



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Rhodobacter capsulatus als Wirtsstamm zum
aktivitätsbasierten Screening von Enzymen und
zur Synthese von Membranproteinen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anuschka Malach

aus Mettmann

Düsseldorf, September 2013

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferent: Prof. Dr. Georg Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2013

Das Höchste, wozu der Mensch gelangen kann, ist das Erstaunen

Johann Wolfgang von Goethe

VERÖFFENTLICHUNGEN

PRÄSENTATIONEN BEI INTERNATIONALEN KONFERENZEN

Anuschka Malach, Achim Heck, Karl-Erich Jaeger, Thomas Drepper (2012) *Poster-Präsentation*: Development of a novel system for the functional expression and screening of membrane proteins. 5th European Conference on Prokaryotic Genomics „PokaGENOMICS“, Göttingen, Deutschland

Anuschka Malach, Achim Heck, Karl-Erich Jaeger, Thomas Drepper (2012) *Poster-Präsentation*: Development of a novel system for the functional expression and screening of membrane proteins. VAAM conference, Tübingen, Deutschland

Achim Heck, Nadine Katzke, Anita Loeschcke, **Anuschka Malach**, Armagan Özgür, Vera Svensson, , Karl-Erich Jaeger, Thomas Drepper (2013) *Poster-Präsentation*: A toolbox for the heterologous gene expression in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Bremen

Achim Heck, Nadine Katzke, Vera Svensson, Anita Loeschcke, **Anuschka Malach**, Armagan Özgür, Karl-Erich Jaeger, Thomas Drepper (2013) *Vortrag*: *Rhodobacter capsulatus* as an alternative host for the expression of membrane proteins, 12th *International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM)*, Cancún/MX, 2013-06-25

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die Überlassung des interessanten wissenschaftlichen Themas, die sehr guten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie, sowie für sein stetiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Groth danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Thomas Drepper danke ich für die engagierte Betreuung während meiner Doktorarbeit, für das Schaffen einer kreativen und freundschaftlichen Arbeitsatmosphäre, sowie die Diskussionsbereitschaft und die vielen wertvollen Ratschläge während der letzten drei Jahre.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Drepper für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und dass es mit dieser Arbeitsgruppe nie langweilig wird. Speziell danke ich Dr. Janko Potzkei, Stephan Endres, Christian Rupprecht, Dr. Nadine Katzke, Marcus Wingen und Armagan Özgür. Mein besonderer Dank für ihre Hilfe gilt Dr. Achim Heck, Dr. Anita Loeschcke und Vera Svensson. Leonard Heinrich danke ich für die hervorragende Durchführung seiner Bachelorarbeit, die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die dabei vielen lustigen Momenten.

Zudem möchte ich im Besonderen den Mitgliedern meiner Fahrgemeinschaft Dr. Janko Potzkei, Stephan Endres, Christian Rupprecht und Katrin Pünder für die stets interessanten und lustigen Konversationen während der Fahrt nach Jülich danken.

Außerdem möchte ich bei Gunnar Herholz, Anita Loeschcke, Achim Heck und meiner Mutter für die Durchsicht meiner Arbeit bedanken.

Schließlich danke ich meiner Mutter und meinen Freunden, insbesondere Nadine Schwarz, Luisa Boll, Arun Nanda, Judith Paulus und Christian Herholz für die immer währende Unterstützung, die Geduld, den Zuspruch und ihr Interesse an meiner Arbeit während der gesamten Promotionszeit!

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | VII |
| TABELLENVERZEICHNIS..... | IX |
| ABKÜRZUNGEN | X |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Verwendung von Proteinen in der Biotechnologie und Medizin..... | 1 |
| 1.1.1 Lipolytische Enzyme | 1 |
| 1.1.1.1 Biotechnologische Relevanz von lipolytischen Enzymen | 2 |
| 1.1.1.2 Bedeutung der Metagenomik für die Identifizierung neuer Gene | 4 |
| 1.1.2 Membranproteine..... | 5 |
| 1.1.2.1 Bedeutung von Membranproteinen für die Medizin..... | 6 |
| 1.2 Gewinnung von Proteinen durch die heterologe Genexpression..... | 8 |
| 1.2.1 Limitierungen und Ansätze zur Optimierung von heterologen Proteinprodukten.. | 10 |
| 1.2.1.1 Abweichender Codon-Gebrauch | 11 |
| 1.2.1.2 Toxische Effekte von Proteinen..... | 12 |
| 1.2.1.3 Bildung von inclusion bodies..... | 13 |
| 1.2.1.4 Proteindegradation durch Proteasen..... | 15 |
| 1.2.1.5 Fehlen von Kofaktoren | 15 |
| 1.3 Das phototrophe Bakterium <i>Rhodobacter capsulatus</i> als alternativer Expressionswirt . | 17 |
| 1.3.1 Bildung von intracytoplasmatischen Membranen | 20 |
| 1.3.2 Bereitstellung einer speziellen Lipidzusammensetzung | 22 |
| 1.3.3 Nutzung von wirtseigenen Kofaktoren | 23 |
| 1.4 Das T7-RNA-Polymerase-basierte <i>R. capsulatus</i> -Expressionssystem | 24 |
| 1.5 Zielsetzung..... | 26 |
| 2. Material und Methoden..... | 28 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.1 | Material..... | 28 |
| 2.1.1 | Bakterienstämme..... | 28 |
| 2.1.2 | Vektoren..... | 28 |
| 2.1.3 | Oligonukleotide..... | 30 |
| 2.1.4 | Nährmedien und Zusätze..... | 31 |
| 2.1.4.1 | <i>E. coli</i> -Medien..... | 31 |
| 2.1.4.2 | <i>R. capsulatus</i> -Medien..... | 31 |
| 2.1.4.3 | Medien und Lösungen für den Nachweis lipolytischer und esterolytischer Aktivität..... | 33 |
| 2.1.5 | Antibiotika..... | 34 |
| 2.1.6 | Antikörper, Enzyme, Chemikalien und Detergenzien..... | 35 |
| 2.1.7 | Puffer und Lösungen..... | 38 |
| 2.1.7.1 | Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese..... | 38 |
| 2.1.7.2 | Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA..... | 38 |
| 2.1.7.3 | Puffer und Lösungen zur Proteinisolierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 39 |
| 2.1.7.4 | Puffer und Lösungen für das Immunoblotting (<i>Western Blot</i>)..... | 40 |
| 2.1.7.5 | Puffer und Lösungen für die Bestimmung der Enzymaktivität von Lipasen und Esterasen mit Hilfe des Substrats <i>p</i> -Nitrophenylcaproat (<i>pNPC</i>)..... | 40 |
| 2.1.8 | Geräte und sonstige Materialien..... | 41 |
| 2.2 | Molekularbiologische Methoden..... | 43 |
| 2.2.1 | Anzucht von <i>R. capsulatus</i> | 43 |
| 2.2.2 | Anzucht auf Festmedium..... | 43 |
| 2.2.2.1 | Photoheterotrophe Anzucht unter Starklichtbedingungen..... | 43 |
| 2.2.2.2 | Chemoheterotrophe Anzucht im Dunkeln..... | 44 |
| 2.2.2.3 | Anzucht unter Verwendung von LED (<i>light emitting diods</i>)..... | 44 |
| 2.2.2.4 | Bestimmung der optischen Dichte..... | 44 |
| 2.2.2.5 | Messung von Absorptionsspektren..... | 45 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.2.3 | Anzucht von <i>E. coli</i> | 45 |
| 2.2.4 | Anzucht von <i>P. putida</i> | 45 |
| 2.2.5 | Herstellung von transformationskompetenten Zellen..... | 46 |
| 2.2.5.1 | Chemisch kompetente Zellen..... | 46 |
| 2.2.5.2 | Elektrokompetente Zellen..... | 46 |
| 2.2.6 | Transformation kompetenter Zellen..... | 47 |
| 2.2.6.1 | Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen und phänische Expression | 47 |
| 2.2.6.2 | Elektroporation von <i>P. putida</i> -Zellen und phänische Expression | 47 |
| 2.2.7 | Konjugativer Plasmidtransfer mobilisierbarer Plasmide von <i>E. coli</i> nach <i>R. capsulatus</i> | 47 |
| 2.3 | Gentechnische Methoden..... | 49 |
| 2.3.1 | Präparationen von Plasmid-DNA..... | 49 |
| 2.3.2 | DNA-Konzentrationsbestimmung | 49 |
| 2.3.3 | Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen | 49 |
| 2.3.4 | Agarosegelelektrophorese | 49 |
| 2.3.5 | Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 50 |
| 2.3.6 | Ligation von Vektor- und Fragment-DNA..... | 50 |
| 2.3.7 | Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) | 51 |
| 2.4 | Proteinbiochemische Methoden..... | 53 |
| 2.4.1 | Zellaufschluss | 53 |
| 2.4.2 | Fraktionierung der Zellkompartimente..... | 53 |
| 2.4.3 | Trennung von Zellkompartimenten durch Saccharosedichtegradienten | 53 |
| 2.4.4 | Präparation von Proteinproben für SDS-Gele | 54 |
| 2.4.5 | Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese..... | 54 |
| 2.4.6 | Coomassie-Färbung zur Proteindetektion | 54 |
| 2.4.7 | Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen..... | 54 |
| 2.4.8 | Immunodetektion von Proteinen..... | 55 |
| 2.4.9 | Proteinquantifizierung (Bradford)..... | 55 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.4.10 | Solubilisierung von Membranproteinen | 56 |
| 2.4.11 | Metallaffinitätschromatographie..... | 56 |
| 2.4.12 | Nachweis von esterolytischer und lipolytischer Aktivität | 56 |
| 2.4.12.1 | Nachweis lipolytischer Aktivität auf Tributyrin-Agar | 56 |
| 2.4.12.2 | Nachweis lipolytischer Aktivität auf Rhodamin B-Agar..... | 57 |
| 2.4.12.3 | Bestimmung der Lipase-/Esteraseaktivität mittels <i>p</i> -Nitrophenylcaproat | 57 |
| 2.4.12.4 | Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen | 58 |
| 2.4.12.5 | CO-Differenzspektroskopie | 59 |
| 3. | Ergebnisse..... | 60 |
| 3.1 | Funktionsbasiertes Screening von Genen aus dem Metagenom in <i>Escherichia coli</i> , <i>Rhodobacter capsulatus</i> und <i>Pseudomonas putida</i> | 60 |
| 3.1.1 | Konstruktion der Hydrolasegen-Expressionsvektoren..... | 63 |
| 3.1.2 | Vergleichende Expression der metagenomischen Hydrolasegene in den Expressionswirten <i>E. coli</i> , <i>P. putida</i> und <i>R. capsulatus</i> | 63 |
| 3.1.3 | Vergleich der durch die heterologe Expression hervorgerufenen lipolytischen Aktivitäten in den Expressionswirten <i>E. coli</i> , <i>P. putida</i> und <i>R. capsulatus</i> | 67 |
| 3.1.3.1 | Vergleichende qualitative Analyse der Bakterienklone mittels des für Lipasen und Esterasen spezifischen Substrats Tributyrin | 68 |
| 3.1.3.2 | Vergleichende qualitative Analyse der Bakterienklone mittels des für Lipasen spezifischen Substrats Olivenöl/Rhodamin B..... | 70 |
| 3.1.3.3 | Vergleichende quantitative Analyse von Ganzzellextrakten mittels des Substrats <i>p</i> -Nitrophenylcaproat..... | 72 |
| 3.2 | <i>R. capsulatus</i> als alternativer Expressionswirt für die heterologe Synthese von Membranproteinen | 76 |
| 3.2.1 | Die Monooxygenase CYP175A1 aus <i>Thermus thermophilus</i> | 79 |
| 3.2.2 | Die Squalenepoxidase aus <i>Stigmatella aurantiaca</i> | 80 |
| 3.2.3 | Bakteriorhodopsin aus <i>Halobacterium salinarium</i> | 82 |
| 3.2.4 | Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die heterologe Synthese von Membranproteinen in <i>R. capsulatus</i> | 83 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.2.5 | Lokalisierung der heterologen Membranproteine CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin in <i>R. capsulatus</i> | 88 |
| 3.2.5.1 | Lokalisierungsstudien zum Nachweis der heterologen Membranproteine in <i>inclusion bodies</i> oder der Membranfraktion..... | 88 |
| 3.2.5.2 | Lokalisierungsstudien zum Nachweis der Einlagerung der heterologen Membranproteine in die intracytoplasmatischen Vesikel..... | 90 |
| 3.2.5.3 | Einfluss der heterologen Synthese von Membranproteinen auf die Vesikelmorphologie | 95 |
| 3.2.6 | Reinigung und spektrale Charakterisierung der Monooxygenase CYP175A1..... | 97 |
| 3.3 | Untersuchungen zur lichtabhängigen Regulation eines <i>nif</i> -Promotor-basierten Expressionssystems in <i>R. capsulatus</i> | 102 |
| 3.3.1 | Der Expressionsvektor pRhonHi-2..... | 104 |
| 3.3.2 | Untersuchungen zur <i>nif</i> -Promotor-abhängigen Expression von YFP und Bakteriorhodopsin unter Einfluss verschiedener Lichtbedingungen | 105 |
| 3.3.3 | Untersuchungen zur T7-abhängigen Expression von Bakteriorhodopsin unter Einfluss verschiedener Lichtbedingungen | 110 |
| 4. | Diskussion | 115 |
| 4.1 | <i>R. capsulatus</i> als möglicher Wirt für das komparative Screening nach Hydrolasegenen aus verschiedenen Metagenombanken | 115 |
| 4.1.1 | Synthese lipolytischer Enzyme in den Expressionswirten <i>E. coli</i> , <i>P. putida</i> und <i>R. capsulatus</i> | 120 |
| 4.1.1.1 | Einfluss der heterologen Expression auf das Zellwachstum | 121 |
| 4.1.1.2 | Einfluss eines unterschiedlichen GC-Gehalts von heterologen Genen und Expressionswirt | 121 |
| 4.1.1.3 | Einfluss proteolytischer Aktivität auf die heterologe Expression | 123 |
| 4.1.1.4 | Unterschiedliche Enzymaktivität in den verschiedenen Expressionswirten.. | 125 |
| 4.2 | <i>R. capsulatus</i> als Expressionswirt für die Synthese von heterologen Membranproteinen | 128 |
| 4.2.1 | Modulation der Membranfläche mittels der Kultivierungsbedingungen | 129 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.2.2 | Die heterolog synthetisierten Membranproteine CYP175A1, SqEp und bR sind in die Vesikel von <i>R. capsulatus</i> eingelagert | 131 |
| 4.2.3 | Die Synthese von Membranproteinen in <i>R. capsulatus</i> ermöglicht die Gewinnung von korrekt gefaltetem Protein..... | 134 |
| 4.2.4 | Eignet sich das <i>R. capsulatus</i> -Expressionssystem für die Synthese heterologer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren?..... | 134 |
| 4.2.5 | Synthese heterologer Membranproteine in anderen alternativen Expressionswirten | 135 |
| 4.3 | Etablierung eines lichtgesteuerten Expressionssystems in <i>R. capsulatus</i> | 138 |
| 4.3.1 | Der <i>nif</i> -Promotor in <i>R. capsulatus</i> ist Blaulicht-reguliert | 138 |
| 4.3.2 | Existieren weitere lichtregulierte Expressionssysteme?..... | 140 |
| 5. | Zusammenfassung..... | 143 |
| 5. | Summary..... | 145 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 147 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Die katalytische Reaktion von Lipasen und Esterasen | 2 |
| Abb. 2: Schematische Darstellung typischer Membranproteine in einer Biomembran..... | 5 |
| Abb. 3: Schematische Darstellung möglicher Limitierungen während der heterologen Expression in <i>E. coli</i> | 10 |
| Abb. 4: Kultivierung von <i>R. capsulatus</i> auf Agarplatten und in Flüssigkultur..... | 17 |
| Abb. 5: Ausbildung von intracytoplasmatischen Membranen (ICM) in <i>R. capsulatus</i> unter phototrophen Wuchsbedingungen | 21 |
| Abb. 6: Plasmidkarte des pRhotHi-2-Expressionsvektors..... | 24 |
| Abb. 7: Lipase-katalysierte Hydrolyse von Tributyrin..... | 57 |
| Abb. 8: Lipolytisch-katalysierte Hydrolyse von <i>p</i> -Nitrophenylcaproat..... | 58 |
| Abb. 9: Expression von Hydrolasegenen aus dem Metagenom in <i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>P. putida</i> KT2440T7 sowie <i>R. capsulatus</i> B10ST7 unter phototrophen und chemotrophen Bedingungen | 65 |
| Abb. 10: Nachweis lipolytischer Aktivität in <i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>P. putida</i> KT2440T7 und <i>R. capsulatus</i> B10ST7 unter phototrophen und chemotrophen Bedingungen auf Tributyrin-Agar | 69 |
| Abb. 11: Nachweis lipolytischer Aktivität in <i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>P. putida</i> KT2440T7 und <i>R. capsulatus</i> B10ST7 unter phototrophen und chemotrophen Bedingungen auf Rhodamin B-Agar | 71 |
| Abb. 12: Nachweis lipolytischer Aktivität in <i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>P. putida</i> KT2440T7 und <i>R. capsulatus</i> B10ST7 unter phototrophen und chemotrophen Bedingungen mittels des Substrats <i>p</i> NPC bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C..... | 73 |
| Abb. 13: Die katalytische Reaktion der Monooxygenase CYP175A1..... | 79 |
| Abb. 14: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von CYP175A1 aus <i>T. thermophilus</i> | 80 |
| Abb. 15: Die katalytische Reaktion der Squalenepoxidase | 81 |
| Abb. 16: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von Bakteriorhodopsin mit eingelagertem Retinal aus <i>H. salinarium</i> | 82 |
| Abb. 17: Synthese der Membranproteine CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin in <i>R. capsulatus</i> unter verschiedenen Anzuchtbedingungen | 85 |
| Abb. 18: Differentielle Zentrifugation von <i>R. capsulatus</i> - und <i>E. coli</i> -Zellextrakten zur Lokalisation der heterologen Membranproteine..... | 89 |
| Abb. 19: Darstellung einer durch Saccharosedichte-gradientenzentrifugation aufgetrennte Membranfraktion von <i>R. capsulatus</i> | 91 |
| Abb. 20: Lokalisierungsstudien zum Nachweis der Membranproteine CYP175A1, SqEp und bR in den intracytoplasmatischen Vesikeln von <i>R. capsulatus</i> | 92 |
| Abb. 21: Photopigmentgehalt der photosynthetischen Membranen von <i>R. capsulatus</i> zum Nachweis der Photosynthesekomplex-Verdrängung durch die Einlagerung der heterologen Membranproteine | 94 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 22: Analyse der Vesikelmorphologie von <i>R. capsulatus</i> -Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie zum Nachweis der Einlagerung der heterologen Membranproteine CYP175A1, Sqp und bR..... | 96 |
| Abb. 23: Solubilisierungsstudien von CYP175A1 mittels der Detergenzien Triton X-100 und Chaps sowie 60 °C-Inkubation | 98 |
| Abb. 24: Aktivitätsnachweis der gereinigten CYP175A1 mittels CO-Differenzspektrums..... | 100 |
| Abb. 25: Plasmidkarte des pRhonHi-2-Expressionsvektors | 104 |
| Abb. 26: Phototrophe Kultivierung von <i>R. capsulatus</i> in Flüssigkultur unter der definierten Standardbeleuchtung | 105 |
| Abb. 27: Lichtemissionsspektrum der verschiedenen Beleuchtungssysteme sowie das Absorptionsspektrum photosynthetischer Membranen von <i>R. capsulatus</i> | 106 |
| Abb. 28: Phototrophe Kultivierung von <i>R. capsulatus</i> in Flüssigkultur mittels LED-Beleuchtungsplatten .. | 107 |
| Abb. 29: Synthese der heterologen Proteine YFP und Bakteriorhodopsin mittels des <i>nif</i> -Promotor-basierten <i>R. capsulatus</i> -Expressionssystems unter verschiedenen Lichtbedingungen | 108 |
| Abb. 30: Synthese von Bakteriorhodopsin mittels des T7-Promotor-basierten <i>R. capsulatus</i> -Expressionssystems unter verschiedenen Lichtbedingungen | 112 |
| Abb. 31: Anzahl der im Konsortium ExpressSys untersuchten lipolytisch aktiven Enzyme in den verschiedenen Expressionswirten..... | 127 |
| Abb. 32: Schematische Darstellung der Expression heterologer Membranproteine in <i>E. coli</i> und <i>R. capsulatus</i> | 132 |
| Abb. 33: Schematische Darstellung der lichtregulierten Genexpression unter der Kontrolle des <i>nif</i> -Promotors | 139 |
| Abb. 34: Nachweis lipolytischer Aktivität in <i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>P. putida</i> KT2440T7 und <i>R. capsulatus</i> B10ST7 unter phototrophen und chemotrophen Bedingungen mittels des Substrat <i>pNPC</i> bei einer Reaktionstemperatur von 70 °C..... | 163 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| Tab. 1: Übersicht der verwendeten Stämme | 28 |
| Tab. 2: Übersicht der verwendeten Plasmide | 28 |
| Tab. 3: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide | 29 |
| Tab. 4: Übersicht der verwendeten Primer für PCR | 30 |
| Tab. 5: Übersicht der verwendeten Antibiotika | 34 |
| Tab. 6: Übersicht der verwendeten Chemikalien | 35 |
| Tab. 7: Übersicht der verwendeten Detergenzien | 37 |
| Tab. 8: Übersicht der verwendeten Geräte..... | 41 |
| Tab. 9: Übersicht sonstiger Materialien | 41 |
| Tab. 10: Übersicht der verwendeten Software | 41 |
| Tab. 11: Übersicht der verwendeten internetbasierten Programme..... | 42 |
| Tab. 12: Übersicht der verwendeten Kits | 42 |
| Tab. 13: Eigenschaften der lipolytischen Enzyme | 62 |
| Tab. 14: Eigenschaften der ausgewählten heterologen Membranproteine | 78 |
| Tab. 15: GC-Gehalt der in dieser Arbeit verwendeten Organismen..... | 122 |
| Tab. 16: GC-Gehalt der in dieser Arbeit verwendeten Hydrolasegene | 123 |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|------------|---|
| A | Ampere |
| A. dest. | destilliertes Wasser (lat.: <i>aqua destillata</i>) |
| ATP | Adeninriphosphat |
| AU | <i>absorbance units</i> (engl.) |
| bp | Basenpaare |
| °C | Grad Celsius |
| Cm | Chloramphenicol |
| C-Terminus | Carboxyterminus |
| Da | Dalton |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| g | Gramm |
| h | Stunde(n) |
| IPTG | Isopropyl-β-D-Thiogalactosid |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| Km | Kanamycin |
| kPa | Kilopascal |
| L | Liter |
| LB | Luria-Bertani Broth |
| m | milli |
| M | Molar (mol/Liter) |
| MCS | <i>multiple cloning site</i> (engl.) |
| min | Minute(n) |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> (engl.) |
| MW | Molekulargewicht |
| n | nano |
| N-Terminus | Aminoterminus |
| OD | Optische Dichte (Schichtdicke 1 cm, Messvolumen 1 ml) |
| P | Promotor |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde(n) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| tRNA | <i>transport RNA</i> (engl.) |
| U | Enzymeinheit |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| λ | Wellenlänge |
| μ | mikro |

1. Einleitung

1.1 Verwendung von Proteinen in der Biotechnologie und Medizin

Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaute Biomoleküle und werden oft als „Bausteine der Zelle“ bezeichnet. Sie geben der Zelle nicht nur ihre Form und Struktur, sondern sind auch in unzähligen ihrer Funktionen involviert. Beispiele hierfür sind unter anderem Enzyme, eine Klasse von Proteinen, die intrazelluläre biochemische Reaktionen katalysieren und damit häufig Aufgaben des Zellmetabolismus erfüllen. In die Membran eingebettete Proteine, sogenannte Membranproteine, können Kanäle oder Poren bilden, die für den Transport von Nährstoffen oder auch anderer kleiner Moleküle verantwortlich sind. Andere Proteine wiederum wirken in der Zelle als Rezeptoren oder Signalübermittler. Die Vielzahl der von Proteinen ausgeführten Aufgaben basiert auf der Vielfältigkeit ihrer dreidimensionalen Strukturen. Aufgrund der genannten Funktionen, die Proteine in der Zelle übernehmen, sind sie für die Biotechnologie und Medizin von besonderem Interesse. Beispielsweise wird in der Biotechnologie auf die Erforschung von Enzymen aufgrund ihrer vielfältigen Anwendungsgebiete als Biokatalysatoren in der organischen Synthese bestimmter Produkte (Li *et al.*, 2013; Straathof *et al.*, 2002), in der Lebensmittelproduktion (Jaeger & Reetz, 1998; Martins *et al.*, 2013), der Textilindustrie (Basto *et al.*, 2007; Díaz Blanco *et al.*, 2012) oder in der Herstellung medizinischer Materialien (Vasconcelos *et al.*, 2010) ein besonderes Augenmerk gerichtet. Ebenso ist die Identifizierung neuer Proteine und die Entschlüsselung ihrer Funktionen die Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente. Eines der bedeutendsten Beispiele hierfür ist die Entdeckung des Insulins aus dem Pankreasgewebe von Hunden, welches Diabetikern injiziert wurde und wodurch ihr Blutzuckerspiegel nachweislich gesenkt werden konnte (Banting *et al.*, 1923, 1991). Die Aufgaben und die biologische Relevanz lipolytischer Enzyme als Vertreter einer besonders erforschten Proteingruppe der Biotechnologie sowie die Proteinklasse der Membranproteine, die in der Medizin an Relevanz gewinnt, sollen im Nachfolgenden detailliert erläutert werden.

1.1.1 Lipolytische Enzyme

Lipolytische Enzyme werden allgemein zu Enzymen zusammengefasst, die Ester unter Anwesenheit von Wasser in einer reversiblen Reaktion hydrolytisch in einen Alkohol und eine Säure spalten. Damit spielen sie eine wichtige Rolle bei der Fettverdauung und bei der Mobilisierung von körpereigenen Fettreserven zur Energiebereitstellung. Lipolytische Enzyme sind

in einzelligen Bakterien, aber auch in höheren Organismen wie Pilzen und Pflanzen bis hin zu Säugetieren aufzufinden (Nagarajan, 2012; Schmid & Verger, 1998; Singh & Mukhopadhyay, 2012). Die meisten bakteriellen lipolytischen Enzyme stammen hierbei aus *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Bacillus* und *Chromobacterium spec.*, während lipolytische Enzyme aus Pilzen vorwiegend aus *Candida*, *Humicola*, *Penicillium*, *Yarrowia*, *Mucor*, *Rhizopus* und *Aspergillus spec.* gewonnen werden (Jaeger & Reetz, 1998; Nagarajan, 2012; Singh & Mukhopadhyay, 2012). Bakterien produzieren neben verschiedenen anderen Klassen von lipolytischen Enzymen insbesondere die Carboxylester-Hydrolasen (EC 3.1.1). Lipasen und Esterasen werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Substratspezifitäten in zwei weitere Unterklassen unterteilt. Die Esterasen, welche der Klasse der Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) zugewiesen werden, hydrolysieren kurzkettige Triglyceride (Abb. 1), die partiell in Wasser löslich sind (Arpigny & Jaeger, 1999). Lipasen, welche der Klasse der Triacylglycerol-Lipasen (EC 3.1.1.3) zugehörig sind, katalysieren bevorzugt die Hydrolyse und die Synthese von langkettigen, wasserunlöslichen Triglyceriden. Sie sind jedoch ebenfalls in der Lage, kurzkettige Triglyceride umzusetzen, wie in Abbildung 1 dargestellt (Arpigny & Jaeger, 1999; Jaeger & Reetz, 1998).

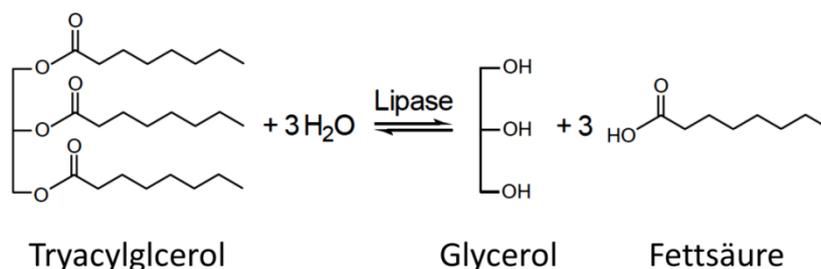


Abb. 1: Die katalytische Reaktion von Lipasen und Esterasen

Triacylglycerol kann durch die Katalyse von Lipasen oder Esterasen zu Glycerol und Fettsäuren hydrolysiert werden. In der umgekehrten Reaktion werden Glycerol und Fettsäuren zu einem Triacylglycerid katalysiert.

1.1.1.1 Biotechnologische Relevanz von lipolytischen Enzymen

Die enzymatische Synthese von chemischen Verbindungen weist mehrere Vorteile gegenüber der chemischen Synthese auf. Dazu gehören unter anderem umweltfreundlichere Reaktionsbedingungen, eine CO₂-neutrale Produktion sowie ein niedrigerer Energieverbrauch und eine leichtere Abfallentsorgung (Hudlicky & Reed, 2009).

Lipolytische Enzyme, im Besonderen Lipasen, gehören zu der bedeutendsten Enzymklasse im Bereich der Biotechnologie (Boland *et al.*, 1991). Ein Grund für ihr hohes biokatalytisches und biotechnologisches Potential ist unter anderem die Eigenschaft, Reaktionen mit hoher Regio- und Enantioselektivität zu katalysieren (Jaeger *et al.*, 1999; Romas J. Kazlauskas, 1998). Dabei spielen weitere Faktoren wie eine hohe Stabilität in organischen Lösungsmitteln (Bornscheuer *et al.*,

2002; White & White, 1997) und ein breites Substratspektrum (Henne *et al.*, 2000) eine entscheidende Rolle. Lipolytische Enzyme können oft in großen Mengen biotechnologisch zur Verfügung gestellt werden, da viele Lipasen und Esterasen hohe Expressionslevel in Organismen wie Bakterien oder Pilzen zeigen (Jaeger & Eggert, 2002; Valero, 2012). Die funktionelle Expression der Hydrolasegene erfolgt dabei ohne die Zugabe bestimmter Kofaktoren (Bornscheuer *et al.*, 2002; Jaeger & Eggert, 2002).

Die kommerzielle Anwendung von Lipasen und Esterasen ist ein Milliardengeschäft im Hinblick auf ihren vielfältigen Einsatz als Biokatalysatoren (Hasan *et al.*, 2006; Kennedy & White, 1983). So werden sie in unterschiedlichen industriellen Prozessen wie der Herstellung von Pharmazeutika aufgrund ihrer hohen enantioselektiven Reaktionen (Ono *et al.*, 2001) oder der Produktion von Kosmetika wie Seifen (Schmid & Verger, 1998) und Duftstoffen (Kiyota *et al.*, 2001) eingesetzt. Ein weiterer Einsatzbereich ist die Lebensmittelindustrie (Jaeger & Reetz, 1998; Olempska-Beer *et al.*, 2006). So werden Lipasen und Esterasen beispielsweise für die Bereitstellung von Kakaobutter-Äquivalenten oder für die Produktion von Käse (Schmid & Verger, 1998) eingesetzt. Ebenso sind sie in die Produktion von Agrochemikalien (Tanaka *et al.*, 2002) und Biodiesel involviert (Fukuda *et al.*, 2001; Jaeger & Eggert, 2002). Lipolytische Enzyme spielen des Weiteren eine wichtige Rolle in der Synthese von Polymeren (Gross *et al.*, 2001) und Feinchemikalien wie enantiomerenreiner Alkohole sowie chiraler Amide und Amine (Schmid *et al.*, 2001; Straathof *et al.*, 2002).

Die Nutzung dieser Biokatalysatoren im industriellen Maßstab wird häufig durch eine ineffiziente funktionelle Synthese limitiert. Hierfür sollte der Mechanismus der Genexpression, Faltung und Sekretion der verfügbaren lipolytischen Enzyme geklärt sein. Bislang konnten einige Kristallstrukturen von Lipasen und Esterasen gelöst werden, wobei die daraus erhaltenen Informationen über ihre Proteinstruktur das molekulare Modulieren zwecks Aktivitätsoptimierung erleichtern (Jaeger *et al.*, 1999; Jaeger & Eggert, 2002). Trotz dieser Fortschritte sind die 3D-Strukturen vieler Lipasen zurzeit noch nicht verfügbar, wodurch die Erforschung der Eigenschaften lipolytischer Proteine beeinträchtigt wird (Jaeger *et al.*, 1999). Die Suche nach geeigneten bakteriellen Expressionswirten für Lipasen und Esterasen, die eine verbesserte Genexpression und Enzymaktivität ermöglichen, stellt eine Möglichkeit zur Überwindung der vorhandenen Limitierungen dar. Ein weiteres Ziel der Biotechnologie ist neben der Aktivitätsoptimierung von bisher identifizierten Enzymen die Entdeckung neuer Enzyme mit noch unbekanntem und möglicherweise außergewöhnlichen Eigenschaften. Eine Möglichkeit neue lipolytische Enzyme zu identifizieren, ist das Screening von Lipasen und Esterasen innerhalb von Metagenom-Bibliotheken, das die Entdeckung von Enzymen bisher nicht kultivierbarer Organismen ermöglicht (Chow *et al.*, 2011; Streit & Schmitz, 2004).

1.1.1.2 Bedeutung der Metagenomik für die Identifizierung neuer Gene

Die Metagenomik ist ein relativ neues Feld der Biowissenschaften, das die Identifizierung neuer Mikroorganismen und ihrer Enzyme unabhängig von ihrer Kultivierbarkeit ermöglicht. 99,8 % aller Mikroben, die in den unterschiedlichsten Habitaten vorkommen, sind nicht kultivierbar. Die Metagenom-Technologie überwindet dieses Hindernis, indem Kultur-unabhängige Methoden angewendet werden. Metagenomische Anwendungen bedeuten für die Biotechnologie die Entdeckung neuer Biokatalysatoren und eine größere Auswahl an Molekülen, die großes Potential besitzen, um in industriellen Prozessen verwendet zu werden (Streit & Schmitz, 2004; Streit *et al.*, 2004). Die Methode der Metagenomik beinhaltet die Extraktion und Analyse der Genome eines gesamten Habitats. Dies ermöglicht die Erforschung der Vielfältigkeit der unterschiedlichen Gene und ihrer Produkte und erlaubt Einblicke in die Ökologie des jeweiligen Habitats (Schmeisser *et al.*, 2007). Hierfür wird die DNA aus dem zu untersuchenden Habitat isoliert und mittels Klonierung in spezielle Vektorsysteme eingebracht. Die so generierten DNA-Bibliotheken sind das Grundgerüst der Metagenom-Analyse. Die weitere Untersuchung der genomischen DNA kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen gibt es die funktionsbasierte Analyse, in der die Metagenom-Bibliothek hinsichtlich ihrer Enzymaktivitäten untersucht wird. Zum anderen kann die sequenzbasierte Analyse verwendet werden, in der das Genom auf bestimmte Gen-Sequenzen analysiert wird, um funktionelle Informationen des Organismus zu erhalten (Schloss & Handelsman, 2003). Die funktionsbasierte Analyse, die überwiegend in der Biotechnologie Anwendung findet, wird durch eine ineffektive funktionelle heterologe Expression der Gene limitiert. Limitierungen der heterologen Genexpression sind unter anderem nicht erkannte Promotoren, Proteintoxizität, fehlende Kofaktoren oder fehlende Faltungshelfer und Sekretionssysteme (Streit & Schmitz, 2004). *E. coli* wird in der funktionsbasierten Metagenom-Analyse als Standardwirt verwendet (Streit & Schmitz, 2004). Ein Großteil der Gene kann aufgrund der ineffizienten Proteinsynthese in *E. coli* nicht beschrieben werden. Diese Limitierung ist unter anderem auf eine partielle Syntheseleistung der bakteriellen Polymerasen zurückzuführen, die aufgrund der Größe der Metagenomfragmente nur die Gene, die in den „Randbereichen“ der Fragmente lokalisiert sind, exprimiert (Troeschel *et al.*, 2010). Eine Möglichkeit, die Expression von bisher unbekannt Genen, insbesondere Hydrolasegenen, zu verbessern und damit die Chance, neue lipolytische Enzyme zu entdecken, ist möglicherweise der Einsatz verschiedener Expressionswirte während der Metagenomstudien (Leis *et al.*, 2013).

1.1.2 Membranproteine

Membranproteine sind in die Membran eingebettete oder an diese assoziierte Proteine und kommen in Membranen von einzelligen Bakterien bis hin zu höheren Organismen wie Pflanzen oder Säugetieren vor. Membranprotein kodierende Gene machen bis zu einem Drittel des prokaryotischen und eukaryotischen Genoms aus, und ihre Produkte übernehmen zentrale Aufgaben der Zellphysiologie (Drew *et al.*, 2003; Wallin & von Heijne, 1998) wie die Signalübermittlung (Bilwes *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2010; Warne *et al.*, 2010), die Energieumwandlung (Capaldi & Aggeler, 2002; Neutze *et al.*, 2002), den selektiven Ionentransport (Gonen & Walz, 2006; Olesen *et al.*, 2007), die Nährstoffaufnahme oder die Zell-Zell-Interaktion (Drew *et al.*, 2003). Sie werden eingeteilt in integrale Membranproteine, die vollständig in die Membran eingebettet sind, und in periphere Membranproteine, die meist nur an den Lipidkopfgruppen der Membran oder anderen integralen Membranproteinen gebunden sind (Abb. 2).

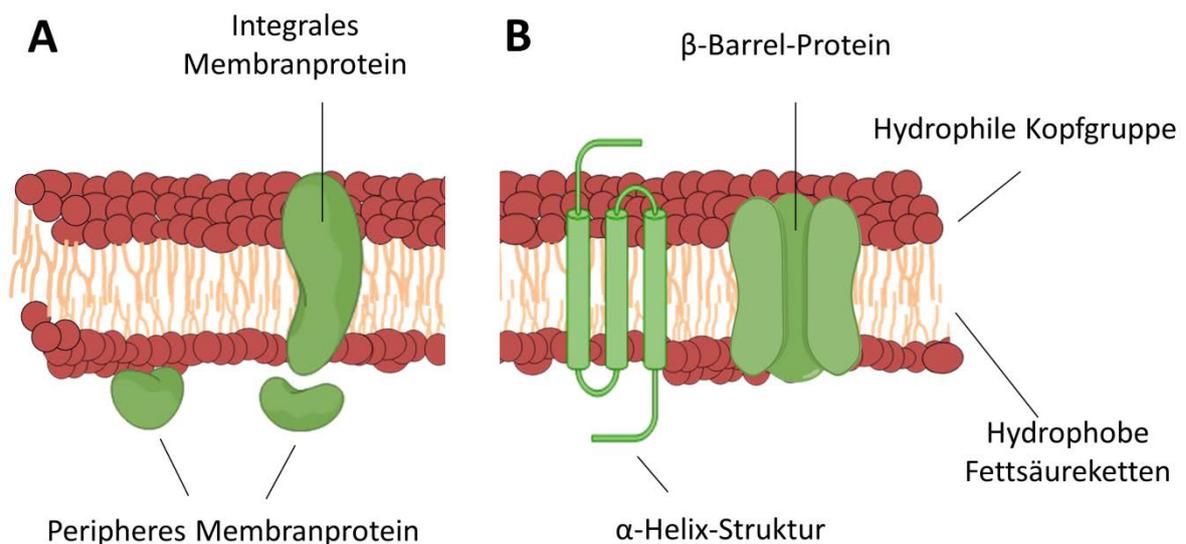


Abb. 2: Schematische Darstellung typischer Membranproteine in einer Biomembran

Zellmembranen bestehen aus einer Doppelschicht von Phospholipidmolekülen, die aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einer hydrophoben Fettsäurekette bestehen. A) Integrale Membranproteine durchspannen die Phospholipid-Doppelschicht, während die peripheren Proteine nicht in den hydrophoben Bereich der Zellmembran eindringen, sondern an die polaren Kopfgruppen der Lipide oder an die integralen Membranproteine über spezifische Wechselwirkungen gebunden sind. B) Besondere Membranstrukturen der integralen Membranproteine sind die α -helikalen und β -Barrel-Proteine.

Integrale Membranproteine können anhand ihrer Architektur in zwei Klassen unterteilt werden: Proteine mit einer α -Helix-Sekundärstruktur und Proteine mit β -Faltblattstrukturen. α -helikale Proteine sind in allen zellulären Membranen vertreten, und laut Vorhersageberechnungen von internetbasierten Programmen wie TMHMM repräsentieren sie 20-25 % aller bislang

sequenzierten offenen Leserahmen (Krogh *et al.*, 2001). Die Anzahl von Membranproteinen mit β -Faltblatt-Strukturen ist ungewiss, da sich die Identifizierung dieser Proteine mit Hilfe von Sequenzanalysen schwieriger gestaltet (Elofsson & von Heijne, 2007). In Bakterien sind alle bekannten β -Barrel-Proteine in den äußeren Membranen lokalisiert und besitzen laut Vorhersageberechnungen ein N-terminales Signalpeptid (Elofsson & von Heijne, 2007). Beide Klassen von integralen Membranproteinen zeigen eine ähnliche Oberflächenstruktur bezüglich ihrer nach außen gerichteten Aminosäurereste (Seshadri *et al.*, 1998). Die Proteine werden von einem hydrophoben „Gürtel“ umschlossen, der von aromatischen Aminosäuren (Tryptophan und Tyrosin) flankiert wird (Elofsson & von Heijne, 2007). Während α -helikale Membranproteine eine mehr oder weniger gleichmäßige hydrophobe Verteilung aufweisen (Bowie, 1997; Wallin *et al.*, 1997), zeigen β -Barrel-Proteine ein amphiphiles Verhalten, wodurch die Proteinoberfläche in der Membrandomäne eine größere Hydrophobizität als der Proteinkern aufweist (Ulmschneider *et al.*, 2005). Auch wenn sich die Oberflächenstruktur beider Proteinklassen ähnelt, unterscheiden sich Sekundärstruktur und Faltung stark voneinander (Elofsson & von Heijne, 2007). α -helikale Proteine bestehen aus langen transmembranen α -Helices, die spiralförmig umeinander angeordnet sind, während β -Barrel-Proteine aus antiparallel verlaufenden β -Faltblättern bestehen, die eine Röhre bilden.

1.1.2.1 Bedeutung von Membranproteinen für die Medizin

Das Interesse an Membranproteinen ist aufgrund ihrer zentralen Funktionen in der Zellbiologie und -physiologie sehr groß. 50–60 % aller bisher entwickelten Medikamente zielen auf die Funktion von Membranproteinen ab (Klabunde & Hessler, 2002; Ren *et al.*, 2009; Yin, 2008). Die größte Superfamilie der menschlichen integralen Membranproteine stellt die der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) dar (Flower, 1999; Takeda *et al.*, 2002). GPCR-kodierende Gene machen ca. 4 % des menschlichen Genoms aus und stellen damit ungefähr 800 funktionelle Gene dar (Ren *et al.*, 2009; Warne *et al.*, 2010). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren besitzen eine konservierte Struktur aus 7 Transmembran-Helices und sind in der Zellmembran lokalisiert. Ihre Aufgabe besteht in der Detektion und Umwandlung endogener Signale in eine intrazelluläre Antwort (Klabunde & Hessler, 2002). Damit spielen sie beispielsweise eine wichtige Rolle in den zellulären Prozessen des Sehvermögens, des Gedächtnisses, der Regulation des Blutdrucks oder der Entwicklung der Geschlechtsorgane (Neves *et al.*, 2002; Sodhi *et al.*, 2004).

Viele Prozesse, in denen Membranproteine, insbesondere GPCR, involviert sind, hängen oft mit Krankheiten wie rheumatischer Arthrose, Multipler Sklerose, Autoimmunerkrankungen, Darm- und Lungenentzündungen, HIV-Infektionen oder Krebs zusammen (Scholten *et al.*, 2012).

Während im Jahr 2001 die Produktion von Medikamenten, die auf die Funktionen von Membranproteinen zielen, einen Jahresumsatz von 30 Milliarden Dollar ausmachte (Klabunde & Hessler, 2002), steigerte sich der weltweite jährliche Umsatz in den darauf folgenden fünf Jahren auf 50 Milliarden (Lundstrom, 2006). Ein bekanntes Beispiel ist die Herstellung von Betablockern, die oft bei Herzleiden eingesetzt werden. Ihr Wirkstoff blockiert die β -Adrenorezeptoren und unterbindet damit die Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin. Die Folge ist das Herabsetzen der Ruheherzfrequenz und des Blutdrucks (Rengo *et al.*, 2012).

Trotz des großen Interesses an Membranproteinen und ihrer Wirkung auf den Zellmetabolismus konnte bisher nur eine kleine Anzahl von Membranproteinstrukturen gelöst werden (Andréll & Tate, 2013; Koth & Payandeh, 2009; Surade & Klein, 2006), die jedoch für die Entschlüsselung ihrer Funktionen oft notwendig sind. Von insgesamt 91.550 gelösten Proteinstrukturen entfallen bislang nur 484 Strukturen auf Membranproteine, womit diese Proteingruppe in der Proteinstruktur-Datenbank extrem unterrepräsentiert ist (RCSB Protein Data Bank, Stand Juni 2013; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Die Anzahl der mittels Sequenzanalysen berechneten Membranproteine steigt stetig an, während die Informationen über ihre Struktur und Funktion unentschlüsselt bleiben. Dieses Ergebnis ist auf die technischen Schwierigkeiten bezüglich ihrer hydrophoben Natur, ihres teilweise geringen natürlichen Vorkommens sowie der Proteininstabilität zurückzuführen (Bernaumat *et al.*, 2011), die häufig mit Problemen der Expression, Reinigung und Charakterisierung einhergehen. Die Entdeckung neuer unbekannter GPCR sowie die Entschlüsselung der Funktion bereits identifizierter GPCR mit Hilfe von verbesserten Expressionssystemen und neu entwickelten Screening-Tests ist ein wichtiger Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Medikamente gegen bislang noch unheilbare und tödliche Krankheiten (Wang *et al.*, 2012; Zhang & Xie, 2012).

1.2 Gewinnung von Proteinen durch die heterologe Genexpression

Die Identifizierung neuer Proteine und ihrer Funktion ist aufgrund des potentiellen Nutzens für industrielle oder therapeutische Anwendungen ein wesentlicher Bestandteil der Biotechnologie und Biomedizin. Voraussetzung für das vollständige Erfassen der Funktion von Proteinen ist meistens die Struktur. Für die strukturelle Aufklärung zu untersuchender Proteine werden signifikante Mengen an Protein benötigt. Proteine werden in ihrem Ursprungswirt jedoch oft nur in geringen Mengen und unter definierten Bedingungen synthetisiert, so dass deren Aufreinigung hieraus nicht effizient oder unmöglich ist. Der Einsatz von alternativen Expressionswirten ist erforderlich.

Bei der heterologen Genexpression erfolgt die Synthese des Zielproteins nicht in seinem Ursprungsorganismus, sondern durch genetische Manipulation in einem kostengünstigen und leicht handhabbaren Mikroorganismus oder in Zellkulturen. Als Expressionswirte dienen unter anderem Bakterien (Sørensen & Mortensen, 2005; Zweers *et al.*, 2008), Hefen (Cregg *et al.*, 2009) oder auch höhere Organismen wie Pflanzen (Boehm, 2007), insbesondere auch Algen (León-Bañares *et al.*, 2004), Insekten (Altmann *et al.*, 1999) oder Säugerzellen (Hofmann *et al.*, 1995).

Die verschiedenen Organismen unterscheiden sich deutlich in ihren Eigenschaften. So eignen sich Bakterien aufgrund des schnellen Zellwachstums, der einfachen genetischen Manipulier- und Kultivierbarkeit sowie des hohen Expressionslevels (Zweers *et al.*, 2008) besonders als Wirte für die heterologe Expression von löslichen prokaryotischen Genen. Aufgrund verschiedener Faktoren wie beispielsweise das Fehlen von posttranslationalen Modifikationen führt die Synthese von eukaryotischen Proteinen sowie von Membranproteinen häufig zu der Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten (Freigassner *et al.*, 2009; Georgiou & Valax, 1996). Als Alternative zu den prokaryotischen Expressionswirten wird oftmals auf einen eukaryotischen Expressionswirt zurückgegriffen. Hefen verfügen ähnlich wie die Bakterien über kurze Generationszeiten und eine einfache Kultivierbarkeit. Zudem sind sie in der Lage, posttranslationale Modifikationen an dem rekombinanten Protein vorzunehmen und besitzen eine Lipidzusammensetzung, die der der höheren eukaryotischen Systeme ähnelt (Freigassner *et al.*, 2009). Diese Besonderheiten zeichnen den Expressionswirt Hefe für die Synthese eukaryotischer Proteine aus. Nachteile dieser Organismen sind jedoch die Proteindegradation durch die Sekretion der heterologen Proteine ins Medium und die Hyperglykosylierung, die sich deutlich von der Glykosylierung in Säugetieren oder Menschen unterscheidet (Boehm, 2007). Höhere eukaryotische Organismen wie Algen, Pflanzen oder Säugerzellen eignen sich aufgrund der kosten- und zeitintensiven Kultivierung sowie der häufig geringen Proteinausbeuten nur bedingt für die heterologe Expression in größeren Mengen. Diese Wirte werden vorwiegend für beispielsweise *in vivo*-Studien, die Synthese von

Verbindungen wie Carotinoiden oder die Produktion von Antikörpern verwendet (Bernaumat *et al.*, 2011; León-Bañares *et al.*, 2004). Die Expression von Genen in Insektenzellen stellt einen Kompromiss zwischen bakteriellen Expressionssystemen und Expressionen in höheren eukaryotischen Systemen dar. Obwohl die Kultivierung von Insektenzellen kosten- und zeitintensiver ist als die der Bakterienzellen, eignet sich dieser Expressionswirt aufgrund besserer posttranslationaler Modifikationen im Vergleich zu Bakterien und Hefen besonders für die heterologe Expression eukaryotischer Gene (Bernaumat *et al.*, 2011).

Um ein heterologes Protein effizient zu synthetisieren, wird neben dem Expressionswirt ein geeigneter, leistungsstarker Expressionsvektor benötigt.

Grundsätzlich werden Expressionssysteme in zwei Kategorien eingeteilt:

- 1) Systeme, die konstitutiv exprimierende Promotoren verwenden wie beispielsweise den Promotor des Kanamycin-Gens (*PaphII*) (Katzke *et al.*, 2010). Diese Promotoren werden für eine kontinuierliche Expression der heterologen Gene verwendet.
- 2) Systeme, die induzierbare Promotoren verwenden, um die Expression heterologer Gene durch die Zugabe eines künstlichen Induktors zu induzieren, was die Trennung der Wachstumsphase von der Expressionsphase ermöglicht. Diese Methode wird vorwiegend verwendet, um durch die Expression ausgelöste negative Effekte zu regulieren.

Beispiele für Expressionssysteme, die sich in ihrem Induktionsmechanismus unterscheiden, sind unter anderem Expressionssysteme, die auf Zucker-induzierbaren Promotoren wie den *lac*-, *tac*, oder *Gal1*-Promotoren basieren (de Boer *et al.*, 1983; Brosius, 1988; Johnston, 1987). Neben den bereits gut etablierten Systemen konnten auch lichtinduzierbare (Drepper *et al.* 2011; Hurley *et al.* 2012; Lee *et al.* 2013), temperaturabhängige (Valdez-Cruz *et al.*, 2010) oder autoinduzierbare Expressionssysteme (Nocadello & Swennen, 2012) entwickelt werden.

Als besonderer Vertreter der Bakterien wird das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* vorgestellt. Die Expression heterologer Gene in *E. coli* beruht häufig auf dem T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem. Es ist das bekannteste und weitverbreitetste Expressionssystem (Studier & Moffatt, 1986; Tabor & Richardson, 1985; Terpe, 2006) und besteht aus einer T7-RNA-Polymerase, deren Synthese unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht, und dem dazugehörigem T7-Promotor, der letztlich die Expression des Zielgens reguliert (Studier & Moffatt, 1986; Tabor & Richardson, 1985). Die T7-RNA-Polymerase besteht aus einer Untereinheit, benötigt keine weiteren Kofaktoren und ist spezifisch für den T7-Promotor, der aus einer Sequenz von 23 Basenpaaren besteht (Kochetkov *et al.*, 1998; Tabor & Richardson, 1985). Die strikte Spezifität der T7-RNA-Polymerase gegen den T7-Promotor sowie die Nichterkennung des T7-Promotors von bakteriellen RNA-Polymerasen erlauben eine gerichtete Expression von

selektiven Genen unter der Kontrolle des T7-RNA-Polymerase-Promotors (Davanloo *et al.*, 1984; Kochetkov *et al.*, 1998; Tabor & Richardson, 1985).

Die Expression heterologer Gene in *E. coli* weist neben der kostengünstigen Kultivierung, der einfachen genetischen Manipulierbarkeit (Studier *et al.*, 1990), den schnellen Generationszeiten sowie der großen Anzahl an verfügbaren Vektoren (Peti & Page, 2007) noch einen weiteren Vorteil auf. *E. coli* ist in der Lage, 10 - 30 % heterologes Protein, bezogen auf seinen Gesamtproteingehalt, zu synthetisieren (Goulding & Jeanne Perry, 2003).

Die Synthese des Proteins hängt jedoch von den Proteineigenschaften ab, und nicht jedes Protein kann erfolgreich in *E. coli* synthetisiert werden. Komplex aufgebaute Proteine bestehen oft aus mehreren Untereinheiten, Kofaktoren oder prosthetischen Gruppen und benötigen posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen, um in ihre aktive Form umgewandelt zu werden (Freigassner *et al.*, 2009; Wagner *et al.*, 2006; Weickert & Doherty, 1996). Diese Anforderungen führen häufig, insbesondere bei eukaryotischen Proteinen, zu Problemen bei der heterologen Synthese der Proteine, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

1.2.1 Limitierungen und Ansätze zur Optimierung von heterologen Proteinprodukten

Wie in Kapitel 1.2 bereits erwähnt, weist die heterologe Genexpression in *E. coli* klare Vorteile wie höhere Proteinausbeuten, schnellere Generationszeiten sowie kostengünstige Kultivierung gegenüber der homologen Genexpression auf. Dennoch treten auch erhebliche Nachteile auf, die im Folgenden erläutert werden sollen (Abb. 3).

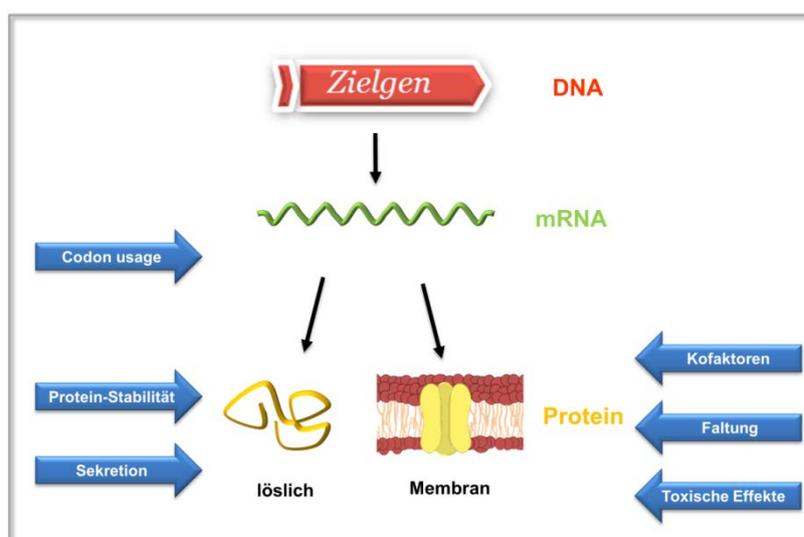


Abb. 3: Schematische Darstellung möglicher Limitierungen während der heterologen Expression in *E. coli* Dargestellt ist der Ablauf der Proteinbiosynthese. Die blauen Pfeile stellen einige der kritischen Punkte während der heterologen Expression dar, die oft zu geringen Ausbeuten und inaktiven Proteinen führen können.

1.2.1.1 Abweichender Codon-Gebrauch

Codon usage beschreibt das Phänomen, dass eine Aminosäure von mindestens einem oder auch mehreren Triplett-Codons repräsentiert werden kann, wobei sich die Frequenz der Codon-Triplets in den einzelnen Organismen unterscheidet (Carbone *et al.*, 2003). So kodieren die insgesamt 61 vorhandenen Codons für die 20 in der Natur vorkommenden Aminosäuren. Demnach wird jede Aminosäure von einem (Methionin oder Tryptophan) bis zu sechs Codons (Arginin, Leucin oder Serin) kodiert (Angov, 2011; Gustafsson *et al.*, 2004). Die Bevorzugung bestimmter Codons korreliert mit der Anzahl der spezifischen tRNA-Moleküle im tRNA-Pool der Zelle, die deutlich stärker vertreten sind als tRNA-Moleküle, die seltene Codons erkennen (Andersson & Kurland, 1991; Ikemura, 1985). Die Verwendung unterschiedlicher Codons geht oft einher mit dem unterschiedlichem GC-Gehalt des Genoms (Knight *et al.*, 2001). Zum Beispiel kommt das Codon AGA, welches für die Aminosäure Arginin kodiert, in eukaryotischen Genen häufig vor, während es in *E. coli* besonders selten genutzt wird. Inzwischen wurde ein Algorithmus, der „Codon Adaption Index“, entwickelt, der beschreibt, wie gut die Codons eines heterolog exprimierten Gens mit der *codon usage* des Wirtsorganismus übereinstimmen (Calderone *et al.*, 1996).

Bei der heterologen Expression kann der Vorrat der kognitiven tRNA für seltene Codons schnell erschöpft sein, wenn der Organismus, aus dem das Zielgen stammt, und der Expressionswirt sich in ihrer *codon usage* unterscheiden (Angov *et al.*, 2008; Gustafsson *et al.*, 2004). Folgen sind unter anderem eine Verzögerung während der Elongation der Peptidkette (Zahn, 1996), ein fehlerhafter Einbau von Aminosäuren wie beispielsweise Lysin statt Arginin (Calderone *et al.*, 1996; Forman *et al.*, 1998; McNulty *et al.*, 2003), translationale „Sprünge“ (Kane *et al.*, 1992) sowie Leserasterverschiebungen (McNulty *et al.*, 2003). Diese Beeinträchtigungen während der Proteinbiosynthese führen häufig zu einer niedrigen Akkumulation des Zielproteins (Abb. 3).

In den letzten Jahrzehnten wurden viele Techniken entwickelt, um die Limitierungen des abweichenden Codon-Gebrauchs bei der heterologen Genexpression zu überwinden. Eine übliche Methode ist die *codon harmonization*, bei der die Codon-Sequenz des Zielgens verändert wird, so dass die benötigten Codons den üblichen Codons des Expressionswirts entsprechen, ohne jedoch die Aminosäuresequenz des Proteins zu beeinflussen (Angov, 2011; Gustafsson *et al.*, 2004). Hierfür werden gerichtete Punktmutationen eingeführt, um spezifische Basenpaaraustausche durchzuführen (AGA wird zu CGC), wobei die Aminosäure nicht verändert bzw. durch eine andere ersetzt wird (Calderone *et al.*, 1996; Sørensen & Mortensen, 2005). Bei vielen Codon-Austauschen wird aufgrund des Kosten- und Zeitfaktors auf die komplette Neusynthese des Gens

zurückgegriffen (Gustafsson *et al.*, 2004; Patterson *et al.*, 2005). Am Beispiel des humanen Proteins Troponin T konnte gezeigt werden, dass die *codon harmonization* des Zielgens zu einer verbesserten Genexpression führte (Hu *et al.*, 1996). Weniger gute Ergebnisse hinsichtlich der Expressionseffizienz wurden bei der ATP/ADP-Translokase aus *Rickettsia prowazekii* erzielt, da trotz *codon harmonization* keine Verbesserung der Expressionsausbeute aufgezeigt werden konnte (Alexeyev & Winkler, 1999).

Eine andere Möglichkeit, verbesserte Proteinausbeuten zu erreichen, ist die Koexpression von Genen, die für die kognitiven tRNA der seltenen Codons kodieren (Calderone *et al.*, 1996; McNulty *et al.*, 2003), um damit den intrazellulären tRNA-Pool des Expressionswirts zu entlasten bzw. zu erweitern (Gustafsson *et al.*, 2004). Die tRNA-Expression kann somit zu deutlichen Verbesserungen der Proteinausbeute führen (Calderone *et al.*, 1996; Kane, 1995), birgt jedoch auch klare Nachteile. Die exprimierten tRNA benötigen bestimmte posttranskriptionale Modifikationen (Björk *et al.*, 1987) wie tRNA-Methylierungen, um translationale Fehler wie Leserasterverschiebungen zu vermeiden. Viele synthetisierte tRNA in *E. coli* werden aber nicht ausreichend modifiziert und führen zu Fehlern während der Translation (Gustafsson *et al.*, 2004).

1.2.1.2 Toxische Effekte von Proteinen

Ein weiteres Problem der heterologen Expression ist der potentiell toxische Effekt von Proteinen auf den Zellmetabolismus. Die Synthese toxischer Proteine kann die internen Zellprozesse beeinflussen, so dass dies zum Absterben der Wirtszellen führt oder deutliche Defekte des Zellwachstums hervorruft (Guan *et al.*, 2013). Oft werden Plasmide, die ein toxisches Gen enthalten, in entsprechenden Wirten instabil (Plasmidinstabilität), da viele Promotoren eine basale Expression des Gens ohne vorherige Induktion zulassen (Andersson *et al.*, 1996; Doherty *et al.*, 1993). Auch Proteine, die keine toxische Wirkung auf den Expressionsorganismus haben, können diesen maßgeblich bezüglich seiner Energie-Ressourcen und Biomasseproduktion beeinflussen (Glick, 1995). Die Energie für die Erhaltung und Replikation der Expressionsplasmide sowie die Synthese der heterologen Proteine wird durch den Metabolismus des Wirts bereitgestellt und kann eine Stressantwort in der Zelle hervorrufen (Corchero & Villaverde, 1998; Dragosits *et al.*, 2012). Als Konsequenz der metabolischen Überbelastung sind unter anderem die Verminderung der Wachstumsrate und Produktion der Biomasse sowie die Zerstörung der Ribosomen zu beobachten (Dong *et al.*, 1995). Folge dieser physiologischen Veränderung ist oft eine geringe Ausbeute des Zielproteins (Abb. 3) (Glick, 1995; Hoffmann & Rinas, 2004).

Limitierungen durch toxische Effekte von Proteinen werden mit Hilfe verschiedener Methoden überwunden bzw. reduziert. Eine Möglichkeit, toxische Effekte von Proteinen zu minimieren, ist

der Einsatz von strikt regulierenden Promotoren. Diese unterbinden eine basale Expression vor der Induktor-Zugabe (Saïda *et al.*, 2006) und gewährleisten damit die Produktion einer ausreichenden Menge an Zellmaterial und eine kontrollierte Expression (Weickert & Doherty, 1996).

Das erste publizierte Expressionssystem (T7-RNA-Polymerase und T7-Promotor), das sich aufgrund der geringen basalen Proteinexpression für die Verwendung toxischer Proteine eignet, wurde 1989 von Studier und Moffat beschrieben (Studier & Moffatt, 1986). In den letzten zwei Jahrzehnten wurden viele weitere Expressionssysteme für die Synthese heterologer Proteine entwickelt, die beispielsweise Rhamnose- oder Eisen-abhängige Promotoren verwenden (Giacalone *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2013). Zudem wurde ein selbst reguliertes System, das die Proteinsynthese mit einem stressinduzierten, negativen Feedback-Mechanismus koppelt, vorgestellt (Dragosits *et al.*, 2012). Weitere Möglichkeiten, toxische Effekte durch die Synthese heterologer Proteine zu reduzieren, sind die Nutzung einer geringeren Wachstumstemperatur vor und während der Induktion (Giacalone *et al.*, 2006) sowie eine geringere Konzentrationszugabe des Induktors, um eine bessere metabolische Kontrolle der Expression zu erhalten (Saïda *et al.*, 2006) oder die Verwendung von Inhibitoren der Polymerase, um die basale Genexpression zu reduzieren (Studier, 1991; Wagner & Klepsch, 2008).

1.2.1.3 Bildung von inclusion bodies

Ein Nachteil der heterologen Expression von Genen, insbesondere von Genen, die für Membranproteine kodieren, ist häufig die Fehlfaltung des Zielproteins (Baneyx & Mujacic, 2004; Sabate *et al.*, 2010). Fehlfaltete und aggregierte Proteine werden als Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) bezeichnet. Die Proteine liegen hierbei nicht in ihrer nativen Form vor und können ohne weitere kosten- und zeitintensive Maßnahmen wie Denaturierung und Renaturierung nicht in weiterführenden Studien eingesetzt werden.

Die Bildung von *inclusion bodies* wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Hierbei handelt es sich vor allem um die strukturellen Eigenschaften des Proteins (Murby *et al.*, 1995), den pH-Wert und die Temperatur während der Kultivierung und Expression (Charbonnier *et al.*, 2001) sowie das Expressionslevel des Gens (Strandberg & Enfors, 1991). Membranproteine sind typischerweise in der Cytoplasmamembran (Bakterien) oder der Membran des endoplasmatischen Retikulums (Eukaryoten) lokalisiert (Wagner *et al.*, 2006), so dass die hydrophoben Reste des Proteins mit den Lipiden der Membran wechselwirken. Dabei kann die zur Verfügung stehende Membranoberfläche von *E. coli* eine Limitierung für die Aufnahme von Membranproteinen in die Zellmembran darstellen. So diskutieren zum Beispiel Schlieker *et al.* (2002), ob die Größe der

Proteine bei der Aggregation eine Rolle spielt. Größere Proteine besitzen größere hydrophobe Oberflächen, die möglicherweise schneller zum Aggregieren neigen als kleinere Proteine (Schlieker *et al.*, 2002). Ein weiteres Problem ist die unterschiedliche Insertion von Membranproteinen in Bakterien und Eukaryoten. Rekombinante Proteine werden in bakteriellen Systemen im Cytosol hergestellt und mittels der Sekretions-Maschinerie - bestehend unter anderem aus dem SRP (*signal recognition particle*), dem Sec-Translocon und YidC - richtig gefaltet und in die Zellmembran eingelagert. Es konnte beschrieben werden, dass eine Überlastung des SRP zu einer facettenreichen Antwort in der Zelle führt. Unter anderem konnte eine Inaktivierung der Ribosomen durch den RMF (*ribosome modulation factor*) beobachtet werden, indem die 70S-Ribosomen zu 100S-Ribosomen dimerisieren. Folgen dieser Überlastung sind die Bildung von *inclusion bodies* (Abb. 3), Inhibierung der Translation von SRP-abhängigen und -unabhängigen Proteinen, vermindertes Zellwachstums oder sogar Zelltod (Bürk *et al.*, 2009; Laible *et al.*, 2004).

Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, um die Bildung aggregierter Proteine zu vermeiden. Ein Lösungsansatz ist die Genexpression bei geringeren Temperaturen und unter Einsatz schwacher Promotoren, um der Bildung von *inclusion bodies* vorzubeugen (Nannenga & Baneyx, 2012; Wagner & Klepsch, 2008). Dabei soll die Proteinsynthese herunterreguliert werden, um die metabolischen Systeme des Expressionswirts nicht zu überlasten und im Falle von Membranproteinen eine kontrollierte Inkorporation der Proteine in die Membran herbeizuführen. Von Miroux und Walker wurden zwei neue *E. coli*-Expressionsstämme C43(DE3) und C41(DE3) mit drei Mutationen im Bereich des für die Genexpression der T7-RNA-Polymerase verantwortlichen *lacUV5*-Promotors entwickelt, die durch Herabsetzen des Expressionslevels die Bildung von Einschlusskörperchen verhindern sollen (Miroux & Walker, 1996; Wagner & Klepsch, 2008). Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Assemblierung von Membranproteinen in der Membran ist die Kopplung eines Fusionspartners mit dem rekombinanten Protein. Mystic, ein 13 kDa großes Protein aus *Bacillus subtilis*, konnte als Faltungshelfer der heterologen Gene beschrieben werden (Bernaudat *et al.*, 2011). Dabei ist es, unabhängig davon, ob es allein oder als Fusionspartner exprimiert wird, mit der Membran assoziiert. Mystic interagiert direkt mit dem Translokationskomplex von *E. coli* und hilft bei gleichzeitiger Expression mit dem rekombinanten Membranprotein, dieses in die Membran zu integrieren (Kefala *et al.*, 2007). Die erfolgversprechendste Methode jedoch ist die Koexpression von Faltungshelfern, sogenannten molekularen Chaperonen. Molekulare Chaperone sind eine Klasse von Proteinen, die anderen Proteinen helfen, ihre richtige Konformation und Lokalisation in der Zelle zu erlangen, indem sie Teil des Proteins werden, jedoch ohne die native Proteinstruktur zu verändern (Baneyx, 2004). Die Koexpression der drei Chaperon-Unterklassen (Baneyx & Mujacic, 2004) „folding chaperones“ wie

DnaK oder das GroEL/ES-System (Schlieker *et al.*, 2002), „holding chaperones“ wie IbpA/IbpB (Allen *et al.*, 1992) und „disaggregation chaperones“ wie ClpB (Sørensen & Mortensen, 2005) können die Insertion der Proteine in die Membran verbessern (Sabate *et al.*, 2010; Schlieker *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2006). Jedoch birgt die Koexpression von Chaperonen neben dem rekombinanten Protein ähnliche Nachteile wie bei der Koexpression von Genen, die für tRNA kodieren. Es entsteht ein Energieverlust, der zu einer Blockade des metabolischen Synthesewegs des Wirts führen kann. Nicht alle Chaperone sind gleich gut für die Synthese jedes Proteins geeignet. Die Kombination eines Zielgens mit Chaperonen beruht auf dem „trial-and-error-Prinzip“ (Sabate *et al.*, 2010).

1.2.1.4 Proteindegradation durch Proteasen

Eine weitere Folge der Bildung von aggregierten Proteinen ist die Stressantwort der Zelle bezüglich der Synthese von Hitzeschockproteinen (Allen *et al.*, 1992; Schlieker *et al.*, 2002), Faltungshelfern und Proteasen (Andersson & Kurland, 1991; Dragosits *et al.*, 2012). Die vermehrte Bildung von wirtseigenen Proteasen kann einhergehen mit der Proteolyse des Zielproteins (Harcum & Bentley, 1999; Ramírez & Bentley, 1999; Sørensen & Mortensen, 2005) und verhindert oder reduziert damit dessen Akkumulation (Abb. 3).

Die Proteinausbeute Protease-sensitiver Proteine kann durch Deletionen der wirtsspezifischen Proteasen verbessert werden (Bill *et al.*, 2011; Idiris *et al.*, 2006; Weickert & Doherty, 1996). Protease-defiziente Stämme verhindern den proteolytischen Abbau des Zielproteins, verbessern jedoch nicht die Genexpression.

1.2.1.5 Fehlen von Kofaktoren

Die Synthese komplexer Proteine benötigt oftmals die Anwesenheit von essentiellen Kofaktoren oder prosthetischen Gruppen wie Häm oder Flavin (Abb. 3) (Weickert & Doherty, 1996). Kofaktoren helfen den Proteinen, ihre richtige Struktur auszubilden und stabilisieren zusätzlich ihre Konformation (Opekarová & Tanner, 2003).

Als Beispiel können die P450-Monooxygenasen genannt werden, bei denen es sich um Häm b enthaltende Monooxygenasen handelt. Die prosthetische Gruppe Häm b besteht aus einem Eisenion, welches von einem Porphyrin-Molekül umgeben und nicht kovalent an die Cystein-Reste des Apoproteins gebunden ist (Urlacher & Girhard, 2012). P450-Monooxygenasen katalysieren die Hydroxylierung nicht aktivierter Kohlenwasserstoffe nur in Anwesenheit der gebundenen prosthetischen Gruppe (Urlacher & Girhard, 2012).

Ebenso benötigen viele Membranproteine die Anwesenheit bestimmter Kofaktoren. Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium* ist eine membranintegrierte lichtgesteuerte Protonen-Pumpe, die als Kofaktor Retinal gebunden hat. Das Vitamin A Retinal wird als Chromophor verwendet und ist über einen Lysin-Rest (Lys216) an das Apoprotein gebunden (Deshpande & Sonar, 1999). Der lichtinduzierte Photozyklus von Bakteriorhodopsin kann nur in Anwesenheit des gebundenen Retinals ablaufen (Lanyi, 2004).

Des Weiteren benötigen manche Membranproteine eine bestimmte Lipidzusammensetzung, um funktionell synthetisiert werden zu können (Opekarová & Tanner, 2003). Der eukaryotische Hexose/Protonen-Symporter aus *Chlorella kessleri* ist für den passiven Austausch von Hexosen und Protonen verantwortlich. Es konnte beschrieben werden, dass die Anwesenheit des Lipids Phosphatidylcholin für die Aktivität und Stabilität der Permease eine entscheidende Rolle spielt (Robl *et al.*, 2000).

In prokaryotischen Systemen herrscht oft ein Mangel an bestimmten Kofaktoren, oder bestimmte Lipidzusammensetzungen fehlen ganz. Die Konsequenz daraus ist oft die Bildung von *inclusion bodies* oder inaktivem Protein.

Durch Steigerung der endogenen Produktion oder durch Zugabe dieser Kofaktoren kann die Synthese der rekombinanten Proteine verbessert werden (Weickert & Doherty, 1996). Insbesondere während der Faltung können Kofaktoren wie Ca^{2+} oder Zn^{2+} bestimmte Proteine stabilisieren (Lilie *et al.*, 1998).

1.3 Das phototrophe Bakterium *Rhodobacter capsulatus* als alternativer Expressionswirt

Wie in dem vorangegangenen Kapitel erläutert, geht die Expression rekombinanter Gene oft mit verschiedenen Limitierungen einher, die durch die Optimierung eines Standardexpressionswirts minimiert werden können. Jedoch bewirken diese Ansätze gerade bei komplex aufgebauten Proteinen sowie bei Membranproteinen oft nur eine leichte Verbesserung der Expression und Funktion. Die Expression in einem alternativen Organismus stellt daher oft den besseren Lösungsweg dar. Ein besonderer Vertreter dieser alternativen Expressionswirte ist das phototrophe Bakterium *Rhodobacter capsulatus*.

R. capsulatus ist ein einzelliges, fakultativ anaerobes Nichtschwefel-Purpurbakterium aus der Familie der *Rhodospirillaceae* (Weaver *et al.*, 1975), welches erstmals 1907 beschrieben wurde (Molisch, 1907). Die genauere Einordnung von *R. capsulatus* erfolgt in die Untergruppe der Gram-negativen α -Proteobakterien, die sich durch stäbchenförmige Zellen auszeichnen (Imhoff *et al.*, 1984). Als natürliche Habitate dienen lichtdurchdrungene Schichten in stehenden oder langsam fließenden Gewässern und Seen sowie feuchter Boden und Schlamm (Weaver *et al.*, 1975). Phänotypisch zeichnet sich *R. capsulatus* durch die Bildung einer Polysaccharidkapsel sowie durch eine rote Färbung aus, die durch die Photosynthesekomplexe unter phototrophen Bedingungen hervorgerufen wird (Abb. 4). Die komplette Genomsequenz von *R. capsulatus* konnte 2010 sequenziert werden (Strnad *et al.*, 2010).

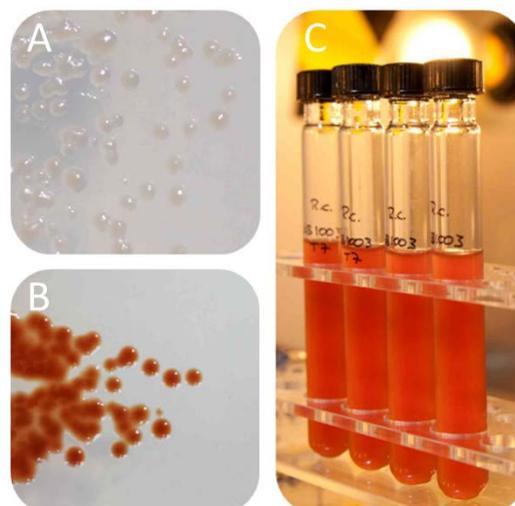


Abb. 4: Kultivierung von *R. capsulatus* auf Agarplatten und in Flüssigkultur

Dargestellt ist die chemotrophe Kultivierung von *R. capsulatus* auf Agarplatten A). Phototroph kultivierte Zellen auf Agar-Platten B) oder in Flüssigkultur C) zeigen aufgrund der Photosynthesekomplex-Bildung eine rötliche Färbung. Fotografien entnommen aus Drepper *et al.*, 2012.

Anoxygenen, phototropen Bakterien wie *R. capsulatus* ist es möglich, verschiedene biochemische Prozesse zu nutzen, um Energie zu generieren. Angepasst an ihre Umgebung können sie von aerober zu anaerober Atmung (McCordle *et al.*, 2005; Zannoni, 1995) oder anoxygener Photosynthese in Abwesenheit von Sauerstoff wechseln (Bauer *et al.*, 2003; Gregor & Klug, 1999).

Der Prozess der anoxygenen Photosynthese wandelt Lichtenergie in einen Protonengradienten um, der zur Synthese von Energieäquivalenten in Form von ATP genutzt wird. In Sekundärreaktionen der Photosynthese wird CO₂ mittels der RuBisCo unter ATP-Verbrauch zum Aufbau von organischen Kohlenstoffverbindungen fixiert (Tabita, 1995). Im Unterschied zu der oxygenen Photosynthese der Pflanzen werden keine Redoxäquivalente und kein Sauerstoff produziert. Diese Art der Energiegewinnung wird ausschließlich unter anaeroben Bedingungen im Licht verwendet, während im Dunkeln und unter aeroben Bedingungen die aerobe Respiration zur Energiegewinnung eingesetzt wird.

Fällt demnach der Sauerstoffgehalt in der Umgebung, wird in phototropen Bakterien die Bildung des Photosyntheseapparats in Anwesenheit, aber auch in Abwesenheit von Licht induziert, die mit einer gleichzeitigen Vergrößerung der Membranfläche einhergeht (Gregor & Klug, 1999; Gubellini *et al.*, 2007; Niederman, 2013; Woronowicz *et al.*, 2013). Diese zusätzlichen Membranstrukturen werden als intracytoplasmatisches Membransystem bezeichnet und beinhalten die neu gebildeten Photosynthesekomplexe (Drews & Golecki, 1995; Drews, 2013; Oelze & Drews, 1972; Tucker *et al.*, 2010). Der Gehalt an Photosynthesekomplexen in den intracytoplasmatischen Membranen ist abhängig von dem Sauerstoffgehalt und der Lichtintensität, denen die Zellen ausgesetzt sind (Drews, 2013; Gregor & Klug, 1999; Woronowicz *et al.*, 2013).

Steigt der Sauerstoffgehalt in der Umgebung an, erfolgt die Energiegewinnung über die aerobe Respiration. Die hierfür benötigten Komplexe der Atmungskette sind in der Cytoplasmamembran lokalisiert, so dass die Synthese eines intracytoplasmatischen Membransystems entfällt und die bereits gebildeten intracytoplasmatischen Membranen degradiert werden (Arai *et al.*, 2008).

In *R. capsulatus* konnte ein Zwei-Komponenten-System RegB/RegA beschrieben werden, das eine zentrale Rolle in der Regulation der Expression der Photosynthesegene einnimmt (Gregor & Klug, 1999; Wu & Bauer, 2008). Es wird postuliert, dass der Redox-Status des Ubiquinon/Ubiquinol-Pools durch die Sensor-Kinase RegB wahrgenommen und dessen konservierte Histidinkinase unter reduzierten Bedingungen autophosphoryliert wird. Die Phosphoryl-Gruppe wird auf den Transkriptionsaktivator RegA übertragen, welcher die Transkription der Photosynthese-Gene induziert (Drews, 2013). RegA kontrolliert dabei die Expression der Photosynthese-Gene für die Lichtsammelkomplexe I/II, das Reaktionszentrum sowie die Bakteriochlorophyllsynthese und die

Carotinoidsynthese. Darüber hinaus ist das RegB/RegA-System an der Regulation der CO₂- als auch an der N₂-Fixierung beteiligt (Elsen *et al.*, 2000; Wu & Bauer, 2008). Der Elektronenfluss entlang der Atmungskette bis zu der Cytochrom-c-Oxygenase und dem Ubiquinon/Ubiquinol-Pool wird dabei durch die Lichtintensität und den Sauerstoffgehalt bestimmt (Drews, 2013).

Es konnte ein zweiter Regulator beschrieben werden, der in Anwesenheit von Sauerstoff für die Inhibierung der Expression der Photosynthesegene verantwortlich ist (Elsen, 1998; Gregor & Klug, 1999). CrtJ ist ein Repressorprotein und reprimiert die Expression verschiedener Gencluster, indem es an die palindromische Promotorsequenz (TGT-N₁₂-ACA) bindet, die den Genclustern für die Bakteriochlorophyllsynthese, der Carotinoidsynthese und der Synthese des Lichtsammelkomplexes II vorgeschaltet ist (Elsen, 1998). Unter oxidierenden Wuchsbedingungen bildet CrtJ zwei intramolekulare Disulfid-Brücken aus, wodurch die DNA-Bindungsaktivität des Repressors stimuliert wird (Bauer *et al.*, 2003).

Eine weitere besondere Eigenschaft von *R. capsulatus* ist es, verschiedene Stickstoffquellen zu nutzen und unter Stickstoffmangelbedingungen atmosphärischen Stickstoff (N₂) zu fixieren und diazotroph zu wachsen (Masepohl and Drepper 2002; Drepper 2003; Masepohl and Hallenbeck 2010). Die Umsetzung von molekularem Stickstoff zu Ammoniak wird entweder durch eine Eisen-Molybdän-(FeMo)-Nitrogenase (Weaver *et al.*, 1975), die von den *nif*-Genen (nitrogen fixation) kodiert wird, oder durch eine Eisen-(Fe)-Nitrogenase (Schneider *et al.*, 1991), welche wiederum von den *anf*-Genen (alternative nitrogen fixation) kodiert wird, katalysiert (Masepohl & Hallenbeck, 2010). Unter Stickstoffmangelbedingungen wird die Expression verschiedener Gene, die an der Synthese der FeMo- und der Fe-Nitrogenase beteiligt sind, durch das NtrB/C-Zwei-Komponenten-System reguliert (Masepohl & Drepper, 2002; Wu & Bauer, 2008). Hierbei wird die Sensor-Kinase NtrB autophosphoryliert und überträgt die Phosphoryl-Gruppe auf den Transkriptionsaktivator NtrC. Phosphoryliertes NtrC bindet an den Ziel-Promotor und aktiviert die Transkription zahlreicher Gene, die in die Stickstoff-Fixierung und -Assimilation involviert sind. Hierzu zählen unter anderem die Gene *nifA1* und *nifA2* (Drepper *et al.*, 2006; Masepohl & Drepper, 2002; Masepohl & Hallenbeck, 2010; Wu & Bauer, 2008) sowie *anfA*, welches jedoch in Anwesenheit von Molybdän reprimiert wird (Drepper, 2003). Die Expression der Transkriptionsaktivatoren NifA1 und NifA2 aktiviert die Expression aller weiteren *nif*-Gene, die an der Bildung der FeMo-Nitrogenase-Komplexe beteiligt sind (Masepohl & Drepper, 2002; Wu & Bauer, 2008).

Die Synthese und Aktivität der FeMo- und Fe-Nitrogenasen wird von den P_{II}-Signaltransduktionsproteinen GlnB/GlnK, deren Expression durch die Phosphorylierung von NtrC aktiviert wird, auf drei Ebenen reguliert.

- 1) Die Aktivität der Sensor-Kinase NtrB wird durch GlnB reguliert, so dass die Phosphorylierung von NtrC und die Transkription der *nif*-Gene in Anwesenheit von Ammonium inhibiert wird (Drepper, 2003).
- 2) Die Inaktivierung von NifA wird in Anwesenheit von Ammonium durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit GlnB und GlnK reguliert.
- 3) Die Dinitrogenasereduktase NifH wird durch Interaktion mit der Dinitrogenase-Reduktase-ADP-Ribosyltransferase DraT, welche durch GlnB und GlnK reguliert wird, in Anwesenheit von Ammonium inaktiviert (Drepper, 2003).

R. capsulatus weist einige physiologische Besonderheiten auf, die möglicherweise für die Synthese von schwer zu synthetisierenden Proteinen wie Membranproteinen genutzt werden können. Die besonderen Vorteile sollen im Nachfolgenden aufgeführt werden.

1.3.1 Bildung von intracytoplasmatischen Membranen

R. capsulatus besitzt die Fähigkeit, unter verschiedenen Umgebungsbedingungen zu wachsen, wobei die phototrophe Anzucht in Abwesenheit von Sauerstoff die bevorzugte Wachstumsbedingung von *R. capsulatus* ist. Einige phototrophe Bakterien wie *R. capsulatus* synthetisieren unter phototrophen Bedingungen ein umfangreiches intracytoplasmatisches Membransystem (Abb. 5) (Oelze & Drews, 1972), um die Membranoberfläche für den Einbau der Photosynthesekomplexe zu vergrößern (Tucker *et al.*, 2010). Dieses intracytoplasmatische Membransystem wird aus der Cytoplasmamembran gebildet und stellt sich in Form von kleinen tubulären Membranstrukturen dar, die letztlich als intrazelluläre Vesikel abgeschnürt werden können (Chory *et al.*, 1984). Die Bildung der intracytoplasmatischen Membranen und ihrer integrierten Photosynthesekomplexe wird durch die phototrophen Wachstumsbedingungen induziert, wobei der Gehalt der Photosynthesekomplexe abhängig von der Lichtintensität und dem Sauerstoffgehalt ist (Drews, 2013; Golecki *et al.*, 1979, 1980; Gubellini *et al.*, 2007). Unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen wird die Induktion der zusätzlichen Membranen aktiviert, während die Ausbildung der ICM unter Bedingungen mit einem hohen Sauerstoffgehalt inhibiert ist (Drews & Golecki, 1995; Gregor & Klug, 1999; Niederman, 2013). Schwachlichtbedingungen führen üblicherweise zu einer starken Induktion der intracytoplasmatischen Membranen, während die Synthese dieser unter Starklichtbedingungen reduziert wird (Adams & Hunter, 2012; Niederman, 2013; Oelze & Drews, 1972). Die Ausbildung des Membransystems kann je nach gewählter Wachstumsbedingung die Membranoberfläche 3-9-fach vergrößern (Drews & Golecki, 1995) und möglicherweise somit für die Einlagerung rekombinanter Membranproteine genutzt werden (Butzin *et al.*, 2010).

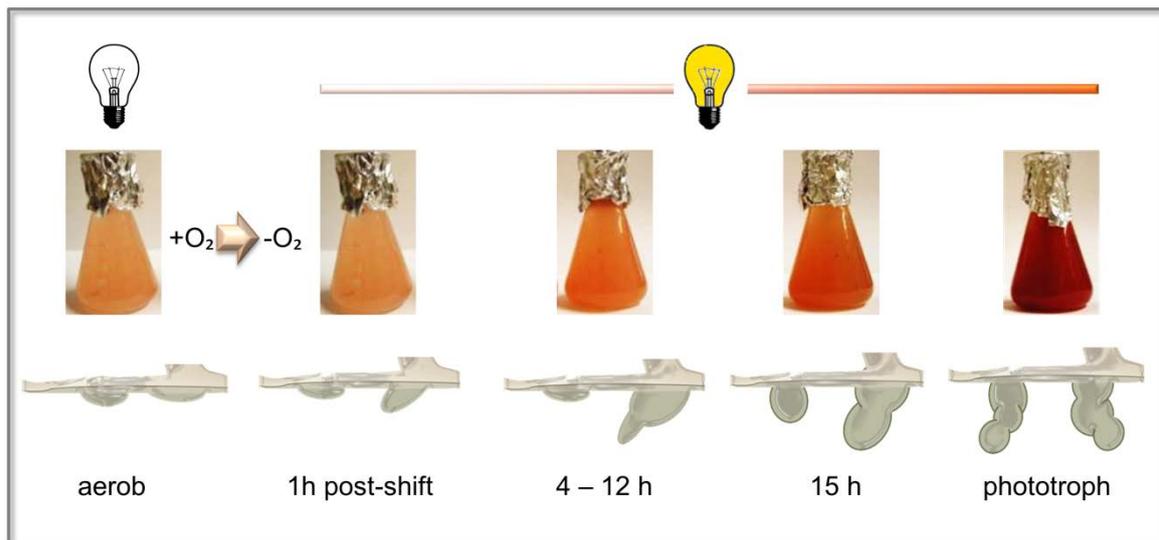


Abb. 5: Ausbildung von intracytoplasmatischen Membranen (ICM) in *R. capsulatus* unter phototrophen Wachstumsbedingungen

Unter aeroben Wachstumsbedingungen im Dunkeln in Anwesenheit von Sauerstoff wächst der Organismus chemoheterotroph und bildet kein intracytoplasmatisches Membransystem aus. Ändern sich die Umgebungsbedingungen durch Absinken des Sauerstoffgehalts und Anwesenheit von Licht, wechselt *R. capsulatus* zu phototrophen Wachstum. Dabei werden intracytoplasmatische Membranen gebildet, die für die Einlagerung der Photosynthesekomplexe genutzt werden. Die in den Photosynthesekomplexen enthaltenden Photopigmente Bakteriochlorophyll *a* sowie die Carotinoide Spheroiden und Spheroidenon färben die Zellen rot-bräunlich. Die Bildung des Membransystems, welches die Membranoberfläche um das 3-9-fache vergrößert, beginnt mit der Ausstülpung der Cytoplasmamembran in längliche, tubuläre Strukturen und endet mit der Abschnürung von „inside-out“-Vesikeln. Fotografien von Achim Heck.

In *Rhodobacter sphaeroides*, dem nächsten Verwandten von *R. capsulatus*, konnte während der Bildung von intracytoplasmatischen Membranen die Akkumulation von sogenannten *membrane assembly factors* beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um die homologen Präproteine der Translokasen YidC, YajC und SecY sowie eine bakterielle Typ1-Peptidase und die Doppel-Arginin-Translokationsuntereinheit Tata. In weiteren Studien konnten die Translokasen SecY SecD und SecF sowie die Chaperone DnaJ und DnaK identifiziert werden (Woronowicz *et al.*, 2013). Diese Proteine sind unter anderem an der Insertion von Membranproteinen in die Lipiddoppelschicht beteiligt. Es wird vermutet, dass die Akkumulation der *membrane assembly factors* initiiert wird, um die Einlagerung der Photosynthesekomplexe in die ICM zu bewerkstelligen (Woronowicz *et al.*, 2013). Möglicherweise können die *membrane assembly factors* auch für die korrekte Faltung der heterologen Membranproteine und deren Einlagerung in die Membran genutzt werden. Durch Modulation der Anzuchtbedingungen können die Bildung der ICM und die Akkumulation verschiedener Translokasen und Chaperone gesteuert werden, was wiederum möglicherweise eine gezielte Einlagerung der heterologen Membranproteine erlaubt.

R. capsulatus eignet sich aufgrund der beschriebenen Eigenschaften als ideales Testsystem, um zu überprüfen, ob die gezielte Steuerung der ICM-Bildung und der Akkumulation der *membrane assembly factors* die heterologe Synthese von Membranproteinen positiv beeinflusst.

1.3.2 Bereitstellung einer speziellen Lipidzusammensetzung

Ein weiteres Problem der heterologen Genexpression ist die unterschiedliche Lipidzusammensetzung in Prokaryoten und Eukaryoten. Manche Membranproteine eukaryotischen Ursprungs benötigen für ihre funktionelle Synthese die Gegenwart bestimmter Lipide. Die wichtigsten Membranlipide phototropher Bakterien sind üblicherweise, wie bei den meisten anderen Bakterien auch, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Cardiolipin (Arondel *et al.*, 1993; Klug & Benning, 2001; Pucheu *et al.*, 1997). Die phototrophen Membranen von *R. capsulatus* enthalten zusätzlich noch eine signifikante Menge eines weiteren Lipids - das Phosphatidylcholin (Russell & Harwood, 1979) -, welches überwiegend in eukaryotischen Systemen vorkommt (Arondel *et al.*, 1993). Nur wenige Bakterien wie *R. capsulatus* oder *R. sphaeroides* sind in der Lage, Phosphatidylcholin über die N-Methylierung von Phosphatidylethanolamin zu synthetisieren (Arondel *et al.*, 1993). Die Anwesenheit von Phosphatidylcholin wird für die richtige Bildung der photosynthetischen Membran benötigt, da es in die Einlagerung mancher Photosynthesekomplexe involviert ist (Kim *et al.*, 2007). Die Lipidzusammensetzung unter photo- und chemotrophen Wuchsbedingungen weicht demnach deutlich voneinander ab, so dass der gezielte Wechsel der Wuchsbedingungen möglicherweise für die erfolgreiche Synthese und Insertion rekombinanter Membranproteine genutzt werden kann. Als Beispiel soll der eukaryotische Hexose/Protonen-Symporter aus *Chlorella kessleri* genannt werden, dessen Stabilität und Aktivität von Phosphatidylcholin abhängig ist (Robl *et al.*, 2000).

Ebenso spielen die Lipopolysaccharide auf der Zellmembran eine wichtige Rolle bei der Produktion von Pharmazeutika und Nahrungsergänzungsmitteln. Die Lipopolysaccharide vieler Gram-negativer Bakterien wie *E. coli* sind pyrogen und können Fieber, Bluthochdruck, Organversagen oder sogar den Tod hervorrufen können (Loppnow *et al.*, 1990). *R. capsulatus* gehört zu den wenigen Gram-negativen Bakterien, denen diese pyrogenen Lipopolysaccharide fehlen (Loppnow *et al.*, 1990) und zeichnet sich daher grundsätzlich ebenfalls als alternativer Wirt für die Synthese von therapeutischen Proteinen für Pharmazeutika aus.

1.3.3 Nutzung von wirtseigenen Kofaktoren

Ein weiterer Vorteil für die Synthese von heterologen Proteinen in *R. capsulatus* ist die wirtseigene Synthese verschiedener Kofaktoren, prothetischen Gruppen sowie Elektronendonoren, die in den meisten anderen Bakterien, wie z.B. *E. coli*, nur in geringen Mengen vorkommen oder gänzlich fehlen (Katzke *et al.*, 2012). Einige Beispiele hierfür sind Eisen-Schwefel-Cluster (Jeong and Jouanneau 2000; Chevallet 2003; Sainz *et al.* 2006), Hämgruppen (De Smet *et al.* 2001; Smart *et al.* 2004), Molybdän-Kofaktoren (Wang *et al.* 1993; Solomon *et al.* 1999), FAD (Nogués *et al.*, 2005) und der Elektronendonor Ferredoxin (Nogués *et al.* 2005; Sainz *et al.* 2006; Bortolotti *et al.* 2009). Die Synthese von Kofaktoren und prothetischen Gruppen ist an die jeweilige Umgebungsbedingung gekoppelt. So werden beispielsweise unter Stickstoff-limitierten Wuchsbedingungen vermehrt Eisen- oder Molybdän-Ionen, die für die Synthese der Nitrogenasen benötigt werden, gebildet. Die chemotrophe Anzucht hingegen fördert die Biosynthese von Häm, welches in den Komplexen der Atmungskette benötigt wird. Durch Modulation der Wuchsbedingungen (photo- oder chemotroph, Stickstoff oder Stickstoff-Limitierung) kann die gezielte Synthese bestimmter Kofaktoren, prothetischer Gruppen oder Elektronendonoren reguliert werden. Proteine, deren Struktur oder Aktivität von bestimmten Kofaktoren abhängt, können so möglicherweise in *R. capsulatus* effizienter synthetisiert werden.

1.4 Das T7-RNA-Polymerase-basierte *R. capsulatus*-Expressionssystem

R. capsulatus eignet sich aufgrund der in den vorherigen Kapiteln beschriebenen physiologischen Eigenschaften als alternativer Expressionswirt für die heterologe Genexpression. Um eine effiziente heterologe Genexpression unter phototrophen und chemotrophen Wachstumsbedingungen zu erzielen, wurde der Expressionsstamm *R. capsulatus* B10ST7 mit dem dazugehörigen Expressionsvektor pRhotHi-2 erzeugt (Abb. 6) (Katzke *et al.*, 2010).

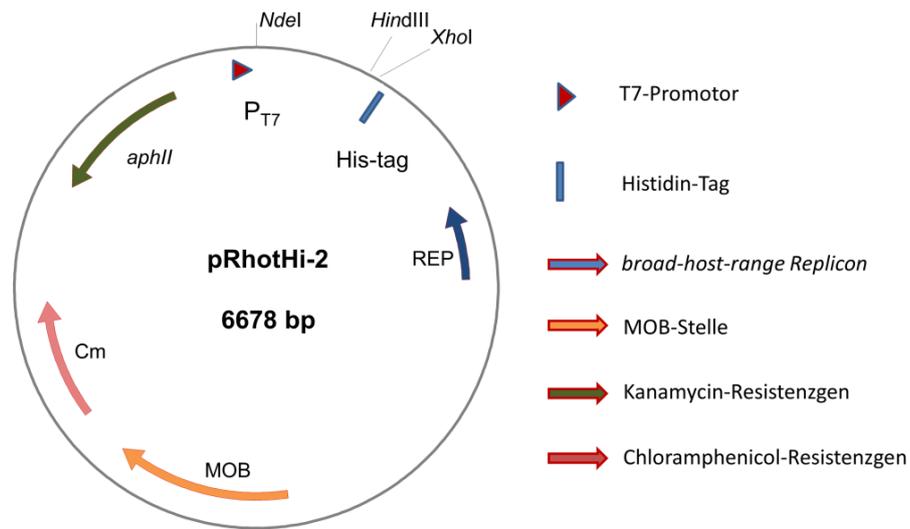


Abb. 6: Plasmidkarte des pRhotHi-2-Expressionsvektors

Der Vektor beinhaltet unter anderem den T7-Promotor, eine His-Tag kodierende Sequenz, das *broad host range Replicon* (REP), die MOB-Sequenz sowie die Resistenzgene gegen die Antibiotika Chloramphenicol (Cm) und Kanamycin (*aphII*). Die Richtung der Pfeile gibt die Orientierung der Gene bez. des Promotors an.

Die Konstruktion des Expressionsstamms *R. capsulatus* B10ST7 erfolgte, indem die T7-RNA-Polymerase kodierenden Gene unter der Kontrolle des P_{fru}-Promotors in das Genom integriert wurden (Katzke *et al.*, 2010). Der zugehörige Expressionsvektor pRhotHi-2 wurde auf Grundlage des Vektors pBBR22b (Rosenau & Jaeger, 2004), welcher aus Teilen des *broad host range* Vektors pBBR1MCS (M E Kovach, 1994) und des *E. coli*-T7-Expressionvektors pET22b (Novagen) besteht, entwickelt. Dies ermöglicht die Nutzung des pRhotHi2-Vektors auch in anderen Expressionswirten wie *E. coli* oder *Pseudomonas putida*. Die Expression des Zielgens steht unter der Kontrolle des T7-Promotors aus dem Bakteriophagen T7. Weitere Merkmale des Expressionsplasmids sind eine His₆-Tag kodierende Sequenz, die für die Identifizierung und Aufreinigung des Zielproteins genutzt werden kann, das *broad host range Replicon* (REP), welches die Plasmidstabilität in vielen Gram-negativen Bakterien ermöglicht, die MOB-Stelle, die den konjugationalen Transfer in den

Expressionswirt ermöglicht sowie Gene, die Resistenzen gegen die Antibiotika Kanamycin und Chloramphenicol vermitteln (Katzke *et al.*, 2010).

Die Charakterisierung des T7-Expressionssystems erfolgte mit dem löslichen Protein YFP (*yellow fluorescent protein*) aus *Aequorea victoria*. Es konnte gezeigt werden, dass YFP in *R. capsulatus* in signifikanten Mengen synthetisiert wurde. Die Expression des Zielgens ließ sich durch die Anzuchtbedingungen phototroph und chemotroph modulieren. So konnte beobachtet werden, dass die Expression von YFP unter phototrophen (80 mg/L Kultur) im Vergleich zu chemotrophen (30 mg/L Kultur) Wuchsbedingungen eine 2-3-fach höhere Proteinausbeute erzielte. Die synthetisierten Proteinmengen sind damit durchaus mit denen in *E. coli* (100 mg/L Kultur) vergleichbar (Katzke, 2010). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass neben dem löslichen Modellprotein YFP auch das Hydrogenase-Gencluster aus *R. capsulatus* homolog (Arvani *et al.*, 2012) und das Carotionoid-Biosynthese-Gencluster aus *Pantoea ananatis* heterolog (Loeschcke *et al.*, 2013) in *R. capsulatus* exprimiert werden konnte.

Die Charakterisierung des Expressionssystems ergab somit, dass das phototrophe Bakterium *R. capsulatus* als alternativer Expressionswirt für die Synthese löslicher heterologer Proteine, aber auch kompletter Gencluster geeignet ist.

1.5 Zielsetzung

Die Identifizierung und funktionelle Synthese von Proteinen ist ein wichtiger Bestandteil der biotechnologischen und medizinischen Forschung. Da Proteine in ihrem jeweiligen Ursprungswirt oft nur in geringen Mengen synthetisiert und isoliert werden können, erfolgt die Proteinproduktion in der Regel in einem heterologen Expressionswirt wie *E. coli*.

Jedoch wird die heterologe Expression von Proteinen, insbesondere von Membranproteinen, im Standard-Expressionswirt *E. coli* häufig durch verschiedene Faktoren wie beispielsweise ein geringes Expressionslevel, Bildung von *inclusion bodies* oder geringe Membranoberflächen zur Aufnahme des heterologen Zielproteins erschwert. Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, ist die Nutzung eines alternativen Expressionswirts, wie des phototrophen Bakteriums *R. capsulatus*. Um eine effiziente heterologe Expression von löslichen Proteinen in diesem Wirt zu ermöglichen, wurde der rekombinante Expressionsstamm *R. capsulatus* B10ST7 mit dem dazugehörigen Expressionsvektor pRhotHi-2 erzeugt (Katzke *et al.*, 2010), der die Expression des Zielgens mittels der T7-RNA-Polymerase ermöglicht. Bisher wurde das alternative Expressionssystem noch nicht systematisch für die funktionelle Expression von Membranproteinen evaluiert. Dabei weist das fakultativ phototrophe Bakterium unter photosynthetischen Wuchsbedingungen viele besondere physiologische Eigenschaften - wie etwa die Bildung eines intracytoplasmatischen Membransystems – auf, die für die Überexpression, Faltung und Insertion von Membranproteinen Vorteile bieten könnten. Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die weitere Charakterisierung des Expressionswirts *R. capsulatus*. Dabei sollen die folgenden Aspekte eingehend untersucht werden:

- 1) Mithilfe von vergleichenden aktivitätsbasierten Expressionsstudien soll untersucht werden, inwieweit verschiedene Lipase- und Esterasegene aus Metagenombanken in unterschiedlichen bakteriellen Expressionswirten dargestellt werden können. Hierfür soll die Akkumulation von sechs Hydrolasegenen metagenomischen Ursprungs in den Wirtsorganismen *E. coli*, *Pseudomonas putida* und *R. capsulatus* untersucht werden und anschließend eine quantitative Aussage über deren Aktivität getroffen werden.
- 2) Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit soll die Eignung von *R. capsulatus* für die funktionelle Synthese von Membranproteinen und die mögliche Einlagerung der rekombinanten Proteine in das intracytoplasmatische Membransystem und der damit einhergehenden möglichen Veränderung der Zellphysiologie untersucht werden. Hierfür werden die Proteinakkumulation und Lokalisation der drei Membranproteine CYP175A1 aus *Thermus thermophilus*, Squalenepoxidase aus *Stigmatella aurantiaca* und Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium* in *R. capsulatus* untersucht.

3) Im letzten Teil der Arbeit soll außerdem die lichtabhängige Regulation eines *nif*-Promotor-basierten Expressionssystems in *R. capsulatus* untersucht werden. Die Charakterisierung des *nif*-Promotor-basierten *R. capsulatus*-Expressionssystems erfolgt mit dem Membranprotein Bakteriorhodopsin und dem löslichen Protein YFP (*yellow fluorescent protein*) unter Illumination verschiedener Lichtqualitäten.

Die durch diese Studien erzielten Ergebnisse sollen so dazu beitragen, ein umfassenderes Bild von *R. capsulatus* als alternativen Expressionswirt zu erlangen und individuelle Vor- und Nachteile des neuartigen Expressionssystems zu beschreiben.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Stämme

| Organismus | Stamm | Relevante Eigenschaften | Referenz |
|-------------------------------|--------------|---|-------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | DH5 α | F ⁻ , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , [Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15], <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , (<i>res</i> ⁻ , <i>mod</i> ⁺), <i>deoR</i> | (Hanahan, 1983) |
| | BL21(DE3) | F' <i>ompT hsdSb</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) | (Studier & Moffatt, 1986) |
| | S17-I | Ec294:: <i>[RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)]</i> , <i>pro</i> , <i>res</i> , <i>recA</i> , <i>TpR</i> , <i>SmR</i> | (Simon <i>et al.</i> , 1986) |
| <i>Rhodobacter capsulatus</i> | B10S | Spontane Sm-resistente <i>R. capsulatus</i> -Mutante | (Klipp <i>et al.</i> , 1988) |
| | B10S-T7 | <i>R. capsulatus</i> B10S mit <i>recA</i> ::(<i>P</i> _{fru} > <i>T7Pol</i> Gm ^R) | (Katzke <i>et al.</i> , 2010) |
| <i>Pseudomonas putida</i> | KT2440-T7 | <i>P. putida</i> KT2440 mit <i>Gal</i> λ Gm ^R (DE3) | (Knops, 2008) |

2.1.2 Vektoren

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Plasmide

| Plasmide | Relevante Eigenschaften | Referenz/Herkunft |
|-----------|---|-------------------------------|
| pRhotHi-2 | pBBR1-MCS-Derivat, Polylinker aus pET22b, Km ^R (<i>aphII</i> Orientierung II), Cm ^R ; <i>aphII</i> Orientierung II, MOB, His ₆ -Tag | (Katzke <i>et al.</i> , 2010) |
| pRhonHi-2 | pBBR1-MCS-Derivat, Polylinker aus pET22b, Cm ^R ; <i>Pnif</i> , MCS (pET22b) | (Özgür, unveröffentlicht) |

Tab. 3: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide

| Rekombinante Plasmide | Relevante Eigenschaften | Referenz/Herkunft |
|----------------------------|--|-----------------------------------|
| pRhotHi-2- <i>lipS</i> | 842 bp Fragment (<i>NdeI-lipS-HindIII</i>) in <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II | (diese Arbeit und Heinrich, 2012) |
| pRhotHi-2- <i>lipT</i> | 1007 bp Fragment (<i>NdeI-lipT-HindIII</i>) in <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II | (diese Arbeit und Heinrich, 2012) |
| pRhotHi-2- <i>est5E5</i> | 1385 bp Fragment (<i>NdeI-est5E5-HindIII</i>) in <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II | (diese Arbeit und Heinrich, 2012) |
| pRhotHi-2- <i>lipA8b2</i> | 1250 bp Fragment (<i>NdeI-lipA8b2-HindIII</i>) in <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II | (diese Arbeit und Heinrich, 2012) |
| pRhotHi-2- <i>estA3</i> | 1190 bp Fragment (<i>NdeI-estA3-HindIII</i>) in <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II | (diese Arbeit und Heinrich, 2012) |
| pRhotHi-2- <i>lipC5</i> | 959 bp Fragment (<i>NdeI-lipC5-HindIII</i>) in <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II | (diese Arbeit und Heinrich, 2012) |
| pRhotHi-2- <i>bR</i> | 788 bp Fragment (<i>NdeI-bR-XhoI</i>) in <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II | (Bernds, 2006) |
| pRhotHi-2- <i>sqep</i> | 1382 bp Fragment (<i>NdeI-sqep-XhoI</i>) in <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II | (Kucz, 2005) |
| pRhotHi-2- <i>cyp175a1</i> | 1169 bp Fragment (<i>NdeI-cyp175a1-HindIII</i>) in <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II | diese Arbeit |
| pRhotHi-2- <i>bR</i> | 788 bp Fragment (<i>NdeI-bR-XhoI</i>) in <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II | diese Arbeit |
| pRhotHi-2- <i>yfp</i> | 716 bp Fragment (<i>NdeI-yfp-XhoI</i>) in <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> von pRhotHi-2; Expressionsvektor; <i>aphII</i> Orientierung II | (Özgür, unveröffentlicht) |

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten PCR-Startermoleküle (Primer) wurden von Eurofins MWG Operon bezogen.

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Primer für PCR

Die eingefügten Schnittstellen sind unterstrichen.

| Name | Sequenz (5'→3') | T _m (°C) | Länge (bp) | Verwendung |
|-----------------|--|---------------------|------------|---|
| <i>Pnif</i> -fw | AATCGCTAGCTCCCGACAGAG GG | 62,5 | 23 | Forward Primer zur Amplifikation des Gens <i>nifH</i> |
| <i>Pnif</i> -rv | CGATTCTAGACGGCCAGGTGC A | 61,3 | 22 | Reverse Primer zur Amplifikation des Gens <i>nifH</i> |
| LipA8b2-fw | ATAGGGTGCATATGATGAAA GGCTGTGGGCTGATGG | 71,0 | 36 | Forward Primer zur Amplifikation des Gens <i>lipa8b2</i> |
| LipA8b2-rv | ACTGTTAAGCTTAGGCCGCAA GCTCGCCAGTTG | 72,0 | 33 | Reverse Primer zur Amplifikation des Gens <i>lipa8b2</i> |
| EstA3-fw | ATAGGGTGCATATGAGCGCC GAAGAACTAGGGT | 70,7 | 33 | Forward Primer zur Amplifikation des Gens <i>esta3</i> |
| EstA3-rv | TATTGAAAGCTTGCGGCGA GCGCGCTGTAGAT | 72,0 | 33 | Reverse Primer zur Amplifikation des Gens <i>esta3</i> |
| LipC5-fw | ATCATCGTCATATGGCGTCAC TTGCTGCAAAAA | 67,0 | 33 | Forward Primer zur Amplifikation des Gens <i>lipC5</i> |
| LipC5-rv | GATTCAAAGCTTTGCAACAGC CTCCTGCGT | 68,1 | 30 | Reverse Primer zur Amplifikation des Gens <i>lipC5</i> |
| CYP175A1-fw | CATATGAAGCGCCTTCCCTG AGGGAGGCCTGG | 69 | 33 | Forward Primer zur Amplifikation des Gens <i>cyp175a1</i> |
| CYP175A1-rv | AAGCTTCGCCCGCACCTCCTC CCTAGG | 67 | 27 | Reverse Primer zur Amplifikation des Gens <i>cyp175a1</i> |

2.1.4 Nährmedien und Zusätze

Alle Nährmedien und steril zu verwendenden Zusätze wurden 20 min bei 200 kPa und 121 °C autoklaviert, sofern nicht anders angegeben. Hitzelabile Komponenten wie z.B. Antibiotika oder IPTG wurden stattdessen sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter, Porendurchmesser 0,2 µm) und dem Medium nachträglich bei handwarmer Temperatur zugesetzt.

2.1.4.1 *E. coli*-Medien

LB-Vollmedium (Sambrook & Russell, 1989)

| | |
|-------------|------------|
| Trypton | 10 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| A. dest. | ad 1000 ml |

LB-Agar

| | |
|-------------|------------|
| Trypton | 10 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar | 15 g |
| A. dest. | ad 1000 ml |

2.1.4.2 *R. capsulatus*-Medien

PY-Flüssigmedium (Sambrook & Russell, 1989)

| | |
|--------------|------------|
| Bacto Pepton | 10 g |
| Hefeextrakt | 0,5 g |
| A. dest. | ad 1000 ml |

Nach dem Autoklavieren wurden dem PY-Agar noch folgende Zusätze, welche separat autoklaviert wurden, hinzugefügt:

| | |
|--------------------------------|--------|
| 1 M MgCl ₂ | 2,0 ml |
| 1 M CaCl ₂ | 2,0 ml |
| 0,5 % FeSO ₄ (s.u.) | 2,4 ml |

PY-Agar

| | |
|--------------|------------|
| Bacto Pepton | 10 g |
| Hefeextrakt | 0,5 g |
| Agar | 15 g |
| A. dest. | ad 1000 ml |

Nach dem Autoklavieren wurden dem PY-Agar noch folgende Zusätze, welche separat autoklaviert wurden, hinzugefügt:

| | |
|--------------------------------|--------|
| 1 M MgCl ₂ | 2,0 ml |
| 1 M CaCl ₂ | 2,0 ml |
| 0,5 % FeSO ₄ (s.u.) | 2,4 ml |

R. capsulatus RCV-Minimalmedium (Weaver et al., 1975)

| | |
|--------------------------------|-----------|
| 10 % DL-Malat (pH 6,8) | 40 ml |
| 1 % EDTA | 2 ml |
| 20 % MgSO ₄ | 1 ml |
| Spurenelemente-Lösung (s.u.) | 1 ml |
| 7,5 % CaCl ₂ | 1 ml |
| 0,5 % FeSO ₄ (s.u.) | 2,4 ml |
| 0,1 % Thiamin | 1 ml |
| 1 M Phosphatpuffer, pH 6,8 | 9,6 ml |
| A. dest. | ad 990 ml |

Der Phosphatpuffer wurde sterilfiltriert und dem handwarmen Medium nach dem Autoklavieren hinzugefügt. Das RCV-Minimalmedium kann mit zwei unterschiedlichen Stickstoffquellen

verwendet werden. Ammoniumhaltigen RCV-Medium wurden 10 ml steriles $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10 % w/v) hinzugegeben. Serinhaltigen RCV-Medium wurden 10 ml steriles Serin (10 % w/v) hinzugegeben.

0,5 %-ige FeSO_4 -Lösung für RCV und Py-Medium (200 ml):

| | |
|-----------------|--------------|
| FeSO_4 | 0,50 % (w/v) |
| HCl (32 %) | 1 ml |

Phosphatpuffer (pH 6,8) für RCV-Medium (500 ml):

| | |
|--------------------------|--------|
| KH_2PO_4 | 81,3 g |
| K_2HPO_4 | 78,7 g |

Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt und anschließend sterilfiltriert.

Spurenelement-Lösung für RCV (250 ml):

| | |
|--|--------|
| $\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$ | 0,4 g |
| H_3BO_3 | 0,7 g |
| $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ | 0,01 g |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 0,06 g |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ | 0,02 g |

2.1.4.3 Medien und Lösungen für den Nachweis lipolytischer und esterolytischer Aktivität

Tributyryn Agar (250 ml):

| | |
|-------------|--------|
| LB-/PY-Agar | 250 ml |
|-------------|--------|

Die folgenden Lösungen wurden dem handwarmen Medium hinzugefügt und anschließend homogenisiert.

| | |
|-------------------------|---------|
| Tributyryn | 3,75 ml |
| Gummi arabicum | 0,375 g |
| Phenolrot-Lösung (s.u.) | 2 ml |

Rhodamin B-Agar (250 ml) (Kouker & Jaeger, 1987)

LB-/Py-Agar 250 ml

Die folgenden Lösungen wurden dem handwarmen Medium hinzugefügt und anschließend homogenisiert.

Olivenöl 5 ml

Gummi arabicum 0,375 g

Rhodamin B-Lösung 2,5 ml

Phenolrot-Lösung (20 ml):

Phenolrot 0,6 mg

20 %-ige MgSO₄-Lösung 123,4 µl

A. dest. ad 20 ml

Rhodamin B-Lösung:

Rhodamin B 1 mg/ml in Milli-Q-Wasser

2.1.5 Antibiotika

Alle Antibiotika wurden sterilfiltriert.

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Antibiotika

| Antibiotika | Konzentration in LB-Medien [µg/ml] | Konzentration in PY-Medien [µg/ml] | Konzentration in RCV-Medien [µg/ml] |
|--------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Ampicillin | 100 | - | - |
| Kanamycin | 50 | 50 | 25 |
| Streptomycin | - | 200 | 200 |
| Gentamycin | - | 4 | 4 |

| | |
|--|----------------|
| Ethidiumbromid | Sigma |
| Fructose | Merck |
| Glycerol | Riedel de Haën |
| Hefeextrakt | Gibco BRL |
| Isopropyl- β -D-Thiogalactosid, IPTG | Biomol |
| Kaliumacetat | Merck |
| Kaliumchlorid | Roth |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck |
| Kanamycin | Serva |
| Kupfernitratt-Trihydrat | Merck |
| Laktose | Roth |
| LB-Medium | Roth |
| L-Glycin | Roth |
| L-Serin | Calbiochem |
| Magermilchpulver | Merck |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat | Calbiochem |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | Merck |
| Manganchlorid | Merck |
| Mangansulfat-Hydrat | Merck |
| β -Mercaptoethanol | Sigma |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, TEMED | Roth |
| Natrimdodecylsulfat, SDS | Roth |
| Natriumformiat | Merck |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck |
| Natriumhydroxid | Roth |
| Natriummolybdat-Dihydrat | Merck |
| Pepton | BD |
| <i>p</i> -Nitrophenylcaproat, <i>p</i> NPC | TCI-Europe |
| Polyethylenglycol, PEG | Roth |

| | |
|---|--------|
| Polyoxyethylensorbitolmonolaurat, Tween | Roth |
| Rubidiumchlorid | Sigma |
| Saccharose | Roth |
| Salzsäure, HCl | Roth |
| Streptomycin | Sigma |
| Tetracyclin | Serva |
| Thiamin | Sigma |
| Trishydroxymethylaminomethan, Tris | Biomol |
| Trypton | Sigma |
| Zinksulfat-Heptahydrat | Merck |

Alle verwendeten Chemikalien wurden in analytischer Qualität von den angegebenen Firmen bezogen. Allgemeine, nicht aufgelistete Chemikalien wurden von den Firmen Sigma, Roth, Merck Serva und Calbiochem bezogen.

Tab. 7: Übersicht der verwendeten Detergenzien

| Detergenz | Bezugsfirma | Eigenschaft |
|----------------------------------|--------------|----------------|
| Chaps | Roth | zwitterionisch |
| Fos-Choline12 | Thermosience | zwitterionisch |
| Fos-Choline16 | Thermosience | zwitterionisch |
| Natriumdodecylsulfat | Roth | anionisch |
| n-Octyl- β -glucopyranosid | Roth | nicht-ionisch |
| Triton X-100 | Roth | nicht-ionisch |

2.1.7 Puffer und Lösungen

2.1.7.1 Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer 5-fach (pH 8,3):

| | |
|-----------------------|--------|
| Tris-HCl | 89 mM |
| Borsäure | 89 mM |
| Na ₂ -EDTA | 2,5 mM |

DNA-Probenpuffer (5-fach):

| | |
|-----------------------|--------------|
| Na ₂ -EDTA | 100 mM |
| Glycerol | 43 % (v/v) |
| Bromphenolblau | 0,05 % (w/v) |

DNA-Molekulargewichtsstandards:

Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder, ready to use (Fermentas): kb 10,0 - 8,0 - **6,0** - 5,0 - 4,0 - 3,5 - **3,0** - 2,5 - 2,0 - 1,5 - **1,0** - 0,75 - 0,5 - 0,25

Zur besseren Orientierung heben sich die Banden bei 6000, 3000 und 1000 bp im Agarosegel durch eine höhere DNA-Konzentration von den anderen Banden ab.

2.1.7.2 Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

MgCl₂-Lösung:

| | |
|-------------------|--------|
| MgCl ₂ | 100 mM |
|-------------------|--------|

CaCl₂-Lösung:

| | |
|-------------------|--------|
| CaCl ₂ | 100 mM |
|-------------------|--------|

Glycerol-Lösung:

| | |
|----------|------------|
| Glycerol | 89 % (v/v) |
|----------|------------|

2.1.7.3 Puffer und Lösungen zur Proteinisolierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Aufschlusspuffer

| | |
|---------------------------------|--------|
| K ₂ HPO ₄ | 40 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 22 mM |
| NaCl | 150 mM |

Dem Aufschlusspuffer wurde der Proteaseinhibitor Complete EDTA-frei hinzugegeben.

SDS-Proenpuffer (pH 6,8):

| | |
|----------------------|---------|
| 4-fach Sammelpuffer | 1,25 ml |
| 87 % Glycerol | 1,2 ml |
| 10 % SDS | 3 ml |
| β-Mercaptoethanol | 0,5 ml |
| 0,5 % Bromphenolblau | 0,6 ml |
| A. dest. | 2,65 ml |

Protein-Größenstandard

Precision Plus Protein Dual Color Standard (BioRad)

250; 150; 100; **75**; 50; 37; **25**; 20; 15; 10 kDa

Zur besseren Orientierung sind die 75 und 25 kDa-Banden rot gefärbt. Die 75 kDa-Bande zeigt zusätzlich ein Chemilumineszenzsignal.

XCell Sure Lock Systems der Firma Invitrogen

1-fach NuPAGE SDS-Laufpuffer:

| | |
|-------------------------------------|------------|
| NuPAGE SDS Running Buffer (20-fach) | 50 ml |
| A. dest. | ad 1000 ml |

2.1.7.4 Puffer und Lösungen für das Immunoblotting (*Western Blot*)1-fach NuPAGE SDS-Transferpuffer:

| | |
|----------------------------------|------------|
| NuPAGE Transfer Buffer (20-fach) | 50 ml |
| A. dest. | ad 1000 ml |

20-fach TBS-Puffer (pH 8,0):

| | |
|------|--------|
| Tris | 25 mM |
| NaCl | 150 mM |
| KCl | 3 mM |

TBST-Puffer:

| | |
|--------------------|-------------|
| 20-fach TBS (s.o.) | 50 ml |
| A. dest. | 950 ml |
| Tween 20 | 0,2 % (v/v) |

Blockierlösung:

TBST + 2 % Milchpulver

2.1.7.5 Puffer und Lösungen für die Bestimmung der Enzymaktivität von Lipasen und Esterasen mit Hilfe des Substrats *p*-Nitrophenylcaproat (*p*NPC)Pufferlösung (0,1 M KPI pH 7,2 + 10 mM MgSO₄) (1000 ml):

| | |
|--|---------|
| KH ₂ PO ₄ | 12,63 g |
| K ₂ HPO ₄ | 3,72 g |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 2,46 g |

Substratlösung:

| | |
|--------------|-------|
| <i>p</i> NPC | 25 µl |
|--------------|-------|

Das *p*NPC wurde in 5 ml Ethanol (abs.) gelöst. Bei -20 °C gelagert ist die Lösung stabil.

2.1.8 Geräte und sonstige Materialien

Tab. 8: Übersicht der verwendeten Geräte

| Geräte | Hersteller |
|--|------------|
| BioPhotometer | Eppendorf |
| Dokumentationssystem für Agarosegelelektrophorese (Eagle Eye II) | Stratagene |
| Dokumentationssystem für Westernblots (STELLA) | Raytest |
| Elektrophoresekammer XCell SureLock™ Elektrophoresis Cell | Invitrogen |
| MicroPulser | Bio-Rad |
| PCR-Cycler | Biometra |
| Thermoblock Thermomixer Comfort | Eppendorf |

Die hier nicht aufgeführten Geräte entsprechen den üblichen Laborstandards.

Tab. 9: Übersicht sonstiger Materialien

| Materialien | Hersteller |
|-----------------------------------|---------------------|
| 4-12 % Bis-Tris-NuPAGE-Fertiggele | Invitrogen |
| Cellulose-Acetat-Filter, 0,2 µm | Schleicher & Schüll |
| Microbiology Anaerocult A | Merck |
| PVDF-Membran | Biorad |

Tab. 10: Übersicht der verwendeten Software

| Software | Hersteller |
|------------------------|-----------------------------------|
| AIDA | Raytest |
| AxioVision | Carl Zeiss |
| Clone-Manager 9.2 | Scientific & Educational Software |
| Mendeley Desktop 1.8.1 | Mendeley |

Tab. 11: Übersicht der verwendeten internetbasierten Programme

| Internetbasierte Programme | Referenz |
|----------------------------|--|
| HMMTOP | (Tusnady & Simon, 2001) |
| MEMSAT | (Jones <i>et al.</i> , 1994) |
| PRED-TMR | (Pasquier <i>et al.</i> , 1999) |
| SOSUI | (Hirokawa <i>et al.</i> , 1998) |
| SPLIT | (Juretic <i>et al.</i> , 1999) |
| TMHMM | (Krogh <i>et al.</i> , 2001) |
| TMPred | (Hofman & Stoffel, 1993) |
| Toppred | (von Heijne, 1992) |
| SignalP 4.0 | (Petersen <i>et al.</i> , 2011) |
| Pymol | The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC |

Tab. 12: Übersicht der verwendeten Kits

| Reaktions- und Nachweis-„Kits“ | Hersteller |
|---------------------------------|---------------|
| innuPrep DOUBLEpure Kit | Analytik Jena |
| peqGold Plasmid Miniprep Kit II | Peqlab |
| Phusion Polymerase Kit | Finnzymes |

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Anzucht von *R. capsulatus*

2.2.2 Anzucht auf Festmedium

Die Kultivierung von *R. capsulatus* auf Festmedium erfolgte auf PY-Agar-Platten (2.1.4.2) mit dementsprechend zugesetzten Antibiotikum. Die ausgestrichenen Platten wurden in speziellen Anaerob-Inkubationstöpfen unter Verwendung von „Gas Packs“ (Microbiology Anaerocult A, Merck) im Starklicht bei 30 °C für drei Tage inkubiert. Als Lichtquelle dienten bei allen anaeroben Kulturen von *R. capsulatus* sechs Glühbirnen à 60 W (Firma Osram, ca. 2500 Lux).

2.2.2.1 Photoheterotrophe Anzucht unter Starklichtbedingungen

(nach Klipp et al., 1988)

R. capsulatus wurde standardmäßig anaerob unter photoheterotrophen Bedingungen angezogen. Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte unter Selektionsdruck in gasdicht verschließbaren Röhrchen („Hungates“, Volumina bis 15 ml), gefüllt mit RCV-Flüssigmedium (2.1.4.2). Als Kohlenstoffquelle wurde Malat verwendet. Ammonium oder Serin wurden als Stickstoffquelle hinzugefügt. Die Vorkulturen wurden mit einer kleinen Menge Zellen von einer PY-Agarplatte (2.1.4.2) in das Medium überführt. Die Gefäße wurden luftdicht verschlossen und 5-10 Minuten mit Argon begast, um den Sauerstoff aus dem Totvolumen zu entfernen. Die Inkubation erfolgte über 3 Tage bei 30 °C im Starklicht. Phototrophe Hauptkulturen von *R. capsulatus* wurden unter Selektionsdruck in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben, welcher mit 100 ml RCV-Flüssigmedium gefüllt war, mit einer Start-OD_{660nm} von 0,05 inokuliert. Die Kolben wurden anschließend mit einem Gummistopfen (Septum) gasdicht verschlossen und durch das Septum für 5-10 min mit Argon begast.

Die Induktion der Expression T7-Promoter-kontrollierter Gene im Expressionsplasmid pRhotHi-2 in *R. capsulatus* B10ST7 erfolgte mit 8 mM Fructose zum Zeitpunkt der Inokulation (Katzke et al., 2010). Die Induktion der Expression *nif*-Promoter-kontrollierter Gene im Expressionsplasmid pRhoHi-2 in *R. capsulatus* B10S erfolgte ohne die Zugabe eines Induktors. Die Kulturen wurden je nach Versuchsverlauf für 3-10 Tage bei 30 °C inkubiert. Als Lichtquellen wurden entweder sechs 60 W-Glühbirnen (Firma Osram, ca. 2500 lux) oder Leuchtdioden (Firma Insta GmbH/Osram/Nichia) verwendet. Die Probenentnahme erfolgte in der exponentiellen Phase bei einer OD_{660nm} = 1 und in der stationären Phase nach 96 h.

2.2.2.2 Chemoheterotrophe Anzucht im Dunkeln

R. capsulatus kann neben der phototrophen Anzucht auch unter aeroben Bedingungen im Dunkeln wachsen. Die aeroben Vorkulturen wurden in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben, gefüllt mit 20 ml RCV-Flüssigmedium (2.1.4.2), mit einer kleinen Menge Zellen von einer PY-Agarplatte (2.1.4.2) inokuliert. Als Kohlenstoffquelle wurde Malat verwendet. Ammonium oder Serin wurden als Stickstoffquelle hinzugefügt. Zur Vermeidung von Lichteinstrahlung und damit einhergehender ROS-Entwicklung wurden die Erlenmeyerkolben mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Inkubation erfolgte über 3 Tage in Brutschränken bei 30 °C und 120 rpm im Dunkeln. Die aerobe Kultivierung der Hauptkulturen erfolgte ebenfalls unter Selektionsdruck in mit Aluminiumfolie umwickelten 1000 ml-Erlenmeyerkolben und einem Kulturvolumen von 100 ml RCV-Flüssigmedium. Die Inokulierung der Hauptkulturen erfolgte mittels der aeroben Vorkulturen entsprechend einer OD_{660} von 0,05.

Die Induktion der Expression T7-Promoter-kontrollierter Gene im Expressionsplasmid pRhotHi-2 in *R. capsulatus* B10ST7 erfolgte mit 8 mM Fructose zum Zeitpunkt der Inokulation (Katzke *et al.*, 2010). Die Kulturen wurden 3-10 Tage in einem abgedunkelten Inkubationsschüttler (120 rpm) bei 30 °C inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte in der exponentiellen Phase nach 72 h und in der stationären Phase nach 96 h.

2.2.2.3 Anzucht unter Verwendung von LED (*light emitting diods*)

In Kooperation mit der Firma Insta GmbH aus Lüdenscheid wurden LED-Platinen konstruiert, die die Anzucht von *R. capsulatus* bei 460 nm, 856 nm oder beiden Wellenlängen gleichzeitig ermöglichen (Heck, 2008). Bei den Leuchtdioden handelte es sich um den High Power Infrared Emitter SFH 4257 der Firma Osram sowie die Blue LED NSSB100BT der Firma Nichia im Abstand von je 1,5 cm auf der Platine. Pro LED-Platine wurden 120 blaue und 120 rote LED abwechselnd voneinander verteilt. Die Expressionskulturen wurden mit 2 Platinen im Abstand von 25 cm zueinander illuminiert.

2.2.2.4 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte mit einem Spektralphotometer (2.1.8.). Proben, die einen Wert von $OD = 1$ überschritten, wurden vor dem Messvorgang verdünnt. Die Verdünnung erfolgte mit LB-Medium (bei *E. coli* und *P. putida*) oder RCV-Flüssigmedium (bei *R. capsulatus*) im Maßstab 1:2 bis 1:10. Der Nullwert wurde ebenfalls mit LB-Medium (*E. coli* und *P. putida*) oder RCV-Medium (*R. capsulatus*) eingestellt. *E. coli* und *P. putida* wurden bei einer Wellenlänge von 580 nm gemessen. Eine OD_{580nm} von 1 entspricht etwa 1×10^9 Zellen pro ml

Kultur. Bei *R. capsulatus* erfolgt die Messung bei 660 nm, wobei die optische Dichte von 1 ungefähr 3×10^8 Zellen pro ml Kulturvolumen entspricht.

2.2.2.5 Messung von Absorptionsspektren

R. capsulatus-Zellen wurden entsprechend einer $OD_{660 \text{ nm}} = 1$ geerntet und zentrifugiert. Nach Resuspension des entstandenen Zellpellets in 1 ml Ethanol wurden die Pigmente aus der Membran extrahiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt und das Absorptionsspektrum des Überstandes am Spektralphotometer *Genesys 6* (Thermo Scientific) im Wellenlängenbereich von 300 - 900 nm gemessen.

2.2.3 Anzucht von *E. coli*

E. coli wurde auf LB-Agarplatten (2.1.4.1) oder in LB-Flüssigmedium (2.1.4.1) unter Selektionsdruck bei 37 °C kultiviert. Übernachtskulturen (ÜK) wurden mindesten 16 h inkubiert. Kulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Brutroller (160 rpm), größere Kulturen in Erlenmeyerkolben auf einem Inkubationsschüttler (130 rpm) angezogen. Das Kulturvolumen betrug dabei maximal 1/10 des Gefäßvolumens. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von Transformationsplatten inokuliert. Hauptkulturen wurden mittels einer ÜK auf eine Zelldichte, entsprechend einer $OD_{580 \text{ nm}}$ von 0,05, angeimpft. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte durch Trübungsmessungen in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 580 nm mit dem entsprechenden Medium als Referenz.

Für die Expression aller in dieser Arbeit verwendeten Gene in *E. coli* wurde der Stamm BL21 (DE3) verwendet. Zur Expression T7-Promotor-kontrollierter Gene wurden die Zellen unter Selektionsdruck bei 37 °C und 130 rpm in LB-Medium bis zu einer Zelldichte, die einer $OD_{580 \text{ nm}}$ von 0,6-0,8 entsprach, inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion durch Zugabe von 0,4 mM IPTG, bevor die Zellen unter den gleichen Bedingungen weiter inkubiert wurden. Die Probenentnahme erfolgte in der exponentiellen Phase bei einer $OD_{580 \text{ nm}} = 1$ und in der stationären Phase nach 24 h.

2.2.4 Anzucht von *P. putida*

P. putida wurde auf LB-Agarplatten (2.1.4.1) oder in LB-Flüssigmedium (2.1.4.1) unter Selektionsdruck bei 30 °C kultiviert. ÜK wurden mindestens 16 h inkubiert. Kulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Brutroller (160 rpm), größere Kulturen in Erlenmeyerkolben auf einem Inkubationsschüttler (130 rpm) angezogen. Das Kulturvolumen betrug dabei maximal 1/10 des Gefäßvolumens. Die Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von Transformationsplatten inokuliert. Die Hauptkulturen wurden mittels einer ÜK auf eine Zelldichte,

entsprechend einer OD_{580nm} von 0,05, angeimpft. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte durch Trübungsmessungen in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 580 nm mit dem entsprechenden Medium als Referenz.

Für die Expression der verwendeten Gene in *P. putida* wurde der *P. putida*-Stamm KT2440T7 verwendet. Zur Expression T7-Promotor-kontrollierter Gene wurden die Zellen unter Selektionsdruck bei 30 °C und 130 rpm in LB-Medium bis zu einer Zelldichte, die einer OD_{580nm} von 0,6-0,8 entsprach, inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion durch Zugabe von 0,4 mM IPTG, bevor die Zellen unter den oben genannten Bedingungen weiter inkubiert wurden. Die Probenentnahme erfolgte in der exponentiellen Phase bei einer $OD_{660nm} = 1$ und in der stationären Phase nach 24 h.

2.2.5 Herstellung von transformationskompetenten Zellen

2.2.5.1 Chemisch kompetente Zellen

Mittels Calciumchlorid und Magnesiumchlorid wurden Bakterienzellen (*E. coli*) kompetent für die Aufnahme von Plasmid-DNA gemacht und damit für die Hitzeschocktransformation vorbereitet. Die Vorkultur wurde mit 100 µl Zellen aus einer Glycerolkultur inokuliert und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Die Hauptkultur (400 ml) wurde mit einer Start- OD_{580nm} von 0,05 angeimpft und unter optimalen Bedingungen bis zu einer Zelldichte von OD_{580nm} von 0,5 angezogen. Die Zellen wurden bei 5000 rpm und 4 °C pelletiert und danach vorsichtig in 10 ml 100 mM Magnesiumchlorid resuspendiert. Das Zell-Puffer-Gemisch wurde 20 – 30 min auf Eis inkubiert und danach in einen weiteren Zentrifugationsschritt eingesetzt. Das entstandene Pellet wurde in 2 ml 100 mM Calciumchlorid und 15 % Glycerol resuspendiert und in 200 ml Portionen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.5.2 Elektrokompetente Zellen

Für die Herstellung von elektrokompetenten *P. putida*-Zellen wurde keine Vorkultur benötigt. Die Hauptkultur (100 ml) wurde mit 100 µl Zellen aus dem Glycerolstock inokuliert und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Die ÜK wurden in 20 ml-Fractionen aufgeteilt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen jeweils mit 30 ml sterilem, kaltem Milli-Q-Wasser aufgefüllt und bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden wiederholt mit 150 mM und 75 mM Saccharoselösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Fractionen vereint, zentrifugiert und in 2 ml 300 mM Saccharoselösung resuspendiert. Die Zellen wurden in 200 ml Portionen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.6 Transformation kompetenter Zellen

2.2.6.1 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*-Zellen und phänische Expression

Für die Hitzeschock-Transformation wurden 200 µl chemisch kompetenter Zellen (2.2.5.1) und 100 ng DNA eingesetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 120 s einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurde dem Ansatz 700 µl LB-Medium (2.1.4.1) hinzugefügt und es folgte die phänische Expression, bei der der Ansatz je nach Antibiotikaresistenz für 0,5 h bis 3 h bei 37 °C inkubiert wurde. Der Ansatz wurde bei 5000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert, unter sterilen Bedingungen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.2.6.2 Elektroporation von *P. putida*-Zellen und phänische Expression

200 µl elektrokompetente Zellen (2.2.5.2) wurden mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und in eine Elektroporationsküvette überführt. Der Ansatz wurde für 4 Sekunden 2,5 kV mittels Bio-Rad-MicroPulser ausgesetzt und sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen. Es folgte die phänische Expression, bei der der Ansatz je nach Antibiotikaresistenz für 0,5 h bis 3 h bei 30 °C inkubiert wurde. Der Ansatz wurde bei 5000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert, unter sterilen Bedingungen auf LB-Selektagar-Platten (2.1.4.1) ausplattiert und über Nacht bei 30 °C bebrütet.

2.2.7 Konjugativer Plasmidtransfer mobilisierbarer Plasmide von *E. coli* nach *R. capsulatus*

(nach Elhai & Wolk, 1988)

R. capsulatus gilt als schwer bzw. nicht transformierbarer Wirt. Deshalb müssen Plasmide aus *E. coli* mittels di- oder triparentaler Konjugation in diesen Wirtsorganismus eingebracht werden (Klug & Drews, 1984). Die Übertragung von rekombinanten Plasmiden nach *R. capsulatus* erfolgt durch Konjugation (Filterkreuzung) mit dem Stamm *E. coli* S17-1, welcher als Donor fungiert. Das zu übertragende Plasmid wurde zunächst in die *E. coli*-Zellen transformiert. Am folgenden Tag wurde der Rezipient *R. capsulatus* von einer frischen Stammplatte in 10 ml RCV-Flüssigmedium (2.1.4.2) resuspendiert. 20-30 *E. coli*-Kolonien wurden in 0,5 ml eisenfreiem PY-Medium (2.1.4.2) vorsichtig resuspendiert und mit 1 ml der *R. capsulatus*-Kultur vermischt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 16000 x g, RT) pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet im Rücklauf vorsichtig resuspendiert. Die gelösten Zellen wurden auf einem

Nitrocellulosefilter bei 30 °C über Nacht auf einer PY-Agarplatte (2.1.4.2) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Filter in 2 ml EPG mit 1 ml RCV+N+P überführt und die Konjugation durch starkes Schütteln (Vortex) beendet und die Bakterien von dem Filter entfernt. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (10 min, 16000 x g, RT), der Überstand abgenommen, die Zellen im Rücklauf resuspendiert und auf PY-Selektagar-Platten (2.1.4.2) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über 3 Tage bei 30 °C anaerob im Licht.

2.3 Gentechnische Methoden

2.3.1 Präparationen von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach Anweisung des Herstellers mit dem „peqGold Plasmid Mini-Prep Kit II“ der Firma Peqlab unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde der Elutionsschritt variiert. Bei Mini-DNA-Präparationen betrug das Elutionsvolumen 30 µl nukleasefreies H₂O, während bei Midi-DNA-Präparationen mit einem Kulturvolumen von 50 ml ein Elutionsvolumen von 5 - 100 µl des mitgelieferten Elutionspuffers gewählt wurde.

2.3.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte in Agarosegelen anhand der Banden des Molekulargewichtsstandards („GeneRuler 1 kb DNA Ladder“, Fermentas). Die Stärke der Bande in der DNA-Probe wurde mit der Bandenstärke im DNA-Marker verglichen und die DNA-Konzentration anhand der vom Hersteller gegebenen Mengenangaben in den Proben geschätzt.

2.3.3 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

(nach Smith & Birnstiel, 1976)

Die hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen dient zur Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden oder der Überprüfung neu konstruierter Plasmide. Von den jeweiligen Restriktionsenzymen wurden pro µg DNA 5 - 10 U im jeweiligen Reaktionspuffer eingesetzt. Die Spaltung erfolgte bei einer vom Restriktionsenzym abhängigen Temperatur für mindestens 2 Stunden oder über Nacht. Zur Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen wurden die Ansätze nach Herstellerangaben thermisch inaktiviert oder mit DNA-Probenpuffer (2.1.7.1) versetzt und mittels Agarosegelelektion (2.3.5) von der restringierten DNA isoliert.

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

(nach Sambrook & Russell, 1989)

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, die DNA-Moleküle anhand ihrer Größe über einem elektrischen Feld auftrennt und wird für die Analyse von DNA-Restriktionen, Größen- und Mengenabschätzung verwendet. Die Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Dabei hängt die

Wandergeschwindigkeit von der Molekülgröße, der Konformation, der Agarosegelkonzentration sowie der Stärke des elektrischen Feldes ab.

In dieser Arbeit wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 1 % verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TBE-Lösung (2.1.7.1) aufgekocht und in eine Gelkammer gegossen. Anschließend wurde die Agarosegel-Lösung mit Ethidiumbromid versetzt und ein Gelkamm eingesetzt. Nach vollendeter Polymerisierung wurde das Gel in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt und mit 0,5-fach-TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 5-fach-DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde für 35 min bei einer Spannung von 135 Volt durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mit der Eagle-Eye-II-Kamera (2.1.8), nachdem die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254\text{-}366\text{ nm}$) visualisiert wurde. Verantwortlich dafür ist das zugesetzte Ethidiumbromid, das in die Helix der doppelsträngigen DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbares Licht ($\lambda = 590\text{ nm}$) emittiert und so die DNA sichtbar macht.

2.3.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

(nach Vogelstein & Gillespie, 1979)

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen dient der Wiedergewinnung von DNA, welche noch in weiteren Versuchen verwendet werden soll. Das Verfahren wurde nach DNA-Restriktionen (2.3.3) oder zur Reinigung von PCR-Fragmenten verwendet.

Die Bande wurde mit Hilfe eines Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml EPG überführt. Die Isolierung der DNA aus dem Gel wurde mittels des „innuPrep DOUBLEpure Kits“ der Firma Analytik Jena nach Herstellerangaben und mit den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

2.3.6 Ligation von Vektor- und Fragment-DNA

(nach Dugaiczky, 1975)

Die Ligation von DNA-Fragmenten und hydrolysierter Vektor-DNA wurde durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Die Vektor-DNA und das zu insertierende DNA-Fragment wurden im Verhältnis 1:5 miteinander versetzt, 1U T4-DNA-Ligase mit dem vom Hersteller mitgelieferten Ligasepuffer wurde hinzugegeben. Der Ligationsansatz wurde anschließend 1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Inaktivierung der Ligase erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation bei 65 °C.

2.3.7 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

(nach Mullis & Faloona, 1987)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird für die *in vitro*-Amplifikation bestimmter DNA-Bereiche aus einem Gemisch von DNA-Molekülen verwendet. Hierzu werden eine thermostabile DNA-Polymerase, DNA als Matrize, zwei Oligonukleotid-Primer, DNA-Polymerasepuffer und dNTP benötigt. Das Prinzip der PCR beruht auf einer sich wiederholenden Abfolge von drei Schritten. 1. Denaturierung: Die Matrize wird denaturiert. 2. Hybridisierung: Die Primer lagern sich an die komplementären DNA-Sequenzen der Matrize an. 3. Elongation: Die angelagerten Oligonukleotid-Primer werden durch die DNA-Polymerase verlängert und kopieren auf diese Weise die Matrize. Die Hybridisierung erfolgt an beiden Strängen der Matrizen-DNA, wodurch sich die DNA in einem Zyklus verdoppelt.

Alle PCR-Reaktionen in dieser Arbeit wurden mit der „Phusion Hot Start High Fidelity DNA-Polymerase“ (Finnzymes) durchgeführt. Polymerase, PCR-Puffer, DMSO und dNTP entstammen dem „Phusion Hot Start High Fidelity DNA-Polymerase-Kit“ (Finnzymes). Die Reaktionen wurden in dem PCR-Cycler ep gradient S der Firma Eppendorf durchgeführt. Die für die verschiedenen PCR-Reaktionen verwendeten Primer sind in Tab. 1 aufgelistet.

Standard-PCR-Ansatz

| | |
|---------------------------------|---------|
| Template-DNA | 1,0 µl |
| Primer (fw) | 0,5 µl |
| Primer (rv) | 0,5 µl |
| 2,5 mM dNTP | 4,0 µl |
| Phusion HF-Puffer | 10,0 µl |
| DMSO | 1,5 µl |
| Polymerase | 0,5 µl |
| H ₂ O (nukleasefrei) | 32,0 µl |

Standard-Programm für PCR

| | |
|------------------------|-----------------------|
| Initiale Denaturierung | 98 °C, 30 s |
| Denaturierung | 98 °C, 10 s |
| Hybridisierung | T _m , 20 s |
| Elongation | 72 °C, 30 s/kb |
| Terminale Elongation | 72 °C, 7 min |

Die Schritte Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wurden in 30 Zyklen wiederholt. Die DNA wurde anschließend durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und dann mittels Gelelektion isoliert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Zellaufschluss

Das Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und durch Zugabe des Aufschlusspuffers resuspendiert. Hierzu wurde pro Gramm Zellen 5 ml Aufschlusspuffer eingesetzt. Die Zellsuspension wurde durch viermalige Scherung mit einer *French Press* der Firma Thermo Electron in einer 40K-Zelle bei 1500 psi lysiert.

2.4.2 Fraktionierung der Zellkompartimente

Die aufgeschlossenen Zellen wurden für eine Fraktionierung der verschiedenen Zellkompartimente mehreren Zentrifugationsschritten unterzogen. Die differentielle Zentrifugation dient der Isolierung verschiedener Zellfraktionen wie *inclusion bodies*, Membranfragmenten und Cytoplasma aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten. Die Fraktionierung beginnt mit dem Zentrifugationsschritt der geringsten Beschleunigung. Der Überstand wird für den nächsten Zentrifugationsschritt eingesetzt, während das Pellet im gleichen Volumen Aufschlusspuffer resuspendiert wird. Als Trennstufen wurden 5000 x g (30 min), 12000 x g (60 min), und 100000 x g (24 h) verwendet. Bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 5000 x g pelletieren nicht aufgeschlossene Zellen und größere Zelltrümmer. Ab einer Sedimentationsgeschwindigkeit von 12000 x g sedimentieren aggregierte Proteine, sogenannte *inclusion bodies*. Der letzte Zentrifugationsschritt bei 100000 x g pelletiert Membranfragmente und daran gebundene Proteine; lösliche Proteine sollten sich im Überstand befinden.

2.4.3 Trennung von Zellkompartimenten durch Saccharosedichtegradienten

Der kontinuierliche Saccharosedichtegradient wurde für die Isolation intracytoplasmatischer Vesikel verwendet. Aufgeschlossene Zellen wurden in mehreren Schritten fraktioniert. Die pelletierten Membranfragmente wurden in 2 ml Aufschlusspuffer (2.1.7.3) resuspendiert und auf ihren Gesamtproteingehalt analysiert. 5 mg Gesamtprotein wurden in den Saccharosedichtegradienten (10 – 60 % Saccharosekonzentration) eingesetzt und für 48 h bei 175000 x g und 4 °C ultrazentrifugiert. 1 ml-Fractionen wurden vom Boden des Zentrifugationsröhrchen, welches mit einer Nadel durchstoichen wurde, aufgefangen. Die Saccharosekonzentration jeder Fraktion wurde mit Hilfe eines Refraktometers (Optech) bestimmt. Der Protein- sowie der Photopigmentgehalt aller Fraktionen wurden mittels des Bradford-Assay und der Absorptionsspektrumanalyse (300 nm – 900 nm) ebenfalls gemessen.

2.4.4 Präparation von Proteinproben für SDS-Gele

Für die SDS-Gel-Analyse wurden 1,5 ml Proben aus den Expressionskulturen entnommen und durch Zentrifugation bei 16000 x g (*R. capsulatus*: 10 min; *E. coli*: 3 min) pelletiert. Das Pellet wurde in 50 - 100 µl SDS-Probenpuffer (2.1.7.3) resuspendiert und unter ständigem Schütteln (1200 rpm) bei 99 °C für 20 min inkubiert. Anschließend konnten die Proben auf das SDS-Gel aufgetragen werden. Noch benötigte Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

(nach Laemmli, 1970)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird zur analytischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe verwendet. Natriumdodecylsulfat (SDS), ein anionisches Detergenz, denaturiert Proteine, überdeckt ihre Eigenladung und maskiert sie mit negativen Ladungen, so dass ein konstantes Verhältnis von Masse zu Ladung entsteht. Die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) führt zur Aufspaltung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinen und verstärkt damit die Denaturierung der Proteine. Die SDS-PAGE wurde mit NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Fertiggelen der Firma Invitrogen (Elektrophoreseapparatur: XCell SureLock™ Electrophoresis Cell) bei einer Laufzeit von 35 min und einer Spannung von 200 V durchgeführt. Als Laufpuffer wurde der 1 x NuPAGE SDS Running Buffer nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.6 Coomassie-Färbung zur Proteindetektion

(nach Merril, 1990)

Die Färbung von SDS-PAGE-Gelen erfolgte nach der Elektrophorese in Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung unter langsamem Schütteln. Nach 30 min Inkubation wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung ersetzt bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrunds. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe der Dokumentationsanlage Stella.

2.4.7 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (2.4.5) wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde die PVDF-Membran vor ihrer Benutzung 1 min in Ethanol äquilibriert und danach 5 min in Wasser gewaschen. Der Transfer erfolgte nach Angaben des Herstellers in der

XCell SureLock™-Elektrophoresekammer mit mitgeliefertem Transferpuffer (2.1.7.4) für eine Stunde bei 25 V.

2.4.8 Immunodetektion von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese über Nacht in TBST + 3 % Milchpulver (2.1.7.4) bei 4 °C gelagert, um freie Bindungsstellen der Membran abzudecken und unspezifische Bindungen auszuschließen. Die Membran wurde 2 x 15 Minuten in TBST-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen, um anschließend mit dem Anti-His-(C-Term)-HRP-Antikörper (Invitrogen; Konzentration 1:5000) für eine Stunde bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln im TBST-Puffer behandelt zu werden. Nicht gebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen in TBST-Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur entfernt. Die Detektion der Signale erfolgte mittels der „Enhanced-Chemo-Luminescence“-Lösung (ECL). Dafür wurde die Membran luftblasenfrei auf eine durchsichtige Plastikunterlage gelegt und die ECL-Lösung gleichmäßig auf die Membran verteilt. Entstehende Chemolumineszenz durch die Reaktion der Peroxidaseeinheit des His₆-Antikörpers mit der ECL-Lösung wurde mittels STELLA (Raytest) (Programmeinstellung: „sensitive chemoluminescence“, 30 s, 1 min, 2 min, 5 min) festgehalten, die Bilder wurden anschließend mit dem Programm AIDA (2.1.8) bearbeitet.

2.4.9 Proteinquantifizierung (Bradford)

Der Bradford-Assay wird als Standardmethode zur quantitativen Proteinbestimmung verwendet. Coomassie-Brilliant-Blau-G-250 wird als Farbstoff benutzt und dient als Indikator für Proteine, indem sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs in Gegenwart von Proteinen und saurem Milieu von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Coomassie-Brilliant-Blau-G-250 bindet an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Aminosäuren und führt zu einer Komplexbildung zwischen Protein und Farbstoff. Die Änderung des Absorptionsmaximums lässt sich photometrisch ermitteln und wird für die Berechnung der Proteinkonzentration eingesetzt.

Für den photometrischen Test wurden 900 µl des Bradford-Reagenz in Küvetten vorgelegt. 10 µl der Proteinprobe wurde mit 90 µl aqua dest. verdünnt und mit dem Bradford-Reagenz vermischt. BSA wurde zur Erstellung einer Standardreihe in den Konzentrationen 0, 2, 4, 6, 8 und 10 µg/ml eingesetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben im Photometer bei 595 nm gemessen. Für alle Proben wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.4.10 Solubilisierung von Membranproteinen

Integrale Membranproteine sind über transmembrane Helices oder sogenannte β -Barrel fest in der Membran verankert, während membranassoziierte Proteine nur über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran verbunden sind. Detergenzien können Membranproteine aus der Membran lösen, indem sich die hydrophoben Reste der Detergenzien an die hydrophoben Bereiche der Proteine anlagern und dadurch die Phospholipide der Membran verdrängen. Zur Solubilisierung der Membranproteine wurden aufgeschlossene Zellen mit verschiedenen Detergenzien (2.1.6) versetzt. Die Solubilisierung variiert je nach Protein in der Behandlungsdauer, Detergenz-Konzentration und der Temperatur. Der Ansatz wurde nach Behandlung mit Detergenzien für 24 h bei 100000 x g und 4 °C zentrifugiert. Im Überstand sollte sich das aus der Membran gelöste Protein befinden.

2.4.11 Metallaffinitätschromatographie

Das Prinzip der Metallaffinitätschromatographie beruht auf der spezifischen Adsorption eines Moleküls an einen Bindungspartner. Als stationäres Säulenmaterial wurde Nitrilotriessigsäure (NTA) eingesetzt. Der an die stationäre Säulenmatrix gebundene Bindungspartner ist das Metallion Ni^{2+} . NTA und Nickel bilden einen Chelat-Komplex, wobei zwei Bindungsstellen für basische Gruppen der Proteine unbesetzt bleiben. Proteine mit einem His-Tag können an diese freien Bindungsstellen binden und durch mehrere Waschschriffe von anderen Proteinen isoliert werden. Zur Elution des Proteins kann das Histidinanalogon Imidazol verwendet werden, welches Histidin kompetitiv verdrängt. Schwach gebundene Proteine können bei niedrigen Imidazolkonzentrationen von den Koordinationsplätzen verdrängt werden, während stark gebundene Proteine erst bei höheren Imidazolkonzentrationen eluieren.

2.4.12 Nachweis von esterolytischer und lipolytischer Aktivität

2.4.12.1 Nachweis lipolytischer Aktivität auf Tributyrin-Agar

(nach Lawrence *et al.*, 1967)

Die Eigenschaft von Lipasen und Esterasen, Esterbindungen zu hydrolysieren wird im Tributyrin-Assay genutzt. Das wasserunlösliche Tributyrin bildet mit dem Agar-Nährboden eine milchig trübe Emulsion. Lipase-Klone werden auf diesen Tributyrin-Agar-Platten angezogen und bezüglich ihrer Aktivität untersucht. Aktive Lipasen setzen das unlösliche Substrat in die wasserlöslichen Produkte

Glycerin und Buttersäure um (Abb. 7), wodurch das trübe Medium aufklart und sich Höfe um die Bakterienkolonien bilden (Chow *et al.*, 2011).

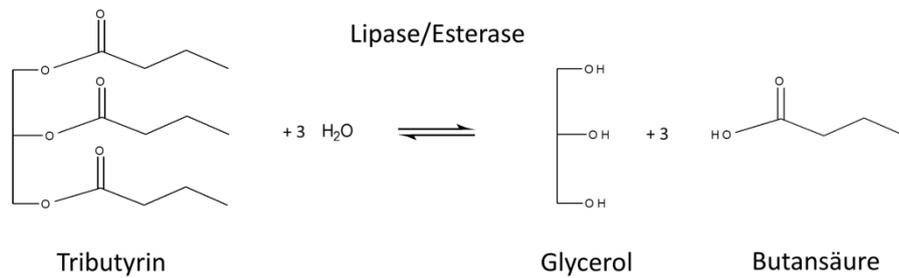


Abb. 7: Lipase-katalysierte Hydrolyse von Tributyrin

Tributyryn kann durch die Katalyse von Lipasen in Gegenwart von H₂O zu Glycerol und der Fettsäure Butansäure hydrolysiert werden. Die umgekehrte Reaktion verbindet Glycerol und Butansäure wieder zu Tributyrin.

2.4.12.2 Nachweis lipolytischer Aktivität auf Rhodamin B-Agar

(nach Kouker & Jaeger, 1987)

Der Rhodamin B-Assay in Anwesenheit von Olivenöl wird als Aktivitätsnachweis für Lipasen verwendet, ohne dabei durch Esterasen beeinflusst zu werden. Lipasen sind an der Umsetzung von Olivenöl beteiligt. Die entstandenen Fettsäuren komplexieren daraufhin mit Rhodamin B. Lipase-Klone wurden auf den Rhodamin B-Agar übertragen und über mehrere Tage bei optimaler Anzuchttemperatur inkubiert. Aktive Lipasen zeigen unter UV-Licht (350 nm) aufgrund des Fettsäure-Rhodamin B-Komplexes einen fluoreszierenden Hof um die Kolonie, der sich orange-gelb darstellt (Chow *et al.*, 2011).

2.4.12.3 Bestimmung der Lipase-/Esteraseaktivität mittels *p*-Nitrophenylcaproat

(nach Wilhelm *et al.*, 1999)

Der *p*-Nitrophenylcaproat-Assay wird als quantitativer Nachweis von Esterase- und Lipaseaktivitäten verwendet. *p*-Nitrophenylcaproat ist ein farbloser Ester der Hexansäure, der bei Hydrolyse durch Lipasen oder Esterasen *p*-Nitrophenol freisetzt. Die Freisetzung dieser chromogenen Gruppe führt zu einem gelben Farbumschlag, welcher photometrisch bei einer Wellenlänge von 410 nm gemessen werden kann.

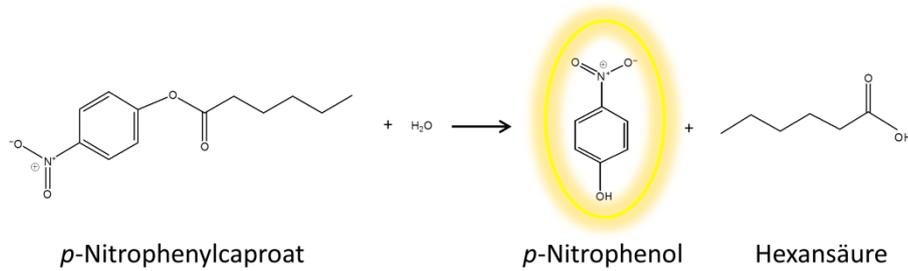


Abb. 8: Lipolytisch-katalysierte Hydrolyse von *p*-Nitrophenylcaproat

p-Nitrophenylcaproat kann durch die Katalyse von Lipasen und Esterasen zu *p*-Nitrophenol und Hexansäure hydrolysiert werden. Die Reaktionsgleichung korreliert mit einem gelben Farbumschlag, dessen Absorption bei 410 nm gemessen werden kann.

Zellkulturen mit überexprimierten Lipasen/Esterasen wurden bei einer optische Dichte von OD = 1 geerntet und mit Hilfe von Glasperlen 10 min bei 4 °C aufgeschlossen. Zur Herstellung der Testlösung wurden 20 ml der Pufferlösung (2.1.7.5) mit 1 ml der Substratlösung (2.1.7.5) gemischt. 1 ml der Testlösung wurde in einem 1,5 ml EPG vorgelegt und der Test durch Zugabe der aufgeschlossenen Zellen (OD = 0,05) gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C oder 70 °C und 1200 rpm für 5 min. Anschließend wurde die Absorption der Probe bei OD_{410 nm} gemessen. Als Referenzwert diente die reine Testlösung ohne Zellkultur. Die Werte werden als relative Aktivität angegeben, bezogen auf 1 ml Probenvolumen und die Zelldichte (OD) bzw. die Zellzahl.

$$U = \frac{\Delta OD_{410 \text{ nm}} \times V}{v \times t \times \epsilon}$$

V = Gesamtvolumen

v = Probenvolumen

t = Reaktionszeit

ε = Extinktionskoeffizient 10,4

2.4.12.4 Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen

Die Transmissionselektronenmikroskopie wird zur mikroskopischen Untersuchung aufgeschnittener Zellen verwendet. Zellkulturen wurden bei einer optischen Dichte von OD = 1 - 2 geerntet und unverzüglich mit 2,5 % Glutaraldehyd und 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Natrium-Cacodilate-Puffer (pH 7,2) fixiert. Die weiteren Schritte wurden im Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm durchgeführt. Die über Nacht fixierten Zellen wurden mit PBS und anschließend in einer wässrigen 2 %-Osmiumtetroxid-Kontrast-Lösung für 1 h gewaschen. Zur Dehydrierung der Zellen wurden diese in steigenden 1-Propanol-Konzentrationen (30 %, 50 %, 70 %

und 90 %) inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die Zellen für 30 min bei 37°C mit einer alkoholischen Uranyl-Acetat-Lösung versetzt, um anschließend mittels des Ultracut UCT ultramicrotome (Leica) aufgeschnitten und im Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss) analysiert zu werden.

2.4.12.5 CO-Differenzspektroskopie

Die CO-Differenz-Spektroskopie wird für die Analyse der CO-Bindungsaktivitäten verwendet. Hierfür wurde gereinigtes Protein in spektrophotometrische Messungen eingesetzt. Das UV-Spektrum von CO-gebundenem Protein nach Zugabe von Natriumdithionit wurde mittels Spektrometers im Bereich von 400 – 500 nm gemessen. Die Proteinkonzentration kann bestimmt werden, indem das Spektrum reduzierten Proteins von dem Absorptionsspektrum des reduzierten CO-gebundenen Proteins subtrahiert wird. Die CO-Differenzspektroskopie der CYP175A1 wurde in Kooperation mit dem Institut für Biochemie II der Heinrich-Heine-Universität (Prof. Dr. Urlacher) in Düsseldorf durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Funktionsbasiertes Screening von Genen aus dem Metagenom in *Escherichia coli*, *Rhodobacter capsulatus* und *Pseudomonas putida*

Die Identifizierung neuer Proteine und deren effiziente Synthese stehen im besonderen Interesse der Biotechnologie und Medizin. Die Metagenomik ermöglicht die Entdeckung neuer Gene unabhängig von der Kultivierbarkeit ihrer Ursprungsorganismen und erweitert somit das Spektrum potentieller Gene für biotechnologische Anwendungen. Für das funktionsbasierte Screening von Genen aus dem Metagenom wird üblicherweise der Standardwirt *E. coli* verwendet (Streit & Schmitz, 2004), dessen heterologe Expression jedoch durch Limitierungen häufig beeinträchtigt wird.

Die Fragestellung, ob das funktionsbasierte Screening von Metagenombanken in unterschiedlichen Expressionswirten hinsichtlich der Entdeckung neuer Enzyme oder der Expressions- und Aktivitätssteigerung von Nutzen ist, sollte im Verbund ExpresSys beantwortet werden. Hierfür untersuchten die einzelnen Kooperationspartner die Nutzbarkeit unterschiedlicher Expressionswirte. Für die vergleichende Analyse der alternativen Wirte wurden *Thermus thermophilus* (Prof. Dr. Liebl, TU München), *Pseudomonas antarctica* (Prof. Dr. W. Streit, Universität Hamburg), *Sulfolobus acidocaldarius* (Prof. Dr. Albers, Max-Planck-Institut Marburg; Prof. Dr. Siebers, Universität Duisburg-Essen), *Pseudomonas putida* und *Rhodobacter capsulatus* (Prof. Dr. Jaeger, Universität Düsseldorf) ausgewählt. Die verschiedenen Expressionswirte unterscheiden sich grundlegend in ihren Eigenschaften.

T. thermophilus ist ein hyperthermophiler Mikroorganismus, der bei Temperaturen bis 85 °C kultiviert werden kann (Liebl, 2004). Die Vorteile von *T. thermophilus* sind zum einen hohe Wachstumsraten und gute Zellerträge während der Kultivierung (Cava *et al.*, 2009), zum anderen eine funktionelle Expression von Proteinen, die aus thermophilen Organismen stammen. Die funktionelle Synthese dieser Proteine ist in Standardorganismen aufgrund einer reduzierten Flexibilität der Proteinkonformation, die zu einer Inaktivierung des Proteins bei niedrigeren Temperaturen führt, oft limitiert (Feller, 2010).

P. antarctica ist ein psychrophiles Bakterium und kann zwischen 4 °C und 30 °C kultiviert werden, wobei das Temperaturoptimum bei 22 °C liegt (Reddy, 2004). Möglicherweise eignet sich *P. antarctica* als Expressionswirt für die Identifizierung von besonders hitzelabilen Proteinen.

S. acidocaldarius ist ein thermoacidophiles Crenarcheota und kann bei 76 °C und pH 3 optimal kultiviert werden (Wagner *et al.*, 2012). In vielen Eigenschaften wie bei den Prozessen der

Proteinbiosynthese, beispielsweise die N-Glycosylierung, ähneln die Archaeen eher den Eukaryoten als den Bakterien (Meyer & Albers, 2013). Der Expressionswirt *S. acidocaldarius* kann möglicherweise für die Identifizierung von Archaeen-ähnlichen Proteinen genutzt werden.

P. putida ist ein aerobes, saprophytisches Bakterium und kann bei 30 °C optimal kultiviert werden. Es zeichnet sich durch schnelles Wachstum, eine unkomplizierte Kultivierung und einfache genetische Manipulation aus. Zudem besitzt *P. putida* 15 % mehr cytoplasmatische Membrantransportsysteme, die beispielsweise die Aufnahme von Aminosäuren regulieren (Nelson *et al.*, 2002). Dies bevorteilt *P. putida* in der Substratverwertung. Es konnte bereits als Alternativwirt für die funktionsbasierte Anwendung von Metagenombanken etabliert werden (Martinez *et al.*, 2004).

R. capsulatus ist ein phototrophes Nicht-Schwefel-Purpur-Bakterium und zeichnet sich durch mehrere spezifische Eigenschaften als Expressionswirt für funktionsbasierte Screenings aus. Aufgrund seines phototrophen, anaeroben Wachstums können vor allem Sauerstoff-sensitive Proteine synthetisiert werden. Ein weiterer Vorteil ist die große Membranfläche, die möglicherweise für die Einlagerung von Membranproteinen genutzt werden kann sowie für die Produktion von verschiedenen Kofaktoren, die in *E. coli* nicht hergestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit steht die Charakterisierung des Expressionswirts *R. capsulatus* für die Anwendbarkeit der funktionellen Expression von Genen aus dem Metagenom im Vordergrund. Es sollte untersucht werden, inwieweit die verschiedenen spezifischen physiologischen Eigenschaften des Wirts für die heterologe Expression von Genen aus dem Metagenom vorteilhaft sind.

Hierfür wurden im Verbundprojekt ExpresSys sechs Hydrolasegene aus dem Metagenom ausgewählt (Tab. 13), die vom ExpresSys-Partner Prof. Dr. W. Streit (Universität Hamburg) für komparative Expressionsstudien in den oben genannten Wirten bereitgestellt wurden. Neben der Analyse in *R. capsulatus*, erfolgte die heterologe Expression der Gene in dem Standardwirt *E. coli* und in dem etablierten Alternativwirt *P. putida*. So können die Proteinproduktion sowie die Aktivität der Enzyme vergleichend untersucht werden.

Es wurden Enzyme mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgesucht, um die Befähigung der Organismen *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus* als Expressionswirte zu evaluieren. Die in dieser Arbeit untersuchten lipolytischen Enzyme stammen aus verschiedenen Metagenombanken und unterscheiden sich hinsichtlich der Proteingröße, des Temperaturoptimums und der Substratspezifität (Tab. 13).

Tab. 13: Eigenschaften der lipolytischen Enzyme

¹TBT: Tributyrin; pNPC: *p*-Nitrophenylcaproat; O.-öl: Olivenöl. ²Die Signalpeptid-Analyse erfolgte mit dem Internetbasierten Programm SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011).

| Bezeichnung | Molekulargewicht (kDa) | Herkunft Metagenom | Substrat ¹ | Temp. Opt. (°C) | Seq. | Signalpeptid ² | Funktion |
|-------------|------------------------|---|-----------------------|-----------------|------|---------------------------|-----------------|
| LipS | 32 | Erd- und Wasserproben des Botanischen Gartens (65 °C) | TBT, pNP C4-14 | 70 | Ja | Nein | Esterase/Lipase |
| LipT | 38 | Heizungswasserproben (75 °C) | TBT, pNP C4-15 | 75 | Ja | Ja | Esterase/Lipase |
| Est5E5 | 53 | Biofilm auf EPDM beschichteten Absperrschiebern | TBT, pNP C4-10 | 55 | Ja | Nein | Esterase |
| LipA8b2 | 48 | <i>Geobacillus sp.</i> HH01 | TBT, O.-öl, pNP C6-18 | 60 | Ja | Nein | Lipase |
| EstA3 | 50 | Esterase Klon aus „Biofilm“-DNA | TBT, pNP C4-10 | 50 | Ja | Nein | Esterase |
| LipC5 | 42 | Esterase Klon aus „Biofilm“-DNA | TBT, pNP C4-10 | n.v. | Ja | Nein | Esterase |

Das LipS kodierende Gen wurde aus Anreicherungen (65 °C) von Erd- und Wasserproben eines Botanischen Gartens entnommen. Das entsprechende Protein besitzt eine Größe von 32 kDa und ist mit einem Temperaturoptimum von 70 °C weitgehend vor thermaler Denaturierung geschützt. LipS gehört zu den ersten metagenomischen Lipasen, die mit Hilfe von kristallographischen Methoden analysiert werden konnten (Chow *et al.*, 2012). Das LipT kodierende Gen wurde aus Anreicherungen (70 °C) von Heizungswasserproben gewonnen. LipT besitzt eine Größe von 38 kDa und ein Temperaturoptimum von 75 °C. Bei beiden Enzymen handelt es sich nach derzeitigem Wissensstand um Lipasen, die bevorzugt langkettige Fettsäuren (C₁₂-C₁₄) hydrolysieren (Chow *et al.*, 2012). Die Hydrolasegene *est5E5*, *estA3* und *lipC5* wurden aus Biofilmen isoliert. Die kodierenden Proteine besitzen eine Größe von 53 kDa (Est5E5), 50 kDa (EstA3) und 42 kDa (LipC5) und bevorzugen die Umsetzung von kurzkettigen Fettsäuren, wodurch sie den Esterasen zugeordnet werden. Das Temperaturoptimum beträgt für Est5E5 55 °C und für EstA3 50 °C, während die bevorzugte Temperatur von LipC5 derzeit nicht bekannt ist. Das Gen *lipA8b2* wurde aus *Geobacillus sp.* HH01 isoliert. Das entsprechende Protein besitzt eine Größe von 48 kDa und ein Temperaturoptimum von 60 °C. Die Besonderheit von LipA8b2 ist, neben kurzkettigen Fettsäuren auch solche mit einer Kettenlänge von C18 umzusetzen (persönliche Angaben, Prof. Dr. Streit).

Im Rahmen der während dieser Doktorarbeit betreuten Bachelorarbeit von Leonard Elias Heinrich wurden die Expressionsplasmide, die die Hydrolasegene beinhalten, kloniert. Zudem wurden erste Expressions- und Aktivitätsversuche der sechs lipolytischen Enzyme in den Expressionswirten *E. coli* und *R. capsulatus* durchgeführt (Heinrich, 2012).

3.1.1 Konstruktion der Hydrolasegen-Expressionsvektoren

Für die vergleichende Expression der Hydrolasegene in *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus* wurden diese zunächst mittels der Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* in den Expressionsvektor pRhotHi-2 (siehe 1.4) kloniert (Heinrich 2012 und diese Arbeit). Der *broad host range* Vektor ermöglicht die Expression des Zielproteins als rekombinantes Protein in *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus*. Das Protein weist an seinem C-terminalen Ende einen His₆-Tag auf, der für die spätere Identifizierung des Proteins via Immunodetektion verwendet wird. Die Expression der heterologen Zielgene steht dabei unter der Kontrolle des Promotors der T7-RNA-Polymerase (Katzke *et al.*, 2010). Aufgrund des T7-Promotors müssen für die vergleichenden Expressionsstudien Bakterienstämme eingesetzt werden, denen das Gen für die T7-Polymerase in das Wirtsgenom integriert wurde. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Stämmen handelt es sich um *E. coli* BL21 (DE3) (Studier & Moffatt, 1986), *P. putida* KT2440T7 (Knops, 2008) und *R. capsulatus* B10ST7 (Katzke *et al.*, 2010).

3.1.2 Vergleichende Expression der metagenomischen Hydrolasegene in den Expressionswirten *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus*

Um zu untersuchen, inwieweit die Hydrolasegene aus dem Metagenom mit dem Expressionsvektor pRhotHi-2 in den verwendeten Expressionsstämmen *E. coli*, *R. capsulatus* und *P. putida* exprimiert werden können und ob die Genexpression das Zellwachstum beeinflusst, wurden während der Expressionsstudien das Wuchsverhalten der Bakterien sowie die Proteinakkumulation der Hydrolasen analysiert.

Die Anzucht der Kulturen von *E. coli* und *P. putida* erfolgte wie unter 2.2.3, 2.2.4 beschrieben. Wie bereits in Kapitel 1.3 erläutert, ist *R. capsulatus* in der Lage, unterschiedliche biochemische Prozesse zur Energiebereitstellung zu nutzen. Hierbei handelt es sich um die Photosynthese, die unter phototrophen Wuchsbedingungen genutzt wird, während unter chemotrophen Wuchsbedingungen die metabolischen Prozesse zur Energiebereitstellung wechseln und die aerobe Respiration verwendet wird. Vor diesem Hintergrund ergab sich die Fragestellung, ob die Nutzung der photo- und chemotrophen Wuchsbedingungen die heterologe Expression in

R. capsulatus beeinflusst. Hierfür wurden *R. capsulatus*-Zellen, wie unter 2.2.2.1 und 2.2.2.2 beschrieben, photo- und chemoheterotroph kultiviert (im Nachfolgenden als „phototroph“ und „heterotroph“ bezeichnet).

Für die Analyse des Zellwachstums wurden die Zelldichten der Expressionskulturen in regelmäßigen Intervallen bestimmt. Um die Akkumulation der lipolytischen Enzyme nachzuweisen, wurden in der exponentiellen Phase ($OD_{580/660nm} = 1$) sowie in der stationären Phase Proben (1,5 ml) für die Immunodetektion der mit dem His₆-Tag markierten Proteine mittels *Western Blot* (II.2.4.8) entnommen. Das aufgetragene Probenvolumen wurde so gewählt, dass die eingesetzte Menge für *E. coli*-Zellen einer $OD_{580nm} = 0,2$ und für *P. putida*- und *R. capsulatus*-Zellen aufgrund der schwächeren Proteinakkumulation einer $OD_{580/660nm} = 0,8$ entsprach.

Die Ergebnisse der vergleichenden Expressionsstudien zeigen, dass die verschiedenen untersuchten Expressionswirte während der heterologen Genexpression ein unterschiedliches Zellwachstum aufweisen (Abb. 9).

Die Wachstumskurven der *E. coli*-Expressionskulturen zeigen untereinander ein abweichendes Muster. Sie weisen durch die Expression bestimmter Hydrolasegene ein verlangsamtes oder auch vermindertes Zellwachstum auf. Ebenso konnte beobachtet werden, dass die *E. coli*-Kontrollkultur im Vergleich zu den Lipase/Esterase-Expressionskulturen ein verlangsamtes Wachstum zeigt (Abb. 9 A, hellblaue Linie). Es wurde vermutet, dass durch die Zugabe des Induktors ein Bereich der *multiple cloning site* (MCS), eine ca. 100 bp lange DNA-Sequenz, abgelesen wird, die zur Bildung eines auf die Zellen toxisch wirkenden Produkts führt. Dieser Effekt konnte durch die Entfernung der Ribosomenbindestelle sowie der MCS behoben werden (nicht veröffentlicht, Marcus Wingen).

Die Wuchsrate der *P. putida*-Expressionskulturen ist durch die heterologe Genexpression, außer im Fall der Est5E5-exprimierenden Kultur (grüne Linie), nicht beeinträchtigt. Diese zeigt im Vergleich zu den übrigen *P. putida*-Expressionskulturen herabgesetzte Generationszeiten sowie eine Verminderung der finalen Zelldichte (Abb. 9 B).

Wie in Abbildung C und D dargestellt, zeigen die *R. capsulatus*-Expressionskulturen, die unter phototrophen oder chemotrophen Bedingungen kultiviert wurden, im Vergleich verschiedene Profile des Zellwachstums bezüglich Generationszeiten und finaler Zelldichte. Phototrophe *R. capsulatus*-Kulturen erreichen nach einer kurzen Anpassungsphase die logarithmische Wuchsphase und weisen unabhängig von der heterologen Genexpression hohe Zelldichten ($OD_{660nm} = 3 - 4$) auf, während die Wuchsrate sowie die finale Zelldichte ($OD_{660nm} = 1 - 1,5$) aller chemotrophen Expressionskulturen beeinträchtigt sind. Das unterschiedliche Wuchsverhalten der phototroph und chemotroph kultivierten *R. capsulatus*-Zellen ist demnach auf die

unterschiedlichen Anzuchtbedingungen und nicht auf die heterologe Genexpression zurückzuführen. Diese Unterschiede rühren von den unterschiedlichen metabolischen Prozessen zur Energiebereitstellung unter phototrophen und chemotrophen Wachstumsbedingungen her (Lampe *et al.*, 1972).

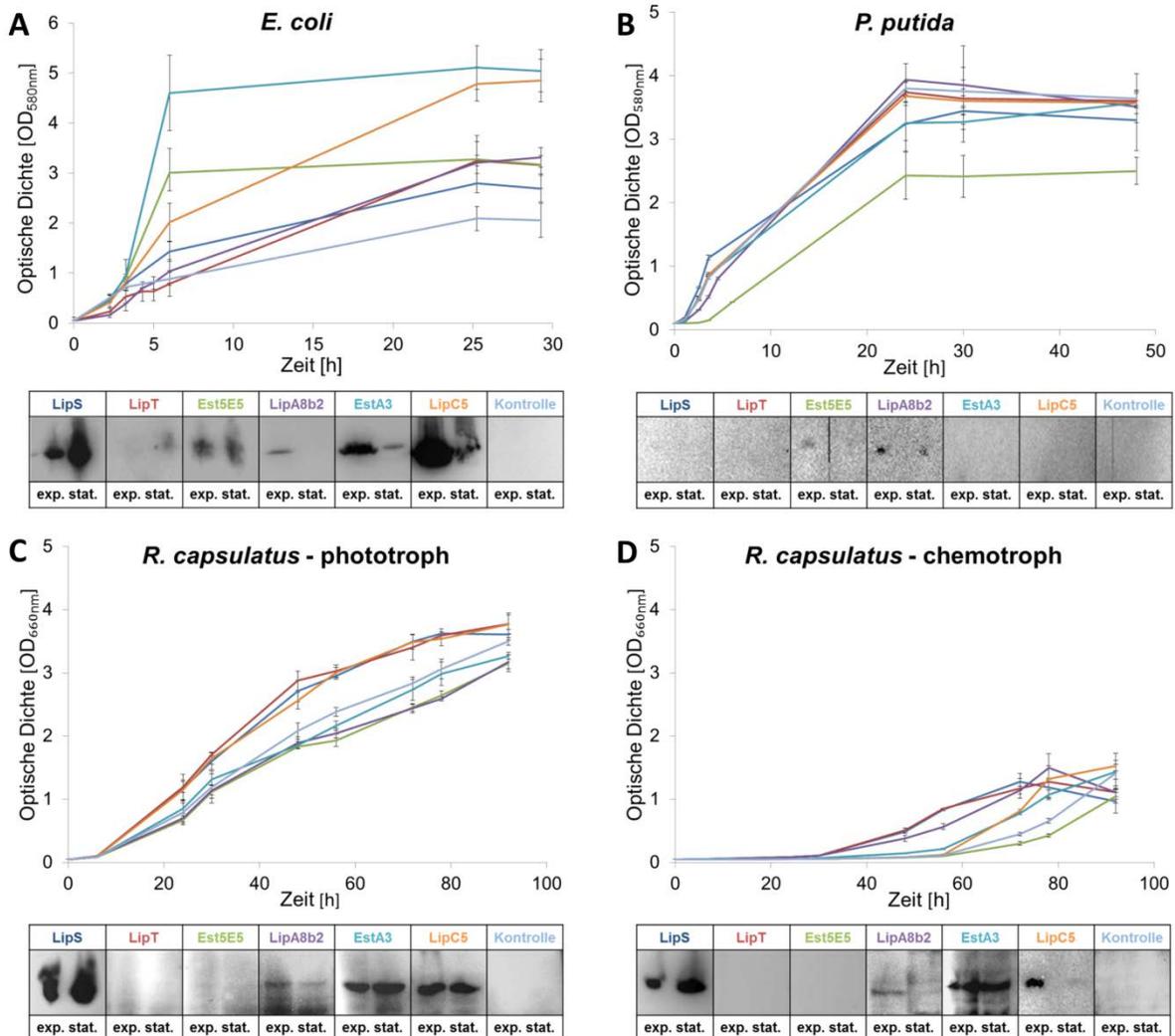


Abb. 9: Expression von Hydrolasegenen aus dem Metagenom in *E. coli* BL21 (DE3), *P. putida* KT2440T7 sowie *R. capsulatus* B10ST7 unter phototrophen und chemotrophen Bedingungen

Die Abbildung zeigt das Wachstumsverhalten der verschiedenen Bakterien während der Expression von sechs verschiedenen Hydrolasegenen im Expressionsvektor pRhotHi-2. Als Negativkontrolle wurde das Zellwachstum von *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus* mit dem pRhotHi-2-Leervektor verfolgt. Die Werte geben den Mittelwert einer Dreifachbestimmung an. Die Fehlerbalken zeigen die entsprechenden Standardabweichungen. Die Immunodetektion der Proteine erfolgte mit Proben, die während der exponentiellen („exp.“) und stationären („stat.“) Phase aus den Kulturen entnommen wurden (genaue Angaben zur Probenentnahme siehe 2.2.2.1, 2.2.2.2, 2.2.3, 2.2.4). Das aufgetragene Probenvolumen wurde so gewählt, dass die eingesetzte Menge für *E. coli*-Zellen einer OD_{580nm} = 0,2 und für *P. putida*- und *R. capsulatus*-Zellen einer OD_{580/660nm} = 0,8 entsprach. Die Detektion erfolgte mittels HRP-Antikörpern, die spezifisch an den His₆-Tag der Proteine binden.

Die unterschiedlichen Wachstumsprofile der drei untersuchten Expressionswirte bezüglich Generationszeiten und finaler Zelldichten haben vermutlich mehrere Ursachen. Das verminderte Wachstum der Zellen wird möglicherweise durch toxische Effekte, die durch die Synthese von heterologen Proteinen ausgelöst werden, hervorgerufen. Oft korreliert die heterologe Expression mit einer Überlastung der metabolischen Synthesewege der Zellen, die im ungünstigsten Fall zum Absterben der Zellen führt.

Neben der Analyse des Bakterienwachstums wurde auch die Expressionseffizienz der lipolytischen Enzyme in den Wirten *E. coli*, *R. capsulatus* und *P. putida* durch Nachweis der Proteinakkumulation in der exponentiellen und stationären Wuchsphase untersucht.

Die *Western Blot*-Analyse der *E. coli*-Expressionskulturen zeigt, dass alle sechs Hydrolasegene in *E. coli* spezifisch nachgewiesen werden konnten, wobei ein unterschiedliches Muster der Proteinakkumulation in der exponentiellen und stationären Phase zu beobachten ist. Abhängig von der untersuchten Lipase konnten einige Lipasen überwiegend in der exponentiellen Wuchsphase nachgewiesen werden, während eine Proteinakkumulation einiger anderer Lipasen (LipS und LipT) vermehrt in der stationären Phase beobachtet werden konnte. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expressionslevel der lipolytischen Enzyme nicht mit den Veränderungen des Zellwachstums korrelieren. Beispielsweise konnte für die Lipase LipC5 die höchste Proteinakkumulation nachgewiesen werden, wobei das Zellwachstum hier kaum negativ beeinflusst ist. Im Gegensatz dazu konnte für die Lipase LipT ein geringes Expressionslevel aufgezeigt werden, obwohl die Teilungsrate der Zellen herabgesetzt ist (Abb. 9 A). Diese Beobachtungen entsprechen nicht den Erwartungen, da aufgrund höherer Expressionsraten eine Stressantwort der Zellen mit einem verminderten Zellwachstum vermutet wurde. Die festgestellten Verminderungen des Zellwachstums stehen daher nicht in erkennbarem Zusammenhang mit den beobachteten Expressionsleveln der lipolytischen Enzyme, können aber möglicherweise durch die heterologe Expression ausgelösten toxischen Effekte hervorgerufen werden.

Die *Western Blot*-Analyse der *P. putida*-Kulturen zeigt, dass lediglich zwei der sechs untersuchten Hydrolasegene in *P. putida* exprimiert werden konnten. Hierbei handelt es sich um die lipolytischen Enzyme Est5E5 und LipA8b2. Die Mengen der synthetisierten lipolytischen Enzyme sind im Vergleich zu den in den anderen Expressionswirten nachgewiesenen sehr gering. Die lipolytischen Enzyme zeigen ebenso wie in den *E. coli*-Expressionskulturen eine variable Proteinpräsenz in der exponentiellen und stationären Phase (Abb. 9 B).

In *R. capsulatus*-Expressionskulturen konnten sowohl unter phototrophen als auch unter chemotrophen Anzuchtbedingungen vier der sechs untersuchten lipolytischen Enzyme

synthetisiert werden. Hierbei handelt es sich um die Proteine LipS, LipA8b2, EstA3 und LipC5. Dabei ist die Stärke der Proteinakkumulation in der exponentiellen und stationären Phase abhängig von der phototrophen oder chemotrophen Kultivierung der *R. capsulatus*-Zellen. Die lipolytischen Enzyme der phototrophen Expressionskulturen weisen keine auffälligen Unterschiede der Proteinakkumulation in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase auf, während unter chemotrophen Anzuchtbedingungen eine Degradation der Lipasen LipA8b2 und LipC5 in der stationären Wachstumsphase zu beobachten ist (Abb. 9 C und D). Die Nutzung von *R. capsulatus* unter phototrophen Wachstumsbedingungen hat einen verstärkenden Einfluss auf die heterologe Genexpression.

Es konnte gezeigt werden, dass in den Expressionswirten *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus* lipolytische Enzyme synthetisiert wurden, wobei die heterologe Expression abhängig von dem gewählten Expressionswirt ist. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Nutzung der hier untersuchten Expressionswirte zu einer unterschiedlich starken Proteinakkumulation der jeweiligen Hydrolasen führt. Das Zellwachstum der Bakterien ist, abhängig von dem verwendeten Expressionswirt, durch die heterologe Genexpression unterschiedlich beeinflusst.

3.1.3 Vergleich der durch die heterologe Expression hervorgerufenen lipolytischen Aktivitäten in den Expressionswirten *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Hydrolasegene partiell in den Expressionswirten *E. coli*, *R. capsulatus* und *P. putida* exprimiert werden können, wurden zur Überprüfung der funktionellen Expression zunächst Aktivitätsanalysen auf Agarplatten mit den Substraten Tributyrin und Rhodamin durchgeführt. Für die Aktivitätstests wurden sowohl Agarplatten (siehe 2.1.4.3) mit Nährböden verwendet, die den Induktor der Genexpression (*E. coli* und *P. putida*: 0,4 mM IPTG, *R. capsulatus*: 8 mM Fruktose) enthielten, als auch Nährböden, denen dieser Zusatz fehlte. Die verschiedenen Bedingungen ermöglichen die Analyse, inwieweit die Induktion der Genexpression Einfluss auf das Wachstum der Bakterienkolonien und die Aktivität der lipolytischen Enzyme hat. Für die anschließende quantitative Analyse der Enzymaktivität mittels des Substrats pNPC wurden Expressionskulturen, wie in 2.2.1, 2.2.3, 2.2.4 beschrieben, kultiviert, die heterologe Genexpression induziert und während der exponentiellen Phase Proben entnommen. Als Kontrolle wurden Testkulturen verwendet, die den Leervektor pRhotHi-2 trugen.

3.1.3.1 Vergleichende qualitative Analyse der Bakterienklone mittels des für Lipasen und Esterasen spezifischen Substrats Tributyrin

Der Nachweis der lipolytischen Aktivität der Bakterienkolonien auf Tributyrin-Agar basiert auf der Hydrolyse von Tributyrin zu Glycerin und Butansäure. Tributyrin ist das Triacylglycerid der Butansäure. Die Hydrolyse von Tributyrin durch eine entsprechende Lipase oder Esterase führt zur Bildung eines klaren Hofes um die Bakterienkolonie auf dem ansonsten trüben TBT-Agar (Hasan *et al.*, 2009).

Der TBT-Aktivitätstest konnte eine unterschiedliche Verteilung der Enzymaktivitäten in den Expressionswirten *E. coli*, *R. capsulatus* und *P. putida* aufzeigen (Abb. 10).

Die Ergebnisse des qualitativen Lipase/Esterase-Aktivitätstest der *E. coli*-Bakterienkolonien zeigen, dass fünf der sechs Hydrolasen funktionell in *E. coli* synthetisiert wurden und in der Lage sind, das Substrat Tributyrin zu hydrolysieren. *E. coli*-Kolonien, die LipT synthetisierten, zeigen, obgleich die Genexpression immunologisch nachgewiesen werden konnte, keine Aktivität. Die Zugabe von IPTG in die Agarplatten führte zu einer reduzierten Hofbildung, die mit der Enzymaktivität des lipolytischen Enzyms korreliert. Die Bakterienkolonien, die als Kontrollwert dienten, zeigten keine intrinsischen wirtsspezifischen Aktivitäten, so dass die Hofbildung um die Bakterienkolonien, die die lipolytischen Enzyme synthetisierten, auf deren spezifische Aktivität zurückzuführen ist (Abb. 10).

P. putida-Kolonien, die Est5E5 und LipA8b2 synthetisierten, wiesen im TBT-Aktivitätstest eine Hofbildung auf. Die Expression dieser beiden Hydrolasegene konnte im *Western Blot* immunologisch erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 9 B). Die Zugabe von IPTG in die Agarplatten führt wie bei *E. coli* zu einem schwach negativen Effekt auf die Hofbildung, die als Maßstab für die Enzymaktivität dient (Abb. 10).

Phototroph kultivierte *R. capsulatus*-Kolonien, die LipA8b2, EstA3 und LipC5 produzierten, zeigen im TBT-Aktivitätstest durch die Bildung klarer Höfe um die Bakterienkolonie Enzymaktivität. LipS konnte spezifisch in den *Western Blot*-Analysen der phototrophen *R. capsulatus*-Kulturen nachgewiesen werden (Abb. 9 C), Enzymaktivität wurde jedoch nicht beobachtet. Es konnte ein verstärkender Effekt durch die Zugabe von Fruktose auf die Enzymaktivität von LipA8b2, EstA3 und LipC5 gezeigt werden, aber nur im Fall von LipC5 in signifikanter Weise (Abb. 10).

Im Gegensatz dazu zeigt die Untersuchung der chemotroph-kultivierten *R. capsulatus*-Zellen, dass zwei der sechs lipolytischen Enzyme Aktivität aufweisen, wenngleich vier Proteine synthetisiert werden konnten. Bei den aktiven lipolytischen Enzymen handelt es sich um LipA8b2 und EstA3. Im Vergleich zu den Untersuchungen der phototrophen *R. capsulatus*-Kolonien konnte keine

Steigerung der Enzymaktivität der hier untersuchten Proteine durch die Zugabe von Fruktose erzielt werden. Bemerkenswerter Weise konnte zudem eine Veränderung der Pigmentierung der chemotrophen *R. capsulatus*-Kolonien beobachtet werden. Die chemotrophe Inkubation der Bakterien auf Tributyrin-Platten führt zum partiellen Verlust der Pigmente (Abb. 10).

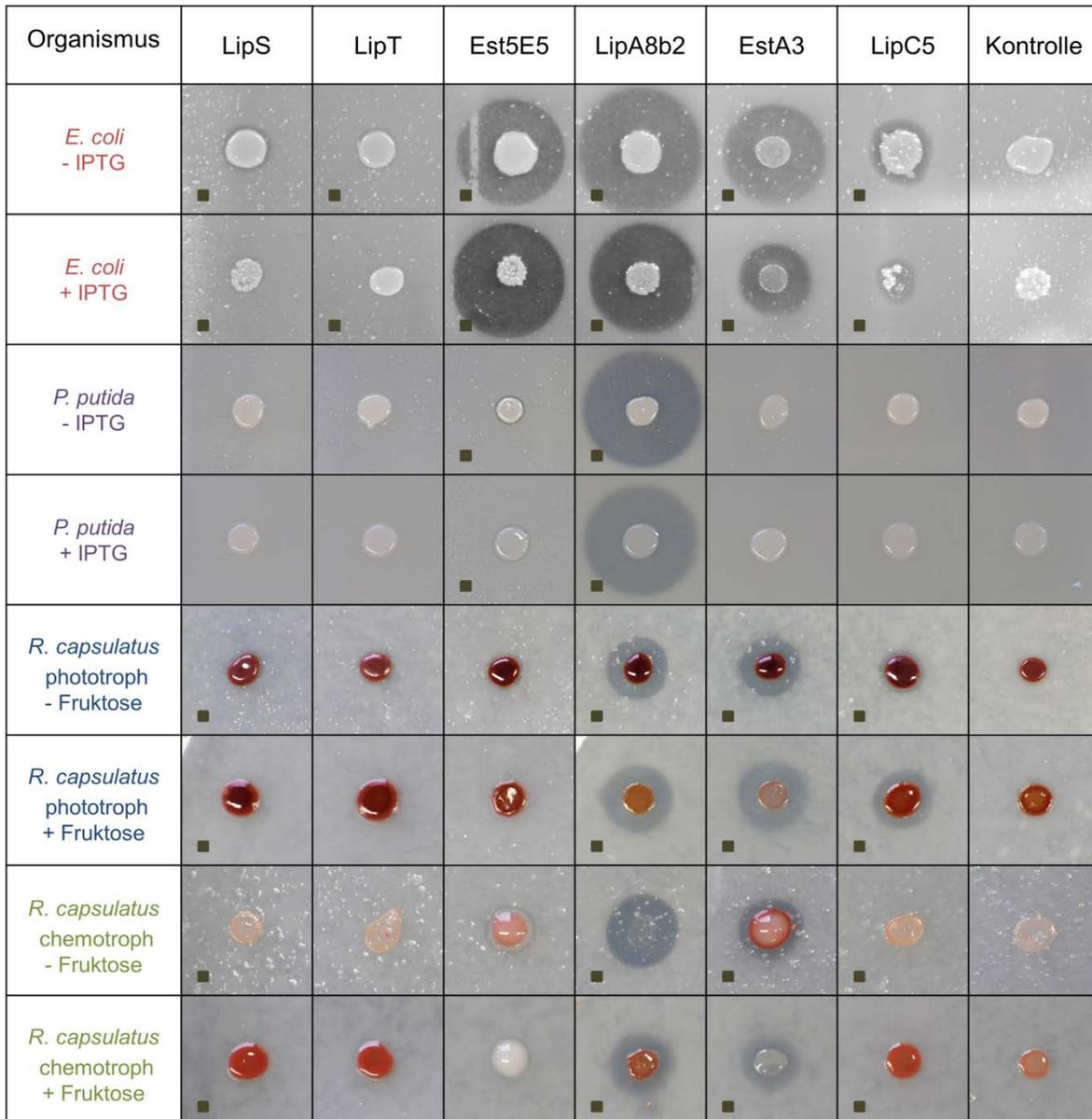


Abb. 10: Nachweis lipolytischer Aktivität in *E. coli* BL21 (DE3), *P. putida* KT2440T7 und *R. capsulatus* B10ST7 unter phototrophen und chemotrophen Bedingungen auf Tributyrin-Agar

Die Abbildung zeigt Bakterienkolonien, die den Expressionsvektor pRhotHi-2 mit den Genen *lipS*, *lipT*, *est5E5*, *lipA8b2*, *estA3* und *lipC5* oder als Kontrolle den Leervektor enthielten. Die Hydrolyse von Tributyrin führt zur Bildung eines klaren Hofes um die Bakterienkolonie auf dem ansonsten trüben TBT-Agar, der dadurch auf eine lipolytische Enzymaktivität hinweist. Die dunkelgrünen Kennzeichnungen (■) markieren die lipolytischen Enzyme, die immunologisch in den Expressionswirten nachgewiesen werden konnten.

Es konnte gezeigt werden, dass die lipolytischen Enzyme partiell in den verschiedenen Expressionswirten synthetisiert wurden. Dabei ist die Enzymaktivität der lipolytischen Enzyme abhängig von dem gewählten Expressionswirt. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinakkumulation nicht mit der Enzymaktivität korreliert.

3.1.3.2 Vergleichende qualitative Analyse der Bakterienklone mittels des für Lipasen spezifischen Substrats Olivenöl/Rhodamin B

Um die Enzymaktivität der Hydrolasen umfassender beurteilen zu können, wurde ein weiterer qualitativer Aktivitätstest mit einem für Lipasen spezifischen Substrat durchgeführt. Hier wird Olivenöl in Gegenwart von Rhodamin B von lipolytischen Enzymen, die bevorzugt Substrate mit längeren Fettsäureketten umsetzen, hydrolysiert.

Lipasen können durch die Hydrolyse von Olivenöl in Gegenwart von Rhodamin B nachgewiesen werden. Die Lipase-Aktivität wird unter UV-Licht (350 nm) durch einen fluoreszierenden Hof um die Bakterienkolonie belegt (Kouker & Jaeger, 1987). Die Hydrolyse von Fettsäuren mit der einhergehenden Bildung von Carbonsäuren führt zu einer pH-Verschiebung in der unmittelbaren Umgebung der Kolonie. Der niedrige pH-Wert führt zu einer Verschiebung der Absorption von Rhodamin B in den UV-Bereich und zeigt sich durch einen fluoreszierenden Hof um die Bakterienkolonie.

Die Ergebnisse des Rhodamin B-Plattentests bestätigen die Annahme, dass von den hier untersuchten Hydrolasen ausschließlich die Lipase LipA8b2 in der Lage ist, langkettige Fettsäuren wie Olivenöl zu hydrolysieren (Abb. 11). In der Auswertung des Plattentests konnte ein fluoreszierender Hof um die Bakterienkolonien von *E. coli*, *R. capsulatus* und *P. putida*, die LipA8b2 synthetisieren, beobachtet werden. Interessanterweise konnte die Enzymaktivität der Lipase LipA8b2 in *R. capsulatus* lediglich unter phototrophen, jedoch nicht unter chemotrophen Wuchsbedingungen nachgewiesen werden. Dies deutet, genau wie die Unterschiede bei den Expressionseffizienzen (Abb. 9), auf einen für die funktionelle Expression signifikanten Unterschied der beiden untersuchten *R. capsulatus*-Physiologien hin. Wie sich auch in der Analyse des TBT-Aktivitätstests zeigte, beeinflusst die Zugabe von IPTG in den Nährboden der Agarplatten die Enzymaktivität von *E. coli* und *P. putida*. *E. coli*-Zellen, die auf Agarplatten mit IPTG inkubiert wurden, zeigen eine verminderte Enzymaktivität. Im Gegensatz dazu konnten die beobachteten Enzymaktivitäten in *P. putida* durch die Zugabe von IPTG erhöht werden, indem sich eine erhöhte

Fluoreszenz um die Bakterienkolonie zeigte. Das Ergebnis der *P. putida*-Zellen verhält sich reziprok zu den TBT-Aktivitätsanalysen. In Übereinstimmung mit dem *R. capsulatus*-TBT-Aktivitätstest konnte eine verbesserte Enzymaktivität durch die Zugabe von Fruktose in phototroph kultivierten *R. capsulatus*-Zellen gezeigt werden.

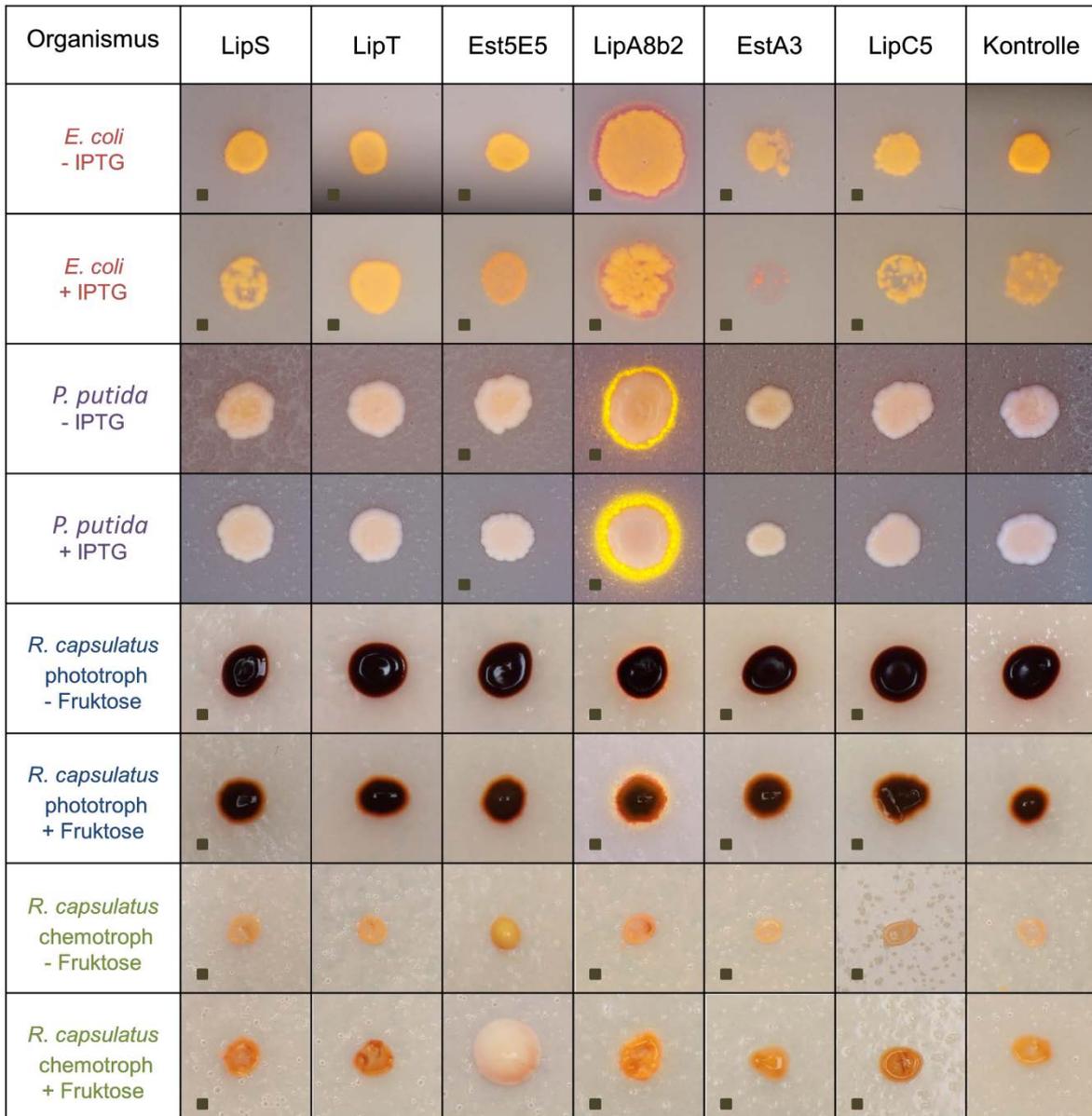


Abb. 11: Nachweis lipolytischer Aktivität in *E. coli* BL21 (DE3), *P. putida* KT2440T7 und *R. capsulatus* B10ST7 unter phototrophen und chemotrophen Bedingungen auf Rhodamin B-Agar

Die Abbildung zeigt Bakterienkolonien, die den Expressionsvektor pRhotHi-2 mit den Genen *lipS*, *lipT*, *est5E5*, *lipA8b2*, *estA3* und *lipC5* oder als Kontrolle den Leervektor enthielten. Die Bildung eines fluoreszierenden Hofes während der Bestrahlung mit UV-Licht deutet auf Enzymaktivität von Lipasen hin. Die dunkelgrünen Kennzeichnungen (■) markieren die lipolytischen Enzyme, die immunologisch in den Expressionswirten nachgewiesen werden konnten.

Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Hydrolasen eine unterschiedliche Substrat-Präferenz aufweisen. Wie vermutet, weisen die lipolytischen Enzyme LipS, LipT, Est5E5, EstA3 und LipC5 überwiegend eine Spezifität für kurzkettige Substrate auf. LipA8b2 ist als einzige der hier untersuchten Lipasen in der Lage, langkettige Substrate umzusetzen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Enzymaktivität von LipA8b2 abhängig von dem verwendeten Expressionswirt ist. Die Enzymaktivität im Rhodamin B-Test korreliert ähnlich wie die bei der Tributyrin-Umsetzung nicht mit der Proteinakkumulation.

3.1.3.3 Vergleichende quantitative Analyse von Ganzzellextrakten mittels des Substrats *p*-Nitrophenylcaproat

Um die Enzymaktivität der Hydrolasen in den verschiedenen Wirten komparativ analysieren zu können, wurde ein quantitativer Aktivitätstest auf Grundlage des Substrats *p*-Nitrophenylcaproat (C6) durchgeführt. Die hier untersuchten lipolytischen Enzyme weisen eine Spezifität von Substraten mit mindestens C6 – C10 Kettenlänge auf (Tab. 13), so dass die Hydrolasen in der Lage sein sollten, *p*-Nitrophenolcaproat umzusetzen. Um zu untersuchen, ob die Enzymaktivität durch höhere Reaktionstemperaturen gesteigert werden kann, wurde neben der Substratumsetzung bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C auch die Enzymaktivität bei einer Temperatur von 70 °C analysiert.

Die quantitative Ermittlung lipolytischer Aktivität basiert auf der Umsetzung von *p*-Nitrophenolcaproat zu *p*-Nitrophenol und Hexansäure. Die Reaktion führt zu einem gelben Farbumschlag, der bei einer Wellenlänge von 410 nm photometrisch bestimmt wird. Die resultierende Absorption ist daher ein Maß für die Aktivität der Lipase und kann für die Berechnung der Enzymaktivität eingesetzt werden (siehe 2.4.12.3).

Für die quantitative Analyse der Enzymaktivität wurden Expressionskulturen, wie unter 2.2.1, 2.2.3, 2.2.4 beschrieben, kultiviert. Für die Durchführung des Aktivitätstest wurden Proben während der exponentiellen ($OD_{580/660nm} = 1$) und stationären Phase der Expressionskulturen entnommen. Diese wurden aufgeschlossen und in den *p*NPC-Test eingesetzt. Die Reaktionsumsetzung erfolgte für 5 min, wie unter 2.4.12.3 beschrieben. Die Ergebnisse der Enzymaktivität wurden auf die gleiche Zellzahl bezogen. Dabei ist zu beachten, dass diese nicht mit dem OD-Messwert der Zelldichte gleichzusetzen ist, da *E. coli*- und *P. putida*-Kulturen bei einer $OD_{580nm} = 1$ eine 3,33-fach größere Zellzahl mit 1×10^9 Zellen/ml aufweisen als *R. capsulatus*-Kulturen mit 3×10^8 Zellen/ml (gemessen als OD_{660nm}).

Die normierten Ergebnisse der Substratumsetzung bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C in den Wirten *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus* sind in Abbildung 12 dargestellt.

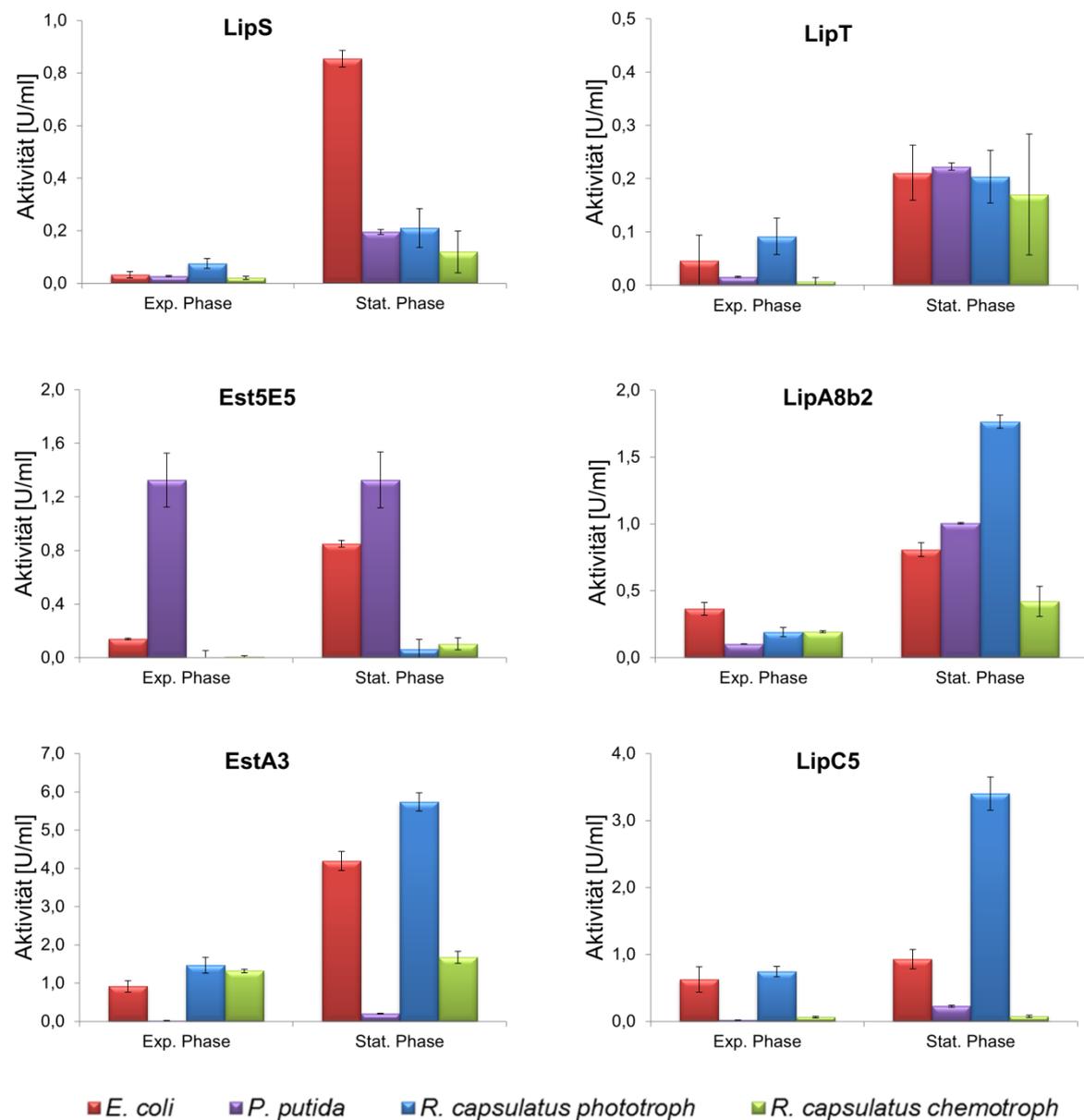


Abb. 12: Nachweis lipolytischer Aktivität in *E. coli* BL21 (DE3), *P. putida* KT2440T7 und *R. capsulatus* B10ST7 unter phototrophen und chemotrophen Bedingungen mittels des Substrats *pNPC* bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C

Dargestellt sind die vergleichenden Enzymaktivitäten der Hydrolasen LipS, LipT, Est5E5, LipA8b2, EstA3 und LipC5, die im Vektor *pRhotHi-2* in den verschiedenen Expressionswirten *E. coli*, *R. capsulatus* und *P. putida* synthetisiert wurden. Die Durchführung des photometrischen *pNPC*-Aktivitätstests erfolgte bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C. Die Aktivitäten wurden auf gleiche Zellzahlen von *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus* normiert. Der entsprechende Wert des Leervektors wurde bereits von den dargestellten Werten abgezogen. Exponentielle und stationäre Wachstumsphasen sind als „Exp.“ und „Stat.“ abgekürzt. Die Analyse der Substratumsetzung erfolgte mit Proben, die aus der exponentiellen und stationären Phase der Kulturen entnommen wurden (genaue Angaben zu der Probenentnahme siehe 2.2.2.1, 2.2.2.2, 2.2.3, 2.2.4).

Es konnte gezeigt werden, dass die lipolytischen Enzyme in den verschiedenen Expressionswirten *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus* unterschiedlich hohe Enzymaktivitäten aufweisen.

Signifikante Enzymaktivitäten konnten in den *E. coli*-Expressionskulturen für die Hydrolasen LipS, Est5E5, LipA8b2, EstA3 und LipC5 nachgewiesen werden, wobei im direkten Aktivitätsvergleich mit den anderen Expressionswirten ausschließlich die Lipase LipS in *E. coli* die höchste Enzymaktivität aufwies. In weiteren Versuchen konnte eine Aktivitätssteigerung von LipS bei einer Erhöhung der Reaktionstemperatur von 37 °C auf 70 °C beobachtet werden. Die anderen lipolytischen Enzyme blieben durch die Temperaturveränderung weitgehend unbeeinflusst (Daten im Anhang, Abb. 34).

Die Aktivitätswerte der *P. putida*-Kulturen belegen, dass eine Aktivität der Hydrolasen Est5E5 und LipA8b2 nachgewiesen werden konnte, wobei die Lipase LipA8b2 die höchste Substratumsetzung im Vergleich zu den Expressionswirten *E. coli* und *R. capsulatus* aufweist. Die Ergebnisse der Substratumsetzung bei einer Reaktionstemperatur von 70 °C zeigen, dass die erhöhte Temperatur einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität dieser beiden Proteine aufweist (Daten im Anhang, Abb. 34).

In den Aktivitätstests der phototrophen *R. capsulatus*-Expressionskulturen konnte eine Substratumsetzung der lipolytischen Enzyme LipA8b2, EstA3 und LipC5 beobachtet werden. Im Vergleich mit den Expressionswirten *E. coli* und *P. putida* konnte für diese Hydrolasen die höchste Substratumsetzung in den phototrophen Expressionskulturen von *R. capsulatus* bestimmt werden. Die Temperaturerhöhung auf 70 °C während der Substratumsetzung erbrachte eine schwache Aktivitätssteigerung der Esterase EstA3. In allen anderen Fällen führte die erhöhte Temperatur zu einer Verminderung der Enzymaktivität (Daten im Anhang, Abb. 34).

Dem gegenüber stehen die Aktivitätsstudien der chemotrophen *R. capsulatus*-Kulturen, in denen ausschließlich schwache Aktivitäten der Lipase LipA8b2 und EstA3 nachgewiesen werden konnten. Es konnten keine signifikanten Abweichungen der Enzymaktivität durch die Temperaturerhöhung auf 70 °C beobachtet werden. Die Befunde demonstrieren, dass die Nutzung von *R. capsulatus* unter phototrophen Wuchsbedingungen für die funktionelle Expression der lipolytischen Enzyme in diesem Fall besser geeignet ist (Daten im Anhang, Abb. 34).

Es konnte gezeigt werden, dass die lipolytischen Enzyme unterschiedliche Enzymaktivitäten in Abhängigkeit des ausgewählten Expressionswirts aufweisen. Dabei korreliert wie im Tributyrin- und Rhodamin-Aktivitätstest die Proteinakkumulation nicht mit der Enzymaktivität. Die unterschiedlichen Enzymaktivitäten der lipolytischen Enzyme in den verschiedenen Expressionswirten können auf Limitierungen bei der heterologen Expression zurückzuführen sein.

Ursachen einer verminderten oder nicht funktionellen Proteinsynthese können beispielsweise die von den Organismen unterschiedliche Nutzung des universellen Codes, toxische Effekte auf das Zellwachstum oder proteolytische Aktivitäten, die gegen das heterologe Protein gerichtet sind, sein. Somit konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz verschiedener Wirte die maximale Enzymaktivität positiv beeinflusst werden kann.

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die heterologe Expression in den Mikroorganismen *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus* unterschiedliche Ergebnisse der Proteinakkumulation und der Enzymaktivität erbringen. Demnach eignet sich die komparative Nutzung von alternativen Wirten für die Entdeckung bislang nicht identifizierter Gene. Die Expressionsstudien zeigten, dass phototrophe Expressionskulturen von *R. capsulatus* im Vergleich zu *E. coli*- und *P. putida*-Expressionskulturen ähnliche maximale Zelldichten erreichten, wobei jedoch keine Limitierungen des Zellwachstums durch die heterologe Expression hervorgerufen wurden. In *R. capsulatus* konnten lediglich vier der sechs Lipasen synthetisiert werden. Diese zeigen jedoch im Vergleich zu *E. coli* eine annähernd gleiche Proteinakkumulation pro Zelle, ohne dabei eine Proteindegradation in der stationären Phase aufzuweisen. Im Tributyrin-Aktivitätstest mit *R. capsulatus*-Klonen konnten im Gegensatz zu *E. coli* und *P. putida* nur schwache Enzymaktivitäten nachgewiesen werden, so dass Tributyrin für das funktionsbasierte Screening von Metagenom-Genen in *R. capsulatus* nicht das bevorzugte Substrat ist. Im quantitativen Enzymtest konnte gezeigt werden, dass in den Expressionskulturen von *R. capsulatus* drei Enzyme die maximale Aktivität und ein Enzym eine durchschnittliche Aktivität aufwiesen, so dass sich *R. capsulatus* als geeigneter alternativer Expressionswirt für die funktionsbasierte Analyse von Genen aus dem Metagenom darstellt.

3.2 *R. capsulatus* als alternativer Expressionswirt für die heterologe Synthese von Membranproteinen

Membranproteine sind in viele wichtige zelluläre Prozesse involviert und repräsentieren die größte Proteinklasse, gegen die Medikamente zur Behandlung verschiedenster Krankheiten gerichtet sind (Bernaudat *et al.*, 2011). Für die Entwicklung neuer Medikamente ist die Entschlüsselung der Struktur und Funktion erforderlich (Wagner *et al.*, 2006). Daher besteht großes Interesse an der funktionellen Synthese von Membranproteinen. Aufgrund der hydrophoben Strukturelemente, aus denen Membranproteine aufgebaut sind, führt die heterologe Synthese im Standardwirt *E. coli* allerdings häufig zu der Bildung von unlöslichen *inclusion bodies*. Die Bildung dieser unlöslichen Proteinaggregate kann möglicherweise durch die Einlagerung der Membranproteine in die Membran vermieden werden. Auch neben einer nicht ausreichenden Membranfläche gibt es noch weitere Limitierungen der heterologen Expression in *E. coli*. Unter anderem handelt es sich hierbei um fehlende Kofaktoren oder prosthetische Gruppen, um den unterschiedlichen Codongebrauch des Ursprungs- und Wirtsorganismus, durch heterolog synthetisierte Proteine ausgelöste toxische Effekte auf den Zellmetabolismus oder um eine unterschiedliche Einlagerung von Membranproteinen der prokaryotischen und eukaryotischen Organismen.

Die Expression in einem alternativen Organismus ist eine Möglichkeit, diese Limitierungen zu überwinden. *R. capsulatus*, als besonderer Vertreter dieser alternativen Expressionswirte, besitzt einzigartige physiologische Eigenschaften. Das phototrophe Bakterium ist in der Lage, zwei verschiedene Formen der Energiegewinnung, die aerobe Atmung und die anoxygene Photosynthese zu nutzen. Unter phototrophen Bedingungen wird in Abwesenheit von Sauerstoff die Bildung der Photosynthesekomplexe zur Nutzung der Photosynthese induziert, die mit einer gleichzeitigen Vergrößerung der Membranfläche einhergeht (Gregor & Klug, 1999; Gubellini *et al.*, 2007; Niederman, 2013; Woronowicz *et al.*, 2013). Der Gehalt an Photosynthesekomplexen in den intracytoplasmatischen Membranen und damit die Ausbildung der ICM ist abhängig von dem Sauerstoffgehalt und der Lichtintensität der Umgebung (Drews, 2013; Gregor & Klug, 1999; Woronowicz *et al.*, 2013). Möglicherweise kann dieses zusätzlich gebildete Membransystem für die Einlagerung heterologer Membranproteine während der Expression genutzt werden (Laible *et al.*, 2004). Ein weiterer Vorteil des Expressionswirts *R. capsulatus* ist die Bereitstellung verschiedenster Kofaktoren und prosthetischen Gruppen, die je nach gewählter Kultivierung gebildet werden und für die funktionelle Synthese heterologer komplex aufgebauter Proteine genutzt werden können.

In vorausgegangenen Studien konnte *R. capsulatus* als alternativer Expressionswirt für die Synthese von löslichen Proteinen etabliert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von YFP in *R. capsulatus* unter phototrophen Wuchsbedingungen durchaus vergleichbare Proteinausbeuten wie im Standardwirt *E. coli* erzielt (Katzke *et al.*, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit steht die Evaluierung des *R. capsulatus*-Expressionssystems für die heterologe Synthese von funktionellen Membranproteinen im Vordergrund. Dabei sollte zunächst analysiert werden, ob die heterologen Membranproteine in *R. capsulatus* synthetisiert werden können und ob die gezielte Nutzung der unterschiedlichen Anzuchtbedingungen die Synthese der heterologen Membranproteine positiv beeinflusst. Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass in die zusätzlichen intracytoplasmatischen Membranen nicht nur die Photosynthesekomplexe eingelagert werden können, sondern – in Konkurrenz dazu – auch heterolog synthetisierte Membranproteine. Daher sollte im Weiteren vergleichend in *R. capsulatus* und *E. coli* untersucht werden, ob die Membranproteine als unlösliche Proteinaggregate synthetisiert oder in die Zellmembran eingelagert werden und dabei potentiell funktionelles Protein gebildet wird. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die heterologen Membranproteine in die Cytoplasmamembran oder in die intracytoplasmatischen Membranen von *R. capsulatus* inkorporiert werden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollten Lokalisationsstudien der Membranfraktionen durchgeführt werden, bei denen die Fragmente der Cytoplasmamembran und die intracytoplasmatischen Vesikel aufgrund unterschiedlicher Dichten getrennt und analysiert werden. Um eine mögliche Einlagerung der heterologen Proteine in die ICM zu verifizieren, sollte ebenfalls einerseits der Gehalt an Photopigment bindenden Proteinen analysiert werden, um eine mögliche Verdrängung dieser nachzuweisen. Andererseits sollte die Zellmorphologie untersucht werden, um eine mögliche Vergrößerung oder Strukturveränderung der intracytoplasmatischen Vesikel aufzuzeigen, die durch die Einlagerung der heterologen Proteine hervorgerufen wird. Die erfolgreiche Einlagerung der Proteine in die Membran ist jedoch nicht direkt mit der Funktionalität des Proteins gleichzusetzen. Komplex aufgebaute Proteine benötigen häufig die Anwesenheit bestimmter Kofaktoren oder prosthetischer Gruppen, um in ihre aktive Form umgewandelt werden zu können. Daher sollte zum Abschluss der Charakterisierung die Funktionalität bzw. die richtige Konformation eines der ausgewählten Proteine untersucht werden.

Für die Evaluierung des *R. capsulatus*-Expressionssystems wurden die drei Membranproteine CYP175A1 aus *Thermus thermophilus*, Squalenepoxidase aus *Stigmatella aurantiaca* und Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium* verwendet (Tab. 14). Diese Membranproteine wurden vor allem aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Unterschiede ausgewählt.

So handelt es sich bei der Monoxygenase CYP175A1 um ein membranassoziiertes Protein, welches über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran assoziiert ist (persönliche Mitteilung, Prof. Dr. Vlada Urlacher). Für die funktionelle Synthese benötigt CYP175A1 die Bereitstellung des Kofaktors Häm. Durch die Auswahl eines Proteins mit diesen Besonderheiten kann überprüft werden, ob *R. capsulatus* als Expressionswirt für die Synthese von komplexen Proteinen, die die Anwesenheit bestimmter Kofaktoren benötigen, geeignet ist.

Die Squalenepoxidase gilt als putatives Membranprotein. Internetbasierten Berechnungen zufolge verfügt das Protein über null bis drei transmembrane Helices. Bislang konnte die Squalenepoxidase nur in unlöslichen Proteinaggregaten in *E. coli* synthetisiert werden. Deshalb wurde dieses Protein ausgewählt, um zu untersuchen, ob *R. capsulatus* ebenfalls ein geeigneter Wirt für die Synthese von heterologen Membranproteinen sein kann, deren Akkumulation in anderen Expressionssystemen ausschließlich zur Bildung von *inclusion bodies* führte.

Bakteriorhodopsin zählt zu den integralen Membranproteinen und besitzt sieben transmembrane Helices. Die Anzahl der transmembranen Helices ist oftmals ein Maß für die erfolgreiche Synthese des Proteins. Die heterologe Synthese von Proteinen mit einer erhöhten Anzahl von Transmembranhelices führt häufig zu der Bildung von *inclusion bodies*. Die Analyse von Bakteriorhodopsin weist die Eignung von *R. capsulatus* als Expressionswirt für schwer synthetisierbare heterologe Membranproteine auf.

Im Folgenden werden die Funktionen und Eigenschaften dieser Proteine kurz erläutert.

Tab. 14: Eigenschaften der ausgewählten heterologen Membranproteine

¹Die Vorhersage der transmembranen Helices erfolgte mit acht verschiedenen Topologie-Vorhersage-Programmen (siehe 2.1.8).

| Protein | Funktion | Aminosäuren | Molekulargewicht [kDa] | Topologie ¹ | Herkunftsorganismus | Referenz |
|----------|-----------------------------|-------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| CYP175A1 | Cytochrom P450 Monoxygenase | 389 | 44 | 0 | <i>Thermus thermophilus</i> | Yano <i>et al</i> , 2003 |
| SqEp | Squalenepoxidase | 468 | 51 | 0-3 | <i>Stigmatella aurantiaca</i> | - |
| bR | Bakteriorhodopsin | 262 | 28 | 7 | <i>Halobacterium salinarium</i> | Oesterhelt & Stoeckenius, 1981 |

3.2.1 Die Monooxygenase CYP175A1 aus *Thermus thermophilus*

Die Monooxygenase CYP175A1 aus *Thermus thermophilus* ist in die Gruppe der thermophilen Cytochrom-P450 Monooxygenasen einzuordnen. Die P450-Cytochrome binden eisenhaltige Häme als prosthetische Gruppe und sind an vielen physiologischen Reaktionen wie der Bereitstellung von Kohlenstoffquellen, der Entgiftung von Pharmaka sowie der Biosynthese von Steroiden, Vitaminen oder Antibiotika beteiligt (Mandai *et al.*, 2009; Urlacher & Girhard, 2012; Yano *et al.*, 2003). Sie kommen sowohl in Bakterien (Lawson *et al.*, 2004) als auch in höheren Organismen wie Pilzen (Kelly *et al.*, 2009), Pflanzen (Nelson *et al.*, 2004a), Hefen, Insekten und Säugetieren (Nelson *et al.*, 2004b) vor. Interessanterweise konnten jedoch in *E. coli* keine CYP-Proteine identifiziert werden (Urlacher & Girhard, 2012). In den letzten 15 Jahren erregten die P450-Cytochrome aufgrund ihres Potentials als Biokatalysatoren für regio- und stereospezifische Oxidationen von nicht aktivierten Kohlenwasserstoffen großes Interesse in der Biotechnologie (Urlacher & Girhard, 2012).

Die Monooxygenase CYP175A1 aus *T. thermophilus* konnte als erste β -Carotin-Hydroxylase der P450-Familie identifiziert werden. Hierbei katalysiert CYP175A1 die Hydroxylierung von β -Carotin zu β -Cryptoxanthin und im nächsten Schritt die Bildung von Zeaxanthin (Abb. 13), indem jeweils an den β -Ring von β -Carotin eine Hydroxylgruppe hinzugefügt wird (Blasco *et al.*, 2004; Momoi *et al.*, 2006).

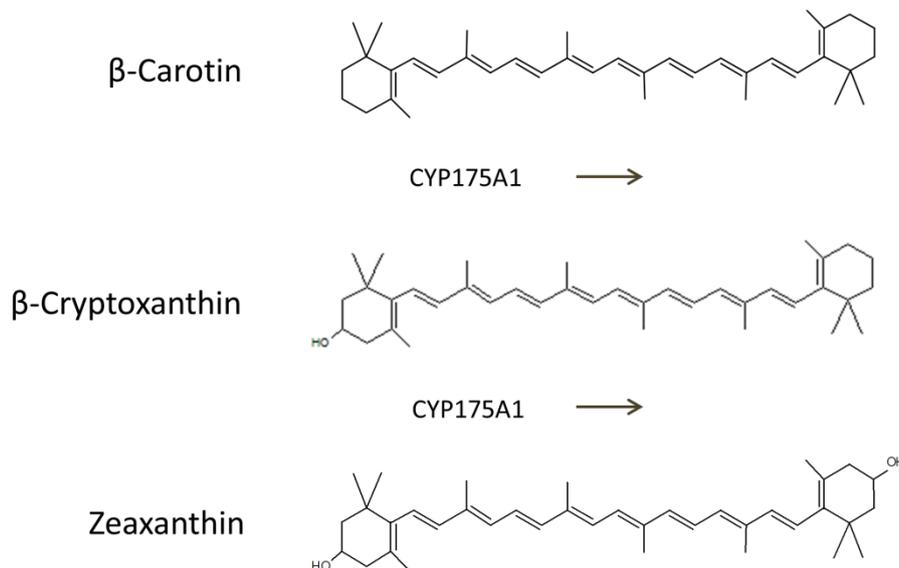


Abb. 13: Die katalytische Reaktion der Monooxygenase CYP175A1

Die Monooxygenase aus *T. thermophilus* katalysiert die Hydroxylierung von C3 am β -Ring von β -Carotin zu β -Cryptoxanthin. Im zweiten Reaktionsschritt wird β -Cryptoxanthin an der C3'-Position des β -Rings zu Zeaxanthin hydroxyliert.

Die Struktur von CYP175A1 konnte inzwischen mit einer Auflösung von 1,8 Angström durch Röntgenstrukturanalyse als zweite Struktur der thermophilen P450-Cytochrome entschlüsselt werden (Yano *et al.*, 2003). Die Monooxygenase besteht aus 389 Aminosäuren. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, zeigt die dreidimensionale Struktur eine für P450-Cytochrome typische Prisma-gefaltete Anordnung, die aus 17 α -Helices und 11 β -Faltblättern besteht. Die prosthetische Häm-Gruppe ist an die Schwefelgruppe des Cys-336 des Proteins gebunden (Yano *et al.*, 2003). Interessanterweise weicht die Sequenz von CYP175A1 von anderen P450-Cytochromen deutlich ab. Dabei zeigt CYP175A1 mit 26 % die höchste Sequenzidentität mit Cytochrom P450 BM-3 aus *Bacillus megaterium* (Goyal *et al.*, 2012). CYP175A1 unterscheidet sich von anderen Monooxygenasen hinsichtlich ihrer Struktur und Größe, indem die meisten anderen bakteriellen Monooxygenasen ein größeres Molekulargewicht aufweisen. Eine weitere abweichende Eigenschaft ist die hohe Thermostabilität von CYP175A1, die deutlich über den anderen P450-Cytochromen liegt. So liegt bei einer Temperatur von 83 - 87 °C CYP175A1 zu 50 % in seiner korrekt gefalteten aktiven Form und zu 50 % in seiner denaturierten Form vor (Behera & Mazumdar, 2010; Yano *et al.*, 2003).

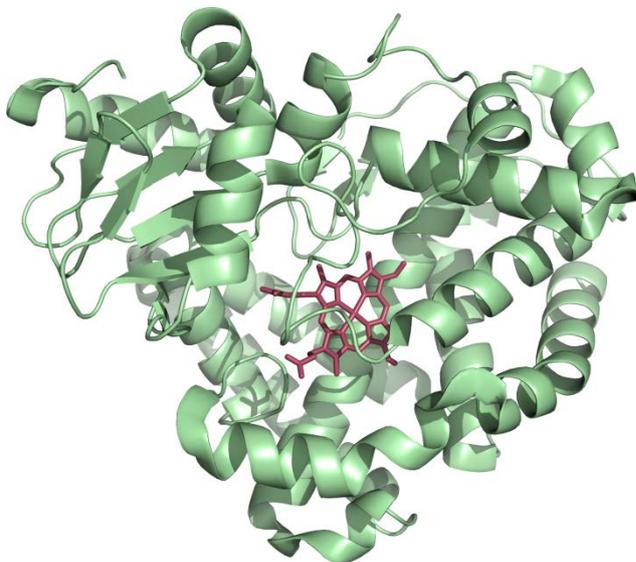


Abb. 14: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von CYP175A1 aus *T. thermophilus*

Die Abbildung zeigt die dreidimensionale Struktur von CYP175A1, die aus 17 α -Helices und 11 β -Faltblättern besteht. Die prosthetische Häm-Gruppe ist an die Schwefelgruppe des Cys-336 des Proteins gebunden. Die grünen Strukturen repräsentieren α -Helices und β -Faltblätter, während die prosthetische Häm-Gruppe in violett dargestellt ist. Die Abbildung wurde mit der PDB-Datei 1N97 und dem Programm Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC) erstellt.

3.2.2 Die Squalenepoxidase aus *Stigmatella aurantiaca*

Die Squalenepoxidase aus *Stigmatella aurantiaca* wird der Proteinklasse der Monooxygenasen zugeordnet, die durch eine katalytische Reaktion ein Sauerstoffatom auf ein Substrat übertragen. Die katalytische Reaktion der Squalenepoxidase ist an verschiedenen Biosynthesewegen wie an der von Steroiden (Nakano *et al.*, 2007) und Phytohormonen (Rasbery *et al.*, 2007) beteiligt.

Proteinhomologe der Squalenepoxidase kommen in Bakterien (Nakano *et al.*, 2007), Pilzen (Rocha *et al.*, 2006), Pflanzen (Rasbery *et al.*, 2007), Hefen (Ruckenstuhl *et al.*, 2008) und Säugetieren vor (Laden *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 1982). Im Fokus der medizinischen Forschung und Weiterentwicklung stehen neue Pharmazeutika, in denen die Squalenepoxidase als Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese als Angriffspunkt für die Inhibierung der Synthese von Cholesterin dient (Chugh *et al.*, 2003).

Bei der Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca* handelt es sich um ein myxobaterielles Protein, das an der Steroidbiosynthese von Cycloartenol beteiligt ist. Dabei katalysiert die Squalenepoxidase den ersten Schritt der Cycloartenol-Synthese, indem Squalen zu (S)-2,3-Oxidosqualene oxidiert wird (Abb. 15). In eukaryotischen Organismen ist die Oxidation von Squalen zu (S)-2,3-Oxidosqualene der erste katalytische Schritt der Cholesterin-Biosynthese (Laden *et al.*, 2000). Während die Steroidbiosynthese von beispielsweise Cholesterin in eukaryotischen Organismen für die Kontrolle der Fluidität und Flexibilität der eukaryotischen Zellmembran benötigt wird (Ourisson & Nakatani, 1994), ist die Synthese von Steroiden in bakteriellen Organismen eher ungewöhnlich (Nakano *et al.*, 2007).



Abb. 15: Die katalytische Reaktion der Squalenepoxidase

Die Squalenepoxidase katalysiert in Gegenwart eines Sauerstoffmoleküls die Oxidation von Squalen zu (S)-2,3-Oxidosqualen.

Die Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca* besteht aus 468 Aminosäuren. Über die strukturellen Eigenschaften der Monooxygenase ist zum heutigen Zeitpunkt wenig bekannt, da strukturelle Analysen durch Limitierungen der Proteinsynthese behindert wurden (persönliche Mitteilung, Prof. Dr. R. Müller, Helmholtz-Institut Saarbrücken). Daher wurde mit Hilfe internetbasierter Programme eine Topologie-Vorhersage erstellt (siehe 2.1.8). Diese beinhaltet, dass die Squalenepoxidase 0-3 transmembrane Helices besitzt (Tab. 14).

3.2.3 Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium*

Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium* ist der Familie der sieben Helix-Membranproteine zugeordnet, die als Chromophor Retinal gebunden haben (Hohenfeld *et al.*, 1999). Es stellt das Schlüsselprotein der halobakteriellen Photosynthese dar und ist als einziges Protein in der Zellmembran lokalisiert (Henderson & Unwin, 1975; Oesterhelt & Stoeckenius, 1973; Saeedi *et al.*, 2012). Dabei handelt es sich um eine lichtgesteuerte Protonenpumpe, die Lichtenergie in einen elektrochemischen Gradienten für die Produktion von ATP und den Ionentransport umwandelt (Dunn *et al.*, 1981; Kouyama *et al.*, 1987; McCurley & Glazier, 1995; Oesterhelt & Stoeckenius, 1973; Saeedi *et al.*, 2012). Das Vorkommen von Bakteriorhodopsin beschränkt sich auf die Familie der Halobakterien, jedoch gibt es ein ähnlich aufgebautes Molekül, das Rhodopsin, welches in der Retina von Vertebraten zu finden ist (Yoshizawa, 1984). Halobakterien gehören zu der Gruppe der extrem halophilen Archaeen, die überwiegend in Salzseen und Salinen verbreitet sind. Bakteriorhodopsin stellt aufgrund seiner besonderen Eigenschaften, die unter anderem auf der strukturellen Ähnlichkeit zu den GPCR beruht, ein Modellprotein für deren Erforschung dar.

Die Struktur von Bakteriorhodopsin konnte mittels NMR-Spektroskopie entschlüsselt werden (Patzelt *et al.*, 2002). Das native Protein ohne Signalsequenz besteht aus 248 Aminosäuren (Karnik *et al.*, 1990), die in sieben annähernd parallelen Helices zu einer Pore angeordnet sind (Abb. 16).

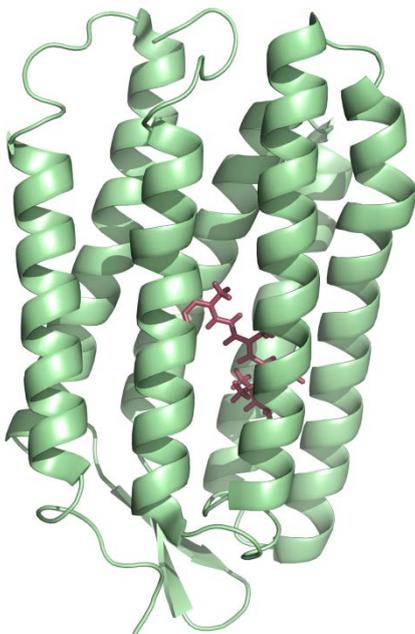


Abb. 16: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von Bakteriorhodopsin mit eingelagertem Retinal aus *H. salinarium*

Die Abbildung zeigt die dreidimensionale Struktur von Bakteriorhodopsin. Es besteht aus sieben transmembranen Helices (grüne Strukturen), die zu einer Pore angeordnet sind. In die Pore eingelagert ist das Chromophor Retinal, hier als violette Struktur dargestellt. Die Abbildung wurde mit der PDB-Datei 1R84 und dem Programm Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC) erstellt.

In der Pore ist Retinal, welches das Chromophor des Proteins darstellt, über eine Imidbindung (auch als Schiff'sche Base bezeichnet) an die Aminfunktion der Aminosäure Lys216 gebunden (Lanyi, 2004). Ohne das gebundene Chromophor Retinal handelt es sich um das Apoprotein Bakterioopsin (Hohenfeld *et al.*, 1999). Da jedoch oftmals von Bakteriorhodopsin gesprochen wird, ohne dass Chromophor eingelagert ist, wurde auch in dieser Arbeit das Apoprotein ohne gebundenes Retinal als Bakteriorhodopsin bezeichnet.

Durch Photoisomerisierung des Retinals wird eine Änderung der Proteinstruktur hervorgerufen, die dazu führt, dass Protonen von der cytoplasmatischen zur extrazellulären Seite durch die Pore von Bakteriorhodopsin transportiert werden. Dabei durchläuft das Protein einen Photozyklus.

3.2.4 Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die heterologe Synthese von Membranproteinen in *R. capsulatus*

Im Rahmen dieses Teilprojekts der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit *R. capsulatus* als Expressionswirt für die Synthese von Membranproteinen geeignet ist. *R. capsulatus* gehört zu den fakultativ phototrophen Bakterien und ermöglicht die strikte Kontrolle der Photosynthese-Genexpression, so dass dieser Organismus hervorragend als Testsystem eingesetzt werden kann, um zu überprüfen, inwieweit die Phototrophie, die mit der ICM-Ausbildung und der Induktion der Chaperon- und Sekretionssysteme einhergeht, die Synthese heterologer Membranproteine begünstigt.

Unter phototrophen Wachstumsbedingungen in Abwesenheit von Sauerstoff wird in *R. capsulatus* ein zusätzliches intracytoplasmatisches Membransystem gebildet, welches die Membranfläche signifikant vergrößert und somit möglicherweise für die Einlagerung von rekombinanten Membranproteinen genutzt werden könnte. In diesem Zusammenhang wäre es zudem denkbar, dass ein Wechsel der Anzuchtbedingungen von chemotrophen Vorkulturen zu phototrophen Hauptkulturen mit einer gleichzeitigen Induktion der heterologen Genexpression die Einlagerung synthetisierter rekombinanter Membranproteine in die ICM begünstigt. Möglicherweise könnten bei gleichzeitiger Ausbildung der ICM und der heterologen Synthese von Membranproteinen diese verstärkt in das Membransystem eingelagert werden, da dieses während seiner Entstehung nicht bereits mit den Proteinen des Photosyntheseapparats angereichert ist. Des Weiteren begünstigt möglicherweise die Bildung der ICM mit der zeitgleichen Einlagerung der Proteine die korrekte Faltung der heterologen Membranproteine. Möglicherweise kann aber auch ein Wechsel der Anzuchtbedingungen von phototrophen Vorkulturen zu chemotrophen Hauptkulturen zu einer verbesserten Einlagerung der heterologen Membranproteine führen. Die phototrophe Vorkultivierung ermöglicht die Ausbildung eines intracytoplasmatischen Membransystems. Durch

den Wechsel zu chemotrophen Anzuchtbedingungen werden keine weiteren photosynthetischen Proteine synthetisiert und in die intracytoplasmatischen Membranen integriert. Bereits bestehende Proteine der Photosynthesekomplexe werden durch die Steigerung des Sauerstoffgehalts degradiert (Arai *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 1986). Die Degradation der photosynthetischen Proteine könnte somit auch eine effizientere Proteineinlagerung ermöglichen, da die rekombinanten Membranproteine nicht mehr in Konkurrenz zu den Proteinen der Photosynthesekomplexe eingebaut werden müssen.

Zur Überprüfung der aufgestellten Hypothesen wurden die Gene, die für die drei Membranproteine kodieren, mit Hilfe des *broad host range* Vektors pRhotHi-2 (1.4) exprimiert. Die Zielgenexpression stand dabei unter Kontrolle eines T7-Promotors. Als Expressionsstamm wurde der *R. capsulatus* B10ST7 verwendet, der eine Kopie des T7-Polymerasegens auf dem Chromosom trägt (Katzke *et al.*, 2010).

Anaerob phototrophe und aerob chemotrophe Expressionskulturen wurden jeweils mit phototrophen und chemotrophen Vorkulturen inokuliert, so dass sich ausschließlich phototrophe ($-O_2 \rightarrow -O_2$) und chemotrophe ($+O_2 \rightarrow +O_2$) Kulturen sowie Expressionskulturen mit einem Wechsel von phototrophen zu chemotrophen Anzuchtbedingungen ($-O_2 \rightarrow +O_2$) und umgekehrt ($+O_2 \rightarrow -O_2$) ergaben (im Folgenden als *shift*-Bedingungen bezeichnet). Phototrophe Kulturen wurden anaerob bei 30 °C unter Standardbedingungen inkubiert (2.2.2.1). Chemotrophe Bedingungen wurden unter Anwesenheit von Sauerstoff bei 30 °C im Dunkeln kultiviert (2.2.2.2). In Abbildung 17 sind im Folgenden die Anzuchten der Expressionskulturen mit $-O_2$ und $+O_2$ angegeben. Die Induktion der T7-RNA-Polymerase-abhängigen Genexpression erfolgte durch Zugabe von 8 mM Fruktose zum Zeitpunkt der Inokulation. Als Kontrolle wurden *R. capsulatus*-Kulturen, die den Leervektor pRhotHi-2 trugen, unter gleichen Bedingungen angezogen. Für die Analyse des Zellwachstums wurden die Zelldichten der Expressionskulturen in regelmäßigen Intervallen bestimmt. Um die Produktion der heterologen Proteine nachzuweisen, wurden in der exponentiellen Phase ($OD_{660nm} = 1$) sowie in der stationären Phase (nach 96 h) Proben (1,5 ml) für die Immunodetektion der mit dem His₆-Tag markierten Proteine mittels *Western Blot* entnommen. Das aufgetragene Probenvolumen wurde auf eine Zelldichte von 0,2 (OD_{660nm}) normiert.

Das Ergebnis der Wachstumsstudien sowie des immunologischen Proteinnachweises ist in Abbildung 17 dargestellt.

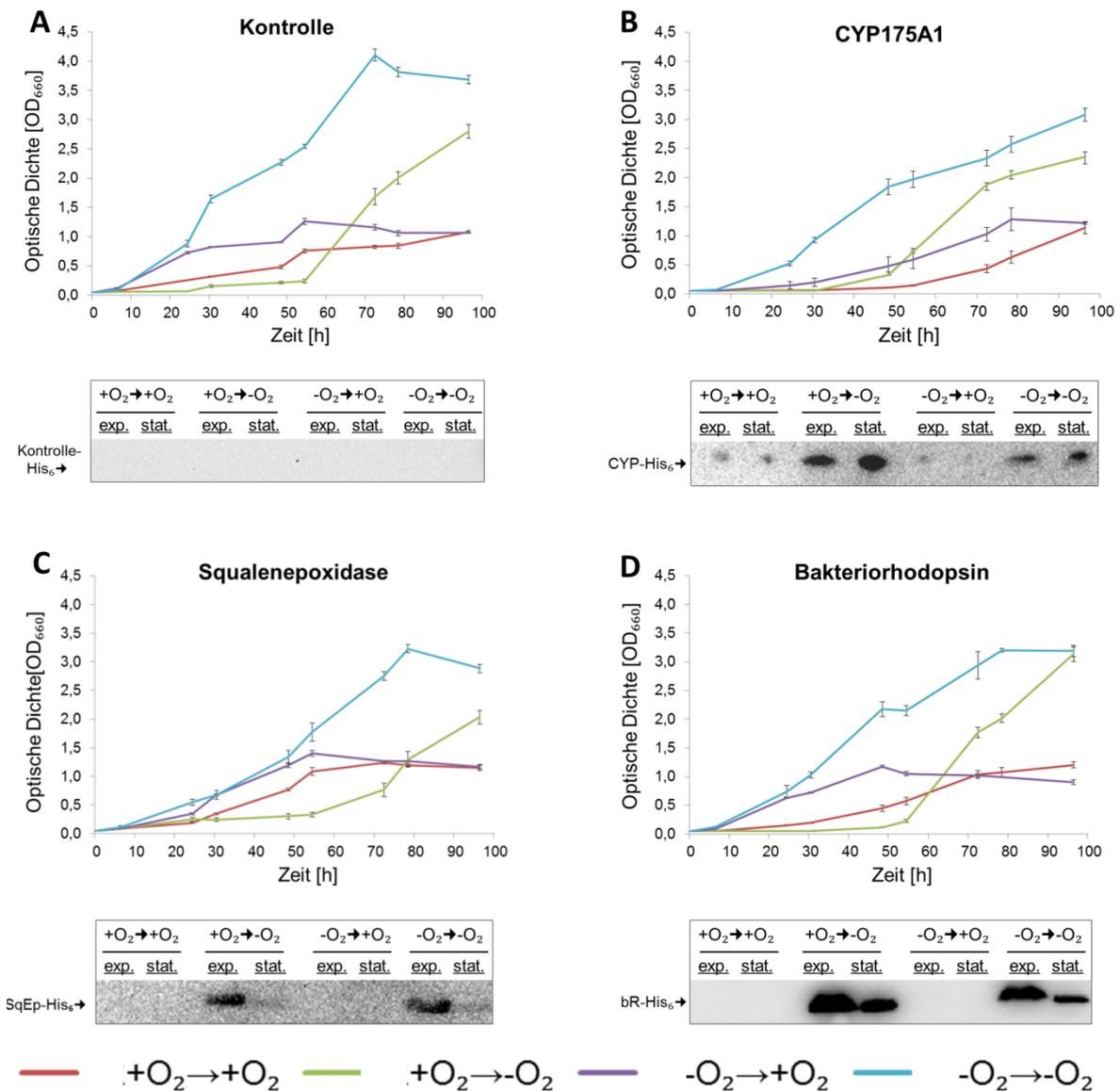


Abb. 17: Synthese der Membranproteine CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin in *R. capsulatus* unter verschiedenen Anzuchtbedingungen

Gezeigt ist das Wachstumsverhalten von *R. capsulatus* B10ST7 mit dem Vektor pRhotHi-2 (A) als Kontrolle sowie mit pRhotHi-2-Derivaten, die Gene der CYP175A1 (B), Squalenepoxidase (C) und Bakteriorhodopsin (D) tragen. Für die Expressionsstudien wurden die Expressionskulturen unter phototrophen (-O₂ → -O₂) und chemotrophen (+O₂ → +O₂) Bedingungen sowie *shift*-Bedingungen von phototrophem zu chemotrophem Wachstum (-O₂ → +O₂) und umgekehrt (+O₂ → -O₂) kultiviert. Die Werte geben den Mittelwert einer Dreifachbestimmung an. Die Fehlerbalken zeigen die entsprechende Standardabweichung. Die Immunodetektion der Proteine erfolgte mit Proben, die aus der exponentiellen (OD_{660nm} = 1) und stationären (nach 96 h) Phase des Zellwachstums entnommen wurden, hier als „exp.“ und „stat.“ gekennzeichnet. Die aufgetragenen Zellextrakte entsprachen einer OD_{660nm} = 0,2. Die Detektion erfolgte durch eine immunologische Nachweisreaktion mittels des HRP-Antikörpers, der spezifisch den His₆-Tag der Proteine nachwies.

Die Wachstumskurven des *R. capsulatus*-Kontrollstamms B10ST7 (pRhotHi-2) sind in Abbildung 17 A dargestellt. Unter ausschließlich phototropher Kultivierung zeigt der Stamm eine typische

Wachstumskurve mit einer Latenzphase, einer exponentiellen und einer stationären Wuchsphase (blaue Linie). Am Ende des Zellwachstums (80 h) erreicht die Kultur eine maximale Zelldichte von $OD_{660nm} = 4$. Chemotrophe Kulturen (rote Linie) und Kulturen, die unter *shift*-Bedingungen von phototroph zu chemotroph (violette Linie) angezogen wurden, erreichen hingegen eine deutlich geringere Zelldichte von $OD_{660nm} = 1 - 1,5$ als phototroph kultivierte Kulturen. Kulturen unter *shift*-Bedingungen von chemotroph zu phototroph (grüne Linie) zeigen eine auffällig lange Latenzphase. Erst nach 55 Stunden sind die Zellen an die veränderten Anzuchtbedingungen adaptiert und gehen in die exponentielle Phase über. Dabei erreichen sie eine Zelldichte von $OD_{660nm} = 3$. Das Kontrollexperiment macht deutlich, dass die untersuchten Anzuchtbedingungen das Zellwachstum beeinflussen und zu Veränderungen der Wachstumskurve führen.

Die Wuchskurven der *R. capsulatus*-Expressionsstämme B10ST7 (pRhotHi-2) mit den synthetisierten Proteinen CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin sind in Abbildung 17 B, C und D dargestellt. Die Wuchskurven dieser Expressionskulturen zeigen ein ähnliches Zellwachstum wie die Wuchskurven des *R. capsulatus*-Kontrollstamms, jedoch mit einer geringeren Zelldichte. Unter ausschließlich phototropher Kultivierung (blaue Linie) zeigen die *R. capsulatus*-Expressionsstämme Wuchskurven, die in allen Fällen eine etwas geringere Zelldichte von $OD_{660nm} = 3 - 3,5$ (Abb. 17 B - D) als der entsprechende Stamm mit dem Kontrollvektor aufweisen. Im Gegensatz dazu konnten keine signifikanten Veränderungen der maximalen Zelldichte der Expressionskulturen unter chemotrophen (rote Linie) und *shift*-Bedingungen von phototroph zu chemotroph (violette Linie) im Vergleich zum Kontrollstamm beobachtet werden. Ähnlich wie die unter phototrophen Bedingungen angezogenen Expressionskulturen zeigen auch Expressionskulturen unter *shift*-Bedingungen von chemotroph zu phototroph (grüne Linie) mit $OD_{660nm} = 2 - 2,5$ eine verminderte Zelldichte. Eine Ausnahme stellt dabei die Bakteriorhodopsin-Expressionskultur dar, die unter diesen Anzuchtbedingungen eine Zelldichte von $OD_{660nm} = 3$ erreicht.

Zusammenfassend zeigt die Auswertung der Zellwachstumsanalyse, dass keine signifikanten Beeinträchtigungen des Zellwachstums durch die Synthese der heterologen Proteine CYP175A1 (Abb. 17 B), SqEp (Abb. 17 C) und bR (Abb. 17 D) nachgewiesen werden konnten.

Im Unterschied zu der Analyse des Zellwachstums zeigen die Ergebnisse des zugehörigen *Western Blots* (Abb. 17) große Unterschiede in der heterologen Expression in Abhängigkeit der Wachstumsbedingung und des jeweiligen Membranproteins.

Die *Western Blot*-Ergebnisse der CYP175A1-Expressionskulturen sind in Abbildung 17 B dargestellt. So konnte eine deutliche Akkumulation von CYP175A1 in Zellen, die phototroph ($-O_2 \rightarrow -O_2$) und unter *shift*-Bedingungen von chemotroph zu phototroph ($+O_2 \rightarrow -O_2$) kultiviert

wurden, nachgewiesen werden. Dabei konnte eine höhere Proteinakkumulation in *R. capsulatus*-Zellen, die unter *shift*-Bedingungen von chemotroph zu phototroph ($+O_2 \rightarrow -O_2$) kultiviert wurden, beobachtet werden. In chemotroph ($+O_2 \rightarrow +O_2$) und unter *shift*-Bedingungen von phototroph zu chemotroph ($-O_2 \rightarrow +O_2$) kultivierten CYP175A1-Expressionskulturen konnte hingegen eine nur sehr geringe Proteinakkumulation aufgezeigt werden. Eine weitere interessante Beobachtung ergibt sich aus dem Vergleich der CYP175A1-Level, die in Zellen während der exponentiellen und stationären Phase erreicht wurden: Die P450-Monooxygenase akkumuliert während der stationären Phase deutlich höher als in der exponentiellen Phase der Expressionskulturen.

Interessanterweise zeigen die Ergebnisse der *Western Blot*-Analyse der SqEp- (Abb. 17 C) und bR- (Abb. 17 D) Expressionskulturen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Proteinakkumulation im Vergleich mit den CYP175A1-Expressionskulturen. Während die Proteinakkumulation von SqEp und bR in *R. capsulatus*-Zellen, die zuvor unter phototrophen ($-O_2 \rightarrow -O_2$) und *shift*-Bedingungen von chemotroph zu phototroph ($+O_2 \rightarrow -O_2$) angezogen wurden, nachgewiesen werden konnte, zeigten weder Expressionskulturen unter chemotrophen noch unter *shift*-Bedingungen von phototroph zu chemotroph eine Proteinakkumulation von SqEp oder bR. Eine weitere interessante Beobachtung ist die wuchsspezifische Proteinakkumulation. So konnte ein deutlicher Unterschied der Akkumulationslevel von SqEp und bR in der exponentiellen und stationären Phase der Expressionskulturen nachgewiesen werden: beide Proteine akkumulieren im Gegensatz zu CYP175A1 während der exponentiellen Phase deutlich höher als in der stationären Phase. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf eine Protein-Degradation durch wirtseigene Proteasen zurückzuführen.

Es konnte gezeigt werden, dass *R. capsulatus* in der Lage ist, die drei heterologen Membranproteine CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin zu synthetisieren. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Synthese der Membranproteine zu keiner signifikanten Beeinträchtigung des Zellwachstums führt. Für die Synthese der integralen Membranproteine Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin scheint das phototrophe Wachstum essentiell zu sein. Im Gegensatz dazu konnte für das membranassoziierte Protein CYP175A1 auch unter chemotrophen Bedingungen eine Akkumulation nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass CYP175A1 und Bakteriorhodopsin in Zellen, die unter *shift*-Bedingungen von chemotroph zu phototroph kultiviert wurden, eine erhöhte Proteinakkumulation aufweisen.

3.2.5 Lokalisierung der heterologen Membranproteine CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin in *R. capsulatus*

3.2.5.1 Lokalisierungsstudien zum Nachweis der heterologen Membranproteine in *inclusion bodies* oder der Membranfraktion

Für die weitere Charakterisierung des *R. capsulatus*-Expressionssystems sollte die Lokalisation der Membranproteine untersucht werden. Hierfür wurde vergleichend in *R. capsulatus* und *E. coli* überprüft, ob die heterologen Membranproteine CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin als unlösliche *inclusion bodies* akkumulieren oder in die Membran eingelagert werden. Dabei sollte analysiert werden, ob Unterschiede in der Proteinakkumulation in *R. capsulatus* und *E. coli* auftreten.

Die Proteine CYP175A1, SqEp und bR wurden unter vergleichenden Bedingungen in *R. capsulatus* und *E. coli* synthetisiert und die Zellproteine mittels differentieller Zentrifugation in drei unterschiedliche Fraktionen (*inclusion body*-Fraktion, Membranfraktion und Cytoplasmafraktion) voneinander getrennt (2.4.2). Hierfür wurden zunächst Expressionskulturen von *R. capsulatus* B10ST7 unter phototrophen Bedingungen (2.2.2.1) und *E. coli* BL21 (DE3) (2.2.3) mit dem *broad host range* Vektor pRhotHi-2 kultiviert. Obwohl die heterologe Synthese von CYP175A1 und bR unter *shift*-Bedingungen von chemotroph zu phototroph effizienter war, wurden die weiteren Versuche aufgrund des schnelleren Zellwachstums unter phototrophen Bedingungen durchgeführt.

In der *inclusion body*-Fraktion werden aufgrund der höheren Dichte unlösliche Proteinaggregate erwartet, während korrekt gefaltete Membranproteine in der Membranfraktion lokalisiert sein sollten. Lösliche Proteine sedimentieren aufgrund der geringen Dichte nicht, sondern befinden sich in der Cytoplasmafraktion. Mittels *Western Blot*-Analyse erfolgte der Nachweis der Proteine in diesen drei Fraktionen (Abb. 18).

Obwohl CYP175A1 nicht zu den integralen Membranproteinen zählt, wird korrekt gefaltetes Protein aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Proteinseitenketten und der Oberfläche der Zellmembran in der Membranfraktion erwartet (persönliche Mitteilung, Vlada Urlacher). Ebenso verhält es sich mit den integralen Membranproteinen SqEp und bR, die aufgrund von mehreren transmembranen Helices in der Membranfraktion lokalisiert sein sollten.

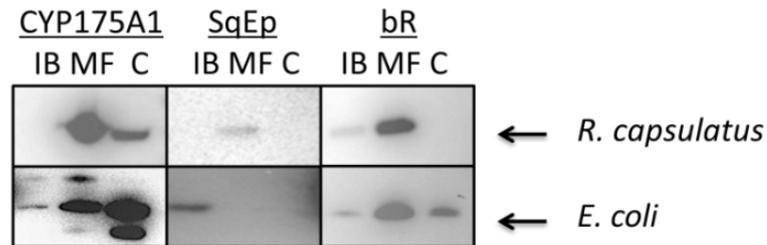


Abb. 18: Differentielle Zentrifugation von *R. capsulatus*- und *E. coli*-Zellextrakten zur Lokalisation der heterologen Membranproteine

Die Abbildung zeigt die Proteinakkumulation von CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin in *R. capsulatus* B10ST7 und *E. coli* BL21 (DE3). Die Expression der Zielgene erfolgte mit dem *broad host range* Vektor pRhotHi-2. Die mittels differentieller Zentrifugation entstandenen Fraktionen sind als IB (*inclusion bodies*), MF (Membranfraktion) und C (Cytoplasma) gekennzeichnet und wurden durch SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert. Die Detektion erfolgte durch eine immunologische Nachweisreaktion mittels des HRP-Antikörpers, der spezifisch den His₆-Tag der Proteine markierte.

Die Ergebnisse der Fraktionierung von *R. capsulatus*- und *E. coli*-Expressionskulturen zeigen eine unterschiedliche Lokalisation der Proteine. Die Proteine CYP175A1, SqEp und bR konnten sowohl in *R. capsulatus* als auch in *E. coli* in signifikanten Proteinmengen nachgewiesen werden, wobei die nachweisbare Proteinmenge in *E. coli* etwas höher war als in den *R. capsulatus*-Expressionskulturen. Die Verteilung der Proteine in den verschiedenen Zellkompartimenten der Wirtsorganismen unterscheidet sich deutlich.

R. capsulatus-Expressionskulturen akkumulieren signifikante Mengen an CYP175A1, SqEp und bR in die Membranfraktion, was die Vermutung nahe legt, dass die Proteine funktionell synthetisiert und richtig in Membran integriert werden. Die Analyse der Fraktionierung von CYP175A1 zeigt eine zusätzliche Proteinakkumulation in der Cytoplasmafraktion und deutet möglicherweise auf eine Dissoziation des Proteins von der Membran. Die Squalenepoxidase konnte in den *R. capsulatus*-Expressionskulturen ausschließlich in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Bakteriorhodopsin ist ebenfalls hauptsächlich in der Membranfraktion lokalisiert; es zeigt sich jedoch auch eine leichte Proteinaggregation in der *inclusion body*-Fraktion.

Proteine, die in *E. coli* synthetisiert wurden, akkumulieren mit Ausnahme der SqEp in sämtlichen Kompartimenten. Im Gegensatz zu der Proteinverteilung in den Zellkompartimenten von *R. capsulatus* scheint CYP175A1 überwiegend in der cytosolischen Fraktion und weniger in der *inclusion body*-Fraktion oder der Membranfraktion lokalisiert zu sein. In diesen Fraktionen konnten zudem Proteinsignale ober- und unterhalb der CYP175A1 entsprechenden Proteingröße beobachtet werden. Dies ist möglicherweise auf eine Fehlfaltung von CYP175A1 zurückzuführen. Die Squalenepoxidase konnte ausschließlich in der *inclusion body*-Fraktion nachgewiesen werden, was zu der Annahme führt, dass kein funktionelles Protein synthetisiert werden konnte.

Bakteriorhodopsin akkumuliert überwiegend in der Membranfraktion, konnte jedoch ebenfalls in der *inclusion body*- und der Cytoplasmafraktion nachgewiesen werden und deutet auf nur teilweise korrekt gefaltetes Protein hin.

Es konnte gezeigt werden, dass die Membranproteine CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin in *R. capsulatus* überwiegend in der Membran lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu konnten die in *E. coli* synthetisierten Proteine nur partiell in der Membran nachgewiesen werden. Dieses deutet darauf hin, dass die heterologen Membranproteine in *R. capsulatus* in ihrer korrekt gefalteten Form vorliegen, während die Expression in *E. coli* häufig zu der Bildung von *inclusion bodies* führt.

CYP175A1 akkumulierte in *E. coli* überwiegend in der cytosolischen Fraktion, während die Akkumulation von CYP175A1 in *R. capsulatus* hauptsächlich in der Membranfraktion beobachtet werden konnte. In der Literatur wird die Monooxygenase häufig als lösliches Protein beschrieben (Behera & Mazumdar, 2010). Die Ergebnisse der Lokalisationsanalyse konnten erstmalig belegen, dass es sich hierbei nicht um ein lösliches, sondern um ein membranassoziertes Protein handelt. Die Lokalisation der Squalenepoxidase in *R. capsulatus* und *E. coli* unterscheidet sich ebenfalls deutlich. Während die Synthese der Squalenepoxidase in *E. coli* zu der Bildung von *inclusion bodies* führte, konnte sie erstmalig ausschließlich in der Membranfraktion von *R. capsulatus* nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis verifiziert die internetbasierten Vorhersagen über die Topologie der Squalenepoxidase und belegt, dass es sich hierbei um ein Membranprotein handelt. Bakteriorhodopsin akkumuliert in der Membranfraktion von *R. capsulatus* und *E. coli* in ungefähr gleichen Mengen, so dass in diesem Fall keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob *R. capsulatus* oder *E. coli* der besser geeignete Expressionswirt ist.

3.2.5.2 Lokalisierungsstudien zum Nachweis der Einlagerung der heterologen Membranproteine in die intracytoplasmatischen Vesikel

Ausgehend von den bisher erbrachten Ergebnissen sollte weiter untersucht werden, ob die heterologen Membranproteine CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin in die intracytoplasmatischen Vesikel von *R. capsulatus*-B10S-T7 Zellen inseriert werden. In diesem Fall könnten die Protein enthaltenden Vesikel mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden und stünden dann für weitere Untersuchungen in ihrer natürlichen Umgebung in einer Art Nanobioreaktor zur Verfügung.

Um dies zu überprüfen, wurden Expressionskulturen von *R. capsulatus* B10S-T7 mit dem Vektor pRhotHi-2 als Kontrolle sowie mit den pRhotHi-2-Derivaten, die Gene von CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin tragen, angezogen und mittels differentieller Zentrifugation fraktioniert. Die resultierenden Membranfraktionen wurden in einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten (15 - 55 %) eingesetzt und 24 Stunden bei 175000 x g ultrazentrifugiert. Dadurch werden die Bestandteile der Membranfraktionen anhand ihrer Dichte aufgetrennt. Schwere und große Membranbestandteile wie Fragmente der Cytoplasmamembran sedimentieren dabei schneller als leichte Bestandteile der Membranfraktionen wie beispielsweise die Vesikel der ICM. Die Bestandteile der ICM sind durch die enthaltenden Photosynthesekomplexe rötlich gefärbt und dadurch leicht im Gradienten zu identifizieren (Abb. 19).

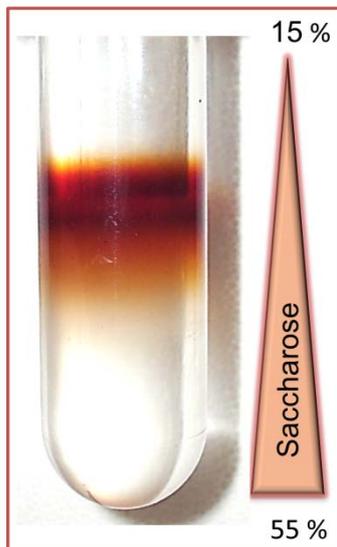


Abb. 19: Darstellung einer durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennte Membranfraktion von *R. capsulatus*

Der Saccharosedichtegradient mit einer Konzentration von 15 - 55 % Saccharose trennt einerseits die intracytoplasmatischen Membranen von der Cytoplasmamembran und andererseits die Vesikel des intracytoplasmatischen Membransystems untereinander aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte durch Ultrazentrifugation auf. Die Färbung im mittleren Bereich des Saccharosedichtegradienten entsteht durch die Pigmente der Photosystemkomplexe der Vesikel.

Anschließend wurde der Saccharosegradient in einzelne Proben von jeweils 1 ml fraktioniert (1 - 29). Bei einer Einlagerung der heterologen Proteine in das intracytoplasmatische Membransystem ist eine Steigerung des Gesamtproteingehalts der ICM enthaltenden Fraktionen zu erwarten. Möglicherweise ist auch eine Verdrängung der Photopigment enthaltenden Photosynthesekomplexe durch die Einlagerung der heterologen Membranproteine zu beobachten. Daher wurden die Fraktionen hinsichtlich ihres gesamten Proteingehalts, der Absorption der Photopigmente, der Akkumulation von heterologem Protein sowie der Saccharosekonzentration untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 zusammengefasst.

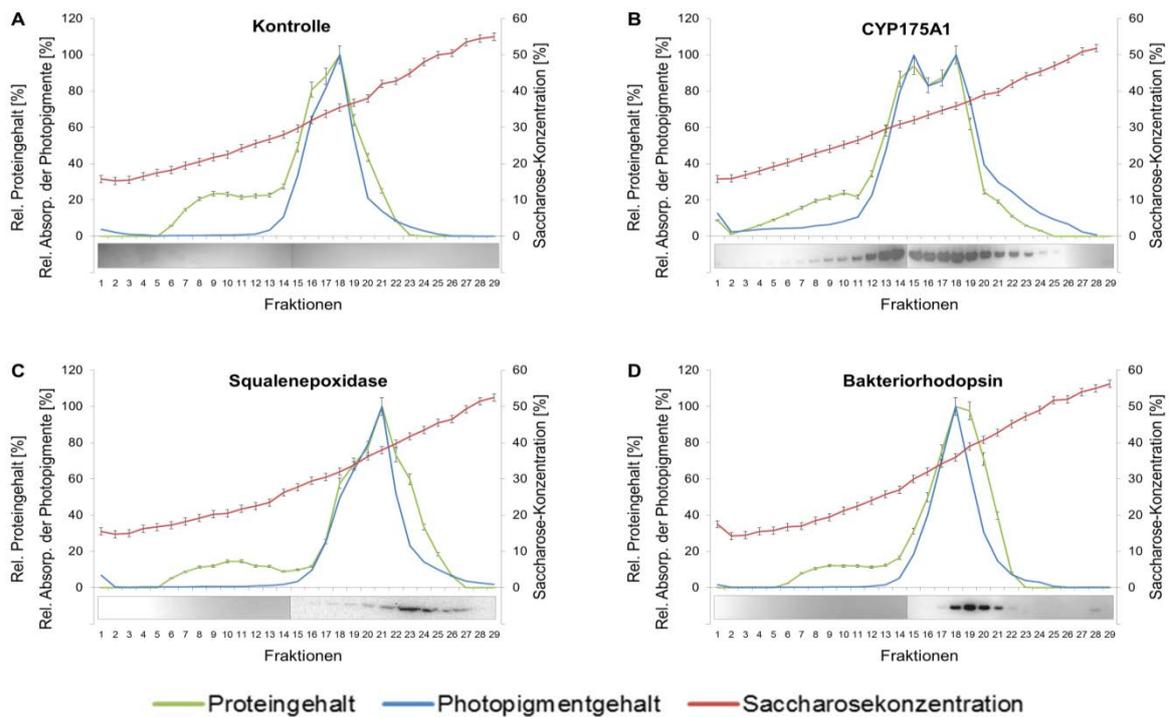


Abb. 20: Lokalisierungsstudien zum Nachweis der Membranproteine CYP175A1, SqEp und bR in den intracytoplasmatischen Vesikeln von *R. capsulatus*

Gezeigt ist die Vesikel-Isolierung von *R. capsulatus* mit dem Vektor pRhotHi-2 (A) als Kontrolle sowie mit pRhotHi-2-Derivaten, die Gene von CYP175A1 (B), Squalenepoxidase (C) und Bakteriorhodopsin (D) tragen. Die mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennten Membranbestandteile wurden im Hinblick auf den Gesamtproteingehalt (grüne Linie) mittels Bradford-Test, den Photopigmentgehalt (blaue Linie), der bei einer Wellenlänge von 480 nm quantifiziert wurde, sowie die Akkumulation von heterologem Protein durch *Western Blot*-Analyse untersucht. Die Saccharosekonzentration (rote Linie) wurde mittels eines Refraktormeters bestimmt. Die Werte wurden jeweils in Dreifachbestimmung gemessen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Verteilung des Gesamtproteingehalts, der Photopigmente sowie der spezifischen Proteinakkumulation im Saccharosedichtegradienten unterscheidet sich in Abhängigkeit von dem exprimierten Protein.

Die in Abbildung 20 gezeigten Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

Bei Betrachtung des durch die Bradford-Analyse ermittelten Proteingehalts der Fraktionen des Kontrollgradienten (*R. capsulatus* B10ST7 pRhotHi-2) ergeben sich zwei lokale Maxima des Gesamtproteingehalts. Diese erstrecken sich über die Fraktionen mit einem Saccharosegehalt von 17 - 27 % und 27 - 42 % Saccharose. In *R. capsulatus* B10S-T7 konnten somit ICM-Vesikel mit zwei unterschiedlichen Dichten identifiziert werden. Dieses Ergebnis konnte auch schon für die intracytoplasmatischen Membranen von *Rhodobacter sphaeroides*, einem nahen Verwandten von *R. capsulatus*, beschrieben werden. Dabei handelt es sich bei den im ersten Bereich des Maximums befindenden Bestandteilen vermutlich um sogenannte Vorläufer-Membranen, die als UPB (*upper*

pigment band) bezeichnet werden (Tucker *et al.*, 2010). Bei den sich im zweiten Bereich des Maximums befindenden Bestandteilen handelt es sich dementsprechend um die fertig ausgebildeten intracytoplasmatischen Vesikel (Tucker *et al.*, 2010). Die unterschiedliche Dichte der UPB und ICM ist auf eine unterschiedliche Membranzmorphologie zurückzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass der durchschnittliche Durchmesser der Vesikel der UPB um ca. die Hälfte kleiner ist als der von den ICM (Tucker *et al.*, 2010). Daraus ergibt sich, dass die intracytoplasmatischen Vesikel von *R. capsulatus* in der definierten Saccharosekonzentration von 27 - 42 % lokalisiert sind (Abb. 20 A).

Vergleicht man die Pigmentierung und den Proteingehalt der ICM enthaltenden Fraktionen aus *R. capsulatus*-B10S-T7-Zellen, die CYP175A1 exprimierten, mit der bereits beschriebenen Kontrolle, so erkennt man signifikante Abweichungen (Abb. 20 B). Im Bereich der Vesikel-Fraktionen, die eine Saccharosekonzentration von 26 - 42 % Saccharose aufweisen, konnten im Gegensatz zu der Kontrolle zwei Maxima des Protein- und Photopigmentgehalts beobachtet werden. Demgegenüber ähnelt der Protein- und Pigmentgehalt der aufgetrennten Fraktionen aus *R. capsulatus*-B10S-T7-Zellen, die SqEp (Abb. 20 C) und bR (Abb. 20 D) exprimierten, dem der Kontrolle. Die Gradienten mit den Membranfraktionen, die aus den *R. capsulatus*-B10S-T7 SqEp- und bR-Expressionskulturen isoliert werden konnten, weisen im Bereich der ICM enthaltenden Fraktionen (27 - 46 % Saccharose) ein lokales Maximum auf. Hier zeigt sich jedoch, dass diese Fraktionen höhere Saccharosekonzentrationen aufweisen. Dies ist möglicherweise auf eine Veränderung der Dichte der Vesikel, die durch die Einlagerung der heterologen Membranproteine vergrößert werden, zurückzuführen. Des Weiteren konnte in den Fraktionen, die eine Saccharosekonzentration von 40 - 46 % Saccharose aufwiesen, eine Abnahme der Photopigmentierung beobachtet werden, wobei der Proteingehalt unverändert blieb. Dieses Ergebnis deutet möglicherweise auf eine Verdrängung der Photosynthesekomplexe durch die Einlagerung der heterolog synthetisierten Proteine hin

Um zu überprüfen, ob die Membranproteine tatsächlich in den Vesikeln der Fraktionen mit erhöhtem Protein- und Photopigmentgehalt akkumulierten, wurden alle aufgetrennten Fraktionen immunologisch mittels HRP-Antikörpern, die spezifisch an den His₆-Tag der Proteine binden, analysiert. Die Proteinakkumulation in den Zellen der Fraktionen des Gradienten unterscheidet sich in Abhängigkeit des untersuchten Proteins. CYP15A1 akkumulierte in den Vesikeln der Fraktionen 8 - 24 (Abb. 20 B). Im Vergleich dazu konnte die Squalenepoxidase nur in den Fraktionen 18 - 21 immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 20 C), während bR in den Fraktionen 20 - 27 detektierbar war (Abb. 20 D). Die Ergebnisse zeigen auf, dass die heterologen

Proteine und die Photopigmente im gleichen Dichtebereich lokalisiert sind, was eine Einlagerung der heterologen Membranproteine in die ICM von *R. capsulatus* vermuten lässt.

Um zu überprüfen, ob die Einlagerung der wirtsfremden Membranproteine in den ICM zu einer Verdrängung der Photosyntheseproteine und somit zu einer Abnahme der Photopigment-spezifischen Absorption führt, wurden Absorptionsspektren bei einer Wellenlänge von 300 nm - 900 nm aufgenommen (Abb. 21).

Für die Analyse des Photopigmentgehalts der photosynthetischen Membranen wurden ICM enthaltende Fraktionen des Saccharosegradienten mit der für das jeweilige Protein höchsten heterologen Proteinakkumulation eingesetzt.

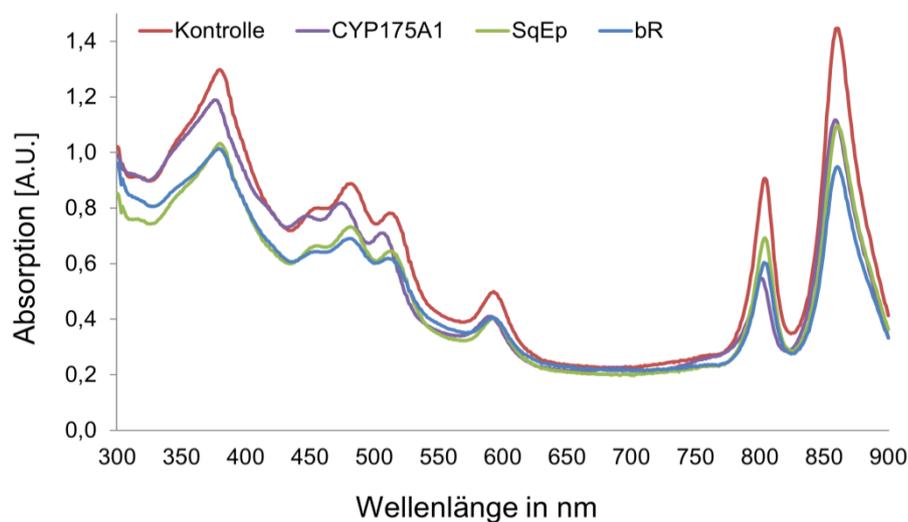


Abb. 21: Photopigmentgehalt der photosynthetischen Membranen von *R. capsulatus* zum Nachweis der Photosynthesekomplex-Verdrängung durch die Einlagerung der heterologen Membranproteine

Die Abbildung zeigt die Photopigment-spezifischen Absorptionen der intracytoplasmatischen Membranen bei CYP175A1, SqEp und bR-Expressionen in *R. capsulatus* B10ST7 pRhotHi2. Eingesetzt wurden ICM enthaltende Fraktionen des Saccharosedichtegradienten, die für das jeweilige Protein die höchste heterologe Proteinakkumulation aufwiesen.

In Abbildung 21 sind die typischen Absorptionscharakteristika der photosynthetischen Membranen von *R. capsulatus* gezeigt. Das Absorptionsspektrum der intracytoplasmatischen Membranen des *R. capsulatus*-Kontrollstamms (rote Linie) zeigt die typischen Peaks von Bakteriochlorophyll *a* mit Absorptionsmaxima bei 376 nm, 590 nm, 800 nm und 860 nm und den Carotinoiden Spheroiden und Spheroidenon mit Absorptionsmaxima bei 448 nm, 476 nm und 508 nm. Die intracytoplasmatischen Membranen des CYP175A1-Expressionsstamms von *R. capsulatus* zeigen ebenfalls die typischen Absorptionsmaxima von Bakteriochlorophyll und den Carotinoiden (violette Linie). Jedoch konnte dabei eine Abnahme des Photopigmentgehalts beobachtet werden. Eine deutlichere Abnahme des Photopigmentgehalts konnte in den

intracytoplasmatischen Membranen der SqEp- (grüne Linie) und bR- (blaue Linie) Expressionskulturen von *R. capsulatus* beobachtet werden. Die abweichenden Ergebnisse der Photopigmentanalyse der intracytoplasmatischen Membranen sind wahrscheinlich auf die unterschiedliche Topologie der Membranproteine zurückzuführen. Das membranassoziierte Protein CYP175A1 wird nicht in die Membranen eingelagert, sondern ist nur mit ihnen assoziiert, während die integralen Membranproteine SqEp und bR in die Membran inseriert werden. Bei der Einlagerung von integralen Membranproteinen wird vermutlich eine größere Membranfläche benötigt, so dass die Photosynthesekomplexe verdrängt werden. Die Assoziation von CYP175A1 erfordert mutmaßlich eine deutlich geringere Membranfläche, so dass die Abnahme der Photopigmente nicht so signifikant erscheint.

Es konnte gezeigt werden, dass in *R. capsulatus*, ähnlich wie in *R. spaehroides*, Vesikel mit zwei unterschiedlichen Dichten identifiziert wurden. Dabei handelt es sich um die sogenannten Vorläufer-Membranen und die fertig ausgebildeten intracytoplasmatischen Vesikel, die sich in ihrer Membranmorphologie deutlich voneinander unterscheiden. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Membranproteine CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin nicht wie in *E. coli* partiell in die Cytoplasmamembran eingelagert werden, sondern in den intracytoplasmatischen Vesikeln von *R. capsulatus* lokalisiert sind. Damit bietet sich die Möglichkeit, heterologe Membranproteine in *R. capsulatus* zu exprimieren, die Membranprotein enthaltenden Vesikel mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation zu isolieren und die Vesikel als Nanobioreaktoren für weitere Anwendungen zu nutzen. Weitere Untersuchungen konnten bestätigen, dass die Einlagerung der heterologen Membranproteine in die ICM die Photopigment bindenden Proteine aus der Membran verdrängt. Eine mögliche Veränderung der Vesikeldichte in Abhängigkeit des gewählten Membranproteins konnte ebenso beobachtet werden.

3.2.5.3 Einfluss der heterologen Synthese von Membranproteinen auf die Vesikelmorphologie

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die heterologen Membranproteine CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin in die Vesikel des intracytoplasmatischen Membransystems eingelagert wurden und dadurch die Dichte der Vesikel veränderten, sollte untersucht werden, ob eine abweichende Vesikeldichte auf eine Veränderung der Vesikelgröße und -morphologie zurückzuführen ist.

Um dieser Fragestellung nachgehen zu können, wurden *R. capsulatus*-Zellen aus Expressionskulturen mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht.

Für die entsprechende Analyse wurden Proben mit einer Zelldichte von $OD_{660nm} = 2$ aus CYP175A1-, SqEp- und bR-Expressionskulturen von *R. capsulatus* B10ST7 pRhotHi2 entnommen. Die Zellen wurden mit einer Fixierlösung versetzt und bei Raumtemperatur gelagert. Danach wurden in Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm (Dr. Daria Zhurina) Zellen aufgeschnitten und mittels des Transmissionselektronenmikroskops analysiert. Dafür wurden bei drei TEM-Aufnahmen je fünf Zellen bestimmt, aus denen der Durchmesser von je 20 Vesikeln gemessen wurde.

Die TEM-Aufnahmen und die statistische Auswertung der Vesikelgröße sind in Abbildung 22 dargestellt.

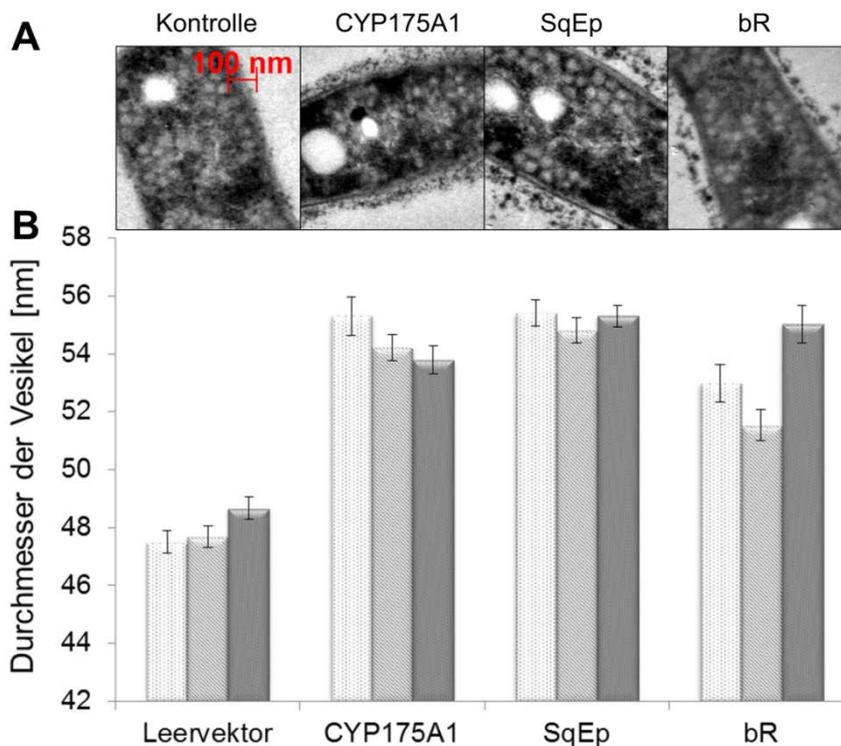


Abb. 22: Analyse der Vesikelmorphologie von *R. capsulatus*-Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie zum Nachweis der Einlagerung der heterologen Membranproteine CYP175A1, Sqep und bR

A) Dargestellt sind die TEM-Aufnahmen von Zellen des *R. capsulatus*-Kontrollstamms B10ST7 pRhotHi-2 sowie der CYP175A1-, SqEp- und bR- Expressionsstämme. Die TEM-Analyse erfolgte mit Zellen, die während der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{660nm} = 1$) der Kulturen entnommen und auf eine Zelldichte von $OD_{660nm} = 2$ konzentriert wurden. B) Dargestellt ist die Auswertung des Vesikeldurchmessers von *R. capsulatus*-B10ST7-Zellen, die mit Hilfe des AxioVison-Programms durchgeführt wurde. Aus drei TEM-Aufnahmen wurden je fünf Zellen bestimmt und darin je 20 Vesikel vermessen. Die Balken geben den Mittelwert des Vesikeldurchmessers an. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

In Abbildung 22 A sind die TEM-Aufnahmen von Zellen des *R. capsulatus*-Kontrollstamms B10ST7 sowie der CYP175A1-, SqEp- und bR-Expressionsstämme dargestellt. In allen Abbildungen ist das ausgebildete intracytoplasmatische Membransystem mit bereits abgeschnürten Vesikeln deutlich zu erkennen. Augenscheinlich zeigen sich keine Veränderungen der Vesikelmorphologie wie beispielsweise eine Veränderung der Form oder Struktur durch die Synthese von verschiedenen heterologen Proteinen. Um die Größe der Vesikel zu bestimmen, wurde der Durchmesser der Vesikel mit der Hilfe des AxioVision-Programms ermittelt (Abb. 22 B). Die Vesikel der Zellen des *R. capsulatus*-Kontrollstamms zeigen einen Durchmesser von durchschnittlich 48 nm, während die Vesikel der *R. capsulatus*-Zellen, die die Proteine CYP175A1, SqEp und bR akkumulierten mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 54 nm deutlich vergrößert sind. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass durch die Einlagerung heterolog synthetisierter Membranproteine in *R. capsulatus* die intracytoplasmatischen Vesikel eine Umfangsvermehrung aufweisen, während die Morphologie der Vesikel unverändert bleibt.

Es konnte gezeigt werden, dass die TEM-Analyse der *R. capsulatus*-Zellen die Einlagerung der heterolog synthetisierten Membranproteine in die ICM verifiziert. Es konnte beobachtet werden, dass die Vesikelgröße durch die Membranprotein-Einlagerung maßgeblich beeinflusst wird. Unabhängig von der Topologie der Membranproteine konnte eine Vesikelvergrößerung beobachtet werden, wobei die Morphologie jedoch unverändert blieb. Damit konnte erstmalig eine Beeinflussung der Vesikelgröße durch die Synthese heterologer Membranproteine beschrieben werden.

3.2.6 Reinigung und spektrale Charakterisierung der Monooxygenase CYP175A1

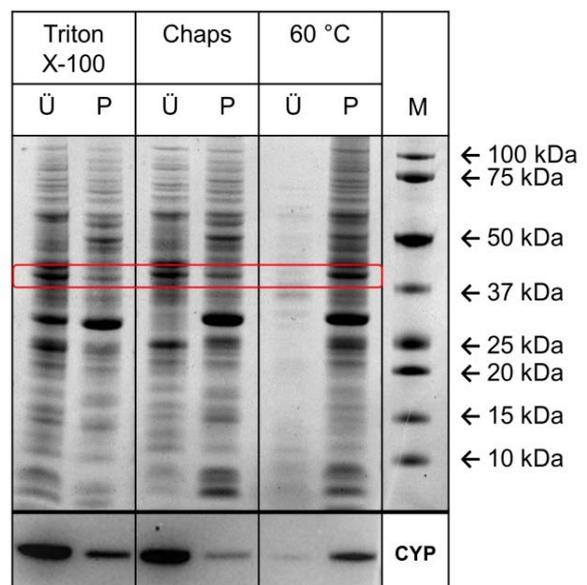
In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass heterologe Membranproteine synthetisiert und in die Vesikel von *R. capsulatus* eingelagert werden können. In diesem Teilabschnitt der Arbeit soll am Beispiel von CYP175A1 untersucht werden, ob die heterologe Expression in *R. capsulatus* auch korrekt gefaltetes Protein erbringt. Der erste Schritt zur Charakterisierung von Membranproteinen ist die Solubilisierung und anschließende Reinigung der Proteine. Die Solubilisierung von Membranproteinen mittels Detergenzien führt bei integralen Membranproteinen zum Herauslösen des Membranproteins aus der Membran, indem sich die Detergenzien um die Proteine lagern und die natürliche Lipiddoppelschicht, in der die Membranproteine eingelagert sind, nachahmen (Seddon *et al.*, 2004). Bei membranassoziierten Proteinen wie der Monooxygenase CYP175A1 werden die Wechselwirkungen der Proteine mit der

Membran unterbunden. Dieser Schritt ist häufig der limitierende Faktor der Proteinreinigung, da die Effizienz der Solubilisierung abhängig von den jeweiligen Eigenschaften des Proteins ist. Grundsätzlich lässt sich beobachten, dass periphere Membranproteine durch mildere Detergenzien leichter solubilisieren als integrale Membranproteine, für deren Extraktion die Zerstörung der Lipiddoppelschicht durch stärkere Detergenzien erforderlich ist (Smith, 2011). Erst nach erfolgreicher Solubilisierung kann mit der Reinigung und der weiteren Charakterisierung der Proteine fortgefahren werden.

Für eine Charakterisierung der Monooxygenase CYP175A1 wurde zunächst von einer entsprechenden *R. capsulatus*-B10ST7-Expressionskultur durch differentielle Zentrifugation die Membranfraktion gewonnen. Diese wurde in Solubilisierungsstudien eingesetzt, um die hydrophoben Wechselwirkungen des Proteins mit der Membran zu unterbinden. Hierfür wurden das Nicht-ionische Detergenz Triton X-100 (1 %) und das Zwitterionische Detergenz Chaps (1 %) verwendet. CYP175A1 stammt aus einem thermophilen Organismus und weist eine hohe Thermostabilität auf. Bei Temperaturen bis zu 83 °C behält das Protein seine native Struktur und denaturiert nicht. Daher sollte neben der Solubilisierung mit den eingesetzten Detergenzien zusätzlich eine Inkubation der Membranfraktion bei 60 °C erfolgen, um die Lipid-Protein-Wechselwirkungen aufzulösen. Die Proben der Membranfraktionen wurden mit Detergenzien bei Raumtemperatur bzw. ohne Detergenzien bei 60 °C für eine Stunde inkubiert. Durch Ultrazentrifugation wurden anschließend die Membranen in der Probe pelletiert. Die Solubilisierung des Proteins wurde mittels SDS-PAGE (2.4.5) und Immunodetektion (2.4.8) untersucht (Abb. 23).

Abb. 23: Solubilisierungsstudien von CYP175A1 mittels der Detergenzien Triton X-100 und Chaps sowie 60 °C-Inkubation

Dargestellt ist die Analyse der Solubilisierung von CYP175A1 (CYP) aus der Membranfraktion von *R. capsulatus*-B10ST7-Zellen. Für die Solubilisierung wurden die eingesetzten Membranfraktionen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Detergenzien Triton X-100 und Chaps versetzt sowie bei 60 °C ohne die Zugabe eines Detergenz inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 24 Stunden ultrazentrifugiert. Die Proteinakkumulation im Überstand (Ü) und Pellet (P) wurde mittels SDS-PAGE und Immunodetektion mittels *Western Blot*-Analyse untersucht. Die Detektion erfolgte mittels HRP-Antikörpern, die spezifisch an den His₆-Tag der Proteine binden. Der rote Kasten markiert die CYP175A1-zugehörigen Proteinbanden.



In der SDS-PAGE ist eine deutliche Bande, die CYP175A1 entspricht (44 kDa), in allen Ansätzen zu erkennen (rot gekennzeichnet). Der Anteil nicht solubilisierten Proteins im Pellet (P) und erfolgreich solubiliertem Proteins im Überstand ist allerdings unterschiedlich. Die Detergenzien Triton X-100 und Chaps zeigen eine effiziente Solubilisierung von CYP175A1 aus der Membran mit einer geschätzten Solubilisierungsrate von ca. 80 - 90 %, wobei die Zugabe von Triton X-100 im Vergleich zu Chaps jedoch eine höhere Menge von anderen wirtseigenen Proteinen aus der Membran herauslöst. Die Inkubation bei 60 °C konnte weder CYP175A1 noch wirtseigene Proteine aus oder von der Membran lösen, wie die fehlenden Banden im Überstand zeigen. In der zugehörigen *Western Blot*-Analyse konnte ein etwas stärkeres immunologisches Signal von CYP175A1 im Überstand durch die Zugabe von Chaps als durch die Zugabe von Triton X-100 nachgewiesen werden. Die Temperaturerhöhung erzielte keine erfolgreiche Solubilisierung von CYP175A1, da geschätzt 95 % des Proteins in der Pelletfraktion immunologisch nachgewiesen werden konnten (Abb. 23).

Für weitere Untersuchungen wurde CYP175A1 mit dem Detergenz Chaps aufgrund der besseren Solubilisierungseffizienz sowie der Tatsache, dass weniger wirtseigene Proteine neben CYP175A1 aus der Membran gelöst werden, solubilisiert.

Das solubilierte CYP175A1 wurde im nächsten Schritt durch eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie (2.4.11) gereinigt (Abb. 24 A). Die Reinigung erfolgte über das Ni-NTA-Säulenmaterial, an das der His₆-Tag von CYP175A1 spezifisch bindet. Durch die Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von Imidazol, welches Histidin kompetitiv verdrängt, konnte das Protein gewaschen und anschließend eluiert werden. Die Proben der einzelnen Reinigungsschritte wurden mittels SDS-Page untersucht (Abb. 24 A).

In der SDS-PAGE ist in der Elutionsfraktion (250 mM Imidazol) eine deutliche Bande, die CYP175A1 (44 kDa) entspricht, zu erkennen. Während der Durchfluss (D) und der erste Waschschrift (50 mM Imidazol) noch große Mengen an wirtseigenen Proteinen aufweist, die von dem Säulenmaterial gewaschen werden, zeigen sich im letzten Waschschrift (100 mM Imidazol) fast keine Proteinverunreinigungen mehr. In der Elutionsfraktion (250 mM Imidazol) konnte ausschließlich CYP175A1 nachgewiesen werden. Dabei entsprach die gereinigte Menge 12 mg Protein pro Liter Zellkultur.

CYP175A1 konnte demnach erfolgreich für die weitere Charakterisierung in hoher Reinheit zur Verfügung gestellt werden.

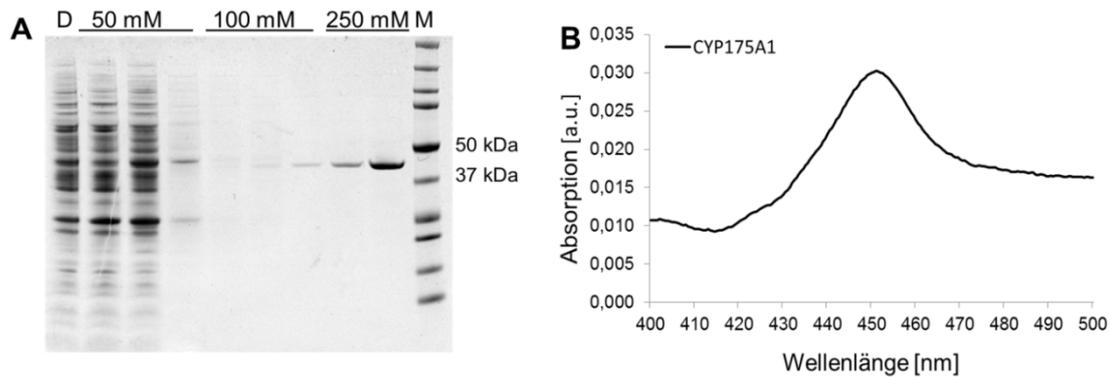


Abb. 24: Aktivitätsnachweis der gereinigten CYP175A1 mittels CO-Differenzspektrums

A) zeigt die Reinigung von CYP175A1 mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie. Die aufgetragenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Fraktion D steht für den Durchfluss der Proteinlösung durch die Affinitätschromatographie-Säule, während die nachfolgenden Spuren als Wasch- und Elutionsfraktionen mit Imidazolkonzentrationen von 50 mM, 100 mM und 250 mM gekennzeichnet sind. Der Proteinstandard ist mit M gekennzeichnet. B) zeigt das Absorptionsspektrum von CYP175A1, welches mit Natriumdithionit reduziert wurde. Das Differenzspektrum ergibt sich aus der Subtraktion der Absorption von Proben, denen Natriumdithionit hinzugefügt wurde und nicht mit CO begast wurden, von der Absorption von Proben, die mit Natriumdithionid reduziert und mit CO komplexiert wurden.

Für die Proteinanalyse der korrekten Faltung kann CYP175A1, welches Häm als prosthetische Gruppe besitzt, aufgrund ihrer klassenspezifischen Eigenschaften in eine CO-Differenzspektroskopie eingesetzt werden. Diese wird verwendet, um die CO-Bindungsaktivität des Proteins zu bestimmen. Die native Form von P450-Monooxygenasen zeigt im Absorptionsspektrum ein Maximum bei 450 nm, während in den Absorptionsspektren von denaturiertem Protein ein Maximum bei 420 nm zu beobachten ist. Die Zugabe von Natriumdithionit reduziert das Fe^{3+} der Hämproteine zu Fe^{2+} und wird durch Kohlenmonoxid komplexiert, was sich durch die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 420 nm zu 450 nm bemerkbar macht. Das Differenzspektrum ergibt sich aus der Subtraktion der Absorption von Proben, denen Natriumdithionit hinzugefügt wurde und nicht mit CO begast wurden, von der Absorption von Proben, denen Natriumdithionid hinzugefügt und mit CO komplexiert wurden. Dementsprechend sollte falsch gefaltetes Protein, welches die prosthetische Gruppe Häm nicht mehr gebunden hat, keine CO-Komplexierungsreaktion mehr eingehen können. Falsch gefaltetes Protein ist demnach durch ein Absorptionsmaximum bei 420 nm gekennzeichnet.

Für den Nachweis der korrekten Faltung von CYP175A1 wurde gereinigtes Protein in die CO-Differenzspektroskopie eingesetzt. Die Durchführung des Experiments erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Biochemie II der Heinrich-Heine-Universität (Prof. Dr. Urlacher) in Düsseldorf. Das

gereinigtes Protein wurde mit Natriumdithionit versetzt und mit CO begast. Die behandelten Proben wurden anschließend einer spektrophotometrischen Analyse unterzogen.

Das Ergebnis des CO-Differenzspektrums von CYP175A1 (Abb. 24 b) zeigt ein deutliches Absorptionsmaximum bei 450 nm. Schätzungsweise mehr als 95 % der Absorption werden von 420 nm zu 450 nm verschoben, was darauf hindeutet, dass mindestens 95 % von CYP175A1 in *R. capsulatus* richtig gefaltet wurden und vermutlich in ihrer aktiven Form vorliegen. Die Ausbeute von korrekt gefaltetem Protein aus einer 100 ml-Expressionskultur konnte auf 1,514 µM bestimmt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Monooxygenase CYP175A1 in *R. capsulatus* nicht nur erfolgreich synthetisiert wurde, sondern zudem in ihrer korrekt gefalteten Form vorliegt. Dadurch konnte die Eignung des *R. capsulatus*-Expressionssystems für die Synthese heterologer Membranproteine bestätigt werden.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Charakterisierung des Expressionswirts *R. capsulatus* für die heterologe Synthese von Membranproteinen zeigen, dass die drei heterologen Membranproteine CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin in *R. capsulatus* synthetisiert werden konnten. Hierbei scheint die Phototrophie für die heterologe Synthese integraler Membranproteine eine essentielle Rolle zu spielen. Des Weiteren konnte eine Einlagerung der heterologen Membranproteine, die mit einer Verdrängung der Photosyntheseproteine aus der Membran einhergeht, gezeigt werden.

Konformationsuntersuchungen konnten nachweisen, dass die in *R. capsulatus* synthetisierte Monooxygenase CYP175A1 in ihrer funktionellen Konformation vorliegt.

Die Ergebnisse der Charakterisierung zeigen auf, dass *R. capsulatus* als Expressionswirt für die Synthese von Membranproteinen aufgrund der großen intracytoplasmatischen Membranfläche besonders geeignet ist.

3.3 Untersuchungen zur lichtabhängigen Regulation eines *nif*-Promotor-basierten Expressionssystems in *R. capsulatus*

Für den Expressionswirt *R. capsulatus* wurde eine Reihe von pRho-Expressionsvektoren auf Grundlage des Plasmids pBBR22b entwickelt (Katzke *et al.*, 2010, 2012). Hierbei kommen bislang zwei verschiedene Promotoren zum Einsatz.

1) Die Reihe der pRhok-Plasmide besitzt den konstitutiven Promotor *PaphII* des Kanamycin-Resistenzgens. Die Expression heterologer Gene mittels der pRhok-Plasmide erfolgt im *R. capsulatus*-Wildtyp-Stamm B10S. Der Einsatzbereich der Vektoren in anderen Expressionswirten ist weit gefächert, da der Kanamycin-Promotor von bakteriellen Polymerasen erkannt wird.

2) Die Reihe der pRhot-Plasmide verfügt im Gegensatz zu den pRhok-Plasmiden über einen T7-RNA-Polymerase-Promotor (1.4). Die heterologe Expression mittels der pRhot-Vektoren erfolgt in dem *R. capsulatus*-Stamm B10ST7, dem das T7-RNA-Polymerasegen unter Kontrolle des *fru*-Promotors in das Genom integriert wurde (Katzke *et al.*, 2010).

In der Arbeitsgruppe „Bakterielle Photobiotechnologie“ wird derzeit ein neues *R. capsulatus*-Expressionssystem etabliert. Hierfür wurde ein *nif*-Promotor (P_{nif})-basierter Expressionsvektor auf der Grundlage der pRho-Vektoren entwickelt (A. Özgür, unveröffentlicht). Bei dem *nif*-Promotor handelt es sich um einen wirtseigenen Promotor von *R. capsulatus*, der dem *nifHDK*-Operon vorgeschaltet ist. Die Gene des *nifHDK*-Operons kodieren in *R. capsulatus* für eine Eisen-Molybdän-Nitrogenase, die die Umsetzung von molekularem Stickstoff zu Ammoniak katalysiert (Avtges *et al.*, 1983; Schneider *et al.*, 1991). Der Nitrogenase-Enzymkomplex ist aus der Dinitrogenase und der Dinitrogenase-Reduktase zusammengesetzt. Die Dinitrogenase ist als $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer aufgebaut. Das Gen *nifD* kodiert hierbei für die α -Untereinheit der Dinitrogenase, während *nifK* die β -Untereinheit kodiert (Willison *et al.*, 1993). Das Gen *nifH* kodiert die Dinitrogenase-Reduktase (Avtges *et al.*, 1983), die als Homodimer aufgebaut ist. Die Expression der *nif*-Gene, die unter der Kontrolle des *nif*-Promotors stehen (*nitrogen fixation*), ist nur unter Abwesenheit von Sauerstoff und Ammonium möglich (Kranz & Haselkorn, 1986). Die Promotor-Regulation mittels Sauerstoff und Ammonium kann für die gezielte Expression heterologer Gene genutzt werden (Pollock *et al.*, 1988). Die Synthese heterologer Proteine, deren Transkription unter der Kontrolle des *nif*-Promotors steht, kann somit ohne die Zugabe eines chemischen Induktors, sondern durch physiologische Veränderungen induziert werden. Diese Eigenschaft ermöglicht durch den Wechsel von aeroben chemotrophen zu anaeroben phototrophen Bedingungen zudem die gleichzeitige Induktion der heterologen Expression sowie

die Ausbildung des intracytoplasmatischen Membransystems, ohne dabei auf die Zugabe eines Induktors angewiesen zu sein. Wie in 3.2.4 erläutert, zeichnen sich diese Bedingungen besonders für die Synthese von heterologen Membranproteinen aus.

Eine andere interessante Besonderheit des *nif*-Promotors von *R. capsulatus* ist dessen mögliche Blaulichtregulation. Im Rahmen der Doktorarbeit von Rene Bergmann wurde der *R. capsulatus*-Wildtypstamm B10S unter Bestrahlung mit verschiedenen Lichtqualitäten kultiviert. Hierbei zeigte sich, dass die Kultivierung des *R. capsulatus*-Wildtypstamms B10S bei veränderten Lichtbedingungen neben dem Zellwachstum und der Photopigmentierung auch die Synthese des Nitrogenase-Enzymkomplexes beeinflusst. Unter Beleuchtung mit Blaulichtdioden ist *R. capsulatus* nicht in der Lage, in der logarithmischen Wuchsphase den Nitrogenase-Enzymkomplex zu bilden. In der späten logarithmischen Wuchsphase bzw. der frühen stationären Phase ist die Inhibierung der Synthese des Nitrogenase-Enzymkomplexes wieder aufgehoben (Bergmann, 2011). Dieser beschriebene Blaulichteffekt kann möglicherweise für ein lichtreguliertes *R. capsulatus*-Expressionssystem genutzt werden. Durch den Wechsel verschiedener Lichtqualitäten bei der Kultivierung von *R. capsulatus* kann möglicherweise die heterologe Expression gezielt gesteuert werden. Hierbei wird eine zeit- und räumliche Kontrolle der Genexpression durch einen externen Stimulus wie Licht ermöglicht. Die Vorteile eines lichtregulierten Expressionssystems sind dabei das variable Einstellen des gewünschten Expressionsniveaus über die Dauer der Beleuchtung, eine mögliche Kostenersparnis, eine leichte Automatisierung sowie eine nicht invasive, kontaminationsfreie Induktion.

Im Rahmen dieser Arbeit steht die Charakterisierung des *nif*-Promotor-basierten *R. capsulatus*-Expressionssystems bezüglich der lichtabhängigen Regulation der heterologen Genexpression im Vordergrund. Dabei sollte zunächst analysiert werden, ob die heterologen Proteine in dem *nif*-Promotor-basierten *R. capsulatus*-Expressionssystem unter verschiedenen Lichtbedingungen synthetisiert werden können und ob die gezielte Nutzung unterschiedlicher Lichtqualitäten die Synthese dieser reguliert. Hierbei stellt sich die Frage, ob neben der Lichtregulation der heterologen Expression die Nutzung der verschiedenen Lichtqualitäten die Synthese heterologer Proteine positiv beeinflussen kann. Um dieser Fragestellung nachgehen zu können, erfolgte die heterologe Expression unter Glühbirnen-, Infrarot- und Blaulicht. Für eine detailliertere Charakterisierung des *R. capsulatus*-Expressionssystems wurden Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgewählt. Hierbei handelt es sich um das Membranprotein Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium* und das lösliche Protein YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) aus *Aequorea victoria*.

3.3.1 Der Expressionsvektor pRhonHi-2

Der Expressionsvektor pRhonHi-2 (A. Özgür, unveröffentlicht) wurde auf Grundlage der pRho-Expressionsplasmide konstruiert, die wiederum auf Grundlage des Vektors pBBR22b (Rosenau & Jaeger, 2004) entwickelt wurden (Abb. 25). Hierbei steht die Expression des Zielgens unter der Kontrolle des *nif*-Promotors. Um eine effiziente heterologe Expression gewährleisten zu können, wurden neben der Promotorsequenz auch die regulatorischen Elemente der UAS (*upstream-activating-sequence*) sowie ein Teil der genkodierenden Sequenz des Gens *nifH* in den Expressionsvektor kloniert. Die heterologe Expression ist durch den Sauerstoff- und Ammoniumgehalt der Umgebung strikt reguliert. In Abwesenheit von Sauerstoff und Ammonium wird die Genexpression induziert. Hierbei wird der *nif*-Promotor nur von der *R. capsulatus* eigenen Polymerase erkannt. Daher ist im Gegensatz zu den pRho-Plasmiden die Anwendung des pRhonHi-2-Expressionsplasmids nur im Organismus *R. capsulatus* möglich, es kann nicht für komparative Expressionsstudien in anderen Wirten eingesetzt werden. Alle weiteren Merkmale des Expressionsplasmids pRhonHi-2 wie die His₆-Tag kodierende Sequenz, die für die Identifizierung und Aufreinigung des Zielproteins genutzt werden können, das *broad host range Replicon* (REP), welches die Plasmidstabilität ermöglicht, die MOB-Stelle, die den konjugationalen Transfer in den Expressionswirt gewährleistet sowie Gene, die Resistenzen gegen die Antibiotika Kanamycin und Chloramphenicol vermitteln, stimmen mit den Elementen der pRhoHi-2- und pRhokHi-2-Plasmiden überein.

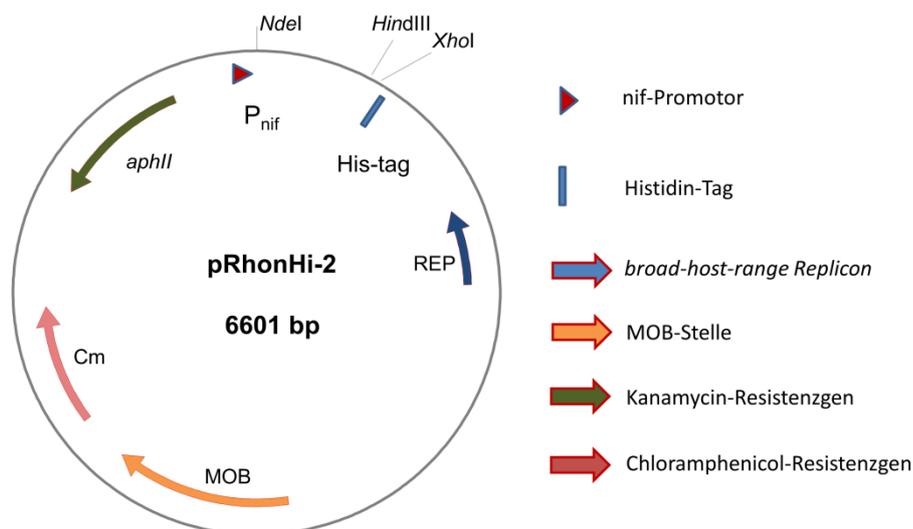


Abb. 25: Plasmidkarte des pRhonHi-2-Expressionsvektors

Der Vektor beinhaltet unter anderem einen *nif*-Promotor, eine His-Tag kodierende Sequenz, das *broad host range Replicon* (REP), die MOB-Sequenz sowie die Resistenzgene gegen die Antibiotika Chloramphenicol (Cm) und Kanamycin (*aphII*). Die Richtung der Pfeile gibt die Orientierung der Gene bez. des Promotors an.

Für vergleichende Expressionsstudien unter verschiedenen Lichtbedingungen wurden zunächst die Gene, die für Bakteriorhodopsin und YFP kodieren, in den ausgewählten Expressionsvektor pRhonHi-2 kloniert. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm handelt es sich um den *R. capsulatus*-Wildtypstamm B10S.

3.3.2 Untersuchungen zur *nif*-Promotor-abhängigen Expression von YFP und Bakteriorhodopsin unter Einfluss verschiedener Lichtbedingungen

Zur Klärung der Fragestellung, inwieweit die verschiedenen Lichtbedingungen das Zellwachstum und die heterologe Expression beeinflussen, mussten zunächst definierte Lichtqualitäten festgelegt werden. Im Rahmen der Doktorarbeit von Achim Heck wurde als Referenzwert für die Kultivierung von *R. capsulatus* das Standardbeleuchtungssystem etabliert. Es besteht aus zwei L-förmigen Vorrichtungen, in denen jeweils drei handelsübliche 60 W-Glühlampen angebracht sind, die im Abstand von 50 cm voneinander platziert wurden (Abb. 26).

Abb. 26: Phototrophe Kultivierung von *R. capsulatus* in Flüssigkultur unter der definierten Standardbeleuchtung

Das Standardbeleuchtungssystem für die phototrophe Kultivierung von *R. capsulatus* besteht aus zwei L-förmigen Vorrichtungen, in denen jeweils drei handelsübliche Glühlampen angebracht sind. Die Vorrichtungen stehen in einem Abstand von 50 cm zueinander.



In Abbildung 27 ist das Emissionsspektrum der 60 W-Glühlampen (gelbe Linie) dargestellt. Es zeigt, dass Glühlampen über den gesamten Bereich des sichtbaren Spektrums emittieren, wobei der Anteil im kurzwelligen Bereich des sichtbaren Lichts (Blauviolet) sehr gering ist; mit steigender Wellenlänge bis in den Infrarotbereich steigt die Lichtemission jedoch leicht an (Heck, 2008).

Da bekannt ist, dass die photosynthetischen Membranen von *R. capsulatus* die Photopigmente Bakteriochlorophyll *a* und die Carotinoide Spheroiden und Spheroidenon enthalten (Abb. 27, violette Linie), wurden neben dem Glühlampensystem alternative Beleuchtungssysteme, die die Photopigmente von *R. capsulatus* anregen sollen, etabliert (Heck, 2008). *R. capsulatus* kann demnach für die Erzeugung von Energieäquivalenten nur Licht nutzen, das zur Anregung der Photopigmente der photosynthetischen Membranen führt. Die Kultivierung von *R. capsulatus* im

Glühbirnenlicht führt hauptsächlich aufgrund der geringen Lichtemission im kurzwelligen Bereich zu der Anregung von Bakteriochlorophyll *a* im Bereich von 800 nm und 860 nm.

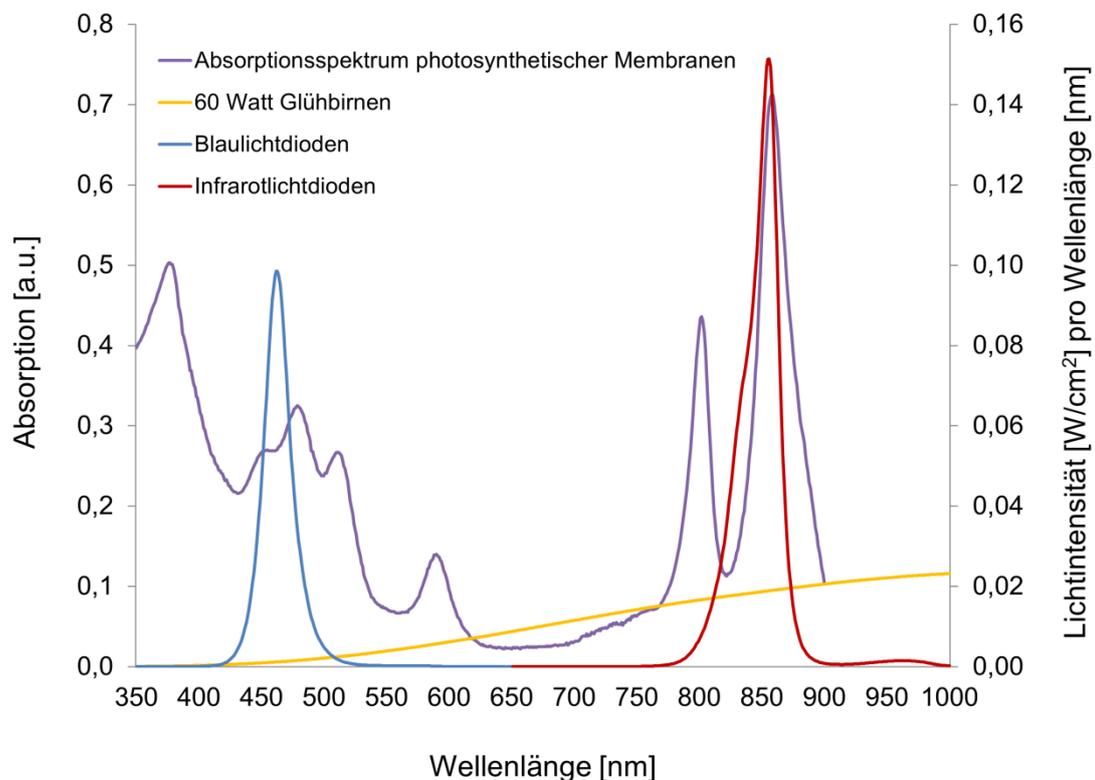


Abb. 27: Lichtemissionsspektrum der verschiedenen Beleuchtungssysteme sowie das Absorptionsspektrum photosynthetischer Membranen von *R. capsulatus*

Die gelbe Linie stellt die Lichtemission der Glühbirnen in Abhängigkeit von der Wellenlänge dar. Das Emissionsspektrum wurde mit einem ADS-FieldSpec-Spectroradiometer im Abstand von 25 cm zu den Glühlampen aufgezeichnet. Die blaue und die rote Linie stellen die Lichtemission der LED-Beleuchtungsplatten in Abhängigkeit von der Wellenlänge dar. Zur Aufnahme der Spektren wurde ein ASD-FieldSpec-Spectroradiometer im Abstand von 10 cm verwendet. Ebenfalls dargestellt ist das Absorptionsspektrum der photosynthetischen Membranen von *R. capsulatus* (violette Linie). Hierfür wurde *R. capsulatus* phototrop kultiviert, die Zellen wurden aufgeschlossen und fraktioniert. Anschließend wurde die Membranfraktion photometrisch analysiert. Aus der Abbildung geht hervor, dass das Emissionsspektrum der Infrarotdioden das Absorptionsspektrum von Bakteriochlorophyll *a* (850 nm) überlagert. Das Emissionsspektrum der Blaulichtdioden liegt genau im Bereich des Absorptionsspektrums der Carotinoide (Spheroiden) bei einer Wellenlänge von 460 nm. Zu berücksichtigen ist, dass die Lichtintensität der Blaulichtdioden nur 66 % der Intensität der Infrarotlichtdioden erreicht. Die Lichtintensität der Glühbirnen liegt deutlich unter der Intensität der LED-Platinen (Heck 2008).

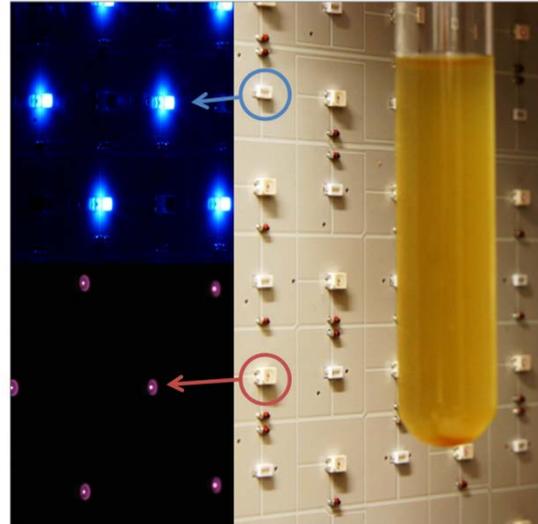
Als erste alternative Lichtquelle wurde daher ein Beleuchtungssystem gewählt, das Licht im Infrarotbereich von 856 nm emittiert (Abb. 27, rote Linie) und für die Anregung von Bakteriochlorophyll *a* geeignet ist. Als zweite Beleuchtungsquelle wurden Dioden gewählt, die

Licht im blauen Bereich des sichtbaren Spektrums mit einer Wellenlänge von 460 nm emittieren (Abb. 27, blaue Linie) und daher für die Anregung der Carotinoide geeignet sind (Heck, 2008).

In Kooperation mit der Firma Insta Elektro GmbH (Lüdenscheid) wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Achim Heck spezielle Leuchtdioden entwickelt, die die gezielte Anregung der Photopigmente während der Kultivierung von *R. capsulatus* ermöglichen (Abb. 28).

Abb. 28: Phototrophe Kultivierung von *R. capsulatus* in Flüssigkultur mittels LED-Beleuchtungsplatinen

Das LED-Beleuchtungssystem kann zur alternativen Beleuchtung von *R. capsulatus* verwendet werden. In Kooperation mit der Firma Insta Elektro GmbH wurden die LED-Platinen entwickelt, die die Anzucht von *R. capsulatus* in den definierten Wellenlängen im blauen (460 nm) und roten (856 nm) Bereich des Lichtspektrums ermöglichen. Dazu wurden pro Platine abwechselnd 120 infrarote sowie 120 blaue Leuchtdioden im Abstand von 1,5 cm montiert. Die Blau- und Rotleuchtdioden sind in ihren Farben kreisförmig markiert. Fotografien von Achim Heck.



Um den Einfluss von Licht auf die *nif*-abhängige Expression von löslichen Proteinen und Membranproteinen zu untersuchen, wurden YFP- und bR-Expressionskulturen sowie Kontrollkulturen des *R. capsulatus*-Wildtypstamms B10S, wie unter 2.2.2.1 und 2.2.2.3 beschrieben, kultiviert. Stickstoffmangelbedingungen wurden durch die Nutzung von Serin anstelle von Ammonium als Stickstoffquelle simuliert. Um zu überprüfen, ob die heterologe Genexpression unter den verschiedenen Lichtbedingungen das Wachstum der Zellen beeinflusst, wurden die Zelldichten der Kulturen in regelmäßigen Intervallen bestimmt. Um die Synthese der heterologen Proteine nachzuweisen, wurden in der exponentiellen Phase ($OD_{660nm} = 1$) sowie in der stationären Phase (168 h) Proben (1,5 ml) für die Immunodetektion der mit dem His₆-Tag markierten Proteine mittels *Western Blot* entnommen. Das aufgetragene Probenvolumen wurde so gewählt, dass die eingesetzte Menge der *R. capsulatus*-Zellen einer $OD_{660nm} = 0,2$ entsprach.

Das Ergebnis der Wachstumsstudien sowie des immunologischen Proteinnachweises ist in Abbildung 29 dargestellt.

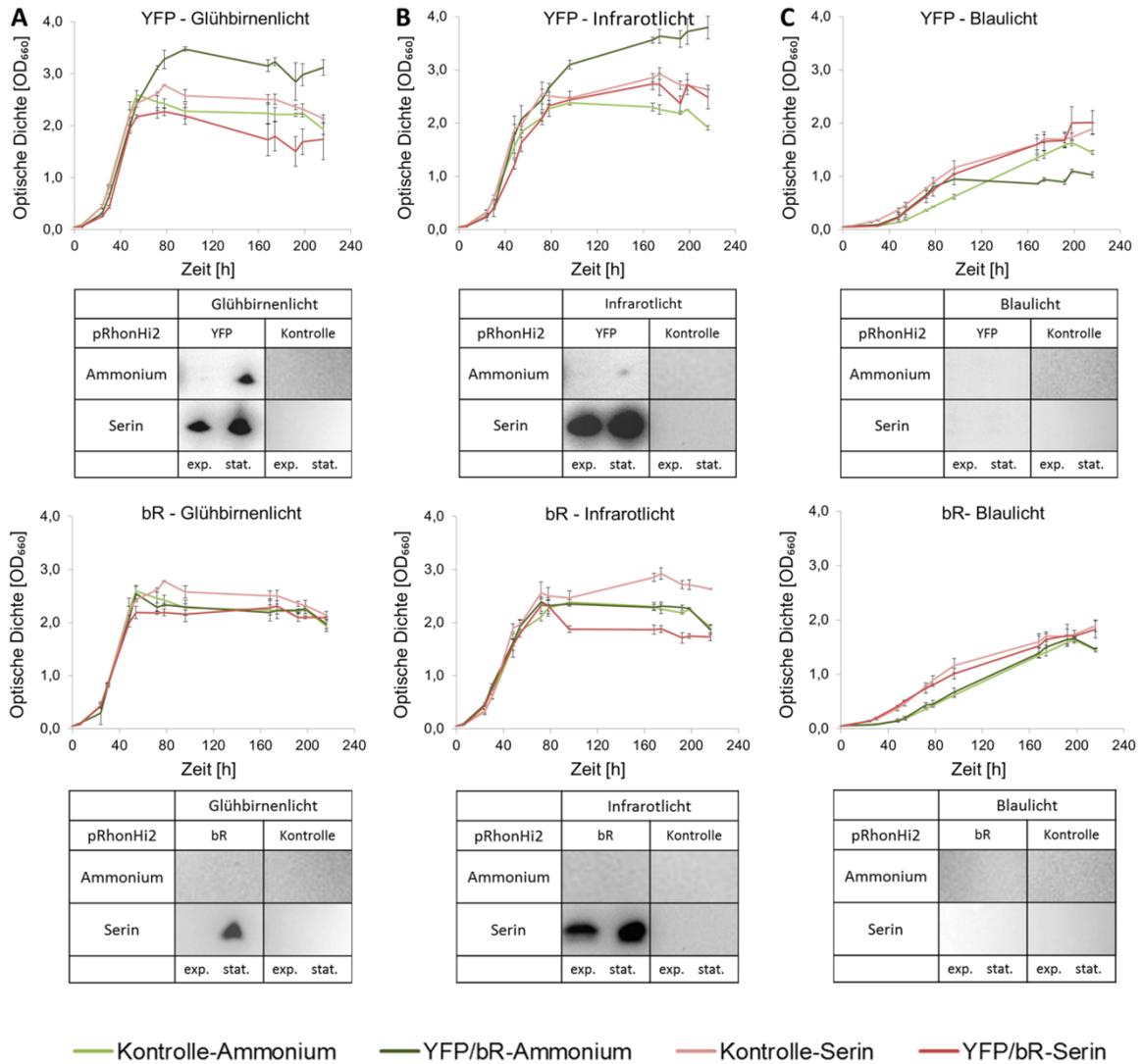


Abb. 29: Synthese der heterologen Proteine YFP und Bakteriorhodopsin mittels des *nif*-Promotor-basierten *R. capsulatus*-Expressionssystemes unter verschiedenen Lichtbedingungen

Gezeigt sind die Wuchskurven der YFP- und bR-Expressionskulturen des *R. capsulatus*-Wildtypstamms B10S unter phototrophen Bedingungen. Die Kulturen wurden jeweils unter Glühbirnenlicht (A), Infrarotlicht (B) und Blaulicht (C) mit den Stickstoffquellen Serin oder Ammonium inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das Zellwachstum von *R. capsulatus*-B10S-pRhonHi2-Leervektor verfolgt. Die Werte geben den Mittelwert einer Dreifachbestimmung an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Immunodetektion der Proteine erfolgte mit Proben, die während der exponentiellen ($OD_{660nm} = 1$) und stationären (nach 168 h) Phase des Zellwachstums entnommen wurden, hier als „exp.“ und „stat.“ gekennzeichnet. Die aufgetragene Zellmenge entsprach einer $OD_{660nm} = 0,2$. Die Detektion erfolgte durch eine immunologische Nachweisreaktion mittels des HRP-Antikörpers, der spezifisch den His₆-Tag der Proteine markierte.

Die Wuchskurven der *R. capsulatus*-Kulturen, die unter Glühbirnenlicht kultiviert wurden, sind in Abbildung 29 A dargestellt. Die YFP- und bR-Expressionskulturen sowie die Kontrollkulturen des *R. capsulatus*-Wildtypstamms B10S zeigen eine typische Wachstumskurve mit einer Latenzphase, einer exponentiellen und einer stationären Wuchphase. Unter diesen definierten Bedingungen erreichen sie am Ende des Zellwachstums eine maximale Zelldichte von $OD_{660nm} = 2,2 - 3,5$. Die

YFP- und bR-Expressionskulturen, die Serin als Stickstoffquelle verwerten (dunkelrote Linie), zeigen eine verringerte Zelldichte im Vergleich zu dem Serin nutzenden Kontrollstamm (hellrote Linie). Im Gegensatz dazu zeigen die Ammonium verwertenden Expressionskulturen (dunkelgrüne Linie) kein negativ beeinflusstes Zellwachstum im Vergleich zu dem unter gleichen Bedingungen kultivierten Kontrollstamm (hellgrüne Linie). YFP-Expressionskulturen erreichen, verglichen mit der Kontrollkultur, zudem eine erhöhte Zelldichte. Diese Ergebnisse lassen sich durch die unterschiedliche Wirkungsweise von Ammonium und Serin als Stickstoffquelle erklären. Die heterologe Expression unter Kontrolle des *nif*-Promotors wird durch die Zugabe von Ammonium reprimiert, während heterologes Protein in Serin nutzenden Expressionskulturen akkumulieren kann. Das unterschiedliche Wuchsverhalten ist demnach auf toxische Effekte, die durch die Synthese von heterologen Proteinen ausgelöst werden, zurückzuführen.

Die Ergebnisse der zugehörigen *Western Blot*-Analyse bestätigen diese Annahme und zeigen in Abhängigkeit der gewählten Stickstoffquelle große Unterschiede hinsichtlich der Proteinakkumulation. Es zeigte sich, dass in der stationären Phase der Ammonium nutzenden YFP-Expressionskulturen eine Proteinakkumulation nachgewiesen werden konnte, während in den unter gleichen Bedingungen kultivierten bR-Expressionskulturen keine Akkumulation von Bakteriorhodopsin beobachtet werden konnte. Dieses Ergebnis entspricht nicht den Erwartungen und ist durch einen vorzeitigen Abbau des Ammoniums aufgrund der langen Inkubationszeit der YFP-Expressionskulturen zu erklären. In Serin verwertenden Expressionskulturen konnte eine signifikante Proteinakkumulation von YFP in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase nachgewiesen werden, während Bakteriorhodopsin nur in der stationären Wachstumsphase akkumulierte.

In Abbildung 29 B sind die Wuchskurven der YFP- und bR-Expressionskulturen sowie der Kontrollkulturen dargestellt, die unter Infrarotlichtbeleuchtung kultiviert wurden. Die Kulturen erreichen unter diesen definierten Bedingungen ähnliche finale Zelldichten von $OD_{660nm} = 2,2 - 3,8$ wie die unter Glühbirnenlicht kultivierten Kulturen. Weiterhin konnten auch keine signifikanten Abweichungen der Wachstumskurven zwischen den Serin und Ammonium nutzenden Kulturen aufgezeigt werden.

In Hinblick auf die *Western Blot*-Analyse ist jedoch ein entscheidender Unterschied zu beobachten. Während in unter Glühbirnenlicht kultivierten bR-Expressionskulturen eine Proteinakkumulation ausschließlich in der stationären Wachstumsphase nachgewiesen werden konnte, ist unter Infrarotlichtbedingungen eine Proteinakkumulation sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase zu beobachten. Zudem ist die Proteinakkumulation von YFP und Bakteriorhodopsin unter diesen definierten Bedingungen im Vergleich zu den Glühbirnenlichtbedingungen erhöht.

Die Wuchskurven der YFP- und bR-Expressionskulturen, die unter Blaulichtbedingungen kultiviert wurden, sind in Abbildung 29 Abb. 29 C dargestellt. Unter diesen Bedingungen zeigen die Kulturen ein abweichendes Ergebnis der Wachstumskurve. Die Kulturen zeigen eine auffällig lange Latenzphase und können auch nach 60 Stunden nur ein vermindertes exponentielles Zellwachstum aufweisen. Dabei erreichen sie nur eine finale Zelldichte von $OD_{660nm} = 1,1 - 1,8$. Interessanterweise konnten keine Abweichungen der finalen Zelldichte der Serin- und Ammonium nutzenden Kulturen beobachtet werden.

In der zugehörigen *Western Blot*-Analyse der YFP- und bR-Expressionskulturen konnte keine Proteinakkumulation, unabhängig von der gewählten Stickstoffquelle, nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis verifiziert die Annahme, dass *R. capsulatus*-Zellen einen Blaulichteffekt aufweisen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese des heterologen, löslichen Proteins YFP und des Membranproteins Bakteriorhodopsin in dem neuen *nif*-Promotor-basierten *R. capsulatus*-Expressionssystem möglich ist. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine ausschließlich unter Glühbirnen- und Infrarotlicht synthetisiert werden können. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung der *R. capsulatus*-Zellen mit Infrarotlicht zu einer erhöhten heterologen Proteinakkumulation führt. Im Gegensatz dazu ist die heterologe Expression durch die Kultivierung der Zellen mit Blaulicht reprimiert.

3.3.3 Untersuchungen zur T7-abhängigen Expression von Bakteriorhodopsin unter Einfluss verschiedener Lichtbedingungen

Ausgehend von den bisher erbrachten Ergebnissen ergibt sich die Fragestellung, wodurch die ausbleibende Proteinakkumulation unter Blaulichtbedingungen hervorgerufen wird. Hierfür ergeben sich zwei mögliche Erklärungen:

- 1) Die Reprimierung der heterologen Expression korreliert mit einer unter Blaulichtbedingungen grundsätzlichen Beeinträchtigung der Zellen, die sich in diesem Fall in einem verminderten Zellwachstum äußert.
- 2) Die ausbleibende Proteinakkumulation unter Blaulichtbedingungen ist auf einen direkten Blaulichteffekt zurückzuführen. Der wirtseigene *nif*-Promotor von *R. capsulatus* wird durch die Bestrahlung mit Blaulicht reprimiert und führt dadurch zu einer Inhibierung der heterologen Expression.

Um zu überprüfen, ob die fehlende Synthese der heterologen Proteine unter Blaulichtbedingungen aufgrund einer blaulichtbedingten Beeinträchtigung des Zellwachstums oder durch eine direkte Blaulichtregulation des *nif*-Promotors hervorgerufen wird, wurden Bakteriorhodopsin-Expressionsstudien mit dem T7-abhängigen *R. capsulatus*-Expressionssystem unter denselben Bedingungen durchgeführt. Der T7-Promotor wird in *R. capsulatus* durch die Zugabe von Fruktose induziert und ist dabei unabhängig von Serin, Ammonium oder Licht. Sollte die Reprimierung der heterologen Expression im *nif*-abhängigen Expressionssystem auf eine direkte Blaulichtregulation des *nif*-Promotors zurückzuführen sein, wird im T7-abhängigen Expressionssystem eine Proteinakkumulation unter Blaulichtbedingungen erwartet.

Hierfür wurden bR-Expressionskulturen sowie Kontrollkulturen des *R. capsulatus*-Wildtypstamms B10ST7, wie unter 2.2.2.1 und 2.2.2.3 beschrieben, kultiviert. Stickstoffmangelbedingungen wurden durch die Nutzung von Serin anstelle von Ammonium als Stickstoffquelle simuliert. Um zu überprüfen, ob die heterologe Genexpression unter den verschiedenen Lichtbedingungen das Wachstum der Zellen beeinflusst, wurden die Zelldichten der Kulturen in regelmäßigen Intervallen bestimmt. Um die Synthese der heterologen Proteine nachzuweisen, wurden in der exponentiellen Phase ($OD_{660nm} = 1$) sowie in der stationären Phase (96 h) Proben (1,5 ml) für die Immunodetektion der mit dem His₆-Tag markierten Proteine mittels *Western Blot* entnommen. Das aufgetragene Probenvolumen wurde so gewählt, dass die eingesetzte Menge der *R. capsulatus*-Zellen einer $OD_{660nm} = 0,2$ entsprach.

Das Ergebnis der Wachstumsstudien sowie des immunologischen Proteinnachweises ist in Abbildung 30 dargestellt.

Die bR-Expressionskulturen sowie die Kontrollkulturen des *R. capsulatus*-Stamms B10ST7 zeigen unter Standardbeleuchtung mit Glühbirnenlicht im Vergleich zu den pRhonHi2-bR-Expressionskulturen eine veränderte Wachstumskurve (Abb. 30 A). Die Nutzung von Serin oder Ammonium als Stickstoffquelle führt zu einem unterschiedlichen Wuchsverhalten der Zellen, was sich in einer verringerten maximalen Zelldichte der Serin nutzenden Kulturen bemerkbar macht. Ebenso konnte ein abweichendes Ergebnis der Wuchskurven zwischen den bR-Expressionskulturen und den Kontrollkulturen beobachtet werden. bR-Expressionskulturen weisen unabhängig von der gewählten Stickstoffquelle im Vergleich zu den Kontrollkulturen ein vermindertes Zellwachstum auf. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der T7-Promotor nicht Ammonium-reguliert ist und die Genexpression unabhängig von der Serin- oder Ammonium-Zugabe durch Fruktose induziert wird. Die Induktion der heterologen Expression führt wiederum zu einer Stressantwort der Zelle, die oft mit einem reduzierten Zellwachstum korreliert.

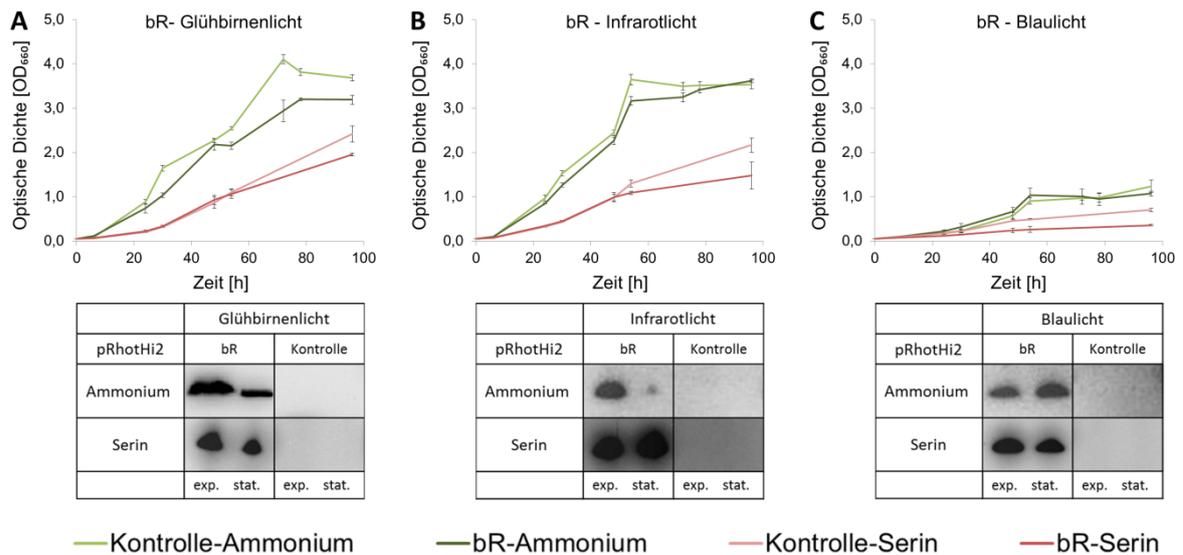


Abb. 30: Synthese von Bakteriorhodopsin mittels des T7-Promotor-basierten *R. capsulatus*-Expressionssystem unter verschiedenen Lichtbedingungen

Gezeigt ist das Wachstumsverhalten der bR-Expressionskultur des *R. capsulatus*-Wildtypstamms B10S unter phototrophen Bedingungen. Die Kultur wurde jeweils unter Glühbirnenlicht (A), Infrarotlicht (B) und Blaulicht (C) mit den Stickstoffquellen Serin oder Ammonium inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das Zellwachstum von *R. capsulatus*-B10S-pRhotHi2-Leervektor verfolgt. Die Werte geben den Mittelwert einer Dreifachbestimmung an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Immunodetektion der Proteine erfolgte mit Proben, die aus der exponentiellen ($OD_{660nm} = 1$) und stationären (nach 96 h) Phase des Zellwachstums entnommen wurden, hier als „exp.“ und „stat.“ gekennzeichnet. Die aufgetragene Zellmenge entsprach einer $OD_{660nm} = 0,2$. Die Detektion erfolgte durch eine immunologische Nachweisreaktion mittels des HRP-Antikörpers, der spezifisch den His₆-Tag der Proteine markierte.

Die Ergebnisse der *Western Blot*-Analyse zeigen eine Proteinakkumulation in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase unabhängig von der Serin- oder Ammonium-Zugabe und bestätigen damit, dass der T7-Promotor nicht durch die Zugabe von Serin oder Ammonium beeinflusst wird. Bei dem Vergleich der Bakteriorhodopsin-Level, die in Zellen während der exponentiellen und stationären Phase erreicht wurden, konnte eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden: Bakteriorhodopsin akkumuliert während der exponentiellen Phase deutlich höher als in der stationären Phase der Expressionskulturen.

In Abbildung B sind die Wuchskurven der bR-Expressionskultur sowie der Kontrollkultur des *R. capsulatus*-Stamms B10ST7, die unter Infrarotlichtbeleuchtung angezogen wurden, dargestellt. Die Kulturen erreichen unter diesen definierten Bedingungen ähnliche finale Zelldichten wie die unter Glühbirnenlicht kultivierten Kulturen. Ebenso konnte kein abweichendes Ergebnis der Wuchskurven bezüglich der unterschiedlichen Stickstoffquellen-Nutzung beobachtet werden.

Die *Western Blot*-Analyse der Expressionskulturen zeigt ebenfalls eine ähnliche Proteinakkumulation wie die unter Glühbirnenlicht angezogenen Expressionskulturen. Jedoch

konnte dabei eine erhöhte Proteinakkumulation in allen Fällen beobachtet werden. In Ammonium nutzenden Kulturen konnte ein unterschiedliches Proteinlevel in den Zellen der exponentiellen und stationären Phase beobachtet werden, während die Proteinakkumulation in der exponentiellen und stationären Phase der Serin nutzenden Expressionskulturen annähernd gleich ist. Hierbei zeigte sich, dass Bakteriorhodopsin in Ammonium nutzenden Expressionskulturen deutlicher höher in der exponentiellen als in der stationären Phase akkumuliert.

Die Wuchskurven der *R. capsulatus*-B10ST7-Kulturen, die unter Blaulichtbeleuchtung kultiviert wurden, sind in Abbildung 30 C dargestellt. Unter diesen definierten Bedingungen zeigt der Stamm ein abweichendes Ergebnis bezüglich der finalen Zelldichte. Die bR-Expressionskulturen sowie die Kontrollkulturen verbleiben länger in der Latenzphase und zeigen auch nach 40 Stunden nur ein sehr vermindertes exponentielles Zellwachstum bzw. erreichen die stationäre Phase. Dabei erreichen Kulturen mit Ammonium-Zugabe im Vergleich zu den Serin nutzenden Kulturen eine etwas höhere finale Zelldichte.

Die Ergebnisse zeigen auf, dass in den bR-Expressionskulturen, die unter Blaulichtbedingungen kultiviert wurden, eine deutliche Proteinakkumulation zu beobachten ist. Dabei scheint das Level von Bakteriorhodopsin in der exponentiellen und stationären Phase der Expressionskulturen, die Ammonium oder Serin als Stickstoffquelle nutzen, annähernd gleich zu sein.

Es konnte gezeigt werden, dass Bakteriorhodopsin im T7-abhängigen Expressionssystem unter Blaulichtbedingungen synthetisiert werden kann. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die heterologe Expression unter der Kontrolle des *nif*-Promotors Blaulicht-reguliert ist und nicht auf ein blaulichtbeeinträchtigt Zellwachstums zurückzuführen ist. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Synthese von heterologen Proteinen unter Infrarotlichtbedingungen unabhängig von dem genutzten Promotor gesteigert wird.

Dies ist möglicherweise durch die unterschiedliche Lichtintensität der Beleuchtungssysteme zu erklären, die unter Infrarotlichtdioden um ein Vielfaches höher ist.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Charakterisierung des *nif*-Promotor-basierten *R. capsulatus*-Expressionssystems konnten aufzeigen, dass YFP und Bakteriorhodopsin unter Glühbirnenlicht- und Infrarotlichtbedingungen synthetisiert werden konnten. Die heterologe Expression ist unter Blaulichtbedingungen reprimiert. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass dieser Effekt auf eine direkte Blaulichtregulation des *nif*-Promotors zurückzuführen ist. Damit konnte erstmalig ein lichtreguliertes Expressionssystem in *R. capsulatus* beschrieben werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Beleuchtung der Zellen mit Infrarotlicht einen positiven Einfluss auf die Proteinakkumulation hat. Diese Beobachtung konnte unabhängig von dem gewählten Promotor festgestellt werden, so dass eine Beleuchtung der Expressionskulturen mit Infrarotlicht die heterologe Expression schlecht zu synthetisierender Proteine möglicherweise verbessern kann.

4. Diskussion

Die Identifizierung von bisher unbekanntem Proteinen und die damit einhergehende Erforschung ihrer Funktionen stehen aufgrund ihrer verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten im unmittelbaren Fokus der Biotechnologie und Medizin. Um den Zugang zu neuen Proteinen zu optimieren, wurde das Expressionssystem *R. capsulatus* entwickelt und in dieser Arbeit evaluiert. Im Folgenden werden die verschiedenen Schritte der Evaluierung des *R. capsulatus*-Expressionssystems beschrieben und mit Blick auf die grundsätzliche Anwendbarkeit beurteilt. Dabei standen besonders die Fragen nach der Anwendbarkeit des Systems für ein funktionsbasiertes Screening von Genen aus dem Metagenom sowie die Synthese heterologer Membranproteine im Vordergrund. Des Weiteren sollte außerdem die lichtabhängige Regulation eines *nif*-Promotor-basierten Expressionssystems in *R. capsulatus* untersucht werden.

4.1 *R. capsulatus* als möglicher Wirt für das komparative Screening nach Hydrolasegenen aus verschiedenen Metagenombanken

Bislang sind weniger als 1% aller bekannten Mikroorganismen unter Laborbedingungen kultivierbar, was zur Folge hat, dass das gesamte Repertoire ihrer Genprodukte bislang auch nicht biotechnologisch genutzt werden kann (Streit *et al.*, 2004). Die Metagenomik überwindet diese Limitierung und ermöglicht durch kulturunabhängige Verfahren die Identifizierung neuer Gene von nicht kultivierbaren Mikroorganismen. Damit kann das Spektrum potentieller Kandidatengene für Proteine, die für biotechnologische Anwendungen genutzt werden können, erheblich erweitert werden (Schmeisser *et al.*, 2007). Allgemein beschreibt das Metagenom die Gesamtheit aller genomischen Informationen der Organismen eines Habitats.

Für die Biotechnologie sind vor allem Enzyme von Bedeutung, die in industriellen Prozessen wie bei der Produktion von Wasch- und Reinigungsmitteln, Lebensmitteln, Textilien, Papier, Leder sowie Bulk- und Feinchemikalien Anwendung finden (Lorenz & Eck, 2005). Hierbei weisen Enzyme als Biokatalysatoren einige Vorteile, wie eine hohe Regio- und Enantioselektivität (Jaeger *et al.*, 1999; Romas J. Kazlauskas, 1998), Stabilität in organischen Lösungsmitteln (Bornscheuer *et al.*, 2002; White & White, 1997) oder ein breites Substratspektrum (Henne *et al.*, 2000), auf. Aufgrund von umweltfreundlicheren Reaktionsbedingungen, einer CO₂-neutralen Produktion sowie einem niedrigeren Energieverbrauch und der weniger aufwendigen Abfallentsorgung lassen sich in der industriellen Synthese enorme Kosten einsparen (Hudlicky & Reed, 2009). Für viele chemische Reaktionen konnten die entsprechenden Biokatalysatoren jedoch noch nicht identifiziert und

beschrieben werden (Lorenz & Eck, 2005). An dieser Stelle finden kulturunabhängige Metagenom-Screenings Anwendung, um neue Biokatalysatoren zu erschließen. In kulturunabhängigen Verfahren wird die metagenomische DNA isoliert, kloniert und mittels funktionsbasierter Screenings durchmustert. Dabei hängt die Identifizierung eines neuen Gens mittels aktivitätsbasierten Screenings von mehreren Faktoren ab. Limitierungen hierbei sind unter anderem die Länge des Zielgens, das Expressionslevel des Zielgens in dem gewähltem Expressionswirt sowie die posttranslationalen Modifikationen (Gabor *et al.*, 2007).

Escherichia coli gilt in der funktionsbasierten Metagenomanalyse unter anderem aufgrund seiner hohen Transformationsrate als Standard-Expressionswirt (Gabor *et al.*, 2007). Die funktionelle Expression der Metagenom-Gene wird allerdings häufig durch verschiedene Faktoren limitiert. Hierbei handelt es sich beispielsweise um bakterielle Promotoren, die aufgrund der Insert-Größe nur die Gene, die in den „Randbereichen“ der Fragmente lokalisiert sind, exprimieren. Im Besonderen kodieren bakterielle Genome hierbei für eine Vielzahl von Transkriptions-Terminations-Sequenzen, durch die es zum vorzeitigen Abbruch der Transkription kommen kann (Troeschel *et al.*, 2010, 2012). Neben der Transkriptions-Problematik ist die Detektion von aktiven Klonen in *E. coli* durch weitere Limitierungen während der Proteinsynthese und Faltung beeinflusst. Zu nennen sind hierbei unter anderem das Fehlen von Kofaktoren sowie die Unfähigkeit, posttranslationale Modifikationen, wie die Glykosylierung, an den rekombinanten Proteinen vorzunehmen (Freigassner *et al.*, 2009; Weickert & Doherty, 1996).

Eine vielversprechende Alternative, um diesen Limitierungen entgegenzuwirken und neue Gene zu identifizieren, ist der Einsatz von alternativen Expressionswirten (Leis *et al.*, 2013). Die Etablierung neuer geeigneter Expressionswirte ist hierbei von großer Bedeutung. Die verschiedenen Expressionswirte unterscheiden sich in ihren physiologischen und regulatorischen Eigenschaften, wodurch nicht alle Proteine gleich stark in den verschiedenen Organismen synthetisiert werden können. Beispielsweise wird die Fähigkeit Promotoren zu erkennen von den Sigmafaktoren bestimmt. Die Anzahl dieser Sigmafaktoren variiert signifikant in den unterschiedlichen Organismen. Während in *E. coli* nur sieben verschiedene Sigmafaktoren beschrieben werden konnten, waren es beispielsweise in *P. putida* sogar 20 (Ono *et al.*, 2007). Neben der Promotorerkennung und der erfolgreichen Transkription (Jana & Deb, 2005) sind jedoch auch die Translation, korrekte Proteinfaltung (Baneyx, 2004) und posttranslationale Modifikationen (Peti & Page, 2007) von Bedeutung.

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass funktionsbasierte Analysen von Metagenombanken in verschiedenen alternativen Expressionswirten zur Identifizierung bisher

nicht beschriebener Gene führten (Gabor *et al.*, 2007). Dieser Effekt wurde in der Literatur als „different host - different hit“ beschrieben (Gabor *et al.*, 2007).

Zu den bereits etablierten alternativen Expressionswirten zählen die Pseudomonaden, Streptomyzeten als auch Rhizobien (Courtois & Cappellano, 2003; Ferrer *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 2007).

Pseudomonaden

So konnte beispielsweise in vergleichenden funktionsbasierten Metagenom-Analysen in *E. coli* und dem auch in dieser Arbeit untersuchten Expressionswirt *P. putida* gezeigt werden, dass die Gene einer Naphthalen-Dioxygenase (NDO) ausschließlich in *P. putida* identifiziert werden konnten (Gabor *et al.*, 2007; Ono *et al.*, 2007). Die untersuchte Genbank wurde aus metagenomischer DNA aus Öl-kontaminierten Böden in Japan konstruiert. Für die Durchmusterung der Genbank wurden jedoch nicht die in dieser Arbeit vorgestellten Aktivitätstests angewandt, sondern die Identifizierung der NDO erfolgte über Komplementationsversuche. Der defiziente *E. coli*-Stamm konnte nicht auf Naphthalen als einziger Kohlenstoffquelle wachsen, so dass dieses Bakterium nicht der Lage ist, Naphthalen aufzunehmen und als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Der defiziente *P. putida*-Stamm hingegen zeigte einen Abbau von Naphthalen, so dass nachgewiesen werden konnte, dass *P. putida* Naphthalen als einzige Kohlenstoffquelle verwerten kann (Ono *et al.*, 2007).

Streptomyzeten

Ein weiterer alternativer Expressionswirt, der bereits für komparative funktionsbasierte Metagenom-Screenings verwendet wurde, ist *Streptomyces lividans*, der zu der Klasse der Streptomyzeten gehört. Streptomyzeten sind aerobe, Gram-positive Bodenbakterium und werden wiederum der Ordnung der *Actinomycales* zugeordnet. Diese Organismen produzieren eine Vielzahl an Sekundärstoffen, die vor allem in industriellen und pharmazeutischen Anwendungen - insbesondere bei der Herstellung von Antibiotika - genutzt werden. Zwei Drittel aller bekannten mikrobiell synthetisierten Antibiotika werden in Actinomyzeten produziert (Kieser *et al.*, 2000). Des Weiteren verfügen die Streptomyzeten über ein 8 MB großes lineares Genom, das damit fast doppelt so groß ist wie das Genom anderer etablierter Bakterien (Schrempf, 1991). Als besonderer Vertreter der Streptomyzeten gilt *Streptomyces lividans*. Dieser Organismus konnte bereits als vielversprechendes bakterielles Expressionssystem beschrieben werden und zeichnet sich durch eine effiziente heterologe Expression aus (Anné *et al.*, 2012). Die Wachstumsrate von *S. lividans* (2 h) ist verglichen mit dem Standard-Expressionswirt *E. coli* jedoch erheblich niedriger.

Weitere besondere Eigenschaften dieses Bakteriums sind die einfache genetische Manipulierbarkeit (Martinez *et al.*, 2004) sowie die hohe Sekretionskapazität (Anné *et al.*, 2012). Eine Vielzahl an synthetisierten Proteinen wie zum Beispiel hydrolytische Enzyme werden in *S. lividans* direkt in das Kulturmedium sekretiert. Dies führt in vielen Fällen zu einer nativen Faltung des Proteins und häufig zu einer leichteren und effizienteren Reinigung (Sevillano *et al.*, 2013). So konnte noch keine Bildung von *inclusion bodies* in der Literatur beschrieben werden (Sevillano *et al.*, 2013). Diese physiologischen Eigenschaften verschaffen *S. lividans* einen Vorteil gegenüber dem bereits gut etablierten Expressionswirt *E. coli*. Des Weiteren besitzt *S. lividans* einen hohen genomischen GC-Anteil (Kieser *et al.*, 2000), so dass sich diese Bakterien vorrangig für die Expression von Genen GC-reicher Organismen eignen.

In komparativen funktionsbasierten Metagenom-Screenings in den Expressionswirten *E. coli* und *S. lividans* konnte gezeigt werden, dass, abhängig von dem gewählten Expressionswirt, unterschiedliche Gene funktionell exprimiert werden (Courtois & Cappellano, 2003). Hierfür wurde zunächst ein *shuttle cosmid vector* konstruiert, der sowohl für *E. coli* als auch für *S. lividans* verwendet werden konnte. Die metagenomische DNA entstammte aus im Boden lebenden Mikroben und sollte auf Polyketid-Synthase-Gene untersucht werden, da die entsprechenden Polyketid-Synthasen möglicherweise für die Produktion neuer Polyketide, sogenannter Naturstoffe, verwendet werden können. Erste sequenzbasierte Analysen erbrachten, dass der GC-Gehalt der metagenomischen DNA zwischen 53 % - 70 % lag, so dass *E. coli* mit einem GC-Gehalt von 51 % deutlich unter diesem lag. *S. lividans* erschien mit einem deutlich höheren GC-Gehalt und dem hohen Potential Sekundärstoffe zu produzieren als geeigneter Kandidat, um in komparativen Metagenomanalysen eingesetzt zu werden. In der funktionsbasierten Analyse wurden Bakterienklone von *E. coli* und *S. lividans* auf nachweisbare biologische Aktivitäten durchmustert. Es stellte sich jedoch heraus, dass nur die eingebrachten Cosmide zu einer Aktivität der *E. coli*-Kolonien führten (Courtois & Cappellano, 2003). In anderen funktionsbasierten Metagenom-Screenings, die ebenfalls auf die Identifizierung neuer Polyketid-Synthasen zur Synthese neuer Naturstoffe zielten, wurde metagenomische DNA aus im Boden lebenden Mikroben isoliert und in *S. lividans* eingebracht. Die Metagenom-Screenings in *S. lividans* führten diesmal zu der Identifizierung von 5 neuen Naturstoffen (Wang *et al.*, 2000).

Rhizobien

Neben den Pseudomonaden und den Streptomycceten wurden ebenfalls Rhizobien in komparative Metagenom-Screenings eingesetzt. Bei den Rhizobien handelt es sich um aerobe, Gram-negative Bodenbakterien, die der Ordnung der Rhizobiales zugeordnet werden. Eine Besonderheit dieser Organismen ist die Fähigkeit, mit Pflanzen eine Symbiose einzugehen (Young *et al.*, 2006). Diese

landwirtschaftlich bedeutsamen Bakterien sind in der Lage, in Verbindung mit Pflanzen Stickstoff fixierende Knöllchen zu bilden. Diese Fähigkeit ist ihnen jedoch nur in der Symbiose mit Pflanzen möglich (Ding *et al.*, 2013). Die Generationszeit der Rhizobien ist im Vergleich mit dem Standardexpressionswirt *E. coli* erheblich länger. So beträgt die Generationszeit dieser Bakterien auf wurzelfreiem Boden 12 Tage und verkürzt sich in der Rhizospähre auf 9 Stunden (Schenker *et al.*, 1997). *Rhizobium leguminosarum* gilt als besonderer Vertreter der Rhizobien. Das Bakterium verfügt über ein 7,8 MB großes zirkuläres Genom, wobei ein relativ hoher GC-Gehalt von 61 % beschrieben werden konnte. Dieser Expressionswirt eignet sich aufgrund seines hohen GC-Gehalts besonders für die heterologe Expression GC-reicher Gene und stellt eine gute Alternative zu der Expression in *E. coli* dar, der einen signifikant niedrigeren GC-Gehalt besitzt.

So wurden bereits auch *E. coli* und *R. leguminosarum* in komparativen Metagenomanalysen eingesetzt (Li *et al.*, 2005; Wexler *et al.*, 2005). Die metagenomische DNA entstammte aus Gärprozessen einer Kläranlage. Für die Durchmusterung der Genbank in *E. coli* und *R. leguminosarum* wurde ein *wide host range* Cosmid konstruiert. Die Untersuchung zeigte, dass *R. leguminosarum* durch das eingebrachte Cosmid in der Lage war, auf Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Dieser Effekt konnte auf ein Gen, das für eine untypische Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase kodiert, zurückgeführt werden. Dieser Effekt konnte hingegen nicht bei *E. coli*-Zellen beobachtet werden, so dass davon auszugehen ist, dass *E. coli* nicht in der Lage ist, das Gen der Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase funktionell zu synthetisieren (Wexler *et al.*, 2005).

Die bereits durchgeführten komparativen Metagenom-Screenings in verschiedenen alternativen Expressionswirten liefern insofern ein beeindruckendes Ergebnis, als sie das hohe Potential der Nutzbarkeit verschiedener Wirte für funktionsbasierte Metagenomstudien augenfällig demonstrieren.

Im Verbund ExpresSys wurden daher weitere Expressionswirte für das funktionsbasierte *Screening* von Genen aus dem Metagenom untersucht, die sich jedoch in ihren physiologischen Eigenschaften deutlicher als die bereits von Gabor *et al.* (2007) beschriebenen Expressionswirte unterscheiden. Vier Arbeitsgruppen analysierten neben dem Standardorganismus *E. coli* die fünf alternativen Wirte *Thermus thermophilus* (Prof. Dr. Liebl, TU München), *Pseudomonas antarctica* (Prof. Dr. Streit, Universität Hamburg), *Sulfolobus acidocaldarius* (Prof. Dr. Albers, Max-Planck-Institut Marburg; Prof. Dr. Siebers, Universität Duisburg-Essen), *Pseudomonas putida* und *Rhodobacter capsulatus* (Prof. Dr. Jaeger, Universität Düsseldorf), inwieweit sie sich für funktionelle Expressionen verschiedener Hydrolasegene eignen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die alternativen Expressionswirte *P. putida* und *R. capsulatus* im Vergleich zu dem Standardwirt *E. coli* hinsichtlich ihres Nutzens für das funktionsbasierte Screening von Genen aus dem Metagenom untersucht. Hierbei lag der Schwerpunkt besonders auf der Analyse der Expressionseffizienz und Aktivität. *P. putida* konnte, wie bereits erwähnt, als alternativer Expressionswirt für das funktionsbasierte Metagenom-Screening etabliert werden und wurde unter anderem aufgrund dieser Tatsache in die komparativen Studien miteinbezogen. Besondere Eigenschaften von *P. putida* sind sein relativ großes Genom (über 6 MB), die metabolische Vielfalt sowie die Produktion von Sekundärmetaboliten (Martinez *et al.*, 2004). *R. capsulatus* konnte in früheren Studien als alternativer Expressionswirt für heterologe, lösliche Proteine beschrieben werden (Katzke *et al.*, 2010). Die Wachstumsrate von *R. capsulatus* (3 h) ist verglichen mit dem Standardexpressionswirt *E. coli* (0,5 h) niedriger, jedoch deutlich schneller im Vergleich zu den Wachstumsraten des alternativen Expressionswirts *R. leguminosarum*. Weitere Besonderheiten von *R. capsulatus* sind seine einfache genetische Manipulierbarkeit sowie die bereits gut etablierten Expressionssysteme (Katzke *et al.*, 2010; Laible *et al.*, 2009). Zudem verfügt *R. capsulatus* über weitere besondere Eigenschaften, die ihn als alternativen Expressionswirt für die funktionelle Expression von Metagenom-Genen interessant machen. Zu nennen ist die einzigartige Membranphysiologie von *R. capsulatus*. Unter phototrophen Bedingungen bildet sich, wie bereits in 1.3.1 detailliert beschrieben, ein intracytoplasmatisches Membransystem, was zu einer deutlichen Vergrößerung der Membranfläche führt. Dieses zusätzlich gebildete Membransystem kann möglicherweise für die Einlagerung heterologer Membranproteine benutzt werden. So konnte bisher ähnlich wie in *S. lividans* keine *inclusion body*-Bildung beobachtet werden. Die Bereitstellung von verschiedensten Kofaktoren und die spezielle Lipidzusammensetzung (siehe 1.3.2 und 1.3.3) bevorteilt *R. capsulatus* gegenüber dem Standardwirt *E. coli* und den oben erwähnten anderen alternativen Expressionswirten *S. lividans* und *R. leguminosarum*. Aufgrund seines hohen genomischen GC-Gehalts ist *R. capsulatus* wie auch *S. lividans* und *R. leguminosarum* vorrangig für die Expression von Genen GC-reicher Organismen geeignet.

4.1.1 Synthese lipolytischer Enzyme in den Expressionswirten *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus*

Um zu überprüfen, ob die alternativen Expressionswirte *R. capsulatus* und *P. putida* im Vergleich zu *E. coli* für das funktionsbasierte Screening von Genen aus dem Metagenom geeignet sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Synthese sechs verschiedener lipolytischer Enzyme

unterschiedlicher Herkunft auf Expressions- und Aktivitätsebene untersucht. Hierbei handelt es sich um die Lipasen und Esterasen LipS, LipT, Est5E5, LipA8b2, EstA3 und LipC5.

4.1.1.1 Einfluss der heterologen Expression auf das Zellwachstum

Während der heterologen Genexpression wiesen die verschiedenen untersuchten Expressionswirte ein unterschiedlich stark beeinträchtigt Zellwachstum auf. So konnte beobachtet werden, dass die Synthese der lipolytischen Enzyme in *R. capsulatus* keine signifikanten Veränderungen der maximalen Zelldichten hervorrief, während sich bei *E. coli*-Kulturen ein abweichendes Muster der Generationszeiten und Zelldichten zeigte. Diese wiesen durch die Expression aller Hydrolasegene, mit Ausnahme von *estA3*, ein verlangsamtes oder auch vermindertes Zellwachstum auf. Im Vergleich dazu waren die *P. putida*-Kulturen, mit Ausnahme der Est5E5-Expressionskultur, in ihren finalen Zelldichten und Generationszeiten nicht durch die heterologe Expression beeinflusst (Abb. 9).

Die negativen Effekte auf das Zellwachstum können durch die Überexpression heterologer Proteine hervorgerufen werden, deren Synthese einen hohen Anspruch an die Ressourcen und den Energiehaushalt der Wirtszellen stellt.

Rekombinante Proteine werden beispielsweise in *E. coli* im Cytosol hergestellt und mittels der Sekretions-Maschinerie - bestehend unter anderem aus dem SRP (*signal recognition particle*), dem Sec-Translocon und YidC - richtig gefaltet. Eine Überlastung der Faltungsmaschinerie durch die heterologe Expression kann nicht nur zu einer Fehlfaltung des heterologen Proteins (Freigassner *et al.*, 2009), sondern auch zu einer Inaktivierung der Ribosomen durch den RMF (*ribosome modulation factor*) führen, indem die 70S-Ribosomen zu 100S-Ribosomen dimerisieren. Folgen der Inaktivierung der Ribosomen sind oftmals die Aggregation der wirtseigenen cytosolischen und membranintegrierten Proteine, einer Inhibierung der Translation von SRP-abhängigen und -unabhängigen Proteinen, ein vermindertes Zellwachstum oder Zelltod (Bürk *et al.*, 2009; Laible *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2006). Dieses Phänomen konnte bereits für die Proteine Succinatdehydrogenase und Cytochromoxygenase der Atmungskette in *E. coli* beschrieben werden (Wagner *et al.*, 2006).

4.1.1.2 Einfluss eines unterschiedlichen GC-Gehalts von heterologen Genen und Expressionswirt

Die Expressionsstudien im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die heterologe Expression in den Organismen *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus* unterschiedliche Ergebnisse der Proteinakkumulation und der Enzymaktivität erbringt.

In den *E. coli*-Expressionskulturen konnten alle sechs lipolytischen Enzyme immunologisch nachgewiesen werden. Der Expressionswirt *R. capsulatus* synthetisierte hingegen die vier Hydrolasen LipS, LipA8b2, EstA3 und LipC5, während in *P. putida* ausschließlich Est5E5 und LipA8b2 nachgewiesen werden konnten (Abb. 9).

Ein möglicher Grund für das abweichende Expressionsverhalten in den drei verschiedenen Wirten ist die unterschiedliche *codon usage* zwischen dem jeweils ursprünglichen Wirt der untersuchten Gene und den Expressionswirten *E. coli*, *R. capsulatus* und *P. putida*. *Codon usage* beschreibt das Phänomen, dass der universelle genetische Code von verschiedenen Organismen unterschiedlich verwendet wird. Bestimmte Codons des degenerierten Codes werden bevorzugt benutzt. Das hat zur Folge, dass die spezifischen tRNA-Moleküle für die bevorzugten Codons im tRNA-Pool der Zelle deutlich stärker vertreten sind als tRNA-Moleküle, die seltene Codons erkennen (Andersson & Kurland, 1991; Ikemura, 1985). Bei der heterologen Expression kann der Vorrat der kognitiven tRNA für seltene Codons schnell erschöpft sein (Angov *et al.*, 2008; Gustafsson *et al.*, 2004). Die Auswirkungen der unterschiedlichen *codon usage* können unter anderem Verzögerungen während der Elongation der Peptidkette (Zahn, 1996), der fehlerhafte Einbau von Aminosäuren (Calderone *et al.*, 1996; Forman *et al.*, 1998; McNulty *et al.*, 2003), translationale „Sprünge“ (Kane *et al.*, 1992) sowie Leserasterverschiebungen (McNulty *et al.*, 2003) sein. Letztlich ist die Folge, dass das heterologe Gen ein niedriges Expressionslevel aufweist oder nicht akkumuliert.

Daher sollte für eine effiziente Translation heterologer mRNA in Protein die Nutzung der Codons des Expressionswirts mit dem des ursprünglichen Organismus kompatibel sein. Der GC-Gehalt der Produzenten kann als Indikator dienen, ob eine erfolgreiche Expression zu erwarten ist, da die Verwendung unterschiedlicher Codons oft mit einem unterschiedlichem GC-Gehalt des Genoms einhergeht (Knight *et al.*, 2001). Ist der GC-Gehalt des Ursprungsorganismus wie bei der Metagenom-Analyse nicht bekannt, ist die parallele Verwendung alternativer Expressionswirte mit unterschiedlichen GC-Gehalten eine vielversprechende Alternative.

Die in dieser Arbeit verwendeten Expressionswirte unterscheiden sich deutlich in dem GC-Gehalt ihres Genoms. Das Genom von *E. coli* weist einen GC-Gehalt von 50,8 % auf. Im Gegensatz dazu konnte für *P. putida* (61,5 %) und *R. capsulatus* (68 %) ein deutlich höherer GC-Gehalt beschrieben werden (Tab. 15).

Tab. 15: GC-Gehalt der in dieser Arbeit verwendeten Organismen

| Organismus | GC-Gehalt |
|----------------------|-----------|
| <i>E. coli</i> | 50,8 % |
| <i>P. putida</i> | 61,5 % |
| <i>R. capsulatus</i> | 68 % |

Da die Ursprungsorganismen der in dieser Arbeit untersuchten lipolytischen Enzyme, mit Ausnahme von *Geobacillus sp.* HH01 für LipA8b2, nicht bekannt sind und der GC-Gehalt in Abschnitten des Genoms variieren kann, empfiehlt sich die genaue Betrachtung des GC-Gehalts der zu exprimierenden Gene (Tab. 16).

Die GC-Gehalte der untersuchten Hydrolasegene variieren zwischen 55,47 - 61,05 %. *R. capsulatus* weist mit einem GC-Gehalt von 68 % die deutlichste Differenz zu dem der lipolytischen Enzyme auf. Trotz dieser möglichen Limitierung konnte eine effiziente Synthese von vier Hydrolasen in *R. capsulatus* nachgewiesen werden, so dass sich möglicherweise eine deutlich höhere Proteinakkumulation von Proteinen mit korrelierenden GC-Gehalten ergibt. Der GC-Gehalt von *E. coli* mit 50,8 % liegt deutlich näher an den GC-Gehalten der lipolytischen Enzyme. Es zeigte sich, dass *E. coli* in der Lage war, alle Hydrolasegene zu exprimieren. *P. putida* weist einen GC-Gehalt von 61,5 % auf und korreliert mit den GC-Gehalten der lipolytischen Enzyme. Wie bereits erwähnt, kann der GC-Gehalt ein Indikator für eine erfolgreiche Expression sein, da der GC-Gehalt häufig mit dem unterschiedlichen Gebrauch der Codons korreliert. Dies muss aber nicht zwingend der Fall sein. Im Fall von *P. putida* kann die geringe Expressionseffizienz jedoch auch auf andere Faktoren wie eine hohe proteolytische Aktivität zurückzuführen sein.

Tab. 16: GC-Gehalt der in dieser Arbeit verwendeten Hydrolasegene

| Protein | GC-Gehalt |
|---------|-----------|
| LipS | 59,56 % |
| LpiT | 59,41 % |
| Est5E5 | 61,05 % |
| LipA8b2 | 55,47 % |
| EstA3 | 56,69 % |
| LipC5 | 57,29 % |

4.1.1.3 Einfluss proteolytischer Aktivität auf die heterologe Expression

Darüber hinaus ergibt sich eine weitere interessante Beobachtung aus dem Vergleich der Akkumulation der lipolytischen Enzyme während der exponentiellen und stationären Wachstumsphase in den verschiedenen Wirten. Mit Ausnahme der temperaturstabilen Proteine LipS und LipT zeigten alle anderen in *E. coli* synthetisierten Proteine eine herabgesetzte Proteinakkumulation in der stationären Phase. Der gleiche Effekt konnte auch in den Est5E5- und LipA8b2-Expressionskulturen von *P. putida* beobachtet werden, während die Expression der Hydrolasegene in *R. capsulatus* unter phototrophen Bedingungen zu einem gleichmäßigen Proteingehalt in der exponentiellen und stationären Phase führte. Die Kultivierung der

R. capsulatus-Zellen unter chemotrophen Bedingungen führte hingegen zu einer leichten Abnahme der Proteinakkumulation in der stationären Phase (Abb. 9).

Ein bekanntes Problem der heterologen Expression ist die Proteolyse der heterolog synthetisierten Proteine durch wirtseigene Proteasen, die die finale Proteinakkumulation in den Zellen deutlich herabsetzen können (Idiris *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2002). Studien konnten belegen, dass die Überexpression der heterologen Gene und die dabei häufig auftretende Aggregation der heterologen Proteine verschiedene Reaktionen der Stressantwort auslösen (Glick, 1995). Dabei handelt es sich unter anderem um die Synthese von wirtseigenen Proteasen wie beispielsweise Lon, Clp oder CAT (Gill *et al.*, 2000; Harcum & Bentley, 1999; Ramírez & Bentley, 1999). Weitere Merkmale der Stressantwort sind, neben der erhöhten Proteaseaktivität, eine gesteigerte Plasmidinstabilität, vermindertes Zellwachstum sowie Zelllyse (Bentley *et al.*, 1990; Georgiou *et al.*, 1988).

Die Verwendung von Protease-defizienten Stämmen zählt zu den Standardmethoden, um die Expressionseffizienz heterologer Proteine zu optimieren. So wurden bereits vielfältige Veränderungen des Standardexpressionswirts *E. coli* vorgenommen. *E. coli* BL21(DE3) gehört zu den Protease-defizienten *E. coli*-Stämmen (*lon*⁻ und *ompT*⁻). *lon* und *ompT* kodieren für Proteasen, die an der Stressantwort der Zelle beteiligt sind. Die Synthese dieser Proteasen wird bereits nach wenigen Minuten bei einer rekombinanten Proteinakkumulation induziert (Valdez-Cruz *et al.*, 2010). Protease-defiziente Stämme sollen die Degradation von heterolog synthetisierten Proteinen vermeiden. Der in dieser Arbeit verwendete *E. coli* BL21 (DE3)-Stamm wies jedoch immer noch eine ausreichende proteolytische Aktivität auf, um die Proteinakkumulation der heterologen Proteine LipA8b2, EstA3 und LipC5 negativ zu beeinflussen. LipS und LipT, die in der stationären Wachstumsphase keine Proteindegredation zeigten, werden den thermophilen Lipasen zugeordnet (Chow *et al.*, 2012). Thermophile Proteine unterscheiden sich physiologisch aufgrund ihrer thermophilen Umgebung von mesophilen Proteinen. Es konnte gezeigt werden, dass thermophile Proteine nicht nur eine höhere Proteinstabilität bei höheren Umgebungstemperaturen aufweisen, sondern aufgrund ihrer Festigkeit bei niedrigeren Temperaturen auch besser gegen Proteolyse und Degradation geschützt sind (Jaenicke, 1991).

Das proteolytische System von *R. capsulatus* und dessen Auswirkungen auf das heterologe Expressionslevel sind im Gegensatz zu *E. coli* wenig erforscht. Sequenzanalysen von *R. capsulatus* und *E. coli* konnten mehrere homologe Gene in *R. capsulatus* identifizieren, die in *E. coli* für proteolytische Enzyme kodieren. Bei den betreffenden Enzymen handelt es sich in *E. coli* um die Proteasen Lon, HslUV und ClpXP (Kreuz, 2003). Die Erzeugung Protease-defizienter *R. capsulatus*-Stämme könnte möglicherweise das Expressionslevel heterologer Proteine steigern und die

Bedeutung von *R. capsulatus* als alternativer Expressionswirt für das funktionsbasierte Screening von Genen aus dem Metagenom erhöhen.

Das abweichende Muster bezüglich der Proteinakkumulation in der exponentiellen und stationären Phase von chemotrophen und phototrophen *R. capsulatus*-Expressionskulturen ist möglicherweise auf die unterschiedliche Kultivierung zurückzuführen. So konnte bereits beschrieben werden, dass der Wechsel von anaeroben phototrophen zu aeroben chemotrophen Anzuchtbedingungen zu einer Regulation der unterschiedlichsten Gene führt (Arai *et al.*, 2008). Möglicherweise wird das unterschiedliche Proteinlevel in der logarithmischen und stationären Phase der phototroph und chemotroph kultivierten Expressionskulturen durch ein variierendes Proteom hinsichtlich der Regulation von wirtseigenen Proteasen hervorgerufen. Durch Modulation der Anzuchtbedingungen könnte so möglicherweise die heterologe Expression optimiert werden.

Auch in *P. putida* konnte ein proteolytisches System für die Proteolyse und das Recycling von nicht funktionellen Proteinen beschrieben werden (Cascieri & Mallette, 1976), so dass die unterschiedliche Proteinakkumulation der in *P. putida* exprimierten Gene wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist. Es konnte beispielsweise in früheren Studien gezeigt werden, dass in *P. putida* Gene für eine homologe Lon-Protease vorliegen, die auch schon in *E. coli* oder *P. aeruginosa* identifiziert werden konnten (Bertani *et al.*, 2007). Hierbei handelt es sich um eine Protease, die für die Degradation von fehlgefaltetem Proteinen verantwortlich ist (Bertani *et al.*, 2007). Die Verwendung eines Protease-defizienten *P. putida*-Stamms führt möglicherweise zu einer verbesserten Proteinproduktion und könnte somit auch zur Identifizierung neuer Gene beitragen.

4.1.1.4 Unterschiedliche Enzymaktivität in den verschiedenen Expressionswirten

Neben den Untersuchungen zur Proteinakkumulation in den verschiedenen Wirten wurden auch Aktivitätsversuche mit den lipolytischen Enzymen durchgeführt, um einerseits eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Proteine funktionell synthetisiert werden und um andererseits zu überprüfen, ob eine Korrelation der Proteinakkumulation mit der Enzymaktivität besteht.

Im Ergebnis wurde deutlich, dass fünf der sechs in *E. coli* synthetisierten lipolytischen Enzyme Aktivität zeigten, wobei ihr Aktivitätslevel deutlich variierte. Hierbei handelte es sich um die Hydrolasen LipS, Est5E5, LipA8b2, EstA3 und LipC5. Im Expressionswirt *R. capsulatus* konnten unter phototrophen Bedingungen drei von vier Enzymen, LipA8b2, EstA3 und LipC5, Aktivität aufweisen. Die Anzucht von *R. capsulatus*-Zellen unter chemotrophen Bedingungen führte hingegen zu einer verminderten Enzymaktivität, so dass nur zwei Enzyme Aktivität zeigten. In *P. putida* als zweitem alternativen Expressionswirt konnten die zwei lipolytischen Enzyme Est5E5

und LipA8b2 synthetisiert werden, wobei die Aktivität beider Proteine durch Aktivitätstests bestätigt werden konnte.

Die akkumulierten Lipasen und Esterasen zeigten ein abweichendes Muster bezüglich ihrer Aktivität, unabhängig von der erreichten Proteinakkumulation in dem jeweiligen Wirt. Beispielsweise konnte in *E. coli* eine deutliche Akkumulation von LipC5 nachgewiesen werden, während diese in *R. capsulatus* deutlich geringer ausfällt. Die komparative Aktivitätsanalyse zeigte jedoch eine 3,5-fach höhere Substratumsetzung von LipC5 in *R. capsulatus*.

Obwohl die höchste Proteinakkumulation der lipolytischen Enzyme in Expressionskulturen von *E. coli* gezeigt werden konnte, wurde die höchste Substratumsetzung in *E. coli* im direkten Vergleich mit den alternativen Expressionswirten nur für die Lipase LipS beobachtet. Die Ergebnisse der Expressions- und Aktivitätsstudien in *R. capsulatus* zeigten im Vergleich mit *E. coli* und *P. putida* eine erhöhte Aktivität der Enzyme LipA8b2, EstA3 und LipC5. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die höchste Enzymaktivität von Est5E5 in *P. putida* beobachtet werden konnte.

Neben den in dieser Arbeit untersuchten Expressionswirten *R. capsulatus* und *P. putida* wurden, wie bereits erwähnt, im Verbund ExpressSys noch weitere Organismen auf ihre Eignung als alternative Expressionswirte für das funktionsbasierte Screening von Genen aus dem Metagenom untersucht. Hierfür wurden ebenfalls die in dieser Arbeit untersuchten lipolytischen Enzyme verwendet.

In Abbildung 31 ist die Verteilung der Lipaseaktivität in den verschiedenen Wirten in Beziehung zueinander dargestellt.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die Verteilung der Enzymaktivität der heterolog synthetisierten Hydrolasen in den Expressionswirten *E. coli*, *R. capsulatus*, *P. putida* und *T. thermophilus* deutlich variiert. So konnten beispielsweise in *P. putida* zwei und in *T. thermophilus* drei Hydrolasen funktionell synthetisiert werden. Vergleicht man die in den beiden Expressionswirten synthetisierten lipolytischen Enzyme miteinander, wird deutlich, dass in *P. putida* und *T. thermophilus* unterschiedliche Enzyme funktionell synthetisiert werden. Vergleicht man hingegen die Enzymaktivitäten der in *R. capsulatus* und *P. putida* synthetisierten Hydrolasen miteinander, konnte zumindest eine Hydrolase, in diesem Fall LipA8b2, in beiden Wirten funktionell synthetisiert werden. Des Weiteren zeigt die Abbildung auf, dass, in den drei Expressionswirten, *R. capsulatus*, *P. putida* und *T. thermophilus*, kein einziges lipolytisches Enzym in allen drei Wirten gemeinsam exprimiert werden konnte. Dieses Phänomen beruht auf der Tatsache, dass jeder Mikroorganismus als Expressionswirt unterschiedliche physiologische

Eigenschaften in Bezug auf die Synthese heterologer Proteine aufweist und auch jedes Protein spezifischen Anforderungen hinsichtlich seiner Biosynthese unterliegt. Daher ist es sinnvoll, verschiedene alternative Expressionswirte für funktionsbasierte Metagenom-Screenings zu testen. Die Verwendung alternativer Expressionswirte erhöht deutlich die Chance, funktionell synthetisiertes Protein zu gewinnen und ermöglicht damit möglicherweise die Identifizierung nicht beschriebener Gene.

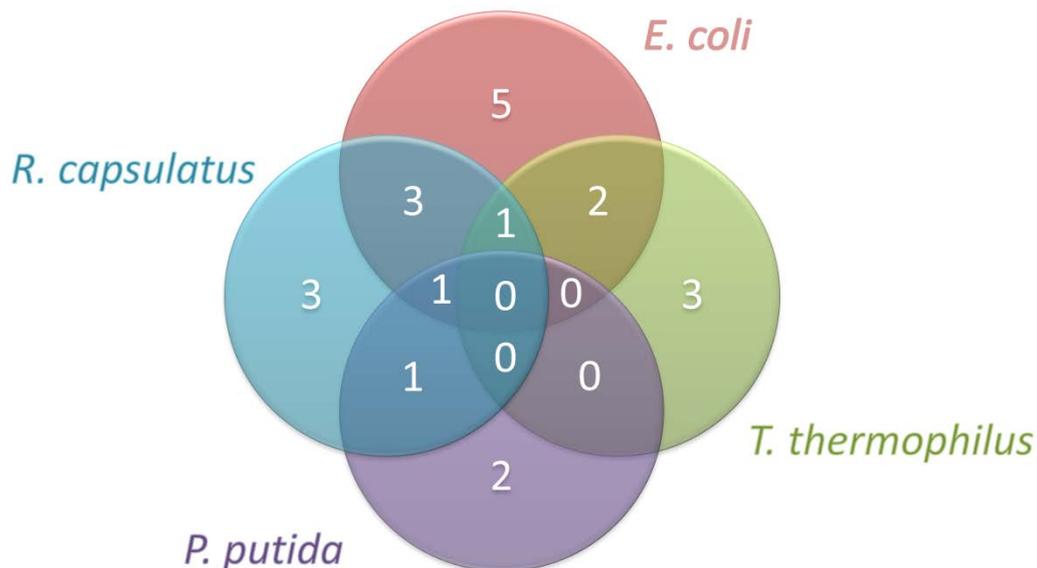


Abb. 31: Anzahl der im Konsortium ExpressSys untersuchten lipolytisch aktiven Enzyme in den verschiedenen Expressionswirten

Die Abbildung zeigt die Verteilung der Aktivität der heterolog synthetisierten Hydrolasen in den Wirten *E. coli*, *R. capsulatus*, *P. putida* und *T. thermophilus*. Die Zahlen stehen für die Anzahl der aktiven heterologen Enzyme. Die äußeren Zahlen geben Enzymaktivitäten in dem jeweiligen Wirt an, innere Zahlen stehen für die Anzahl der lipolytisch aktiven Enzyme, die sich in den jeweiligen Wirten überschneiden. Die Daten der Lipaseaktivitäten in *T. thermophilus* stammen von Prof. Dr. Liebl aus dem Lehrstuhl für Mikrobiologie von der Technischen Universität München. Untersuchungen der lipolytischen Aktivitäten in *P. antarctica* werden derzeit noch in der Abteilung für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Hamburg, Prof Dr. Streit, durchgeführt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressions- und Aktivitätsstudien belegen, dass sich besonders *R. capsulatus* als alternativer Expressionswirt für die heterologe Expression von Metagenom-Genen eignet. So konnte gezeigt werden, dass trotz eines abweichenden GC-Gehalts eine effiziente und funktionelle Expression von einer Mehrzahl der untersuchten Hydrolasen möglich war. *R. capsulatus* zeigte im Vergleich mit *E. coli* und *P. putida* eine erhöhte Aktivität der Enzyme LipA8b2, EstA3 und LipC5.

4.2 *R. capsulatus* als Expressionswirt für die Synthese von heterologen Membranproteinen

Membranproteine erfüllen wichtige Aufgaben in nahezu allen zellulären Prozessen wie in der Signaltransduktion (Bilwes *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2010; Warne *et al.*, 2010), der Energieumwandlung (Capaldi & Aggeler, 2002; Neutze *et al.*, 2002), dem selektiven Ionentransport (Gonen & Walz, 2006; Olesen *et al.*, 2007), der Nährstoffaufnahme und Zell-Zell-Interaktionen (Drew *et al.*, 2003). Das wirtschaftliche Interesse an der Identifizierung und Funktionsaufklärung neuer Membranproteine ist groß, da 50 – 60 % aller bisher entwickelten Medikamente auf die Funktionen von Membranproteinen zielen (Klabunde & Hessler, 2002; Ren *et al.*, 2009; Yin, 2008). Für die Aufklärung von Struktur und Funktion neuer Membranproteine werden signifikante Mengen an Protein benötigt.

Die einfachste und kostengünstigste Methode, diese Voraussetzungen zu erfüllen, ist die heterologe Expression in einem kostengünstigen und leicht handhabbaren Mikroorganismus.

Wie in 1.2.1.3 bereits erwähnt, ergeben sich jedoch während der heterologen Synthese von Membranproteinen auch bedeutende Nachteile, im Besonderen aufgrund ihrer Topologie. Membranproteine weisen große hydrophobe Bereiche auf, die oftmals während der heterologen Expression für die Bildung von *inclusion bodies* verantwortlich sind. Die Rückfaltung dieser Proteine ist ein zeit- und kostenaufwendiger Prozess (Roussel *et al.*, 2013; Schlager *et al.*, 2012), der auch nur bei einigen Membranproteinen zum Erfolg führt. Ein Beispiel für eine erfolgreiche Renaturierung von Membranproteinen ist unter anderem die lichtgesteuerte Protonenpumpe Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium* (Dahmane *et al.*, 2013; London & Khorana, 1982). Die Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten im Standardwirt *E. coli* ist hauptsächlich auf eine nicht ausreichende Membranfläche (Drew *et al.*, 2003; Freigassner *et al.*, 2009) sowie die schnelle Überlastung der Faltungsmaschinerie und des Sekretionsapparats (Baneyx & Mujacic, 2004; Nannenga & Baneyx, 2011) zurückzuführen.

Eine Möglichkeit, diese Limitierungen zu überwinden, ist die Verwendung eines alternativen Expressionswirts. Das phototrophe Bakterium *R. capsulatus* bildet unter phototrophen Wachstumsbedingungen ein intracytoplasmatisches Membransystem aus (Golecki *et al.*, 1980; Oelze & Drews, 1972), welches je nach gewählter Wachstumsbedingung zu einer 3-9-fachen Membranflächenvergrößerung führt (Drews & Golecki, 1995). In dieses intracytoplasmatische Membransystem werden die Photosynthesekomplexe, die für die anoxygene Photosynthese benötigt werden, eingebaut.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde den Fragestellungen nachgegangen, ob heterologe Membranproteine in *R. capsulatus* synthetisiert werden können, inwiefern die Modulation der Anzuchtbedingungen einen Einfluss auf die heterologe Synthese von Membranproteinen hat und ob das intracytoplasmatische Membransystem von *R. capsulatus* möglicherweise neben der Inkorporation der Photosyntheseproteine auch für die Einlagerung heterologer Membranproteine genutzt werden kann.

Um zu überprüfen, ob *R. capsulatus* ein geeigneter alternativer Expressionswirt für die heterologe Synthese von Membranproteinen ist, wurden zunächst drei Membranproteine unterschiedlicher Topologie, Funktion und Herkunft ausgewählt und in Expressions- und Lokalisationsstudien untersucht.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Membranproteinen handelt es sich um die membranassoziierte CYP175A1 aus *T. thermophilus*, die integrale Monooxygenase Squalenepoxidase aus *S. aurantiaca* sowie die transmembrane Protonenpumpe Bakteriorhodopsin aus *H. salinarum*.

4.2.1 Modulation der Membranfläche mittels der Kultivierungsbedingungen

Da über die Kultivierungsbedingungen die Größe der Membranfläche moduliert werden kann, wurden zunächst verschiedene Anzuchtbedingungen des phototrophen Bakteriums untersucht, um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Wachstumsbedingung für die Produktion von Membranproteinen die geeignetste ist.

Es zeigte sich, dass alle untersuchten Membranproteine unter phototrophen Bedingungen in signifikanten Mengen akkumulierten. Unter diesen definierten Wachstumsbedingungen bildet sich in phototrophen Bakterien wie *R. capsulatus* ein intracytoplasmatisches Membransystem, welches zu einer enormen Vergrößerung der Membranoberflächen führt (Drews, 2013; Tucker *et al.*, 2010). Die heterologen Membranproteine werden mutmaßlich in das zusätzliche intracytoplasmatische Membransystem in Konkurrenz zu den Photosynthesekomplexen eingelagert (Butzin *et al.*, 2010).

Eine weitere interessante Beobachtung zeigten die Expressionskulturen, die unter *shift*-Bedingungen von chemotrophem zu phototrophem Wachstum kultiviert wurden. In diesen Kulturen zeigten alle Membranproteine eine erhöhte oder zumindest äquivalente Proteinakkumulation. In früheren Studien konnte belegt werden, dass der Wechsel von chemotrophem zu phototrophem Wachstum die Bildung von intracytoplasmatischen Membranen innerhalb einer Stunde hervorruft (Chory *et al.*, 1984). Da die Membranproteine verstärkt unter *shift*-Bedingungen von chemotrophem zu phototrophem Wachstum akkumulierten, führt diese

Bedingung wahrscheinlich zu einer effizienteren Einlagerung des zu synthetisierenden Proteins, weil die Bildung des intracytoplasmatischen Membransystems und die heterologen Genexpression zeitgleich induziert werden.

Unter chemotrophen Bedingungen konnte ausschließlich eine Akkumulation der membranassoziierten Monooxygenase CYP175A1 nachgewiesen werden. Frühere Untersuchungen der *R. capsulatus*-Zellmorphologie konnten aufzeigen, dass unter chemotrophen Bedingungen in Anwesenheit von Sauerstoff die Bildung des intracytoplasmatischen Membransystems inhibiert ist (Arai *et al.*, 2008; Chory *et al.*, 1984). Die nicht erfolgreiche Synthese der integralen Membranproteine Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin unter chemotrophen Bedingungen lässt darauf schließen, dass die Anwesenheit eines zusätzlichen Membransystems für die erfolgreiche Synthese von heterologen, integralen Membranproteinen unbedingt erforderlich ist. Da jedoch CYP175A1 in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte, ist die Bildung eines intracytoplasmatischen Membransystems für die Synthese von Proteinen, die nur mit der Membran assoziiert und nicht integriert sind, nicht unbedingt erforderlich.

In Expressionskulturen, die unter *shift*-Bedingungen von phototroph zu chemotroph kultiviert wurden, konnte ebenfalls keine Proteinakkumulation bei Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin nachgewiesen werden. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Untersuchungen von *R. capsulatus*-Zellen, die unter diesen Bedingungen kultiviert wurden, eine Degradation der photosynthetischen Proteine und ihrer Pigmente zeigten, sobald die Zellen chemotrophen Bedingungen ausgesetzt wurden (Arai *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 1986). Vermutlich führt die Degradation der Photosynthesekomplexe ebenfalls zu einem Abbau der intracytoplasmatischen Membran, so dass unter diesen Bedingungen keine effiziente Synthese heterologer, integraler Membranproteine möglich ist.

Demnach eignen sich phototrophe Wuchsbedingungen und *shift*-Bedingungen von chemotroph zu phototroph vorrangig für die Synthese heterologer, integraler Membranproteine. Chemotrophe Expressionskulturen und *shift*-Bedingungen von phototrophem zu chemotrophem Wachstum können vermutlich vor allem für die Synthese von sauerstoffabhängigen, löslichen Proteinen verwendet werden. Dies konnte bereits in vorangegangenen Studien mit dem sauerstoffabhängigen Protein YFP belegt werden (Katzke *et al.*, 2010).

4.2.2 Die heterolog synthetisierten Membranproteine CYP175A1, SqEp und bR sind in die Vesikel von *R. capsulatus* eingelagert

Um die Lokalisation der Membranproteine festzustellen, wurden *E. coli*- und phototroph kultivierte *R. capsulatus*-Zellen einer Fraktionierung in *inclusion bodies*, Membranen und Cytoplasma unterzogen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Proteine in signifikanten Mengen in den Membranen von *R. capsulatus* akkumulierten. Im Gegensatz dazu zeigte die Fraktionierungsanalyse der *E. coli*-Zellen, neben der partiellen Proteinakkumulation in der Membranfraktion, auch deutliche Proteinmengen sowohl in der *inclusion body*- als auch in der Cytoplasmafraktion.

Die Monooxygenase CYP175A1 konnte in ungefähr gleichen Proteinmengen in *E. coli* und *R. capsulatus* synthetisiert werden, jedoch zeigte sich nur in den *E. coli*-Expressionskulturen eine deutliche Degradation des Proteins. Die putative transmembrane Squalenepoxidase (Nagumo *et al.*, 1995) konnte erstmalig ausschließlich in den Membranen von *R. capsulatus* lokalisiert werden, so dass eindeutig, neben den computerbasierten Berechnungen, gezeigt werden konnte, dass es sich bei der Squalenepoxidase um ein Membranprotein handelt. Die Synthese der Squalenepoxidase in *E. coli* hingegen führte ausschließlich zu der Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten. Bakteriorhodopsin akkumulierte äquivalent in den Membranfraktionen von *R. capsulatus*, jedoch konnte in *E. coli* eine weitere Proteinakkumulation in der *inclusion body*-Fraktion sowie in der Cytoplasmafraktion beobachtet werden. Dies deutet auf eine Fehlfaltung des Proteins hin.

Wie schon in der Einleitung beschrieben, führt die heterologe Expression von Membranproteinen in *E. coli* häufig zu der Bildung von unlöslichen *inclusion bodies* (Abb. 32). Dies ist oftmals eine Folge von einer nicht ausreichenden Membranfläche (Drew *et al.*, 2003; Freigassner *et al.*, 2009) sowie einer schnellen Überlastung der Faltungsmaschinerie und des Sekretionsapparats (Baneix & Mujacic, 2004; Nannenga & Baneix, 2011). So konnte beispielsweise eine Expressionsstudie in *E. coli* aufzeigen, dass von 100 untersuchten Proteinen nur 35 % in signifikanten und 35 % der Proteine in geringen Proteinmengen synthetisiert wurden. Sobald die Proteine mehr als eine Transmembranhelix aufwiesen, aggregierten die Proteine zu unlöslichen *inclusion bodies* (Korepanova *et al.*, 2005).

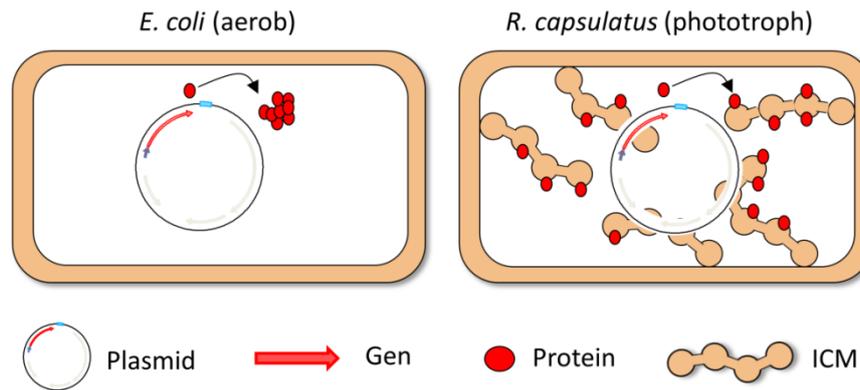


Abb. 32: Schematische Darstellung der Expression heterologer Membranproteine in *E. coli* und *R. capsulatus*

Die heterologe Expression von Membranproteinen führt in *E. coli* aufgrund von fehlender Membranoberfläche häufig zur Bildung von *inclusion bodies*, während in *R. capsulatus* unter phototrophen Bedingungen eine zusätzliche Membranfläche gebildet wird, in die die rekombinanten Membranproteine möglicherweise eingelagert werden können und dadurch die Aggregation der Proteine verhindert werden kann.

In neueren Untersuchungen allerdings konnte gezeigt werden, dass *E. coli* unter bestimmten Voraussetzungen in Lage ist, ähnlich wie *R. capsulatus*, intracytoplasmatische Membranen auszubilden (Arechaga, 2013). Dieses Phänomen konnte beispielsweise bei dem bakteriellen Chemotaxis-Rezeptor Tsr (Lefman *et al.*, 2004) oder der ATP-Synthase-B-Untereinheit von *E. coli* (Arechaga *et al.*, 2000) beschrieben werden. Die ausgebildeten Strukturen der ICM variieren zwischen Vesikeln (Eriksson *et al.*, 2009) sowie tubulären und stapelartigen Formen (Arechaga *et al.*, 2000; Lefman *et al.*, 2004). Die Bildung dieser ICM ist dabei von mehreren Faktoren wie der Größe und Form des synthetisierten Proteins, der Ladung des Proteins und der interagierenden Lipide sowie des Insertionsdrucks, den das heterologe Membranprotein auf die Plasmamembran ausübt, abhängig. So kann im Gegensatz zu *R. capsulatus* die Bildung der ICM nicht gesteuert werden, so dass das intracytoplasmatische Membransystem von *E. coli* nicht gezielt für die Synthese bestimmter Membranproteine genutzt werden kann. In *R. capsulatus* kann hingegen nicht nur die Bildung der ICM, sondern auch, mittels Modulation der Kultivierungsbedingungen, die ausgebildete Fläche der ICM gesteuert werden.

Im nächsten Schritt der Charakterisierung des *R. capsulatus*-Expressionssystems sollte die Hypothese überprüft werden, ob die heterolog synthetisierten Membranprotein in die Vesikel des intracytoplasmatischen Membransystems eingelagert werden. Der Vorteil dieser Proteineinlagerung liegt in den weiteren Anwendungsmöglichkeiten. Proteine, die in ihrer natürlichen Umgebung isoliert werden, ständen dann für weitere Untersuchungen in einer Art Nanobioreaktor zur Verfügung. So müssten die integralen Proteine nicht mehr in aufwendigen Prozessen aus der Membran isoliert und gereinigt werden, sondern könnten direkt in *in vivo*-

Studien eingesetzt werden. Die Nanobiotechnologie zielt im Wesentlichen darauf, Proteine in ihrer nativen Umgebung zu untersuchen, um sich von den in der Natur entwickelten Funktionen für weitere - zum Beispiel technische - Anwendungen inspirieren zu lassen (Curnow, 2009). Als Beispiel kann das Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium* genannt werden. In der nativen photosynthetischen Membran ist Bakteriorhodopsin als hexagonales Gitter aufgebaut. Diese Struktur wurde bereits als Vorlage für die Konstruktion eines Nanopartikel-Array verwendet (Mo *et al.*, 2006). Ein anderer interessanter Ansatz ist, die photochromen und photoelektrischen Eigenschaften von Bakteriorhodopsin für die Datenspeicherung zu nutzen. Dabei wird ein durch externe Lichtsignale steuerbarer Photozyklus ausgenutzt. Mittels genetischer und chemischer Modifikationen lassen sich die photochromen Eigenschaften von Bakteriorhodopsin so modulieren, dass Daten durch Licht geschrieben und gelesen werden können (Hampp, 2000).

Um die Annahme zu überprüfen, dass die heterologen Membranproteine in *R. capsulatus* in das intracytoplasmatische Membransystem und den zugehörigen Vesikel inseriert werden, wurde die Membranfraktion durch Dichtegradientenzentrifugation in ihre Bestandteile aufgetrennt; diese danach eingehend untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Membranproteine nicht in die Cytoplasmamembran, sondern ausschließlich in das intracytoplasmatische Membransystem und dessen Vesikel eingelagert wurden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Einlagerung der Proteine mit einer Veränderung der Vesikeldichte einhergeht (3.2.5.1). Dabei ließ sich eine Verminderung der Absorption der Photopigmente beobachten. Um zu überprüfen, ob die Einlagerung der heterologen Membranproteine mit einer Reduzierung der Photopigmente korreliert, wurden photometrische Absorptionsspektren von *R. capsulatus*-Zellen gemessen. Hierbei konnte eine Verminderung der Photopigmente in den photosynthetischen Membranen beobachtet werden, sobald die Synthese der heterologen Membranproteine induziert wurde (3.2.5.2). Die Ergebnisse weisen auf eine Degradation oder vorzeitige Verdrängung der Photosynthesekomplexe hin, die höchstwahrscheinlich durch die heterologe Expression ausgelöst werden.

Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen von *R. capsulatus*-Zellen konnten die Ergebnisse der Dichtegradientenzentrifugation verifizieren. Durch die Einlagerung der heterologen Membranproteine konnte eine Vergrößerung der Vesikel von einigen Nanometern nachgewiesen werden (3.2.5.3). Ein derartiger Einfluss von Proteinen auf die strukturellen Eigenschaften der Vesikel konnte bislang nur durch die Enzymkomplexe des Photosynthesystems beobachtet werden. Studien der photosynthetischen Membranen von *R. sphaeroides*, einem nahen Verwandten von *R. capsulatus*, zeigten, dass Photosynthesekomplex-Mutanten Veränderungen in der Vesikelmorphologie aufwiesen. So

konnten sowohl längliche, tubuläre Strukturen als auch vergrößerte Vesikel beobachtet werden (Adams *et al.*, 2011; Kiley *et al.*, 1988). Gleiche Untersuchungen von *R. capsulatus-pufx*-Mutanten zeigten, dass diese Stämme nicht in der Lage waren, unter phototrophen Bedingungen in Minimalmedium oder in Vollmedium unter geringen Lichtintensitäten zu wachsen (Lilburn *et al.*, 1992). Weitere Analysen der photosynthetischen Membranen ergaben, dass die ICM um 50 % im Durchmesser vergrößert waren (Lilburn *et al.*, 1992).

4.2.3 Die Synthese von Membranproteinen in *R. capsulatus* ermöglicht die Gewinnung von korrekt gefaltetem Protein

Nachdem die erfolgreiche Synthese der heterologen Membranproteine in *R. capsulatus* und die damit einhergehende Einlagerung der Proteine in das intracytoplasmatische Membransystem gezeigt werden konnte, wurde am Beispiel der Monooxygenase CYP175A1 überprüft, ob dabei korrekt gefaltetes Protein gebildet wird. Die Monooxygenase CYP175A1 konnte in signifikanten Mengen (12 mg Protein pro L Kultur) von der Membran solubilisiert und gereinigt werden. Untersuchungen mittels CO-Differenzspektren ergaben, dass mutmaßlich 95 % der Monooxygenasen korrekt gefaltet synthetisiert wurden. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die heterologe Synthese von Membranproteinen mit funktionaler Faltung in *R. capsulatus* möglich ist.

4.2.4 Eignet sich das *R. capsulatus*-Expressionssystem für die Synthese heterologer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren?

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind Membranproteine und besitzen eine konservierte Struktur aus sieben transmembranen Helices. Sie stellen die größte und vielseitigste Klasse der Membranrezeptoren dar. Ihre Aufgabe besteht in der Weiterleitung von endogenen Signalen in eine intrazelluläre Antwort (Klabunde & Hessler, 2002). Dabei spielen verschiedenste Moleküle wie Hormone oder Neurotransmitter eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion. Aufgaben der GPCR sind beispielsweise die Signaltransduktion bezüglich des Sehvermögens, des Gedächtnisses, der Regulation des Blutdrucks oder auch die Wahrnehmung von Gerüchen für die sexuelle Entwicklung (Neves *et al.*, 2002; Sodhi *et al.*, 2004). Viele Prozesse, in denen GPCR involviert sind, hängen mit Krankheiten wie rheumatischer Arthrose, Multipler Sklerose, Autoimmunerkrankungen, Darm- und Lungenentzündungen, HIV-Infektionen oder Krebs zusammen (Scholten *et al.*, 2012).

Trotz der geringen Sequenzhomologie untereinander zeichnen sich alle GPCR durch sieben transmembrane α -Helices und einen intrazellulär lokalisierten C-Terminus aus. Auch die

Rhodopsine, die strukturelle Homologien zu Bakteriorhodopsin aufweisen, sind der Gruppe der GPCR zugeordnet (Nikiforovich *et al.*, 2001). Bakteriorhodopsin konnte im Rahmen dieser Arbeit in signifikanten Mengen synthetisiert und in den Vesikeln der intracytoplasmatischen Membranen lokalisiert werden. Aufgrund der großen Strukturhomologien von Bakteriorhodopsin mit den GPCR kann möglicherweise *R. capsulatus* als Expressionswirt für ihre funktionelle Synthese genutzt werden. So konnte bereits in Studien mit dem phototrophen Bakterium *R. sphaeroides*, einem nahen Verwandten von *R. capsulatus*, gezeigt werden, dass der humane AT1a-Rezeptor (AT1aR) erfolgreich in diesem Wirt synthetisiert werden konnte (Roy *et al.*, 2008). Weitere Studien bezüglich der Fragestellung, ob *R. capsulatus* ebenfalls als Expressionswirt für die Synthese heterologer G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren geeignet ist, werden zurzeit im Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

4.2.5 Synthese heterologer Membranproteine in anderen alternativen Expressionswirten

Wie bereits in 1.2 erwähnt, existiert inzwischen eine Vielzahl etablierter Expressionswirte für die Synthese heterologer Proteine. Membranproteine erfordern aufgrund ihrer besonderen Morphologie bestimmte Voraussetzungen des Expressionswirts. Im Folgenden sollen ein bakterieller und ein eukaryotischer Expressionswirt vorgestellt werden, wobei *Lactococcus lactis* als bakterieller Expressionswirt mit *R. capsulatus* verglichen wird.

Lactococcus lactis

Lactokokken sind Gram-positive, mesophile Bakterien und werden der Ordnung der Lactobazillen (Milchsäurebakterien) zugeordnet. Aufgrund ihrer Fähigkeit Zucker zu Milchsäure umzusetzen, nehmen die Milchsäurebakterien in der Lebensmittelindustrie einen besonderen Stellenwert ein. Ein besonderer Vertreter dieser Bakterien ist *Lactococcus lactis*. Dieser Organismus konnte bereits als alternativer Expressionswirt für heterologe Membranproteine, insbesondere eukaryotischen Ursprungs, beschrieben werden (Kunji *et al.*, 2003; Monné *et al.*, 2005). Er verfügt über ein halb so großes Genom wie *E. coli* (Kunji *et al.*, 2003). Die Generationszeit von *L. lactis* (1 h) ist deutlich kürzer als die von *R. capsulatus* (3 h). Damit erreicht *L. lactis* mit kürzeren Inkubationszeiten eine höhere Zelldichte. Im Weiteren zeichnen sich diese Bakterien durch eine einfache und kostengünstige Kultivierung aus (Kunji *et al.*, 2003). Zu den besonderen Vorteilen von *L. lactis* als alternativer Expressionswirt zählen unter anderem die einfache genetische Manipulierbarkeit und die bereits etablierten Expressionssysteme (Kunji *et al.*, 2003). Für die Synthese heterologer Membranproteine wird vorrangig das NICE-System (*nisin-inducible controlled gene expression*)

verwendet (Mierau & Kleerebezem, 2005; de Ruyter *et al.*, 1996). Hierbei handelt es sich um einen strikt regulierten Promotor, der durch Nisin induziert wird (de Ruyter *et al.*, 1996). Aufgrund einer strikten Genregulation ermöglicht dieses System die heterologe Synthese von Proteinen, die toxische Effekte hervorrufen können. Das NICE-System kann neben *L. lactis* auch in anderen Gram-positiven Bakterien verwendet werden. In *R. capsulatus* konnten ebenfalls inzwischen viele Expressionssysteme mit strikt regulierten Promotoren entwickelt werden (Katzke *et al.*, 2010; Laible *et al.*, 2009). Dabei basiert beispielsweise das pRhotHi2-Expressionssystem auf einen *broad host range* Vektor, der auch in vielen anderen Gram-negativen Bakterien Anwendung findet (Katzke *et al.*, 2010). Dies ermöglicht zum Beispiel die parallele Expression heterologer Membranproteine in *R. capsulatus* und *E. coli*. In *L. lactis* akkumulieren die heterologen Membranproteine wie in *R. capsulatus* ausschließlich in der Membran. Eine Bildung von *inclusion bodies* konnte bisher nicht beschrieben werden (Kunji *et al.*, 2003). Zudem konnte keine Degradation der heterologen Membranproteine in *L. lactis* beobachtet werden, was auf dessen geringe proteolytische Aktivität zurückzuführen ist (Kunji *et al.*, 2003, 2005). Das proteolytische System von *R. capsulatus* ist zurzeit noch wenig erforscht. Sequenzanalysen mit *E. coli* konnten jedoch mehrere homologe Gene in *R. capsulatus* identifizieren, die in *E. coli* für proteolytische Enzyme kodieren. Zur Optimierung von *R. capsulatus* können Protease-defiziente Stämme konstruiert werden, die die Proteinaggregation heterologer Membranproteine durch wirtseigene Proteasen verhindern soll. Ein weiterer Vorteil von *L. lactis* ist, die Möglichkeit, funktionelle Studien mit den heterologen Membranproteinen in ganzen Zellen durchzuführen, da viele Substrate, Liganden und Inhibitoren die Zellwand des Gram-positiven Bakteriums ungehindert passieren können (Kunji *et al.*, 2005). In *R. capsulatus* steht die Möglichkeit zur Verfügung, funktionelle Studien mit den intracytoplasmatischen Vesikeln, in denen nachweislich die heterologen Membranproteine eingelagert werden, durchzuführen. Dies hat den Vorteil, dass keine störenden Substanzen - beispielsweise des Mediums - die Studien beeinflussen. Ein Nachteil des *L. lactis*-Expressionssystems ist die ständige Regulierung des pH-Werts im Kulturmedium. Lactat ist die bevorzugte Kohlenstoffquelle von *L. lactis*. In undissoziierter Form jedoch zeigt Lactat einen toxischen Effekt auf das Zellwachstum (Kashket, 1987; Mierau & Kleerebezem, 2005), so dass die ständige Regulation des pH-Werts erforderlich ist. In *R. capsulatus* war bei den in dieser Arbeit verwendeten Kulturen eine solche pH-Regulation nicht erforderlich. Eine Gemeinsamkeit der beiden Organismen ist der hohe genomische GC-Anteil (Fuglsang, 2003). Aus diesem Grund eignen sich *L. lactis* wie auch *R. capsulatus* (68 %) vorrangig für die Expression von Genen GC-reicher Organismen.

In Expressionsstudien konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene heterologe Membranproteine, auch eukaryotischen Ursprungs, im alternativen Expressionswirt *L. lactis*

funktionell synthetisiert werden. So konnte beispielsweise die funktionelle Synthese des KDEL-Rezeptors aus *Homo sapiens* (Kunji *et al.*, 2003, 2005), eines ABC-Transporters aus *Homo sapiens* (Janvilisri *et al.*, 2005) sowie verschiedener mitochondrialer Carrier aus *Saccharomyces cerevisiae* (Monné *et al.*, 2005) beschrieben werden.

Pichia pastoris

Eine weitere Möglichkeit heterologe Membranproteine zu synthetisieren, ist die Verwendung eines eukaryotischen Expressionssystems.

P. pastoris ist eine methylotrophe Hefeart und wird der Ordnung der Saccharomycetales (Echte Hefen) zugeordnet. Eine Besonderheit dieses Organismus ist die Fähigkeit, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten (Gonçalves *et al.*, 2013). Zudem ist er der meist verwendete Expressionswirt für eukaryotische Membranproteine (Hedfalk, 2013). Dies liegt vor allem an seinen besonderen Eigenschaften wie der schnellen und einfachen Kultivierung sowie der einfachen genetischen Manipulierbarkeit (Gonçalves *et al.*, 2013). Der entscheidende Vorteil der eukaryotischen Expressionssysteme ist jedoch die posttranslationale Modifikation der Proteine. Im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* vermeidet *P. pastoris* jedoch die Hyperglykosylierung der heterologen Proteine (Gonçalves *et al.*, 2013). So konnte *P. pastoris* bereits als besonders geeigneter Expressionswirt für die Synthese von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ionenselektiven Calciumkanälen beschrieben werden (Hedfalk, 2013).

In Expressionsstudien konnte bereits die funktionelle Synthese verschiedener Membranproteine in *Pichia pastoris* beschrieben werden. Dabei handelt es sich beispielsweise um den Aquaporinkanal AQP4 aus *Homo sapiens* (Ho *et al.*, 2009) oder den Histamin-H-Rezeptor aus *Homo sapiens* (Shimamura *et al.*, 2011).

4.3 Etablierung eines lichtgesteuerten Expressionssystems in *R. capsulatus*

Grundvoraussetzung für eine mikrobielle Synthese heterologer Proteine ist die Verwendung von Expressionssystemen. Sie bestehen aus einem Expressionswirt, der bestimmte Voraussetzungen wie eine einfache und kostengünstige Kultivierung erfüllt, einem dazugehörigen Expressionsvektor und einer promotor-spezifischen Polymerase. Die Etablierung neuer Expressionssysteme ist ein wichtiger Schritt für Expressionsoptimierungen von Proteinklassen, die in den herkömmlichen Wirten geringe Expressionseffizienzen zeigten.

Die lichtkontrollierte Genexpression und die damit einhergehende Kontrolle über Proteinfunktionen und metabolische Prozesse in der Zelle ist ein sich schnell entwickelnder Forschungsbereich in der Systembiologie und der Biotechnologie (Drepper *et al.*, 2011). Für die Analyse und Kontrolle komplexer mikrobiologischer Prozesse in der Zelle wird eine strikte Regulation der Genexpression durch einen externen Stimulus benötigt. Die dadurch erzeugte Trennung der Wachstumsphase von der Expressionsphase ermöglicht eine Regulation der durch die Expression ausgelösten negativen Effekte.

Die Verwendung des Umgebungsstimulus Licht erlaubt eine unabhängige Photokontrolle verschiedenster mikrobieller Prozesse, ohne die metabolischen Prozesse durch die Zugabe eines externen Stoffs zu verändern (Drepper *et al.*, 2011). Hierbei wird eine zeit- und räumliche Kontrolle der Genexpression ermöglicht. Weitere Vorteile lichtregulierter Expressionssysteme sind das variable Einstellen des gewünschten Expressionsniveaus über die Dauer der Beleuchtung, eine mögliche Kostenersparnis, eine leichte Automatisierung sowie eine nicht invasive, kontaminationsfreie Induktion.

4.3.1 Der *nif*-Promotor in *R. capsulatus* ist Blaulicht-reguliert

In *R. capsulatus* konnte im Rahmen dieser Arbeit ein blaulichtreguliertes Expressionssystem identifiziert werden. Neben der Ammonium- und Sauerstoffregulation des *nif*-Promotors (Hübner *et al.*, 1991; Kranz & Haselkorn, 1986) wurde ebenfalls eine Inhibierung der Genexpression beobachtet, sofern Zellen Blaulicht ausgesetzt wurden.

Unter Stickstoffmangelbedingungen ohne Ammonium und ohne Sauerstoff bildet sich in *R. capsulatus* ein Nitrogenasekomplex (*nifHDK*-Operon) aus, der für die Fixierung von molekularem Stickstoff verantwortlich ist (Avtges *et al.*, 1983; Weaver *et al.*, 1975). Der *nif*-Promotor ist dem *nifHDK*-Operon vorgeschaltet. Aufgrund der strikten Regulation der Expression des *nifHDK*-Operons lässt sich der *nif*-Promotor auch für die Expression heterologer Gene verwenden (Pollock *et al.*, 1988). Die Expression der *nif*-Gene ist nur in Abwesenheit von

Sauerstoff und Ammonium möglich (Hübner *et al.*, 1991; Kranz & Haselkorn, 1986). Die Synthese heterologer Proteine, deren Transkription unter der Kontrolle des *nif*-Promotors steht, kann demnach ohne die Zugabe eines chemischen Induktors erfolgen. Diese Eigenschaft ermöglicht es, durch einen *shift* von einem hohen Sauerstoffgehalt zur Abwesenheit von Sauerstoff die gleichzeitige Induktion der heterologen Expression sowie die Ausbildung des intracytoplasmatischen Membransystems zu induzieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Bakteriorhodopsin und YFP unter der Kontrolle des *nif*-Promotors unter Glühbirnenlicht und Infrarotlicht erfolgte, während die Beleuchtung mit Blaulicht zu einer Inhibierung der Genexpression führte (Abb. 33). Expressionsstudien von Bakteriorhodopsin unter der Kontrolle des T7-Promotors konnten belegen, dass die Inhibierung der Genexpression nicht auf ein blaulichtbedingtes geringes Zellwachstum zurückzuführen ist, sondern wahrscheinlich durch eine Blaulichtregulation eines putativen Photorezeptors, der möglicherweise an den Mechanismus der Nitrogenase-Bildung gekoppelt ist, erfolgt (3.3.3).

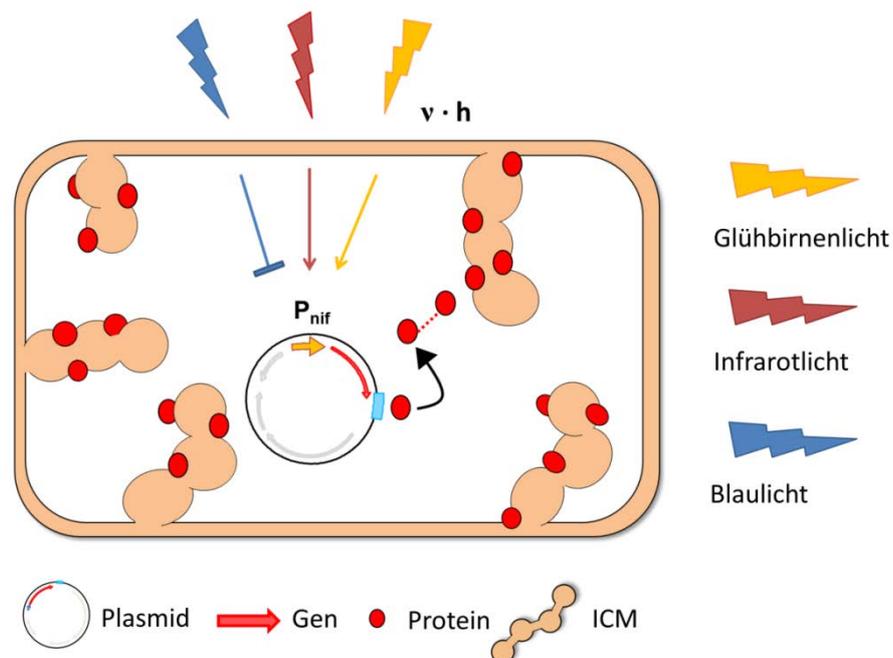


Abb. 33: Schematische Darstellung der lichtregulierten Genexpression unter der Kontrolle des *nif*-Promotors

Unter Glühbirnenlicht- und Infrarotlichtbedingungen erfolgt die heterologe Expression unter der Kontrolle des *nif*-Promotors, während die Beleuchtung mit Blaulicht die Genexpression reprimiert.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Blaulichtregulation in *R. capsulatus* beschrieben werden. In der Literatur ist bisher keine solche für *R. capsulatus* bekannt. Hingegen konnten verschiedene Studien eine lichtabhängige Genexpression in einer anderen *Rhodobacter*-Spezies beschreiben. Hierbei handelt es sich um eine blaulichtregulierte Expression der

Photosynthesegene in *Rhodobacter sphaeroides* (Gomelsky & Kaplan, 1997). Die Expression der Photosynthesegene wird hier durch den Photorezeptor AppA vermittelt, welcher als Antagonist des PpSr-Proteins wirkt, der wiederum den globalen Repressor aller Photosynthesegene in diesem Organismus darstellt. Die Kultivierung von *R. sphaeroides*-Zellen im Blaulicht führt zu einer Reprimierung der Gene des *puc*- und *puf*-Operons, die für die Lichtsammelkomplexe der Photosynthesekomplexe in *R. sphaeroides* kodieren. Das Blaulichtsignal wird hierbei mutmaßlich durch die *blue-light using FAD* (BLUF) Sensor-Domäne des AppA-Photorezeptors wahrgenommen und initiiert die Dissoziation des AppA-PpSr-Komplexes, was wiederum zu der Freisetzung von PpSr führt, der als Repressor an DNA-Bereiche der Photosynthesegene bindet und so deren Expression unterbindet (Gomelsky & Klug, 2002; Masuda & Bauer, 2002). Vermutlich wird die Reprimierung dieser Gene bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sauerstoff und einer hohen Lichtintensität ausgelöst, um das Bakterium vor Photooxidation zu schützen (Braatsch & Moskvina, 2004).

In *R. capsulatus* konnte mit CrtJ ein Protein identifiziert werden, das funktionshomolog zu dem Photosynthese-Repressor PpSr ist (Elsen, 1998). Jedoch konnte bis heute noch kein zugehöriges antagonistisch wirkendes Protein wie der Photorezeptor AppA aus *R. sphaeroides* entdeckt werden. Als möglicher Blaulichtrezeptor in *R. capsulatus* rückt das *photoactive yellow protein* (PYP) ins Augenmerk (Kyndt *et al.*, 2004a, b). Die genaue Funktion des putativen Blaulichtrezeptors PYP und inwieweit die Blaulichtregulation in *R. capsulatus* mit dem Photorezeptor in Verbindung steht, konnte bislang noch nicht geklärt werden und bedarf weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen.

4.3.2 Existieren weitere lichtregulierte Expressionssysteme?

Natürlich vorkommende Photorezeptoren weisen eine Sensitivität für Lichtsignale auf, die für lichtregulierte Anwendungen genutzt werden können. Die Komplexität der Signalweiterleitung limitiert jedoch aufgrund von fehlenden Informationen über den genauen Mechanismus ihren Nutzen für die lichtkontrollierte heterologe Genexpression. Eine Möglichkeit diese Probleme zu umgehen, ist die Verwendung von künstlich hergestellten lichtregulatorischen Systemen. Gut charakterisierte licht-sensitive Sensordomänen und regulatorische Effektor-domänen können für die Konstruktion neuer lichtinduzierbarer Expressionssysteme verwendet werden (Drepper *et al.*, 2011). Photorezeptoren in allen *kingdoms* nutzen eine limitierte Anzahl konservierter Sensor- und Empfänger-Domänen für die Umwandlung eines Lichtstimulus in eine spezifische intrazelluläre Antwort (Drepper *et al.*, 2011; Losi & Gärtner, 2008, 2012; Losi, 2004; Purcell & Crosson, 2008).

Für die lichtregulierte Genexpression können verschiedene lichtregulatorische Wege benutzt werden.

1) Die Regulation der lichtabhängigen Genexpression kann durch licht-sensitive DNA bindende Proteine erfolgen. Dabei empfängt die Sensor-Domäne des DNA bindenden Proteins ein Lichtsignal und reguliert die Genexpression durch Bindung an eine entsprechende DNA-Sequenz des Zielpromotors. Der erste solcher lichtsensitiven Repressoren konnte durch Strickland *et al.* (2008) beschrieben werden. Hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus der blaulichtsensitiven LOV2 (*light-oxygen-voltage*)-Domäne aus Phototropin 1 von *Avena sativa* und dem *L-tryptophan-responsive* TrpR-Repressor aus *E. coli*.

2) In ähnlicher Weise können von Shimizu-Sato *et al.* (2002) beschriebene Fusionsproteine, bestehend aus Sensor- und Effektor-Domäne, durch Licht zur Bildung eines aktiven Transkriptionsfaktors gebracht werden. Hier beruht dies auf einer lichtinduzierten Interaktion der Proteine. Das Fusionskonstrukt besteht aus dem Photorezeptor PhyB aus *Arabidopsis thaliana* und seinem zugehörigen *phytochrome interacting factor 3* (PIF3). Dieses System stellt die erste Rot-/Infrarotlicht-Regulation dar und basiert auf der Grundlage, dass Rotlicht die Bindung der Proteine initiiert, während durch Infrarotlicht diese Proteinbindung wieder aufgehoben wird.

3) Sogenannte Zwei-Komponenten-Systeme nutzen für die Umwandlung eines Lichtstimulus in eine intrazelluläre Antwort eine licht-sensitive Kinase, bestehend aus einer Photorezeptor-Domäne und einer Histidinkinase-Domäne, und einen sogenannten *response regulator*. Die künstlich konstruierte Phytochrom-Sensor-Kinase Cph8 ist die Grundlage des ersten bakteriellen rotlichtregulierten Expressionssystems und besteht aus der Photorezeptor-Domäne des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1 aus *Synechocystis sp.* und der *E. coli*-Histidin-Kinase EnvZ, die den zugehörigen *response regulator* OmpR phosphorylieren kann. Dieser wiederum steuert letztlich die Expression eines Zielgens unter einem spezifischen Promotor P_{OMPc} (Levskaia *et al.*, 2005). *In vivo*-Expressionsstudien konnten demonstrieren, dass Cph8 den *response regulator* im Dunkeln aktiviert, während unter Rotlichtbedingungen die Phosphorylierungsaktivität der Sensor-Kinase inhibiert ist, was wiederum zu einer Reprimierung des Promotors P_{OMPc} führt (Tabor *et al.*, 2011). Ein weiteres Beispiel für ein lichtsensitives Zwei-Komponenten-System, welches für die photoreguliert Genexpression in *E. coli* konstruiert wurde, ist der chimäre Photorezeptor YF1. Die Sensor-Histidin-Kinase ist aus der LOV-Photosensor-Domäne YtvA aus *Bacillus subtilis* und der Histidin-Kinase-Domäne FixL aus *Bradyrhizobium japonicum* aufgebaut. Im Dunkeln phosphoryliert YtvA den *response regulator* FixJ, der wiederum die Expression der Zielgene mittels des spezifischen Promotors P_{fixK2} induziert, während unter Blaulichtbeleuchtung die Phosphorylierung von FixJ, und damit auch die Expression der Zielgene, inhibiert ist (Gleichmann *et al.*, 2013; Möglich *et al.*, 2009).

Neben den bisher bekannten lichtregulierten Expressionssystemen in beispielsweise *E. coli* oder *A. thaliana* konnte nun ein weiteres für die lichtabhängige heterologe Genexpression in *R. capsulatus* entwickelt werden. Damit konnte das Spektrum von Wirten, die die lichtregulierte heterologe Genexpression nutzen, um *R. capsulatus* erweitert werden. Im Vergleich zu den etablierten lichtabhängigen Expressionssystemen basiert das *R. capsulatus*-Expressionssystem nicht auf einem synthetischen Photorezeptor. Der Vorteil dieses nativen Expressionssystems besteht darin, dass keine zusätzliche Zugabe eines Chromophors, wie am Beispiel der Phytochrom-Sensor-Kinase Cph8 deutlich wird, erforderlich ist. Wie bereits erwähnt, wurde die Sensor-Domäne der *E. coli*-Enz-Histidinkinase durch die Photosensor-Domäne des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1 ersetzt. Das Chromophor Phycocyanobilin, das für die lichtabhängige Antwort des Photorezeptors verantwortlich ist, wird jedoch natürlicherweise nicht in *E. coli* produziert. Für eine erfolgreiche Expression der Zielgene ist daher die exogene Zugabe von Phycocyanobilin oder dessen endogene Produktion durch zusätzlich einzuführende Gene, die an der Phycocyanobilin-Biosynthese beteiligt sind, erforderlich (Levskaia *et al.*, 2005).

5. Zusammenfassung

Die Identifizierung neuer Gene und deren funktionelle Synthese steht in der Biotechnologie und Medizin aufgrund verschiedenster Anwendungsmöglichkeiten im besonderen Fokus. Die funktionelle Expression wirtsfremder Gene in gut handhabbaren Mikroorganismen ermöglicht hierbei die einfache und kostengünstige Produktion beliebiger Zielproteine. Die erfolgreiche Genexpression im Standardexpressionswirt *Escherichia coli* wird jedoch häufig durch verschiedene Faktoren wie Proteintoxizität oder die Bildung unlöslicher Proteinaggregate limitiert. Eine Möglichkeit diese Limitierungen zu umgehen, ist die Verwendung alternativer Expressionswirte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das fakultativ phototrophe α -Proteobakterium *Rhodobacter capsulatus* als Expressionswirt für funktionsbasierte Screenings von Genen aus dem Metagenom sowie für die Synthese von heterologen Membranproteinen eingesetzt und mit den Wirten *E. coli* und *Pseudomonas putida* verglichen. Mittels komparativer Expressions- und Aktivitätsstudien konnte gezeigt werden, dass die Verwendung mehrerer bakterieller Expressionswirte mit unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften eine funktionsbasierte Durchmusterung von Genbanken deutlich verbessern kann. So zeigten beispielsweise drei der sechs untersuchten lipolytischen Enzyme, die aus verschiedenen Metagenombanken stammten, in dem photosynthetischen Bakterium die höchsten Enzymaktivitäten. Im zweiten Teil der Arbeit wurde *R. capsulatus* als Expressionswirt für die Synthese heterologe Membranproteine evaluiert. Im Gegensatz zu herkömmlichen Expressionswirten bildet *R. capsulatus* unter phototrophen Wachstumsbedingungen ein weit verzweigtes intracytoplasmatisches Membransystem aus. Anhand von Expressionsanalysen unter chemoheterotrophen und phototrophen Wachstumsbedingungen konnte nachgewiesen werden, dass die einzigartige Membranmorphologie für die Akkumulation der heterologen Membranproteine CYP175A1, Squalenepoxidase und Bakteriorhodopsin essentiell ist. Mit Hilfe einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation konnte zudem der Nachweis erbracht werden, dass die heterologen Membranproteine in die Vesikel des intracytoplasmatischen Membransystems eingelagert wurden. Im Fall der P450-Monooxygenase CYP175A1 konnte darüber hinaus anhand eines CO-Differenzspektrums die korrekte Faltung und Kofaktorbeladung des Proteins nachgewiesen werden. Somit ist *R. capsulatus* ein vielversprechender alternativer Expressionswirt, der nicht nur die funktionelle Synthese schwer exprimierbarer Membranproteine ermöglicht, sondern überdies semiartifizielle Membranvesikel für zukünftige nanobiotechnologische Anwendungen bereitstellt. Im letzten Teil der Doktorarbeit erfolgte die Charakterisierung des *nif*-Promotor-basierten *R. capsulatus*-Expressionsvektors pRhonHi-2. In

R. capsulatus kontrolliert dieser Promotor die Expression der Nitrogenase-Strukturgene. Unter Verwendung zweier Zielgene, die für das *yellow fluorescent protein* (YFP) bzw. Bakteriorhodopsin kodieren, konnte eine starke P_{nif} -vermittelte Überexpression sowie eine strikte Repression in Gegenwart von Ammonium nachgewiesen werden. Die Verwendung verschiedener Lichtquellen führte darüber hinaus zu einer unerwarteten Beobachtung: Die P_{nif} -vermittelte Expression unterlag zusätzlich einer blaulichtabhängigen Repression. Somit kann der *nif*-Promotor-basierte Expressionsvektor in *R. capsulatus* als leistungsstarkes optogenetisches System zur lichtgesteuerten Kontrolle der heterologen Genexpression eingesetzt werden.

5. Summary

The identification and synthesis of new genes is important in biotechnology and medicine due to the wide variety of possible applications in these areas. The functional expression of heterologous genes in easily manageable microorganisms enables a simple and cost-efficient way to produce any target gene. However, successful gene expression in the most common expression host *Escherichia coli* is often limited due to several factors such as protein toxicity or the synthesis of insoluble protein aggregates. A possibility to overcome this limitation is the utilisation of alternative expression hosts. Within the presented work, the facultative phototrophic α -proteobacteria *Rhodobacter capsulatus* was used as an expression host for function-based screening of genes from the metagenome as well as the synthesis of membrane proteins and was compared to *E. coli* and *Pseudomonas putida*. Comparative expression and activity studies have shown that the utilisation of several bacterial expression hosts with different physiological properties can optimise the function-based screenings of gene libraries. In this case, three of the six investigated lipolytic enzymes from various metagenomic libraries showed the highest enzyme activity in the phototropic bacterium. Furthermore, *R. capsulatus* was evaluated as an expression host for the synthesis of heterologous membrane proteins. In contrast to common expression hosts, *R. capsulatus* exhibits a strongly enlarged intra-cytoplasmic membrane system when cultivated under phototropic growth conditions. Expression analysis with chemoheterotrophic and phototropic growth conditions proved that the unique membrane morphology is essential for the accumulation of the membrane proteins CYP175A1, Squalene epoxidase and Bacteriorhodopsin. Also, sucrose density gradient centrifugation has shown that the heterologous membrane proteins were integrated in vesicles of the intracytoplasmic membrane system. In the case of the P450 Monooxygenase CYP175A1, a CO-differentiation spectrum also confirmed correct folding and cofactor loading. Therefore, *R. capsulatus* shows to be a promising alternative expression host, which not only allows the functional synthesis of membrane proteins that are difficult to express, but also provides semi-artificial membrane vesicles for future application in nanobiotechnology. In addition, the *nif*-promoter based *R. capsulatus* expression vector pRhonHi-2 was characterized. This promoter controls the expression of nitrogenase structural genes in *R. capsulatus*. With the usage of two different target genes, which encodes the *yellow fluorescent protein* (YFP) and bacteriorhodopsin, a strong P_{nif} -controlled over-expression and a strict repression in the presence of ammonium was established. The application of different light sources presented an unexpected observation. The P_{nif} -controlled expression also underlies blue-light regulated repression. Therefore, the *nif*-promoter-based expression vector can be used as a

high-performance optogenetic system for the light regulated heterologous gene expression in *R. capsulatus*.

6. Literaturverzeichnis

1. **Adams, P. G. & Hunter, C. N. (2012).** Adaptation of intracytoplasmic membranes to altered light intensity in *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1817**, 1616–1627.
2. **Adams, P. G., Mothersole, D. J., Ng, I. W., Olsen, J. D. & Hunter, C. N. (2011).** Monomeric RC-LH1 core complexes retard assembly and intracytoplasmic membrane formation in PufX-minus mutants of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1807**, 1044–1055.
3. **Alexeyev, M. F. & Winkler, H. H. (1999).** Gene synthesis, bacterial expression and purification of the *Rickettsia prowazekii* ATP/ADP translocase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1419**, 299–306.
4. **Allen, S. P., Polazzi, J. O., Gierse, J. K. & Easton, A. M. (1992).** Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **174**, 6938–6947.
5. **Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I. B. H. & März, L. (1999).** Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate Journal* **123**, 109–123.
6. **Andersson, G. & Kurland, C. (1991).** An extreme codon preference strategy: codon reassignment. *Molecular Biology and Evolution* **8**, 530–544.
7. **Andersson, L., Yang, S., Neubauer, P. & Enfors, S. (1996).** Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **46**, 255–263.
8. **Andréll, J. & Tate, C. G. (2013).** Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Molecular Membrane Biology* **30**, 52–63.
9. **Angov, E. (2011).** Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnology Journal* **6**, 650–659.
10. **Angov, E., Hillier, C. J., Kincaid, R. L. & Lyon, J. A. (2008).** Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. *PLoS one* **3**, e2189.
11. **Anné, J., Maldonado, B., Van Impe, J., Van Mellaert, L. & Bernaerts, K. (2012).** Recombinant protein production and streptomycetes. *Journal of Biotechnology* **158**, 159–167.
12. **Arai, H., Roh, J. H. & Kaplan, S. (2008).** Transcriptome dynamics during the transition from anaerobic photosynthesis to aerobic respiration in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology* **190**, 286–299.
13. **Arechaga, I., Miroux, B., Karrasch, S., Huijbregts, R., de Kruijff, B., Runswick, M. J. & Walker, J. E. (2000).** Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F(1)F(0) ATP synthase. *FEBS letters* **482**, 215–219.
14. **Arechaga, I. (2013).** Membrane invaginations in bacteria and mitochondria: common features and evolutionary scenarios. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **23**, 13–23.
15. **Aronel, V., Benning, C. & Somerville, C. (1993).** Isolation and functional expression in *Escherichia coli* of a gene encoding phosphatidylethanolamine methyltransferase (EC 2.1.1.17) from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 16002–16008.
16. **Arpigny, J. L. & Jaeger, K. E. (1999).** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *The Biochemical Journal* **343**, 177–183.
17. **Arvani, S., Markert, A., Loeschcke, A., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2012).** A T7 RNA polymerase-based toolkit for the concerted expression of clustered genes. *Journal of Biotechnology* **159**, 162–171.
18. **Avtges, P., Scolnik, P. A. & Haselkorn, R. (1983).** Genetic and physical map of the structural genes (*nifH,D,K*) coding for the nitrogenase complex of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Journal of Bacteriology* **156**, 251–256.
19. **Baneyx, F. (2004).** Keeping up with protein folding. *Microbial Cell Factories* **2**, 2–3.
20. **Baneyx, F. & Mujacic, M. (2004).** Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **22**, 1399–1408.
21. **Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R. & Fletcher, A. (1991).** Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. 1922. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal* **145**, 1281–1286.
22. **Banting, F., Campbell, W. & Fletcher, A. (1923).** Further clinical experience with insulin (pancreatic extracts) in the treatment of diabetes mellitus. *British Medical Journal* **8–12**.

23. **Basto, C., Tzanov, T. & Cavaco-Paulo, A. (2007).** Combined ultrasound-laccase assisted bleaching of cotton. *Ultrasonics Sonochemistry* **14**, 350–354.
24. **Bauer, C., Elsen, S., Swem, L. R., Swem, D. L. & Masuda, S. (2003).** Redox and light regulation of gene expression in photosynthetic prokaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **358**, 147–154.
25. **Behera, R. K. & Mazumdar, S. (2010).** Thermodynamic basis of the thermostability of CYP175A1 from *Thermus thermophilus*. *International Journal of Biological Macromolecules* **46**, 412–418.
26. **Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H. & Kompala, D. S. (1990).** Plasmid-encoded protein: the principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* **35**, 668–681.
27. **Bergmann, R. (2011).** *Optimierung eines Expressionssystems für die Synthese von Redox- und Membranproteinen in Rhodobacter capsulatus*. Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
28. **Bernaodat, F., Frelet-Barrand, A., Pochon, N., Dementin, S., Hivin, P., Boutigny, S., Rioux, J.-B., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D. & other authors. (2011).** Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host. *PLoS one* **6**, e29191.
29. **Bernds, J. (2006).** *Etablierung eines neuen Systems zur heterologen Expression von Membranproteinen in Rhodobacter capsulatus*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
30. **Bertani, I., Rampioni, G., Leoni, L. & Venturi, V. (2007).** The *Pseudomonas putida* Lon protease is involved in N-acyl homoserine lactone quorum sensing regulation. *BMC Microbiology* **7**, 71.
31. **Bill, R. M., Henderson, P. J. F., Iwata, S., Kunji, E. R. S., Michel, H., Neutze, R., Newstead, S., Poolman, B., Tate, C. G. & Vogel, H. (2011).** Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nature Biotechnology* **29**, 335–340.
32. **Bilwes, a M., Alex, L. a, Crane, B. R. & Simon, M. I. (1999).** Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**, 131–141.
33. **Björk, G. R., Ericson, J. U., Gustafsson, C. E., Hagervall, T. G., Jönsson, Y. H. & Wikström, P. M. (1987).** Transfer RNA modification. *Annual Review of Biochemistry* **56**, 263–287.
34. **Blasco, F., Kauffmann, I. & Schmid, R. D. (2004).** CYP175A1 from *Thermus thermophilus* HB27, the first beta-carotene hydroxylase of the P450 superfamily. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**, 671–674.
35. **Boehm, R. (2007).** Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1102**, 121–134.
36. **De Boer, H. A., Comstock, L. J. & Vasser, M. (1983).** The tac promoter: A functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Biochemistry* **80**, 21–25.
37. **Boland, W., Frossl, C. & Lorenz, M. (1991).** Esterolytic and lipolytic enzymes in organic-synthesis. *SynthesisStuttgart* **12**, 1049–1072.
38. **Bornscheuer, U. T., Bessler, C., Srinivas, R. & Krishna, S. H. (2002).** Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology* **20**, 433–437.
39. **Bortolotti, A., Pérez-Dorado, I., Goñi, G., Medina, M., Hermoso, J. A., Carrillo, N. & Cortez, N. (2009).** Coenzyme binding and hydride transfer in *Rhodobacter capsulatus* ferredoxin/ flavodoxin NADP(H) oxidoreductase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1794**, 199–210.
40. **Bowie, J. U. (1997).** Helix packing in membrane proteins. *Journal of Molecular Biology* **272**, 780–789.
41. **Braatsch, S. & Moskvina, O. (2004).** Responses of the *Rhodobacter sphaeroides* transcriptome to blue light under semiaerobic conditions. *Journal of Bacteriology* **186**, 7726–7735.
42. **Brosius, J. (1988).** Expression vectors employing lambda-, trp-, lac-, and lpp-derived promoters. *Biotechnology (Reading, Mass)* **10**, 205–225.
43. **Bürk, J., Weiche, B., Wenk, M., Boy, D., Nestel, S., Heimrich, B. & Koch, H.-G. (2009).** Depletion of the signal recognition particle receptor inactivates ribosomes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **191**, 7017–7026.
44. **Butzin, N. C., Owen, H. a & Collins, M. L. P. (2010).** A new system for heterologous expression of membrane proteins: *Rhodospirillum rubrum*. *Protein Expression and Purification* **70**, 88–94.
45. **Calderone, T. L., Stevens, R. D. & Oas, T. G. (1996).** High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **262**, 407–412.
46. **Capaldi, R. a & Aggeler, R. (2002).** Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends in Biochemical Sciences* **27**, 154–160.
47. **Carbone, a., Zinovyev, a. & Kepes, F. (2003).** Codon adaptation index as a measure of dominating codon bias. *Bioinformatics* **19**, 2005–2015.

48. **Cascieri, T. & Mallette, M. (1976).** Intracellular peptide hydrolysis by *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas maltophilia*. *Journal of General Microbiology* **92**, 296–303.
49. **Cava, F., Hidalgo, A. & Berenguer, J. (2009).** *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles: life under extreme conditions* **13**, 213–231.
50. **Charbonnier, F., Köhler, T., Pechère, J. C. & Ducruix, A. (2001).** Overexpression, refolding, and purification of the histidine-tagged outer membrane efflux protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expression and Purification* **23**, 121–127.
51. **Chevallet, M. (2003).** Two EPR-detectable [4Fe–4S] clusters, N2a and N2b, are bound to the Nuol (TYKY) subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1557**, 51–66.
52. **Chory, J., Donohue, T. J., Varga, a R., Staehelin, L. a & Kaplan, S. (1984).** Induction of the photosynthetic membranes of *Rhodospseudomonas sphaeroides*: biochemical and morphological studies. *Journal of Bacteriology* **159**, 540–554.
53. **Chow, J., Krauss, U., Jaeger, K.-E. & Streit, W. (2011).** Carboxylesterases and Lipases from Metagenomes. In *Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats*, pp. 499–506. Edited by F. J. de Bruijn. John Wiley & Sons.
54. **Chow, J., Kovacic, F., Dall Antonia, Y., Krauss, U., Fersini, F., Schmeisser, C., Lauinger, B., Bongen, P., Pietruszka, J. & other authors. (2012).** The metagenome-derived enzymes LipS and LipT increase the diversity of known lipases. *PLoS one* **7**, e47665.
55. **Chugh, A., Ray, A. & Gupta, J. B. (2003).** Squalene epoxidase as hypocholesterolemic drug target revisited. *Progress in Lipid Research* **42**, 37–50.
56. **Corchero, J. L. & Villaverde, A. (1998).** Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnology and Bioengineering* **58**, 625–632.
57. **Courtois, S. & Cappellano, C. (2003).** Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 49–55.
58. **Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K. & Chappell, T. (2009).** Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods in Enzymology* **463**, 169–189.
59. **Curnow, P. (2009).** Membrane proteins in nanotechnology. *Biochemical Society Transactions* **37**, 643–52.
60. **Dahmane, T., Rappaport, F. & Popot, J.-L. (2013).** Amphipol-assisted folding of bacteriorhodopsin in the presence or absence of lipids: functional consequences. *European Biophysics Journal: EBJ* **42**, 85–101.
61. **Davanloo, P., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Studier, F. W. (1984).** Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 2035–2039.
62. **Deshpande, A. & Sonar, S. (1999).** Bacterioopsin-triggered retinal biosynthesis is inhibited by bacteriorhodopsin formation in *Halobacterium salinarium*. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 23535–23540.
63. **Díaz Blanco, C., Trifonov, A., Georgiev, G. & Tzanov, T. (2012).** Light harvesting amphiphiles boost the performance of lipase-based washing formulations. *Enzyme and Microbial Technology* **51**, 156–162.
64. **Ding, H., Yip, C. B. & Hynes, M. F. (2013).** Genetic characterization of a novel rhizobial plasmid conjugation system in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae strain VF39SM. *Journal of Bacteriology* **195**, 328–339.
65. **Doherty, A. J., Connolly, B. A. & Worrall, A. F. (1993).** Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. *Gene* **136**, 337–340.
66. **Dong, C.-H., Jang, M., Scharein, B., Malach, A., Rivarola, M., Liesch, J., Groth, G., Hwang, I. & Chang, C. (2010).** Molecular association of the *Arabidopsis* ETR1 ethylene receptor and a regulator of ethylene signaling, RTE1. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 40706–40713.
67. **Dong, H., Nilsson, L. & Kurland, C. (1995).** Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of Bacteriology* **177**, 1497–1504.
68. **Dragosits, M., Nicklas, D. & Tagkopoulos, I. (2012).** A synthetic biology approach to self-regulatory recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Engineering* **6**, 1–10.
69. **Drepper, T. (2003).** Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology* **149**, 2203–2212.

70. **Drepper, T., Wiethaus, J., Giaourakis, D., Gross, S., Schubert, B., Vogt, M., Wienczek, Y., McEwan, A. G. & Masepohl, B. (2006).** Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiology Letters* **258**, 250–256.
71. **Drepper, T., Krauss, U., Meyer zu Berstenhorst, S., Pietruszka, J. & Jaeger, K.-E. (2011).** Lights on and action! Controlling microbial gene expression by light. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**, 23–40.
72. **Drepper, T., Heck, A. & Jaeger, K.-E. (2012).** Heterologe Genexpression in photosynthetischen Bakterien. *systembiologie.de*, 46–50.
73. **Drew, D., Fröderberg, L., Baars, L. & de Gier, J.-W. L. (2003).** Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1610**, 3–10.
74. **Drews, G. (2013).** The intracytoplasmic membranes of purple bacteria-assembly of energy-transducing complexes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **23**, 35–47.
75. **Drews, G. & Golecki, J. R. (1995).** Structure, molecular organization and biosynthesis of membranes of purple bacteria. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, pp. 231–257. Edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer. Kluwer Academic Publishers.
76. **Dugaiczky, A. (1975).** Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *Journal of Molecular Biology* **96**, 171–184.
77. **Dunn, R., McCoy, J., Simsek, M., Majumdar, A., Chang, S. H., Rajbhandary, U. L. & Khorana, H. G. (1981).** The bacteriorhodopsin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 6744–6748.
78. **Elhai, J. & Wolk, C. P. (1988).** Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods in Enzymology* **167**, 747–754.
79. **Elofsson, A. & von Heijne, G. (2007).** Membrane protein structure: prediction versus reality. *Annual Review of Biochemistry* **76**, 125–140.
80. **Elsen, S., Dischert, W., Colbeau, A. & Bauer, C. E. (2000).** Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system. *Journal of Bacteriology* **182**, 2831–2837.
81. **Elsen, S. (1998).** CrtJ bound to distant binding sites interacts cooperatively to aerobically repress photopigment biosynthesis and light harvesting ii gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 30762–30769.
82. **Eriksson, H. M., Wessman, P., Ge, C., Edwards, K. & Wieslander, A. (2009).** Massive formation of intracellular membrane vesicles in *Escherichia coli* by a monotopic membrane-bound lipid glycosyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 33904–33914.
83. **Feller, G. (2010).** Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures. *Journal of Physics Condensed Matter: an Institute of Physics Journal* **22**, 323101–323118.
84. **Ferrer, M., Beloqui, A., Timmis, K. N. & Golyshin, P. N. (2009).** Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **16**, 109–23.
85. **Flower, D. R. (1999).** Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochimica et Biophysica Acta* **1422**, 207–234.
86. **Forman, M., Stack, R. & Masters, P. (1998).** High level, context dependent misincorporation of lysine for arginine in *Saccharomyces cerevisiae* a1 homeodomain expressed in *Escherichia coli*. *Protein Science* **7**, 500–503.
87. **Freigassner, M., Pichler, H. & Glieder, A. (2009).** Tuning microbial hosts for membrane protein production. *Microbial Cell Factories* **8**, 69.
88. **Fuglsang, A. (2003).** Lactic acid bacteria as prime candidates for codon optimization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **312**, 285–291.
89. **Fukuda, H., Kondo, A. & Noda, H. (2001).** Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**, 405–416.
90. **Gabor, E., Liebeton, K., Niehaus, F., Eck, J. & Lorenz, P. (2007).** Updating the metagenomics toolbox. *Biotechnology Journal* **2**, 201–206.
91. **Georgiou, G., Shuler, M. L. & Wilson, D. B. (1988).** Release of periplasmic enzymes and other physiological effects of beta-lactamase overproduction in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **32**, 741–748.
92. **Georgiou, G. & Valax, P. (1996).** Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 190–197.

93. **Giacalone, M., Gentile, A., Lovitt, B., Berkley, N., Gunderson, C. & Surber, M. (2006).** Toxic protein expression in *Escherichia coli* using a rhamnose-based tightly regulated and tunable promoter system. *BioTechniques* **40**, 355–364.
94. **Gill, R. T., Valdes, J. J. & Bentley, W. E. (2000).** A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* **2**, 178–189.
95. **Gleichmann, T., Diensthuber, R. P. & Möglich, A. (2013).** Charting the signal trajectory in a light-oxygen-voltage photoreceptor by random mutagenesis and covariance analysis. *The Journal of Biological Chemistry* 1–16.
96. **Glick, B. (1995).** Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances* **13**, 247–261.
97. **Golecki, J., Drews, G. & Bühler, R. (1979).** The size and number of intramembrane particles in cells of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* studied by freeze-fracture electron microscopy. *Cytobiologie* **18**, 381–389.
98. **Golecki, J. R., Schumacher, A. & Drews, G. (1980).** The differentiation of the photosynthetic apparatus and the intracytoplasmic membrane in cells of *Rhodospseudomonas capsulata* upon variation of light intensity. *European Journal of Cell Biology* **23**, 1–5.
99. **Gomelsky, M. & Kaplan, S. (1997).** Molecular genetic analysis suggesting interactions between AppA and PpsR in regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology* **179**, 128–134.
100. **Gomelsky, M. & Klug, G. (2002).** BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends in Biochemical Sciences* **27**, 497–500.
101. **Gonçalves, A. M., Pedro, A. Q., Maia, C., Sousa, F., Queiroz, J. A. & Passarinha, L. A. (2013).** *Pichia pastoris*: a recombinant microfactory for antibodies and human membrane proteins. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**, 587–601.
102. **Gonen, T. & Walz, T. (2006).** The structure of aquaporins. *Quarterly Reviews of Biophysics* **39**, 361–396.
103. **Goulding, C. W. & Jeanne Perry, L. (2003).** Protein production in *Escherichia coli* for structural studies by X-ray crystallography. *Journal of Structural Biology* **142**, 133–143.
104. **Goyal, S., Banerjee, S. & Mazumdar, S. (2012).** Oxygenation of monoenoic fatty acids by CYP175A1, an orphan cytochrome P450 from *Thermus thermophilus* HB27. *Biochemistry* **51**, 7880–7890.
105. **Gregor, J. & Klug, G. (1999).** Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS Microbiology Letters* **179**, 1–9.
106. **Gross, R. a., Kalra, B. & Kumar, A. (2001).** Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**, 655–660.
107. **Guan, L., Liu, Q., Li, C. & Zhang, Y. (2013).** Development of a Fur-dependent and tightly regulated expression system in *Escherichia coli* for toxic protein synthesis. *BMC Biotechnology* **13**, 25.
108. **Gubellini, F., Francia, F., Turina, P., Lévy, D., Venturoli, G. & Melandri, B. A. (2007).** Heterogeneity of photosynthetic membranes from *Rhodobacter capsulatus*: size dispersion and ATP synthase distribution. *Biochimica et Biophysica Acta* **1767**, 1340–1352.
109. **Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J. (2004).** Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology* **22**, 346–353.
110. **Hampp, N. A. (2000).** Bacteriorhodopsin: mutating a biomaterial into an optoelectronic material. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**, 633–639.
111. **Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557–580.
112. **Harcum, S. W. & Bentley, W. E. (1999).** Heat-shock and stringent responses have overlapping protease activity in *Escherichia coli*. Implications for heterologous protein yield. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **80**, 23–37.
113. **Hasan, F., Shah, A. A. & Hameed, A. (2006).** Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* **39**, 235–251.
114. **Hasan, F., Shah, A. A. & Hameed, A. (2009).** Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* **27**, 782–798.
115. **Heck, A. (2008).** Synthese heterologer Membranproteine und Carotinoide in dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus*. Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
116. **Hedfalk, K. (2013).** Further advances in the production of membrane proteins in *Pichia pastoris*. *Bioengineered* **4**, 1–5.

117. **Von Heijne, G. (1992).** Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *Journal of Molecular Biology* **225**, 487–494.
118. **Heinrich, L. E. (2012).** Vergleichende Expressionsanalysen von Genen aus Metagenombanken. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
119. **Henderson, R. & Unwin, P. (1975).** Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* **257**, 28–32.
120. **Henne, A., Schmitz, R. a, Bömeke, M., Gottschalk, G. & Daniel, R. (2000).** Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3113–3116.
121. **Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. & Mitaku, S. (1998).** SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**, 378–379.
122. **Ho, J. D., Yeh, R., Sandstrom, A., Chorny, I., Harries, W. E. C., Robbins, R. A., Miercke, L. J. W. & Stroud, R. M. (2009).** Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 7437–42.
123. **Hoffmann, F. & Rinas, U. (2004).** Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **89**, 73–92.
124. **Hofman, K. & Stoffel, W. (1993).** TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **374**, 1.
125. **Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P. & Strauss, M. (1995).** Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 10099–10103.
126. **Hohenfeld, I., Wegener, A. & Engelhard, M. (1999).** Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **442**, 198–202.
127. **Hu, X., Shi, Q., Yang, T. & Jackowski, G. (1996).** Specific replacement of consecutive AGG codons results in high-level expression of human cardiac troponin T in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **7**, 289–293.
128. **Hübner, P., Willison, J. C., Vignais, P. M. & Bickle, T. a. (1991).** Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology* **173**, 2993–2999.
129. **Hudlicky, T. & Reed, J. W. (2009).** Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis. *Chemical Society Reviews* **38**, 3117–3132.
130. **Hurley, J. M., Chen, C.-H., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2012).** Light-inducible system for tunable protein expression in *Neurospora crassa*. *G3 (Bethesda, Md)* **2**, 1207–1212.
131. **Idiris, A., Bi, K., Tohda, H., Kumagai, H. & Giga-Hama, Y. (2006).** Construction of a protease-deficient strain set for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, useful for effective production of protease-sensitive heterologous proteins. *Yeast* **23**, 83–99.
132. **Ikemura, T. (1985).** Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Molecular Biology and Evolution* **2**, 13–34.
133. **Imhoff, J., Trüper, H. & Pfennig, N. (1984).** Rearrangement of the species and genera of the phototrophic “purple nonsulfur bacteria”. *International Journal of Bacteriology* **34**, 340–343.
134. **Jaeger, K. E. & Reetz, M. T. (1998).** Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology* **16**, 396–403.
135. **Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W. & Reetz, M. T. (1999).** Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology* **53**, 315–351.
136. **Jaeger, K.-E. & Eggert, T. (2002).** Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 390–397.
137. **Jaenicke, R. (1991).** Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **202**, 715–728.
138. **Jana, S. & Deb, J. K. (2005).** Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**, 289–298.
139. **Janvilisri, T., Shahi, S., Venter, H., Balakrishnan, L. & van Veen, H. W. (2005).** Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *The Biochemical Journal* **385**, 419–426.

140. **Jensen, C. L., Stephenson, K., Jørgensen, S. T. & Harwood, C. (2000).** Cell-associated degradation affects the yield of secreted engineered and heterologous proteins in the *Bacillus subtilis* expression system. *Microbiology* **146**, 2583–2594.
141. **Jeong, H.-S. & Jouanneau, Y. (2000).** Enhanced nitrogenase activity in strains of *Rhodobacter capsulatus* that overexpress the *rnf* Genes. *Journal of Bacteriology* **182**, 1208–1214.
142. **Jiang, X., Oohira, K., Iwasaki, Y., Nakano, H., Ichihara, S. & Yamane, T. (2002).** Reduction of protein degradation by use of protease-deficient mutants in cell-free protein synthesis system of *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **93**, 151–156.
143. **Johnston, M. (1987).** A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* **51**, 458–476.
144. **Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. (1994).** A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* **33**, 3038–3049.
145. **Juretić, D., Jerončić, A. & Zucić, D. (1999).** Sequence analysis of membrane proteins with the web server SPLIT. *Croatica Chemica Acta* **72**, 975–997.
146. **Kane, J. F., Violand, B. N., Curran, D. F., Staten, N. R., Duffin, K. L. & Bogosian, G. (1992).** Novel in-frame two codon translational hop during synthesis of bovine placental lactogen in a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* **20**, 6707–6712.
147. **Kane, J. (1995).** Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 494–500.
148. **Karnik, S., Doi, T., Molday, R. & Khorana, H. G. (1990).** Expression of the archaeobacterial bacterio-opsin gene with and without signal sequences in *Escherichia coli*: the expressed proteins are located in the membrane but bind retinal poorly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 8955–8959.
149. **Kashket, E. (1987).** Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Letters* **46**, 233–244.
150. **Katzke, N. (2010).** Entwicklung eines *Rhodobacter*-basierten Systems zur Synthese wirtsfremder Proteine und Phospholipide. Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
151. **Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Markert, A., Svensson, V., Jaeger, K.-E., Heck, A. & Drepper, T. (2010).** A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein Expression and Purification* **69**, 137–146.
152. **Katzke, N., Bergmann, R., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2012).** Heterologous high-level gene expression in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Methods in Molecular Biology*, pp. 251–269.
153. **Kefala, G., Kwiatkowski, W., Esquivies, L., Maslennikov, I. & Choe, S. (2007).** Application of Mystic to improving the expression and membrane integration of histidine kinase receptors from *Escherichia coli*. *Journal of Structural and Functional Genomics* **8**, 167–172.
154. **Kelly, D. E., Krasevec, N., Mullins, J. & Nelson, D. R. (2009).** The CYPome (Cytochrome P450 complement) of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B* **46**, S53–S61.
155. **Kennedy, J. F. & White, C. A. (1983).** *Industrial enzymology: the application of enzymes in industry* (T. Godfrey & J. Reichelt, Eds.).
156. **Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000).** Practical *Streptomyces* Genetics. *International Microbiology* **3**, 1–613.
157. **Kiley, P. J., Varga, A. & Kaplan, S. (1988).** Physiological and structural analysis of light-harvesting mutants of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* **170**, 1103–1115.
158. **Kim, E., Kim, M. & Lee, J. (2007).** Phosphatidylcholine is required for the efficient formation of photosynthetic membrane and B800-850 light-harvesting complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**, 373–377.
159. **Kiyota, H., Higashi, E., Koike, T. & Oritani, T. (2001).** Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate. *Tetrahedron: Asymmetry* **12**, 1035–1038.
160. **Klabunde, T. & Hessler, G. (2002).** Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *ChemBiochem: a European Journal of Chemical Biology* **3**, 928–944.
161. **Klipp, W., Masepohl, B. & Pühler, A. (1988).** Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: duplication of a *nifA-nifB* region. *Journal of Bacteriology* **170**, 693–699.
162. **Klug, G. & Drews, G. (1984).** Construction of a gene bank of *Rhodopseudomonas capsulatus* using a broad host range dna cloning system. *Archives of Microbiology* **139**, 319–325.

163. **Klug, R. M. & Benning, C. (2001).** Two enzymes of diacylglycerol-O-4'-(N,N,N-trimethyl)homoserine biosynthesis are encoded by btaA and btaB in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5910–5915.
164. **Knight, R. D., Freeland, S. J. & Landweber, L. F. (2001).** A simple model based on mutation and selection explains trends in codon and amino-acid usage and GC composition within and across genomes. *Genome Biology* **2**, 1–13.
165. **Knops, K. (2008).** Eignung von Autotransportern zum Oberflächendisplay in Gram-negativen Bakterien. Diplomarbeit, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf.
166. **Kochetkov, S. N., Rusakova, E. E. & Tunitskaya, V. L. (1998).** Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism. *FEBS Letters* **440**, 264–267.
167. **Korepanova, A., Gao, F. & Hua, Y. (2005).** Cloning and expression of multiple integral membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli*. *Protein Science* **3**, 148–158.
168. **Koth, C. M. M. & Payandeh, J. (2009).** Strategies for the cloning and expression of membrane proteins. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* **76**, 43–86.
169. **Kouker, G. & Jaeger, K. E. (1987).** Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 211–213.
170. **Kouyama, T., Kouyama, A. & Ikegami, A. (1987).** Bacteriorhodopsin is a powerful light-driven proton pump. *Biophysical Journal* **51**, 839–841.
171. **Kranz, R. G. & Haselkorn, R. (1986).** Anaerobic regulation of nitrogen-fixation genes in *Rhodospseudomonas capsulata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 6805–6809.
172. **Kreuz, A. (2003).** Untersuchungen zur Funktion von Proteasen bei der Regulation der beiden Nitrogenase-Systeme in dem phototrophen Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.
173. **Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* **305**, 567–580.
174. **Kucz, N. (2005).** Erzeugung eines *nif*-Promotor basierten Expressionssystems in *Rhodobacter capsulatus*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
175. **Kunji, E. R. S., Chan, K. W., Slotboom, D. J., Floyd, S., O'Connor, R. & Monné, M. (2005).** Eukaryotic membrane protein overproduction in *Lactococcus lactis*. *Current Opinion in Biotechnology* **16**, 546–551.
176. **Kunji, E. R. S., Slotboom, D.-J. & Poolman, B. (2003).** *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1610**, 97–108.
177. **Kyndt, J. A., Hurley, J. K., Devreese, B., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., Tollin, G. & Van Beeumen, J. J. (2004a).** *Rhodobacter capsulatus* photoactive yellow protein: genetic context, spectral and kinetics characterization, and mutagenesis. *Biochemistry* **43**, 1809–1820.
178. **Kyndt, J. A., Meyer, T. E., Olson, K. T., Van Beeumen, J. & Cusanovich, M. A. (2004b).** Photokinetic, biochemical and structural features of chimeric photoactive yellow protein constructs. *Photochemistry and Photobiology* **89**, 349–360.
179. **Laden, B., Tang, Y. & Porter, T. (2000).** Cloning, heterologous expression, and enzymological characterization of human squalene monooxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **374**, 381–388.
180. **Laemmli, U. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
181. **Laible, P. D., Scott, H. N., Henry, L. & Hanson, D. K. (2004).** Towards higher-throughput membrane protein production for structural genomics initiatives. *Journal of Structural and Functional Genomics* **5**, 167–172.
182. **Laible, P. D., Donna L., M. & Deborah K., H. (2009).** Foreign Gene Expression in Photosynthetic Bacteria. *The Purple Phototrophic Bacteria*, pp. 839–860. Edited by C. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnauer & J. T. Beatty. Dordrecht: Springer Netherlands.
183. **Lampe, H. H., Oelze, J. & Drews, G. (1972).** Die Fraktionierung des Membransystems von *Rhodospseudomonas capsulata* und seine Morphogenese. *Archiv für Mikrobiologie* **83**, 78–94.
184. **Lanyi, J. K. (2004).** Bacteriorhodopsin. *Annual Review of Physiology* **66**, 665–688.
185. **Lawrence, R., Fryer, T. & Reiter, B. (1967).** Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature* **213**, 1264 – 1265.

186. **Lawson, R. J., Leys, D., Sutcliffe, M. J., Kemp, C. A., Cheesman, M. R., Smith, S. J., Clarkson, J., Smith, W. E., Haq, I. & other authors. (2004).** Thermodynamic and biophysical characterization of cytochrome P450 Biol from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **43**, 12410–26.
187. **Lee, J. M., Lee, J., Kim, T. & Lee, S. K. (2013).** Switchable gene expression in *Escherichia coli* using a miniaturized photobioreactor. *PLoS one* **8**, e52382.
188. **Lefman, J., Zhang, P., Hirai, T., Weis, R. M., Juliani, J., Bliss, D., Kessel, M., Bos, E., Peters, P. J. & Subramaniam, S. (2004).** Three-dimensional electron microscopic imaging of membrane invaginations in *Escherichia coli* overproducing the chemotaxis receptor Tsr. *Journal of Bacteriology* **186**, 5052–5061.
189. **Leis, B., Angelov, A. & Liebl, W. (2013).** Screening and expression of genes from metagenomes. *Advances in Applied Microbiology* **83**, 1–68.
190. **León-Bañares, R., González-Ballester, D., Galván, A. & Fernández, E. (2004).** Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends in Biotechnology* **22**, 45–52.
191. **Leung, M. M., Brimacombe, C. a & Beatty, J. T. (2013).** Transcriptional regulation of the *Rhodobacter capsulatus* response regulator CtrA. *Microbiology* **159**, 96–106.
192. **Levskaya, A., Chevalier, A. A., Tabor, J. J., Simpson, Z. B., Lavery, L. A., Levy, M., Davidson, E. A., Scouras, A., Ellington, A. D. & other authors. (2005).** Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light. *Nature* **438**, 441–442.
193. **Li, X.-J., Zheng, R.-C., Ma, H.-Y. & Zheng, Y.-G. (2013).** Engineering of *Thermomyces lanuginosus* lipase Lip: creation of novel biocatalyst for efficient biosynthesis of chiral intermediate of Pregabalin. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
194. **Li, Y., Wexler, M., Richardson, D. J., Bond, P. L. & Johnston, A. W. B. (2005).** Screening a wide host-range, waste-water metagenomic library in tryptophan auxotrophs of *Rhizobium leguminosarum* and of *Escherichia coli* reveals different classes of cloned *trp* genes. *Environmental Microbiology* **7**, 1927–36.
195. **Liebl, W. (2004).** Genomics taken to the extreme. *Nature Biotechnology* **22**, 524–525.
196. **Lilburn, T. G., Haith, C. E., Prince, R. C. & Beatty, J. T. (1992).** Pleiotropic effects of *pufX* gene deletion on the structure and function of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter capsulatus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1100**, 160–170.
197. **Lillie, H., Schwarz, E. & Rudolph, R. (1998).** Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 497–501.
198. **Loeschcke, A., Markert, A., Wilhelm, S., Wirtz, A., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2013).** TRES: a universal tool for the transfer and expression of biosynthetic pathways in bacteria. *ACS Synthetic Biology* **2**, 22–33.
199. **London, E. & Khorana, H. G. (1982).** Denaturation and renaturation of bacteriorhodopsin in detergents and lipid-detergent mixtures. *The Journal of Biological Chemistry* **257**, 7003–7011.
200. **Loppnow, H., Libby, P., Freudenberg, M., Krauss, J. H., Weckesser, J. & Mayer, H. (1990).** Cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) corresponds to lethal toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter capsulatus* LPS. *Infection and Immunity* **58**, 3743–3750.
201. **Lorenz, P. & Eck, J. (2005).** Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 510–516.
202. **Losi, A. & Gärtner, W. (2008).** Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **7**, 1168–1178.
203. **Losi, A. (2004).** The bacterial counterparts of plant phototropins. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **3**, 566–574.
204. **Losi, A. & Gärtner, W. (2012).** The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 49–72.
205. **Lundstrom, K. (2006).** Latest development in drug discovery on G protein-coupled receptors. *Current Protein & Peptide Science* **7**, 465–470.
206. **M E Kovach, R. W. P. (1994).** pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *BioTechniques* **16**, 800 – 802.
207. **Mandai, T., Fujiwara, S. & Imaoka, S. (2009).** A novel electron transport system for thermostable CYP175A1 from *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS Journal* **276**, 2416–2429.
208. **Martinez, A., Kolvek, S. & Yip, C. (2004).** Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 2452–2463.

209. **Martins, A. B., Friedrich, J. L. R., Garcia-Galan, C., Fernandez-Lafuente, R., Ayub, M. A. Z. & Rodrigues, R. C. (2013).** Optimized butyl butyrate synthesis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase. *Biotechnology Progress*.
210. **Masepohl, B. & Drepper, T. (2002).** Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Molecular Biotechnology* **4**, 243–248.
211. **Masepohl, B. & Hallenbeck, P. C. (2010).** Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes **675** (P. C. Hallenbeck, Ed.). New York, NY: Springer New York.
212. **Masuda, S. & Bauer, C. E. (2002).** AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell* **110**, 613–623.
213. **McCordle, S. L., Kappler, U. & McEwan, A. G. (2005).** Microbial dimethylsulfoxide and trimethylamine-N-oxide respiration. *Advances in Microbial Physiology* **50**, 147–198.
214. **McCurley, M. & Glazier, S. (1995).** Optical control of enzymatic conversion of sucrose to glucose by bacteriorhodopsin incorporated into self-assembled phosphatidylcholine vesicles. *Analytica Chimica Acta* **311**, 211–215.
215. **McNulty, D. E., Claffee, B. a, Huddleston, M. J., Porter, M. L., Cavnar, K. M. & Kane, J. F. (2003).** Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **27**, 365–374.
216. **Merril, C. R. (1990).** Gel-staining techniques. *Methods in Enzymology* **182**, 477–488.
217. **Meyer, B. H. & Albers, S.-V. (2013).** Hot and sweet: protein glycosylation in *Crenarchaeota*. *Biochemical Society Transactions* **41**, 384–392.
218. **Mierau, I. & Kleerebezem, M. (2005).** 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**, 705–717.
219. **Miroux, B. & Walker, J. E. (1996).** Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology* **260**, 289–298.
220. **Mo, X., Krebs, M. P. & Yu, S. M. (2006).** Directed synthesis and assembly of nanoparticles using purple membrane. *Small* **2**, 526–529.
221. **Möglich, A., Ayers, R. a & Moffat, K. (2009).** Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases. *Journal of Molecular Biology* **385**, 1433–1444.
222. **Molisch, H. (1907).** Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen: Eine mikrobiologische Studie von Molisch, Hans [1856-1937]: *Gustav Fischer, Jena - Expatriate Bookshop of Denmark*.
223. **Momoi, K., Hofmann, U., Schmid, R. D. & Urlacher, V. B. (2006).** Reconstitution of beta-carotene hydroxylase activity of thermostable CYP175A1 monooxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **339**, 331–336.
224. **Monné, M., Chan, K., Slotboom, D. & Kunji, E. (2005).** Functional expression of eukaryotic membrane proteins in *Lactococcus lactis*. *Protein Science* **14**, 3048–3056.
225. **Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335–350.
226. **Murby, M., Samuelsson, E., Nguyen, T. N., Mignard, L., Power, U., Binz, H., Uhlén, M. & Ståhl, S. (1995).** Hydrophobicity engineering to increase solubility and stability of a recombinant protein from respiratory syncytial virus. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **230**, 38–44.
227. **Nagarajan, S. (2012).** New tools for exploring “old friends-microbial lipases”. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **168**, 1163–1196.
228. **Nagumo, a, Kamei, T., Sakakibara, J. & Ono, T. (1995).** Purification and characterization of recombinant squalene epoxidase. *Journal of Lipid Research* **36**, 1489–1497.
229. **Nakano, C., Motegi, A., Sato, T., Onodera, M. & Hoshino, T. (2007).** Sterol biosynthesis by a prokaryote: First in vitro identification of the genes encoding squalene epoxidase and lanosterol synthase from *Methylococcus capsulatus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**, 2543–2550.
230. **Nannenga, B. L. & Baneyx, F. (2011).** Reprogramming chaperone pathways to improve membrane protein expression in *Escherichia coli*. *Protein Science: a Publication of the Protein Society* **20**, 1411–1420.
231. **Nannenga, B. L. & Baneyx, F. (2012).** Folding engineering strategies for efficient membrane protein production in *E. coli*. *Methods in Molecular Biology* **899**, 187–202.
232. **Nelson, D. R., Schuler, M. A., Paquette, S. M., Werck-Reichhart, D. & Bak, S. (2004a).** Comparative genomics of rice and Arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiology* **135**, 756–772.

233. Nelson, D. R., Zeldin, D. C., Hoffman, S. M. G., Maltais, L. J., Wain, H. M. & Nebert, D. W. (2004b). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* **14**, 1–18.
234. Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M. & other authors. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* **4**, 799–808.
235. Neutze, R., Pebay-Peyroula, E., Edman, K., Royant, A., Navarro, J. & Landau, E. M. (2002). Bacteriorhodopsin: a high-resolution structural view of vectorial proton transport. *Biochimica et Biophysica Acta* **1565**, 144–167.
236. Neves, S. R., Ram, P. T. & Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science* **296**, 1636–1639.
237. Niederman, R. A. (2013). Membrane development in purple photosynthetic bacteria in response to alterations in light intensity and oxygen tension. *Photosynthesis Research* **116**, 333–348.
238. Nikiforovich, G. V., Galaktionov, S., Balodis, J. & Marshall, G. R. (2001). Novel approach to computer modeling of seven-helical transmembrane proteins: current progress in the test case of bacteriorhodopsin. *Acta Biochimica Polonica* **48**, 53–64.
239. Nocadello, S. & Swennen, E. F. (2012). The new pLAI (lux regulon based auto-inducible) expression system for recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* **11**, 3. BioMed Central Ltd.
240. Nogués, I., Pérez-Dorado, I., Frago, S., Bittel, C., Mayhew, S. G., Gómez-Moreno, C., Hermoso, J. A., Medina, M., Cortez, N. & Carrillo, N. (2005). The ferredoxin-NADP(H) reductase from *Rhodobacter capsulatus*: molecular structure and catalytic mechanism. *Biochemistry* **44**, 11730–11740.
241. Oelze, J. & Drews, G. (1972). Membranes of photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **265**, 209–239.
242. Oesterhelt, D. & Stoekenius, W. (1973). Functions of a new photoreceptor membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**, 2853–2857.
243. Olempska-Beer, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D. & DiNovi, M. J. (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **45**, 144–158.
244. Olesen, C., Picard, M., Winther, A.-M. L., Gyrupe, C., Morth, J. P., Oxvig, C., Møller, J. V. & Nissen, P. (2007). The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature* **450**, 1036–1042.
245. Ono, A., Miyazaki, R., Sota, M., Ohtsubo, Y., Nagata, Y. & Tsuda, M. (2007). Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**, 501–510.
246. Ono, M., Suzuki, K., Tanikawa, S. & Akita, H. (2001). First synthesis of (+)- and (-)-elvirol based on an enzymatic function. *Tetrahedron: Asymmetry* **12**, 2597–2604.
247. Ono, T., Nakazono, K. & Kosaka, H. (1982). Purification and partial characterization of squalene epoxidase from rat liver microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta* **709**, 84–90.
248. Opekarová, M. & Tanner, W. (2003). Specific lipid requirements of membrane proteins—a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1610**, 11–22.
249. Ourisson, G. & Nakatani, Y. (1994). The terpenoid theory of the origin of cellular life: the evolution of terpenoids to cholesterol. *Chemistry & Biology* **1**, 11–23.
250. Pasquier, C., Promponas, V. J., Palaios, G. a, Hamodrakas, J. S. & Hamodrakas, S. J. (1999). A novel method for predicting transmembrane segments in proteins based on a statistical analysis of the SwissProt database: the PRED-TMR algorithm. *Protein Engineering* **12**, 381–385.
251. Patterson, S. S., Dionisi, H. M., Gupta, R. K. & Saylor, G. S. (2005). Codon optimization of bacterial luciferase (lux) for expression in mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **32**, 115–123.
252. Patzelt, H., Simon, B., TerLaak, A., Kessler, B., Kühne, R., Schmieder, P., Oesterhelt, D. & Oschkinat, H. (2002). The structures of the active center in dark-adapted bacteriorhodopsin by solution-state NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 9765–9770.
253. Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* **8**, 785–786.
254. Peti, W. & Page, R. (2007). Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expression and Purification* **51**, 1–10.

255. **Pollock, D., Bauer, C. E. & Scolnik, P. a. (1988).** Transcription of the *Rhodobacter capsulatus nifHDK* operon is modulated by the nitrogen source. Construction of plasmid expression vectors based on the *nifHDK* promoter. *Gene* **65**, 269–275.
256. **Pucheu, N. L., Kerber, N. L., Rivas, E. A., Cortez, N. & Garcia, A. F. (1997).** Association of LHII α (B870) Polypeptide with Phospholipids During Insertion in the Photosynthetic Membrane of an LHII – Mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *Current Microbiology* **34**, 155–161.
257. **Purcell, E. B. & Crosson, S. (2008).** Photoregulation in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology* **11**, 168–178.
258. **Ramírez, D. M. & Bentley, W. E. (1999).** Characterization of stress and protein turnover from protein overexpression in fed-batch *E. coli* cultures. *Journal of Biotechnology* **71**, 39–58.
259. **Rasbery, J. M., Shan, H., LeClair, R. J., Norman, M., Matsuda, S. P. T. & Bartel, B. (2007).** *Arabidopsis thaliana* squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 17002–17013.
260. **Reddy, G. S. N. (2004).** Psychrophilic pseudomonads from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 713–719.
261. **Ren, H., Yu, D., Ge, B., Cook, B., Xu, Z. & Zhang, S. (2009).** High-level production, solubilization and purification of synthetic human GPCR chemokine receptors CCR5, CCR3, CXCR4 and CX3CR1. *PloS one* **4**, e4509.
262. **Rengo, G., Lyemperopoulos, A., Zincarelli, C., Femminella, G., Liccardo, D., Pagano, G., de Lucia, C., Cannavo, A., Gargiulo, P. & other authors. (2012).** Blockade of β -adrenoceptors restores the GRK2-mediated adrenal $\alpha(2)$ -adrenoceptor-catecholamine production axis in heart failure. *British Journal of Pharmacology* **166**, 2430–2440.
263. **Robl, I., Grassl, R., Tanner, W. & Opekarová, M. (2000).** Properties of a reconstituted eukaryotic hexose/proton symporter solubilized by structurally related non-ionic detergents: specific requirement of phosphatidylcholine for permease stability. *Biochimica et Biophysica Acta* **1463**, 407–418.
264. **Rocha, E. M. F., Gardiner, R. E., Park, S., Martinez-Rossi, N. M. & Perlin, D. S. (2006).** A Phe389Leu substitution in *ergA* confers terbinafine resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**, 2533–2536.
265. **Romas J. Kazlauskas, U. T. B. (1998).** Biotransformations with Lipases. *Biotechnology*, pp. 37 – 191. Edited by H.-J. Rehm & G. Reed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH.
266. **Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2004).** Overexpression and secretion of biocatalysts. *Enzyme Functionality: Design, Engineering and Screening*. Edited by A. Svendsen.
267. **Roussel, G., Tinti, E., Perpète, E. & Michaux, C. (2013).** Refolding of SDS-denatured proteins using amphipathic cosolvents and osmolytes. *Current Protocols in Protein Science*.
268. **Roy, A., Shukla, A. K., Haase, W. & Michel, H. (2008).** Employing *Rhodobacter sphaeroides* to functionally express and purify human G protein-coupled receptors. *Biological Chemistry* **389**, 69–78.
269. **Ruckenstuhl, C., Poschenel, A., Possert, R., Baral, P. K., Gruber, K. & Turnowsky, F. (2008).** Structure-function correlations of two highly conserved motifs in *Saccharomyces cerevisiae* squalene epoxidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 1496–1499.
270. **Russell, N. J. & Harwood, J. L. (1979).** Changes in the acyl lipid composition of photosynthetic bacteria grown under photosynthetic and non-photosynthetic conditions. *The Biochemical Journal* **181**, 339–345.
271. **De Ruyter, P. G., Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., van Alen-Boerrigter, I. & de Vos, W. M. (1996).** Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* **178**, 3434–3439.
272. **Sabate, R., de Groot, N. S. & Ventura, S. (2010).** Protein folding and aggregation in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **67**, 2695–2715.
273. **Saeedi, P., Moosaabadi, J. M., Sebtahmadi, S. S., Mehrabadi, J. F., Behmanesh, M. & Mekhilef, S. (2012).** Potential applications of bacteriorhodopsin mutants. *Bioengineered* **3**, 326–328.
274. **Saïda, F., Uzan, M., Odaert, B. & Bontems, F. (2006).** Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. *Current Potein & Peptide Science* **7**, 47–56.
275. **Sainz, G., Jakoncic, J., Sieker, L. C., Stojanoff, V., Sanishvili, N., Asso, M., Bertrand, P., Armengaud, J. & Jouanneau, Y. (2006).** Structure of a [2Fe-2S] ferredoxin from *Rhodobacter capsulatus* likely involved in Fe-S cluster biogenesis and conformational changes observed upon reduction. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: a Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **11**, 235–246.
276. **Sambrook, J. & Russell, D. W. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 3*. CSHL Press.

277. **Schenker, R., Schulin, R., Stadelmann, F. X. & Sticher, H. (1997).** *Bodenökologie*, 2nd edn. (U. Gisi, Ed.). Stuttgart New York, NY: Georg Thieme Verlag.
278. **Schlager, B., Straessle, A. & Hafen, E. (2012).** Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression. *BMC Biotechnology* **12**, 95. BMC Biotechnology.
279. **Schlieker, C., Bukau, B. & Mogk, A. (2002).** Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *Journal of Biotechnology* **96**, 13–21.
280. **Schloss, P. D. & Handelsman, J. (2003).** Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 303–310.
281. **Schmeisser, C., Steele, H. & Streit, W. R. (2007).** Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**, 955–962.
282. **Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. & Witholt, B. (2001).** Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**, 258–268.
283. **Schmid, R. D. & Verger, R. (1998).** Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie* **37**, 1608–1633.
284. **Schneider, K., Müller, A., Schramm, U. & Klipp, W. (1991).** Demonstration of a molybdenum- and vanadium-independent nitrogenase in a *nifHDK*-deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **195**, 653–661.
285. **Scholten, D. J., Canals, M., Maussang, D., Roumen, L., Smit, M. J., Wijtmans, M., de Graaf, C., Vischer, H. F. & Leurs, R. (2012).** Pharmacological modulation of chemokine receptor function. *British Journal of Pharmacology* **165**, 1617–1643.
286. **Schrenpf, H. (1991).** Genetic instability in *Streptomyces*. *Genetics and Product Formation in Streptomyces* **21**, 433–444.
287. **Seddon, A. M., Curnow, P. & Booth, P. J. (2004).** Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta* **1666**, 105–117.
288. **Seshadri, K., Garemyr, R. & Wallin, E. (1998).** Architecture of β -barrel membrane proteins: Analysis of trimeric porins. *Protein Science* **7**, 2026–2032.
289. **Sevillano, L., Díaz, M. & Santamaría, R. I. (2013).** Stable expression plasmids for *Streptomyces* based on a toxin-antitoxin system. *Microbial Cell Factories* **12**, 39.
290. **Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W. & other authors. (2011).** Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* **475**, 65–70.
291. **Simon, R., O'Connell, M., Labes, M. & Pühler, A. (1986).** Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods in Enzymology* **118**, 640–659.
292. **Singh, A. K. & Mukhopadhyay, M. (2012).** Overview of fungal lipase: A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **166**, 486–520.
293. **Smart, J. L., Willett, J. W. & Bauer, C. E. (2004).** Regulation of hem gene expression in *Rhodobacter capsulatus* by redox and photosystem regulators RegA, CrtJ, FnrL, and AerR. *Journal of Molecular Biology* **342**, 1171–1186.
294. **De Smet, L., Pettigrew, G. W. & Van Beeumen, J. J. (2001).** Cloning, overproduction and characterization of cytochrome c peroxidase from the purple phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **268**, 6559–6568.
295. **Smith, H. & Birnstiel, M. (1976).** A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Research* **3**, 2387–2398.
296. **Smith, S. M. (2011).** Strategies for the purification of membrane proteins. *Methods in Molecular Biology* **681**, 485–496.
297. **Sodhi, A., Montaner, S. & Gutkind, J. S. (2004).** Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 998–1012.
298. **Solomon, P. S., Shaw, a L., Lane, I., Hanson, G. R., Palmer, T. & McEwan, a G. (1999).** Characterization of a molybdenum cofactor biosynthetic gene cluster in *Rhodobacter capsulatus* which is specific for the biogenesis of dimethylsulfoxide reductase. *Microbiology* **145**, 1421–1429.
299. **Sørensen, H. P. & Mortensen, K. K. (2005).** Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **115**, 113–128.
300. **Straathof, A. J. ., Panke, S. & Schmid, A. (2002).** The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 548–556.
301. **Strandberg, L. & Enfors, S. O. (1991).** Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 1669–1674.

302. **Streit, W. R. & Schmitz, R. A. (2004).** Metagenomics - the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 492–498.
303. **Streit, W. R., Daniel, R. & Jaeger, K.-E. (2004).** Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* **15**, 285–290.
304. **Strickland, D., Moffat, K. & Sosnick, T. R. (2008).** Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10709–10714.
305. **Strnad, H., Lapidus, A., Paces, J., Ulbrich, P., Vlcek, C., Paces, V. & Haselkorn, R. (2010).** Complete genome sequence of the photosynthetic purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus* SB 1003. *Journal of Bacteriology* **192**, 3545–3546.
306. **Studier, F. W. (1991).** Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology* **219**, 37–44.
307. **Studier, F. W. & Moffatt, B. a. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**, 113–130.
308. **Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990).** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology* **185**, 60–89.
309. **Surade, S. & Klein, M. (2006).** Comparative analysis and “expression space” coverage of the production of prokaryotic membrane proteins for structural genomics. *Protein Science* **21**, 2178–2189.
310. **Tabita, R. (1995).** The Biochemistry and Metabolic Regulation of Carbon Metabolism and CO₂ Fixation in Purple Bacteria. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
311. **Tabor, J. J., Levskaya, A. & Voigt, C. A. (2011).** Multichromatic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **405**, 315–324.
312. **Tabor, S. & Richardson, C. (1985).** A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 1074–1078.
313. **Takeda, S., Kadowaki, S., Haga, T., Takaesu, H. & Mitaku, S. (2002).** Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Letters* **520**, 97–101.
314. **Tanaka, K., Yoshida, K., Sasaki, C. & Osano, Y. T. (2002).** Practical asymmetric synthesis of the herbicide (S)-indanofan via lipase-catalyzed kinetic resolution of a diol and stereoselective acid-catalyzed hydrolysis of a chiral epoxide. *The Journal of Organic Chemistry* **67**, 3131–3133.
315. **Terpe, K. (2006).** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 211–222.
316. **Troeschel, S. C., Drepper, T., Leggewie, C., Streit, W. R. & Jaeger, K.-E. (2010).** Novel tools for the functional expression of metagenomic DNA. *Methods in Molecular Biology* **668**, 117–139.
317. **Troeschel, S. C., Thies, S., Link, O., Real, C. I., Knops, K., Wilhelm, S., Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2012).** Novel broad host range shuttle vectors for expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida*. *Journal of Biotechnology* **161**, 71–79.
318. **Tucker, J. D., Siebert, C. A., Escalante, M., Adams, P. G., Olsen, J. D., Otto, C., Stokes, D. L. & Hunter, C. N. (2010).** Membrane invagination in *Rhodobacter sphaeroides* is initiated at curved regions of the cytoplasmic membrane, then forms both budded and fully detached spherical vesicles. *Molecular Microbiology* **76**, 833–847.
319. **Tusnady, G. E. & Simon, I. (2001).** The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**, 849–850.
320. **Ulmschneider, M. B., Sansom, M. S. P. & Di Nola, A. (2005).** Properties of integral membrane protein structures: derivation of an implicit membrane potential. *Proteins* **59**, 252–265.
321. **Urlacher, V. B. & Girhard, M. (2012).** Cytochrome P450 monooxygenases: An update on perspectives for synthetic application. *Trends in Biotechnology* **30**, 26–36.
322. **Valdez-Cruz, N. a, Caspeta, L., Pérez, N. O., Ramírez, O. T. & Trujillo-Roldan, M. a. (2010).** Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microbial Cell Factories* **9**, 18.
323. **Valero, F. (2012).** Heterologous expression systems for lipases: A review. *Methods in Molecular Biology* **861**, 161–178 (G. Sandoval, Ed.). Totowa, NJ: Humana Press.
324. **Vasconcelos, A., Pego, A. P., Henriques, L., Lamghari, M. & Cavaco-Paulo, A. (2010).** Protein matrices for improved wound healing: Elastase inhibition by a synthetic peptide model. *Biomacromolecules* **11**, 2213–2220.

325. **Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 615–619.
326. **Wagner, M., van Wolferen, M., Wagner, A., Lassak, K., Meyer, B. H., Reimann, J. & Albers, S.-V. (2012).** Versatile genetic tool box for the crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius*. *Frontiers in Microbiology* **3**, 214.
327. **Wagner, S. & Klepsch, M. (2008).** Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 14371–14376.
328. **Wagner, S., Bader, M. L., Drew, D. & de Gier, J.-W. (2006).** Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends in Biotechnology* **24**, 364–371.
329. **Wallin, E. & von Heijne, G. (1998).** Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Science: a Publication of the Protein Society* **7**, 1029–1038.
330. **Wallin, E., Tsukihara, T., Yoshikawa, S., von Heijne, G. & Elofsson, A. (1997).** Architecture of helix bundle membrane proteins: an analysis of cytochrome c oxidase from bovine mitochondria. *Protein Science: a Publication of the Protein Society* **6**, 808–815.
331. **Wang, D., Li, Y., Zhang, Y., Liu, Y. & Shi, G. (2012).** High throughput screening (HTS) in identification new ligands and drugable targets of G protein-coupled receptors (GPCRs). *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **15**, 232–241.
332. **Wang, G., Angermüller, S. & Klipp, W. (1993).** Characterization of *Rhodobacter capsulatus* genes encoding a molybdenum transport system and putative molybdenum-pterin-binding proteins. *Journal of Bacteriology* **175**, 3031–3042.
333. **Wang, G. Y., Graziani, E., Waters, B., Pan, W., Li, X., McDermott, J., Meurer, G., Saxena, G., Andersen, R. J. & Davies, J. (2000).** Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. *Organic Letters* **2**, 2401–2404.
334. **Warne, T., Serrano-vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, C., Henderson, R., Leslie, A. G. W. & Tate, C. G. (2010).** Structure of a β 1-adrenergic G protein-coupled receptor. *Nature* **454**, 486–491.
335. **Weaver, P. F., Wall, J. D. & Gest, H. (1975).** Characterization of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Archives of Microbiology* **105**, 207–216.
336. **Weickert, M. & Doherty, D. (1996).** Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 494–499.
337. **Wexler, M., Bond, P. L., Richardson, D. J. & Johnston, A. W. B. (2005).** A wide host-range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase. *Environmental Microbiology* **7**, 1917–1926.
338. **White, J. S. & White, D. C. (1997).** *Source Book of Enzymes*. CRC Press.
339. **Wilhelm, S., Tommassen, J. & Jaeger, K. (1999).** A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **181**, 6977–6986.
340. **Willison, J. C., Pierrard, J. & Hübner, P. (1993).** Sequence and transcript analysis of the nitrogenase structural gene operon (*nifHDK*) of *Rhodobacter capsulatus*: evidence for intramolecular processing of *nifHDK* mRNA. *Gene* **133**, 39–46.
341. **Woronowicz, K., Harrold, J. W., Kay, J. M. & Niederman, R. A. (2013).** Structural and functional proteomics of intracytoplasmic membrane assembly in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **23**, 48–62.
342. **Wu, J. & Bauer, C. (2008).** RegB/RegA, a global redox-responding two-component system. *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*, pp. 131–148.
343. **Yano, J. K., Blasco, F., Li, H., Schmid, R. D., Henne, A. & Poulos, T. L. (2003).** Preliminary characterization and crystal structure of a thermostable cytochrome P450 from *Thermus thermophilus*. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 608–616.
344. **Yin, H. (2008).** Exogenous agents that target transmembrane domains of proteins. *Angewandte Chemie* **47**, 2744–2752.
345. **Yoshizawa, T. (1984).** Photophysiological functions of visual pigments. *Advances in Biophysics* **17**, 5–67.
346. **Young, J. P. W., Crossman, L. C., Johnston, A. W. B., Thomson, N. R., Ghazoui, Z. F., Hull, K. H., Wexler, M., Curson, A. R. J., Todd, J. D. & other authors. (2006).** The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biology* **7**, R34.
347. **Zahn, K. (1996).** Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *Journal of Bacteriology* **178**, 2926–2933.

348. **Zannoni, D. (1995).** Aerobic and anaerobic electron transport chains in anoxygenic phototrophic bacteria. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, pp. 695–724. Edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer. Kluwer Academic Publishers.
349. **Zhang, R. & Xie, X. (2012).** Tools for GPCR drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica* **33**, 372–384.
350. **Zhu, Y. S., Cook, D. N., Leach, F., Armstrong, G. a, Alberti, M. & Hearst, J. E. (1986).** Oxygen-regulated mRNAs for light-harvesting and reaction center complexes and for bacteriochlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* during the shift from anaerobic to aerobic growth. *Journal of Bacteriology* **168**, 1180–1188.
351. **Zweers, J. C., Barák, I., Becher, D., Driessen, A. J., Hecker, M., Kontinen, V. P., Saller, M. J., Vavrová, L. & van Dijk, J. M. (2008).** Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. *Microbial Cell Factories* **7**, 10.

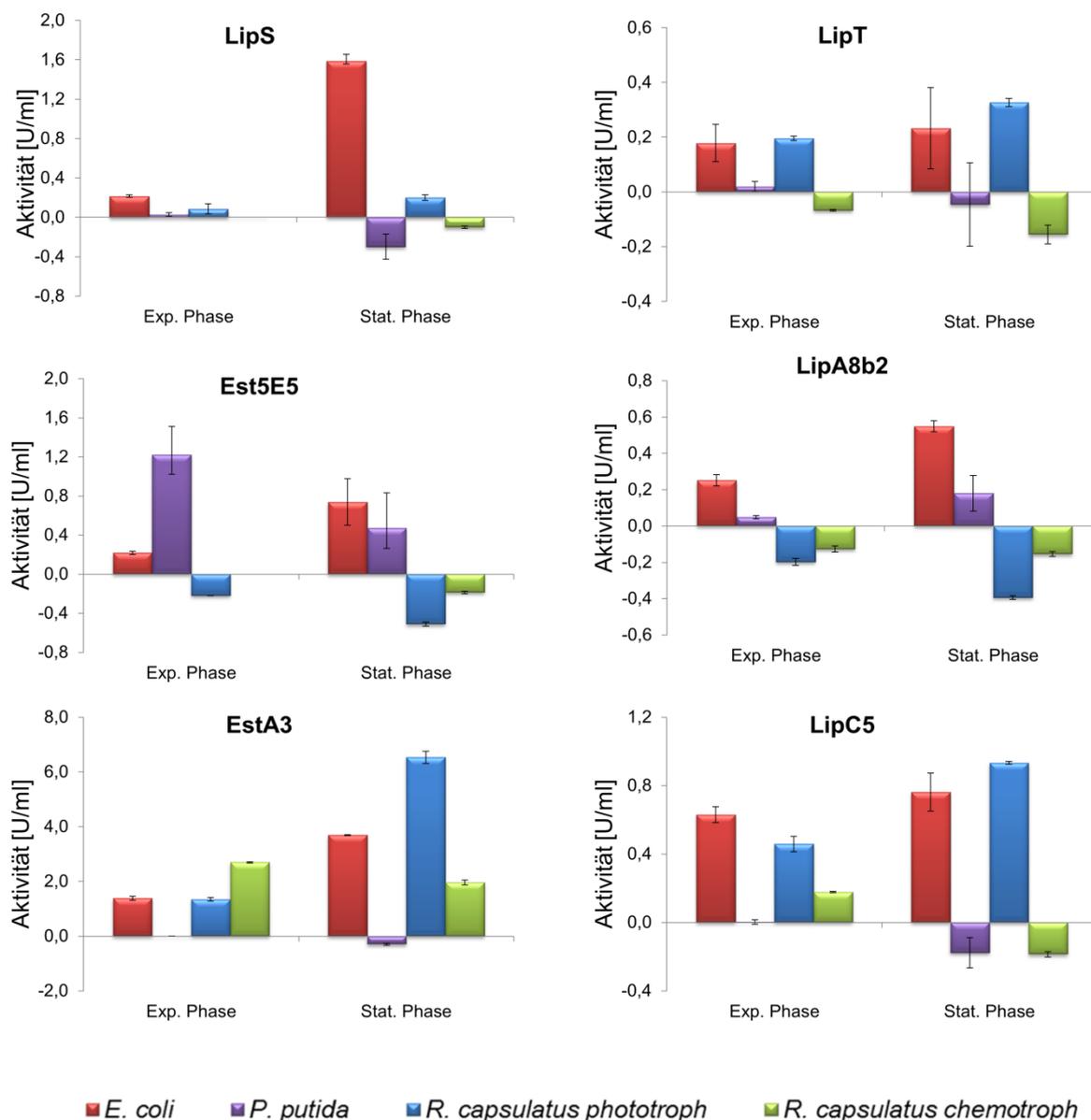


Abb. 34: Nachweis lipolytischer Aktivität in *E. coli* BL21 (DE3), *P. putida* KT2440T7 und *R. capsulatus* B10ST7 unter phototrophen und chemotrophen Bedingungen mittels des Substrat *pNPC* bei einer Reaktionstemperatur von 70 °C

Dargestellt sind die vergleichenden Enzymaktivitäten der Hydrolasen LipS, LipT, Est5E5, LipA8b2, EstA3 und LipC5, die im Vektor *pRhotHi-2* in den verschiedenen Expressionswirten *E. coli*, *R. capsulatus* und *P. putida* synthetisiert wurden. Die Durchführung des photometrischen *pNPC*-Aktivitätstests erfolgte bei einer Reaktionstemperatur von 70 °C. Die Aktivitäten wurden auf gleiche Zellzahlen von *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus* normiert. Der entsprechende Wert des Leervektors wurde bereits von den dargestellten Werten abgezogen. Exponentielle und stationäre Wachstumsphasen sind als „Exp.“ und „Stat.“ abgekürzt. Die Analyse der Substartumsetzung erfolgte mit Proben, die aus der exponentiellen und stationären Phase der Kulturen entnommen wurden (Genauere Angaben zu der Probenentnahme sind dem Material und Methodenteil II.2.2.2.1, II.2.2.2.2, II.2.2.3, II.2.2.4 zu entnehmen).

Lebenslauf

Anuschka Malach

Geboren: 14.11.1985

Schulische Ausbildung

1992 – 1996 Don-Bosco-Grundschule in Düsseldorf

1996 – 2005 Cecilien-Gymnasium in Düsseldorf
Abschluss: Abitur

Studium

Okt. 2005 – Nov. 2009 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf

Studienschwerpunkt: Pflanzenphysiologie
Biochemie

Abschluss: Diplom

Thema der Diplomarbeit:

„Expression, Reinigung und molekulare Charakterisierung des putativen Membranproteins Reversion-to-Ethylene-Sensitivity1 (RTE1) aus *Arabidopsis thaliana*“

Berufliche Erfahrungen

Jan. 2010 – Juni 2010 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung für Biochemische Pflanzenphysiologie an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Promotionsstudium

seit Juli 2010 Promotionsstudium am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich

Thema der Dissertation:

„*Rhodobacter capsulatus* als Wirtsstamm zum aktivitätsbasierten Screening von Enzymen und zur Synthese von Membranproteinen“

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 13. September 2013

Anuschka Malach