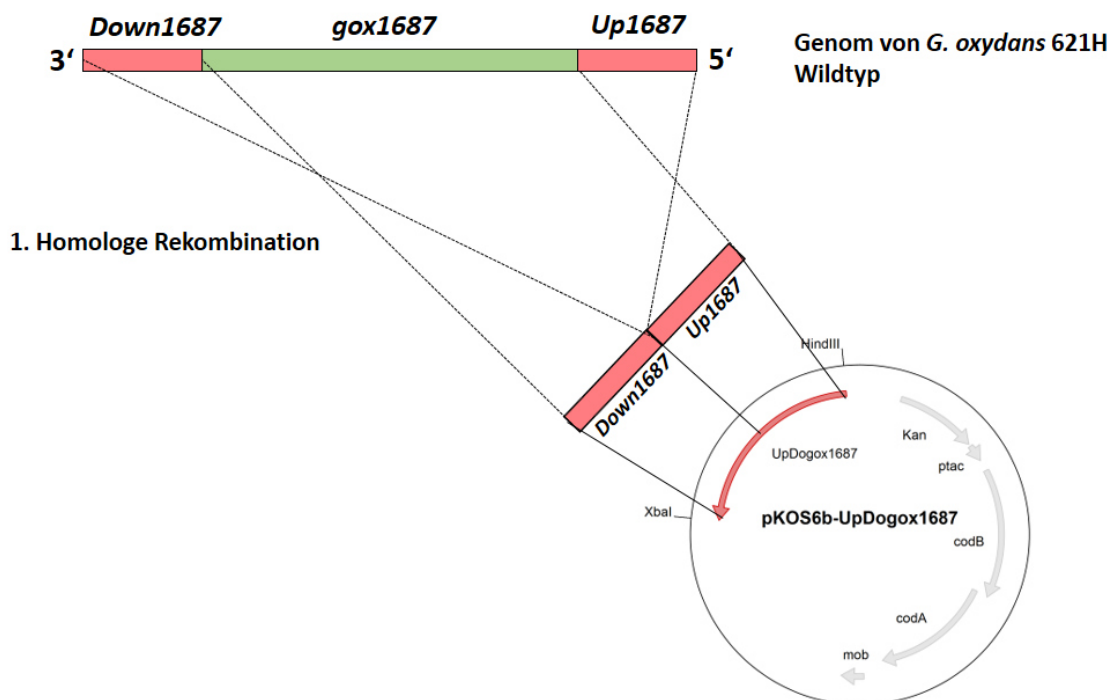


Abbildung 14: Schematische Darstellung der ersten homologen Rekombination, bei der der Vektor pKOS6b-UpDogox1687 in die genomische DNA von *G. oxydans* integriert wurde.

Es erfolgte eine Kolonie-PCR der auf YM+Kanamycin-Agarplatten entstandenen koloniebildenden Einheiten (KbE). Dabei wurden Oligonukleotide verwendet, mit denen das im Vektorrückgrat befindliche Gen *codA* nachgewiesen werden konnte (Abb. 15). Die erwartete Fragmentgröße betrug 1151 bp.

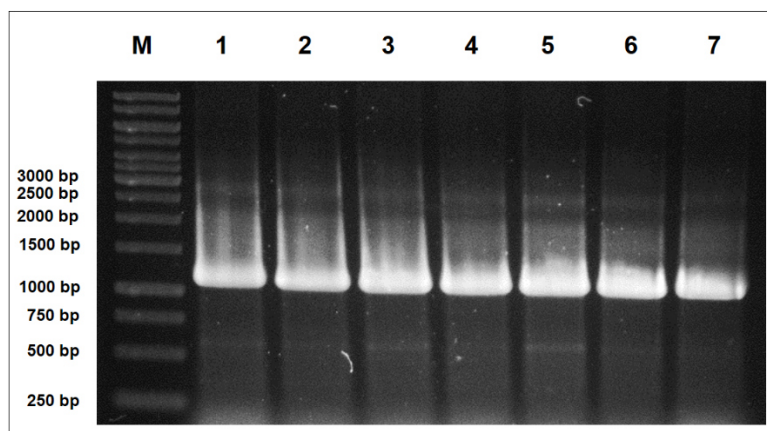


Abbildung 15: Kolonie-PCR von *G. oxydans* nach Elektroporation zum Nachweis einer erfolgreichen ersten homologen Rekombination. Als Markergen wurde *codA* verwendet, welches für den Nachweis des in das Genom integrierten Vektors diente. M: 1 kb Marker; 1-7: Klone von *G. oxydans*, die den Vektor pKOS6b-UpDogox1687 erfolgreich in das Genom integriert hatten.

Die positiven Klone wurden auf YM-Agarplatten transferiert, welche 5-Fluorocytosin (5-FC) anstelle von Kanamycin beinhalteten. 5-FC diente hier der Gegenselektion über die heterolog produzierte Cytosin-Deaminase (CodA) und Cytosin-Permease (CodB), deren Gene als Bestandteil des Vektorrückgrats von pKOS6b-UpDogox1687 ebenfalls in das Genom integriert wurden (Kostner *et al.* 2013). Um die durch CodAB verursachten toxischen Eigenschaften von 5-FC umgehen zu können, musste ein spontaner Verlust dieser Gene aus der genomischen DNA erfolgen. Dies konnte einerseits über eine Reversion zum Wildtyp geschehen, dessen Genotyp das Zielgen *gox1687* weiterhin aufwies. Fand durch die Auswahl der Gen-flankierenden Regionen spontan eine zweite homologe Rekombination statt, so war es möglich, dass das Gen *gox1687* deletiert wurde. Es ist bekannt, dass eine Deletion von Bestandteilen des Tol-Pal-Systems bisher nur in wenigen Organismen, wie zum Beispiel in *Erwinia chrysanthemi* und *Caulobacter crescentus*, zu einem letalen Effekt führte (Dubuisson *et al.* 2005; Yeh *et al.* 2010; Lo Sciuto *et al.* 2014).

Es wurde eine Kolonie-PCR der KbE durchgeführt, die auf YM-Agarplatten, welche 5-FC anstelle des Kanamycin enthielten, wachsen konnten. Die dafür verwendeten Oligonukleotide waren Upgox1687_3.fw und Downgox1687.rev, welche eine Amplifizierung von *gox1687* sowie der stromaufwärts und stromabwärts liegenden Regionen von *gox1687* (900 bp und 1000 bp) ermöglichten. Im Falle einer Reversion zum Wildtyp wurde bei dieser Kolonie-PCR somit eine Fragmentgröße von 3262 bp erwartet. Bei einer erfolgreichen Deletion von *tolB* wären ausschließlich die flankierenden Bereiche amplifiziert worden, sodass hier eine Fragmentgröße von 1900 bp erwartet wurde. Wie in Abbildung 16 erkennbar, konnte der gewünschte Genotyp, welcher eine Deletion des *tolB*-kodierenden Gens aufwies, detektiert werden.

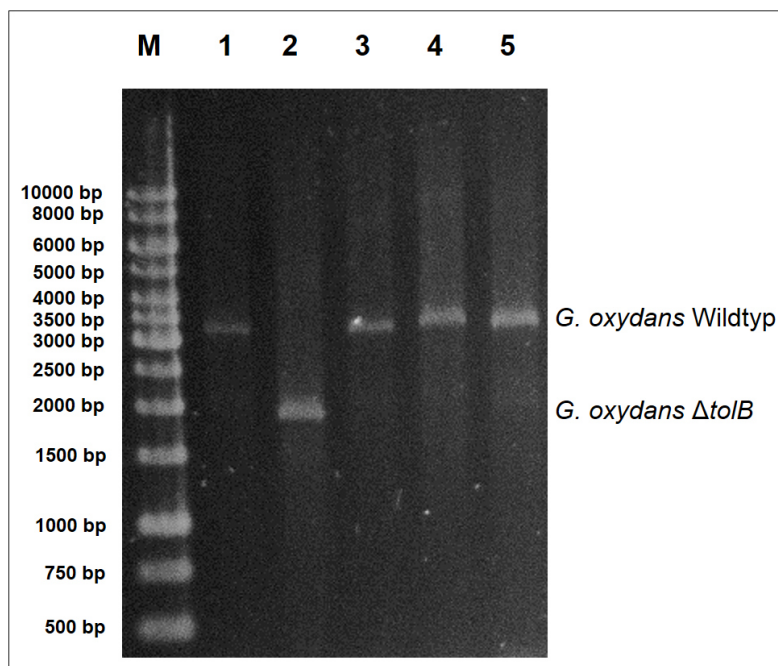


Abbildung 16: Kolonie-PCR von *G. oxydans* zum Nachweis einer erfolgreichen zweiten homologen Rekombination. Im Fall einer Reversion zum Wildtyp wurde eine Fragmentgröße von 3262 bp erwartet und bei einer erfolgreichen Deletion lag die Fragmentgröße bei 1900 bp. M: 1 kb Marker; 1-5: Klon von *G. oxydans*, bei denen die zweite homologe Rekombination erfolgte. Klon 2 zeigte eine erfolgreiche Deletion von *tolB*.

3.3.3 Phänotypische Charakterisierung von *G. oxydans* $\Delta tolB$

Im Fall von überlebensfähigen *tolB*-Deletionsmutanten verschiedener Bakterienarten konnte oftmals ein Phänotyp beschrieben werden, der eine gestörte Zellteilungsfähigkeit aufwies (Dubuisson *et al.* 2005; Lo Sciuto *et al.* 2014). Diese Zellen bildeten Ketten unterschiedlicher Länge aus und zeigten häufig eine erhöhte Sensitivität gegenüber Detergenzien und verschiedenen Antibiotika. Zusätzlich wurde oft ein verschlechtertes Wachstum unter hypoosmotischen Bedingungen, sowie bei einer hohen Ionenstärke, verursacht durch Salzstress, beobachtet (Dubuisson *et al.* 2005; Lo Sciuto *et al.* 2014). Da der Wildtyp von *G. oxydans* im natürlichen Habitat bevorzugt in hyperosmotischen Medien wächst und dort bereits sensitiv auf Salzstress reagiert, wurden bei *in vivo*-Experimenten unter Standardbedingungen für die Anzucht ausschließlich Kulturmedien ohne Salzzugabe und mit hohen Zuckerkonzentrationen verwendet. Dadurch wurde der durch die Deletion von *tolB* entstandene mögliche negative Einfluss auf die Populationsdynamik minimiert. Für die experimentelle Analyse wurde ein vergleichendes Wachstumsexperiment zwischen *G. oxydans* Wildtyp und *G. oxydans* $\Delta tolB$ unter Standardbedingungen durchgeführt (Abb. 17).

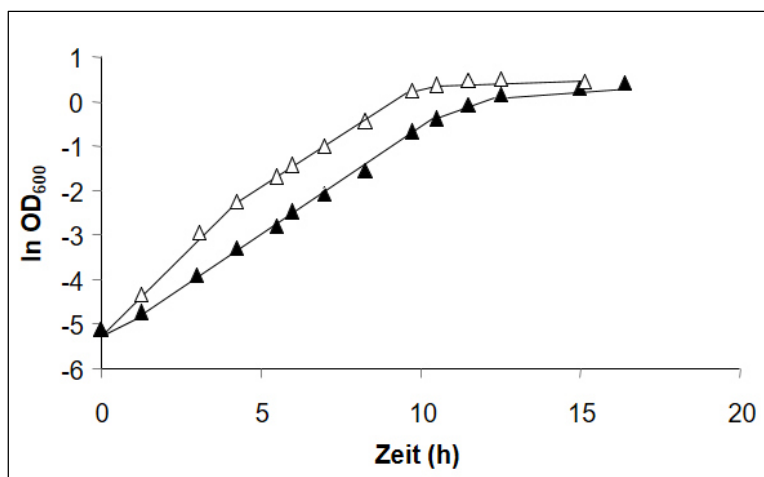


Abbildung 17: Logarithmische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *G. oxydans* Wildtyp (Δ) im Vergleich zur *tolB*-Deletionsmutante (\blacktriangle). Beim verwendeten Medium handelte es sich um YM-Medium mit einer Mannitol-Konzentration von 50 mM. Die Anzucht erfolgte bei 30 °C. Modifiziert nach Kosciow *et al.* 2016.

Der Wildtyp erreichte eine finale OD_{600nm} von 1,6. Zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase lag die Verdopplungszeit bei 1,0 h und erhöhte sich in der späten exponentiellen Phase auf 1,5 h. *G. oxydans* $\Delta tolB$ erreichte eine finale OD_{600nm} von 1,45 mit einer Verdopplungszeit von 1,5 h. Diese Werte verdeutlichten, dass beide Stämme ähnliche Wachstumscharakteristika besaßen und dass die Deletionsmutante unter den gegebenen Bedingungen nur eine leichte Reduktion der finalen Zelldichte sowie der initialen Wachstumsrate aufwies (Kosciow *et al.* 2016).

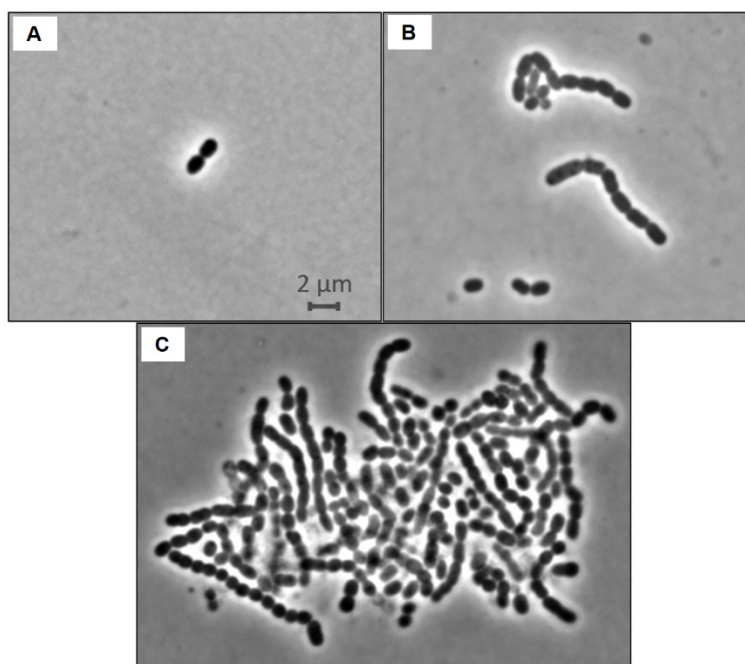


Abbildung 18: Morphologie von *G. oxydans* (A) und *G. oxydans* $\Delta tolB$ (B, C). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von *G. oxydans* Wildtyp und der TolB-defizienten Mutante. Modifiziert nach Kosciow *et al.* 2016.

Eine Analyse mittels Phasenkontrastmikroskopie zeigte eine charakteristische Morphologie, die für *tolB*-defiziente prokaryotische Organismen bereits zuvor beobachtet wurde (Dubuisson *et al.* 2005; Lo Sciuto *et al.* 2014). Der Wildtyp von *G. oxydans* (Abb. 18 A) lag als ovales Kurzstäbchen vor und erschien während der Zellteilung als Doppelstäbchen. *G. oxydans* $\Delta tolB$ (Abb. 18 B) hingegen bildete längere Zellverbände bestehend aus bis zu 20 Einzelzellen unterschiedlicher Größe aus. Diese wiederum bildeten teilweise große Aggregate (Abb. 18 C). Makroskopisch war kein Unterschied zum Wildtyp erkennbar.

3.3.4 Nachweis der Sekretion einer periplasmatischen Ribonuklease durch *G. oxydans* $\Delta tolB$

Nach mikroskopischer Analyse des Phänotyps sowie des Wachstumsverhaltens von *G. oxydans* $\Delta tolB$, sollte im nächsten Schritt die Permeabilität der äußeren Membran untersucht werden. Zunächst erfolgte dies über den Nachweis der Aktivität periplasmatischer Ribonukleasen im Kulturmedium. Bei diesem Nachweis handelte es sich um eine Methode, die bereits für die Untersuchung von sekretorischen Eigenschaften von *E. coli* und *Salmonella typhimurium* angewendet wurde (Lopes *et al.* 1972; Weigand und Rothfield 1976; Lazzaroni und Portalier 1979; Levensgood-Freyermuth *et al.* 1993). Basierend auf der Genomsequenz (Prust *et al.* 2005) konnten in *G. oxydans* bioinformatisch verschiedene Gene identifiziert werden, bei denen es sich um putative Ribonuklease-kodierende Gene handelt. Durch Analysen mit den Internetprogrammen Phobius und SignalP (Käll *et al.* 2004; Petersen *et al.* 2011) war es möglich, Gox2020 als einzige potentielle periplasmatische Ribonuklease zu ermitteln (Tab. 10).

Tabelle 10: Bioinformatische Analyse möglicher periplasmatischer Ribonukleasen in *G. oxydans*. Dargestellt sind Gene aus *G. oxydans* 621H mit zugehöriger Annotation sowie das Vorhandensein eines Signalpeptids als Hinweis für eine Translokation, analysiert mittels SignalP (Petersen *et al.* 2011) und Phobius (Käll *et al.* 2004).

| Gen in <i>G. oxydans</i> | Annotation | Signalsequenz (SignalP) | Signalsequenz (Phobius) |
|--------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>gox0177</i> | Ribonuklease H | Nein | Nein |
| <i>gox0345</i> | Ribonuklease HIII | Nein | Nein |
| <i>gox0625</i> | Ribonuklease D | Nein | Nein |
| <i>gox1282</i> | Ribonuklease PH | Nein | Nein |
| <i>gox1731</i> | Ribonuklease E | Nein | Nein |
| <i>gox1750</i> | Ribonuklease III | Nein | Nein |
| <i>gox1847</i> | Ribonuklease D | Nein | Nein |
| <i>gox2020</i> | Ribonuklease I | Ja | Ja |

NCBI BLASTp-Analysen ergaben deutliche Sequenzähnlichkeiten von Gox2020 mit den bereits bekannten periplasmatischen Typ I RNasen aus *E. coli* K12 (Meador und Kennell 1990) und *Aeromonas (A.) hydrophila* AH1133 (Favre *et al.* 1993). Im Fall von *E. coli* lag die Identität bei 31 % und

einer Sequenzabdeckung von 83 %, beim korrespondierenden Enzym aus *A. hydrophila* etwas niedriger bei einer Identität von 24 % und einer Sequenzabdeckung von 66 %. Diese bioinformatische Analyse ließ darauf schließen, dass es sich bei Gox2020 mit großer Wahrscheinlichkeit um eine periplasmatische Ribonuklease handelt und das Enzym somit ein geeignetes natives Markerprotein für die Untersuchung der Membranpermeabilität von *G. oxydans* $\Delta tolB$ darstellte.

Für diesen Nachweis wurden sowohl der Wildtyp von *G. oxydans* als auch der Stamm *G. oxydans* $\Delta tolB$ zunächst auf Toluidinblau-Indikator-Agarplatten ausgestrichen und bei 30 °C für 48 h inkubiert (Abb. 19). Dieses YM-Festmedium enthielt zusätzlich Toluidinblau O und Hefe-RNA. Das Prinzip beruht darauf, dass Toluidinblau in Kombination mit der RNA einen blauen Farbkomplex bildet. Bei Spaltung der RNA durch beispielsweise RNAsen erfolgt eine Bindung von Toluidinblau an Sulfatestergruppen des Agars. Hierbei entsteht ein rötlicher Farbkomplex, wodurch eine visuelle Detektion aktiver RNAsen ermöglicht wird (Korn *et al.* 2000).

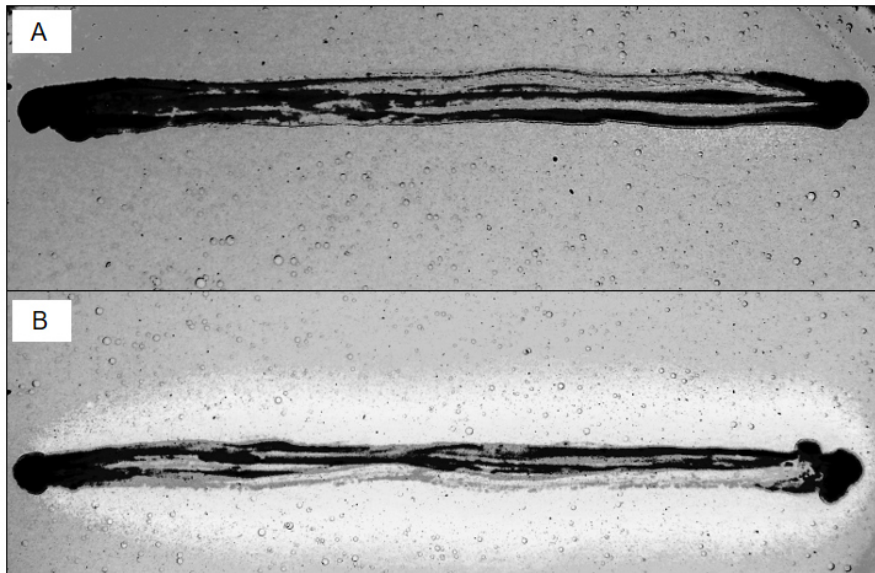


Abbildung 19: Nachweis der Sekretion nativ vorhandener periplasmatischer Ribonukleasen mittels Toluidinblau-Indikator-Agarplatten. A: *G. oxydans* Wildtyp B *G. oxydans* $\Delta tolB$. Modifiziert nach Kosciow *et al.* 2016.

In Abbildung 19 ist erkennbar, dass *G. oxydans* $\Delta tolB$ einen sehr großen und klaren Hof während des Wachstums auf Toluidinblau-Indikator-Agarplatten erzeugte, was auf eine starke Freisetzung nativer periplasmatischer Ribonukleasen zurückzuführen war (Abb. 19 B). Im Gegensatz dazu war im Fall des Wildtyps nur ein Hof mit geringer Größe erkennbar (Abb. 19 A). Dieser war vermutlich das Resultat cytoplasmatischer und periplasmatischer RNAsen, welche im Verlauf des Wachstums durch lysierte Zellen freigesetzt wurden.

3.3.5 Nachweis der Sekretion des heterolog produzierten Reporterenzym *PhoA* durch *G. oxydans* $\Delta tolB$

Um die Funktionalität des zuvor entwickelten pBBR1-basierten Expressionssystems (Abschnitt 3.1) für die heterologe Produktion von Exoenzymen zu analysieren, wurde der Vektor pBBR1p264-SP*pelB*-*phoA* (Abb. 12) in die Deletionsmutante *G. oxydans* $\Delta tolB$ mittels Elektroporation eingebracht. Das Gen *phoA*, welches eine alkalische Phosphatase kodiert, diente als Reporter. Als aktives Enzym spaltet PhoA unter extrazellulären Bedingungen Phosphatmonoester, sodass anorganisches Phosphat sowie der korrespondierende Alkohol freigesetzt werden (Coleman und Gettins 1983). Neben *p*-Nitrophenylphosphat (Abschnitt 3.1) stellt auch 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) ein mögliches artifizielles chromogenes Substrat dieser Phosphatase dar. Durch diese Hydrolyse wird das Substrat BCIP zu Phosphat und Brom-4-chlorindolyl gespalten. Unter Sauerstoffeinwirkung erfolgt spontan eine Oxidation zu der blauen Verbindung 5,5-Dibrom-4,4-dichlorindigo (Brickman und Beckwith 1975; Starkweather 1977; Coleman und Gettins 1983).

Sowohl *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB*-*phoA* als auch *G. oxydans* $\Delta tolB$ pBBR1p264-SP*pelB*-*phoA* wurden auf BCIP-Agarplatten aufgetragen und die freigesetzten Phosphatasen mittels Agardiffusionstest nachgewiesen (Abb. 20).

Im Fall von *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB*-*phoA* war ein sehr kleiner Hof erkennbar. Wie auch bei den periplasmatischen Ribonukleasen ist diese Beobachtung wahrscheinlich auf lysierte Zellen zurückzuführen (Abb. 20 A). *G. oxydans* $\Delta tolB$ pBBR1p264-SP*pelB*-*phoA* hingegen zeigte einen sehr deutlichen und großen Hof bei einem Wachstum auf BCIP-Agar, was wiederum auf eine starke Freisetzung der heterolog produzierten alkalischen Phosphatasen hindeutete (Abb. 20 B).

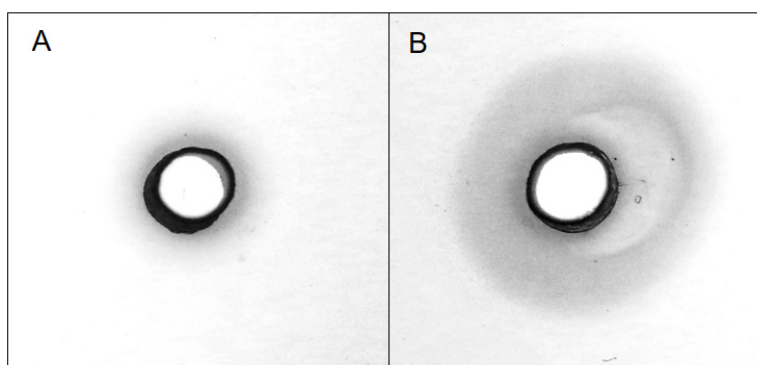


Abbildung 20: Nachweis der Sekretion heterolog produzierter alkalischer Phosphatase mittels BCIP-Agarplatten. A: *G. oxydans* pBBR1p264-SP*pelB*-*phoA* **B** *G. oxydans* $\Delta tolB$ pBBR1p264-SP*pelB*-*phoA*. Modifiziert nach Kosciow *et al.* 2016.

Dieser visuelle Schnelltest zeigte, dass mit der Deletionsmutante *G. oxydans* $\Delta tolB$ und dem Expressionssystem pBBR1p264-SP*pelB*-*phoA* die alkalische Phosphatase PhoA erfolgreich in das Periplasma transloziert und anschließend in aktiver Form in das Medium sekretiert wurde. Um die Verteilung der PhoA-Aktivität vergleichend quantifizieren zu können, wurde sowohl der *phoA*-exprimierende Wildtyp als auch die *phoA*-exprimierende TolB-defiziente Mutante von *G. oxydans* bis zu

einer OD_{600nm} von 0,6 – 0,8 unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend erfolgte eine Abtrennung des Medienüberstandes von der Zellfraktion. Das Zellpellet wurde mittels Ultraschall lysiert und das geklärte Lysat sowie der Kulturüberstand für die weiteren Enzymtests verwendet. Eine Verunreinigung des Kulturüberstands durch cytoplasmatische Zellbestandteile wurde über einen NADP⁺-gekoppelten Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Test ausgeschlossen. In allen Fällen lag die Kontamination des Überstands mit dem cytoplasmatischen Markerprotein Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase bei maximal 1 – 3 % der gesamten Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität (Kosciow *et al.* 2016).

Im Fall des PhoA-produzierenden Wildtyps von *G. oxydans* konnten 97,4 % der gesamten PhoA-Aktivität ($4,6 \pm 0,7 \text{ mmol h}^{-1} \text{ Kultur}^{-1}$) im Zellysate gemessen werden (Abb. 21). Nur ein sehr geringer Anteil von 2,6 % befand sich, wahrscheinlich freigesetzt von lysierten Zellen, im Kulturüberstand. Die PhoA-produzierende Mutante *G. oxydans* $\Delta tolB$ zeigte eine Verteilung der Gesamt-PhoA-Aktivität ($6,3 \pm 0,6 \text{ mmol h}^{-1} \text{ Kultur}^{-1}$) von $50,4 \pm 3 \%$ in der zellulären Fraktion und $49,6 \pm 3 \%$ im Kulturüberstand. Diese Werte verdeutlichten eine etwa 19-fache Steigerung der PhoA-Aktivität im Kulturmedium von *G. oxydans* $\Delta tolB$ im Vergleich zum Wildtyp von *G. oxydans* (Kosciow *et al.* 2016).

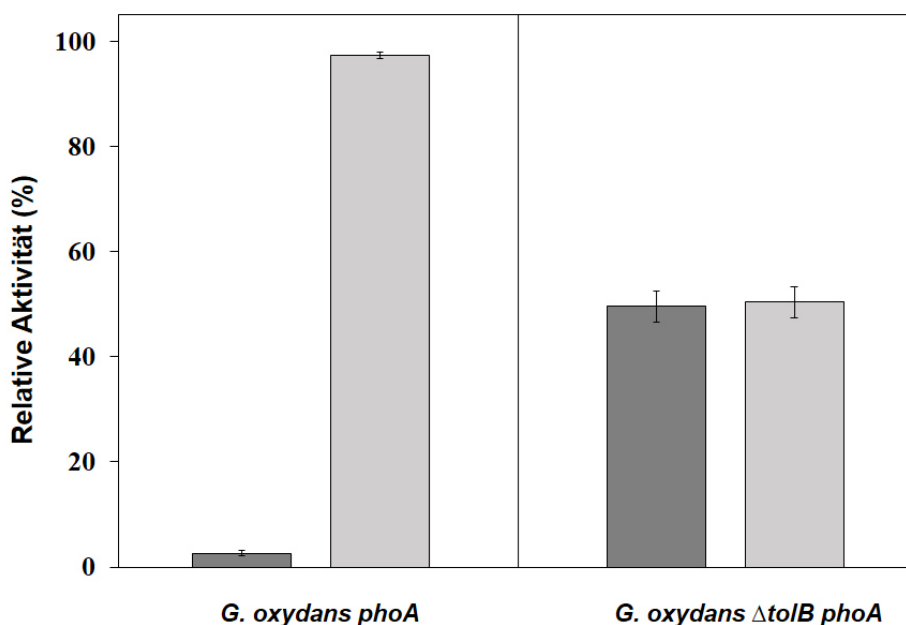


Abbildung 21: Verteilung der alkalischen Phosphatase-Aktivität im *phoA*-exprimierenden Wildtyp von *G. oxydans* und der *phoA*-exprimierenden Deletionsmutante. Die Gesamtaktivität betrug im Fall von *G. oxydans phoA* $4,6 \pm 0,7 \text{ mmol h}^{-1} \text{ Kultur}^{-1}$ und im Fall von *G. oxydans* $\Delta tolB$ *phoA* $6,3 \pm 0,6 \text{ mmol h}^{-1} \text{ Kultur}^{-1}$. Die relative Aktivität des Kulturüberstands ist in dunkelgrau dargestellt und die relative Aktivität des Zellextrakts in hellgrau. Modifiziert nach Kosciow *et al.* 2016.

Mit der Entwicklung des TolB-defizienten Stamms von *G. oxydans* 621H in Kombination mit dem Expressionssystem, welches für die Produktion periplasmatischer Hydrolasen in *Gluconobacter* konstruiert und optimiert wurde (Abschnitt 3.1), ergaben sich völlig neue Möglichkeiten im Hinblick auf die Stammoptimierung mit dem Schwerpunkt der Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans*.

3.4 Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um das nachhaltige Disaccharid Saccharose

In Abschnitt 3.1 konnte ein pBBR1-basiertes Expressionssystem für heterologe Hydrolasen entwickelt werden, mit dem es möglich war, das Substratspektrum von *G. oxydans* auf das Modellsaccharid Trehalose zu erweitern. Dies erfolgte durch Austausch des Reporterenzym-kodierenden Gens *phoA* im Vektor pBBR1p264-*SPpeIB-phoA* durch die periplasmatische Trehalase *treA* aus *E. coli* K12 (Kosciow *et al.* 2014). Der nächste Schritt der Stammoptimierung sollte von diesem Modellsystem wegführen und den Übergang zu einem industriell anwendbaren System schaffen. Bei Trehalose handelt es sich um einen Zucker, der in der Natur ubiquitär, jedoch in verhältnismäßig geringer Menge vorhanden ist. In industriellem Maßstab wird Trehalose, auch als Mykose oder Pilzzucker bezeichnet, entweder aufwendig über einen Trehalose-Synthase-Komplex von *Saccharomyces cerevisiae* synthetisiert (Bell *et al.* 1998; Schiraldi *et al.* 2002; Jules *et al.* 2008) oder durch schrittweise Hydrolyse von Stärke gewonnen (Kobayashi *et al.* 1997; Mukai *et al.* 1997). Dieser Mehraufwand führt, verglichen mit dem von *G. oxydans* benötigten und aus der Hydrolyse von Trehalose resultierenden Substrat Glukose, schließlich zu einem um den Faktor 40 – 100 höheren Marktpreis. Somit besaß Trehalose in dieser Arbeit ausschließlich Modellfunktion.

Das Disaccharid Saccharose hätte als neues Substrat für *G. oxydans* aus industrieller Sicht große Vorteile. Dieser Zucker besteht aus D-Glukose, welche über eine α,β -1,2-glykosidische Bindung mit D-Fruktose geknüpft ist. Die industrielle Gewinnung erfolgt einfach und in großem Maßstab aus Zuckerrübe, Zuckerrohr und Zuckerpalme (Hatch und Slack 1966; Giaquinta 1979; Ho *et al.* 2007). Vor dem Hintergrund, dass das Trockengewicht von Saccharose in Zuckerrüben einen Massenanteil von bis zu 75 % aufweisen kann (Wyse 1979), wäre ein direkter Einsatz dieses nachwachsenden Rohstoffs als Substrat von *G. oxydans* aus finanzieller Sicht sinnvoll und wünschenswert.

In diesem Abschnitt der Arbeit war es daher das Ziel, das Substratspektrum von *G. oxydans* um Saccharose zu erweitern.

3.4.1 Identifikation einer geeigneten Sucrase

Prokaryoten haben verschiedene Strategien entwickelt um Saccharose enzymatisch hydrolysieren zu können. Zu diesen zählen beispielsweise Levan- und Inulosucrasen, welche neben der hydrolytischen Funktion zusätzlich eine Transfruktosylreaktion katalysieren. Bei der Transfruktosylreaktion dient Saccharose als erstes Substrat, sowie $(2,6\text{-}\beta\text{-D-Fruktosyl})_n$ im Fall von Levan und $(2,1\text{-}\beta\text{-D-Fruktosyl})_n$ im Fall von Inulin als zweites Substrat. Als Produkte entstehen bei dieser Reaktion Glukose sowie $(2,6\text{-}\beta\text{-D-Fruktosyl})_{n+1}$ oder $(2,1\text{-}\beta\text{-D-Fruktosyl})_{n+1}$. Durch die Übertragung der Fruktosylreste findet somit die Bildung eines Fruktanpolymers statt, das im Fall von Levan β -2,6- und im Fall von Inulin β -2,1-glykosidisch verknüpft ist. (Dedonder 1966; Lyness und Doelle 1983; Olivares-Illana *et al.* 2003; Ozimek *et al.* 2006).

Beide Enzymklassen waren jedoch in dieser Arbeit für die Spaltung der Saccharose nicht von Bedeutung, da zunächst eine rein hydrolytische Enzymfunktion gewünscht war. Wie auch im Fall der

Trehalase TreA sollte die Sucrase bevorzugt einem Gram-negativen Organismus entstammen und nativ in löslicher Form und außerhalb des cytoplasmatischen Zellkompartiments vorliegen. Ein geeignetes Enzym konnte in einem nah mit *G. oxydans* verwandten Organismus identifiziert werden, *Zymomonas (Z.) mobilis*. Dieses α -Proteobakterium besitzt eine intrazelluläre Sucrase SacA, eine extrazelluläre Levansucrase SacB und eine extrazelluläre Sucrase SacC (Preziosi *et al.* 1990; O'Mullan *et al.* 1992; Senthilkumar *et al.* 2004). Die Primärsequenz von SacC besteht aus 413 AS und das erwartete Molekulargewicht beträgt 46 kDa. Das Enzym liegt in nativer Form als Monomer vor (Abb. 22) und wird im Wirtsorganismus über einen bisher ungeklärten Transportweg sekretiert (Preziosi *et al.* 1990). *In vivo* katalysiert SacC als Exosucrase die Hydrolyse von extrazellulärer Saccharose. Das pH-Optimum liegt im für *G. oxydans* idealen Bereich von pH 5 - 6, der K_m -Wert für Saccharose bei 86 mM und der V_{max} -Wert bei etwa 900 μmol hydrolysiertem Substrat $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Enzym (O'Mullan *et al.* 1992).

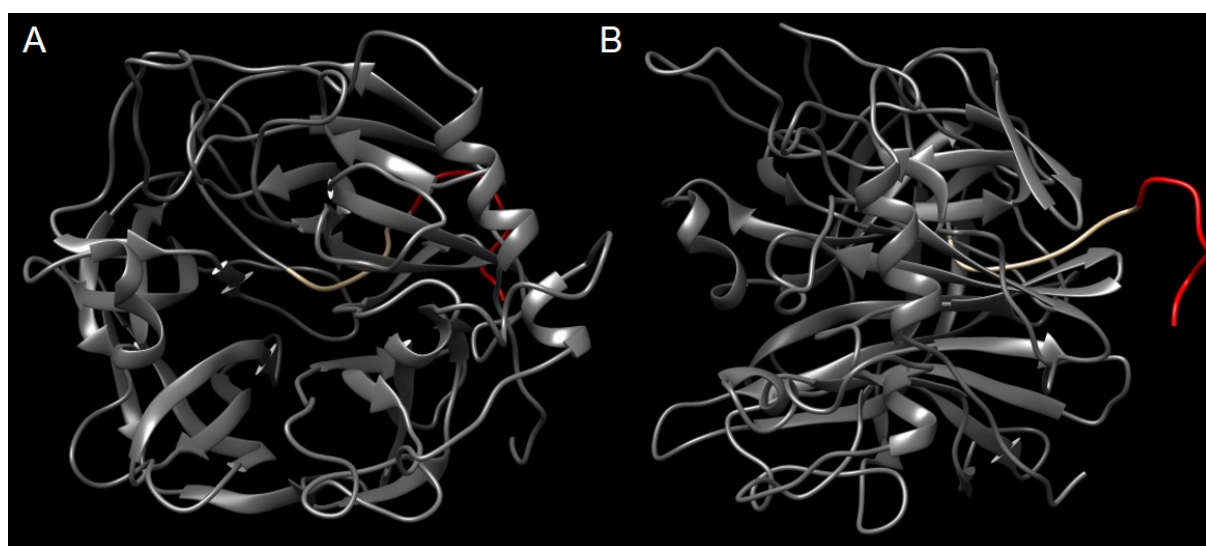


Abbildung 22: Die extrazelluläre Sucrase SacC aus *Z. mobilis*. SacC zählt zur Glykosidhydrolase-Familie 68 und liegt nativ als Monomer vor. Rot gekennzeichnet ist der C-terminal angefügte Strep-Tag, welcher über eine verlängerte Linkerregion (hellgrau) an das Enzym gekoppelt wurde. Das Modell wurde mittels Phyre2 und UCSF Chimera erstellt (Pettersen *et al.* 2004; Kelley *et al.* 2015).

3.4.2 Konstruktion eines *sacC*-beinhaltenden Expressionssystems

Analog zur Klonierungsstrategie von pBBR1p264-SP*pelB-treA* (Abschnitt 3.2) sollte die Erstellung des Vektors pBBR1p264-SP*pelB-sacC* durch Austausch des Gens *phoA* im Vektor pBBR1p264-SP*pelB-phoA* durch das extrazelluläre Sucrase-kodierende Gen *sacC* erfolgen (Abb. 24 A). Dazu wurde *sacC* nach Standardprotokoll bei $T_A = 65^\circ\text{C}$ amplifiziert, wobei die genomische DNA von *Z. mobilis* ZM4 als Matrize diente. Da SacC kein bekanntes Signalpeptid besitzt, wurde bei der Amplifizierung ausschließlich das Start- und Stopkodon der Nukleotidsequenz entfernt. Dadurch wurde eine N-terminale Fusion an die Sec-abhängige Signalsequenz von *PelB* und eine C-terminale Fusion an den Strep-Tag ermöglicht. Über die Oligonukleotide *SacC.fw* und *SacC.rev* konnten die Restriktionsschnittstellen *Sna*BI und *As*CI eingebracht werden. Nach Restriktionsverdau des Amplifikats

mit der zu erwartenden Länge von 1258 bp und des Vektors pBBR1p264-*SPpeIB-phoA* mit *Sna*BI und *As*cl, war eine Ligation mit anschließender Transformation in *E. coli* DH5 α möglich. Es folgte eine Kolonie-PCR, um positive Klone von *E. coli* DH5 α , die den Vektor pBBR1p264-*SPpeIB-sacC* trugen, zu erhalten. Für diese Kolonie-PCR wurden die beiden Oligonukleotide p264SP.f und pASK_R (Kosciow *et al.* 2016) verwendet. Mit diesen Oligonukleotiden ließ sich im pBBR1-basierten Expressionssystem der Bereich amplifizieren, der vom Endbereich der Promotorregion und von der Genregion stromabwärts der Strep-Tag-kodierenden Sequenz flankiert wurde (Abb. 23). Aufgrund ihrer universellen Kompatibilität wurden beide Oligonukleotide für die Kolonie-PCR sowie Sequenzierung zur Überprüfung eines korrekten Leserasters für alle pBBR1p264-basierten Expressionssysteme eingesetzt.

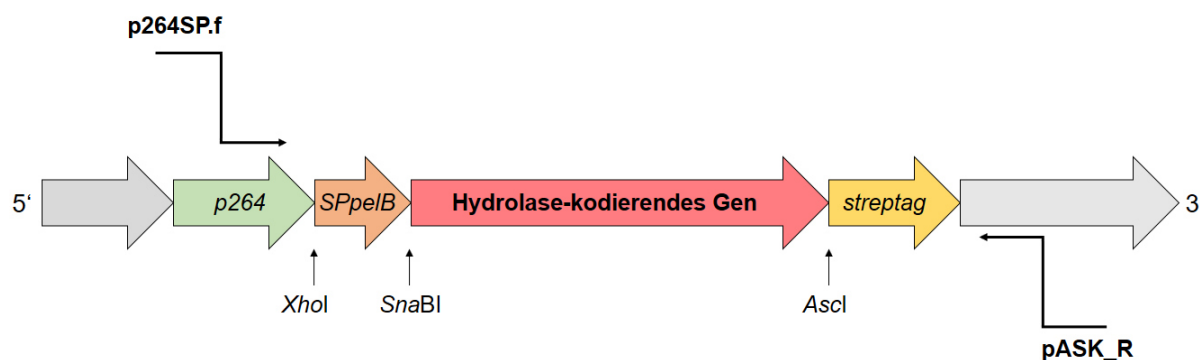


Abbildung 23: Bindestellen der Oligonukleotide p264SP.f und pASK_R. Aufgrund der universellen Einsetzbarkeit wurden diese Oligonukleotide sowohl für die Kolonie-PCR als auch Sequenzierung aller folgenden pBBR1p264-basierten Expressionssysteme für die Expression heterologer Hydrolasen verwendet (Kosciow *et al.* 2016). Schematisch dargestellt ist die Region eines pBBR1p264-Vektors, in der über einfache Klonierungsschritte ein Austausch der Signalsequenz *SPpeIB* oder des gewünschten Gens erfolgen kann. Zusätzlich sind die Restriktionsschnittstellen *Xho*I, *Sna*BI und *As*cl angegeben.

Bei einer erfolgreichen Klonierung wurde bei der Kolonie-PCR im Fall von pBBR1p264-*SPpeIB-sacC* ein Amplifikat mit einer Größe von 1565 bp erwartet. Diese Größe korrespondierte mit dem erhaltenen Fragment (Abb. 24 B).

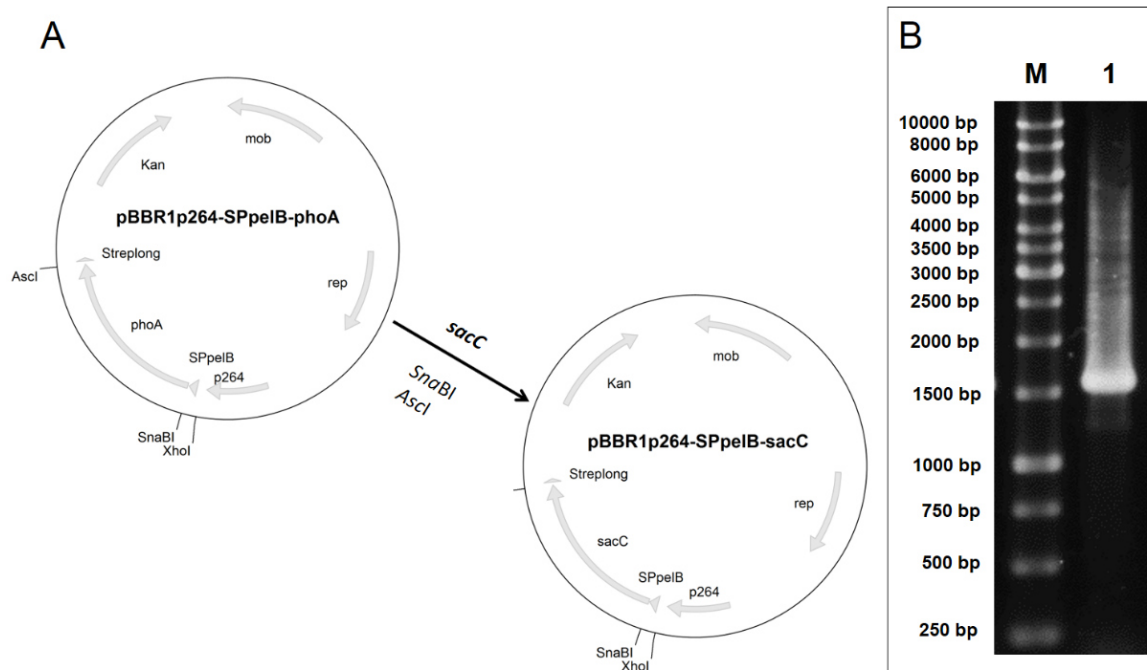


Abbildung 24: Klonierungsstrategie für das extrazelluläre Sucrase-kodierende Gen *sacC*. **A:** Erstellung des Expressionssystems für *sacC*. Das Reportergen *phoA* wurde über einen einfachen Klonierungsschritt über die Schnittstelle *SnaBI/Ascl* durch *sacC* ersetzt. Kan: Kanamycinresistenzkassette; rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion vom gen *gox0264*; mob: Mobilisierungsgen; Streplong: Strep-Tag mit elongierter Linkerregion **B:** Gelbild der Kolonie-PCR mit einem Klon von *E. coli* DH5 α , welcher den gewünschten Vektor pBBR1p264-*SPpelB-sacC* aufgenommen hatte. Bei der PCR wurde als Hybridisierungstemperatur T_A [°C] = 59 °C gewählt. Das entstandene PCR-Produkt wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die erwartete Fragmentgröße betrug 1565 bp. M: 1 kb Marker.

3.4.3 *In vitro*-Analyse der mit *G. oxydans* heterolog produzierten und aufgereinigten Sucrase SacC

Nachdem der Vektor pBBR1p264-*SPpelB-sacC* erfolgreich konstruiert und in *E. coli* vervielfältigt wurde, konnte dieser mittels Elektroporation in *G. oxydans* transformiert werden. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob auch eine erfolgreiche heterologe Produktion von SacC möglich war. Dazu wurde *G. oxydans* pBBR1p264-*SPpelB-sacC* (nachfolgend *G. oxydans sacC*) bis zu einer OD_{600nm} von 0,8 - 1,2 unter Standardbedingungen in YM-Medium kultiviert, geerntet und das Zellpellet durch Ultraschall lysiert. Das Lysat wurde anschließend geklärt und SacC über den C-terminal fusionierten Strep-Tag mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Es wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot durchgeführt, um über die detektierte Größe auf ein erfolgreich produziertes Protein schließen zu können. Für SacC wurde, mit Signalsequenz und elongiertem C-terminal fusionierten Strep-Tag, mithilfe des Internetprogramms ProtParam (Gasteiger *et al.* 2005) ein Molekulargewicht von 50 kDa berechnet. Dieser Wert stimmte mit der experimentell bestimmten molekularen Masse überein (Abb. 25).

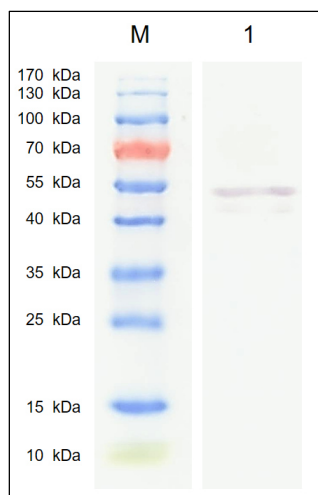


Abbildung 25: Visualisierung der durch *G. oxydans sacC* heterolog produzierten Sucrase SacC mittels Westernblot. Das *in silico* berechnete Molekulargewicht von SacC mit Signalsequenz und mit C-terminal fusionierten Strep-Tag betrug 50 kDa und entsprach der detektierten Größe (1). Es wurden 3 μg aufgereinigtes Protein aufgetragen. M: Marker.

Für den Nachweis einer katalytisch aktiven Konformation der heterolog durch *G. oxydans sacC* produzierten Sucrasen wurde ein Aktivitätstest mit aufgereinigten Enzymen durchgeführt. Dabei wurden die Reaktionsbedingungen so gewählt, dass sie den später bei *in vivo*-Experimenten mit *G. oxydans* vorliegenden Reaktionsbedingungen entsprachen. Das aufgereinigte Enzym SacC wurde in verschiedenen Mengen (0 – 10 μg) in einen Aktivitätstest eingesetzt, welcher neben einem 100 mM Kaliumphosphatpuffersystem pH 6,8 eine Konzentration von 50 mM Saccharose als Substrat enthielt (Abb. 26).

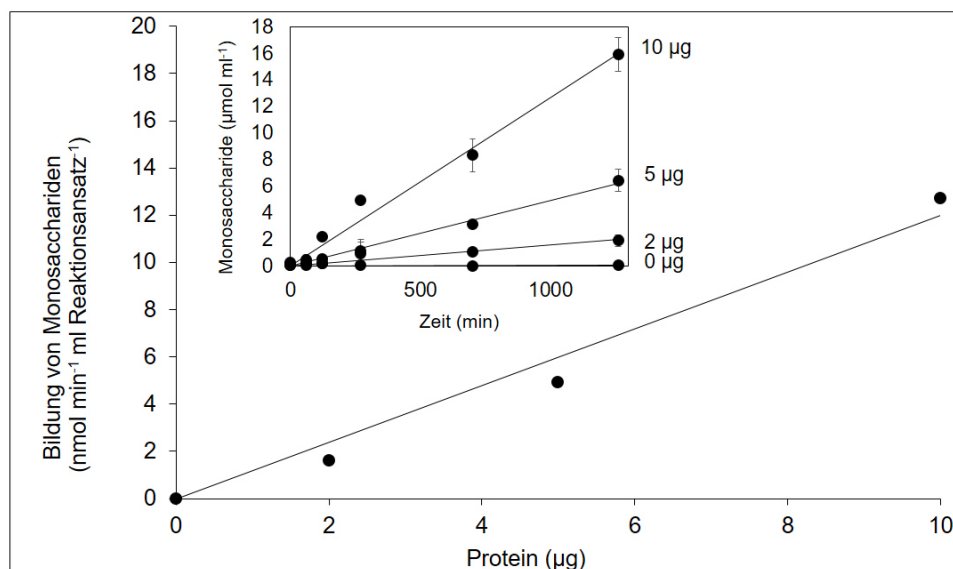


Abbildung 26: Enzymaktivität von gereinigtem SacC. Dargestellt ist die Zunahme der Sucrase-Aktivität bei ansteigender Enzymmenge ($\text{nmol produzierte Monosaccharide min}^{-1} \text{ ml Reaktionsansatz}^{-1}$)
Insert: Bildung von Monosacchariden in $\mu\text{mol pro ml Reaktionsansatz}$ über die Zeit, 0 – 10 μg Protein wurde eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestand aus 100 μl 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,8, 100 μl Saccharose-Lösung (0,5 M) sowie der angegebenen Enzymmenge. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 1 ml.

Abbildung 26 zeigt, dass eine enzymatische Aktivität der heterolog von *G. oxydans* *sacC* produzierten Sucrasen *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Die Reaktionsbedingungen entsprachen dabei den physiologischen Ansprüchen von *G. oxydans*, sodass diese Voraussetzung für eine *in vivo*-Hydrolyse von Saccharose durch *G. oxydans* *sacC* gegeben war. Es war ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Enzymmenge und der nachweisbaren Stoffmenge an freien Monosacchariden pro Zeiteinheit erkennbar. Der Nachweis dieser Monosaccharide, zu gleichen Anteilen Glukose und Fruktose, erfolgte mittels DNS-Test (Sumner und Graham 1921). Die spezifische Aktivität von SacC unter den gegebenen Bedingungen lag bei $1 \pm 0,2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

3.4.4 Wachstumsverhalten einer Sucrase-produzierenden Mutante von *G. oxydans*

In Abschnitt 3.4.3 konnte erfolgreich gezeigt werden, dass *G. oxydans* 621H mit dem Expressionssystem pBBR1p264-*SPpeIB-sacC* dazu befähigt wurde, die extrazelluläre Sucrase SacC in aktiver Form zu produzieren. Auch zeigte sich, dass SacC unter für *G. oxydans* physiologischen Bedingungen Saccharose in Glukose und Fruktose hydrolysieren konnte. Als nächstes sollte nun die Anwendungsmöglichkeit des Systems für die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um das Disaccharid Saccharose *in vivo* überprüft werden.

Dazu wurde YS-Medium, welches 50 mM Saccharose als einzige C-Quelle und 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 beinhaltetete, mit *G. oxydans* *sacC* inokuliert. Sowohl der SacC-produzierende Stamm als auch der Wildtyp von *G. oxydans* erreichten jedoch beide gleichermaßen eine geringe $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,2, was für eine Unfähigkeit des Stamms *G. oxydans* *sacC* zur Hydrolyse von Saccharose sprach. Da durch Experimente mit aufgereinigter Sucrase aus *G. oxydans* *sacC* Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte (Abb. 26), wurde von einer unzureichenden Translokation des Enzyms in das Periplasma ausgegangen. Somit sollte im nächsten Schritt eine Möglichkeit gefunden werden, die Proteintranslokation zu optimieren und dadurch auch die Saccharose-hydrolysierenden Eigenschaften des Stamms zu verbessern.

Proteomanalysen zeigten, dass TolB abhängig vom Organismus eines der häufigsten Proteine im Periplasma darstellen kann (Imperi *et al.* 2009; Lo Sciuto *et al.* 2014). Eine geringere Belastung des Sec-Translokationsmechanismus infolge einer Deletion des entsprechenden Gens könnte somit zu einer Optimierung der Transportrate der heterolog produzierten periplasmatischen Hydrolasen in *G. oxydans* ΔtolB führen.

Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Verwendung der in Abschnitt 3.3 erstellten *tolB*-defizienten Mutante von *G. oxydans* die Erweiterung des Substratspektrums auf Saccharose mit dem Expressionssystem pBBR1p264-*SPpeIB-sacC* ermöglichen könnte. Dazu wurde dieser Vektor mittels Elektroporation in *G. oxydans* ΔtolB eingebracht. Sowohl der Kontrollstamm *G. oxydans* ΔtolB als auch die *sacC*-exprimierende TolB-Deletionsmutante wurden in YS-Flüssigmedium kultiviert, welches 50 mM Saccharose als einzige C-Quelle enthielt. Während die finale $\text{OD}_{600\text{nm}}$ im Fall von *G. oxydans* ΔtolB bei nur 0,25 lag, erreichte der SacC produzierende Stamm eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 1,9. Innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase lag die Wachstumsrate dieses Stamms bei $0,045 \text{ h}^{-1}$ und einer Verdopplungszeit von 15,4 h (Abb. 27).

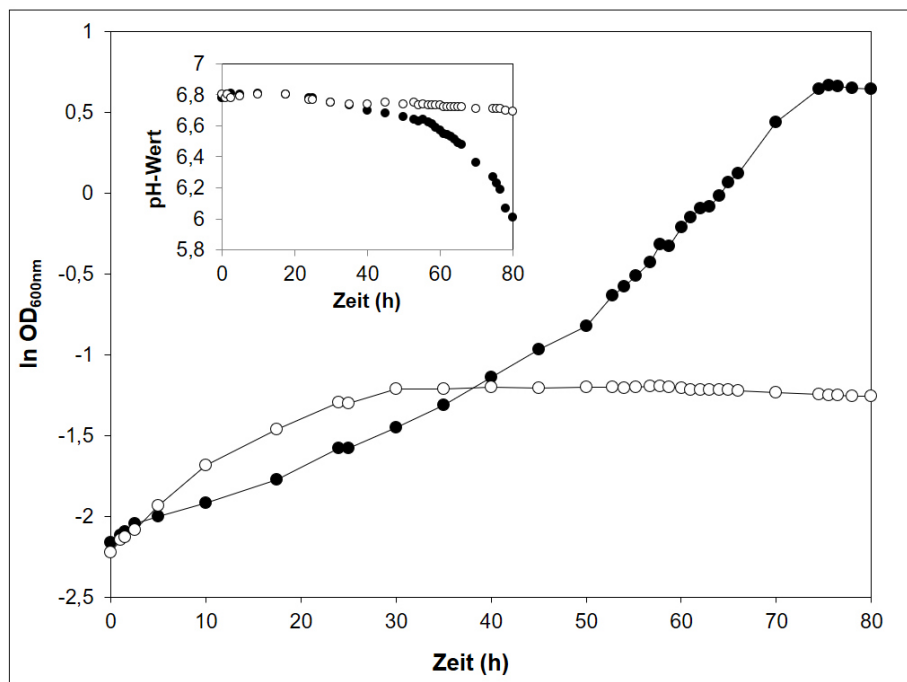


Abbildung 27: Wachstumsverhalten verschiedener *G. oxydans* - Stämme mit 50 mM Saccharose als Kohlenstoffquelle. Logarithmisch dargestellte Zunahme der Zelldichte von *G. oxydans* $\Delta tolB$ (\circ) und *G. oxydans* $\Delta tolB$ pBBR1p264-SPpeIB-sacC (\bullet) **Insert:** Darstellung des pH-Wert-Profiles der korrespondierenden Stämme bei einem Wachstum mit Saccharose als C-Quelle über die Zeit. Das Medium enthielt zusätzlich einen 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8.

Wie auch im Fall des TreA-produzierenden Stamms (Abschnitt 3.2) konnte durch Beobachtung des pH-Profiles über die Zeit im Fall von *G. oxydans* $\Delta tolB$ pBBR1p264-SPpeIB-sacC (nachfolgend *G. oxydans* $\Delta tolB$ sacC) nach Eintritt in die exponentielle Phase ein deutlicher pH-Abfall durch verstärkte Acetatbildung beobachtet werden. Während des Wachstumsversuchs wurden beiden Kulturen Proben entnommen und mittels HPLC eine Bestimmung der Saccharose-Konzentration durchgeführt (Abb. 28). Der SacC produzierende Stamm besaß demnach die Fähigkeit, Saccharose als einzige C-Quelle hydrolysieren zu können, während die Saccharose-Konzentration im Fall von *G. oxydans* $\Delta tolB$ ohne Hydrolase nur einen minimalen Abfall verzeichnete.

Durch Produktion der *Z. mobilis*-stämmigen Sucrase SacC in *G. oxydans* $\Delta tolB$ konnte somit ein Stamm von *G. oxydans* konstruiert werden, der 50 mM Saccharose als einzige C-Quelle im Medium für ein Wachstum effizient nutzen konnte und dabei eine hohe Zelldichte von $OD_{600nm} = 1,9$ erreichte.

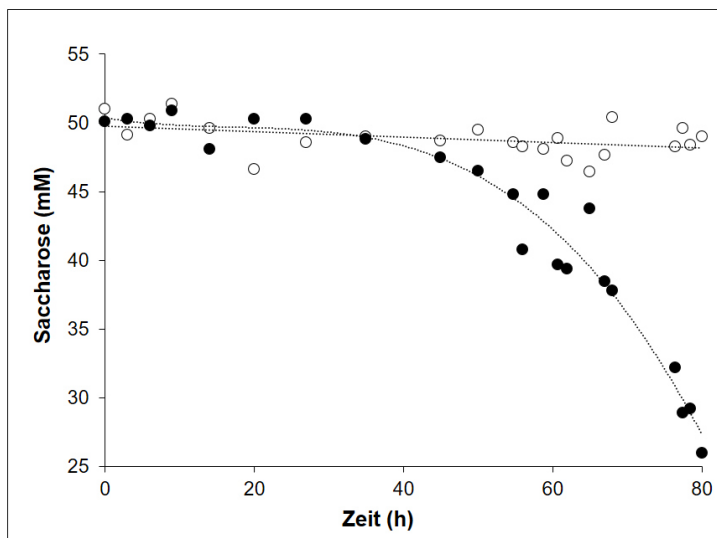


Abbildung 28: Änderung der Saccharose-Konzentration im Kulturüberstand. Darstellung der mittels HPLC bestimmten Saccharose-Konzentration innerhalb der Flüssigkultur von *G. oxydans* $\Delta tolB$ (○) und *G. oxydans* $\Delta tolB sacC$ (●) zu verschiedenen Zeitpunkten. Beim verwendeten Medium handelte es sich um YS-Medium mit einer initialen Substratkonzentration von 50 mM Saccharose. Zusätzlich enthielt das Medium 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8.

Das Enzym SacC besitzt seine maximale hydrolytische Aktivität mit Saccharose als Substrat, kann jedoch mit einer etwa 70 % geringeren spezifischen Aktivität das Substrat Raffinose hydrolysieren (O'Mullan *et al.* 1992). Bei Raffinose handelt es sich um ein Trisaccharid, bestehend aus Saccharose mit einem zusätzlichen Galaktose-Molekül, welches über eine α -1,6-Verknüpfung mit der Glukoseeinheit verbunden ist (Galaktosyl- α -1,6- Glukosyl- α -1, β -2-Fruktose). Durch ein Wachstum von *G. oxydans* $\Delta tolB sacC$ auf Raffinose sollte somit die Fruktose-Einheit abgespalten und verstoffwechselt werden, während Melibiose (Galaktosyl- α -1,6-Glukose) im Kulturüberstand verbleiben würde. Wachstumsexperimente in YR-Medium mit 50 mM Raffinose als einzige Kohlenstoffquelle und einem 100 mM Kaliumphosphatpuffersystem pH 6,8 bestätigten diese Annahme. Während *G. oxydans* eine finale OD_{600nm} von 0,3 erreichte, wuchs *G. oxydans* $\Delta tolB sacC$ bis zu einer finalen OD_{600nm} von 1,8. Ein Abfall des pH-Werts des Kulturüberstandes bis zu pH 5,6, trotz eines verwendeten Puffersystems, deutete auf eine vermehrte Säurebildung bedingt durch die Produktion von Acetat hin. Die Wachstumsparameter lagen wie erwartet deutlich unter den bei einem Wachstum mit Saccharose als Substrat beobachteten Werten.

In diesem Teil der Arbeit war es möglich, analog zur Erweiterung des Substratspektrums um das Modellsaccharid Trehalose, die Erweiterung um das kostengünstige Disaccharid Saccharose mithilfe einer TolB-Deletionsmutante von *G. oxydans* zu erreichen. Dies gelang durch die heterologe Produktion von SacC, einer extrazellulären Sucrase aus *Z. mobilis*. SacC konnte mithilfe einer N-terminalen Signalsequenz Sec-abhängig in das Periplasma transloziert und aufgrund der Deletion von TolB in aktiver Form in den Kulturüberstand sekretiert werden. Zusätzlich war die Mutante *G. oxydans* $\Delta tolB sacC$ ebenfalls dazu befähigt, das Trisaccharid Raffinose als einzige C-Quelle nutzen zu können.

3.5 Die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um das erste Polysaccharid: Xylan

Bei Xylanen handelt es sich um heteropolymer aufgebaute Hemicellulosen, die in der Natur nach Cellulose das zweithäufigste Polysaccharid darstellen. Anders als bei Cellulose liegt hier keine einfache polymere Struktur eines Monosaccharids zu Grunde, da die genaue chemische Zusammensetzung und die Mengenanteile auftretender verschiedener Monosaccharide je nach Pflanzenfamilie variieren können (Timell 1967; Bastawde 1992; Ebringerova und Heinze 2000). Die Hauptkette besteht dabei ausschließlich aus β -D-Xylopyranose-Einheiten (D-Xylose), die bei Landpflanzen β -1,4-glykosidisch verknüpft sind (Beg *et al.* 2001). Harthölzer weisen im Vergleich zu Weichhölzern seltener Verzweigungen der Hauptkette auf, jedoch ist diese bei Harthölzern häufig stark acetyliert (Timell 1967; Wikberg und Maunu 2004). In Hartholz-Hemicellulosen stellen Xylane den Hauptbestandteil dar. In monokotylen Pflanzen machen sie etwa 40 % der Biomasse aus, wo sie häufig in Form von landwirtschaftlichem Abfall als wertvoller Rohstoff verloren gehen (Singh *et al.* 2003; Collins *et al.* 2005). Aufgrund der Prävalenz und Häufigkeit dieses Polymers stellt Xylan ein ideales Grundsubstrat für die biobasierte Produktion von Feinchemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen dar (Kosciow *et al.* 2016). Eine Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um diesen nachwachsenden Rohstoff wäre daher äußerst wünschenswert. Bei einer vollständigen Hydrolyse bis zum Monosaccharid könnte in einem einzigen Fermentationsprozess Xylan extrazellulär abgebaut und periplasmatisch, die aus der Hydrolyse resultierende Xylose, zu Xylonsäure oxidiert werden (Zhou *et al.* 2015a).

Weitere wichtige Produkte, welche bei einer partiellen Hydrolyse von Xylan entstehen würden, sind Xylooligosaccharide (XOs). Bei diesen Verbindungen handelt es sich um Xylose-Oligomere mit einem geringen Polymerisationsgrad. Je nach Anwendungsfeld ist ein unterschiedlicher Grad der Polymerisation erwünscht. So werden für einen Einsatz im Nahrungsmittelbereich kurzkettige Oligomere bestehend aus 2 - 4 verknüpften Einheiten bevorzugt (van Loo *et al.* 1999; Vazquez *et al.* 2000).

In diesem Kapitel sollte unter Verwendung der sekretorischen Mutante *G. oxydans* Δ *tolB* und der heterologen Produktion geeigneter Enzyme die Nutzbarkeit des Polysaccharids Xylan durch den Organismus *G. oxydans* ermöglicht werden.

3.5.1 Auswahl geeigneter Xylan-spaltender Enzyme

Für die vollständige Spaltung der meisten natürlichen Xylane ist aufgrund vieler verschiedenartiger Seitenketten die kooperative Aktivität unterschiedlicher Enzyme notwendig (Biely 1985; Puls *et al.* 1987; Subramanian und Prema 2002; Collins *et al.* 2005). Allen Xylanen gemeinsam ist das universelle Xylan-Rückgrat, welches bei Landpflanzen ausschließlich aus β -1,4-glykosidisch verknüpften D-Xylose-Einheiten besteht (Collins *et al.* 2005). Der vollständige Abbau dieses Moleküls zu den Xylose-Grundbausteinen erfolgt in der Natur durch insgesamt drei kooperierende Enzymklassen. Endo-Xylanasen spalten das Makromolekül endohydrolytisch in kürzere Fragmente, sogenannte XOs, und verbessern so die Zugänglichkeit für die anderen beiden Enzymklassen, die Exo-Xylanasen und

Xylosidasen (Frederick *et al.* 1985; Kormelink *et al.* 1993). Von den reduzierenden Enden der Xylooligosaccharide agierend, katalysieren Exo-Xylanasen die Abspaltung von Xylose oder kürzeren Oligomeren und sorgen damit für eine starke Beschleunigung des Degradationsprozesses. Das dritte Enzym, die Xylosidase, spaltet die β -1,4-glykosidische Bindung zwischen zwei D-Xylose-Molekülen innerhalb einer Xylobiose-Einheit.

In dieser Arbeit sollte zunächst, im Hinblick auf die reine Produktion von XOs, eine geeignete Endo-Xylanase identifiziert werden. Diese sollte sich durch *G. oxydans* Δ *tolB* effizient produzieren und in aktiver Form in den Kulturüberstand sekretieren lassen. Als geeignete Kandidaten wurden hier die Enzyme Cex (P07986) aus *Cellulomonas (C.) fimi* (O'Neill *et al.* 1986; Notenboom *et al.* 1998; White *et al.* 1994), Xyll (P49942) aus *Bacteroides (B.) ovatus* (Whitehead 1995) und XynA (P18429) aus *Bacillus (B.) subtilis* (Sung *et al.* 1993; Banka *et al.* 2014) ausgewählt. Anschließend sollte die reine Endohydrolyse von Xylan bis zum vollständigen Abbau zum Monosaccharid D-Xylose erweitert werden, indem die Endo-Xylanase mit einer geeigneten heterologen β -Xylosidase koproduziert wurde. Die Enzyme, die als geeignete β -Xylosidasen für diese Arbeit ausgewählt wurden, waren XynB (P94489) aus *B. subtilis* (Desrochers 1985) und Xsa (P49943) aus *B. ovatus* (Weaver *et al.* 1992; Whitehead 1995).

3.5.2 Klonierungsstrategie von *cex*, *xyll* und *xynA*

Analog zu vorherigen Klonierungsstrategien sollte zur Erstellung der Expressionsvektoren pBBR1p264-*SPpeIB-cex*, pBBR1p264-*SPpeIB-xyll* und pBBR1p264-*SPpeIB-xynA* der Vektor pBBR1p264-*SPpeIB-phoA* (Zeiser *et al.* 2014; Kosciow *et al.* 2014) als Basis dienen. Alle drei Gene wurden mithilfe der Oligonukleotide XynA.fw/ XynA.rev, Cex.fw/ Cex.rev und XyIL.fw/ Xyll.rev unter Verwendung der jeweiligen genomischen DNA als Matrize amplifiziert und die Restriktionsschnittstellen *Ascl* und *SnaBI* eingebracht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die zuvor mittels SignalP und Phobius bioinformatisch bestimmten nativen Signalsequenzen nicht mit-amplifiziert wurden. Im Fall von *cex* betraf dies die ersten 123 bp (Signalpeptid bestehend aus 41 AS), bei *xyll* die ersten 72 bp (24 AS) und im Fall von *xynA* die ersten 84 bp (28 AS). Zusätzlich wurde jeweils das Stopp-Kodon am 3'-Ende entfernt um eine Fusion mit einem Strep-Tag zu ermöglichen. Die erwarteten Fragmentlängen lagen bei 1353 bp im Fall von *cex*, 579 bp bei *xynA* und 1078 bp bei *xyll* und entsprachen somit der Größe der erhaltenen Fragmente. Alle drei Gene wurden über die korrespondierenden Schnittstellen in den Vektor pBBR1p264-*SPpeIB-phoA* kloniert und so das Reporterenzym-kodierende Gen *phoA* ausgetauscht. Nach erfolgreicher Ligation und Vervielfältigung in *E. coli* wurden alle drei Konstrukte (Abb. 29) mittels Elektroporation in den Wildtyp und die Deletionsmutante *G. oxydans* Δ *tolB* eingebracht.

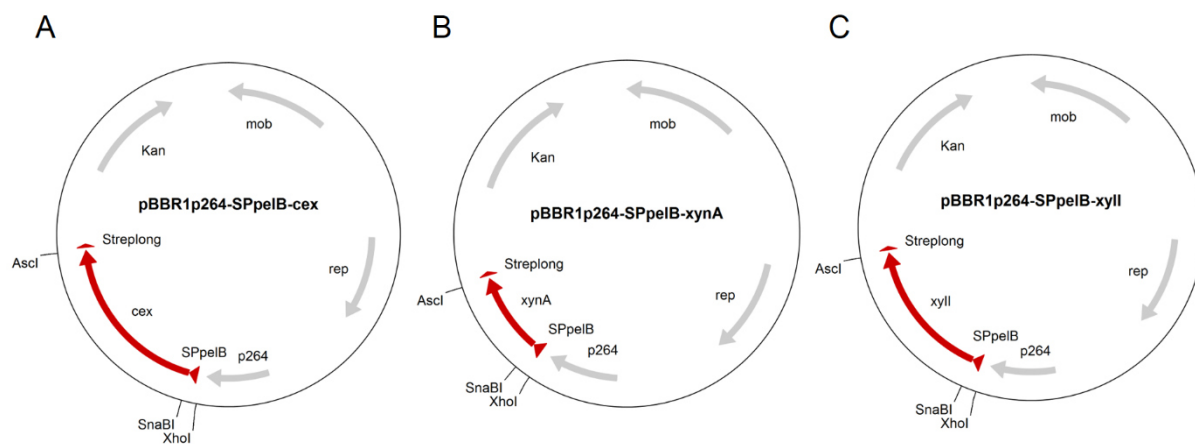


Abbildung 29: Die Vektoren pBBR1p264-SPpeIB-cex (A) und pBBR1p264-SPpeIB-xynA (B) sowie pBBR1p264-SPpeIB-xylI (C). Kan: Kanamycinresistenzkassette; rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion vom Gen *gox0264*; mob: Mobilisierungsgen; Streplong: Strep-Tag mit elongierter Linkerregion.

3.5.3 Nachweis der heterologen Expression, Produktion und Translokation der Endoxylanasen in *G. oxydans* und *G. oxydans* Δ tolB

Sowohl der Vektor pBBR1p264-SPpeIB-xylI als auch der Vektor pBBR1p264-SPpeIB-cex wurden erfolgreich in *G. oxydans* transformiert, jedoch war es in beiden Fällen nicht möglich eine heterologe Produktion dieser Proteine nachzuweisen.

Im Fall der Endoxylanase XynA aus *B. subtilis* Stamm 168 hingegen konnte eine erfolgreiche Produktion gezeigt werden. Für den Nachweis und die Lokalisation dieses Exoenzyms wurden sowohl der Wildtyp-Stamm von *G. oxydans*, welcher den Vektor pBBR1p264-SPpeIB-xynA trug (*G. oxydans* xynA), als auch der XynA-exprimierende TolB-Deletionsstamm (*G. oxydans* Δ tolB xynA) in 250 ml YM-Medium angezogen. Beide Kulturen wurden in der exponentiellen Phase bei einer OD_{600nm} von 0,8 – 1,0 geerntet und der klare Kulturüberstand wurde jeweils über eine Streptactin-Affinitätschromatographie-Säule gegeben. Da im verwendeten Expressionssystem an das 3'-Ende von xynA ein Strep-Tag fusioniert wurde, war eine Aufreinigung von XynA möglich.

Im Fall von *G. oxydans* xynA konnte eine XynA-Konzentration im Kulturüberstand von $0,9 \text{ mg l}^{-1}$ bestimmt werden, während dieser Wert im Fall von *G. oxydans* Δ tolB xynA bei 14 mg l^{-1} lag und damit um einen Faktor von etwa 15,6 höher war (Abb. 30 A; Kosciow *et al.* 2016). Das so aufgereinigte Enzym wurde mittels SDS-PAGE und Silberfärbung visualisiert. Die Größe der Proteinbande entsprach der erwarteten molekularen Masse von XynA ohne Signalsequenz und mit fusioniertem Strep-Tag von 21,4 kDa (Abb. 30 B; Kosciow *et al.* 2016).

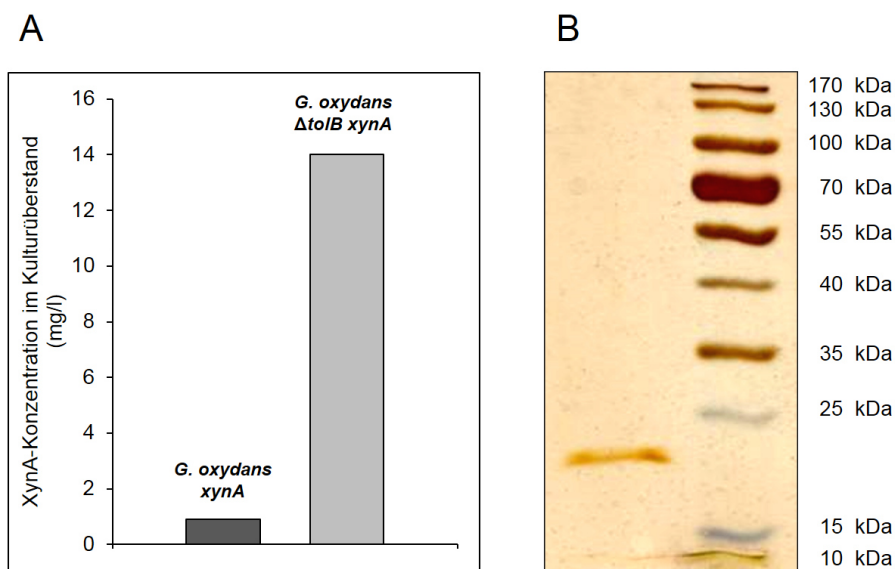


Abbildung 30: Nachweis der Endoxylanase XynA, heterolog produziert von *G. oxydans xynA* und *G. oxydans ΔtolB xynA*. **A:** Die Konzentration an XynA im Kulturüberstand von *G. oxydans xynA* und *G. oxydans ΔtolB xynA* betrug 0,9 beziehungsweise 14 mg l⁻¹ und war somit bei gleicher optischer Dichte im Fall der sekretorischen Mutante 15,6-fach höher. **B:** Silberfärbung der aufgereinigten Endoxylanase XynA. Das erwartete Molekulargewicht betrug für das Protein ohne Signalsequenz und mit Strep-Tag 21,4 kDa und korrelierte mit der experimentell nachgewiesenen Größe. Modifiziert nach Kosciow *et al.* 2016.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob XynA durch *G. oxydans ΔtolB xynA* nicht nur sekretiert wurde, sondern auch aktiv im Kulturüberstand vorlag. Dazu wurde das aus dem Überstand aufgereinigte Enzym in einen enzymatischen Aktivitätstest eingesetzt. Dieses Testsystem ist für den Nachweis endohydrolytischer Enzymaktivitäten optimiert und basiert auf der Hydrolyse von Farbstoff-gekoppelten Polysacchariden. Für die Aktivitätsmessung von XynA wurde Remazol-Brilliant-Blau (RBB) - gefärbtes Xylan als Substrat verwendet. Bei der Färbereaktion wird der Farbstoff zunächst kovalent an Monosaccharide innerhalb der Polysaccharidkette gekoppelt. In wässriger Lösung ist RBB-Xylan bis zu einer bestimmten Konzentration löslich, fällt jedoch bei Zugabe von Ethanol durch Entzug der Hydrathülle aus und lässt sich als Feststoff abzentrifugieren. Durch die Aktivität von Endohydrolasen werden die Polymere zu kleineren Molekülen hydrolysiert und können nicht mehr durch Ethanolzugabe aus dem Reaktionsansatz gefällt werden. Im Verlauf dieses diskontinuierlichen Tests erfolgt nach Zentrifugation eine Farbzunahme des Überstands, wodurch sich die hydrolytische Geschwindigkeit des Enzyms bestimmen lässt.

In Abbildung 31 ist die enzymatische Aktivität der mit *G. oxydans ΔtolB xynA* heterolog produzierten und sekretierten Endoxylanase XynA dargestellt. Es konnte ein klarer linearer Zusammenhang der eingesetzten Enzymmenge von 0–5 µg und der Enzymaktivität (Freisetzung von RBB in U ml Reaktionsansatz⁻¹) nachgewiesen werden. Das Maximum betrug 141 mU ml⁻¹ bei einer eingesetzten Enzymmenge von 5 µg. Insgesamt konnte für das Enzym XynA unter für den Produktionsorganismus optimalen physiologischen Bedingungen eine spezifische Aktivität von 33 ± 7 U mg⁻¹ gemessen werden (Kosciow *et al.* 2016).

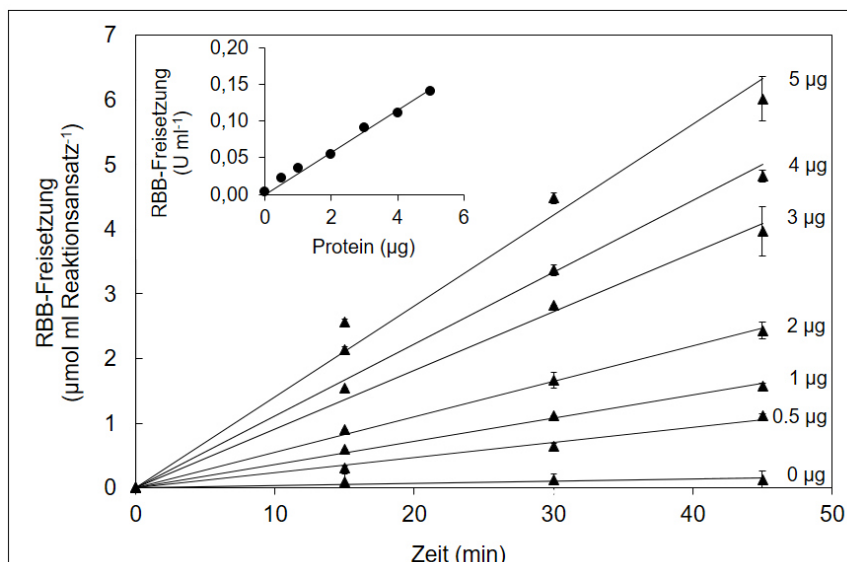


Abbildung 31: Aktivität der aufgereinigten Endoxylanase XynA. Dargestellt ist die Enzymaktivität pro ml Reaktionsansatz mit RBB-Xylan als Substrat bei verschiedenen Enzymmengen. Der Reaktionsansatz bestand aus 250 µl Proteinlösung versetzt mit 250 µl 0,1 M Acetatpuffer pH 6,8, welcher RBB-Xylan in einer Konzentration von 11,5 mg ml⁻¹ enthielt. **Insert:** Enzymaktivität von XynA, ausgedrückt in RBB-Freisetzung in U ml⁻¹ bei unterschiedlichen Proteinmengen. Modifiziert nach Kosciow *et al.* 2016.

Zur Überprüfung der Sekretionseffizienz von XynA im Stamm *G. oxydans* $\Delta tolB$ *xynA* im Vergleich zu *G. oxydans* *xynA* wurde jeweils die prozentuale Verteilung der XynA-Gesamtaktivität bestimmt (Abb. 32). Es zeigte sich, dass im Fall von *G. oxydans* *xynA* 9,9 ± 5 % der Endoxylanaseaktivität im Überstand nachweisbar war, während 90,1 ± 4,8 % der Aktivität in der Zellfraktion verblieb. *G. oxydans* $\Delta tolB$ *xynA* hingegen wies 70,9 ± 8 % der XynA-Aktivität im Kulturüberstand auf und 29,1 ± 7,8 % der Aktivität konnte in der Zellfraktion gemessen werden.

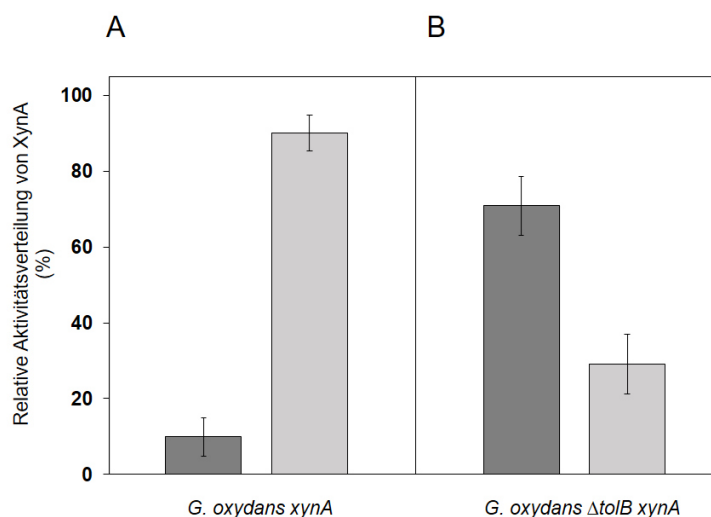


Abbildung 32: Verteilung der XynA-Aktivität in *G. oxydans* *xynA* (A) und *G. oxydans* $\Delta tolB$ *xynA* (B). Die Präparation des Kulturüberstands und des Zellextrakts erfolgte jeweils aus 250 ml Kultur. Die Gesamtaktivität bezogen auf die RBB-Freisetzung betrug im Fall von *G. oxydans* *xynA* 0,47 ± 0,05 mmol h⁻¹ | Kultur⁻¹ und im Fall von *G. oxydans* $\Delta tolB$ *xynA* 1,18 ± 0,21 mmol h⁻¹ | Kultur⁻¹. Modifiziert nach Kosciow *et al.* 2016.

3.5.4 Hydrolyse von Xylan durch intakte Zellen von *G. oxydans* $\Delta tolB xynA$

Es konnte nachgewiesen werden, dass durch den Stamm *G. oxydans* $\Delta tolB xynA$ die Endoxylanase XynA erfolgreich in aktiver Form in den Kulturüberstand sekretiert wurde. Als nächstes sollte eine Überprüfung erfolgen, ob eine Ganzzell-Hydrolyse von Xylan durch diesen Stamm möglich war. Dazu wurden sowohl der Wildtyp-Stamm von *G. oxydans* als auch die Stämme *G. oxydans xynA* und *G. oxydans* $\Delta tolB xynA$ bis zu einer OD_{600nm} von 0,7 bis 1,0 unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen in einem Verhältnis von 1:1 mit RBB-Xylan-Lösung versetzt und bei einer Temperatur von 30 °C inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde eine Probe entnommen, mit Ethanol versetzt und abzentrifugiert, um sowohl Zellen als auch langkettige RBB-Xylan-Polymere vom Überstand zu separieren. Eine Zunahme der Absorption des geklärten Überstandes bei 595 nm zeigte dabei eine Erhöhung des Xylan-Oligomer-Anteils und somit eine vorhandene Endoxylanase-Aktivität an. Im Fall des Wildtyps von *G. oxydans*, welcher das Gen *xynA* nicht exprimierte, konnte über einen Zeitraum von 180 min keine signifikante Endoxylanase-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 33 A). Im Gegensatz dazu zeigte *G. oxydans xynA* eine leichte hydrolytische Aktivität gegenüber RBB-Xylan von 0,24 $mmol\ h^{-1}\ I\ Kultur^{-1}$. Diese Aktivität war auf die Freisetzung aktiver Xylanase A durch lysierende Zellen zurückzuführen.

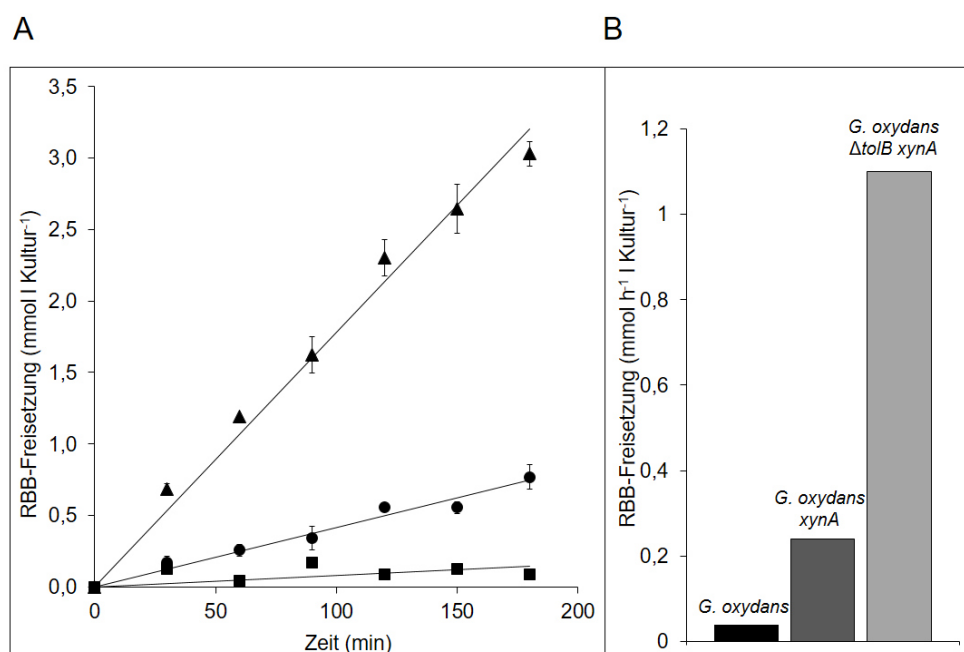


Abbildung 33: Ganzzell-Hydrolyse von Xylan durch verschiedene *G. oxydans*-Stämme. **A:** RBB-Xylan-Spaltung über die Zeit durch den Wildtyp-Stamm von *G. oxydans* (■), *G. oxydans xynA* (●) und *G. oxydans* $\Delta tolB xynA$ (▲). 250 μl aktive Kultur wurden bei gleicher optischen Dichte mit RBB-Xylan versetzt und bei 30 °C inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden die Reaktionen durch Zugabe von 1 ml Ethanol gestoppt, abzentrifugiert und die Absorption des Überstands bei 595 nm gemessen. **B:** Vergleichende Darstellung der RBB-Freisetzung verschiedener *G. oxydans*-Stämme. Die Hintergrundaktivität betrug im Fall des Wildtyps (schwarzer Balken) 0,04 $mmol\ h^{-1}\ I\ Kultur^{-1}$, im Fall von *G. oxydans xynA* lag die RBB-Xylan-hydrolysierende Aktivität bei 0,24 $mmol\ h^{-1}\ I\ Kultur^{-1}$ (dunkelgrauer Balken) und bei *G. oxydans* $\Delta tolB xynA$ bei 1,1 $mmol\ h^{-1}\ I\ Kultur^{-1}$ (hellgrauer Balken). Modifiziert nach Kosciow *et al.* 2016.

Die XynA-produzierende sekretorische Mutante *G. oxydans* $\Delta tolB$ *xynA* zeigte mit $1,1 \text{ mmol h}^{-1} \text{ l Kultur}^{-1}$ im Vergleich mit dem *xynA*-exprimierenden Wildtyp eine 4,6-fach erhöhte hydrolytische Aktivität mit Xylan als Substrat (Abb. 33 B, Kosciow *et al.* 2016).

In diesen Experimenten wurde deutlich, dass der Stamm *G. oxydans* $\Delta tolB$ *xynA* zur endohydrolytischen Hydrolyse von Xylan fähig war und sich somit als potentieller Produktionsstamm für XOs eignete.

3.5.5 Klonierungsstrategie von *xynB* und *xsa*

Durch den Stamm *G. oxydans* $\Delta tolB$ *xynA* konnte eine effiziente Hydrolyse von Xylan *in vivo* zu kurzkettigen XOs als Endprodukt erreicht werden. Um im nächsten Schritt vom kleinstmöglichen und primären Produkt dieser Endoxylanase (Banka *et al.* 2014), dem Disaccharid Xylobiose, zum Monomer Xylose zu gelangen, musste eine geeignete β -D-Xylosidase identifiziert werden. In dieser Arbeit fiel die Wahl auf XynB (P94489) aus *B. subtilis* (Desrochers 1985) und Xsa (P49943) aus *B. ovatus* (Weaver *et al.* 1992; Whitehead 1995).

Für die Erstellung der Expressionsvektoren pBBR1p264-SP*pelB*-*xsa* und pBBR1p264-SP*pelB*-*xynB* wurde der Vektor pBBR1p264-SP*pelB*-*phoA* (Zeiser *et al.* 2014; Kosciow *et al.* 2014) verwendet. Beide Gene wurden mithilfe der Oligonukleotide Xsa.fw/ Xsa.rev und XynB.fw/ XynB.rev unter Verwendung der jeweiligen genomischen DNA als Matrize amplifiziert und so die Restriktionsschnittstellen *Ascl* und *Sna**BI* eingebracht. Für beide Enzyme wurde nach bioinformatischer Analyse kein Signalpeptid nachgewiesen, sodass für die Klonierung lediglich jeweils das Start- sowie Stoppkodon entfernt wurde. Die erwarteten Fragmentgrößen lagen bei 994 bp für *xsa* und 1618 bp für *xynB* und entsprachen den mittels PCR erhaltenen Fragmenten. Beide Gene wurden in die korrespondierende Position im Vektor pBBR1p264-SP*pelB*-*phoA* kloniert und die resultierenden Vektoren in *E. coli* DH5 α vervielfältigt.

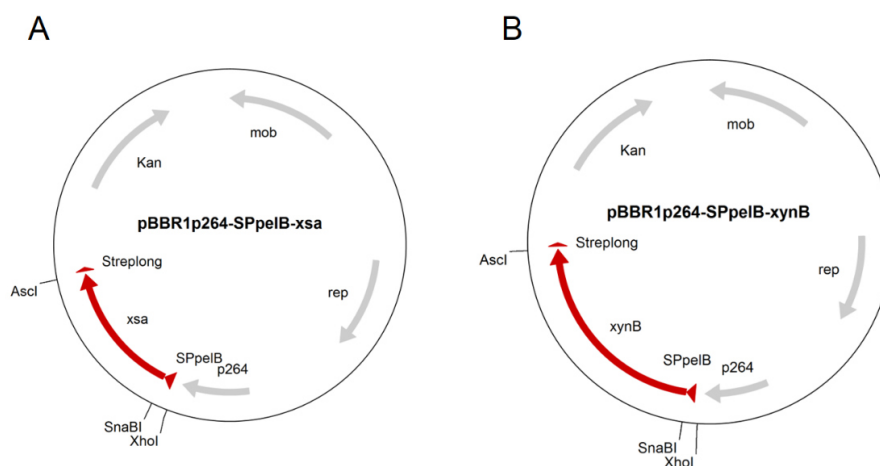


Abbildung 34: Die Vektoren pBBR1p264-SP*pelB*-*xsa* (A) und pBBR1p264-SP*pelB*-*xynB* (B). Kan: Kanamycinresistenzkassette; rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion vom Gen *gox0264*; mob: Mobilisierungsgen; Streplong: Strep-Tag mit elongierter Linkerregion.

Es erfolgte eine Elektroporation beider Vektoren (Abb. 34) in *G. oxydans* und *G. oxydans* $\Delta tolB$, resultierend in den Stämmen *G. oxydans* pBBR1p264-*SPpeIB-xsa* (nachfolgend *G. oxydans xsa*) und *G. oxydans* pBBR1p264-*SPpeIB-xynB* (nachfolgend *G. oxydans xynB*) und den jeweiligen TolB-Deletionsmutanten (nachfolgend *G. oxydans* $\Delta tolB xsa$ und *G. oxydans* $\Delta tolB xynB$).

3.5.6 Produktion der beiden Xylosidasen in *G. oxydans*

Zunächst wurde überprüft, ob sich die beiden Xylosidasen Xsa und XynB heterolog durch *G. oxydans* mit dem gewählten Expressionssystem produzieren lassen. Dazu erfolgte, zunächst für XynB, eine Anzucht des Stamms *G. oxydans xynB* bis zur späten exponentiellen Phase in YM-Medium unter Standardbedingungen und eine Ernte mittels Zentrifugation. Für die Produktion wurde der nicht-sekretorische Stamm gewählt, da so XynB bei erfolgreicher Translokation in der zellulären Fraktion verbleiben würde. Nach der Zellyse erfolgte eine affinitätschromatographische Aufreinigung über den C-terminal angefügten Strep-Tag und anschließend eine Visualisierung mittels Westernblot und Silberfärbung (Abb. 35 A). Für das heterolog produzierte Enzym XynB mit Strep-Tag und mit Signalpeptid wurde ein Molekulargewicht von 65,3 kDa rechnerisch und experimentell ermittelt. Die Silberfärbung deutete auf eine reine Proteinfraction hin, sodass eine nachgewiesene Aktivität ausschließlich auf dieses Enzym zurückzuführen war.

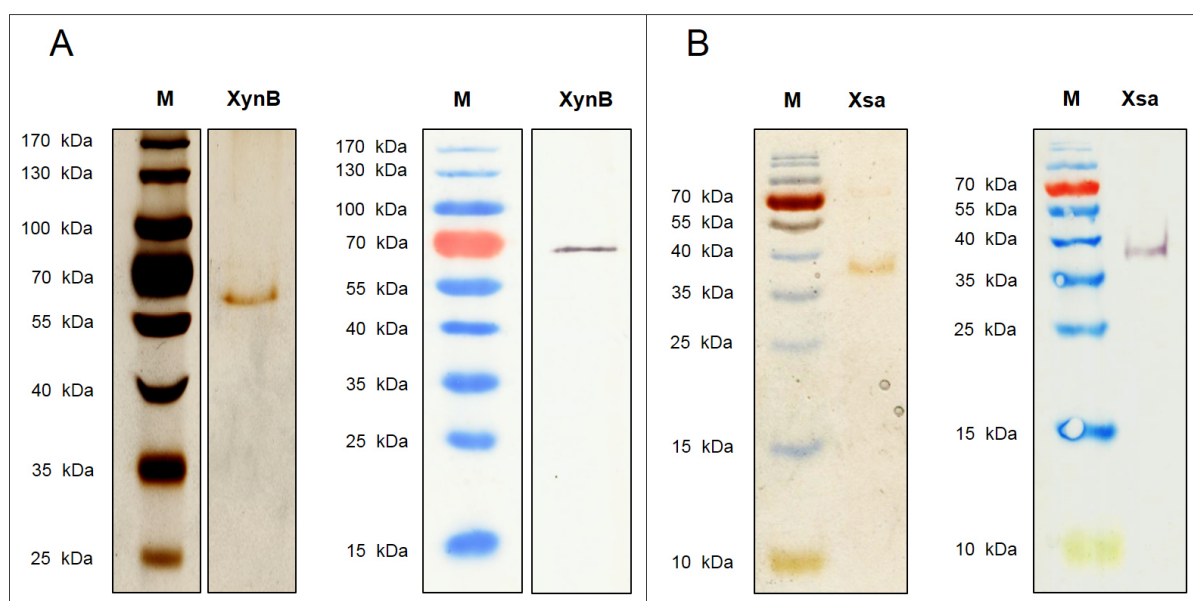


Abbildung 35: Visualisierung von XynB und Xsa. **A:** Silberfärbung (links) und Westernblot (rechts) der durch *G. oxydans xynB* produzierten Xylosidase XynB. Die erwartete Größe lag bei 65,3 kDa und korrelierte mit dem nachgewiesenen Molekulargewicht. **B:** Silberfärbung (links) und Westernblot (rechts) von Xsa, produziert durch *E. coli* DH5 α pBBR1p264-*SPpeIB-xsa*. Bioinformatisch wurde ein Molekulargewicht von 39 kDa berechnet, welches mit der erhaltenen Größe übereinstimmte. M: Marker.

Ein Nachweis von Xsa in *G. oxydans xsa* gelang nicht und war wahrscheinlich bedingt durch eine nicht vorhandene oder zu geringe Proteinproduktion. Zur Überprüfung der generellen Funktionalität des Expressionsvektors pBBR1p264-*SPpeIB-xsa* wurde *E. coli* als Produktionsstamm verwendet. *E. coli*

DH5 α pBBR1p264-*SPpeIB-xsa* wurde bei einer OD_{600nm} von 1,8 geerntet, lysiert und Xsa erfolgreich und in reiner Form aus dem geklärten Lysat aufgereinigt (Abb. 35 B). Das rechnerisch ermittelte Molekulargewicht von 39 kDa stimmte mit der experimentell erhaltenen Größe überein.

Xsa wurde in Aktivitätstests mit *p*-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranosid (*p*-NPX) als chromogenes Substrat eingesetzt. Als Reaktionstemperatur wurde 30 °C gewählt und ein 100 mM Kaliumphosphatpuffersystem pH 6,8 eingesetzt. Durch diesen Aktivitätstest sollte analysiert werden, welche kinetischen Parameter das aus *B. ovatus* stammende Enzym Xsa unter *G. oxydans*-spezifischen Bedingungen besitzt. Der V_{\max} -Wert lag mit *p*-NPX als Substrat bei 78 U mg⁻¹ und der K_M -Wert bei 6,7 mM. Diese Parameter zeigten eine generelle Eignung von Xsa als Xylosidase für die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans*. Aufgrund der problematischen Produktion im Zielorganismus *G. oxydans* wurde die Arbeit mit Xsa jedoch eingestellt.

Im Gegensatz dazu war eine Aufreinigung von XynB aus *G. oxydans xynB* möglich. Wie auch im Fall von Xsa, erfolgte zunächst eine Analyse des gereinigten Enzyms. Als Reaktionstemperatur wurde 30 °C gewählt und der pH-Wert durch Zugabe eines 100 mM Kaliumphosphat-Puffersystems bei pH 6,8 stabilisiert. In Abbildung 36 ist eine klare lineare Abhängigkeit zwischen der Spaltung des chromogenen Substrats *p*-NPX pro Zeiteinheit und der eingesetzten Menge XynB erkennbar. Diese Umsetzung ließ sich photometrisch bei 420 nm bestimmen, da durch die Spaltung des farblosen Substrats das Produkt *p*-Nitrophenol freigesetzt wurde, resultierend in einer zunehmenden Gelbfärbung des Reaktionsansatzes (Lederberg 1950). Für das heterolog produzierte und aufgereinigte Enzym XynB konnte unter für *G. oxydans* physiologischen Bedingungen eine maximale Enzymaktivität von $24,8 \pm 1$ U mg⁻¹ bestimmt werden.

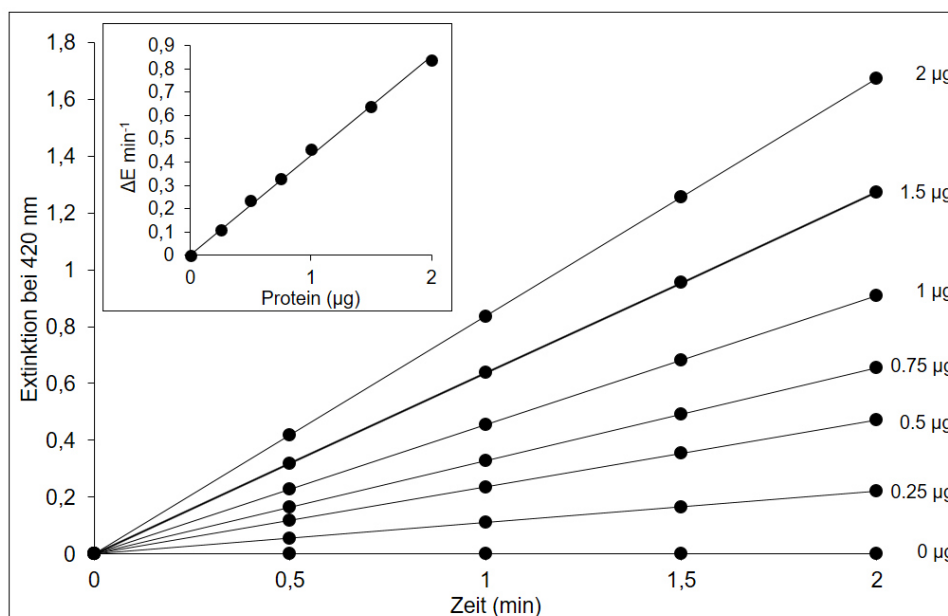


Abbildung 36: Aktivität der aufgereinigten Xylosidase XynB. Dargestellt ist die Zunahme der Extinktion bei 420 nm infolge der Spaltung von *p*-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranosid als Substrat durch verschiedene Enzymmengen. Der Reaktionsansatz (1 ml) enthielt 100 μ l 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 und 100 μ l 50 mM *p*-NPX. **Insert:** Enzymaktivität ausgedrückt als Extinktionsänderung über die Zeit ($\Delta E \text{ min}^{-1}$) bei unterschiedlichen Proteinmengen.

3.5.7 Nachweis der XynB-Aktivität an intakten Zellen

Im vorherigen Abschnitt zeigte sich, dass die aus *G. oxydans xynB* aufgereinigte Xylosidase XynB eine spezifische Aktivität von $24,8 \pm 1 \text{ U mg}^{-1}$ für *p*-NPX aufwies. Bei einer korrekten Translokation in das Periplasma ist diese Aktivität ausreichend, um effizient die durch die Endoxylanase-Aktivität von XynA aus Xylan entstandene Xylobiose hydrolytisch in das gewünschte Monomer Xylose zu spalten. Für den Nachweis der Translokation von XynB wurden Experimente mit intakten Zellen durchgeführt. Dazu wurden sowohl der Wildtyp-Stamm *G. oxydans* als auch *G. oxydans xynB* und *G. oxydans ΔtolB xynB* bis zu einer OD_{600nm} von 1,3 unter Standardbedingungen in YM-Medium angezogen. Jeweils 1 ml Kultur wurde abzentrifugiert, gewaschen und resuspendiert. 100 μl Zellsuspension wurden in einen 1 ml Reaktionsansatz eingesetzt, zusammen mit einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 und 5 mM *p*-NPX als Substrat, die Reaktionstemperatur lag bei 30 °C. Es erfolgte eine photometrische Aufnahme der Extinktionsänderung bei 420 nm über die Zeit, als direkter Hinweis auf eine Spaltung des artifiziellen Xylobiose-Analogons (Abb. 37 A). Die gemessene Extinktionsänderung lag im Fall des Wildtyp-Stamms bei einem minimalen Wert von $0,02 \Delta E \text{ min}^{-1}$, bei *G. oxydans xynB* bei $0,39 \Delta E \text{ min}^{-1}$ und bei *G. oxydans ΔtolB xynB* bei $0,65 \Delta E \text{ min}^{-1}$. Die relative XynB-Aktivität gemessen an intakten Zellen betrug im Fall des Wildtyp-Stamms 2,6 % der durch *G. oxydans ΔtolB xynB* erhaltenen Aktivität und stellt eine Hintergrundaktivität dar. Im Fall von *G. oxydans xynB* wurde 61 % der durch *G. oxydans ΔtolB xynB* erhaltenen Aktivität nachgewiesen (Abb. 37 B).

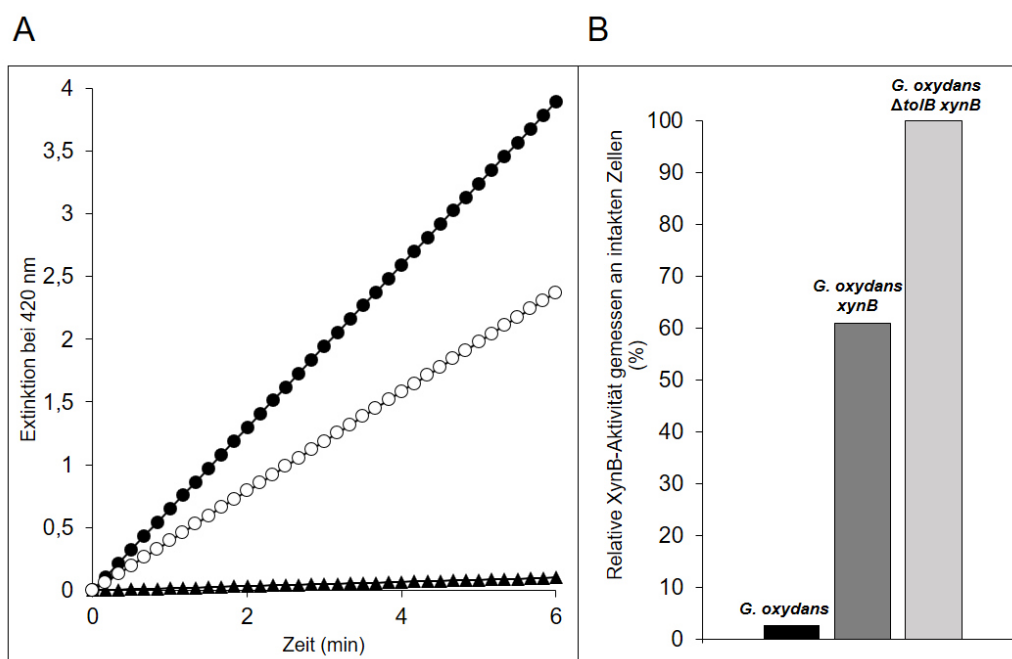


Abbildung 37: Hydrolyse von *p*-NPX durch intakte Zellen. Dargestellt ist die Zunahme der Extinktion bei 420 nm infolge der Spaltung von *p*-Nitrophenyl-β-D-Xylopyranosid als Substrat durch intakte Zellen von *G. oxydans* Wildtyp (▲), *G. oxydans xynB* (○) und *G. oxydans ΔtolB xynB* (●). Die Extinktionsänderung min^{-1} lag im Fall des Wildtyp-Stamms bei $0,02 \Delta E \text{ min}^{-1}$, bei *G. oxydans xynB* bei $0,39 \Delta E \text{ min}^{-1}$ und bei *G. oxydans ΔtolB xynB* bei $0,65 \Delta E \text{ min}^{-1}$ **B**: Relative XynB-Aktivität der verschiedenen Stämme ausgedrückt in Prozent und bezogen auf die höchste Aktivität. *G. oxydans*: 2,6 % (Hintergrundaktivität); *G. oxydans xynB*: 61 %; und *G. oxydans ΔtolB xynB*: 100 %.

Eine Ursache dafür, dass XynB im Fall von *G. oxydans* $\Delta toIB$ *xynB* durch das Waschen der Zellen nicht in den Kulturüberstand verloren ging, ist eine mögliche Assoziation des Proteins mit der inneren Membran. Die Membranbindung von XynB wurde bereits durch Roncero 1983 vermutet, konnte jedoch durch eine bioinformatische Analyse in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, sodass von einem löslichen periplasmatischen Enzym ausgegangen wurde.

In diesem Abschnitt konnte die erfolgreiche Produktion von XynB durch *G. oxydans* *xynB* und *G. oxydans* $\Delta toIB$ *xynB* nachgewiesen werden. Die Mutante *G. oxydans* $\Delta toIB$ *xynB* zeigte außerdem bei einem direkten Einsatz intakter Zellen eine deutlich gesteigerte Fähigkeit das Xylobiose-Analogon *p*-NPX zu hydrolysieren.

3.5.8 Klonierungsstrategie eines Expressionssystems für die simultane Produktion von XynA und XynB in *G. oxydans*

Mithilfe der Expressionssysteme pBBR1p264-*SPpeIB-xynA* und pBBR1p264-*SPpeIB-xynB* sowie der sekretorischen Mutante *G. oxydans* $\Delta toIB$ konnten zwei einzelne Stämme entwickelt werden, die zur Hydrolyse von Xylan-Polymeren und Xylobiose-Einheiten befähigt wurden.

Im nächsten Schritt sollte die Expression beider Gene in einem Stamm ermöglicht werden, um so die vollständige Hydrolyse von Xylan zu Xylose durch eine einzelne Mutante von *G. oxydans* zu gewährleisten. Als Strategie wurde dabei die Konstruktion des Vektors pBBR1p264-*SPpeIB-xynB_SPpeIB-xynA* gewählt (Abb. 38). Dazu sollte zunächst *xynB* mithilfe der Oligonukleotide XynBfusion.fw und XynBfusion.rev mit dem Vektor pBBR1p264-*SPpeIB-xynB* als Matrize amplifiziert werden (Abb. 38 A).

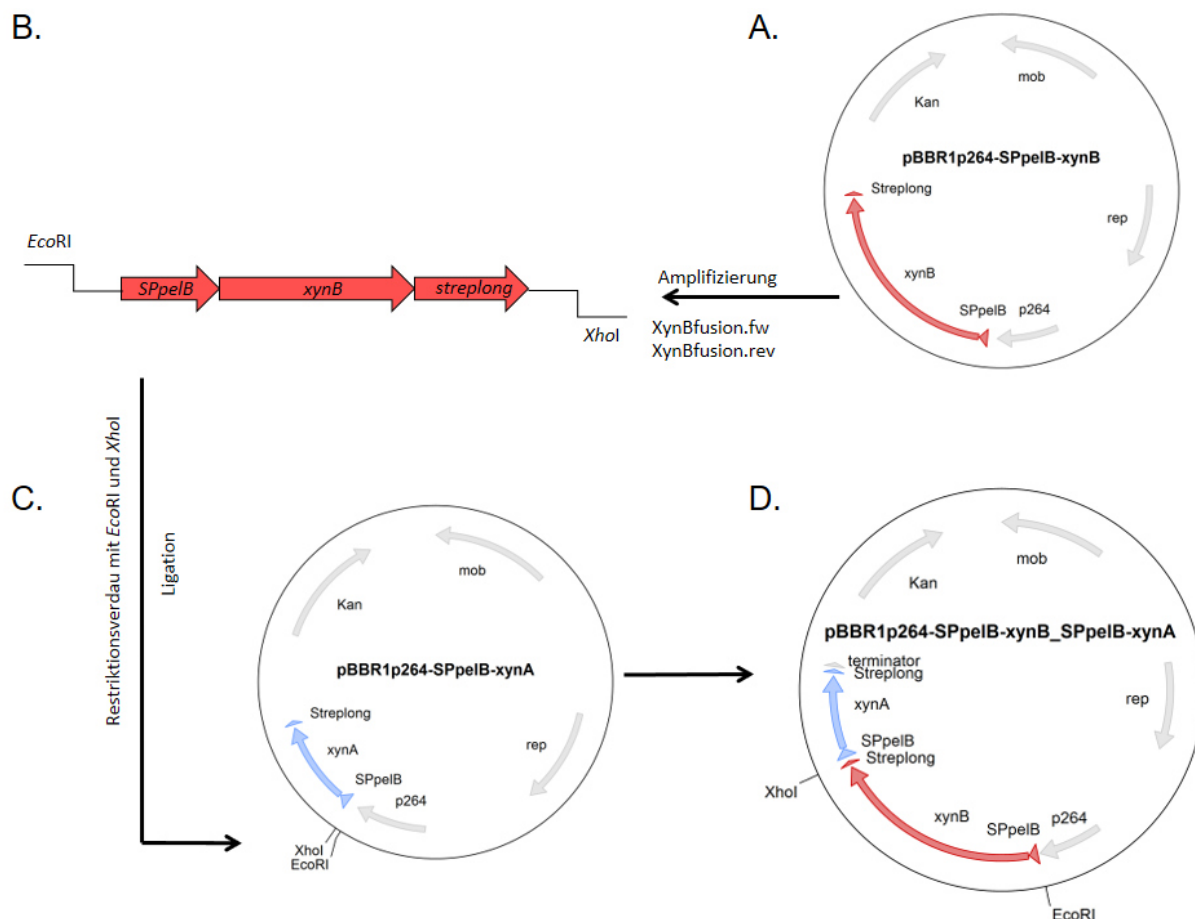


Abbildung 38: Klonierungsstrategie des Vektors pBBR1p264-SPpelB-xynB_SPpelB-xynA. Mittels PCR und der Oligonukleotide *XynBfusion.fw/ XynBfusion.rev* sollte mit dem Vektor pBBR1p264-SPpelB-xynB als Matrize *xynB* inklusive Strep-Tag-kodierender Sequenz und Signalsequenz amplifiziert werden (A). Über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* war anschließend eine Klonierung dieses Fragments in die korrespondierenden Schnittstellen im Vektor pBBR1p264-SPpelB-xynA möglich (B, C). Das fertige Expressionssystem stellte dabei der Vektor pBBR1p264-SPpelB-xynB_SPpelB-xynA mit einer Größe von 7999 bp dar (D).

Über die beiden Oligonukleotide könnten so die Schnittstellen für *EcoRI* und *XhoI* eingebracht werden (Abb. 38 B), um nach Restriktionsverdau eine Ligation in den Vektor pBBR1p264-SPpelB-xynA zu ermöglichen (Abb. 38 C). Als Resultat sollte dabei ein mit *G. oxydans* kompatibles Expressionssystem entstehen, bei dem sich sowohl *xynB* als auch *xynA* unter der Regulation desselben starken konstitutiven Promotors befänden. Trotz derselben Promotorregion sollten beide Gene eine eigene PelB-Signalsequenz am 5'-Ende besitzen und am 3'-Ende eine Fusion an das Strep-Tag-kodierende Gen aufweisen (Abb. 38 D).

Das *xynB*-tragende Fragment konnte erfolgreich bei $T_{(A)} = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ amplifiziert werden und besaß die erwartete Größe von 1740 bp. Auch die Ligation und Transformation des fertigen Konstrukts in *E. coli* DH5 α stellte sich als erfolgreich heraus.

Der fertige Vektor pBBR1p264-SPpelB-xynB_SPpelB-xynA wurde anschließend mittels Elektroporation in den Wildtyp-Stamm und die TolB-Deletionsmutante von *G. oxydans* eingeschleust, resultierend in den beiden Stämmen *G. oxydans p264 xynBA* und *G. oxydans Δ tolB p264 xynBA*.

3.5.9 Nachweis und Lokalisation der Aktivität von XynB und XynA in *G. oxydans* $\Delta tolB$ p264 xynBA

Da im Vektor pBBR1p264-SPpeIB-xynB_SPpeIB-xynA sowohl das Endoxylanase-kodierende Gen *xynA* als auch das Xylosidase-kodierende Gen *xynB* eine C-terminale Strep-Tag-kodierende Sequenz besaßen, sollte die erfolgreiche simultane Expression und Produktion in *G. oxydans* über eine Affinitätschromatographische Aufreinigung nachgewiesen werden. Dazu wurde *G. oxydans* p264 xynBA bis zu einer OD_{600nm} von 1,5 bei Standardbedingungen angezogen, mittels Zentrifugation geerntet und die Zellen lysiert. Anschließend erfolgte die chromatographische Aufreinigung beider Proteine, welche nachfolgend in Aktivitätstests eingesetzt wurden. Diese Tests wurden wie in Abschnitt 3.5.3 für XynA und in Abschnitt 3.5.6 für XynB beschrieben durchgeführt. Bei der aufgereinigten Enzymfraktion handelte es sich um ein Gemisch aus XynB und XynA mit unbekanntem Verhältnis, sodass sowohl die Messungen der Xylosidase-Aktivität, als auch der Endoxylanase-Aktivität mit der selben Fraktion durchgeführt wurden. Es stellte sich heraus, dass dieses Proteingemisch aus *G. oxydans* p264 xynBA eine Xylosidase-Aktivität von 58 ± 13 mU mg^{-1} und eine Endoxylanase-Aktivität von 67 ± 27 mU mg^{-1} (bezogen auf die RBB-Freisetzung) besaß.

Im nächsten Schritt sollte eine Fraktionierung durchgeführt werden, um sowohl XynB als auch XynA zu lokalisieren. Dazu wurde der TolB-Deletionsstamm *G. oxydans* $\Delta tolB$ p264 xynBA bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und wie zuvor beschrieben fraktioniert. In diesem Experiment erfolgte keine Separation der Cytoplasmamembran von der Cytoplasmafraktion, sodass die Zellen hier in die Kompartimente Überstand, Periplasma und lysierte Sphäroplasten fraktioniert wurden. Durch Bestimmung der Verteilung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität über die Kompartimente war es möglich, die Reinheit der Fraktionierung zu überprüfen. Es zeigte sich, dass die Aktivität dieses cytoplasmatischen Enzyms, kodiert durch *gox0145*, wie erwartet zu $94 \pm 0,4$ % im Sphäroplasten-Lysat zu finden war. Die Aktivität von *Gox0145* lag zu einer sehr geringen Menge von $0,3 \pm 0,2$ % im Periplasma beziehungsweise $6 \pm 0,5$ % im Überstand vor, freigesetzt von lysierten Zellen (Abb. 39 A). XynA wurde in *G. oxydans* $\Delta tolB$ p264 xynBA zu $87 \pm 0,6$ % im Überstand lokalisiert und zu $11,5 \pm 0,2$ % im Periplasma. Der Anteil der Aktivität im Sphäroplasten-Lysat lag bei einem geringen Wert von $1,3 \pm 0,4$ % (Abb. 39 B). Die Aktivität von XynB hingegen wurde zu 100 % in der Sphäroplasten-Fraktion nachgewiesen (Abb. 39 C). Da diese Fraktion ebenfalls die Cytoplasmamembran enthielt und in Abschnitt 3.5.7 (Abb. 37) die Hydrolyse von *p*-NPX durch ganze Zellen gezeigt werden konnte, ist eine Lokalisation von XynB in der inneren Membran von *G. oxydans* wahrscheinlich. Hinweise auf eine derartige Lokalisation wurden für XynB auch im nativen Wirt *B. subtilis* beschrieben (Roncero 1983).

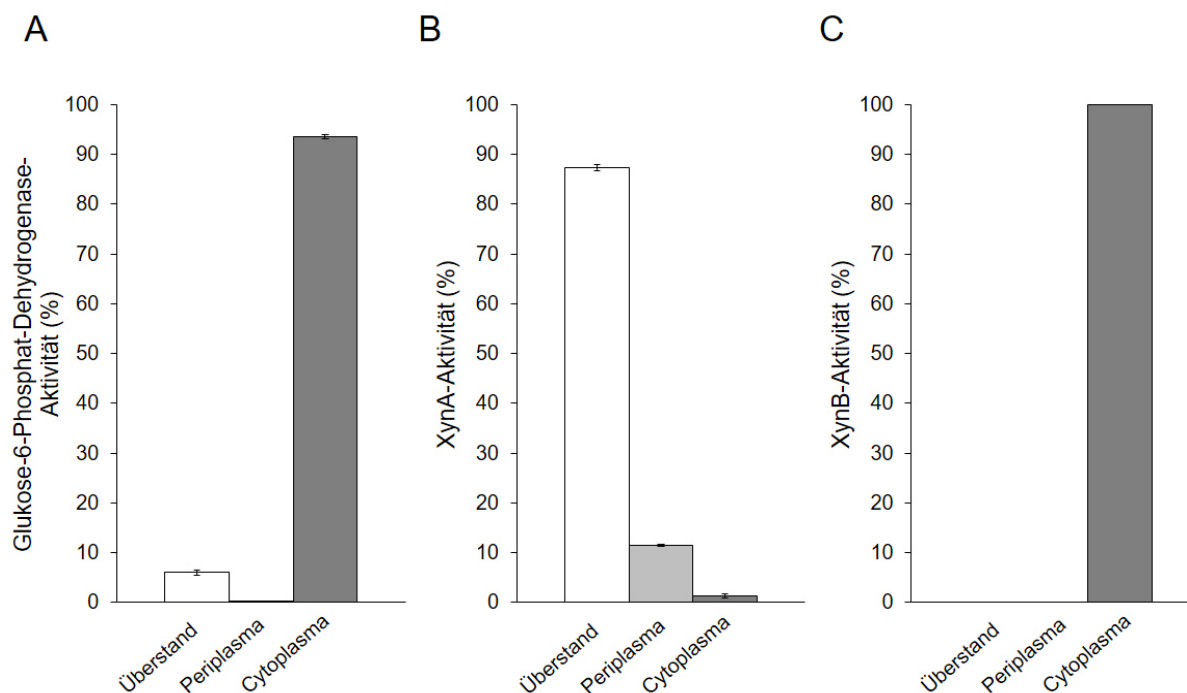


Abbildung 39: Relative Aktivitätsverteilung verschiedener Enzyme in den Kompartimenten Überstand, Periplasma und Cytoplasma von *G. oxydans* $\Delta tolB$ p264 xynBA. A: Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase. B: XynA. C: XynB

Es konnte gezeigt werden, dass *G. oxydans* $\Delta tolB$ p264 xynBA die Fähigkeit besaß, XynA und XynB simultan zu exprimieren und zu produzieren. Die Proteinausbeuten waren jedoch gering und die spezifischen Aktivitäten lagen unter den erwarteten Werten, sodass zusätzlich der Hinweis auf eine fehlerhafte Faltung der produzierten Proteine gegeben war.

3.6 Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um das zweite Polysaccharid: Cellulose

In diesem zweiten Polysaccharid-bezogenen Kapitel sollte unter Verwendung der sekretorischen Mutante *G. oxydans* $\Delta tolB$ und geeigneten heterolog produzierten Enzymen die *in vivo*-Hydrolyse des Polysaccharids Cellulose ermöglicht werden. Cellulose, das häufigste Polysaccharid der Erde, besitzt eine weniger komplexe Struktur als Xylan. Dies ist vor allem durch ein Fehlen verzweigter Seitenketten bedingt. In der Natur wird daher für den vollständigen Abbau von Cellulose auch die kooperative Aktivität von einer geringeren Anzahl unterschiedlicher hydrolytischer Enzyme benötigt.

Diese Degradation erfolgt zunächst durch die synergistische Aktivität von Endo- und Exoglukanasen zur Verkleinerung des Makromoleküls, bei dem es sich um ein Polymer aus bis zu tausenden linearen β -1,4-glykosidisch verknüpften Cellobiose-Einheiten handelt. Die Hydrolyse der aus dieser Reaktion resultierenden Cellobiose-Einheiten erfolgt anschließend durch die β -1,4-glykosidische Aktivität von β -Glukosidasen, wobei pro Molekül Cellobiose zwei Moleküle Glukose entstehen (O'sullivan 1997). Cellulose liegt natürlicherweise in einer kristallinen Struktur vor, die in Wasser sowie den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich ist und daher eine erschwerte Zugänglichkeit für die

enzymatische Hydrolyse aufweist. Industriell erfolgt die Konversion zur besser zugängigen amorphen Cellulose durch den Einsatz von hohen Temperaturen und Drücken (Fan *et al.* 1980). In dieser Arbeit wurde Carboxymethylcellulose (CMC) als Substrat zum Nachweis von Endoglukanasen anstelle natürlicher Cellulose eingesetzt. CMC ist ein Derivat der Cellulose, deren Hydroxylgruppen teilweise mit Carboxymethylgruppen verethert sind, wodurch die Bildung kristalliner Strukturen inhibiert wird. Dadurch wird die Wasserlöslichkeit deutlich erhöht. CMC werden standardisiert für die Charakterisierung von Endoglukanasen eingesetzt, da diese Enzyme häufig eine Präferenz von amorpher CMC gegenüber kristalliner Cellulose aufweisen (Zhou und Ingram 2000; Gilad *et al.* 2003).

3.6.1 Die Wahl verschiedener prokaryotischer Cellulose-spaltender Enzyme

Für eine effiziente Hydrolyse von Cellulose ist die synergistische Aktivität von Endo- beziehungsweise Exoglukanasen sowie die β -1,4-glykosidische Aktivität von β -Glukosidasen notwendig.

Wie auch bei der Hydrolyse von Xylan (Abschnitt 3.5), sollten die ausgewählten Enzyme für die Hydrolyse von Cellulose durch *G. oxydans* aus möglichst nah mit diesem Organismus verwandten Organismengruppen stammen. Zusätzlich sollten diese Hydrolasen biochemische Optima aufweisen, die mit der Physiologie von *G. oxydans* weitgehend kompatibel sind.

Im Fall der β -Glukosidasen (Cellobiasen) wurde daher BglX ausgewählt, eine periplasmatische β -Glukosidase aus *E. coli* K12 (Yang *et al.* 1996). Beim zweiten Enzym dieser Klasse handelte es sich um BglB, eine monomere β -Glukosidase aus *Paenibacillus (P.) polymyxa*, welche neben Cellobiose auch exohydrolytisch Cellodextrine hydrolysieren kann (González-Candelas *et al.* 1989; Isorna *et al.* 2007). Darüber hinaus wurden die beiden Enzyme BoGH3A und BoGH3B aus *B. ovatus* ausgewählt, wobei die Substratpräferenz im Fall von BoGH3A bei Cellodextrinen wie Cellotetraosen und Cellohexaosen liegt und im Fall von BoGH3B beim Disaccharid Cellobiose (Larsbrink *et al.* 2014). Beide Enzyme besitzen ein pH-Optimum von 6 – 7 und entsprechen somit optimal dem von *G. oxydans* bevorzugten pH-Wert.

Als Endoglukanasen wurden CelY aus *Erwinia (E.) chrysanthemi* (Guiseppe *et al.* 1991) sowie EglS aus *B. subtilis* (Aa *et al.* 1994) ausgewählt. Der einzige Vertreter des dritten Cellulose-spaltenden Enzymtyps, der Exoglukanase (Cellobiohydrolase), wurde durch CbhA aus *C. fimi* dargestellt (Meinke *et al.* 1994).

3.6.2 Klonierungsstrategie von *bgIX* und *bgIB* sowie *boGH3A* und *boGH3B*

Wie auch bei der Erweiterung des Substratspektrums um die zuvor beschriebenen Substrate wurden zunächst die Expressionsvektoren pBBR1p264-*SPpeIB-bgIX*, pBBR1p264-*SPpeIB-bgIB*, pBBR1p264-*SPpeIB-boGH3A* und pBBR1p264-*SPpeIB-boGH3B* erstellt. Dazu wurden die Gene *bgIX*, *bgIB*, *boGH3A* und *boGH3B* mittels PCR und der jeweils notwendigen genomischen DNA als Matrize amplifiziert. Die bioinformatisch bestimmten nativen Signalsequenzen von *bgIX* (60 bp), von *boGH3A* (78 bp) und von *boGH3B* (72 bp) wurden bei der Amplifizierung entfernt. Für *bgIB* konnte keine Sec-abhängige Signalsequenz bestimmt werden. Im Fall von *bgIX* wurden die Oligonukleotide *bgIX.f* und

bgIX.rev verwendet, über die die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Eco47III* und *Ascl* eingefügt wurden. Anders als bei den zuvor beschriebenen Klonierungen konnte die Schnittstelle für *SnaBI* für *bgIX* nicht verwendet werden, da diese nativ im Gen vorhanden war. Für alle anderen Gene wurden für die Klonierung die Schnittstellen *SnaBI* und *Ascl* verwendet. Die hierfür genutzten Oligonukleotide trugen die Bezeichnungen *BglB*-polymyxa.fw/ *BglB*-polymyxa.re, *BoGH3A*.fw/ *BoGH3A*.rev sowie *BoGH3B*.fw/ *BoGH3B*.rev. Alle Fragmente konnten erfolgreich amplifiziert werden und die erwarteten Fragmentgrößen entsprachen den mittels PCR erhaltenen Größen. Diese betragen für *bgIX* 2256 bp, für *bgIB* 1362 bp, für *boGH3A* 2184 bp und für *boGH3B* 2313 bp.

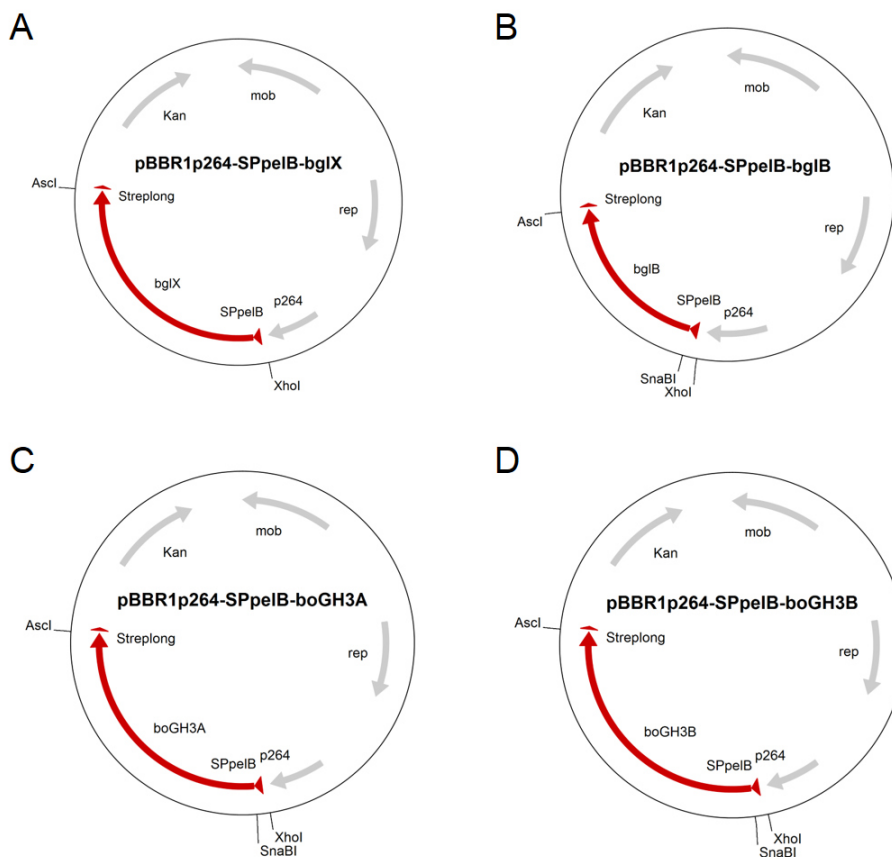


Abbildung 40: Die Vektoren pBBR1p264-SPpeIB-*bgIX* (A), pBBR1p264-SPpeIB-*bglB* (B), pBBR1p264-SPpeIB-*boGH3A* (C) und pBBR1p264-SPpeIB-*boGH3B* (D). Kan: Kanamycinresistenzkassette; rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion vom Gen *gox0264*; mob: Mobilisierungsgen; Streplong: Strep-Tag mit elongierter Linkerregion.

Es wurde nach Standardprotokoll ein Restriktionsverdau dieser Fragmente sowie des Vektors pBBR1p264-SPpeIB-*phoA* mit den entsprechenden Restriktionsenzymen durchgeführt, gefolgt von einer Ligation und Transformation in *E. coli* DH5 α . Eine nachfolgende Kolonie-PCR bestätigte die erfolgreiche Konstruktion der vier Expressionssysteme pBBR1p264-SPpeIB-*bgIX*, pBBR1p264-SPpeIB-*bglB*, pBBR1p264-SPpeIB-*boGH3A* und pBBR1p264-SPpeIB-*boGH3B* (Abb. 40). Alle Konstrukte konnten anschließend mittels Elektroporation in *G. oxydans* und *G. oxydans* Δ *tolB* eingebracht werden.

3.6.3 Nachweis einer erfolgreichen heterologen Produktion der β -Glukosidasen in *G. oxydans*

Zunächst sollte überprüft werden, ob eine heterologe Produktion der ausgewählten Enzyme in *G. oxydans* möglich war. Dazu wurden die vier Stämme *G. oxydans* pBBR1p264-*SPpelB-bglX*, *G. oxydans* pBBR1p264-*SPpelB-bglB*, *G. oxydans* pBBR1p264-*SPpelB-boGH3A* und *G. oxydans* pBBR1p264-*SPpelB-boGH3B* (nachfolgend *G. oxydans bglX*, *G. oxydans bglB*, *G. oxydans boGH3A*, *G. oxydans boGH3B* genannt) unter Standardbedingung kultiviert und in der späten exponentiellen Phase geerntet. Anschließend folgte eine Zellyse und eine affinitätschromatographische Aufreinigung der C-terminal mit einem Strep-Tag fusionierten Proteine. Im Fall der Cellobiase BoGH3B aus *B. ovatus* war es nicht möglich eine heterologe Produktion durch den Stamm *G. oxydans boGH3B* nachzuweisen, sodass die Arbeit mit diesem Enzym eingestellt wurde. BglX hingegen ließ sich durch den Stamm *G. oxydans bglX* produzieren und mittels Silberfärbung visualisieren, wobei die nachgewiesene Größe mit der bioinformatisch ermittelten molaren Masse von 84,4 kDa übereinstimmte (Abb. 41).

Das von *G. oxydans bglX* produzierte Enzym wurde in einen Enzymaktivitätstest eingesetzt, bei dem *p*-Nitrophenyl- β -D-Glukopyranosid (*p*-NPGlu) als chromogenes Substrat fungierte. Als Reaktionsbedingungen wurden 30 °C und ein 100 mM Kaliumphosphatpuffersystem pH 6,8 gewählt, da diese den Wachstumsbedingungen von *G. oxydans* entsprachen. Zusätzlich dienten eine Temperatur von 22 °C sowie ein 100 mM Tris-HCl-Puffersystem pH 7,5 als Reaktionsbedingungen, welche den von Yang *et al.* 1996 angewendeten Parametern entsprachen. Unter keiner der gewählten Bedingungen konnte eine Aktivität der durch *G. oxydans bglX* produzierten β -Glukosidase nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der generellen Funktionalität des Expressionssystems pBBR1p264-*SPpelB-bglX* wurde BglX homolog in *E. coli* produziert und über den fusionierte Strep-Tag aufgereinigt. Unter den von Yang *et al.* 1996 beschriebenen Reaktionsbedingungen zeigte das homolog produzierte Enzym BglX mit dem Substrat *p*-NPGlu eine spezifische Aktivität von $0,52 \pm 0,1$ U mg⁻¹, was in guter Übereinstimmung mit den bekannten Werten steht (Yang *et al.* 1996). Dieses Ergebnis bestätigte die Funktionalität des Expressionsvektors.

Um zu überprüfen, ob *in vivo* eine hydrolytische Aktivität der heterolog produzierten Hydrolase BglX nachweisbar war, wurden *G. oxydans Δ tolB bglX* sowie der Wildtyp-Stamm von *G. oxydans* in YC-Flüssigmedium kultiviert, welches 25 mM Cellobiose als einzige Kohlenstoffquelle aufwies. Dabei zeigte *G. oxydans Δ tolB bglX* keine signifikante Verbesserung bei der Verstoffwechselung dieses Disaccharids im Vergleich zum Wildtyp, die finale OD_{600nm} lag bei 0,06 und 0,04 bei einem konstanten pH-Profil. Somit war es nicht möglich, eine Erweiterung des Substratspektrums durch die *E. coli*-stämmige periplasmatische β -Glukosidase BglX zu erreichen. Der Stamm *G. oxydans Δ tolB bglX* wurde daher für weitere Arbeiten im Hinblick auf die Cellulose-Hydrolyse durch *G. oxydans* nicht mehr verwendet.

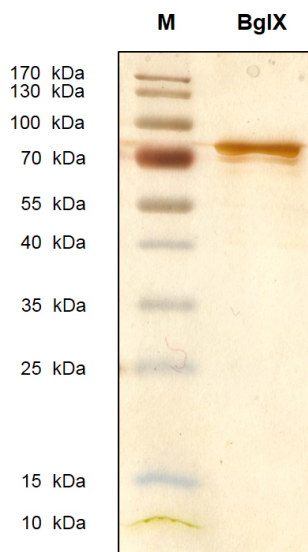


Abbildung 41: Silberfärbung der heterolog produzierten β -Glukosidase BglX. Es wurden 5 μ g Protein aufgetragen, das erwartete Molekulargewicht betrug 84,4 kDa.

Im Fall von BglB und BoGH3A, heterolog produziert durch *G. oxydans bglB* und *G. oxydans boGH3A* zeigte eine Proteinbestimmung nach Bradford eine erfolgreiche Aufreinigung der Proteine. Infolgedessen sollten zunächst für beide Enzyme Aktivitätstests durchgeführt werden. Für die gereinigte β -Glukosidase BglB zeigte sich unter den gewünschten Reaktionsbedingungen (30 °C, 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8) ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Enzymmenge und der Freisetzung von *p*-Nitrophenol. Die spezifische Aktivität lag hier bei 82 ± 3 mU mg^{-1} für *p*-NPGLu (Abb. 42). Dieser Wert lag deutlich unter der von González-Candelas *et al.* 1989 bestimmten spezifischen Aktivität von $3,5$ U mg^{-1} für *p*-NPGLu, allerdings wurden in diesen Experimenten unterschiedliche Reaktionsbedingungen gewählt. Die Reaktionstemperatur lag dort bei 37 °C und ein pH-Wert von 7 wurde mittels eines 50 mM Citratpuffersystems eingestellt (González-Candelas *et al.* 1989).

Eine Fraktionierung von *G. oxydans Δ tolB bglB* in die Kompartimente Überstand, Periplasma und Cytoplasma zeigte eine vollständige Retention von BglB in der Cytoplasma-Fraktion.

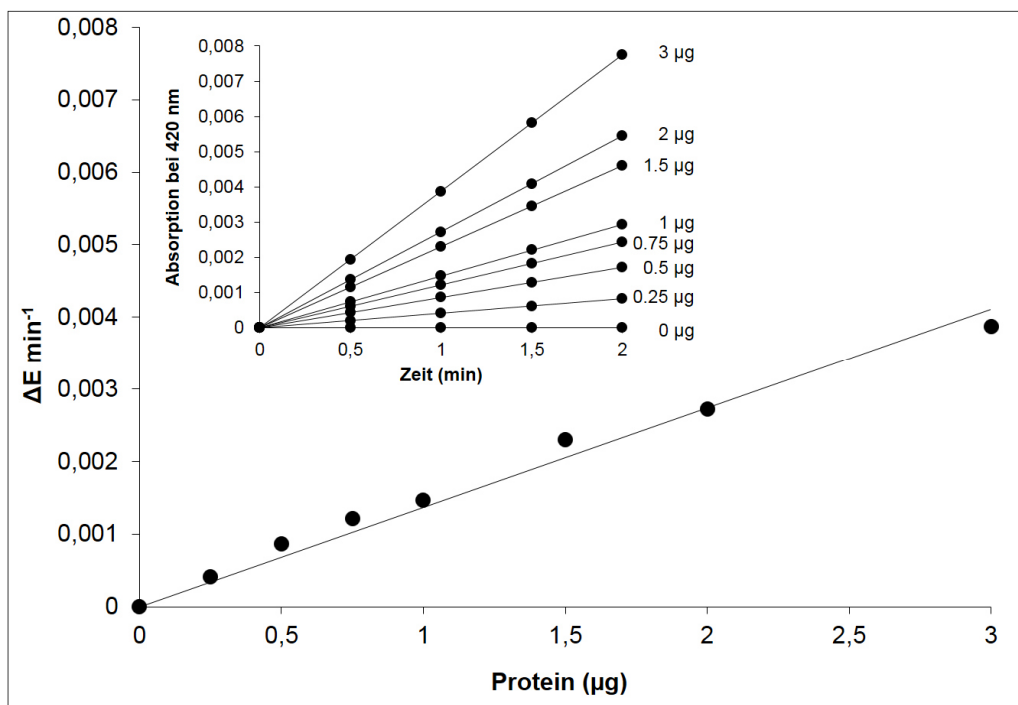


Abbildung 42: Enzymaktivität von gereinigtem BglB. Die Aktivität ist ausgedrückt als Absorptionsänderung bei 420 nm min^{-1} bei unterschiedlicher Mengen heterolog durch *G. oxydans* *bgIB* produzierten Proteins. **Insert:** Absorptionszunahme bei 420 nm über die Zeit infolge der enzymatischen Hydrolyse von *p*-NPGlu, 0 – 3 μg Protein wurden eingesetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 100 μl 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,8, 10 μl *p*-NPGlu-Lösung (0,05 M) sowie der angegebenen Enzymmenge. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 1 ml.

Anders als bei *G. oxydans* ΔtolB *xynB* (Abb. 36) konnte im Fall von *G. oxydans* ΔtolB *bgIB* keine *p*-NPGlu-hydrolysierende Aktivität durch gewaschene, intakte Zellen gemessen werden, sodass von einer unzureichenden Translokation der Proteine über die Cytoplasmamembran auszugehen war. Da *G. oxydans* ΔtolB *bgIB* in Wachstumsexperimenten mit 25 mM Cellobiose als C-Quelle keinen physiologischen Vorteil gegenüber dem Wildtyp-Stamm besaß (Daten nicht gezeigt), wurde die Arbeit mit diesem Stamm eingestellt.

BoGH3A, aus *B. ovatus* stammend und heterolog durch *G. oxydans* *boGH3A* produziert, zeigte *in vitro* bei 30 °C und in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 eine geringe spezifische Aktivität von $42 \pm 9 \text{ mU mg}^{-1}$ mit *p*-NPGlu als Substrat. Diese geringe hydrolytische Aktivität von BoGH3A mit *p*-NPGlu war bekannt (Larsbrink *et al.* 2014). Auch stellt nicht das Disaccharid Cellobiose das bevorzugte Substrat dieser β -Glukosidase dar, sondern kurze Cellodextrine, insbesondere Cellotetraose und Cellohexaose. Die für die beiden Substrate bekannten spezifischen Aktivitäten liegen bei $48,4 \pm 2,8 \text{ U mg}^{-1}$ (Cellotetraose) und $0,46 \pm 0,1 \text{ U mg}^{-1}$ (Cellohexaose), die K_m -Werte liegen bei $2,5 \pm 0,4 \text{ mM}$ und $0,7 \pm 0,5 \text{ mM}$ (Larsbrink *et al.* 2014).

In diesem Teil der Arbeit wurden die vier β -Glukosidasen BglB, BoGH3A, BoGH3B und BglX ausgewählt und auf ihre Eignung für die Generierung eines cellulolytischen Stamms von *G. oxydans* untersucht. BglX und BoGH3B konnten dabei nicht in aktiver Form durch *G. oxydans* produziert werden. Die *P. polymyxa* – stämmige β -Glukosidase BglB hingegen wurde erfolgreich und als aktives Enzym

produziert, verblieb jedoch vollständig im Cytoplasma. Die Ursache für diese Retention war wahrscheinlich eine fehlerhafte Translokation aufgrund einer Inkompatibilität zwischen der Signalsequenz von PelB und dem Protein BglB. Das vierte Enzym, BoGH3A aus *B. ovatus*, konnte ebenfalls in *G. oxydans* in aktiver Form produziert werden. Diese β -Glukosidase besitzt eine Präferenz für kurze Cellooligosaccharide und zeigt mit Cellobiose oder dem chromogenen Substrat *p*-NPGlu nur eine geringe Enzymaktivität (Larsbrink *et al.* 2014). Anders als bei *G. oxydans bglB* war beim Stamm *G. oxydans boGH3A* auch eine geringe hydrolytische Aktivität mit *p*-NPGlu als Substrat durch intakte Zellen messbar. Daher wurde davon ausgegangen, dass der Stamm *G. oxydans boGH3A* kurzkettige Cellooligosaccharide, vor allem Cellotetraosen und Cellohexaosen, *in vivo* zu Glukose hydrolysieren konnte.

Für eine vollständige Hydrolyse von Cellulose zu Glukose durch *G. oxydans* ist jedoch die kooperative hydrolytische Aktivität von mindestens einem weiteren Enzym notwendig. Mithilfe von BoGH3A war die Umsetzung kurzer Cellodextrine zu Glukose und somit zu einem Wachstumssubstrat von *G. oxydans* möglich. Das zweite notwendige Enzym stellte eine Cellulase (Endoglukanase) dar. Diese katalysiert die endohydrolytische Spaltung β -1,4-glykosidischer Verbindungen im Makromolekül Cellulose und setzt damit als Produkt kurzkettige Cellodextrine frei. Im nächsten Schritt sollte daher eine geeignete Endoglukanase identifiziert werden, die das Enzym BoGH3A hydrolytisch im Hinblick auf eine vollständige Spaltung von Cellulose ergänzt.

3.6.4 Klonierungsstrategie von *celY*, *eglS* und *cbhA*

Als geeignete Endoglukanasen wurden CelY aus *Erwinia (E.) chrysanthemi* (Boyer *et al.* 1987, Guiseppi *et al.* 1991), EglS aus *B. subtilis* (Aa *et al.* 1994) sowie CbhA aus *C. fimi* (Meinke *et al.* 1994) ausgewählt. CelY eignete sich besonders, da es sich um ein nativ extrazelluläres Enzym mit geringer molekularer Masse handelt (34,9 kDa). Zusätzlich konnte CelY bereits erfolgreich rekombinant produziert und für die Endhydrolyse von Cellulose eingesetzt werden (Zhou und Ingram 2000). Auch besitzt das Enzym eine Präferenz gegenüber langkettigen Polymeren, was eine ideale Ergänzung der enzymatischen Aktivität von BoGH3A darstellt. Lösliche Cellooligosaccharide bestehend aus 2-5 Glykosylresten werden von CelY hingegen nicht hydrolysiert (Zhou *et al.* 2001).

Das zweite Enzym, die Endoglukanase EglS, besitzt die maximale Aktivität in einem breiten, leicht sauren pH-Bereich zwischen 5,5 und 6,5 und entspricht somit den physiologischen Ansprüchen von *G. oxydans*. Die Cellobiohydrolase CbhA vereint durch eine zusätzliche Endoglukanase-Aktivität eine exo- und endohydrolytische Eigenschaft, was die Effizienz der vollständigen Hydrolyse von Cellulose durch *G. oxydans* enorm steigern könnte.

Als erstes galt es, die Expressionsvektoren pBBR1p264-*SPpeIB-cbhA*, pBBR1p264-*SPpeIB-eglS* und pBBR1p264-*SPpeIB-celY* zu klonieren. Dazu wurden die Gene *eglS*, *celY* und *cbhA* mithilfe der Oligonukleotide EglS.fw/ EglS.rev, celY.f/ celY.rev und CbhA.fw/ CbhA.rev amplifiziert. Als Matrize diente die genomische DNA von *B. subtilis*, *D. chrysanthemi* und *C. fimi*. Aufgrund bioinformatisch ermittelter nativer Signalsequenzen wurden im Fall von *eglS* die ersten 87 bp, im Fall von *cbhA* die ersten 120 bp und bei *celY* die ersten 69 bp bei der Klonierung entfernt. Die bei der Amplifizierung

erwarteten Fragmentgrößen lagen bei 2517 bp (*cbhA*), 948 bp (*celY*) und 1431 bp (*eglS*) und entsprachen den erhaltenen Fragmenten.

Es erfolgte ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *Sna*BI und *Asc*I mit anschließender Ligation in die korrespondierende Position im Ausgangsvektor pBBR1p264-*SPpelB-phoA*. Die entstandenen Vektoren pBBR1p264-*SPpelB-eglS*, pBBR1p264-*SPpelB-cbhA* und pBBR1p264-*SPpelB-celY* (Abb. 43) wurden in *E. coli* DH5 α vervielfältigt, sequenziert und mittels Elektroporation in *G. oxydans* und *G. oxydans* Δ *tolB* transformiert. Die daraus resultierenden Organismen werden nachfolgend als *G. oxydans* (Δ *tolB*) *eglS*, *G. oxydans* (Δ *tolB*) *cbhA* und *G. oxydans* (Δ *tolB*) *celY* bezeichnet.

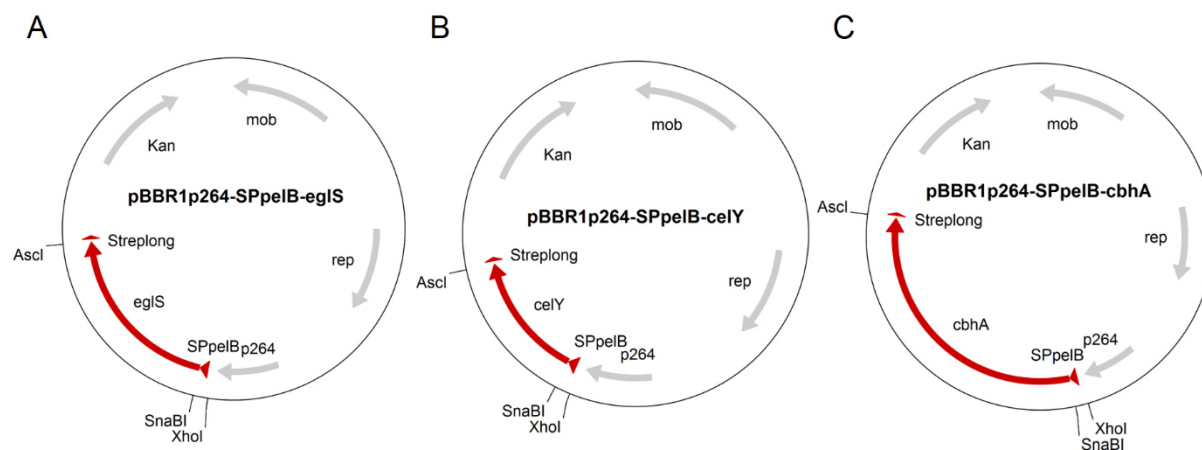


Abbildung 43: Die Vektoren pBBR1p264-*SPpelB-eglS* (A) und pBBR1p264-*SPpelB-celY* (B) sowie pBBR1p264-*SPpelB-cbhA* (C). Kan: Kanamycinresistenzkassette; rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion vom Gen *gox0264*; mob: Mobilisierungsgen; Streplong: Strep-Tag mit elongierter Linkerregion.

3.6.5 Nachweis der Aktivität sowie Lokalisierung der heterolog produzierten Cellulasen *CelY*, *EglS* und *CbhA*

Die Stämme *G. oxydans eglS*, *G. oxydans cbhA* und *G. oxydans celY* wurden unter Standardbedingungen bis zu einer OD_{600nm} zwischen 1,5 und 1,8 angezogen, geerntet und die heterolog produzierten Proteine nach Zellyse mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Allerdings gelang im Fall von *CbhA* und *CelY* auch durch Veränderung der Anzuchtbedingungen keine heterologe Produktion durch *G. oxydans*.

Die Endoglukanase *EglS* aus *B. subtilis* konnte erfolgreich aufgereinigt werden. Analog zu den in dieser Arbeit durchgeführten Endoxylanase-Enzymtests (Abschnitt 3.5), diente für die enzymatische Charakterisierung von *EglS* Remazol-Brilliant-Blau-gekoppelte Carboxymethylcellulose (Azo-CMC) als Substrat. Bei dem angewendeten Enzymtest wurde die *EglS*-enthaltene Enzymlösung in einem Verhältnis von 1:1 mit der Substratlösung versetzt, welche aus einem 100 mM Natriumacetatpuffersystem pH 4,6 bestand und 20 g l⁻¹ Azo-CMC beinhaltete. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Reaktionen gestoppt und polymere Azo-CMC durch Entzug der Hydrathülle mittels Ethanolzugabe gefällt. Die Produkte der von *EglS* katalysierten enzymatischen Reaktionen, Cellooligosaccharide, wurden durch diesen Schritt nicht gefällt und verblieben in Lösung.

Da diese Oligosaccharide kovalent an RBB gekoppelt waren, stieg die Absorption des Überstandes bei 595 nm mit zunehmender Endoglukanase-Aktivität. Mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ließ sich die freigesetzte Stoffmenge des Farbstoffs über die Zeit beim Einsatz unterschiedlicher Enzymmengen berechnen. Durch Herstellerangaben war bekannt, dass die verwendete Azo-CMC eine Kopplungseffizienz von 5 % besaß. Dies bedeutete, dass die Konzentration an freigesetzter Glukose (in Form von kurzkettigen Oligosacchariden) um den Faktor 20 höher war als die freigesetzte Menge an Azo-Farbstoff (Abb. 44). Somit ergab sich für das heterolog in *G. oxydans* produzierte Enzym EgIS unter gegebenen Bedingungen eine spezifische Aktivität von $79,5 \pm 13 \text{ mU mg}^{-1}$ bezogen auf den freigesetzten Farbstoff RBB und eine spezifische Aktivität von $1590 \pm 230 \text{ mU mg}^{-1}$ bezogen auf die freigesetzte Glukose in Form von kurzkettigen Cellooligosacchariden.

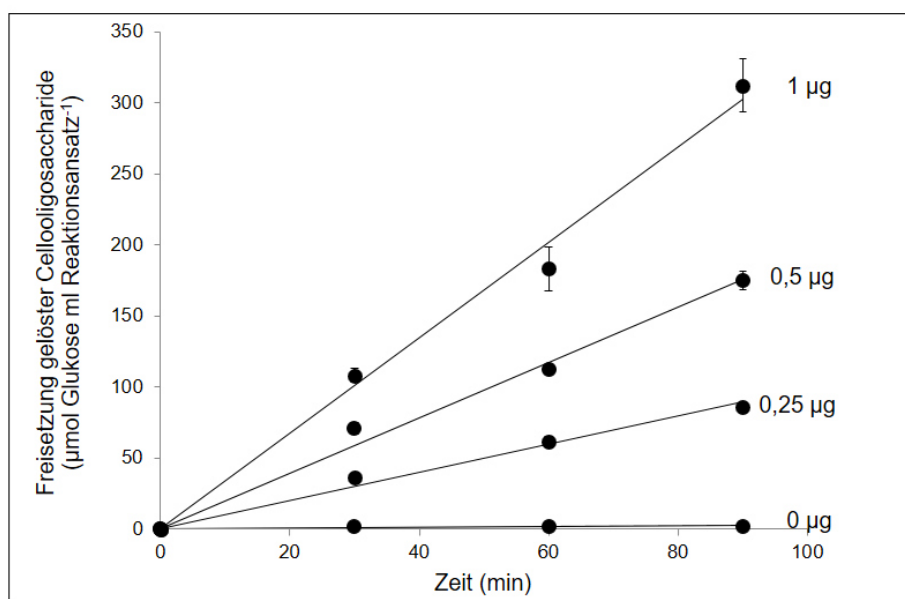


Abbildung 44: Enzymaktivität von EgIS aus *G. oxydans egIS*. Die Aktivität des gereinigten Enzyms wurde bei 30 °C und mit Azo-CMC (Megazyme, Bray, Irland) als Substrat und unterschiedlichen Enzymmengen bestimmt. Gemessen wurde die Stoffmenge des freigesetzten RBB-Farbstoffs. Durch die bekannte Farbstoffkopplungseffizienz von 5 % konnte die Stoffmenge freigesetzter Glukose, vorliegend in Form löslicher Cellooligosaccharide, berechnet werden.

Diese Ergebnisse bestätigten, dass der Stamm *G. oxydans egIS* dazu befähigt war, eine aktive Endoglukanase aus *B. subtilis* zu produzieren.

Zur Überprüfung, ob *G. oxydans ΔtolB egIS* auch *in vivo* CMC hydrolysieren konnte, wurden intakte Zellen anstelle der aufgereinigten Enzyme mit Azo-CMC als Substrat inkubiert. Bei diesem Experiment war es allerdings nicht möglich, eine Hydrolyse des Polysaccharids nachzuweisen. Eine Fraktionierung von *G. oxydans ΔtolB egIS* ergab eine vollständige Retention von EgIS in der cytoplasmatischen Fraktion, sodass möglicherweise eine Störung der Sec-abhängigen SPpelB-vermittelten Translokation in diesem Stamm vorlag. Auch durch die beiden Stämme *G. oxydans ΔtolB celY* und *G. oxydans ΔtolB cbhA* wurde keine *in vivo*-Hydrolyse von Azo-CMC nachgewiesen.

Auf der Suche nach einer geeigneten Endocellulase, welche die enzymatische Aktivität der β -Glukosidase BoGH3A im Hinblick auf die vollständige Degradation von CMC durch *G. oxydans* ergänzen sollte, wurden die Enzyme EglS, CbhA und CelY ausgewählt. Während im Fall von CbhA und CelY die Produktion in *G. oxydans* nicht gelang, konnte EglS erfolgreich heterolog produziert werden. Diese Endocellulase war *in vitro* aktiv, jedoch wurde durch Experimente an intakten Zellen von *G. oxydans* *eglS* eine vollständige Retention von EglS im Cytoplasma nachgewiesen. Wie im Fall der β -Glukosidase BglB war auch hier eine fehlerhafte Translokation die mögliche Ursache. In diesem Abschnitt gelang zwar die vollständige Hydrolyse von CMC durch *G. oxydans* nicht, jedoch konnte durch *G. oxydans boGH3A* ein Stamm generiert werden, der zur Hydrolyse von Cellooligosacchariden befähigt war.

3.7 Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um das kostengünstige Disaccharid Laktose

Laktose (Milchzucker) ist ein Disaccharid, bestehend aus den beiden Molekülen Glukose und Galaktose, die über eine β -1,4-glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Dieser Zucker ist in der Natur ubiquitär vorhanden und kommt in großer Menge in Säugermilch vor. In Kuhmilch kann der Anteil an Laktose 3,8 % bis 5,3 % (w/w) der Gesamtzusammensetzung ausmachen. Dies entspricht einem durchschnittlichen Gehalt von etwa 45 g l Milch⁻¹ (Luinge *et al.* 1993). Im industriellen Maßstab wird Laktose in großer Menge mit einem einfachen Verfahren aus Süß- und Sauermolke gewonnen, welche bei der Käseproduktion als Nebenprodukt anfällt und kostengünstig zur Verfügung steht (Souza *et al.* 2010).

Somit könnte Laktose, wie auch Saccharose, ebenfalls ein kostengünstiges Substrat für *G. oxydans* darstellen. Bisherige Versuche die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um Laktose zu ermöglichen, beispielsweise durch heterologe Expression der *E. coli*-stämmigen Gene *lacZ* und *lacY*, scheiterten oder resultierten nur in einer teilweisen Nutzung dieses Substrats (Mostafa *et al.* 2002). Durch die heterologe Produktion und Translokation geeigneter β -Galaktosidasen in das Periplasma sollte die Laktose-Verwertung in der vorliegenden Arbeit erreicht werden. So könnte die bei der Hydrolyse entstehende Glukose als Wachstumssubstrat dienen und wie im Fall von Trehalose (Abschnitt 3.2) intrazellulär verstoffwechselt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die bei einer schnellen Hydrolyse von Laktose auftretende periplasmatische Oxidation der Glukose zu nutzen, um Glukonsäure und Ketoglukonat zu produzieren (Olijve und Kok 1979b). Die bei der Spaltung freigesetzte Galaktose könnte anschließend von *G. oxydans* 621H weiter zur hochpreisigen Feinchemikalie Galaktonsäure oxidiert werden (Švitel und Šturdik 1994).

Bei den meisten β -Galaktosidasen handelt es sich um cytoplasmatische Hydrolasen mit hoher molekularer Masse. Ein gut untersuchtes Beispiel stellt das Enzym LacZ aus *E. coli* dar, dessen Quartärstruktur ein Homotetramer ist und dessen Untereinheiten jeweils ein Molekulargewicht von etwa 116 kDa aufweisen (Jacobson *et al.* 1994). Cytoplasmatische Enzyme dieser Komplexität und Größe stellen ungeeignete Kandidaten für eine Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* auf Laktose dar. Die Wahrscheinlichkeit einer mangelhaften Translokation oder einer anschließenden

fehlerhaften Konformationsbildung aufgrund der stark unterschiedlichen physiologischen Bedingungen zwischen Periplasma und Cytoplasma wäre zu hoch (Lee *et al.* 1989; Dwyer *et al.* 2014).

Aus diesem Grund wurde nach alternativen β -Galaktosidasen gesucht, die nativ im Periplasma lokalisiert sind und bevorzugt aus Gram-negativen Organismen stammen. Die Wahl fiel dabei auf BoGH2A, eine membranständige periplasmatische β -Galaktosidase aus *B. ovatus*. Zusätzlich wurden die drei bisher nicht charakterisierten putativen β -Galaktosidasen Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1686 aus *Akkermansia (A.) muciniphila* ausgewählt. Der bioinformatischen Analyse zufolge wiesen alle Proteine ein Signalpeptid auf, welches diese Enzyme als periplasmatische oder sekretierte β -Galaktosidasen klassifizierte. Somit stellten diese Enzyme ideale Kandidaten für die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* dar. Im Fall von BoGH2A konnte bereits eine Aktivität mit dem chromogenen, zu Laktose homologen Substrat *p*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (*p*-NPGal) gezeigt werden (Larsbrink *et al.* 2014). Im Fall der Enzyme aus *A. muciniphila* war eine enzymatische Aktivität gegenüber β -galaktosidischen Bindungen jedoch noch nicht bekannt.

3.7.1 Klonierungsstrategie von *boGH2A*, *amuc_0771*, *amuc_0824* und *amuc_1686*

Der erste Schritt für die Erstellung eines Expressionssystems, welches *G. oxydans* ein Wachstum auf Laktose ermöglichen sollte, war die Amplifizierung der entsprechenden Gene von der genomischen DNA von *B. ovatus* und *A. muciniphila*. Die dafür verwendeten Oligonukleotide waren BoGH2a-3.fw/BoGH2a.rev, Amuc0771-1.f/Amuc0771.rev, Amuc_0824neu.f/Amuc_0824.rev sowie Amuc1686-1.f/Amuc1686.rev. Mithilfe des Internetprogramms TMHMM Server 2.0 (Krogh *et al.* 2001) konnte bioinformatisch nachgewiesen werden, dass im Fall von BoGH2A die N-terminalen Aminosäuren 9-31 mit großer Wahrscheinlichkeit eine Membranhelix ausbilden. Diese durchspannt einmal die innere Membran im Organismus und verankert dort das reife Protein, dessen aktives Zentrum zur periplasmatischen Seite gerichtet ist (Larsbrink *et al.* 2014). Da die heterologe Produktion von Membranproteinen häufig mit physiologischen Problemen des Produktionsorganismus verbunden ist, sollte dieser Membrananker über die Klonierung entfernt werden. Das verkürzte Protein BoGH2A sollte mit einer geeigneten Signalsequenz versehen werden und sollte dadurch in reifer Form als lösliches periplasmatisches Protein vorliegen. Das Vorwärtsoligonukleotid wurde daher so gewählt, dass die ersten 102 bp von *boGH2A* bei der Amplifizierung entfernt wurden. Im Fall von *amuc_0771* bestand die ermittelte Signalsequenz aus den ersten 72 bp, bei *amuc_0824* aus den ersten 63 bp und bei *amuc_1686* aus den ersten 51 bp. Auch hier wurden die Oligonukleotide für die Amplifizierung so gewählt, dass die nativen Sequenzen entfernt und eine Fusion an die Signalsequenz der Pektatlyase B möglich war. Die erwarteten Fragmentgrößen lagen bei 2469 bp für *boGH2A*, 1878 Bp für *amuc_0771*, 3753 bp für *amuc_0824* und 2310 bp für *amuc_1686*. Die experimentell erhaltenen Fragmente entsprachen in ihrer Größe den bioinformatisch erwarteten Fragmentgrößen. Alle Fragmente wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut und mit den korrespondierenden Bereichen des Vektors pBBR1p264-*SPpeIB-phoA* ligiert (Abb. 45).

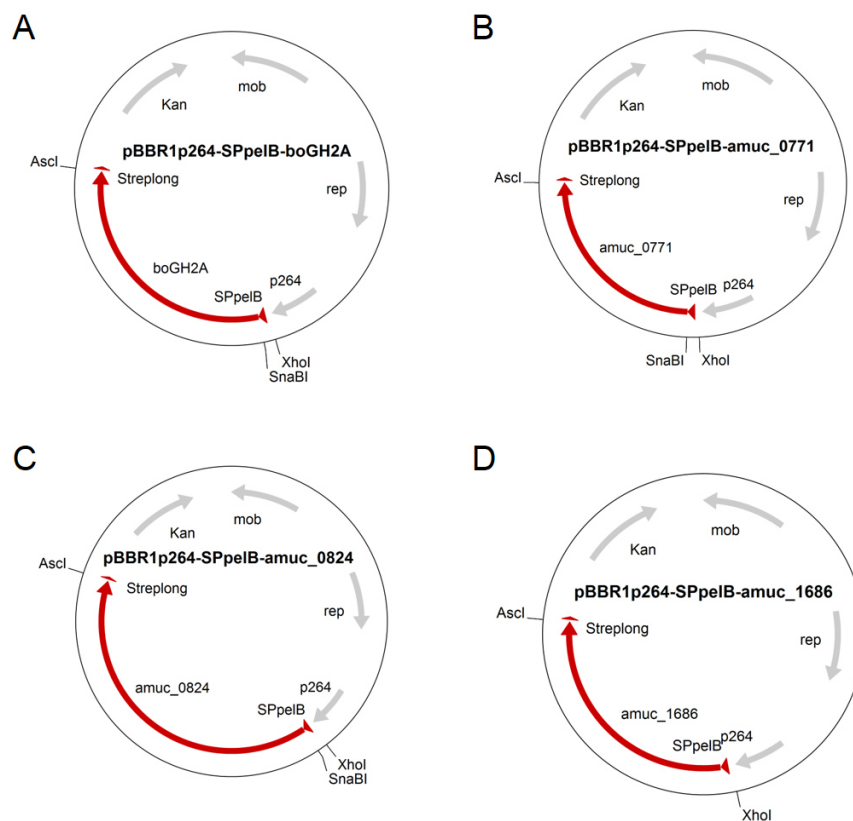


Abbildung 45: Die Vektoren pBBR1p264-SPpelB-boGH2A (A), pBBR1p264-SPpelB-amuc_0771 (B), pBBR1p264-SPpelB-amuc_0824 (C) und pBBR1p264-SPpelB-amuc_1686 (D). Kan: Kanamycinresistenzkassette; rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion vom Gen *gox0264*; mob: Mobilisierungsgen; Streplong: Strep-Tag mit elongierter Linkerregion.

Nach Vervielfältigung in *E. coli* DH5 α wurden die entstanden Vektoren mittels Elektroporation in *G. oxydans* und *G. oxydans* $\Delta tolB$ transformiert. Im Fall von Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1686 handelte es sich um bisher vollständig unbekannte Enzyme und die Identifizierung einer möglichen Signalsequenz beruhte ausschließlich auf bioinformatischen Analysen. Daher wurden zusätzlich zu den SPpelB-tragenden Expressionssystemen drei weitere Vektoren konstruiert. Diese drei Vektoren, ebenfalls basierend auf pBBR1p264-SPpelB-*phoA*, trugen die Gensequenzen für *amuc_0771*, *amuc_0824* und *amuc_1686* inklusive der jeweiligen nativen Signalsequenz. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide waren Amuc0824(ja).fw/ Amuc0824(ja).rev, Amuc1686-nat.fw/ Amuc1686.rev sowie Amuc0771-nat.fw/ Amuc0771.rev. Die fertigen Vektoren erhielten die Bezeichnungen pBBR1p264-SPnat-amuc_0824, pBBR1p264-SPnat-amuc_1686 und pBBR1p264-SPnat-amuc_0771.

3.7.2 Aktivitätsnachweis der β -Galaktosidase BoGH2A

Im Fall der β -Galaktosidase BoGH2A aus *B. ovatus* war bekannt, dass diese Hydrolase einen weit gefassten optimalen pH-Bereich zwischen 6,5 und 8 besitzt und nativ membrangebunden vorliegt (Larsbrink *et al.* 2014). Das Enzym vermittelt mit großer Wahrscheinlichkeit die Spaltung β -galaktosidischer Verknüpfungen und trägt so zur vollständigen Degradation hochverzweigter, komplexer Xyloglukane durch *B. ovatus* bei. Die Experimente wurden bei 37 °C durchgeführt und für

das chromogene Substrat *p*-NPGal konnte eine spezifische Aktivität von $2,5 \pm 0,07$ U mg⁻¹ ermittelt werden (Larsbrink *et al.* 2014). Es war jedoch unklar, ob BoGH2A auch unter an *G. oxydans* angepassten Bedingungen ausreichend enzymatisch aktiv ist und ob das Vorhandensein des Membranankers einen Einfluss auf die finale Proteinfaltung und somit möglicherweise auf die Enzymaktivität hat. Auch gab es keinen Hinweis darauf, ob BoGH2A β -galaktosidische Verbindungen vom Typ β -1,4, wie sie im Disaccharid Laktose vorliegen, hydrolysieren kann.

Daher wurde zunächst überprüft, ob BoGH2A heterolog als lösliches Protein produziert werden kann, aktiv ist und auch unter für *G. oxydans* physiologischen Bedingungen Aktivität zeigt. *E. coli* DH5 α *boGH2A* wurde dazu unter Standardbedingungen angezogen, lysiert und BoGH2A mittels Strep-Tag aufgereinigt. Es konnte gezeigt werden, dass das heterolog produzierte Enzym unter an *G. oxydans* angepassten Bedingungen (30 °C, 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8) eine spezifische Aktivität von $6,6 \pm 0,8$ U mg⁻¹ und einen K_m-Wert von 0,6 mM für das Substrat *p*-NPGal aufwies. Mit den chromogenen Substraten *p*-Nitrophenyl- β -D-Glukopyranosid, *p*-Nitrophenyl- α -D-Glukopyranosid und *p*-Nitrophenyl- α -D-Galaktopyranosid zeigte BoGH2A keine Aktivität. Jedoch deutete die Reaktion mit *p*-NPGal daraufhin, dass das Enzym ohne Membrananker unter den gewünschten Bedingungen ebenfalls hoch aktiv vorlag und so aus dieser Sicht für eine Stammoptimierung von *G. oxydans* geeignet war.

Allerdings war es nicht möglich, eine heterologe Produktion von BoGH2A in *G. oxydans boGH2A* oder *G. oxydans Δ tolB boGH2A* nachzuweisen. Der Stamm *G. oxydans Δ tolB boGH2A* erreichte auch im Vergleich zum Wildtyp-Stamm nur eine leicht erhöhte finale optische Dichte bei einem Wachstum mit 50 mM Laktose (Abb. 46) als Kohlenstoffquelle (YL-Flüssigmedium). Diese OD_{600nm} lag im Fall von *G. oxydans Δ tolB boGH2A* bei 0,2 und im Fall des Wildtyp-Stamms bei 0,1. Der korrespondierende pH-Wert im ungepufferten Medium lag bei 6 und 5,2. Dieses Ergebnis zeigte eine vorhandene, geringe Laktose-hydrolysierende Aktivität. Da das Wachstum mit Laktose als Substrat zu schwach ausfiel, war das Konstrukt pBBR1p264-*SPpeIB-boGH2A* für die weitere Arbeit auf dem Gebiet der Laktoseverstoffwechslung von *G. oxydans* nicht mehr von Relevanz.

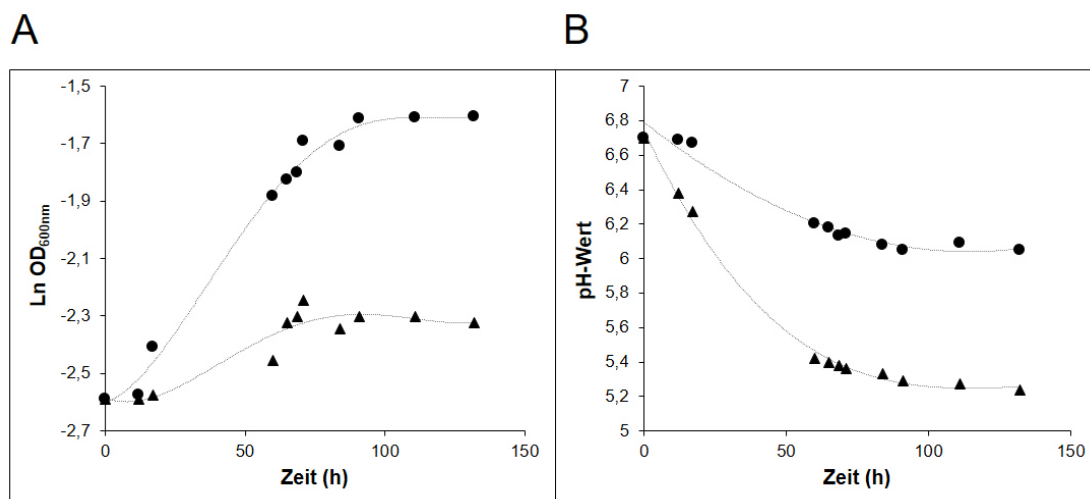


Abbildung 46: Wachstumsverhalten von *G. oxydans Δ tolB boGH2A* mit Laktose als C-Quelle. A: Wachstum von *G. oxydans Δ tolB boGH2A* (●) und dem Wildtyp *G. oxydans* (▲) in YL-Flüssigmedium, welches 50 mM Laktose enthielt. Die finale OD_{600nm} lag im Fall der Mutante bei 0,2 und im Fall des Wildtyp-Stamms bei 0,1. **B:** Veränderung des pH-Profiles der Kulturen der beiden Stämme *G. oxydans Δ tolB boGH2A* (●) und *G. oxydans* (▲) bei einem Wachstum mit 50 mM Laktose.

3.7.3 Lokalisation der *A. muciniphila*-stämmigen putativen β -Galaktosidasen in *G. oxydans*

In *G. oxydans* war es nicht möglich das Protein Amuc_0771 heterolog zu produzieren, weder mit dem Expressionssystem pBBR1p264-SP*pelB*-*amuc_0771* noch mit dem Vektor pBBR1p264-SP*nat*-*amuc_0771*. Aus diesem Grund wurde, wie auch im Fall von BoGH2A, die Arbeit mit diesem Enzym im Zuge der Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* eingestellt.

Die anderen beiden Galaktosidasen, Amuc_0824 und Amuc_1686, konnten sowohl mit der nativen als auch mit der fusionierten *pelB*-Signalsequenz erfolgreich in *G. oxydans* und *G. oxydans* Δ *tolB* produziert werden. *G. oxydans* SP*nat*-*amuc_1686* wurde in Kultur unter Standardbedingungen bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase kultiviert, geerntet, und SP*nat*-Amuc_1686 über den C-terminal fusionierten Strep-Tag aus dem geklärten Lysat aufgereinigt. Da Amuc_1686 bisher nicht charakterisiert war, gab es keinen Hinweis auf die enzymkinetischen Eigenschaften dieses Proteins. So wurde zunächst eine V_{\max} - und K_m -Bestimmung unter den an *G. oxydans* angepassten Bedingungen durchgeführt. Die Kenntnis dieser Parameter war notwendig, um bei einer späteren Erweiterung des Substratspektrums Aussagen über die katalytischen Umsatzraten treffen zu können. Bei 30 °C und mit einem 100 mM Kaliumphosphatpuffersystem bei pH 6,8 wurde für das artifizielle Substrat *p*-NPGal ein V_{\max} -Wert von 80 U mg⁻¹ bestimmt, der K_m -Wert lag bei 0,25 mM.

Der nächste Schritt war der experimentelle Nachweis, ob ein Transport von Amuc_1686 über die cytoplasmatische Membran mithilfe des verwendeten Expressionssystems sowie der *pelB*-Signalsequenz tatsächlich stattfand und ob Amuc_1686 nach erfolgreicher Translokation in aktiver Form vorlag.

Dazu wurden *G. oxydans* Δ *tolB* SP*pelB*-*amuc_1686* sowie *E. coli* DH5 α SP*pelB*-*amuc_1686* als zusätzliche Kontrollen unter Standardbedingungen kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und in die verschiedenen Zellkompartimente fraktioniert (Abb. 47). Als Reinheitskontrolle wurde in beiden Fällen die Aktivitätsverteilung der nativ vorhandenen cytoplasmatischen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase bestimmt. Im Fall von *E. coli* DH5 α SP*pelB*-*amuc_1686* befanden sich 98,9 % dieser Aktivität in der Cytoplasmafraktion, bei *G. oxydans* Δ *tolB* SP*pelB*-*amuc_1686* lag die relative Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase im Cytoplasma bei 99,4 %. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass keine Verunreinigung der periplasmatischen Fraktion durch cytoplasmatische Enzyme vorlag. Bei *G. oxydans* Δ *tolB* SP*pelB*-*amuc_1686* wurde zusätzlich die Aktivität eines nativ vorhandenen periplasmatischen Enzyms gemessen, um eine Vermischung der Fraktionen in umgekehrter Richtung auszuschließen. Bei diesem Kontrollenzym handelte es sich um eine saure Phosphatase, kodiert durch *gox1076* beziehungsweise *gox0994*. Für das Enzym wurde keine Aktivität in der Cytoplasmafraktion und 4,8 % der Gesamtaktivität in der periplasmatischen Fraktion gemessen. Aufgrund der sekretorischen Eigenschaften von *G. oxydans* Δ *tolB* konnten 95,2 % der Gesamtaktivität der periplasmatischen sauren Phosphatasen im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Diese Kontrollen bestätigten für beide Fälle eine saubere Fraktionierung. Im Fall der β -Galaktosidase SP*pelB*-Amuc_1686 konnte in *E. coli* DH5 α SP*pelB*-*amuc_1686* 94,6 \pm 1,3 % der

Gesamtaktivität im Cytoplasma gemessen werden, $4 \pm 0,5$ % in der Periplasmafraktion sowie $1,4 \pm 0,2$ % im Kulturüberstand, wahrscheinlich freigesetzt durch lysierte Zellen (Abb. 47 A).

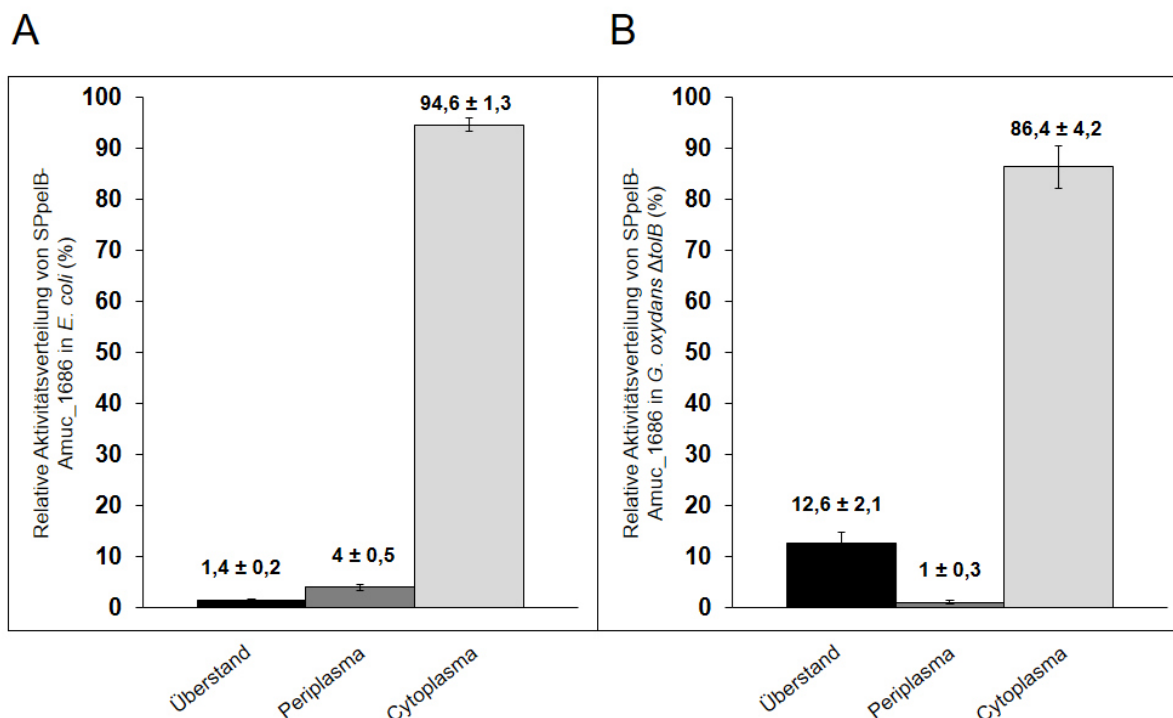


Abbildung 47: Relative Aktivitätsverteilung der heterolog produzierten Galaktosidase Amuc_1686 nach SPPelB-vermittelter Translokation in *E. coli* DH5α SPPelB-amuc_1686 (A) und *G. oxydans* ΔtolB SPPelB-amuc_1686 (B). Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 100 µl Zellfraktion, 100 µl *p*-NPGal (50 mM) und 800 µl 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.

Der im Periplasma gemessene Anteil der Aktivität könnte ein Hinweis auf eine vorhandene, jedoch stark beeinträchtigte SPPelB-vermittelte Translokation von Amuc_1686 sein. Dadurch, dass im Stamm *E. coli* DH5α die nativ vorhandene β-Galaktosidase LacZ deletiert vorliegt, konnte auf eine alleinige Aktivität des heterolog produzierten Enzyms Amuc_1686 geschlossen werden. Im Fall von *G. oxydans* ΔtolB SPPelB-amuc_1686 wurden $86,4 \pm 4,2$ % der Gesamtaktivität im Cytoplasma lokalisiert, $1 \pm 0,3$ % im Periplasma und $12,6 \pm 2,1$ % im Kulturüberstand (Abb. 47 B). Dieses Ergebnis war ein deutlicher Hinweis für eine SPPelB-vermittelte Translokation von Amuc_1686 in das Periplasma mit anschließender Sekretion durch den TolB-Deletionsstamm von *G. oxydans*.

Von den *A. muciniphila*-stämmigen putativen β-Galaktosidasen war es im Fall von Amuc_0771 nicht möglich, dieses Enzym in *G. oxydans* zu produzieren. Amuc_1686 hingegen konnte sowohl erfolgreich produziert, als auch in das Periplasma transloziert werden. Im nächsten Schritt sollte die Produktion und Lokalisation von Amuc_0824 analysiert werden. Hierzu wurde analog zum Xylosidase-Nachweis (Abb. 36) die Substratumsetzung an intakten, gewaschenen Zellen mit *o*-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (*o*-NPGal) als Substrat gemessen (Abb. 48). Während der Wildtyp-Stamm von *G. oxydans* nicht die Fähigkeit besaß *o*-NPGal zu hydrolysieren, konnte im Fall von *G. oxydans* ΔtolB SPnat-amuc_0824 sowie bei *G. oxydans* ΔtolB SPPelB-amuc_0824 eine Spaltung des chromogenen Substrats gemessen werden. *G. oxydans* ΔtolB SPPelB-amuc_0824 zeigte dabei

gegenüber *G. oxydans* $\Delta tolB$ *SPnat-amuc_0824* eine etwa 33 % höhere extrazelluläre β -Galaktosidase-Aktivität, sodass dieser Stamm für weitere Wachstumsexperimente verwendet wurde.

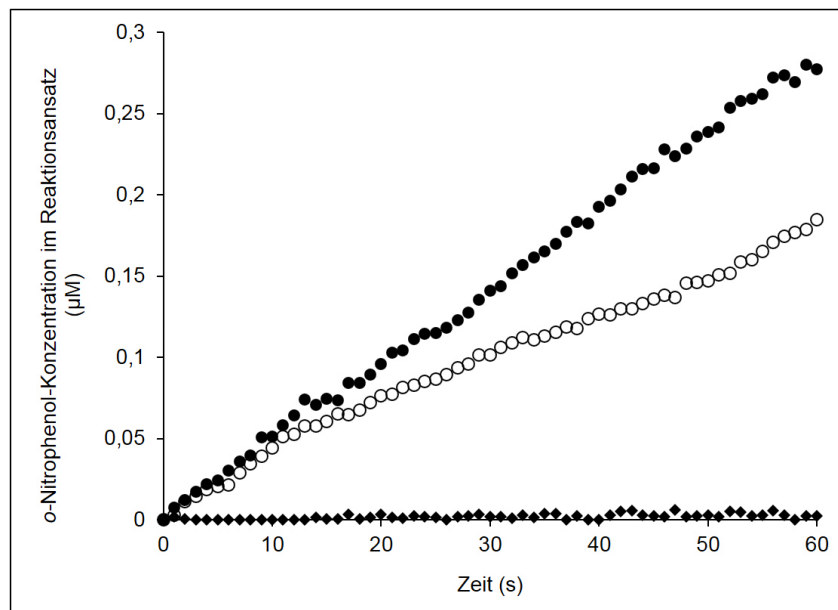


Abbildung 48: Hydrolyse von *o*-NPGal durch intakte Zellen von *G. oxydans* (◆), *G. oxydans* $\Delta tolB$ *SPnat-amuc_0824* (○) und *G. oxydans* $\Delta tolB$ *SPpelB-amuc_0824* (●). Dargestellt ist die Zunahme der *o*-Nitrophenol-Konzentration im Reaktionsansatz infolge der externen Spaltung von *o*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid als Substrat durch intakte Zellen. Der Reaktionsansatz (1 ml) enthielt 100 μ l 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 und 100 μ l 100 mM *o*-NPGal sowie 50 μ l gewaschene Zellsuspension mit einer OD_{600nm} von 0,5.

Nachfolgend wurden *G. oxydans* $\Delta tolB$ *SPpelB-amuc_0824* und *G. oxydans* $\Delta tolB$ *SPpelB-amuc_1686* Wachstumsexperimenten mit Laktose als einzige Kohlenstoffquelle unterzogen. Allerdings war es nicht möglich, diese Stämme unter Standardbedingungen in 50 mM YL-Flüssigmedium zu kultivieren. Da zuvor gezeigt wurde, dass beide Enzyme in *G. oxydans* $\Delta tolB$ transloziert wurden und extrazellulär mit *o*-NPGal aktiv waren, sollte nun die hydrolytische Aktivität der beiden Galaktosidasen mit Laktose überprüft werden. Sowohl Amuc_0824 als auch Amuc_1686 waren bisher nicht charakterisiert, sodass diesbezüglich keine Daten in der Literatur vorhanden waren. Mittels Aktivitätstests mit den gereinigten Proteinen und anschließender Analyse über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Säule (HPLC) konnte auch nach einer Reaktionszeit von 24 h keine signifikante Spaltung von Laktose nachgewiesen werden. Diese Beobachtung zeigte, dass Laktose nicht das native Substrat der Enzyme Amuc_0824 und Amuc_1686 darstellt und erklärte somit die fehlgeschlagene Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um dieses Disaccharid.

Das unbekannte Substratspektrum der beiden potentiellen periplasmatischen β -Galaktosidasen aus *A. muciniphila* und ihre ungewöhnlichen bioinformatischen Charakteristika wurden zum Anlass genommen, im nächsten Kapitel dieser Arbeit eine ausführliche Charakterisierung dieser Enzyme durchzuführen.

3.8 Charakterisierung von vier neuartigen putativen Galaktosidasen des Darmbakteriums *Akkermansia muciniphila*

Im Rahmen der Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um das Disaccharid Laktose wurden bei der Suche nach geeigneten Hydrolasen drei bisher nicht charakterisierte putative periplasmatische β -Galaktosidasen aus *A. muciniphila* ausgewählt (Abschnitt 3.7). Von diesen Enzymen konnten Amuc_0824 und Amuc_1686 erfolgreich produziert und eine Aktivität mit dem chromogenen artifiziellen Substrat *o*-NPGal nachgewiesen werden. Mit Laktose jedoch wurde keine hydrolytische Aktivität beobachtet. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass die Hydrolasen Amuc_0824 und Amuc_1686 im nativen Wirt *A. muciniphila* eine andere Funktion als die Spaltung von Laktose besitzen. Zur Aufklärung der tatsächlichen Funktion von Amuc_0824 und Amuc_1686 wurde in diesem Kapitel der Schwerpunkt auf die bioinformatische und Protein-biochemischen Charakterisierung der Enzyme gelegt. Im Fall von Amuc_0771 gelang in Kapitel 3.7 die Produktion in *G. oxydans* nicht, sodass dieses Enzym für die Erweiterung des Substratspektrums nicht geeignet war. Im Rahmen der genaueren Charakterisierung sollte Amuc_0771 in diesem Kapitel erneut aufgegriffen und heterolog durch *E. coli* produziert werden. Als vierte zu charakterisierende putative β -Galaktosidase wurde Amuc_1666 ausgewählt, da dieses Enzym wie auch die anderen drei Hydrolasen ein mögliches Signalpeptid aufwies und bioinformatischen Blast-Analysen zufolge nur sehr geringe Homologien mit anderen bereits charakterisierten Enzymen besaß.

3.8.1 Der Organismus *A. muciniphila*

Akkermansia (A.) muciniphila ist ein Gram-negatives anaerobes Bakterium, das zum Phylum der Verrucomicrobia gehört (Derrien *et al.* 2004). Aufgrund aktueller Erkenntnisse über die Wichtigkeit der Mikrobiom-Zusammensetzung des Gastrointestinaltrakts für die menschliche Gesundheit, steigt das allgemeine Interesse an diesem Organismus. Es konnte gezeigt werden, dass *A. muciniphila* einen positiven Einfluss auf eine Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder und Stoffwechselstörungen haben kann. Zu diesen gehören beispielsweise Fettleibigkeit, Typ-2-Diabetes und Adipositas-assoziierte Begleitsymptome wie Gewebsinflammationen, Insulinresistenz, eine verminderte Mucus-Schichtdicke sowie eine gestörte Enterozyten-Monolayer-Integrität (Everard *et al.* 2013; Shin *et al.* 2013; Reunanen *et al.* 2015; Zhao *et al.* 2017; Shang *et al.* 2017). 16S-RNA-Genanalysen des komplexen mikrobiellen Ökosystems im Darm sowie Anreicherungen Mucin-spaltender Bakterien konnten zeigen, dass *A. muciniphila* ein verbreiteter und wichtiger Vertreter dieser Organismen im menschlichen colonalen Darmabschnitt ist (Derrien *et al.* 2004; Collado *et al.* 2007; Derrien *et al.* 2008). Trotz des offensichtlichen positiven Einflusses auf die Darmgesundheit sind die genauen Mechanismen der Bakterium-Wirt-Beziehung sowie die exakten Mucin-abbauenden Prozesse bei *A. muciniphila* weitgehend unklar.

Nur ein sehr geringer Anteil der Mikroorganismen im Colon sind zum Abbau von Mucin befähigt und liefern durch die Spaltung dieser Strukturen Nährstoffe für die übrigen Mitglieder des Mikrobioms. Besonders im Dickdarm kommt den Mucin-spaltenden Organismen somit eine wichtige Rolle zu

(Salyers *et al.* 1977; Derrien *et al.* 2008). Aufgrund der Komplexität und Diversität der intestinalen Mucin-Glykan-Strukturen ist für eine effiziente Degradation die kooperative Aktivität von vielen Enzyme notwendig. Dies gilt besonders für verschiedene Glykosid-Hydrolase (GH)-Familien, unter denen sich auch eine Vielzahl an Endo- β -1,4-Galaktosidasen (GH98) und β -Galaktosidasen vom Typ GH2, GH20 und GH42 befinden (Willis *et al.* 1996; Derrien *et al.* 2004; Crost *et al.* 2016).

3.8.1.1 Das Vorhandensein periplasmatischer oder sekretierter β -Galaktosidasen in *A. muciniphila*

Bioinformatische Analysen ergaben für den Stamm *A. muciniphila* ATCC BAA-835 sieben putativ periplasmatische Galaktosidasen (Tab. 11), von denen es sich im Fall von Amuc_0480 (GlaB) und Amuc_1463 (GlaA) sowie Amuc_1187 wahrscheinlich um α -Galaktosidasen handelt. Amuc_0771, Amuc_0824, Amuc_1666 und Amuc_1686 hingegen sind als β -Galaktosidasen unterschiedlicher Größe annotiert. Für alle Proteine konnte das Vorhandensein einer N-terminalen Sec-abhängigen Signalsequenz bioinformatisch bestätigt werden.

Tabelle 11: Putative periplasmatische Galaktosidasen aus *A. muciniphila* ATCC BAA-835. Zusätzlich dargestellt sind jeweils die Annotation, die Anzahl der Aminosäuren sowie die mittels SignalP bestimmte Länge der N-terminalen Signalsequenz.

| Name | Annotation | Anzahl Aminosäuren | Anzahl Aminosäuren putativen der N-terminaler Signalsequenz |
|-----------|-------------------------------|--------------------|---|
| Amuc_0480 | α -1,3-Galaktosidase B | 794 | 57 |
| Amuc_0771 | β -Galaktosidase | 368 | 24 |
| Amuc_0824 | β -Galaktosidase | 1264 | 21 |
| Amuc_1187 | α -Galaktosidase | 533 | 21 |
| Amuc_1463 | α -1,3-Galaktosidase A | 596 | 21 |
| Amuc_1666 | β -Galaktosidase | 1289 | 17 |
| Amuc_1686 | β -Galaktosidase | 780 | 17 |

Da in diesem Kapitel die Charakterisierung der β -Galaktosidasen im Vordergrund stand, wurden ausschließlich Amuc_0771, Amuc_0824, Amuc_1666 und Amuc_1686 näher untersucht.

Für den experimentellen Nachweis periplasmatischer oder sekretierter β -Galaktosidasen in *A. muciniphila* wurde eine Fraktionierung des Organismus unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde *A. muciniphila* unter Standardbedingungen (37 °C, PYG-Medium) bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 kultiviert, geerntet und der Kulturüberstand entnommen. Das resultierende Zellpellet wurde anschließend in die periplasmatische und cytoplasmatische Fraktion unterteilt (Kapitel 2.4.1.3). Von jeder Fraktion wurden 50 μ l in einen Reaktionsansatz von 1 ml eingesetzt, welcher zusätzlich ein 40 mM Kaliumphosphatpuffersystem pH 7 sowie 5 mM *p*-NP- β -Gal (nachfolgend *p*-NPGal) als Substrat enthielt. Die Aktivitätsmessung wurde bei 37 °C, dem Temperatur-Optimum von *A. muciniphila*,

durchgeführt und die Freisetzung von *p*-Nitrophenol durch hydrolytische Spaltung des Substrats photometrisch bei 420 nm gemessen.

$51 \pm 4,6$ % der β -Galaktosidase-Aktivität wurden im Überstand, $2,7 \pm 1,7$ % im Periplasma und $46,3 \pm 2,9$ % in der cytoplasmatischen Fraktion gemessen (Abb. 49).

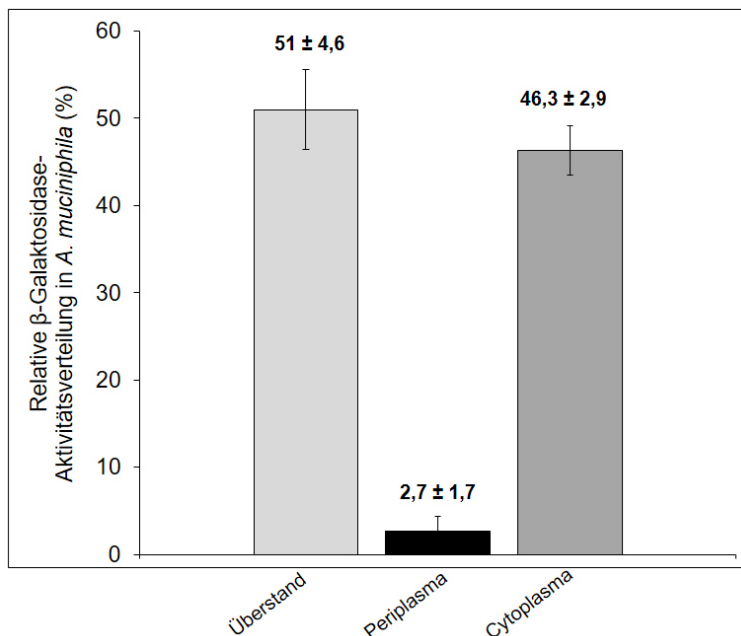


Abbildung 49: Relative Aktivitätsverteilung der Gesamt- β -Galaktosidase-Aktivität in *A. muciniphila*. Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 100 μ l Zellfraktion, 100 μ l *p*-NPGal (50 mM) und 800 μ l 40 mM Tris-Kaliumphosphatpuffer pH 7.

Bei diesen Ergebnissen handelte es sich um einen klaren Hinweis auf das Vorhandensein sekretierter und möglicherweise auch periplasmatischer β -Galaktosidasen in *A. muciniphila*.

Für den Nachweis einer Beteiligung der vier Enzyme am Mucinabbau durch *A. muciniphila* wurde die Expression der korrespondierenden Gene bei einem Wachstum mit 0,1 % Glukose als C-Quelle (Kontrolle) und 0,1 % Mucin anstelle der Glukose in PYG-Medium unter Standardbedingungen analysiert. Beide *A. muciniphila*-Kulturen wurden bis zu einer OD_{600nm} von 0,4 kultiviert, die RNA isoliert und eine mögliche Verunreinigung durch DNA ausgeschlossen. Für die RT-qPCR wurde eine Zyklenzahl von 40 sowie eine T_A von 55,5 °C gewählt. Als interne Kontrolle diente das Gen *amuc_0302*, welches das ribosomale Protein L25 kodiert, sowie das Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen *amuc_1417*. Beide Kontrollen stellten aufgrund ihrer konstitutiven Expression einen Referenzwert dar, der die Identifizierung von Veränderungen in der Expression von *amuc_0771*, *amuc_0824*, *amuc_1666* und *amuc_1686* ermöglichte.

Es zeigte sich, dass in Anwesenheit von 0,1 % Mucin im Medium anstelle von 0,1 % Glukose eine Hochregulation der Expression aller vier Gene erfolgte (Abb. 50).

Die Änderung der Expressionsrate in Bezug auf die konstitutiv exprimierten Genen *amuc_1417* und *amuc_0302* lag im Fall von *amuc_1686* bei einem Faktor von 40 ± 9 . Im Fall von *amuc_1666* betrug dieser Wert 124 ± 28 . Das Gen *amuc_0824* zeigte eine Hochregulation um den Faktor $10,5 \pm 2,4$ und das Gen *amuc_0771* um den Faktor 13 ± 3 .

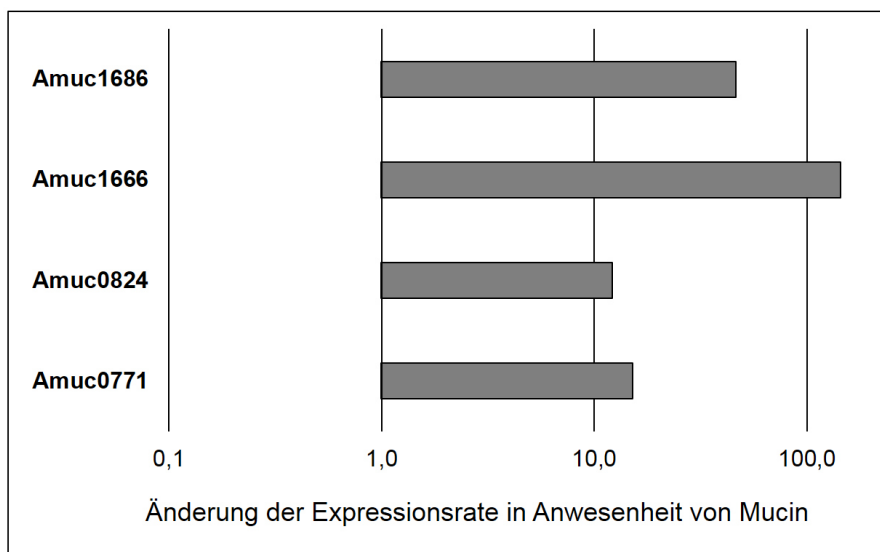


Abbildung 50: Änderung der Expressionsrate der vier putativen β -Galaktosidasen bei einem Wachstum mit 0,1 % Mucin im Medium. Die Änderung der Expressionsrate wurde in Bezug zu einem Wachstum mit 0,1 % Glukose bestimmt.

Im nächsten Schritt sollten die vier Enzyme Amuc_0771, Amuc_0824, Amuc_1666 und Amuc_1686 genauer charakterisiert werden.

3.8.2 Das Enzym Amuc_1686

3.8.2.1 Bioinformatische Analyse

Das erste in dieser Arbeit neu charakterisierte Enzym war die putative β -Galaktosidase Amuc_1686 des Mucin-spaltenden Darmbakteriums *A. muciniphila* Stamm ATCC BAA-835. Das korrespondierende Gen *amuc_1686* besteht aus 2343 bp und kodiert ein Protein mit einer Größe von 780 AS. Mithilfe der Internetprogramme SignalP (Nielsen *et al.* 1997; Petersen *et al.* 2011) und Phobius (Käll *et al.* 2004) konnte gezeigt werden, dass durch die ersten 17 AS beziehungsweise 51 bp eine potentielle Signalsequenz gebildet wurde, was auf eine periplasmatische oder sekretierte Lokalisation des Enzyms in *A. muciniphila* hinwies. NCBI BLASTp-Analysen (Altschul *et al.* 1990; Gish und States 1993) zeigten unter Verwendung der nicht-redundanten Proteindatenbank (NR-Datenbank), dass Amuc_1686 hoch spezifisch innerhalb der Gattung *Akkermansia* und dort innerhalb der Art *A. muciniphila* zu finden ist (Abb. 51). Innerhalb der Gattung variierte die Identität von mit Amuc_1686 verwandten Proteinen in einem Bereich zwischen 91 % und 100 % bei einer Sequenzabdeckung von 97 - 100 %. Außerhalb der Gattung *Akkermansia* wurde das am nächsten verwandte Protein in *Arcticibacter eurypsychrophilus* (Identität 43 %, Sequenzabdeckung 95 %) gefunden, einem psychrophilen Vertreter der Bacteroidetes (Shen *et al.* 2015).

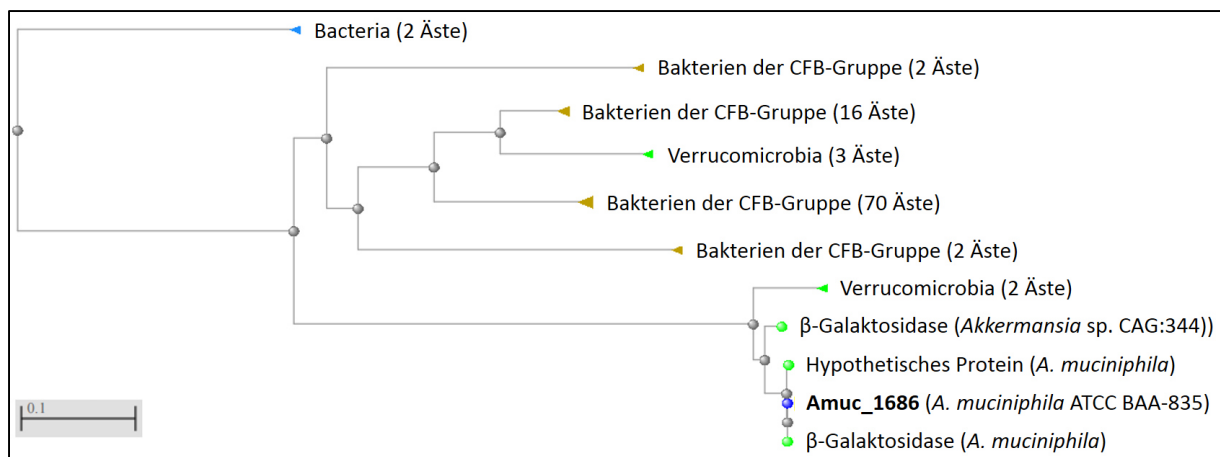


Abbildung 51: Verwandtschaftsdiagramm nach NCBI BLASTp-Analyse der putativen β-Galaktosidase Amuc_1686. Verwendet wurde dabei die nicht-redundante Proteindatenbank bei maximaler Sequenzdifferenz von 0,85. Als Algorithmus zur Erstellung des Baumdiagramms basierend auf gegebenen Distanzen wurde „Fast Minimum Evolution“ (Desper und Gascuel 2004) gewählt und als Distanzmodell der Algorithmus nach Grishin (Grishin 1995).CFB-Gruppe = Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes-Gruppe.

Mit Ausnahme von *Fimbriimonas ginsengisoli*, welcher zu den Armatimonadetes zählt, gehörten alle Organismen der sieben nächsten BLASTp-Treffer unter Verwendung der NR-Datenbank zu den Bacteroidetes (Tab. 12). Die Übereinstimmungen mit hypothetischen Proteinen oder putativen β-Galaktosidasen von *Mucilaginibacter gossypiicola*, *Flavihumibacter petaseus*, *Niabella drilacis*, *Rufibacter tibetensis* and *Pedobacter borealis* zeigten Identitäten von 40 - 43 % bei einer Sequenzabdeckung von 59 – 99 %. Bei diesen annotierten Funktionen handelte es sich um automatische Annotationen auf bioinformatischer Basis, die tatsächliche Funktion der Enzyme war unbekannt.

Tabelle 12: BLASTp-Analyse von Amuc_1686 unter Verwendung der NR-Datenbank. Dargestellt sind die sieben homologen Proteine mit der höchsten Übereinstimmung.

| Organismus | Annotation | Identität (%) | Sequenzabdeckung (%) | Zugangsnummer |
|---------------------------------------|------------------------|---------------|----------------------|----------------|
| <i>Akkermansia muciniphila</i> | β-Galaktosidase | 100 | 100 | WP 012420719.1 |
| <i>Articibacter eurypsychrophilus</i> | Hypothetisches Protein | 43 | 95 | WP 069658037.1 |
| <i>Mucilaginibacter gossypiicola</i> | β-Galaktosidase | 43 | 95 | SEO07740.1 |
| <i>Flavihumibacter petaseus</i> | Hypothetisches Protein | 43 | 98 | WP 046370646.1 |
| <i>Fimbriimonas ginsengisoli</i> | Hypothetisches Protein | 43 | 95 | WP 052547660.1 |

| | | | | |
|------------------------------|------------------------|----|----|----------------|
| <i>Niabella drilacis</i> | β -Galaktosidase | 43 | 95 | SDD61260.1 |
| <i>Rufibacter tibetensis</i> | β -Galaktosidase | 42 | 95 | WP 062545789.1 |
| <i>Pedobacter borealis</i> | Hypothetisches Protein | 40 | 98 | WP 029276303.1 |

BLASTp-Analysen von Amuc_1686 unter Verwendung der manuell überprüften SwissProt-Datenbank zeigten, dass 19 der 20 ähnlichsten Proteine innerhalb eukaryotischer β -Galaktosidasen, und dort hauptsächlich innerhalb der Mammalia zu finden waren (Tab. 13).

Tabelle 13: BLASTp-Analyse von Amuc_1686 unter Verwendung der SwissProt-Datenbank. Dargestellt sind die 10 Proteine mit der höchsten Übereinstimmung.

| Treffer | Organismus | Annotation | Identität (%) | Zugangsnummer |
|---------|------------------------------|--|---------------|---------------|
| 1 | <i>Xanthomonas manihotis</i> | β -Galaktosidase | 43,6 | P48982 |
| 2 | <i>Homo sapiens</i> | β -Galaktosidase-1-ähnliches Protein 2 | 37,7 | Q8IW92 |
| 3 | <i>Homo sapiens</i> | β -Galaktosidase-1-ähnliches Protein 3 | 37,6 | Q8NCI6 |
| 4 | <i>Mus musculus</i> | Isoform 2 des β -Galaktosidase-1-ähnlichen Protein 2 | 37,1 | Q3UPY5-2 |
| 5 | <i>Mus musculus</i> | β -Galaktosidase-1-ähnliches Protein 2 | 37,1 | Q3UPY5 |
| 6 | <i>Rattus norvegicus</i> | β -Galaktosidase-1-ähnliches Protein 3 | 36,7 | Q5XIL5 |
| 7 | <i>Canis lupus</i> | β -Galaktosidase | 37,4 | Q9TRY9 |
| 8 | <i>Mus musculus</i> | β -Galaktosidase-1-ähnliches Protein 3 | 35,0 | A2RSQ1 |
| 9 | <i>Felis catus</i> | β -Galaktosidase | 37,8 | O19015 |
| 10 | <i>Mus musculus</i> | β -Galaktosidase | 37,0 | P23780 |

Die Identitäten dieser Enzyme variierten in einem Bereich von 34 – 38 % bei einer Sequenzabdeckung von 69 – 75 %. Es konnte nur ein Vertreter mit signifikanter Homologie innerhalb der Bacteria identifiziert werden, die β -Galaktosidase Bga aus *Xanthomonas manihotis* (Taron *et al.* 1995). Es handelt sich dabei um das stärkste homologe Protein von Amuc_1686, die Identität lag hier bei 44 % und die Sequenzabdeckung bei 69 %.

3.8.2.2 Klonierung, Produktion und Aufreinigung von Amuc_1686

Der erste Schritt für die Charakterisierung von Amuc_1686 war die Klonierung des korrespondierenden Gens *amuc_1686* in ein geeignetes Expressionssystem. Da die Überproduktion heterolog in *E. coli* durchgeführt werden sollte, wurde als Expressionsvektor pASK-IBA5 gewählt. Dieser besitzt eine Ampicillin-Resistenzkassette und ein AHT-induzierbares Promotorsystem, sowie die Möglichkeit der N-terminalen Fusion eines Strep-Tags. Eine C-terminale Fusion des Strep-Tags war im Fall von

Amuc_1686 nicht möglich, da bioinformatischen Analysen zufolge der C-Terminus eine zentrale Funktion für die Aktivität des Enzyms besitzt (Abschnitt 3.8.2.5-3.8.2.7). Da der N-terminale Bereich von Amuc_1686 jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit eine Signalsequenz trägt, musste diese durch die Wahl geeigneter Oligonukleotide bei der Amplifizierung des korrespondierenden Gens vor der Fusion an den Strep-Tag entfernt werden. Für die Klonierung von pASK5-*NoSP-amuc1686* wurden die Oligonukleotide A1686_nosp_pa5.f und A1686_pASK5.rev (Endonukleasen-Schnittstellen *SacI* und *XhoI*) verwendet. Die bei der Amplifizierung erwartete Fragmentgröße lag bei 2312 bp und entsprach dem experimentell erhaltenen Fragment. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *XhoI* verdaut, in den entsprechenden Vektor ligiert und in *E. coli* DH5 α vervielfältigt. Für die eigentliche heterologe Produktion wurde der Expressionsvektor pASK5-*NoSP-amuc1686* anschließend mittels Hitzeschock in *E. coli* BL21 eingebracht. Nach der erfolgreichen Klonierung erfolgte eine Kultivierung von *E. coli* BL21 pASK5-*NoSP-amuc1686* unter Standardbedingungen in LB-Medium. Die Induktion der Proteinproduktion wurde durch Zugabe von AHT nach Erreichen einer OD_{600nm} zwischen 0,6 und 0,8 eingeleitet. Anschließend wurde die Inkubationstemperatur auf 20 °C herabgesenkt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 12 Stunden wurde die Kultur geerntet, die Zellen lysiert und die Strep-Tag-fusionierten Proteine mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Das aufgereinigte Protein Amuc_1686 wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung sowie Westernblot visualisiert (Abb. 52). So konnte einerseits eine hohe Reinheit gezeigt werden und andererseits die erfolgreiche Fusion des Proteins an einen N-terminalen Strep-Tag bestätigt werden. Die erwartete molekulare Masse mit Strep-Tag lag bei 86 kDa und entsprach den experimentell erhaltenen Ergebnissen.

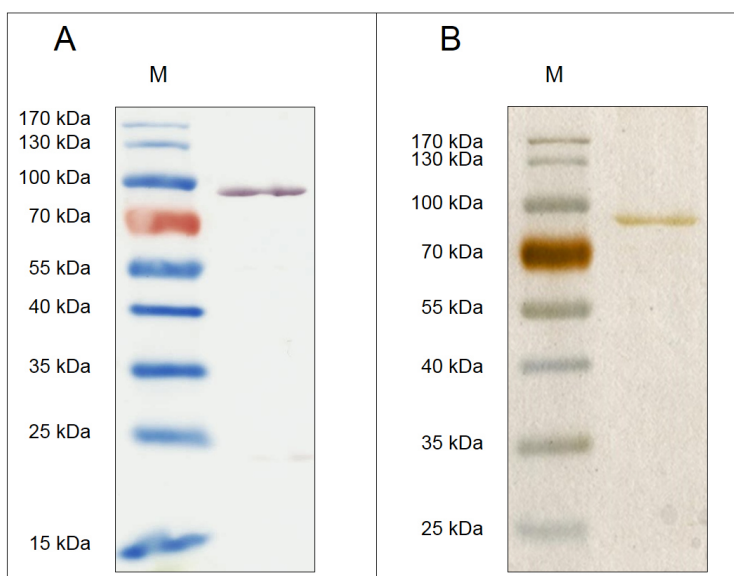


Abbildung 52: Visualisierung von Amuc_1686 mittels Westernblot (A) und Silberfärbung (B). Die erwartete molare Masse betrug 86 kDa. M = Marker.

Mittels Gelfiltrationschromatographie wurde die native Quartärstruktur von Amuc_1686 aufgeklärt. Dabei wurde ein einzelnes Signal bei etwa 88 kDa detektiert, was auf eine monomere Quartärstruktur im nativen Zustand hinwies.

3.8.2.3 Proteinbiochemische Eigenschaften und Enzymkinetiken

Die spezifische Aktivität von Amuc_1686 wurde bei verschiedenen pH-Werten sowie Reaktionstemperaturen dem chromogenen Substrat *p*-NPGal bestimmt (Abb. 53). Dabei wurde ein kombiniertes Puffersystem verwendet, bestehend aus 50 mM Natriumacetat, 50 mM Tris-HCl und 50 mM Dikaliumhydrogenphosphat, sowie 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat zu jeweils gleichen Anteilen (Salusjärvi *et al.* 2004; Schweiger und Deppenmeier 2010). Der optimale pH-Wert für Amuc_1686 lag bei 7,5 und das Temperaturoptimum bei einem hohen Wert zwischen 65 und 70 °C (Abb. 53).

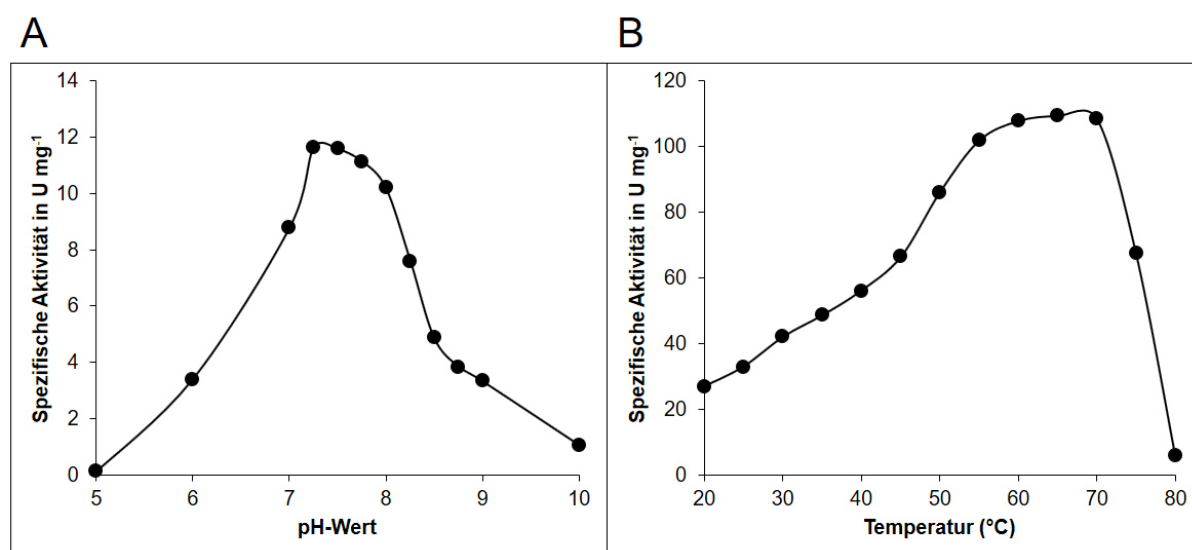


Abbildung 53: Der optimale pH-Bereich (A) sowie das Temperaturoptimum (B) von Amuc_1686. Als Puffersystem wurde ein kombinierter Puffer nach Schweiger und Deppenmeier 2010 verwendet.

Zur Bestimmung möglicher kationischer Kofaktoren wurde ein Reaktionansatz bestehend aus 5 mM *p*-NPGal und einem 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7 mit 1 µg Amuc_1686 versetzt und die spezifische Aktivität nach Zugabe von 5 mM Kationen bei 30 °C bestimmt (Abb. 54).

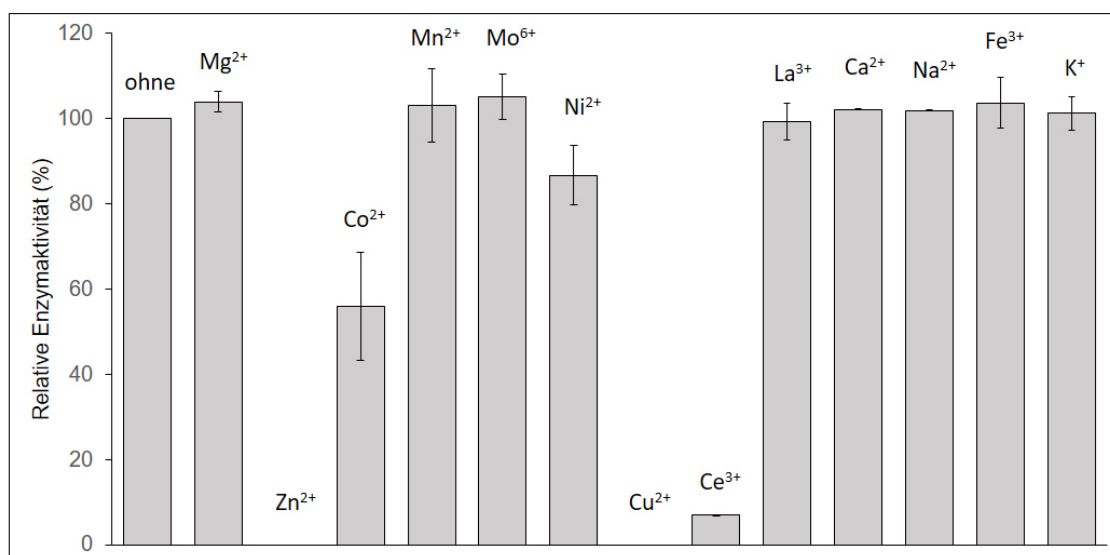


Abbildung 54: Relative Enzymaktivität von Amuc_1686 nach Zugabe verschiedener Kationen. Die gemessene Aktivität ohne Zusatz wurde als 100 % Aktivität festgelegt. Der Reaktionsansatz bestand aus 1 µg Amuc_1686, 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7, 5 mM *p*-NPGal als Substrat sowie 5 mM des jeweiligen Kations. Das Gesamtvolumen betrug 1 ml und die Reaktionstemperatur 30 °C.

Im Vergleich zum Reaktionsansatz ohne Kationenzusatz konnte für K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Fe³⁺, La³⁺ und Mo⁶⁺ keine signifikante Veränderung beobachtet werden. Der Zusatz von Ni²⁺ (Restaktivität 86,6 ± 6,9 %), Co²⁺ (Restaktivität 55,5 ± 12,7 %) und Ce³⁺ (Restaktivität 6,9 ± 0,2 %) hingegen führte zu einer Abnahme der Aktivität. Die Zugabe von 5 mM Zn²⁺ oder Cu²⁺ führte zu einer vollständigen Inhibierung von Amuc_1686.

Es wurde eine Analyse des Substratspektrums durchgeführt, die sowohl verschiedene artifizielle chromogene Nitrophenyl-gekoppelte Zucker (Tab. 14) als auch natürliche Di- und Trisaccharide (Tab. 15) berücksichtigte. Als abiotische Faktoren für die Messung mit den chromogenen Substraten wurde der optimale Temperaturbereich von 65 °C und als pH-Wert der optimale Wert von 7,5 gewählt.

Tabelle 14: Spezifische Aktivität (U mg⁻¹) von Amuc_1686 mit verschiedenen artifiziellen chromogenen Substraten. Es wurde ein 50 mM Kombinationspuffer pH 7,5 (Schweiger und Deppenmeier 2010) verwendet sowie eine finale Substratkonzentration von 5 mM. Die Reaktionstemperatur betrug 65 °C.

| Substrat | Spezifische Aktivität (U mg ⁻¹) |
|---|---|
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-Glukopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-α-D-Glukopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-Glukuronid | < 0,1 |
| <i>o</i> -Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid | 35 ± 4 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid | 370 ± 43 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-Xylopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Galaktosaminid | 0,2 ± 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glukosaminid | < 0,1 |

3 Ergebnisse

| | |
|--|-------|
| <i>p</i> -Nitrophenyl- β -L-Fucopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl- α -L-Fucopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-Arabinopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-Galaktopyranosid | < 0,1 |
| GalNAc- β - <i>p</i> -Nitrophenol (O-glykosidisch verknüpft) | < 0,1 |

Von allen getesteten künstlichen Substraten wurde die höchste Aktivität mit *p*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (*p*-NPGal) gemessen. Der V_{\max} -Wert lag für dieses Substrat bei $370 \pm 43 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ und der K_m -Wert bei $0,5 \pm 0,3 \text{ mM}$ (Abb. 55). Dies entspricht einer Wechselzahl K_{cat} von $530,3 \pm 87,1 \text{ s}^{-1}$ und somit einer katalytischen Effizienz $K_{\text{cat}} K_m^{-1}$ von Amuc_1686 von $1060,6 \pm 174,23 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

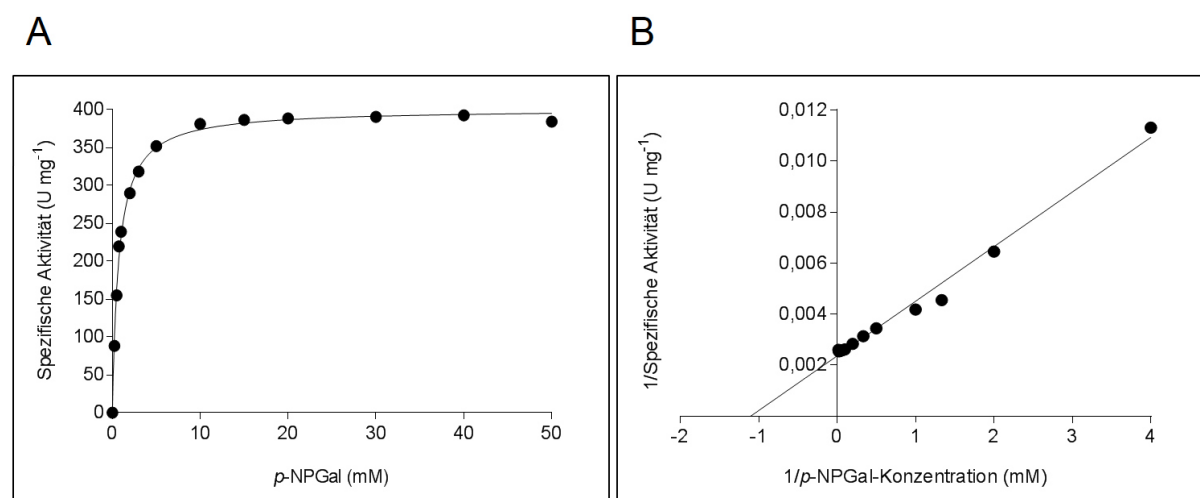


Abbildung 55: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von Amuc_1686 von der Konzentration des Substrats *p*-NPGal, dargestellt als Michaelis-Menten-Kinetik (A) und Lineweaver-Burk-Diagramm (B). Die Reaktion erfolgte bei 65 °C und in einem kombinierten Puffersystem pH 7,5. Die spezifische Aktivität betrug für dieses Enzym $370 \pm 43 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bei einem K_m -Wert von $0,5 \pm 0,3 \text{ mM}$. Die nicht-lineare Regression der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 7 und ist hier beispielhaft für eine Enzympräparation gezeigt.

Im Fall der *ortho*-verknüpften Variante des β -D-Galaktopyranosids *o*-NPGal war die spezifische Aktivität etwa um den Faktor 10 geringer. Mit allen anderen Substraten, auch mit dem chromogenen α -D-Galaktopyranosid, konnte keine signifikante Aktivität nachgewiesen werden. Dadurch wurde bestätigt, dass es sich bei Amuc_1686 tatsächlich um eine β -Galaktosidase handelt.

Zusätzlich wurde die hydrolytische Fähigkeit gegenüber verschiedenen natürlichen Sacchariden überprüft (Tab. 15). Es wurde eine Reaktionstemperatur von 37 °C gewählt, da diese der optimalen Temperatur von *A. muciniphila* sowie den natürlichen Temperaturgegebenheiten im menschlichen Darm entspricht.

Als Puffersystem diente auch hier ein kombiniertes Puffer mit pH 7,5 (Schweiger und Deppenmeier 2010) und es wurde pro Reaktionsansatz 1 μg Enzym sowie 5 mM Substrat eingesetzt. Die Substratabnahme und Produktbildung wurde mittels HPLC analysiert.

Tabelle 15: Nachgewiesene Hydrolyse verschiedener Saccharide durch Amuc_1686. Es wurde ein 50 mM Kombinationspuffer pH 7,5 (Schweiger und Deppenmeier 2010) eingesetzt, die Substratkonzentration lag bei 5 mM. Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C und die eingesetzte Enzymmenge 1 µg. (*) = Minimale Aktivität, Spaltung von etwa 10 % Substrat innerhalb von 24 h.

| Substrat | Spaltung |
|--|----------|
| Saccharose (Glukose- α , β -1,2-Fruktose) | Nein |
| Trehalose (Glukose- α , α -1,1-Glukose) | Nein |
| Melibiose (Galaktose- α -1,6-Glukose) | Nein |
| Xylobiose (Xylose- β -1,4-Xylose) | Nein |
| Maltose (Glukose- α -1,4-Glukose) | Nein |
| Laktose (Galaktose- β -1,4-Glukose) | Nein |
| LacNac (Galaktose- β -1,4-N-Acetyl-D-Glukosamin) | Nein |
| Galakto-N-Biose (Galaktose- β -1,3-N-Acetyl-D-Galaktosamin) | (Ja)* |
| Raffinose (Galaktose- α -1,6-Glukose- β -1,2-Fruktose) | Nein |
| 2`Fukosyllaktose (Fukose- α -1,2-Galaktose- β -1,4-Glukose) | Nein |
| N-Acetyl-D-Galaktosamin- β -1,4-Galaktose | Nein |

Die einzige nachweisbare Enzymaktivität mit natürlichen Substraten wurde mit Galakto-N-Biose gezeigt. Dabei handelt es sich um ein Disaccharid bestehend aus Galaktose, welche über eine β -1,3-glykosidische Bindung an N-Acetyl-D-Glukosamin verknüpft ist. Diese Aktivität war jedoch sehr gering. Es konnte nach einer Inkubationszeit von 24 h nur eine Spaltung von 10 % des Substrats durch Amuc_1686 nachgewiesen werden.

3.8.2.4 Bioinformatische Charakterisierung der C-terminalen Region von Amuc_1686

Wie in Abschnitt 3.8.2.1 beschrieben, zeigten NCBI BLASTp-Analysen von Amuc_1686 unter Verwendung der SwissProt-Datenbank als stärkstes homologes Protein die β -Galaktosidase Bga aus *Xanthomonas manihotis* (Taron *et al.* 1995). Dieses Enzym (P48982) zeigte eine Identität von 44 % bei einer Sequenzübereinstimmung von 69 % auf Aminosäureebene und stellte das einzige Protein prokaryotischen Ursprungs innerhalb der ähnlichsten 20 Treffer dar. Ein Sequenz-Alignment der Aminosäuresequenzen von Amuc_1686 (780 AS) und Bga (598 AS) unter Verwendung des Internetprogramms ClustalOmega (Sievers *et al.* 2011; McWilliam *et al.* 2013; Li *et al.* 2015) zeigte einen fehlenden C-terminalen Bereich im Fall von Bga, bestehend aus etwa 180 AS (Abb. 56).

Durch weitere Analysen mit den Programmen Pfam (Finn *et al.* 2016) und Prosite (Hulo *et al.* 2008; Sigrist *et al.* 2012) konnte im zusätzlichen C-terminalen Bereich von Amuc_1686 eine Discoidin-Domäne, auch bekannt als Koagulationsfaktor Typ C F5/8-Domäne oder FA58C-Domäne (Foster *et al.* 1990; Ortel *et al.* 1994; Villoutreix *et al.* 1998; Baumgartner *et al.* 1998), identifiziert werden (Abb. 56, Abb. 57).

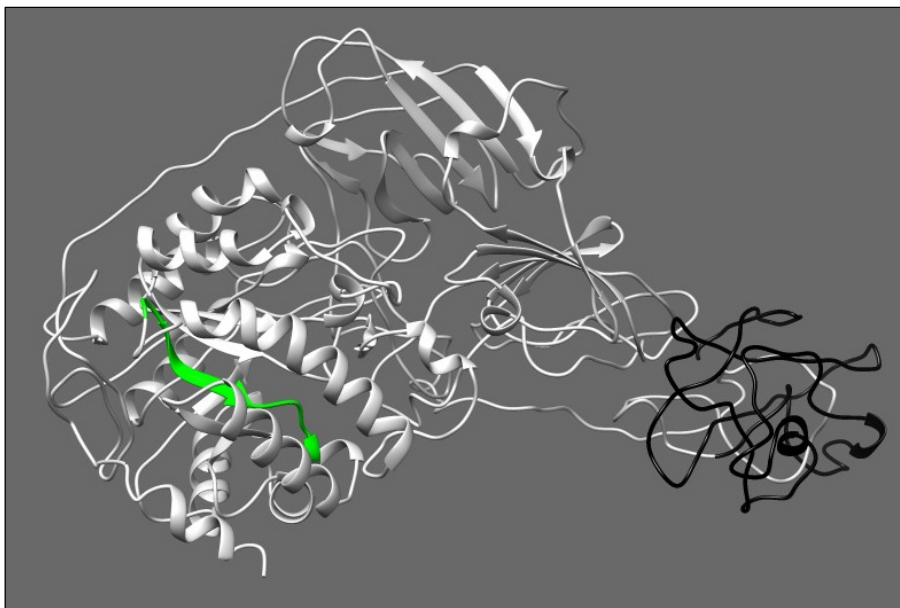


Abbildung 57: Bioinformatisch erstelltes Modell von Amuc_1686. Der C-terminale Discoidin-Bereich stellt eine klar distanzierte Domäne dar (schwarz). Der Bereich des wahrscheinlichen katalytischen Zentrums ist grün markiert, liegt im Bereich der AS 177-189 und wurde mittels Prosite bestimmt (Hulo *et al.* 2008; Sigrist *et al.* 2012). Das Modell wurde mittels Phyre2 und UCSF Chimera erstellt (Pettersen *et al.* 2004; Kelley *et al.* 2015).

Es wurde eine NCBI BLASTp-Analyse unter Verwendung der nicht-redundanten Protein-Datenbank für die C-terminale Discoidin-Domäne von Amuc_1686 durchgeführt. Die 15 ähnlichsten Proteine wurden innerhalb der Bacteroidetes mit einer Identität von 48 – 57 % und einer Sequenzabdeckung von 97 % identifiziert. Unter Verwendung der SwissProt-Datenbank wurden die höchsten Homologien mit NedA, einer Sialidase aus *Micromonospora viridifaciens*, NagJ, einer N-Acetyl- β -Hexosaminidase aus *Clostridium perfringens* ATCC 13124 und NagH, einer Hyaluronoglucosaminidase, gefunden (Rao *et al.* 2006; Ficko-Blean und Boraston 2006; Pathak *et al.* 2008). Weitere homologe Discoidin-Domänen konnten bei der Galaktose-Oxidase GAOA aus dem Ascomycet *Gibberella zeae* (Cooper *et al.* 1959; Kosman *et al.* 1974) sowie einer Endo- α -N-Acetylgalaktosaminidase aus *Streptococcus pneumonia* ATCCBAA-255 identifiziert werden (Umemoto *et al.* 1977; Willis *et al.* 1996; Caines *et al.* 2008). Die Sequenzabdeckung lag dabei in einem Bereich von 71 – 96 % mit bei einer geringen Identität von 30 – 43 %.

Die durchschnittliche Länge der Discoidin-Domänen der vier ähnlichsten Treffer NagH, NagJ, NedA und GAOA betrug 130 ± 3 AS. Im Fall von Amuc_1686 war die Domäne hingegen stark verkürzt und wies eine Anzahl von nur 79 AS auf.

Im Fall von NagJ stellt die Discoidin-Domäne ein Kohlenhydrat-bindendes Modul der Familie 32 (CBM32) dar und ermöglicht dem Enzym hochspezifisch die Bindung an Galaktose-Moleküle innerhalb von komplexen Polysacchariden (Ficko-Blean und Boraston 2006). Es wurde ein Alignment durchgeführt, durch das im Fall von Amuc_1686 ein Fehlen des C-terminalen Teils der Discoidin-Domäne gezeigt werden konnte (Abb. 58). Während die N-terminalen, an der Bindung von Galaktose-Einheiten beteiligten Aminosäuren der Discoidin-Domäne im Fall von Amuc_1686 vorhanden sind,

fehlen die C-terminalen konservierten und hochkonservierten Regionen (Ficko-Blean und Boraston 2006).

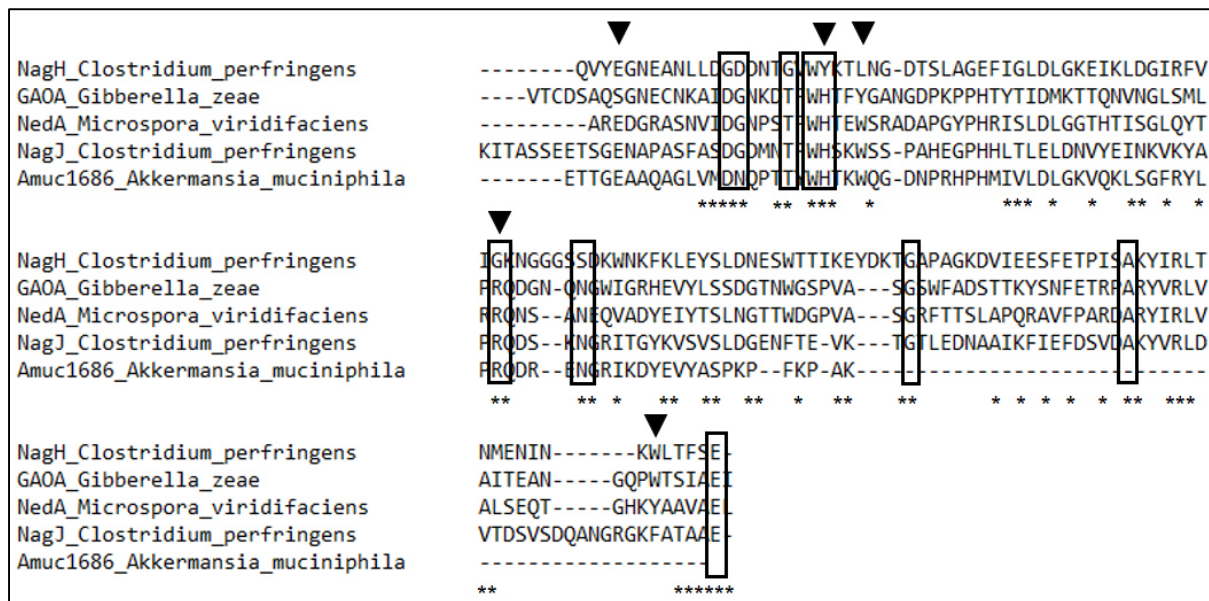


Abbildung 58: Bioinformatische Analyse der C-terminalen Discoidin-Domäne von Amuc_1686.

Die Aminosäuresequenz der C-terminalen Discoidin-Domäne von Amuc_1686 und die am nächsten verwandten Discoidin-Domänen der bereits charakterisierten Enzyme NagH, GAOA, NedA und NagJ wurden miteinander verglichen. Ein Dreieck (▲) deutet auf Aminosäurereste hin, welche vermutlich an der Bindung von Galaktose-Molekülen innerhalb von komplexen Polysacchariden beteiligt sind. Ein Stern (*) kennzeichnet konservierte Bereiche und schwarz umrahmt sind hochkonservierte Bereiche (Ficko-Blean und Boraston 2006).

3.8.2.5 Die Konstruktion einer Variante von Amuc_1686 ohne C-terminaler Discoidin-Domäne und der Einfluss verschiedener Phospholipide auf die Enzymaktivität von Amuc_1686.

Im nächsten Schritt sollte die Funktion der Discoidin-Domäne von Amuc_1686 analysiert werden. Zu diesem Zweck musste zunächst eine Variante des Proteins konstruiert werden, der diese C-terminale Domäne fehlt. Dazu wurde unter Verwendung der Oligonukleotide A1686_nosp_pa5.fw/pask1686short.rev mittels PCR das verkürzte *amuc_1686*-Gen amplifiziert. Über die Oligonukleotide wurden die Schnittstellen *SacI* und *XhoI* flankierend angefügt. Das erwartete Fragment besaß eine Größe von 2012 bp und entsprach dem bei der Amplifizierung erhaltenen Fragment.

Nach enzymatischem Verdau wurde das Fragment in die korrespondierende Position im Ausgangsvektor pASK-IBA5 ligiert und mittels Hitzeschock in den Klonierungsstamm *E. coli* DH5α transformiert. Das resultierende Expressionssystem pASK5-NoSP-*amuc1686short* wurde im Anschluss in den Produktionsstamm *E. coli* BL21 eingebracht und die Proteinproduktion und Aufreinigung von Amuc_1686short analog zu Abschnitt 3.8.2.3 durchgeführt.

Discoidin-Domänen, wie sie beispielsweise am Carboxylterminus der Blut-Koagulationsfaktoren V und VIII identifiziert wurden, können sowohl die Bindung an Phospholipide (z.B. Phosphatidylserin) als auch die Aktivität des Enzyms (Kane und Davie 1988; Foster *et al.* 1990; Ortel *et al.* 1994) sowie das

Produktspektrum beeinflussen (Song *et al.* 2013). Aus diesem Grund wurde eine mögliche Interaktion der Discoidin-Domäne von Amuc_1686 mit Phospholipiden untersucht. Zunächst wurde überprüft, ob Amuc_1686 aufgrund der Domäne eine Bindungskapazität gegenüber Phosphatidylserin besitzt. Dieser Bindungstest erfolgte nach Herstellerangaben in einem Lipid-Protein-Pulldown-Reaktionsansatz. Dazu wurden Phosphatidylserin-gekoppelte Agarose-Perlen (Echelon Biosciences, Salt Lake City, USA) zusammen mit Amuc_1686 inkubiert, zentrifugiert, gewaschen und sowohl ein enzymatischer Test mit *p*-NPGal als Substrat, als auch eine SDS-PAGE mit nachfolgender Visualisierung durchgeführt. Durch beide Methoden gelang der Nachweis einer Bindung des Enzyms an Phosphatidylserin nicht. Auch war der Nachweis einer Bindung an andere Phospholipide über Membran-Lipid-Streifen (Echelon Biosciences, Salt Lake City, USA) nicht möglich (Daten nicht gezeigt)

Diese Ergebnisse zeigten, dass im Falle einer Interaktion der C-terminalen Domäne von Amuc_1686 mit Phospholipiden wahrscheinlich keine reine Bindefunktion vorlag.

Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt der Einfluss verschiedener Phospholipide auf die enzymatische Aktivität untersucht werden. Dazu wurden Aktivitätstest durch Zugabe von 1 µg Amuc_1686 in einem kombinierten Puffersystem pH 7,5 und 5 mM *p*-NPGal als Substrat unter Standardbedingungen gestartet und die Extinktionsänderung über die Zeit bei 405 nm verfolgt. Nach einer Reaktionszeit von 30 Sekunden wurden unterschiedliche Mengen Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylcholin (PC) oder Phosphatidylethanolamin (PE) zugegeben. Alle Lipide wurden zuvor in Methanol gelöst und ein möglicher Einfluss des Lösungsmittels auf die Enzymaktivität ausgeschlossen. Im Fall von PC und PE hatte eine finale Konzentration von 1 mM im Reaktionsansatz auf 1 µg Amuc_1686 keinen Effekt. PS, PA und PG hingegen zeigten bereits in geringer Konzentration einen starken inhibitorischen Effekt auf das Enzym (Abb. 59). Die berechnete mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}), welche die Inhibitorkonzentration angibt, bei der eine halbmaximale Inhibition von Amuc_1686 zu beobachten war, lag im Fall von PS bei $29,3 \pm 1,5 \mu\text{mol l}^{-1}$, bei PA bei $4,3 \pm 0,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ und bei PG bei $1 \pm 0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$. Diese mittleren inhibitorischen Konzentrationen entsprachen pIC_{50} -Werten von 4,53 (PS), 5,37 (PA) und 6 (PG).

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die C-terminale Region von Amuc_1686, welche die Discoidin-Domäne trägt, für die Phospholipid-induzierte Inhibition des Enzyms verantwortlich war. Dazu wurden mit der verkürzten Protein-Variante Amuc_1686short, der die letzten 107 AS fehlten, die Inhibitionsexperimente unter denselben Bedingungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass Amuc_1686short im Vergleich zu Amuc_1686 nach Zugabe von PS, PG oder PA keine oder eine nur minimal verringerte Aktivität aufwies (Abb. 59). Im direkten Vergleich zu Amuc_1686 wies Amuc_1686short eine generell leicht verringerte spezifische Aktivität auf.

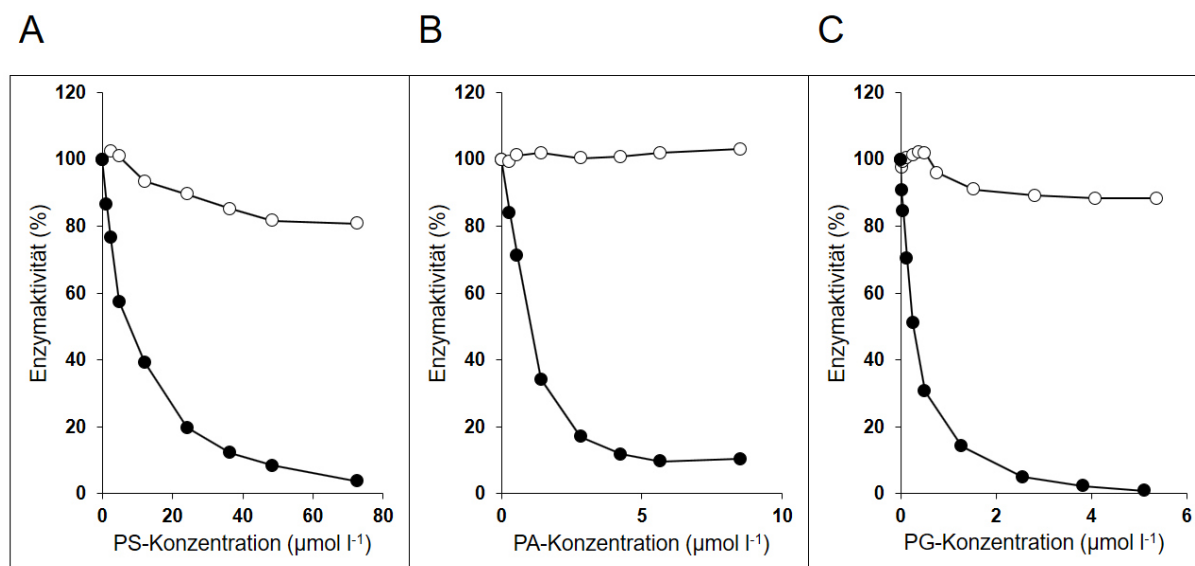


Abbildung 59: Inhibitorischer Effekt verschiedener Phospholipide auf die Aktivität von Amuc₁₆₈₆ und Amuc_{1686short}. Darstellung des Einflusses einer steigenden Konzentration an Phosphatidylserin (A), Phosphatidsäure (B) und Phosphatidylglycerol (C) auf die enzymatische Aktivität von Amuc₁₆₈₆ (○) und Amuc_{1686short} (●).

Zusätzlich wurde überprüft, ob auch die Kopfgruppen der getesteten Phospholipide einen Einfluss auf Amuc₁₆₈₆ haben. Getestet wurden L-Serin, Glycerol, Cholin und Ethanolamin unter denselben Bedingungen mit einer finalen Konzentration im Reaktionsansatz von 3 mmol l⁻¹. Mit keinem dieser Zusätze konnte eine Hemmung nachgewiesen werden.

Für Amuc₁₆₈₆ wurde analog zu Kapitel 3.8.2.3 eine erneute Bestimmung des K_m -Wertes unter Zugabe von 0,25 μmol l⁻¹ PG durchgeführt. Dieser Test diente dazu, die Art der Hemmung zu charakterisieren. Da der K_m -Wert für *p*-NPGal trotz Inhibitorzugabe innerhalb der Standardabweichung des zuvor bestimmten K_m -Wertes von $0,5 \pm 0,5$ mM lag, wurde von einer nicht-kompetitiven Hemmung ausgegangen. Dabei handelte es sich um einen zusätzlichen Hinweis auf eine Interaktion der Phospholipide mit der Discoidin-Domäne und nicht direkt mit dem katalytischen Zentrum.

Ein weiterer Hinweis dafür war die schwächere Inhibierbarkeit von Amuc₁₆₈₆, welches durch das Expressionssystem pBBR1p264-*SPnat-amuc₁₆₈₆* in *E. coli* BL21 (Abschnitt 3.7.1) produziert wurde und somit einen C-terminalen Strep-Tag aufwies. Wahrscheinlich führte die Anwesenheit des Strep-Tags zu einer sterisch negativen Beeinflussung der Interaktion zwischen der C-terminalen Domäne von Amuc₁₆₈₆ und dem Inhibitor (Abb. 60).

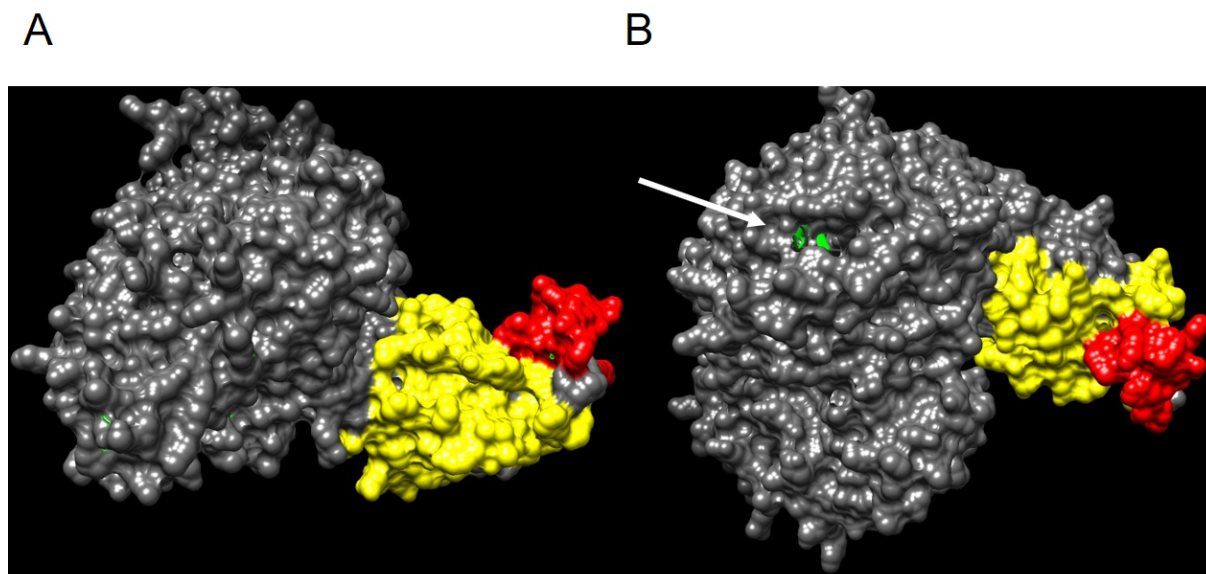


Abbildung 60: Bioinformatisch erstelltes Modell von Amuc_1686, welches mittels pBBR1p264-*SPnat-amuc_1686* produziert und somit C-terminal an einen Strep-Tag fusioniert wurde. **A:** Klar erkennbar ist die möglicherweise störende Wirkung des Strep-Tags (rot) zwischen der Discoidin-Domäne (gelb) und einem Inhibitor. **B:** Dargestellt ist hier Amuc_1686, 90° um die horizontale Achse rotiert. Das wahrscheinliche aktive Zentrum wird durch Aminosäure 177-189 gebildet (grün). Das Modell wurde mittels Phyre2 und UCSF Chimera erstellt (Pettersen *et al.* 2004; Kelley *et al.* 2015).

3.8.3 Charakterisierung der Enzyme Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1666

In Kapitel 3.7 konnte im Rahmen der Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* bereits gezeigt werden, dass es sich bei Amuc_0824 um eine aktive β -Galaktosidase handelte. Jedoch besaß dieses Enzym mit Laktose als Substrat keine hydrolytische Aktivität. Die kinetischen Eigenschaften von Amuc_0824 wurden bisher nur unter den für *G. oxydans* physiologischen Bedingungen untersucht (Abschnitt 3.7.3), sodass im vorliegenden Abschnitt der Arbeit eine genaue Charakterisierung von Amuc_0824 erfolgte. Zusätzlich wurde das Protein Amuc_0771, dessen heterologe Produktion mit *G. oxydans* nicht gelang (Abschnitt 3.7.3), nun für eine genaue Untersuchung heterolog in *E. coli* produziert. Das dritte *A. muciniphila*-stämmige Enzym, welches in diesem Kapitel untersucht wurde, war Amuc_1666. Dabei handelte es sich um eine vierte bioinformatisch identifizierte, putative β -Galaktosidase.

3.8.3.1 Bioinformatische Analyse der Enzyme

Die putativen β -Galaktosidasen Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1666 bestehen aus 643 AS, 1264 AS und 128 AS, von denen jeweils die ersten 24 AS, 21 AS und 17 AS eine Sec-abhängige Signalsequenz darstellen. Im Fall von Amuc_0771 konnte mithilfe des Programms TMHMM 2.0 (Krogh *et al.* 2001) gezeigt werden, dass die N-terminale Signalsequenz, analog zu zu BoGH2A (Larsbrink *et al.* 2014), vermutlich als Membranhelix in der Cytoplasmamembran verbleibt und dort das reife Protein verankert.

Von allen drei Enzymen wurden NCBI BLASTp-Analysen unter Verwendung der NR- sowie SwissProt-Datenbank durchgeführt. In allen drei Fällen wurde deutlich, dass diese Proteine außerhalb der Gattung *Akkermansia* keine starken Homologien zu anderen Proteinen aufwiesen. Im Fall von Amuc_0771 besaßen die ersten fünf putativen, automatisch annotierten Proteine innerhalb der NR-Datenbank eine Identität zwischen 47 - 52 % bei einer Sequenzübereinstimmung von 88 – 95 % (Tab. 16) und innerhalb der SwissProt-Datenbank eine Identität zwischen 34,1 % und 38,4 % (Tab. 17). Alle zu Amuc_0771 homologen, jedoch nicht charakterisierten putativen Proteine der NR-Datenbank wurden innerhalb der Bacteroidetes identifiziert. Das ähnlichste bekannte Protein nach der Analyse mittels SwissProt-Datenbank war, wie auch im Fall von Amuc_1686, Bga aus *Xanthomonas manihotis* (Taron *et al.* 1995). Die Sequenzübereinstimmung war hier jedoch deutlich geringer als im Fall von Amuc_1686 (Abschnitt 3.8.2.1). Bei allen weiteren bekannten homologen Enzymen handelte es sich um Proteine eukaryotischen Ursprungs. Im Fall von Amuc_0824 und Amuc_1666 stammten ebenfalls alle ähnlichen Proteine innerhalb der NR-Datenbank aus der Abteilung der Bacteroidetes. Die Identitäten lagen zwischen 44 – 45 % bei einer Sequenzübereinstimmung von 97 – 99 % (Amuc_0824) sowie einer Identität von 35 – 37 % bei einer Sequenzübereinstimmung von 97 – 100 % (Amuc_1666, Tab. 16). BLASTp-Analysen beider Proteine unter Verwendung der SwissProt-Datenbank zeigten, dass sowohl Amuc_0824 als auch Amuc_1666 die größte Übereinstimmung mit der thermostabilen β -Galaktosidase LacZ aus *Thermotoga maritima* besaßen (Moore *et al.* 1994; Kim *et al.* 2004). Die Identität war jedoch auch hier gering und lag unter 40 % (Tab. 17).

Tabelle 16: BLASTp-Analyse von Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1666 unter Verwendung der NR-Datenbank. Dargestellt sind jeweils die fünf putativen, automatisch annotierten Proteine mit der höchsten Übereinstimmung.

| Organismus | Annotation | Identität (%) | Abdeckung der Sequenz (%) | Zugangsnummer |
|--|------------------------|---------------|---------------------------|----------------|
| Amuc_0771 | | | | |
| <i>Akkermansia muciniphila</i> | β -Galaktosidase | 100 | 100 | ACD04606.1 |
| <i>Bacteroides spp.</i> | β -Galaktosidase | 52 | 88 | OFY02273.1 |
| <i>Chitinophaga filiformis</i> | β -Galaktosidase | 50 | 89 | SDG95166.1 |
| <i>Chitinophaga terrae</i> | β -Galaktosidase | 48 | 95 | SEA16929 |
| <i>Chitinophaga arvensicola</i> | β -Galaktosidase | 47 | 95 | SEW41486.1 |
| Amuc_0824 | | | | |
| <i>Akkermansia muciniphila</i> | GH-Familie 2 | 100 | 100 | ACD04657.1 |
| <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> | β -Galaktosidase | 45 | 97 | WP 014790413.1 |
| <i>Parabacteroides goldsteinii</i> | β -Galaktosidase | 44 | 99 | WP 009860027.1 |
| <i>Bacteroides fluxus</i> | β -Galaktosidase | 44 | 99 | WP 009125768.1 |
| <i>Bacteroides johnsonii</i> | β -Galaktosidase | 44 | 99 | WP 039848172.1 |

3 Ergebnisse

| Amuc_1666 | | | | |
|--|------------------------|-----|-----|----------------|
| <i>Akkermansia muciniphila</i> | GH-Familie 2 | 100 | 100 | WP 012420699.1 |
| <i>Bacteroides fingoldii</i> | β -Galaktosidase | 37 | 98 | WP 055278534.1 |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | β -Galaktosidase | 37 | 98 | WP 035447501.1 |
| <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> | β -Galaktosidase | 35 | 97 | WP 014790413.1 |
| <i>Bacteroides helcogenes</i> | β -Galaktosidase | 37 | 100 | WP 013546422.1 |

Tabelle 17: BLASTp-Analyse von Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1666 unter Verwendung der SwissProt-Datenbank. Dargestellt sind jeweils die fünf charakterisierten Proteine mit der höchsten Übereinstimmung.

| Hit | Organismus | Annotation | Identität (%) | Zugangsnummer |
|------------------|-----------------------------------|--|---------------|---------------|
| Amuc_0771 | | | | |
| 1 | <i>Xanthomonas manihotis</i> | β -Galaktosidase | 38,4 | P48982 |
| 2 | <i>Homo sapiens</i> | β -Galaktosidase-1-ähnliches Protein 3 | 34,1 | Q8NCI6 |
| 3 | <i>Mus musculus</i> | Isoform 2 des β -Galaktosidase-1-ähnlichen Protein 2 | 36,4 | Q3UPY5-2 |
| 4 | <i>Mus musculus</i> | β -Galaktosidase-1-ähnliches Protein 2 | 36,7 | Q3UPY5 |
| 5 | <i>Homo sapiens</i> | β -Galaktosidase-1-ähnliches Protein 2 | 35,4 | Q8IW92 |
| Amuc_0824 | | | | |
| 1 | <i>Thermotoga maritima</i> | β -Galaktosidase | 38,1 | Q56307 |
| 2 | <i>Bacillus megaterium</i> | β -Galaktosidase | 36,2 | O52847 |
| 3 | <i>Bacillus halodurans</i> | β -Galaktosidase | 32,9 | Q9K9C6 |
| 4 | <i>Vibrio cholerae</i> | β -Galaktosidase | 34,8 | A5F5U6 |
| 5 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | β -Galaktosidase | 32,6 | P23989 |
| Amuc_1666 | | | | |
| 1 | <i>Thermotoga maritima</i> | β -Galaktosidase | 35,6 | Q56307 |
| 2 | <i>Bacillus megaterium</i> | β -Galaktosidase | 35,3 | O52847 |
| 3 | <i>Shigella dysenteriae</i> | β -Galaktosidase | 32,9 | Q32JB6 |
| 4 | <i>Escherichia coli</i> | β -Galaktosidase | 32,7 | Q8X685 |
| 5 | <i>Shigella sonnei</i> | β -Galaktosidase | 32,2 | Q3Z583 |

Die Ergebnisse der BLASTp-Analysen zeigten sowohl für Amuc_1686 und Amuc_0771 als auch Amuc_0824 und Amuc_1666 auf Sequenzebene Ähnlichkeiten, sodass im Folgenden ein Sequenz-BLAST des einen Proteins gegen das jeweils andere durchgeführt wurde. Dabei zeigte sich, dass die Identität zwischen Amuc_0771 und Amuc_1686 unter 40 % und einer Sequenzübereinstimmung von 89 % lag. Auch fehlte im Fall von Amuc_0771 der charakteristische, C-terminale Discoidin-Domäne-tragende Bereich (Abb. 61). Die Übereinstimmung von Amuc_0824 und Amuc_1666 lag ebenfalls bei einem niedrigen Wert von 35 % bei einer Sequenzabdeckung von 99 %.

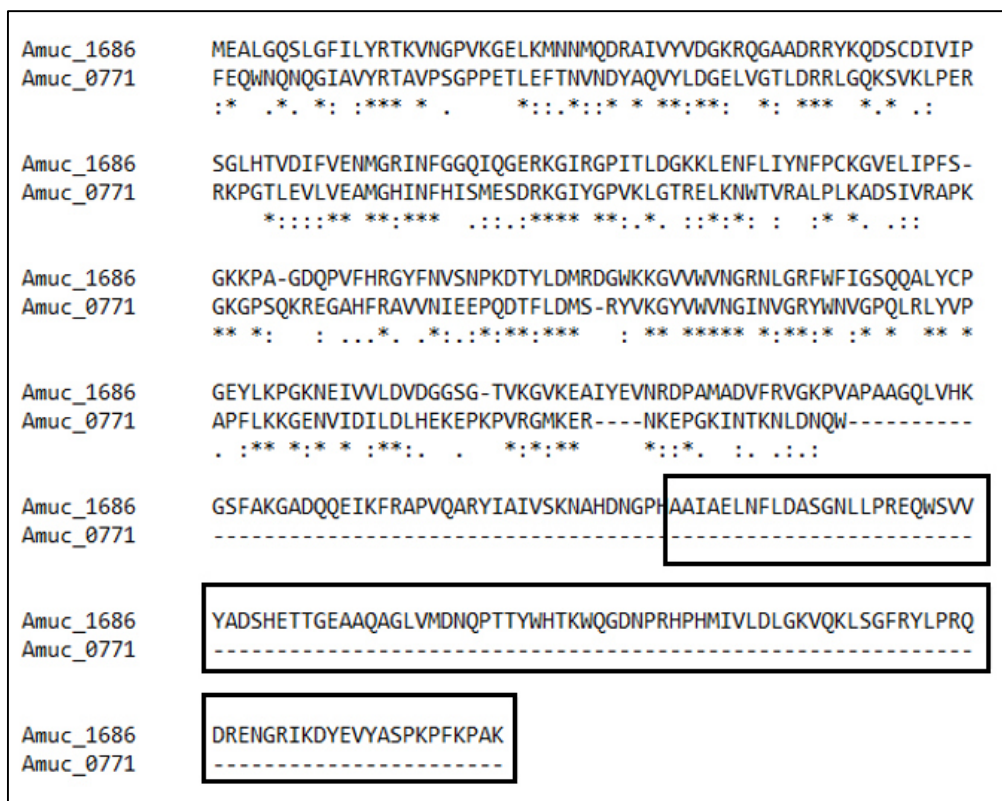


Abbildung 61: Alignment der Aminosäuresequenz von Amuc_0771 und Amuc_1686. Deutlich erkennbar ist der zusätzliche C-terminale Bereich im Fall von Amuc_1686, welcher nach bioinformatischer Analyse eine Discoidin-Domäne beinhaltet (schwarzer Rahmen) und bei Amuc_0771 fehlt.

3.8.3.2 Klonierungsstrategie für die Produktion von Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1666 sowie Visualisierung der Proteine

Für die heterologe Produktion von Amuc_0824 wurde das zuvor erstellte Expressionssystem pBBR1p264-*SPnat-amuc0824* verwendet, dessen Funktionalität bereits in Abschnitt 3.7 gezeigt werden konnte. Für die Produktion von Amuc_0771 und Amuc_1666 diente der für die Produktion von Amuc_1686 verwendete Ausgangsvektor pASK-IBA5, welcher die N-terminale Fusion eines Strep-Tags ermöglichte. Da für beide Proteine bioinformatisch ein Signalpeptid identifiziert wurde, sollten bei der Amplifizierung der entsprechenden Gene die Signalsequenzen entfernt werden. Die verwendeten Oligonukleotide waren A0771NoSPpask5.f/ A0771NoSPpask5.r und A1666NoSPpask5.f/

pASK_NatSP1666, über die die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *EcoRI* hinzugefügt wurden. Die erwarteten Fragmente besaßen eine Größe von 1881 bp (*NoSP-amuc_0771*) und 3840 bp (*NoSP-amuc_1666*) und entsprachen den erhaltenen Fragmentgrößen.

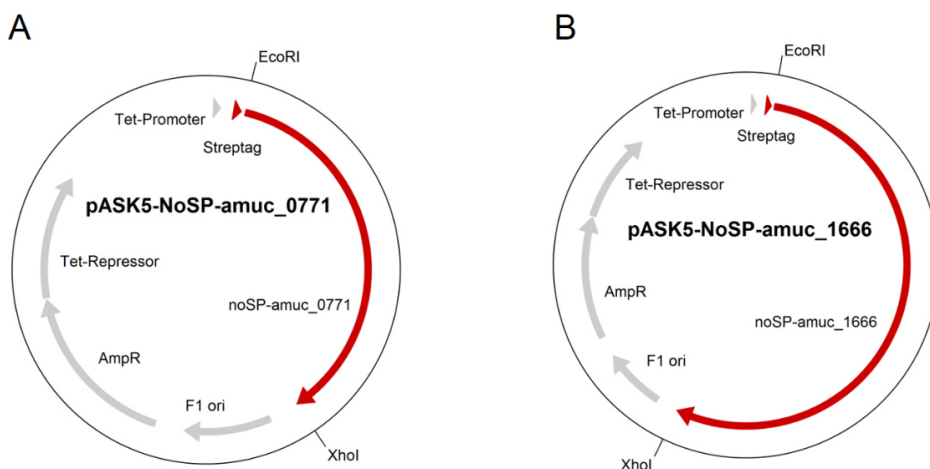


Abbildung 62: Die Vektoren pASK5-NoSP-amuc0771 (A) und pASK5-NoSP-amuc1666 (B). AmpR: Ampicillinresistenzkassette; F1 ori: Replikationsursprung.

Über die angefügten Schnittstellen war nach Restriktionsverdau eine Ligation in den Vektor pASK-IBA5 möglich. Die resultierenden Expressionssysteme *pASK5-NoSP-amuc0771* und *pASK5-NoSP-amuc1666* (Abb. 62) konnten anschließend im Klonierungsstamm *E. coli* DH5 α vervielfältigt und für die Proteinexpression in den Produktionsstamm *E. coli* BL21 eingebracht werden. Die Produktion erfolgte wie in Abschnitt 3.8.2.2 beschrieben. Alle aufgereinigten Proteine Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1666 wurden mittels SDS-PAGE und Silberfärbung visualisiert (Abb. 63). Die erwarteten Proteingrößen lagen bei 72 kDa für Amuc_0772, 143,8 kDa für Amuc_0824 und 144 kDa für Amuc_1666 und entsprachen den Größen der visualisierten heterolog produzierten Proteine.

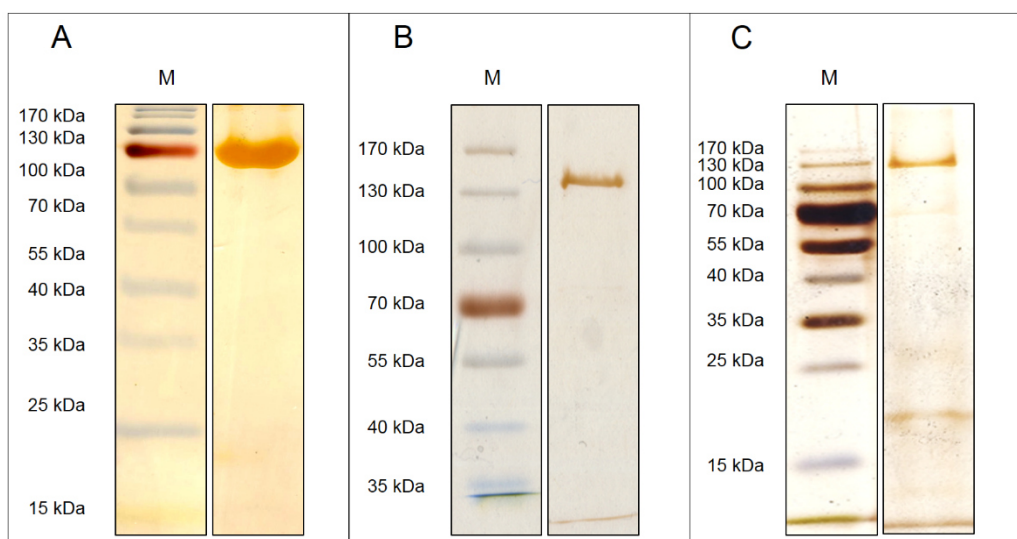


Abbildung 63: Visualisierung von Amuc_0771 (A), Amuc_0824 (B) und Amuc_1666 (C) mittels Silberfärbung. Das erwartete Molekulargewicht betrug mit Strep-Tag 72 kDa für Amuc_0771, 143,8 kDa für Amuc_0824 und 144 kDa für Amuc_1666. M = Marker.

Gelfiltrationsanalysen wurden durchgeführt, um einen Hinweis auf die nativ vorliegende Quartärstruktur dieser Enzyme zu erhalten. Die Analyse ergab für Amuc_0771 und Amuc_1666 eine monomere Struktur, während Amuc_0824 als Dimer vorlag (Daten nicht gezeigt).

3.8.3.3 Charakterisierung der kinetischen Parameter von Amuc_0771

Der erste Schritt für die Bestimmung der kinetischen Parameter von Amuc_0771 war die Analyse des optimalen Temperatur- und pH-Bereichs dieses Enzyms. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde Amuc_0771 mit 5 mM *p*-NPGal als Substrat in einen Reaktionsansatz eingesetzt. Die Temperatur lag dabei konstant bei 30 °C und der pH-Wert des eingesetzten kombinierten Puffersystems wurde in einem Bereich zwischen pH 5 und pH 10 variiert. Für die Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde bei konstantem pH-Wert des Puffers die Reaktionstemperatur zwischen 20 °C und 80 °C variiert. Es zeigte sich, dass der optimale pH-Bereich von Amuc_0771 zwischen 7,5 und 7,75 lag und die optimale Temperatur bei 60 °C (Abb. 64).

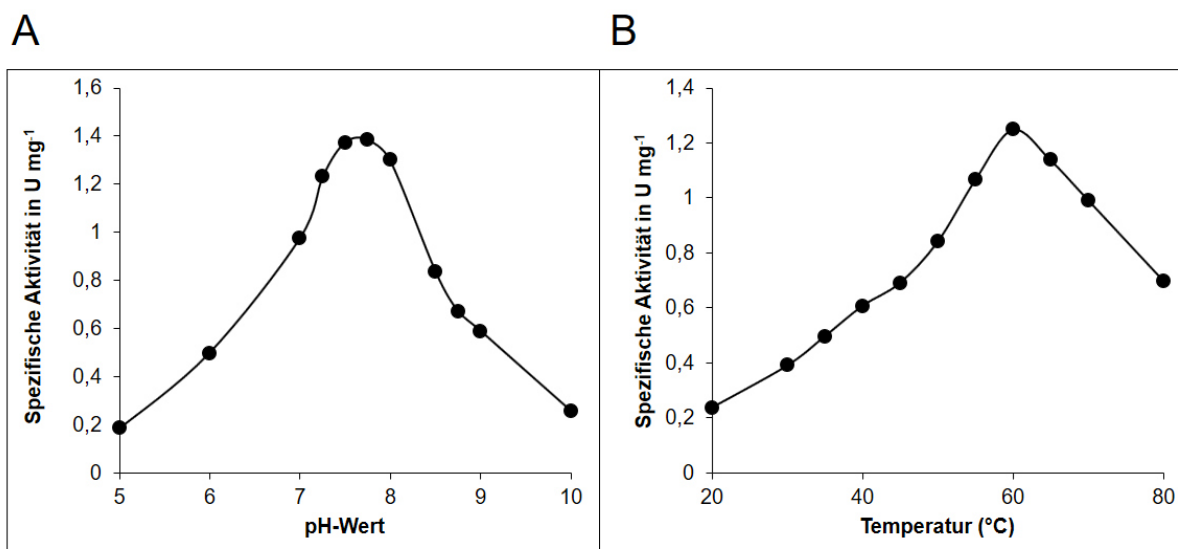


Abbildung 64: Optimaler pH-Bereich (A) und Temperaturoptimum (B) von Amuc_0771. Für diese Reaktionsansätze wurde ein kombiniertes Puffersystem verwendet (Schweiger und Deppenmeier 2010) und als Substrat diente 5 mM *p*-NPGal.

Anschließend wurde eine Analyse des Substratspektrums von Amuc_0771 durchgeführt. Dazu wurden, wie bei Amuc_1686, sowohl chromogene artifizielle Substrate (Tab. 18) als auch natürliche Zuckerverbindungen eingesetzt (Tab. 19).

Tabelle 18: Aktivität (U mg⁻¹) von Amuc_0771 mit verschiedenen artifiziellen Substraten. Es wurde ein 50 mM Kombinationspuffer pH 7,5 (Schweiger und Deppenmeier 2010) verwendet sowie eine Substratkonzentration von 5 mM. Der Reaktionstemperatur betrug 60 °C.

| Substrat | Aktivität (U min ⁻¹) |
|--|----------------------------------|
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-Glukopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-α-D-Glukopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-Glukuronid | < 0,1 |
| <i>o</i> -Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid | 7 ± 1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid | 16 ± 6 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-Xylopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Galaktosaminid | 0,4 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glukosaminid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-L-Fucopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-α-L-Fucopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-α-D-Arabinopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-α-D-Galaktopyranosid | < 0,1 |
| GalNac-β- <i>p</i> -Nitrophenol (O-glykosidisch verknüpft) | < 0,1 |

Innerhalb der chromogenen Substrate wurde die höchste Enzymaktivität von Amuc_0771 mit *p*-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (*p*-NPGal) gemessen. Der V_{max} -Wert lag bei $16 \pm 6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ und der K_m -Wert bei $2 \pm 0,5$ (Abb. 65). Dies entspricht einer Wechselzahl K_{cat} von $19,2 \pm 10,2 \text{ s}^{-1}$ und somit einer katalytischen Effizienz $K_{cat} K_m^{-1}$ von Amuc_0771 von $9,6 \pm 5 \text{ s}^{-1} \text{mM}^{-1}$. Für das ortho-verknüpfte Substrat *o*-NPGal wurde unter den gleichen Bedingungen ein K_m -Wert von 0,6 mM bei einer maximalen spezifischen Aktivität von $7 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bestimmt. Dies entspricht einem K_{cat} -Wert von $8,4 \pm 1,7 \text{ s}^{-1}$ und somit einer katalytischen Effizienz von $14 \pm 2,8 \text{ s}^{-1} \text{mM}^{-1}$.

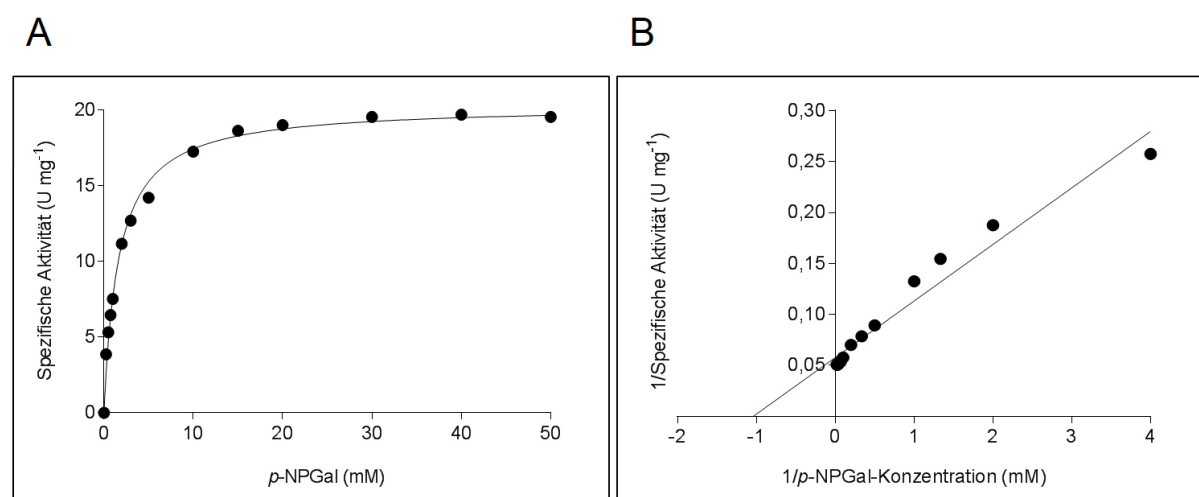


Abbildung 65: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von Amuc_0771 von der Konzentration des Substrats *p*-NPGal, dargestellt als Michaelis-Menten-Kinetik (A) und Lineweaver-Burk-Diagramm (B). Die spezifische Aktivität betrug für dieses Enzym $16 \pm 6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bei einem K_m -Wert von $2 \pm 0,5$ mM. Die nicht-lineare Regression der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad

Prism 7 und ist hier beispielhaft für eine Enzympräparation gezeigt. Die Messung wurde bei pH 7 und 60 °C durchgeführt.

Zusätzlich wurde eine mögliche Aktivität von Amuc_0771 mit verschiedenen natürlichen Zuckerverbindungen getestet (Tab.19). Nach einer Inkubationszeit von 12 h konnte mittels HPLC eine Hydrolyse von etwa 65 % der Disaccharide LacNac und Galakto-N-Biose nachgewiesen werden. Mit Laktose als Substrat konnte eine minimale hydrolytische Aktivität von etwa 2 % gezeigt werden.

Tabelle 19: Hydrolyse verschiedener natürlicher Saccharide durch Amuc_0771. Es wurde ein 50 mM Kombinationspuffer pH 7,5 (Schweiger und Deppenmeier 2010) sowie 5 mM Substrat eingesetzt. Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C und die eingesetzte Enzymmenge 1 µg.

| Substrat | Spaltung |
|--|----------|
| Saccharose (Glukose- α , β -1,2-Fruktose) | Nein |
| Trehalose (Glukose- α , α -1,1-Glukose) | Nein |
| Melibiose (Galaktose- α -1,6-Glukose) | Nein |
| Xylobiose (Xylose- β -1,4-Xylose) | Nein |
| Maltose (Glukose- α -1,4-Glukose) | Nein |
| Laktose (Galaktose- β -1,4-Glukose) | (Ja) |
| LacNac (Galaktose- β -1,4-N-Acetyl-D-Glukosamin) | Ja |
| Galakto-N-Biose (Galaktose- β -1,3-N-Acetyl-D-Galaktosamin) | Ja |
| Raffinose (Galaktose- α -1,6-Glukose- β -1,2-Fruktose) | Nein |
| 2`Fukosyllaktose (Fukose- α -1,2-Galaktose- β -1,4-Glukose) | Nein |
| N-Acetyl-D-Galaktosamin - β -1,4-Galaktose | Nein |

3.8.3.4 Charakterisierung der kinetischen Parameter von Amuc_1666

Analog zu vorangegangenen Analysen wurde das Temperatur- und pH-Optimum von Amuc_1666 bestimmt (Abb. 66). Dabei zeigte sich, dass der optimale pH-Wert dieses Enzyms im Bereich von pH 8 lag. Das Temperatur-Optimum befand sich, wie auch im Fall von Amuc_1686 und Amuc_0771, bei einem für thermophile Organismen charakteristischen Wert von etwa 60 °C.

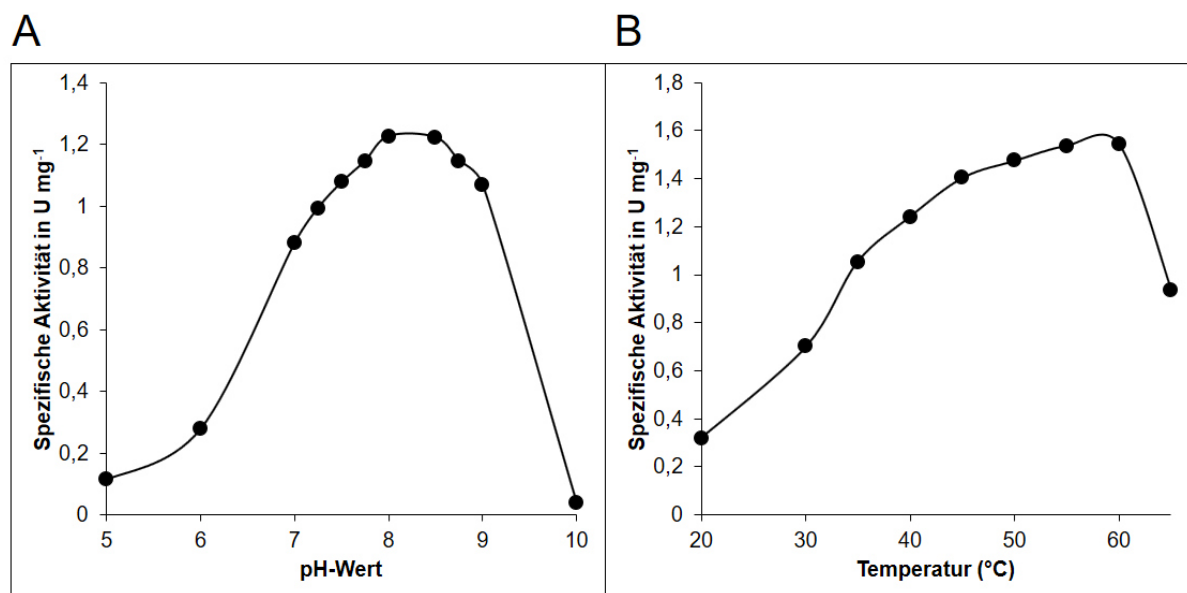


Abbildung 66: Optimaler pH-Bereich (A) und Temperatur-Optimum (B) von Amuc_1666. Als Puffersystem wurde ein kombinierter Puffer verwendet (Schweiger und Deppenmeier 2010) und als Substrat diente *p*-NPGal in einer Konzentration von 5 mM.

Anschließend wurde für das chromogene Substrat *p*-NPGal bei 60 °C und einem pH-Wert von 8 sowohl der K_m -Wert als auch der V_{max} -Wert von Amuc_1666 bestimmt (Abb. 67). Anders als bei Amuc_1686 und Amuc_0771 zeigte Amuc_1666 eine deutliche Steigerung der Aktivität durch Zugabe von Mg^{2+} , sodass der Reaktionsansatz zusätzlich 10 mM $MgCl_2$ enthielt. Der V_{max} -Wert lag hier bei $11,5 \pm 1,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ und der K_m -Wert bei $1,2 \pm 0,83 \text{ mM}$ ($K_{cat} = 27,6 \pm 5,1 \text{ s}^{-1}$; $K_{cat} K_m^{-1} = 23,6 \pm 4,2 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$).

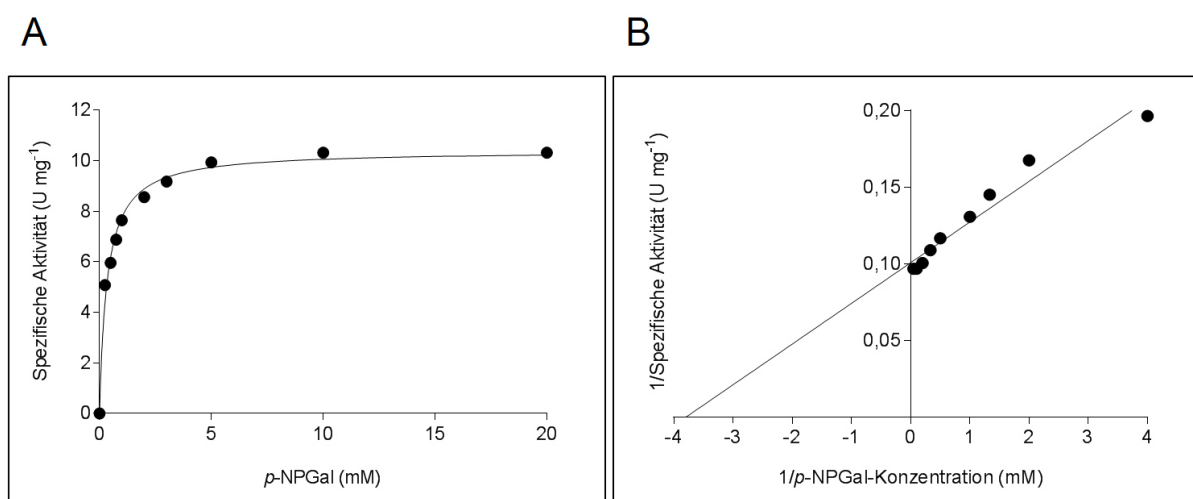


Abbildung 67: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von Amuc_1666 von der Konzentration des Substrats *p*-NPGal, dargestellt als Michaelis-Menten-Kinetik (A) und Lineweaver-Burk-Diagramm (B). Die Reaktion erfolgte bei 60 °C und in einem kombinierten Puffersystem bei pH 8. Zusätzlich enthielt der Reaktionsansatz 10 mM $MgCl_2$. Die spezifische Aktivität betrug für dieses Enzym $11,5 \pm 1,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bei einem K_m -Wert von $1,2 \pm 0,83 \text{ mM}$. Die nicht-lineare Regression der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 7 und ist hier beispielhaft für eine Enzympräparation gezeigt.

Das Substratspektrum von Amuc_1666 bezüglich artifizierlicher und natürlicher Substrate wurde analysiert (Tab. 20 und Tab. 21). Innerhalb der chromogenen Substraten konnten nur im Fall von *p*-NPGal und, in geringerem Maße, für *o*-NPGal eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

Tabelle 20: Aktivität (U mg⁻¹) von Amuc_1666 mit verschiedenen artifizierlichen Substraten. Es wurde ein 50 mM Kombinationspuffer pH 8 (Schweiger und Deppenmeier 2010) eingesetzt sowie eine Substratkonzentration von 5 mM. Der Reaktionstemperatur betrug 60 °C. Zusätzlich wurden 10 mM MgCl₂ als kationischer Kofaktor zum Reaktionsansatz hinzugefügt.

| Substrat | Aktivität (U min ⁻¹) |
|--|----------------------------------|
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-Glukopyranosid | 0 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-α-D-Glukopyranosid | 0 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-Glukuronid | 0 |
| <i>o</i> -Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid | 6 ± 2 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid | 11,5 ± 1,5 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-Xylopyranosid | 0 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Galaktosaminid | 0 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glukosaminid | 0 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-β-L-Fucopyranosid | 0 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-α-L-Fucopyranosid | 0 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-α-D-Arabinopyranosid | 0 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-α-D-Galaktopyranosid | 0 |
| GalNac-β- <i>p</i> -Nitrophenol (O-glykosidisch verknüpft) | 0 |

Im Fall der natürlichen Verbindungen konnte gezeigt werden, dass innerhalb von 12 h etwa 37 % der eingesetzten Laktose und 98 % von LacNac, einem Disaccharid bestehend aus den beiden Zuckern Galaktose und N-Acetyl-D-Glukosamin, hydrolysiert worden sind (Tab. 21, Abb. 68)

Tabelle 21: Hydrolyse natürlicher Saccharide durch Amuc_1666. Es wurde ein 50 mM Kombinationspuffer pH 8 (Schweiger und Deppenmeier 2010) sowie eine Substratkonzentration von 5 mM eingesetzt. Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C und die eingesetzte Enzymmenge 1 µg, zusätzlich enthielt der Reaktionsansatz 10 mM MgCl₂.

| Substrat | Spaltung |
|---|----------|
| Saccharose (Glukose- α, β -1,2-Fruktose) | Nein |
| Trehalose (Glukose- α, α -1,1-Glukose) | Nein |
| Melibiose (Galaktose- α-1,6-Glukose) | Nein |
| Xylobiose (Xylose- β-1,4-Xylose) | Nein |
| Maltose (Glukose- α-1,4-Glukose) | Nein |
| Laktose (Galaktose-β-1,4-Glukose) | Ja |
| LacNac (Galaktose-β-1,4-N-Acetyl-D-Glukosamin) | Ja |
| Galakto-N-Biose (Galaktose-β-1,3-N-Acetyl-D-Galaktosamin) | Nein |

| | |
|--|------|
| Raffinose (Galaktose- α -1,6-Glukose- β -1,2-Fruktose) | Nein |
| 2'Fukosyllaktose (Fukose- α -1,2-Galaktose- β -1,4-Glukose) | Nein |
| N-Acetyl-D-Galaktosamin- β -1,4-Galaktose | Nein |

Durch eine Analyse mittels HPLC konnte bestätigt werden, dass in Anwesenheit von Amuc_1666 LacNac hydrolysiert wurde und dabei das Produkt N-Acetyl-D-Glukosamin entstand (Abb. 69). Galaktose, welches bei der Hydrolyse von LacNac als zweites Produkt gebildet wurde, ließ sich mittels UV-Detektor bei 220 nm nicht detektieren, konnte jedoch mittels RI-Detektor nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die geringe Menge an N-Acetyl-D-Glukosamin, welche nach einer Inkubation für 12 h ohne Enzym nachgewiesen werden konnte, resultierte aus einer Verunreinigung des eingesetzten Substrats mit diesem Zucker.

Mit allen anderen natürlichen getesteten Substraten konnte keine hydrolytische Aktivität von Amuc_1666 bei einer für *A. muciniphila* physiologischen Temperatur gezeigt werden.

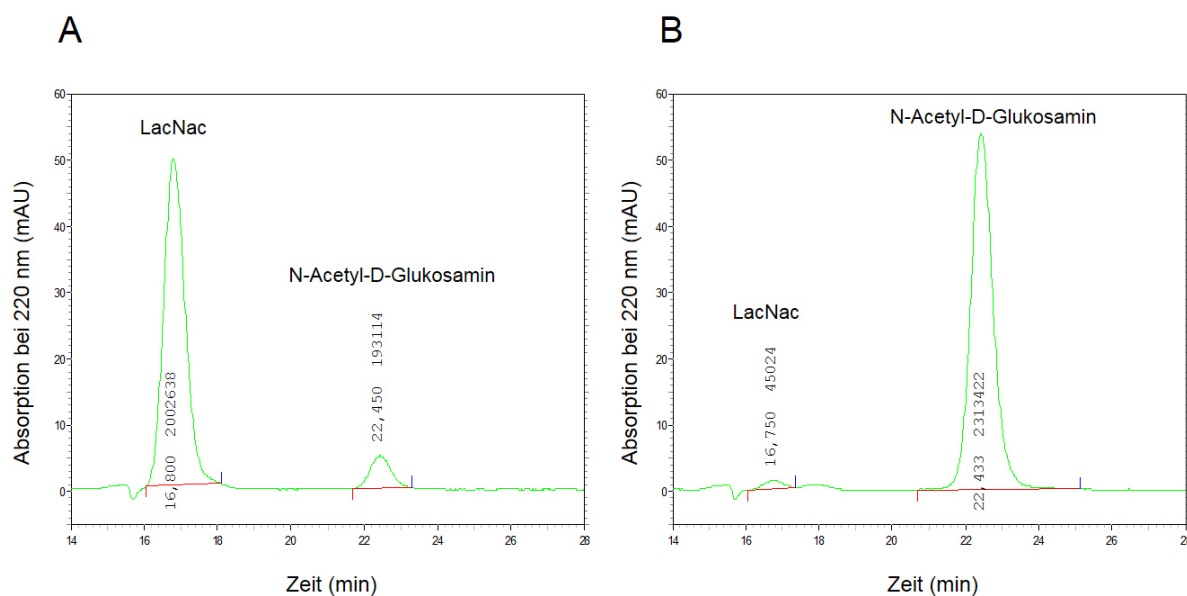


Abbildung 68: Nachweis der hydrolytischen Aktivität von Amuc_1666 mit LacNac als Substrat. (A): HPLC-Spektrum des Reaktionsansatzes nach 12 h Inkubationszeit ohne Enzym. **(B):** HPLC-Spektrum des Reaktionsansatzes nach 12 h Inkubation mit 1 µg Amuc_1666. Als Reaktionsbedingungen wurde ein pH-Wert von 7,5 und eine Temperatur von 37 °C eingestellt. LacNac wurde in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt und die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei 220 nm.

3.8.3.5 Charakterisierung der kinetischen Parameter von Amuc_0824

Die kinetischen Parameter von Amuc_0824, dem vierten bisher nicht charakterisierten Enzym, wurden ebenfalls analysiert. Dabei zeigte sich, dass dieses Enzym mit einem Temperatur-Optimum von 40 °C das einzige Protein mit einem mesophilen Temperatur-Optimum innerhalb der vier untersuchten β -Galaktosidasen darstellte (Abb. 69). Der optimale pH-Wert lag in einem leicht alkalischen Bereich bei 7,75.

Wie auch im Fall von Amuc_1666 resultierte die Zugabe von Mg^{2+} in einer Erhöhung der spezifischen Aktivität von Amuc_0824, sodass Mg^{2+} als Kofaktor in allen Reaktionsansätzen in einer Konzentration von 10 mM hinzugefügt wurde. Die Analyse des Substratspektrums bezogen auf artifizielle Substrate (Tab. 22) zeigte, dass Amuc_0824 als einzige der vier β -Galaktosidasen eine Präferenz von *o*-NPGal gegenüber *p*-NPGal besaß.

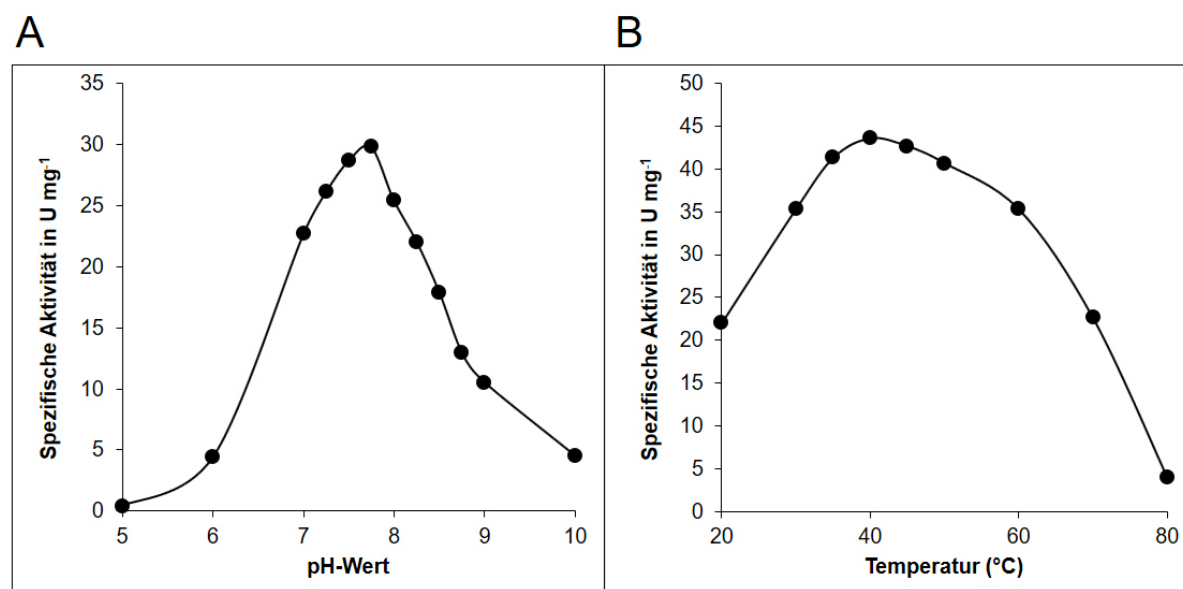


Abbildung 69: Optimaler pH-Bereich (A) und Temperatur-Optimum (B) von Amuc_0824. Als Puffersystem wurde ein kombinierter Puffer verwendet (Schweiger und Deppenmeier 2010) und als Substrat diente *p*-NPGal mit einer Konzentration von 5 mM.

Tabelle 22: Aktivität (U mg⁻¹) von Amuc_0824 mit verschiedenen chromogenen Substraten. Es wurde ein 50 mM Kombinationspuffer pH 7,75 verwendet sowie eine Substratkonzentration von 5 mM. Der Reaktionstemperatur betrug 40 °C. Zusätzlich wurden 10 mM $MgCl_2$ als kationischer Kofaktor eingesetzt.

| Substrat | Aktivität (U min ⁻¹) |
|--|----------------------------------|
| <i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-Glukopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-Glukopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-Glukuronid | < 0,1 |
| <i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid | 44,7 \pm 6,5 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid | 2 \pm 0,5 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-Xylopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Galaktosaminid | 0,4 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glukosaminid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl- β -L-Fucopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl- α -L-Fucopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-Arabinopyranosid | < 0,1 |
| <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-Galaktopyranosid | 0,3 |
| GalNac- β - <i>p</i> -Nitrophenol (O-glykosidisch verknüpft) | < 0,1 |

Im Fall von *o*-NPGal wurde für Amuc_0824 ein V_{\max} -Wert von $44,7 \pm 6,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bei einem K_m -Wert von $1 \pm 0,3 \text{ mM}$ ermittelt (Abb. 70). Dies entsprach einem K_{cat} -Wert von $107 \pm 22 \text{ s}^{-1}$ und somit einer katalytischen Effizienz $K_{\text{cat}} K_m^{-1}$ von ebenfalls $107 \pm 22 \text{ s}^{-1} \text{mM}^{-1}$. Die Aktivität mit *p*-NPGal als Substrat war etwa um den Faktor 22 geringer.

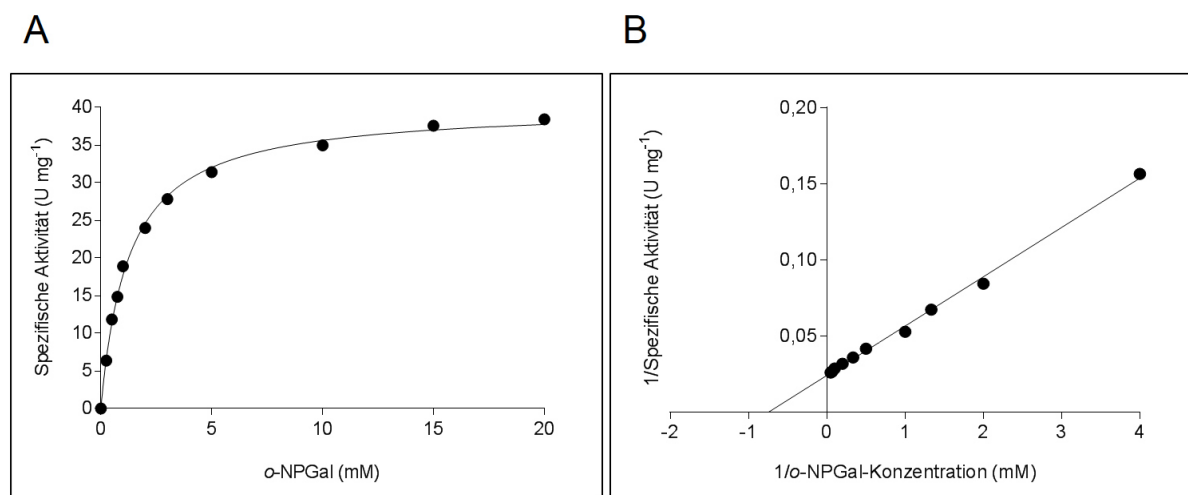


Abbildung 70: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von Amuc_0824 von der Konzentration des Substrats *o*-NPGal, dargestellt als Michaelis-Menten-Kinetik (A) und Lineweaver-Burk-Diagramm (B). Die Reaktion erfolgte bei 40 °C und in einem kombinierten Puffersystem bei pH 7,75. Zusätzlich enthielt der Reaktionsansatz 10 mM MgCl₂. Die spezifische Aktivität betrug für dieses Enzym $44,7 \pm 6,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bei einem K_m -Wert von $1 \pm 0,3 \text{ mM}$. Die nicht-lineare Regression der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 7 und ist hier beispielhaft für eine Enzympräparation gezeigt.

Im Fall der natürlichen Substrate konnte eine Spaltung von 20 % des Disaccharids Galaktose- β -1,3-N-Acetyl-D-Galaktosamin nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C nachgewiesen werden, alle anderen Substrate wurden nicht hydrolysiert (Tab. 23).

Tabelle 23: Hydrolyse verschiedener Saccharide durch Amuc_0824. Es wurde ein 50 mM Kombinationspuffer pH 7,75 verwendet sowie eine Substratkonzentration von 5 mM. Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C und die eingesetzte Enzymmenge 1 μg , zusätzlich wurden 10 mM MgCl₂ eingesetzt.

| Substrat | Spaltung |
|---|----------|
| Saccharose (Glukose- α , β -1,2-Fruktose) | Nein |
| Trehalose (Glukose- α , α -1,1-Glukose) | Nein |
| Melibiose (Galaktose- α -1,6-Glukose) | Nein |
| Xylobiose (Xylose- β -1,4-Xylose) | Nein |
| Maltose (Glukose- α -1,4-Glukose) | Nein |
| Laktose (Galaktose- β -1,4-Glukose) | Nein |
| LacNac (Galaktose- β -1,4-N-Acetyl-D-Glukosamin) | Nein |
| Galakto-N-Biose (Galaktose- β -1,3-N-Acetyl-D-Galaktosamin) | Ja |
| Raffinose (Galaktose- α -1,6-Glukose- β -1,2-Fruktose) | Nein |

4 Diskussion

G. oxydans ist ein Organismus von äußerst vielfältiger biotechnologischer und industrieller Bedeutung. Aufgrund seiner ungewöhnlichen physiologischen Fähigkeit zur unvollständigen periplasmatischen Oxidation wird er weltweit für die Produktion wichtiger Feinchemikalien und Pharmazeutika eingesetzt. Aus diesem Grund unterliegt der Organismus stetigen Stammoptimierungen, die sowohl auf die Verbesserung bestehender biokatalytischer Verfahren als auch den Biomassezuwachs und die Charakterisierung neuartiger stereospezifischer Reaktionen zur Produktion neuer Verbindungen abzielen (Schweiger *et al.* 2010; Meyer *et al.* 2013; Kiefler *et al.* 2015; Mientus *et al.* 2017).

Ein für *G. oxydans* bisher weitgehend unerschlossenes Feld ist die Erweiterung der Substratnutzung. Der Organismus ist zwar dazu befähigt, eine Vielzahl von Monosacchariden und Zuckeralkoholen als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können, jedoch fehlt ihm diese Eigenschaft in Bezug auf Di-, Oligo- und Polysaccharide aufgrund von nicht vorhandenen Importsystemen sowie fehlender enzymatischer Ausstattung. Aus industrieller Sicht stellen diese Substanzen jedoch oftmals kostengünstige und nachhaltige Substrate dar, deren Einsatz als Ausgangsstoffe für biokatalysierte Stoffumwandlungen durch *G. oxydans* äußerst wünschenswert wären. So ist bisher beispielsweise für die Produktion von Miglitol durch *G. oxydans* zunächst eine Anzucht auf hochpreisigen Substraten wie Sorbitol oder Mannitol in einem primären Fermenter notwendig, um eine stabile und ausreichende Biomasse zu erhalten. Anschließend werden die Zellen geerntet und in einen sekundären Fermenter transferiert, wo dann die eigentliche Biotransformation durch ruhende Zellen erfolgt (Deppenmeier *et al.* 2002; Kosciow *et al.* 2014). Durch eine Erweiterung des Substratspektrums auf günstige Disaccharide oder Polysaccharide wäre eine drastische Senkung der Produktionskosten vieler etablierter Produkte wie Miglitol, Glukonat oder Ketoglukonat möglich. Zusätzlich würde die ökologische Bilanz durch direkte Verwendung nachwachsender Rohstoffe erheblich optimiert werden. Aber auch die Erschließung völlig neuartiger Produkte durch eine Anpassung an neue Substrate wäre denkbar.

Somit war es das Ziel dieser Arbeit, die Umsetzung neuer Substrate durch *G. oxydans* zu ermöglichen.

4.1 Entwicklung eines Expressionssystems für die Produktion periplasmatischer Hydrolasen

4.1.1 Strategien zur Erweiterung des Substratspektrums

Die Idee der Erweiterung des Substratspektrums von industriell wichtigen Organismen ist aus der Literatur bekannt und konnte bisher bereits bei einigen Mikroorganismen, besonders *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum* und *Saccharomyces cerevisiae*, erfolgreich durchgeführt werden (Barbosa *et al.* 1992; Ostergaard *et al.* 2000; Buschke *et al.* 2013). Die Gründe für die Substratlimitierung divergieren von Organismus zu Organismus, sodass etablierte Systeme nicht einfach übernommen werden können und von Grund auf an den Zielorganismus angepasst werden

müssen. Die Hauptursache für die Unfähigkeit von *G. oxydans* Di- und Oligosaccharide nutzen zu können liegt darin begründet, dass diesem Proteobakterium geeignete Importsysteme und entsprechende enzymatische Ausstattungen zur Hydrolyse der Verbindungen fehlen. In diesem Projekt sollten jedoch die schnellen periplasmatischen Oxidationsmöglichkeiten für neuartige Substrate nutzbar gemacht werden, sodass auf die Strategie der Etablierung von passenden Importsystemen verzichtet wurde. Stattdessen sollte *G. oxydans* so modifiziert werden, dass Di- und Trisaccharide, welche aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichts die Porine der äußeren Membran frei passieren können, im Periplasma hydrolysiert werden und dort eine weitere unvollständige Oxidation dieser Substrate stattfinden kann. In einem ersten Ansatz wurde ein effizienter Expressionsvektor konstruiert, welcher die Expression heterolog, für die Spaltung des jeweiligen Substrats notwendiger Hydrolasen in *G. oxydans* ermöglicht und gleichzeitig die Translokation dieser rekombinanten Proteine über die Cytoplasmamembran gewährleistet. Bei der Erstellung des Expressionssystems wurden als Basis die beiden Vektoren pBBR1p264 und pBBR1p452 verwendet. Diese beinhalten einen moderaten beziehungsweise starken konstitutiv exprimierten Promotor, welcher durch die 5' nicht-translatierten Bereiche der Gene *gox0452* und *gox0264* kodiert wird (Kallnik *et al.* 2010). Diese Promotoren wurden in der Vergangenheit bereits erfolgreich für die homologe Expression in *G. oxydans* verwendet (Meyer *et al.* 2013). Folglich konnte in Bezug auf diese Arbeit von einer guten Funktionalität, auch für heterologe Expressionen, ausgegangen werden.

Die heterologe Proteinproduktion mit anschließender Translokation des Proteins ist im Bereich der weißen Biotechnologie eine gut untersuchte und etablierte Technik. Dies hängt unter anderem mit den Vorteilen einer Proteinproduktion im Periplasma gegenüber der Produktion im Cytoplasma zusammen. So sind nur etwa vier Prozent der Gesamtproteinmenge eines Bakteriums im Periplasma lokalisiert (Nossal und Heppel 1966), sodass rekombinant produzierte Proteine im Periplasma in einer konzentrierten und leicht zugänglichen Form vorliegen. Die im Periplasma vorherrschenden oxidativen Bedingungen können darüber hinaus die Proteinfaltung sowie die Löslichkeit begünstigen (Talmadge und Gilbert 1982; Bowden *et al.* 1991; Makrides 1996). Dies konnte bereits im Fall von heterolog produzierten eukaryotischen Proteinen gezeigt werden (Talmadge *et al.* 1980). Zusätzlich wirkt sich die verminderte Zahl an Proteasen im Periplasma und somit eine geringere Degradationsrate positiv auf die Stabilität der produzierten Proteine aus (Gottesman 1996; Choi und Lee 2004).

In Gram-negativen Bakterien stellt die äußere Membran eine Art molekulares Sieb dar, welches durch das Vorhandensein von verschiedenen Porinen die freie Diffusion von Molekülen bis zu einer gewissen Ausschlussgröße in das Periplasma ermöglicht. Diese Ausschlussgrößen variieren je nach Art der Porine, liegen jedoch oftmals im Bereich von etwa 600 Da (Jap und Walian 1996). Dieser Wert liegt oberhalb der Molekulargewichte von Di- und Trisacchariden, deren periplasmatische Hydrolyse in dieser Arbeit angestrebt wurde (Laktose 342,3 Da, Trehalose 342,3 Da, Saccharose 342,29 Da, Raffinose 504,46 Da). Aus diesem Grund war davon auszugehen, dass, bezogen auf die kurzkettigen Saccharide, eine Translokation der heterolog exprimierten Hydrolasen in das Periplasma für eine Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* ausreichend sein sollte. Zu bedenken war jedoch der antiproportionale Zusammenhang zwischen der Substratmasse und der Diffusionsgeschwindigkeit durch die Porine (Nikaido und Rosenberg 1983). Demnach war bei verhältnismäßig großen Substraten

nahe der Ausschlussgröße nicht klar, ob die Diffusionsgeschwindigkeit in das Periplasma einen limitierenden Faktor darstellen könnte. In *G. oxydans* war es auf bioinformatischer Ebene nicht möglich, homologe Proteine für die gut charakterisierten Porine OmpC, OmpF, LamB und PhoE aus *E. coli* zu identifizieren. BLASTp-Analysen ergaben jedoch, dass die bisher nicht charakterisierten Proteine Gox0538, Gox1416, Gox1418, Gox2029 sowie Gox0758 signifikante Homologien (Identität 23 – 27 % bei einer Sequenzabdeckung von 79 – 97 %) zu Porin B (OprB) aus *Pseudomonas (P.) aeruginosa* zeigen. Bei diesem Protein handelt es sich um einen Substrat-selektiven Kanal, der in *P. aeruginosa* die Diffusion von Zuckern in das Periplasma ermöglicht (Wylie und Worobec 1995). Basierend auf den bioinformatischen Analysen der vorhandenen Porine und der bekannten schnellen Produktfreisetzung nach Oxidation von Monosacchariden in den Kulturüberstand, wurde von einer effizienten Substratdiffusion in *G. oxydans* ausgegangen. Dies stellte die Prämisse für die Hydrolyse von Di- und Trisacchariden im periplasmatischen Raum von *G. oxydans* dar.

4.1.2 Signalsequenzen als Vermittler bakterieller Proteintranslokation

Sowohl in eukaryotischen als auch prokaryotischen Zellen können viele Proteine nur dann aus dem Cytoplasma geschleust werden, wenn sie ein Signalpeptid aufweisen (Gierasch 1989; von Heijne 1990; Rapoport 1992). Dieses befindet sich N-terminal am zu translozierenden Protein und wird nach Ausschleusung durch Signalpeptidasen entfernt. Im Fall von membrangebundenen Proteinen hingegen, bleiben diese Signalsequenzen jedoch oft als Membrananker bestehen (von Heijne 1990; Dalbey und von Heijne 1992). Es werden mindestens zwei Arten der Protein-Translokation über die Cytoplasmamembran unterschieden, die jeweils charakteristische Signalpeptide benötigen. Das erste der beiden in Prokaryoten bekannten Systeme ist der Sec-abhängige Transportweg. Bei diesem Weg werden die zu translozierenden Proteine von Targetingfaktoren begleitet und unter ATP-Verbrauch im ungefalteten Zustand durch die Membran geschleust (Schatz und Beckwith 1990; Wickner *et al.* 1991). Obwohl zwischen Signalpeptiden in der Regel kaum Sequenzähnlichkeiten zu finden sind, lassen sich doch einige generelle Strukturmerkmale erkennen. So ist es möglich, ein Signalpeptid in drei charakteristische Bereiche einzuteilen, deren Primärstruktur auch entscheidend für die Exporteffizienz des Proteins ist (Vlasuk *et al.* 1983; Emr und Silhavy 1983; von Heijne 1990). Der erste Bereich, die N-Region, befindet sich am Aminoterminus der Signalsequenz und hat, im Fall eines Sec-abhängigen Signalpeptids, eine Länge von etwa 1 - 5 Aminosäuren (Heijne 1985; Fekkes und Driessen 1999, Abb. 72). Typisch für die N-Region ist eine überdurchschnittlich hohe positive Gesamtladung, die durch das Vorhandensein von geladenen Aminosäureresten erreicht wird und über die mittels Interaktion mit der Membran und der Translokase der Proteinexport eingeleitet wird. Ein Fehlen dieser basischen Aminosäuren oder ein Ersatz durch saure Aminosäuren führt zu einer Erniedrigung der Exportgeschwindigkeit (Vlasuk *et al.* 1983; Lehnhardt *et al.* 1988; Bosch *et al.* 1989; Puziss *et al.* 1989).



Abbildung 72: Beispielhaft dargestellte Signalsequenz der SldA-Untereinheit der Sorbitoldehydrogenase aus *G. oxydans*. Die Länge beträgt 24 Aminosäuren. Hellrot, vorrangig positiv geladene N-Region; grün, hydrophober Bereich; dunkelrot, C-terminale Region mit charakteristischem A-X-A-Motiv; schwarz, N-Bereich der prozessierten SldA-Untereinheit.

Der mittlere Bereich dieses Signalpeptides besitzt eine Länge von etwa 7 - 15 Aminosäuren (Fekkes und Driessen 1999) und wird als H-Region bezeichnet. Dieses Kürzel leitet sich von der charakteristischen hohen Anzahl an hydrophoben Aminosäuren dieses Bereiches ab. Es konnte nachgewiesen werden, dass für den Proteintransport eine Hydrophobizität vorhanden sein muss und die Translokationseffizienz mit steigender Hydrophobizität und Länge des H-Bereichs optimiert werden kann (Chou und Kendall 1990; Doud *et al.* 1993). Dieses Verhältnis kann durch eine sigmoidale Kurve beschrieben werden (Doud *et al.* 1993). Geladene Aminosäuren haben im Gegenzug eine negative Auswirkung auf die Translokation.

Der C-terminale polare Bereich, auch C-Region genannt, ist etwa 3 - 7 Aminosäuren lang (Fekkes und Driessen 1999) und interagiert mit der Signalpeptidase (SPase), durch die dieses Peptid von dem translozierten Protein abgeschnitten wird (von Heijne 1984; Dalbey und von Heijne 1992). Die typische Konsensus-Sequenz im C-Bereich gibt die Prozessierungsstelle an und besteht aus dem Motiv A-X-A in den Positionen -3 bis -1 bezogen auf die Schnittstelle, an der das Signalpeptid abgespalten wird (Abb. 72, Perlman und Halvorson 1983; von Heijne 1984).

Signalpeptide von Gram-negativen Bakterien sind in der Regel kürzer (< 25 Aminosäuren) als Signalpeptide von Gram-positiven Organismen mit 30 oder mehr Aminosäuren (Heijne und Abrahmsen 1989; Heijne 1990). Die Struktur der Signalpeptide unterschiedlicher Bakteriengruppen ähnelt sich soweit, dass periplasmatische Proteine von Gram-positiven oft auch von Gram-negativen Organismen über die Cytoplasmamembran geschleust werden können und umgekehrt (Meens *et al.* 1993).

Das zweite bekannte Transportsystem ist der Tat-abhängige Proteintransport („twin arginin translocation“), bei dem die Translokation des Proteins im teilgefalteten Zustand erfolgt (Berks 1996; Berks *et al.* 2000). Ein wichtiger Unterschied zwischen den Signalsequenzen des Sec-abhängigen Transports und des Tat-abhängigen Transports ist neben einem deutlich verlängerten N-terminalen Bereich im Fall der Tat-Signalsequenzen auch das charakteristische Motiv R-R-X-## (# = hydrophobe Aminosäure), welches im N-Bereich von Tat-Signalpeptiden zu finden ist und für dieses Transportsystem namensgebend ist (Berks *et al.* 2000).

4.1.3 Geeignete Signalsequenzen für die Translokation heterolog produzierter Proteine in *G. oxydans*

Für die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* bot sich eine Signalpeptid-vermittelte Translokation der heterolog produzierten Hydrolasen in das Periplasma an. Diese Strategie konnte bereits in anderen Organismen erfolgreich umgesetzt werden (Le Loir *et al.* 2001; Brockmeier *et al.* 2006; Hemmerich *et al.* 2016; Kang *et al.* 2016). Da alle für diese Arbeit ausgewählten Hydrolasen im nativen Wirtsorganismus über den Sec-abhängigen Proteintransportweg transloziert werden, sollte dieser ebenfalls für die Vektor-basierte Produktion und Translokation heterologer Enzyme in *G. oxydans* verwendet werden. Mittels bioinformatischer Analyse konnten die verschiedenen notwendigen Untereinheiten des Sec-Apparats im verwendeten Stamm *G. oxydans* 621H identifiziert werden (Tab. 24)

Tabelle 24: Bioinformatische Analyse vorhandener Untereinheiten des Sec-Translokationsapparats in *G. oxydans* 621H.

| Untereinheit | In <i>G. oxydans</i> 621H kodiert durch | Homologe Proteine in <i>E. coli</i> K12 | |
|--------------|---|---|---------------|
| | | Sequenz – abdeckung (%) | Identität (%) |
| SecA | <i>gox1678</i> | 99 | 54 |
| SecB | <i>gox1885</i> und <i>gox2237</i> | 95 und 82 | 28 und 26 |
| SecD | <i>gox2402</i> | 82 | 37 |
| SecE | <i>gox1306</i> | 38 | 38 |
| SecF | <i>gox2401</i> | 88 | 39 |
| SecY | <i>gox0360</i> | 95 | 54 |

Bis auf SecE zeigten alle Untereinheiten, die für eine Translokation notwendig sind, große Übereinstimmungen mit den korrespondierenden Untereinheiten aus *E. coli* K12. Diese Ähnlichkeit basiert darauf, dass die Translokationsmaschinerie Organismen-unabhängig mit stark variierenden Signalsequenzen interagieren und das ungefaltete Präprotein effizient durch die Cytoplasmamembran translozieren muss. Die Sec-abhängigen Signalsequenzen besitzen zwar einen gemeinsamen basalen Grundaufbau, jedoch erfordern die verschiedenen primären Sequenzen eine Flexibilität bei der Interaktion zwischen Bindedomäne und Substrat. Dies gilt insbesondere für die ATP-abhängige Translokase SecA, welche direkt mit der N-terminalen Region des Signalpeptids interagiert und die Translokation vermittelt (Schatz und Beckwith 1990; Rapoport 1992).

Aufgrund des generellen gemeinsamen Grundaufbaus von Sec-Signalsequenzen ist ein Austausch dieser häufig möglich und kann zu einer effizienten Translokation des Zielproteins in das Periplasma führen (Talmadge *et al.* 1980; Tommassen *et al.* 1983). Es ist jedoch auch bekannt, dass die Addition einer Signalsequenz nicht zwingend und in jedem Fall zu einem erfolgreichen Proteintransport führt (Moreno *et al.* 1980; Smith *et al.* 1985; Chang *et al.* 1987).

Die Translokationseffizienz eines Signalpeptids hängt von der Primärsequenz des Signals selbst, der Art des zu translozierenden Proteins und dem Wirtsorganismus ab. Somit wurde bereits im Rahmen der vorangegangenen Masterarbeit bei der Erstellung eines effizienten Expressionssystems in *G. oxydans* ein besonderer Schwerpunkt auf die Wahl des verwendeten Signalpeptids gelegt. Um das Nichterkennen einer Sequenz durch den Zielorganismus zu umgehen, wurde zunächst eine Signalpeptid-Bibliothek basierend auf nativ in *G. oxydans* vorkommenden Signalsequenzen erstellt. Dazu wurde eine bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenz aller putativen Proteine des Genoms sowie der fünf Plasmide pGox1-5 durchgeführt und anschließend wurden mittels der Online-Plattform SignalP mögliche Signalsequenzen identifiziert. Von den 240 möglicherweise *in vivo* translozierten Proteinen wurden insgesamt sechs eindeutige Signalpeptide ausgewählt (Kosciow *et al.* 2014). Da bekannt war, dass ein möglichst polarer N-Bereich sowie eine hydrophobe H-Region die Translokationseffizienz sowie Translokationsgeschwindigkeit positiv beeinflussen können (Vlasuk *et al.* 1983; Lehnhardt *et al.* 1988; Bosch *et al.* 1989; Puziss *et al.* 1989; Chou und Kendall 1990), wurde auch auf diese Charakteristika geachtet. Da auch die Signalsequenz der Pektatlyase B aus *E. carotovora* bei der heterologen Proteinsekretion in der Literatur erfolgreich eingesetzt werden konnte (Kipriyanov *et al.* 1997; Georgiou und Segatori 2005; Zeiser *et al.* 2014), wurde auch diese in die Bibliothek möglicher Signalsequenzen von *G. oxydans* aufgenommen. Über die Fusion der Signale an das Reporterenzym alkalische Phosphatase PhoA aus *E. coli* wurden die Translokationseffizienzen der Signalpeptide von PelB, Gox0605, Gox0748, Gox0854, Gox0952, Gox2077 und Gox2219 bestimmt (Kosciow *et al.* 2014). Die besten Transporteffizienzen konnten sowohl für *E. coli* als auch für *G. oxydans* für die Signalsequenzen von PelB und Gox2219, einem periplasmatischen Ribose-ABC-Transporter Bindeprotein, beobachtet werden. Die Bestimmung erfolgte über den Nachweis der Menge an aktiver, pro Zeiteinheit in das Periplasma translozierter, alkalischer Phosphatase (Kapitel 3.1). Im Fall von *G. oxydans* und dem Signalpeptid von PelB wurde dabei mit dem starken und moderaten Promotor eine ähnliche translozierte Menge PhoA im Periplasma nachgewiesen (1518 ± 584 und 1214 ± 128 MU). Möglicherweise wurde hier die maximale Translokationsleistung des nativen Sec-Apparats in *G. oxydans* erreicht, welche sich durch eine noch stärker induzierte Proteinproduktion nicht steigern lässt und bei der die Translokationsleistung der vorhandenen Sec-Maschinerie den Flaschenhals darstellt.

Somit fiel die Entscheidung für die Erstellung des Grund-Expressionsvektors zur Produktion periplasmatischer Hydrolasen auf den starken konstitutiven Promotor p264 und die Signalsequenz der Pektatlyase B. Beide gewährleisteten in Kombination, zumindest im Fall der alkalische Phosphatase PhoA, eine äußerst effiziente Proteinproduktion sowie anschließende Translokation in *G. oxydans*. Dennoch ist kein optimale, universell gültige Signalsequenz bekannt, was bereits durch Experimente mit artifizialen Konsensussequenzen gezeigt werden konnte (Sletta *et al.* 2004; Sletta *et al.* 2007). Bei diesen Versuchen wurde zunächst ein Konsensus-signalpeptid basierend auf den Signalsequenzen periplasmatischer Protein aus *E. coli* erstellt. Dabei wurde die Primärsequenz artifizial an die am häufigsten vorkommenden Aminosäuren innerhalb der untersuchten Signalpeptide angepasst, um so ein allgemein gültiges Sec-abhängiges Exportsignal für diesen Organismus zu erhalten. Es zeigte sich jedoch, dass eine solche Konsensussequenz nicht vollständig nach rationalen Kriterien erstellt werden

kann und die tatsächliche Exporteffizienz sowie das Expressionslevel stark vom C-terminal fusionierten Protein abhängt (Sletta *et al.* 2007). Somit muss die Wahl einer optimalen Signalsequenz aus einer erstellten Sequenzbibliothek über Austausch und Überprüfen der Transporteffizienz der jeweiligen Konstellation erfolgen (Choi und Lee 2004).

Mit dem in dieser Arbeit erstellten Expressionssystem für *G. oxydans* war ein Austausch der Signalsequenzen möglich. Alle Konstrukte dieser Arbeit trugen zunächst die für PhoA effizienteste Signalsequenz SPpeIB. Durch einen einfachen Klonierungsschritt konnte SPpeIB durch eine andere Signalsequenz aus der zuvor erstellten Bibliothek ersetzt werden. Diese Strategie sollte zum Einsatz kommen, wenn durch die Kombination von SPpeIB und der angefügten Hydrolase in *G. oxydans* keine Translokation nachgewiesen werden konnte.

Eine weitere Strategie zur Optimierung der Translokationseffizienz einer Signalsequenz in Bezug auf ein bestimmtes Protein wurde von Heggeset *et al.* 2013 verfolgt. Dabei wurden durch ungerichtete Mutagenese der Konsensussequenz eine Vielzahl verschiedener Varianten dieser erzeugt und jede dieser Variationen in einen Expressionsvektor stromaufwärts eines β -Laktamase-kodierenden Gens (*bla*) kloniert. Durch diese Art der Feinoptimierung der Translokations- sowie Expressionseffizienz dieser Signalpeptid-Protein-Kombination konnte die Produktion der periplasmatischen β -Laktamase um den Faktor 5,5 und die Ampicillintoleranz des heterologen Wirtsorganismus um den Faktor 8 gesteigert werden. Im Fall der alkalischen Phosphatase lag die Steigerung der Menge des produzierten und translozierten Enzyms bei einem Faktor von 8 (Heggeset *et al.* 2013).

Diese Art der Optimierung durch ungerichtete Mutagenese ist auch für das in dieser Arbeit verwendete System eine gute Möglichkeit zur Verbesserung einer bereits funktionierenden Translokation. Folglich wäre eine geeignete Optimierungsstrategie, zunächst experimentell die beste Kombination aus heterologer Hydrolase und Signalsequenz der erstellten Signalpeptid-Datenbank für *G. oxydans* zu finden. Anschließend könnte diese identifizierte Signalsequenz über Zufallsmutagenese einer Feinanpassung unterzogen und dadurch die Translokationseffizienz noch weiter verbessert werden.

In dieser Arbeit sollte der Proteintransport über die Cytoplasmamembran über den Sec-abhängigen Transportweg erfolgen, da dieser für periplasmatische, einfache Hydrolasen den hauptsächlich genutzten Weg darstellt. Die Nutzung des Tat-Signal-abhängigen Translokationsapparates, welcher häufig dem gefalteten Transport von Proteinen mit prosthetischen Gruppen dient, war für diese Arbeit vorerst nicht von Bedeutung, da keines der ausgewählten Enzyme einen Kofaktor dieser Art besaß. Jedoch sind auch Fälle bekannt, in denen einfache Proteine, welche sich beispielsweise zu schnell nach der Translation falten, über den Tat-abhängigen Weg transloziert werden (Berks 1996; Brüser *et al.* 1998; Berks *et al.* 2000). Somit könnte dies eine alternative Methode zum Transport heterologer Enzyme in *G. oxydans* darstellen, die trotz Signalsequenz-Optimierung nicht über den Sec-Transport transloziert werden können.

Die Größe der zu transportierenden Proteine besitzt dabei eine untergeordnete Rolle, da der Tat-abhängige Transport in das Periplasma für Proteine mit Molekulargewichten zwischen 20 kDa (NrfC) und maximal 142 kDa (FdnGH Subkomplex der Formiat-Dehydrogenase aus *E. coli*) beschrieben wurde

und der maximalen Porendurchmesser des Tat-Translokationsapparats bei 60-70 Å liegt (Berg *et al.* 1991, Hussain *et al.* 1994; Weiner *et al.* 1998; Berks *et al.* 2000).

Somit wäre dieser Transportapparat mit der Größe der meisten in dieser Arbeit ausgewählten Hydrolasen kompatibel. Auch die notwendigen Untereinheiten des Translokationsapparats, TatA, TatB und TatC sind nach bioinformatischer Analyse in *G. oxydans* 621H vorhanden und werden durch *gox1241* (*tatA*), *gox1757* (*tatB*) und *gox1758* (*tatC*) kodiert.

Im Fall eines fehlgeschlagenen Sec-Signalpeptid-vermittelten Transports wäre somit auch ein Ausweichen auf den Tat-Signalsequenz-vermittelten Proteintransportweg denkbar. Aus diesem Grund wurde im Genom von *G. oxydans* zusätzlich eine Tat-abhängige Signalsequenz bioinformatisch identifiziert. Bei dieser Sequenz handelte es sich um die Signalsequenz der putativen Disulfidisomerase Gox0187, welche ebenfalls in die Signalsequenzbibliothek von *G. oxydans* 621H aufgenommen wurde.

4.2 Erweiterung der nutzbaren Substrate um das Modelldisaccharid Trehalose

Das erste Substrat, mit dem im Rahmen dieser Arbeit die periplasmatische Hydrolyse *in vivo* gelang, war Trehalose. Dieses Disaccharid besteht aus zwei α,α -1,1-glykosidisch verknüpften Glukose-Molekülen. Der industrielle Einsatz von Trehalose für ein Wachstum von *G. oxydans* ist allerdings zu kostenintensiv. Dennoch ist dieser Zucker als Modell für die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* für diese Arbeit von großer Bedeutung gewesen. Wachstumsexperimente mit Trehalose als einzige Kohlenstoffquelle zeigten, dass der Organismus nicht in der Lage ist, dieses Saccharid als Substrat zu nutzen. Dies deutet auf ein Fehlen nativ vorhandener Trehalose-spaltender Enzyme, beziehungsweise ein nicht vorhandenes Importsystem hin. Trehalose konnte auch durch isolierte Zellmembranen nicht oxidiert werden (Kosciow *et al.* 2014), sodass dieses Disaccharid zur Überprüfung der Funktionalität des konstruierten Expressionssystems einen idealen Modellzucker darstellte.

4.2.1 Die periplasmatische Trehalase TreA und ihr cytoplasmatisches Pendant TreF

Trehalose ist ubiquitär innerhalb der Eukaryota und Prokaryota vorhanden. So fungiert dieser Zucker als Gefrierschutz bei Tardigrada-Arten oder als Hauptreservezucker in der Hämolymphe vieler Vertreter der Hexapoda. Generell besitzt dieses Disaccharid oftmals die Funktion eines Schutzstoffs, welcher von vielen Lebewesen bei Umweltstressbedingungen wie Austrocknung, Salz-, Kälte- und Hitzestress intrazellulär akkumuliert wird (Strom und Kaasen 1993).

In dieser Arbeit wurde die Trehalase TreA aus *E. coli* K12 zur Hydrolyse von Trehalose eingesetzt. Dieses periplasmatische Enzym wird in *E. coli* abhängig von der Osmolarität des umgebenden Mediums produziert. Unter hochosmolaren Bedingungen, bei denen in *E. coli* das Phosphotransferasesystem reprimiert vorliegt, wird das Gen *treA* stark induziert. Diese verstärkte Expression konnte durch Experimente mit dem Fusionsprodukt *treA-lacZ* gezeigt werden (Boos *et al.* 1987; Repoila und Gutierrez 1991; Blattner *et al.* 1997). Das Protein TreA wird Sec-abhängig in das Periplasma transportiert und

dient dort der Spaltung von Trehalose zu Glukose, welche wiederum als C- und Energiequelle genutzt werden kann. Zusätzlich ermöglicht TreA die Wiederverwertung von Trehalose, welche unter osmotischem Stress intrazellulär synthetisiert und teilweise freigesetzt wird (Styvold und Strøm 1991). Das mit einem Molekulargewicht von 60,5 kDa relativ kleine, monomere Enzym besitzt als Modellhydrolase für *G. oxydans* optimale Enzymcharakteristika. Da es im Wirtsorganismus bereits periplasmatisch vorliegt, konnte von einem Erhalt der enzymatischen Aktivität nach erfolgreicher Translokation ins Periplasma ausgegangen werden. Auch das pH-Optimum von 5,5 und das Temperatur-Optimum von 30 °C entsprachen den physiologischen Ansprüchen von *G. oxydans*. Mit einer spezifischen Aktivität von 87 $\mu\text{mol pro Minute und mg}$ handelt es sich bei TreA zusätzlich um ein hochaktives Enzym (Boos *et al.* 1987; Tourinho-dos-Santos *et al.* 1994).

Neben *treA* ist auch ein weiteres Trehalase-kodierendes Gen in *E. coli* vorhanden, *treF*. Diese Trehalase ist hoch homolog zu TreA (Identität von 51 % bei 85 % Sequenzübereinstimmung). Beide Enzyme besitzen eine nahezu identische Größe, zwei charakteristische Sequenzmotive, die sie als Glykosylhydrolasen vom Typ 37 definieren, sowie eine ähnliche Aktivität mit Trehalose als Substrat (87 U mg^{-1} TreA, 54 U mg^{-1} TreF; Henrissat und Bairoch 1993). Anders als TreA trägt TreF jedoch keine Signalsequenz und liegt in nativer Form cytoplasmatisch vor. Dort hat das Enzym wahrscheinlich die Funktion, die intrazellulär akkumulierte Trehalose nach einer Rückkehr von hoch- zu normalosmotischen Bedingungen wieder abzubauen und zu verwerten (Horlacher *et al.* 1996).

Aufgrund der auffälligen Übereinstimmungen wird von einem gemeinsamen Vorläuferprotein ausgegangen, von dem aus die jeweilige evolutive Anpassung an die unterschiedlichen Zellkompartimente erfolgte (Horlacher *et al.* 1996). Diese Besonderheit, zwei homologe Enzyme mit unterschiedlicher Lokalisation *in vivo* vorzufinden, bot die Gelegenheit zu überprüfen, ob sich das an *G. oxydans* angepasste Expressionssystem auch für die Translokation cytoplasmatischer Proteine eignet. Es zeigte sich jedoch, dass anders als im Fall von TreA, TreF nicht in aktiver Form im Periplasma von *G. oxydans* zu finden war und so auch keine Hydrolyse von Trehalose ermöglichte (Daten nicht gezeigt). Trotz des relativ geringen strukturellen Unterschieds scheint TreF somit vollständig an das cytoplasmatische Kompartiment angepasst zu sein. Dass die Translokation eines aktiven cytoplasmatischen Proteins nach heterologer Produktion scheitert, ist nicht ungewöhnlich. Häufig ist die fehlende Aktivität dieser Proteine im Periplasma auf Fehlfaltungen zurückzuführen, welche durch die unterschiedlichen Bedingungen im Periplasma und Cytoplasma entstehen (Moreno *et al.* 1980).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt bei der Wahl weiterer Hydrolasen daher auf nativ im Periplasma lokalisierte sowie extrazelluläre Enzyme gelegt.

4.2.2 Expression, Produktion und Translokation von TreA in *G. oxydans*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die periplasmatische Trehalase TreA erfolgreich in *G. oxydans* mithilfe des pBBR1-basierten Expressionssystems heterolog exprimiert und in aktiver Form produziert werden. Durch die N-terminale Fusion an die Signalsequenz von PelB wurde auch, wie zuvor bereits beim Reporterenzym PhoA beschrieben, eine erfolgreiche Sec-abhängige Translokation über die Cytoplasmamembran erreicht. Mittels Detektion des C-terminal angefügten Strep-Tags wurde nachgewiesen, dass TreA einen Großteil der periplasmatischen Gesamtproteine ausmachte (Abb. 7 A).

In *in vitro*-Experimenten, bei denen eine definierte Menge periplasmatischer Gesamtproteine des Trehalase-produzierenden Stamms eingesetzt wurden, konnte eine hydrolytische Aktivität von $6,2 \pm 0,7 \text{ U mg}^{-1}$ nachgewiesen werden. Im Fall der cytoplasmatischen Proteine wurde eine Aktivität von $0,5 \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}$ bestimmt (Abb. 8). Für das aufgereinigte Protein TreA konnte zuvor eine spezifische Aktivität unter vergleichbaren Bedingungen von etwa 87 U mg^{-1} bestimmt werden (Tourinho-dos-Santos *et al.* 1994; Horlacher *et al.* 1996). Geht man von einer gleichen spezifischen Aktivität des aufgereinigten Enzyms aus *G. oxydans* aus, so würde dies bedeuten, dass TreA etwa 7 % des periplasmatischen Gesamtproteingehalts und etwa 0,6 % des cytoplasmatischen Gesamtproteingehalts ausmacht. Es ist bekannt, dass in Gram-negativen Bakterien der Gesamtanteil periplasmatischer Proteine nur bei etwa 10 - 15 % des Gesamtproteins liegt (Heppel 1971; Ames *et al.* 1984). Bezieht man diesen Wert in die Berechnung mit ein, so ergibt sich, dass etwa 58 – 67 % der gesamten Menge der aktiven Trehalase TreA im Periplasma vorlag. Dieser Wert spricht für eine effiziente Translokation des Proteins ins Periplasma mit Hilfe der Signalsequenz von PelB. Zudem kann von einem ausgewogenen Verhältnis zwischen Proteinproduktion und Transport ausgegangen werden.

Experimente unter Verwendung des Expressionssystems ohne die Signalsequenz von PelB in *G. oxydans* (Abb. 7 B) zeigten, dass die erfolgreiche Translokation von TreA in das Periplasma tatsächlich aufgrund der Anwesenheit der Signalsequenz erfolgte.

4.2.3 Produktanalyse bei einem Wachstum von *G. oxydans treA* mit Trehalose als C-Quelle

Der *G. oxydans*-Stamm, welcher *treA* inklusive der 5'-terminal fusionierten Signalsequenz von PelB exprimiert (im folgenden *G. oxydans treA* bezeichnet), zeigte ein stabiles Wachstum mit 50 mM Trehalose als einzige Kohlenstoffquelle (Abb. 10). Die Hauptprodukte, die bei der Metabolisierung entstanden sind, waren Acetat (53 mM) und 5-Ketoglukonat (34 mM). 2-Ketoglukonat konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (Kosciow *et al.* 2014).

Aus der Hydrolyse von Trehalose durch TreA in *G. oxydans* entsteht zunächst Glukose. Diese kann nachfolgend über zwei verschiedene Stoffwechselprozesse oxidiert werden (Abb. 73).

Einer dieser Prozesse basiert auf der direkten Oxidation zu Glukonat und im nächsten Schritt weiter zu 2- und 5-Ketoglukonat. Diese Reaktion wird durch die periplasmatische, membrangebundene Glukose-Dehydrogenase sowie Glukonat-Dehydrogenase katalysiert (Matsushita *et al.* 2003). Beim zweiten Prozess wird Glukose zunächst in das Cytoplasma aufgenommen und anschließend über Enzyme des Pentosephosphatwegs abgebaut (Richhardt *et al.* 2013). Während des Wachstums in Glukose-haltigem Medium wird die Aktivität der Enzyme beider Prozesse stark durch den pH-Wert und die Konzentration der Glukose im Medium selbst beeinflusst. Bei Konzentrationen oberhalb des Schwellenwertes von 5 – 15 mM ist die Oxidation von Glukose über den Pentosephosphatweg fast vollständig reprimiert, sodass eine schnelle Akkumulation von Glukonat und 2-Ketoglukonat im Kulturüberstand erfolgt (Olijve und Kok 1979b; Hanke *et al.* 2013). Unterhalb dieses Schwellenwertes erfolgt die Oxidation maßgeblich intrazellulär über den Pentosephosphatweg unter Bildung von Glyceraldehyd-3-Phosphat, welches weiter zu Pyruvat umgewandelt wird (Prust *et al.* 2005). Pyruvat wird anschließend über Acetaldehyd zu Acetat verstoffwechselt, unter Beteiligung der Pyruvat-Decarboxylase (Gox1081) und der NADP-

abhängigen Acetaldehyd-Dehydrogenase (Gox2018)(Richardt *et al.* 2012). Bei *G. oxydans* *treA* stellte sich durch Spaltung von Trehalose in der exponentiellen Wachstumsphase ein Gleichgewichtszustand zwischen Glukosebildung- und abbau ein, der sich in einem Konzentrationsbereich von 2 – 4 mM befand und somit unter dem oben genannten Schwellenwert lag (Olijve und Kok 1979b; Kosciow *et al.* 2014). Die Entstehung von 5-Ketoglukonat erklärt sich durch partielle Oxidation der aufgenommenen Glukose zu Glukonat. Diese Verbindung wird wiederum maßgeblich zu 5-Ketoglukonat oxidiert und in den Überstand sekretiert. Ein geringer Teil von Glukonat wird zu 6-Phosphoglukonat phosphoryliert und über die Glukose-Dehydrogenase (Gox2015), die Glukonatkinase (Gox1709) sowie Enzyme des Pentosephosphatwegs und der Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt (Rauch *et al.* 2010, Hanke *et al.* 2013). Pyruvat wird abschließend decarboxyliert und zu Acetat oxidiert, welches aus der Zelle entlassen wird.

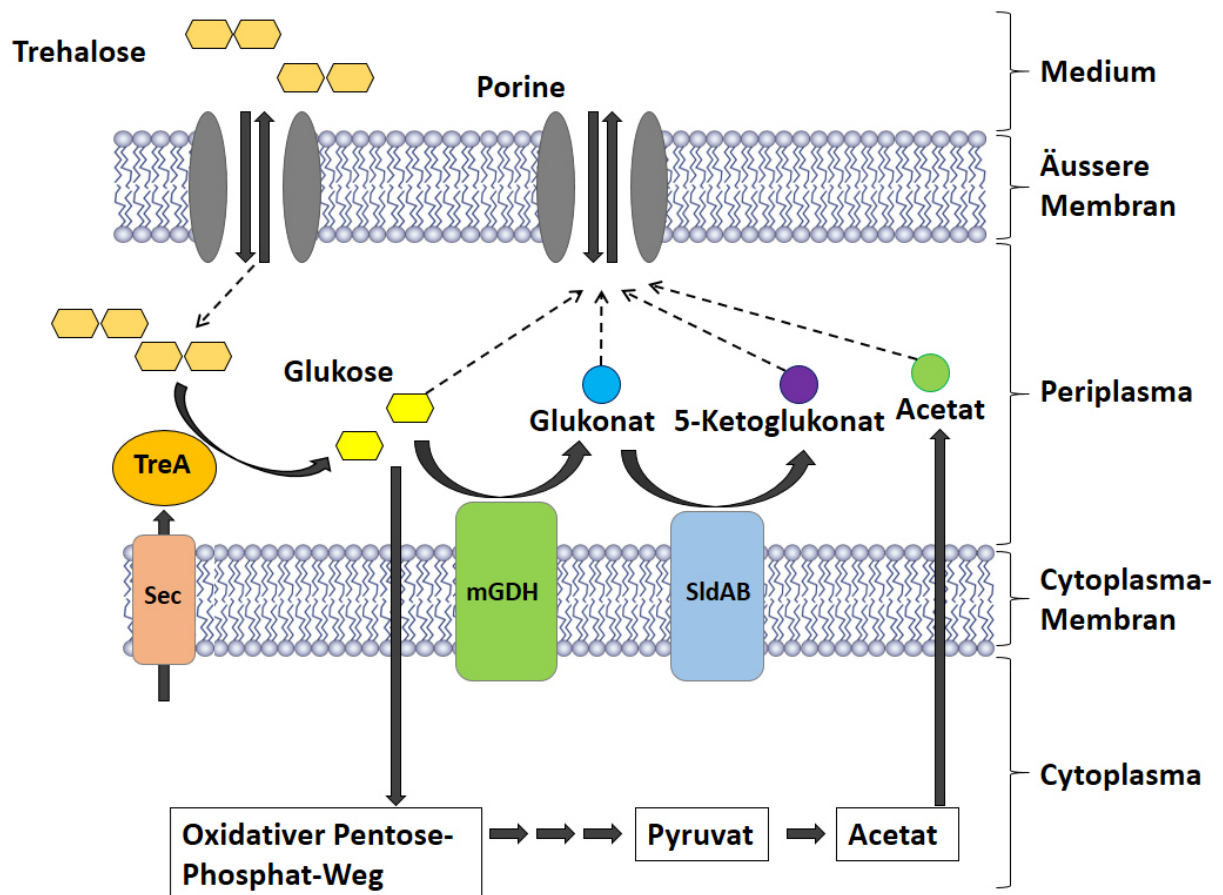


Abbildung 73: Schematische Darstellung des Abbaus von Trehalose durch *G. oxydans* *treA*. Trehalose kann aufgrund des geringen Molekulargewichts durch die Porine der äußeren Membran in den periplasmatischen Raum diffundieren. Dort wird das Disaccharid durch die erfolgreich rekombinant produzierte und mittels Sec-Transport (Sec) ins Periplasma translozierte Trehalase TreA zu zwei Molekülen Glukose hydrolysiert. Da die Glukosekonzentration mit dem gegebenen Expressionssystem unterhalb des Schwellenwerts liegt (Olijve und Kok 1979b), wird Glukose maßgeblich intrazellulär über den oxidativen Pentosephosphatweg zu Acetat abgebaut. Acetat wird anschließend ins Medium freigesetzt. Zusätzlich kann Glukose über die Membran-gebundene Glukosedehydrogenase (mGDH) zu Glukonat und dann über die Sorbitol-Dehydrogenase (SldAB) weiter zu 5-Ketoglukonat oxidiert werden.

Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung von 5-Ketoglukonat ist die Oxidation von Glukonat im Periplasma zu 5-Ketoglukonat durch die Sorbitol-Dehydrogenase, welche beim erniedrigten pH-Wert der späten exponentiellen Phase aktiv ist (Abb. 73; Matsushita *et al.* 2003). Diese Beobachtungen erklären die ungewöhnliche Akkumulation von Acetat und 5-Ketoglukonat durch *G. oxydans treA* bei einem Wachstum auf Trehalose.

Die Hydrolyse von Trehalose durch TreA stellt *in vivo* in *G. oxydans* eine Art Flaschenhals dar, durch den der Metabolismus und das resultierende Produktspektrum stark beeinflusst und reguliert werden kann. Durch die Optimierung der Expression von *treA*, der Produktion der Trehalase oder der Translokationsrate würde die Glukosekonzentration im Medium über den Glukoseschwellenwert ansteigen. Dadurch fände maßgeblich eine periplasmatische Oxidation statt, resultierend in der Umwandlung von Glukose zu Glukonat als Endprodukt. Wird der pH-Wert dabei gezielt kontrolliert, erfolgt eine weitere Oxidation zu 2-Ketoglukonat.

Somit ist es über die Regulation der Expression von *treA* möglich, die gezielte Produktion von 5-Ketoglukonat oder 2-Ketoglukonat durch *G. oxydans treA* zu steuern. Eine Zugabe von CaCO₃ kann dabei die Verschiebung in Richtung 5-Ketoglukonat positiv beeinflussen (Weenk *et al.* 1984).

Da die Feinchemikalie 5-Ketoglukonat in die industriell wichtige Verbindung L-(+)-Weinsäure (2,3-Dihydroxybernsteinsäure) umgewandelt werden kann, sind bereits Bestrebungen zur Optimierung der Produktion dieser Verbindung durch *G. oxydans* 621H bekannt (Toyama *et al.* 2007). Die Produktion von 5-Ketoglukonat ist bisher exklusiv innerhalb der Gattung *Gluconobacter* zu finden (Toyama *et al.* 2007). Die einzige Ausnahme stellt *Xanthomonas campestris* dar, der über eine sekundäre Alkoholdehydrogenase ebenfalls zur Oxidation von Glukonat zu 5-Ketoglukonat befähigt ist (Salusjärvi *et al.* 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ruhende Zellen des Wildtyps von *G. oxydans* unter Standardbedingungen 11 % der zugesetzten Glukose zu 2-Ketoglukonat und 6 % der Glukose zu 5-Ketoglukonat umsetzten (Elfari *et al.* 2005). Unter genau definierten abiotischen Faktoren (pH 5, 10 % pO₂, 0,05 % pCO₂) konnte die Umsetzung von Glukose zu 5-Ketoglukonat auf eine Ausbeute von 45 % gesteigert werden. Da eine zeitgleiche Entstehung von 2-Ketoglukonat unerwünscht ist, wurde eine Deletionsmutante von *G. oxydans* erstellt. Dieser Mutante fehlt der membrangebundene Glukonat-2-Dehydrogenase-Komplex, wodurch eine Umsetzung von Glukose zu 5-Ketoglukonat mit einer Effizienz von 84 % erreicht werden konnte (Elfari *et al.* 2005). Durch Einsatz des Stamms *G. oxydans* IFO 12528, welcher unter den bekannten *Gluconobacter*-Stämmen als effizientester Produzent von 5-Ketoglukonat gilt, wurde sogar eine Umsetzung von 90 % der C-Quelle gezeigt (Shinagawa *et al.* 1983). Die Produktion erfolgte allerdings mit ruhenden Zellen bei einem nicht physiologischen pH-Wert von 2,5 - 3 sowie einer Temperatur von 20 °C.

Im Fall des in dieser Arbeit erstellten Produktionsstamms *G. oxydans treA* konnte bei Analysen des Produktspektrums beim Wachstum mit Trehalose als Substrat unter den gegebenen Bedingungen keine 2-Ketoglukonat-Produktion nachgewiesen werden, weder mittels HPLC noch enzymatisch über die 2-Ketoglukonat-Reduktase Gox0417 (Rauch *et al.* 2010). Somit zeigte sich bereits unter den gegebenen Produktionsbedingungen eine sehr große Reinheit des Produkts 5-Ketoglukonat, trotz Vorhandenseins des Glukonat-2-Dehydrogenase-Komplexes. Darüber hinaus lag die Umsetzungseffizienz der in Form von Trehalose zugeführten Glukose zu 5-Ketoglukonat bereits bei 40 %.

Durch die Herstellung der Mutante *G. oxydans treA* konnte im Rahmen dieser Arbeit ein effizientes Expressionssystem für periplasmatische Hydrolasen entwickelt werden. Dieses System ermöglichte dem Organismus mit Trehalose als einzige Kohlenstoffquelle zu wachsen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass über die heterolog produzierte periplasmatische Trehalase eine Art sensitiver Regulationsmechanismus entstanden ist, mit dem das Produktspektrum von *G. oxydans treA* maßgeblich in die gewünschte Richtung beeinflusst werden kann.

4.3 Strategie für die Produktion von sekretierten Hydrolasen in *G. oxydans*

Mit dem Stamm *G. oxydans treA* konnte gezeigt werden, dass durch das pBBR1-basierte Expressionssystem und durch eine geeignete Hydrolase, in Kombination mit einer kompatiblen Signalsequenz, die Nutzung neuer Substrate möglich ist (Abschnitt 4.2; Kosciow *et al.* 2014). Wie in Abbildung 2 erkennbar, stellt der Durchmesser der Porine der äußeren Membran bei Gram-negativen Bakterien den limitierenden Faktor für die Auswahl neuer Substrate dar. Der durchschnittliche Innendurchmesser der häufigen und gut charakterisierten Porine OmpF, OmpC, PhoE und LamB liegt bei einer Ausschlussgröße von etwa 600 Da (Jap und Walian 1996) und lässt somit eine freie Diffusion der meisten Di- und Trisaccharide zu. Mit zunehmendem Molekulargewicht unterhalb der Ausschlussgröße verlangsamt sich die freie Diffusion. Der Konzentrationsausgleich von Trisacchariden wie Raffinose erfolgt zwischen Medium und Periplasma langsamer als der Austausch von Disacchariden wie Saccharose oder Laktose (Nikaido und Rosenberg 1983).

Eine Erweiterung des Substratspektrums um langkettige Saccharide stellt jedoch, im Hinblick auf die Nutzbarkeit von nachwachsenden Rohstoffen wie Cellulosen und Hemicellulosen für die Produktion von Feinchemikalien und enantiomerreinen Synthesebausteinen, einen weiteren wichtigen Schritt bei der Optimierung von *G. oxydans* dar.

In diesem Kapitel der vorliegenden Arbeit soll diskutiert werden, wie die in das Periplasma translozierten aktiven Hydrolasen in den Kulturüberstand sekretiert werden können. Auf diese Weise wäre *G. oxydans* dazu befähigt auch größere Substrate nutzen zu können, unabhängig von der Ausschlussgröße der Porine in der äußeren Membran.

4.3.1 Natürliche Sekretionswege in Gram-negativen Bakterien

Während die Sekretion von Enzymen in Gram-positiven Organismen aufgrund der fehlenden äußeren Membran durch die einfache Translokation der Proteine über die Cytoplasmamembran erfolgt, ist dies in Gram-negativen Bakterien nicht möglich. Das Vorhandensein der äußeren Membran führte zur Entwicklung unterschiedlicher Strategien, um diese zweite Membran überwinden zu können. Anders als die Cytoplasmamembran stellt die äußere Membran eine Art molekulares Sieb für die freie Diffusion von niedermolekularen Substanzen dar. Die Ausschlussgröße liegt durchschnittlich bei 600 Da und in extremen Fällen maximal bei 5000 Da und somit weit unterhalb der Größe der meisten Exoproteine (Nakae 1976; Welte *et al.* 1995). Um eine Translokation dieser Proteine über die zweite Membran zu ermöglichen, sind weitere Mechanismen notwendig. In Gram-negativen Organismen wird von

mindestens sechs verschiedenen, distinkten Sekretionssystemen ausgegangen, über die der Proteintransport erfolgen kann (Büttner und Bonas 2002; Pukatzki *et al.* 2007).

Beim Sekretionssystem Typ I handelt es sich um einen ABC-Transporter, welcher mit zwei anderen Proteinen, dem Membranfusionsprotein (MFP) und einem äußere-Membran-Protein („outer membrane protein“, OMP) interagiert (Wandersman 1992; Letoffe *et al.* 1996; Binet *et al.* 1997). Dabei wird ein Proteintunnel gebildet, der den Export von Ionen, Metaboliten und Proteinen mit einem Molekulargewicht von bis zu 900 kDa ermöglicht (Hinsa *et al.* 2003). Dieses Sekretionssystem wird oft für den Export von Toxinen genutzt. Ein gut charakterisiertes Beispiel hierfür ist das Transportsystem des Hämolyisin A in *E. coli*, welches durch *hlyA* kodiert wird (Kayser 1903; Snyder und Koch 1966; Springer und Goebel 1980). Es handelt sich hierbei um einen Sec- und Tat-unabhängigen Transportweg, für den keine Sec- oder Tat-Signalsequenz am N-Terminus des zu translozierenden Proteins vorhanden sein muss.

Beim Typ II-Sekretionssystem (T2SS) erfolgt zunächst ein Transport der Proteine im ungefalteten oder gefalteten Zustand über die innere Membran und anschließend ein Transport über einen multimeren Porenkomplex durch die äußere Membran (Kornacker und Pugsley 1990; Pugsley *et al.* 1997; Russel 1998; Stathopoulos *et al.* 2000). Eine Vielzahl von Proteinen, deren Funktion teilweise noch unbekannt ist, ist in diesen Transportweg integriert. Intensiv untersucht wurde das T2SS im Zusammenhang mit dem Exoenzym Pullulanase der Gattung *Klebsiella*, welches den extrazellulären Abbau von pflanzlichem Pullulan katalysiert und dem Organismus somit die Aufnahme des monomeren Bestandteils dieses Polysaccharids ermöglicht (Kornacker und Pugsley 1990).

Wie auch beim Sekretionssystem I handelt es sich beim Sekretionssystem III (T3SS) um einen Sec- und Tat-unabhängigen Transportmechanismus. Dieses System, mit dem vorzugsweise Toxine exportiert werden, leitet sich von dem flagellaren Basalkörper ab. Es erlaubt aufgrund der molekularen Nadelstruktur den direkten Export des zu transportierenden Moleküls in das Cytoplasma der Zielzelle (Jarvis *et al.* 1995; Kubori *et al.* 1998; Hueck 1998; Galán und Collmer 1999). Viele bekannte Virulenzfaktoren der Gattungen *Salmonella*, *Shigella* und *Vibrio* werden über diesen Weg exportiert. Erstmals charakterisiert wurde das T3SS in *Yersinia pestis*. Bei den dabei untersuchten Proteinen handelte es sich um sogenannte Yops („*Yersinia* outer membrane proteins“), welche durch eine Störung der Signalkaskaden im Cytoplasma von eukaryotischen Zellen eine Porenbildung und somit Cytolyse ermöglichen (Rosqvist *et al.* 1990; Rosqvist *et al.* 1994; Persson *et al.* 1995). Das Sekretionssystem Typ IV besitzt einen zum bakteriellen Konjugationsapparat homologen Aufbau, wobei Proteine zunächst entweder Sec/Tat-unabhängig oder Sec/Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran transloziert und von dort über einen Proteinkomplex sekretiert werden. Auch der Export von DNA kann über dieses System vermittelt werden. Das am besten untersuchte Beispiel ist das *Vir*-System des phytopathogenen Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens*. Mit Hilfe dieses Systems erfolgt das Einschleusen der T-DNA des Ti-Plasmids in die Pflanzenzelle und, nach der Integration der DNA in die Wirts-DNA, die Induzierung der Tumorbildung (Schell *et al.* 1979; Alt-Moerbe *et al.* 1988; Salmond 1994; Christie 1997). Im Fall des Sekretionssystems V, einem Autotransportsystem, wird das zu translozierende Protein zunächst über das Sec-Transportsystem in das Periplasma sezerniert (Pohlner *et al.* 1987; Henderson *et al.* 1998). Über den C-Terminus des Autotransporters findet eine Integration in die äußere Membran statt, bei der sich eine β -Fass-Sekundärstruktur bildet und dem Protein eine Translokation ermöglicht.

Im Anschluss findet in der Regel eine Abspaltung des reifen Proteins statt. Dieses System wurde erstmals für die IgA-Protease der humanpathogenen Diplokokken *Neisseria gonorrhoeae* beschrieben (Pohlner *et al.* 1987). Im Jahr 2006 wurde ein weiteres Sekretionssystem in *Vibrio cholerae* und *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert (Mougous *et al.* 2006; Pukatzki *et al.* 2006). Dabei handelt es sich um ein System der interbakteriellen Interaktion, über das beispielsweise toxische Effektorproteine durch direkten Kontakt in eine Rezipientenzelle übertragen werden können (Russell *et al.* 2014). Ein potentieller weiterer Sekretionstyp wurde in Mykobakterien charakterisiert. Dieser wird aufgrund seiner Einzigartigkeit oft als Sekretionsweg Typ VII beschrieben. Dort dient dieses System dem Proteintransport über die äußerst hydrophobe und impermeable Zellwandstruktur von Mykobakterien (Abdallah *et al.* 2007). Weitere Exportsysteme, die jedoch nicht als generelle Proteinsekretionssysteme gesehen werden, sind beispielsweise der Chaperon-Usher-Weg und der Curli-Biogenese-Weg. Der Chaperon-Usher-Weg ist beim Export der Pilus-Untereinheiten aus dem Periplasma über die äußere Membran beteiligt (Thanassi *et al.* 1998; Waksman und Hultgren 2009). Der Curli-Biogenese-Weg hingegen ermöglicht den Export der Untereinheiten der Curli-Fimbrien für die Zelladhäsion oder die Biofilmbildung (Barnhart und Chapman 2006). Ein weiterer bedeutsamer Sekretionsmechanismus ist die RND („resistance-nodulation-division“)-Efflux-Pumpe, die beide Membranen durchspannt und nah mit T1SS verwandt ist. Da diese vor allem der Sekretion sehr kleiner exogener Moleküle dient, spielt sie für die Proteinsekretion nur eine untergeordnete Rolle (Blair und Piddock 2009; Costa *et al.* 2015).

4.3.2 Die Wahl einer geeigneten Strategie zur Überbrückung der äußeren Membran in *G. oxydans*

In Gram-negativen Bakterien stellt die äußere Membran ein Hindernis für die Sekretion von rekombinanten Exoenzymen dar. Dies gilt besonders für *G. oxydans*, bei dem die oben beschriebenen Exportsysteme entweder fehlen oder unvollständig vorliegen (Prust *et al.* 2005). Es sind verschiedene Strategien zur Überwindung der äußeren Membran bekannt. Viele von diesen Strategien zielen auf eine direkte Destabilisierung der äußeren Membran und somit auf die Freisetzung der periplasmatischen Fraktion in den Überstand ab. Eine weitere Möglichkeit stellt die gezielte Sekretion des gewünschten Proteins dar. Ein Beispiel hierfür ist die Sekretion über den Hämolyisin-Transportweg, bei dem es sich um ein Sekretionssystem vom Typ I handelt. HlyA, das α -Hämolyisin aus *E. coli*, wird dabei Sec/Tat-unabhängig in einem Schritt über die Cytoplasmamembran-assoziierten Proteine HlyB und HlyD sowie über das äußere-Membran-assoziierte Protein TolC in den Extrazellularraum sekretiert (Blight und Holland 1994). Im Fall von HlyA wird der Transport über diesen Weg durch eine C-terminale Signalsequenz vermittelt. Daher war es möglich, diesen Transportweg durch die Fusion der C-terminalen 46 - 50 Aminosäuren von HlyA an verschiedene Zielproteine ebenfalls für eine Sekretion nutzen zu können (Blight und Holland 1994; Gentshev *et al.* 2002). Durch dieses System konnte eine Sekretion von über 400 mit HlyA unverwandten rekombinant produzierten Enzymen über den *E. coli*-Hämolyisin-Transportweg ermöglicht werden. Diese Sekretion gelang sowohl für prokaryotische als auch eukaryotische Proteine mit einer Größe zwischen 20 - 1000 Aminosäuren (Gentshev *et al.* 2002). Auch in *G. oxydans* wäre die Nutzung dieses Transportwegs denkbar. Es zeigte sich, dass die notwendigen Untereinheiten TolC (Gox2487), HlyD (Gox0714), sowie ein *hlyA*-ähnliches Gen (*gox0253*)

in diesem Organismus vorhanden sind. Die wichtige Untereinheit HlyB ist jedoch nicht vorhanden. Folglich ist in *G. oxydans* 621H der Hämolyisin-Transportweg mit großer Wahrscheinlichkeit nicht funktional.

Es sind verschiedene Methoden bekannt, die nicht auf die Sekretion von bestimmten Proteine abzielen, sondern auf die Veränderung der Integrität und Stabilität der äußeren Membran. Diese Beeinflussung kann chemisch geschehen, wie beispielsweise durch den Einsatz von Glycin oder durch Verwendung des Detergens Triton-X. Während Glycin bei *E. coli* durch Störung der Quervernetzung des Peptidoglykannetzes auch zu einer Freisetzung von cytoplasmatischen Proteinen führen kann, werden durch Triton-X hauptsächlich periplasmatische Proteine freigesetzt (Yang *et al.* 1998). Dieser Effekt beruht auf einer stärkeren Wirksamkeit dieses Detergens auf die äußere Membran als auf die Cytoplasmamembran (Yang *et al.* 1998). Eine weitere Strategie zur Gewinnung von Stämmen mit veränderter Membranintegrität ist die Anwendung von unspezifischer Mutagenese. Diese Methode erfolgt häufig durch den Einsatz von Methylnitrosoguanidin oder Ethylmethansulfonat mit anschließender phänotypischer Selektion (Lopes *et al.* 1972; Weigand und Rothfield 1976; Lazzaroni und Portulier 1979). Der Nachteil dieser Form der Mutagenese ist die Unspezifität der erzeugten Mutationen und die Ungewissheit über möglicherweise zusätzlich erzeugte genotypische Veränderungen. Über die Koproduktion des Zielproteins mit einer Cutinase aus *Thermobifida fusca* konnte ebenfalls die Membranpermeabilität erhöht werden, da dieses Enzym die Hydrolyse von Phospholipiden in der Zellmembran katalysiert. In *E. coli* war es so möglich, die Sekretion einer α -Amylase sowie einer Xylanase deutlich zu steigern (Su *et al.* 2013a; Su *et al.* 2013b; Wu *et al.* 2015). Da für die Proteinproduktion in dieser Arbeit jedoch das zuvor konzipierte pBBR1-basierte Expressionssystem verwendet werden sollte, musste eine andere Strategie entwickelt werden.

Lazzaroni *et al.* 1999 erreichten eine Destabilisierung der äußeren Membran in *E. coli* durch gezielte Deletion der Gene *tolA*, *tolB*, *tolQRA*, *rfa*, *pal* und *lpp*. Diese Gene kodieren periplasmatische, membrangebundene und lösliche Proteine, welche mit dem Peptidoglykan-Netzwerk assoziiert sind und somit unter anderem die Integrität und Stabilität der Membranen gewährleisten. Lpp, auch Braun's Lipoprotein genannt, stellt dabei eines der häufigsten Membranproteine in vielen Gram-negativen Bakterien dar. Ein Drittel dieser Proteine im Periplasma liegt über einen C-terminalen Lysinrest kovalent gebunden an Diaminopimelat der Peptidoglykanschicht vor. Somit stabilisieren sie die Verbindung zwischen der cytoplasmatischen Membran und der periplasmatischen Zellwandstruktur (Braun und Bosch 1972; Inouye *et al.* 1972; Hantke und Braun 1973; Clavel *et al.* 1998). Eine Deletion dieses Membranproteins führte in *E. coli* zu einer Freisetzung von 40 % der nativ im Periplasma vorhandenen alkalischen Phosphatasen während der stationären Phase. Durch den Wildtyp hingegen wurden nur 5 % dieser Enzyme freigesetzt (Lazzaroni *et al.* 1999). Im Fall von *G. oxydans* war es allerdings nicht möglich, ein entsprechendes homologes Gen für *lpp* zu identifizieren.

Auch die Deletion von Proteinen des Tol-Pal-Systems kann zu einem Verlust der Membranintegrität und Membranstabilität führen (Lazzaroni *et al.* 1999). Das Tol-Pal-System setzt sich aus den drei Untereinheiten TolA, TolQ und TolR zusammen, welche in der Cytoplasmamembran verankert sind (Derouiche *et al.* 1995; Lazzaroni *et al.* 1995). Der C-terminale Bereich von TolA interagiert wiederum mit dem löslichen periplasmatischen Protein TolB und teilweise mit dem Peptidoglykan-assoziierten Lipoprotein (Pal). Pal, welches in der äußeren Membran verankert ist, bildet zusätzlich einen Komplex

mit dem äußeren Membran-Protein A (OmpA) und TolB (Bouveret *et al.* 1995; Cascales *et al.* 2000). TolB stellt demnach ein periplasmatisches, lösliches Linkerprotein zwischen TolA in der inneren Membran und dem am Peptidoglykan-gebundenen Protein Pal in der äußeren Membran dar. Neben der stabilisierenden Funktion dieses Komplexes sind eine Vielzahl weiterer Funktionen bekannt, darunter eine Beteiligung am Colicin-Transport sowie an der Aufnahme filamentöser Phagen-DNA (Bouveret *et al.* 1998; Click und Webster 1998). Eine Deletion dieser Proteine führte in *E. coli* ebenfalls zur Freisetzung von periplasmatischen alkalischen Phosphatasen (Lazzaroni *et al.* 1999). Im Fall der Deletion von Pal lag diese Freisetzung während der stationären Phase bei 93 % und bei den Deletionen von TolA und TolB jeweils bei 100 %. Über eine BLASTp-Analyse wurden in *G. oxydans* 621H das zu Pal homologe Protein Gox1688 sowie das zu TolB homologe Protein Gox1687 identifiziert. Die Sequenzübereinstimmung lag im Fall von Pal bei 57 % mit 42 % Identität und im Fall von TolB bei 86 % bei einer Identität von 28 %. Für TolA konnte keine signifikante Homologie gefunden werden. Da in *E. coli* die maximale Sekretion durch die Deletion von TolB erreicht wurde und das entsprechende Gen in *G. oxydans* identifiziert werden konnte, erfolgte die Erstellung der Sekretionsmutante in dieser Arbeit durch die gezielte markerlose Deletion des Gens *gox1687*.

4.3.3 Phänotypische Untersuchung der Mutante *G. oxydans* Δ *tolB*

Mit Ausnahme der beiden Organismen *Erwinia chrysanthemi* und *Caulobacter crescentus* konnte gezeigt werden, dass das Tol-Pal-System nicht essentiell für bakterielles Wachstum ist (Dubuisson *et al.* 2005; Yeh *et al.* 2010). Häufig weisen diese Mutanten jedoch aufgrund der manipulierten Membranintegrität ein verändertes Erscheinungsbild, eine erhöhte Sensitivität gegenüber toxischen Verbindungen wie Antibiotika und Detergenzien, sowie eine verminderte Pathogenität auf (Bowe *et al.* 1998; Llamas *et al.* 2000; Heilpern und Waldor 2000; Cascales *et al.* 2002; Godlewska *et al.* 2009). Während *G. oxydans* Δ *tolB* unter Standardbedingungen ein ähnliches Wachstumsverhalten und ähnliche Verdopplungszeiten wie der Wildtyp zeigte (Kosciow *et al.* 2016), konnte ebenfalls eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber zugesetzten Antibiotika und Detergenzien beobachtet werden. Die TolB-defizienten Zellen bildeten bei der Teilung lange Ketten aus teilweise verkürzten Einzelzellen aus, was auf einen negativen Einfluss der Deletion auf das Längenwachstum sowie die Membraninvagination während der Zellteilung hinweist. Dieses optische Erscheinungsbild ist charakteristisch und konnte bereits bei anderen TolB-Deletionsmutanten beobachtet werden (Gerding *et al.* 2007; Egan und Vollmer 2013; Lo Sciuto *et al.* 2014). Auch ist anzunehmen, dass im Fall von *G. oxydans* Δ *tolB* eine Bildung und Freisetzung von Membranvesikeln gefüllt mit Periplasma nachweisbar ist. Dieses Phänomen wurde ebenfalls zuvor beschrieben und resultiert aus dem Ablösen der äußeren Membran von der Peptidoglykanschicht und anschließender Neuorganisation der Membran im wässrigen Milieu (Lazzaroni *et al.* 1999). Von anderen Organismen mit partiellen Deletionen des Tol-Pal-Systems ist außerdem bekannt, dass diese besonders empfindlich gegenüber einem erhöhten NaCl-Gehalt im Medium sowie einer niedrigen Osmolarität sind. Für erhöhte Zuckerkonzentrationen hingegen konnte in Experimenten mit *Erwinia chrysanthemi* gezeigt werden, dass das Vorhandensein von 10 % Saccharose sowie Galaktose, Glukose, Maltose und Laktose im Medium ein normales Wachstum unterstützt. Negative phänotypische Effekte der Deletion werden hingegen abgeschwächt (Dubuisson

et al. 2005). Eine mögliche Ursache ist die Eigenschaft einiger Zucker, darunter auch die von Saccharose, im Medium als Membran- und Proteinstabilisator agieren zu können (Crowe *et al.* 1988; Leslie *et al.* 1995; Molina-Höppner *et al.* 2004). Da *G. oxydans* $\Delta tolB$ in dieser Arbeit unter Standardbedingungen ohne NaCl-Zugabe sowie hohen Osmolaritäten angezogen wurde, wies die Deletion keine negativen Einflüsse auf das Wachstum unter den gegebenen Anzuchtbedingungen auf. Über Toluidinblau-Indikator-Agarplatten war es möglich, eine starke Sekretion der nativ im Periplasma lokalisierten Ribonukleasen I, kodiert durch *gox2020*, in der Deletionsmutante *G. oxydans* $\Delta tolB$ nachzuweisen (Abb. 19). Auch gelang der Nachweis der Sekretion der heterolog produzierten alkalischen Phosphatasen mit vorheriger Sec-abhängigen Translokation in das Periplasma (Abb. 20). Während beim Wildtyp von *G. oxydans* nur etwa 3 % der Gesamt-PhoA-Aktivität im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnte, lag dieser Wert im Fall von *G. oxydans* $\Delta tolB$ bei etwa 50 % und entsprach somit einer 19-fach erhöhten Sekretion (Kosciow *et al.* 2016). Etwa 23 % der Gesamtaktivität von PhoA wurde bei der Deletionsmutante in der periplasmatischen Fraktion nachgewiesen und die restliche Aktivität von etwa 30 % wurde im Cytoplasma lokalisiert (Abschnitt 3.5.3; Kosciow *et al.* 2016). Der verhältnismäßig große Anteil an im Periplasma verbliebenen alkalischen Phosphatasen lässt sich durch das vorhandene und intakte Peptidoglykan-Netzwerk erklären, welches sich zwischen der inneren und äußeren Membran befindet. Diese Zellstruktur stellt eine Art molekulares Sieb dar und erschwert die Sekretion von in das Periplasma translozierten Proteinen. In *E. coli* liegt für hydrophile Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 25 kDa eine freie Diffusion durch diesen Zellwandbestandteil vor. Die freie Diffusion wird jedoch mit zunehmender Proteingröße verlangsamt und unter normalen Bedingungen besitzt das intakte Peptidoglykan-Netzwerk eine Ausschlussgröße von etwa 50 kDa (Demchick und Koch 1996). *In vivo* ist der Tol-Pal-Komplex mit großer Wahrscheinlichkeit an der erfolgreichen Überquerung von Proteinen mit größerer molekularer Masse durch die Peptidoglykanschicht beteiligt (Clavel *et al.* 1998). Geht man nun von einer ähnlichen Ausschlussgröße im Fall von *G. oxydans* aus, so liegt die rekombinant produzierte alkalische Phosphatase PhoA als Monomer mit einem Molekulargewicht von etwas über 50 kDa genau in diesem Bereich und als funktionales Dimer deutlich darüber. Durch die Deletion von TolB ist der native Tol-Pal-Komplex gestört und kann nicht mehr effizient die Translokation von PhoA über das Peptidoglykan-Netzwerk vermitteln. Dies hat eine Retention und Anstauung von PhoA im Periplasma zur Folge und erklärt so die hohe relative Aktivität der alkalischen Phosphatasen im periplasmatischen Kompartiment von *G. oxydans* $\Delta tolB$ *phoA*.

Dennoch war es in diesem Teil der Arbeit möglich, eine Mutante von *G. oxydans* zu erzeugen, die aufgrund gezielter Deletion die Sekretion von periplasmatischen Proteinen erlaubt. Diese Mutante ist kompatibel mit dem pBBR1-basierten Expressionssystem und stellt so einen geeigneten Stamm für die Produktion von Exoenzymen in *G. oxydans* dar. Trotz des veränderten morphologischen Phänotyps lag unter Normalbedingungen bei geringem Salzstress sowie hoher Osmolarität keine signifikante Beeinträchtigung des Wachstums vor. Somit ist *G. oxydans* $\Delta tolB$ auch für die biotechnologische und industrielle Anwendung geeignet.

4.4 Saccharose, Raffinose und Laktose als Wachstumssubstrate für *G. oxydans*

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit konnte durch ein geeignetes Expressionssystem und die Produktion der periplasmatischen Trehalase TreA eine Verstoffwechslung des Disaccharids Trehalose durch *G. oxydans* erreicht werden. Das Wachstum von *G. oxydans treA* mit diesem Modellzucker als Substrat bestätigte den Erfolg der genutzten Strategie zur Erweiterung des Substratspektrums. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit erfolgte nun eine Übertragung dieses Systems von Trehalose auf nachhaltige und günstige kurzkettige Zucker.

4.4.1 Die Verwertung von Saccharose durch den Wildtyp *G. oxydans* 621H

Innerhalb der Bacteria wurden bereits verschiedene Strategien beschrieben, mit denen die enzymatische Spaltung von Saccharose, bestehend aus α,β -1,2-glykosidisch verknüpfter D-Glukose und D-Fruktose, ermöglicht wird. Eine Möglichkeit ist die Expression von extrazellulären Levan-beziehungsweise Inulosucrasen (Dedonder 1966; Lyness und Doelle 1983; Olivares-Illana *et al.* 2003; Ozimek *et al.* 2006). Diese Enzyme katalysieren gleichzeitig die hydrolytische Spaltung von Saccharose und eine Transfruktosylationsreaktion, bei der die entstehende Fruktose auf einen weiteren Fruktosylrest übertragen wird. Dabei findet oft eine Polymerisation statt. Je nach Enzymklasse, entsteht entweder das β -2,6-verknüpfte Fruktosepolymer Levan oder das β -2,1-verknüpfte Fruktosepolymer Inulin (Li *et al.* 2015b). Abhängig von den exakten Reaktionsbedingungen kann das Produktspektrum dieser Enzyme sowie der Polymerisationsgrad der entstehenden Produkte variieren (Yanase *et al.* 1992; Goldman *et al.* 2008).

Levansucrasen der Glykosid-Hydrolase-Familie 68 sind innerhalb der Gattung *Gluconobacter* weit verbreitet, jedoch unterscheiden sich die verschiedenen Arten und Stämme außerordentlich in ihren Levanproduktionsraten (Jakob *et al.* 2012). Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *G. oxydans* 621H besitzt nach bioinformatischer Analyse eine Levansucrase, kodiert durch das Gen *gox0873*. Dieses Enzym ist hoch homolog zur gut charakterisierten und sehr aktiven Levansucrase SacB aus *Zymomonas mobilis*, einem nah verwandten α -Proteobakterium (Sequenzübereinstimmung 95 % bei einer Identität von 59 %; Gunasekaran *et al.* 1995). Beide Enzyme besitzen kein N-terminales Sec- oder Tat-abhängiges Signalpeptid und unterscheiden sich so zum Beispiel von der Levansucrase LsdA aus *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Dieses Enzym trägt eine Sec-abhängige Signalsequenz und wird über den Sekretionsweg Typ II sekretiert (Arrieta *et al.* 2004; Martínez-Fleites *et al.* 2005). Der *in vivo* genutzte Exportweg für die Levansucrase SacB ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. In *Z. mobilis* konnte gezeigt werden, dass die erfolgreiche Expression und Sekretion von SacB maßgeblich durch das Expressions-Aktivatorprotein ZliE und das Sekretions-Aktivatorprotein ZliS bestimmt wird (Oda *et al.* 1994; Kondo *et al.* 1994). Der in dieser Arbeit verwendeten Stamm *G. oxydans* 621H weist jedoch keine zu ZliE und ZliS homologen Proteine auf. Trotz der deutlichen Sequenzübereinstimmung zwischen SacB aus *Z. mobilis* und *Gox0873* aus *G. oxydans* 621H zeigt der letztgenannte Stamm keine Levanproduktion in Anwesenheit von Saccharose. Ein Grund hierfür könnte ein Fehlen von entsprechenden Sekretions-Aktivatoren oder von Untereinheiten des Exportmechanismus sein. Eine

andere Möglichkeit könnte der Austausch einer zentralen Aminosäure durch eine Punktmutation sein, was eine Inaktivierung der Transfruktosylreaktion von Gox0873 verursacht haben könnte. Diese Beobachtung wurde für den Histidinrest an Position 296 im Fall der Levansucrase SacB von *Z. mobilis* gemacht (Goldman *et al.* 2008). Alle vorhergesagten und für eine funktionale Levansucrase essentiellen konservierten Bereiche sind bei Gox0873 jedoch vorhanden (Jakob *et al.* 2012). Im Fall von SacB von *Z. mobilis* ist auch bekannt, dass erst bei pH-Werten unterhalb von 6 und in Anwesenheit von NaCl eine effiziente Levanproduktion vorliegt. Bei einem neutralen pH-Wert und geringer Ionenstärke besitzt dieses Enzym eine andere aktive Konformation, durch die der Schwerpunkt der Aktivität auf der Saccharose-Hydrolyse und nicht auf der Transfruktosylierungsreaktion liegt (Goldman *et al.* 2008). Im Fall von *G. oxydans* zeigten sowohl niedrige pH-Werte als auch der Zusatz von 20 mM NaCl keine Aktivierung der Levanproduktion. Neben Gox0873 gibt es, bioinformatischen Analysen zufolge, keinen Hinweis auf weitere extra- oder intrazelluläre Sucrasen in dem verwendeten Stamm *G. oxydans* 621H. In Wachstumsexperimenten mit Saccharose als einzige C-Quelle (50 mM) erreichte der Wildtyp eine finale OD_{600nm} von 0,25 - 0,3. Diese niedrige Zelldichte zeigt, dass der Stamm *G. oxydans* 621H nicht zu einer effizienten Nutzung von Saccharose als Substrat befähigt ist. Mit großer Wahrscheinlichkeit wurden Glukose und Fruktose genutzt, welche als Kontamination in der Saccharose vorlagen.

4.4.2 Die Erweiterung des Substratspektrums um Saccharose und Raffinose

Die einfache industrielle Gewinnung von raffinierter Saccharose aus Zuckerrübe, Zuckerrohr oder Zuckerpalme führt dazu, dass ihr Marktpreis niedrig ist (Hatch und Slack 1966; Giaquinta 1979; Ho *et al.* 2007). Durch den Einsatz dieses Disaccharids als nutzbares Substrat für *G. oxydans* könnten die Produktionskosten für Glukose- und Fruktose-basierte Feinchemikalien stark gesenkt werden. Zuckerrüben weisen einen Saccharoseanteil des Trockengewichts von 75 % und mehr auf (Wyse 1979), sodass auch der direkte Einsatz von homogenisierten Rüben anstelle von raffinierter Saccharose möglich erscheint. Zwischenschritte einer vorgeschalteten Raffination könnten so eingespart werden. Die direkte Verwendung von Zuckerrüben würde daher einerseits einen kostensenkenden Effekt mit sich führen und andererseits eine Optimierung der nachhaltigen Produktion aus bioökonomischer Sicht bedeuten.

Der Wildtyp *G. oxydans* 621H zeigt nur ein minimales Wachstum auf Saccharose, was vermutlich durch eine geringe hydrolytische Aktivität der Levansucrase Gox0873 begründet ist. Daher wurde in diesem Teil der Arbeit das Substratspektrum von *G. oxydans*, analog zur Konstruktion des Trehalose-hydrolysierenden Stamms *G. oxydans treA*, um das Substrat Saccharose erweitert. Als geeignete Hydrolase wurde dabei SacC aus *Z. mobilis* ausgewählt. Dieses Enzym zeigt eine deutliche Sequenzhomologie zur Levansucrase SacB, katalysiert jedoch ausschließlich die extrazelluläre Hydrolyse von Saccharose (Kannan *et al.* 1995). Wie auch bei SacB ist im Fall von SacC kein Sec- oder Tat-abhängiges Signalpeptid nachweisbar, sodass der Export *in vivo* wahrscheinlich ebenfalls über ein spezifisches Sekretions-Aktivatorprotein vermittelt wird (Kondo *et al.* 1994).

In *G. oxydans* ist diese Form des Proteinexports bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit erfolgte die Translokation von SacC in das Periplasma daher über den Sec-vermittelten Transportweg mittels einer Fusion an die Signalsequenz von PeIB. Die rekombinant produzierte Sucrase SacC konnte aus

G. oxydans sacC aufgereinigt werden und besaß unter den für *G. oxydans* physiologischen Bedingungen (30 °C, pH 6,8) eine spezifische Aktivität von $1 \pm 0,2 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. Der bekannte V_{max} -Wert liegt mit $900 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ deutlich darüber (O'Mullan *et al.* 1992). Eine Ursache hierfür könnte die aus der Lyse ganzer Zellen resultierende zusätzliche Aufreinigung der noch ungefalteten Enzyme sein. Diese Präproteine liegen nach der Translation im Cytoplasma an das Chaperon SecB gebunden vor. Das Chaperon verhindert die vorzeitige Faltung und ermöglicht die Interaktion des Präproteins mit dem Translokationsapparat (Driessen *et al.* 2001; Mori und Ito 2001). Durch Lyse der Zellen werden auch diese ungefalteten Präproteine über den C-terminal angefügten Strep-Tag aufgereinigt, besitzen jedoch keine enzymatische Aktivität. Somit könnte die Berechnung der spezifischen Aktivität von SacC, durch das Vorhandensein von zusammen mit den reifen SacC-Proteinen aufgereinigten Präproteinen, verfälscht worden sein. Möglicherweise besitzt die Kombination aus SacC und der Signalsequenz von PelB eine schlechte Kompatibilität in Bezug auf die Translokationseffizienz, verglichen mit den Fusionsprodukten SPpelB-phoA und SPpelB-treA. Eine schlechte Translokationseffizienz kann zu einer Akkumulation der noch ungefalteten Proteine im Cytoplasma führen, wenn die Translationsrate die Translokationsrate deutlich übersteigt.

Während der Stamm *G. oxydans sacC* das Substrat Saccharose nicht als Kohlenstoffquelle nutzen konnte, erreichte die *sacC* exprimierende TolB-Deletionsmutante von *G. oxydans* bei einer Saccharosekonzentration von 50 mM eine hohe finale OD von 1,9.

Diese Beobachtung ist auf die Häufigkeit von TolB im Periplasma Gram-negativer Bakterien zurückzuführen. Diese Häufigkeit wurde bereits zuvor durch Proteomanalysen nachgewiesen (Imperi *et al.* 2009; Lo Sciuto *et al.* 2014). Eine Deletion von TolB könnte dazu geführt haben, dass der Sec-abhängige Transportmechanismus im Fall von *G. oxydans ΔtolB* weniger stark ausgelastet ist und so die Translokation heterolog produzierter Enzyme im Vergleich zum Wildtyp verbessert wurde. Auch wenn Disaccharide, hier Saccharose, die Porine der äußeren Membran passieren können und eine Translokation von SacC in das Periplasma für eine effiziente Hydrolyse ausreichend sein sollte, könnte durch eine Sekretion von SacC die hydrolytische Spaltung der Substrate verbessert werden.

Wie BLASTp-Analysen zeigten, besitzen die nativ vorhandenen Porine in *G. oxydans* die stärksten Sequenzhomologien mit Porin B, kodiert durch *oprB*, aus *Pseudomonas (P.) aeruginosa*. Dieses Porin ist an den unspezifischen Transport von ausschließlich Monosacchariden angepasst, da *P. aeruginosa* nur wenige Saccharide mit einem Molekulargewicht über 200 kDa verstoffwechseln kann (Wylie und Worobec 1995, Hancock und Brinkman 2002). *G. oxydans* ist ebenfalls vollständig an Monosaccharide als Substrat angepasst, sodass auch in diesem Organismus das Vorhandensein von Monosaccharid-spezifischen Porinen denkbar ist. Dieser Hypothese widerspricht jedoch die in dieser Arbeit gezeigte Nutzung des Disaccharids Trehalose durch *G. oxydans treA* und die in anderen *Gluconobacter*-Stämmen nachgewiesene periplasmatische Oxidation verschiedener Disaccharide (Kiryu *et al.* 2015)

Die Verdopplungszeit von *G. oxydans ΔtolB sacC* mit 50 mM Saccharose betrug etwa 15 h und war somit viermal höher als die Verdopplungszeit des Stammes *G. oxydans treA* mit Trehalose als Substrat. Die Wachstumsrate von *G. oxydans treA* mit Trehalose stimmte mit den bekannten Wachstumsraten von *G. oxydans* mit Glukose als C-Quelle überein (Richhardt *et al.* 2013; Kosciow *et al.* 2014). Für diese Beobachtung sind verschiedene Erklärungen möglich. Wie durch Tests gezeigt wurde, besitzt die durch

G. oxydans $\Delta tolB$ *sacC* produzierte Sucrase eine deutlich verminderte Aktivität, die entweder auf eine Fehlfaltung oder eine unzureichende Translokation über die Cytoplasmamembran zurückzuführen ist. Die geringe hydrolytische Aktivität von SacC außerhalb der Zelle könnte der limitierende Faktor für die Saccharose-Spaltung sein und so die niedrige Wachstumsrate von *G. oxydans* $\Delta tolB$ *sacC* mit Saccharose als Substrat verursachen. Durch Optimierung der Translokationseffizienz, möglicherweise durch eine verbesserte Signalsequenz-SacC-Kompatibilität, könnte eine Erhöhung der Menge aktiven Enzyms außerhalb der Zelle erfolgen. Diese beschleunigte Saccharose-Hydrolyse würde in einer Erhöhung der Wachstumsrate resultieren. Auch die Nutzung der TolB-Deletionsmutante von *G. oxydans* als Produktionsstamm von SacC kann sich negativ auf die Verdopplungszeit auswirken. Unter Standardbedingungen weist *G. oxydans* $\Delta tolB$ eine ähnliche Wachstumsrate wie der Wildtyp auf (Kosciow *et al.* 2016), zeigt jedoch, in Anwesenheit von Kanamycin zur Erhaltung des SacC-Expressionssystems, eine verminderte Verdopplungszeit aufgrund der erhöhten Antibiotika-Sensitivität (Lo Sciuto *et al.* 2014).

Das langsamere Wachstum des Stamms *G. oxydans* $\Delta tolB$ *sacC* mit Saccharose als C-Quelle im Vergleich zu *G. oxydans* *treA* mit Trehalose als C-Quelle ist auch durch die bei der Spaltung des Disaccharids entstehenden Monosaccharide begründet. Während im Fall von Trehalose pro Molekül zwei Moleküle Glukose entstehen, werden durch die Hydrolyse von Saccharose ein Molekül Glukose und ein Molekül Fruktose gebildet. Beide Zucker werden durch *G. oxydans* 621H unterschiedlich verstoffwechselt. Beim Wachstum auf Glukose liegt die Verdopplungszeit des Wildtyps bei etwa 3,5 h (Richhardt *et al.* 2013; Kosciow *et al.* 2014, Abschnitt 4.2). Mit Fruktose als Substrat wächst der Organismus deutlich langsamer und besitzt eine Verdopplungszeit von 6,5 h (persönliche Mitteilung Anna Siemen, M.Sc.). Fruktose wird im Stamm *G. oxydans* 621H hauptsächlich intrazellulär metabolisiert. Dabei erfolgt nach deren Aufnahme eine Phosphorylierung der Fruktose zu Fruktose-6-Phosphat durch die Fruktokinase Gox0284 (Richhardt *et al.* 2012). Diese Verbindung wird anschließend weiter durch die Phosphoglukose-Isomerase Gox1704 zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt und kann so in den oxidativen Pentosephosphatweg einfließen.

Die Absenkung des pH-Werts (Abb. 27) bei einem Wachstum auf Saccharose, welche durch SacC in Fruktose und Glukose hydrolysiert wird, resultiert einerseits aus der Bildung von Glukonat durch die periplasmatische Oxidation von Glukose und andererseits aus der intrazellulären Produktion von Acetat aus Pyruvat durch die Pyruvatdecarboxylase Gox1081 und die NADP-abhängige Acetaldehyd-Dehydrogenase Gox2018 (Krajewski *et al.* 2010; Richhardt *et al.* 2012).

In diesem Abschnitt der Arbeit gelang es durch Konstruktion von *G. oxydans* $\Delta tolB$ *sacC* erstmalig einen Stamm von *G. oxydans* zu erstellen, der das Disaccharid Saccharose als einzige Kohlenstoffquelle für ein Wachstum bis zu hohen Zelldichten nutzen konnte. Die finale OD_{600nm} überstieg dabei sogar die Zelldichten, die mit äquivalente Konzentration an Glukose im Medium erreicht wurden. Eine Ursache hierfür ist wahrscheinlich, wie auch im Fall von *G. oxydans* *treA* mit Trehalose als Substrat, die intrazelluläre Verstoffwechslung eines wesentlichen Teils der freigesetzten Glukose anstelle der periplasmatischen Oxidation des Zuckers zu Glukonat. Darüber hinaus besitzt *G. oxydans* $\Delta tolB$ *sacC* zusätzlich die Fähigkeit, neben Saccharose auch das Trisaccharid Raffinose (Galaktosyl- α -1,6-Glukosyl- α -1, β -2-Fruktose) als einzige Kohlenstoffquelle für ein Wachstum zu nutzen. Diese Fähigkeit resultiert aus dem natürlichen Substratspektrum der Sucrase SacC, für die neben Saccharose auch

eine hydrolytische Aktivität gegenüber Raffinose beschrieben wurde (O'Mullan *et al.* 1992). Die spezifische Aktivität mit Raffinose als Substrat ist 70 % geringer als die spezifische Aktivität mit Saccharose. Die deutliche Präferenz für Saccharose durch SacC erklärt die schlechtere Wachstumsrate von *G. oxydans* $\Delta tolB sacC$ mit 50 mM Raffinose, verglichen mit der äquivalenten Konzentration an Saccharose als einzige C-Quelle (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wird ein Molekül Raffinose in das Monosaccharid Fruktose und das Disaccharid Melibiose (Galaktose- α -1,6-Glukose) gespalten. Fruktose kann von *G. oxydans* $\Delta tolB sacC$ metabolisiert werden, die Melibiose verbleibt hingegen unverstoffwechselt im Medium. Diese Akkumulation des äußerst hochpreisigen Disaccharids Melibiose im Kulturüberstand kann aus biotechnologischer Sicht jedoch von großem Nutzen sein, da neue Erkenntnisse die Bedeutung von Melibiose als unverdaubares Trehalose-Analogon zeigten (Lee *et al.* 2015; Lin *et al.* 2016). So besitzt Melibiose bei pharmazeutischer Anwendung einen positiven Effekt auf neurodegenerativen Erkrankungen, z.B. Alzheimer oder Parkinson (Lee *et al.* 2015; Lin *et al.* 2016). Auch für den Bereich der Lebensmittelindustrie stellt Melibiose eine äußerst interessante Verbindung da. So konnten präbiotische Effekte für dieses Disaccharid nachgewiesen werden, da Melibiose von Vertretern der Gattungen *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* im Darm genutzt werden kann und deren Prävalenz positiv beeinflusst (Côté *et al.* 2003; Tzortzis *et al.* 2004). Des Weiteren wurde gezeigt, dass oral verabreichte Melibiose die Immunantwort durch T-Helferzellen vom Typ 2 stark supprimieren kann. Im Fall von Lebensmittelallergien konnte so die Toleranz bei gleichzeitiger Gabe der entsprechenden allergenen Verbindung deutlich erhöht werden. Somit ist auch der Einsatz von Melibiose zur Unterdrückung von Lebensmittelallergien denkbar (Tomita *et al.* 2007).

Der in der vorliegenden Arbeit erstellte Stamm *G. oxydans* $\Delta tolB sacC$ stellte darüber hinaus die Grundlage für weitere Arbeiten dar, bei denen die effiziente Produktion von 5-Ketofruktose aus Saccharose durch *G. oxydans* ermöglicht wurde (Europäisches Patentregister, Anmeldenummer EP17175730.5). Bei 5-Ketofruktose handelt es sich um einen potentiellen kalorienarmen Zuckerersatzstoff, der durch die Oxidation von Fruktose mittels Fruktose-Dehydrogenase gewonnen werden kann (Kawai *et al.* 2013). Die Synthese von 5-Ketofruktose aus dem Substrat Saccharose basiert auf der Anzucht von zwei verschiedenen *Gluconobacter*-Stämmen in einem Ein-Fermenter-System. Der erste in dieser Arbeit erstellte Stamm *G. oxydans* $\Delta tolB sacC$ besitzt die Fähigkeit Saccharose zu hydrolysieren, wobei die Produkte Glukose und Fruktose entstehen. Der zweite Stamm, *G. oxydans* $\Delta hsdR fdh$ (Europäisches Patentregister, Anmeldenummer EP17175730.5), exprimiert die Gene *fdhC*, (M1V1V5), *fdhL* (M1VMF7) und *fdhS* (M1VB40), welche für die drei Untereinheiten der Fruktose-Dehydrogenase aus *G. japonicus* kodieren (Kawai *et al.* 2013). *G. oxydans* $\Delta hsdR fdh$ kann somit die durch *G. oxydans* $\Delta tolB sacC$ aus der Hydrolyse von Saccharose freigesetzte Fruktose direkt periplasmatisch zu 5-Ketofruktose oxidieren, welche anschließend in den Kulturüberstand freigesetzt und dort akkumuliert wird. Beiden Stämmen dient dabei das zweite aus der Hydrolyse von Saccharose resultierende Produkt Glukose als primäre C-Quelle. Im Hinblick auf eine nachhaltigere und ressourcenschonendere Produktion von 5-Ketofruktose erfolgten auch Experimente, bei denen anstelle von aufgereinigter Saccharose direkt zerkleinerte und autoklavierte Zuckerrüben als Substrat für das Zwei-Stamm-System eingesetzt wurden. Zuckerrüben enthalten einen Saccharose-Massenanteil von bis zu 75 % des Trockengewichts (Wyse 1979), sodass diese als Substrat für die mikrobielle 5-

Ketofruktose-Produktion geeignet waren. Wie im Fall der aufgereinigten Saccharose konnte auch durch direkten Einsatz von Rüben eine effiziente Produktion von 5-Ketofruktose durch das Zwei-Stamm-System erreicht werden (persönliche Mitteilung Anna Siemen, M.Sc.). Diese Ergebnisse zeigten die aus biotechnologischer und industrieller Sicht gute Eignung des in der vorliegenden Arbeit konstruierten Stamms *G. oxydans* $\Delta tolB$ *sacC* für die umweltschonende Produktion von Fruktose- und Glukose-basierten Feinchemikalien aus nachwachsenden und günstigen Rohstoffen.

4.4.3 Laktose als potentielles Substrat für *G. oxydans*

In dieser Arbeit sollte neben einem Wachstum auf Trehalose, Saccharose und Raffinose auch ein Wachstum mit dem günstigen Disaccharid Laktose als Substrat ermöglicht werden, wozu *G. oxydans* 621H natürlicherweise nicht befähigt ist (King und Cheldelin 1957; Kiryu *et al.* 2015). Laktose kommt z.B. in Kuhmilch vor und erreicht dort einen Gehalt von über 40 g l⁻¹ (Luinge *et al.* 1993). Bei der industriellen Käseproduktion wird Laktose zusammen mit der Molke als unerwünschtes Nebenprodukt abgetrennt und steht somit leicht zugänglich in großer Menge zur Verfügung. Daher stellt das Disaccharid Laktose ein ideales Ausgangssubstrat für die Produktion von Feinchemikalien durch *G. oxydans* dar. Bisher ist für die Gewinnung von Glukonat aus Molke durch *G. oxydans* der kostenintensive Zusatz von aufgereinigten β -Galaktosidasen notwendig, die eine Spaltung der Laktose in die Monosaccharide Glukose und Galaktose katalysieren. Anschließend erfolgt eine Oxidation von Glukose zu Glukonat durch *G. oxydans* (van Huynh *et al.* 1986; El-Sayed *et al.* 1996). Die Vermeidung der Zugabe reinen Enzyms sowie die direkte Nutzung von Laktose stellen somit ein angestrebtes Ziel der Prozessoptimierung dar. Als mögliche periplasmatische β -Galaktosidasen wurden in dieser Arbeit das Enzym BoGH2A aus *Bacteroides ovatus* sowie die bisher nicht charakterisierten Enzyme Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1686 aus *Akkermansia muciniphila* für die Erweiterung des Substratspektrums auf Laktose ausgewählt.

Im Fall von BoGH2A wurde für das rekombinant produzierte und aufgereinigte Enzym (unter für *G. oxydans* optimalen Bedingungen) eine spezifische Aktivität von $6,6 \pm 0,8$ U mg⁻¹ mit dem chromogenen Substrat *p*-NPGal gemessen. Der Literaturwert liegt jedoch etwas niedriger bei einer spezifischen Aktivität von 2,5 U mg⁻¹ (Larsbrink *et al.* 2014). Auch der bekannte K_M-Wert von 0,09 mM liegt unterhalb des in dieser Arbeit bestimmten K_M-Werts für dieses Substrat von 0,6 mM. Neben den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen könnte auch die Entfernung der nativen N-terminalen Membranhelix einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben, da diese die Tertiärstruktur des reifen Proteins verändern kann. Eine enzymatische Aktivität von BoGH2A im Stamm *G. oxydans* $\Delta tolB$ *boGH2A* konnte auch durch intakte Zellen nachgewiesen werden, sodass von einer erfolgreichen Translokation des Enzyms über den Sec-vermittelten Transportweg ausgegangen werden kann. Dennoch zeigten intakte Zellen von *G. oxydans* $\Delta tolB$ *boGH2A* nur eine geringe Hydrolyse von Laktose (Abb. 46). Möglicherweise stellt Laktose kein natives Substrat von BoGH2A dar, auch wenn es sich bei diesem Enzym um eine β -Galaktosidase handelt. Es ist bekannt, dass β -Galaktosidasen in der Natur auf die Hydrolyse unterschiedlicher β -galaktosidisch verknüpfter Verbindungen spezialisiert sind, zu denen neben verschiedenen Di-, Oligo- oder Polysacchariden auch beispielsweise Glykoproteine oder Glykosphingolipide gehören (Tanaka und Suzuki 1977; Terra *et al.* 2009; Husain 2010). Im

Wirtsorganismus *Bacteroides ovatus* gehört BoGH2A zu einer komplexen Enzymsausstattung, welche die vollständige Degradation von stark verzweigten Xyloglukanen ermöglicht (Larsbrink *et al.* 2014). Dabei wird das Rückgrat dieses Polysaccharids zunächst durch Endohydrolasen (z.B. BoGH5A oder BoGH9A), die sich in der äußeren Membran befinden, in kleine Fragmente gespalten. Diese verzweigten Oligosaccharide können die SusC-artigen Porine von *Bacteroides ovatus* passieren und in das Periplasma gelangen (Martens *et al.* 2009). Dort findet eine weitere Hydrolyse der kurzkettigen Glukane und ihrer Verzweigungen, welche vor allem aus den Zuckern Xylose, Galaktose, Fukose und Arabinose bestehen, statt. BoGH2A katalysiert hier als periplasmatisches, membrangebundenes Enzym die Hydrolyse von β -1,2-Bindungen zwischen D-Galaktose und D-Xylose (Larsbrink *et al.* 2014). Die in dieser Arbeit gefundene leicht erhöhte Nutzung von Laktose als Substrat durch den Stamm *G. oxydans* $\Delta tolB$ *boGH2A* im Vergleich zum Wildtyp resultierte möglicherweise aus einer minimalen hydrolytischen Aktivität von BoGH2A mit der β -1,4-verknüpften Laktose. Die Säurebildung ergab sich im Fall von *G. oxydans* $\Delta tolB$ *boGH2A* durch die Verstoffwechslung der abgespaltenen Glukose zu Glukonat (Abb. 46 B).

Neben BoGH2A konnten auch die putativen periplasmatischen β -Galaktosidasen Amuc_0824 und Amuc_1686 erfolgreich durch *G. oxydans* und *G. oxydans* $\Delta tolB$ produziert werden (Abschnitt 3.7.3). Eine mögliche β -Galaktosidaseaktivität wurde bisher nur auf Basis bioinformatischer Analysen vorhergesagt, sodass zunächst ein Nachweis der Aktivität unter an *G. oxydans* angepassten Bedingungen erfolgte. Das heterolog produzierte und aufgereinigte Enzym Amuc_1686 zeigte bei 30 °C und einem pH-Wert von 6,8 eine spezifische Aktivität von 80 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ bei einem K_M -Wert von 0,25 mM mit *p*-NPGal als Substrat. Bei Amuc_0824 lag die spezifische Aktivität für *o*-NPGal unter den gegebenen Bedingungen bei 20 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ und einem K_M -Wert von 1 mM. Für beide Enzyme wurde eine β -galaktosidische Aktivität gezeigt, die unter den gewünschten Bedingungen ausreichend hoch und somit für eine Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* geeignet war. Im Fall von Amuc_1686 wurde zusätzlich nach Produktion des Enzyms in den Stämmen *E. coli* DH5 α und *G. oxydans* $\Delta tolB$ eine Zellfraktionierung durchgeführt. Dadurch konnte eine Analyse der Translokationseffizienz des Fusionsprodukts, bestehend aus der PelB-Signalsequenz und Amuc_1686, erfolgen. In beiden Produktionsstämmen wurde der Hauptanteil der Aktivität von Amuc_1686 in der cytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen. Dies spricht für ein unausgewogenes Verhältnis zwischen der Translations- und Translokationsrate dieses Enzyms. Durch einen Austausch des N-terminalen Signalpeptids könnte die Kompatibilität zwischen Protein und Signalsequenz erhöht und so auch die Translokation über die Cytoplasmamembran beschleunigt werden. Anders als in *E. coli*, in dem die native Membranintegrität eine Sekretion von Amuc_1686 verhindert, wurde im Fall von *G. oxydans* $\Delta tolB$ *amuc_1686* etwa 13 % der β -Galaktosidase-Gesamtktivität im Überstand gemessen. Der im Periplasma von *G. oxydans* $\Delta tolB$ *amuc_1686* gemessene Anteil dieser Aktivität ist mit 1 % sehr gering und spricht für eine effiziente Sekretion der erfolgreich translozierten Enzyme in den Kulturüberstand (Abschnitt 3.7.3). Mittels Aktivitätsmessungen an intakten Zellen wurde auch für Amuc_0824 der Nachweis einer erfolgreichen Translokation in das Periplasma durch *G. oxydans* *amuc_0824* erbracht. Durch Verwendung von *G. oxydans* $\Delta tolB$ *amuc_0824* ließ sich die extrazelluläre Umsetzung von *o*-NPGal noch um mehr als 30 % optimieren (Abb. 47).

Sowohl für *G. oxydans* $\Delta tolB amuc_{1686}$ als auch *G. oxydans* $\Delta tolB amuc_{0824}$ konnte eine erfolgreiche Proteinproduktion und -sekretion nachgewiesen werden, jedoch war keiner der Stämme dazu befähigt, Laktose als Wachstumssubstrat nutzen zu können.

Zudem zeigten HPLC-Analysen, dass weder das aufgereinigte Enzym Amuc_0824, noch das Enzym Amuc_1686 Laktose hydrolysieren konnte. Wie auch im Fall von BoGH2A katalysieren diese β -Galaktosidasen mit großer Wahrscheinlichkeit die extrazelluläre Spaltung von β -galaktosidischen Bindungen innerhalb bisher noch unbekannter Substrate. Da es sich bei *A. muciniphila* um ein Mucin-spaltendes Darmbakterium handelt, ist von einer Beteiligung dieser Enzyme an der Degradation von komplexen Mucin-artigen Polysacchariden auszugehen (Derrien *et al.* 2004; Derrien *et al.* 2008). Diese Strukturen sind stark verzweigt und beinhalten D-Galaktose in verschiedenen Verknüpfungsarten, sodass das Vorhandensein von Galaktosidasen unterschiedlicher Glykosidhydrolase-Familien notwendig ist (Willis *et al.* 1996; Crost *et al.* 2016). Da weder Amuc_0824 noch Amuc_1686 die Nutzung von Laktose als Wachstumssubstrat von *G. oxydans* ermöglichen konnten, wurde die Arbeit mit diesen Enzymen im Hinblick auf die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* eingestellt.

Mostafa *et al.* 2002 verfolgten eine andere Strategie, die die Nutzung von Laktose durch *G. oxydans* ermöglichen sollte. Eine Koproduktion der Laktose-Permease LacY zusammen mit der intrazellulären β -Galaktosidase LacZ aus *E. coli* ermöglichte *G. oxydans* eine partielle Nutzung von Laktose. Dies konnte experimentell durch die Abnahme der Laktose-Konzentration im Kulturüberstand sowie durch die Zunahme der Säureproduktion bestätigt werden. Die erzeugten Klone waren jedoch nicht stabil und variierten stark in ihrer Laktose-hydrolysierenden Effizienz. Als mögliche Ursache diskutierten die Autoren dabei die Akkumulation von intrazellulärer Galaktose, welche erst nach vollständigem Glukose-Verbrauch von etwa 1 % der Zellen metabolisiert wurde. Mostafa *et al.* sahen daher die Erklärung für die Instabilität der erzeugten Klone in einer angeblichen Inhibierung des intrazellulären Glukose-Stoffwechsels durch Galaktose (Mostafa *et al.* 2002). Ein solcher inhibitorischer Effekt von Galaktose auf den Glukose-Metabolismus von Prokaryoten konnte bisher in der Literatur nicht gezeigt werden.

Die von Mostafa *et al.* verfolgte Strategie der intrazellulären Verstoffwechselung von Laktose diente ausschließlich einer Zunahme von Biomasse, da bei dieser Form der Metabolisierung die Glukose in den oxidativen Pentosephosphatweg einfließt und nicht periplasmatisch zu Glukonat oxidiert wird. Für die Produktion von Feinchemikalien der aus der Hydrolyse von Laktose resultierenden Produkte Glukose und Galaktose mittels periplasmatischer Oxidation ist die intrazelluläre Hydrolyse von Laktose durch *G. oxydans* als Strategie ungeeignet.

Ein weiteres interessantes Anwendungsfeld für einen Laktose-spaltenden *G. oxydans*-Stamm ist das Gebiet der Biosensorik. In diesem Bereich wird *G. oxydans* bereits erfolgreich für die Detektion von verschiedenen Zuckern und Alkoholen in Form von immobilisierten Zellen genutzt (Svitel *et al.* 1998; Reshetilov *et al.* 2015). Da *G. oxydans* keine Disaccharide oxidieren kann, erfolgt die Detektion von Laktose über eine Ko-Immobilisation mit permeabilisierten Zellen von *Kluyveromyces marxianus*, einer Hefeart, die eine β -Galaktosidase exprimiert (Svitel *et al.* 1998; Švitel *et al.* 2006). Durch einen β -Galaktosidase-produzierenden Stamm von *G. oxydans* wäre eine Ko-Immobilisation nicht notwendig. Laktose könnte im Periplasma zu Galaktose und Glukose gespalten werden und die etablierte Detektion von Glukose anschließend als ein indirekter Nachweis für die Spaltung der Laktose fungieren. Diese

Anwendung wäre ebenso für die Stämme *G. oxydans treA* und *G. oxydans $\Delta tolB$ sacC* denkbar, welche eine biosensorische Detektion von Trehalose und Saccharose ermöglichen könnten. Analog zur Laktose, erfolgt der Nachweis von Saccharose bisher über Ko-Immobilisierung von *G. oxydans* mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welche über eine nativ exprimierte Invertase die Spaltung von Saccharose ermöglicht (Svitel *et al.* 1998; Švitel *et al.* 2006).

4.5 Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um Polysaccharide

Die Erstellung einer TolB-Deletionsmutante von *G. oxydans* ermöglichte die Sekretion von nativen periplasmatischen Proteinen sowie des Reporterenzym PhoA, welches heterolog im Cytoplasma produziert und über einen Sec-abhängigen Transportweg in das Periplasma transloziert wurde (Abschnitt 4.3; Kosciow *et al.* 2016). In diesem Teil der Arbeit sollte die sekretorische Eigenschaft von *G. oxydans $\Delta tolB$* genutzt werden, um durch die Produktion extrazellulärer Hydrolasen Polysaccharide im Medium zu spalten.

Polysaccharide besitzen aufgrund ihrer Größe keine Möglichkeit, die Pore der äußeren Membran passieren zu können. Die Degradation dieser Polymere muss über spezifische Exoenzyme erfolgen, die durch den Prozess der Sekretion in den Kulturüberstand gelangen (Abb. 74). Es wird neben diesen endohydrolytisch aktiven Enzymen mindestens eine weitere Enzymklasse benötigt, die die resultierenden Produkte weiter zu den von *G. oxydans* nutzbaren Monosacchariden hydrolysiert. In einem ersten Schritt sollten zunächst geeignete Endohydrolasen für das jeweilige Polysaccharid identifiziert werden. Anschließend sollte durch Koproduktion dieser Endohydrolase mit einer weiteren kompatiblen Hydrolase die vollständige Spaltung des Polysaccharids in dessen Grundbausteine ermöglicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die beiden häufigsten Polysaccharide Xylan und Cellulose gelegt.

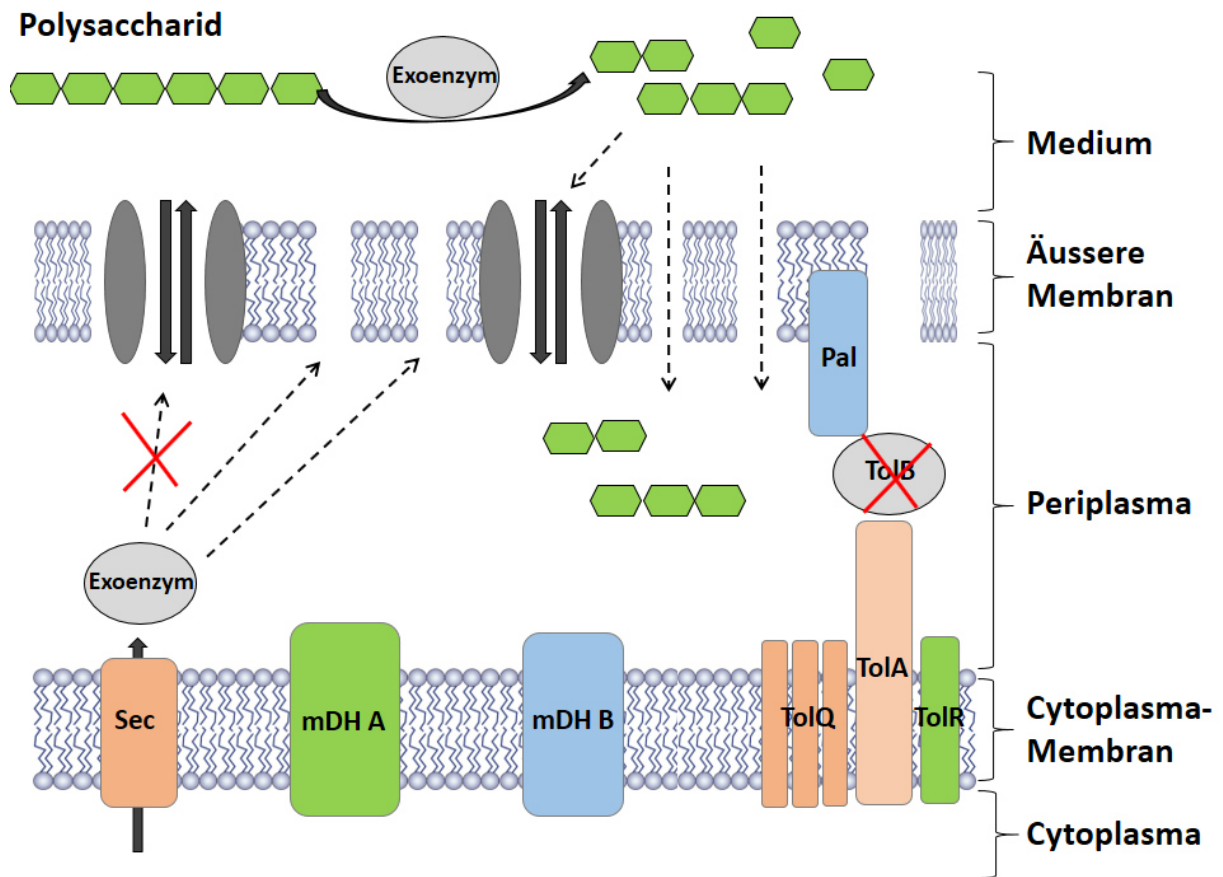


Abbildung 74: Die Hydrolyse von Polysacchariden durch *G. oxydans* Δ tolB. Polysaccharide können aufgrund ihrer Größe im Wildtyp von *G. oxydans* nicht durch die Porine der äußeren Membran gelangen und heterolog produzierte periplasmatische Hydrolasen gelangen nicht in den Kulturüberstand. Durch Deletion des TolB-Proteins als Bestandteil des Tol-Pal-Komplexes erfolgt ein Verlust der Membranintegrität in *G. oxydans*, welcher die Sekretion der in das Periplasma translozierten Enzyme zur Folge hat (Kosciow *et al.* 2016). Diese können außerhalb der Zelle die entsprechenden Polysaccharide hydrolysieren und so die resultierenden kurzketigen Produkte in das Periplasma gelangen. Diese Produkte können als Substrate der membrangebundenen Dehydrogenasen (mDH) dienen und direkt im Periplasma oxidiert werden.

4.5.1 Die Endohydrolyse des Polysaccharids Xylan durch *G. oxydans*

Aufgrund der Komplexität der meisten natürlichen Xylane ist für eine vollständige Hydrolyse in alle Grundbausteine eine kooperative Aktivität verschiedener Enzymklassen essentiell. Die Hauptkette von Xylanen besteht bei Landpflanzen ausschließlich aus β -1,4-glykosidisch verknüpften D-Xylose-Einheiten, welche lange Polymere bilden (Collins *et al.* 2005). Dieses Xylan-Rückgrat ist, abhängig von der Art des Holzes, stark verzweigt und acetyliert, wobei die chemische Zusammensetzung der Verzweigungen wiederum abhängig von der Pflanzenfamilie variiert (Timell 1967; Beg *et al.* 2001; Wikberg und Maunu 2004). Für die Abtrennung der möglichen Seitenketten ist eine enzymatische Spaltung durch α -L-Arabinofuranosidasen (EC 3.2.1.55), α -D-Glucuronidasen (EC 3.2.1.139), Acetyl-Xylan-Esterasen (EC 3.1.1.72), Ferulasäure-Esterasen (EC 3.1.1.73) und *p*-Coumarsäure-Esterasen (EC 3.1.1.-) notwendig (Biely 1985; Puls *et al.* 1987; Subramaniyan und Prema 2002; Collins *et al.* 2005). Eine Ausnahme stellen Esparto-Xylane dar, welche ausschließlich aus D-Xylose bestehende

Verzweigungen besitzen (Chanda *et al.* 1950). In dieser Arbeit sollte der Schwerpunkt auf die Degradation des universellen Xylan-Rückgrats ohne Verzweigungen gelegt werden. In der Natur erfolgt die Hydrolyse zunächst mittels Endo-Xylanasen, welche das Polymer unspezifisch in kleine Einheiten, Xylooligosaccharide (XOs), zerteilen. So wird die Effizienz und Zugänglichkeit für die weiteren hydrolysierenden Enzyme optimiert (Frederick *et al.* 1985; Kormelink *et al.* 1993). Exo-Xylanasen agieren vom reduzierenden Ende dieser Oligomere aus und produzieren entweder das Monosaccharid Xylose oder zunächst weiter verkürzte Oligosaccharide wie Xylobiose und Xylotriose (Sunna und Antranikian 1997; Juturu und Wu 2014). Xylobiose wird als kleinste Einheit durch β -D-Xylosidasen vollständig zu D-Xylose hydrolysiert (Sunna und Antranikian 1997; Collins *et al.* 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Strategien zur Hydrolyse von Xylan durchgeführt. Als erstes sollte eine Möglichkeit gefunden werden, Xylan *in vivo* mittels *G. oxydans* und einer geeigneten Endo-Xylanase in kurzkettige XOs zu hydrolysieren. Da diese Strategie nur auf die Produktion von XOs abzielte, sollte Xylan nicht als Wachstumssubstrat für *G. oxydans* dienen. Als geeignete Enzyme wurden Cex aus *Cellulomonas fimi* (O'Neill *et al.* 1986; Notenboom *et al.* 1998; White *et al.* 1994), XylI aus *Bacteroides ovatus* (Whitehead 1995) und XynA aus *Bacillus subtilis* (Sung *et al.* 1993; Banka *et al.* 2014) ausgewählt.

Trotz erfolgreicher Konstruktion der entsprechenden Expressionssysteme sowie einer anschließenden Transformation dieser in den Zielorganismus war es nicht möglich, eine heterologe Produktion von XylI und Cex in *G. oxydans* oder *G. oxydans* $\Delta tolB$ nachzuweisen. Im Fall der Endoxylanase XynA war diese Strategie hingegen erfolgreich. Im direkten Vergleich mit *G. oxydans xynA*, konnte mittels des C-terminal fusionierten Strep-Tags im Fall des Stamms *G. oxydans* $\Delta tolB xynA$ die 15-fache Menge des Enzyms aus dem Kulturüberstand aufgereinigt werden. Hierbei handelt es sich um einen klaren Nachweis für eine effiziente Sekretion von XynA durch die Deletionsmutante *G. oxydans* $\Delta tolB$. Das aufgereinigte Enzym besaß bei 30 °C eine spezifische Aktivität von 33 ± 7 U mg⁻¹. Für diese Endo-Xylanase aus *B. subtilis* 168 ist in der Literatur keine spezifische Aktivität bekannt. Für ein homologes Enzym aus *Bacillus* sp. Stamm K-1 konnte bei 30 °C hingegen ein V_{Max} -Wert von 32,7 U mg⁻¹ nachgewiesen werden (Ratanakhanokchai *et al.* 1999). Dieser Wert korreliert mit der Aktivität des in dieser Arbeit rekombinant produzierten und sekretierten Enzyms. XynA-ähnliche Endoxylanasen wurden bereits zuvor heterolog in *E. coli* produziert (Baek *et al.* 2012; Banka *et al.* 2014). Die Enzyme akkumulierten jedoch oft im Cytoplasma, bedingt durch eine fehlgeschlagene Translokation in das Periplasma. Eine Sekretion von XynA in den Kulturüberstand konnte unter Verwendung von *E. coli* als Produktionsstamm nicht beobachtet werden (Baek *et al.* 2012), sodass für eine *in vivo* Degradation von Xylan eine Lyse der Zellen notwendig wäre. Im Fall von *G. oxydans xynA*, welcher das Fusionsprodukt von SP*pelB* und *xynA* exprimiert, wurden $90,1 \pm 4,8$ % der Aktivität in der Zellfraktion bestimmt und nur $9,9 \pm 5$ % der gesamten Endoxylanase-Aktivität im Kulturüberstand gemessen (Abb. 32; Kosciow *et al.* 2016). Diese geringe Aktivität im Überstand wird möglicherweise durch Endoxylanasen erzeugt, die durch lysierte Zellen freigesetzt wurden. Analysen der Aktivitätsverteilung innerhalb der Zellfraktion zeigten, dass von diesen 90 % etwa 47 % der Aktivität im Cytoplasma zu finden und 33 % im Periplasma lokalisiert waren. Dieses Verhältnis spricht für eine effiziente, durch die Signalsequenz von PelB vermittelte, Translokation von XynA in das Periplasma. Im Fall des Stamms *G. oxydans* $\Delta tolB xynA$,

welcher das Protein SPpelB-XynA produzierte, konnten $70,9 \pm 8 \%$ der gesamten Endoxylanase-Aktivität im Überstand nachgewiesen werden und nur $29,1 \pm 7,8 \%$ in der Zellfraktion. Von diesen 29 % der XynA-Aktivität wurden etwa 24 % im Periplasma und etwa 5 % im Cytoplasma lokalisiert. Demnach wurde das erfolgreich produzierte Protein XynA durch die Signalsequenz von PelB fast vollständig über die innere Membran in das Periplasma transloziert. Dieses Ergebnis spricht für ein ausgewogenes Verhältnis zwischen der p264-vermittelten *xynA*-Expressionsrate und der Signalsequenz-vermittelten Translokationsrate. Das Fehlen des häufigen periplasmatischen Proteins TolB und der damit verbundenen geringeren Auslastung des Sec-Translokationsapparats begünstigte die effiziente Translokation zusätzlich (Abschnitt 3.4.4). Anders als bei *G. oxydans xynA* fand in *G. oxydans ΔtolB xynA* im Periplasma keine Akkumulation statt, da eine effiziente Sekretion der periplasmatischen Proteine in den Kulturüberstand erfolgte.

Vergleicht man diese Aktivitätsverteilung mit den Werten der Signalsequenz-vermittelten Translokation und Sekretion von PhoA in *G. oxydans ΔtolB phoA*, so handelt es sich bei der Produktion von XynA um ein besser angepasstes Expressionssystem. Es ist zu vermuten, dass eine effektivere Translokationseffizienz des Fusionsprodukts SPpelB-XynA eine Aggregation ungefalteter Proteine im Cytoplasma verhindern konnte. Somit stellte hier die Geschwindigkeit des Sec-abhängigen Transportmechanismus keinen limitierenden Faktor dar. Auch war der Anteil des in den Überstand sekretierten Enzyms XynA über 40 % höher als im Fall von PhoA. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich das deutlich geringere Molekulargewicht von XynA. PhoA besitzt bereits als Monomer ein Molekulargewicht von etwa 48 kDa und befindet sich so im Bereich der Ausschlussgröße des Peptidoglykan-Netzwerks (Abschnitt 4.3.3). In der Form des aktiven Dimers liegt das Molekulargewicht von PhoA deutlich darüber (Sone *et al.* 1997; Lazzaroni *et al.* 1999). XynA besitzt als aktives Monomer nur eine Größe von etwa 21 kDa. Somit kann dieses Enzym frei durch das Peptidoglykannetz diffundieren und wird durch dieses nicht zurückgehalten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *G. oxydans ΔtolB xynA* auch beim Einsatz intakter Zellen eine starke *in vivo*-Hydrolyse von Xylan zeigte. Dies bestätigte die Effizienz des konstruierten Systems im Hinblick auf die Exoenzym-Produktion sowie den Erfolg einer erstmaligen Polysaccharid-Hydrolyse durch einen *G. oxydans*-Stamm (Kosciow *et al.* 2016).

XynA katalysiert die Endohydrolyse von langkettigen Xylan-Polymeren zu kurzen Oligomeren. Xylobiose stellt dabei, neben geringen Produktanteilen von Xylotriase und Xyloetraose, das Hauptprodukt dar (Banka *et al.* 2014). Das Monomer Xylose wird nicht produziert. Dieses Produktspektrum macht XynA zum idealen Enzym für die industrielle Produktion von XO₂, da dort besonders für den Lebensmittelbereich ein geringer Polymerisationsgrad von 2-4 eingesetzt wird (van Loo *et al.* 1999; Vazquez *et al.* 2000). *G. oxydans* ist als Produktionsstamm von Xylobiose dem nativen XynA-produzierenden Organismus *B. subtilis* überlegen. Während *B. subtilis* Xylobiose effizient zu Xylose hydrolysiert (Banka *et al.* 2014), akkumuliert *G. oxydans* dieses Disaccharid aufgrund einer unzureichenden enzymatischen Ausstattung im Kulturüberstand.

XO₂ besitzen eine Vielzahl von Anwendungsgebieten in Lebensmittel- und Nicht-Lebensmittelbereichen (Vazquez *et al.* 2000). In der Agrarwirtschaft werden diese beispielsweise als Wachstumsstimulatoren in der Aquakultur eingesetzt (Moure *et al.* 2006; Xu *et al.* 2009). Aus pharmazeutischer Sicht spielen

XOs eine Rolle bei der Prävention und Behandlung von gastrointestinalen Infektionen sowie als Wirkstoff bei Krankheitsbildern wie Osteoporose, Otitis oder dermatologischem Juckreiz (Dohnalek *et al.* 1998; Hosokawa *et al.* 1999; Ohta *et al.* 2002).

Das Hauptanwendungsfeld von XOs ist die Verwendung als Nahrungsergänzungsmittel bei der Gewichtsabnahme oder in Kombination mit probiotisch aktiven Organismen in synbiotischen Nahrungsmitteln (Vazquez *et al.* 2000). Besonders Xylobiose spielt dabei eine wichtige Rolle. Diese Verbindung wird als Hauptprodukt bei der XynA-vermittelten Endohydrolyse von Xylan produziert. Xylobiose wird im Menschen weder durch im Speichel enthaltene Enzyme, Pankreatin oder die Magensäure hydrolysiert, noch erfolgt eine Resorption über die Darmschleimhaut (Fujikawa *et al.* 1991). Beobachtet werden konnte jedoch eine Zunahme der Organismenzahl von *Bifidobacteriaceae* und *Lactobacillaceae*, deren Präsenz mit einer gesunden Darmflora korreliert (Moure *et al.* 2006; Chapla *et al.* 2012). Diese Analysen müssen jedoch mit Vorsicht betrachtet werden, da der Einfluss der einzelnen Vertreter des menschlichen Mikrobioms auf die Darmgesundheit noch weitgehend ungeklärt ist. Im Gegensatz zu anderen Präbiotika sind XOs sowohl hitze- als auch säurestabil, was den industriellen Einsatz in Lebensmitteln stark vereinfacht. Neben einer Süßkraft von 30 – 40 % der Süßkraft von Saccharose, besitzt diese Verbindung keinen unnatürlichen Nebengeschmack (Modler 1994; Vazquez *et al.* 2000; Nabarlatz *et al.* 2005). Dies macht Xylobiose zu einer idealen kalorienarmen Zuckeralternative.

4.5.2 Die Produktion einer β -Xylosidase als zweiter Schritt auf dem Weg zur vollständigen Xylan-Hydrolyse durch *G. oxydans*

Im ersten Schritt dieses Teilprojekts konnte eine effiziente Endohydrolyse von Xylan durch intakte Zellen von *G. oxydans* $\Delta tolB$ *xynA* erreicht werden (Abschnitt 3.5.4). Als nächstes folgte die Entwicklung eines Expressionssystems, mit dem *G. oxydans* dazu befähigt werden sollte, eine aktive heterologe β -D-Xylosidase zu produzieren und diese in das Periplasma zu translozieren. In Kombination mit einer funktionierenden Endoxylanase wäre so eine vollständige Hydrolyse von Xylan zu Xylose möglich. Dieses Monosaccharid könnte in weiteren Prozessierungsschritten periplasmatisch zu Xylonsäure oxidiert (Zhou *et al.* 2015b) oder über eine Xylose-Isomerase zu Xylulose umgewandelt, phosphoryliert und anschließend in den Pentosephosphatweg eingeschleußt werden (Schellenberg *et al.* 1984). Als geeignete β -D-Xylosidasen wurden XynB aus *B. subtilis* (Desrochers 1985) und Xsa aus *B. ovatus* (Weaver *et al.* 1992; Whitehead 1995) identifiziert.

Im Fall von Xsa konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein Enzym mit dualer Aktivität handelt, dessen Produktion in Anwesenheit von Xylan hochreguliert wird (Whitehead und Hespell 1990). Enzymatisch agiert es sowohl als Arabinosidase, als auch als β -Xylosidase, die die Hydrolyse kurzkettiger XOs (Polymerisationsgrad 2-5) katalysiert. Eine spezifische Enzymaktivität war jedoch nicht bekannt, sodass das Enzym zunächst durch ein pBBR1-basiertes Expressionssystem in *E. coli* produziert und anschließend aufgereinigt werden sollte. Unter an *G. oxydans* angepassten Bedingungen (30 °C, pH-Wert 6,8) zeigte das rekombinant produzierte Enzym Xsa eine spezifische Aktivität von 78 U mg⁻¹ bei einem K_M-Wert von 6,7 mM für das Substrat *p*-NPX. Xsa aus *B. ovatus* ist hoch homolog zu XynB aus *Prevotella (P.) ruminicola* (Identität 67 %; Sequenzabdeckung 97 %).

Anders als XynB aus *P. ruminicola* ist Xsa auch unter aeroben Bedingungen aktiv (Gasparic *et al.* 1995), was für eine Produktion durch *G. oxydans* zwingend notwendig ist. Obwohl eine Funktionalität des verwendeten Expressionssystems in *E. coli* nachgewiesen wurde, war keine Produktion von Xsa in *G. oxydans* nachweisbar. Möglicherweise ist dies durch eine unterschiedliche Ausstattung an Proteasen bedingt, die im Fall von *G. oxydans* zu einer Degradation des rekombinanten Proteins führte. Somit wurde im weiteren Verlauf der Schwerpunkt auf die Produktion von XynB aus *B. subtilis* (Desrochers 1985) gelegt. Mit XynA konnte bereits ein Protein der Gattung *Bacillus* erfolgreich in *G. oxydans* heterolog produziert werden, sodass eine generelle Kompatibilität nicht auszuschließen war (Kosciow *et al.* 2016). Durch den Stamm *G. oxydans xynB* war in dieser Arbeit eine Produktion und Aufreinigung dieser β -Xylosidase möglich und bei 30 °C sowie einem pH-Wert von 6,8 betrug die Aktivität mit *p*-NPX $24,8 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

Es konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung des Substrats *p*-NPX auch durch intakte Zellen möglich war. Dieses Ergebnis war ein Hinweis auf eine erfolgreiche Translokation von XynB durch die Cytoplasmamembran. Durch den Sekretionsstamm *G. oxydans Δ tolB xynB* konnte im Vergleich zu *G. oxydans xynB* eine Steigerung der extrazellulären β -Xylosidase-Aktivität um 64 % erreicht werden. In vorherigen Experimenten war dies nicht möglich (La Grange *et al.* 1997). So scheiterte der Versuch von La Grange, eine homologe β -Xylosidase aus *B. pumilus* (Identität 75 %, Sequenzübereinstimmung 100 %) nach heterologer Produktion zu sekretieren. In diesen Experimenten wurde XynB mit der Signalsequenz eines Mating-Pheromon- α -Faktors (*MF α 1_s*) fusioniert und in *Saccharomyces cerevisiae* produziert, die Enzymaktivität lag dabei vollständig zellassoziiert vor (La Grange *et al.* 1997). Möglicherweise war diese fehlgeschlagene Translokation durch die Inkompatibilität zwischen der eukaryotischen Signalsequenz und dem prokaryotischen Zielenzym bedingt.

Die für XynB aus *B. subtilis* bekannten Temperatur- und pH-Optima liegen bei 35 °C und pH 7. Bei der optimalen physiologischen Temperatur von *G. oxydans* von 30 °C liegt die Aktivität bei etwa 80 % (Banka *et al.* 2014). Diese stark mit den physiologischen Ansprüchen von *G. oxydans* übereinstimmenden Parameter machen XynB zu einem geeigneten Enzym für die erweiterte Hydrolyse der durch XynA aus Xylan produzierten XO's (Kosciow *et al.* 2016). Die Aktivität von XynB wird durch das Produkt Xylose bereits bei einer Konzentration von 20 mM auf 55 % der Ursprungsaktivität gehemmt (Banka *et al.* 2014). Im Fall von *G. oxydans Δ tolB xynB* hätte dies jedoch keinen negativen Einfluss auf die Hydrolyse von Xylobiose, da durch *G. oxydans* eine Oxidation der entstehenden Xylose zu Xylonsäure erfolgt (Zhou *et al.* 2015b).

4.5.3 Die simultane Produktion von XynA und XynB in einem Ein-Stamm-System

Die Endoxylanase XynA und die β -Xylosidase XynB stammen beide aus demselben Wirtsorganismus, *B. subtilis*. Für diese Enzyme ist eine nativ vorhandene synergistische Wirkungsweise beim Abbau des Xylanrückgrats bekannt (Banka *et al.* 2014). So ließ sich durch den simultanen Einsatz der Enzyme im Verhältnis 1:3 (XynA : XynB) die Gesamtzahl freigesetzter Zuckereinheiten um 20 % steigern.

Da XynA und XynB einzeln in *G. oxydans* erfolgreich produziert werden konnten, sollte in diesem Teil der Arbeit eine simultane Produktion in einem Ein-Stamm-System erfolgen.

Das Ziel war es, sowohl XynA als auch XynB Sec-abhängig durch die Cytoplasmamembran zu translozieren. Für die Produktion wurde die TolB-Deletionsmutante verwendet, sodass eine Sekretion dieser Enzyme in den Kulturüberstand erfolgen konnte (Abb. 75). XynA ermöglicht im Zellüberstand die Endohydrolyse von Xylan zu hauptsächlich Xylobiose (Banka *et al.* 2014). Xylobiose gelangt anschließend aufgrund des geringen Molekulargewichts in das Periplasma und wird in diesem Zellkompartiment sowie im Kulturüberstand durch XynB zu Xylose hydrolysiert. Der größte Anteil an Xylose wird im Periplasma durch die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase Gox0265 zum industriell wertvollen Produkt Xylonsäure oxidiert. Dabei ist zu beachten, dass die reine Xylose-Oxidation nicht für ein Wachstum ausreicht (Buchert und Viikari 1988). Ein geringerer Teil dieses Zuckers wird intrazellulär durch eine Xylose-Reduktase zu Xylitol und dann über die Xylitol-Dehydrogenase Gox0865 weiter zu Xylulose umgewandelt. Durch das Enzym Xylulose-Kinase (Gox2214) erfolgt daraufhin die Umsetzung zu Xylulose-5-Phosphat, welches in den oxidativen Pentosephosphatweg einfließen kann (Deppenmeier und Ehrenreich 2008; Zhang *et al.* 2013).

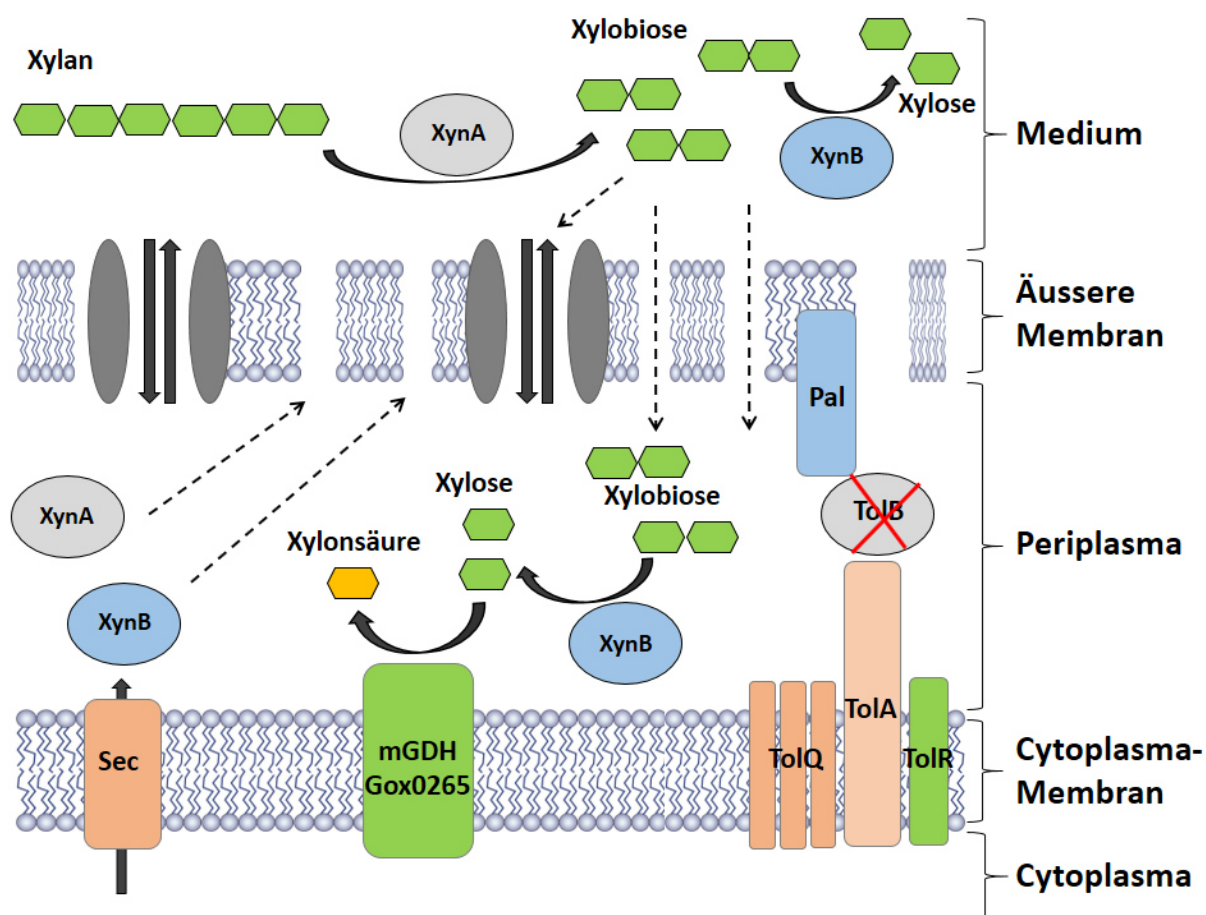


Abbildung 75: Die Hydrolyse von Xylan durch *G. oxydans* $\Delta tolB$ *xynBA*. Durch das pBBR1-basierte Expressionssystem sollten simultan sowohl die Endoxylanase XynA als auch die β -Xylosidase XynB produziert und über die fusionierte Signalsequenz von PelB Sec-abhängig in das Periplasma transloziert werden. Durch die Deletion von TolB ist die Integrität der äußeren Membran gestört, sodass die Enzyme in den Kulturüberstand gelangen können. Dort erfolgt durch XynA die Endohydrolyse von Xylan zu Xylobiose. Die Xylobiose wird anschließend extrazellulär oder im Periplasma durch XynB zu Xylose hydrolysiert. Die membrangebundene Glukosedehydrogenase Gox0265 katalysiert anschließend die Oxidation von Xylose zur hochwertigen Feinchemikalie Xylonsäure (Buchert und Viikari 1988; Zhang *et al.* 2013).

Im ersten Schritt wurde die *xynB*-kodierende Gensequenz mit der 5'-terminal fusionierten Signalsequenz von PelB in den Vektor pBBR1p264-*SPpelB-xynA* kloniert. Dadurch standen sowohl *xynB* als auch *xynA* unter der Regulation des konstitutiven starken Promotors p264. Von einem 50 %igen Mischverhältnis ausgehend, betrug die spezifischen Aktivitäten des XynB-XynA-Gemisches für die β -Xylosidase-Aktivität 58 ± 13 mU mg⁻¹ und für die Endoxylanase-Aktivität 67 ± 27 mU mg⁻¹.

Die spezifische Aktivität des einzeln aufgereinigten XynB-Proteins betrug unter gleichen Bedingungen $24,8 \pm 1$ U mg⁻¹ (Abb. 36). Dieser Wert entspricht einer 210-fachen Reduktion der Aktivität von XynB, produziert mit dem Expressionsstamm *G. oxydans* Δ *tolB xynBA*. Im Fall von XynA lag die spezifische Aktivität mit 33 ± 7 U mg⁻¹ (Abb. 31) 250-fach über der spezifischen Aktivität des durch den Stamm *G. oxydans* Δ *tolB xynBA* produzierten Enzyms (Abschnitt 3.5.3 und 3.5.6). Diese Werte sprechen für eine Fehlfaltung der simultan produzierten Enzyme, die in der intrazellulären Akkumulation der Proteine und einem deutlichen Aktivitätsverlust resultierte (Kane und Hartley 1988).

Analysen der XynA- und XynB-Aktivitätsverteilung im Stamm *G. oxydans* Δ *tolB xynBA* zeigten, dass die vorhandene Endoxylanase-Aktivität fast vollständig extrazellulär vorlag, die XynB-Aktivität hingegen ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert war. Auch dieses Ergebnis spricht für eine Fehlfaltung von XynB und einen dadurch bedingten gestörten Proteintransport über die Cytoplasmamembran.

In einem anderen Versuch wurde ebenfalls die Koexpression zweier Gene unter einem Promotor im verwendeten pBBR1-basierten System versucht. Dieser Ansatz war ebenfalls nicht erfolgreich (persönliche Mitteilung Dr. rer. nat. Nageena Zahid). Dabei sollten sowohl die Trehalose-Synthase TreS aus *Mycobacterium smegmatis* (Pan *et al.* 2004), als auch die periplasmatische Trehalase TreA aus *E. coli* (Boos *et al.* 1987), unter dem starken Promotor p264 produziert werden. Auf diese Weise sollte das Wachstum von *G. oxydans* auf Maltose ermöglicht werden. TreS katalysiert die Umsetzung von Maltose zu Trehalose und TreA die periplasmatische Hydrolyse von Trehalose zu Glukose (Kosciow *et al.* 2014). Wie im Fall von XynA und XynB ließen sich sowohl TreA als auch TreS einzeln in aktiver Form produzieren, jedoch gelang keine erfolgreiche Koproduktion beider Proteine.

Auch ein Austausch der Promotorregion durch ein induzierbares Tetrazyklin-Promotorsystem im Fall der XynA-XynB-Expression zeigte keine Optimierung der Koproduktion (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf eine fehlende Eignung des pBBR1-basierten Systems für die simultane Produktion zweier periplasmatischer Proteine hindeuten. Möglicherweise wäre eine simultane Expression, bei der jedes der zu exprimierenden Gene eine 5' lokalisierte Promotorregion trägt, erfolgreich.

4.5.4 Die heterologe Produktion aktiver cellulolytischer Enzyme in *G. oxydans* im Hinblick auf die Nutzbarkeit von Cellulose

Cellulose ist das häufigste Polysaccharid in der Natur und macht etwa 45 % des Trockengewichts von Hölzern aus (Pérez *et al.* 2002). Dieses Polymer bestehen aus bis zu Tausenden linear polymerisierten Cellobiose-Einheiten, welche wiederum durch zwei β -1,4-glykosidisch verknüpfte Glukosemoleküle gebildet werden (O'Sullivan 1997). Anders als im Fall von Xylan, handelt es sich bei Cellulose um ein unverzweigtes Polysaccharid, welches kristallin oder amorph vorliegen kann. Somit ist für eine vollständige Degradation eine weniger komplexe Ausstattung an hydrolytischen Enzymen notwendig

als im Fall des Xylan-Abbaus. Die meisten cellulolytisch aktiven Organismen sind innerhalb der Gruppe der Pilze zu finden. Im Fall der Prokaryoten gehören *Pseudomonas*, *Cellulomonas* und *Streptomyces* zu den am besten untersuchten Gattungen (Crawford 1978; Gilkes *et al.* 1988; Béguin und Aubert 1994; Bolam *et al.* 1998; Pérez *et al.* 2002). Für eine effiziente Hydrolyse von Cellulose zu Glukose wird die synergistische Aktivität von drei verschiedenen Enzymklassen benötigt. Zunächst wirken die Endoglukanasen (Endo-1,4- β -Glukanasen) innerhalb des Polymers und schaffen durch die Endohydrolyse interner β -1,4-glykosidischer Bindungen freie terminale Enden. Von diesen aus agiert das zweite Enzym, die Cellobiohydrolase (Exo-1,4- β -Glukanase), und verstärkt den Abbau vom reduzierenden oder auch nicht-reduzierenden Ende. Das dritte Enzym, die β -Glukosidase, spaltet die freigesetzten Cellobiose-Moleküle in ihre beiden Glukose-Grundbausteine (Sternberg *et al.* 1977; Medve *et al.* 1998; Lynd *et al.* 2002; Pérez *et al.* 2002). Als weltweit häufigstes nachwachsendes Polysaccharid stellt Cellulose ein wichtiges bisher nicht nutzbares Substrat für die Produktion wertvoller Produkte durch *G. oxydans* dar. Eine vollständige Spaltung von Cellulose *in vivo* würde beispielsweise die direkte Produktion von Glukonat sowie 2- und 5-Ketoglukonat oder den Einsatz dieses Polysaccharids als kostengünstiges Wachstumssubstrat für die Produktion Glukose-unabhängiger Feinchemikalien ermöglichen.

Der erste Schritt in dieser Arbeit war die Identifizierung einer geeigneten β -Glukosidase, welche zunächst die Hydrolyse von Cellooligosacchariden durch *G. oxydans* ermöglichen sollte. Ausgewählt wurden hierfür die Enzyme BglX aus *E. coli*, BglB aus *P. polymyxa* sowie BoGH3A und BoGH3B aus *B. ovatus*.

Im Fall der Cellobiase BoGH3B war eine Produktion weder in *G. oxydans* noch in *E. coli* möglich. Im Gegensatz zum zweiten Enzym aus *B. ovatus*, BoGH3A, stellt BoGH3B eine echte Cellobiase dar, die sowohl das Disaccharid Cellobiose als auch das chromogene Substrat *p*-NP- β -Glukopyranosid hydrolysieren kann (Larsbrink *et al.* 2014).

Die nativen Substrate von BoGH3A hingegen sind vorrangig Cellooligosaccharide mit einem Polymerisationsgrad von 3-6, sodass mit Cellobiose oder *p*-NP- β -Glukopyranosid (*p*-NPGlu) als Substrat nur eine sehr geringe Aktivität gezeigt werden konnte (Larsbrink *et al.* 2014). Diese Tatsache wurde auch in dieser Arbeit durch Tests mit dem aufgereinigten Enzym unter für *G. oxydans* physiologischen Bedingungen bestätigt (Abschnitt 3.6.3). Die durch *G. oxydans boGH3A* heterolog produzierte β -Glukosidase BoGH3A zeigte bei 30 °C mit *p*-NPGlu als Substrat eine β -1,4-hydrolytische Aktivität von 42 ± 9 mU mg⁻¹. Da bereits aus der Literatur die geringe Aktivität mit *p*-NPGlu als Substrat bekannt war, konnte in dieser Arbeit von einer erfolgreichen Produktion des Enzyms BoGH3A durch *G. oxydans boGH3A* mit einer hydrolytischen Aktivität gegenüber länger-kettigen Cellooligosacchariden ausgegangen werden. Bei einer Temperatur von 37 °C wurden für diese Oligosaccharide in der Literatur spezifische Aktivitäten von $48,4 \pm 2,8$ U mg⁻¹ (Cellotetraose) und $0,46 \pm 0,1$ U mg⁻¹ (Cellohexaose) bestimmt, die K_m -Werte lagen dort bei $2,5 \pm 0,4$ mM und $0,7 \pm 0,5$ mM (Larsbrink *et al.* 2014).

Die Cellobiase BglB aus *P. polymyxa* konnte erfolgreich durch den Stamm *G. oxydans bglB* produziert werden. *In vitro* zeigte dieses Enzym jedoch nur eine geringe spezifische Aktivität von 82 ± 3 mU mg⁻¹ mit *p*-NPGlu unter den gewünschten Bedingungen bei 30 °C (Abb. 42). Dieser Wert ist

etwa 43-fach niedriger als die bei 37 °C beschriebene Aktivität von 3,5 U mg⁻¹ für das selbe Substrat und unter den gleichen pH-Bedingungen (González-Candelas *et al.* 1989). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass BglB, trotz N-terminal angefügter Signalsequenz, im Stamm *G. oxydans* $\Delta tolB$ *bglB* vollständig in der Cytoplasmafraktion vorlag. Diese beiden Beobachtungen deuten auf eine fehlerhafte Translokation über die Cytoplasmamembran hin. Ein Austausch der Signalsequenz von PelB durch die Signalsequenz von Gox2219 (Abschnitt 3.1) könnte hier die Translokation der Cellobiase ermöglichen. Anders als im Fall der hochhomologen und nativ intrazellulär vorliegenden Cellobiase BglA, ist die native Lokalisation von BglB extrazellulär (González-Candelas *et al.* 1990). Somit ist eine Fehlfaltung nach Translokation in das Periplasma in *G. oxydans* $\Delta tolB$ *bglB* auszuschließen.

Die spezifische Aktivität von BglB gegenüber Cellobiose ist etwa um den Faktor 15 geringer als für das chromogene Substrat *p*-NPGlu (González-Candelas *et al.* 1989). Somit würde im Fall des durch *G. oxydans* $\Delta tolB$ *bglB* produzierten Enzyms die spezifische Aktivität nur einen theoretisch ermittelten Wert von 5 mU mg⁻¹ unter den gegebenen Bedingungen erreichen. Diese geringe Aktivität reicht für ein Wachstum von *G. oxydans* auf Cellobiose als einzige Kohlenstoffquelle nicht aus. Somit ist der Stamm *G. oxydans* $\Delta tolB$ *bglB* für die effiziente extrazelluläre Cellobiose-Hydrolyse nicht geeignet. Dass eine Erweiterung des Substratspektrums durch BglB aus *P. polymyxa* jedoch generell möglich ist, konnte durch González-Candelas *et al.* 1989 gezeigt werden. Durch heterologe Produktion dieses Enzyms zusammen mit der nativen Signalsequenz in *E. coli*, konnte 90 % der β -Glukosidase-Aktivität im Periplasma detektiert werden. Dadurch wurde dem Zielorganismus ein langsames Wachstum auf reiner Cellobiose als einzige C-Quelle ermöglicht.

Die vierte β -Glukosidase, die auf ihre Eignung für die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* untersucht wurde, war BglX aus *E. coli*. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Expressionssystem konnte diese periplasmatische β -Glukosidase homolog in *E. coli* produziert werden und zeigte dort mit dem Substrat *p*-NPGlu eine spezifische Aktivität von $0,52 \pm 0,1$ U mg⁻¹ bei 30 °C. Dieser Wert lag im Bereich des bekannten V_{Max} -Werts von $3 \pm 0,7$ U mg⁻¹ (Yang *et al.* 1996).

In *G. oxydans* war es nicht möglich BglX heterolog zu produzieren, obwohl dasselbe Expressionssystem genutzt wurde und die Promotorregion an diesen Organismus angepasst war. Möglicherweise stellt der in beiden Organismen deutlich unterschiedliche Codongebrauch eine Erklärung für die bessere homologe Produktion im Vergleich zur heterologen Produktion von BglX in *G. oxydans* dar (Sharp *et al.* 1988). Beim Codongebrauch, auch Codon Usage oder Codon Bias genannt, werden bestimmte Codons durch unterschiedliche Spezies verschieden bevorzugt genutzt. Dies führt zu einer unterschiedlichen Häufigkeit verschiedener tRNAs und kann so bei der heterologen Proteinproduktion die Translationsgeschwindigkeit- und effizienz stark beeinträchtigen (Grosjean und Fiers 1982; Sharp und Li 1987; Sharp *et al.* 1988). In dieser Arbeit konnte auch durch *G. oxydans* $\Delta tolB$ *bglX* kein Wachstum mit Cellobiose nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in diesem Abschnitt der vorliegenden Arbeit mit der Identifizierung des Oligocellulose-hydrolysierenden Enzyms BoGH3A aus *B. ovatus*, als ein durch *G. oxydans* erfolgreich produzierbares, aktives Enzym, der erste Schritt in der Entwicklung eines cellulolytisch aktiven Stamms von *G. oxydans* getan wurde.

Wie im Fall von Xylan ist für den Abbau von Cellulose die Etablierung mindestens eines weiteren Enzyms notwendig, einer Endocellulase beziehungsweise Endoglukanase. Diese extrazelluläre Hydrolase katalysiert die Spaltung des Cellulose-Makromoleküles in kurzkettige Oligosaccharide, dem Substrat von BoGH3A. Von den in dieser Arbeit ausgewählten Endohydrolasen CbhA aus *C. fimi*, CelY aus *E. chrysanthmi* und EglS aus *B. subtilis* konnte EglS als einziges Enzym erfolgreich in *G. oxydans* produziert werden (Abschnitt 3.6.5). Mit dem aufgereinigten Enzym wurde bei 30 °C eine spezifische Aktivität von etwa 1,6 U mg⁻¹, bezogen auf die Freisetzung von Glukose in Form von Cellooligosacchariden, gemessen. Durch diese Tests sowie bei der Fraktionierung von *G. oxydans* Δ *tolB* *eglS* konnte ermittelt werden, dass die gesamte Aktivität dieses Enzyms intrazellulär vorlag. Somit konnte EglS keine Hydrolyse von Cellulose durch intakte Zellen gewährleisten. Der fehlerhafte Export ist vermutlich wie im Fall der extrazellulären β -Glukanase BglB auf eine Inkompatibilität zwischen EglS und der PelB-Signalsequenz zurückzuführen. Da EglS nativ extrazellulär vorliegt, sollte dieses Enzym nach einer erfolgreichen Translokation in das Periplasma keine Fehlfaltung aufweisen. Auch hier wäre der Austausch der N-terminalen Signalsequenz vor EglS eine mögliche Lösung zur Behebung der fehlerhaften Translokation von EglS in das Periplasma.

Der in der vorliegenden Arbeit verfolgte Ansatz zur mikrobiellen vollständigen Hydrolyse von Cellulose und Xylan im Hinblick auf die Produktion von hochwertigen Feinchemikalien aus nachwachsenden, ubiquitär präsenten Rohstoffen (NawaRo) durch *G. oxydans* ist bisher aus der Literatur nicht bekannt und in dieser Form neuartig. Es ist jedoch vor dem Hintergrund der Bioökonomie eine Abwendung von fossilen Ausgangssubstanzen, bei gleichzeitiger Hinwendung zu bio-basierten Substratalternativen, beabsichtigt. Der Schwerpunkt der Forschung in diesem Bereich liegt nicht auf dem in dieser Arbeit verfolgtem Ziel der Produktion von Feinchemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen, sondern auf der bio-basierten Gewinnung von Ethanol aus Cellulose und Xylan. Die wichtigsten gentechnischen Arbeiten zur Ermöglichung einer Ein-Schritt-Fermentation von Lignocellulosen zu Ethanol erfolgten dabei vorrangig durch natürliche pro- und eukaryotischen Ethanolproduzenten. Dazu gehören beispielsweise das mit *G. oxydans* nah verwandte α -Proteobakterium *Z. mobilis* (Feldmann *et al.* 1992) oder verschiedene Hefestämme (Walfridsson *et al.* 1996). Aber auch verschiedene Gattungen von Enterobacteriaceae wie *Erwinia*, *Klebsiella* und allen voran *Escherichia* wurden gentechnischen Optimierungen für die Bioethanolproduktion unterzogen (Bräu und Sahn 1986; Tolan und Finn 1987a, 1987b). *E. coli* ist diesbezüglich besonders geeignet, da der Organismus natürlicherweise eine Vielzahl von in Lignocellulose vorkommenden Hexosen und Pentosen metabolisieren kann. Zu diesen zählen neben Glukose auch Xylose, Mannose, Arabinose und Galaktose. Auch eine hohe Ethanoltoleranz zeichnet *E. coli* aus. Durch heterologe Expression von *Z. mobilis*-stämmigen Genen, welche für eine Alkoholdehydrogenase sowie Pyruvat-Decarboxylase kodieren, konnte durch *E. coli* die Umsetzung von Xylose und Glukose zu Ethanol mit nahezu maximaler Ausbeute realisiert werden (Takahashi *et al.* 1994).

Z. mobilis stellt einen natürlichen Ethanolproduzenten dar, der Ethanolkonzentrationen von über 12 % (w/v) mit sehr hohen Ausbeuten sowie einer, den meisten Hefen überlegenen, volumetrischen Produktivität erreichen kann. Der große Nachteil im Hinblick auf die Nutzung von Lignocellulosen ist jedoch das maßgeblich auf Glukose, Fruktose und Saccharose limitierte Substratspektrum dieses

Organismus. So besitzt *Z. mobilis* natürlicherweise keine Möglichkeit Pentosen wie Xylose nutzen zu können. Aus diesem Grund wurde mit der Etablierung eines Stoffwechselweges begonnen, der die Metabolisierung von Xylose in *Z. mobilis* ermöglichen sollte (Feldmann *et al.* 1992; Zhang *et al.* 1995; Aristidou und Penttilä 2000). Dies geschah durch die Integration zweier vollständiger Operons aus *E. coli*, von denen das erste alle notwendigen Gene für die Umsetzung von Xylose zu Xylulose-5-Phosphat enthielt. Das zweite Operon kodierte die übrigen fehlenden Gene des nicht-oxidativen Pentosephosphatwegs. Durch diese metabolischen Optimierungen konnte ein *Z. mobilis* - Stamm entwickelt werden, welcher effizient Xylose als einzige C-Quelle nutzte und die eingesetzte Glukose sowie Xylose mit Ethanol ausbeuten von über 90 % verstoffwechseln konnte (Feldmann *et al.* 1992; Zhang *et al.* 1995; Aristidou und Penttilä 2000).

Dennoch bleibt bei der Verwendung von Cellulose oder Xylan für die Bioethanolproduktion durch Gram-negative Organismen die initiale Degradation der Polymere zu den metabolisierbaren Hexosen und Pentosen ein Problem. Um auf eine vorangehende saure Hydrolyse sowie externe Zugabe gereinigter Exoenzyme zu verzichten, ist daher die Entwicklung von sekretorischen Mutanten, die Nutzung von nativen Sekretionsmechanismen sowie die Identifikation neuer Sekretionssignale notwendig (Gao *et al.* 2015a; Gao *et al.* 2015b).

4.6 Die Charakterisierung von Amuc_0771, Amuc_0824, Amuc_1666 und Amuc_1686 aus *Akkermansia muciniphila*

Im Rahmen der Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* auf Laktose wurden drei potentielle, bisher nicht charakterisierte β -Galaktosidasen aus *A. muciniphila* identifiziert. Bei diesen Proteinen, Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1686, handelt es sich wahrscheinlich um periplasmatische Enzyme, da alle drei ein Sec-abhängiges Signalpeptid aufweisen. Alle gereinigten Proteine zeigten eine Aktivität gegenüber *p*- oder *o*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid, was diese Enzyme als tatsächliche β -Galaktosidasen kennzeichnete. Dennoch wurde für keines der Enzyme eine signifikante Aktivität mit Laktose als Substrat nachgewiesen, sodass eine andere, bisher nicht bekannte Verbindung das bevorzugte Substrat darstellen muss. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine ausführliche Charakterisierung der ungewöhnlichen β -Galaktosidasen durchgeführt. Zusätzlich zu Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1686 erfolgte auch die Analyse einer vierten, möglicherweise periplasmatischen Galaktosidase, Amuc_1666.

4.6.1 Das Mucin-spaltende Darmbakterium *Akkermansia muciniphila*

Wie oben dargestellt, wurden vier verschiedene β -Galaktosidasen aus *A. muciniphila* im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Bei diesem Bakterium handelt es sich um einen anaeroben, Gram-negativen Vertreter der Verrucomicrobia (Derrien *et al.* 2004). Dieser Organismus ist spezialisiert auf die Degradation von stark glykosylierten Proteinen, sogenannten Mucinen, welche auf der Oberfläche von Epithelzellen im Säugerdarm zu finden sind. Besonders im Caecum, wo der Hauptteil des Mucins produziert wird, ist die

Zellzahl von *A. muciniphila* signifikant hoch (Derrien *et al.* 2011). Neuste Erkenntnisse im Bereich der gastrointestinalen Mikrobiomzusammensetzung und ihre Wichtigkeit für die menschliche Gesundheit führten zu einem steigenden Interesse an *A. muciniphila*. Dies hängt mit einer Vielzahl von positiven Einflüssen des Organismus auf verschiedene humane Krankheitsbilder zusammen. So konnte an Typ-2-Diabetes erkrankten und übergewichtigen Mausmodellen gezeigt werden, dass die Anwesenheit von *A. muciniphila* invers mit den Symptomen dieser Erkrankung korreliert. Dabei führte eine Erhöhung der *A. muciniphila*-Zellzahl in diesen Wirten, erreicht durch präbiotische Fütterung, zu einer Verbesserung des metabolischen Profils (Everard *et al.* 2013; Shin *et al.* 2013; Shang *et al.* 2017). Diese Verbesserung zeigte sich durch eine Reduktion der durch fettreiche Ernährung induzierten Symptome, wie adipöse Gewebeanflammation, Fettmassezunahme und Insulinresistenz. Es konnte zeitgleich eine Beschleunigung der Entzündungsheilung, eine Verbesserung der Verdauungsenzymsekretion sowie eine Verdickung der schützenden Mucinschicht beobachtet werden. Ebenso zeigte sich eine verstärkte Barrierefunktion durch Erhöhung der Enterozyten-Monolayer-Integrität (Everard *et al.* 2013; Reunanen *et al.* 2015; Zhao *et al.* 2017). Zusätzlich zu fettinduzierten Krankheitsbildern, welche mit einem Fehlen von *A. muciniphila* in Verbindung gebracht werden konnten, zeigte sich auch eine Korrelation mit gastrointestinalen Störungen bei Autismus-Patienten (Wang *et al.* 2011). Eine Linderung von Darm-assoziierten Krankheitssymptomen trat bei einer Gabe von hitzeinaktivierten Zellen nicht auf, sodass von einem positiven *in vivo*-Einfluss durch *A. muciniphila* ausgegangen wird (Everard *et al.* 2013). Die Erkenntnis einer direkten Beteiligung dieses Darmbakteriums bei der Heilung von Krankheitssymptomen erfolgte durch intensive Genexpressionsanalysen. Dabei wurde das Transkriptom von intestinalen Biopsien keimfreier Mäuse untersucht und vergleichend dazu die Änderung des Transkriptoms als Wirtsantwort auf eine Kolonisierung durch *A. muciniphila* analysiert (Derrien *et al.* 2011). Es zeigte sich, dass bei den mit *A. muciniphila* kolonisierten Mäusen eine einzigartige und spezifische Modulation von über 750 Genen erfolgte. Diese Modulation betraf hauptsächlich die Expression von Genen, welche mit der Ausbildung der Mucusschicht sowie mit der Regulation der Zellentwicklung und Immunantwort zusammenhängen (Derrien *et al.* 2011).

Ein Beispiel für ein solches hochreguliertes Gen ist *spp2a*, das ein kleines Prolin-reiches Protein („Small prolin rich rotein“;SPRR) kodiert. Es handelt sich hierbei um einen spezifischen Liganden, der die Wundheilung beschleunigt und die Verletzungsresistenz des intestinalen Gewebes erhöht (Demetris *et al.* 2008). Ein weiteres, verstärkt exprimiertes Gen ist *glycam-1*. Dieses Gen kodiert ein Mucin-ähnliches Glycoprotein, das maßgeblich O-glykosidisch verbundene Kohlenhydratketten trägt und als wichtiger Ligand für L-Selektin agiert. L-Selektin, auch Lymphozyten-Selektin genannt, vermittelt den Zellkontakt zwischen Lymphozyten und Endothelzellen bei der Immunreaktion (Imai *et al.* 1993; Derrien *et al.* 2011). Die Mucusschicht, welche die intestinalen Epithelzellen bedeckt, stellt für Darmbakterien eine wichtige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle dar. Dies gilt besonders für den colonalen Bereich des Darms (Salyers *et al.* 1977; Derrien *et al.* 2008). Mittels 16S-RNA-Analysen dieses komplexen mikrobiellen Ökosystems sowie Anreicherungskulturen Mucin-spaltender Mikroorganismen aus menschlichem Stuhl war es möglich, *A. muciniphila* als weit verbreiteten und wichtigen Vertreter dieser Organismen zu identifizieren (Derrien *et al.* 2004; Collado *et al.* 2007; Derrien *et al.* 2008).

Trotz des positiven Einflusses auf die Darmgesundheit, sind die genauen Interaktionsmechanismen zwischen Wirt und Bakterium sowie die exakten Mucin-Degradationsprozesse bei *A. muciniphila* bisher noch nicht vollständig aufgeklärt (Reunanen *et al.* 2015).

Es ist bekannt, dass nur ein sehr geringer Teil der Darmflora des Colons die Fähigkeit besitzt, Mucin zu hydrolysieren und die resultierenden Produkte dem übrigen Mikrobiom als Nährstoff zur Verfügung zu stellen (Hoskins und Boulding 1981; Derrien *et al.* 2004). Über *in vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass für die effiziente und vollständige Spaltung ein kooperativ arbeitendes, enzymatisches System notwendig ist. So werden aufgrund der Komplexität intestinaler Mucin-Glykan-Strukturen für einen vollständigen Abbau verschiedene Enzyme Mucin-abbauender Mikroorganismen benötigt. Dabei spielen vor allem Sulfatasen, Proteasen und verschiedene Glykosidhydrolasefamilien eine entscheidende Rolle (Willis *et al.* 1996; Derrien *et al.* 2004; Crost *et al.* 2016). Von diesen Glykosidhydrolasefamilien stellen Fukosidasen (GH29 und GH95), Exo und Endo- β -N-Acetylglukosaminidasen (GH84 und GH85), Neuraminidasen/ Sialidasen (GH33), Endo- β -1,4-Galaktosidasen (GH98) und β -Galaktosidasen (GH2, GH20 und GH42) die wichtigsten Vertreter dar (Crost *et al.* 2016). Diese Enzyme werden vorrangig für die Spaltung des Oligosaccharidanteils von Mucinen benötigt.

Die O-Glykosylierung des Proteinrückgrats von Mucin erfolgt im Golgi-Apparat, wo eine Kopplung von N-Acetylgalaktosamin an Hydroxylgruppen von Threonin- und Serinresten stattfindet. Diese Struktur wird als Tn-Antigen bezeichnet (Jensen *et al.* 2010; Holmen-Larsson *et al.* 2013). Das Tn-Antigen wird anschließend am C3- oder C6- Atom weiter glykosyliert. Hierdurch entstehen verschiedene Zuckerketten, die auch als Kernstrukturen des Mucins bezeichnet werden. Abhängig von der exakten Zuckerzusammensetzung werden insgesamt vier verschiedene Mucin-Kernstrukturen voneinander differenziert. Holmen-Larsson *et al.* 2013 konnten zeigen, dass bei Mäusen im proximalen und distalen Colon, dem natürlichen Habitat von *A. muciniphila*, vorrangig Mucine basierend auf dem Kerntyp 2 und in geringerem Maße der Kerntyp 4 vorzufinden sind (Holmen-Larsson *et al.* 2013). Kerntyp 2 besitzt dabei die allgemeine Struktur [Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-O-S/T] und Kerntyp 4 die Zusammensetzung [GlcNAc1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-O-S/T] (Gal = Galaktose, GlcNAc = N-Acetylglukosamin, GalNAc = N-Acetylgalaktosamin).

Im Menschen stellt in jeder Region des intestinalen Bereichs Kerntyp 3 [GlcNAc β 1-3GalNAc-O-S/T] die Hauptstruktur dar, wobei mehr als die Hälfte dieser Strukturen einen β -1,3 oder β -1,4 verknüpften Galaktoserest am N-Acetylglukosamin aufweisen (Robbe *et al.* 2004).

Alle diese Kernstrukturen liegen durch Moleküle wie Fukose, N-Acetylhexosamin oder N-Acetylneuraminsäure erweitert vor. Die Art der glykosidischen Verknüpfung kann dabei stark variieren. Diese Komplexität der Oligosaccharide zeigt die Notwendigkeit einer Vielzahl hochspezifischer Glykosidhydrolasen für die effiziente Mucin-Degradation.

4.6.2 Biochemische Eigenschaften der β -Galaktosidase Amuc₁₆₈₆

Neben Fukosidasen, Endo- β -N-Acetylglukosaminidasen, Sialidasen, α -N-Acetylglukosaminidasen und α -N-Acetylglukosaminidasen besitzen verschiedene β -Galaktosidasen und Endo- β -1,4-

Galaktosidasen vom Typ GH2, GH20, GH42 und GH98 eine wichtige Rolle bei der Spaltung des Oligosaccharidanteils von intestinalen Mucinen (Crost *et al.* 2016). Im Fall der in dieser Arbeit untersuchten β -Galaktosidase Amuc_1686 handelt es sich jedoch um einen ungewöhnlichen Vertreter der Glykosidhydrolase-Familie 35. Diese Familie ist besonders bei Eukaryoten wie Pilzen, Pflanzen und Säugetieren zu finden (Zhang *et al.* 1994; Kotake *et al.* 2005; Ahn *et al.* 2007; Gamauf *et al.* 2007), GH35 wurde jedoch auch bei verschiedenen Bakterien und Archaeen beschrieben (Taron *et al.* 1995; Ito und Sasaki 1997; Tanaka *et al.* 2003; Liu *et al.* 2006). Diese Glykosidhydrolasen spalten meist unter sauren Bedingungen terminale β -1,3-, β -1,4- und β -1,6-galaktosidische Verbindungen in Di- und Oligosacchariden, Glykolipiden und Glykoproteinen (van Casteren *et al.* 2000; Zinin *et al.* 2002; Gamauf *et al.* 2007; Tanthanuch *et al.* 2008). Im Fall von Amuc_1686 konnte die einzige Aktivität mit einem nicht-chromogenen Substrat mit Gal- β -1,3-GalNAc, der sogenannten Galakto-N-Biose, nachgewiesen werden. Dieser Verbindungstyp ist häufig in menschlichen Mucinen anzutreffen (Robbe *et al.* 2004). Die Hydrolyserate war jedoch gering, nach 24 Stunden lagen nur etwa 10 % der initialen Galakto-N-Biose-Moleküle hydrolysiert vor. Eine mögliche Erklärung ist, dass β -1,3-galaktosidische Bindungstypen zwar prinzipiell von Amuc_1686 hydrolysiert werden, das Enzym jedoch Oligosaccharide, wie sie *in vivo* in Mucinen zu finden sind, als Substrat bevorzugt. Solche Eigenschaften sind für Oligo- und Polysaccharid-spaltende Exoenzyme nicht ungewöhnlich. So hydrolysiert die β -Glukosidase BoGH3A zwar hochspezifisch β -1,4-glykosidische Verbindungen zwischen zwei Glukosemolekülen, benötigt dafür jedoch eine Kettenlänge von drei bis sechs Molekülen. Mit dem entsprechenden Disaccharid ist nur eine sehr geringe Aktivität nachweisbar (Larsbrink *et al.* 2014)

Mit einer spezifischen Aktivität von $370 \pm 43 \text{ U mg}^{-1}$ bei einem K_M -Wert von $0,5 \pm 0,3 \text{ mM}$ mit dem chromogenen Substrat *p*-NPGal zeigte Amuc_1686 eine der höchsten bekannten Aktivitäten verglichen mit anderen prokaryotischen β -Galaktosidasen (Abb. 55). Die meisten β -Galaktosidase besitzen unter optimalen Bedingungen spezifische Aktivitäten zwischen $0,5 \text{ U mg}^{-1}$ und 288 U mg^{-1} . Unter diesen β -Galaktosidasen befinden sich auch LacZ aus *E. coli* (Huber *et al.* 1979), LacA aus *B. subtilis* (Shipkowski und Brenchley 2006), verschiedene β -Galaktosidasen aus Milchsäurebakterien (Schwab *et al.* 2010) sowie die beiden hochaktiven Enzyme Bga aus *Enterobacter agglomerans* (Lu *et al.* 2007) und BgaB aus *Carnobacterium piscicola* (Coombs und Brenchley 1999).

Während die meisten β -Galaktosidasen der Glykosidhydrolase-Familie 35 ihre maximale Aktivität bei einem eher sauren pH-Wert besitzen (Zhang *et al.* 1994; Taron *et al.* 1995; van Casteren *et al.* 2000; Kaneko und Kobayashi 2003; Wang *et al.* 2009), zeigte Amuc_1686 die maximale hydrolytische Aktivität bei einem pH-Wert von 7 - 7,5 (Abb. 53). Dies spricht für eine gute Adaption des Enzyms an die im Colon vorherrschenden physiologischen Bedingungen (Evans *et al.* 1988; Fallingborg 1999; Nugent *et al.* 2001). Der optimale Temperaturbereich von Amuc_1686 liegt hingegen ungewöhnlich hoch bei 65 - 70 °C. Dies entspricht einem Temperaturoptimum, das häufig bei β -Galaktosidasen thermophiler Mikroorganismen beobachtet werden kann (Gabelsberger *et al.* 1993; Ohtsu *et al.* 1998; Shaikh *et al.* 1999). Anders als bei vielen anderen prokaryotischen β -Galaktosidasen, beispielsweise LacZ, konnte durch Zugabe verschiedener Kationen keine Steigerung der Enzymaktivität erreicht werden. Die Zugabe von 5 mM Zn^{2+} und Cu^{2+} führte zu einer vollständigen Inhibierung von Amuc_1686 und die Zugabe von Ce^{3+} , Co^{2+} sowie Ni^{2+} zeigte einen deutlichen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität (Abb. 54).

4.6.3 Bioinformatische Einordnung des Enzyms Amuc_1686

Bioinformatische Untersuchungen des Proteins Amuc_1686 mittels BLASTp-Analysen unter Verwendung der SwissProt-Datenbank zeigten, dass nur ein Enzym signifikanter Homologie zu Amuc_1686 prokaryotischen Ursprungs war, die β -Galaktosidase Bga aus *Xanthomonas (X.) manihotis* (Taron *et al.* 1995). Dieses Enzym stellt auch gleichzeitig mit einer Sequenzübereinstimmung von 44 % und einer Sequenzabdeckung von 69 % das stärkste homologe Protein dar. Bei Bga handelt es sich um eine Exoglykosidase, welche β -1,3- und β -1,4-glykosidisch verknüpfte terminale Galaktose-Einheiten von Polysacchariden abspaltet. Das Enzym bevorzugt jedoch die Spaltung von β -1,3-Verbindungen. Der optimale pH-Wert liegt bei 4,5 und weicht somit stark vom pH-Optimum von Amuc_1686 (pH 7 – 7,5) ab (Wong-Madden und Landry 1995; Taron *et al.* 1995). Wie auch Amuc_1686, zeigt Bga sehr starke Sequenzübereinstimmungen mit verschiedenen eukaryotischen β -Galaktosidasen, darunter humanen lysosomalen Proteinen, dem humanen β -Galaktosidase-1-ähnlichen Protein 2 (Q8IW92) und pflanzlichen β -Galaktosidasen sowie pflanzlichen Endo- β -1,3-Glukanasen (Taron *et al.* 1995). Aufgrund dieser Tatsache wird davon ausgegangen, dass sich Bga aus dem phytopathogenen Bakterium *X. manihotis* ursprünglich aus einem pflanzlichen Enzym entwickelte. Dieses Ursprungsenzym wurde zuvor wahrscheinlich mittels horizontalem Gentransfer erworben. Die Ergebnisse der bioinformatischen Analysen von Amuc_1686 deuteten für dieses Enzym auf eine ähnliche Entwicklung hin. Amuc_1686 zeigt hohe Homologien zu bekannten β -Galaktosidasen und den β -Galaktosidase-1-ähnlichen Proteinen 2 und 3 aus *Homo sapiens* (Q8IW92, Q8NCI6), *Mus musculus* (Q3UPY5), *Rattus norvegicus* (Q5XIL5) und *Felis catus* (O19015).

Unter Verwendung der nicht-redundanten Proteindatenbank bei der BLASTp-Analyse wurden die höchsten Homologien außerhalb der Gattung *Akkermansia* im Phylum der Bacteroidetes identifiziert. Unter diesen befindet sich auch eine Vielzahl mutualistischer und vorherrschender Organismengruppen des menschlichen Gastrointestinaltrakts, insbesondere Vertreter der Gattung *Bacteroides*.

Wie im Fall von Bga, könnte auch hier ein horizontaler Gentransfer, bedingt durch die enge Interaktion zwischen Wirt und Bakterienzelle, erfolgt sein. Aus dem daraus resultierenden Vorläuferprotein konnte sich vermutlich Amuc_1686 entwickeln.

4.6.4 Die außergewöhnliche C-terminale Domäne von Amuc_1686

Durch einen direkten Sequenzabgleich zwischen Amuc_1686 und Bga konnte in der Sequenz von Amuc_1686 eine zusätzliche C-terminale Domäne identifiziert werden (Abb. 56), welche bioinformatisch als Discoidin-Domäne charakterisiert wurde (Abschnitt 3.8.2.4). Nach Modellierung des Proteins schien diese Domäne klar abgegrenzt vom restlichen Protein vorzuliegen (Abb. 57). Eine BLASTp-Analyse dieser Region unter Verwendung der nicht-redundanten Proteindatenbank zeigte die stärksten Homologien innerhalb der Bacteroidetes, während durch Verwendung der SwissProt-Datenbank nur wenige homologe Proteine mit niedrigen Übereinstimmungen identifiziert werden konnten. Unter diesen befand sich NagJ aus *Clostridium perfringens*, wobei es sich um ein mit der humanen O-N-Acetylglukosaminidase nah verwandtes Protein handelt. Dieses Enzym (111 kDa) gehört zur Glykosidhydrolase-Familie 84 und hydrolysiert spezifisch das chromogene Substrat

p-NP-N-Acetylglucosamin sowie O-N-Acetylglucosamin-verknüpfte Proteine und Peptide (Rao *et al.* 2006; Ficko-Blean und Boraston 2006; Pathak *et al.* 2008). Das zweite charakterisierte Protein mit einer homologen Sequenzdomäne stellt eine Endo- α -N-Acetylgalaktosaminidase aus *Streptococcus pneumonia* dar. Dieses Enzym ist in der Lage, extrazellulär das Disaccharid Gal- β -1,3-GalNAc (Galakto-N-Biose) von Mucin-artigen O-glykosidisch verknüpften Glykanen abzuspalten (Umemoto *et al.* 1977; Willis *et al.* 2009). Während das pH-Optimum dieses Enzyms dem von Amuc_1686 entspricht, ist das Molekulargewicht etwa doppelt so hoch. Generell gehörte keines der identifizierten homologen Proteine zur Glykosidhydrolase-Familie 35 und keines der für diese Enzyme beschriebenen Substrate wurde durch Amuc_1686 hydrolysiert.

Diese am C-Terminus von Amuc_1686 vorhandene Discoidin-Domäne, auch bekannt als F5/8-Typ-C oder C2-ähnliche Domäne, ist innerhalb eukaryotischer Proteine weit verbreitet. Enzyme, die eine solche Domäne aufweisen, können unterschiedliche Funktionen erfüllen. So ermöglichen sie die Zellaggregation, die Blutgerinnung, Zelladhäsion, Zellerkennung sowie verschiedene Zell-Zell-Interaktionen (Jenny *et al.* 1987; Takagi *et al.* 1991; Baumgartner *et al.* 1996; He und Tessier-Lavigne 1997; Sauer *et al.* 1997; Baumgartner *et al.* 1998; Villoutreix und Miteva 2016). Während dieser Prozesse ist die Discoidin-Domäne beispielsweise für die Integrin-Rezeptor-Bindung (Hidai *et al.* 1998), die Phospholipid-Bindung (Borisenko *et al.* 2004) sowie die Kohlenhydratkettenbindung durch Erhöhung der Galaktose-Affinität verantwortlich (Poole *et al.* 1981). Neben eukaryotischen Zellen konnte die DS-Domäne auch in verschiedenen prokaryotischen Vertretern beschrieben werden. Aufgrund der häufig starken Sequenzhomologien innerhalb der DS-Domänen-Familien wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieses Modul über einen einmaligen oder mehrfachen horizontalen Gentransfer aus dem Genom eines Eukaryoten erlangt wurde (Bork und Doolittle 1994; Baumgartner *et al.* 1998; Ponting *et al.* 1999). Bisher wurden nur wenige prokaryotische Enzyme, die diese Domäne aufweisen, analysiert, sodass nur wenig über die *in vivo*-Funktion bekannt ist. Eine Untergruppe der Domäne, klassifiziert als Kohlenhydrat-bindendes Modul aus der Familie 32 (CBM32), besitzt die Fähigkeit spezifisch Kohlenhydrate zu binden und damit die biologische Aktivität der Glykosidhydrolase-Einheit zu erhöhen (Cheng *et al.* 2009). Charakterisierte Beispiele hierfür sind LamA, eine β -1,3-Glukanase aus *Paenibacillus spp.* (Cheng *et al.* 2009) und NedA, eine Sialidase aus dem endophytischen Actinomyceten *Microspora viridifaciens* (Newstead *et al.* 2005). Weiter Beispiele sind eine α -N-Acetylgalaktosaminidase aus *Streptococcus pneumonia* und eine Hyaluronoglukosaminidase aus *Clostridium perfringens*. Beide Enzyme stellen für diese Organismen wichtige Virulenzfaktoren dar. Ein weiteres prokaryotisches Enzym mit einer ähnlichen Domäne ist BgaD, eine β -Galaktosidase aus *Bacillus circulans*. Für dieses Enzym konnte gezeigt werden, dass die Discoidin-Domäne essentiell für die Repression der Transglykosylierungsaktivität und somit für die Galaktooligosaccharid-Produktion ist (Song *et al.* 2013).

Es wurde ein Alignment durchgeführt, bei dem die Discoidin-Domäne von Amuc_1686 mit den vier am höchsten homologen Discoidin-Domänen, welche über eine Blastp-Analyse identifiziert werden konnten, verglichen wurde.

Dabei zeigte sich im Fall von Amuc_1686 ein einzigartiges Fehlen von etwa 40 % des C-terminalen Bereichs dieses Moduls (Abb. 58). Ficko-Blean und Boraston analysierten 2006 die Interaktion des CBM32-Bereichs der N-Acetyl- β -Hexosaminidase NagJ mit ihrem spezifischen Substrat und

identifizierten dabei die Aminosäuren, die direkt an der Bindung von Galaktose-Einheiten der Polysaccharid-Substrate beteiligt sind, inklusive der konservierten und hochkonservierten Bereiche (Ficko-Blean und Boraston 2006). Dabei zeigte sich, dass die Aminosäuren Glu-641, His-658, Trp-661, Arg-690 und Phe-757 für NagJ die zentralen, für die Bindung essentiellen Reste darstellen. Im Fall von Amuc_1686 sind die vier erstgenannten Aminosäuren vorhanden. Dies könnte auf eine mögliche Substratbindungsfunktion dieser Discoidin-Domäne hinweisen, durch die die Galaktose-Einheiten im Oligosaccharid-Anteil der Mucine spezifisch identifiziert werden können, wodurch die enzymatische Aktivität von Amuc_1686 mit dem natürlichen Substrat gesteigert wird. Eine solche Funktion der Discoidin-Domäne von Amuc_1686 würde auch erklären, weshalb im Fall der verkürzten Variante des Enzyms ohne Discoidin-Domäne (Amuc_1686short) eine reduzierte Aktivität beobachtet wurde.

4.6.5 Die Discoidin-Domäne von Amuc_1686: Möglicherweise ein Hinweis auf die mutualistische Beziehung zwischen Wirt und Bakterium?

Keine der bisher analysierten oder beschriebenen prokaryotischen Proteine mit vorhandener Discoidin-Domäne zeigen eine so stark verkürzte Variante dieses Moduls wie sie in Amuc_1686 zu finden ist. Somit ist die Vorhersage der *in vivo*-Funktion äußerst schwierig. Zusätzlich handelt es sich bei Amuc_1686 um die erste prokaryotische Hydrolase, bei der eine starke Inhibierung durch Phospholipide nachgewiesen werden konnte (Abb. 59). In eukaryotischen Enzymen wurde diese Art der Inhibierung bereits zuvor beschrieben (Stace und Ktistakis 2006). Die γ -Isoform der humanen Phosphatase 1 (PP1 γ) stellt dabei *in vitro* ein hoch affines Ziel für den bioaktiven sekundären Lipid-Botenstoff Phosphatidylsäure (PA) dar. Wie auch im Fall von Amuc_1686, wird das Enzym durch dieses Phospholipid nicht-kompetitiv gehemmt und zeigt dabei einen sehr niedrigen IC₅₀-Wert von 15 nM (Jones und Hannun 2002). Im Fall von Amuc_1686 lagen die gemessenen IC₅₀-Werte zwar deutlich darüber (Abb. 59), jedoch noch bei einem sehr geringen Wert von $29,3 \pm 1,5 \mu\text{mol l}^{-1}$ für Phosphatidylserin (PS), $4,3 \pm 0,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ für Phosphatidylsäure und $1 \pm 0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ für Phosphatidylglycerol (PG). Allerdings wird diese Inhibierung wahrscheinlich nicht über eine Discoidin-Domäne induziert (Jones und Hannun 2002). Ein weiteres Beispiel stellt die allosterische Regulation der GAP-Enzym-Aktivität durch PA, Lysophosphatidylsäure und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat dar, bei der die Inhibitor-Bindestelle des Enzyms durch die N-terminalen 57 Aminosäuren gebildet wird (Tu und Wilkie 2004; Stace und Ktistakis 2006). Zusätzlich konnte auch für die Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums eine Inhibierung durch PS und PA gezeigt werden (Dalton *et al.* 1998).

Im Fall der sekretierten β -Galaktosidase Amuc_1686 aus *A. muciniphila* sind die Mechanismen und die genaue Funktion der Inhibierung durch PS, PA und PG bisher unklar. Aufgrund der engen und offensichtlich äußerst positiven Bakterium-Wirt-Interaktion ist eine regulatorische Funktion nicht auszuschließen. So ist es beispielsweise bekannt, dass *A. muciniphila* die Wundheilung sowie Gewebsregeneration beschleunigen kann (Alam *et al.* 2016). Der Metabolismus dieses Bakteriums beinhaltet jedoch die Degradation des intestinalen Mucins des Wirtes, der diese Struktur wiederum als angeborene Schutzbarriere gegenüber pathogene Mikroorganismen benötigt (Lindén *et al.* 2008; Dharmani *et al.* 2009). Dabei scheint es sich zunächst um einen klaren Widerspruch zu handeln. Es ist

annehmbar, dass Amuc_1686 als kleine sekretierte β -Galaktosidase *in vivo* spezifisch bestimmte galaktosidische Verbindungen im Oligosaccharidanteil des intestinalen Mucins hydrolysiert. Jedoch sind solche Mucin-artigen Strukturen mit ähnlicher Zusammensetzung weit verbreitet und können auf der Oberfläche einer Vielzahl molekularer Strukturen gefunden werden. Zu diesen gehören neben Protein- und Zelloberflächen auch Rezeptoren, bei denen diese Strukturen für eine Funktionalität essentiell sind. Wenn durch eine Infektion oder Gewebsverletzung die Apoptose von Epithelzellen eingeleitet wird, haben Mucin-artige Strukturen eine Schlüsselrolle bei der Immunantwort, Zellerneuerung sowie Gewebsregeneration. So ist eines der ersten Ereignisse während des programmierten Zelltods die externe Darstellung von PS, welches 10 - 15 % des zellulären Lipids ausmacht, auf der äußeren Seite der Epithelzellmembran (Yamaji-Hasegawa und Tsujimoto 2006; Stace und Ktistakis 2006). Die Veränderung der normalen asymmetrischen Membranarchitektur durch die schnelle Externalisierung von PS ist eines der wichtigsten „eat-me“-Signale beim Clearance-Prozess, der Zellentfernung durch Phagozyten (Ravichandran 2010). Ohne diese Signale könnten apoptotische Zellen nicht entfernt werden und würden weitere Entzündungen durch Freisetzung intrazellulärer Bestandteile verursachen. Die Mucin-artigen Oligosaccharidketten auf den Epithelzelloberflächen dienen dabei als zusätzliches Signal für die Entfernung der apoptotischen Zelle (Beppu *et al.* 1996; Yamanaka *et al.* 2005).

Die temporäre Bildung des Mucin-artigen Sialoglykoproteins CD43, auch bekannt als Leukosialin, besitzt ebenfalls eine wichtige Funktion. CD43 interagiert mit der Zelloberfläche der apoptotischen Zelle und sorgt dort für eine Kondensation der Kohlenhydratketten, was zu einer Erhöhung der Bindungskapazität an Makrophagen-Rezeptoren führt (Eda *et al.* 2004; Yamanaka *et al.* 2005). Eine Degradation dieser Sialylpolylactosaminyl-Saccharid-Liganden durch Amuc_1686 würde zu einer Verschlechterung der Makrophagenerkennung und somit auch Verschlechterung des Clearance-Prozesses und der Gewebsregeneration führen. Darüber hinaus würde eine verlangsamte Zellentfernung in weiteren Entzündungs- und Autoimmunreaktionen resultieren, verursacht durch von sterbenden Zellen freigesetzte Antigene (Savill und Fadok 2000; Kobayashi *et al.* 2007).

Ein weiteres Beispiel für eine Mucin-artige Struktur mit Beteiligung an der Immunantwort ist auf dem Glykoprotein Lactadherin zu finden, auch bekannt als MFG-E8. Dieses wird von Makrophagen sekretiert und erkennt und bindet PS über eine vorhandene Discoidin-Domäne. Die Mucin-artigen glykosidischen Strukturen auf MFG-E8 erhöhen die Phagozytoserate und sind essentiell für die Reparatur von Verletzungen des intestinalen Epithelgewebes (Seok *et al.* 2001; Bu *et al.* 2007).

Auch finden sich solche Mucin-artigen Oligosaccharide auf den T-Zell-Immunglobulin-Mucin-Proteinen 1 und 4 (TIM-1, TIM-4), welche auf der Oberfläche von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden (Kobayashi *et al.* 2007). Diese können direkt mit PS auf apoptotischen Zellen interagieren und vermitteln auf diese Weise eine T-Zell-Aktivierung sowie die Aufnahme der Zielzelle. Strukturell gehören TIM-1 und TIM-4 ebenfalls zu den Glykoproteinen und besitzen wie auch MFG-E8 wichtige Mucin-artige glykosidische Strukturen (Kobayashi *et al.* 2007). Um negative Effekte durch Störung dieser beschriebenen Immunreaktionen auszuschließen, könnte die Discoidin-Domäne von Amuc_1686 neben einer Erhöhung der Substratspezifität auch die Determinierung zwischen apoptotischen und gesunden Epithelzellen ermöglichen. Da bei apoptotischen Zellen PS auf die Außenseite der Membran externalisiert wird, würde durch eine PS-vermittelte Inhibierung von Amuc_1686 die Hydrolyse Mucin-artiger Strukturen, welche in die Immunantwort involviert sind,

ausgeschlossen werden. Dies könnte wiederum die Gesundheit und Regeneration des Darmepithels fördern und die bislang beobachtete mutualistische Beziehung zwischen *A. muciniphila* und dem Wirtsorganismus, zumindest teilweise, erklären.

4.6.6 Charakterisierung der drei weiteren β -Galaktosidasen Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1666

Neben der außergewöhnlichen β -Galaktosidase Amuc_1686 wurden in dieser Arbeit noch drei weitere mögliche β -Galaktosidasen aus *A. muciniphila* charakterisiert, Amuc_0771, Amuc_0824 und Amuc_1666. Wie auch bei Amuc_1686, zeigte sich nach bioinformatischer Analyse der Primärsequenz das Vorhandensein einer wahrscheinlichen Sec-abhängigen Signalsequenz am N-Terminus aller drei Enzyme. Im Fall von Amuc_0771 stellt diese Signalsequenz nach bioinformatischer Vorhersage vermutlich einen Membrananker dar, der durch die Signalpeptidase nicht entfernt wird. Mit großer Wahrscheinlichkeit wird bei Amuc_0771 dieser Membrananker durch die AS 5-24 in Form einer einzelnen Transmembranhelix gebildet. Somit ist es möglich, dass dieses Enzym *in vivo* in der Cytoplasmamembran verankert und mit dem aktiven Zentrum im Periplasma lokalisiert vorliegt. Eine dazu analoge Lokalisation konnte beispielsweise für BoGH2A aus *B. ovatus* gezeigt werden. BoGH2A, eine β -Galaktosidase, hydrolysiert periplasmatisch β -galaktosidische Verknüpfungen in kurzen Xyloglukan-Oligomeren (Larsbrink *et al.* 2014). Bei Amuc_0771 handelt es sich, wie auch bei Amuc_1686, um ein monomeres Enzym (Abschnitt 3.8.3.2), welches ebenfalls zur Glykosidhydrolase-Familie 35 gehört. BLASTp-Analysen dieser beiden Enzyme zeigten eine hohe Identität von 40 % bei einer Sequenzübereinstimmung von 89 %. Trotz dieser hohen Homologie besitzt Amuc_0771, wie auch Bga aus *X. manihotis*, keine C-terminale Discoidin-Domäne. Die Identität dieser beiden Enzyme liegt bei 38 % und einer Sequenzübereinstimmung von 92 %. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten zwischen Amuc_1686, Amuc_0771 und Bga lässt sich für diese drei Enzyme ein gemeinsames Vorläuferprotein mit möglicherweise eukaryotischen Ursprung vermuten.

Wie auch Amuc_1686 zeigt Amuc_0771 ein für die Glykosidhydrolase-Familie 35 untypisch hohes pH-Optimum zwischen 7,5 - 7,75. Dies könnte auf eine Anpassung an die physiologischen Gegebenheiten des Colons hindeuten (Evans *et al.* 1988; Fallingborg 1999; Nugent *et al.* 2001). Auch der optimale Temperaturbereich von 60 °C ist ähnlich zu Temperatur-Optima von β -Galaktosidasen thermophiler Prokaryonten (Abb. 64). Bei einer Erhöhung auf 80 °C lag die gemessene Aktivität noch bei etwa 60 %. Die höchste spezifische Aktivität von Amuc_0771 konnte mit *p*-NPGal als Substrat gemessen werden und lag dort bei 16 ± 6 U mg⁻¹ (Tab. 18). Dieser Wert ist etwa 23-fach geringer als die für Amuc_1686 ermittelte maximale spezifische Aktivität für dieses Substrat. Aufgrund der Sequenzübereinstimmungen ist dieser Unterschied möglicherweise durch das Fehlen der Discoidin-Domäne oder eine weitere Anpassung an andere Substrate erklärbar. Mit Laktose als Substrat zeigte Amuc_0771 eine sehr geringe Aktivität, hydrolysierte jedoch 65 % der eingesetzten Menge an LacNac (Galaktose- β -1,4-N-Acetyl-D-Glukosamin) sowie Galakto-N-Biose (Galaktose- β -1,3-N-Acetyl-D-Galaktosamin). Vergleichend dazu konnte im Fall von Amuc_1686 nur eine minimale hydrolytische Spaltung von 10 % der initialen Galakto-N-Biose-Konzentration gemessen werden, LacNac wurde nicht hydrolysiert. Amuc_0771 katalysiert somit sowohl die Spaltung von β -1,3 als auch β -1,4-galaktosidischen

Bindungen. Auch für Bga aus *X. manihotis* konnte die Aktivität mit beiden Verbindungstypen nachgewiesen werden. Die Präferenz lag jedoch deutlich bei β -1,3-glykosidisch verbundener Galaktose (Taron *et al.* 1995). Die beiden Disaccharide Laktose und LacNac unterscheiden sich ausschließlich durch einen acetylierten Aminrest an Position 2 des Glukosemoleküls. Da Laktose kaum hydrolysiert wurde und Galakto-N-Biose wie auch das präferierte Substrat LacNac einen acetylierten Aminrest an der zweiten Zuckereinheit trägt, ist diese funktionelle Gruppe möglicherweise für eine Hydrolyse durch Amuc_0771 notwendig. Im Fall von Bga wurde ebenfalls die spezifische Hydrolyse terminaler Galaktose-Einheiten nachgewiesen, die über einen N-Acetylglukosaminrest an eine Polysaccharidkette gekoppelt waren (Taron *et al.* 1995). Beide Verbindungstypen sind in intestinalen Mucinen häufig und lassen sich nicht nur in den Verzweigungen, sondern beispielsweise auch im Kerntyp 2 (Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-O-S/T) nachweisen (Holmen-Larsson *et al.* 2013).

Wie Amuc_0771 und Amuc_1686, wiesen auch Amuc_0824 und Amuc_1666 strukturelle Ähnlichkeiten auf. Diese Enzyme besaßen eine Identität von 35 % bei einer Sequenzübereinstimmung von 99 % und ein Molekulargewicht von etwa 140 kDa. Die beiden Enzyme gehören der Glykosidhydrolase-Familie 2 an. Sowohl das Molekulargewicht als auch die GH-Familie entspricht bisher gut charakterisierten Vertretern der β -Galaktosidasen, wie beispielsweise LacZ aus *E. coli*. Es konnte für Amuc_0824 und Amuc_1666 gezeigt werden, dass die Aktivität dieser Enzyme, wie auch im Fall von LacZ, durch Mg²⁺ deutlich gesteigert wird (Abschnitt 3.8.3.4 und 3.8.3.5; Huber *et al.* 1979). Dennoch sind die Unterschiede von Amuc_1666 und Amuc_0824 zu allen bisher bekannten β -Galaktosidasen gravierend. BLASTp-Analysen unter Verwendung der SwissProt-Datenbank zeigten, dass beide Enzyme innerhalb der charakterisierten Proteine die größte Homologie zur thermostabilen β -Galaktosidase LacZ aus *Thermotoga (T.) maritima* aufweisen (Moore *et al.* 1994; Kim *et al.* 2004). Die Identität lag dabei unter 40 % (Tab. 17). Diese β -Galaktosidase aus *T. maritima* besitzt ein Temperaturoptimum von 80 - 85 °C bei einem leicht sauren pH-Wert von 6,5 (Kim *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu lag das pH-Optimum von Amuc_0824 und Amuc_1666 im leicht alkalischen Bereich zwischen 7,75 – 8 (Abb. 66 und Abb. 69), was wie im Fall von Amuc_0771 und Amuc_1686 für eine Anpassung an das natürliche Habitat spricht. Auch die Temperatur-Optima waren im Vergleich zu LacZ aus *T. maritima* niedriger und lagen für Amuc_1666 bei 60 °C und Amuc_0824 in einem mesophilen Bereich von 40 °C. Für beide Enzyme wurde bioinformatisch ein klares Sec-abhängiges Signalpeptid identifiziert. Diese Signalsequenz weist auf eine periplasmatische Lokalisation hin und grenzt diese Enzyme somit klar von den übrigen β -Galaktosidasen dieser Größe ab. Die weniger komplexe Quartärstruktur spricht ebenfalls für eine extrazelluläre Lokalisation *in vivo*. Während LacZ aus *E. coli* nativ in einer homotetrameren Konformation vorliegt (Sinnott 1978; Juers *et al.* 2001), wurde mittels Gelfiltrationsanalysen für Amuc_1666 eine monomere Struktur und für Amuc_0824 eine dimere Struktur nachgewiesen (Abschnitt 3.8.3.4 und 3.8.3.5). Wie auch Amuc_0771 und Amuc_1686 sind Amuc_0824 und Amuc_1666 hochspezifisch für die Gattung *Akkermansia*. BLASTp-Analysen unter Verwendung der nicht-redundanten Datenbank ergaben geringe Identitäten außerhalb der Gattung von 37 - 40 %. Diese homologen Proteine waren wiederum ausschließlich innerhalb der Bacteroidetes zu finden. Amuc_1666 zeigte mit den getesteten chromogenen Substraten sowohl mit o-NPGal als auch mit p-NPGal spezifische Aktivitäten in einem Bereich von 6 ± 2 und $11,5 \pm 1,5$ U mg⁻¹. Wie auch für die

übrigen drei Enzyme wurden ausschließlich β -glykosidisch verknüpfte Verbindungen gespalten, was Amuc_1666 und Amuc_0824 als β -Galaktosidasen identifiziert. Amuc_1666 hydrolysierte bei 37 °C innerhalb von 12 h etwa 40 % der eingesetzten Laktose und LacNac vollständig (Tab. 21, Abb. 68). Diese Aktivität weist auf eine Spezialisierung des Enzyms auf β -1,4-Verknüpfungen hin, da auch Galakto-N-Biose nicht gespalten werden konnte. Eine acetylierte Aminogruppe am Substrat ist nicht notwendig, da sowohl die acetylierte Verbindung LacNac als auch die nicht-acetylierte Verbindung Laktose hydrolysiert wurden. Amuc_0824 zeigte bei den chromogenen Substraten als einzige der vier β -Galaktosidasen eine klare Präferenz von *o*-NPGal gegenüber *p*-NPGal als Substrat, die gemessene Aktivität war für dieses Substrat unter gleichen Bedingungen etwa 22 mal höher. Anders als Amuc_1666 konnte Amuc_0824 β -1,4-glykosidische Verbindungen nicht spalten. Auch konnte nur eine 20 %ige Hydrolyse der β -1,3-glykosidisch verbundenen Galakto-N-Biose nachgewiesen werden.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zu bekannten β -Galaktosidasen dieser Glykosidhydrolase-Familie ist die C-terminale Präsenz einer Discoidin-Domäne, die bereits bei Amuc_1686 beschrieben wurde. Im Fall von Amuc_0824 und Amuc_1666 liegt dieses Modul jedoch nicht verkürzt vor und es konnte auch keine Inhibierung durch Phospholipide gezeigt werden. Durch ein Alignment mit NedA aus *Micromonospora viridifaciens* (Ficko-Blean und Boraston 2006) zeigte sich das Vorhandensein aller notwendigen konservierten Bereiche, die an der Bindung an Galaktosereste innerhalb von Oligosacchariden beteiligt sind (Abb. 71). Somit ist davon auszugehen, dass diese beiden Discoidin-Domänen, anders als die Discoidin-Domäne von Amuc_1686, mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließlich die Substratspezifität sowie Substratbindungsaffinität von Amuc_0824 und Amuc_1666 erhöhen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit einem bislang weitgehend unbearbeiteten Bereich der Stammoptimierung des biotechnologisch und industriell wichtigen Essigsäurebakteriums *G. oxydans*. Dieser Organismus ist aufgrund einer fehlenden enzymatischen Ausstattung sowie nicht vorhandener geeigneter Importsysteme nicht dazu in der Lage, Di-, Oligo- und Polysaccharide als Kohlenstoffquelle nutzen zu können. Gerade aus industrieller Sicht und im Hinblick auf bioökonomische Prozessoptimierungen ist eine Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um diese, im Vergleich zu Monosacchariden oftmals günstigeren und nachhaltigeren Substrate, äußerst wünschenswert. Auf diese Weise könnten so einerseits die Kosten für die etablierte Produktion von verschiedenen Feinchemikalien wie Glukonat oder Ketoglukonat gesenkt werden und andererseits Prozesse für die Produktion neuer Verbindungen durch *G. oxydans* erschlossen werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde in dieser Arbeit eine neuartige Strategie entwickelt, die auf der heterologen Produktion geeigneter Hydrolasen mit anschließender Translokation in das Periplasma basierte.

Der erste Schritt bei der Entwicklung eines geeigneten Expressionssystems war dabei die Identifikation von Sec-abhängigen Signalsequenzen, bei denen von einem Erkennen durch die Sec-Translokationsmaschinerie in *G. oxydans* ausgegangen werden konnte und durch die eine effiziente Translokation der heterolog produzierten Hydrolasen vermittelt werden sollte. Dazu wurden zunächst bioinformatisch 240 Signalsequenzen innerhalb des Genoms von *G. oxydans* identifiziert. Von diesen wurden anschließend, basierend auf der Aminosäurezusammensetzung der Primärsequenzen, sechs Signalpeptide ausgewählt und eine Signalpeptidbibliothek erstellt. Diese enthielt neben den *G. oxydans*-stämmigen Signalpeptiden auch die Signalsequenz der Pektatlyase B aus *E. carotovora*. Mittels des Reporterenzym PhoA konnte die Translokationseffizienz der verschiedenen Signalpeptide in *G. oxydans* quantifiziert und die Signalsequenz von PelB, bezogen auf PhoA, als effizientestes Sec-abhängiges Signalpeptid identifiziert werden (Kosciow *et al.* 2014). Da die Translokationseffizienz eines Signalpeptids neben der Aminosäurezusammensetzung und dem Expressionsorganismus jedoch auch vom zu translozierenden Protein abhängig ist, lies die erstellte Signalsequenzbibliothek Optimierungsmöglichkeiten zu, durch die das Expressionssystem an die jeweils zu produzierende Hydrolase angepasst werden konnte.

Im nächsten Schritt wurden die Funktionalität sowie Eignung des generierten Expressionssystems für die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* untersucht. Dabei diente zunächst das Disaccharid Trehalose als Modellzucker. Durch die heterologe Produktion der *E. coli*-stämmigen Trehalase TreA mit anschließender PelB-Signalsequenz vermittelten Translokation in das Periplasma war es möglich, die Hydrolyse von Trehalose durch *G. oxydans* *in vivo* zu erreichen (Kosciow *et al.* 2014). Während der Wildtyp von *G. oxydans* Trehalose als einzige C-Quelle im Medium nicht für ein Wachstum nutzen konnte, erreichte der generierte Stamm *G. oxydans treA* mit 50 mM Trehalose eine

finale OD_{600nm} von 1,7 bei einer Verdopplungszeit von 4,2 h. Diese Werte entsprachen etwa den Wachstumsparametern, die unter gleichen Bedingungen mit dem Substrat Mannitol erreicht wurden. Dieses Substrat wird in der Industrie standardisiert für die Anzucht von *G. oxydans* verwendet. Darüber hinaus zeigte sich, dass über die Regulation der Expressionsstärke von *treA* mit großer Wahrscheinlichkeit ein Mechanismus gegeben ist, durch den sich das Produktspektrum bei der Nutzung von Trehalose als Substrat stark beeinflussen lässt (Kosciow *et al.* 2014).

Im Hinblick auf die Erweiterung des Substratspektrums um Polysaccharide wurde in dieser Arbeit eine Strategie entwickelt, um die äußere Membran als Hindernis bei der Produktion von Exoenzymen zu überbrücken und so den extrazellulären Abbau dieser Polymere zu gewährleisten. Diese Strategie basierte auf der Deletion von TolB, kodiert durch *gox1687*, was eine Destabilisierung der äußeren Membran zur Folge hatte und in einem sekretorischen Stamm von *G. oxydans* resultierte (Kosciow *et al.* 2016). Bei diesem Stamm *G. oxydans* Δ *tolB*, welcher zusätzlich *phoA* exprimierte, konnten $49,6 \pm 3$ % der Gesamt-Aktivität des heterolog produzierten Reporterenzym im Überstand detektiert werden. Im Fall des *phoA* exprimierenden Wildtyps hingegen wurden nur 2,6 % der PhoA-Aktivität extrazellulär nachgewiesen. Diese enorme Steigerung der sekretorischen Eigenschaften verdeutlichte das Potential des Stamms *G. oxydans* Δ *tolB* in Kombination mit dem generierten Expressionssystem für die Produktion und Translokation rekombinanter Enzyme im Hinblick auf die Nutzung von Polysacchariden. Es zeigte sich außerdem, dass die Deletion von TolB, bei dem es sich um eines der häufigsten Proteine im Periplasma handelt, eine Entlastung des Sec-Translokationsapparats zur Folge hatte und die Translokationseffizienz der produzierten Hydrolasen noch weiter optimierte.

So konnte für den Stamm *G. oxydans* Δ *tolB* *sacC*, welcher anstelle von *treA* das *Z. mobilis*-stämmige, Sucrase-kodierende Gen *sacC* trug, eine Nutzung des nachhaltigen und günstigen Substrats Saccharose gezeigt werden. *G. oxydans* Δ *tolB* *sacC* erreichte mit Saccharose als einzige C-Quelle eine OD_{600nm} von 1,9. Zusätzlich besaß der Stamm die Fähigkeit, das Trisaccharid Raffinose als Substrat nutzen zu können, wobei eine Akkumulation der Feinchemikalie Melibiose im Kulturüberstand erfolgte. *G. oxydans* Δ *tolB* *sacC* diente, über diese Arbeit hinaus, als Grundlage für die Produktion des potentiellen Süßungsmittels 5-Ketofruktose mittels eines Zwei-Stamm-Systems, wobei sowohl aufgereinigte Saccharose als auch homogenisierte Zuckerrüben direkt als Substrat eingesetzt werden konnten (Europäisches Patentregister, Anmeldenummer EP17175730.5)

Im Hinblick auf die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um Polysaccharide wurde sowohl mit Xylan als auch mit Cellulose als potentiellen nachhaltigen Substraten gearbeitet. Im Fall von Xylan konnte durch die Generierung des Stamms *G. oxydans* Δ *tolB* *xynA* eine Mutante entwickelt werden, welche zur Produktion der *B. subtilis*-stämmigen Endoxylanase XynA befähigt war (Kosciow *et al.* 2016). Dieses Enzym wurde mit großer Effizienz in der Überstand sekretiert und vermittelte dort die Hydrolyse von Xylan zu hauptsächlich Xylobiose. Diese präbiotisch aktive Verbindung konnte von *G. oxydans* nicht als Substrat genutzt werden und akkumulierte sich daher im Kulturüberstand. Somit war der Stamm *G. oxydans* Δ *tolB* *xynA* optimal für die effiziente Produktion von Xylooligosacchariden (XOs) geeignet.

Für einen weiteren Stamm, *G. oxydans* Δ *tolB xynB*, konnte die Produktion und Translokation der β -Xylosidase XynB aus *B. subtilis* nachgewiesen werden. Durch dieses Enzym wurde extrazellulär die Hydrolyse des chromogenen Xylobiose-Analogons *p*-Nitrophenyl-Xylopyranosid durch intakte Zellen ermöglicht. Die zukünftige Erstellung eines Stamms von *G. oxydans*, welcher sowohl *xynA* als auch *xynB* mit dem in dieser Arbeit konstruierten System exprimiert, könnte somit die vollständige Hydrolyse von unverzweigtem Xylan mit Xylonsäure als Oxidations-Endprodukt ermöglichen.

Im Hinblick auf die vollständige Hydrolyse von Cellulose für die Produktion Glukose-basierter Feinchemikalien wie Glukonat und Ketoglukonat, konnte durch die Mutante *G. oxydans* Δ *tolB boGH3A* ein Stamm generiert werden, der zur Hydrolyse von Cellooligosacchariden befähigt war. Der Stamm *G. oxydans* Δ *tolB egIS* besaß zwar die Fähigkeit, die Endoglukanase EglS in aktiver Form zu produzieren, jedoch scheiterte die PelB-Signalsequenz-vermittelte Translokation. Durch Anpassung der Signalsequenz könnte, in Kombination mit der β -Glukosidase BoGH3A aus *B. ovatus*, zukünftig ein cellulolytischer Stamm von *G. oxydans* erstellt werden, der für die Produktion von Glukose-basierten Feinchemikalien aus dem nachwachsenden Rohstoff Cellulose geeignet wäre.

Bei der Suche nach einer geeigneten β -Galaktosidase für die Erweiterung des Substratspektrums von *G. oxydans* um Laktose wurde durch den Stamm *G. oxydans* Δ *tolB boGH2A* eine leicht erhöhte Nutzung dieses Disaccharids beobachtet.

Mit der Analyse der Enzyme Amuc_0771, Amuc_0824, Amuc_1666 und Amuc_1686 aus dem Darmbakterium *A. muciniphila* wurden vier neuartige β -Galaktosidasen identifiziert und charakterisiert. Besonders Amuc_1686 stellte hierbei einen außergewöhnlichen Vertreter dieser Enzymklasse dar. Dieses Enzym wies starke Homologien mit eukaryotischen Proteinen auf, was auf einen erfolgten horizontalen Gentransfer hindeuten könnte. Darüber hinaus besitzt Amuc_1686 eine einzigartige C-terminale Discoidin-Domäne. Diese Domäne vermittelt eine nicht-kompetitive Hemmung des Enzyms durch verschiedenen Phospholipide und könnte einen direkten Hinweis auf einen Regulationsmechanismus innerhalb der mutualistischen Beziehung zwischen *A. muciniphila* und dem Wirtsorganismus liefern.

6 Literaturverzeichnis

- Aa, K.; Flengsrud, R.; Lindahl, V.; Tronsmo, A. (1994): Characterization of production and enzyme properties of an endo- β -1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* CK-2 isolated from compost soil. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 66 (4), S. 319–326.
- Abdallah, A. M.; Van Pittius, N. C. Gey; Champion, P. A. D.; Cox, J.; Luirink, J.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E.; Appelmelk, B. J.; Bitter, W. (2007): Type VII secretion—mycobacteria show the way. In: *Nature Reviews Microbiology* 5 (11), S. 883–891.
- Ahn, Y. O.; Zheng, M.; Bevan, D. R.; Esen, A.; Shiu, S.-H.; Benson, J.; Peng, H.-P.; Miller, J. T.; Cheng, C.-L.; Poulton, J. E. (2007): Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 35. In: *Phytochemistry* 68 (11), S. 1510–1520.
- Alam, A.; Leoni, G.; Quiros, M.; Wu, H.; Nusrat, A.; Neish, A. (2016): O-012 The Intestinal Wound Regeneration Modulates Mucosal Microenvironment to Stimulate Expansion of a Local Pro-restitutive Microbiota. In: *Inflammatory Bowel Diseases* 22, S4.
- Alt-Moerbe, J.; Neddermann, P.; Lintig, J.; Weiler, Elmar W.; Schröder, J. (1988): Temperature-sensitive step in Ti plasmid vir-region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacteria*. In: *Molecular and General Genetics MGG* 213 (1), S. 1–8.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. In: *Journal of Molecular Biology* 215 (3), S. 403–410.
- Ames, G. F.; Prody, C.; Kustu, S. (1984): Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. In: *Journal of Bacteriology* 160 (3), S. 1181–1183.
- Aristidou, A.; Penttilä, M. (2000): Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. In: *Current Opinion in Biotechnology* 11 (2), S. 187–198.
- Arrieta, J. G.; Sotolongo, M.; Menéndez, C.; Alfonso, D.; Trujillo, L. E.; Soto, M.; Ramírez, R.; Hernández, L. (2004): A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. In: *Journal of Bacteriology* 186 (15), S. 5031–5039.
- Baek, C. U.; Lee, S. G.; Chung, Y. R.; Cho, I.; Kim, J. H. (2012): Cloning of a family 11 xylanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 isolated from Cheonggukjang. In: *Indian Journal of Microbiology* 52 (4), S. 695–700.
- Banka, A. L.; Guralp, S. A.; Gulari, E. (2014): Secretory expression and characterization of two hemicellulases, xylanase, and β -xylosidase, isolated from *Bacillus subtilis* M015. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174 (8), S. 2702–2710.
- Barbosa, M. F.; Beck, M. J.; Fein, J. E.; Potts, D.; Ingram, L. O. (1992): Efficient fermentation of *Pinus* sp. acid hydrolysates by an ethanologenic strain of *Escherichia coli*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 58 (4), S. 1382–1384.
- Barnhart, M. M.; Chapman, M. R. (2006): Curli biogenesis and function. In: *Annual Review of Microbiology* 60, S. 131–147.
- Bastawde, K. B. (1992): Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8 (4), S. 353–368.
- Baumgartner, S.; Hofmann, K.; Bucher, P.; Chiquet-Ehrismann, R. (1998): The discoidin domain family revisited: new members from prokaryotes and a homology-based fold prediction. In: *Protein Science* 7 (7), S. 1626–1631.
- Baumgartner, S.; Littleton, J. T.; Broadie, K.; Bhat, M. A.; Harbecke, R.; Lengyel, J. A.; Chiquet-Ehrismann, R.; Prokop, A.; Bellen, H. J. (1996): A *Drosophila* neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. In: *Cell* 87 (6), S. 1059–1068.
- Beg, Q.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. S. (2001): Microbial xylanases and their industrial applications: a review. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (3-4), S. 326–338.

- Béguin, P.; Aubert, J.-P. (1994): The biological degradation of cellulose. In: *FEMS Microbiology Reviews* 13 (1), S. 25–58.
- Bell, W.; Sun, W.; Hohmann, S.; Wera, S.; Reinders, A.; De Virgilio, C.; Wiemken, A.; Thevelein, J. M. (1998): Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (50), S. 33311–33319.
- Beppu, M.; Fujimaki, M.; Hishiyama, E.; Kikugawa, K. (1996): Recognition of poly-N-acetyllactosaminyl saccharide chains on iron-oxidized erythrocytes by human monocytic leukemia cell line THP-1 differentiated into macrophages. In: *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 19 (2), S. 188–194.
- Berg, B. L.; Li, J.; Heider, J.; Stewart, V. (1991): Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. I. Nucleotide sequence of the *fdnGHI* operon and evidence that *opal* (UGA) encodes selenocysteine. In: *Journal of Biological Chemistry* 266 (33), S. 22380–22385.
- Berks, B. C. (1996): A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? In: *Molecular Microbiology* 22 (3), S. 393–404.
- Berks, B. C.; Sargent, Frank; Palmer, Tracy (2000): The Tat protein export pathway. In: *Molecular Microbiology* 35 (2), S. 260–274.
- Bertokova, A.; Bertok, T.; Filip, J.; Tkac, J. (2015): *Gluconobacter sp.* cells for manufacturing of effective electrochemical biosensors and biofuel cells. In: *Chemical Papers* 69 (1), S. 27–41.
- Bhandari, N.; Bahl, R.; Taneja, S.; Strand, T.; Mølbak, K.; Ulvik, R. J.; Sommerfelt, H.; Bhan, M. K. (2002): Substantial reduction in severe diarrheal morbidity by daily zinc supplementation in young north Indian children. In: *Pediatrics* 109 (6), S. 1-7.
- Biely, P. (1985): Microbial xylanolytic systems. In: *Trends in Biotechnology* 3 (11), S. 286–290.
- Biely, P.; Mislovičová, D.; Toman, R. (1988): Remazol brilliant blue-xylan: a soluble chromogenic substrate for xylanases. In: *Methods in Enzymology* 160, S. 536–541.
- Binet, R.; Létouffé, S.; Ghigo, J. M.; Delepelaire, P.; Wandersman, C. (1997): Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters—a review. In: *Gene* 192 (1), S. 7–11.
- Blair, J. M. A.; Piddock, L. J. V. (2009): Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. In: *Current Opinion in Microbiology* 12 (5), S. 512–519.
- Blattner, F. R.; Plunkett, G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B.; Shao, Y. (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. In: *Science* 277 (5331), S. 1453–1462.
- Blight, M. A.; Holland, I. B. (1994): Heterologous protein secretion and the versatile *Escherichia coli* haemolysin translocator. In: *Trends in Biotechnology* 12 (11), S. 450–455.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. In: *Electrophoresis* 8 (2), S. 93–99.
- Bolam, D. N.; Ciruela, A.; McQueen-Mason, S.; Simpson, P.; Williamson, M. P.; Rixon, J. E.; Boraston, A.; Hazlewood, G. P.; Gilbert, H. J. (1998): *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. In: *Biochemical Journal* 331 (3), S. 775–781.
- Boos, W.; Ehmann, U.; Bremer, E.; Middendorf, A.; Postma, P. (1987): Trehalase of *Escherichia coli*. Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions. In: *Journal of Biological Chemistry* 262 (27), S. 13212–13218.
- Borisenko, G. G.; Iverson, S. L.; Ahlberg, S.; Kagan, V. E.; Fadeel, B. (2004): Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8) binds to oxidized phosphatidylserine: implications for macrophage clearance of apoptotic cells. In: *Cell Death & Differentiation* 11 (8), S. 943–945.
- Bork, P.; Doolittle, R. F. (1994): *Drosophila* kelch motif is derived from a common enzyme fold. In: *Journal of Molecular Biology* 236 (5), S. 1277–1282.
- Bosch, D.; De Boer, P.; Bitter, W.; Tommassen, J. (1989): The role of the positively charged N-terminus of the signal sequence of *E. coli* outer membrane protein PhoE in export. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 979 (1), S. 69–76.

- Boulanger, R. R.; Kantrowitz, E. R. (2003): Characterization of a monomeric *Escherichia coli* alkaline phosphatase formed upon a single amino acid substitution. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (26), S. 23497–23501.
- Bouveret, E.; Derouiche, R.; Rigal, A.; Llobès, R.; Lazdunski, C.; Bénédicti, H. (1995): Peptidoglycan-associated lipoprotein-TolB interaction. A possible key to explaining the formation of contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (19), S. 11071–11077.
- Bouveret, E.; Rigal, A.; Lazdunski, C.; Bénédicti, H. (1998): Distinct regions of the colicin A translocation domain are involved in the interaction with TolA and TolB proteins upon import into *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology* 27 (1), S. 143–157.
- Bowden, G. A.; Paredes, A. M.; Georgiou, G. (1991): Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. In: *Nature Biotechnology* 9 (8), S. 725–730.
- Bowe, F.; Lipps, C. J.; Tsolis, R. M.; Groisman, E.; Heffron, F.; Kusters, J. G. (1998): At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. In: *Infection and Immunity* 66 (7), S. 3372–3377.
- Boyer, M.-H.; Cami, B.; Chambost, J.-P.; Magnan, M.; Cattaneo, J. (1987): Characterization of a new endoglucanase from *Erwinia chrysanthemi*. In: *European Journal of Biochemistry* 162 (2), S. 311–316.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), S. 248–254.
- Bräu, B.; Sahm, H. (1986): Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. In: *Archives of Microbiology* 144 (3), S. 296–301.
- Braun, V.; Bosch, V. (1972): Sequence of the Murein Lipoprotein and the Attachment Site of the Lipid. In: *European Journal of Biochemistry* 28 (1), S. 51–69.
- Brickman, E.; Beckwith, J. (1975): Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and ϕ 80 transducing phages. In: *Journal of Molecular Biology* 96 (2), S. 307–316.
- Brockmeier, U.; Caspers, M.; Freudl, R.; Jockwer, A.; Noll, T.; Eggert, T. (2006): Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. In: *Journal of Molecular Biology* 362 (3), S. 393–402.
- Brüser, T.; Deutzmann, R.; Dahl, C. (1998): Evidence against the double-arginine motif as the only determinant for protein translocation by a novel Sec-independent pathway in *Escherichia coli*. In: *FEMS Microbiology Letters* 164 (2), S. 329–336.
- Bu, H.-F.; Zuo, X.-L.; Wang, X.; Ensslin, M. A.; Koti, V.; Hsueh, W.; Raymond, A. S.; Shur, B. D.; Tan, X.-D. (2007): Milk fat globule-EGF factor 8/lactadherin plays a crucial role in maintenance and repair of murine intestinal epithelium. In: *The Journal of Clinical Investigation* 117 (12), S. 3673–3683.
- Buchert, J.; Viikari, L. (1988): Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 29 (4), S. 375–379.
- Buschke, N.; Schäfer, R.; Becker, J.; Wittmann, C. (2013): Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications—optimization of substrate spectrum and process robustness by rational and evolutive strategies. In: *Bioresource Technology* 135, S. 544–554.
- Büttner, D.; Bonas, U. (2002): Port of entry—the type III secretion translocon. In: *Trends in Microbiology* 10 (4), S. 186–192.
- Caines, M. E. C.; Zhu, H.; Vuckovic, M.; Willis, L. M.; Withers, S. G.; Wakarchuk, W. W.; Strynadka, N. C. J. (2008): The Structural Basis for T-antigen Hydrolysis by *Streptococcus pneumoniae* - a target for structure-based vaccine design. In: *Journal of Biological Chemistry* 283 (46), S. 31279–31283.
- Canard, B.; Garnier, T.; Saint-Joanis, B.; Cole, S. T. (1994): Molecular genetic analysis of the *nagH* gene encoding a hyaluronidase of *Clostridium perfringens*. In: *Molecular and General Genetics MGG* 243 (2), S. 215–224.
- Cascales, E.; Bernadac, A.; Gavioli, M.; Lazzaroni, J.-C.; Llobès, R. (2002): Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. In: *Journal of Bacteriology* 184 (3), S. 754–759.

- Cascales, E.; Gavioli, M.; Sturgis, J. N.; Lloubès, R. (2000): Proton motive force drives the interaction of the inner membrane TolA and outer membrane pal proteins in *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology* 38 (4), S. 904–915.
- Chanda, S. K.; Hirst, E. L.; Jones, J. K. N.; Percival, E. G. V. (1950): 262. The constitution of xylan from esparto grass (*Stipa tenacissima*, L.). In: *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, S. 1289–1297.
- Chang, C. N.; Key, M.; Bochner, B.; Heyneker, H.; Gray, G. (1987): High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. In: *Gene* 55 (2), S. 189–196.
- Chapla, D.; Pandit, P.; Shah, A. (2012): Production of xylooligosaccharides from corn cob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. In: *Bioresource Technology* 115, S. 215–221.
- Cheng, Y.-M.; Hsieh, F.-C.; Meng, M. (2009): Functional analysis of conserved aromatic amino acids in the discoidin domain of *Paenibacillus* β -1, 3-glucanase. In: *Microbial Cell Factories* 8 (1), S. 62.
- Choi, J. H.; Lee, S. Y. (2004): Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (5), S. 625–635.
- Chou, M. M.; Kendall, D. A. (1990): Polymeric sequences reveal a functional interrelationship between hydrophobicity and length of signal peptides. In: *Journal of Biological Chemistry* 265 (5), S. 2873–2880.
- Christie, P. J. (1997): *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. In: *Journal of Bacteriology* 179 (10), S. 3085.
- Chun, B. W., Dair, B., Macuch, P. J., Wiebe, D., Porteneuve, C., Jeknavorian, A. (2006): The Development of Cement and Concrete Additive. In: McMillan, J. D., Adney, W. S., Mielenz, J. R., Klasson, K. T. (Ed.) Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. ABAB Symposium. Humana Press. S. 645-658.
- Clavel, T.; Germon, P.; Vianney, A.; Portalier, R.; Lazzaroni, J. C. (1998): TolB protein of *Escherichia coli* K-12 interacts with the outer membrane peptidoglycan-associated proteins Pal, Lpp and OmpA. In: *Molecular Microbiology* 29 (1), S. 359–367.
- Click, E. M.; Webster, R. E. (1998): The TolQRA proteins are required for membrane insertion of the major capsid protein of the filamentous phage f1 during infection. In: *Journal of Bacteriology* 180 (7), S. 1723–1728.
- Coleman, J. E.; Gettins, P. (1983): Alkaline phosphatase, solution structure, and mechanism. In: *Advances in Enzymology and related Areas of Molecular Biology* 55, S. 381–452.
- Collado, M. C.; Derrien, M.; Isolauri, E.; De Vos, W. M.; Salminen, S. (2007): Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. In: *Applied and Environmental Microbiology* 73 (23), S. 7767–7770.
- Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G. (2005): Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. In: *FEMS Microbiology Reviews* 29 (1), S. 3–23.
- Coombs, J. M.; Brenchley, J. E. (1999): Biochemical and phylogenetic analyses of a cold-active β -galactosidase from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* BA. In: *Applied and Environmental Microbiology* 65 (12), S. 5443–5450.
- Cooper, J. A. D.; Smith, W.; Bacila, M.; Medina, H. (1959): Galactose oxidase from *Polyporus circinatus*, Fr. In: *Journal of Biological Chemistry* 234 (3), S. 445–448.
- Costa, T. R. D.; Felisberto-Rodrigues, C.; Meir, A.; Prevost, M. S.; Redzej, A.; Trokter, M.; Waksman, G. (2015): Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. In: *Nature Reviews Microbiology* 13 (6), S. 343–359.
- Côté, G. L.; Scott, M. H.; Miller-Fosmore, C. (2003): Prebiotic oligosaccharides via alternansucrase acceptor reactions. *Oligosaccharides in Food and Agriculture* 849 (7), S. 76-89.
- Crawford, D. L. (1978): Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. In: *Applied and Environmental Microbiology* 35 (6), S. 1041–1045.
- Crost, E. H.; Tailford, L. E.; Monestier, M.; Swarbreck, D.; Henrissat, B.; Crossman, L. C.; Juge, N. (2016): The mucin-degradation strategy of *Ruminococcus gnavus*: The importance of intramolecular trans-sialidases. In: *Gut Microbes* 7 (4), S. 302–312.

- Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Carpenter, J. F.; Rudolph, A. S.; Wistrom, C. A.; Spargo, B. J.; Anchordoguy, T. J. (1988): Interactions of sugars with membranes. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 947 (2), S. 367–384.
- Dalbey, R. E.; Von Heijne, G. (1992): Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes—a new protease family. In: *Trends in Biochemical Sciences* 17 (11), S. 474–478.
- Dalton, A. K.; East, J. M.; Sanjay, M.; Oliver, S.; Starling, P. A.; Lee, G. A. (1998): Interaction of phosphatidic acid and phosphatidylserine with the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum and the mechanism of inhibition. In: *Biochemical Journal* 329 (3), S. 637–646.
- Daniels, D. W.; Bertrand, K. P. (1985): Promoter mutations affecting divergent transcription in the Tn10 tetracycline resistance determinant. In: *Journal of Molecular Biology* 184 (4), S. 599–610.
- De Ley, J., Gillis, M.; Swings, J. (1984): The genus *Gluconobacter*. Krieg, N.R.; Holt, J. G. (Ed) In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Bd. 1. Baltimore, The Williams and Wilkins Co. S. 267–278.
- De Muynck, C.; Pereira, C. S. S.; Naessens, M.; Parmentier, S.; Soetaert, W.; Vandamme, E. J. (2007): The genus *Gluconobacter oxydans*: comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications. In: *Critical Reviews in Biotechnology* 27 (3), S. 147–171.
- Dedonder, R. (1966): Levansucrase from *Bacillus subtilis*. In: *Methods in Enzymology* 8, S. 500–505.
- Demchick, P.; Koch, A. L. (1996): The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. In: *Journal of Bacteriology* 178 (3), S. 768–773.
- Demetris, A. J.; Specht, S.; Nozaki, I.; Lunz, J. G.; Stolz, D. B.; Murase, N.; Wu, T. (2008): Small proline-rich proteins (SPRR) function as SH3 domain ligands, increase resistance to injury and are associated with epithelial–mesenchymal transition (EMT) in cholangiocytes. In: *Journal of Hepatology* 48 (2), S. 276–288.
- Deppenmeier, U.; Hoffmeister, M.; Prust, C. (2002): Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (3), S. 233–242.
- Deppenmeier, U.; Ehrenreich, A. (2008): Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16 (1–2), S. 69–80.
- Derman, A. I.; Beckwith, J. (1991): *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. In: *Journal of Bacteriology* 173 (23), S. 7719–7722.
- Derouiche, R.; Bénédicti, H.; Lazzaroni, J.-C.; Lazdunski, C.; Lloubès, R. (1995): Protein complex within *Escherichia coli* inner membrane. TolA N-terminal domain interacts with TolQ and TolR proteins. In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (19), S. 11078–11084.
- Derrien, M.; Collado, M. C.; Ben-Amor, K.; Salminen, S.; De Vos, W. M. (2008): The Mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract. In: *Applied and Environmental Microbiology* 74 (5), S. 1646–1648.
- Derrien, M.; van Baarlen, P.; Hooiveld, G.; Norin, E.; Müller, M.; De Vos, W. M. (2011): Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*. In: *Frontiers in Microbiology* 166 (2), S. 1–14.
- Derrien, M.; Vaughan, E. E.; Plugge, C. M.; De Vos, W. M. (2004): *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (5), S. 1469–1476.
- Desper, R.; Gascuel, O. (2004): Theoretical foundation of the balanced minimum evolution method of phylogenetic inference and its relationship to weighted least-squares tree fitting. In: *Molecular Biology and Evolution* 21 (3), S. 587–598.
- Desrochers, M. (1985): Molecular cloning of a β -xylosidase gene from *Bacillus subtilis*. In: *The Journal of General and Applied Microbiology* 31 (6), S. 513–518.
- Dharmani, P.; Srivastava, V.; Kisson-Singh, V.; Chadee, K. (2009): Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. In: *Journal of Innate Immunity* 1 (2), S. 123–135.
- Dohnalek, Margaret I. H.; Ostrom, Karin M.; Hilty, Milo D. (1998): Use of indigestible oligosaccharides to reduce the incidence of otitis media in humans: United States Patent (US5849324 A).

- Doud, Suzanne K.; Chou, Margaret M.; Kendall, Debra A. (1993): Titration of protein transport activity by incremental changes in signal peptide hydrophobicity. In: *Biochemistry* 32 (5), S. 1251–1256.
- Driessen, A. J. M.; Manting, E. H.; Van der Does, C. (2001): The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nature Structural & Molecular Biology* 8 (6), S. 492–498.
- Dubuisson, J.-F.; Vianney, A.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Lazzaroni, J. C. (2005): Tol-Pal proteins are critical cell envelope components of *Erwinia chrysanthemi* affecting cell morphology and virulence. In: *Microbiology* 151 (10), S. 3337–3347.
- Dwyer, R. S.; Malinverni, J. C.; Boyd, D.; Beckwith, J.; Silhavy, T. J. (2014): Folding LacZ in the periplasm of *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 196 (18), S. 3343–3350.
- Ebringerova, A.; Heinze, T. (2000): Xylan and xylan derivatives– biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. In: *Macromolecular Rapid Communications* 21 (9), S. 542–556.
- Eda, S. Yamanaka, M.; Beppu, M. (2004): Carbohydrate-mediated phagocytic recognition of early apoptotic cells undergoing transient capping of CD43 glycoprotein. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (7), S. 5967–5974.
- Egan, A. J. F.; Vollmer, W. (2013): The physiology of bacterial cell division. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1277 (1), S. 8–28.
- Elfari, M.; Ha, S.-W.; Bremus, C.; Merfort, M.; Khodaverdi, V.; Herrmann, U.; Sahm, H.; Görisch, H. (2005): A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 66 (6), S. 668–674.
- El-Sayed, M. M.; El-Deeb, S. A.; Abdel-Rehim, N. Z.; Mostafa, H. E.; Khorshid, M. A. (1996): Utilization of cheese whey for producing gluconic acid as a mean for pollution control. In: *Milchwissenschaft* 51 (5), S. 266–268.
- Emr, S. D.; Silhavy, T. J. (1983): Importance of secondary structure in the signal sequence for protein secretion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (15), S. 4599–4603.
- Entner, N.; Doudoroff, M. (1952): Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. In: *Journal of Biological Chemistry* 196 (2), S. 853–862.
- Evans, D. F.; Pye, G.; Bramley, R.; Clark, A. G.; Dyson, T. J.; Hardcastle, J. D. (1988): Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. In: *Gut* 29 (8), S. 1035–1041.
- Everard, A.; Belzer, C.; Geurts, L.; Ouwerkerk, J. P.; Druart, C.; Bindels, L. B.; Guiot, Y.; Derrien, M.; Muccioli, G. G.; Delzenne, N. M.; De Vos, W. M.; Cani, P. D. (2013): Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (22), S. 9066–9071.
- Fallingborg, J. (1999): Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. In: *Danish Medical Bulletin* 46 (3), S. 183–196.
- Fan, L. T.; Lee, Y.-H.; Beardmore, D. H. (1980): Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 22 (1), S. 177–199.
- Favre, D.; Ngai, P. K.; Timmis, K. N. (1993): Relatedness of a periplasmic, broad-specificity RNase from *Aeromonas hydrophila* to RNase I of *Escherichia coli* and to a family of eukaryotic RNases. In: *Journal of Bacteriology* 175 (12), S. 3710–3722.
- Fekkes, P.; Driessen, A. J. M. (1999): Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (1), S. 161–173.
- Feldmann, S. D.; Sahm, H.; Sprenger, G. A. (1992): Pentose metabolism in *Zymomonas mobilis* wild-type and recombinant strains. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 38 (3), S. 354–361.
- Ficko-Blean, E.; Boraston, A. B. (2006): The interaction of a carbohydrate-binding module from a *Clostridium perfringens* N-acetyl- β -hexosaminidase with its carbohydrate receptor. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (49), S. 37748–37757.
- Finn, R. D.; Coghill, P.; Eberhardt, R. Y.; Eddy, S. R.; Mistry, J.; Mitchell, A. L.; Potter, S. C.; Punta, M.; Qureshi, M.; Sangrador-Vegas, A.; Salazar, G. A.; Tate, J.; Bateman, A. (2016): The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. In: *Nucleic Acids Research* 44 (1), S. 279–285.

- Foster, P. A.; Fulcher, C. A.; Houghten, R. A.; Zimmerman, T. S. (1990): Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. In: *Blood* 75 (10), S. 1999–2004.
- Frederick, M. M.; Kiang, C.-H.; Frederick, J. R.; Reilly, P. J. (1985): Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points. In: *Biotechnology and Bioengineering* 27 (4), S. 525–532.
- Fujikawa, S.; Okazaki, M.; Matsumoto, N. (1991): Effect of xylooligosaccharide on growth of intestinal bacteria and putrefaction products. In: *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science* 44 (1), S. 37–40.
- Gabelsberger, J. Liebl, W.; Schleifer, K.-H. (1993): Cloning and characterization of β -galactoside and β -glucoside hydrolysing enzymes of *Thermotoga maritima*. In: *FEMS Microbiology Letters* 109 (2-3), S. 131–137.
- Galán, J. E.; Collmer, A. (1999): Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. In: *Science* 284 (5418), S. 1322–1328.
- Gamauf, C.; Marchetti, M.; Kallio, J.; Puranen, T.; Vehmaanperä, J.; Allmaier, G.; Kubicek, C. P.; Seiboth, B. (2007): Characterization of the bga1-encoded glycoside hydrolase family 35 β -galactosidase of *Hypocrea jecorina* with galacto- β -d-galactanase activity. In: *FEBS Journal* 274 (7), S. 1691–1700.
- Gao, D.; Luan, Y.; Wang, Q.; Liang, Q.; Qi, Q. (2015): Construction of cellulose-utilizing *Escherichia coli* based on a secretable cellulase. In: *Microbial Cell Factories* 14 (159), S. 1–8.
- Gao, D.; Wang, S.; Li, H.; Yu, H.; Qi, Q. (2015): Identification of a heterologous cellulase and its N-terminus that can guide recombinant proteins out of *Escherichia coli*. In: *Microbial Cell Factories* 14 (49), S. 1–8.
- Gasparic, A.; Martin, J.; Daniel, A. S.; Flint, H. J. (1995): A xylan hydrolase gene cluster in *Prevotella ruminicola* B (1) 4: sequence relationships, synergistic interactions, and oxygen sensitivity of a novel enzyme with exoxylanase and beta-(1, 4)-xylosidase activities. In: *Applied and Environmental Microbiology* 61 (8), S. 2958–2964.
- Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. (2005): Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker J.M. (Ed) The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press. S. 571–607.
- Gentschev, I.; Dietrich, G.; Goebel, W. (2002): The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. In: *Trends in Microbiology* 10 (1), S. 39–45.
- Georgiou, G.; Segatori, L. (2005): Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. In: *Current Opinion in Biotechnology* 16 (5), S. 538–545.
- Gerding, M. A.; Ogata, Y.; Pecora, N. D.; Niki, H.; De Boer, P. A. J. (2007): The trans-envelope Tol–Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in *E. coli*. In: *Molecular Microbiology* 63 (4), S. 1008–1025.
- Giaquinta, R. T. (1979): Sucrose translocation and storage in the sugar beet. In: *Plant Physiology* 63 (5), S. 828–832.
- Gierasch, L. M. (1989): Signal sequences. In: *Biochemistry* 28 (3), S. 923–930.
- Gilad, R.; Rabinovich, L.; Yaron, S.; Bayer, E. A.; Lamed, R.; Gilbert, H. J.; Shoham, Y. (2003): Cell, a noncellulosomal family 9 enzyme from *Clostridium thermocellum*, is a processive endoglucanase that degrades crystalline cellulose. *Journal of bacteriology* 185 (2), S. 391–398.
- Gilkes, N. R.; Warren, R.; Miller, R. C.; Kilburn, D. G. (1988): Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. In: *Journal of Biological Chemistry* 263 (21), S. 10401–10407.
- Gish, W.; States, D. J. (1993): Identification of protein coding regions by database similarity search. In: *Nature Genetics* 3 (3), S. 266–272.
- Godlewska, R.; Wiśniewska, K.; Pietras, Z.; Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2009): Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. In: *FEMS Microbiology Letters* 298 (1), S. 1–11.

- Goldman, D.; Lavid, N.; Schwartz, A.; Shoham, G.; Danino, D.; Shoham, Y. (2008): Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase an ordered microfibril structure of the enzyme promotes levan polymerization. In: *Journal of Biological Chemistry* 283 (47), S. 32209–32217.
- González-Candelas, L.; Aristoy, M. C.; Polaina, J.; Flors, A. (1989): Cloning and characterization of two genes from *Bacillus polymyxa* expressing beta-glucosidase activity in *Escherichia coli*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 55 (12), S. 3173–3177.
- González-Candelas, L.; Ramón, D.; Polaina, J. (1990): Sequences and homology analysis of two genes encoding β -glucosidases from *Bacillus polymyxa*. In: *Gene* 95 (1), S. 31–38.
- Gornall, A. G.; Bardawill, C. J.; David, M. M. (1949): Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. In: *Journal of Biological Chemistry* 177 (2), S. 751–766.
- Gottesman, S. (1996): Proteases and their targets in *Escherichia coli* 1. In: *Annual Review of Genetics* 30 (1), S. 465–506.
- Goujon, M.; McWilliam, H.; Li, W.; Valentin, F.; Squizzato, S.; Paern, J.; Lopez, R. (2010): A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. In: *Nucleic Acids Research* 38 (2), S. 695–699.
- Grishin, N. V. (1995): Estimation of the number of amino acid substitutions per site when the substitution rate varies among sites. In: *Journal of Molecular Evolution* 41 (5), S. 675–679.
- Grosjean, H.; Fiers, W. (1982): Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. In: *Gene* 18 (3), S. 199–209.
- Guisseppi, A.; Aymeric, J. L.; Cami, B.; Barras, F.; Creuzet, N. (1991): Sequence analysis of the cellulase-encoding celY gene of *Erwinia chrysanthemi*: a possible case of interspecies gene transfer. In: *Gene* 106 (1), S. 109–114.
- Gunasekaran, P.; Mukundan, G.; Kannan, R.; Velmurugan, S.; Ait-Abdelkader, N.; Alvarez-Macarie, E.; Baratti, J. (1995): The *sacB* and *sacC* genes encoding levansucrase and sucrose form a gene cluster in *Zymomonas mobilis*. In: *Biotechnology Letters* 17 (6), S. 635–642.
- Gupta, A.; Singh, V. K.; Qazi, G. N.; Kumar, A. (2001): *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. In: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3 (3), S. 445–456.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Journal of Molecular Biology* 166 (4), S. 557–580.
- Hancock, R. D. (2009): Recent patents on vitamin C: opportunities for crop improvement and single-step biological manufacture. In: *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* 1 (1), S. 39–49.
- Hancock, R. E. W.; Brinkman, F. S. L. (2002): Function of *Pseudomonas porins* in uptake and efflux. In: *Annual Reviews in Microbiology* 56 (1), S. 17–38.
- Hanke, T.; Nöh, K.; Noack, S.; Polen, T.; Bringer, S.; Sahm, H.; Wiechert, W.; Bott, M. (2013): Combined fluxomics and transcriptomics analysis of glucose catabolism via a partially cyclic pentose phosphate pathway in *Gluconobacter oxydans* 621H. In: *Applied and Environmental Microbiology* 79 (7), S. 2336–2348.
- Hantke, K.; Braun, V. (1973): Covalent binding of lipid to protein. In: *The FEBS Journal* 34 (2), S. 284–296.
- Hatch, M. D.; Slack, C. R. (1966): Photosynthesis by sugar-cane leaves: a new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. In: *Biochemical Journal* 101 (1), S. 103–111.
- He, Z.; Tessier-Lavigne, M. (1997): Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. In: *Cell* 90 (4), S. 739–751.
- Heggeset, T. M. B.; Kucharova, V.; Nærdal, I.; Valla, S.; Sletta, H.; Ellingsen, T. E.; Brautaset, T. (2013): Combinatorial mutagenesis and selection of improved signal sequences and their application for high-level production of translocated heterologous proteins in *Escherichia coli*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 79 (2), S. 559–568.
- Von Heijne, G. (1984): How signal sequences maintain cleavage specificity. In: *Journal of Molecular Biology* 173 (2), S. 243–251.
- Von Heijne, G. (1985): Signal sequences: the limits of variation. In: *Journal of Molecular Biology* 184 (1), S. 99–105.

- Von Heijne, G. (1990): The signal peptide. In: *Journal of Membrane Biology* 115 (3), S. 195–201.
- Von Heijne, G.; Abrahmsen, L. (1989): Species-specific variation in signal peptide design Implications for protein secretion in foreign hosts. In: *FEBS letters* 244 (2), S. 439–446.
- Heilpern, A. J.; Waldor, M. K. (2000): CTX ϕ infection of *Vibrio cholerae* requires the *tolQRA* gene products. In: *Journal of Bacteriology* 182 (6), S. 1739–1747.
- Hekmat, D.; Bauer, R.; Fricke, J. (2003): Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 26 (2), S. 109–116.
- Hemmerich, J.; Rohe, P.; Kleine, B.; Jurischka, S.; Wiechert, W.; Freudl, R.; Oldiges, M. (2016): Use of a Sec signal peptide library from *Bacillus subtilis* for the optimization of cutinase secretion in *Corynebacterium glutamicum*. In: *Microbial Cell Factories* 15 (208), S. 1–11.
- Henderson, I. R.; Navarro-Garcia, F.; Nataro, J. P. (1998): The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. In: *Trends in Microbiology* 6 (9), S. 370–378.
- Henrissat, B.; Bairoch, A. (1993): New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. In: *Biochemical Journal* 293 (3), S. 781–788.
- Hidai, C.; Zupancic, T.; Penta, K.; Mikhail, A.; Kawana, M.; Quertermous, E. E.; Aoka, Y.; Fukagawa, M.; Matsui, Y.; Platika, D.; Auerbach, R. Hogan, B. L. M.; Snodgrass, R.; Quertermous, T. (1998): Cloning and characterization of developmental endothelial locus-1: an embryonic endothelial cell protein that binds the $\alpha v \beta 3$ integrin receptor. In: *Genes & Development* 12 (1), S. 21–33.
- Hinsa, S. M.; Espinosa-Urgel, M.; Ramos, J. L.; O'toole, G. A. (2003): Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. In: *Molecular Microbiology* 49 (4), S. 905–918.
- Ho, C. W.; Wan Aida, W. M.; Maskat, M. Y.; Osman, H. (2007): Changes in volatile compounds of palm sap (*Arenga pinnata*) during the heating process for production of palm sugar. In: *Food Chemistry* 102 (4), S. 1156–1162.
- Hoffman, C. S.; Wright, A. (1985): Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: an approach for studying protein secretion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (15), S. 5107–5111.
- Holmen-Larsson, J. M.; Thomsson, K. A.; Rodríguez-Piñeiro, A. M.; Karlsson, H.; Hansson, G. C. (2013): Gastrointestinal Muc5ac and Muc2 mucin O-glycan pattern reveal a regio-specific distribution-3. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. In: *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. DOI: 10.1152/ajpgi.00048.2013
- Hölscher, T.; Görisch, H. (2006): Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. In: *Journal of Bacteriology* 188 (21), S. 7668–7676.
- Hölscher, T.; Weinert-Sepalage, D.; Görisch, H. (2007): Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. In: *Microbiology* 153 (2), S. 499–506.
- Holst, O.; Enfors, S.-O. Mattiasson, B. (1982): Oxygenation of immobilized cells using hydrogen-peroxide; a model study of *Gluconobacter oxydans* converting glycerol to dihydroxyacetone. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 14 (2), S. 64–68.
- Horlacher, R.; Uhland, K.; Klein, W.; Ehrmann, M.; Boos, W. (1996): Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 178 (21), S. 6250–6257.
- Hoskins, L. C.; Boulding, E. T. (1981): Mucin degradation in human colon ecosystems: evidence for the existence and role of bacterial subpopulations producing glycosidases as extracellular enzymes. In: *Journal of Clinical Investigation* 67 (1), S. 163–172.
- Hosokawa, T.; Ando, K.; Shimaoka, T.; Nakamura, T. (1999): Use of oligosaccharides for the treatment of pruritus cutaneus associated with renal failure. United States Patent (US5972905 A).
- Huber, R. E.; Parfett, C.; Woulfe-Flanagan, H.; Thompson, D. J. (1979): Interaction of divalent cations with beta-galactosidase (*Escherichia coli*). In: *Biochemistry* 18 (19), S. 4090–4095.
- Hueck, C. J. (1998): Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (2), S. 379–433.

- Hulo, N.; Bairoch, A.; Bulliard, V.; Cerutti, L.; Cuče, B. A.; De Castro, E.; Lachaize, C.; Langendijk-Genevaux, P. S.; Sigrist, C. J. A. (2008): The 20 years of PROSITE. In: *Nucleic Acids Research* 36 (1), S. 245–249.
- Hussain, H.; Grove, J.; Griffiths, L.; Busby, S.; Cole, J. (1994): A seven-gene operon essential for formate-dependent nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. In: *Molecular Microbiology* 12 (1), S. 153–163.
- Imai, Y.; Lasky, L. A.; Rosen, S. D. (1993): Sulphation requirement for GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin. In: *Nature* 361 (6412), S. 555–557.
- Imperi, F.; Ciccocanti, F.; Perdomo, A. B.; Tiburzi, F.; Mancone, C.; Alonzi, T.; Ascenzi, P.; Visca, P.; Fimia, G. M. (2009): Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen. In: *Proteomics* 9 (7), S. 1901–1915.
- Inouye, M.; Shaw, J.; Shen, C. (1972): The assembly of a structural lipoprotein in the envelope of *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry* 247 (24), S. 8154–8159.
- Isorna, P.; Polaina, J.; Latorre-García, L.; Cañada, F. J.; González, B.; Sanz-Aparicio, J. (2007): Crystal structures of *Paenibacillus polymyxa* β -glucosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate specificity and give new insights into the catalytic machinery of family I glycosidases. In: *Journal of Molecular Biology* 371 (5), S. 1204–1218.
- Ito, Y.; Sasaki, T. (1997): Cloning and characterization of the gene encoding a novel β -galactosidase from *Bacillus circulans*. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61 (8), S. 1270–1276.
- Itzhaki, R. F.; Gill, D. M. (1964): A micro-biuret method for estimating proteins. In: *Analytical Biochemistry* 9 (4), S. 401–410.
- Jacobson, R. H.; Zhang, X. J.; DuBose, R. F.; Matthews, B. W. (1994): Three-dimensional structure of beta-galactosidase from *E. coli*. In: *Nature* 369 (6483), S. 761–766.
- Jakob, F.; Meißner, D.; Vogel, R. F. (2012): Comparison of novel GH 68 levansucrases of levan-overproducing *Gluconobacter* species. In: *Acetic Acid Bacteria* 1 (1), S. 6–14.
- Jap, B. K.; Walian, P. J. (1996): Structure and functional mechanism of porins. In: *Physiological reviews* 76 (4), S. 1073–1088.
- Jarvis, K. G.; Giron, J. A.; Jerse, A. E.; McDaniel, T. K.; Donnenberg, M. S.; Kaper, J. B. (1995): Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (17), S. 7996–8000.
- Jenny, R. J.; Pittman, D. D.; Toole, J. J.; Kriz, R. W.; Aldape, R. A.; Hewick, R. M.; Kaufman, R. J.; Mann, K. G. (1987): Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (14), S. 4846–4850.
- Jensen, P. H.; Kolarich, D.; Packer, N. H. (2010): Mucin-type O-glycosylation—putting the pieces together. In: *FEBS journal* 277 (1), S. 81–94.
- Jones, J. A.; Hannun, Y. A. (2002): Tight Binding Inhibition of Protein Phosphatase-1 by Phosphatidic Acid Specificity of Inhibition by the Phospholipid. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (18), S. 15530–15538.
- Juers, D. H.; Heightman, T. D.; Vasella, A.; McCarter, J. D.; Mackenzie, L.; Withers, S. G.; Matthews, B. W. (2001): A Structural View of the Action of *Escherichia coli* (*lacZ*) β -Galactosidase. In: *Biochemistry* 40 (49), S. 14781–14794.
- Jules, M.; Beltran, G.; François, J.; Parrou, J. L. (2008): New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: NTH2 encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of TPS1 reveals Ath1p-dependent trehalose mobilization. In: *Applied and Environmental Microbiology* 74 (3), S. 605–614.
- Juturu, V.; Wu, J. C. (2014): Microbial exo-xylanases: a mini review. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174 (1), S. 81–92.
- Käll, L.; Krogh, A.; Sonnhammer, E. L. L. (2004): A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. In: *Journal of Molecular Biology* 338 (5), S. 1027–1036.

- Kallnik, V.; Meyer, M.; Deppenmeier, U.; Schweiger, P. (2010): Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Biotechnology* 150 (4), S. 460–465.
- Kane, J. F.; Hartley, D. L. (1988): Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. In: *Trends in Biotechnology* 6 (5), S. 95–101.
- Kane, W. H.; Davie, E. W. (1988): Blood Coagulation Factors V and VIII: Structural and Functional Similarities and Their Relationship to Hemorrhagic and Thrombotic Disorders. In: *Blood* 71 (3), S. 539–555.
- Kaneko, S.; Kobayashi, H. (2003): Purification and characterization of extracellular β -galactosidase secreted by suspension cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67 (3), S. 627–630.
- Kang, D. G.; Seo, J. H.; Jo, B. H.; Kim, C. S.; Choi, S. S.; Cha, H. J. (2016): Versatile signal peptide of *Flavobacterium*-originated organophosphorus hydrolase for efficient periplasmic translocation of heterologous proteins in *Escherichia coli*. In: *Biotechnology progress* 32 (4), S. 848–854.
- Kannan, R.; Mukundan, G.; Ait-Abdelkader, N.; Augier-Magro, V.; Baratti, J.; Gunasekaran, P. (1995): Molecular cloning and characterization of the extracellular sucrose gene (*sacC*) of *Zymomonas mobilis*. In: *Archives of Microbiology* 163 (3), S. 195–204.
- Kawai, S.; Goda-Tsutsumi, M.; Yakushi, T.; Kano, K.; Matsushita, K. (2013). Heterologous overexpression and characterization of a flavoprotein-cytochrome c complex fructose dehydrogenase of *Gluconobacter japonicus* NBRC3260. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (5), S. 1654-1660.
- Kayser, H. (1903): Über Bakterienhämolyse, im Besonderen das Colilysin. In: *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 42 (1), S. 118–138.
- Keller, K. L.; Bender, K. S.; Wall, J. D. (2009): Development of a markerless genetic exchange system for *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and its use in generating a strain with increased transformation efficiency. In: *Applied and Environmental Microbiology* 75 (24), S. 7682–7691.
- Kelley, L. A.; Mezulis, S.; Yates, C. M.; Wass, M. N.; Sternberg, M. J. E. (2015): The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. In: *Nature protocols* 10 (6), S. 845–858.
- Kerstens, K.; De Ley, J. (1968): The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 34 (1), S. 393–408.
- Kiefler, I.; Bringer, S.; Bott, M. (2015): SdhE-dependent formation of a functional *Acetobacter pasteurianus* succinate dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* - a first step toward a complete tricarboxylic acid cycle. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (21), S. 9147–9160.
- Kim, C. S.; Ji, E.-S.; Oh, D.-K. (2004): Characterization of a thermostable recombinant β -galactosidase from *Thermotoga maritima*. In: *Journal of Applied Microbiology* 97 (5), S. 1006–1014.
- King, T. E.; Cheldelin, V. H. (1957): Glucose oxidation and cytochromes in solubilized particulate fractions of *Acetobacter suboxydans*. In: *Journal of Biological Chemistry* 224 (1), S. 579–590.
- Kipriyanov, S. M.; Moldenhauer, G.; Little, M. (1997): High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures. In: *Journal of Immunological Methods* 200 (1-2), S. 69–77.
- Kiryu, T.; Kiso, T.; Nakano, H.; Murakami, H. (2015): Lactobionic and cellobionic acid production profiles of the resting cells of acetic acid bacteria. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 79 (10), S. 1712–1718.
- Kobayashi, K.; Komeda, T.; Miura, Y.; Kettoku, M.; Kato, M. (1997): Production of trehalose from starch by novel trehalose-producing enzymes from *Sulfolobus solfataricus* KM1. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83 (3), S. 296–298.
- Kobayashi, N.; Karisola, P.; Peña-Cruz, V.; Dorfman, D. M.; Jinushi, M.; Umetsu, S. E.; Butte, M. J.; Nagumo, H.; Chernova, I. (2007): TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. In: *Immunity* 27 (6), S. 927–940.
- Kondo, Y.; Toyoda, A.; Fukushi, H.; Yanase, H.; Tonomura, K.; Kawasaki, H.; Sakai, T. (1994): Cloning and characterization of a pair of genes that stimulate the production and secretion of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase and invertase. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 58 (3), S. 526–530.

- Koressaar, T.; Remm, M. (2007): Enhancements and modifications of primer design program Primer3. In: *Bioinformatics* 23 (10), S. 1289–1291.
- Kormelink, F. J. M.; Searle-van Leeuwen, M. J. F.; Wood, T. M.; Voragen, A. G. J. (1993): Purification and characterization of three endo-(1, 4)- β -xylanases and one β -xylosidase from *Aspergillus awamori*. In: *Journal of Biotechnology* 27 (3), S. 249–265.
- Korn, K.; Greiner-Stöffe, T.; Hahn, U. (2000): Ribonuclease assays utilizing toluidine blue indicator plates, methylene blue, or fluorescence correlation spectroscopy. In: *Methods in Enzymology* 341, S. 142–153.
- Kornacker, M. G.; Pugsley, A. P. (1990): Molecular characterization of *pulA* and its product, pullulanase, a secreted enzyme of *Klebsiella pneumoniae* UNF5023. In: *Molecular Microbiology* 4 (1), S. 73–85.
- Kosciow, K.; Domin, C.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2016): Extracellular targeting of an active endoxylanase by a TolB negative mutant of *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 43 (7), S. 989–999.
- Kosciow, K.; Zahid, N.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2014): Production of a periplasmic trehalase in *Gluconobacter oxydans* and growth on trehalose. In: *Journal of Biotechnology* 189, S. 27–35.
- Kosman, D. J.; Ettinger, M. J.; Weiner, R. E.; Massaro, E. J. (1974): The molecular properties of the copper enzyme galactose oxidase. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 165 (2), S. 456–467.
- Kostner, D.; Peters, B.; Mientus, M.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2013): Importance of *codB* for new *codA*-based markerless gene deletion in *Gluconobacter* strains. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (18), S. 8341–8349.
- Kotake, T.; Dina, S.; Konishi, T.; Kaneko, S.; Igarashi, K.; Samejima, M.; Watanabe, Y.; Kimura, K.; Tsumuraya, Y. (2005): Molecular cloning of a β -galactosidase from radish that specifically hydrolyzes β -(1 \rightarrow 3)- and β -(1 \rightarrow 6)-galactosyl residues of arabinogalactan protein. In: *Plant Physiology* 138 (3), S. 1563–1576.
- Kovach, M. E.; Phillips, R. W.; Elzer, P. H.; Roop, R. M.; Peterson, K. M. (1994): pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. In: *BioTechniques* 16 (5), S. 800–802.
- 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. In: *Gene* 166 (1), S. 175–176.
- Krajewski, V.; Simić, P.; Mouncey, N. J.; Bringer, S.; Sahm, H.; Bott, M. (2010): Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* for improved growth rate and growth yield on glucose by elimination of gluconate formation. In: *Applied and Environmental Microbiology* 76 (13), S. 4369–4376.
- Krogh, A.; Larsson, B.; Von Heijne, G.; Sonnhammer, E. L. L. (2001): Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. In: *Journal of Molecular Biology* 305 (3), S. 567–580.
- Kubori, T.; Matsushima, Y.; Nakamura, D.; Uralil, J.; Lara-Tejero, M.; Sukhan, A.; Galán, J. E.; Aizawa, S.-I. (1998): Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. In: *Science* 280 (5363), S. 602–605.
- La Grange, D. C.; Pretorius, I. S.; Van Zyl, W. H. (1997): Cloning of the *Bacillus pumilus* β -xylosidase gene (*xynB*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 47 (3), S. 262–266.
- Heppel, L. A. (1971): *The concept of periplasmic enzymes*. In: Rothfield, L. I. (Ed.): *Structure and Function of Biological Membranes* 223. Academic Press, New York. S. 224–245.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics* 23 (21), S. 2947–2948.
- Larsbrink, J.; Rogers, T. E.; Hemsworth, G. R.; McKee, L. S.; Tauzin, A. S.; Spadiut, O.; Klintner, S.; Pudlo, N. A.; Urs, K.; Koropatkin, N. M.; Creagh, A. L.; Haynes, C. A.; Kelly, A. G.; Cederholm, S. N.; Davis, G. J.; Martens, E. C.; Brumer, H. (2014): A discrete genetic locus confers xyloglucan metabolism in select human gut Bacteroidetes. In: *Nature* 506 (7489), S. 498–502.

- Lazzaroni, J. C.; Germon, P.; Ray, M.-C.; Vianney, A. (1999): The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. In: *FEMS Microbiology Letters* 177 (2), S. 191–197.
- Lazzaroni, J. C.; Portalier, R. C. (1979): Isolation and preliminary characterization of periplasmic-leaky mutants of *Escherichia coli* K-12. In: *FEMS Microbiology Letters* 5 (6), S. 411–416.
- Lazzaroni, J. C.; Vianney, A.; Popot, J. L.; Bénédicti, H.; Samatey, F.; Lazdunski, C.; Portalier, R.; Géli, V. (1995): Transmembrane α -Helix Interactions are Required for the Functional Assembly of the *Escherichia coli* Tol Complex. In: *Journal of Molecular Biology* 246 (1), S. 1–7.
- Le Loir, Y.; Nouaille, S.; Commissaire, J.; Bretigny, L.; Gruss, A.; Langella, P. (2001): Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 67 (9), S. 4119–4127.
- Lederberg, J. (1950): The beta-d-galactosidase of *Escherichia coli* strain K-12. In: *Journal of Bacteriology* 60 (4), S. 381–392.
- Lee, C.; Li, P.; Inouye, H.; Brickman, E. R.; Beckwith, J. (1989): Genetic studies on the inability of beta-galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. In: *Journal of Bacteriology* 171 (9), S. 4609–4616.
- Lee, G.-C.; Lin, C.-H.; Tao, Y.-C.; Yang, J.-M.; Hsu, K.-C.; Huang, Y.-J.; Huang, S.-H.; Kung, P.-J.; Chen, W.-L.; Wang, C.-M. (2015): The potential of lactulose and melibiose, two novel trehalase-indigestible and autophagy-inducing disaccharides, for polyQ-mediated neurodegenerative disease treatment. In: *NeuroToxicology* 48, S. 120–130.
- Lehnhardt, S.; Pollitt, N. S.; Goldstein, J.; Inouye, M. (1988): Modulation of the effects of mutations in the basic region of the OmpA signal peptide by the mature portion of the protein. In: *Journal of Biological Chemistry* 263 (21), S. 10300–10303.
- Lennox, E. S. (1955): Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. In: *Virology* 1 (2), S. 190–206.
- Leslie, S. B.; Israeli, E.; Lighthart, B.; Crowe, J. H.; Crowe, L. M. (1995): Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. In: *Applied and Environmental Microbiology* 61 (10), S. 3592–3597.
- Létoffé, S.; Delepelaire, P.; Wandersman, C. (1996): Protein secretion in gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding. In: *The EMBO Journal* 15 (21), S. 5804–5811.
- Levengood-Freyermuth, S. K.; Click, E. M.; Webster, R. E. (1993): Role of the carboxyl-terminal domain of TolA in protein import and integrity of the outer membrane. In: *Journal of Bacteriology* 175 (1), S. 222–228.
- Li, Weizhong; C., Andrew; Uludag, M.; Gur, T.; McWilliam, H.; Squizzato, S.; Park, Y. M.; Buso, N.; Lopez, R. (2015): The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. In: *Nucleic Acids Research* 43 (1), S. 580–584.
- Lin, C.-H.; Wu, Y.-R.; Yang, J.-M.; Chen, W.-L.; Chao, C.-Y.; Chen, I.-C.; Lin, T.-H.; Wu, Y.-C.; Hsu, K.-C.; Chen, C.-M.; Lee, G.-C.; Hsieh-Li, H.-M.; Lee, C.-M.; Lee-Chen, G.-J. (2016): Novel lactulose and melibiose targeting autophagy to reduce PolyQ aggregation in cell models of spinocerebellar ataxia 3. In: *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets* 15 (3), S. 351–359.
- Lindén, Sara K.; Florin, Timothy H. J.; McGuckin, Michael A. (2008): Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. In: *PloS one* 3 (12), e3952.
- Liu, B.; Li, Z.; Hong, Y.; Ni, J.; Sheng, D.; Shen, Y. (2006): Cloning, expression and characterization of a thermostable exo- β -D-glucosaminidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. In: *Biotechnology Letters* 28 (20), S. 1655–1660.
- Liu, H.; Valdehuesa, K. N. G.; Nisola, G. M.; Ramos, K. R. M.; Chung, W.-J. (2012): High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*. In: *Bioresource Technology* 115, S. 244–248.
- Llamas, M. A.; Ramos, J. L.; Rodríguez-Herva, J. J. (2000): Mutations in Each of the *tol* Genes of *Pseudomonas putida* Reveal that They Are Critical for Maintenance of Outer Membrane Stability. In: *Journal of Bacteriology* 182 (17), S. 4764–4772.

- Lo Sciuto, A.; Fernández-Piñar, R.; Bertuccini, L.; Iosi, F.; Superti, F.; Imperi, F. (2014): The periplasmic protein TolB as a potential drug target in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *PLoS one* 9 (8), e103784.
- Löe, H.; Rindom Schiøtt, C. (1970): The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. In: *Journal of Periodontal Research* 5 (2), S. 79–83.
- Lopes, J.; Gottfried, S.; Rothfield, L. (1972): Leakage of periplasmic enzymes by mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: isolation of “periplasmic leaky” mutants. In: *Journal of Bacteriology* 109 (2), S. 520–525.
- Lu, L.; Xiao, M.; Xu, X.; Li, Z.; Li, Y. (2007): A novel β -galactosidase capable of glycosyl transfer from *Enterobacter agglomerans* B1. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356 (1), S. 78–84.
- Luinge, H. J.; Hop, E.; Lutz, E. T.G.; Van Hemert, J. A.; De Jong, E. A.M. (1993): Determination of the fat, protein and lactose content of milk using Fourier transform infrared spectrometry. In: *Analytica Chimica Acta* 284 (2), S. 419–433.
- Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; Van Zyl, W. H.; Pretorius, I. S. (2002): Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (3), S. 506–577.
- Lyness, E. W.; Doelle, H. W. (1983): Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. In: *Biotechnology Letters* 5 (5), S. 345–350.
- Macauley, S.; McNeil, B.; Harvey, L. M. (2001): The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. In: *Critical Reviews in Biotechnology* 21 (1), S. 1–25.
- Makrides, S. C. (1996): Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. In: *Microbiological Reviews* 60 (3), S. 512–538.
- Mamman, A. S.; Lee, J.-M.; Kim, Y.-C.; Hwang, I. T.; Park, N.-J.; Hwang, Y. K.; Jong-San, C.; Hwang, J.-S. (2008): Furfural: Hemicellulose/xylose derived biochemical. In: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2 (5), S. 438–454.
- Manoil, C.; Beckwith, J. (1985): TnpA: a transposon probe for protein export signals. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (23), S. 8129–8133.
- Martens, E. C.; Koropatkin, N. M.; Smith, T. J.; Gordon, J. I. (2009): Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: the Bacteroidetes Sus-like paradigm. In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (37), S. 24673–24677.
- Martínez-Fleites, C.; Ortíz-Lombardía, M.; Pons, T.; Tarbouriech, N.; Taylor, E. J.; Arrieta, J. G.; Hernández, L.; Davies, G. J. (2005): Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. In: *Biochemical Journal* 390 (1), S. 19–27.
- Matsushita, K.; Fujii, Y.; Ano, Y.; Toyama, H.; Shinjoh, M.; Tomiyama, N.; Taro, M.; Sugisawa, T.; Hoshino, T.; Adachi, O. (2003): 5-Keto-d-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. In: *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4), S. 1959–1966.
- Matsushita, K.; Toyama, H.; Adachi, O. (1994): Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. In: *Advances in Microbial Physiology* 36, S. 247–301.
- 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. In: *Nucleic Acids Research* 41 (1), S. 597–600.
- Meador, J.; Kennell, D. (1990): Cloning and sequencing the gene encoding *Escherichia coli* ribonuclease I: exact physical mapping using the genome library. In: *Gene* 95 (1), S. 1–7.
- Medve, J.; Karlsson, J.; Lee, D.; Tjerneld, F. (1998): Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. In: *Biotechnology and Bioengineering* 59 (5), S. 621–634.
- Meens, J.; Frings, E.; Klose, M.; Freudl, R. (1993): An outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* can be translocated across the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. In: *Molecular Microbiology* 9 (4), S. 847–855.
- Meinke, A.; Gilkes, N. R.; Kwan, E.; Kilburn, D. G.; Warren, R. A. J.; Miller, R. C. (1994): Cellobiohydrolase A (CbhA) from the cellulolytic bacterium *Cellulomonas fimi* is a β -1, 4-

- exoceilobiohydrolase analogous to *Trichoderma reesei* CBH II. In: *Molecular Microbiology* 12 (3), S. 413–422.
- Mergulhao, F. J. M.; Summers, David K.; Monteiro, Gabriel A. (2005): Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. In: *Biotechnology Advances* 23 (3), S. 177–202.
- Meyer, M.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2013): Effects of membrane-bound glucose dehydrogenase overproduction on the respiratory chain of *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (8), S. 3457–3466.
- Michaelis, S.; Inouye, H.; Oliver, D.; Beckwith, J. (1983): Mutations that alter the signal sequence of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 154 (1), S. 366–374.
- Mientus, M.; Kostner, D.; Peters, B.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2017): Characterization of membrane-bound dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans* 621H using a new system for their functional expression. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (8), S. 3189–3200.
- Miller, J. H. (1972): Assay of β -galactosidase. In: *Experiments in molecular genetics*. S. 352–355.
- Miller, K. D.; Greenberg, A. E.; Campbell, C. C. (1989): Treatment of severe malaria in the United States with a continuous infusion of quinidine gluconate and exchange transfusion. In: *New England Journal of Medicine* 321 (2), S. 65–70.
- Modler, H. W. (1994): Bifidogenic factors—sources, metabolism and applications. In: *International Dairy Journal* 4 (5), S. 383–407.
- Molina-Höppner, A.; Doster, W.; Vogel, R. F.; Gänzle, M. G. (2004): Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure treatments. In: *Applied and Environmental Microbiology* 70 (4), S. 2013–2020.
- Moore, J. B.; Markiewicz, P.; Miller, J. H. (1994): Identification and sequencing of the *Thermotoga maritima lacZ* gene, part of a divergently transcribed operon. In: *Gene* 147 (1), S. 101–106.
- Moreno, F.; Fowler, A. V.; Hall, M.; Silhavy, T. J.; Zabin, I.; Schwartz, M. (1980): A signal sequence is not sufficient to lead beta-galactosidase out of the cytoplasm. In: *Nature* 286 (5771), S. 356–359.
- Mori, H.; Ito, K. (2001): The Sec protein-translocation pathway. *Trends in microbiology* 9 (10), S. 494–500.
- Mostafa, H. E.; Heller, K. J.; Geis, A. (2002): Cloning of *Escherichia coli lacZ* and *lacY* genes and their expression in *Gluconobacter oxydans* and *Acetobacter liquefaciens*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 68 (5), S. 2619–2623.
- Mougous, J. D.; Cuff, M. E.; Raunser, S.; Shen, A.; Zhou, M.; Gifford, C. A.; Goodman, A. L.; Joachimiak, G.; Ordóñez, C. L.; Lory, S.; Walz, T.; Joachimiak, A.; Mehalanos, J. J. (2006): A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. In: *Science* 312 (5779), S. 1526–1530.
- Moure, A.; Gullón, P.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. (2006): Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. In: *Process Biochemistry* 41 (9), S. 1913–1923.
- Mukai, K.; Tabuchi, A.; Nakada, T.; Shibuya, T.; Chaen, H.; Fukuda, S.; Kurimoto, M.; Tsujisaka, Y. (1997): Production of trehalose from starch by thermostable enzymes from *Sulfolobus acidocaldarius*. In: *Starch* 49 (1), S. 26–30.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R. K.; Horn, G. T.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51. S. 263–273.
- Nabarlatz, D.; Farriol, X.; Montané, D. (2005): Autohydrolysis of almond shells for the production of xylo-oligosaccharides: product characteristics and reaction kinetics. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research* 44 (20), S. 7746–7755.
- Nakae, T. (1976): Identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71 (3), S. 877–884.

- Newstead, S. L.; Watson, J. N.; Bennet, A. J.; Taylor, G. (2005): Galactose recognition by the carbohydrate-binding module of a bacterial sialidase. In: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 61 (11), S. 1483–1491.
- Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S.; Von Heijne, G. (1997): Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. In: *Protein Engineering, Design and Selection* 10 (1), S. 1–6.
- Nikaido, H.; Rosenberg, E. Y. (1983): Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. In: *Journal of Bacteriology* 153 (1), S. 241–252.
- Niu, W.; Molefe, M. N.; Frost, J. W. (2003): Microbial synthesis of the energetic material precursor 1, 2, 4-butanetriol. In: *Journal of the American Chemical Society* 125 (43), S. 12998–12999.
- Nossal, N. G.; Heppel, L. A. (1966): The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. In: *Journal of Biological Chemistry* 241 (13), S. 3055–3062.
- Notenboom, V.; Birsan, C.; Warren, R. A. J.; Withers, S. G.; Rose, D. R. (1998): Exploring the Cellulose/Xylan Specificity of the β -1, 4-Glycanase Cex from *Cellulomonas fimi* through Crystallography and Mutation. In: *Biochemistry* 37 (14), S. 4751–4758.
- Nugent, S. G.; Kumar, D.; Rampton, D. S.; Evans, D. F. (2001): Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs. In: *Gut* 48 (4), S. 571–577.
- Oda, Y.; Yanase, H.; Kato, N.; Tonomura, K. (1994): Liberation of sucrose-hydrolyzing enzymes from cells by the *zliS* gene product that mediates protein secretion in *Zymomonas mobilis*. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77 (4), S. 419–422.
- Ohta, A.; Hirayama, M.; Adachi, T. (2002): Prophylactic, therapeutic agent for osteoporosis: United States Patent (US6417224 B1).
- Ohtsu, N.; Motoshima, H.; Tsukasaki, F.; Matsuzawa, H. (1998): Thermostable β -galactosidase from an extreme thermophile, *Thermus sp. A4*: enzyme purification and characterization, and gene cloning and sequencing. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62 (8), S. 1539–1545.
- Olijve, W.; Kok, J. J. (1979a): An analysis of the growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures. In: *Archives of Microbiology* 121 (3), S. 291–297.
- Olijve, W.; Kok, J. J. (1979b): Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. In: *Archives of Microbiology* 121 (3), S. 283–290.
- Olivares-Illana, V.; López-Munguía, A.; Olvera, C. (2003): Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. In: *Journal of Bacteriology* 185 (12), S. 3606–3612.
- O'Mullan, P. J.; Chase, T.; Eveleigh, D. E. (1992): Purification and some properties of extracellular invertase B from *Zymomonas mobilis*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 38 (3), S. 341–346.
- O'Neill, G.; Goh, S. H.; Warren, R. A. J.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C. (1986): Structure of the gene encoding the exoglucanase of *Cellulomonas fimi*. In: *Gene* 44 (2), S. 325–330.
- Ortel, T. L.; Quinn-Allen, M. A.; Keller, F. G.; Peterson, J. A.; Larocca, D.; Kane, W. H. (1994): Localization of functionally important epitopes within the second C-type domain of coagulation factor V using recombinant chimeras. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (22), S. 15898–15905.
- Orth, P.; Schnappinger, D.; Hillen, W.; Saenger, W.; Hinrichs, W. (2000): Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor–operator system. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 7 (3), S. 215–219.
- Ostergaard, S.; Olsson, L.; Nielsen, J. (2000): Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (1), S. 34–50.
- O'sullivan, A. C. (1997): Cellulose: the structure slowly unravels. In: *Cellulose* 4 (3), S. 173–207.
- Ozimek, L. K.; Kralj, S.; Van der Maarel, M. J. E. C.; Dijkhuizen, L. (2006): The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyze processive and non-processive transglycosylation reactions. In: *Microbiology* 152 (4), S. 1187–1196.

- Pan, Y. T.; Koroth Edavana, V.; Jourdian, W. J.; Edmondson, R.; Carroll, J. D.; Pastuszak, I.; Elbein, A. D. (2004): Trehalose synthase of *Mycobacterium smegmatis*. In: *European Journal of Biochemistry* 271 (21), S. 4259–4269.
- Pathak, S.; Dorfmueller, H. C.; Borodkin, V. S.; Van Aalten, D. M. F. (2008): Chemical dissection of the link between streptozotocin, O-GlcNAc, and pancreatic cell death. In: *Chemistry & Biology* 15 (8), S. 799–807.
- Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; De la Rubia, T.; Martínez, J. (2002): Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. In: *International Microbiology* 5 (2), S. 53–63.
- Perlman, D.; Halvorson, H. O. (1983): A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. In: *Journal of Molecular Biology* 167 (2), S. 391–409.
- Persson, C.; Nordfelth, R.; Holmström, A.; Rosqvist, R.; Wolf-Watz, H. (1995): Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell. In: *Molecular Microbiology* 18 (1), S. 135–150.
- Peters, B.; Junker, A.; Brauer, K.; Mühlthaler, B.; Kostner, D.; Mientus, M.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2013a): Deletion of pyruvate decarboxylase by a new method for efficient markerless gene deletions in *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (6), S. 2521–2530.
- Peters, B.; Mientus, M.; Kostner, D.; Junker, A.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2013b): Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multideletion strains. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (14), S. 6397–6412.
- Petersen, T. N.; Brunak, S.; Von Heijne, G.; Nielsen, H. (2011): SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. In: *Nature methods* 8 (10), S. 785–786.
- Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. (2004): UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. In: *Journal of Computational Chemistry* 25 (13), S. 1605–1612.
- Pfeifer, V. F.; Vojnovich, C.; Heger, E. N.; Nelson, G. E. N.; Haynes, W. C. (1958): Production of calcium 2-ketogluconate by fermentation with species of *Pseudomonas*. In: *Industrial & Engineering Chemistry* 50 (7), S. 1009–1012.
- Pohlner, J.; Halter, R.; Beyreuther, K.; Meyer, T. F. (1987): Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. In: *Nature* 325 (6103), S. 458–462.
- Ponting, C. P.; Aravind, L.; Schultz, J.; Bork, P.; Koonin, E. V. (1999): Eukaryotic signalling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. In: *Journal of Molecular Biology* 289 (4), S. 729–745.
- Poole, S.; Firtel, R. A.; Lamar, E.; Rowekamp, W. (1981): Sequence and expression of the discoidin I gene family in *Dictyostelium discoideum*. In: *Journal of Molecular Biology* 153 (2), S. 273–289.
- Preziosi, L.; Michel, G. P. F.; Baratti, J. (1990): Sucrose metabolism in *Zymomonas mobilis*: production and localization of sucrase and levansucrase activities. In: *Canadian Journal of Microbiology* 36 (3), S. 159–163.
- 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*. In: *Nature biotechnology* 23 (2), S. 195–200.
- Pugsley, Anthony P.; Francetic, Olivera; Possot, Odile M.; Sauvonnnet, Nathalie; Hardie, Kim R. (1997): Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria—a review. In: *Gene* 192 (1), S. 13–19.
- Pujos, P.; Jijakli, M. H. (2014): Compositions for use against one or more pathogens: United States Patent (US8828450 B2).
- Pukatzki, S.; Ma, A. T.; Revel, A. T.; Sturtevant, D.; Mekalanos, J. J. (2007): Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (39), S. 15508–15513.
- Pukatzki, S.; Ma, A. T.; Sturtevant, D.; Krastins, B.; Sarracino, D.; Nelson, W. C.; Heidelberg, J. F.; Mekalanos, J. J. (2006): Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio*

- cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (5), S. 1528–1533.
- Puls, J.; Schmidt, O.; Granzow, C. (1987): α -Glucuronidase in two microbial xylanolytic systems. In: *Enzyme and Microbial Technology* 9 (2), S. 83–88.
- Puziss, J. W.; Fikes, J. D.; Bassford, P. J. (1989): Analysis of mutational alterations in the hydrophilic segment of the maltose-binding protein signal peptide. In: *Journal of Bacteriology* 171 (5), S. 2303–2311.
- Rabenhorst, J.; Gatfield, I.; Hilmer, J. M. (2001): Natural, aliphatic and thiocarboxylic acids obtainable by fermentation and a microorganism therefore: Europäisches Patentregister (EP1078990).
- Rao, F. V.; Dorfmüller, H. C.; Villa, F.; Allwood, M.; Eggleston, I. M.; Van Aalten, D. M. F. (2006): Structural insights into the mechanism and inhibition of eukaryotic O-GlcNAc hydrolysis. In: *The EMBO journal* 25 (7), S. 1569–1578.
- Rapoport, T. A. (1992): Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. In: *Science* 258 (5084), S. 931–936.
- Ratanakhanokchai, K.; Kyu, K. L.; Tanticharoen, M. (1999): Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. In: *Applied and Environmental Microbiology* 65 (2), S. 694–697.
- Rauch, B.; Pahlke, J.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2010): Characterization of enzymes involved in the central metabolism of *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 88 (3), S. 711–718.
- Ravichandran, K. S. (2010): Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. In: *Journal of Experimental Medicine* 207 (9), S. 1807–1817.
- Reichstein, T.; Grüssner, A. (1934): Eine ergiebige Synthese der L-Ascorbinsäure (C-Vitamin). In: *Helvetica Chimica Acta* 17 (1), S. 311–328.
- Repoila, F.; Gutierrez, C. (1991): Osmotic induction of the periplasmic trehalase in *Escherichia coli* K12: characterization of the *treA* gene promoter. In: *Molecular Microbiology* 5 (3), S. 747–755.
- Reshetilov, A. N.; Kitova, A. E.; Kolesov, V. V.; Yaropolov, A. I. (2015): Mediator-Free Bioelectrocatalytic Oxidation of Ethanol on an Electrode from Thermally Expanded Graphite Modified by *Gluconobacter oxydans* Membrane Fractions. In: *Electroanalysis* 27 (6), S. 1443–1448.
- Reunanen, J.; Kainulainen, V.; Huuskonen, L.; Ottman, N.; Belzer, C.; Huhtinen, H.; De Vos, W.; Satokari, R. (2015): *Akkermansia muciniphila* adheres to enterocytes and strengthens the integrity of the epithelial cell layer. In: *Applied and Environmental Microbiology* 81 (11), S. 3655–3662.
- Reznikoff, P.; Goebel, W. F. (1937): The Use of Ferrous Gluconate in the Treatment of Hypochromic Anemia. In: *Journal of Clinical Investigation* 16 (4), S. 547–554.
- Richhardt, J.; Bringer, S.; Bott, M. (2012): Mutational analysis of the pentose phosphate pathway and the Entner-Doudoroff pathway in *Gluconobacter oxydans* reveals improved growth of an *edd-eda* deletion mutant on mannitol. In: *Applied and Environmental Microbiology*. DOI:10.1128/AEM-01166-12.
- Richhardt, J.; Bringer, S.; Bott, M. (2013): Role of the pentose phosphate pathway and the Entner-Doudoroff pathway in glucose metabolism of *Gluconobacter oxydans* 621H. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (10), S. 4315–4323.
- Robbe, C.; Capon, C.; Coddeville, B.; Michalski, J.-C. (2004): Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. In: *Biochemical Journal* 384 (2), S. 307–316.
- Roncero, M. I. (1983): Genes controlling xylan utilization by *Bacillus subtilis*. In: *Journal of Bacteriology* 156 (1), S. 257–263.
- Rosqvist, R.; Forsberg, Å.; Rimpiläinen, M.; Bergman, T.; Wolf-Watz, H. (1990): The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. In: *Molecular Microbiology* 4 (4), S. 657–667.
- Rosqvist, R.; Magnusson, K.-E.; Wolf-Watz, H. (1994): Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. In: *The EMBO Journal* 13 (4), S. 964–972.

- Russel, M. (1998): Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. In: *Journal of Molecular Biology* 279 (3), S. 485–499.
- Russell, A. B.; Peterson, S. B.; Mougous, J. D. (2014): Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. In: *Nature Reviews Microbiology* 12 (2), S. 137–148.
- Saha, B. C. (2003): Hemicellulose bioconversion. In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30 (5), S. 279–291.
- Salmond, G. P. C. (1994): Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. In: *Annual review of phytopathology* 32 (1), S. 181–200.
- 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. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 65 (3), S. 306–314.
- Salusjärvi, T.; Hvorslev, N.; Miasnikov, A. N. (2005): Characterisation of a secondary alcohol dehydrogenase from *Xanthomonas campestris* DSM 3586. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 66 (6), S. 664–667.
- Salyers, A. A.; West, S. E.; Vercellotti, J. R.; Wilkins, T. D. (1977): Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. In: *Applied and Environmental Microbiology* 34 (5), S. 529–533.
- Sambrook, J. R.; Russel, D. W. (2001): Molecular cloning: a laboratory manual. In: *Quarterly Review of Biology* 76 (3), S. 348–349.
- Sauer, C. G.; Gehrig, A.; Warneke-Wittstock, R.; Marquardt, A.; Ewing, C. C.; Gibson, A.; Lorenz, B.; Jurklies, B.; Weber, B. H. F. (1997): Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. In: *Nature Genetics* 17 (2), S. 164–170.
- Savill, J.; Fadok, V. (2000): Corpse clearance defines the meaning of cell death. In: *Nature* 407 (6805), S. 784–788.
- Schatz, P.J.; Beckwith, J. (1990): Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. In: *Annual Review of Genetics* 24 (1), S. 215–248.
- Schedel, M. (2000): Regioselective Oxidation of Aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, Key Reaction in the Industrial 1-Deoxynojirimycin Synthesis. In: Kelly, D. R. (Ed.), *Biotechnology Set, Second Edition*. Weinheim, Wiley-VCH. S. 295–311.
- Schell, J.; Van Montagu, M.; De Beuckeleer, M.; De Block, M.; Depicker, A.; De Wilde, M.; Engler, G.; Genetello, C.; Hernalsteens, J. P.; Holsters, M.; Seurinck, J.; Silva, B.; Van Vliet, F.; Villarroel, J. P. (1979): Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host. In: *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 204 (1155), S. 251–266.
- Schellenberg, G. D.; Sarthy, A.; Larson, A. E.; Backer, M. P.; Crabb, John W.; Lidstrom, M.; Hall, B. D.; Furlong, C. E. (1984): Xylose isomerase from *Escherichia coli*. Characterization of the protein and the structural gene. In: *Journal of Biological Chemistry* 259 (11), S. 6826–6832.
- Schenkmyerová, A.; Bertóková, A.; Šefčovičová, J.; Štefuca, V.; Bučko, M.; Vikartovská, A.; Gemeiner, P.; Tkáč, J.; Katrik, J. (2015): Whole-cell *Gluconobacter oxydans* biosensor for 2-phenylethanol biooxidation monitoring. In: *Analytica Chimica Acta* 854, S. 140–144.
- Schiraldi, C.; Di Lernia, I.; De Rosa, M. (2002): Trehalose production: exploiting novel approaches. In: *Trends in Biotechnology* 20 (10), S. 420–425.
- Schwab, C.; Sørensen, K. I.; Gänzle, M. G. (2010): Heterologous expression of glycoside hydrolase family 2 and 42 β -galactosidases of lactic acid bacteria in *Lactococcus lactis*. In: *Systematic and Applied Microbiology* 33 (6), S. 300–307.
- Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2010): Analysis of aldehyde reductases from *Gluconobacter oxydans* 621H. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (4), S. 1025–1031.
- Schweiger, P.; Gross, H.; Deppenmeier, U. (2010): Characterization of two aldo–keto reductases from *Gluconobacter oxydans* 621H capable of regio- and stereoselective α -ketocarboxyl reduction. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (4), S. 1415–1426.

- Schweiger, P.; Gross, H.; Wesener, S.; Deppenmeier, U. (2008): Vinyl ketone reduction by three distinct *Gluconobacter oxydans* 621H enzymes. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (6), S. 995–1006.
- Senthilkumar, V.; Rameshkumar, N.; Busby, S. J.W.; Gunasekaran, P. (2004): Disruption of the *Zymomonas mobilis* extracellular sucrose gene (*sacC*) improves levan production. In: *Journal of Applied Microbiology* 96 (4), S. 671–676.
- Seok, J.-S.; Shimoda, M.; Azuma, N.; Kanno, C. (2001): Structures of the N-linked sugar chains in PAS-7 glycoprotein sharing the same protein core with PAS-6 glycoprotein from the bovine milk fat globule membrane. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65 (4), S. 901–912.
- Shaikh, S. A.; Khire, J. M.; Khan, M. I. (1999): Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1472 (1), S. 314–322.
- Shang, Q.; Song, G.; Zhang, M.; Shi, J.; Xu, C.; Hao, J.; Li, G.; Yu, G. (2017): Dietary fucoidan improves metabolic syndrome in association with increased *Akkermansia* population in the gut microbiota of high-fat diet-fed mice. In: *Journal of Functional Foods* 28, S. 138–146.
- Sharp, P. M.; Cowe, E.; Higgins, D. G.; Shields, D. C.; Wolfe, K. H.; Wright, F. (1988): Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. In: *Nucleic Acids Research* 16 (17), S. 8207–8211.
- Sharp, P. M.; Li, W.-H. (1987): The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. In: *Nucleic Acids Research* 15 (3), S. 1281–1295.
- Shen, L.; Liu, Y.; Gu, Z.; Yao, T.; Xu, B.; Wang, N.; Jiao, N.; Liu, H.; Zhou, Y. (2015): *Arcticibacter eurypsychrophilus* sp. nov., isolated from ice core. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65 (2), S. 639–643.
- Shin, N.-R.; Lee, J.-C.; Lee, H.-Y.; Kim, M.-S.; Whon, T. W.; Lee, M.-S.; Bae, J.-W. (2013): An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. In: *Gut* 63 (5), 727–735.
- Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O.; Ameyama, M. (1983): Selective production of 5-keto-D-gluconate by *Gluconobacter* strains. In: *Journal of Fermentation Technology* 61 (4), S. 359–363.
- Shine, J.; Dalgarno, L. (1974): The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71 (4), S. 1342–1346.
- Shipkowski, S.; Brenchley, J. E. (2006): Bioinformatic, genetic, and biochemical evidence that some glycoside hydrolase family 42 β -galactosidases are arabinogalactan type I oligomer hydrolases. In: *Applied and Environmental Microbiology* 72 (12), S. 7730–7738.
- 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. In: *Molecular Systems Biology* 7 (539), S. 1–6.
- Sievers, M.; Swings, J. (2005): Family II Acetobacteriaceae. In: Garrity, G.; Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Bd. 2c, New York: Springer, S. 41–95.
- Sigrist, C. J. A.; De Castro, E.; Cerutti, L.; Cuche, B. A.; Hulo, N.; Bridge, A.; Bougueleret, L.; Xenarios, I. (2012): New and continuing developments at PROSITE. In: *Nucleic Acids Research* 41 (1), S. 344–347.
- Singh, S.; Madlala, A. M.; Prior, B. A. (2003): *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. In: *FEMS Microbiology Reviews* 27 (1), S. 3–16.
- Sinnott, M. L. (1978): Ions, ion-pairs and catalysis by the lacZ β -galactosidase of *Escherichia coli*. In: *FEBS Letters* 94 (1), S. 1–9.
- Sletta, H.; Nedal, A.; Aune, T. E. V.; Hellebust, H.; Hakvåg, S.; Aune, R.; Ellingsen, T. E.; Valla, S.; Brautaset, T. (2004): Broad-host-range plasmid pJB658 can be used for industrial-level production of a secreted host-toxic single-chain antibody fragment in *Escherichia coli*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 70 (12), S. 7033–7039.

- Sletta, H.; Tøndervik, A.; Hakvåg, S.; Aune, T. VeeE; Nedal, A.; Aune, R.; Evensen, G.; Valla, S.; Ellingsen, T. E.; Brautaset, T. (2007): The presence of N-terminal secretion signal sequences leads to strong stimulation of the total expression levels of three tested medically important proteins during high-cell-density cultivations of *Escherichia coli*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 73 (3), S. 906–912.
- Smith, R. A.; Duncan, M. J.; Moir, D. T. (1985): Heterologous protein secretion from yeast. In: *Science* 229 (4719), S. 1219–1224.
- Snyder, I. S.; Koch, N. A. (1966): Production and characteristics of hemolysins of *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 91 (2), S. 763–767.
- Sone, M.; Kishigami, S.; Yoshihisa, T.; Ito, K. (1997): Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (10), S. 6174–6178.
- Song, J.; Imanaka, H.; Imamura, K.; Minoda, M.; Yamaguchi, S.; Nakanishi, K. (2013): The discoidin domain of *Bacillus circulans* β -galactosidase plays an essential role in repressing galactooligosaccharide production. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77 (1), S. 73–79.
- Souza, R. R.; Bergamasco, R.; Da Costa, S. C.; Feng, X.; Faria, S. H. Be.; Gimenes, M. L. (2010): Recovery and purification of lactose from whey. In: *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 49 (11), S. 1137–1143.
- Springer, W.; Goebel, W. (1980): Synthesis and secretion of hemolysin by *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 144 (1), S. 53–59.
- Stace, C. L.; Ktistakis, Nicholas T. (2006): Phosphatidic acid-and phosphatidylserine-binding proteins. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761 (8), S. 913–926.
- Starkweather, W. H. (1977): Alkaline phosphatase isoenzyme determination: United States Patent (US4030995 A).
- Stathopoulos, C.; Hendrixson, D. R.; Thanassi, D. G.; Hultgren, S. J.; Geme III, J. W.; Curtiss III, R. (2000): Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story. In: *Microbes and Infection* 2 (9), S. 1061–1072.
- Sternberg, D.; Vuayakumar, P.; Reese, E. T. (1977): β -Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. In: *Canadian Journal of Microbiology* 23 (2), S. 139–147.
- Strom, A. R.; Kaasen, I. (1993): Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. In: *Molecular Microbiology* 8 (2), S. 205–210.
- Styrvold, O. B.; Strøm, A. R. (1991): Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase. In: *Journal of Bacteriology* 173 (3), S. 1187–1192.
- Su, L.; Woodard, R. W.; Chen, J.; Wu, J. (2013a): Extracellular location of *Thermobifida fusca* cutinase expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) without mediation of a signal peptide. In: *Applied and Environmental Microbiology* 79 (14), S. 4192–4198.
- Su, L.; Xu, C.; Woodard, R. W.; Chen, J.; Wu, J. (2013b): A novel strategy for enhancing extracellular secretion of recombinant proteins in *Escherichia coli*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (15), S. 6705–6713.
- Subramaniyan, S.; Prema, P. (2002): Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. In: *Critical Reviews in Biotechnology* 22 (1), S. 33–64.
- Sumner, J. B.; Graham, V. A. (1921): Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. In: *Journal of Biological Chemistry* 47 (1), S. 5–9.
- Sung, W. L.; Luk, C. K.; Zahab, D. M.; Wakarchuk, W. (1993): Overexpression of the *Bacillus subtilis* and *circulans* xylanases in *Escherichia coli*. In: *Protein Expression and Purification* 4 (3), S. 200–206.
- Sunna, A.; Antranikian, G. (1997): Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. In: *Critical Reviews in Biotechnology* 17 (1), S. 39–67.
- Svitel, J.; Curilla, O.; Tkac, J. (1998): Microbial cell-based biosensor for sensing glucose, sucrose or lactose. In: *Biotechnology and Applied Biochemistry* 27, S. 153–158.
- Švitel, J.; Šturdik, E. (1994): D-Galactose transformation to D-galactonic acid by *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Biotechnology* 37 (1), S. 85–88.

- Švitel, J.; Tkáč, J.; Voštiar, I.; Navrátil, M.; Štefuca, V.; Bučko, M.; Gemeiner, P. (2006): *Gluconobacter* in biosensors: applications of whole cells and enzymes isolated from *Gluconobacter* and *Acetobacter* to biosensor construction. In: *Biotechnology Letters* 28 (24), S. 2003–2010.
- Takagi, S.; Hirata, T.; Agata, K.; Mochii, M.; Eguchi, G.; Fujisawa, H. (1991): The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. In: *Neuron* 7 (2), S. 295–307.
- Takahashi, D. F.; Carvalhal, M. L.; Alterthum, F. (1994): Ethanol production from pentoses and hexoses by recombinant *Escherichia coli*. In: *Biotechnology Letters* 16 (7), S. 747–750.
- Talmadge, Karen; Gilbert, Walter (1982): Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79 (6), S. 1830–1833.
- Talmadge, K.; Stahl, S.; Gilbert, W. (1980): Eukaryotic signal sequence transports insulin antigen in *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77 (6), S. 3369–3373.
- Tanaka, T.; Fukui, T.; Atomi, H.; Imanaka, T. (2003): Characterization of an exo- β -D-glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. In: *Journal of Bacteriology* 185 (17), S. 5175–5181.
- Tanhanuch, W.; Chantarangsee, M.; Maneesan, J.; Ketudat-Cairns, J. (2008): Genomic and expression analysis of glycosyl hydrolase family 35 genes from rice (*Oryza sativa* L.). In: *BMC Plant Biology* 8 (84), S. 1-17.
- Taron, C. H.; Benner, J. S.; Hornstra, L. J.; Guthrie, E. P. (1995): A novel β -galactosidase gene isolated from the bacterium *Xanthomonas manihotis* exhibits strong homology to several eukaryotic β -galactosidases. In: *Glycobiology* 5 (6), S. 603–610.
- Thanassi, D. G.; Saulino, E. T.; Hultgren, S. J. (1998): The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. In: *Current Opinion in Microbiology* 1 (2), S. 223–231.
- Thomas, D.; Jaeger, U.; Sagoschen, I.; Lamberti, C.; Wilhelm, K. (2009): Intra-arterial calcium gluconate treatment after hydrofluoric acid burn of the hand. In: *Cardiovascular and Interventional Radiology* 32 (1), S. 155-158.
- Timell, T. E. (1967): Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. In: *Wood Science and Technology* 1 (1), S. 45–70.
- Tolan, J. S.; Finn, R. K. (1987a): Fermentation of D-xylose and L-arabinose to ethanol by *Erwinia chrysanthemi*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 53 (9), S. 2033–2038.
- Tolan, J. S.; Finn, R. K. (1987b): Fermentation of D-xylose to ethanol by genetically modified *Klebsiella planticola*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 53 (9), S. 2039–2044.
- Tomita, K.; Nagura, T.; Okuhara, Y.; Nakajima-Adachi, H.; Shigematsu, N.; Aritsuka, T.; Kaminogawa, S.; Hachimura, S. (2007): Dietary melibiose regulates Th cell response and enhances the induction of oral tolerance. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71 (11), S. 2774-2780.
- Tommassen, J.; Van Tol, H.; Lugtenberg, B. (1983): The ultimate localization of an outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12 is not determined by the signal sequence. In: *The EMBO Journal* 2 (8), S. 1275-1279.
- Tomoda, Y.; Hanaoka, A.; Yasuda, T.; Takayama, T.; Hiwatashi, A. (2003): Method of decreasing acrylamide in food cooked under heat: United States Patent (US20040126469 A1).
- Tourinho-dos-Santos, C. F.; Bachinski, N.; Paschoalin, V. M.; Paiva, C. L.; Silva, J. T.; Panek, A. D. (1994): Periplasmic trehalase from *Escherichia coli*—characterization and immobilization on spherisorb. In: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27 (3), S. 627–636.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76 (9), S. 4350–4354.
- Toyama, H.; Furuya, N.; Saichana, I.; Ano, Y.; Adachi, O.; Matsushita, K. (2007): Membrane-bound, 2-keto-D-gluconate-yielding D-gluconate dehydrogenase from “*Gluconobacter dioxyacetonicus*” IFO 3271: molecular properties and gene disruption. In: *Applied and Environmental Microbiology* 73 (20), S. 6551–6556.

- Tsukada, Y.; Perlman, D. (1972): The fermentation of L-sorbose by *Gluconobacter melanogenus*. I. General characteristics of the fermentation. In: *Biotechnology and Bioengineering* 14 (5), S. 799–810.
- Tu, Y.; Wilkie, T. M. (2004): Allosteric regulation of GAP activity by phospholipids in regulators of G-protein signaling. In: *Methods in Enzymology* 389, S. 89–105.
- Tzortzis, G.; Goulas, A. K.; Baillon, M. L.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A. (2004): *In vitro* evaluation of the fermentation properties of galactooligosaccharides synthesised by α -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (1), S. 106–111.
- Umamoto, J.; Bhavanandan, V. P.; Davidson, E. A. (1977): Purification and properties of an endo- α -N-acetyl-D-galactosaminidase from *Diplococcus pneumoniae*. In: *Journal of Biological Chemistry* 252 (23), S. 8609–8614.
- Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B. C.; Remm, M.; Rozen, S. G. (2012): Primer3—new capabilities and interfaces. In: *Nucleic Acids Research* 40 (15), S. 1–12.
- Van Casteren, W. H. M.; Eimermann, M.; Van den Broek, L.; Vincken, J.-P.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J. (2000): Purification and characterisation of a β -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39 and B891. In: *Carbohydrate Research* 329 (1), S. 75–85.
- Van Huynh, N.; Decleire, M.; Am Voets; Motte, J. C.; Monseur, X. (1986): Production of gluconic acid from whey hydrolysate by *Gluconobacter oxydans*. In: *Process Biochemistry* 21 (1), S. 31–32.
- Van Loo, J.; Cummings, J.; Delzenne, N.; Englyst, H.; Franck, A.; Hopkins, M.; Kok, N.; Macfarlane, G.; Newton, D.; Quigley, M.; Roberfroid, M.; Van Vliet, T.; Van den Heuvel, E. (1999): Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). In: *British Journal of Nutrition* 81 (2), S. 121–132.
- Vazquez, M. J.; Alonso, J. L.; Dominguez, H.; Parajo, J. C. (2000): Xylooligosaccharides: manufacture and applications. In: *Trends in Food Science & Technology* 11 (11), S. 387–393.
- Villoutreix, B. O.; Bucher, P.; Hofmann, K.; Baumgartner, S.; Dahlbäck, B. (1998): Molecular models for the two discoidin domains of human blood coagulation factor V. In: *Journal of Molecular Modeling* 4 (8), S. 268–275.
- Villoutreix, B. O.; Miteva, M. A. (2016): Discoidin Domains as Emerging Therapeutic Targets. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 37 (8), S. 641–659.
- Vlasuk, G. P.; Inouye, S.; Ito, H.; Itakura, K.; Inouye, M. (1983): Effects of the complete removal of basic amino acid residues from the signal peptide on secretion of lipoprotein in *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry* 258 (11), S. 7141–7148.
- Waksman, G.; Hultgren, S. J. (2009): Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogenesis. In: *Nature Reviews Microbiology* 7 (11), S. 765–774.
- Walfridsson, M.; Bao, X.; Anderlund, M.; Lilius, G.; Bülow, L.; Hahn-Hägerdal, B. (1996): Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. In: *Applied and Environmental Microbiology* 62 (12), S. 4648–4651.
- Wandersman, C. (1992): Secretion across the bacterial outer membrane. In: *Trends in Genetics* 8 (9), S. 317–322.
- Wang, H.; Luo, H.; Bai, Y.; Wang, Y.; Yang, P.; Shi, P.; Zhang, W.; Fan, Y.; Yao, B. (2009): An acidophilic β -galactosidase from *Bispora* sp. MEY-1 with high lactose hydrolytic activity under simulated gastric conditions. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (12), S. 5535–5541.
- Wang, L.; Christophersen, C. T.; Sorich, M. J.; Gerber, J. P.; Angley, M. T.; Conlon, M. A. (2011): Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. In: *Applied and Environmental Microbiology* 77 (18), S. 6718–6721.
- Weaver, J.; Whitehead, T. R.; Cotta, M. A.; Valentine, P. C.; Salyers, A. A. (1992): Genetic analysis of a locus on the *Bacteroides ovatus* chromosome which contains xylan utilization genes. In: *Applied and Environmental Microbiology* 58 (9), S. 2764–2770.
- Weenk, G.; Olijve, W.; Harder, W. (1984): Ketogluconate formation by *Gluconobacter* species. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 20 (6), S. 400–405.

- Weigand, R. A.; Rothfield, L. I. (1976): Genetic and physiological classification of periplasmic-leaky mutants of *Salmonella typhimurium*. In: *Journal of Bacteriology* 125 (1), S. 340–345.
- Weiner, J. H.; Bilous, P. T.; Shaw, G. M.; Lubitz, S. P.; Frost, L.; Thomas, G. H.; Cole, J. A.; Turner, R. J. (1998): A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. In: *Cell* 93 (1), S. 93–101.
- Welte, W.; Nestel, U.; Wacker, T.; Diederichs, K. (1995): Structure and function of the porin channel. In: *Kidney International* 48 (4), S. 930–940.
- White, A.; Withers, S. G.; Gilkes, N. R.; Rose, D. R. (1994): Crystal structure of the catalytic domain of the beta-1, 4-glycanase *cex* from *Cellulomonas fimi*. In: *Biochemistry* 33 (42), S. 12546–12552.
- Whitehead, T. R. (1995): Nucleotide sequences of xylan-inducible xylanase and xylosidase/arabinosidase genes from *Bacteroides ovatus* V975. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1244 (1), S. 239–241.
- Whitehead, T. R.; Hespell, R. B. (1990): The genes for three xylan-degrading activities from *Bacteroides ovatus* are clustered in a 3.8-kilobase region. In: *Journal of Bacteriology* 172 (5), S. 2408–2412.
- Wickner, W.; Driessen, A. J. M.; Haril, F.-U. (1991): The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. In: *Annual Review of Biochemistry* 60 (1), S. 101–124.
- Wikberg, H.; Maunu, S. L. (2004): Characterisation of thermally modified hard-and softwoods by 13 C CPMAS NMR. In: *Carbohydrate Polymers* 58 (4), S. 461–466.
- Wilks, J. C.; Slonczewski, J. L. (2007): pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. In: *Journal of Bacteriology* 189 (15), S. 5601–5607.
- Willis, C. L.; Cummings, J. H.; Neale, G.; Gibson, G. R. (1996): *In Vitro* Effects of Mucin Fermentation on the Growth of Human Colonic Sulphate-Reducing Bacteria: In: *Anaerobe* 2 (2), S. 117–122.
- Willis, L. M.; Zhang, R.; Reid, A.; Withers, S. G.; Wakarchuk, W. W. (2009): Mechanistic investigation of the endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Streptococcus pneumoniae* R6. In: *Biochemistry* 48 (43), S. 10334–10341.
- Wong-Madden, S. T.; Landry, D. (1995): Purification and characterization of novel glycosidases from the bacterial genus *Xanthomonas*. In: *Glycobiology* 5 (1), S. 19–28.
- Wu, J.; Su, L.; Chen, J. (2015): Method for enhancing extracellular secretion of recombinant proteins in *Escherichia coli* by co-expressing *Thermobifida fusca* cutinase: United States Patent (US9109212 B2).
- Wylie, J. L.; Worobec, E. A. (1995): The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Journal of Bacteriology* 177 (11), S. 3021–3026.
- Wyse, R. (1979): Sucrose uptake by sugar beet tap root tissue. In: *Plant Physiology* 64 (5), S. 837–841.
- Xu, B.; Wang, Y.; Li, J.; Lin, Q. (2009): Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). In: *Fish Physiology and Biochemistry* 35 (3), S. 351–357.
- Yamaji-Hasegawa, A.; Tsujimoto, M. (2006): Asymmetric distribution of phospholipids in biomembranes. In: *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29 (8), S. 1547–1553.
- Yamanaka, M.; Eda, S.; Beppu, M. (2005): Carbohydrate chains and phosphatidylserine successively work as signals for apoptotic cell removal. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328 (1), S. 273–280.
- Yanase, H.; Iwata, M.; Nakahigashi, R.; Kita, K.; Kato, N.; Tonomura, K. (1992): Purification, crystallization, and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. In: *Bioscience, Biotechnology, and biochemistry* 56 (8), S. 1335–1337.
- Yang, J.; Moyana, T.; MacKenzie, S.; Xia, Q.; Xiang, J. (1998): One Hundred Seventy-Fold Increase in Excretion of an FV Fragment-Tumor Necrosis Factor Alpha Fusion Protein (sFV/TNF- α) from *Escherichia coli* Caused by the Synergistic Effects of Glycine and Triton X-100. In: *Applied and Environmental Microbiology* 64 (8), S. 2869–2874.
- Yang, M.; Luoh, S.-M.; Goddard, A.; Reilly, D.; Henzel, W.; Bass, S. (1996): The *bgIX* gene located at 47.8 min on the *Escherichia coli* chromosome encodes a periplasmic β -glucosidase. In: *Microbiology* 142 (7), S. 1659–1665.

- Yeh, Y.-C.; Comolli, L. R.; Downing, K. H.; Shapiro, L.; McAdams, H. H. (2010): The Caulobacter Tol-Pal complex is essential for outer membrane integrity and the positioning of a polar localization factor. In: *Journal of Bacteriology* 192 (19), S. 4847–4858.
- Zahid, N.; Schweiger, P.; Galinski, E.; Deppenmeier, U. (2015): Identification of mannitol as compatible solute in *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (13), S. 5511–5521.
- Zeiser, J.; Mühlenbeck, L. H.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2014): Characterization of a periplasmic quinoprotein from *Sphingomonas wittichii* that functions as aldehyde dehydrogenase. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (5), S. 2067–2079.
- Zhang, M.; Eddy, C.; Deanda, K.; Finkelstein, M.; Picataggio, S. (1995): Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. In: *Science* 267 (5195), S. 240.
- Zhang, M.; Wei, L.; Zhou, Y.; Du, L.; Imanaka, T.; Hua, Q. (2013): Genetic analysis of D-xylose metabolism pathways in *Gluconobacter oxydans* 621H. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 40 (3-4), S. 379–388.
- Zhang, S.; McCarter, J. D.; Okamura-Oho, Y.; Yaghi, F.; Hinek, A.; Withers, S. G.; Callahan, J. W. (1994): Kinetic mechanism and characterization of human β -galactosidase precursor secreted by permanently transfected Chinese hamster ovary cells. In: *Biochemical Journal* 304 (1), S. 281–288.
- Zhao, S.; Liu, W.; Wang, J.; Shi, J.; Sun, Y.; Wang, W.; Guang, N.; Liu, R.; Hong, J. (2017): *Akkermansia muciniphila* improves metabolic profiles by reducing inflammation in chow diet-fed mice. In: *Journal of Molecular Endocrinology* 58 (1), S. 1–14.
- Zhou, S.; Davis, F. C.; Ingram, L. O. (2001): Gene Integration and Expression and Extracellular Secretion of *Erwinia chrysanthemi* Endoglucanase CelY (*celY*) and CelZ (*celZ*) in Ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2. In: *Applied and Environmental Microbiology* 67 (1), S. 6–14.
- Zhou, S.; Ingram, L. O. (2000): Synergistic Hydrolysis of Carboxymethyl Cellulose and Acid-Swollen Cellulose by Two Endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. In: *Journal of Bacteriology* 182 (20), S. 5676–5682.
- Zhou, X.; Lü, S.; Xu, Y.; Mo, Y.; Yu, S. (2015a): Improving the performance of cell biocatalysis and the productivity of xylonic acid using a compressed oxygen supply. In: *Biochemical Engineering Journal* 93, S. 196–199.
- Zhou, X.; Zhou, X.; Xu, Y.; Yu, S. (2016): Improving the production yield and productivity of 1, 3-dihydroxyacetone from glycerol fermentation using *Gluconobacter oxydans*. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 39 (8), S. 1315–1318.
- Zinin, A. I.; Eneyskaya, E. V.; Shabalin, K. A.; Kulminskaya, A. A.; Shishlyannikov, S. M.; Neustroev, K. N. (2002): 1-O-Acetyl- β -d-galactopyranose: a novel substrate for the transglycosylation reaction catalyzed by the β -galactosidase from *Penicillium sp.* In: *Carbohydrate Research* 337 (7), S. 635–642.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei einigen Personen bedanken, die mir die Fertigstellung der vorliegenden Dissertation ermöglicht haben.

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Dr. Uwe Deppenmeier für die Bereitstellung eines sehr interessanten Themas, die engagierte Betreuung und die vielen guten wissenschaftlichen und kreativen Diskussionen und Ratschläge.

Ich danke Frau PD Dr. Christiane Dahl für die freundliche Übernahme des Korreferats und dafür, dass sie mich als Erste vom äußerst spannenden Forschungsfeld der Mikrobiologie überzeugen konnte.

Dr. Fabian Grein danke ich für seine Hilfe bei der Erstellung von mikroskopischen Aufnahmen und ganz besonders für die spannende und interessante Zeit, die wir mit der Erforschung ungewöhnlicher Phänomene und Beobachtungen abseits der eigentlichen Projekte verbrachten.

Dr. Tatjana Hoppe danke ich für die Bereitstellung von Zellkulturen für Experimente, bei denen eine Interaktion von Amuc_1686 mit humanen Zelllinien untersucht wurde.

Hans-Jürgen Ensikat aus dem Nees-Institut für Biodiversität der Pflanzen danke ich für seine freundliche Unterstützung bei der Aufnahme von elektronenrastermikroskopischen Bildern von *G. oxydans*.

Sebastian van Helmont danke ich für die Unterstützung bei der Analyse von nativen Protein-Konformationen mittels FPLC.

Mein besonderer Dank geht an alle Mitglieder und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe Deppenmeier. Frau Dr. Sarah Refai danke ich besonders, einerseits für das genaue und sorgfältige Korrekturlesen dieser Dissertation und andererseits für die unzähligen aufbauenden und guten Gespräche, wenn etwas mal nicht so lief wie es sollte. Ich danke Anna Siemen, Dr. Jessica Zeiser und Dr. Maria Meyer aus dem „Swox-Labor“, Thomas Franke, Lena Kröninger, Dr. Stefanie Berger, Dr. Cornelia Welte und Dr. Kati Waßmann aus dem „großen Labor“ sowie allen Praktikanten und Studenten für die schönen vergangenen Jahre, die vielen guten Ideen und die stetige gegenseitige Unterstützung. Elisabeth Schwab danke ich explizit dafür, dass sie stets und in jeder Situation behilflich war und sich dabei, egal wie stressig es wurde, nicht aus der Fassung bringen ließ.

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

7 Danksagung

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank an dieser Stelle den Personen, die mir am nächsten stehen.

Ich danke meiner Verlobten Paula, meinen Eltern und meiner Schwester Victoria dafür, dass sie mich in all den Jahren auf jede Art und Weise unterstützt haben, mich in harten Zeiten aufgebaut haben und in jedem Moment für mich da waren. Ohne euch wäre vieles nicht möglich gewesen.

8 Publikationsliste

Veröffentlichungen

Liu, Y. W.; Denkmann, K.; Kosciow, K.; Dahl, C.; Kelly, D. J. (2013): Tetrathionate stimulated growth of *Campylobacter jejuni* identifies a new type of bi-functional tetrathionate reductase (TsdA) that is widely distributed in bacteria. *Molecular microbiology* 88 (1), S. 173-188.

Kosciow, K.; Zahid, N.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2014): Production of a periplasmic trehalase in *Gluconobacter oxydans* and growth on trehalose. *Journal of Biotechnology* 189, S. 27-35.

Kosciow, K.; Domin, C.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2016): Extracellular targeting of an active endoxylanase by a TolB negative mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 43 (7), S. 989-999.

Büchs, J.; Deppenmeier, U.; Bott, M.; Kiefler, I.; Kosciow, K.; Herweg, E.; Siemen, A. (2017): Methods of producing 5-ketofructose. *Europäisches Patentregister* (EP17175730.5).

Vorträge

Kosciow, K.; Domin, C.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2016): Extracellular targeting of an active endoxylanase by a TolB negative mutant of *Gluconobacter oxydans*. VAAM Jahrestagung 2016, Jena.

Poster

Kosciow, K.; Zahid, N.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2014): Production of a periplasmic trehalase in *Gluconobacter oxydans* and growth on trehalose. VAAM Jahrestagung 2014, Dresden.

Zahid, N.; Kosciow, K.; Galinski, E.; Deppenmeier, U. (2016): Osmotolerance of the industrially important strain *Gluconobacter oxydans* 621H. VAAM Jahrestagung 2016, Jena.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe.
Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Die Arbeit wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.
Alle Veröffentlichungen sind angegeben.

Ort, Datum

Konrad Kosciow