

**Charakterisierung thermophiler
Cellulasen aus *Sulfolobus solfataricus*
und *Thermotoga maritima***

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
- Doktor der Naturwissenschaften -
der Fakultät für Biologie, Chemie
und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin

Kristina Kufner

Bayreuth 2010

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2007 bis September 2010 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth bzw. an der Fachhochschule Nordwestschweiz unter Anleitung von Prof. Dr. Georg Lipps angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Promotionsgesuch eingereicht am: 15.12.2010

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 08.03.2011

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Georg Lipps	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Franz Xaver Schmid	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Karlheinz Seifert	(Vorsitzender)
Prof. Dr. Wolfgang Schumann	

1. Einleitung	1
1.1. Cellulasen.....	1
1.1.1. Cellulose	1
1.1.2. Klassifizierung von Cellulasen.....	2
1.1.3. Wirkungsweise von Cellulasen.....	3
1.1.4. Verwendung von Cellulasen	4
1.1.5. Die Cellulase SSO1949 aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	5
1.2. Rückfaltung von Proteinen	6
1.3. Archaea und ihre Ähnlichkeit zu Eukaryoten	8
1.4. Die Gattung <i>Sulfolobus</i>.....	10
1.5. Proteinexpression in <i>Sulfolobus</i>	12
1.5.1. <i>Sulfolobus</i> - <i>E. coli</i> -Shuttle-Vektor	12
1.5.2. Homologe Rekombination	15
1.6. Problemstellung	17
2. Materialien und Methoden	19
2.1. Materialien	19
2.1.1. Nährmedien.....	24
2.1.1.1. Bakteriennährmedien.....	24
2.1.1.2. XT (Xylose, Trypton)- bzw. ST (Saccharose, Trypton)-Flüssigmedium... 24	
2.1.1.3. NZ,X,D (NZ-Amin, Xylose, Dextrin)-Platten bzw. NZ,S (NZ-Amin, Saccharose)-Platten (festes Nährmedium)	24
2.1.1.4. <i>Sulfolobus</i> -Glycerin-Medium	26
2.1.1.5. <i>Sulfolobus</i> -Fermenter-Medium	26
2.1.2. Oligodesoxynukleotide	26
2.2. Methoden	30
2.2.1. Elektrophoretische Methoden	30
2.2.1.1. Agarose-Gelelektrophorese.....	31
2.2.1.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schaeffer und von Jagow (SDS-PAGE).....	31
2.2.2. Detektion von Nukleinsäuren und Proteinen in Gelen.....	32
2.2.2.1. Detektion von DNA mittels Ethidiumbromid.....	32
2.2.2.2. Coomassie-Färbung	32
2.2.2.3. Westernblot	32
Transfer mittels <i>semi-dry blotting</i>	32
Antikörperreaktion	33
2.2.2.4. Silberfärbung	33
2.2.3. Isolierung und Reinigung von DNA.....	33
2.2.3.1. Phenol/Chloroform-Präparation von Plasmid-DNA	33
2.2.3.2. Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA mit Kit.....	34

2.2.3.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und PCR-Ansätzen.	34
2.2.3.4. Bestimmung der Konzentration von DNA	34
2.2.4. Klonierung	34
2.2.4.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
2.2.4.1.1. PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	34
2.2.4.1.2. Quikchange-Mutagenese	35
2.2.4.2. Spaltung mit Restriktionsenzymen.....	35
2.2.4.3. Enzymatische Dephosphorylierung.....	36
2.2.4.4. Ligation.....	36
2.2.4.5. Verwendung von Klonierungsvektoren.....	36
2.2.5. Transformation von <i>E. coli</i>	37
2.2.5.1. Herstellung RbCl-kompetenter <i>E. coli</i> – Zellen.....	37
2.2.5.2. Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	37
2.2.5.3. Hitzeschocktransformation.....	37
2.2.6. Expression und Aufreinigung von Proteinen.....	38
2.2.6.1. Test auf Überexpression	39
2.2.6.2. Lokalisation des überexprimierten Proteins	40
2.2.6.3. Fermentation und Aufschluss der Zellen	41
2.2.6.4. Aufreinigung von löslichem Protein	42
2.2.6.4.1. ÄKTA-gestützte Anionenaustauscherchromatographie	42
2.2.6.4.2. ÄKTA-gestützte Hydrophobe Interaktionschromatographie	42
2.2.6.4.3. Dialyse der Proteine.....	42
2.2.6.4.4. Proteinkonzentrationsbestimmung.....	43
2.2.6.5. Aufreinigung von unlöslichem Protein aus "Inclusion Bodies".....	43
2.2.6.5.1. Aufreinigung von SSO1949.....	43
2.2.6.5.2. Aufreinigung des Hybridproteins CelA_SSO1949_CelA.....	45
2.2.7. Untersuchung der Cellulaseaktivität	46
2.2.7.1. Qualitative Aktivitätsbestimmung durch Carboxymethylcellulose (CMC)- Platten-Test	46
2.2.7.2. Qualitative Aktivitätsbestimmung durch Aktivitätsgel	47
2.2.7.3. Quantitative Bestimmung der Cellulaseaktivität mit Fluoreszenzsubstrat	48
2.2.7.4. Quantitative Bestimmung der Cellulaseaktivität durch p-Nitrophenyl-β-D- cellobiosid	48
2.2.7.5. Bestimmung von v_{max} , K_M und k_{cat}	49
2.2.8. Arbeiten mit <i>Sulfolobus</i>	49
2.2.8.1. Präparation elektrokompetenter Zellen.....	49
2.2.8.1.1. Präparation elektrokompetenter <i>E. coli</i> ER1821	49
2.2.8.1.2. Präparation elektrokompetenter <i>Sulfolobus</i> -Zellen	50
2.2.8.2. Elektroporation	50

2.2.8.2.1. Elektroporation zur Methylierung von Plasmiden.....	50
2.2.8.2.2. Elektroporation von <i>Sulfolobus</i>	51
2.2.8.3. Präparation von Glycerinlagerkulturen.....	51
2.2.8.4. Isolierung genomischer DNA aus <i>Sulfolobus</i>	51
2.2.8.5. Retransformation der aus <i>S.a.</i> MR31 präparierten DNA in <i>E. coli</i> XL1 Blue.....	52
2.2.8.6. Integration von SSO1949 ins Genom von <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> MR31.....	52
2.2.8.7. Test auf Cellulaseproduktion in <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> MR31.....	52
2.2.8.8. Large-Scale-Kultivierung von <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> MR31.....	53
2.2.8.9. Aufreinigung von SSO1949 aus <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> MR31.....	53
2.2.8.9.1. Aufreinigung von SSO1949 aus der Membran von <i>Sulfolobus</i> <i>acidocaldarius</i> MR31.....	53
2.2.8.9.2. Aufreinigung von SSO1949 aus dem Überstand einer <i>Sulfolobus</i> <i>acidocaldarius</i> -Kultur.....	54
3. Ergebnisse und Diskussion.....	56
3.1. Expression von SSO1949 in <i>E. coli</i>.....	56
3.1.1. Reinigung und Löslichkeit von SSO1949.....	56
3.1.2. Rückfaltung von SSO1949.....	57
3.1.3. Aufkonzentrierung des rückgefalteten Proteins.....	59
3.1.4. Enzymatische Charakterisierung von SSO1949.....	60
3.2. Semi-quantitativer Vergleich der Aktivität verschiedener Punktmutanten von SSO1949.....	63
3.3. Erhöhung der Löslichkeit von SSO1949 bei rekombinanter Expression in <i>E. coli</i>.....	66
3.3.1. Erhöhung der Löslichkeit von SSO1949 durch Fusion mit Thioredoxin (Trx)- Tag.....	68
3.3.2. Verkürzung des hydrophoben Loops von SSO1949 und Entfernen von sechs Aminosäuren am C-Terminus.....	69
3.4. Expression von SSO1949 in <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> MR31.....	72
3.4.1. Aufreinigung von SSO1949 aus der Membranfraktion.....	76
3.4.1.1. Aufschluss von <i>S. acidocaldarius</i> MR31 und Präparation der Membran...76	
3.4.1.2. Aufreinigung von SSO1949 über Con A-Sepharose.....	77
3.4.1.3. Kombination von Coomassie- und Aktivitätsfärbung im SDS-Gel.....	78
3.4.2. Aufreinigung von SSO1949 aus dem Überstand einer <i>S. acidocaldarius</i> -Kultur	79
3.4.2.1. Aufreinigungsstrategie 1 (Kombination von Affinitäts- und Anionenaustauschchromatographie).....	80

3.4.2.2. Aufreinigungsstrategie 2 (Kombination von Hydrophober Interaktionschromatographie und Anionenaustauschchromatographie).....	80
3.4.3. Vergleich von SSO1949 aus Membran und Überstand.....	83
3.5. Übertragung der Mutationsstudien von SSO1949 auf das hyperthermophile Enzym CelA aus <i>Thermotoga maritima</i>	85
3.5.1. Aufreinigung von CelA aus <i>E. coli</i>	86
3.5.2. Enzymatische Charakterisierung von CelA und seiner Punktmutanten mit dem Substrat p-Nitrophenyl- β -D-cellobiosid	88
3.5.3. Enzymatische Charakterisierung von CelA mit dem FRET-Substrat.....	92
3.5.4. Expression und Aufreinigung von EglA aus <i>Pyrococcus furiosus</i>	96
3.6. Konstruktion von Hybridproteinen aus SSO1949 und CelA	97
3.6.1. Überexpression, Löslichkeit und Aktivität der Hybridproteine CelA_SSO1949_CelA und SSO1949_CelA_SSO1949	98
3.6.2. Aufreinigung und Rückfaltung von CelA_SSO1949_CelA	99
3.6.3. Enzymatische Charakterisierung von CelA_SSO1949_CelA.....	100
4. Zusammenfassende Diskussion	104
4.1. Aufreinigung und Charakterisierung von SSO1949.....	104
4.1.1. Expression von SSO1949 in <i>E. coli</i>	104
4.1.1.1. Aufreinigung von SSO1949	104
4.1.1.2. Enzymatische Charakterisierung von SSO1949.....	105
4.1.1.3. Verbesserung der Löslichkeit von SSO1949	106
4.1.1.4. Untersuchung der Punktmutanten von SSO1949	108
4.1.2. Expression von SSO1949 in <i>S. acidocaldarius</i> MR31	109
4.2. Aufreinigung und Charakterisierung von CelA und EglA	111
4.3. Generierung eines Hybridproteins aus SSO1949 und CelA	113
5. Zusammenfassung.....	115
6. Summary	118
7. Abkürzungsverzeichnis.....	120
8. Literaturverzeichnis.....	123

1. Einleitung

1.1. Cellulasen

1.1.1. Cellulose

Cellulose ist das häufigste Biopolymer der Erde und Hauptbestandteil von Pflanzenzellwänden. Insgesamt macht Cellulose 35 bis 50 % des Trockengewichtes von Pflanzen aus (Lynd *et al.*, 2002). Sie stellt daher auch einen wichtigen Stabilisator pflanzlicher Zellwände dar, da sie als eine der Barrieren für den Eintritt von Pathogenen angesehen werden kann. Cellulose besteht aus β -1,4-glykosidisch, linear verknüpften Glukosemolekülen (Abbildung 1-1). Cellulosemoleküle bestehen meist aus mehreren Tausend Einheiten und können sich über Wasserstoffbrückenbindungen und Van der Waals-Bindungen zu größeren kristallinen Strukturen aneinander lagern. Cellulose ist wasserunlöslich und kann nur von wenigen Mikroorganismen langsam abgebaut werden (Bayer *et al.*, 1998).

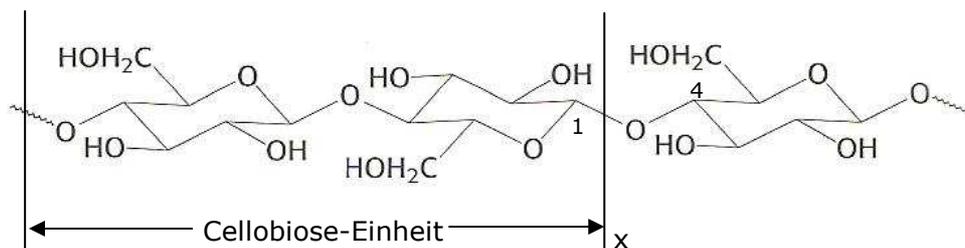


Abbildung 1-1: Cellulosemolekül mit der sich wiederholenden Einheit Cellobiose. Die Glukosemoleküle sind um 180° gegeneinander gedreht und β -1,4-glykosidisch verknüpft. Der Polymerisationsgrad der Cellulose beträgt meist mehrere Tausend Glukosemoleküle (entnommen aus L. Stryer, Biochemie-Lehrbuch, 5. Auflage).

Verschiedene Mikroorganismen arbeiten im Ökosystem zusammen, um unlösliches Cellulosesubstrat in lösliche Zucker wie Cellobiose und Glukose zu überführen, die in die Zelle aufgenommen werden. Dazu produzieren diese Mikroorganismen spezielle Glykosidhydrolasen, die sog. Cellulasen (Bayer *et al.*, 1998). Cellulasen katalysieren die Spaltung der β -1,4-glykosidischen Bindung in der Cellulose. Sie liegen dabei einzeln oder in einem spezialisierten Multienzymkomplex, dem Cellulosom, vor (Bayer *et al.*, 1998).

1.1.2. Klassifizierung von Cellulasen

Cellulasen können aufgrund ihrer Wirkungsweise und Substratspezifität in Exoglukanasen (EC 3.2.1.91), Endoglukanasen (EC 3.2.1.4) und β -Glukosidasen (EC 3.2.1.21) eingeteilt werden (Henrissat *et al.*, 1997). Exoglukanasen bauen die Cellulose vom Strangende her ab, während Endoglukanasen die β -1,4-glykosidische Bindungen an beliebigen Stellen innerhalb der Glukosestränge spalten. Kurzkettige Oligosaccharide wie Cellobiose werden schliesslich durch β -Glukosidasen zu Glukose abgebaut (Wood *et al.*, 1990).

Da angenommen wird, dass Proteine mit ähnlichen Sequenzen auch ähnliche Strukturen und Wirkmechanismen aufweisen, können Cellulasen auch anhand ihrer Aminosäuresequenz klassifiziert (Henrissat *et al.*, 1997) und in verschiedene Glykosidhydrolase-Familien eingeordnet werden (Henrissat, 1991; Henrissat & Davis, 2000). Die aktuelle Liste der GH-Familien und ihrer Mitglieder kann der CAZy-Datenbank im Internet entnommen werden (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>). Cellulasen verteilen sich über insgesamt 14 GH-Familien (Familien 5-10, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 61 und 74). Die Mitglieder einer Familie zeichnen sich durch eine ähnliche 3D-Struktur und den gleichen Reaktionsmechanismus aus (Henrissat & Davies, 2000). Aufgrund ähnlicher Tertiärstruktur, konservierter katalytischer Reste und gleicher Reaktionsmechanismen lassen sich einige Glykosidhydrolasefamilien in 14 Clans (A bis N) einteilen. Cellulasen sind in Clan A (GH 5, 10, 26 und 51), Clan B (GH 7), Clan C (GH 12) und Clan M (GH 8 und 48) zu finden (Henrissat & Bairoch, 1996; http://www.cazy.org/CAZY/fam/acc_GH.html).

Cellulasen können auch modular aufgebaut sein und besitzen zusätzlich zur katalytischen Domäne eine Cellulosebindungsdomäne (CBD), wodurch kristalline Cellulose besser gebunden und abgebaut werden kann (Linder & Teeri, 1997; Boraston *et al.*, 2004) und welche den Kohlenhydrate-bindenden Modulen (CBM) zugeordnet wird (Bourne *et al.*, 2001). Cellulosebindungsdomänen können im Protein sowohl N- als auch C-Terminal vorkommen und sind über einen Linker mit der katalytischen Domäne verbunden (Ohmiya *et al.*, 1997). CBMs werden in über 60 Familien eingeordnet (CAZy-Datenbank). CBMs aus Pilzen finden sich ausschließlich in der Familie I, die anderen Familien enthalten überwiegend bakterielle CBMs (Linder & Teeri, 1997). CBMs erhöhen die Substratzugänglichkeit und somit die Aktivität hydrolytischer Enzyme (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Kürzlich wurden Chitin abbauende Enzyme aus *Serratia marcescens* und *Thermobifida fusca* entdeckt, welche der CBM-Familie 33 zugeordnet werden können. Diese Proteine katalysieren die Spaltung von glykosidischen Bindungen in kristallinem Chitin und machen das sonst schwer zugängliche Polysaccharid zugänglich für normale Glykosidhydrolasen (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010).

1.1.3. Wirkungsweise von Cellulasen

Bei der Spaltung von Oligo- und Polysacchariden durch Glykosidhydrolasen sind zwei Mechanismen zu unterscheiden (McCarter *et al.*, 1994). Cellulasen hydrolysieren die glykosidischen Bindungen in der Cellulose entweder unter Beibehaltung („retaining“) oder Inversion („invertin“) der Konfiguration des anomeren Zentrums. Im aktiven Zentrum der Enzyme befinden sich zwei katalytisch aktive Carboxylgruppen. Dabei handelt es sich um Aspartat- oder Glutamatreste (Henrissat *et al.*, 1997).

Invertierende Cellulasen spalten die Bindungen in einem sogenannten „single displacement“ Mechanismus. Ein nukleophiler Angriff eines Wassermoleküls am anomeren Zentrum führt zur Spaltung der Bindung (Abbildung 1-2 a) (McCarter *et al.*, 1994). Dieser nukleophile Angriff wird durch die Deprotonierung des Wassermoleküls (Basenkatalyse) sowie einer Protonierung (Säurekatalyse) der abgehenden Gruppe unterstützt. Cellulasen mit diesem Reaktionsmechanismus finden sich in den GH-Familien 6, 8, 9, 44, 45, 48 und 74 (Bayer *et al.*, 1998; CAZy-Datenbank).

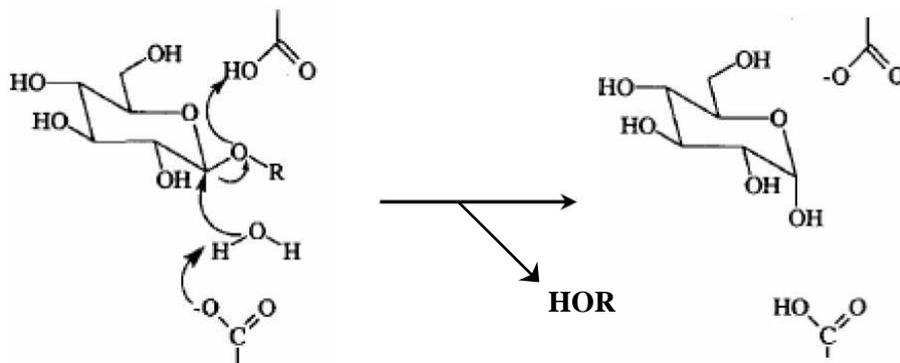


Abbildung 1-2 a: Mechanismus der Substrathydrolyse unter Inversion der Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom des Substrats (McCarter *et al.*, 1994)

Wird die Konfiguration des anomeren Zentrums nicht geändert („retaining“), so spalten die Cellulasen die glykosidischen Bindungen nach einem als „double displacement“ bezeichneten Mechanismus (Abbildung 1-2 b). Hierbei bildet sich ein kovalentes Enzym-Substrat-Intermediat. Eine als Säure fungierende katalytische Aminosäure protoniert die abgehende Gruppe und wird dabei von einer zweiten, als Nukleophil wirkenden katalytischen Aminosäure unterstützt. Es bildet sich ein Enzym-Substrat-Zwischenprodukt über ein Oxocarbeniumion. Der im ersten Schritt als Säure fungierende katalytische Rest wirkt nun als Base und deprotoniert ein Wassermolekül, welches das C1-Atom nukleophil angreift. Im Anschluss wird das kovalente Enzym-Substrat-Zwischenprodukt über die erneute Bildung eines Oxocarbeniumions aufgelöst. Cellulasen mit diesem Reaktionsmechanismus finden sich in den GH-Familien 5, 7, 10, 12, 26 und 51 (Bayer *et al.*, 1998).

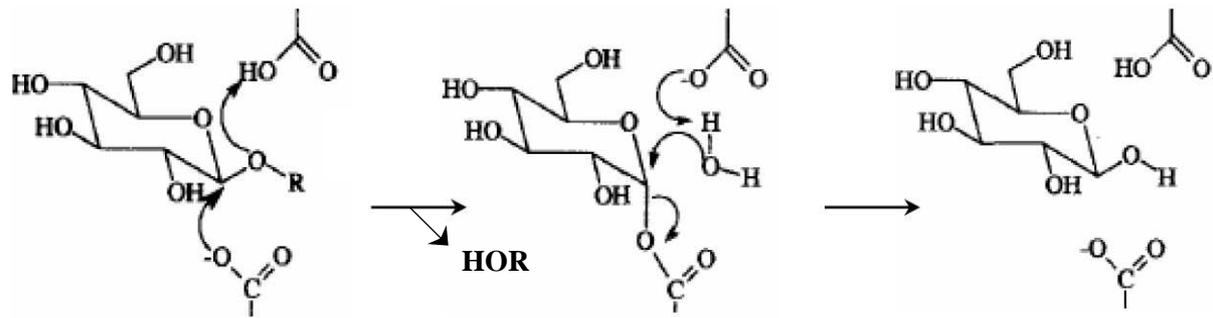


Abbildung 1-2 b: Mechanismus der Substrathydrolyse unter Retention der Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom des Substrats (McCarter *et al.*, 1994).

1.1.4. Verwendung von Cellulasen

Cellulasen sind vielfältig anwendbar und finden vor allem Verwendung in der Wein-, Textil-, Waschmittel-, Papier- (Levy, 2002), Nahrungsmittel- und Futtermittelindustrie sowie auch bei der Beseitigung von Altpapier. Die Zugabe einer Enzymmischung aus Cellulasen, Hemicellulasen und Pektinasen vor dem Pressen der Trauben kann positive Effekte auf das Aroma und die Farbextraktion von roten Trauben haben. Auch bei der Olivenölproduktion kann diese Enzymmischung zur optimalen Fruchtaufquellung eingesetzt werden (Galante *et al.*, 1998b). Auch für die Altpapierprozessierung sind Cellulasen von Nutzen. Nur die Hälfte des Altpapiermülls wird tatsächlich recycelt. Bei dem Recyclingsprozess werden verschiedene Reagenzien zugegeben und bei den folgenden Wasch-, Aufschwemm- und Bleichvorgängen wird Wasserstoffperoxid verwendet, um Tinte aus dem Altpapier zu entfernen. Ein umweltfreundlicheres Verfahren wäre, an dieser Stelle Cellulasen einzusetzen, um Cellulosefasern mit Farbresten zu entfernen. Dadurch würde sich die Giftigkeit von Abwässern enorm verringern (Tombs & Harding, 1998).

Die Nachfrage nach stabileren sowie hochaktiven und spezifischen Enzymen steigt ständig (Bhat, 2000). Cellulose ist ein massenhaft verfügbarer, nachwachsender Rohstoff und stellt ein ideales Ausgangsprodukt für die Herstellung von Ethanol dar, das als Kraftstoffalternative zu den fossilen Brennstoffen eingesetzt werden könnte. Cellulasen bauen Cellulose zu Glukose ab, welche im Anschluss durch Hefen zu Ethanol fermentiert wird. Da die dafür benötigten Enzyme teuer sind, ist dieses Verfahren im Moment jedoch noch nicht wirtschaftlich. Ethanol stellt eine wichtige erneuerbare Energiequelle dar. Ethanol wurde bisher bevorzugt aus Stärke gewonnen, deren Verfügbarkeit in naher Zukunft jedoch limitiert sein wird. Die Nahrungsmittel-, Futter- und Energiemärkte sind unmittelbar miteinander verbunden und mit dem Energiepreis gekoppelt. Je teurer das Erdöl wird, desto attraktiver wird es die Agrarrohstoffe in Energieträger umzuwandeln, anstatt sie für die Lebensmittelindustrie bereitzustellen. Da eine Erhöhung des Ölpreises

zu erwarten ist, wird der Anbau von Energiepflanzen spürbar in Konkurrenz zur Lebens- und Futtermittelproduktion treten.

Aufgrund dessen muss dazu übergegangen werden, Ethanol aus Biomasse zu gewinnen (Gray, 2006). Es müssen Verfahren entwickelt werden, Biomasse möglichst kostengünstig in Rohstoffe und Chemikalien zu überführen, da diese relativ resistent gegen enzymatischen Abbau ist. Die Zahl der kommerziell erhältlichen Cellulasen ist sehr begrenzt und in der Regel handelt es sich um Enzyme des mesophilen Pilzes *Trichoderma reesei*. Um die Polysaccharide für den enzymatischen Abbau zugänglich zu machen, wird die Biomasse mit hoher Temperatur und starken Säuren vorbehandelt (Gray, 2006). Dazu werden extrem thermoacidophile Enzyme benötigt. Die Cellulase aus SSO1949 aus *Sulfolobus solfataricus* stellt beispielsweise ein solches Enzym dar.

1.1.5. Die Cellulase SSO1949 aus *Sulfolobus solfataricus*

Der Crenarchaeot *Sulfolobus solfataricus* P2 lebt in vulkanischen schwefelhaltigen Quellen bei einem pH-Optimum zwischen 2 und 4 und einer Temperatur von ca. 80°C. Die Gene *sso1354*, *sso1949*, *sso2534* im Genom von *S. solfataricus* codieren für 3 potentielle extrazelluläre Endo-β-Glucanasen (Abbildung 1-3) (She *et al.*, 2001).

	1						60
SSO1354	M--NKLYIVL	-PVIVIIAIG	VMGGIIYLHQ	QSLSVKP--V	TTTEFSTTTS	TSTTTNAITT	
SSO1949	MIMNKLYIII	VPIIIVIIVVG	VIGGAIYLHH	QSPNVKTSSI	TVTTNETTTL	MSITTNIVPT	
SSO2534	M--NKLIPIF	--VVVIIIVLG	II-----	-----V	SIEFGKFHQN	ASLTRSTERF	
	61						120
SSO1354	TVTQTVTSIT	SYNQLIYVTS	SASSPTPVYL	NNSTIPSFYL	EVNMWNAKNY	NGNYTMVFNP	
SSO1949	TVTPTTSSIP	---QLIYVTS	SASSPTPVYL	NNSTVPSFYL	EVNMWNAKTW	NGNYTMVFNP	
SSO2534	TLFPAHNRPF	---SVLGNYS	SNSADALAIL	NSSTNATLMV	SPFLWNIGYA	LGNVNMТИN-	
	121						180
SSO1354	LARTLSVSFN	LTQVKPLEWT	--NGYPEIYV	GRKPW-----	-DTAYAGNIF	PMRIGNMTPF	
SSO1949	LTRTLVSFN	LTQVNPLQWT	--NGYPEIYV	GRKPW-----	-DTSYAGNIF	PMRIGNMTPF	
SSO2534	-INYLHVAIN	LSQISKISSN	VVDGYPGLMY	GQELWPFMY	RTTQLQFLSL	PMIVLRLPNF	
	181						240
SSO1354	MVSFYINLTK	LDPSINFDAIA	SDAWIVRPQI	AFSPGTAPGN	GDIEIMVWLF	-SQNLQ--PA	
SSO1949	MVSFYINLTK	LDPSINFDAIA	SDAWIVRPQI	AFSPGTAPGN	GDIEIMVWLF	-SQNLQ--PA	
SSO2534	YSILNYSVYL	INGSID-DFS	YDIWLSQNP	I----TSLQY	GDFEIMIWMY	WENLSHTPY	
	241						300
SSO1354	GEQVGKVVVP	IYINHTLVNA	TFQVWEM-KS	VPWGGWEYIA	FRPD-----	GWKVTNGYVS	
SSO1949	GQQVGEVVIP	IYINHTLVNA	TFQVWKM-KN	VPWGGWEYIA	FRPD-----	GWKVTNGYVA	
SSO2534	FIYVGNMSIP	TLINGKIENL	SWEVYVLPRT	GSANGWTGVY	FLSPLKEPKA	EFGVPIGYIL	
	301						356
SSO1354	YEPNLFIKAL	SNFTSYNITN	YYLTDWEFGT	EWGTMTSNGT	AYFSWTVSNF	SETLL	
SSO1949	YEPNLFIKAL	NNFASYNITN	YYLTDWEFGT	EWGTMTSNGT	AYFSWTVSNF	YETLL	
SSO2534	KNMGSYIEK-	AGVNIYVNT	YYLDAIQVGM	EFSD--NQGT	AIMGYLLYSW	QIWLLS	

Abbildung 1-3: Alignment der drei Endo-Glucanasen SSO1949, SSO1354 und SSO2534 aus *Sulfolobus solfataricus* P2. Hochkonservierte Regionen sind rot, wenig konservierte Regionen sind blau gekennzeichnet. SSO1949 zeigt 85% Sequenzidentität zu SSO1354 (Girfoglio, 2009).

SSO1949 besteht aus 334 AS, wurde im Jahr 2005 biochemisch charakterisiert und weist ein pH-Optimum von ca. 1.8 und ein Temperaturoptimum von ca. 80°C auf. SSO1949 zählt zur Glykosidhydrolasefamilie 12 (Huang *et al.*, 2005; Franke, 2004) und zeigt die höchste Sequenzähnlichkeit mit EglA aus *Pyrococcus furiosus*. Das bevorzugte Substrat von SSO1949 sind längere Cello-Oligomere, welche zu Cellobiose und Cellotriose abgebaut werden. Das Enzym besitzt keine Cellulosebindende Domäne und kann vermutlich deshalb kristalline Cellulose nicht abbauen (Huang *et al.*, 2005). Die Aminosäuren 1-24 umfassen das Signalpeptid, darauf folgt eine serin- und threoninreiche Region (AS 25-85), die keine Sequenzähnlichkeit zu anderen Proteinen aufweist (Huang *et al.*, 2005). Der exakte Übergang zwischen Ser/Thr-reicher Region und der katalytischen Domäne konnte noch nicht geklärt werden. Die katalytische Region weist Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz mit Cel12A, einer thermostabilen Cellulase aus *Rhodothermus marinus*, mit CelB2 aus *Streptomyces lividans* und Cel12A aus *Trichoderma reesei* auf (Huang *et al.*, 2005). Die Halbwertszeit des Enzyms beträgt ca. 8 h bei 80°C und pH 1.8. Die Cellulase SSO2534 wurde bereits 2001 charakterisiert und weist ein Temperaturoptimum von ca. 65°C und ein pH-Optimum bei ca. 5.8 auf (Limauro *et al.*, 2001). Auch SSO1354 wurde bereits näher untersucht und scheint zusammen mit einer thermostabilen Xylanase exprimiert zu werden (Maurelli *et al.*, 2008).

1.2. Rückfaltung von Proteinen

Bakterielle Expressionssysteme, wie beispielsweise *E. coli* eignen sich für die Expression von grösseren Mengen an Protein (Swietnicki, 2006). Aufgrund von Fehlfaltungen präzipitiert das rekombinante Protein häufig während der Expression und wird in Form von Einschlusskörperchen („Inclusion Bodies“) unlöslich überexprimiert. Durch Senkung der Expressionstemperatur oder durch Koexpression des gewünschten Proteins mit Chaperonen kann diese Aggregation in manchen Fällen verhindert und der lösliche Anteil des Proteins erhöht werden (Thomas *et al.*, 1997; Buchner, J., 2002; Nishihara *et al.*, 1998; Nishihara *et al.*, 2000). Führen diese Methoden nicht zum gewünschten Erfolg muss das Protein denaturierend aufgereinigt und durch Rückfaltung *in vitro* wieder in seine aktive Form überführt werden (Abbildung 1-4). Bei der Rückfaltung von Proteinen handelt es sich um eine Reaktion erster Ordnung, die mit der Fehlfaltung und Aggregation (Reaktion zweiter oder höherer Ordnung) der Proteine aufgrund von hydrophoben oder ionischen Wechselwirkungen konkurriert. Bei hoher Proteinkonzentration dominiert somit die Aggregation von Proteinen über deren Rückfaltung (Tsumoto *et al.*, 2003).

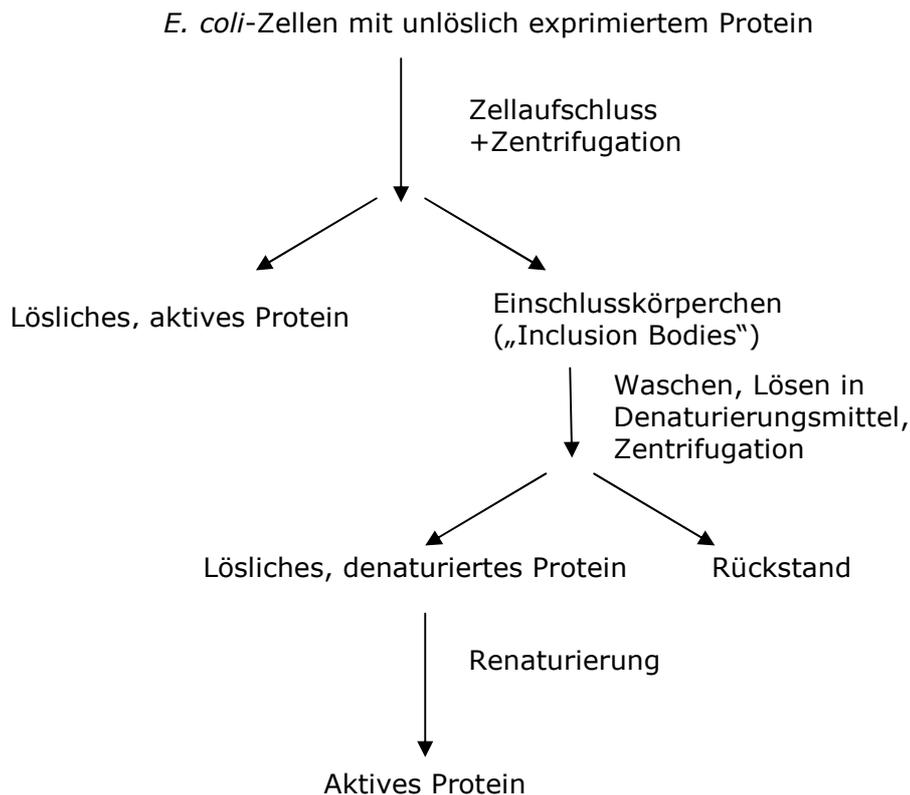


Abbildung 1-4: Der Weg vom aggregierten zum aktiven Protein (angelehnt an De Bernadez Clark, 2001)

„Inclusion Bodies“ sind dicht gepackte Proteinaggregate und kommen bei Überexpression in *E. coli* sowohl im Cytoplasma als auch im Periplasmatischen Raum vor (De Bernadez Clark, 2001). Durch mechanische, chemische oder enzymatische Methoden werden die Zellen homogenisiert und durch anschließende Zentrifugation die „Inclusion Bodies“ von löslichen Proteinen getrennt. Im Anschluss folgen Waschschrte mit niedrig konzentrierten Denaturierungsmitteln oder mit Detergenzien, um Membranbestandteile und Kontaminationen zu entfernen (De Bernadez Clark, 2001). Durch Denaturierungsmittel wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid wird das aggregierte Protein im Anschluss gelöst (Rudolph *et al.*, 1996). Guanidiniumchlorid hat im Gegensatz zu Harnstoff den Vorteil, dass seine Abbauprodukte vor allem bei alkalischem pH nicht wie die des Harnstoffs zur Modifikation von Aminogruppen des Proteins führen können (Rudolph *et al.*, 1996). Bei der Reinigung von Proteinen, die Cysteinreste enthalten, sollten dem Denaturierungsmittel Reduktionsmittel wie beispielsweise β -Mercaptoethanol zugesetzt werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, denaturierte Proteine durch Rückfaltung in ihre aktive Form zu überführen. Neben der Rückfaltung durch Verdünnen, welches die

schnellste und einfachste Methode darstellt, kann dies auch durch Dialyse oder Chromatographie erfolgen.

Um schnell in Form eines Hochdurchsatzscreenings den geeigneten Rückfaltungspuffer zu ermitteln, wurden von Vincentelli *et al.* 96 Rückfaltungspuffer entwickelt (Vincentelli *et al.*, 2004). Diese Puffer umfassen einen pH-Bereich von 4–9, beinhalten Salze in Form von NaCl und KCl, verschiedene Additive wie Glycerin, Glukose, PEG4000, PEG400, Arginin, EDTA, Redoxmittel wie β -Mercaptoethanol und Glutathion und Detergenzien wie Sulfobetaine (NDSB195, 201 und 256) (Vincentelli *et al.*, 2004).

1.3. Archaea und ihre Ähnlichkeit zu Eukaryoten

Archaea oder auch „Archaeobakterien“ genannt stellen neben Bakterien und Eukaryoten die dritte Domäne des Lebens dar (Abbildung 1-5) (Woese *et al.*, 1990). Aufgrund ihrer 16S-rRNA sowie anderer genetischer, physiologischer, struktureller und biochemischer Eigenschaften unterscheiden sich Archaea grundlegend von den Bakterien (Woese & Fox, 1977). Unterschieden werden die Phyla Korarchaeota (Barns *et al.*, 1996), Euryarchaeota und Crenarchaeota (Garrity *et al.*, 2004), zu denen die Gattung *Sulfolobus* zählt, welche zum ersten Mal 1972 von Brock *et al.* beschrieben wurde. 2002 entdeckten Huber *et al.*, eine weitere Gruppe der Archaea, die Nanoarchaeota. Bisher ist *Nanoarchaeum equitans* der einzige bekannte Vertreter dieser Gruppe und lebt symbiontisch oder parasitär auf anderen Archaea, nämlich *Ignicoccus hospitalis* (Huber *et al.* 2006). Viele Arten der Archaeen sind an extreme Milieubedingungen wie sehr hohe Temperaturen (hyperthermophil), hoch konzentrierte Salzlösungen (halophil) oder stark saures (acidophil) oder basisches Milieu (alkaliphil) angepasst (Madigen *et al.*, 2001). Aufgrund ihres aussergewöhnlichen Stoffwechsels sind Archaea auch für die Forschung von Interesse. Hyperthermophile Archaeen findet man häufig in marinen (Black Smoker) und terrestrischen vulkanischen Gebieten, Halophile wachsen gut in Umgebungen mit hohem Salzgehalt, z. B. im Toten Meer.

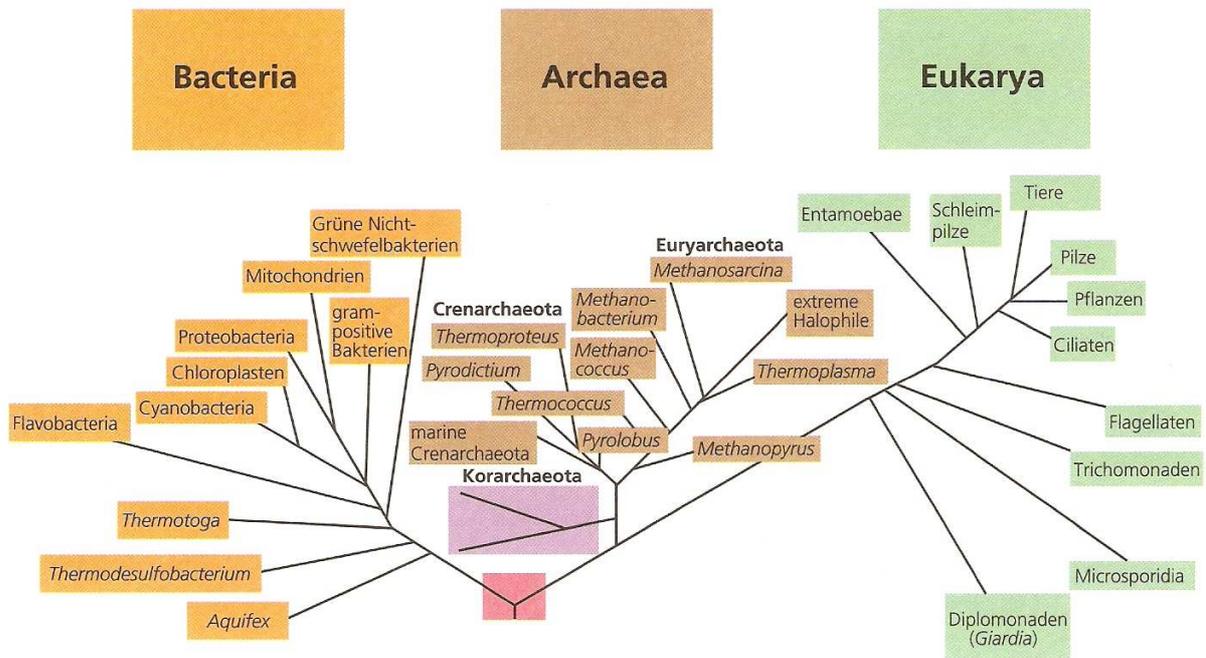


Abbildung 1-5: Phylogenetischer Stammbaum. Dargestellt sind die drei Domänen des Lebens: Bacteria, Archaea und Eukarya. Dieser Stammbaum wurde aus vergleichenden Sequenzanalysen an 16S- und 18S-rRNA abgeleitet (entnommen aus Brock Mikrobiologie, 2001).

Der Aufbau der Zellwand von Archaeen zeigt deutliche Unterschiede zu den anderen Domänen. Ihre Zellwände enthalten kein Murein und zeigen einen besonderen Aufbau, der ihnen Resistenz gegen Zellwandantibiotika verleiht. *Thermoplasma* besitzt beispielsweise keine Zellwand, während andere Arten wie z.B. *Methanospirillum* aus mehreren Schichten aufgebaute Zellwände besitzen. Auch die Plasmamembran der Archaea unterscheidet sich von denen der Bakterien und Eukaryoten. In Bakterien und Eukaryoten sind Fettsäuren über eine Ester-Bindung an die Glycerol-Moleküle gebunden, während bei Archaeen Glycerol-Diether sowie Bis-Glycerol-Tetraether zu finden sind und einfache Fettsäuren durch verzweigte Isopreneinheiten ersetzt sind (Abbildung 1-6). Hyperthermophile Archaeen besitzen häufig eine stabile einschichtige Membran aus Tetraetherlipiden (Madigan *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2008).

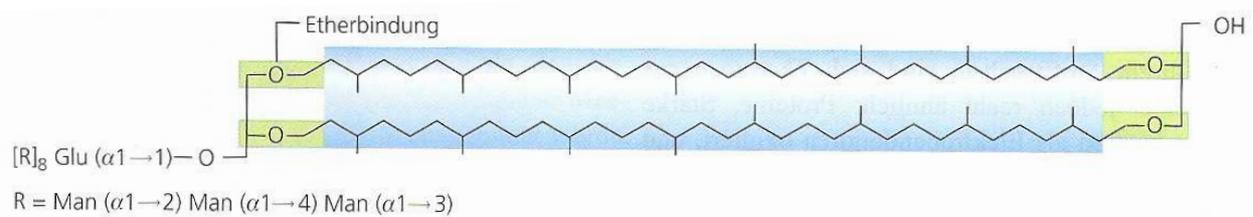


Abbildung 1-6: Struktur des Tetraethers Lipoglykan von Archaea (*Thermoplasma acidophilum*). Glu – Glukose, Man – Mannose. Die Etherbindungen sind grün dargestellt (entnommen aus Brock Mikrobiologie, 2001).

Archaeen sind in vielen molekularbiologischen Eigenschaften den Eukaryoten ähnlicher als den Bakterien. Jedoch besitzen sie auch typisch bakterielle Eigenschaften wie beispielsweise die Zellgröße und ihnen fehlt ein Zellkern. Sie besitzen ein ringförmiges Chromosom, das je nach Art in verschieden hoher Kopienzahl vorliegen kann (Breuert *et al.*, 2006; Norais *et al.*, 2007). Proteine, die an informationsverarbeitenden Prozessen wie Replikation oder Transkription beteiligt sind, sind zwischen Archaeen und Eukaryonten konserviert. Bei den Archaeen ist zwar die Organisation einfacher und es liegen weniger Einzelkomponenten vor, jedoch sind die grundlegenden Prozesse wie Replikation, Transkription, Translation und Reparatur ähnlich (Edgell & Doolittle, 1997; Bell & Jackson, 1998). Archaea können daher auch als Modellsystem zur Untersuchung komplexer eukaryontischer Prozesse dienen.

1.4. Die Gattung *Sulfolobus*

Der Crenarchaeot *Sulfolobus acidocaldarius* wurde 1972 erstmals durch Brock *et al.* beschrieben und gehört zu den hyperthermophilen Archaea. Aus Schwefelquellen in der Nähe von Neapel wurde *S. solfataricus* isoliert (DeRosa *et al.*, 1975, Zillig *et al.*, 1980). 2001 wurde das Genom von *S. solfataricus* entschlüsselt und als erste Genomsequenz der *Sulfolobus* veröffentlicht (She *et al.*, 2001). Die Art *S. acidocaldarius* wurde aus der Locomotive Spring des Yellowstone Nationalparks isoliert. Auch sein Genom wurde vollständig sequenziert (Chen *et al.*, 2005).

S. solfataricus und *S. acidocaldarius* zählen zu den am häufigsten verwendeten und bestuntersuchten Arten. Durch Zillig *et al.* (1994) wurden bereits mehrere *S. islandicus*-Stämme aus geothermalen Quellen in Island isoliert. Weitere *Sulfolobus*-Arten wären *S. tokodaii*, dessen Genom ebenfalls sequenziert wurde (Kawarabayasi *et al.*, 2001), *S. metallicus* (Huber & Stetter, 1991), *S. tengchongensis* (Xiang *et al.*, 2003) und *S. yangmingensis* (Jan *et al.*, 1999).

Wie bereits erwähnt gehört *Sulfolobus* zu den thermophilen bzw. hyperthermophilen Archaeen. Die optimalen Wachstumsbedingungen liegen zwischen 65 und 88 °C und pH 2-5.5 (Grogan, 1989). Der pH-Wert innerhalb der Zellen liegt jedoch mit pH 7 im neutralen Bereich (Moll & Schäfer, 1988). Aufgrund dieser Wachstumsbedingungen und seiner thermo- und säurestabilen sekretierten Enzyme ist *Sulfolobus* auch für die Biotechnologie interessant.

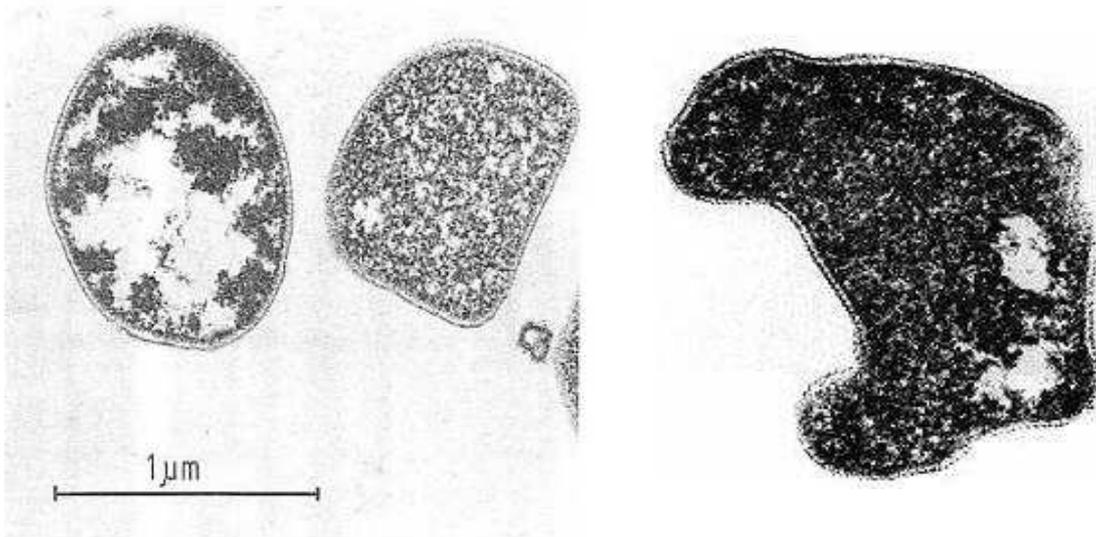


Abbildung 1-7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen *Sulfolobus*-Zellen (Stetter et. al, 1985; Madigan et al., 2001)

Sulfolobus ist ein aerober Chemolithoautotropher und ist somit in der Lage H_2S oder S^0 zu H_2SO_4 zu oxidieren. Aus dieser Fähigkeit leitet sich der erste Teil des Gattungsnamens „*Sulfolobus*“ ab. Er verwendet dabei CO_2 als einzige Kohlenstoffquelle (Madigan et al., 2001). Neben der aeroben Veratmung von Schwefel und organischen Verbindungen kann *Sulfolobus* auch Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidieren. Diese Fähigkeit wird bei der Erzlaugung von Eisen- und Kupfererzen bei hohen Temperaturen genutzt. Jedoch haben die routinemäßig verwendeten Laborstämme, wie *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* die Fähigkeit zu chemolithoautotrophem Wachstum verloren (Huber und Prangishvili, 2006) und sind auf komplexen organischen Nährmedien kultivierbar (Grogan, 1989). Die Generationszeiten von *Sulfolobus* liegen je nach Wachstumstemperatur und Species im Bereich von 3 bis 11 Stunden.

Der zweite Teil seines Namens *Sulfolobus* leitet sich von seiner Form ab. *Sulfolobus*-Zellen sind mehr oder weniger kugelförmig und bilden aber unverwechselbare Lappen (Abbildung 1-7, rechts) (Madigan et al., 2001). Mit einem Durchmesser von etwa $1 \mu\text{m}$, sind sie von einer S-Layer, welche eine 10 nm dicke, quasikristalline Proteinhülle aus regelmässig angeordneten Glykoproteineinheiten darstellt, umgeben (Weiss, 1974). Zwischen S-Layer und Zellmembran befindet sich der ca. 20 nm breite periplasmatische Raum. Wie bereits erwähnt besteht die Zellmembran von *Sulfolobus* aus Glyceroletherlipiden (Tornabene und Langworthy, 1979). Wie andere hyperthermophile Archaeen besitzt auch *Sulfolobus* eine stabile, einschichtige Membran, die mit bipolaren Tetraetherlipiden durchzogen ist (Pearson et al., 2008).

1.5. Proteinexpression in *Sulfolobus*

Die Gattung *Sulfolobus* ist dabei ein wichtiger Modellorganismus für die Untersuchung wichtiger eukaryotischer Prozesse zu werden, da wichtige Vorgänge wie Replikation oder Transkription in Archaeen und Eukaryoten konserviert sind. Diese Untersuchungen waren bisher jedoch erschwert, da für *Sulfolobus* keine genetischen Systeme zur Verfügung standen bzw. schlechte Reproduzierbarkeit zeigten. In den letzten Jahren konnten jedoch einige Fortschritte auf diesem Gebiet gemacht und nicht integrative sowie integrative Shuttle-Vektoren für die Proteinexpression in *Sulfolobus* entwickelt werden. Der Shuttle-Vektor kann im Zielorganismus entweder in einer oder in mehreren Kopien episomal vorliegen oder in einer oder mehreren Kopien durch homologe Rekombination in das Wirtschromosom integriert werden.

1.5.1. *Sulfolobus-E. coli*-Shuttle-Vektor

Bereits in den 90er Jahren wurden Shuttle-Vektoren für Archaeen entwickelt und für die Proteinexpression eingesetzt (Allers & Mevarech, 2005). Für den Crenarchaeot *Sulfolobus acidocaldarius* konnte 2007 ein funktionierender Shuttle-Vektor entwickelt werden (Berkner *et al.*, 2007). Dieser Shuttle-Vektor basiert auf dem Plasmid pRN1 (Abbildung 1-8). Das 5350 bp grosse, zirkuläre archaeale Plasmid pRN1 wurde aus dem Crenarchaeoten *Sulfolobus islandicus* REN1H1 isoliert (Keeling *et al.*, 1996) und gehört zur pRN-Familie. Bei den pRN-Plasmiden handelt es sich um kryptische Plasmide, d. h. Plasmide mit unbekannter Funktion. Auch ausserhalb der Crenarchaeota konnten bisher keine Plasmide nachgewiesen werden, denen eine Verwandtschaft zur pRN-Familie nachgewiesen werden konnte (Lipps, 2009). pRN1 weist Homologien zu pRN2 und anderen Mitgliedern der pRN-Familie auf.

pRN1 ist vollständig sequenziert (Keeling *et al.*, 1996) und enthält sechs offene Leseraster (orfs), von denen drei in allen Mitgliedern der pRN-Familie hoch konserviert sind, nämlich *orf56*, *orf80* und *orf904*. Diese drei offenen Leseraster kodieren für Proteine. Vor *orf56* und *orf80* liegen jeweils Promotorregionen. Die restlichen drei offenen Leseraster (*orf72*, *orf90a* und *orf90b*) sind relativ kurz, weisen keine Sequenzähnlichkeiten mit bekannten Proteinen auf und ihre Funktion ist bisher unklar. Die Genprodukte der drei konservierten Leseraster konnten bereits in *E. coli* exprimiert und biochemisch untersucht werden (Lipps *et al.* 2003; Lipps, 2004; Beck & Lipps, 2007; Beck *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2009)

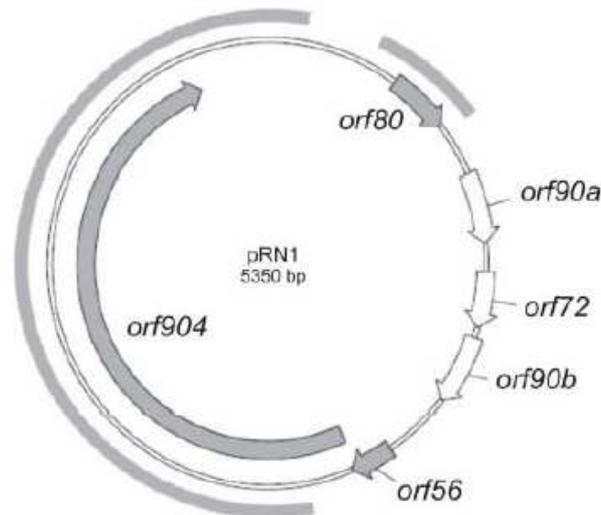


Abbildung 1-8: Plasmidkarte des archaealen Plasmids pRN1. Die in der pRN-Familie konservierten offenen Leseraster sind dunkelgrau dargestellt, der variable Anteil von pRN1 weiß. Die Bereiche, welche in allen pRN-Plasmiden konserviert sind, sind grau gekennzeichnet (entnommen aus Berkner *et al.*, 2007).

Ein Shuttle-Vektor muss in mindestens zwei verschiedenen Organismen replizieren können. In diesem Fall stellt *E. coli* einen der beiden Organismen dar, da dort die Herstellung rekombinanter DNA-Sequenzen besonders optimiert ist. *Sulfolobus* stellt den Zielorganismus dar, in dem der Shuttle-Vektor anschliessend replizieren wird. Zur Konstruktion eines *Sulfolobus-E. coli*-Shuttle-Vektors wird ein *E. coli*-Replikon mit selektivem Marker, ein *Sulfolobus*-Replikon und ein selektiver Marker für *Sulfolobus* benötigt (Berkner *et al.*, 2007, Abbildung 1-9).

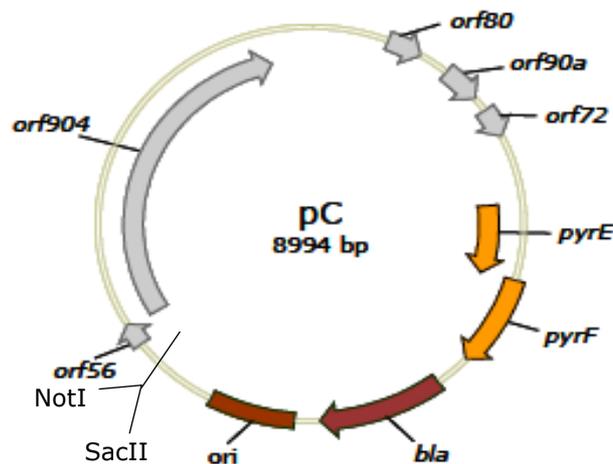
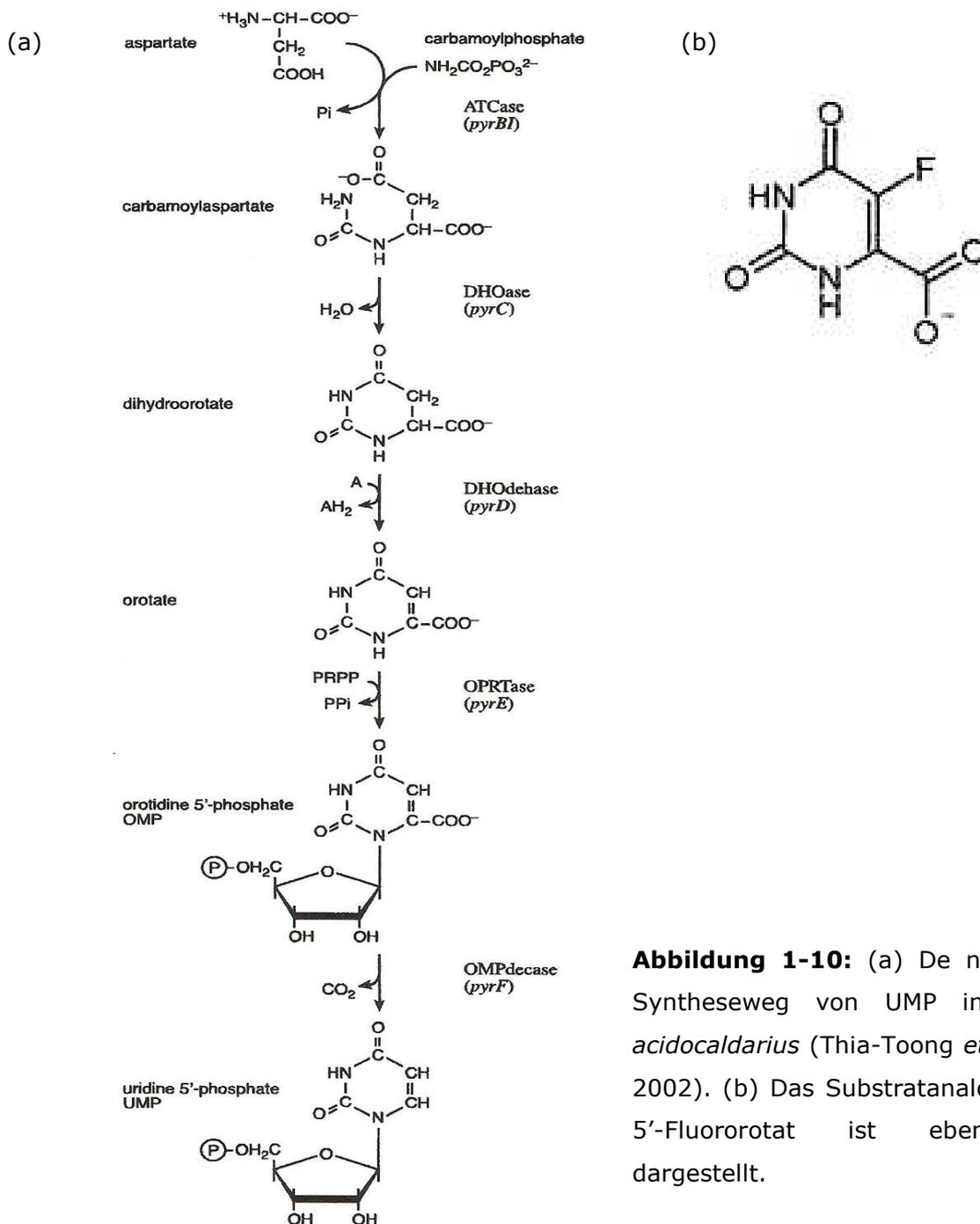


Abbildung 1-9: Plasmidkarte des in dieser Arbeit verwendeten Shuttle-Vektors pC. Offene Leseraster des Plasmids pRN1 sind grau, der *E. coli*-Anteil dunkelrot und die selektiven Marker für *Sulfolobus* sind orange gekennzeichnet (entnommen aus Berkner *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurden die verwendeten Genkonstrukte über die Schnittstellen NotI und SacII in den Shuttle-Vektor kloniert.

Als selektive Marker in *Sulfolobus* dienen die *pyrEF*-Gene aus *S. solfataricus* P2, welche für Enzyme des Uridinmonophosphat-Syntheseweges (Abbildung 1-10 a) codieren. Die für die Selektion verwendeten auxotrophen Mutanten sind durch Inaktivierung dieser Gene nicht mehr zu einer bestimmten Stoffwechsellistung in der Lage. Diesen auxotrophen Stämmen ist nur ein Wachstum möglich, wenn das (End-) Produkt des Stoffwechselweges (in diesem Fall Uracil) im Medium zur Verfügung gestellt wird und von den Zellen aufgenommen werden kann (Berkner, 2007). Nach der Untersuchung des de novo Stoffwechselweges zur Herstellung von UMP (5'-Uridinmonophosphat) in *Sulfolobus* (Grogan & Gunsalus, 1993), wurde die Uracil-Selektion erstmals beschrieben (Grogan, 1996).



pyrE codiert für die Orotatphosphoribosyltransferase, welche die Addition von Phosphoribosylpyrophosphat an Orotat katalysiert. Dabei entsteht Orotidin-5'-monophosphat. *pyrF* codiert für die Orotidin-5'-monophosphatdecarboxylase. Sie katalysiert den letzten Schritt der UMP-Synthese, wobei Orotidin 5'-phosphats zu 5'-Uridinmonophosphat decarboxyliert wird. Sobald eines dieser beiden Enzyme nicht mehr gebildet wird, können die Zellen Uracil nicht mehr synthetisieren und es muss ihnen im Medium bereitgestellt werden. *pyrE* und *pyrF* besitzen einen gemeinsamen Promotor und werden kotranskribiert (Thia-Toong *et al.*, 2002).

Die Selektion dieser *pyrEF* auxotrophen Stämme erfolgte durch Fluororotat (Abbildung 1-10, b). Durch diese Negativ-Selektion lassen sich sehr effizient und selektiv Uracil-auxotrophe Stämme identifizieren. 5'-Fluororotat ist ein Fluor-Analogon von Orotat, welches ein natürliches Intermediat in der Uracil-Biosynthese darstellt. Die Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase, welche durch *pyrF* codiert wird, wandelt Orotat in Uracil um und kann dabei nicht zwischen seinem natürlichen Substrat und 5'-Fluororotat unterscheiden. Deshalb wird in Uracil-prototrophen Zellen 5'-Fluororotat in das stark toxische 5'-Fluoruracil umgewandelt, das somit zum Zelltod führt. Da Uracil-auxotrophe *Sulfolobus*-Zellen jedoch auf die externe Zufuhr von Uracil angewiesen sind, können sie somit auf den Selektionsplatten wachsen.

1.5.2. Homologe Rekombination

Homologe Rekombination spielt während der Meiose, der DNA-Reparatur oder der geschlechtlichen Fortpflanzung eine wichtige Rolle. Sie kann jedoch auch eingesetzt werden, um gezielt Abschnitte im Genom von Organismen auszutauschen.

In dieser Arbeit wurden DNA-Sequenzen zur stabileren Proteinexpression ins Genom von *Sulfolobus acidocaldarius* durch „Double Crossover“ integriert. Durch dieses Verfahren kann eine Sequenz an einer gezielt ausgesuchten Stelle im Erbgut durch eine beliebige andere Sequenz ersetzt werden. Nach Amplifikation der gewünschten Sequenz und Ligation in einen integrativen Vektor wird dieser nach Linearisierung im Anschluss über Elektroporation in die *Sulfolobus*-Zelle eingeführt. Die Integration in das Erbgut erfolgt durch homologe Rekombination. Der eingesetzten Sequenz werden zwei wichtige Eigenschaften verliehen. Sie enthält einen selektiven Marker (in diesem Fall die *pyrEF*-Gene), der dazu dient, die *Sulfolobus*-Zellen, bei denen das Erbgut verändert wurde zu identifizieren. Neben dem Marker liegen auf beiden Seiten der zu integrierenden DNA-Sequenz zum Genom homologe Sequenzen, die dafür sorgen sollen, dass hier eine Hybridisierung stattfindet und die Sequenz somit an der richtigen Stelle im Erbgut eingesetzt werden kann.

Wie bereits erläutert dienen als selektive Marker in *Sulfolobus* die funktionsfähigen Wildtyp-Gene *pyrEF*, die Uracil-auxotrophe *Sulfolobus*-Stämme nach erfolgreicher Transformation zur Uracil-Produktion befähigen und sie somit auf Uracil-freien Selektionsplatten wachsen lassen. In den Abbildungen 1-11 und 1-12 sind das Prinzip der homologen Rekombination und der verwendete Integrationsvektor dargestellt.

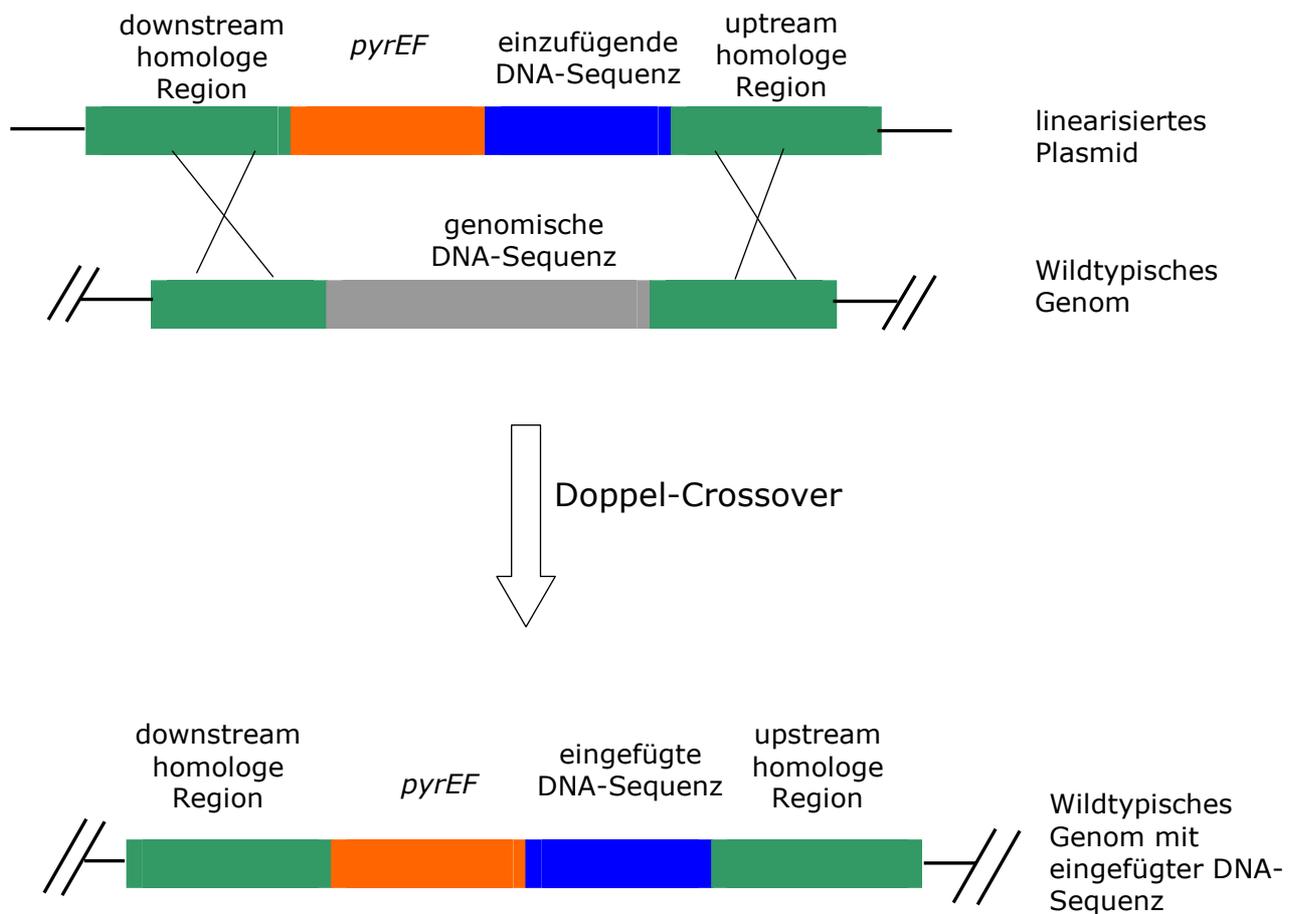


Abbildung 1-11: Integration von DNA-Sequenzen ins Wirtsgenom durch homologe Rekombination. Der linearisierte Integrationsvektor wird durch „Doppel-Crossover“ in das Wirtsgenom ligiert. Die zum Genom homologen Sequenzen sind grün und die *pyrEF*-Gene orange dargestellt. Die einzubringende DNA-Sequenz ist blau markiert.

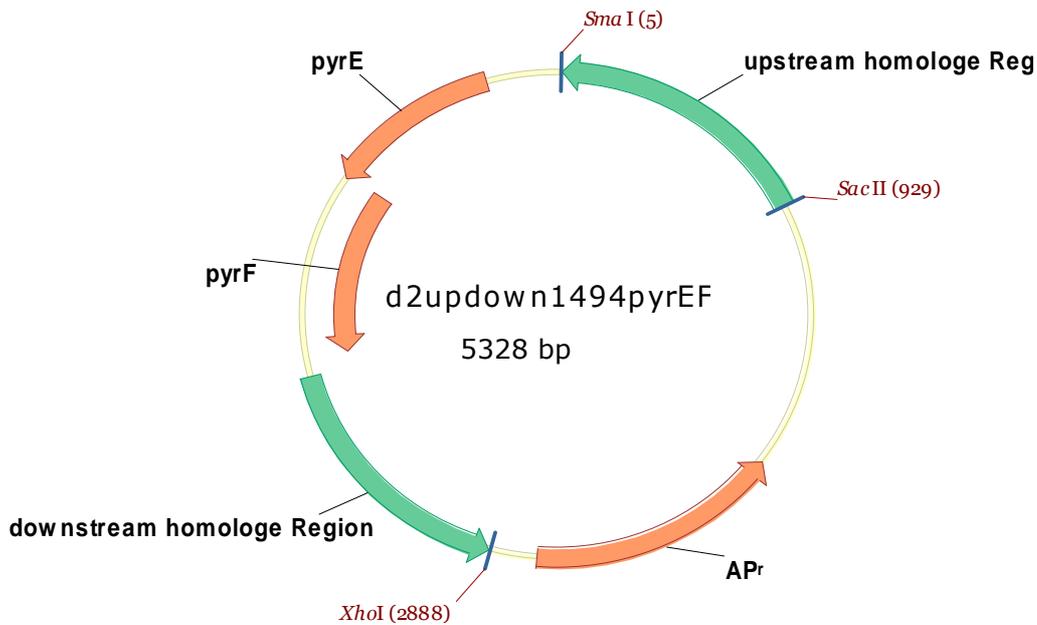


Abbildung 1-12: Integrationsvektor für *S. acidocaldarius*. Die zum Genom von *S. acidocaldarius* homologen Sequenzen sind grün gekennzeichnet. Die *pyrEF*-Gene sind orange dargestellt. Über die Schnittstelle *Sma*I wurde die gewünschte DNA-Sequenz in den Vektor kloniert. Die Linearisierung des Vektors erfolgt durch Restriktion mit *Sac*II und *Xho*I. Zusätzlich enthält der Vektor einen Resistenzmarker für *E. coli*, nämlich Ampicillinresistenz.

1.6. Problemstellung

Bereits in früheren Arbeiten wurde die thermoacidophile Cellulase SSO1949 aus dem Archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2 charakterisiert. Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass SSO1949 eine optimale katalytische Aktivität bei einem pH-Wert von ca. 1.8 und einer Temperatur von ca. 80°C aufweist, was dieses Enzym für industrielle Anwendungen überaus interessant macht. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass SSO1949 zum größten Teil unlöslich in Form von „Inclusion Bodies“ exprimiert wird. Da eine Erhöhung des löslichen Anteils an Cellulase beispielsweise durch Koexpression mit Chaperonen nicht möglich war, sollte in dieser Arbeit versucht werden, die bereits aufgezeigten Reinigungsmethoden für SSO1949 weiterzuführen und zu verbessern, um nach Entwicklung einer geeigneten Rückfaltungsmethode größere Mengen von aktivem Protein zu erhalten. Darüber hinaus sollte die extreme Temperatur- und Säurestabilität von SSO1949 untersucht werden. Durch Modellstrukturanalysen von SSO1949 wurden verschiedene Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms identifiziert, die möglicherweise eine Rolle für das extreme pH-Optimum von SSO1949 spielen.

Da die rekombinante Expression von SSO1949 in *E. coli* Schwierigkeiten bereitete, sollte versucht werden, die Cellulase unter den Bedingungen zu exprimieren, unter denen sie auch natürlicherweise vorkommt. Daher wurde versucht SSO1949 in *Sulfolobus acidocaldarius* MR31, welcher bereits eingehend untersucht wurde und für den auch ein funktionierendes Shuttle-Vektor-System zur Verfügung steht, zu exprimieren und aufzureinigen.

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu SSO1949 wurden zwei weitere Glykosidhydrolasen für Mutationsstudien im aktiven Zentrum ausgewählt, nämlich CelA aus *Thermotoga maritima* und EglA aus *Pyrococcus furiosus*. Dabei handelt es sich ebenfalls um thermophile Enzyme, jedoch liegt ihr pH-Optimum im leicht sauren Bereich bei pH 6. Durch gezielten Austausch von Aminosäuren im aktiven Zentrum gegen die homologen Aminosäuren in SSO1949 sollte untersucht werden, ob dadurch ihr pH-Optimum weiter erniedrigt werden kann. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass dies im Fall der Xylanase XylI (pH-Optimum bei pH 6) aus *Streptomyces sp.* durch gezielte Mutationen erreicht werden konnte. Durch Austausch bestimmter Aminosäuren im katalytische Zentrum gegen homologe Aminosäuren der Xylanase XynC (pH-Optimum bei pH 2) aus *Aspergillus kawachii* konnte das pH-Optimum von XylI nach pH 4,7 verschoben werden.

In vitro-Rekombination ermöglicht die Kombination und Optimierung bestimmter Eigenschaften verschiedener Proteine. Im Idealfall trägt das entstandene Hybridprotein alle positiven Eigenschaften der Elternproteine. Die beiden Cellulasen SSO1949 aus *Sulfolobus solfataricus* und CelA aus *Thermotoga maritima* zeigen Sequenzähnlichkeiten und gehören beide zur Glykosidhydrolasefamilie 12. Durch Konstruktion eines Hybridproteins aus SSO1949 und CelA sollte untersucht werden, ob die Eigenschaften beider Cellulasen kombiniert werden können, ohne dass das entstandene Fusionsprotein seine Aktivität verliert.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

Häufig verwendete Chemikalien sind in Tabelle 2-1 aufgeführt. Alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in *per analysis* Qualität von Merck (Darmstadt) bezogen. Alle Puffer wurden mit doppeltdestilliertem Wasser hergestellt. In den folgenden Tabellen sind verwendete Hilfsmittel (Tabelle 2-2), Geräte (Tabelle 2-3), Computerprogramme (Tabelle 2-4), Chromatographiematerialien (Tabelle 2-5), Enzyme (Tabelle 2-6), Antikörper (Tabelle 2-7), Längenstandards (Tabelle 2-8), kommerziell erhältliche Systeme (Kits) (Tabelle 2-9), Substrate für Aktivitätsmessungen (Tabelle 2-10), Plasmide (Tabelle 2-11) sowie Bakterien- und *Sulfolobus*-Stämme (Tabelle 2-12) aufgelistet.

Tabelle 2-1: Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Fluka BioChemika, Neu Ulm
Acrylamid: Bisacrylamid (29:1), 40 %	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose (NEEO, GTQ)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Gerbu, Gaiberg
APS (Ammonium-Peroxodisulfat)	Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	BD, Heidelberg
Carboxymethylcellulose	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Gerbu, Gaiberg
Dodecylmaltosid	Roth, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka BioChemika, Neu Ulm
Gelrite	Fluka BioChemika, Neu Ulm
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Gerbu, Gaiberg
IPTG	Gerbu, Gaiberg
Kanamycin	Gerbu, Gaiberg
Kongorot	Fluka Biochemika, Neu Ulm
L-Arabinose	Fluka Biochemika, Neu Ulm
L-Arginin	Fluka Biochemika, Neu Ulm
NZ-Amin	Fluka Biochemika, Neu Ulm

Chemikalie	Bezugsquelle
Phenol (TE-gesättigt)	Roth, Karlsruhe
Pepton	Gerbu, Gaiberg
Roti®Nanoquant	Roth, Karlsruhe
Temed (N,N,N',N', Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tricin	Roth, Karlsruhe

Tabelle 2-2: Hilfsmittel

Hilfsmittel	Bezugsquelle
Chromatographiesäulchen Mobicols	Mo Bi Tec GmbH, Göttingen
Einmalspritzen (2,5/20 ml)	Dispomed, Geinhausen
Eppendorfggefäße (1,5/2,0 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Kunststoffpetrischalen	Sarstedt, Nürmbrecht
Küvetten (10x4x45 mm)	Sarstedt, Nürmbrecht
Mikroliterpipetten (10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Nitrocellulosemembran (0,2 µm)	Kisker Biotech, Steinfurt
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Pipettenspitzen, Kunststoff	Sarstedt, Nürmbrecht
Platte F. Suspensionskultur, 48/24/12-well, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polyethylenröhrchen (10/50 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Quarzküvetten (0,1/1 cm Schichtdicke)	Hellma, Müllheim
Spritzenfilter steril (Porengröße 0,22 µm)	Roth, Karlsruhe
Ultrazentrifugationsröhrchen (12 ml)	Sartorius Stedim Biotech, Aubagne (F)
Ultrafiltrationsäule Vivaspin 500 bzw. 20	Herolab, Wiesloch

Tabelle 2-3: Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Autoklav	Webeco, Selmsdorf
ÄKTA	GE Healthcare, Glattbrugg, Schweiz
Blot-Apparatur Panther.Semidry Electroblotter HEP-1	Thermo Scientific Owl Separation Systems, Rochester NY (USA)
Brutschrank	Memmert, Schwabach
Elektrophoreseapparaturen für Agarose- und PAA-Gele	Technik, Universität Bayreuth

Gerät	Bezugsquelle
Elektrophoreseapparaturen <i>mighty small</i>	Hoefer, Holliston MA (USA)
Eismaschine	ZIEGRA, Isernhagen
Feinwaage 1201 MP2	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenz-Spektrometer LS-50B	Perkin Elmer, Waltham MA (USA)
Geldokumentation UV-Transilluminator	Intas, Göttingen
Geltrockenapparatur Minidry D61	Biometra, Göttingen
Gene Pulser Xcell	Biorad, Reinach, CH
Labfors Kleinfermentersystem	Infors AG, Bottmingen (CH)
Magnet-Heizrührer RETbasic	IKA Laborbedarf, Staufen
Nanodrop	Thermo Scientific, Wilmington (USA)
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Greifensee (CH)
Plattenlesegerät	MWG-Biotech, Ebersberg
Spannungsquelle EV 243	Consort, Turnhout (B)
Spektralphotometer Lambda 25	Perkin Elmer, Waltham MA (USA)
Spektropolarimeter Jasco J-600	JASCO GmbH, Groß-Umstadt
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermoschüttler Thermoshake	Gerhardt, Königswinter
Thermoschüttler Innova 42	IG, Zürich (CH)
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Sonorex Super RK106	Bandelin, Berlin
Ultraschallstab Sonifier B15	Branson, Danbury CT (USA)
Ultrazentrifuge Centrikon T-1055	KontronInstruments, Neufahrn
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Waage, TE 1502 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifuge Sorvall RC6 Plus	Thermo, Waltham MA (USA)

Tabelle 2-4: Computerprogramme

Programm	Bezugsquelle
Expasy Proteomic Server	http://www.expasy.ch/
MS Office	Microsoft GmbH (D), Unterschleißheim
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
VectorNTI Suite7	InforMax, Bethesda MD (USA)
SCHEMA	Arbeitsgruppe F. Arnold, California Institute of Technology (USA)

Tabelle 2-5: Chromatographiematerialien

Chromatographiematerial	Bezugsquelle
Fractogel EMD-SO ³⁻	Merck, Darmstadt
Fractogel EMD-Propyl	Merck, Darmstadt
Fractogel EMD-TMAE	Merck, Darmstadt
HiTrap™ Q FF	GE Healthcare, Glattbrugg (CH)
Talon, Metal Affinity Resins	Clontech, Saint-Germain-en-Laye (F)

Tabelle 2-6: Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
<i>Taq</i> -Polymerase	peqlab, Erlangen
<i>Pfu</i> -Polymerase	promega, Madison (USA)
Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Klenow exo ⁻ , Antarktischen Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a. Main
RNase A	Roth, Karlsruhe
O-Glycosidase	Sigma-Aldrich, München

Tabelle 2-7: Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
α-His6-Antikörper aus Maus	Sigma-Aldrich, München
Kaninchen-α-Maus-alkalische Phosphatase Konjugat	Jackson ImmunoResearch, West Grove (USA)

Tabelle 2-8: Längenstandards

Längenstandard	Bezugsquelle
SmartLadder DNA Standard	Eurogentec, Köln
Gene ruler™ 100 bp DNA ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Tabelle 2-9: Kommerziell erhältliche Systeme (Kits)

Kit	Bezugsquelle
GeneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PageSilver™, Silberfärbungs-Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
peqGold Plasmid Midiprep Kit I	peqlab, Erlangen
peqGold Gel Extraction Kit	peqlab, Erlangen

Tabelle 2-10: Substrate für Aktivitätsmessungen

Substrat	Bezugsquelle
p-Nitrophenyl-Cellobiosid	Sigma-Aldrich, München
Bifunktionalisiertes hexameres bzw. tetrameres Fluoreszenzsubstrat	Arbeitsgruppe H. Driguez, Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, Grenoble (F)

Tabelle 2-11: Plasmide

Plasmid	Referenz	Anwendung
pET28c	Novagen, Darmstadt	Expressionvektor für <i>E. coli</i>
pET32a	Novagen, Darmstadt	Expressionvektor für <i>E. coli</i>
pJET1.2/blunt	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	Klonierungsvektor
pC	Dr. Silvia Berkner, Universität Bayreuth	Expressionsvektor für <i>Sulfolobus</i>
d2updown1494pyrEF	Dr. Silvia Berkner, Universität Bayreuth	Genomintegrationsvektor für <i>Sulfolobus</i>
pG-KJE8; pGro7; pKJE7; pG-Tf2; pTf16	TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye (F)	Plasmide für Chaperonexpression

Tabelle 2-12: Bakterien- und *Sulfolobus*-Stämme

Stamm	genetische Marker	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, La Jolla (USA)
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIL strain	<i>E. coli</i> B F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^r]	Stratagene, La Jolla (USA)
<i>E. coli</i> BL21 AI	F- ompT hsdSB (r _B -m _B -) gal dcm araB:T7RNAP-tetA	Invitrogen, Darmstadt
<i>E. coli</i> K12 ER1821 [pM.EsaBC4I]	Methylierungsstamm	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> MR31	pyrEF	Reilly, S., Grogan, D.W., University of Cincinnati (USA)

2.1.1. Nährmedien

2.1.1.1. Bakteriennährmedien

LB-Medium: 5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton

Psi-Medium: 5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Trypton, 5 g/l MgSO₄, pH 7.6 mit NaOH

Alle Medien wurden vor der Verwendung 20 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von Nährböden wurden vor dem Autoklavieren noch 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium je nach Bedarf Antibiotika zugegeben (Chloramphenicol 34 mg/l, Kanamycin 50 mg/l oder Ampicillin 100 mg/l).

2.1.1.2. XT (Xylose, Trypton)- bzw. ST (Saccharose, Trypton)-Flüssigmedium

Dieses Medium diente als selektives Nährmedium für Shuttle-Vektor tragende *Sulfolobus acidocaldarius* MR31-Zellen.

XT-Medium: 10 ml 100x Brock, 5 ml 200x Brock, 1 ml 1000x Brock, 0.2% Xylose, 0.2% Trypton auf 1 l ddH₂O (für Expression unter *dps*- und *sac7d*-Promotor)

ST-Medium: 10 ml 100x Brock, 5 ml 200x Brock, 1 ml 1000x Brock, 0.2% Saccharose, 0.2% Trypton auf 1 l ddH₂O (für Expression unter *mal*-Promotor)

Der pH-Wert des XT- bzw. ST-Mediums liegt zwischen pH 3–3.5. Zur Kultivierung Shuttle-Vektor freier *S. acidocaldarius* MR31-Zellen wurde 20 µg/ml Uracil zugesetzt.

2.1.1.3. NZ,X,D (NZ-Amin, Xylose, Dextrin)-Platten bzw. NZ,S (NZ-Amin, Saccharose)-Platten (festes Nährmedium)

Das selektive Festmedium wurde zur Kultivierung von Shuttle-Vektor tragenden *Sulfolobus acidocaldarius* MR31-Zellen verwendet. Bei Proteinexpression unter dem *dps*- bzw. *sac7d*-Promotor wurden NZ,X,D-Platten, bei Expression unter dem *mal*-Promotor wurden NZ,S-Platten verwendet.

Zur Herstellung der Platten wurden 2.4 g Gelrite mit 390 ml destilliertem Wasser versetzt und 30 min bei 121°C und 2 bar gelöst. Im Anschluss wurde das Gelrite auf 80°C abgekühlt und 4 ml 100x Brock, 2 ml 200x Brock, 400 µl 1000x Brock, 0.1% NZ-Amin, 0.2% Xylose und 0.2% Dextrin bzw. 0,2% Saccharose zugegeben. Die Verfestigung des

Mediums erfolgte durch die Zugabe von 4 ml 1 M Calciumchlorid. Die Lagerung der NZ-Amin, Xylose, Dextrin- bzw. NZ-Amin, Saccharose-Platten erfolgte bei 4°C.

Zur Kultivierung von Shuttle-Vektor freien *S. acidocaldarius* MR31-Zellen wurden die Platten mit 20 µg/ml Uracil versetzt.

100x Brock-Lösung pH 3: 130 g Diammoniumsulfat, 25 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 2 g Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat auf 1 l ddH₂O. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit H₂SO₄. Anschliessend wurde die Lösung sterilfiltriert.

200x Brock-Lösung pH 3: 11.2 g Kaliumdihydrogenphosphat, 40 ml 1000x Trace-Elements (36 ml 10 mg/ml Manganchlorid-Tetrahydrat, 4.4 ml 10 mg/ml Zinkchlorid, 1 ml 10 mg/ml Kupferchlorid, 600 µl 10 mg/ml Vanadiumsulfat-Hydrat, 90 µl 10 mg/ml di-Natriumtetraborat-Hydrat, 600 µl 10 mg/ml Natriummolybdat-Dihydrat, 100 µl 10 mg/ml Nickelsulfat-Hexahydrat) auf 0.2 l ddH₂O. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit H₂SO₄. Anschliessend wurde die Lösung sterilfiltriert.

1000x Brock-Lösung: 14 g Calciumchlorid-Dihydrat auf 200 ml ddH₂O. Anschliessend wurde die Lösung bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert.

20% NZ-Amin-Lösung: 20 % NZ-Amin in ddH₂O. Mit H₂SO₄ wurde der pH auf 3.5 eingestellt. Die Lösung wurde anschliessend sterilfiltriert.

20% Xylose-Lösung: 20 % Xylose in ddH₂O. Die Lösung wurde anschliessend sterilfiltriert.

20% Dextrin-Lösung: 20 % Dextrin in ddH₂O. Die Lösung wurde anschliessend sterilfiltriert.

20% Trypton-Lösung: 20 % Trypton in ddH₂O. Mit H₂SO₄ wurde der pH auf 3.5 eingestellt. Die Lösung wurde anschliessend sterilfiltriert.

2.1.1.4. *Sulfolobus*-Glycerin-Medium

10 ml 100x Brock, 5 ml 200x Brock, 1 ml 1000x Brock und 10 % Glycerin in 1 l ddH₂O. Der pH wurde mit KOH auf pH 5 eingestellt. Im Anschluss wurde die Lösung sterilfiltriert.

2.1.1.5. *Sulfolobus*-Fermenter-Medium

10x Base-Medium: 4 g (NH₄)₂SO₄, 5,6 g KH₂PO₄, 35 g K₂SO₄ auf
2 l ddH₂O, pH 3

200 ml 10x Base-Medium, 2 ml 1 M MgSO₄, 1 ml 1 M CaCl₂, 20 ml 10 mM Fe(III)citrat, 10 ml 20% NZ-Amin, 30 ml 20% Maltose bzw. Dextrin, 2 ml Trace Elements (siehe 2.1.1.3) auf 2 l ddH₂O. Für die Kultivierung von Shuttle-Vektor-freien *S. acidocaldarius* MR31-Zellen mussten noch 20 µg/ml Uracil zugegeben werden.

2.1.2. Oligodesoxynukleotide

Alle Oligodesoxynukleotide wurden entweder von Metabion (Planegg-Martinsried, D) oder Microsynth (Balgach, CH) bezogen.

Tabelle 2-12: Oligodesoxynukleotide zur Klonierung von Punktmutanten von SSO1949

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Klonierung von
W193A.for	GCGTCTGACGCTGCGATCGTACGGCCTCAAATAGC	pET28c_SSO1949
W193A.rev	GCTATTTGAGGCCGTACGATCGCAGCGTCAGACGC	W193A
W258A.for	GATGAAGAACGTCCCAGCGGGAGGTTGGGAGT	pET28c_SSO1949
W258A.rev	ACTCCCAACCTCCCGCTGGGACGTTCTTCATC	W258A
W261A.for	GAAGAACGTCCCGTGGGGAGGTGCGGAGTACATAGC	pET28c_SSO1949
W261A.rev	GCTATGTACCCGCACCTCCCCACGGGACGTTCTTC	W261A
Y263A.for	GGTTGGGAGGCCATAGCATTTTCGGCCGGATGGCTGG	pET28c_SSO1949
Y263A.rev	CCAGCCATCCGGCCGAAATGCTATGGCCTCCCAACC	Y263A
Y140A.for	ACTAATGGCGCTCCGGAGATCTACGTGGGCAGA	pET28c_SSO1949
Y140A.rev	TCTGCCACGTAGATCTCCGGAGCGCCATTAGT	Y140A
D187A.for	GACCCGTCAATAAACTTCGCTATTGCGTCTGAC	pET28c_SSO1949
D187A.rev	GTCAGACGCAATAGCGAAGTTTATTGACGGGTC	D187A

Tabelle 2-13: Oligodesoxynukleotide zur Klonierung von CelA und EglA

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Klonierung von
CelA_NheI.for	AGCTAGCATGGTGGTACTGATGACAAAACCGGGAA	
CelA_HindIII.rev	AAAGCTTTCATTCTCTCACCTCCAGATCAATAGAG	pET28c_CelA
CelA_BsaI.for	AGGTCTCGCATGGTGGTACTGATGACAAAACCG GGAA	
EglA_Nhe.for	AGCTAGCATATATTTTTGTAGAAAAGTATCATACCTCTG	
EglA_d58_Nhe.for	AGCTAGCGATGACGGTGAGTGGCCAGGAGCTCCT	pET28c_EglA
EglA_NotI.rev	AGCGGCCGCTTAGGAAATAAGAGGTCTATCTAGAGGAG	bzw.
EglA_BsaI.for	AGGTCTCGCATGATATATTTTTGTAGAAAAGTATCATACC	pET28c_EglA
EglA_d58_BsaI.for	AGGTCTCGCATGGAGACGGTGAGTGGCCAGGAGCT	d58
EglA_XhoI.rev	ACTCGAGTTAGGAAATAAGAGGTCTATCTAGAGGAG	

Tabelle 2-14: Oligodesoxynukleotide zur Klonierung von Punktmutanten von CelA

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Klonierung von
CelA_V63T.for	CCGGAAAGGTATACCCTAGGTTATCCCGAG	pET28c_CelA_
CelA_V63T.rev	CTCGGGATAACCTAGGGTATACCTTTCCGG	V63T
CelA_P111N.for	CGAACCTCTCTGAACTTGAACCTTGCC	pET28c_CelA_
CelA_P111N.rev	GGCAAAGTTCAGGTTCCAGAGAGGGTTCG	P111N
CelA_N113D.for	CGAACCTCTCTGCCTTTGGACTTTGCCATG GAAACA	pET28c_CelA_
CelA_N113D.rev	TGTTTCCATGGCAAAGTCCAAGGCAGAGA GGGTTCG	N113D
CelA_E117.for	CTTTGAACTTTGCCATGGACACATGGCTC GAGAAAAG	pET28c_CelA_
CelA_E117.rev	CTTTTCTCGAGTGAGCCATGTGTCCATGGCA AAGTTCAAAG	E117D
CelA_P111N_N113D.for	CACCACGAACCCTCTCTGAACTTGGACTTTG CCATGGAAACA	pET28c_CelA_
CelA_P111N_N113D.rev	TGTTTCCATGGCAAAGTCCAAGTTCAGAG GTTTCGTGGTG	P111N/N113D
CelA_P111N_N113D_	CGAACCTCTCTGAACTTGGACTTTGCCATG	
E117D.for	GACACATGGCTC	pET28c_CelA_
CelA_P111N_N113D_	GAGCCATGTGTCCATGGCAAAGTCCAAGTT	P111N/N113D/
E117D.rev	CAGAGAGGGTTCG	N117D
CelA_63_QWTN.for	CCGAAAGAACCGGAACAGTGGACCAACGGT TATCCCGAGTTT	pET28c_CelA_63 _QWTN

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Klonierung von
CelA_63_QWTN.rev	AAACTCGGGATAACCGTTGGTCCACAGTTC CGGTTCTTTGGC	pET28c_CelA_63 _QWTN
CelA_N113D_E117D.for	CGAACCCCTCTCTGCCTTTGGACTTTGCCATG GACACATGG	pET28c_CelA_
CelA_N113D_E117D.rev	CCATGTGTCCATGGCAAAGTCCAAAGGCAG AGAGGGTTTCG	N113D/E117D
CelA_63_QWVN.for	CCGAAAGAACCGGAACAGTGGGTAAACGGT TATCCCGAGTTT	pET28c_CelA_
CelA_63_QWVN.rev	AAACTCGGGATAACCGTTAACCCACTGTTCC GGTTCTTTGGC	63_QWVN
CelA_F233W.for	GGGAAATCGGAACCGAGTGGGGAAGC CCGAAACAAAAAGTGC	pET28c_CelA_
CelA_F233W.rev	GCACTTTTTGTTTTCCGGGCTTCCCCA CTCGGTTCCGATTTC	F233W.for

Tabelle 2-15: Oligodesoxynukleotide zur Klonierung von Punktmutanten von EglA und EglAd58

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Klonierung von
EglA_V122T.for	GATAGAAGTAATTGGACCCATGGATATCCG GAAATATTCTATGGA	pET28c_EglA_V122T bzw.
EglA_V122T.rev	TCCATAGAATATTTCCGGATATCCATGGGTC CAATTACTTCTATC	pET28c_EglA_V122T_ d58
EglA_P172N.for	CTTGAGCCCAAGAACGGTCTCAACATTA TCGC	pET28c_EglA_P172N bzw.
EglA_P172N.rev	GCGAAGTTAATGTTGAGACCGTTCTTGGGC TCAAG	pET28c_EglA_P172N_ d58
EglA_N174D.for	GAGCCCAAGAACGGTCTCCAATTGACTTC GCAATAGAATCC	pET28c_EglA_P174D bzw.
EglA_N174D.rev	GGATTCTATTGCGAAGTCAATTGGGAGACC GTTCTTGGGCTC	pET28c_EglA_P174D_ d58
EglA_E178D.for	ATTAACTTCGCAATTGACTCCTGGTTAACGA GAG	pET28c_EglA_E178D bzw.
EglA_E178D.rev	CTCTCGTTAACCAGGAGTCAATTGCGAAGTT AAT	pET28c_EglA_E178D_ d58
EglA_E196D.for	GAGAACAACAGGAATTAATAGCGATGACCA AGAAGTAATG	pET28c_EglA_E196D bzw.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Klonierung von
EgIA_E196D.rev	CATTACTTCTTGGTCATCGCTATTAATTCCTG TTGTTCTC	pET28c_EgIA_E196D_ d58
EgIA_I239W.for	GTATGGAAGGCAAACCTGGGGTTGGGAGTAC GTAGCATTTAGAATA	pET28c_EgIA_I239W bzw.
EgIA_I239W.rev	TATTCTAAATGCTACGTACTCCCAACCCCAG TTTGCCTTCCATAC	pET28c_EgIA_I239W_ d58

Tabelle 2-16: Oligodesoxynukleotide zur Klonierung der Hybridproteine CelA_SSO1949_CelA und SSO1949_CelA_SSO1949

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Klonierung von
1_1949_CelA.rev	CAGGGTTT TCTGCCACATAAACTCGGGATAAC	
2_CelA_1949.for	GTTATCCCGAGTTTTATGTGGGCAGAAAACCCCTG	
3_CelA_1949.rev	CTTCCAAACTCGGTTCCGAACTCCCAATCCGTTA	pET28c_CelA_SSO
4_1949_CelA.for	TAACGGATTGGGAGTTCGGAACCGAGTTTGGAAAG	1949_CelA

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Klonierung von
5_CelA_1949.rev	TTGAAATAGAACCAGACCATTATCTCAATGTCCC	
6_1949_CelA.for	GGGACATTGAGATAATGGTCTGGTTCTATTTCAA	
7_1949_CelA.rev	TAATAGTTTGTAAATGTTAGCAGAACTCGAAAGAG	pET28c_SSO1949
8_CelA_1949.for	CTCTTTCGAGTTCTGCTAACATTACAACTATTA	_CelA_SSO1949

Tabelle2-17: Oligodesoxynukleotide zur Expression von SSO1949 in *Sulfolobus*

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Klonierung von
Sso1949_signal.for	GGCGTCTCGCATGATAATGAATAAATTATATAT	Vektoren für
Sso1949_HindIII.rev	GGAAGCTTGAGGAGAGTTTCATAGAAATTC	<i>Sulfolobus</i> - Expression
QC_pdelPE_1949_ BamHI.for	GTAATTGGTGGAGCTGGATCCCTACACCATCAG TCA	
QC_pdelPE_1949_ BamHI.rev	TGACTGATGGTGTAGGGATCCAGCTCCACCAAT TAC	SSO1949 mit N- terminalen His-tag
SSO1949Nhis.for	AAGGATCCATCATCATCATCACAGCAGCGG CCTG	für <i>Sulfolobus</i> - Expression
SSO1949Nhis.rev	AAGCGGCCGCTTAGAGGAGAGTTTCATAGAAA TTCGATAT	

Tabelle 2-18: Oligodesoxynukleotide zur Verbesserung der Löslichkeit von SSO1949 bei rekombinanter Expression in *E. coli*

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Klonierung von
SSO1949_BamHI.for	AGGATCCGCTATTTACCTACACCATCAGTCACCT	pET32a_SSO1949
SSO1949_XhoI.rev	ACTCGAGTTAGAGGAGAGTTTCATAGAAATTCG ATATTGT	Trx
SSO1949_d53_BamHI.for	AGGATCCTCTGCTAGTTCACCAACTCCAGTTTAT CTA	pET32a_SSO1949 d77Trx
SSO1949_d64_BamHI.for	AGGATCCCTAAATAACTCAACTGTACCATCATTT TATC	pET32a_SSO1949 d86Trx
QC_loop_LV.for	CCAATATATATAAATCACACTAACGCCACTTTCC AAGTGTGG	
QC_loop_LV.rev	CCCACTTGGAAAGTGGCGTTAGTGTGATTTAT ATATATTGG	Verkürzung des hydrophoben
QC_loop_VI.for	GGGCAACAAGTTGGAGAAGTACCAATATATATA AATCACACT	Loops
QC_loop_VI.rev	AGTGTGATTTATATATATTGGTACTTCTCCA TGTTGCC	
QC_F_C-Term.for	TGGACAATATCGAATTAATATGGATCCCTCCTC	Entfernen von 6
QC_F_C-Term.rev	GAGGAGGATCCATATTAATTCATATTGTCCA	AS am C-Terminus

Tabelle 2-19: Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Sequenzierung von
pJET1.2.for	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	pJET/1.2 blunt-Vektor
pJET1.2.rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	
T7-Prom	TAATACGACTCACTATAG GG	pET28c-Vektor
T7-Term	GCTAGTTATTGCTCAGCG	

2.2. Methoden

2.2.1. Elektrophoretische Methoden

Durch Gelelektrophorese können Nukleinsäuren oder Proteine im elektrischen Feld innerhalb eines festen Trägermaterials entsprechend ihrer Grösse aufgetrennt werden. Bei dem Trägermaterial handelt es sich entweder um Agarose oder Polyacrylamid.

2.2.1.1. Agarose-Gelelektrophorese

1x TBE-Puffer:	90 mM Tris/Borat, pH 8.3, 1 mM EDTA
Probenpuffer:	75% (v/v) Glycerin, 0.1% (w/v) Xylencyanol, 0.1% (w/v) Bromphenolblau, 1 mM EDTA

Die analytische und präparative Auftrennung großer DNA-Fragmente erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese. In Abhängigkeit von den darzustellenden Fragmentgrößen wurden 1 – 2 prozentige Lösungen von Agarose in Laufpuffer angesetzt und durch Erhitzen in einer Mikrowelle geschmolzen. Nach dem Abkühlen der Lösungen wurden die Gele in die Gellaufkammer gegossen und die Kämme gesetzt. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V. Die Detektion der Banden erfolgte mittels Ethidiumbromid-Färbung (2.2.2.1).

Wenn nötig wurden die DNA-Fragmente für eine anschließende Präparation mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und isoliert wie in 2.2.3.3.

2.2.1.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schaeffer und von Jagow (SDS-PAGE)

3x S/J-Puffer:	3 M Tris/HCl, pH 8.45, 0.3% (w/v) SDS
Kathodenpuffer:	0.1 M Tris/HCl, 0.1 M Tricin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8.25
Anodenpuffer:	0.2 M Tris/HCl, pH 8.9
Probenpuffer:	0.1 M Tris/HCl, pH 6.8, 8% (w/v) SDS, 24% (v/v) Glycerin, 4% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0.02% (v/v) Coomassie 250 G, 6 M Harnstoff

Die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schaeffer und von Jagow (Schaeffer *et al.*, 1987) ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen nach ihrer Grösse. Durch die Verwendung von Chlorid als Leition ist diese Methode besonders geeignet für Proteine im Bereich von 5 bis 100 kDa. Sie wurde zur analytischen Trennung von Proteingemischen bei der Testexpression und Proteinlokalisierung sowie zur Kontrolle der Proteinaufreinigung verwendet. Dazu wurde auf ein 9%iges Trenngel (3 ml 3x S/J-Puffer, 2 ml ddH₂O, 2 ml 40% Acrylamidlösung, 2 ml 64%iges Glycerin, 100 µl 10% (w/v) APS und 10 µl TEMED) ein 6%iges Sammelgel (0,75 ml 40% Acrylamidlösung, 1,25 ml 3x Gelpuffer, 3 ml ddH₂O, 100 µl APS, 10 µl TEMED) in einer Mighty Small™ -Gelgiesskammer polymerisiert. Die Proben wurden mit einem Volumen Probenpuffern versetzt und vor dem Auftragen 5 min bei 95°C denaturiert. Die Trennung erfolgte bei 18 W für 40 min.

2.2.2. Detektion von Nukleinsäuren und Proteinen in Gelen

2.2.2.1. Detektion von DNA mittels Ethidiumbromid

Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Helix. Dabei fluoresziert das Ethidiumbromid bei einer Anregungswellenlänge von ca. 320 nm orange. Die Agarosegele wurden für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) gefärbt und nicht interkaliertes Ethidiumbromid durch kurzes Waschen mit bidestilliertem Wasser entfernt. Die Visualisierung und Dokumentation erfolgte auf einem Transilluminator (Gel iX, Intas, Göttingen). Eine semiquantitative Abschätzung der DNA-Konzentration ist dabei über einen Vergleich mit dem verwendeten Standard möglich.

2.2.2.2. Coomassie-Färbung

Färbelösung: 10% Essigsäure, 30% Ethanol, 0.2% Coomassie 250 G in ddH₂O

Entfärbelösung: 10% Essigsäure, 30% Ethanol in ddH₂O

Mittels der Coomassie-Färbung können Proteine ab einer Menge von ca. 100 ng sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde nach der Elektrophorese für etwa eine Stunde unter Schütteln in der Färbelösung gefärbt und im Anschluss daran unter mehrmaligem Wechseln mit dem Entfärber 2-3 h entfärbt, bis der Gelhintergrund fast farblos war und die einzelnen Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Zur Archivierung wurden die Gele mittels Vakuum (<100 mbar, 80°C) 60 min getrocknet.

2.2.2.3. Westernblot

Mit Hilfe von Westernblot konnten auch geringe Mengen an rekombinanten Proteinen, die einen Hexahistidinrest besitzen, nachgewiesen werden.

Transfer mittels *semi-dry blotting*

Transferpuffer: 0.1 M Tris/HCl, 0.1 M Tricin, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.25

Hierzu wurde zunächst eine SDS-PAGE wie unter 2.2.1.2 beschrieben durchgeführt. Als Marker wurde ein Prestained Marker (Fermentas) verwendet. Im Anschluss wurden die Proteine aus den ungefärbten Gelen auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, indem 2 Filterpapiere, das SDS-Gel, die Nitrocellulosemembran und 2 weitere Filterpapiere in einer Blot-Apparatur (HEP-1 Panther, Owl Separation Systems) übereinandergelegt wurden. Das Blotting erfolgte bei 1-2 mA/cm² für mindestens 1,5 h.

Antikörperreaktion

TBS-T:	138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.7 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.4 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.5, 0,02% Tween 20
Blockierungspuffer:	5% (w/v) Milchpulver in TBS-T
AP-Puffer:	100 mM Tris/HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂

Nach dem Blotten wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran durch 1stündige Inkubation in Blockierungspuffer gesättigt. Danach wurde die Membran dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen und dann mit dem primären Antikörper anti-His₆ aus Maus (1:3000 in TBS-T) für mindestens 1 h unter Schütteln inkubiert. Nach dieser ersten Inkubation wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen und im Anschluss mit dem sekundären Antikörper anti-Maus aus Kaninchen, der an alkalische Phosphatase gekoppelt ist, für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Im Folgenden wurde nochmals dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen.

Zur Farbentwicklung wurde die Membran in 20 ml AP-Puffer transferiert und jeweils 100 µl 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (15 mg/ml in DMF) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (30 mg/ml in 70% (v/v) DMF) zugegeben. Die Membran wurde so lange lichtgeschützt inkubiert, bis deutliche Signale erkennbar waren. Proteine mit einem His₆-Tag sind als violette Proteinbanden auf der Membran zu erkennen. Zum Stoppen der Reaktion wurde die Membran mit H₂O gewaschen und zur Aufbewahrung getrocknet.

2.2.2.4. Silberfärbung

Zum Nachweis von Proteinmengen, die unter der Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung liegen, wurde die Silberfärbung verwendet.

Für die Silberfärbung wurde das PageSilver-Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) nach der Vorschrift des Herstellers verwendet. Zur Archivierung wurden die Gele mittels Vakuum (<100 mbar, 80°C) 60 min getrocknet.

2.2.3. Isolierung und Reinigung von DNA**2.2.3.1. Phenol/Chloroform-Präparation von Plasmid-DNA**

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA

Zur schnellen Kontrolle neuer Plasmide nach Ligationen wurde eine Phenol/Chloroform-Reinigung von DNA angewendet. Dazu wurden nach der Transformation einer Ligation (2.2.4.4) in *E. coli* XL1Blue 18 Klone in jeweils 750 µl LB-Medium plus dem jeweiligen Antibiotikum bei 37°C über Nacht geschüttelt. Dann wurden 500 µl der Kultur

entnommen, mit 500 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und durch Vortexen gut gemischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben bei 15 000 g für 5 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, welche die DNA enthält, wurde abgenommen und mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei 15 000 g für 10 min wurden die Pellets mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet. Danach wurden sie in 25 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase A resuspendiert und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten.

2.2.3.2. Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA mit Kit

Für die Isolierung größerer Mengen doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde das peqGold Plasmid Miniprep Kit II (peqlab, Erlangen) verwendet. Die DNA wird unter Hochsalzbedingungen an eine Silikamatrix adsorbiert und mit einem Niedrigsalzpuffer eluiert. Dafür wurden 4 bis 10 ml einer *E. coli*-Kultur eingesetzt und nach Vorschrift des Herstellers bearbeitet.

2.2.3.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und PCR-Ansätzen

Zur Isolierung bzw. Reinigung von DNA-Fragmenten wurde das peqGold Gel Extraction Kit (peqlab, Erlangen) verwendet. Dieses Kit nutzt ebenfalls die Adsorption von DNA an eine Silikamatrix. Auch hier wurde nach der Anleitung des Herstellers gearbeitet.

2.2.3.4. Bestimmung der Konzentration von DNA

Die DNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop bestimmt. Zusätzlich wurde das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} berechnet, welches idealerweise einen Wert von 2.0 annehmen sollte.

2.2.4. Klonierung

2.2.4.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.4.1.1. PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die PCR ist ein Verfahren, bei welchem Nukleinsäureabschnitte exponentiell bzw. linear amplifiziert, aber auch mutagenisiert werden können. Bei diesem Verfahren wurde eine dreistufige, zyklische Reaktion angewandt, die in folgende Schritte unterteilt ist: Denaturierung, Oligodesoxynukleotidanlagerung und Verlängerung.

Reaktionspuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1% Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA

Bei der PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde ein Gemisch aus *Taq*- und *Pfu*-DNA-Polymerase (25:1 U:U) verwendet, da die 3'-5' Exonuklease-Aktivität der *Pfu*-Polymerase zu einer verminderten Fehleranzahl gegenüber der *Taq*-Polymerase allein führt. Die verwendeten Primer sind unter 2.1.2 aufgeführt. In einem Reaktionsansatz von 10 μl wurden 1 x Reaktionspuffer, 200 μM dNTPs, 1 μM Forward- und Reverse-Primer und ca. 2 ng Templat-DNA eingesetzt. Die Hybridisierungstemperatur (meist zwischen 45 und 60°C) und die Verlängerungszeit der Primer (ca. 1 min/kb Templat) wurden für jede PCR individuell optimiert. Nach der PCR wurde die amplifizierte DNA wenn nötig über ein Agarose-Gel gereinigt (siehe 2.2.3.3). Alle mit PCR generierten DNA-Fragmente wurden durch die Firma MWG (Ebersberg) mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

2.2.4.1.2. Quikchange-Mutagenese

Die Quikchange-Mutagenese wurde nach Vorgabe des Herstellers Stratagene (La Jolla, USA) durchgeführt. Um spezifische Mutationen in das Gen von SSO1949 bzw. CelA einzuführen, wurden zwei komplementäre Primer eingesetzt, welche beide die gewünschte Modifikation der Sequenz enthielten (siehe 2.1.14). Zur Verlängerung der Primer wurde *Pfu*-Polymerase in dem unter 2.2.4.1.1 aufgeführten PCR-Reaktionspuffer verwendet und ca. 25 ng DNA-Templat eingesetzt. Es wurden 16 Zyklen durchgeführt, was zusammen mit der Verwendung der *Pfu*-Polymerase zu einer Verringerung von Fehlern bei der PCR führte. Anschließend wurde das methylierte DNA-Templat mittels *DpnI* verdaut. *DpnI* schneidet seine Erkennungssequenz GATC nur, wenn das Guanin methyliert vorliegt. Die verbleibende neu synthetisierte DNA wurde in *E. coli* XL1Blue transformiert, anschließend präpariert und sequenziert.

2.2.4.2. Spaltung mit Restriktionsenzymen

Restriktionsanalysen von DNA-Molekülen wurden mit Restriktionsendonukleasen (NEB, Frankfurt am Main) durchgeführt. Diese sind bakteriellen Ursprungs und spalten die Phosphodiesterbindungen an den Erkennungsstellen der doppelsträngigen Nukleinsäuren. Restriktionsenzyme wurden eingesetzt, um DNA-Fragmente für Klonierungen zu isolieren und um die gespaltenen DNA-Moleküle mit Hilfe elektrophoretischer Auftrennung charakterisieren zu können.

Alle Restriktionen wurden nach Angaben des Herstellers in den jeweils vorgesehenen Puffern und evtl. mit Zugabe von BSA angesetzt. Die Inkubationstemperatur war

abhängig vom verwendeten Enzym, allerdings betrug sie in den meisten Fällen 37°C. Die erfolgreiche Restriktion wurde anschliessend auf einem DNA-Agarosegel überprüft. Im Falle von präparativen Restriktionen wurden die DNA-Fragmente im Anschluss mit Hilfe eines Agarose-Gels aufgetrennt und das gewünschte Fragment isoliert und aufgereinigt (2.2.3.3).

2.2.4.3. Enzymatische Dephosphorylierung

AP-Puffer: 50 mM Bis-Tris-Propan/HCl, pH 6.0, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂

Für die Dephosphorylierung des 5'-Terminus von DNA-Molekülen wurde antarktische Phosphatase (AP, New England Biolabs) eingesetzt. Dabei wurde nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Nach der Dephosphorylierung wurde das Enzym durch eine 5-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Plasmide wurden vor dem Einsatz in Ligationen stets dephosphoryliert, um die Möglichkeit einer Selbstligation zu verringern.

2.2.4.4. Ligation

Ligasepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP

Ligationen wurden mit T4-DNA-Ligase in 1x Ligasepuffer durchgeführt. Alle Ligationen wurden bei ca. 16°C über Nacht inkubiert. Dabei erfolgt eine kovalente Verknüpfung zwischen Vektor-DNA und einzufügendem DNA-Fragment (Insert). Anschließend wurde *E. coli* XL1-Blue mit dem gesamten Ligationsansatz (10 µl) transformiert.

2.2.4.5. Verwendung von Klonierungsvektoren

Zur Vereinfachung der Klonierung wurden PCR-Fragmente, welche durch Reaktionen mit *Taq*- und *Pfu*-Polymerase gewonnen wurden, im Anschluss in den Klonierungsvektor pJET1.2/blunt (Fermentas, St. Leon-Rot) ligiert. Dieser Vektor liegt linear vor und besitzt glatte Enden. Da mit *Taq*-Polymerase synthetisierte PCR-Fragmente einen A-Überhang besitzen, müssen diese zunächst mit einem Blunting-Enzym verdaut werden. Mit *Pfu*-Polymerase generierte Fragmente können direkt in den Vektor ligiert werden. Dabei wurde nach den Vorschriften des Herstellers verfahren. Diese Plasmide konnten dann mit Hilfe der im Kit vorhandenen Primer sequenziert werden und wurden für die weitere Klonierung verwendet.

2.2.5. Transformation von *E. coli*

2.2.5.1. Herstellung RbCl-kompetenter *E. coli* – Zellen

TfbI: 30 mM KOAc, pH 5.8, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin

TfbII: 10 mM NaMOPS, pH 6.5, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% (v/v) Glycerin

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 100 ml Psi-Medium (für plasmidtragende Zellen mit Antibiotikum) in einem Schikanekolben mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Daraufhin erfolgte eine mehrstündige Inkubation bei 37°C unter Schütteln. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde das Wachstum gestoppt und die Kultur auf Eis gekühlt. Danach wurden die Zellen pelletiert (4000 g, 5 min, 4°C) und in 40 ml kaltem TfbI (2/5 des Ausgangsvolumens) resuspendiert. Es folgte eine 15 minütige Inkubation auf Eis. Nach einer erneuten Zentrifugation (4000 g, 5 min, 4°C) wurden die Zellen in 4 ml kaltem TfbII (1/25 das Ausgangsvolumens) aufgenommen, in sterile Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem N₂ eingefroren. Die Aliquots wurden bei -70°C gelagert.

2.2.5.2. Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 10 ml LB-Medium (für plasmidtragende Zellen mit Antibiotikum) mit 100 µl Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 inkubiert. Danach wurden die Zellen 10 min auf Eis abgekühlt und im Anschluss 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml eiskaltem CaCl₂ resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und 4 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 500 µl eiskaltem CaCl₂ resuspendiert. Schließlich wurden Aliquots von je 100 µl in sterile Eppis pipettiert, die bis zur anschließenden Transformation auf Eis aufbewahrt wurden.

2.2.5.3. Hitzeschocktransformation

Um Plasmide oder Ligations- bzw. Quikchange-Produkte zu transformieren, wurden die RbCl-kompetenten Zellen 5 min auf Eis aufgetaut. Dann wurden entweder ca. 1-10 ng Plasmid-DNA oder der gesamte Ligations- bzw. Quikchange-Ansatz zugegeben. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min wurde ein 90-sekündiger Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium gemischt und zur Regeneration 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 2000 g wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet im Rücklauf (ca. 100 µl) resuspendiert und auf

LB-Selektivplatten (mit dem entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert. Auf diesen Platten wachsen spezifisch nur die Klone, welche das Plasmid aufgenommen haben.

2.2.6. Expression und Aufreinigung von Proteinen

Für die Überexpression aller Proteine wurde der Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-Ril sowie *E. coli* BL21 AI verwendet. *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-Ril wurde für die Expression heterologer Proteine entwickelt. Er enthält ein pACYC-basiertes, CoLE1-kompatibles Plasmid (pRARE, camR) welches tRNAs für folgende, in *E. coli* selten genutzte Codons kodiert: AUA (*ileY*), AGG, AGA (beide *argU*), CUA (*leuW*). Außerdem fehlen ihm die Lon und OmpT Proteasen, welche rekombinante Proteine lysieren könnten. Darüber hinaus ist er ein Lysogen des Phagen λ DE3 und enthält somit eine Kopie der T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors. Das ermöglicht eine Nutzung des pET-Systems (Studier & Moffatt, 1986) zur Überexpression von Proteinen nach Induktion mit IPTG. *E. coli* BL21 AITM ermöglicht die bestmögliche Regulation für die Expression von toxischen Proteinen. Der Stamm enthält eine chromosomale Kopie der T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des Arabinose induzierbaren *araBAD*-Promoters. Der *araBAD*-Promoter reguliert die Expression der T7-RNA-Polymerase und somit die Expression des gewünschten Genes in einem T7-vermittelten Expressionssystem.

Des Weiteren wurde Cella mit Chaperonen koexprimiert. Für die Koexpression wurden *E. coli* BL21(DE3)-Stämme verwendet, die je eines der in Tabelle 2-20 sowie in Abb. 2-1 dargestellten Plasmide enthielten, welche für verschiedene Chaperone codieren. Die Chaperonexpression wurde durch Zugabe von L-Arabinose (*araB*-Promotor) und/oder Tetracyclin (Pzt1-Promotor) induziert. Als Resistenzmarker diente Chloramphenicol (20 μ g/ml).

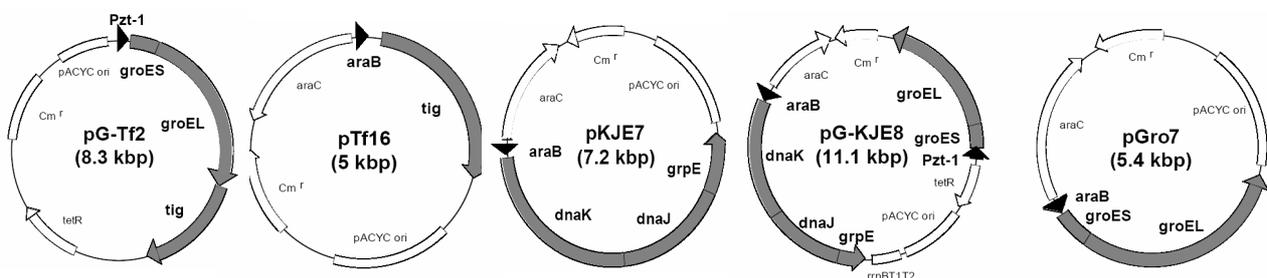


Abbildung 2-1: Chaperon-Plasmide (www.takara-bio.com)

Tabelle 2-20: Für Koexpression verwendete Plasmide und exprimierte Chaperone

Plasmid	Chaperone	Promotor	Induktor	Resistenzmarker
pG-KJE8	DnaK-DnaJ-GrpE	<i>araB</i>	L-Arabinose	Chloramphenicol
	GroES-GroEL	<i>Pzt1</i>	Tetracyclin	
pGro7	GroES-GroEL	<i>araB</i>	L-Arabinose	Chloramphenicol
pKJE7	DnaK-DnaJ-GrpE	<i>araB</i>	L-Arabinose	Chloramphenicol
pG-Tf2	GroES-GroEL-Tf	<i>Pzt1</i>	Tetracyclin	Chloramphenicol
pTf16	Tf	<i>araB</i>	L-Arabinose	Chloramphenicol

Die exprimierten Chaperone besitzen folgende Größen:

- GroEL ~ 60 kDa
- GroES ~ 10 kDa
- DnaK ~ 70 kDa
- DnaJ ~ 40 kDa
- Tf (Triggerfaktor) ~ 56 kDa
- GrpE ~ 22 kDa

2.2.6.1. Test auf Überexpression

Um die Überexpression der verschiedenen Proteine zu überprüfen, wurden jeweils drei Klone der entsprechenden *E. coli* BL21-Stämme, die mit dem jeweiligen Plasmid, transformiert sind, getestet. Dazu wurden in einer 48well-Platte Kulturen von je 750 µl angesetzt und bis zu einer $OD_{600} \approx 0,6$ bei 37°C geschüttelt. Für die Koexpression von CelA mit Chaperonen sind dem Medium noch Arabinose und Tetracyclin zuzusetzen (Tabelle 2-21). Dann wurden 200 µl der Kultur abgenommen, mit 20 µl 80% Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert. Zu den restlichen 550 µl wurde IPTG (Endkonzentration 1mM) gegeben, um die Proteinexpression zu induzieren. Für die Expression in *E. coli* BL21 AI musste zusätzlich noch L-Arabinose (Endkonzentration 0.2 %) zugegeben werden. Nach 4 h wurden 200 µl jeder Kultur abzentrifugiert (15 000 g, 1 min, 4°C) und das Pellet in 25 µl ddH₂O resuspendiert. Die Zellen wurden durch 5-minütige Inkubationen bei 95°C und im Ultraschallbad aufgeschlossen. Daraufhin wurden sie mit 25 µl SDS-Probenpuffer mit 6 M Harnstoff versetzt und mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Kontrolle diente eine Kultur, welche nicht induziert wurde. Die Überexpression konnte durch das Auftreten einer verstärkten Bande des entsprechenden Molekulargewichts nach der Induktion visualisiert werden. Im Falle einer Überexpression wurden die Glycerinkulturen bei -70°C gelagert und als Ausgangskultur für die folgenden Fermentationen genutzt.

Tabelle 2-21: Vorbereitung des Mediums für die Testexpression von C_{el}A mit Chaperonen

Bakterienstamm + Plasmide	Antibiotikum	Induktor
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	50 µg/ml Kanamycin	-
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pGro7	50 µg/ml Kanamycin 20 µg/ml Chloramphenicol	7,5 µl L-Arabinose (50 g/l)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pKJE7	50 µg/ml Kanamycin 20 µg/ml Chloramphenicol	7,5 µl L-Arabinose (50 g/l)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pG-KJE8	50 µg/ml Kanamycin 20 µg/ml Chloramphenicol	7,5 µl L-Arabinose (50 g/l) 3,2 µl Tetracyclin (1,2 mg/l)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pTf16	50 µg/ml Kanamycin 20 µg/ml Chloramphenicol	7,5 µl L-Arabinose (50 g/l)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pG-Tf2	50 µg/ml Kanamycin 20 µg/ml Chloramphenicol	3,2 µl Tetracyclin (1,2 mg/l)

2.2.6.2. Lokalisation des überexprimierten Proteins

Von positiv getesteten Kulturen wurden 100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit 350 µl Übernachtskultur angeimpft. Für die Koexpression von C_{el}A mit Chaperonen müssen dem Medium noch Tetracyclin und Arabinose zugesetzt werden. Die Vorbereitung des Mediums ist aus Tab. 2-22 zu entnehmen. Im Gegensatz zur Testexpression wurde hier die halbe Induktorenkonzentration zur Expression der Chaperone verwendet, da diese ausreichend ist.

Tab. 2-22: Vorbereitung des Mediums für die Überexpression von C_{el}A mit Chaperonen

Bakterienstamm + Plasmide	Antibiotikum	Induktor
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	100 µl Kanamycin (50 g/l)	-
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pGro7	100 µl Kanamycin (50 g/l) 60,6 µl Chloramphenicol (33 g/l)	500 µl L-Arabinose (50 g/l)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pKJE7	100 µl Kanamycin (50 g/l) 60,6 µl Chloramphenicol (33 g/l)	500 µl L-Arabinose (50 g/l)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pG-KJE8	100 µl Kanamycin (50 g/l) 60,6 µl Chloramphenicol (33 g/l)	500 µl L-Arabinose (50 g/l) 2,1 µl Tetracyclin (120 mg/l)

Bakterienstamm + Plasmide	Antibiotikum	Induktor
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pTf16	100 µl Kanamycin (50 g/l) 60,6 µl Chloramphenicol (33 g/l)	500 µl L-Arabinose (50 g/l)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pG-Tf2	100 µl Kanamycin (50 g/l) 60,6 µl Chloramphenicol (33 g/l)	2,1 µl Tetracyclin (120 mg/l)

Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,6 wurde die Proteinexpression mit 100 µl IPTG (1 M) induziert und die Kultur für weitere 3-4 h bei 37°C geschüttelt. Schließlich wurden die Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 2000 g und 4°C geerntet. Das Pellet wurde bis zur Präparation bei -20°C gelagert.

Das Pellet von je 100 ml Kultur wurde in 5 ml 0,5x PBS-Puffer resuspendiert, mit 50 µl Lysozym (100 mg/ml) und 100 µl 5% Triton X-100 versetzt und durch leichtes Schütteln gemischt. Nach 30minütiger Inkubation aus Eis wurden die Zellen 3 min mit Ultraschall behandelt (50% Puls, Stufe 4) und 30 min bei 20 000 g und 4°C zentrifugiert. Der Rohextrakt wurde abgenommen und das verbliebene Pellet in 5 ml 100 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff pH 8 gelöst und nochmals 20 min bei 20 000 g zentrifugiert. Zur Analyse mittels SDS-Gel wurden die Proben mit dem gleichen Volumen Auftragspuffer versetzt.

2.2.6.3. Fermentation und Aufschluss der Zellen

Die Fermentation der Zellen erfolgte für alle Proteine bei Raumtemperatur ($\approx 22^\circ\text{C}$), da hierbei die Menge und Qualität des exprimierten Proteins optimal waren.

Die Fermentation erfolgte in 2 l LB-Medium, welches mit den notwendigen Antibiotika versetzt wurde. Zur Inokulation wurden 10 ml einer über Nacht bei 37°C gewachsenen Vorkultur genutzt. Bei einer $OD_{600} \approx 0,6$ wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG bzw. 0.2% L-Arabinose die Proteinexpression induziert. Nach ca. 20 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (8000 g, 10 min, 4°C) geerntet und bei -20°C gelagert.

Für die Aufreinigung von CelA und EglA wurden die Zellen in 20 ml Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.0) aufgetaut und resuspendiert. Für die Aufreinigung von SSO1949 erfolgte die Resuspension in 20 ml PBS-Puffer. Nach vollständiger Resuspension wurde die Lösung mit 200 µl Lysozym (100 g/l) und 400 µl 5% Triton X-100 versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde hochviskos. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (Sonifier B15, Branson) für 10 min bei Ultraschallstufe 4.5 mit 50% Leistung (pulsed) aufgeschlossen. Anschliessend wurden die größeren Zellbruchstücke für 20 min bei 4°C und 20 000 g abzentrifugiert.

2.2.6.4. Aufreinigung von löslichem Protein

2.2.6.4.1. ÄKTA-gestützte Anionenaustauscherchromatographie

Puffer A: 20 mM Tris/HCl, pH 8

Puffer B: 20 mM Tris/HCl, pH 8, 1 M NaCl

Alle Varianten von CelA wurden im ersten Schritt über eine 5 ml HiTrap™ Q FF-Anionenaustauschersäule (GE Healthcare, Glattbrugg, Schweiz) gereinigt und aufkonzentriert. Dabei wurde der pH-Wert jeder Proteinvariante auf pH 8 eingestellt, um die Bindung des Proteins an die Säulenmatrix aufgrund seiner negativen Ladung zu gewährleisten. Die Chromatographie wurde an einer ÄKTA-Explorer (GE Healthcare, Glattbrugg, Schweiz) durchgeführt. Die Säule wurde mit 5% Puffer B in A äquilibriert. Der Rohextrakt nach dem Zellaufschluss, der lösliches Protein enthält, wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 ml/min aufgegeben. Nach dem Waschen mit dem Auftragspuffer wurde die Säule mit einem Gradienten von 100 bis 1000 mM NaCl entwickelt. Dabei wurden 5 ml Fraktionen gesammelt und die Absorption dieser Fraktionen bei 280 nm und 215 nm wurde aufgezeichnet. Die Elutionsfraktionen wurden auf einem Proteingel analysiert.

2.2.6.4.2. ÄKTA-gestützte Hydrophobe Interaktionschromatographie

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 8, 2 M Ammoniumsulfat

Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH 8

Für alle Varianten von CelA wurden die Fraktionen nach dem ersten Aufreinigungsschritt, welche Protein enthielten vereinigt und auf 2 M Ammoniumsulfat eingestellt. Durch das Salz wird den Proteinen die Hydrathülle entzogen. Dadurch verringert sich die Löslichkeit des Proteins und es bindet an die ebenfalls hydrophoben Gruppen der Gelmatrix. Die Chromatographie wurde an einer ÄKTA-Explorer (GE Healthcare, Glattbrugg, Schweiz) durchgeführt. Die Säule (EMD-Propyl, Merck) wurde mit 5% Puffer B in A äquilibriert. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min aufgegeben. Nach dem Waschen mit dem Auftragspuffer wurde die Säule mit absteigender Ammoniumsulfatkonzentration eluiert. Proteine mit weniger apolaren Gruppen werden dabei eher eluiert. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und die Absorption dieser Fraktionen bei 280 nm und 215 nm wurde aufgezeichnet. Die Elutionsfraktionen wurden auf einem Proteingel analysiert.

2.2.6.4.3. Dialyse der Proteine

Dialysepuffer: 20 mM Na-Phosphat, pH 7.0, 50% (v/v) Glycerin, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 150 mM NaCl

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Proteine nach der Aufreinigung gegen einen glycerinhaltigen Puffer dialysiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie bei -20°C gelagert.

2.2.6.4.4. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen aller Proteine wurden spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurden die Proteine verdünnt und es wurde mit einem PerkinElmer Lambda 25 UV/Vis-Spektrophotometer ein UV-Absorptionsspektrum von 220 bis 320 nm aufgenommen. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm. Als Referenz diente der entsprechende Puffer. Die Proteinkonzentration wurde nach Ehresmann (Ehresmann *et al.*, 1973) berechnet. Da die Mehrheit der untersuchten Proteine mit DNA interagieren kann, wurde außerdem das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Wenn dieses unterhalb von 0.6 lag, wurden die Proteine ohne weitere Aufreinigung verwendet.

$$\text{Protein (mg/ml)} = \frac{A_{228,5} - A_{234,5}}{3,14} \quad \text{Gleichung 1}$$

(Ehresmann *et al.*, 1973)

2.2.6.5. Aufreinigung von unlöslichem Protein aus "Inclusion Bodies"

2.2.6.5.1. Aufreinigung von SSO1949

Waschen aus "Inclusion Bodies"

Puffer A: 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 3, 8 M Harnstoff, 0.2% β -Mercaptoethanol

Puffer B: 45 mM Tris/ H_3PO_4 , pH 8, 6 M GdmCl, 0.2% β -Mercaptoethanol

Puffer C: 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 8 M Harnstoff

Das nach dem Zellaufschluss unter 2.2.6.3 verbliebene Pellet, welches unlösliches SSO1949 enthält, wurde mit 20 ml 5% Triton X-100 gewaschen. Im Anschluss wurde der „Inclusion Body“ in 20 ml Puffer A durch Vortexen vollständig resuspendiert und bei 20 000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand erneut in 20 ml Puffer A resuspendiert. Nach der Zentrifugation bei 20 000 g und 4°C für 15 min im SS34-Rotor wurde der Überstand verworfen und der Rückstand noch einmal nach gleichem Schema mit Puffer A behandelt. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 10 ml Puffer B gelöst und nochmals bei 20 000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Zur Analyse mittels SDS-PAGE wurden 50 μ l des Überstandes (pH 4.5), welcher das Protein enthält, gegen Puffer C dialysiert.

Rückfaltung von SSO1949

Rückfaltungspuffer E4: 50 mM MES-Puffer pH 6, 100 mM NDSB 256, 800 mM Arginin, 20% Glycerin

Nach dem Waschen aus den „Inclusion Bodies“ wurde das Protein durch Rückfaltung in seine aktive Form überführt. Die Rückfaltung von Proteinen und somit die Überführung in ihre aktive Form kann durch Chromatographie, Dialyse oder Verdünnung erfolgen. Die Rückfaltung durch Verdünnen stellt die schnellste und einfachste Methode dar, jedoch muss das Protein nach erfolgreicher Rückfaltung wieder aufkonzentriert werden. Um herauszufinden, welche Pufferzusätze für die Rückfaltung von SSO1949 am besten geeignet sind, wurden alle Rückfaltungspuffer von Vincentelli *et al.* (2004) ohne Glutathion gescreent.

Zur Rückfaltung wurden die Proteinlösungen in den entsprechenden Puffern, in denen sie gelöst sind, verdünnt (unterschiedliche Verdünnungen wurden getestet). In eine 96 well-Platte wurden je 95 µl Rückfaltungspuffer vorgelegt und die optische Dichte bei 340 nm gemessen. Im Anschluss wurden 5 µl Proteinlösung zugegeben und die optische Dichte bei 340 nm erneut gemessen. Danach wurde die Platte bei 4°C für 24 h inkubiert und die Messung wiederholt. Bei einer optischen Dichte von unter 0.05 ist das Protein nicht präzipitiert und liegt weiterhin löslich vor. Diese Puffer eignen sich somit für die Rückfaltung. Die Rückfaltungen wurden zusätzlich durch CMC-Plattentest analysiert. In dem am besten geeigneten Puffer (Puffer E4) wurden nach dem gleichen Schema größere Rückfaltungen von 60 ml angesetzt.

Aufkonzentrierung von rückgefaltetem SSO1949

Puffer A: 50 mM NaP, pH 4

Puffer B: 50 mM NaP, pH 4, 4 M GdmCl

0.4 ml EMD-SO³⁻-Säulenmaterial wurde zweimal mit 5 ml Puffer A äquilibriert. Nach 8facher Verdünnung des Rückfaltungsansatzes von 10 ml mit ddH₂O (unter Rühren langsam verdünnen) und Einstellen auf pH 4, wurde dieser 1 h mit dem Säulenmaterial unter Rühren inkubiert. Im Anschluss wurde mit 5 ml Puffer A gewaschen und anschließend dreimal mit 500 µl Puffer B eluiert. Nach jedem Aufreinigungsschritt wurden 20 µl der Lösung auf CMC-Platten getüpfelt.

Bestimmung der Proteinkonzentration von SSO1949 mit Bradford-Assay

Nach der Aufkonzentrierung und Elution mit 4 M GdmCl wurde die Konzentration von SSO1949 mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt, da GdmCl Schwierigkeiten bei der

spektrometrischen Konzentrationsbestimmung bereitet. Der Bradford-Assay eignet sich für Konzentrationsbestimmung in einem Messbereich von 2-50 ng. Zunächst wurde ein BSA-Standard in GdmCl von 0, 2, 5, 10, 15, 30 bis 50 ng/µl vorbereitet und eine Standardkurve erstellt. Im Anschluss wurden die Proben geeignet verdünnt und jeweils 50 µl Blank, Standards und Proben als Duplikate in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Dann wurden zu allen Standards und Proben (aber nicht zu dem Blank) 150 µl 1x Roth-Nanoquant-Lösung pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen der Platte auf einem Eppendorfschüttler wurde die Platte mit dem Mikrotiterplattenlesegerät bei 595 nm gemessen.

2.2.6.5.2. Aufreinigung des Hybridproteins C_{elA}_SSO1949_C_{elA}

Waschen aus "Inclusion Bodies"

Puffer A: 20 mM Tris/HCl, pH 8, 5 M Harnstoff

Puffer B: 20 mM Tris/HCl, pH 8, 6 M Harnstoff

Puffer C: 20 mM Tris/HCl, pH 8, 8 M Harnstoff

Das nach dem Zellaufschluss unter 2.2.6.3 verbliebene Pellet, welches unlösliches Hybridprotein enthält, wurde mit 20 ml 5% Triton X-100 gewaschen. Im Anschluss wurde der „Inclusion Body“ in 20 ml Puffer A durch Vortexen vollständig resuspendiert und bei 20 000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand in 20 ml Puffer B resuspendiert. Nach der Zentrifugation bei 20 000 g und 4°C für 15 min im SS34-Rotor wurde der Überstand verworfen und der Rückstand in 10 ml Puffer C gelöst und nochmals bei 20 000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert.

Rückfaltung von C_{elA}_SSO1949_C_{elA}

Rückfaltungspuffer: 50 mM MES-Puffer pH 6, 800 mM Arginin

Die Rückfaltung erfolgte in einem Volumen von 50 ml. Dazu wurde das Hybridprotein, welches in 8 M Harnstoff pH 8 gelöst war, 10fach mit 8 M Harnstoff pH 8 verdünnt und mit dem 20fachen Volumen eiskaltem Rückfaltungspuffer versetzt und 2 h bei 8°C rückgefaltet. Zur Überprüfung der erfolgreichen Rückfaltung wurden 20 µl des Rückfaltungsansatzes auf eine CMC-Platte aufgetragen und über Nacht bei 75°C inkubiert.

Aufkonzentrierung von rückgefaltetem CelA_SSO1949_CelA

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 8, 1.5 M Ammoniumsulfat

Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH 8

Die Aufkonzentrierung des rückgefalteten Proteins erfolgte durch Hydrophobe Interaktionschromatographie. Dazu wurde der Rückfaltungsansatz 4fach mit ddH₂O langsam verdünnt, der pH auf 8 eingestellt und mit 1,5 M AS versetzt. Danach wurde der Ansatz 1 h mit 300 µl Säulenmaterial (EMD-Propyl, Merck, Darmstadt) gerührt. Anschliessend wurde der gesamte Ansatz in eine Tropfsäule (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen) überführt und mit 5 ml Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte mit Puffer B in je 0.5 ml Fraktionen. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Die Fraktionen, die Protein enthalten, wurden vereinigt, dialysiert (Dialysepuffer siehe 2.2.6.4.3) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Die Konzentration des Hybrids wurde wie unter 2.2.6.4.4 bestimmt.

2.2.7. Untersuchung der Cellulaseaktivität

2.2.7.1. Qualitative Aktivitätsbestimmung durch Carboxymethylcellulose (CMC)-Platten-Test

Puffer A: 0.1 M Natriumphosphatpuffer, pH 6.0

Puffer B: 0.05% (v/w) Kongorot in ddH₂O

Puffer C: 1 M NaCl, 5 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.0

Mit Hilfe des CMC-Plattentests kann Cellulaseaktivität qualitativ nachgewiesen werden (Wood, 1981). Dazu wurden 2.1 g Gelrite® in 240 ml ddH₂O autoklaviert und im noch heißen Zustand 30 ml 0.5 M Natriumphosphatpuffer pH 3.0, 30 ml 2% (w/v) CMC-Lösung und 3 ml 1 M MgCl₂ zugegeben und in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden zweimal 10 µl Cellulaselösung auf einer Stelle aufgetragen. Nach dem Eintrocknen der Cellulaselösung wurde die Platte bei 75°C über Nacht in einem Glasgefäß mit Deckel inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte bei RT mit Puffer A (3 x 15 ml) auf pH 6 gebracht und dann mit Puffer B 30 min gefärbt. Anschließend wurde die Platte 30 min mit Puffer C (3 x 15 ml) entfärbt. Bei Cellulaseaktivität zeigen die Stellen, auf denen die Cellulaselösung aufgetragen wurde, weiße Spots auf einem roten Hintergrund. Zur Dokumentation wurden die CMC-Platten photographiert.

2.2.7.2. Qualitative Aktivitätsbestimmung durch Aktivitätsgel

Elektrophoretische Auftrennung der Cellulasen durch SDS-PAGE

3x S/J-Puffer:	3 M Tris/HCl, pH 8.45, 0.3% (w/v) SDS
Kathodenpuffer:	0.1 M Tris/HCl, 0.1 M Tricin, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.25
Anodenpuffer:	0.2 M Tris/HCl, pH 8.9
Probenpuffer:	0.1 M Tris/HCl, pH 6.8, 8% (w/v) SDS, 24% (v/v) Glycerin, 4% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,02% (v/v) Coomassie 250 G

Durch das Aktivitätsgel wird die qualitative Detektion einer aktiven Cellulase mit deren Molekulargewicht durch SDS-PAGE gekoppelt. Hierzu wurde ein Trenngel aus 9% Polyacrylamid und 0.1% CMC gegossen (3 ml 3x S/J-Puffer, 2 ml ddH₂O, 2 ml 40% Acrylamidlösung, 2 ml 64%iges Glycerin, 0.45 ml 2% (w/v) CMC-Lösung, 100 µl 10% (w/v) APS und 10 µl TEMED). Auf das Trenngel wurde ein 4%iges Sammelgel polymerisiert (0,5 ml 40% Acrylamidlösung, 1,7 ml 3x Gelpuffer, 2.7 ml ddH₂O, 100 µl APS, 10 µl TEMED). Die Proben wurden mit einem Volumen Probenpuffer ohne Harnstoff gemischt und nicht durch Hitze denaturiert. Die Trennung erfolgte unter Kühlung bei 4 W für 100 min.

Kongorotfärbung des Aktivitätsgels

Das Aktivitätsgel enthält Carboxymethylcellulose (CMC), ein wasserlösliches Derivat der Cellulose, welches als Substrat für die Cellulasen dient. Die Cellulase hydrolysiert die CMC. Abgebaute Cellulosestränge können den Farbstoff Kongorot im Gegensatz zu intakten Strängen nicht binden.

Puffer 1:	20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5.0 / 2-Propanol (4:1)
Puffer 2:	20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 1.8 / 2- Propanol (4:1)
Puffer 3:	20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 1.8
Puffer 4:	100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6
Puffer 5:	5 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6, 1 M NaCl
Färbelösung:	0.05% Kongorot in ddH ₂ O

Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese je 30 min bei Raumtemperatur in Puffer 1 (2 x 50 ml) und Puffer 4 (2 x 50 ml) gewaschen. Nach einstündiger Äquibrierung des Gels in Puffer 3 (3 x 50 ml) wurde es über Nacht in 50 ml Puffer 3 bei 75°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gel in Puffer 4 (3 x 30 ml) bei Raumtemperatur gewaschen, anschliessend 30 min in 0.05% Kongorotlösung (30 ml) gefärbt und 30 min in Puffer 5 entfärbt (3 x 40 ml). Zur Archivierung wurden die Gele mittels Vakuum (<100 mbar, 80°C) 60 min getrocknet.

2.2.7.3. Quantitative Bestimmung der Cellulaseaktivität mit Fluoreszenzsubstrat

Messpuffer: 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 1-7

Die cellulolytische Aktivität der Proteine wurde durch Fluoreszenzmessung mit dem hexameren Substrat Natrium-N-[2-N[(S-(4-deoxy-4-dimethylaminophenylazophenylthioureido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl)-2-thioacetyl)aminoethyl)-1-naphthylamin-5-sulfonat bzw. seinem Tetramer quantifiziert (Boyer *et al.*, 2002). Hierzu wurde aus einer 20 mM Stammlösung des Substrates (MW: 1615 g/mol) in DMF eine 60 μ M Lösung in ddH₂O hergestellt. Für die Fluoreszenzmessung wurden 116 μ l Natriumphosphatpuffer bei pH 1-7 und 2 μ l der 60 μ M Substratstammlösung (Endkonzentration: 1 μ M) in eine Quarzküvette pipettiert und 2 min bei 80°C vorgeheizt bevor die Messung gestartet wurde. Im Anschluss wurden 2 μ l der entsprechenden Proteinverdünnung zugegeben und die Messung gestartet. Um die Autohydrolyse des Substrates zu bestimmen wurde ein identischer Ansatz ohne Protein verwendet. Die Messung wurde bei 80°C Küvettemperatur für 10 min am Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Das Fluorophor wurde bei $\lambda = 340$ nm angeregt. Es wurde ein cut-off-Filter bei $\lambda = 390$ nm verwendet und die Emission wurde bei $\lambda = 490$ nm detektiert. Das Datenintervall betrug 5 s und die Integrationszeit 2 s. Die spezifische Aktivität kann nach Gleichung 2 berechnet werden (Franke, 2004).

$$\text{Aktivität} = \frac{c_S \cdot V \cdot \Delta I / \Delta t \cdot K}{(I_{\max} - I_0) \cdot m_{Pr}} \quad \text{U/mg} \quad \text{Gleichung 2}$$

Angegeben wird die spezifische Aktivität der Cellulase in Units (U), wobei 1 U einem Substratumsatz von 1 μ mol pro Minute entspricht. Für die Berechnung werden außerdem die Substratkonzentration (c_S [μ M]), das Volumen des Reaktionsansatzes (V [l]), die eingesetzte Proteinmenge (m_{Pr} [mg]) sowie ein Korrekturfaktor ($K = 60 \text{ s} \cdot \text{U} / \mu\text{mol}$) für die Umrechnung der Einheiten benötigt.

2.2.7.4. Quantitative Bestimmung der Cellulaseaktivität durch p-Nitrophenyl- β -D-cellobiosid

Reaktionspuffer: 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 3-9

155 μl Puffer (pH 3-9) wurden mit 40 μl 10 mM Substrat, welches in dem Reaktionspuffer gelöst wurde, versetzt und für 1 min bei 95°C vorinkubiert. Im Anschluss wurden 5 μl Enzymlösung, welche genau 0.5 μg Enzym entsprach, zugegeben und somit die Reaktion gestartet. Nach 20 min Inkubation bei 95°C wurden die Proben auf Eis gestellt und die Reaktion durch Zugabe von 1 ml eiskaltem 1 M Natriumcarbonat pH 10 gestoppt. Zur Messung wurden je 200 μl des Reaktionsansatzes in eine 96 well-Platte pipettiert und die Menge des freigewordenen p-Nitrophenols wurde bei 405 nm mit Hilfe eines Plattenlesegeräts (Infinite M200, Tecan, Männedorf, CH) bestimmt.

2.2.7.5. Bestimmung von v_{max} , K_M und k_{cat}

Um die Michaelis-Menten-Konstante (K_M), die Wechselzahl (k_{cat}) und die maximale Anfangsgeschwindigkeit (v_{max}) für CelA und das Hybrid CelA-SSO1949_CelA mit dem FRET-Substrat zu bestimmen, wurde bei konstanter Enzymkonzentration die Substratkonzentration im Bereich von 0 – 33 μM variiert.

Die Durchführung des Experiments erfolgte wie unter 2.2.7.3 beschrieben bei 80°C und pH 4.5 (CelA) bzw. pH 3 (Hybrid). Für die Fluoreszenzmessung wurden 108 μl Reaktionspuffer und 10 μl Fluoreszenzsubstrat in der entsprechenden Konzentration in eine Quarzküvette pipettiert und 2 min bei 80°C vorgeheizt bevor die Messung gestartet wurde. Im Anschluss wurden 2 μl Proteinverdünnung zugegeben und die Messung gestartet. Diese Menge entsprach etwa 12 ng CelA und 120 ng CelA_SSO1949_CelA. v_{max} , K_M und k_{cat} wurden berechnet, indem die Werte mittels nichtlinearer Regression an die Michaelis-Menten-Gleichung angepasst wurden.

2.2.8. Arbeiten mit *Sulfolobus*

2.2.8.1. Präparation elektrokompetenter Zellen

2.2.8.1.1. Präparation elektrokompetenter *E. coli* ER1821

Für die Methylierung von Plasmiden vor der Transformation in *Sulfolobus* wurde der *E. coli*-Stamm ER1821 verwendet, der das Plasmid pM.EsaBC4I trägt. Dieses Plasmid codiert für die Methylase.

100 ml LB-Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin wurden im Verhältnis 1:1000 mit einer über Nacht gewachsenen Flüssigkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0.5 bei 200 rpm und 37°C im Schüttelinkubator angezüchtet. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 2000 g und 4°C im pelletiert. Das Pellet wurde zum Waschen der Zellen zweimal in je 30 ml autoklaviertem deionisiertem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen auf Eis in 1 ml 10%

Glycerin aufgenommen, zu je 50 µl aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -70°C gelagert.

2.2.8.1.2. Präparation elektrokompetenter *Sulfolobus*-Zellen

S. acidocaldarius MR31 kann nur bei Zugabe von Uracil wachsen, da 18 Basenpaare des *pyrE*-Gens deletiert sind. Deshalb wurden die Zellen in XT-Medium unter Zugabe von 20 µg/ml Uracil angeimpft. Nach 1-2 Tagen wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ zwischen 0.3 und 0.7 in frisches Medium von 50 ml überimpft. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ zwischen 0.1 und 0.3 geerntet. Dazu wurden die Zellen kurz auf Eis inkubiert und 20 min bei 2000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit dem gleichen Volumen 20 mM Saccharose gewaschen und anschliessend in 20 mM Saccharose resuspendiert, so dass ihre theoretische optische Dichte einer OD₆₀₀ von 5 entspricht und in je 50 µl aliquotiert. Schliesslich wurden die Zellen ohne flüssigen Stickstoff bei -70°C tiefgefroren.

2.2.8.2. Elektroporation

2.2.8.2.1. Elektroporation zur Methylierung von Plasmiden

Bei den in *Sulfolobus* zu transformierenden Plasmiden liegt die *SuaI*-Erkennungssequenz unmethyliert vor. Damit würden sie nach einer Transformation in *Sulfolobus acidocaldarius* MR31 vollständig geschnitten werden. *Sulfolobus acidocaldarius* MR31-Zellen besitzen ein *SuaI*-Restriktions-/Modifikationssystem, das N4-Methylierung am mittleren Cytosin der GGCC- Erkennungssequenzen erkennt. Bei fehlender N4-Methylierung erfolgt die Restriktion der Plasmid-DNA. Der *E.coli* K12 ER1821-Stamm [pM.*EsaBC4I*] (New England Biolabs, Frankfurt am Main, D) wird zur Methylierung von Plasmid-DNA verwendet. Die Elektroporation stellt eine universelle Transformationsmethode dar. Zellen werden in einem Medium hohen elektrischen Widerstandes für sehr kurze Zeit (Millisekundenbereich) einem starken externen elektrischen Feld ausgesetzt. Dadurch kommt es zu einem starken Anstieg der Leitfähigkeit und Permeabilität der Zellmembran.

Die Zellen wurden 5 min auf Eis aufgetaut und ca. 5 ng des zu transformierenden Plasmids zugegeben. Am Anschluss wurde der Ansatz in eine 1 mm Küvette (Gene Pulser Cuvette) überführt und im Elektroporator (Gene Pulser Xcell, Biorad) bei 1.8 kV elektroporiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen in einem 1.5 ml-Eppendorf-Gefäss für 60 min bei 37°C regeneriert. Anschliessend wurde LB-Medium, welches mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin versetzt war, mit dieser regenerierten Kultur beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Das

Plasmid wurde wie unter 2.2.3.2 beschrieben präpariert. Im Anschluss wurde der Erfolg der Methylierung mittels Verdau mit HaeIII überprüft. Bei erfolgreicher Methylierung darf nur ungeschnittenes Plasmid auf dem Agarosegel zu sehen sein.

2.2.8.2.2. Elektroporation von *Sulfolobus*

Regenerierungslösung: 1% Saccharose, 20 mM Beta-Alanin/Malat-Puffer pH 4.5, 10 mM MgSO₄

Die Zellen wurden bei RT aufgetaut und ca. 5 ng methyliertes Plasmid zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde in eine 1 mm Küvette (Gene Pulser Cuvette, Biorad) überführt und im Elektroporator (Gene Pulser Xcell, Biorad) bei 1250 V, 1000 Ohm und 25 µF elektroporiert. Im Anschluss wurden 50 µl Regenerierungslösung zugegeben und die Zellen nach Überführung in ein 1.5 ml-Eppendorfgefäß genau 30 min bei 75°C unter Schütteln regeneriert. Danach wurden die Zellen auf Platten mit Dextrin, Xylose und NZ-Amin bzw. Saccharose und NZ-Amin ausplattiert und ca. 8 Tage bei 75°C inkubiert. Gut gewachsene Kolonien wurden in ca. 15 ml Flüssigmedium (Xylose/ Trypton- oder Saccharose/Trypton-Medium) angeimpft und unter Schütteln bei 75°C inkubiert.

2.2.8.3. Präparation von Glycerinlagerkulturen

***Sulfolobus*-Glycerin-Medium:** 10 ml 100x Brock, 5 ml 200x Brock, 1 ml 1000x Brock und 10 % Glycerin in 1 l ddH₂O, pH 5

Die Präparation von *Sulfolobus acidocaldarius* MR31-Glycerinlagerkulturen diente ausschließlich zur Aufbewahrung von transformierten *S. acidocaldarius* MR31-Zellen. Damit bestand zu jeder Zeit die Möglichkeit einer erneuten Kultivierung von transformiertem *S. acidocaldarius* MR31. Zur Präparation einer Glycerinlagerkultur wurden Flüssigkulturen mit einer OD₆₀₀ zwischen 0.5 und 0.8 verwendet. Die Kultur wurde 10 min bei ca. 2000 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Glycerin-Brock-Medium resuspendiert. Das Volumen des Glycerin-Brock-Mediums entspricht 1% des Original-Kulturvolumens. Die Lagerung der Glycerinlagerkulturen erfolgte bei -70°C.

2.2.8.4. Isolierung genomischer DNA aus *Sulfolobus*

Um zu überprüfen, ob die transformierten *Sulfolobus*-Zellen das gewünschte Plasmidkonstrukt enthalten, musste die Plasmid-DNA aus den Zellen präpariert werden. Hierzu diente ein Aliquot von 1 ml der Flüssigkultur. Die Isolierung der genomischen DNA

aus dem Zellpellet erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Chemagic DNA Bacteria Kit (Chemagen, Baesweiler, D). Die DNA wurde in 100 µl Elutionspuffer (Chemagic DNA Bacteria Kit) aufgenommen.

2.2.8.5. Retransformation der aus *S.a.* MR31 präparierten DNA in *E. coli* XL1 Blue

Von der aus *S. acidocaldarius* MR31-Zellen präparierten DNA wurden 5–10 µl in kompetente *E. coli* XL1 Blue-Zellen durch Hitzeschock transformiert. Nach der Regeneration der Zellen wurden diese auf selektiven Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus einer Kolonie wurde eine Flüssigkultur angelegt. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers wie unter 2.2.3.2 beschrieben. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 50 µl Elutionspuffers aufgenommen. Zum Vergleich der retransformierten Plasmid-DNA mit der unmethylierten Plasmid-DNA wurde ein Verdau mit spezifischen Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Im Anschluss wurde die DNA auf einem Agarosegel analysiert.

2.2.8.6. Integration von SSO1949 ins Genom von *Sulfolobus acidocaldarius* MR31

Für die Integration von SSO1949 ins Genom von *S. a.* MR31 wurde ein spezielles Plasmid (d2updown1494pyrEF, Abbildung 1-13) verwendet. In d2updown1494pyrEF wird das gewünschte Gen von zwei zum Genom von *S. a.* MR31 homologen Regionen flankiert und kann durch homologe Rekombination ins *Sulfolobus*-Genom integriert werden. SSO1949 wurde mit dem gewünschten Promoter (*mal* oder *sac7d*) über die SmaI-Schnittstelle in das Plasmid ligiert. Im Anschluss wurde das Plasmid methyliert (siehe 2.2.8.2.1), mit SacII und XhoI geschnitten und mittels Elektroporation in *Sulfolobus* transformiert (2.2.8.2.2). Zur Kultivierung wurden die Zellen auf Selektivplatten ausplattiert und 7-10 Tage bei 75°C inkubiert. Gut gewachsene Kolonien wurden in Flüssigkultur angeimpft und auf Cellulaseaktivität getestet.

2.2.8.7. Test auf Cellulaseproduktion in *Sulfolobus acidocaldarius* MR31

Aktivitätsplatten: 2.4 g Gelrite, 4 ml 100x Brock, 2 ml 200x Brock, 400 µl
1000x Brock, 0.1% NZ-Amin, 0.2% CMC in 390 ml H₂O

Sulfolobus-Klone, die SSO1949 exprimieren, wurden mit Hilfe spezieller Platten identifiziert. Diese Platten enthielten zum einen Brocks-Medium, wodurch die Zellen auf den Platten wachsen konnten, zum anderen enthielten die Platten

Carboxymethylcellulose, welche zum Aktivitätsnachweis diente. Zu Nachweis wurden 10 µl eine Flüssigkultur (OD_{600} ca. 0.8) auf eine Platte pipettiert und diese für 4-5 Tage bei 75°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte wie unter 2.2.7.1 beschrieben mit Kongorot gefärbt. Bei Zellen, die SSO1949 exprimieren, ist deutlich ein heller Hof um die gewachsene Kultur zu erkennen.

2.2.8.8. Large-Scale-Kultivierung von *Sulfolobus acidocaldarius* MR31

Da Proteine in *Sulfolobus* nur in relativ geringen Mengen exprimiert werden, wurde SSO1949 für eine spätere Aufreinigung in einem Volumen von 2 l exprimiert. Zwei Liter Fermenter-Medium (2.1.1.5) wurden mit 30-50 ml einer *Sulfolobus*-Kultur (OD_{600} = 0.3-0.5) beimpft. Die Kultivierung erfolgte im Labfors Kleinfementersystem (Infors AG, Bottmingen, CH) bei 75°C für ca. 3 Tage. Die Kultur wurde unter permanenter Sauerstoffzufuhr mit 200 rpm gerührt. Als Medium diente ein spezielles Fermentermedium (siehe 2.1.1.5) bzw. XT-Medium. Unter dem *mal*-Promotor wurde die Proteinexpression mit 0.2% Maltose induziert. Nach Erreichen der gewünschten OD_{600} (0.8-1.2) wurde die Kultur bei 8000 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C tiefgefroren und der Überstand wie unter 2.2.8.9.2 beschrieben direkt weiterverarbeitet.

2.2.8.9. Aufreinigung von SSO1949 aus *Sulfolobus acidocaldarius* MR31

2.2.8.9.1. Aufreinigung von SSO1949 aus der Membran von *Sulfolobus acidocaldarius* MR31

Membranpräparation von *S.a.* MR31

Aufschlusspuffer: 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 7, 300 mM NaCl

Das Pellet aus 1 l *S. acidocaldarius*-Kultur wurde in 15 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung (Ultraschallstufe 4.5 mit 50% Leistung (pulsed)) für 30 min unter ständiger Kühlung aufgeschlossen. Im Anschluss wurde für 30 min bei 20 000 g zentrifugiert. Zur Präparation der Membranen wurde der Überstand 20 h bei 50 000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet in 5 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Nach Einstellen der Proteinkonzentration auf 5 mg/ml wurden 2% Dodecylmaltosid (DDM) zugegeben. Für die eine weitere Aufreinigung des Proteins mittels Con A-Säule, wurde Dodecylmaltosid durch 0.5% Triton X ersetzt, da DDM mit dem Säulenmaterial interagieren könnte.

Aufreinigung von SSO1949 mittels Affinitätschromatographie über Con A-Säule

Puffer A:	20 mM Tris/HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl
Puffer B:	20 mM Tris/HCl pH 7, 0.5 M NaCl, 200 mM α -D Methylmannoside
Puffer C:	0.1 M Natriumacetat pH 6, 1 M NaCl, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 20% Ethanol

Vor dem Auftrag wurde die in Triton X gelöste Membranfraktion gegen Puffer A dialysiert. Im Anschluss wurde der Extrakt filtriert und auf eine mit Puffer A äquilibrierte Con A-Tropf-Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit ca. 5 - 10 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte mit Puffer B. Es wurden 1,5 ml Fraktionen gesammelt und mit Hilfe eines CMC-Plattentests analysiert. Im Anschluss wurde die Säule regeneriert und in Puffer C bei 4°C gelagert.

2.2.8.9.2. Aufreinigung von SSO1949 aus dem Überstand einer *Sulfolobus acidocaldarius*-Kultur

Im Laufe der Arbeit wurde festgestellt, dass SSO1949 auch aus dem Kulturüberstand aufgereinigt werden kann. Dies wurde über die folgenden Reinigungsschritte versucht.

Affinitätschromatographie über Con A-Säule

Puffer A:	20 mM Tris/HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl
Puffer B:	20 mM Tris/HCl pH 7, 0.5 M NaCl, 200 mM α -D Methylmannoside
Puffer C:	0.1 M Natriumacetat pH 6, 1 M NaCl, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 20% Ethanol

Der Überstand einer *S. acidocaldarius*-Kultur wurde auf pH 7.4 eingestellt. Anschliessend wurde er mit 10 ml des mit Puffer A äquilibrierten Säulenmaterials (Con A-Sepharose) für 2 h bei RT gerührt. Nach dem Absaugen des Säulenmaterials über eine Nutsche, wurde es erneut in Puffer A aufgenommen und in eine Tropf-Säule überführt. Nach dem Waschen mit ca. 5 Säulenvolumen Puffer A wurde mit Puffer B eluiert und 2 ml Fraktionen gesammelt, die im Anschluss mittels CMC-Platten auf Aktivität getestet wurden. Im Anschluss wurde die Säule regeneriert und in Puffer C bei 4°C gelagert.

Hydrophobe Interaktionschromatographie

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 8, 2.5 M Ammoniumsulfat

Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH 8

Der Überstand einer *S. acidocaldarius*-Kultur wurde auf 2.5 M Ammoniumsulfat und pH 8 eingestellt. Anschliessend wurde er mit 10 ml des mit Puffer A äquilibriertem Säulenmaterials (EMD-Propyl, Merck) für 2 h bei RT gerührt. Nach dem Absaugen des Säulenmaterials über eine Nutsche, wurde es erneut in Puffer A aufgenommen und in eine Tropf-Säule überführt. Nach dem Waschen mit ca. 5 Säulenvolumen Puffer A wurde mit Puffer B eluiert und 2 ml Fraktionen gesammelt, die im Anschluss mittels CMC-Platten auf Aktivität getestet wurden.

Anionenaustauschchromatographie

Puffer A: 20 mM Tris/HCl pH 7.5

Puffer B: 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 M NaCl

Die Fraktionen, die nach dem ersten Reinigungsschritt Aktivität zeigten, wurden vereinigt und über Nacht gegen Puffer A dialysiert. Die Chromatographie wurde an einer ÄKTA-Explorer (GE Healthcare, Glattbrugg, Schweiz) durchgeführt. Die Säule (EMD-TMAE, Merck) wurde mit 5% Puffer B in A äquilibriert. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min aufgegeben. Nach dem Waschen mit dem Auftragspuffer wurde die Säule mit steigender Salzkonzentration eluiert. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und die Absorption dieser Fraktionen bei 280 nm und 215 nm wurde aufgezeichnet. Die Aktivität der Elutionsfraktionen wurde auf CMC-Platten getestet.

Affinitätschromatographie

Puffer A: 20 mM Natriumphosphat pH 7, 300 mM NaCl

Puffer B: 20 mM Natriumphosphat pH 7, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol

Der Überstand einer 50 ml *S. acidocaldarius*-Kultur wurde über Nacht gegen Puffer A dialysiert und eine Stunde mit 0.2 ml mit Puffer A äquilibriertem Talon-Säulenmaterial (Clontech, Saint-Germain-en-Layne, F) unter Rühren inkubiert. Im Anschluss wurde mit 5 ml Puffer A gewaschen und anschließend mit Puffer B eluiert. Es wurde 300 µl-Fraktionen gesammelt. Die Eluatfraktionen wurden mittels CMC-Plattentest auf Aktivität getestet.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Expression von SSO1949 in *E. coli*

Die thermoacidophile Cellulase SSO1949 aus *Sulfolobus solfataricus* P2 besteht aus 334 Aminosäuren und besitzt eine Molekularmasse von 37.5 kDa (Huang *et al.*, 2005). An ein N-terminales Signalpeptid (AS 1-24) schliesst eine Ser/Thr-reiche Region an, die sich über die Aminosäuren 25-85 erstreckt und keine Sequenzhomologie zu anderen bekannten Proteinen zeigt. Zur Überexpression in *E. coli* wurde das N-terminale Signalpeptid durch einen His₆-tag ersetzt. Die hochkonservierte Region (AS 86-334) umfasst das katalytische Zentrum der Cellulase (Abbildung 3-1).

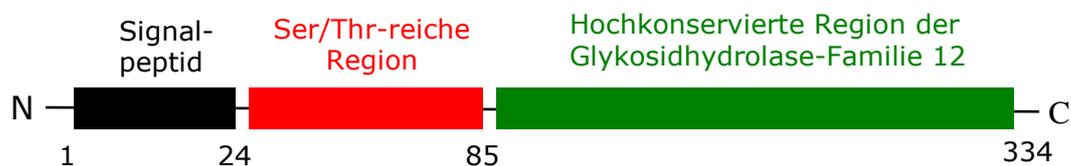


Abbildung 3-1: Schematische Domänenorganisation von SSO1949

3.1.1. Reinigung und Löslichkeit von SSO1949

SSO1949 wird unlöslich exprimiert, der lösliche Anteil des Proteins ist mittels Westernblot-Analyse kaum detektierbar (Kufner, 2007). Auch durch Koexpression von SSO1949 mit Chaperonen konnte die Löslichkeit des Proteins kaum verbessert werden (Kufner, 2007). Deshalb erfolgte die Reinigung von SSO1949 wie unter 2.2.6.5.1 beschrieben. Das heisst, nach Entfernen der Membranbestandteile durch Triton X-100 wurde der verbleibende „Inclusion Body“ dreimal mit 8 M Harnstoff pH 3 (W1-W3, Abbildung 3-2) gewaschen. Damit konnte ein Grossteil der *E. coli*-Proteine entfernt werden, ohne dass SSO1949 mit in Lösung geht. Im Anschluss wurde das verbliebene Zellpellet in 6 M GdmCl pH 8 gelöst, da 8 M Harnstoff nicht ausreichte, um das Protein zu lösen. Jedoch sind nur etwa 40% von SSO1949 in 6 M GdmCl pH 8 (GdmCl, Abbildung 3-2) löslich. Das Protein wurde ohne weitere Aufreinigung für die Rückfaltung eingesetzt.

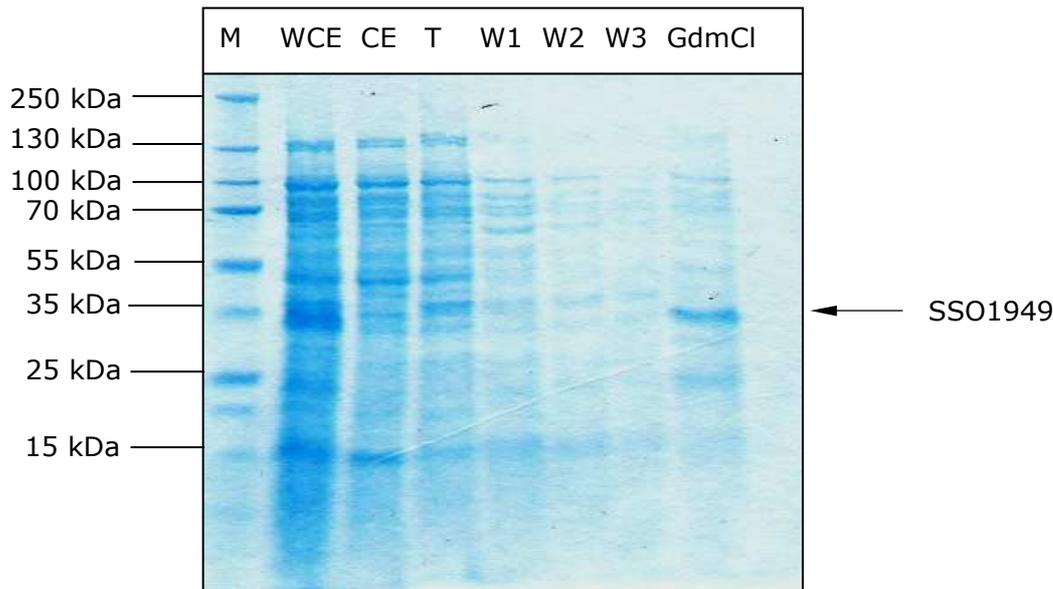


Abbildung 3-2: 9%iges mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Aufreinigung von SSO1949. M: Marker, WCE: Gesamtzellextrakt, CE: Rohextrakt, T: Triton X-Extrakt, W1-W3: Waschfraktionen mit 8 M Harnstoff pH 3, GdmCl: 6 M GdmCl-Extrakt

3.1.2. Rückfaltung von SSO1949

Um herauszufinden, welche Substanzen im Rückfaltungspuffer besonders günstig für die Rückfaltung von SSO1949 sind, wurde ein Rückfaltungsscreen durchgeführt.

Die Rückfaltungsstrategie von Vincentelli *et al.* beruht auf der Rückfaltung durch Verdünnen des Proteins. Hierfür wurden 80 Rückfaltungspuffer (Abbildung 3-3) zusammengestellt, die zur gleichzeitigen Rückfaltung eines Proteins in einer 96-well Platte benutzt werden können. Insgesamt existieren nach Vincentelli *et al.* 96 Rückfaltungspuffer, da jedoch SSO1949 keine Cysteinreste enthält, konnte auf das Testen von Puffern mit Zusatz von Redoxmitteln wie Glutathion verzichtet werden. Die 80 verwendeten Rückfaltungspuffer von Vincentelli *et al.* umfassen einen pH-Bereich von 4 bis 9 und enthalten verschiedene Additive wie 2-Mercaptoethanol, Glycerin, Glukose, NaCl, KCl, Arginin, EDTA, PEG (400, 4000) und Sulfobetaine (NDSB195, NDSB201, NDSB256) (Vincentelli *et al.*, 2004). Von diesen Substanzen ist bekannt, dass sie die Rückfaltung von Proteinen unterstützen. Der pH-Bereich wurde ausgewählt, da unterschiedliche Proteine verschiedene isoelektrische Punkte besitzen und oberhalb oder unterhalb dieses pH-Wertes präzipitieren. Unterschiedliche Ionenstärken (100 mM bzw. 200 mM NaCl) wurden verwendet, da die Salzkonzentration die Löslichkeit von Proteinen ebenfalls positiv oder negativ beeinflussen kann. Amphiphile Komponenten wie Glycerin und PEG wurde zugesetzt, um zu verhindern, dass hydrophobe Reste verschiedener

Moleküle noch während der Rückfaltung miteinander interagieren können. Arginin wurde aus dem gleichen Grund zugesetzt. NDSB wurde verwendet, da es sich bereits bei anderen Rückfaltungsexperimenten (Vuillard *et al.* 1998; Expert-Bezancon *et al.* 2003) als nützlich für die Rückfaltung herausgestellt hat. Zur Verhinderung der Bildung intramolekularen Disulfidbrücken bei Protein mit Cysteinresten wurde β -Mercaptoethanol zugesetzt. Potentielle Kofaktoren wie EDTA werden von manchen Proteinen für die Rückfaltung benötigt, während andere Proteine in ihrer Gegenwart zur Präzipitation neigen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pH 4, β -MSH, Arg	pH 4, KCl, β -MSH, NDSB256	pH 5, NaCl 200 mM	pH 5, KCl, glucose	pH 6, KCl	pH 7	pH 7, NDSB201, Arg	pH 8, KCl, β -MSH, NDSB201, Arg	pH 8, β -MSH	pH 9, glycerol, NDSB201	* GSH 5 mM	* GSH 5 mM, GSSG 5 mM, DsbA 10 mM
B	pH 4, β -MSH, NDSB256	pH 4, β -MSH, NDSB201, glucose	pH 5, NDSB256	pH 5, cocktail	pH 6, NDSB256, glucose	pH 7, KCl	pH 7, PEG 4000, β -MSH	pH 8, glucose	pH 8, NDSB201	pH 9, NaCl 100 mM, glucose	* GSH 5 mM, GSSG 2 mM	* GSH 2 mM, GSSG 5 mM, DsbA 10 mM
C	pH 4, NaCl 100 mM, β -MSH	pH 4, KCl, NDSB195	pH 5, EDTA, β -MSH, NDSB201	pH 6, PEG 400, β -MSH, NDSB201	pH 6, glycerol, β -MSH	pH 7, NaCl 200 mM, NDSB201	pH 7, NDSB195, glucose	pH 8	pH 8, PEG 4000, β -MSH, glucose	pH 9, β -MSH, NDSB195, Arg	* GSH 5 mM, GSSG 5 mM	* GSSG 5 mM, DsbA 10 mM
D	pH 4, glycerol	pH 4, PEG 4000, glucose	pH 5, β -MSH, glycerol	pH 6, β -MSH, NDSB195, glucose	pH 6, EDTA	pH 7, glycerol, β -MSH	pH 7, EDTA, β -MSH, NDSB195	pH 8, PEG 4000, NDSB195	pH 8, KCl, β -MSH, NDSB201, glucose	pH 9, PEG 400	* GSH 2 mM, GSSG 5 mM	* GSSG 10 mM, DsbA 10 mM
E	pH 4, PEG400, glucose	pH 5, EDTA, Arg	pH 5, PEG 400, β -MSH, Arg	pH 6, glycerol, NDSB256, Arg	pH 6, NaCl 100 mM, β -MSH, NDSB195	pH 7, PEG 4000, NDSB256, Arg	pH 7, cocktail	pH 8, β -MSH, glucose	pH 9, β -MSH	pH 9	* GSSG 5 mM	* dbGroEL 10 mM
F	pH 4, EDTA	pH 5, NaCl 100 mM, Arg	pH 5, β -MSH, NDSB256	pH 6, NaCl 200 mM, β -MSH, glucose	pH 6	pH 7, NaCl 100 mM, NDSB201	pH 8, Arg	pH 8, NaCl 100 mM, β -MSH, NDSB256	pH 9, NaCl 100 mM, NDSB256	pH 9, EDTA, β -MSH, Arg	* GSSG 10 mM	* dbGroEL 10 mM, DsbA 10 mM
G	pH 4, NDSB201	pH 5, PEG 4000, β -MSH, NDSB201	pH 5, glycerol, β -MSH, NDSB195	pH 6, β -MSH, NDSB201, Arg	pH 6, PEG 4000	pH 7, β -MSH, Arg	pH 8, EDTA, NDSB256, glucose	pH 8, NaCl 200 mM, β -MSH, glucose	pH 9, β -MSH, NDSB195	pH 9, NDSB195, Arg	* GSH 5 mM, DsbA 10 mM	* GSSG 10 mM, dbGroEL 10 mM, DsbA 10 mM
H	pH 4, NaCl 200 mM, β -MSH, NDSB195, Arg	pH 5, NaCl 200 mM, NDSB195	pH 5, β -MSH	pH 6, PEG 400, NDSB256	pH 7, PEG 400, β -MSH, NDSB256, glucose	pH 7, β -MSH	pH 8, glycerol, β -MSH	pH 8, PEG 400, NDSB195	pH 9, NaCl 200 mM, β -MSH, NDSB256	pH 9, cocktail	* GSH 5 mM, GSSG 2 mM, DsbA 10 mM	*

Abbildung 3-3: Die 96 Rückfaltungspuffer (Vincentelli *et al.*, 2004)

Entfaltetes Protein in 6 M GdmCl wurde 20fach im Rückfaltungspuffer verdünnt und die Rückfaltungseffizienz anschließend durch Messung der optischen Dichte der Rückfaltungsansätze bei $\lambda = 340$ nm bestimmt. Eine aggregatfreie Proteinlösung besitzt eine $OD_{340} < 0.05$, was auf eine erfolgreiche Rückfaltung hindeutet, da falsch gefaltetes oder ungefaltetes Protein präzipitiert und somit eine $OD_{340} > 0.05$ verursacht (Vincentelli *et al.*, 2004). Es konnte festgestellt werden, dass alle in Frage kommenden Rückfaltungspuffer 0,8 M Arginin enthielten. Arginin scheint einen positiven Effekt auf die Rückfaltung zu haben. Um zu beurteilen, ob SSO1949 tatsächlich in seiner aktiven Konformation in den Rückfaltungspuffern vorliegt, wurde die cellulolytische Aktivität der Cellulase durch CMC-Plattentest geprüft. Hier stellte sich Rückfaltungspuffer E4, welcher 50 mM MES-Puffer, pH 6, 20% (v/v) Glycerin, 100 mM NDSB256 und 800 mM Arginin

enthielt, als am besten geeignet für die Rückfaltung heraus. Für eine präparative Rückfaltung des Proteins in grösserem Volumen wurde E4 als Rückfaltungspuffer verwendet.

3.1.3. Aufkonzentrierung des rückgefalteten Proteins

Da SSO1949 nach der Rückfaltung stark verdünnt vorliegt (im Nanogramm-Bereich), wurde versucht das aktive Protein aufzukonzentrieren bzw. es noch weiter aufzureinigen. Verschiedene Chromatographiematerialien wie Talon oder EMD-TMAE wurden getestet, jedoch konnte keine Bindung des Proteins an das Säulenmaterial festgestellt werden. Die Kationenaustauschchromatographie mit EMD-SO³⁻ als Säulenmaterial stellte sich als die vielversprechendste Methode heraus. Dazu musste jedoch im Vorfeld das im Rückfaltungsansatz enthaltene Arginin entfernt werden, da es aufgrund seiner Eigenladung ebenfalls an das Säulenmaterial binden und somit mit SSO1949 um Bindungsplätze konkurrieren könnte. Hierfür wurde versucht Arginin gegen niedrige Salzkonzentrationen oder abnehmende Argininkonzentrationen zu dialysieren. Sobald dem Protein jedoch Arginin entzogen wurde, begann es zu präzipitieren. Deshalb wurde versucht die Argininkonzentration durch 8fache Verdünnung des Rückfaltungsansatzes mit ddH₂O zu verringern. Um Präzipitation zu vermeiden, wurde der Rückfaltungsansatz tropfenweise und unter Rühren verdünnt, auf pH 4 eingestellt und mit dem Säulenmaterial inkubiert.

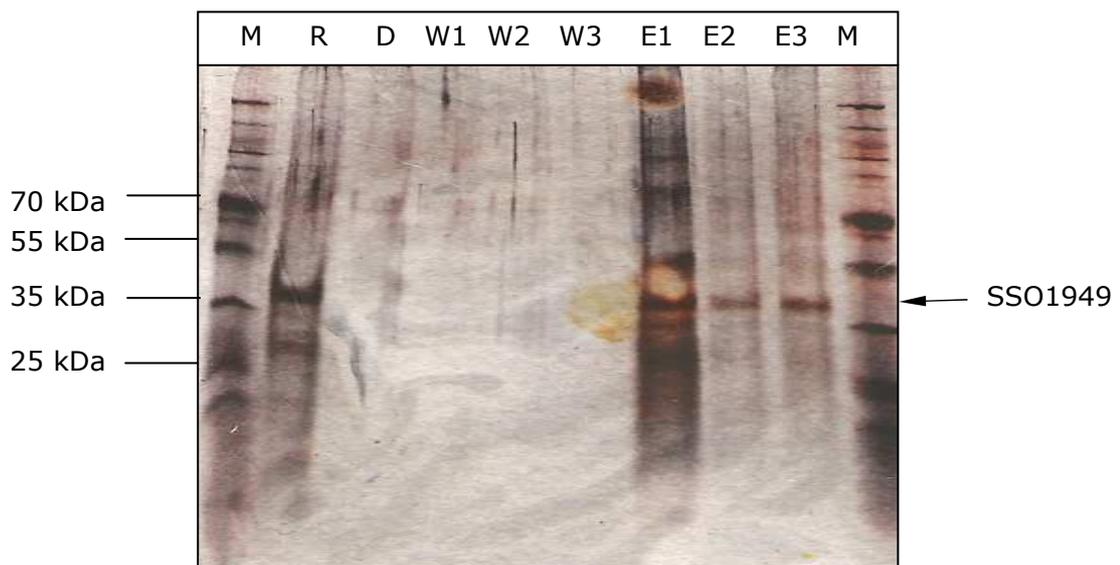


Abbildung 3-4: 9%iges mit Silber gefärbtes SDS-Gel der Aufkonzentrierung von SSO1949 mittels Kationenaustauschchromatographie. M: Marker, R: Rückfaltungsansatz, D: Durchbruch, W: Waschfraktionen, E: Eluatfraktionen

Nach dem Binden von SSO1949 an die EMD-SO³⁻-Säule wurde versucht, das Protein mit Hochsalz, Detergentien und Denaturierungsmitteln zu eluieren. Das Protein präzipitierte auf der Säule und ließ sich nur unter Verwendung des Denaturierungsmittels Guanidiniumchlorid vollständig eluieren (Abbildung 3-4). Die Aktivität des eluierten Proteins konnte durch CMC-Plattentest nachgewiesen werden. Dennoch bringt diese Art der Elution auch Schwierigkeiten in der weiteren Verarbeitung mit sich, da unter anderem ein Teil des rückgefalteten aktiven Proteins wieder denaturiert wird. Auch die Bestimmung der Konzentration von SSO1949, was Voraussetzung für die genaue spätere enzymatische Charakterisierung ist, gestaltete sich damit schwierig, da Guanidiniumchlorid sowohl bei der spektrometrischen Konzentrationsbestimmung als auch im Bradford-Assay stört.

3.1.4. Enzymatische Charakterisierung von SSO1949

Die Aktivität von SSO1949 wurde durch FRET (fluorescence resonance energy transfer) quantifiziert, indem die Fluoreszenzemission eines Cellohexaosidssubstrates bei 490 nm verfolgt wurde. Dieses Substrat besteht aus 6 β -1,4-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten. Am reduzierenden Ende befindet sich ein Fluorophor (EDANS), am nicht reduzierenden Ende befindet sich in einer Entfernung von 30 Å ein Chromophor (Abbildung 3-5).

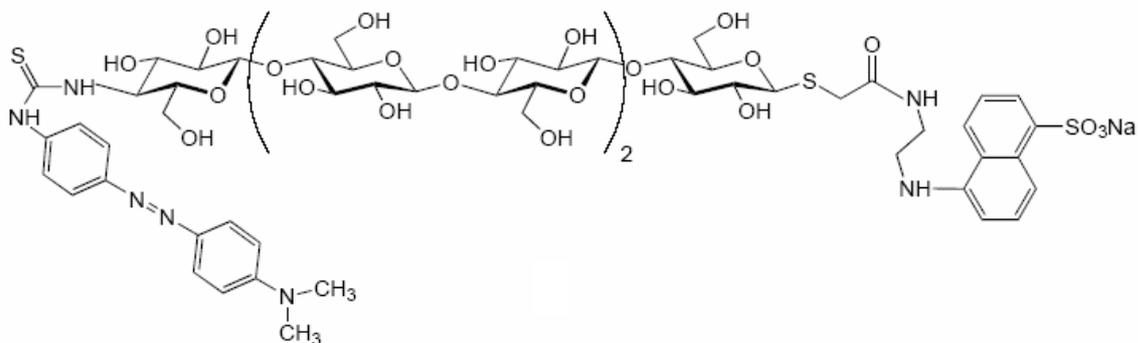


Abbildung 3-5: Struktur des Fluoreszenzsubstrats zur Bestimmung der Cellulaseaktivität (Boyer *et al.*, 2002)

Das Fluoreszenzsubstrat wird bei einer Wellenlänge von 340 nm angeregt und die Fluoreszenz des Fluorophors wird durch das Chromophor gelöscht. Durch cellulolytische Enzyme wird das Substrat hydrolysiert und das Fluorophor emittiert Licht einer Wellenlänge von 490 nm. Die Zunahme der Fluoreszenz bei 490 nm kann gemessen werden und ist proportional zu zur Anzahl der hydrolysierten Substratmoleküle.

Das fluoreszente Cellohexaoside ist stabil unter extremen pH- und Temperaturbedingungen und erlaubt dadurch genaue Aktivitätsmessungen innerhalb eines breiten pH- und Temperaturspektrums.

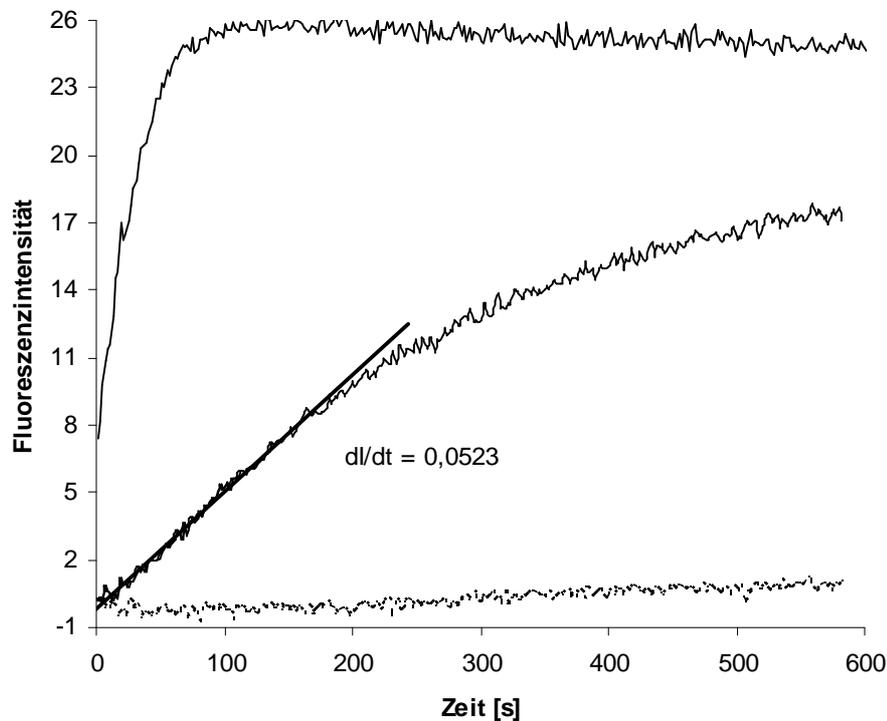


Abbildung 3-6: Hydrolyse des fluoreszenten Cellohexaosids durch SSO1949. Das fluoreszente Substrat ($1 \mu\text{M}$) wurde mit 13 ng SSO1949 in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 1.8 bei 80°C inkubiert. Das Fluorophor wurde bei 340 nm angeregt und der Anstieg der Fluoreszenz, der proportional zur Substrathydrolyse ist, bei 490 nm in Abständen von 2 Sekunden gemessen. Gezeigt ist die Reaktion mit (durchgezogene Linie) und ohne (gestrichelte Linie, Negativkontrolle) Enzymzugabe. Die spontane Substrathydrolyse unter diesen extremen Bedingungen ist sehr gering (gestrichelte Linie). Nach Zugabe von Enzym im Überschuss erreicht die Fluoreszenz ihren Maximalwert (oberste Linie).

Im Reaktionsansatz ohne Enzym (Abbildung 3-6, gestrichelte Linie) zeigt sich nur ein minimaler Anstieg der Fluoreszenz, was auf die extremen Messbedingungen von 80°C und pH 1.8 zurückzuführen ist. Die Inkubation von SSO1949 mit dem fluoreszenten Hexaosid führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz, was dafür spricht, dass das Substrat von SSO1949 gespalten wird. SSO1949 ist nach der Rückfaltung aktiv und bestätigt somit das Ergebnis aus dem CMC-Plattentest.

Die spezifische Aktivität von SSO1949 kann mittels Gleichung 2 (2.2.7.3) berechnet werden. Zur Ermittlung der spezifischen Cellulaseaktivität wurde mit $1 \mu\text{M}$ fluoreszentem

Substrat in Messpuffer eine Grundlinie aufgenommen (Abbildung 3-6, gestrichelte Linie, I_0). Um den Maximalwert der Fluoreszenz I_{\max} bei vollständiger Substrathydrolyse zu bestimmen, wurde dem Reaktionsansatz SSO1949 im Überschuss zugesetzt und der erhaltene Wert um die Grundlinie korrigiert. Messwerte, die einen linearen Verlauf zeigten, wurden zur Berechnung der Steigung ($\Delta I/\Delta t$ in [1/s]) verwendet. Daraus ergibt sich:

$$\text{Aktivität} = \frac{1 \mu\text{M} \cdot 0.0523 \text{ I/s} \cdot 120 \times 10^{-6} \text{ l} \cdot 60 \text{ s} \cdot \text{U}/\mu\text{mol}}{25 \text{ I} \cdot 0,013 \times 10^{-3} \text{ mg}} = 1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$$

Die spezifische Aktivität von SSO1949 nach Rückfaltung konnte mit $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ bei pH 1.8 und 80°C bestimmt werden. Dies entspricht ungefähr der Aktivität von SSO1949 aus einer früheren Arbeit (Huang *et al.*, 2005), in der die spezifische Aktivität von nativem SSO1949 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ betrug. Auch in dieser Arbeit wurde die Aktivitätsmessung mit dem fluoreszenten Hexaoxid durchgeführt. Schwierigkeiten bei einer exakten Bestimmung der spezifischen Aktivität machte in dieser Arbeit die Tatsache, dass das rückgefaltete Protein in 4 M GdmCl gelöst war (3.1.3). Die Proteinkonzentration konnte nicht photometrisch bestimmt werden, sondern musste mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt werden, bei dem das Denaturierungsmittel jedoch auch störte. Die Bestimmung der Proteinkonzentration von SSO1949 muss daher als semi-quantitativ angesehen werden.

Als nächstes wurde das pH-Optimum von rückgefaltetem SSO1949 bestimmt und ein pH-Profil erstellt.

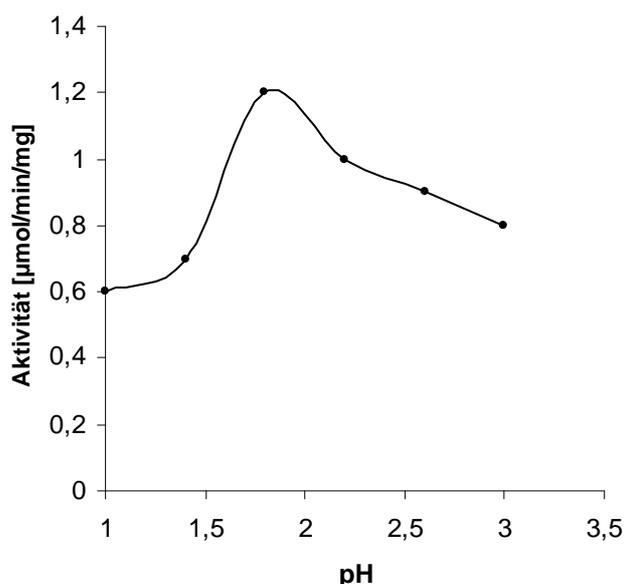


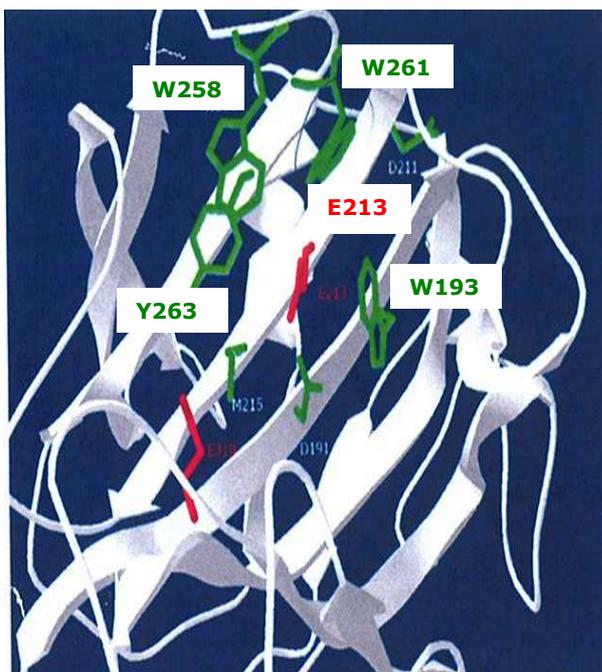
Abbildung 3-7: pH-Profil von SSO1949. Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte in 100 mM Natriumphosphatpuffer mit verschiedenen pH-Werten, 80°C und $1 \mu\text{M}$ Substrat.

Das pH-Optimum von rückgefaltetem SSO1949 wurde bei pH 1.8 bestimmt und bestätigt somit das Ergebnis der Arbeit von Huang *et al.* (2005). Auch das pH-Profil zeigt einen ähnlichen glockenförmigen Verlauf mit Verschiebung in den sauren Bereich, welche in dem Ionisierungsstatus der beiden sauren katalytischen Reste begründet ist. Jedoch fällt die cellulolytische Aktivität auf beiden Seiten des pH-Optimums nicht so stark ab wie in der früheren Arbeit. Bei pH 1 bzw. pH 3 besitzt das Enzym noch immer die Hälfte bzw. zwei Drittel seiner maximalen Aktivität (Abbildung 3-7).

3.2. Semi-quantitativer Vergleich der Aktivität verschiedener Punktmutanten von SSO1949

Im aktiven Zentrum von SSO1949 befinden sich zwei konservierte, katalytisch aktive Glutamatreste (E213 und E310) (Huang *et al.*, 2005). Durch Strukturanalyse von anderen Mitgliedern der Glykosidhydrolase Familie 12 kann darauf geschlossen werden, dass E213 das Nukleophil und E310 die katalytische Säure bzw. Base darstellt (Huang *et al.*, 2005). Auf der Basis einer Modellstruktur von SSO1949 (Huang *et al.*, 2005) konnten Aminosäuren in der Nachbarschaft der katalytischen Reste identifiziert werden, die möglicherweise eine Rolle für die enzymatische Aktivität von SSO1949 unter diesen extremen pH-Bedingungen spielen (Abbildung 3-8).

(a)



(b)



Abbildung 3-8: Modellstruktur des katalytischen Zentrums von SSO1949. Die konservierten katalytischen Reste E213 und E310 sind rot dargestellt. Aminosäuren in

der Nähe des katalytischen Zentrums, deren Mutation zu einer Beeinflussung der Acidophilie des Enzyms führen könnte, sind grün markiert. a) Aminosäuren in der Umgebung von E213: W193, W258, W261, Y263. b) Aminosäuren in der Umgebung von E310: T137, Y140, D187 (G. Lipps, unveröffentlichte Arbeit).

SSO1949 spaltet glykosidische Bindungen unter Beibehaltung der Konfiguration des anomeren Zentrums („retaining“) nach einem „double displacement“- Mechanismus, bei dem sich ein kovalentes Enzym-Substrat-Intermediat bildet. Der katalytische Rest E310 agiert während der unter Abbildung 1-2 b dargestellten enzymatischen Reaktion wahrscheinlich als Säure-Base-Katalysator. E310 protoniert als Säure zunächst die abgehende Gruppe und wird dabei von der als Nukleophil wirkenden katalytischen Aminosäure E213 unterstützt. Nach Bildung eines Enzym-Substrat-Intermediats fungiert E310 im zweiten Schritt als Base und deprotoniert ein Wassermolekül, welches daraufhin als Nukleophil das C1-Atom am Zucker angreift. Eine Punktmutation eines Aspartatrestes zu einem Asparaginrest in der Umgebung von E310 führten zu einer Veränderung des pH-Optimums der Xylanase C von *Aspergillus kawachii* (Fushinobu *et al.*, 1998). In der Umgebung von E310 befinden sich T137, Y140, N185, D187, W217, L223, G308 und G312, wobei W217 und G308 konserviert vorliegen. Die nicht konservierten Aminosäuren könnten also ebenfalls an dem acidophilen Verhalten von SSO1949 beteiligt sein. Die Aminosäure T137 ist homolog zu dem mutierten Aspartatrest der Xylanase C aus *Aspergillus kawachii* und könnte mit E310 Wasserstoffbrücken ausbilden, welche den pK_a-Wert des katalytischen Restes erniedrigen.

E213 fungiert wie bereits erläutert als Nukleophil während der enzymatischen Reaktion. Durch Punktmutationen in der Umgebung von E213 sollte herausgefunden werden, welche Aminosäuren direkt oder indirekt an der Stabilisierung dieses katalytischen Restes beteiligt sind. Auf benachbarten β -Faltblättern von E213 befinden sich D191, W193, D211, M215, W258, W261 und Y263. Die Aminosäuren D191 und M215 sind konserviert innerhalb der Glykosidhydrolase Familie 12, weshalb eine Beteiligung dieser beiden Reste an der Stabilisierung des Enzyms unter extremen Bedingungen ausgeschlossen wird. Möglicherweise spielen die oben genannten aromatischen Aminosäuren aufgrund ihrer negativen Partialladung auf beiden Seiten des aromatischen Ringes eine bedeutende Rolle bei der Stabilisierung positiver Partialladungen.

Für die folgenden Untersuchungen wurden die Aminosäuren T137, Y140, D187, W193, W258, W261 und Y263 zu Alanin mutiert. Darüber hinaus wurde T137 zu Asparagin mutiert, da diese homolog zu dem mutierten Aspartatrest aus Xyn C ist. Die mutierten Proteine wurden in *E. coli* überexprimiert und nach dem gleichen Schema wie der Wildtyp

aufgereinigt. Im Anschluss wurde die Aktivität der verschiedenen Punktmutanten mit dem fluoreszenten Hexaosid bestimmt.

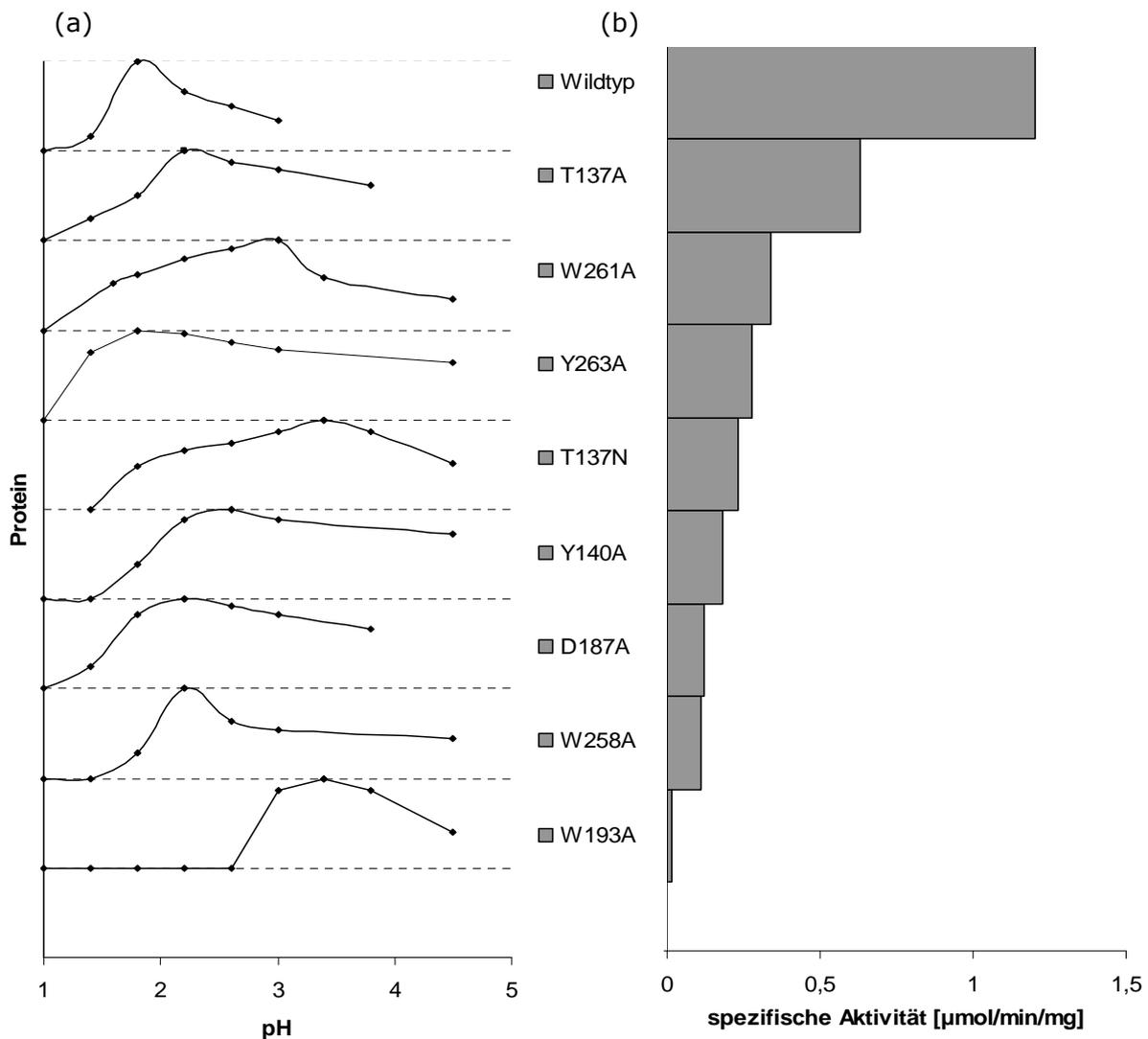


Abbildung 3-9: Charakterisierung der verschiedenen Punktmutanten von SSO1949. (a) pH-Profilen von SSO1949 und seiner Punktmutanten. (b) Semiquantitativ bestimmte spezifische Aktivität von SSO1949 und seiner Punktmutanten bei ihrem jeweiligem pH-Optimum. Alle Messungen wurden in 100 mM Natriumphosphatpuffer bei 80°C und 1 µM Substrat durchgeführt.

Die Mutation von W193 zu Alanin und T137 zu Asparagin zeigen den grössten Effekt bei der Verschiebung des pH-Optimums von SSO1949 auf pH 3.4 (Abbildung 3-9 a). Darüber hinaus führt die Punktmutation von W193 nahezu zum Verlust der spezifischen Aktivität von SSO1949. Die Mutation von T137 zu Alanin zeigt kaum einen Effekt bei der Verschiebung des pH-Optimums, lediglich die spezifische Enzymaktivität geht auf ungefähr die Hälfte der maximalen Aktivität zurück. Wird jedoch T137 zu Asparagin

mutiert, tritt eine deutliche Verschiebung des pH-Optimums in den basischen Bereich auf. Diese Beobachtung konnte bereits für die Xylanase C aus *Aspergillus kawachii* gemacht werden, als die homologe Aminosäure gegen Asparagin mutiert wurde (Fushinobu *et al.*, 1998). Die spezifische Aktivität von SSO1949 geht nach dieser Mutation ebenfalls auf etwa 25% der ursprünglichen Aktivität zurück. Diese Aminosäure scheint also einen bedeutenden Einfluss auf die Acidophilie des Enzyms zu haben.

Abschließend kann festgestellt werden, dass mit Ausnahme von Y263 bei allen Punktmutanten die Acidophilie von SSO1949 in Mitleidenschaft gezogen wird und das pH-Optimum sich in Richtung des basischen Bereichs verschiebt. Auch die spezifische Aktivität aller Punktmutanten fällt im Vergleich zum Wildtyp stark ab. Dazu muss jedoch gesagt werden, dass die spezifische Aktivität nur semi-quantitativ bestimmt werden konnte, da die Bestimmung der genauen Proteinkonzentration schwierig gestaltete. Zum einen wurde dies erschwert durch das Denaturierungsmittel Guanidiniumchlorid, in dem die Proteine nach der Rückfaltung gelöst sind. Zum anderen kann nicht genau gesagt werden, wie viel Prozent des Proteins nach der Rückfaltung tatsächlich in aktiver Form vorliegen. Die berechnete Proteinkonzentration bezieht sich auf das gesamte in der Probe enthaltene Protein und schließt damit auch inaktives Protein mit ein. Die grösste Auswirkung auf die Säurestabilität von SSO1949 zeigten die Mutationen W193A und T137N, wobei die Mutation W193A nahezu zu einer Inaktivierung des Enzyms führte (Abbildung 3-9). Beide Aminosäurereste befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft der katalytischen Reste E213 und E310. Auf die Herstellung von Doppel- und Dreifachmutanten wurde aufgrund der ohnehin schon niedrigen spezifischen Aktivität der Mutanten verzichtet.

3.3. Erhöhung der Löslichkeit von SSO1949 bei rekombinanter Expression in *E. coli*

Da die schlechte Löslichkeit von SSO1949 enorme Schwierigkeiten in der weiteren Verarbeitung und Charakterisierung des Proteins mit sich bringt, wurde versucht die Löslichkeit des Proteins auf verschiedenen Wegen zu erhöhen.

Die hochkonservierte Region (AS 86-334), die das katalytische Zentrum der Cellulase umfasst, zeigt Ähnlichkeit mit der katalytischen Domäne von Cel12A aus *Rhodothermus marinus*, bei dem die Verkürzung der Ser/Thr-reichen Region zu einer Erhöhung der Aktivität führte (Wicher *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass auch bei SSO1949 die Entfernung eines Teils der Ser/Thr-reichen Region zu einer Erhöhung der Cellulaseaktivität führen könnte (Huang *et al.*, 2005). Möglicherweise führt

diese Verkürzung des Proteins am N-Terminus auch zu einer verbesserten Löslichkeit. Aus diesem Grund wurden bereits in früheren Arbeiten verschiedene Deletionsmutanten kloniert (Franke, 2004; Szolkowy, 2006; Kufner, 2007).

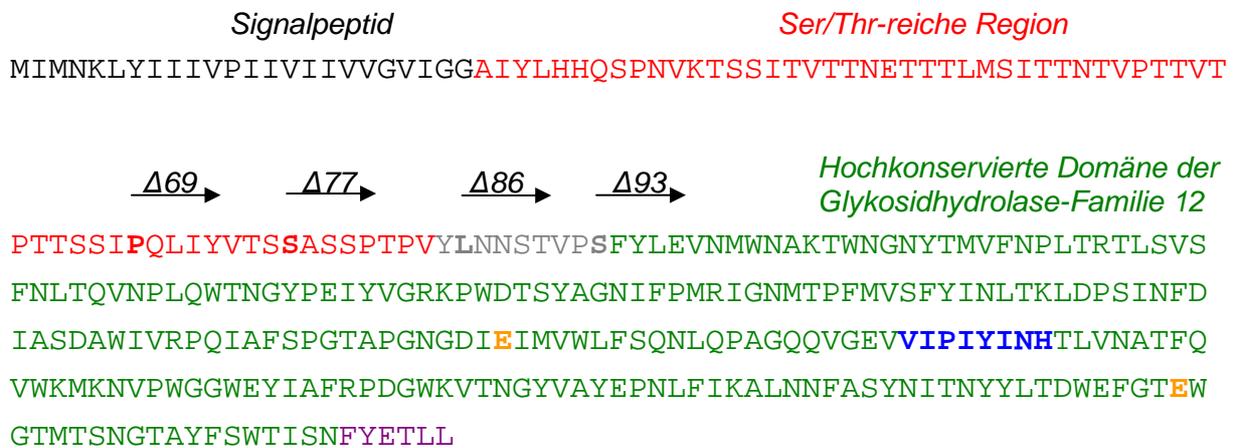


Abbildung 3-10: Aminosäuresequenz der wildtypischen Cellulase SSO1949 (334 AS). Das Signalpeptid (AS 1-24, schwarz dargestellt) wurde zur Überexpression in *E. coli* durch einen His₆-tag ersetzt. Des Weiteren besitzt SSO1949 eine Serin/Threonin-reiche Region (AS 25-85, rot dargestellt), an die eine hochkonservierte Region anschließt (grün dargestellt), die das katalytische Zentrum umfasst. Die exakte Grenze zwischen Ser/Thr-reicher und katalytischer Region ist noch unklar (grau dargestellt). Die N-Termini der untersuchten Deletionsmutanten Δ69-SSO1949-H6, Δ77-SSO1949-H6, Δ86-SSO1949-H6 und Δ93-SSO1949-H6 sind fett und durch einen Pfeil gekennzeichnet (Kufner, 2007). Der hydrophobe Loop ist blau und die für die Untersuchung des C-Terminus entfernten 6 AS sind lila gekennzeichnet. Die zwei katalytischen Glutamat-Reste sind orange hervorgehoben.

Es wurden Deletionsmutanten untersucht, denen die ersten 69 AS beziehungsweise die ersten 93 Aminosäuren am N-Terminus fehlten (Abbildung 3-10). Ersteres wurde ebenfalls unlöslich in Form von „Inclusion Bodies“ exprimiert und besaß nur 10% der katalytischen Aktivität von SSO1949 (Franke, 2004). Die zweite Deletionsmutante wurde zwar in löslicher Form überexprimiert, war jedoch inaktiv (Franke, 2004). Beide Mutanten trugen den His₆-tag am N-Terminus, was möglicherweise eine Blockierung der Substratbindungstasche zur Folge hat. Darüberhinaus wurden möglicherweise beim Entfernen von 93 AS am N-Terminus bereits Aminosäuren des aktiven Zentrums entfernt, was eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge hat. In darauffolgenden Arbeiten wurden weitere Deletionsmutanten kloniert, die am N-Terminus um 69, 77, 86 bzw. 93 Aminosäuren verkürzt sind und den His₆-tag am C-Terminus tragen. Auch sie wurden in

unlöslicher Form überexprimiert (Szolkowy, 2006; Kufner, 2007). Nach Entfernung von 93 Aminosäuren am N-Terminus zeigte das Enzym keinerlei Aktivität mehr (Kufner, 2007). Erklärungen dafür liefert möglicherweise das Strukturmodell von SSO1949, welches zeigt, dass die Ser/Thr-reiche Region wahrscheinlich für die Stabilisierung der aktiven Konformation unter diesen extremen Bedingungen (pH 1.8, 80°C) verantwortlich ist (Huang *et al.*, 2005).

Darüber hinaus wurde bereits versucht die Löslichkeit von SSO1949 durch die Koexpression mit Chaperonen zu verbessern (Kufner, 2007). Chaperone können bei der korrekten Faltung von neu synthetisierten Proteinen helfen, indem sie diese binden und schützen bis sie ihre dreidimensionale Struktur erhalten haben. Die bisher am besten untersuchten Chaperon-Systeme sind das GroEL-GroES- und das DnaK-DnaJ-GrpE-System des gram-negativen Bakteriums *E. coli* (Nishihara *et al.*, 1998), welche auch für den Löslichkeitsversuch von SSO1949 verwendet wurden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Chaperone keinen Einfluss auf die Faltung und somit die Löslichkeit von SSO1949 haben (Kufner, 2007). Auch die C-terminale Fusion der Cellulosebindenden Domäne des thermophilen Pilzes *Humicola grisea var. Thermoidea* konnte die Löslichkeit von SSO1949 nicht erhöhen (Kufner, 2007). Daher wurden in dieser Arbeit weitere Möglichkeiten untersucht, SSO1949 löslich zu exprimieren.

3.3.1. Erhöhung der Löslichkeit von SSO1949 durch Fusion mit Thioredoxin (Trx)-Tag

Durch Fusion eines Thioredoxin (Trx)-tags an archaeale Proteine konnte die Löslichkeit während der rekombinanten Expression in *E. coli* nachweislich verbessert werden (Seonghun, 2008). Thioredoxine sind kleine Proteine (100 AS, ca. 12 kDa), die als Elektronenüberträger an Stoffwechselprozessen beteiligt sind. Sie besitzen ein hoch konserviertes Zentrum der Sequenz Cystein-Glycin-Prolin-Cystein. Sie wirken als Protein-Disulfid-Oxidoreduktasen, indem sie Thiol-Gruppen zweier Cysteine zu einem Disulfid oxidieren.

Auch in dieser Arbeit wurde versucht, die Löslichkeit von SSO1949 während der rekombinanten Expression in *E. coli* durch Ersetzen des N-terminalen His₆-tags durch einen Thioredoxin-tag zu erhöhen.

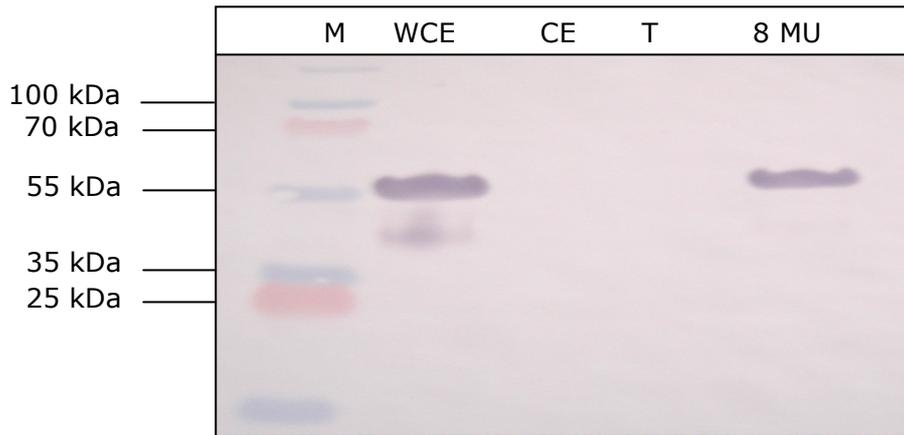


Abbildung 3-11: Westernblot des Löslichkeitstests von SSO1949 nach Fusion mit Thioredoxin-tag. M: Marker, WCE: Gesamtzellextrakt, CE: Rohextrakt, T: Triton X-100-Extrakt, 8 MU: 8 M Harnstoff-Extrakt

Das Molekulargewicht von SSO1949 wurde durch den Thioredoxin-tag auf ca. 55 kDa erhöht. Im Rohextrakt (CE, Abbildung 3-11) ist kein lösliches Protein zu verzeichnen. Die Löslichkeit von SSO1949 konnte durch das Ersetzen des N-terminalen His₆-tags durch einen Thioredoxin-tag nur insofern verbessert werden, dass SSO1949 nun komplett löslich ist in 8 M Harnstoff (8 MU, Abbildung 3-11). Für das Lösen des Proteins mit N-terminalen His₆-tag war bisher ein stärkeres Denaturierungsmittel, nämlich 6 M Guanidiniumhydrochlorid nötig (3.1.1), was die darauf folgende Verarbeitung enorm erschwerte. Auf die Aktivität von SSO1949 hat der Thioredoxin-tag keinen Einfluss genommen, jedoch hat diese Methode nicht zum erwarteten Erfolg geführt. Auch zwei der N-terminalen Deletionsmutanten (Abbildung 3.10, um 77 bzw. 86 AS verkürzt) wurden mit einem Trx-tag fusioniert, was zu dem gleichen Ergebnis wie bei dem Wildtyp führte (nicht gezeigt).

3.3.2. Verkürzung des hydrophoben Loops von SSO1949 und Entfernen von sechs Aminosäuren am C-Terminus

Nach Erstellung einer Modellstruktur der hochkonservierten Region von SSO1949 und Sequenzvergleich mit anderen Mitgliedern der Glykosidhydrolase-Familie 12, konnte ein hydrophober Loop (Abb. 3-12) entdeckt werden, der möglicherweise zur schlechten Löslichkeit von SSO1949 beitragen könnte. Über diesen hydrophoben Bereich könnte SSO1949 mit der Membran interagieren. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Glykosidhydrolase-Familie 12 befindet sich an dieser Stelle eine Insertion von 8 Aminosäuren. Da sich dort beta-Faltblätter befinden, könnte dies bedeuten, dass die benachbarten Faltblätter je um vier Aminosäuren verlängert sind. Um zu überprüfen, ob

dieser Loop Einfluss auf die Löslichkeit von SSO1949 hat, wurden links und rechts des Loops je zwei hydrophobe Aminosäuren deletiert und der Loop somit verkürzt.

		10	20	30	40	50	60	70	80	
T. REESEI	65	IAIPQKRTVNSISSMPTTASWSY-SGSNIRANVAYDLFTAA----	NPN-HVTYSGDY	ELMIWLGKYGDIG	PIGSSQGTV	137				
SSO1949	156	GNIFPMRIGNMTPFMVSYINLTKLDPSINFDIASDAWIVRPQIAFSPG-TAPGNGDI	ELMVWLF	SQN-LQPAGQQVGEV	233					
A. KAWACHII	82	LTFD-KKLVS DVSSIPTSVTWSQ-DDTNVQADVSYDLFTAA----	NAD-HATSSGDY	ELMIWLARYGSVQPIGKQIATA	153					
A. ORYZAE	82	VTFD-KKLVS DVQSIPTDVEWSQ-DNTNVNADVAYDLFTAA----	DQN-HVTYSGDY	ELMIWLARYGTIQPIGTQIDTA	153					
T. NEAPOL.	99	GTEILPVKVKDLPDFYVTLDYSIWYENDLPINLAMETWI TR----	KPDQTSVSSGDV	ELMVWF-YNNILMPGGQK VDEF	172					
S. LIVIDANS	71	PGTDLPVRLDTVSAAPSSISYGF-VDGAVYN-ASYDIWLDP----	TA--RTDGVNQT	ELIXIWFNRVGP IQPIGSPVGT A	141					
R. MARINUS	106	PARAIRDCAARAGAVRRRAHELDVTPITITGRWNAAYDIWFSP----	VTNSGNGYS	GGAEELMIWLNWNGGVMPPGSSRVATV	180					
T. MARITIMA	81	EGSKLPVPVSSMKSF SVEVSFDIHHEP SLPLNFAMETWL TR----	EKYQTEASIGDV	ELMVWF-YFNNLTPGGEKIEEF	154					
		90	100	110	120	130	140	150	160	
T. REESEI	138	-----NV---GGQ---SWTLYY---G----	YNGAMQVYSFVAQTNTTN	-YSGDVKNFFNYLRDNKGY-----	185					
SSO1949	234	<u>VIPYIYNH</u> TL-----YNA-----TFQVWKMKNVPW----	GGWEYIAFRPDG	WKVTNGYVAYE	PNLFKALNNFASY-----	295				
A. KAWACHII	154	-----TV---GGK---SWEVWY---GTS-TQAGAEQKTYSFVAGSPINS-	WSGDIKDFNFNYLTQ	NQGF-----	205					
A. ORYZAE	154	-----TV---EGH---TWELWY---GTT-IQAGAEQKTYSFVSATPINT-	FGGDIKFFDYITSKHSF-----	205						
T. NEAPOL.	173	-----TTTIEINGSPVETKWDVYF---AP---	WGWDYLA	FRLTTPMKDGR-VKFNVKDFVEKAAEVIK	KHSTRVE	235				
S. LIVIDANS	142	-----SV---GGR---TWEVWS---G---	GNGSNDVLSFVAPSAISG	-WSPDVMDFVR-ATVARGL-----	188					
R. MARINUS	181	-----EL---AGA---TWEVWY---AD---	WDWNYIAYRRTP	TPT-TSV-SELDLKAFID-DAVARGY-----	227					
T. MARITIMA	155	-----TIPFVLNGESVEGTWELWL---AE---	WGWDYLA	FRLKDPVKKGR-VKFDVRHFLDAAGKALSSSAR-VK	216					
		170	180	190	200					
T. REESEI	186	NAAGQYVLSYQFGTEP-----FTG----	SGLN	VASWTASIN	218					
SSO1949	296	NITNYLTDWEFGTEWGTMTSNGTA-----YFSWTISNFYETLL	334							
A. KAWACHII	206	PASSQHLITLQCGTEP-----FTGG---	PATFTVDN	WTASVN	239					
A. ORYZAE	206	PASAQYLINMQFGTEP-----FTGG---	PVTFTVPN	WTASVN	239					
T. NEAPOL.	236	NFDEMYFCVWEIGTEF-----GDPNTTAAKFGWTFKDFSV EIG	273							
S. LIVIDANS	189	AENDWYLT SVQAGFEF-----WQN-----GAGLAVNSFSSTVE	221							
R. MARINUS	228	IREPEWYLHAVETGFEL-----WEG-----GAGLRTADFSVTVQ	260							
T. MARITIMA	217	DFEDLYFTVWEIGTEF-----GSPETKSAQFGWK FENFSIDLE	254							

Abbildung 3-12: Alignment der hochkonservierten Region verschiedener Glykosidhydrolasen aus *Trichoderma reesei*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus oryzae*, *Thermotoga neapolitana*, *Streptomyces lividans*, *Rhodothermus marinus* und *Thermotoga maritima*. Alle dargestellten Proteine gehören zur Glykosidhydrolasefamilie 12. SSO1949 ist grün dargestellt. Die konservierten katalytischen Glutamatreste sind orange hervorgehoben. Der hydrophobe Loop in der konservierten Region von SSO1949 ist blau markiert und die vier deletierten hydrophoben Aminosäuren sind unterstrichen.

Des Weiteren könnte auch der hydrophobe C-Terminus eine Rolle bei der schlechten Löslichkeit von SSO1949 spielen. Um dies zu untersuchen, wurden sechs Aminosäuren am C-Terminus deletiert (Abb. 3-10).

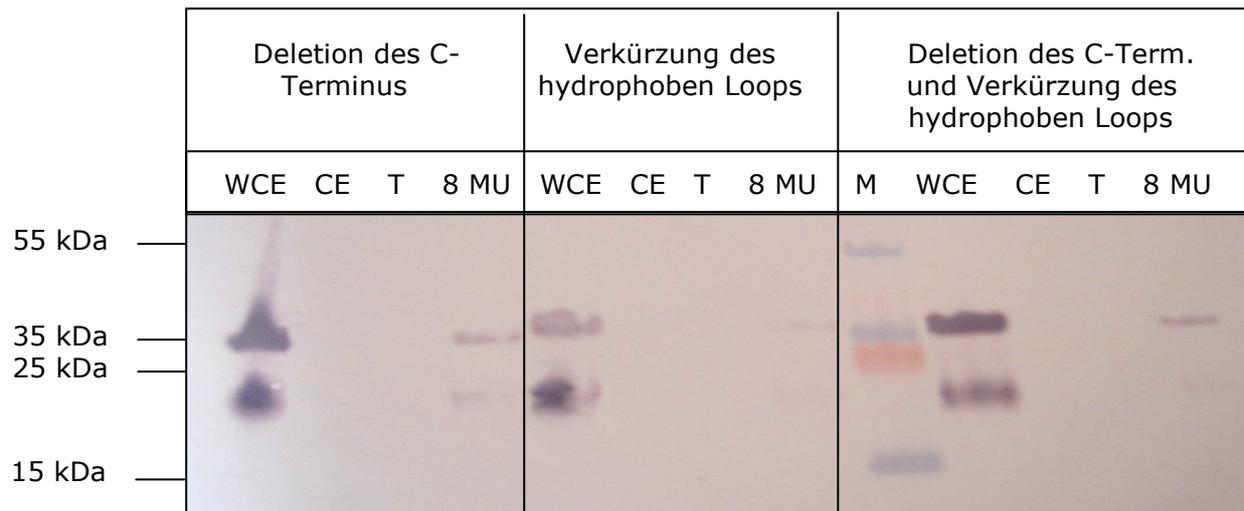


Abbildung 3-13: Westernblot des Löslichkeitstests von SSO1949 nach Deletion von 6 Aminosäuren am C-Terminus und Verkürzung des hydrophoben Loops. M: Marker, WCE: Gesamtzellextrakt, CE: Rohextrakt, T: Triton X-100-Extrakt, 8 MU: 8 M Harnstoff-Extrakt

Abbildung 3-13 zeigt das Ergebnis der Verkürzung des hydrophoben Loops und der Deletion des C-Terminus. Im Rohextrakt (CE, Abbildung 3-13) ist in keiner der drei in Abbildung 3-13 gezeigten Präparationen lösliches Protein zu sehen. SSO1949 wird unlöslich in Form von „Inclusion Bodies“ exprimiert. Auch in 8 M Harnstoff (8 MU, Abbildung 3-13) sind nur ca. 10% des Proteins löslich. Das Vollängenprotein SSO1949 läuft auf der Höhe von ca. 35 kDa. Darüberhinaus ist im Westernblot noch ein Nebenprodukt bei ca. 20 kDa zu sehen. Auch durch die Kombination der beiden Mutationen (Abbildung 3-13, rechts) konnte die Löslichkeit von SSO1949 nicht erhöht werden.

Das Entfernen des C-Terminus beeinflusst die Aktivität von SSO1949 nicht, während die Verkürzung des hydrophoben Loops zu einem Verlust der cellulolytischen Aktivität führt. Der Loop befindet sich in der hochkonservierten Region von SSO1949. Möglicherweise wurde durch Deletion der Aminosäuren in der Umgebung des Loops die strukturelle Integrität der Cellulase beeinträchtigt bzw. zerstört. Auch die Kombination aus Thioredoxin-tag und Deletion des C-Terminus oder Thioredoxin-tag und Verkürzung des hydrophoben Loops führten nicht zu einer verbesserten löslichen Expression von SSO1949 (nicht gezeigt).

3.4. Expression von SSO1949 in *Sulfolobus acidocaldarius* MR31

In den vorherigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die rekombinante Expression von SSO1949 in *E. coli* zu unlöslichem Protein führt. Des Weiteren bereitete die Proteinaufreinigung in Verbindung mit der Proteinrückfaltung Schwierigkeiten.

Daher wurde versucht SSO1949 in *Sulfolobus acidocaldarius* MR31 zu exprimieren und aufzureinigen. In dem Rezipienten *S. acidocaldarius* MR31 sind in dem Gen *pyrE* 18 Basen deletiert (Reilly & Grogan, 2001), wodurch dieser Stamm nicht mehr zur selbstständigen Uracil-Produktion fähig ist. Diese auxotrophen Stämme können nur wachsen, wenn das (End-)Produkt des unterbrochenen Stoffwechselweges durch Zugabe ins Medium zur Verfügung gestellt wird und von den Zellen aufgenommen werden kann. Als selektiver Marker werden die funktionsfähigen Wildtyp-Gene *pyrE* und *pyrF* verwendet, die sich auf dem zu transformierenden Shuttle- bzw. Integrationsvektor befinden. Dies stellt einen enormen Vorteil gegenüber der Antibiotika-Selektion dar (Berkner, 2007). Zur Expression von Proteinen in *Sulfolobus* gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten. Das Gen kann über einen Shuttle-Vektor (Abbildung 3-14 b) oder einen Integrationsvektor (Abbildung 3-14 a) in *Sulfolobus* eingebracht werden. Auf dem Integrationsvektor sind die multiple Klonierungsstelle sowie die *pyrE*- und *pyrF*-Gene von zum Genom von *Sulfolobus acidocaldarius* homologen Regionen flankiert, so dass SSO1949 mit samt *pyrEF* in das Genom von *S. acidocaldarius* durch homologe Rekombination integrieren kann. Die erfolgreiche Transformation bzw. Integration kann durch anschließende Selektion auf Platten ohne Uracil überprüft werden.

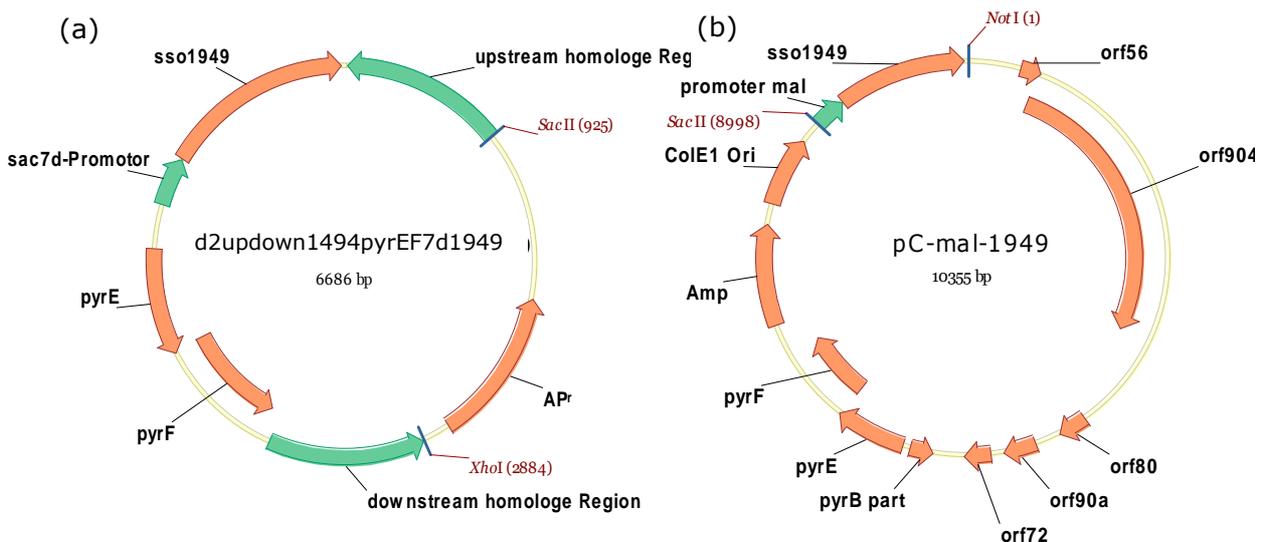


Abbildung 3-14: (a) Integrationsvektor für *S. acidocaldarius*. Die zum Genom von *S. acidocaldarius* homologen Sequenzen sind grün gekennzeichnet. Die *pyrEF*-Gene sind orange dargestellt. Das Gen *sso1949* unter Kontrolle des *sac7d*-Promotors wurde über

eine SmaI-Schnittstelle in den Vektor kloniert, die dabei verloren geht. Durch Restriktion mit SacII und XhoI wurde das Plasmid vor der Transformation in *Sulfolobus acidocaldarius* MR31 linearisiert. (b) *E. coli-Sulfolobus*-Shuttle-Vektor. Zu sehen sind die konservierten und nicht konservierten orfs sowie die *pyrEF*-Gene. Darüber hinaus enthält der Shuttle-Vektor einen Replikationsursprung sowie einen Resistenzmarker (Ampicillin) für *E. coli*. *sso1949* unter Kontrolle des *mal*-Promotors wurde über SacII und NotI in den Vektor ligiert.

In dieser Arbeit wurde SSO1949 unter verschiedenen Promotoren in *S. acidocaldarius* MR31 exprimiert. Dazu wurde SSO1949 sowohl mit Hilfe des Shuttle-Vektors in *S. acidocaldarius* transformiert als auch zur stabileren Proteinexpression ins Genom von *S. acidocaldarius* integriert. Als Promotoren wurden der *dps*-, *mal*- und *sac7d*-Promotor verwendet. Der schwache nicht induzierbare Promotor *dps* stammt von der Promotorregion der *dps*-Gene aus *S. solfataricus* P2 (*sso2079*) bzw. *S. acidocaldarius* (*saci_1821*), die für DNA-bindende Proteine von verkümmerten Zellen kodieren (Maaty *et al.*, 2009; Wiedenheft *et al.*, 2005). Der induzierbare *mal*-Promotor entspringt der Promotorregion des *mbp*-Gens aus *S. acidocaldarius*, welches für das Maltose-bindende Protein *Saci_1165* kodiert (Berkner *et al.*, 2010). Für starke konstitutive Proteinexpression wurde der *sac7d*-Promotor von der Promotorregion des *sac7d*-Gens aus *S. acidocaldarius* gewählt, welches für das DNA-bindende Protein *saci_0064* kodiert. Nach erfolgreicher Transformation wurden die erhaltenen Klone auf Aktivität überprüft (Abbildung 3-15).

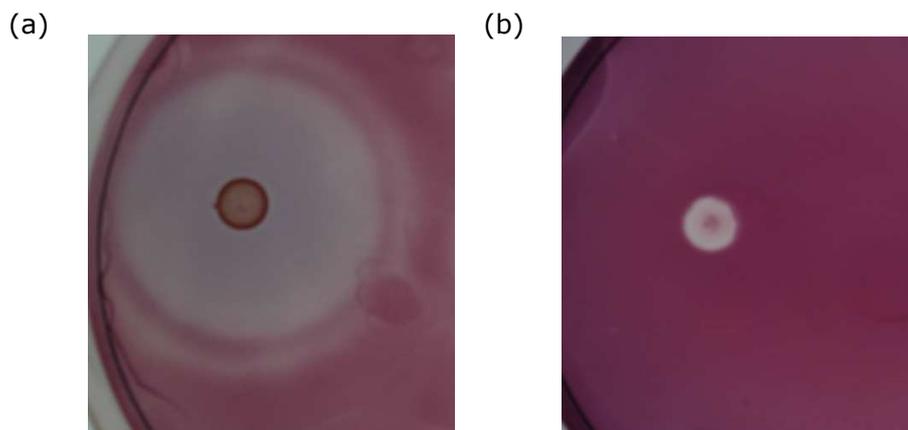


Abbildung 3-15: Nachweis der erfolgreichen Expression von SSO1949 in *S. acidocaldarius* unter dem *sac7d*-Promotor. (a) *S. acidocaldarius* MR31 nach Transformation mit *d2updown1494pyrEF_sso1949*, (b) Negativkontrolle von *S. acidocaldarius* MR31 ohne Plasmid. Nach Anwachsen der Klone in Flüssigkultur wurden je 10 µl Kultur auf NZ,X,D-Platten, die CMC enthielten, aufgetragen und für 3 d bei 75°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten mit Kongorot angefärbt.

In Abbildung 3-15 ist exemplarisch dargestellt wie die erfolgreiche Expression von SSO1949 in *S. acidocaldarius* MR31 überprüft wurde. In diesem Fall wurde SSO1949 unter dem *sac7d*-Promotor exprimiert. Eine erfolgreiche Expression konnte mittels NZ,X,D-Platten, die Carboxymethylcellulose enthielten, nachgewiesen werden. Wird SSO1949 exprimiert, wird die Cellulose um die Kolonie abgebaut. Nach Anfärben der Platten mit Kongorot erscheint nur CMC-enhaltendes Medium rot, während Bereiche ohne Cellulose nicht angefärbt werden können. Dies ist in Abbildung 3-15 (a) dargestellt. Im Gegensatz zur Negativkontrolle (Abbildung 3-15 b) ist ein klarer heller Hof rund um die gewachsene Kolonie zu sehen. SSO1949 wird demnach in *S. acidocaldarius* MR31 ohne Hintergrundaktivität exprimiert.

Dieser Expressionstest wurde für die Expression von SSO1949 unter allen drei Promotoren sowohl nach Transformation des Shuttle-Vektors sowie auch nach der Integration ins Genom von *S. acidocaldarius* MR31 durchgeführt. In Abbildung 3-16 sind die Aktivitäten in einer semiquantitativen Reihung dargestellt.

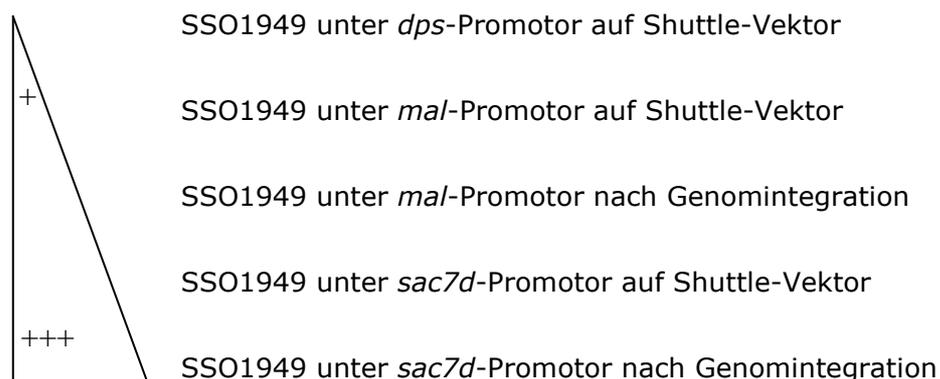


Abbildung 3-16: Semiquantitative Reihung der Expressionseffizienz von SSO1949 in *S. acidocaldarius* MR31 nach Expression mit Hilfe des Shuttle-Vektors und nach Integration ins Genom unter Kontrolle verschiedener Promotoren. Die Expressionsrate nimmt von oben nach unten zu.

Die Expressionsrate von SSO1949 unter dem schwachen *dps*-Promotor ist relativ gering. Expression von SSO1949 konnte zwar nachgewiesen werden, jedoch bildete sich nur ein kleiner Hof um die gewachsene Kolonie aus. Die Expressionsrate unter dem *mal*-Promotor war deutlich höher und unter dem *sac7d*-Promotor wurde die grösste Menge an Protein exprimiert. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass im Vergleich zur Expression mit Hilfe des Shuttle-Vektors, die Expressionsrate nach der Integration von SSO1949 ins Genom nochmals erhöht werden konnte. Die Genomintegration von SSO1949 scheint daher die stabilere Variante der Expression zu sein.

Um SSO1949 weiter zu untersuchen und aufzureinigen zu können, musste zunächst abgeklärt werden, wo SSO1949 lokalisiert ist. SSO1949 besitzt ein Signalpeptid und wird somit sekretiert (Albers & Driessen, 2002). Bei SSO1949 scheint es sich um eine extrazelluläre Cellulase zu handeln, die mit der Zelloberfläche assoziiert ist. Wie diese Bindung an die Zelloberfläche zu stande kommt, konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Das Enzym könnte über die Ser/Thr-reiche Region an die S-Layer gebunden sein, da diese wie in anderen S-Layer gebundenen Proteinen in *Sulfolobus* höchstwahrscheinlich O-glykosyliert vorliegt (Brouns *et al.* 2006). Aufgrund hydrophober Aminosäuren in der Signalsequenz könnte SSO1949 jedoch ebenso auch in der Membran verankert sein (Girfoglio, 2009). SSO1949 zeigt 85% Sequenzähnlichkeit zu SSO1354, einer weiteren Cellulase aus *S. solfataricus*, welche bereits erfolgreich aus der Membranfraktion einer *S. solfataricus*-Kultur aufgereinigt wurde (Maurelli *et al.*, 2008). In einer weiteren Arbeit (Girfoglio, 2009) wurde SSO1354 ebenfalls als extrazelluläre und zelloberflächenassoziierte Cellulase bezeichnet und aus dem Überstand einer Kultur in der stationären Wachstumsphase mit einer optischen Dichte von 1.2 aufgereinigt. Hier wurde davon ausgegangen, dass SSO1354 beim Übergang der *Sulfolobus*-Zellen in die Absterbephase und darauffolgenden Zelllyse in das umgebende Medium freigelassen wird.

Zur Überprüfung dieser Beobachtungen wurden sowohl der Überstand einer *S. acidocaldarius*-Kultur in der stationären Wachstumsphase als auch das gelöste Pellet auf Gelrite-Platten mit Carboxymethyl-Cellulose bei pH 3 aufgetragen, über Nacht bei 75°C inkubiert und mit Kongorot angefärbt (Abbildung 3-17).

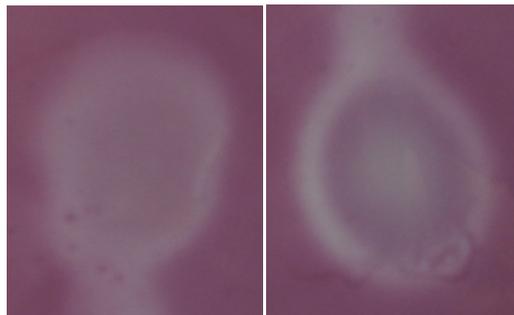


Abbildung 3-17: Vergleich der Aktivitäten von SSO1949 in Pellet (links) und Überstand (rechts) einer *Sulfolobus acidocaldarius* MR31-Kultur in der stationären Wachstumsphase.

Nach Anfärben der Platte stellte sich heraus, dass sich die Aktivität von SSO1949 zu ungefähr gleichen Teilen auf Pellet und Überstand verteilt. Das heisst, dass SSO1949 scheinbar zu 50% zellassoziiert vorliegt und die anderen 50% des Proteins sich im Medium befinden. Deshalb wurde im Folgenden auf verschiedene Arten versucht

SSO1949 sowohl aus der Membranfraktion sowie auch aus dem Kulturüberstand aufzureinigen.

3.4.1. Aufreinigung von SSO1949 aus der Membranfraktion

3.4.1.1. Aufschluss von *S. acidocaldarius* MR31 und Präparation der Membran

Zu Beginn der Arbeiten wurde mit dem induzierbaren *mal*-Promotor gearbeitet. Das Pellet aus 1 l Kultur von *S. acidocaldarius* MR31 in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 und 300 mM NaCl resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach dreimaliger Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die Membran durch Ultrazentrifugation bei 50 000 g für 20 h präpariert. Nach anschließendem Waschen wurde das Membranpellet in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 7, 300 mM NaCl resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde auf 5 mg/ml eingestellt und 2% Dodecylmaltosid zugegeben.

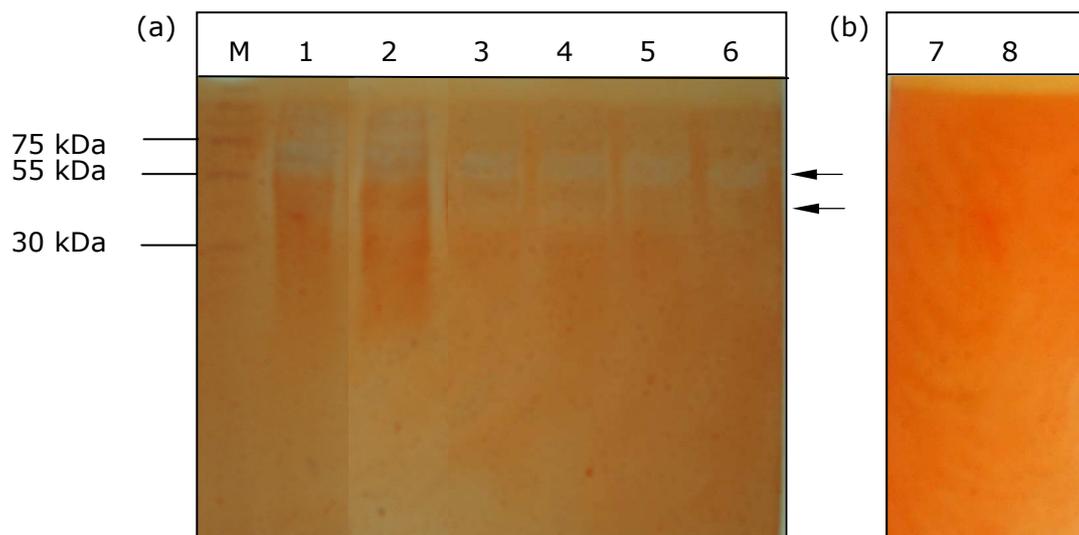


Abbildung 3-18: (a) 9%iges Aktivitätsgel der Membranpräparation von *S. acidocaldarius* MR31 nach Expression von SSO1949 unter dem induzierbaren *mal*-Promotor. M: Marker, 1: WCE, 2: gelöstes Membranpellet, 3/4: Membranfraktion in 2% DDM (15 µl aufgetragen), 5: Membranfraktion in 2% DDM (10 µl aufgetragen), 6: Membranfraktion in 2% DDM (5 µl aufgetragen). (b) Membranpräparation von *S. acidocaldarius* MR31 ohne SSO1949 (Negativkontrolle). 7: Membranfraktion in 2% DDM (15 µl aufgetragen), 8: Membranfraktion in 2% DDM (10 µl aufgetragen)

Für diesen in Abbildung 3-18 dargestellten Aktivitätstest wurde ein SDS-Polyacrylamidgel hergestellt, das 0,1% CMC enthält. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel gewaschen um überschüssiges SDS zu entfernen und SSO1949 zu renaturieren. Anschließend wurde das Gel bei pH 1.8 und 75°C über Nacht inkubiert. Diese Bedingungen wurden gewählt, weil SSO1949 bei diesen Bedingungen optimale enzymatische Aktivität aufweist. Nach der Inkubation wurde das Gel mit Kongorot gefärbt. Aufgrund der Bindung von Kongorot an die im Gel enthaltene CMC ist das Gel insgesamt rot gefärbt. Im Anschluss wurde das Gel mit NaCl gewaschen. Aktive Cellulase sollte durch die Inkubation bei pH 1.8 und 75°C die im Gel enthaltene Cellulose auf der Höhe ihrer Molekularmasse abbauen. Als Folge treten im Bereich des CMC-Abbaus weiße Banden auf. Diese Methode ermöglicht die Detektion einer Cellulase in Verbindung mit ihrer Molekülmasse und trennt Proteinverunreinigungen vom aktiven Enzym.

Nach dem Lösen der Membranen durch Dodecylmaltosid zeigt sich im Aktivitätsgel eine deutliche Bande zwischen 30 und 55 kDa und eine zweite schwächere Bande zwischen 55 und 75 kDa (Abbildung 3-18, Bahn 3-6). Dies entspricht nicht exakt der erwarteten Grösse von ca. 35 kDa. Erklärungen dafür könnte eine mögliche Glykosylierung der Ser/Thr-reichen Region oder Dimersierung des Proteins liefern. Möglicherweise ist das Protein auch noch mit Membranbestandteilen assoziiert und läuft deshalb im Gel oberhalb seiner tatsächlichen Grösse.

Für die Negativkontrolle wurde die Membranfraktion von nicht transformiertem *S. acidocaldarius* MR31 präpariert und auf Aktivität überprüft (Abbildung 3-18 b). Hierbei konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Die in Abbildung 3-18 (a) zu sehende Aktivität kann also nur aus der Expression von SSO1949 resultieren.

3.4.1.2. Aufreinigung von SSO1949 über Con A-Sepharose

Da SSO1949 in der Membranfraktion noch stark verunreinigt ist, wurde versucht das Protein mittels Affinitätschromatographie weiter aufzureinigen. Aufgrund der Glykosylierung der Ser/Thr-reichen Domäne von SSO1949 wurde als Säulenmaterial Con A gewählt. Conavalin A (Con A) ist ein tetrameres Metalloprotein, welches aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) isoliert wurde. Con A bindet Proteine, welche α -D-Mannopyranosyl, α -D-Glucopyranosyl und sterisch verwandte Reste enthalten. Der zu bindende Zucker benötigt die Anwesenheit einer C-3, C-4 und C-5-Hydroxylgruppe für die Reaktion mit Con A. An Sepharose gekoppeltes Con A wird routinemässig für die Aufreinigung von Glykoproteinen, Polysacchariden und Glykolipiden verwendet.

Da Dodecylmaltosid mit dem Säulenmaterial interagiert, wurde das Membranpellet nach dem Zellaufschluss nicht in DDM sondern in 0,5% Triton X gelöst (Maurelli *et al.*, 2008). Nach Dialyse wurde die Membranfraktion auf die Con A-Säule aufgetragen und im Anschluss mit α -D Methylmannoside eluiert.

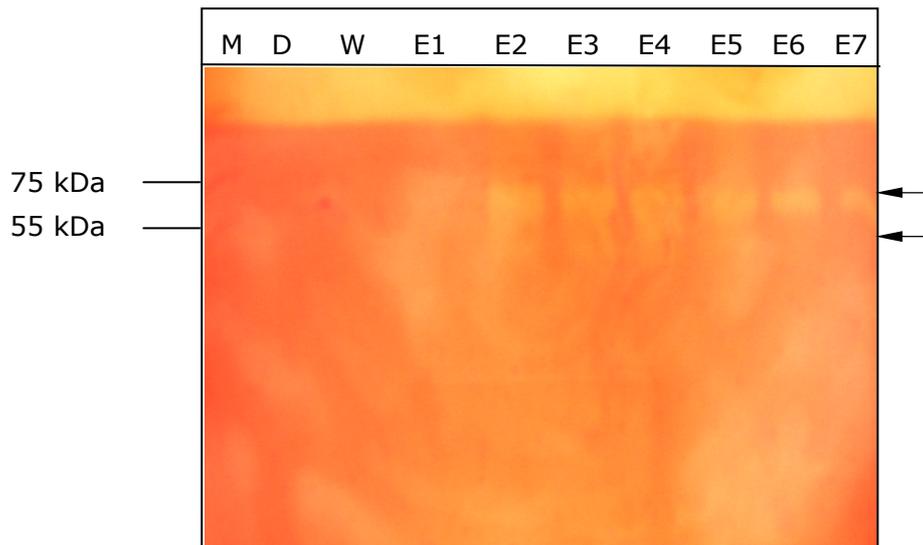


Abbildung 3-19: 9%iges Aktivitätsgel der Aufreinigung von SSO1949 über Con A-Sepharose nach Präparation aus der Membranfraktion von *S. acidocaldarius* MR31. M: Marker, D: Durchbruch, W: Waschfraktion, E: Eluatfraktionen

SSO1949 bindet an die Con A-Sepharose und lässt sich mit α -D-Methylmannoside eluieren (Abbildung 3-19). Das Protein eluiert lange und ist auch noch Eluat 7 noch nicht vollständig von der Säule eluiert. Die Eluate E1-E4 zeigen zwei Banden zwischen 30 und 55 kDa sowie 55 und 75 kDa. Ab Eluat 5 ist nur noch eine Bande zwischen 55 und 75 kDa zu sehen (Abbildung 3-19). Das zu hohe Molekulargewicht und die Bindung an Con A, welches nur mit Zuckerresten interagiert, bestätigen die Vermutung, dass SSO1949 glykosyliert vorliegt.

3.4.1.3. Kombination von Coomassie- und Aktivitätsfärbung im SDS-Gel

Zur weiteren Identifizierung von SSO1949 und um zu untersuchen, ob im SDS-Gel unterschiedliche Banden in Eluaten von SSO1949 im Vergleich zur Negativkontrolle auftreten, wurden Coomassie- und Aktivitätsfärbung im SDS-Gel kombiniert. Die Eluate nach der Con A-Säule wurden vereinigt und aufkonzentriert und zusammen mit der Membranfraktion der Negativkontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen. Eine Hälfte des Gels wurde mit Kongorot, die andere Hälfte mit Coomassie gefärbt (Abbildung 3-20).

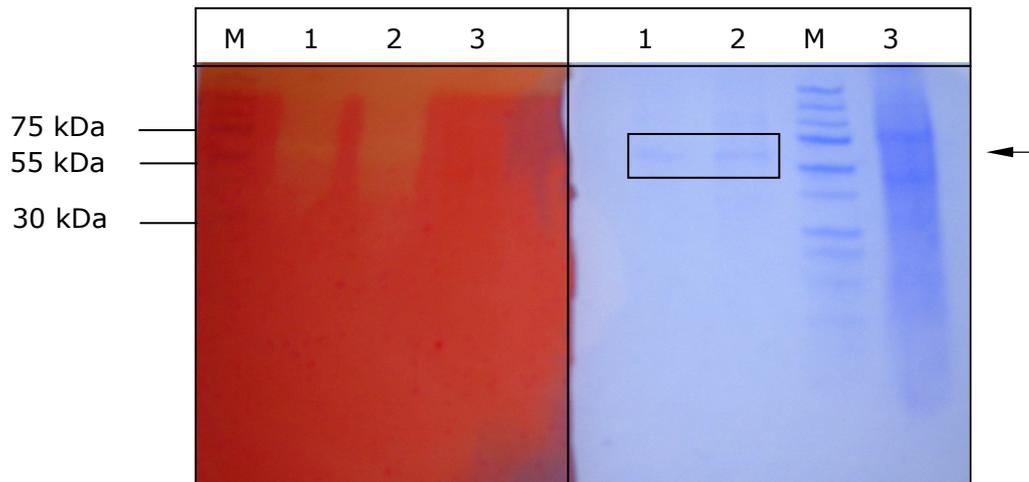


Abbildung 3-20: 9%iges SDS-Gel der vereinigten Eluate von SSO1949 nach der Con A-Säule und der Membranfraktion der Negativkontrolle von *S. acidocaldarius* MR31. M: Marker, 1: 5 μ l Eluat, 2: 10 μ l Eluat, 3: Membranfraktion der Negativkontrolle. Die linke Hälfte des Gels wurde mit Kongorot, die rechte Hälfte mit Coomassie gefärbt.

Die Negativkontrolle (Abbildung 3-20, Bahn 3) zeigt wie erwartet keine Aktivität. Die Bahnen 1 und 2 in Abbildung 3-20 zeigen eine deutliche Bande zwischen 55 und 75 kDa. Auch nach der Coomassiefärbung ist ein klare Bande zwischen 55 und 75 kDa zu sehen (Abbildung 3-20, rechts, Bahnen 1 und 2, Kästchen). Die Proteinbanden in der Negativkontrolle scheinen auch auf einer anderen Höhe zu laufen als die in der SSO1949-Fraktion.

SSO1949 konnte somit erfolgreich in *S. acidocaldarius* MR31 exprimiert und aus der Membranfraktion aufgereinigt werden. Um abzuschließen, dass es sich bei dem unter Abbildung 3-20 identifizierten Protein tatsächlich um SSO1949 müsste die Bande ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht werden.

3.4.2. Aufreinigung von SSO1949 aus dem Überstand einer *S. acidocaldarius*-Kultur

In *S. acidocaldarius* MR31 exprimiertes SSO1949 verteilt sich scheinbar zu gleichen Teilen auf die Membranfraktion und den Kulturüberstand (Abbildung 3-17). Deshalb wurde im Folgenden versucht die Cellulase aus dem Überstand einer *S. acidocaldarius*-Kultur aufzureinigen. Da bei Expression von genomintegriertem SSO1949 unter dem *sac7d*-Promotor die höchste Aktivität zu beobachten war, wurde für die folgenden Aufreinigungsversuche dieses Konstrukt verwendet.

Die Aufreinigung erfolgte aus einer *S. acidocaldarius*-Kultur von 2 l. Zu Beginn der Aufreinigung stand eine Volumenreduktion. Dazu wurden verschiedene Verfahren getestet. Neben der Aufreinigung über Kationenaustauschchromatographie wurde auch versucht SSO1949 durch 90% Ammoniumsulfat aus dem Überstand zu fällen. Die Kationenaustauschchromatographie ergab eine nur sehr schlechte Bindung der Cellulase an das Säulenmaterial. Nach dem Präzipitationsversuch mit Ammoniumsulfat schien das Protein auszufallen. Eine vollständige Resuspension des Proteinpellets war jedoch nicht möglich, wodurch nach erneuter Zentrifugation ca. 70% des Proteins verloren gingen. Als erfolgsversprechender erwiesen sich jedoch zwei weitere Reinigungsverfahren.

3.4.2.1. Aufreinigungsstrategie 1 (Kombination von Affinitäts- und Anionenaustauschchromatographie)

Zunächst wurde versucht, SSO1949 mittels Affinitätschromatographie über Con A-Sepharose aufzureinigen. Der Überstand einer *S. acidocaldarius*-Kultur wurde nach Einstellen des pH-Wertes auf 7.4 für 2 h mit dem Säulenmaterial gerührt und das Säulenmaterial über eine Nutsche abgesaugt. Nach Überführung in eine Tropfsäule wurde mit α -D-Methylmannosid eluiert und die Fraktionen auf Aktivität getestet. Dabei stellte sich heraus, dass zur vollständigen Bindung von SSO1949 an Con A eine grosse Menge Säulenmaterial benötigt wird, da verschiedene Komponenten des Mediums mit der Cellulase um Bindungsplätze konkurrieren. Darüber hinaus eluiert SSO1949 lange. Das Protein verteilte sich über 20 Eluatfraktionen und konnte auch durch eine erhöhte α -D Methylmannosid-Konzentration nicht schneller eluiert werden. Die Eluate, welche Aktivität zeigten, wurden vereinigt und über Anionenaustauschchromatographie bei pH 7.5 weiter aufgereinigt. Die Eluate wurde mit Hilfe von CMC-Platten auf ihre Aktivität geprüft. SSO1949 bindet an EMD-TMAE und lässt sich auch vollständig wieder eluieren. Die vier Eluate, die Aktivität zeigten wurden aufkonzentriert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Es zeigte sich, dass SSO1949 nicht rein in den Eluaten vorlag, sondern noch andere Proteine mitaufgereinigt wurden. SSO1949 konnte keiner Bande genau zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde zu einem anderen Reinigungsverfahren übergegangen.

3.4.2.2. Aufreinigungsstrategie 2 (Kombination von Hydrophober Interaktionschromatographie und Anionenaustauschchromatographie)

Die Aufreinigung von SSO1949 mittels Hydrophober Interaktionschromatographie stellte sich als erfolgsversprechend heraus. Ausgehend von einer 2 l-Kultur, wurde der Kultur-Überstand auf 2.5 M Ammoniumsulfat gebracht und anschliessend 2 h mit dem Säulenmaterial (EMD-Propy, Merck) gerührt. Nach Absaugen des Säulenmaterials über

eine Nutsche, wurde es in eine Tropfsäule überführt und mit sinkender Salzkonzentration eluiert. Alle Fraktionen wurden auf CMC-Platten auf Aktivität überprüft. Im Durchbruch konnte keine Aktivität verzeichnet werden, was dafür spricht, dass das gesamte Protein an die Säule gebunden hat. Alle Eluate, die Aktivität zeigten wurden vereinigt und über Anionenaustauschchromatographie (EMD-TMAE, Merck) bei pH 7.5 weiter aufgereinigt. Auch hier konnte keine Aktivität im Durchbruch verzeichnet werden. Die vier Fraktionen, die Aktivität zeigten, wurden aufkonzentriert und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3-21).

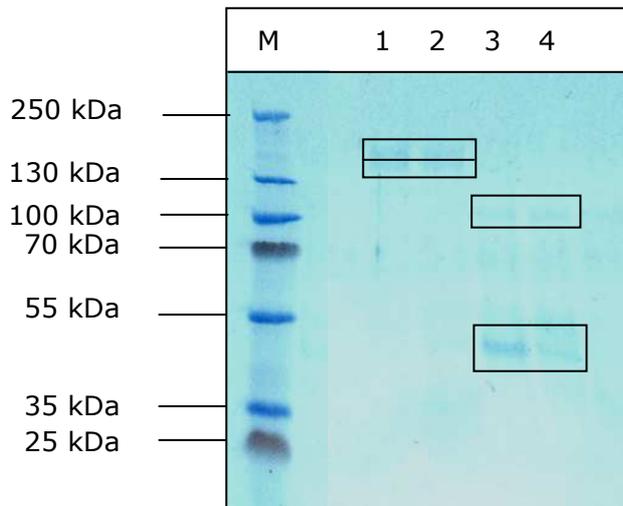


Abbildung 3-21: 9%iges mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel nach der Aufreinigung von SSO1949 über Hydrophobe Interaktions- und anschließender Anionenaustauschchromatographie. M: Marker, 1-4: konzentrierte Eluate nach Anionenaustauschchromatographie. Die mit Kästchen markierten Banden wurden zur massenspektrometrischen Untersuchung geschickt.

Nach der Aufreinigung von SSO1949 über Hydrophobe Interaktions- und Anionenaustauschchromatographie konnten vier Proteinbanden identifiziert werden (Abbildung 3-21). Sie befinden sich zwischen 35 und 55 kDa, 75 und 130 kDa und zwischen 130 und 250 kDa, wobei es sich bei letzterem um eine Doppelbande handelt. Da SSO1949 mit grosser Wahrscheinlichkeit glykosyliert vorliegt, und deshalb das zu erwartenden Molekulargewicht von SSO1949 verändert ist, mussten die Proteine zur Identifikation massenspektrometrisch untersucht werden. Alle vier Banden (Abbildung 3-21, Kästchen) wurden ausgeschnitten und zur Massenspektrometrie geschickt. Die Bande zwischen 75 und 130 kDa konnte als eine endogene Amylase aus *S. acidocaldarius* identifiziert werden. Auch die drei anderen Proteinbanden wurden als verschiedene Hintergrundproteine aus *Sulfolobus acidocaldarius* identifiziert. Es ist daher anzunehmen, dass SSO1949 nur in einer geringen Menge exprimiert wird und aufgrund der Glykosylierung der Ser/Thr-Region keine scharfe Bande im Gel ergibt.

Da das Laufverhalten von SSO1949 im Aktivitätsgel aufgrund der enthaltenen Cellulose höchstwahrscheinlich anders ist als im herkömmlichen SDS-Gel, wurde versucht Aktivitäts- und SDS-Gel zu kombinieren (Abbildung 3-22).

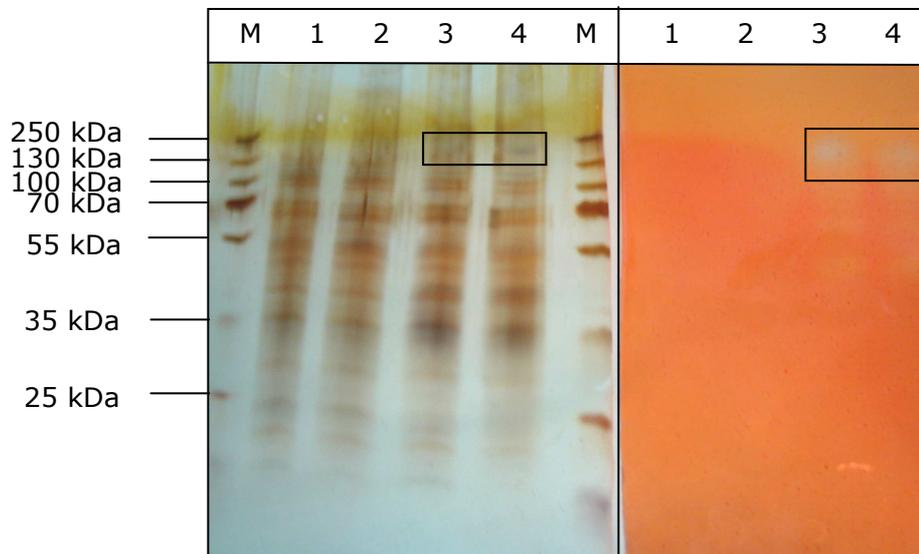


Abbildung 3-22: 9%iges SDS-Gel der vereinigten Eluate von SSO1949 und der Negativkontrolle nach Aufreinigung über Hydrophobe Interaktions- und anschließender Anionenaustauschchromatographie. M: Marker, 1/2: MR31-Kontrolle, 3/4: SSO1949. Die linke Hälfte des Gels wurde mit Silber gefärbt, die rechte Hälfte mit Kongorot. Die mit dem Kästchen markierte Bande wurde zur massenspektrometrischen Untersuchung geschickt.

Ein Aktivitätsgel, welches Carboxymethyl-Cellulose enthält, wurde nach dem Lauf geteilt und zur einen Hälfte mit Kongorot und zur anderen Hälfte mit Silber gefärbt. Es wurde erwartet, dass im Vergleich zur Coomassie-Färbung eine deutlichere Bande auftritt.

Auf der gleichen Höhe, auf der die Aktivität im Aktivitätsgel zu sehen ist, konnte im mit Silber gefärbten Gel ebenfalls im Vergleich zur Negativkontrolle eine schwache Proteinbande entdeckt werden (Abbildung 3-22, Kästchen). Auch diese Bande wurde ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Jedoch konnte auch sie nicht als SSO1949 identifiziert werden.

Es ist eine Tatsache, dass SSO1949 in *S. acidocaldarius* MR31 exprimiert wird, da auch nach mehreren Untersuchungen deutliche cellulolytische Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden konnte. Auch mittels SDS-Gel konnte eine Bande identifiziert werden, bei der es sich möglicherweise um SSO1949 handelt. Dieser Verdacht konnte jedoch nicht durch Massenspektrometrie bestätigt werden. Dies deutet darauf hin, dass SSO1949 in *Sulfolobus acidocaldarius* zwar exprimiert wird, jedoch ist die Expressionsrate scheinbar so gering, dass SSO1949 als kaum sichtbare Bande

auftritt. Möglicherweise läuft SSO1949 in der Nähe der ausgeschnittenen Bande, und wird aber durch andere Proteine überdeckt. SSO1949 scheint jedoch eine hohe spezifische Aktivität aufzuweisen, da trotz nicht bzw. kaum sichtbarer Proteinbande eine deutliche Aktivität auf dem Aktivitätsgel zu sehen ist.

Ausgehend von der spezifischen Aktivität von SSO1949 von $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ nach rekombinanter Expression in *E. coli* und nativer Aufreinigung (Huang *et al.*, 2005), kann die Menge an in *Sulfolobus* exprimierter Cellulase abgeschätzt werden. Für die Aktivitätsmessung mit dem fluoreszenten Hexaosid wurde 1 μl SSO1949 nach der Aufreinigung über Hydrophobe Interaktionschromatographie und Anionenaustauschchromatographie aus dem Kulturüberstand verwendet. Der Anstieg der Fluoreszenz pro Zeit wurde am Fluorometer verfolgt und mit Hilfe von Gleichung 2 (3.1.4) konnte die Enzymmenge im Ansatz berechnet werden. Die Berechnung ergab eine SSO1949-Menge von 12.5 ng in diesem Reaktionsansatz. Ausgehend davon konnte die Proteinmenge pro Bande auf dem mit Silber gefärbten Gel in Abbildung 3-22 abgeschätzt werden. Demnach wären auf das Gel je ca. 35 ng SSO1949 aufgetragen worden. Da die Nachweisgrenze dieser Silberfärbung im Nanogrammbereich liegt, sollte diese Bande gut sichtbar sein. Aufgrund der hohen Sensibilität des Kits treten nach der Färbung jedoch sehr viele Banden auf, die die gesuchte Bande von SSO1949 möglicherweise überdecken und damit ein exaktes Ausschneiden der Banden erschweren. Das Ausschneiden von SSO1949 wird auch noch insofern erschwert, da das Protein aufgrund seiner Glykosylierung möglicherweise keine scharfe Bande im Gel ergibt.

3.4.3. Vergleich von SSO1949 aus Membran und Überstand

Aufgrund von Strukturanalysen wurde vorausgesagt, dass SSO1949 in *Sulfolobus* sekretiert wird (Albers & Driessen, 2002) und mit der Zelloberfläche assoziiert ist. Es zeigte sich, dass sich SSO1949 in einer Kultur der stationären Phase zu gleichen Teilen auf Membran und Überstand verteilte. Daher wurde SSO1949 aus *Sulfolobus acidocaldarius* MR31 sowohl aus der Membranfraktion als auch aus dem Kulturüberstand aufgereinigt. Zum Vergleich wurden die verschiedenen Präparationen auf einem Aktivitätsgel analysiert (Abbildung 3-23).

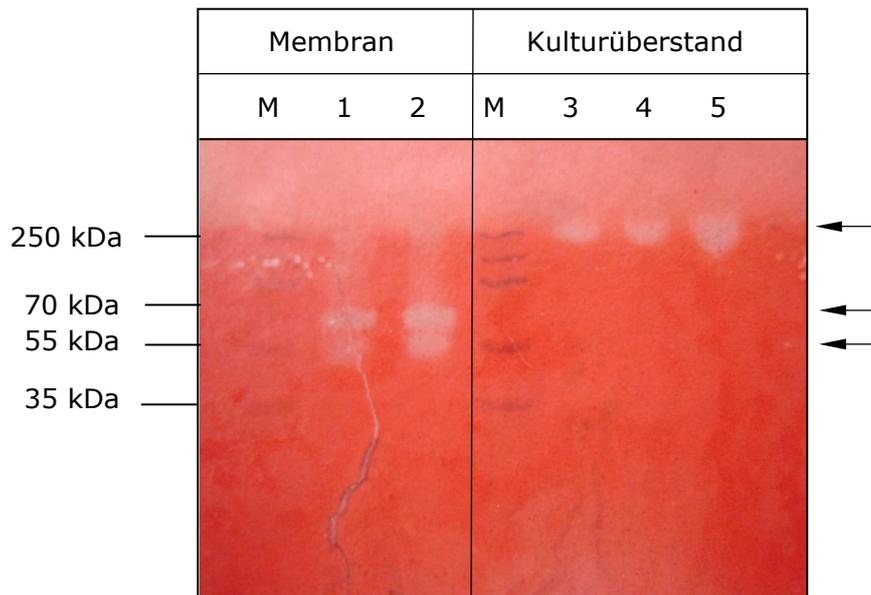


Abbildung 3-23: 9%iges Aktivitätsgel von SSO1949 nach Aufreinigung aus der Membranfraktion von *S. acidocaldarius* MR31 und aus dem Kulturüberstand. M: Marker, 1/2: aus der Membran präpariertes SSO1949, 3/4/5: aus dem Kulturüberstand präpariertes SSO1949

SSO1949 zeigt nach Aufreinigung aus der Membran und aus dem Kultur-Überstand unterschiedliches Laufverhalten. Bei Präparation aus der Membranfraktion treten zwei Aktivitätsbanden zwischen 30 und 55 kDa bzw. 55 und 75 kDa auf. Bei Präparation aus dem Überstand einer *S. acidocaldarius*-Kultur zeigt sich Aktivität bei ca. 250 kDa (Abbildung 3-23). SSO1949 scheint in der Membranfraktion weniger stark glykosyliert zu sein als im Kulturüberstand. Eine andere Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass im Überstand auftretendes SSO1949 nach mit Membranbestandteilen assoziiert ist, die bei Aufreinigung aus der Membranfraktion bereits durch Triton X entfernt wurden. Für die Aufreinigung wurde die Kultur in der stationären Wachstumsphase geerntet. Die Überlegung dabei war, dass die Zellen in dieser Wachstumsphase bereits lysieren und ins Medium gelangtes SSO1949 noch mit Membranbestandteilen assoziiert ist. Diese sollten jedoch aufgrund des im Auftragspuffer enthaltenen SDS von Protein getrennt werden.

3.5. Übertragung der Mutationsstudien von SSO1949 auf das hyperthermophile Enzym CelA aus *Thermotoga maritima*

Die thermoacidophile Cellulase SSO1949 wurde bereits in *E. coli* exprimiert und charakterisiert (Huang *et al.*, 2005). In nachfolgenden Arbeiten konnte SSO1949 nicht mehr löslich exprimiert werden. Die Cellulase musste denaturierend aufgereinigt und durch Rückfaltung in ihre aktive Form überführt werden. Aufgrund der hohen Präzipitationsneigung von SSO1949 gestaltete sich das schwierig. Verschiedene Aminosäuren in der Nachbarschaft der katalytischen Glutamatreste wurden für Mutationsstudien im aktiven Zentrum der Cellulase gewählt. Es sollte untersucht werden, wie sich der gezielte Austausch von Aminosäuren in der Umgebung der katalytischen Reste auf die Acidophilie von SSO1949 auswirkt. Aufgrund der erschwerten Aufreinigung von SSO1949 müssen diese Studien als semiquantitativ angesehen werden, jedoch zeigten einige Mutanten eine enorme Verschiebung des pH-Optimums.

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu SSO1949 wurde eine weitere β -Glukanase für Mutationsstudien im aktiven Zentrum ausgewählt. CelA aus *Thermotoga* wurde bereits in *E. coli* (Liebl *et al.*, 1996) und *Thermotoga* (Bronnenmeier *et al.*, 1995; Bok *et al.*, 1998) exprimiert und aufgereinigt. Die Cellulase besitzt ein Molekulargewicht von 29 kDa und einen isoelektrischen Punkt bei 4.6. Die höchste Aktivität zeigte CelA bei ca. 90-95°C und ca. pH 6 (Bronnenmeier *et al.*, 1995; Liebl *et al.*, 1996; Bok *et al.*, 1998). Durch gezielten Austausch von Aminosäuren im aktiven Zentrum von CelA gegen die homologen Aminosäuren in SSO1949 sollte untersucht werden, ob ihr pH-Optimum weiter erniedrigt werden kann. Im Fall der Xylanase XylI (pH-Optimum bei pH 6) aus *Streptomyces sp.* konnte dies durch gezielte Mutationen erreicht werden (De Lemos Esteves *et al.*, 2004). Durch Austausch bestimmter Aminosäuren im katalytische Zentrum gegen homologe Aminosäuren der Xylanase XynC (pH-Optimum bei pH 2) aus *Aspergillus kawachii* konnte das pH-Optimum von XylI nach pH 4,7 verschoben werden (De Lemos Esteves *et al.*, 2004).

Für die Mutationsstudien im aktiven Zentrum von CelA wurden die homologen Aminosäuren in der Nachbarschaft der konservierten katalytischen Glutamatresten von SSO1949 ausgewählt (Abbildung 3-24). W261, Y263, Y140, W258, W193, D211 und W258 sind konserviert in CelA und SSO1949. Die Aminosäure V63 in CelA entspricht der Aminosäure T137 in SSO1949 und N113 in CelA entspricht D187 in SSO1949. Darüber hinaus wurden für CelA noch drei weitere Aminosäuren (P111, E117 und F233) ausgewählt, die in SSO1949 nicht untersucht wurden, aber nach Betrachtung des aktiven Zentrums noch eine Rolle bei der Stabilisierung des katalytischen Restes spielen könnten (Abbildung 3-24).

```

Cela      MV-----VLMTKPGT----- 10
Egla     MS--KKKFVIVSILTILLVQAI---YF-----VE--KYHTSEDKSTSN---TSS---- 39
Cel12A   MT--VEL----- 5
SSO1949  MIMNKLYIIIVPIIVIIIVVGVIGGAIYLHHQSPNVKTSITVTTNETTTLMSITTTNTVPT 60
        ----Signalpeptid-----Ser/Thr-reiche Region--

Cela      -----SDFVW-----NGIP-LSMELNLWNIKEYSGSVAMKFDG 42
Egla     TPPQTTLSTTKVLKIRYPDDGEWPGAPIDKDGDNPEFYIEINLWNLNATGFAEMTYNL 99
Cel12A   -----CGRWDARDVAGGRYRVINN 24
SSO1949  TVT---PTTSSIPQLIYVTSSASSPTPVYLNNSVPSFYLEVNMWNAKTWNGNYTMVFN 117
        -----
        . *: * :

Cela      EK-----ITFD--ADIQNLSPK--EPERYVLGYPEFYGYKPKWENHTAEG-S-KLPVP 89
Egla     TS-----GVLHYVQQLDNIVLR--DRSNWVHGYPEIFYGNKPWNANYATDGP IPLPSK 150
Cel12A   VWGAETAQCIEVGLLETGNFTITRADHDNGNNVAAYPAIYFGCH-WGACTSNS---GLPRR 80
SSO1949  LT-----RTLVS---FNLTQV--NPLQWVNGYPEIYVGRKPWDTSYAGN---IFPMR 162
        . : . . . ** : : * : * : * : * : * :
        : : . : : * : * : * : * : * : * :

Cela      VSSMKSFVSEVSFDIHH-EPSLPLNFAMETWLTREKYQ----TEASIGDVEIMVWFY-FN 143
Egla     VSNLTDIFYLTISYKLEP-KNGLPINFAIESWLTREAWR---TTGINSDEQEVMIWIY-YD 205
Cel12A   VQELSDVRTSW--TLTP-ITTRWNAAYDIWFSPVTNS---GNGYSGGAELMIWLNWNG 133
SSO1949  IGMNTPFMVSFYINLTKLDPSINFDIASDAWIVRPQIAFSPGTAPGNGDIEIMVWLF-SQ 221
        : : . : : * : * : * : * : * : * :

Cela      NLTPGGEKIEEFTIPFVLNGESVEGTWELWLA---EW-GWDYLAFLRKD-PVKKGRVKFD 198
Egla     GLQPAGSKVKEIVVPIIVNGTPVNATFEVWKA---NI-GWEYVAFRIKT-PIKEGTVTIP 260
Cel12A   GMPPGGSRVATVE-----LAGATWEVWYA---DW-DWNYIAYRRTT-PTT-SVSELD 179
SSO1949  NLQPAGQQVGEVVIPIYINHTLVNATFQVWKMKNVPWGGWEYIAFRPDGKVTNGYVAYE 281
        : * . * : : . : : : : * : * : * : * :

Cela      VRHFLDAAGKALSS-SARVKDFEDLYFTVWEIGTEFGS-PE-TKSAQFGWKFNFSIDL- 254
Egla     YGAFISVAANISS-----LPNYTELYLEDVEIGTEFGT-PS-TTSAHLEWITNITLTPL 313
Cel12A   LKAFIDDAVAR-G-----YIRPEWYLHAVETGFELWEGGAGLRSADFSVTVQKLAALAE 232
SSO1949  PNLFIKALNNFAS-----YNTITNYLTDWEFGTWGT-MTNGTAYFISWTISNFYE--- 331
        * : . : : * : * * * * : * : . . :

Cela      -----EVRE 258
Egla     -----D-----RPLIS 319
Cel12A   IKRASQPELAPEDPEDVE----- 256
SSO1949  -----TLL 334

```

Abbildung 3-24: Alignment verschiedener Cellulasen aus *Thermotoga maritima* (Cela), *Pyrococcus furiosus* (Egla), *Rhodothermus marinus* (Cel12A) und *Sulfolobus solfataricus* (SSO1949). Die zwei katalytischen Glutamatreste sind rot markiert. Die Aminosäuren, die in Cela und Egla gegen die homologen aus SSO1949 ausgetauscht wurden, sind grün markiert. Zusätzlich wurden in Egla noch zwei weitere AS ausgetauscht, die in Cela konserviert waren (blaue Markierung). Das Signalpeptid sowie die Ser/Thr-reiche Region von SSO1949 sind ebenfalls farbig markiert.

3.5.1. Aufreinigung von Cela aus *E. coli*

Cela und seine Punktmutanten wurden in *E. coli* zu ca. 40% in löslicher Form überexprimiert. Die Löslichkeit von Cela konnte durch Koexpression mit Chaperonen nicht verbessert werden. Die Aufreinigung erfolgte im ersten Schritt über einen 20 minütigen Hitzeschritt bei 70°C und anschließender Zentrifugation bei 20 000 g für 20 min. Da Cela ohne Affinitäts-tag exprimiert wurde, erfolgte die weitere Aufreinigung zunächst über Anionenaustauschchromatographie (Abbildung 3-25).

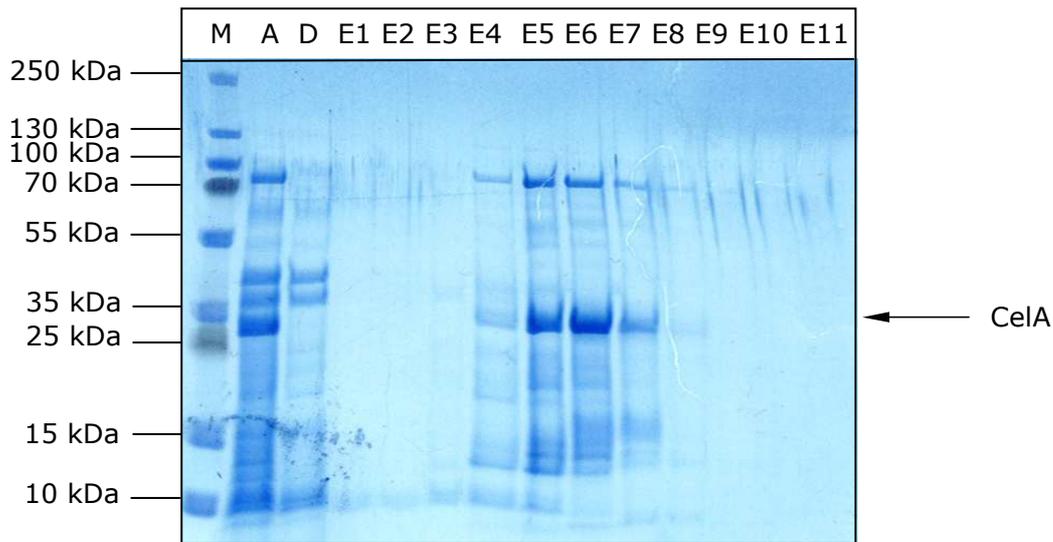


Abbildung 3-25: 9%iges mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel nach dem ersten Aufreinigungsschritt von CelA mittels Anionenaustauschchromatographie. M: Marker, A: Auftrag; D: Durchbruch, E1-E11: Eluatfraktionen

Die Eluate, welche Protein enthielten (Eluate E4-E7, Abbildung 3-25) wurde vereinigt und anschließend durch Hydrophobe Interaktionschromatographie weiter aufgereinigt (Abbildung 3-26). Die Fraktionen E1-E3 (Abbildung 3-26 (a)) wurden vereinigt und für die weitere Aufbewahrung dialysiert (Abbildung 3-26 (b)). Aus 2 l Kultur konnten ca. 2 mg CelA gewonnen werden. Die Ausbeuten für die Punktmutanten lagen zwischen 1 und 2.5 mg aus 2 l Kultur. Diese Proteinmengen sind relativ gering, jedoch zeigen die Proteine eine hohe Reinheit.

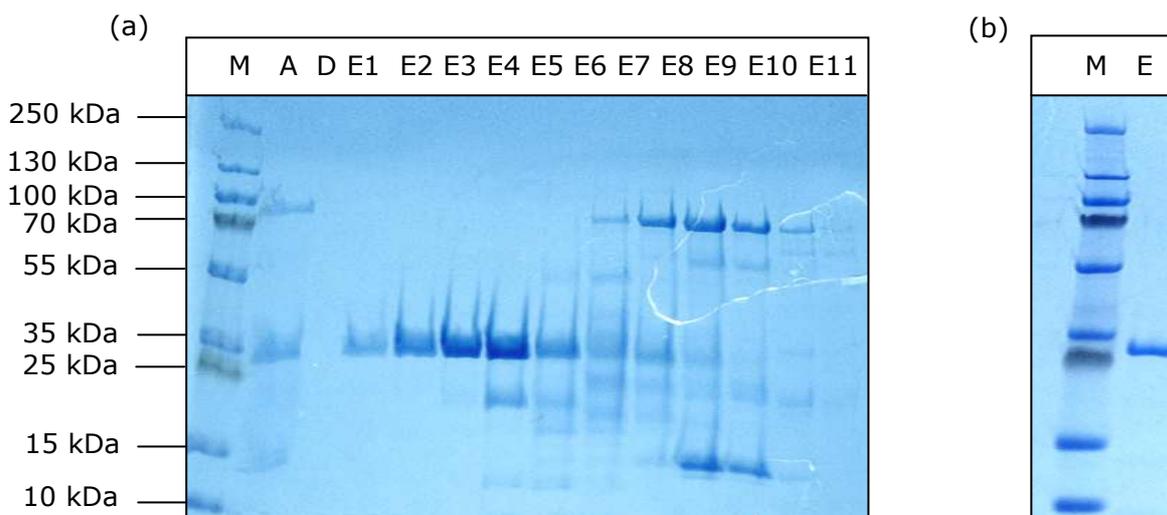


Abbildung 3-26: 9%iges mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel (a) nach dem zweiten Aufreinigungsschritt von CelA mittels Anionenaustauschchromatographie. M: Marker, A: Auftrag; D: Durchbruch, E1-E11: Eluatfraktionen. (b) E: Gereinigtes CelA nach Dialyse

In Abbildung 3-27 sind der Wildtyp sowie alle Punktmutanten von CelA nach Aufreinigung und anschließender Dialyse dargestellt. Sie wurden ohne weitere Aufreinigung für die folgenden Messungen eingesetzt.

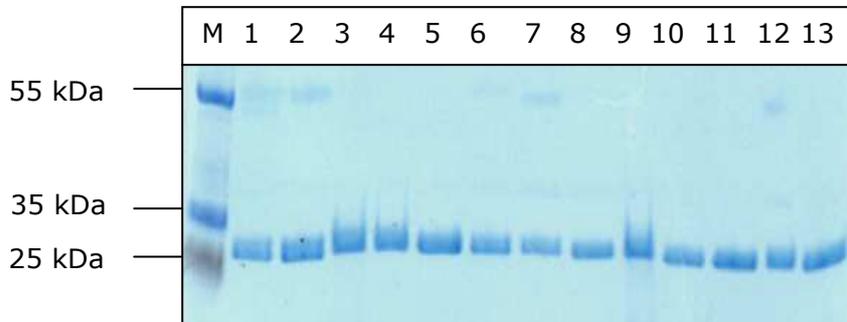


Abbildung 3-27: 9%iges mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel von CelA und seiner Punktmutanten nach Aufreinigung. M: Marker, 1: CelA Wildtyp, 2: CelA_P111N, 3: CelA_N113D, 4: CelA_E117D, 5: CelA_V63T, 6: CelA_V64T_QWTN, 7: CelA:P111N/N113D, 8: CelA_N113D/E117D, 9: CelA_P111N/N113D/E117D, 10: CelA_F233W, 11: CelA_V63T_QWTN/N113D, 12: CelA_63_QWVN, 13: CelA_63_QWVN/N113D

3.5.2. Enzymatische Charakterisierung von CelA und seiner Punktmutanten mit dem Substrat p-Nitrophenyl-β-D-cellobiosid

Bereits aus früheren Arbeiten (Liebl *et al.*, 1996; Bok *et al.*, 1998) war bekannt, dass CelA Carboxymethylcellulose und p-Nitrophenyl-β-D-Cellobiosid abbaut. Da die Bestimmung der Aktivität von SSO1949 mit CMC als Substrat über die Messung von reduzierenden Zuckern erfolgt und diese Messmethode nicht sehr genaue Ergebnisse liefert, erfolgte die Aktivitätsbestimmung für den Vergleich der pH-Profile von Wildtyp und Punktmutanten mit dem Substrat p-Nitrophenyl-β-D-Cellobiosid (Abbildung 3-28).

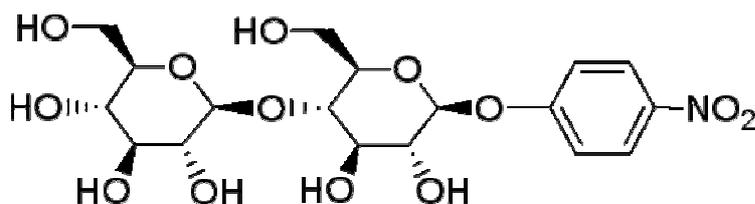


Abbildung 3-28: Struktur von p-Nitrophenyl-β-D-Cellobiosid

Für den Aktivitätstest wurde das Enzym 20 min mit 2 mM Substrat bei 95°C inkubiert. Nach 20 min wurde die Reaktion durch Zugabe von eiskalter 1 M Natriumcarbonatlösung pH 10 gestoppt und im Anschluss wurde die Menge des freigewordenen p-Nitrophenols bestimmt. Ein Unit Enzymaktivität entspricht 1 μmol freigewordenem p-Nitrophenol pro Minute.

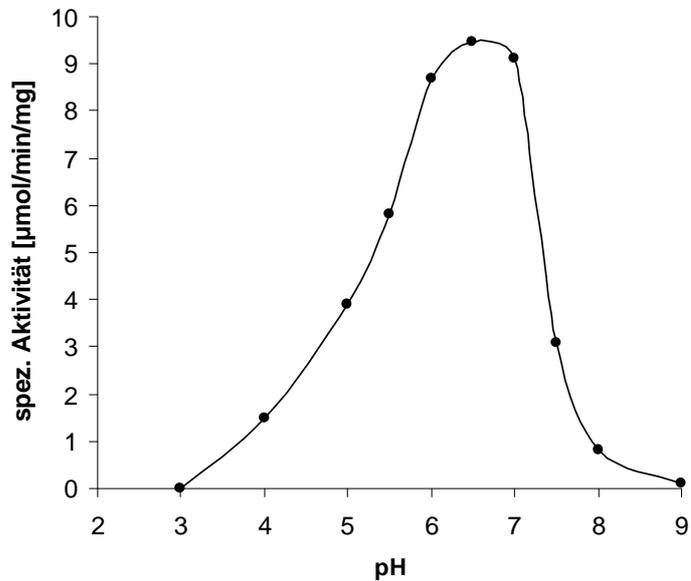


Abbildung 3-29: pH-Profil von CelA. Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte in 100 mM Natriumphosphatpuffer mit verschiedenen pH-Werten bei 95°C mit 2 mM p-Nitrophenyl- β -D-cellobiosid als Substrat.

CelA zeigt ein glockenförmiges pH-Profil mit Verschiebung in den alkalischen Bereich (Abbildung 3-29). Die maximale spezifische Aktivität wurde bei pH 6,5 mit $9,5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ bestimmt. In einer früheren Arbeit betrug die spezifische Aktivität von rekombinantem CelA aus *Thermotoga maritima* bei pH 6 $7,4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (Liebl *et al.*, 1996). Nach Aufreinigung von CelA als *Thermotoga neapolitana* zeigte das Enzym eine spezifische Aktivität von $69,2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ bei pH 6 (Bok *et al.*, 1998). Der Grund für die Diskrepanz der spezifischen Aktivität in *E. coli* und *Thermotoga* ist unbekannt.

Nach der gleichen Methode wurden alle Punktmutanten von CelA gemessen. Abbildung 3-30 zeigt die pH-Profile der Einzel-, Doppel- und Dreifachmutanten von CelA sowie die jeweilige spezifische Aktivität.

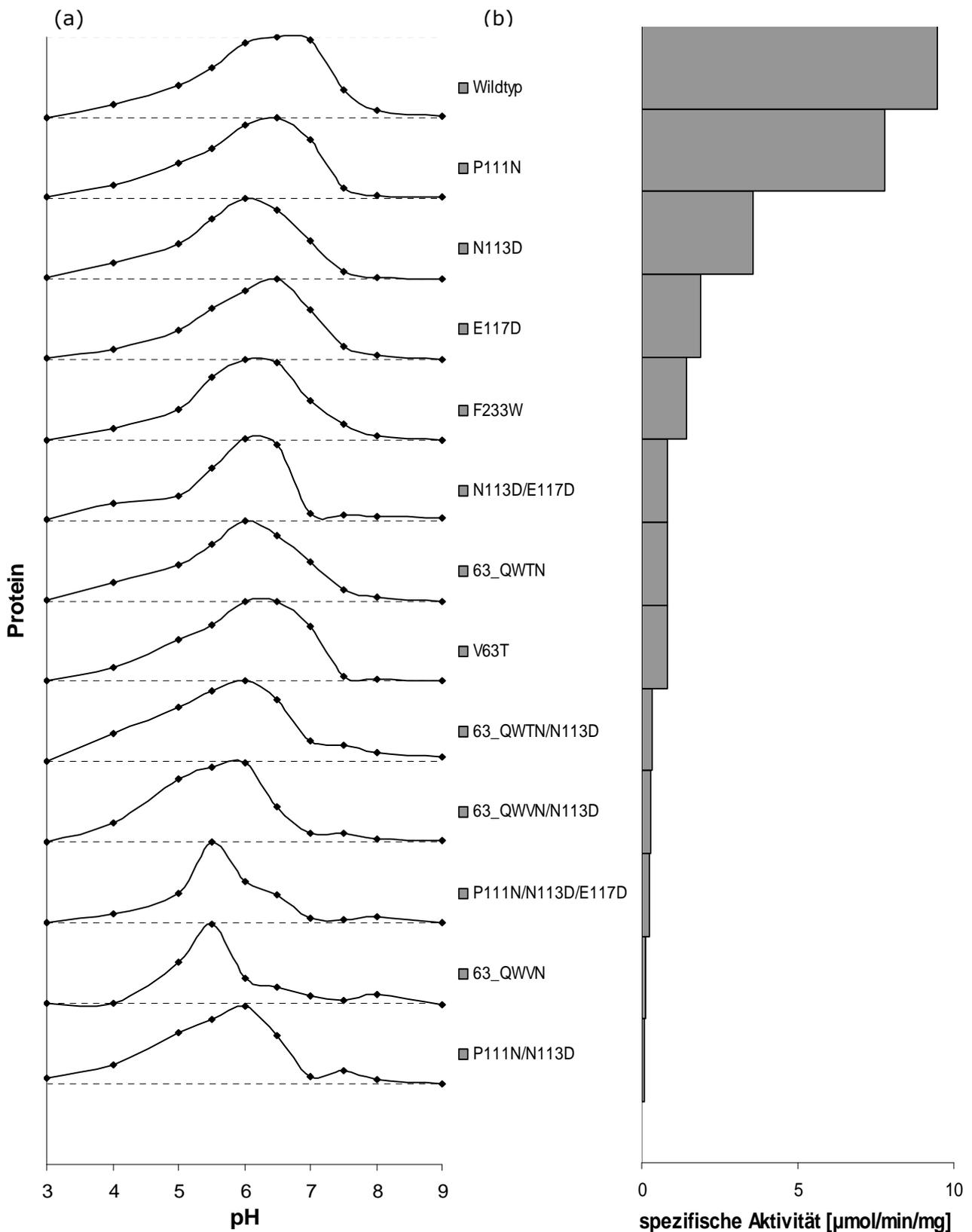


Abbildung 3-30: Charakterisierung der verschiedenen Punktmutanten von CelA. (a) pH-Profile von CelA und seiner Punktmutanten. (b) Spezifische Aktivität von CelA und seiner Punktmutanten bei ihrem jeweiligen pH-Optimum. Alle Messungen wurden in 100 mM Natriumphosphatpuffer bei 95°C durchgeführt. Als Substrat wurde p-Nitrophenyl-β-D-cellobiosid verwendet.

Im Vergleich zu dem Wildtyp zeigen die Punktmutanten mit Ausnahme von P111N eine deutlich verringerte spezifische Aktivität. N113D besitzt noch ca. 40 %, E117D ca. 25 % und V63T noch ca. 12 % der wildtypischen Aktivität. Da die Mutation N113D eine leichte Verschiebung des pH-Optimums im Vergleich zum Wildtyp zeigte, wurde verschiedene Doppel- und ein Dreifachmutante mit N113D konstruiert. Allerdings konnte hier nur ein starker Abfall der Aktivität der Doppel-bzw. Dreifachmutanten beobachtet werden, ohne dass ihr pH-Optimum stark in den sauren Bereich verschoben wird. Die Aktivität der Doppelmutante P111N/N113D geht nahezu vollständig verloren. Die stärkste pH-Verschiebung zeigen 63_QWVN, bei dem in der Umgebung von V63 drei Aminosäuren gegen die homologen in SSO1949 ersetzt sind und die Dreifachmutante P111N/N113D/E117D. Bei ihnen verschiebt sich das pH-Optimum um eine pH-Stufe in Richtung des sauren Milieus. Allerdings verlieren die Enzyme den Grossteil ihrer Aktivität. 63_QWVN besitzt noch 1.3 %, P111N/N113D/E117D noch 2.5 % der wildtypischen Aktivität. Eine stärkere Verschiebung des pH-Optimums wie bei der Xylanase XylI aus *Streptomyces sp.* (De Lemos Esteves *et al.*, 2004) konnte nicht erreicht werden.

Die oben durchgeführten Mutationsstudien im aktiven Zentrum von CelA können nun mit denen in SSO1949 verglichen werden. Hier existieren zwei Aminosäuren, die sowohl in SSO1949 als auch in CelA mutiert wurden. Die Mutation V63T in CelA entspricht T137A bzw. T137N in SSO1949 und N113D in CelA entspricht D187A in SSO1949. Letztere vermindert zwar sowohl in SSO1949 als auch in CelA stark die cellulolytische Aktivität, führt aber weder in CelA noch in SSO1949 zu einer starken Verschiebung des pH-Optimums. Es kommt jeweils nur zu einer pH-Verschiebung von 0.4 bzw. 0.5.

Der Einbau von Asparagin anstelle von Threonin an Position 137 im katalytischen Zentrum von SSO1949 führt zu einer Verschiebung des pH-Optimums auf 3.4, wodurch darauf geschlossen werden könnte, dass Threonin an dieser Stelle wichtig für die Acidophilie der Cellulase ist. Der Einbau von Alanin an der gleichen Stelle führt jedoch nur zu einer geringen Verschiebung des pH-Optimums. Auch bei Ersatz von Valin an Position 63 in CelA durch Threonin konnte keine Verschiebung des pH-Optimums festgestellt werden. Die Mutation führte nur zu einer ca. 10fach erniedrigten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp.

Die Aminosäure T137 in SSO1949 wurde bereits in 5 verschiedenen Systemen untersucht (Tabelle 3-1). Es konnte gezeigt werden, dass sich der Einbau von Aspartat bzw. Asparagin unterschiedlich auf das pH-Optimum auswirkt. Aspartat an dieser Position bewirkt nachweislich eine Verschiebung des pH-Optimums in Richtung des sauren Bereiches, während es bei Einbau von Asparagin zu einer pH-Verschiebung in das basische Milieu kommt.

Tabelle 3-1: Der Einfluss der Aminosäure T137 in SSO1949 auf das pH-Optimum wurde bereits in 5 Systemen untersucht. Gezeigt sind die Aminosäuren an Position 137 in SSO1949 und an homologen Positionen in vier weiteren Proteinen, sowie ihr Einfluss auf das pH-Optimum des Proteins.

Protein	Organismus	Aminosäure	pH-Optimum	Referenz
SSO1949	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	T	1.8	Huang <i>et al.</i> , 2005; diese Arbeit
		A	2.2	
		N	3.4	
Xylanase C	<i>Aspergillus kawachii</i>	D	2.0	Fushinobu <i>et al.</i> , 1998
		N	5.0	
Xylanase A	<i>Bacillus circulans</i>	N	5.7	Joshi <i>et al.</i> , 2000
		D	4.6	
Xylanase I	<i>Streptomyces sp.</i>	N	6.0	De Lemos Esteves <i>et al.</i> , 2004
		D	5.0	
Cela	<i>Thermotoga maritima</i>	V	6.5	diese Arbeit
		T	6.5	
		QWVN	5.5	

3.5.3. Enzymatische Charakterisierung von Cela mit dem FRET-Substrat

Um die unter 3.6 folgenden Messungen besser vergleichen und interpretieren zu können, wurde die enzymatische Aktivität von Cela darüber hinaus mit dem fluoreszenten Hexaosid bestimmt. Da die Endoglykanase Cela β -glykosidische Bindungen spaltet, sollte sie auch dieses Substrat spalten, welches aus 6 β -1,4-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten besteht. Zusätzlich erfolgte die Aktivitätsmessung einem tetrameren Fluoreszenzsubstrat, welches aus vier β -1,4-glykosidisch verknüpften Glukosemolekülen besteht.

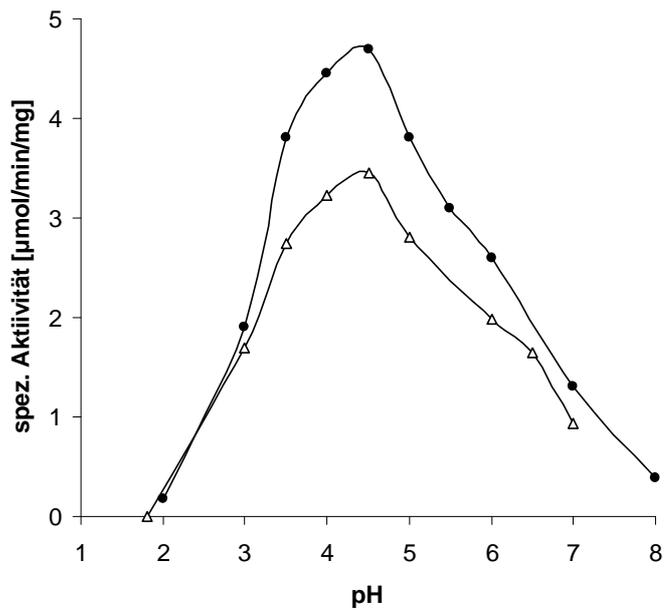
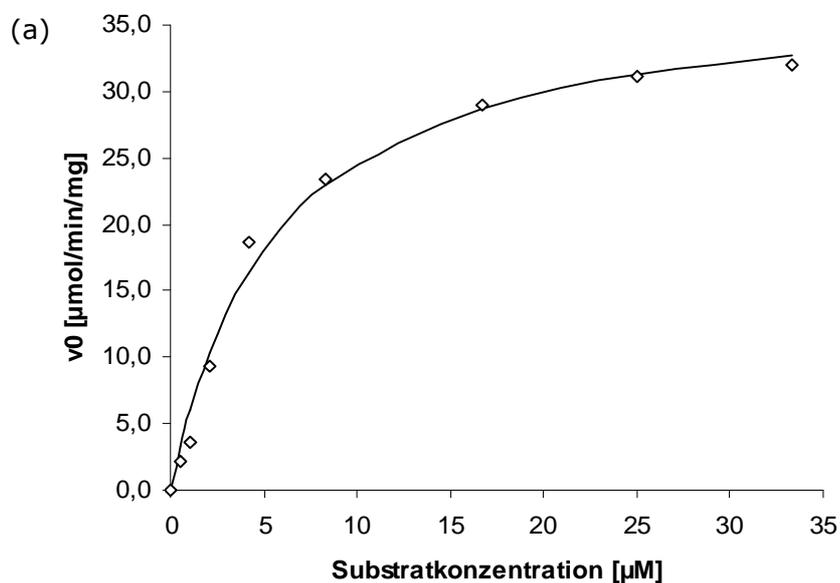


Abbildung 3-31: pH-Profil von CelA mit dem fluoreszenten Hexamer (●) und Tetramer (Δ). Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte in 100 mM Natriumphosphatpuffer mit verschiedenen pH-Werten bei 80°C und einer Substratkonzentration von 1 μM .

Das pH-Profil von CelA mit dem fluoreszenten Substrat stellt sich als glockenförmige Kurve dar (Abbildung 3-31). Es zeigt ein pH-Optimum bei pH 4,5 und eine maximale spezifische Aktivität von 4,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ für das hexamere Substrat und 3,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ für das tetramere Substrat bei einer Messtemperatur von 80°C und einer Substratkonzentration von 1 μM .

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter v_{max} , K_{M} und k_{cat} wurde die Anfangsgeschwindigkeit v_0 von CelA bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (Abbildungen 3-32 a und b).



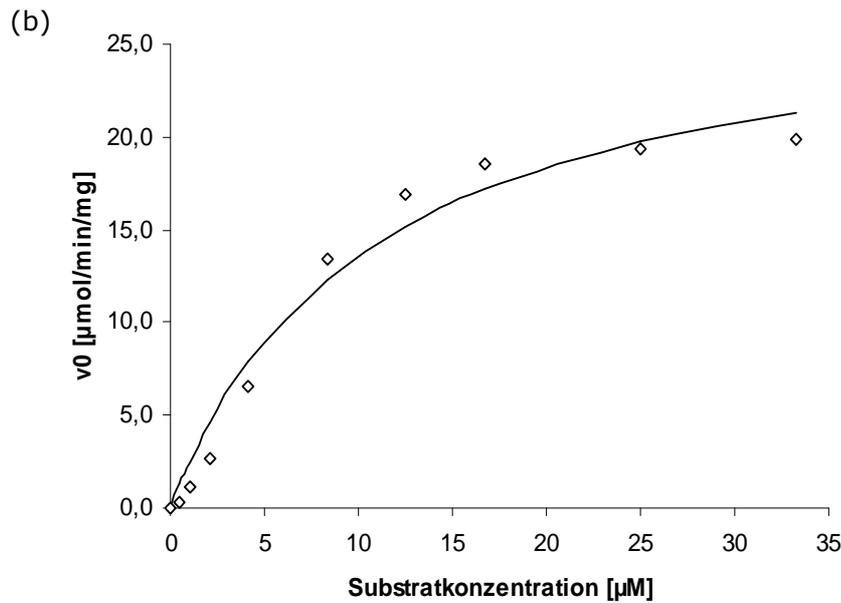


Abbildung 3-32: Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante von CelA für das hexamere (a) und das tetramere (b) FRET-Substrat bei 80°C und pH 4.5. Die Anfangsgeschwindigkeit V_0 ist in Abhängigkeit von der Substratkonzentration dargestellt. Die Punkte stellen die experimentellen Daten dar. Die durchgezogene Linie repräsentiert den Angleich der experimentellen Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung. Aus diesen Daten wurden v_{\max} , K_M und k_{cat} ermittelt.

Die erhaltenen Messwerte wurden mittels nicht linearer Regression an die Michaelis-Menten-Gleichung angepasst und ergaben die in Tabelle 3-2 dargestellten v_{\max} -, K_M - und k_{cat} -Werte.

Tabelle 3-2: v_{\max} -, K_M - und k_{cat} -Werte von CelA für das hexamere und tetramere Fluoreszenzsubstrat bei 80°C und pH 4.5

	v_{\max} [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$]	K_M [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	K_M/k_{cat} [$\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$]
Hexameres				
Substrat	38.1	5.5	19	3.4×10^6
Tetrameres				
Substrat	28.3	10.8	14	1.3×10^6

CelA zeigt eine höhere Affinität zum hexameren ($K_M = 5.5 \mu\text{M}$) als zu dem tetrameren Fluoreszenzsubstrat ($K_M = 10.8 \mu\text{M}$), wobei CelA eine höhere Affinität zu diesem fluoreszenten Substrat zu haben scheint als zu p-Nitrophenyl- β -D-cellobiosid. Der

ermittelte K_M -Wert hierfür betrug 0.97 mM (Bok *et al.*, 1998). Bei Verwendung von p-Nitrophenyl- β -D-cellobiosid als Substrat ergab sich ein pH-Optimum von 6.5 (Abbildung 3-29). Mit dem fluoreszenten Substrat kommt es zu substratabhängigen Verschiebung des pH-Optimums in den sauren Bereich. Diese Beobachtung wurde bereits für eine β -Glukanase (Hitomi *et al.*, 1994) und eine Säugetier α -Amylase (Ishikawa *et al.*, 1990, 1993) beschrieben und kann möglicherweise durch eine pH-abhängige Affinität des Enzyms für verschiedene Substrate erklärt werden (Liebl *et al.*, 1996).

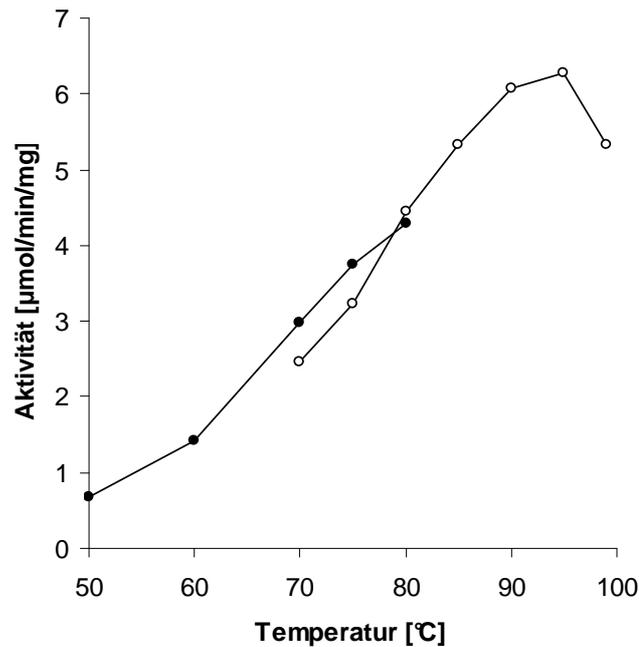


Abbildung 3-33: Temperaturprofil von CelA. Die Messungen wurden in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 4.5 mit 1 μM Substrat durchgeführt. Bis 80°C wurde die Kinetik kontinuierlich am Fluorometer verfolgt (\bullet), bei Temperaturen über 80°C erfolgte die Bestimmung der Aktivität durch Endpunktmessung nach 60 s (\circ). Das Temperaturoptimum von CelA liegt bei 95°C.

Da die Kinetikmessung mit dem Fluoreszenzsubstrat nur bei maximal 80°C Küvettentemperatur durchgeführt werden konnte, erfolgte die Bestimmung des Temperaturoptimums des CelA Wildtyps mittels Endpunktbestimmung (Abbildung 3-33). Das Substrat wurde zusammen mit Enzym in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 4.5 im Heizblock inkubiert und die Reaktion nach 60 s durch Stellen der Probe auf Eis gestoppt. Am Anschluss wurde die Fluoreszenz am Fluorometer gemessen und nach Korrektur um die Grundfluoreszenz die spezifische Aktivität berechnet. Hier konnte das bereits in einer anderen Arbeit (Bronnenmeier *et al.*, 1995) bestimmte Temperaturoptimum von 95°C bestätigt werden. CelA arbeitet optimal bei 95°C mit einer spezifischen Aktivität von 6.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ mit dem FRET-Cellohexaosid als Substrat (Abbildung 3-33).

3.5.4. Expression und Aufreinigung von EglA aus *Pyrococcus furiosus*

EglA ist eine thermostabile Endoglukanase aus dem obligat anaeroben und hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* und wurde bereits in *E.coli* (Bauer *et al.*, 1999) exprimiert und aufgereinigt. Die Cellulase besteht aus 319 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 35.9 kDa und gehört wie SSO1949 und CelA zur Glykosidhydrolase Familie 12. Die höchste Aktivität zeigt EglA bei pH 6 und 100°C. EglA besitzt ein 19 Aminosäuren langes Signalpeptid. Die Cellulase hydrolysiert β -1,4-glykosidische Bindungen und zeigt höchste spezifische Aktivität bei der Hydrolyse von Cellopentaose und Cellohexaose (Bauer *et al.*, 1999).

Durch gezielten Austausch von Aminosäuren im aktiven Zentrum von EglA gegen die homologen Aminosäuren in SSO1949 sollte wie bei CelA untersucht werden, ob dadurch ihr pH-Optimum weiter in Richtung des sauren Milieus verschoben werden kann.

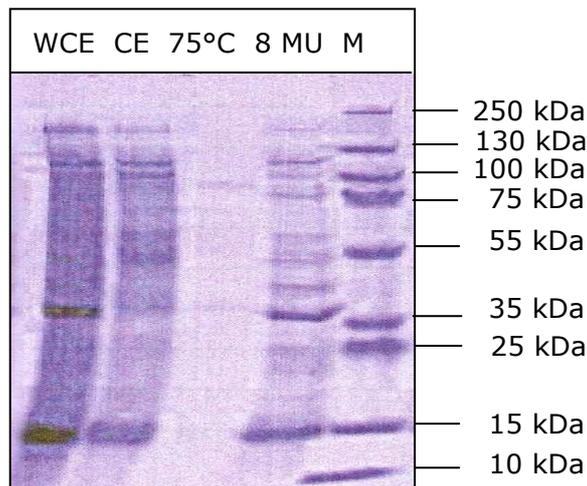


Abbildung 3-34: 9%iges mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel des Löslichkeitstests von EglA. WCE: Gesamtzellextrakt, CE: Rohextrakt, 75°C: Rohextrakt nach Hitzeschritt, 8 MU: 8 M Harnstoff-Extrakt

Das hitzestabile Enzym EglA konnte in *E. coli* exprimiert werden (Abbildung 3-34). Allerdings war auch bei Expression bei Raumtemperatur nur ein minimaler Teil der Cellulase löslich, der jedoch sehr hohe Aktivität zeigte. Der Grossteil der Cellulase konnte erst durch 8 M Harnstoff aus den „Inclusion Bodies“ gelöst werden (Abbildung 3-34, 8 MU). Auch durch Koexpression von EglA mit Chaperonen (Halteh, 2009) konnte die Löslichkeit nicht erhöht werden. Da auch bei der Aufreinigung des geringen löslichen Anteils Probleme auftraten, konnten die Mutationsstudien von EglA aufgrund von Zeitmangel nicht fortgesetzt werden.

3.6. Konstruktion von Hybridproteinen aus SSO1949 und CelA

In vitro-Rekombination ermöglicht die Kombination und Optimierung bestimmter Eigenschaften verschiedener Proteine. Im Idealfall trägt das entstandene Hybridprotein alle positiven Eigenschaften der Elternproteine. Rekombination spielt eine Schlüsselrolle in der natürlichen Evolution von Proteinen und natürlich auch bei der Entwicklung von Antikörpern, Synthasen und Proteasen (Ostermeier *et al.*, 2000).

Die beiden Cellulasen SSO1949 aus *Sulfolobus solfataricus* und CelA aus *Thermotoga maritima* zeigen Sequenzähnlichkeiten und gehören beide zur Glykosidhydrolase Familie 12. SSO1949 besitzt ein Temperatur- bzw. pH-Optimum von 80°C bzw. pH 1.8. CelA zeigt höchste Aktivität bei 95°C und pH 6.5 (p-Nitrophenyl-β-D-cellobiosid als Substrat) bzw. 4.5 (fluoreszentes Hexaosid als Substrat). In dieser Arbeit sollten Fusionsproteine aus SSO1949 und CelA konstruiert werden, um die Eigenschaften beider Cellulasen zu kombinieren, ohne dass das entstandene Fusionsprotein seine Aktivität verliert. Vor der Konstruktion der Hybridproteine musste mit Hilfe eines Programms (SCHEMA, Arbeitsgruppe F. Arnold, California Institute of Technology, USA) berechnet werden, wo die Unterbrechung der Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren eines Proteins am energetisch günstigsten ist (Voigt *et al.*, 2002). Im Anschluss wurden die beiden in Abbildung 3-35 dargestellten Hybridproteine konstruiert.

CelA	MV-----VLMTKPGT-----	10
SSO1949	<u>MIMNKLYIIIVPIIVIIVVGVIGGAIYLHHQSPNVKTSSITVTNETTTLMSIT'NTNVPT</u>	60
	----Signalpeptid-----Ser/Thr-reiche Region--	
CelA	-----SDFVW-----NGIP-LSMELNLWNIKEYSGSVAMKFDG	42
SSO1949	<u>TVT---PTTSSIPQLIYVTSSASSPTPVYLNNSVPSFYLEVNMWNAKTWNGNYTMVFNP</u>	117

CelA	EK-----ITFD--ADIQNLSPK--EPERYVLGYPEFYGYKPWENHTAEG-S-KLPVP	89
SSO1949	<u>LT-----RTLSVS---FNLTQV--NPLQWTNGYPEIYVGRKPWDTSYAGN---IFPMR</u>	162
CelA	VSSMKSFSVEVSFDIHH-EPSPLPNFAMETWLTREKYQ----TEASIGDVEIMVWFY-FN	143
SSO1949	<u>IGNMTPFMVVSFYINLTKLDPSINFDIASDAWIVRPQIAFSPGTAPGNGDIEMVWLF-SQ</u>	221
CelA	NLTPGGEKIEEFTIPFVLNGESVEGTWELWLA---EW-GWDYLAFLRKD-PVKKGRVKFD	198
SSO1949	<u>NLQPAGQQVGEVVPIIYINHTLVNATFQVWKMKNVPWGGWEYIAFRPDGKVTNGYVAYE</u>	281
CelA	VRHFLDAAGKALSS-SARVKDFEDLYFTVWEIGTEFGS-PE-TKSAQFGWKFFENFSIDL-	254
SSO1949	<u>PNLFIKALNNFASY-----NITNYLTDWEFGTEWGT-MTSNGTAYFSWTISNFYE---</u>	331
CelA	-----EVRE	258
SSO1949	-----TLL	334

Abbildung 3-35: Alignment von SSO1949 und CelA. Es wurden zwei Hybridproteine hergestellt. CelA_SSO1949_CelA entspricht der orange dargestellten Sequenz. Die Sequenz von SSO1949_CelA_SSO1949 ist unterstrichen. Die konservierten katalytischen Glutamatreste sind rot gekennzeichnet. Das Signalpeptid von SSO1949 ist grün, die Ser/Thr-reiche Region ist blau markiert.

Das Programm schlug zwei Hybridproteine vor (Abbildung 3-35). CelA_SSO1949_CelA besitzt aussen Anteile von CelA und trägt den grössten Teil des aktiven Zentrums von SSO1949. SSO1949_CelA_SSO1949 besteht im äusseren Teil aus SSO1949 und nur ein kleiner Teil des aktiven Zentrums ist durch CelA ersetzt.

3.6.1. Überexpression, Löslichkeit und Aktivität der Hybridproteine CelA_SSO1949_CelA und SSO1949_CelA_SSO1949

Nach Sequenzierung wurden die Hybridproteine in *E. coli* BL21 AI überexprimiert (Abbildung 3-36). Für CelA_SSO1949_CelA wurde ein Molekulargewicht von ca. 29 kDa, für ein SSO1949_CelA_SSO1949 ein Molekulargewicht von 36 kDa vorausgesagt.

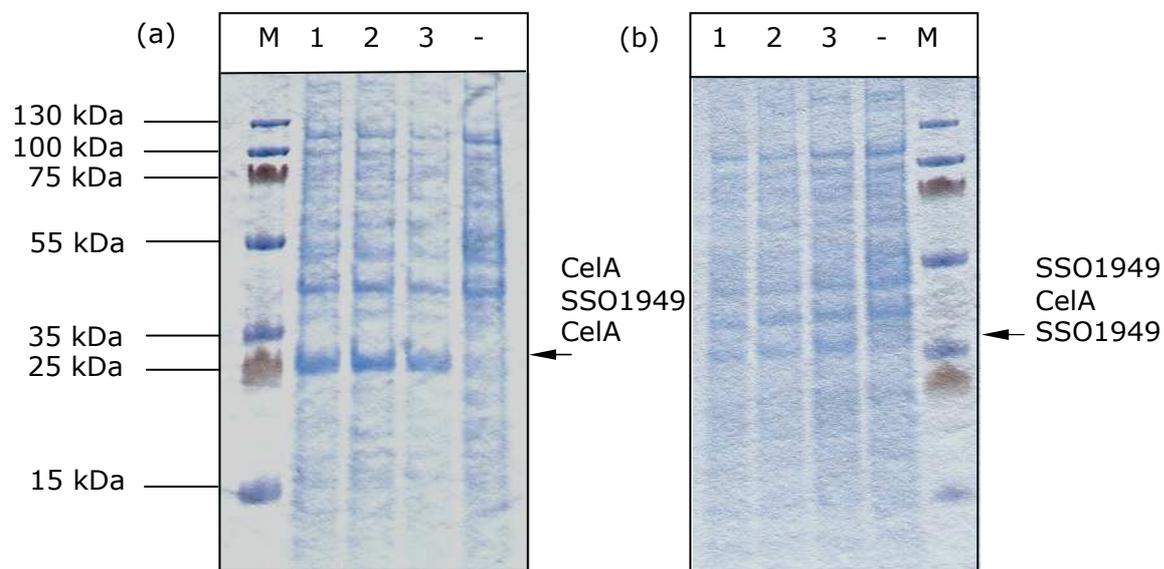


Abbildung 3-36: 9%iges mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Testexpression von (a) CelA_SSO1949_CelA und (b) SSO1949_CelA_SSO1949 in *E. coli* BL21 AI. M: Marker, 1,2,3: Klone 1,2 und 3, -: nicht induzierte Kontrolle

Die beiden Hybridproteine wurden erfolgreich in der erwarteten Grösse überexprimiert (Abbildung 3-36). Die Überexpression von SSO1949_CelA_SSO1949 ist jedoch geringer als von CelA_SSO1949_CelA. Im Anschluss wurde die Löslichkeit von CelA_SSO1949_CelA und SSO1949_CelA_SSO1949 untersucht. Dazu wurde das Bakterienpellet nach Entnahme des Rohextrakts nacheinander in Triton X und 8 M Harnstoff gelöst. Es stellte sich heraus, dass beide Hybridproteine unlöslich exprimiert werden, wobei SSO1949_CelA_SSO1949 noch schlechter löslich in 8 M Harnstoff war als CelA_SSO1949_CelA. Letzteres konnte komplett mit 8 M Harnstoff aus den "Inclusion Bodies" gelöst werden. Um zu testen, ob die beiden Proteine aktiv sind, wurde ein Aktivitätstest auf CMC-Platten durchgeführt. CelA_SSO1949_CelA war aktiv,

SSO1949_CelA_SSO1949 war nicht aktiv. Bei letzterem konnte auch nach der Rückfaltung keine Aktivität nachgewiesen werden. Bei der Konstruktion von SSO1949_CelA_SSO1949 wurde zwar nur ein relativ kleiner Teil des aktiven Zentrums von SSO1949 durch CelA ersetzt (Abbildung 3-35), jedoch sind dabei möglicherweise für die Aktivität wichtige Wechselwirkungen im aktiven Zentrum von SSO1949 zerstört worden. Im Folgenden wurde deshalb nur mit CelA_SSO1949_CelA weitergearbeitet.

3.6.2. Aufreinigung und Rückfaltung von CelA_SSO1949_CelA

Nach dem Zellaufschluss wurde das Bakterienpellet in 5% Triton X-100 gewaschen. Im Anschluss wurde der „Inclusion Body“ mit aufsteigender Harnstoffkonzentration gewaschen und das verbliebene Pellet in 8 M Harnstoff gelöst (Abbildung 3-37 a).

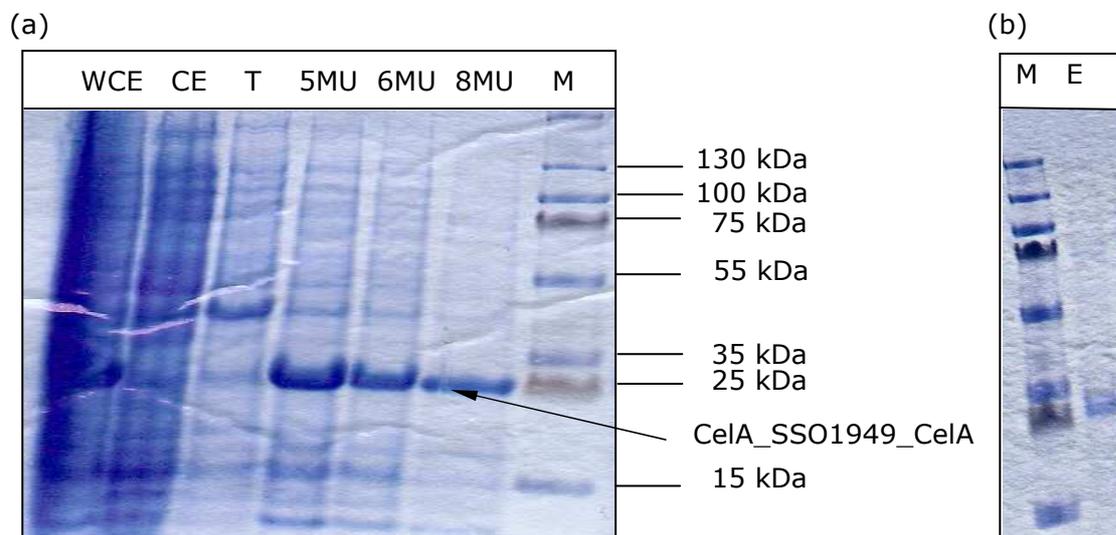


Abbildung 3-37: 9%iges mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel (a) der Aufreinigung von CelA_SSO1949_CelA durch Waschen des „Inclusion Bodies“. WCE: Gesamtzellextrakt, CE: Rohextrakt, T: 5% Triton X-Extrakt, 5MU: 5 M Harnstoff-Extrakt, 6MU: 6 M Harnstoff-Extrakt, 8MU: 8 M Harnstoff-Extrakt. (b) E: gereinigtes CelA_SSO1949_CelA nach Dialyse

Durch das Waschen des „Inclusion Bodies“ mit Harnstoff konnte bereits ein grosser Teil der Verunreinigung durch *E. coli*-Proteine entfernt werden. Da CelA_SSO1949_CelA nach dem Lösen aus dem „Inclusion Body“ durch Harnstoff denaturiert vorliegt, musste das Protein wieder in seine aktive Form zurückgefaltet werden. Für die Rückfaltung wurde das in 8 M Harnstoff gelöste Protein ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Das Hybridprotein, welches in 8 M Harnstoff pH 8 gelöst war, wurde 10fach mit 8 M Harnstoff pH 8 vorverdünnt und mit dem 20fachen Volumen eiskaltem Rückfaltungspuffer mit 0,8 M Arginin versetzt und für 2 h bei 8°C rückgefaltet. Nach Überprüfung der Aktivität

wurde das Protein mit Hilfe von hydrophober Interaktionschromatographie aufkonzentriert und weiter aufgereinigt. Im Anschluss wurde das Protein gegen Dialysepuffer mit 50% Glycerin dialysiert und bei -20°C gelagert. Abbildung 3-37 (b) zeigt C_{elA}_SSO1949_C_{elA} nach der Dialyse. Das Hybridprotein konnte erfolgreich rückgefaltet und aufgereinigt werden und weist eine hohe Reinheit auf. Im CMC-Plattentest konnte cellulolytische Aktivität nachgewiesen werden. Die unter Abbildung 3-37 (b) dargestellte Präparation von C_{elA}_SSO1949_C_{elA} wurde für die weitere enzymatische Charakterisierung verwendet. Aus 2 l Kultur wurden ca. 3 mg rückgefaltetes aktives Enzym erhalten.

3.6.3. Enzymatische Charakterisierung von C_{elA}_SSO1949_C_{elA}

Zunächst wurde wie unter 2.2.7.4 beschrieben versucht, die Aktivität von C_{elA}_SSO1949_C_{elA} mit dem Substrat p-Nitrophenyl- β -D-cellobiosid zu bestimmen. Das Hybridprotein spaltet dieses Substrat jedoch nicht. Diese Eigenschaft hat das Hybridprotein von SSO1949 übernommen, welches PNPC ebenfalls nicht spalten kann (Huang *et al.*, 2005). Daher wurden die Aktivitätsmessungen mit dem FRET-Substrat durchgeführt. Da die Endoglukanase C_{elA}_SSO1949_C_{elA} β -glykosidische Bindungen spaltet, sollte sie auch das Fluoreszenzsubstrat spalten, welches aus 6 β -1,4-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten besteht. Zusätzlich erfolgte die Aktivitätsmessung mit einem tetrameren Fluoreszenzsubstrat, welches aus 4 β -1,4-glykosidisch verknüpften Glukosemolekülen besteht.

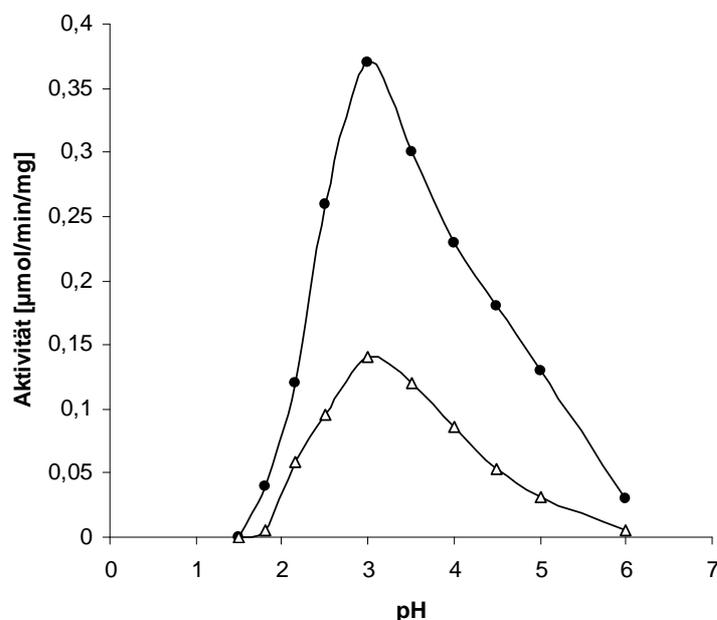


Abbildung 3-38: pH-Profil von C_{elA}_SSO1949_C_{elA} mit dem fluoreszenten Hexamer (●) und Tetramer (Δ). Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte in 100 mM Natriumphosphatpuffer mit verschiedenen pH-Werten bei 80°C und $1 \mu\text{M}$ Substrat.

Abbildung 3-38 zeigt das pH-Profil von CelA_SSO1949_CelA. Das pH-Profil stellt sich als glockenförmige Kurve dar mit einem pH-Optimum bei pH 3 und einer maximalen spezifischen Aktivität von $0.37 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ für das hexamere Substrat und $0.14 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ für das tetramere Substrat bei einer Messtemperatur von 80°C .

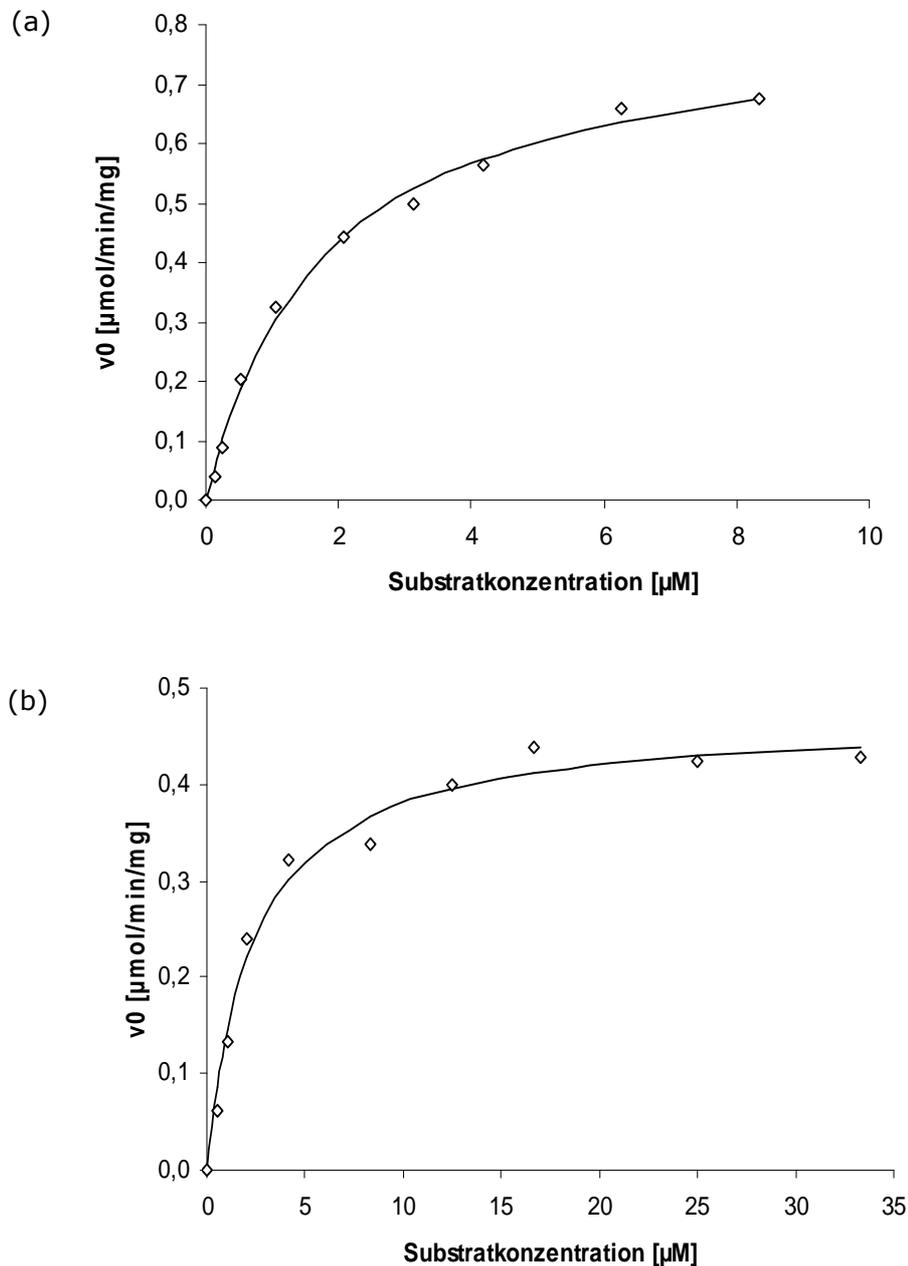


Abbildung 3-39: Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante von CelA_SSO1949_CelA für das hexamere (a) und das tetramere (b) FRET-Substrat bei 80°C und pH 3. Die Anfangsgeschwindigkeit V_0 ist in Abhängigkeit von der Substratkonzentration dargestellt. Die Punkte stellen die experimentellen Daten dar. Die durchgezogene Linie repräsentiert den Angleich der experimentellen Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung. Aus diesen Daten wurden v_{max} , K_M und k_{cat} ermittelt.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter v_{\max} , K_M und k_{cat} wurde die Anfangsgeschwindigkeit v_0 von CelA_SSO1949_CelA bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (Abbildungen 3-39 a und b).

Die erhaltenen Messwerte wurden mittels nicht linearer Regression an die Michaelis-Menten-Gleichung angepasst und ergaben die in Tabelle 3-3 dargestellten v_{\max} -, K_M - und k_{cat} -Werte.

Tabelle 3-3: v_{\max} -, K_M - und k_{cat} -Werte von CelA_SSO1949_CelA für das hexamere und tetramere Fluoreszenzsubstrat bei 80°C und pH 3

	v_{\max} [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$]	K_M [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	K_M/k_{cat} [$\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$]
Hexameres				
Substrat	0.8	1.7	0.4	2.3×10^5
Tetrameres				
Substrat	0.5	2.3	0.2	1.0×10^5

Das Temperaturoptimum des Hybrids wurde durch Endpunktbestimmung am Fluorometer gemessen (Abbildung 3-40).

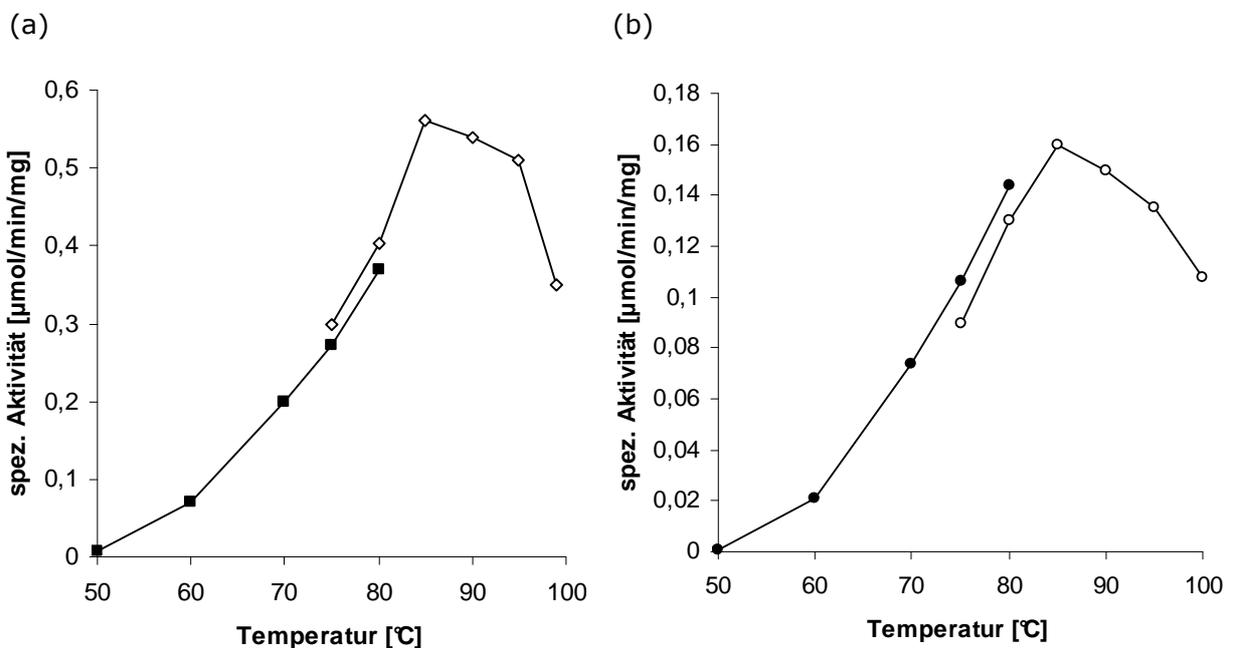


Abbildung 3-40: Temperaturprofil von CelA_SSO1949_CelA mit (a) Hexamer und (b) Tetramer. Die Messungen wurden in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 3 mit $1\ \mu\text{M}$ Substrat durchgeführt. Bis 80°C wurde die Kinetik kontinuierlich am Fluorometer verfolgt

(●), bei Temperaturen über 80°C erfolgte die Bestimmung der Aktivität durch Endpunktmessung nach 60 s (○). Das Temperaturoptimum von Cella_SSO1949_Cella liegt bei 85°C.

Das Temperaturoptimum von Cella_SSO1949_Cella wurde sowohl mit dem hexameren als auch mit dem tetrameren Fluoreszenzsubstrat bestimmt. Da das an das Fluorometer angeschlossene Wasserbad nur auf 100°C aufgeheizt werden konnte, was einer Messtemperatur in der Küvette von 80°C entspricht, wurde das Temperaturoptimum des Hybrids durch Endpunktmessung bestimmt. Dazu wurde die Reaktion nach 60 s gestoppt und die Fluoreszenz gemessen. Für beide Substrate ergab sich ein Temperaturoptimum von 85°C. Die spezifische Aktivität von Cella_SSO1949_Cella liegt mit dem hexameren Substrat bei $0.55 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ und mit dem tetrameren Substrat bei $0.16 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Abbildung 3-40). Damit besitzt das funktionsfähige Hybridprotein aus Cella und SSO1949 ein pH- und Temperaturoptimum, das sich annähernd in der Mitte der Optima von Cella (pH 4.5, 95°C) und SSO1949 (pH 1.8, 80°C) befindet. Damit konnte ein funktionsfähiges thermoacidophiles Enzym generiert werden, das die positiven Eigenschaften beider Cellulasen besitzt. Von SSO1949 besitzt das Hybrid die Acidophilie und durch den Anteil an Cella konnte die Löslichkeit des Enzyms verbessert werden. Cella_SSO1949_Cella ist zwar nach wie vor unlöslich. Jedoch konnte die Löslichkeit insofern erhöht werden, dass das Hybrid in Harnstoff gelöst werden kann und zum Lösen aus den „Inclusion Bodies“ kein stärkeres Denaturierungsmittel erforderlich ist wie bei dem Elternteil SSO1949. Auch das Hybrid musste durch Rückfaltung in seine aktive Form überführt werden, jedoch ist dies im Gegensatz zu SSO1949 deutlich erleichtert. pH- und Temperaturoptimum sowie die k_{cat} - und K_{M} -Werte von SSO1949, Cella und Cella_SSO1949_Cella sind in Tabelle 3-4 nochmals zusammengefasst.

Tabelle 3-4: Übersicht über pH- und Temperaturoptimum, k_{cat} und K_{M} von SSO1949, Cella und dem Hybridprotein mit dem FRET-Cellohexaosid (Huang *et al.*, 2005; diese Arbeit)

	pH-Optimum	Temperatur- optimum	k_{cat}	K_{M}
Bedingungen	80°C; 1 μM Substrat	1 μM Substrat	80°C	80°C
SSO1949	1.8	80°C	0.5 s^{-1}	2.0 μM
Cella	4.5	95°C	19 s^{-1}	5.5 μM
Hybrid	3	85°C	0.4 s^{-1}	1.7 μM

4. Zusammenfassende Diskussion

4.1. Aufreinigung und Charakterisierung von SSO1949

Die Nachfrage nach stabileren sowie hochaktiven und spezifischen Enzymen steigt ständig (Bhat, 2000). Aufgrund ihrer extremen Hitze- und Säurestabilität ist die Cellulase SSO1949 für die Industrie und Biotechnologie besonders interessant. In dieser Arbeit wurde versucht SSO1949 sowohl rekombinant nach Expression in *E. coli* als auch aus dem Organismus, in dem das Enzym natürlicherweise exprimiert wird, nämlich *Sulfolobus*, aufzureinigen.

4.1.1. Expression von SSO1949 in *E. coli*

4.1.1.1. Aufreinigung von SSO1949

Bereits in einer früheren Arbeit (Huang *et al.*, 2005) wurde die thermoacidophile Cellulase SSO1949 aus dem Archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2 aufgereinigt und charakterisiert. Damals schien ein geringer Teil von SSO1949 nach rekombinanter Expression in *E. coli* in löslicher Form exprimiert zu werden. Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Endoglukanase eine optimale katalytische Aktivität bei einem pH von ca. 1.8 und einer Temperatur von ca. 80°C aufweist (Huang *et al.*, 2005). Die spezifische Aktivität konnte damals mit $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bestimmt werden. In darauf folgenden Arbeiten konnte diese lösliche Expression von SSO1949 jedoch nicht mehr reproduziert werden (Szolkowy, 2006; Kufner, 2007). Durch Westernblot-Analyse war keine lösliche Cellulase zu detektieren.

In diesem Fall musste nun dazu übergegangen werden unlösliches SSO1949 denaturierend aus „Inclusion Bodies“ aufzureinigen und durch Rückfaltung wieder in seine aktive Form zu überführen. Durch Behandlung des „Inclusion Body“ mit starken Denaturierungsmitteln geht die Sekundärstruktur, die Proteine in „Inclusion Bodies“ aufweisen, verloren. Eine Möglichkeit dies zu verhindern, wäre der Einsatz von niedriger konzentrierten und somit milderem Lösungsmitteln wie beispielsweise niedrigere Konzentrationen an Harnstoff oder Guanidiniumchlorid in Kombination mit Detergenzien oder extremen pH-Werten. Durch diese milden Denaturierungsbedingungen sollen die einzelnen Polypeptidketten nicht entfaltet, sondern lediglich das aggregierte Protein gelöst werden. Dies erleichtert die Renaturierung und erhöht somit die Rückfaltungsausbeute. Beispielsweise konnte das humane Wachstumshormon aus „Inclusion Bodies“ gereinigt werden. Nach anschließender Rückfaltung lag die Rückfaltungsausbeute für dieses Enzym bei 40% (Singh & Panda, 2005). Für SSO1949 stellte sich jedoch heraus, dass dieses Enzym nicht unter schwachen Denaturierungsbedingungen gelöst werden konnte. In Harnstoff war das Enzym kaum

löslich, erst durch das stärkere Denaturierungsmittel Guanidiniumchlorid konnte SSO1949 zu ca. 40% gelöst werden. Diese schlechte Löslichkeit ist überraschend, da Harnstoff und Guanidiniumchlorid herkömmlicherweise verwendet werden, um unlösliche Proteine zu lösen.

Da SSO1949 nicht in Harnstoff löslich ist, konnten durch vorangegangene Waschschrte mit Harnstoff Verunreinigungen und *E. coli*-Proteine weitestgehend entfernt werden. SSO1949 konnte somit direkt und ohne weitere Aufreinigung für die anschliessende Rückfaltung eingesetzt werden.

Die Rückfaltung von SSO1949 erfolgte durch Verdünnen, da dies die schnellste und einfachste Methode darstellte. Dabei konnten die besten Ergebnisse in Puffern erzielt werden, die Arginin enthielten. Arginin scheint essentiell für die Rückfaltung von SSO1949 zu sein, indem es mit den Faltungsintermediaten interagiert (Waldmann, 2005). Zusätzlich scheint Arginin die rückgefaltete Cellulase zu stabilisieren, da SSO1949 nach Entfernung des Arginins im Puffer präzipitierte. Nur durch sehr langsames Verdünnen des Rückfaltungsansatzes konnte das Enzym in Lösung gehalten werden. Da SSO1949 nach der erfolgreichen Rückfaltung stark verdünnt vorlag, wurde es über Kationenaustauschchromatographie aufkonzentriert. Eine erfolgreiche Elution des Proteins gelang dabei nur mit einer geringen Konzentration an Guanidiniumchlorid, was darauf hindeutete, dass das Protein auf der Säule präzipitierte sobald Arginin dem Enzym vollständig entzogen wird oder sobald sich die Proteinkonzentration erhöht. Diese Tatsache bereitete Probleme für das weitere Arbeiten mit SSO1949. Zum einen ist bei in Guanidiniumchlorid gelöstem Protein kein spektrometrischer Konzentrationsnachweis möglich, da GdmCl bei der Messung stört. Zum anderen wird ein Teil der Proteine bereits wieder denaturiert, so dass der tatsächliche Anteil an aktivem Enzym in der Lösung nicht bekannt ist. Bei der Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay wurde das Gesamtprotein in der Lösung gemessen, aktives sowie auch inaktives. Die folgende enzymatische Charakterisierung des Enzyms muss daher als semiquantitativ angesehen werden.

4.1.1.2. Enzymatische Charakterisierung von SSO1949

Die enzymatische Aktivität von SSO1949 wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzsubstrats bestimmt, welches aus 6 β -1,4-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten besteht. Am reduzierenden Ende befindet sich ein Fluorophor (EDANS), am nicht reduzierenden Ende befindet sich ein Chromophor, welches die Fluoreszenz löscht. Erst wenn das Substrat durch die aktive Cellulase gespalten wird, kommt es durch Abbruch des FRET zu einem Anstieg der Fluoreszenz (Boyer *et al.*, 2002).

Die Aktivität der rückgefalteten Cellulase ergab $1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ und kommt damit der in einer früheren Arbeit bestimmten Aktivität von SSO1949 nahe. Damals betrug die

spezifische Aktivität von SSO1949 $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ und wurde mit löslich exprimiertem Enzym bestimmt. Dieses kann möglicherweise etwas veränderte Eigenschaften aufweisen als rückgefaltetes Enzym. Zum anderen konnte die Konzentration des rückgefalteten Enzyms nicht exakt bestimmt werden, so dass auch dadurch Abweichungen in der spezifischen Aktivität auftreten können. Das glockenförmige pH-Profil konnte ebenfalls bestätigt werden und ist auf die Veränderung des Ionisierungsgrads der beiden sauren katalytischen Reste zurückzuführen. Das pH-Profil ähnelt dem von anderen acidophilen Glykosidhydrolasen wie der Xylanase C von *Aspergillus kawachii* und der Xylanase I von *Trichoderma reesei*, mit dem Unterschied dass das Aktivitätsprofil von SSO1949 schärfer verläuft und in den sauren Bereich verschoben ist (Huang *et al.*, 2005). Jedoch fällt die cellulolytische Aktivität auf beiden Seiten des pH-Optimums nicht so stark ab wie in der früheren Arbeit. Bei pH 1 bzw. pH 3 besitzt das Enzym noch immer die Hälfte bzw. zwei Drittel seiner maximalen Aktivität, was möglicherweise auf Unterschiede zwischen nativ und denaturierend aufgereinigtem Enzym zurückzuführen ist. SSO1949 zeigt sein einzigartiges Temperatur- und pH-Optimum bei 80°C und pH 1.8. Bisher ist nur ein einziges Enzym bekannt, das eine ähnliche Kombination aus Thermo- und Säurestabilität zeigt, nämlich die Protease Thermopsin aus *S. acidocaldarius* (Fusek *et al.*, 1990). Innerhalb der Glykosidhydrolasen ist SSO1949 das einzige Mitglied, das bei extrem hohen Temperaturen und niedrigem pH aktiv ist. Die verwandte Xylanase C aus *Aspergillus kawachii* zeigt zwar ein pH-Optimum bei 2, jedoch ist sie mesophil (Fushinobu *et al.*, 1998).

4.1.1.3. Verbesserung der Löslichkeit von SSO1949

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Löslichkeit eines Proteins bei rekomanter Expression in *E. coli* zu verbessern. Die einfachste Möglichkeit wäre dabei die Expression bei erniedrigter Temperatur, wie z.B. Raumtemperatur oder 16°C . Bei niedrigerer Temperatur werden die Wachstumsgeschwindigkeit von *E. coli* und somit auch die Expressionsgeschwindigkeit verlangsamt. Das Protein hat somit mehr Zeit sich richtig zu falten. Eine weitere Möglichkeit das Problem der Fehlfaltung zu umgehen, ist der Einsatz von sog. Chaperonen (franz. „Anstandsdamen“). Chaperone sind Proteine, die neu synthetisierten Proteinen helfen, sich korrekt zu falten. Chaperone binden und schützen die neu synthetisierten Proteine, bis sie ihre native dreidimensionale Struktur erhalten haben. Sie verhindern unerwünschte Proteinaggregationen, indem sie exponierte hydrophobe Bereiche abschirmen und assistieren bei der nativen Faltung von Proteinen. Sie können sogar bereits aggregierte Proteine wieder auflösen und in den nativen Zustand zurückzufalten. Chaperone können somit bei Koexpression mit dem Zielprotein den löslichen Anteil dieses Proteins zu erhöhen (Thomas, 1997). Durch Koexpression mit

Chaperonen konnten beispielsweise mehr als 50% der Protein-Tyrosinkinase P50^{csk} (Amrein *et al.*, 1995) und mehr als 80% von Endostatin (Nishihara *et al.*, 2000) in löslicher Form erhalten werden.

Im Fall von SSO1949 konnte die Löslichkeit in *E. coli* durch die beiden genannten Verfahren jedoch nicht erhöht werden. Auch eine Verkürzung des Proteins führte nicht zum gewünschten Erfolg. Entweder war das Protein trotz Verkürzung unlöslich oder nicht mehr aktiv (Franke, 2004; Szolkowy, 2006; Kufner, 2007). Eine weitere Methode, die Löslichkeit eines Proteins bei Expression in *E. coli* zu erhöhen, ist die Fusion eines Tags. Kommerziell erhältliche Fusionstags sind beispielsweise Thioredoxin (Trx), Glutathion-S-Transferase (GST) oder Maltose-bindendes Protein (MBP) (Braun & LaBaer, 2003). Bei Löslichkeitsstudien mit den archaealen Proteinen D-Gluconatdehydratase und 2-keto-3-deoxy-D-Gluconatkinase stellte sich der Thioredoxin-tag als erfolgsversprechendste Methode heraus (Seonghun & Lee, 2008). Thioredoxine besitzen ein Molekulargewicht von etwa 12 kDa. Sie tragen in ihrem aktiven Zentrum die Sequenz *Cystein-Glycin-Prolin-Cystein*, die für die Elektronenübergänge verantwortlich ist. Die beiden Cysteingruppen können zwei verschiedene Redoxzustände annehmen. Beim oxidierten Thioredoxin sind die Cysteinreste zu einer Disulfidbrücke verknüpft, reduziert liegen im Enzym zwei SH-Gruppen vor. Bei Fusion von Trx an SSO1949 konnte die Löslichkeit jedoch nur insofern erhöht werden, dass das archaeale Protein nun durch 8 M Harnstoff aus dem „Inclusion Body“ gelöst werden kann und kein stärkeres Denaturierungsmittel mehr nötig ist. Unlöslich wird es nach wie vor exprimiert.

Strukturanalysen der hochkonservierten Region von SSO1949 ergaben, dass SSO1949 im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Glykosidhydrolase-Familie 12 einen hydrophoben Loop trägt (Abbildung 3-12). Dieser Bereich könnte mit der Membran interagieren und möglicherweise für die schlechte Löslichkeit von SSO1949 verantwortlich sein. An dieser Stelle befinden sich 8 Aminosäuren mehr als bei anderen Mitgliedern der Glykosidhydrolase-Familie 12. Da sich dort beta-Faltblätter befinden, könnte dies bedeuten, dass die benachbarten Faltblätter je um vier Aminosäuren verlängert sind. Nach Deletion von je zwei Aminosäuren links und rechts des Loops, stellte sich heraus, dass die Löslichkeit dadurch nicht verbessert werden konnte. Darüber hinaus zeigte sich, dass das Protein keine Aktivität mehr besaß. Da sich der Loop in der hochkonservierten Region von SSO1949 befindet, werden durch die Deletion möglicherweise für die cellulolytische Aktivität wichtige Aminosäuren entfernt bzw. Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren zerstört. Auch die Entfernung von sechs hydrophoben Aminosäuren im C-Terminus von SSO1949 konnte keine Verbesserung der Löslichkeit erzielen. Jedoch zeigt sich, dass der C-Terminus keinen Einfluss auf die cellulolytische Aktivität hat und SSO1949 auch nach Deletion des C-Terminus noch aktiv ist. Auch die Kombination aus Thioredoxin-tag und Deletion des C-Terminus konnten die Löslichkeit von SSO1949 (Daten nicht gezeigt) nicht erhöhen. Die

Expressionsbedingungen in *E. coli* scheinen für das archaeale Protein SSO1949 sehr ungünstig zu sein, weshalb im Folgenden dazu übergegangen wurde das Protein unter Bedingungen zu exprimieren, die seiner natürlichen Umgebung ähneln, nämlich in dem Crenarchaeot *S. acidocaldarius*.

4.1.1.4. Untersuchung der Punktmutanten von SSO1949

Auf Basis der Modellstruktur von SSO1949 konnten in der Umgebung der katalytischen Glutamatreste (E213 und E310) Aminosäuren identifiziert werden, die möglicherweise für die extreme Acidophilie von SSO1949 verantwortlich sind (Huang *et al.*, 2005).

Punktmutationen in der Umgebung des Nukleophils E213 und des Säure-Base-Katalysators E310 sollten Aufschluss darüber geben, welche Aminosäuren direkt oder indirekt an der pK_a -Verschiebung ins Saure beteiligt sind. Bei den anschliessenden Studien führten die Mutationen W193 zu Alanin und T137 zu Asparagin zur grössten Verschiebung des pH-Werts in Richtung des alkalischen Bereiches. Die Punktmutation von W193 führte nahezu zum Verlust der spezifischen Aktivität von SSO1949. Die Mutation von T137 zu Alanin zeigt kaum einen Effekt bei der Verschiebung des pH-Optimums. Wird jedoch T137 zu Asparagin mutiert, tritt eine deutliche Verschiebung des pH-Optimums in den basischen Bereich auf. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Ergebnis der Xylanase C aus *Aspergillus kawachii*, bei der die homologe Aminosäure gegen Asparagin mutiert wurde (Fushinobu *et al.*, 1998). Die Mutation des homologen Aspartatrestes zu Asparagin in der Umgebung des katalytischen Glutamatrestes führte zu einer Verschiebung des pH-Optimums von pH 2 auf pH 5 (Fushinobu *et al.*, 1998). Die Aminosäure T137 ist homolog zu dem mutierten Aspartatrest 37 der Xylanase C aus *Aspergillus kawachii* und könnte mit E310 Wasserstoffbrücken ausbilden, welche möglicherweise Einfluss auf den pK_a -Wert des katalytischen Restes nehmen (Fushinobu *et al.*, 1998). Die umgekehrte Beobachtung konnte für die Xylanase aus *Bacillus circulans* gemacht werden, welche an der homologen Stelle einen Asparaginrest trägt und ein pH-Optimum von 5.7 besitzt. Nach Austausch des Asparagins durch Aspartat zeigte sich, dass das pH-Optimum auf pH 4.6 herabgesetzt wurde (Joshi *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel für die Verschiebung des pH-Optimums stellt die Xylanase 1 aus *Streptomyces sp.* dar. Ihr pH-Optimum liegt bei 6 und konnte durch Mutation von Asparagin 48 (homolog zu T137 in SSO1949) zu Aspartat um eine pH-Stufe in den sauren Bereich verschoben werden. Der Mechanismus dieser pH-Verschiebung konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Der Aspartatrest scheint jedoch den deprotonierten katalytischen Glutamatrest über Wasserstoffbrücken zu stabilisieren, was den pK_a -Wert des Glutamats herabsetzt. Durch Vergleich von Primär- und Tertiärstrukturen von Endo-Xylanasen konnte gezeigt werden, dass im aktiven Zentrum von acidophilen Xylanasen

Aspartat mit dem Säure-Base-Katalysator Wasserstoffbrücken ausbildet, während in alkalischen Xylanasen dieses durch Asparagin ersetzt ist (Torronen & Rouvinen, 1995). Die spezifische Aktivität von SSO1949 geht nach dieser Mutation von T137 zu Asparagin ebenfalls auf etwa 25% der ursprünglichen Aktivität zurück. Diese Aminosäure scheint also einen bedeutenden Einfluss auf die Acidophilie des Enzyms zu haben. Alle anderen Mutationen im aktiven Zentrum von SSO1949 führten zu keiner bedeutenden Verschiebung des pH-Optimums, jedoch verloren alle Punktmutanten an Aktivität.

4.1.2. Expression von SSO1949 in *S. acidocaldarius* MR31

Da *E. coli* nicht das optimale Expressionssystem für archaeale Proteine darstellt und SSO1949 unlöslich exprimiert wurde, wurde versucht das Enzym in dem Organismus zu exprimieren, in dem es auch natürlicherweise vorkommt, nämlich in dem Archaeon *Sulfolobus*. *Sulfolobus* gehört zu den besterforschten archaealen Organismen, doch standen bisher keine genetischen Systeme zur Verfügung oder sie zeigten schlechte Reproduzierbarkeit (Berkner & Lipps, 2007). Bereits in den 90er Jahren wurden Shuttle-Vektoren für Archaeen entwickelt und für die Proteinexpression eingesetzt (Allers & Mevarech, 2005).

Der erste *Sulfolobus-E. coli*-Shuttle-Vektor wurde 1995 durch Aagaard *et al.* beschrieben, indem ein mobiles rDNA-Intron von *Desulfurococcus mobilis* mit dem *E. coli*-Vektor pUC18 kombiniert wurde (Aagaard *et al.*, 1995). 2006 wurde ein Shuttle-Vektor für *S. solfataricus* entwickelt, der auf dem genetischen Element pSSVx, einem Hybrid aus Plasmid und Fusellovirus aus *S. islandicus* REY15/4, basierte (Aucelli *et al.*, 2006). Für den Crenarchaeot *Sulfolobus acidocaldarius* wurde 2007 ein entsprechender *Sulfolobus-E. coli*-Shuttle-Vektor entwickelt (Berkner *et al.*, 2007), der in dieser Arbeit verwendet wurde. Des Weiteren wurde für eine stabilere Proteinexpression ein Integrationsvektor für *S. acidocaldarius* entwickelt (Berkner, unveröffentlichte Arbeit). Die multiple Klonierungsstelle, sowie die *pyrEF*-Gene sind von zum Genom von *S. acidocaldarius* homologen Sequenzen flankiert, wodurch das gewünschte Gen durch Doppel-Crossover ins Genom integriert werden kann. Für die Proteinexpression wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Promotoren verwendet, der schwache *dps*-Promotor aus *S. solfataricus*, der induzierbare *mal-* (*mhp-*) Promotor aus *S. acidocaldarius* und der starke konstitutive *sac7d*-Promotor aus *S. acidocaldarius*. Der *dps*-Promotor wurde gewählt, da die Expression des Dps-Proteins unter verschiedenen Bedingungen bereits beschrieben wurde (Wiedenheft *et al.*, 2005) und dabei herausgefunden wurde, dass die Proteinexpression durch Zugabe von Wasserstoffperoxid gesteigert werden konnte. Die Proteinexpression unter diesem Promotor war jedoch relativ gering. Deshalb wurde zur Expression unter dem induzierbaren Promotor des Maltose-bindenden Proteins (*mal-*

Promotor) übergegangen (Berkner *et al.*, 2010). Bisher wurde noch kein entsprechender induzierbarer Promotor für *S. acidocaldarius* beschrieben. Für *S. solfataricus* stand bisher der induzierbare *araS*-Promotor zur Verfügung, der durch Zugabe von Arabinose zum Medium induziert wurde (Lubelska *et al.*, 2006). In *S. acidocaldarius* konnte dieser Promotor jedoch nicht angewendet werden, da dieser Crenarchaeot kein Arabinose-Transport-Operon besitzt. Das 68 kDa schwere Protein ABCE1 aus *S. solfataricus* konnte bereits erfolgreich unter dem *mal*-Promotor in *S. acidocaldarius* exprimiert und aufgereinigt werden (Berkner *et al.*, 2010).

SSO1949 besitzt ein Signalpeptid und wird somit sekretiert (Albers & Driessen, 2002). Wahrscheinlich handelt es sich bei SSO1949 um ein extrazelluläres und zelloberflächenassoziiertes Enzym. Ob die Cellulase über hydrophobe Aminosäuren in der Signalsequenz mit der Membran interagiert oder ob sie über die Ser/Thr-reiche Region mit der S-Layer verbunden ist, konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Girfoglio (2009) verglich in seinen Untersuchungen die N-terminale Signalsequenz von SSO1354 mit der von zuckerbindenden Protein in *S. solfataricus*, welche den Typ IV Prepilin Signalsequenzen (Albers & Driessen, 2002) geordnet werden können. Nach dieser Definition könnte SSO1354 über hydrophobe Aminosäuren in der Signalsequenz in der Membran verankert sein. SSO1949 zeigt 85% Sequenzähnlichkeit zu SSO1354.

SSO1354 wurde bereits aus der Membranfraktion von *S. solfataricus* aufgereinigt (Maurelli *et al.*, 2008). Deshalb wurde versucht SSO1949 zunächst unter Kontrolle des *mal*-Promotors zu exprimieren und nach der gleichen Methode wie SSO1354 aus der Membran aufzureinigen. SSO1949 konnte erfolgreich exprimiert und über Conavalin A aufgereinigt werden. Dies spricht dafür, dass SSO1949 genauso wie SSO1354 glykosyliert vorliegt. Des Weiteren läuft SSO1949 im Aktivitätsgel nicht auf Höhe seines Molekulargewichts sondern höher, was ebenfalls eine Glykosylierung des Proteins unterstreicht. Nach Coomassiefärbung konnte ebenfalls eine Bande auf der Höhe der Aktivität identifiziert werden, die in der Negativkontrolle nicht auftritt. Dass SSO1949 in *S. acidocaldarius* exprimiert wurde steht ausser Frage, da die Negativkontrolle zu keinem Zeitpunkt Aktivität zeigte. Um jedoch sicher zu sein, dass es sich bei der entsprechenden Bande tatsächlich um SSO1949 handelt, müsste diese Vermutung noch massenspektrometrisch abgesichert werden.

Girfoglio entdeckte 2009 bei seinen Untersuchungen, dass SSO1354 bei Expression in *S. solfataricus* bei Kulturen mit einer optischen Dichte von mehr als 1.2 auch im Medium einer *Sulfolobus*-Kultur zu finden ist. In dieser Wachstumsphase gehen die Zellen bereits in die Absterbephase über und SSO1354 gelangt nach Auflösen der Zellen ins Medium. Somit konnte SSO1354 ebenfalls erfolgreich aus dem Überstand einer *Sulfolobus*-Kultur aufgereinigt werden (Girfoglio, 2009). Basierend auf dieser Arbeit wurde versucht SSO1949 unter Kontrolle des starken konstitutiven Promotors *sac7d* ebenfalls aus dem Überstand einer *S. acidocaldarius*-Kultur aufzureinigen. Die Aufreinigung gestaltete sich

schwierig und erfolgte über hydrophobe Interaktionschromatographie gefolgt von Anionenaustauschchromatographie. Auch das Anhängen eines N-terminalen His₆-tags konnte die Aufreinigung nicht verbessern. Der Tag scheint mit dem Signalpeptid abgespalten zu werden und konnte nicht mehr detektiert werden. Letztendlich konnte cellulolytische Aktivität nachgewiesen werden, jedoch gelang es nicht der Aktivität eine exakte Proteinbande zuzuordnen. Dies spricht dafür, dass SSO1949 in sehr geringer Menge exprimiert wird, aber eine hohe spezifische Aktivität besitzt. Des Weiteren liegt SSO1949 mit hoher Wahrscheinlichkeit heterogen glykosyliert vor und ergibt somit auf dem Proteingel keine scharfe Bande. Bei Vergleich von SSO1949 aus der Membranfraktion und aus dem Kulturüberstand auf einem Aktivitätsgel wurde festgestellt, dass SSO1949 in den beiden Präparationen unterschiedliche Grösse aufweist. Im Gegensatz zu der Membranpräparation lief SSO1949 aus dem Kulturüberstand am oberen Rand des Trenngels. Möglicherweise ist das Enzym im Überstand stärker glykosyliert als in der Membran oder im Medium befindliches SSO1949 ist noch mit Membranbestandteilen assoziiert, welche bei SSO1949 aus der Membranfraktion durch Behandlung mit Dodecylmaltosid oder Triton X entfernt wurden. Um dies auszuschliessen, müsste SSO1949 ebenfalls mit Detergenz behandelt werden, und nochmals mit aus der Membranfraktion präpariertem Enzym verglichen werden.

Die ersten Schritte zur Expression und Reinigung von SSO1949 in *S. acidocaldarius* sind getan und warten darauf noch verfeinert zu werden, denn aufgrund seiner thermoacidophilen Eigenschaften stellt die Cellulase SSO1949 ein sehr interessantes Enzym für die Biotechnologie dar.

4.2. Aufreinigung und Charakterisierung von CelA und EglA

Mitglieder der *Thermotogales*, nämlich *Thermotoga elfii*, *T. maritima*, *T. neapolitana*, *T. thermarum* und andere *Thermotoga* Spezies wurden aus verschiedenen geothermalen Quellen isoliert. Jede Art produziert eine Reihe von hitzestabilen Polysaccharasen wie Cellulasen, Xylanasen, Mannanasen und Galaktosidasen (Sunna *et al.*, 1997). Die Endoglukanase CelA von *T. maritima* zeigt 90% Sequenzähnlichkeit zu CelA aus *T. neapolitana* und wird zusammen mit CelB exprimiert, das 58% Sequenzidentität zu CelA aufweist und im Gegensatz zu CelA ein Signalpeptid trägt (Liebl *et al.*, 1996). Auch das hyperthermophile Archaeon *Pyrococcus furiosus* exprimiert zwei hitzestabile Endoglukanasen, LamA und EglA. Die beiden Enzyme besitzen grundverschiedene Aminosäuresequenzen und Substratspezifitäten. Die Laminarinase LamA wurde klassifiziert und zählt zur Glykosylhydrolase Familie 16 (Gueguen *et al.*, 1997), während EglA ebenso wie CelA der Glykosylhydrolase Familie 12 zugeordnet werden kann.

Die Endoglukanasen CelA und EglA zeigen hohe Sequenzähnlichkeit zu SSO1949. CelA aus *Thermotoga* wurde bereits in *E. coli* (Liebl *et al.*, 1996) und *Thermotoga* (Bok *et al.*,

1998) exprimiert und aufgereinigt. Die Cellulase CelA besitzt ein Molekulargewicht von 29 kDa und einen isoelektrischen Punkt bei 4.6. Die höchste Aktivität zeigte CelA bei 90-95°C (Bronnenmeier *et al.*, 1995; Liebl *et al.*, 1996; Bok *et al.*, 1998). Auch EglA wurde mit einer molekularen Masse von 35.9 kDa und einem Temperaturoptimum von 100°C rekombinant in *E. coli* exprimiert. Trotz der hohen Sequenzähnlichkeiten sind die beiden Enzyme im Gegensatz zu SSO1949 nicht acidophil, beide besitzen ein pH-Optimum bei pH 6. Durch gezielten Austausch von Aminosäuren im aktiven Zentrum von CelA und EglA gegen die homologen Aminosäuren in SSO1949 sollte untersucht werden, ob dadurch ihr pH-Optimum weiter erniedrigt werden kann. Im Fall der Xylanase XylI aus *Streptomyces sp.*, deren pH-Optimum ebenfalls bei pH 6 liegt, konnte dies durch gezielte Mutationen erreicht werden (De Lemos Esteves *et al.*, 2004). Durch Austausch bestimmter Aminosäuren im katalytische Zentrum gegen homologe Aminosäuren der Xylanase XynC (pH-Optimum bei pH 2) aus *Aspergillus kawachii* konnte das pH-Optimum von XylI nach pH 4,7 verschoben werden (De Lemos Esteves *et al.*, 2004). CelA wurde löslich in *E. coli* exprimiert und konnte durch Anionenaustauschchromatographie und darauffolgender hydrophober Interaktionschromatographie aufgereinigt werden. Die Aktivitätsmessung von CelA sowie die Untersuchung der Punktmutanten erfolgten durch Spaltung des Substrats p-Nitrophenyl- β -D-Cellobiosid und der Messung von freigesetztem p-Nitrophenol. CelA sowie seine Punktmutanten zeigen ein glockenförmiges pH-Profil mit Verschiebung in den alkalischen Bereich. Mit Ausnahme der Mutante P111N haben alle Mutanten deutlich an Aktivität verloren, ohne dass sich ihr pH-Optimum deutlich verschiebt. Die stärkste pH-Verschiebung zeigen 63_QWVN, bei dem in der Umgebung von Valin 63 drei Aminosäuren gegen die homologen in SSO1949 ersetzt sind und die Dreifachmutante P111N/N113D/E117D. Bei ihnen verschiebt sich das pH-Optimum um eine pH-Stufe in Richtung des sauren Milieus auf pH 5.5. Allerdings verlieren die Enzyme den Grossteil ihrer Aktivität. 63_QWVN besitzt noch 1.3 %, P111N/N113D/E117D noch 2.5 % der wildtypischen Aktivität. Eine stärkere Verschiebung des pH-Optimums um 1.3 wie bei der Xylanase XylI aus *Streptomyces sp.* (De Lemos Esteves *et al.*, 2004) konnte nicht erreicht werden. Die Aminosäuren V63 und N113 entsprechen den Aminosäuren T137 und D187 in SSO1949. Hier konnte durch den Austausch von T137 gegen N eine Verschiebung des pH-Optimums von 1.8 auf 3.4 beobachtet werden. Entsprechend der Xylanase aus *Bacillus circulans*, welche ebenfalls ein pH-Optimum nahe pH 6 sitzt, wurde erwartet, dass diese Aminosäure auch bei CelA Einfluss auf das pH-Optimum nimmt. Nach Austausch eines Asparaginrestes an der homologen Stelle gegen Aspartat verschob sich ihr pH-Optimum auf 4.6 (Joshi *et al.*, 2000). Für die Cellulase CelA konnte jedoch keine entsprechend grosse pH-Verschiebung festgestellt werden. Es trat lediglich eine Verschiebung um ein halbe pH-Stufe auf. Der Austausch von Aminosäuren in der Umgebung von V63 gegen die homologen in SSO1949 führte zu einer pH Verschiebung auf pH 5.5. Der Austausch von Aminosäuren in der

Nachbarschaft der katalytischen Reste von CelA zeigt somit nicht den gleichen grossen Effekt wie bei den Xylanasen von *Bacillus circulans* und *Aspergillus kawachii*.

Zur besseren Vergleichbarkeit mit SSO1949 und dem späteren Hybridprotein, wurde die Aktivität von CelA ebenfalls mit dem fluoreszenten Hexaosid und Tetraosid quantifiziert. Aufgrund der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Substratbindungsstelle des Enzyms zu verschiedenen Substraten ergab diese Messung ein pH-Optimum von 4.5. Im Vergleich mit SSO1949 jedoch immer noch deutlich alkalischer. Mit $4.7 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ zeigt CelA im Gegensatz zu SSO1949 eine höhere spezifische Aktivität. Mit Hilfe der Endpunktmessung am Fluoreszenzspektrometer, konnte darüber hinaus auch das Temperaturoptimum von CelA mit 95°C ermittelt werden. Die Wechselzahl k_{cat} von CelA wurde für das hexamere Substrat mit 19 s^{-1} und für das tetramere Substrat mit 14 s^{-1} bestimmt. Das Verhältnis aus k_{cat} und K_{M} ergibt die katalytische Effizienz von CelA und lag sowohl für das hexamere als auch für das tetramere Substrat im Bereich von $10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Die Cellulase EglA aus *Pyrococcus furiosus* konnte zwar in *E. coli* exprimiert werden, doch bei Expression bei Raumtemperatur und Koexpression mit Chaperonen war nur ein minimaler Teil der Cellulase löslich, welche jedoch sehr hohe Aktivität zeigte. Da jedoch auch bei der Aufreinigung des geringen löslichen Anteils Probleme auftraten, konnten die Mutationsstudien von EglA aufgrund von Zeitmangel nicht fortgesetzt werden. Interessant wären diese Studien schon deshalb gewesen, da SSO1949 höchste Sequenzähnlichkeit mit EglA zeigt.

4.3. Generierung eines Hybridproteins aus SSO1949 und CelA

Die Cellulasen SSO1949 aus *Sulfolobus solfataricus* und CelA aus *Thermotoga maritima* stellen zwei für die Industrie und Biotechnologie interessante hyperthermophile Enzyme dar. SSO1949 ist darüber hinaus extrem acidophil mit einem pH-Optimum von ca. 1.8, wird jedoch unlöslich in *E. coli* exprimiert. CelA hingegen wird in *E. coli* in löslicher Form exprimiert, zeigt jedoch höchste enzymatische Aktivität bei pH 6. Ziel dieser Arbeit war es, ein Hybridprotein zu entwickeln, in dem diese drei positiven Eigenschaften Thermophilie, Acidophilie und verbesserte Löslichkeit kombiniert werden. Vor der Konstruktion der Hybridproteine musste berechnet werden, wo die Unterbrechung der Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren eines Proteins am energetisch günstigsten waren (Voigt *et al.*, 2002). Die Berechnung ergab zwei Hybridproteine (Abbildung 3-35). CelA_SSO1949_CelA wird N- und C-terminal von CelA flankiert und trägt den grössten Teil der katalytischen Region von SSO1949. Das zweite Hybridprotein SSO1949_CelA_SSO1949 besteht grösstenteils aus SSO1949, ein Teil der katalytischen Domäne ist durch CelA ersetzt. Beide Hybridproteine konnten entsprechend ihrem errechneten Molekulargewicht überexprimiert werden, allerdings in unlöslicher Form. Es

stellte sich heraus, dass SSO1949_CelA_SSO1949 inaktiv war. Die Unterbrechung der katalytischen Domäne von SSO1949 und Ersatz durch CelA scheint doch grossen Einfluss auf die Enzymaktivität zu nehmen. Möglicherweise sind dennoch für die cellulolytische Aktivität wichtige Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren irreversibel zerstört worden.

Durch den Ersatz des grössten Teils des aktiven Zentrums von CelA durch SSO1949 wird das Hybridprotein CelA_SSO1949_CelA im Gegensatz zum löslichen CelA unlöslich exprimiert. Durch die Anteile von CelA ist die Löslichkeit des Hybrids im Vergleich zu SSO1949 jedoch deutlich verbessert. Im Gegensatz dazu kann CelA_SSO1949_CelA durch Harnstoff vollständig aus dem „Inclusion Body“ gelöst werden. Zum Lösen von SSO1949 wurden stärkere Denaturierungsmittel wie Guanidiniumchlorid benötigt. Nach dem Lösen aus dem „Inclusion Body“ konnte das Hybrid rückgefaltet und über hydrophobe Interaktionschromatographie weiter aufgereinigt werden.

Zur Vergleichbarkeit mit SSO1949 und CelA erfolgte die enzymatische Charakterisierung des Hybridproteins CelA_SSO1949_CelA mit dem FRET-Substrat. p-Nitrophenyl- β -D-Cellobiosid wird von dem Hybrid nicht gespalten. Diese Eigenschaft hat das Fusionsprotein von dem Elternteil SSO1949 übernommen (Huang *et al.*, 2005). Die Aktivitätsmessung von CelA_SSO1949_CelA ergab ein glockenförmiges pH-Profil mit Verschiebung in den acidophilen Bereich, welches mit dem von SSO1949 vergleichbar ist. Das pH-Optimum ergab pH 3 und liegt somit ziemlich genau in der Mitte der beiden pH-Optima von SSO1949 (pH 1.8) und CelA (pH 4.5). Auch das Temperaturoptimum ergab einen ungefähren Mittelwert der beiden Cellulasen. Durch Endpunktmessung konnte ein Temperaturoptimum für CelA_SSO1949_CelA von 85°C ermittelt werden. Die gemessene spezifische Aktivität des Hybrids liegt jedoch deutlich unter den spezifischen Aktivitäten der Elternproteine. Bei pH 3 und 85°C lag die spezifische Aktivität von CelA_SSO1949_CelA bei $0.55 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ mit dem hexameren Substrat. Die Wechselzahl k_{cat} lag für das hexamere Substrat bei 0.4 s^{-1} und für das tetramere Substrat bei 0.2 s^{-1} . $K_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ nahm Werte im Bereich von $10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ an. Das Enzym arbeitet nicht mit maximaler Effizienz. Dies kann darauf hindeuten, dass in der Enzymlösung nicht nur aktives Enzym enthalten ist.

In dieser Arbeit konnte ein funktionsfähiges thermoacidophiles Enzym generiert werden, das die positiven Eigenschaften beider Elternteile besitzt. Von SSO1949 hat das Hybrid die Acidophilie übernommen und durch den Anteil an CelA konnte die Löslichkeit des Enzyms verbessert werden. CelA_SSO1949_CelA ist nach wie vor unlöslich, die Löslichkeit konnte jedoch insofern verbessert werden, dass das Hybrid in Harnstoff gelöst werden kann. Auch das Hybrid musste durch Rückfaltung in seine aktive Form überführt werden, jedoch ist die Reinigung von aktivem rückgefaltetem Protein vergleichsweise unproblematisch.

5. Zusammenfassung

Die Cellulase SSO1949 aus dem hyperthermophilen Archaeon *S. solfataricus* P2 ist aufgrund ihrer extremen thermo- und acidophilen Eigenschaften interessant für industrielle Anwendungen. Bereits 2005 wurde das 37 kDa grosse Enzym biochemisch charakterisiert. Es weist ein pH-Optimum von ca. 1.8 sowie ein Temperaturoptimum von ca. 80°C auf. Auf ein N-terminales Signalpeptid folgt eine Ser/Thr-reiche Region, an welche die katalytische Domäne anschliesst, die Sequenzähnlichkeiten zu anderen Mitgliedern der Glykosidhydrolase-Familie 12 aufweist.

Für biotechnologische Anwendungen muss SSO1949 möglichst kostengünstig in grossen Mengen produziert werden. In *E. coli* wird SSO1949 rekombinant in unlöslicher Form („Inclusion Bodies“) überexprimiert. Die Aggregation des Proteins konnte auch durch Koexpression mit Chaperonen, Verkürzung der Ser/Thr-reichen Region sowie des C-Terminus, Deletieren des hydrophoben Loops innerhalb der konservierten Region und Fusion mit verschiedenen Proteinen nicht verhindert werden.

In dieser Arbeit wurde eine Strategie entwickelt, SSO1949 aus „Inclusion Bodies“ denaturierend zu reinigen und das inaktive Enzym anschliessend in seine aktive Form zu überführen. Das geschah durch schnelles Verdünnen des Proteins in Rückfaltungspuffer. Die anschliessende Aufkonzentrierung mittels Ionenaustauschchromatographie gestaltete sich schwierig, da SSO1949 auf der Säule präzipitierte und nur mit Denaturierungsmittel eluiert werden konnte. Dennoch konnte SSO1949 in dieser Arbeit enzymatisch charakterisiert und das Temperatur- und pH-Optimum der früheren Arbeit bestätigt werden. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität für SSO1949 in dieser Arbeit muss jedoch als semiquantitativ angesehen werden, da aufgrund der ungewöhnlichen Aufreinigungsmethode eine genaue Bestimmung der Proteinkonzentration erschwert war. Im katalytischen Zentrum von SSO1949 befinden sich zwei konservierte Glutamatreste (E213 und E310). Durch Modellstrukturanalysen konnten in der Umgebung der katalytischen Reste Aminosäuren identifiziert werden, die möglicherweise für die extreme Acidophilie von SSO1949 verantwortlich sind. Durch gezielten Austausch dieser Aminosäuren wurde untersucht, inwiefern das pH-Optimum des Enzyms verschoben werden kann. Den grössten Einfluss zeigte die Mutation der Aminosäure Threonin 137 zu Asparagin, bei der sich das pH-Optimum von SSO1949 von 1.8 auf 3.4 verschob. Dieser Effekt konnte bereits bei Mutation der homologen Aminosäuren in Xylanasen von in *Aspergillus kawachii*, *Streptomyces sp.* und *Bacillus circulans* beobachtet werden.

Da sich *E. coli* nicht als geeignetes Expressionssystem für SSO1949 herausstellte, wurde in dieser Arbeit dazu übergegangen, das Enzym unter den Bedingungen zu exprimieren, unter denen es natürlicherweise exprimiert wird, nämlich in dem Crenarchaeot *Sulfolobus*. Die Gattung *Sulfolobus* gehört zu den besterforschten archaealen Organismen und bietet mittlerweile entsprechende genetische Systeme für die Expression von

Proteinen. Für *Sulfolobus* stehen bereits mehrere Shuttle-Vektor-Systeme zu Verfügung, seit 2007 auch für *Sulfolobus acidocaldarius*, welcher in dieser Arbeit als Expressionsstamm verwendet wurde. SSO1949 wurde unter Kontrolle des induzierbaren *mal*-Promotors und des konstitutiven *sac7d*-Promotors in *S. acidocaldarius* MR31 exprimiert. Darüberhinaus wurde SSO1949 zur stabileren Proteinexpression auch ins Genom von *S. acidocaldarius* integriert. Durch Verwendung von uraciluxotrophen *pyrEF*-defizienten Mutanten wurde eine effiziente Selektion erreicht. Als selektive Marker für die Uracil-Selektion dienten die funktionsfähigen *pyrEF*-Gene aus *Sulfolobus solfataricus* P2, welche für Enzyme des Uridinmonophosphat-Syntheseweges codieren.

SSO1949 zeigt 85% Sequenzidentität zu einer weiteren Endoglukanase aus *Sulfolobus solfataricus*, welche bereits erfolgreich aus *Sulfolobus* aufgereinigt werden konnte. Dabei zeigte sich, dass es sich bei der Cellulase SSO1354 um eine extrazelluläre Cellulase handelt. Sie wird jedoch nicht frei ins Medium sekretiert, sondern bleibt mit der Zelloberfläche assoziiert. Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass auch SSO1949 sowohl in der Membranfraktion als auch im Kulturüberstand zu finden war und aus beiden Fraktionen aufgereinigt werden kann. Die Aufreinigung von SSO1949 gestaltete sich schwierig und seine Identität konnte nicht massenspektrometrisch bestätigt werden. Die Expression von SSO1949 konnte jedoch zweifelsfrei durch verschiedene Aktivitätsgele nachgewiesen werden, auch wenn das Enzym aufgrund seiner heterogenen Glykosylierung keine scharfe Bande im Proteingel ergab.

Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu SSO1949 wurden zwei weitere Cellulasen der Glykosidhydrolase-Familie 12 für Mutationsstudien im aktiven Zentrum ausgewählt. CelA aus *Thermotoga maritima* und EglA aus *Pyrococcus furiosus* wurden bereits in früheren Arbeiten charakterisiert und weisen ebenfalls extreme Hitzestabilität auf. Ihr pH-Optimum liegt jedoch im leicht sauren Bereich bei pH 6. Durch gezielten Austausch von Aminosäuren im katalytischen Zentrum der beiden Glukanasen gegen die homologen Aminosäuren in SSO1949 sollte in dieser Arbeit herausgefunden werden, ob dadurch ihr pH-Optimum von 6 weiter ins saure Milieu verschoben werden kann. Es war bekannt, dass für die Xylanase XylI aus *Streptomyces sp.*, deren pH-Optimum ebenfalls bei pH 6 liegt, dadurch eine pH-Verschiebung erreicht wurde. Während CelA und seine Punktmutanten erfolgreich aufgereinigt und enzymatisch charakterisiert werden konnten, traten bei der Aufreinigung von EglA Probleme auf, weshalb die Arbeit mit EglA nicht fortgesetzt wurde.

Die Punktmutationen im aktiven Zentrum von CelA führten jedoch nur zu einer geringen Verschiebung des pH-Optimums. Es konnte lediglich eine Verschiebung um eine pH-Stufe in den sauren Bereich gemessen werden, wobei bei allen Mutanten die cellulolytische Aktivität in Mitleidenschaft gezogen wurde.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es möglich ist, die Eigenschaften der beiden Cellulasen SSO1949 aus *Sulfolobus solfataricus* und CelA aus

Thermotoga maritima zu kombinieren. SSO1949 ist extrem acidophil, wird jedoch unlöslich exprimiert. CelA wird teilweise löslich exprimiert, besitzt jedoch ein neutrales pH-Optimum. Durch Generierung eines Hybridproteins aus den beiden Proteinen konnten diese beiden Eigenschaften der besseren Löslichkeit und Acidophilie erfolgreich in einem Protein vereint werden. Das neu entstandene Fusionsprotein wird zwar noch immer unlöslich in *E. coli* exprimiert, kann jedoch im Gegensatz zu SSO1949 mit milderem Denaturierungsmitteln aus „Inclusion Bodies“ gelöst werden. Nach erfolgreicher Rückfaltung zeigte das funktionsfähige Hybridprotein ein Temperaturoptimum von ca. 85°C und ein pH-Optimum von ca. pH 3.

6. Summary

The cellulase SSO1949 from the hyperthermophilic archaeon *S. solfataricus* P2 is optimally adapted to work under acidic conditions and high temperatures and is therefore an interesting enzyme for industry and biotechnology. The enzyme with a molecular mass of 37 kDa was biochemically characterized in 2005 and shows a pH-optimum at approximately 1.8 as well as a temperature optimum at approximately 80°C. The protein consists of an N-terminal signal peptide, a Ser/Thr-rich region and a catalytic domain which shows significant homology to cellulases of glycoside hydrolase family 12.

For biotechnological applications SSO1949 has to be produced in large scale. When SSO1949 is expressed in *E. coli*, it is insoluble and the solubility of the protein couldn't be enhanced by coexpression with chaperones, shortening of the Ser/Thr-rich region and the C-terminal end, deletion of a hydrophobic loop within the catalytic domain or fusion with different proteins.

In this work, a strategy was developed to purify inactive SSO1949 under denaturing conditions from inclusion bodies and to convert the enzyme into its active form. This was done by rapidly diluting the protein in refolding buffer. The subsequent concentration by ion exchange chromatography was difficult because SSO1949 precipitated on the column and therefore elution with denaturing agents was necessary. Nevertheless, SSO1949 was enzymatically characterized in this work and the temperature as well as the pH optimum were confirmed. For these preparations the specific activity of SSO1949 has to be considered as semiquantitative due to the unusual purification method. The determination of the protein concentration was not accurate.

The catalytic center of SSO1949 is formed by two conserved glutamic residues (E213 and E310). Model structure analysis identified amino acids in the environment of the catalytic residues which may be important for the extreme acidophilicity of SSO1949. Replacements of amino acids surrounding the two glutamic acids should clarify how they are involved in the acidophilic adaption. The mutation of threonin 137 to asparagine showed the biggest influence on the pH optimum. The pH optimum was shifted from 1.8 to 3.4. This effect has already been observed in xylanases of *Aspergillus kawachii*, *Streptomyces sp.* and *Bacillus circulans* when the homologous amino acid was mutated.

Because *E. coli* is not the appropriate expression system for SSO1949 we decided to express the enzyme in the crenarchaeot *Sulfolobus*, the organism in which it is naturally expressed. The genus *Sulfolobus* is one of the best studied archaeal organisms and it offers appropriate genetic systems for expression of proteins. Several *Sulfolobus* shuttle vector systems are available and since 2007 also for *Sulfolobus acidocaldarius* which was used as expression strain in this work. SSO1949 was expressed under the control of the inducible *mal* promoter and the constitutive *sac7d* promoter. In addition SSO1949 was integrated into the genome of *S. acidocaldarius* for more stable protein expression.

Efficient selection could be achieved by use of uracil auxotrophic *pyrEF* deficient recipient strains. The intact *pyrEF* genes from *Sulfolobus solfataricus* P2 encoding enzymes from Uridinmonophosphat synthetic pathway were used as selectable markers.

SSO1949 shows 85% sequence identity to SSO1354, another endoglucanase from *Sulfolobus solfataricus*, which has already been successfully purified from *Sulfolobus*. SSO1354 seems to be an extracellular cellulase. In fact, it was shown that it is not freely released in the culture media but associated with the cell surface. In the stationary phase SSO1949 could also be detected in the membrane fraction and in the supernatant of a *Sulfolobus* culture. Therefore SSO1949 was purified from the membrane fraction and the culture supernatant. The purification of SSO1949 was difficult and its identity could not be confirmed by mass spectrometry. Nevertheless the expression of SSO1949 could be detected unambiguously by different activity gels even though the enzyme showed no sharp band in the protein gel probably due to its heterogenous glycosylation.

On the basis of sequence similarities to SSO1949 two other cellulases of the glycoside hydrolase family 12 were selected for mutational studies at the active site. CelA from *Thermotoga maritima* and EglA from *Pyrococcus furiosus* have been characterized in previous studies and showed also extreme heat stability but in contrast to SSO1949 a pH optimum at pH 6. In this work substitutions of amino acids in the catalytic center of the two glucanases against the homologous amino acids in SSO1949 should clarify if their pH optimum can be shifted into the acidic range. From previous studies it was known that for the xylanase XylI from *Streptomyces sp.* a shift of the pH optimum was achieved. While the purification and enzymatic characterization of CelA and its point mutants was successful the purification of EglA was difficult and could not be pursued.

The point mutations at the active site of CelA resulted in a shift of the pH optimum of one pH level into the acidic region, but the cellulolytic activity of all mutants decreased.

In the last part of this study we constructed a hybrid protein of the cellulases SSO1949 from *Sulfolobus solfataricus* and CelA from *Thermotoga maritima*. SSO1949 is extremely acidophilic, but is expressed insolubly. CelA is partially expressed in soluble form, but has a neutral pH optimum. The hybrid protein successfully combined the properties of better solubility and acidophilicity. It is still expressed insolubly in *E. coli*, although it can be purified from inclusion bodies using mild denaturants. After refolding the functional hybrid shows a temperature optimum of approximately 85°C and a pH optimum of approximately pH 3.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
A_x	Absorption bei $\lambda = X$ nm
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CBD	Cellulosebindende Domäne
CBM	Kohlenhydratbindendes Modul
CelA	Cellulase A aus <i>Thermotoga maritima</i>
CMC	Carboxymethylcellulose
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DDM	Dodecylmaltosid
3D	3-dimensional
DMF	N, N,-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	äquimolares Gemisch von dATP, dCTP, dGTP und dTTP
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDANS	(2'-Aminoethyl)aminonaphthalin-1-sulfonsäure
EgIA	Endoglukanase A aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
Fa.	Firma
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
g	bei der Zentrifugation: Schwerebeschleunigung der Erde
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GH	Glykosidhydrolase
His	Histidin
His ₆ -tag	Hexahistidin-tag
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K_{cat}	Wechselzahl
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
NDSB	non-detergent sulfobetaine (engl.)
NDSB256	N-Phenyl-methyl-N,N-dimethylammonium-propan-sulfonat

NBT	p-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid
OD _x	Optische Dichte bei $\lambda = X$ nm
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PNPC	para-Nitrophenyl- β -D-Cellobiosid
Pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
<i>S. a.</i>	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
<i>S. islandicus</i>	<i>Sulfolobus islandicus</i>
<i>S. solfataricus</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiammin
Thr	Threonin
TMAE	Trimethylaminoethyl
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der enzymatischen Aktivität (<i>Unit</i>)
V ₀	Anfangsgeschwindigkeit
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
UV	Ultraviolettstrahlung

Einheiten

A	Ampere
°C	Grad Celsius
d	Tage
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter

m	Meter
M	Molar (mol/l)
min	Minute(n)
s	Sekunde(n)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
U	Unit (Einheit)
V	Volt
W	Watt

Vorsätze

k	kilo 10^3
m	milli 10^{-3}
μ	mikro 10^{-6}
n	nano 10^{-9}

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

8. Literaturverzeichnis

- Aagaard, C., Dalgaard, J.Z. & Garrett, R.A. (1995) Intercellular mobility and homing of an archaeal rDNA intron confers a selective advantage over intron-cells of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**, 12285-12289
- Albers, S.V. & Driessen, A.J.M. (2002) Signal peptides of secreted proteins of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: a genomic survey. *Arch Microbiol*, **177**, 209-216
- Allers, T. & Mevarech, M. (2005). Archaeal genetics - the third way. *Nature Reviews Genetics* **6**, 58-73.
- Amrein, K.E., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flink, N.A. & Burn, P. (1995) Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92** (4),1048-1052
- Aucelli, T., Contursi, P., Girfoglio, M., Rossi, M. & Cannio, R (2006) A spreadable, non-integrative and high copy number shuttle vector for *Sulfolobus solfataricus* based on the genetic element pSSVx from *Sulfolobus islandicus*. *Nucleic Acids Research*, **34** (17), e114, doi:10.1093/nar/gkl615
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W. und Pace, N. R. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **91**, 1609-1613
- Bauer, M.W., Driskill, L.E., Callen, W., Snead, M.A., Mathur, E.J. & Kelly R.M. (1999) An Endoglucanase, EglA, from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* Hydrolyzes β -1.4 Bond in Mixed-Linkage (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D-Glucans and Cellulose. *Journal of Bacteriology* **181**, (1), 284-290
- Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R., Shoham, Y. (1998) Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 548-557
- Beck, K. & Lipps, G. (2007) Properties of an unusual DNA primase from an archaeal plasmid. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5635-5645.
- Beck, K., Vannini, A., Cramer, P. & Lipps, G. (2010) The archaeo-eukaryotic primase of plasmid pRN1 requires a helix bundle domain for faithful primer synthesis. *Nucleic Acid Res.* **14**, doi: 10.1093/nar/gkq447
- Bell, S. D. und Jackson, S. P. (1998). Transcription and translation in archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends in Microbiology* **6** (6), 222-228.
- Berkner, S. & Lipps, G. (2007) Genetic tools für *Sulfolobus* spp.: and first applications. *Arch Microbiol.* **190**, 217-230
- Berkner, S. & Lipps, G. (2007) Characterization of the transcriptional activity of the cryptic plasmid pRN1 from *Sulfolobus islandicus* REN1H1 and regulation of its replication operon. *Journal of Bacteriology*, **189**, 1711-1721.
- Berkner, S. (2007) Entwicklung eines *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektors basierend auf dem Plasmid pRN1. *Dissertation*, Universität Bayreuth, Fachrichtung Biochemie
- Berkner, S., Grogan, D., Albers, S.V. & Lipps, G. (2007) Small multicopy, nonintegrative

- shuttle vectors based on the plasmid pRN1 for *Sulfolobus acidocaldarius* and *Sulfolobus solfataricus*, model organisms of the (cren-)archaea. *Nucleic Acids Research*, **35**.
- Berkner, S., Wlodkowski, A., Albers, S.V., Lipps, G. (2010) Inducible and constitutive promoters for genetic systems in *Sulfolobus acidocaldarius*. *Extremophiles* **14**, 249-259
- Bhat, M. K. (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances* **18**, 355-383
- Bok, J.D., Yernool, D.A. & Eveleigh, D.E. (1998) Purification, Characterization, and Molecular Analysis of Thermostable Cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. *Applied and experimental Microbiology* **64**, (12), 4774-4781
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., Davies, G. J. (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J.* **382**, 769-781
- Bourne, Y., Henrissat, B. (2001) Glykoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 593-600
- Boyer, V., Fort, S., Frandsen T. P., Schülein, M., Cottaz, S, Driguez, H. (2002) Chemoenzymatic Synthesis of a Bifunctionalized Cellohexaoside as a Specific Substrate for the Sensitive Assay of Cellulase by Fluorescence Quenching. *Chem.Eur. J.* **8**, (6), 1389-1394
- Braun, P. & LaBaer, J. (2003) High throughput protein production for functional proteomics. *Trends Biotechnol.* **21**, 383-388
- Breuert, S., Allers, T., Spohn, G. und Soppa, J. (2006). Regulated Polyploidy in Halophilic Archaea. *PLoS ONE* 1(1): e92
- Brock, T. D., Brock, K. M., Belly, R. T. und Weiss, R. L. (1972). *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archives of Microbiology* **84**, 54-68.
- Bronnenmeier, K.; Kern, A.; Liebl, W.; Staudenbauer, W.L. (1995). Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. *Appl Environ Microbiol.* **61** (4), 1399-407
- Brouns, S.J.J.; Ettema, T.J.G.; Stedman, K.M.; Walther, J.; Smidt, H.; Snijders, A.P.L.; Young, M.; Bernander, R.; Wright, P.C.; Siebers, B. & Oost, J. van der (2006) The hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus*: from exploration to exploitation. In: *Geothermal Biology and Geochemistry in Yellowstone National Park / McDermott., T.R., Inskeep, W.P., . - Bozeman : Montana State University Publications, 2006 - ISBN 0963511416*
- Buchner, J. (2002) Introduction: the cellular protein folding machinery. *Cell Mol. Life Sci* **59**, 1587-1588
- Chen, L., Brügger, K., Skovgaard, M., Redder, P., Qunxin, S., Torarinsson, E., Greve, B., Awayez, M., Zibat, A., Klenk, H.-P. und Garrett, R. A. (2005). The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the crenarchaeota. *Journal of Bacteriology* **187** (14), 4992-4999.
- De Bernadez Clark, E. (2001) Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology* **12**, 202-207

- De Lemos Esteves, F., Ruelle, V., Lamotte-Brasseur, J., Quinting, B. & Frère, J.M. (2004) Acidophilic adaption of family 11 endo- β -1,4-xylanaes: Modeling and mutational analysis. *Protein Science* **13**, 1209-1218
- De Rosa, M., Gambacorta, A. und Bullock, J. D. (1975). Extremely thermophilic acidophilic bacteria convergent with *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Genetics and Microbiology* **86** (1), 156-164
- Edgell, D. R. und Doolittle, W. F. (1997). Archaea and the origin(s) of DNA replication proteins. *Cell* **89** (7), 995-998.
- Ehresmann, B., Imbault, P. & Weil, J. H. (1973). Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal. Biochem.* **54**, 454-463
- Expert-Bezancon, N., Rabilloud, T., Vuillard, L., & Goldberg, M. (2003) Physical-chemical features of non-detergent sulfobetaines active as proteinfolding helpers. *Biophys. Chem.* **100**, 469-479.
- Forterre, P. (2002). A hot story from comparative genomics: reverse gyrase is the only hyperthermophile-specific protein. *Trends in Genetics* **18** (5), 236-237.
- Franke, C. (2004) Charakterisierung der Cellulase SSO1949 aus dem thermoacidophilen Archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Diplomarbeit*, Universität Bayreuth, Fachrichtung Biochemie
- Fusek, M., Lin, X.L. & Tang, J. (1990) Enzymatic properties of thermopsin. *J. Biol. Chem.* **265**, 1496-1501
- Fushinobu, S., Ito, K., Konno, M., Wakagi, T. & Matsuzawa, H. (1998) Crystallographic and mutational analysis of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp37 for catalysis at low pH. *Protein Eng.* **11**, 1121-1128
- Galante, A.M., De Conti, A., Monteverdi, R. (1998b) Application of *Trichoderma* enzymes in the food and feed industries. In: *Trichoderma & Gliocladium, Volume 2: Enzymes, biological control and commercial applications*. Gary E. Harman and Christian P. Kubicek (Editor). Taylor & Francis
- Garrity, G. M., Bell, J. und Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. Auflage. New York, Springer Verlag. doi: 10.1007/bergeysoutline
- Girfoglio, M. (2009) *Sulfolobus solfataricus* as source of Glycosyl Hydrolases with biotechnological potential. *Dissertation*. Universität Neapel
- Gray, K. A., Zhao, L., Emtage, M. (2006) Bioethanol. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 141-146
- Grogan, D. W. (1989). Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *Journal of Bacteriology* **171** (12), 6710-6719.
- Grogan, D. W. und Gunsalus, R. P. (1993). *Sulfolobus acidocaldarius* synthesizes UMP via a standard *de novo* pathway: results of a biochemical-genetic study. *Journal of Bacteriology* **175**(5): 1500-1507.

- Grogan, D. W. (1996). Exchange of genetic markers at extremely high temperatures in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology* **178**(11): 3207-3211.
- Gueguen, Y., Voorhorst, W.G.B., von der Oost, J. & deVos, M.W. (1997) Molecular und biochemical characterization of an endo- β -1,3-glucanase of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* **272**, 31258-31264
- Halteh, S. (2009) Aufreinigung und Charakterisierung von EglA. *Semesterarbeit*, Fachhochschule Nordwestschweiz
- Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280** (2), 309-316
- Henrissat, B. and Bairoch, A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316** (2): 695-6
- Henrissat, B. and Davies, G. J. (2000) Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiol* **124** (4): 1515-1519
- Henrissat, B., Davies, G. (1997) Structural and sequence-based classification of Glykoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 637-644
- Huang, Y., Krauss, G., Cottaz, S., Driguez H. & Lipps G. (2005) A highly acid-stable and thermostable endo- β -glucanase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. J.*, **385**, 581-588
- Huber, H. und Stetter, K.-O. (1991). *Sulfolobus metallicus* sp. nov., a novel strictly chemolithotrophic thermophilic archaeal species of metal metabolizers. *Systematic and nApplied Microbiology* **14**, 372-378.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C. & Stetter, K.O. (2002): A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417** (6884), 63-67
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R. & Stetter, K.O. (2006) Nanoarchaeota. *The Prokaryotes*, **3**, 274-280
- Huber, H. and Prangishvili, D. (2006). Sulfolobales. In: Prokaryotes. Hrsg.: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer und E. Stackebrandt. New York, Springer Verlag, 23-51.
- Ishikawa, K., Matsui, I. & Honda, K. (1990) Substrate-dependent shift of optimum pH in
- Ishikawa, K., Matsui, I., Kobayashi, S., Nakatani, H. & Honda, K. (1993) Substrate recognition at the binding site in mammalian pancreatic α -amylases. *Biochemistry* **32**, 6259-6265
- Jan, R. L., Wu, J., Chaw, S. M., Tsai, C. W. und Tsen, S. D. (1999). A novel species of thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus yangmingensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49** (4), 1809-1816.
- Joshi, M.D., Sidhu, G., Pot, I., Brayer, G.D., Withers, S.G. & McIntosh, L.P. (2000) Hydrogen bonding and catalysis: a novel explanation for how a single amino acid substitution can change the pH optimum of a glycosidase. *J. Mol. Biol.* **299**, 255-279

- Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Kato, Y., Yoshizawa, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Masuda, S., Yanagii, M., Nishimura, M., Yamagishi, A., Oshima & T., Kikuchi, H. (2001) Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *DNA Res.* **8** (4), 123-140
- Keeling, P.J., Klenk, H.P., Singh, R.K., Feeley, O., Schleper, C., Zillig, W., Doolittle, W.F. & Sensen, C.W. (1996) Complete nucleotide sequence of the *Sulfolobus islandicus* multicopy plasmid pRN1. *Plasmid*, **35**, 141-144.
- Kufner, K. (2007) Charakterisierung der thermoacidophilen Cellulase SSO1949 von *Sulfolobus solfataricus*. *Diplomarbeit*, Universität Bayreuth, Fachrichtung Biochemie
- Levy, I., Shani, Z. and Shoseyov, O. (2002). Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4- β -glucanase and cellulose-binding domains. *Biomol. Eng.* **19** (1), 17-30.
- Liebl, W., Ruile, P., Bronnemeier, K., Riedel, K., Lottspeich, F. & Greif, I. (1996) Analysis of a *Thermotoga maritima* DNA fragment encoding two similar thermostable cellulases, CelA and CelB, and characterization of the recombinant enzymes. *Microbiology* **142**, 2533-2542
- Limauro, D., Cannio, R., Fiorentino, G., Rossi, M., Bartolucci, S. (2001) Identification and molecular characterization of an endoglucanase gene, CelS, from the extremely thermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* **5**, 213-219
- Linder, M., Teeri, T. T. (1997) The roles and function of cellulose-binding domains. *J. Biotechnol.* **57** (1-3), 15-28
- Lipps, G., Röther, S., Hart, C. und Krauss, G. (2003). A novel type of replicative enzyme harboring ATPase, primase and DNA polymerase activity. *EMBO Journal*. **22**, 2516-2525.
- Lipps, G. (2004). The replication protein of the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1. *Biochemical Society Transactions* **32** (2), 240-243.
- Lipps, G., Weinzierl, A. O., von Scheven, G., Buchen, C. und Cramer, P. (2004). Structure of a bifunctional DNA primase-polymerase. *Nature Structural & Molecular Biology* **11** (2), 157-162.
- Lipps, G. (2006) Plasmids and viruses of the thermoacidophilic crenarchaeote *Sulfolobus*. *Extremophiles* **10**, 17-28.
- Lipps, G. (2009) Molecular biology of the pRN1 plasmid from *Sulfolobus islandicus*. *Biochem. Soc. Trans.*, **37**, 42-45.
- López-García, P. und Forterre, P. (2000). DNA topology and the thermal stress response, a tale from mesophiles and hyperthermophiles. *BioEssays* **22**, 738-746.
- Lubelska, J.M., Jonuscheit, M., Schleper, C., Albers, S.V. & Driessen A.J. (2006) Regulation of expression of the arabinose and Glucose transporter genes in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* **10**, 383-391

- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H. & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* **66** (3), 506-577.
- Maaty, W.S., Wiedenheft, B., Tarlykov, P., Schaff, N., Heinemann, J., Robinson-Cox, J., Valenzuela, J., Dougherty, A., Blum, P., Lawrence, M., Douglas, T., Young, M.J., Bothner, B. (2009) Something old, something new, something borrowed; how the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* responds to oxidative stress. *PLoS One* 4:e6964
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. (2001) Brock Mikrobiologie. Spektrum-Verlag
- Maurelli, L., Giovane, A., Esposito, A., Moracci, M., Flume, I., Rossi, M. & Morana, A. (2008) Evidence that the xylanase activity from *Sulfolobus solfataricus* O₀ is encoded by the endoglucanase precursor gene (sso1354) and characterization of the associated cellulase activity. *Extremophiles* **12** (5), 689-700
- McCarter, J. D., Withers, S. G. (1994) Mechanisms of enzymatic Glykoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 885-892
- Moll, R. und Schäfer, G. (1988). Chemiosmotic H⁺ cycling across the plasma membrane of the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Letters* **232** (2), 359-363.
- Nadal, M., Jaxel, C., Portemer, C., Forterre, P., Mirambeau, G. und Duguet, M. (1988). Reverse gyrase of *Sulfolobus*: purification to homogeneity and characterization. *Biochemistry* **27** (26), 9102-9108.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. & Yura, T. (1998) Chaperone Coexpression Plasmids: Differential and Synergistic Roles of DnaK-DnaJ-GroE and GroEL-GroES in Assisting Folding of an Allergen of Japanese Cedar Pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1694-1699
- Nishihara K., Kanemori M., Yanagi H., Yura T. (2000). Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 884-889
- Norais, C., Hawkins, M., Hartmann, A. L., Eisen, J. A., Myllykallio, H. und Allers, T. (2007). Genetic and physical mapping of DNA replication origins in *Haloferax volcanii*. *PloS Genetics* 3(5): e77. doi:10.1371/journal.pgen.0030077.eor.
- Ohmiya, K., Sakka, K., Karita, S. & Kimura, T. (1997) Structure of cellulases and their applications. *Biotechnology and Genetic Engineering reviews* **14**, 365-414.
- Ostermeier, M. & Benkovic S.J (2000) Evolution of protein function by domain swapping. *Adv. Protein Chem.* **55**, 29-77
- Pearson, A., Pi, Y., Zhao, W., Li, W., Li, Y., Inskeep, W., Perevalova, A., Romanek, C., Li, S., Zhang, C. L. (2008). Factors Controlling the Distribution of Archaeal Tetraethers in Terrestrial Hot Springs. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3523-3532
- Reilly, M. S. und Grogan, D. W. (2001). Characterization of intragenic recombination in a hyperthermophilic archaeon via conjugational DNA exchange. *Journal of Bacteriology* **183**(9): 2943-2946.
- Rudolph, R., Lilie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**, 49-56

- Sanchez, M., Drechsler, M., Stark, H., Lipps, G. (2009) DNA translocation activity of the multifunctional replication protein ORF904 from the archaeal plasmid pRN1. *Nucleic Acid Res.* **37** (20), 6831-6848
- Schägger, H., von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379
- Seonghun, K., Lee, S.B. (2008) Soluble expression of archaeal proteins in *Escherischia coli* by using fusion-partners. *Protein Expr. Purif.*, **62**, (1), 116-119
- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., , Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A. *et al.* (2001) The complete genome of the crenArchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 7835- 7840
- Singh, M. S., Panda, A., K. (2005) Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99** (4), 303-310
- Stetter, K.O. & Zillig, W., in Carl R. Woese, *The Bacteria*, Bd. VIII (1985:94)
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.; Lehrbuch Biochemie, Spektrum-Verlag, 5. Auflage
- 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.
- Sunna, A., Moracci, M., Rossi, M. & Antranikian, G. (1997) Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles* **1**; 2-23
- Swietnicki, W. (2006) Folding aggregated proteins into functionally active forms. *Current Opinion in Biotechnology* **17**, 367-372
- Szolkowy, C. (2006) Overexpression, Refolding and Purification of the thermoacidophilic cellulase SSO1949 from *Sulfolobus solfataricus*. Diplomarbeit, Universität Bayreuth, Fachrichtung Biochemie
- Thia-Thoong, T.-L., Roovers, M., Durbecq, V., Gigot, D., Glansdorf, N. und Charlier, D. (2002). Genes of *de novo* pyrimidine biosynthesis from the hyperthermophilic crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius*: novel organization in a bipolar operon. *Journal of Bacteriology* **184** (16), 4430-4441.
- Thomas, J. G., Ayling, A., Baneyx, F. (1997) Molecular Chaperones, Folding Catalysts, and the Recovery of Active Recombinant Proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl. Biochem. Biotech.* **66**, 197-238
- Tombs, M., Harding, S.E. (1998) An Introduction to Polysaccharide Biotechnology. Taylor & Francis
- Tornabene, T. G. und Langworthy, T. A. (1979). Diphytanyl and dibiphytanyl glycerol ether lipids of methanogenic archaebacteria. *Science* **203**, 51-53.
- Torronen, A. & Rouvinen, J. (1995) Structural comparison of two major endo-1,4-xylanases from *Trichoderma reesei*. *Biochemistry* **34**, 847-856
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., Arakawa, T. (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* **28**, 1-8

- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Srlie, M. & Eijsink, V. G. H. (2010) An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science* **330**, 219- 222
- Vincentelli, R., Canaan, S., Campacci, V., Valencia, C., Maurin, D., Frassinetti, F., Scappucini-Calvo, L., Bourne, Y., Cambillau, C., Bignon, C. (2004) High-Throughput automated refolding screening of inclusion bodies. *Protein Science* **13**, 2782-2792
- Voigt, C.A., Martinez, C., Wang, Z.G., Mayo, S.L. & Arnold, F.H. (2002) Protein building blocks preserved by recombination. *Nature structural biology* **9**, (7)
- Vuillard, L., Rabilloud, T., & Goldberg, M. (1998) Interactions of non-detergent sulfobetaines with early folding intermediates facilitate in vitro protei renaturation. *Eur. J. Biochem.* **256**, 128-135
- Waldmann, L. (2005) Effect of L-arginine and guanidinium chloride (GdmCl) on the unfolding and refolding of hen egg-white lysozyme (HEWL). Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Weiss, R. L. (1974). Subunit cell wall of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology* **118** (1), 275-284.
- Wicher, K. B., Abou-Hachem, M., Halldrdsdttir, S., Thorbjarnadttir, S. H., Eggertson, G., Hreggvidsson, G. O., Nordberg Karlsson, E., Holst, O. (2001) Deletion of a cytotoxic, N-terminal putative signal peptide results in a significant increase in production yields in *Escherichia coli* and improved specific activity of Cel12A from *Rhodothermus marinus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 578-584
- Wiedenheft, B., Mosolf, J., Willits, D., Yeager, M., Dryden, K.A., Young, M., Douglas, T. (2005) From the cover: an archaeal antioxidant: characterization of a Dps-like protein from *Sulfolobus solfataricus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:10551-10556
- Woese, C. & Fox, G. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **74** (11), 5088-5090
- Woese, C., Kandler, O. und Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **87** (12), 4576-4579
- Wood, P.J. (1981) The use of dye-polysaccharide interactions in β -D-glucanase assay. *Carbohydrate research* **94**, C19-C23
- Wood, T. M. & Garcia-Campayo, V. (1990) Enzymology and Cellulose degradation. In Biodegradation, pp. 147-161, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Xiang, X., Dong, X. und Huang, L. (2003). *Sulfolobus tengchongensis* sp. nov., a novel thermoacidophilic archaeon isolated from a hot spring in Tengchong, China. *Extremophiles* **7** (6), 493-498.
- Zillig, W., Stetter, K. O., Wunderl, S., Schulz, W., Priess, H. und Scholz, I. (1980). The *Sulfolobus*-*Caldariella* group: taxonomy on the basis of the structure of DNA dependent RNA polymerases. *Archives of Microbiology* **125**, 259-269.
- Zillig, W., Kletzin, A., Schleper, C., Holz, I., Janekovic, D., Hain, J., Lanzendrfer, M. und

Kristiansson, J. K. (1994). Screening for Sulfolobales, their plasmids, and their viruses in Icelandic solfataras. *Systematic and Applied Microbiology* 16, 606-628.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Diese Arbeit wurde von Mai 2007 bis September 2010 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Georg Lipps angefertigt. Bei ihm möchte ich mich für die das interessante Thema und die wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Krauss für die Möglichkeit, die Arbeiten an seinem Lehrstuhl durchzuführen.

Ebenfalls möchte ich meinen Bayreuther Laborkollegen Linda, Martin, Dong, Irina, Silvia, Kirsten und Claudia für die freundliche Atmosphäre im Labor sowie in der Arbeitsgruppe und ihre Hilfsbereitschaft danken.

Gabriele Kassler danke ich, dass ich mich nach meinem Wechsel an die FHNW mit sämtlichen bürokratischen Sachen immer an sie wenden konnte.

Des Weiteren danke ich meinen Kollegen an der Fachhochschule Nordwestschweiz Claudia, Sybille und Anna, die mich so herzlich aufgenommen haben und mit denen ich viele nette Mittagspausen verbracht habe. Valeria, Jaqueline und Liliane danke ich für die angenehme Atmosphäre im Labor.

Für die Finanzierung des Projekts sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft ebenfalls ein Dank ausgesprochen.

Schließlich gilt mein Dank vor allem meiner Familie und meinem Freund Martin, die mich während der Promotion immer unterstützt haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder an der Universität Bayreuth noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung abzulegen.

Bayreuth, den 15. Dezember 2010

Kristina Kufner

Kristina Kufner