

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
FAKULTÄT FÜR CHEMIE

**Strukturelle und funktionelle  
Charakterisierung einer halo-thermophilen  
Alkoholdehydrogenase aus den Tiefen des  
Roten Meeres**

Stefan Wolfgang Grötzinger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Dissertation.

Vorsitzende

Prof. Dr. rer. nat. Sevil Weinkauf

Prüfer der Dissertation

1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Prof. Dr. rer. nat. Michael Groll

Die Dissertation wurde am 30.05.17 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 18.07.17 angenommen.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den nachstehenden Personen meinen besonderen Dank aussprechen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Ing. Dirk Weuster-Botz, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, der konstruktiven, kompetenten und freundlichen Hilfe auf intellektueller und persönlicher Ebene. Ich habe unsere Dialoge stets als Ermutigung und Motivation empfunden.

Ich danke meinem Mentor Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg Eppinger für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten, seinen kritischen Diskurs, seinen Rat und seine Hilfe.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Michael Groll für die freundliche, hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter, die Möglichkeit in seiner Gruppe zu arbeiten und der intensiven Hilfe in Bezug auf die Proteinkristallisation.

Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Arold bedanke ich mich für die Beihilfe bei der Kristallisation, der Interpretation der erhaltenen Daten und der Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Thorsten Allers danke ich für die Bereitstellung verschiedener *Haloferax volcanii* Stämme und Plasmide sowie der direkten Hilfe bei Fragen rund um dieses Expressionssystem.

Mein Dank gilt darüber hinaus Frau Dr. Annika Frank, Frau Astrid König, Frau Dr. Eva Strillinger, Frau Haissi Cui und den Herren M. Sc. Alois Bräuer, M. Sc. Bastian Bräuning, Dr. Philipp Bär für ihren fachlichen Rat und die schönen Stunden während der Mittagspause oder an so manchem Abend.

Ein besonderer Dank gilt Frau M. Sc. Wiebke Wackerow und meiner Schwester Simone Grötzinger, welche die vorliegende Arbeit korrekturgelesen haben.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Markus Drees für die Hilfe bei verschiedensten bürokratischen Fragen bezüglich der Promotionsordnung und anderen Regularien der Technischen Universität München (TUM).

Danken möchte ich außerdem meinen Mitstudenten/innen, die mich im Rahmen des Studiums begleitet und moralisch unterstützt haben.

Auch danke ich meinen Studenten, Herrn M. Sc. Joachim Koepff, Frau M. Sc. Susanne-Reitberger, Herrn M. Sc. Sascha Siebenhaller sowie Herrn M. Sc. Stefan Bader die mich im Rahmen von studentischen Arbeiten unterstützt haben.

Meine Eltern Anton und Anita Grötzinger sowie meinen Geschwistern gilt ein besonderer Dank, da sie mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet und unterstützt haben.

Zuletzt danke ich meiner Frau Dr. Israa Al-Rowaihi, für die großartige Unterstützung und ihr Verständnis bei der Anfertigung dieser Dissertation.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Theoretischer Hintergrund</b> .....	<b>7</b>
<b>3.1</b>	<b>Enzyme in der Chemie</b> .....	<b>7</b>
3.1.1	Alkoholdehydrogenasen .....	7
3.1.2	Ene-Reduktasen .....	8
3.1.3	Proteasen.....	9
3.1.4	$\beta$ -Galaktosidasen.....	10
<b>3.2</b>	<b>Strategien der Anpassung halo-thermophiler Mikroorganismen</b> .....	<b>12</b>
3.2.1	Thermophile Adaption .....	12
3.2.2	Halophile Adaption, <i>salt in</i> versus <i>compatible solutes</i> .....	13
<b>3.3</b>	<b><i>Red Sea Brine pools</i> als natürliches Habitat von Thermo-Halophilen</b> .....	<b>14</b>
3.3.1	Entstehung und Lage.....	14
3.3.2	Charakteristiken von <i>Discovery</i> , <i>Atlantis II</i> und <i>Kebrit</i> .....	15
<b>3.4</b>	<b>Methoden der Enzymgewinnung</b> .....	<b>18</b>
3.4.1	Historischer Ansatz.....	18
3.4.2	Genom-basierte Methoden.....	19
<b>3.5</b>	<b>Expression thermo-halophiler Gene in <i>E. coli</i></b> .....	<b>21</b>
<b>3.6</b>	<b>Das halophile Expressionssystem <i>Haloferax volcanii</i></b> .....	<b>22</b>
3.6.1	Herkunft und Eigenschaften .....	22
3.6.2	Genetische Modifikationen.....	23
<b>3.7</b>	<b>Methodische Grundlagen</b> .....	<b>25</b>
3.7.1	Sequenz und Ligations unabhängige Klonierung – <i>SLIC</i> .....	25
3.7.2	<i>SUMO-tag</i> .....	26
3.7.3	Proteinkristallographie.....	27
3.7.4	Kleinwinkelröntgenstreuung - SAXS .....	29
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>31</b>

<b>4.1</b>	<b>Generelle Arbeitsschritte und Geräte.....</b>	<b>31</b>
4.1.1	Sterilisierung.....	31
4.1.2	Experimentelle Bedingungen und Chemikalien.....	31
4.1.3	Lagerung.....	31
4.1.4	Universell eingesetzte Geräte.....	32
<b>4.2</b>	<b>Medien, Puffer und Lösungen.....</b>	<b>33</b>
4.2.1	Medien für <i>E. coli</i> .....	34
4.2.2	Medien für <i>Haloferax volcanii</i> .....	35
4.2.3	Lösungen zur Zelltransformation von <i>E. coli</i> .....	38
4.2.4	Lösungen zur Zelltransformation von <i>Haloferax volcanii</i> .....	39
4.2.5	Lösungen für DNA basiertes Arbeiten.....	41
4.2.6	Lösungen für Protein basiertes Arbeiten.....	42
<b>4.3</b>	<b>Mikroorganismen und gentechnische Arbeiten.....</b>	<b>49</b>
4.3.1	Mikroorganismen und Stämme.....	49
4.3.2	Verwendete Vektoren und Primer.....	51
4.3.3	Verwendete Restriktionsenzyme.....	54
4.3.4	Gen Synthese.....	55
4.3.5	Mikrobiologische Methoden.....	55
4.3.6	Klonierung.....	58
4.3.7	Genexpression und Zellaufschluss.....	66
4.3.8	<i>Haloferax volcanii</i> H1895 im Rührkesselreaktor.....	68
<b>4.4</b>	<b>Proteinreinigung und analytische Methoden.....</b>	<b>71</b>
4.4.1	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie – Ni-NTA.....	71
4.4.2	Pufferaustausch – Dialyse.....	72
4.4.3	SUMO Protease.....	72
4.4.4	SDS-PAGE.....	73
4.4.5	Western-Blot.....	73
4.4.6	Bestimmung der Proteinkonzentration und Proteinkonzentrierung.....	75
4.4.7	Trypsin-Verdau zur Proteinidentifizierung.....	75
4.4.8	Protein Massenbestimmung mittels MALDI-TOF.....	76
4.4.9	Protein Massenbestimmung mittels LC-ESI-MS/TOF.....	76

4.4.10	Gefriertrocknung.....	77
<b>4.5</b>	<b>Enzymcharakterisierung.....</b>	<b>77</b>
4.5.1	Ermittlung der Enzymaktivität – ADH.....	77
4.5.2	NAD[P](H) Umsatz bezogene Berechnung der spezifischen Aktivität.....	78
4.5.3	Metallentfernung und Austausch.....	79
4.5.4	Einfluß organischer Lösungsmittel und Salz auf die Enzymaktivität.....	80
4.5.5	Produktbestimmung – GC-MS.....	80
4.5.6	Stabilitätsmessungen.....	80
4.5.7	Aggregationstemperatur.....	81
4.5.8	Ermittlung der Enzymaktivität – $\beta$ -Galaktosidase.....	81
4.5.9	ONPG Umsatz bezogene Berechnung der spezifischen Aktivität.....	82
4.5.10	Ermittlung der Proteaseaktivität.....	82
4.5.11	Größenausschlusschromatographie.....	83
4.5.12	Kleinwinkel-Röntgenstreuung - SAXS.....	83
4.5.13	Circulardichroismus (CD).....	84
4.5.14	Kristallisationsbedingungen und Erzeugung meßbarer Kristalle.....	84
4.5.15	Ermittlung der Röntgenbeugung von Proteinkristallen.....	85
<b>4.6</b>	<b>Programme und ihre Nutzung.....</b>	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>Expression halophiler Gene.....</b>	<b>90</b>
<b>5.1</b>	<b><i>E. coli</i> und <i>Haloferax volcanii</i> als Expressionssysteme.....</b>	<b>90</b>
<b>5.2</b>	<b>Ermittlung der Codon-Nutzung.....</b>	<b>92</b>
<b>5.3</b>	<b>Nomenklatur und Gen-Design.....</b>	<b>93</b>
5.3.1	Nomenklatur.....	93
5.3.2	Generelles Gendesign am Beispiel <i>E. coli</i> .....	94
5.3.3	<i>Haloferax volcanii</i> .....	95
<b>5.4</b>	<b>Expression in <i>E. coli</i>.....</b>	<b>96</b>
5.4.1	Expressionsanalyse der RSBP-Gene im Codon erweiterten <i>E. coli</i> -Stamm.....	96
5.4.2	Alkoholdehydrogenasen aus <i>Discovery</i> und <i>Atlantis II</i> .....	97
5.4.3	Protease aus <i>Atlantis II</i> .....	98
5.4.4	Diskussion.....	102
<b>5.5</b>	<b>Expression in <i>Haloferax volcanii</i>.....</b>	<b>103</b>

5.5.1	Initiale Expressionsanalyse.....	103
5.5.2	Alkoholdehydrogenasen aus <i>Discovery</i> und <i>Atlantis II</i> .....	106
5.5.3	Ene-Reduktasen aus <i>Discovery</i> , <i>Atlantis II</i> und <i>Kebrit</i> .....	110
5.5.4	Proteasen aus <i>Discovery</i> und <i>Atlantis II</i> .....	111
5.5.5	$\beta$ -Galaktosidase von <i>Haloferax lucentense</i> .....	113
5.5.6	Diskussion.....	113
<b>5.6</b>	<b>Proteinreinigung aus <i>Haloferax volcanii</i> am Beispiel der ADH/D1 .....</b>	<b>116</b>
5.6.1	Zellaufschluss .....	116
5.6.2	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie .....	117
5.6.3	Protein Verifizierung .....	119
5.6.4	Diskussion.....	120
<b>6</b>	<b>Charakterisierung der Mn-ADH/D1 aus <i>Discovery</i>.....</b>	<b>122</b>
<b>6.1</b>	<b>Aktivität und Stabilität.....</b>	<b>122</b>
6.1.1	Metallabhängigkeit .....	122
6.1.2	Kofaktor-Abhängigkeit.....	123
6.1.3	Temperaturabhängigkeit .....	124
6.1.4	Einfluß des pH .....	126
6.1.5	Salzabhängigkeit.....	128
6.1.6	Gefriertrocknung.....	129
6.1.7	Substratspektrum und Michaelis-Menten-Kinetik.....	130
6.1.8	Einfluß von Lösungsmitteln.....	131
<b>6.2</b>	<b>Strukturelle Charakterisierung der Mn-ADH/D1 aus <i>Discovery</i>.....</b>	<b>133</b>
6.2.1	Sekundärstruktur und Oligomerisierung.....	133
6.2.2	Kristallisationsbedingungen.....	135
6.2.3	Kristallstruktur .....	136
6.2.4	Homologe.....	137
6.2.5	Metallbindung und YqhD .....	141
6.2.6	NZQ-Kofaktor.....	142
6.2.7	Die Mn-ADH/D1-H277A Mutante.....	144
6.2.8	Konformationsänderung .....	146
6.2.9	Nachweis der Konformationsänderung von ADH/D1 .....	148

<b>6.3 Diskussion .....</b>	<b>149</b>
6.3.1 Metallionen .....	149
6.3.2 Kofaktor und NZQ .....	151
6.3.3 Destabilisierung zur Aktivitätssteigerung der ADH/D1 .....	153
6.3.4 Molekulare Basis der Salz- und Temperaturstabilität von Mn-ADH/D1 .....	153
<b>7 Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>160</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>168</b>
<b>Symbol- und Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>178</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>180</b>



## 1 Einleitung

Enzyme sind essentiell für das Leben wie wir es kennen, da diese biologischen Riesenmoleküle die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen innerhalb des Wirtsorganismus so weit erhöhen, daß Leben möglich ist (1). Enzyme sind hierbei exakt an die Bedingungen innerhalb der Zelle des entsprechenden Wirts angepaßt.

Um zu verstehen wie diese Anpassung genau abläuft, aber auch um die herausragenden Eigenschaften von Enzymen für die chemische- und biotechnologische Industrie nutzbar zu machen ist die Ermittlung neuer Enzyme enorm wichtig. So können zum Beispiel Alkoholdehydrogenasen, welche den Umsatz von Alkoholen und Aldehyden beziehungsweise Ketonen katalysieren, komplexe enantiomerenreine Chemikalien (2-5) erzeugen, wie sie in der Pharmazie oder für Feinchemikalien benötigt werden. Die begrenzte Stabilität der meisten bekannten Enzyme gegenüber Temperatur sowie weiteren Streßfaktoren wie zum Beispiel Salzkonzentration, Druck oder pH kann ihre Nutzung in der Industrie komplett inhibieren (6). Ebenso ist es möglich, daß diese Enzyme unter Reaktionsbedingungen eingesetzt werden, die weit von ihrem Optimum entfernt sind (7), da diese Bedingungen für die gewünschte Reaktion nötig sind.

Verschiedene Methoden wurden genutzt, um diese Limitierung auf genetischer Ebene (8), durch chemische Modifikationen (9), oder Immobilisierung (10) aufzuheben. Es zeigt sich häufig, daß diese Methoden sowohl sehr langwierig und kostenintensiv sind, als auch ein ungewisses Resultat aufzeigen (11). Der Grund hierfür ist, daß kaum generelle Prinzipien bekannt sind, welche die Stabilität eines Enzymes unter bestimmten Bedingungen verbessern, sondern eine Vielzahl an spezifischen Veränderungen in der Aminosäuresequenz (12, 13).

Alternativ bietet die Natur interessante Organismen, welche extreme Bedingungen bevorzugen, die bis zu ihrer Entdeckung als lebensfeindlich erachtet wurden. Über die letzten Jahrzehnte fanden sich Mikroorganismen in fast allen Regionen der Welt, die nahezu alle physikalischen und chemischen Extreme abdecken. Daraus ergibt sich, daß hyperthermophile Mikroorganismen eine ideale Wachstumstemperatur haben, welche teilweise oberhalb von 100°C liegt. Dazu zählt zum Beispiel *Methanopyrus kandleri* mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 105°C und einer maximalen Wachstumstemperatur von 122°C

(14). Weitere Beispiele liefern Organismen, die in stark sauren Lösungen mit einem  $\text{pH} < 3$  ihr Wachstumsoptimum aufweisen, sogenannte Acidophile, wie zum Beispiel *Picrophilus torridus*, welcher einen idealen pH für das Wachstum bei  $\text{pH} 1,1$  zeigt (15). Auch wurden Organismen gefunden, die ihre idealen Wachstumsbedingungen bei einem pH von  $\text{pH} 9$  oder höher haben (Alkaliphile), wie *Alkaliphilus transvaalensis*, das einen idealen pH von  $\text{pH} 10$  aufzeigt (16). Barophile, wie eine *Moritella* Subspezies, weisen ihr optimales Wachstum bei Drücken von 800 bar auf und zeigen kein Wachstum unter 500 bar (17). Halophile, wie *Halobacterium* sp. NRC-1 (18), hingegen leben unter kompletter Salzsättigung. Diese und weitere Organismen, die bevorzugt unter extremen Bedingungen vorkommen, werden als Extremophile bezeichnet.

Mikroorganismen, welche eine Vielzahl an extremen Bedingungen bevorzugen, werden als Polyextremophile bezeichnet. Zum Beispiel zeigt *Acidianus manzaensis* eine Kombination aus einer idealen, thermophilen Wachstumstemperatur von  $85^{\circ}\text{C}$  mit einem optimalen Wachstums-pH von  $\text{pH} 1,2$  auf, der typisch für Acidophile ist (19).

Interessanterweise spiegeln manche dieser extremophilen Lebensräume Bedingungen wieder, die in üblichen chemischen Anwendungen zu finden sind (20). Daher sollten die Enzyme dieser Extremophile, sogenannte Extremozyme, unter diesen extremen Bedingungen aktiv sein (13). Dies macht Extremozyme sehr interessant für den Einsatz in enzymbasierten industriellen Anwendungen, deren Absatzmarkt für 2024 auf derzeit 17,5 Milliarden USD geschätzt werden (21).

Enzyme von halo-thermophilen Mikroorganismen sind von besonderem Interesse für die Biotechnologie (13). Erhöhte Temperaturen können das Reaktionsgleichgewicht ändern, eine Destillation von Produkten ermöglichen und mikrobiellen Kontaminationen vorbeugen. Erhöhte Salztoleranz geht Hand in Hand mit einer geringen Wasseraktivität und halophile Enzyme können somit Mixturen von Wasser mit organischen Lösungsmittel tolerieren (22). Diese Charaktereigenschaften erhöhen das Potential dieser Enzyme für die Biokatalyse. Organische Lösungsmittel werden genutzt, um die Löslichkeit von hydrophoben Substraten zu verbessern, das hydrolytische und kinetische Gleichgewicht zu beeinflussen und um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden, was potentiell die Ausbeute als auch Spezifität des Produktes erhöhen kann (22). Neben dem biotechnologischen Nutzen erbringen Halophile und Thermophile auch einen nicht unerheblichen Nutzen für die Wissenschaft.



Selbstfaltenden halophilen Proteinen wird eine kritische Rolle in der Entstehung des Lebens zugeschrieben (23) und hyperthermophile Mikroorganismen werden als eine der ersten Organismen auf der Erde betrachtet (24). Deshalb liefert die Kombination von halophilen und thermophilen Eigenschaften einen tiefen Einblick in die Evolution des Lebens.

Trotz des hohen potentiellen Nutzens der Extremozyme für wissenschaftliche Entdeckungen und in der Industrie sind diese bisher wenig erforscht und es werden bis dato hauptsächlich Enzyme von Pilzen oder mesophilen Bakterien eingesetzt (6). Die Gründe hierfür sind zum einen die komplizierte Isolierung vieler Extremophile (25) und das Nachahmen ihrer natürlichen Bedingungen im Labor (13) und zum anderen die Produktion der gewünschten Genprodukte in ausreichendem Maßstab. Begründet liegt dies in den unterschiedlichen zytosolischen Bedingungen zwischen Ursprungsorganismus und den üblich genutzten Expressionssystem, wie zum Beispiel *E. coli*.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Obwohl thermo-halophile Proteine ein enormes industrielles und wissenschaftliches Potential aufweisen, wurden sie bisher wenig erforscht (13, 20). Daher soll in dieser Arbeit untersucht werden, welche Adaptionen Enzyme aufzeigen, um unter den dort vorherrschenden harschen Bedingungen Aktivität und strukturelle Stabilität zu erreichen. Dies soll anhand der Expression eines Gens erfolgen, das zuvor aus dem extremophilen Habitat der Solebecken am Grund des Roten Meeres, den sogenannten *Red Sea Brine Pools (RSBP)*, isoliert wurde (20).

Im Vorfeld zu dieser Arbeit wurden während der 3<sup>rd</sup> KAUST Red Sea Expedition-Leg 2 mit dem Forschungsschiff R/V *Aegaeo* im Jahre 2011 biologische Proben aus fünf verschiedenen Solebecken entnommen. Eine Kultivierung extremophiler Mikroorganismen ist nur in Ausnahmefällen möglich, da einerseits die Bedingungen und die komplexe Zusammensetzung des Mediums oft nicht bekannt sind oder im Labor nicht nachgeahmt werden können (13). Darüber hinaus stellt auch die geringen Zelldichte der Ausgangshabitate (25) eine weitere Komplikation dar. Im Falle der RSBP konnten aus diesen Gründen bisher ausschließlich Mikroorganismen aus dem Sediment oder der Schicht in welcher sich Sole und Meerwasser mischen isoliert werden (20). Daher basiert der im Vorfeld zu dieser Arbeit gewählte Ansatz um halo-thermophile Enzyme verfügbar zu machen auf Einzelzellgenomtechniken (26, 27). Hierzu wurden zunächst die entnommenen Zellen vereinzelt, deren jeweilige genomische DNA vervielfältigt, die erhaltenen Einzelzellgenome sequenziert, assembliert und annotiert (Definierung der DNA Abschnitte, welche ein Gen darstellen), bevor zum Abschluß die Vorhersage der potentiellen Genfunktion erfolgte (26, 27).

Genvorhersagen sind fehlerbehaftet und die Ungenauigkeit steigt je weniger verwandt das Genom des Zielorganismus mit beschriebenen Organismen ist (26). Entsprechend werden Annotationsfehler ins Besondere für extremophile Mikroorganismen relevant (28). Daher sollen für die vorliegende Arbeit Ergebnisse des im Vorfeld entwickelten *profile and pattern matching algorithm* (PPMA) (26) genutzt werden. PPMA ist ein neuer Algorithmus, welcher

im Gegensatz zu üblichen Annotationsalgorithmen nicht hauptsächlich auf eine vollständige, sondern eine möglichst verlässliche Genomannotation zielt. Der PPMA wurde im Vorfeld genutzt, um basierend auf den Einzelzellgenomen verschiedener Mikroorganismen aus den drei RSBP *Discovery*, *Atlantis II* und *Kebrit*, Gene von hohem wissenschaftlichen sowie industriellen Wert zu identifizieren.

Zu Beginn dieser Arbeit sollen daher eine Auswahl dieser annotierten RSBP Gene (26) exprimiert, und die halo-thermophile Expressionsprodukte auf eine bestehende Funktion untersucht werden. Da Proteine aus extremophilen Habitaten verschiedene spezifische Adaptionen ihrer Aminosäurekette zeigen, können Probleme bei der Expression dieser Gene in mesophilen Stämmen wie zum Beispiel *E. coli* auftreten. Interessanterweise können verschiedene thermophile Gene in *E. coli* zu funktionalen Proteinen exprimiert werden (29). Im Gegensatz hierzu ist die Expression von Genen aus halophilen Organismen in *E. coli* zwar teilweise möglich, führt jedoch aufgrund der geringen intrazellulären Salzkonzentration in *E. coli* meist zur Bildung von unlöslichen Einschlusskörpern oder inaktivem Protein (30-32). Mittels aufwendiger Methoden zur Erhöhung der Proteinlöslichkeit beziehungsweise durch Proteinrückfaltungen ist es vereinzelt möglich, Proteine in nativer und aktiver Form zu erhalten (33, 34).

Basierend auf der Möglichkeit, daß eine Expression der RSBP Gene in dem sehr gut etablierten Laborstamm *E. coli* erfolgreich sein könnte, soll die Expression ausgewählter RSBP Gene mittels *E. coli* untersucht werden.

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, funktionelle Enzyme zu erhalten soll des Weiteren die Eignung des neue halophile Expressionssystem *Haloferax volcanii* zur Expression von RSBP Genen untersucht werden. Hierbei bietet das moderat halophile Archaeon *Haloferax volcanii* ideale Eigenschaften als Expressionsorganismus, da es einfach, mit hohen Wachstumsraten und in einem breiten Salzbereich von 1,8 – 3,5 M NaCl kultivierbar ist (32, 35), eine vollständig annotierte Genomsequenz vorliegt (36) und auch eine Vielzahl von verschiedenen Selektionsmarkern und Plasmiden für die Genexpression verfügbar sind (32, 37, 38). Der *Haloferax volcanii* Stamm H1424 ist in Kombination mit dem Plasmid pTA963 für die Expression von Genen optimiert, welche einen *His6-tag* zur Proteinreinigung tragen und benötigt keinen Einsatz von Antibiotika als Selektionsmarker (35, 39). Hierfür wurde das

native Gen zur Produktion von Thymidin (*hdrB*) für die Generierung des Stamms H1424 entfernt (32, 40) und eine Kopie auf das Plasmid pTA963 als Selektionsmarker eingeführt (40). Für die Induktion der Genexpression trägt das Plasmid pTA963 einen durch Tryptophan induzierbaren Promotor von der nativen Tryptophanase aus *Haloferax volcanii*, welcher regulierbar die Genexpression initiiert (41).

Während die für eine Anpassung an thermophile oder halophile Habitats relevanten Faktoren bereits teilweise untersucht wurden (12, 42-44), liegen kaum biochemische und strukturelle Informationen über Proteine vor, welche sowohl thermophil als auch halophil sind. Daher bestand ein wesentlicher Punkt dieser Arbeit darin zu erforschen, wie molekulare Kräfte innerhalb von halo-thermophilen Proteinen ausbalanciert werden um gleichzeitig die thermische Denaturierung und ein Aussalzen zu verhindern. Hierzu soll, nach erfolgreicher Expression, das Protein mit dem höchsten Ranking innerhalb des PPMA, die eisenabhängigen Alkohol-Dehydrogenase aus dem RSBP *Discovery* (AF\_D) (26) sowohl biochemisch als auch strukturell untersucht und charakterisiert werden. Des Weiteren sollen Vergleiche zu Alkoholdehydrogenasen mit ähnlicher Struktur durchgeführt werden, um spezifische Adaptionsmechanismen der AF\_D zu identifizieren.

## 3 Theoretischer Hintergrund

### 3.1 Enzyme in der Chemie

Die biotechnologische Großproduktion von Enzymen ermöglicht deren Einsatz in Reaktionen, welche den zwölf Regeln der Grünen Chemie (45) entsprechen und somit deutlich weniger schädlich für die Umwelt sind. Diese zwölf Regeln sind i) die Vermeidung von Abfallprodukten, ii) eine ökonomische Nutzung aller in der Reaktion vorkommenden Atome, iii) die Nutzung von nicht toxischen Substanzen während der Synthese, iv) die Erzeugung von ungiftigen Endprodukten, v) die Vermeidung von Lösungsmitteln, vi) eine Verringerung des Energieeinsatzes, vii) die Nutzung nachwachsender Rohstoffe, viii) die Verringerung der Synthesestufen durch zum Beispiel einer Umgehung von Schutzgruppen, ix) die Nutzung von Katalysatoren, x) die Abbaubarkeit der erzeugten Produkte in der Umwelt, xi) die Echtzeit Analyse der Reaktion, so daß keine toxischen Substanzen während der Reaktion entstehen und xii) die Nutzung von Substanzen in Mengen und Arten, so daß keine Unfälle wie Explosionen, Feuer oder das Austreten giftiger Produkte entstehen können (45).

Des Weiteren ermöglicht die Nutzung von Enzymen Chemo- und Regioselektivitäten in den Produkten, welche mit normalen chemischen Reaktionen entweder überhaupt nicht oder nur unter extremen Aufwand möglich sind (46).

In den folgenden Kapiteln werden die sechs Klassen an Enzymen, welche aufgrund ihres industriellen und/oder wissenschaftlichen Potentials die Grundlage dieser Arbeit bilden dargestellt.

#### 3.1.1 Alkoholdehydrogenasen

Alkoholdehydrogenasen (ADHs) [E.C. 1.1.1.1 und 1.1.1.2] sind eine allgegenwärtige Klasse von kofaktorabhängigen Oxidoreduktasen (47), welche die gegenseitige Umwandlung von Alkoholen und Aldehyden zu Ketonen und *vice-versa* katalysieren, was eine der meistgenutzten Redoxreaktionen innerhalb der organischen Chemie darstellt (48). Folgende Abbildung zeigt das Reaktionsschema.

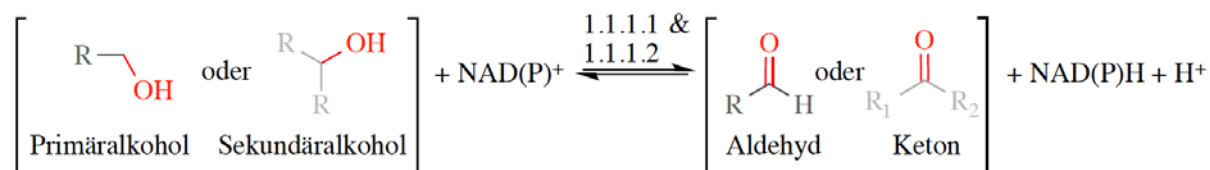


Abbildung 1: Genereller Reaktionsmechanismus für primäre (dunkelgrau) und sekundäre (hellgrau) Alkoholdehydrogenasen

Besonderes Interesse gilt hierbei der Produktion von chiralen Sekundäralkoholen mittels asymmetrischer Ketonreduktion (49). ADHs finden Anwendung in der nachhaltigen Produktion von Basiskomponenten für die pharmazeutische und landwirtschaftliche Industrie, für die Nahrungs- und Parfümindustrie, sowie in der Biosensor basierten Diagnostik (30, 50).

### 3.1.2 Ene-Reduktasen

Ene-Reduktasen katalysieren die asymmetrische Hydrierung von Alkenen zu Alkanen und können hierbei bis zu zwei Stereozentren aufbauen, was eine vielgenutzte Reaktion in der Chemie abbildet (51). Die übergangsmetallbasierte Katalyse hat enorme Fortschritte in der heterogenen *cis*-Hydrierung erzielt. Jedoch sind nach wie vor homogen katalysierte *trans*-Hydrierungen bisweilen nicht ausreichend optimiert (52). Folgende Abbildung zeigt ein Reaktionsschema der Hydrierung von Alkenen.

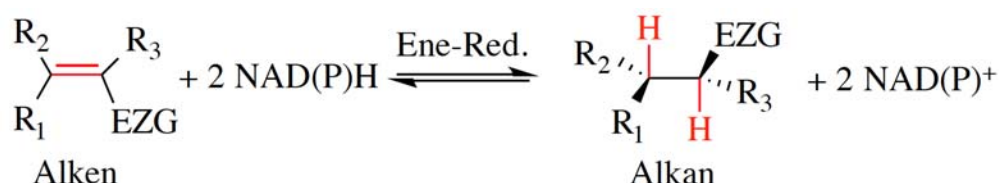


Abbildung 2: Reaktionsschema der Hydrierung von Alkenen durch eine Ene-Reduktase. EZG = Elektronen ziehende Gruppe

Zwei Enzyme welche die Klasse der Ene-Reduktasen darstellen sind die Dihydrodipicolinat Reduktase [E.C. 1.3.1.26 und 1.17.1.8] und die Prephenat Dehydrogenase [E.C. 1.3.1.12].

Die Dihydrodipicolinat Reduktase (DHDPR) hydriert hierbei eine Doppelbindung im Aromaten des komplexen Substrats (S)-2,3-dihydrodipicolinat zu (S)-2,3,4,5-tetrahydropyridin-2,6-dicarboxylat als Teil des Diaminopimelat-Reaktionsmechanismus, welcher unter anderem in mehreren Bakterien zur Lysin-Synthese (53) genutzt wird.

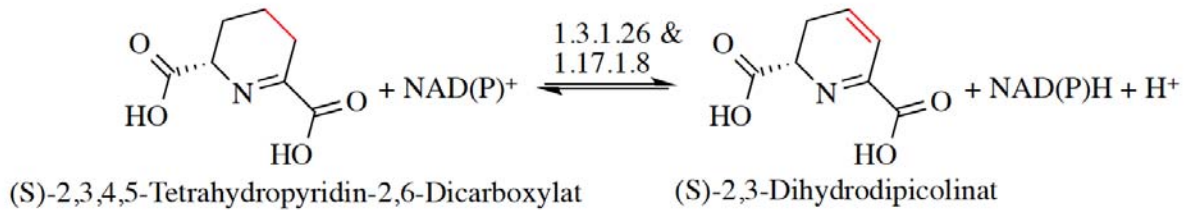


Abbildung 3: Reaktionsschema der Dihydrodipicolinat Reduktase (DHDPR) mit ihrem natürlichen Substrat

Neben dem komplexen nativen Substrat sollte die Bindetasche der DHDPR auch für weniger komplexe, in der Chemie öfter vorkommenden, kleineren Substraten mit ähnlicher Form, wie zum Beispiel dem Citraconsäureanhydrid, zugänglich sein. Somit stellt die DHDPR eine potentiell wichtige Rolle für die stereoselektive Synthese verschiedener aromatischer Chemikalien dar.

Die Prephenat-Dehydrogenase stellt eine abstraktere Variante einer potentiellen Ene-Reduktase dar. Die native Reaktion der Prephenat-Dehydrogenase ist die oxidative Decarboxylierung von Prephenat zu 4-Hydroxyphenylpyruvat, welche im weiteren Verlauf durch eine aromatische Aminotransferase zu Tyrosin umgesetzt wird (54). Folgende Abbildung zeigt das Reaktionsschema der Prephenat Dehydrogenase:

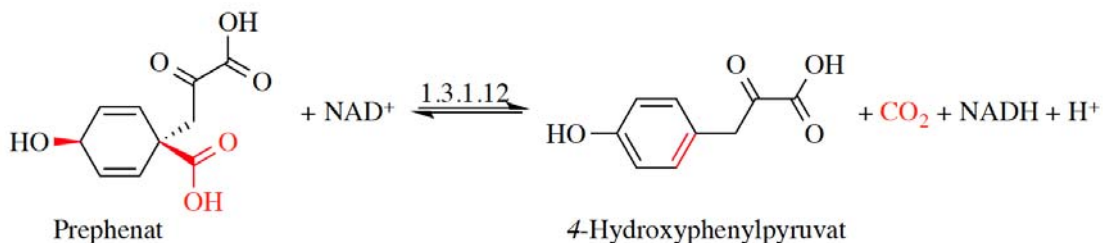


Abbildung 4: Reaktionsschema der Prephenat Dehydrogenase

Für dieses Enzym ist ein gutes Verständnis der einzelnen Aminosäurereste im aktiven Zentrum für die Reaktion vorhanden (54). Aus diesem Grund ist auch hier die Umsetzung eines nicht nativen, aromatischen Substrats von industriellem Interesse.

### 3.1.3 Proteasen

Proteasen katalysieren die Hydrolyse der Peptidbindung von Proteinen in wässrigem Medium. Ein Beispiel für häufig genutzte Proteasen ist die Untergruppe der Serinproteasen [E.C.

3.4.21.1], bei welchen innerhalb der katalytischen Triade die Aminosäure Serin vertreten ist (55). Folgende Abbildung zeigt den Reaktionsmechanismus von Serin-Proteasen:

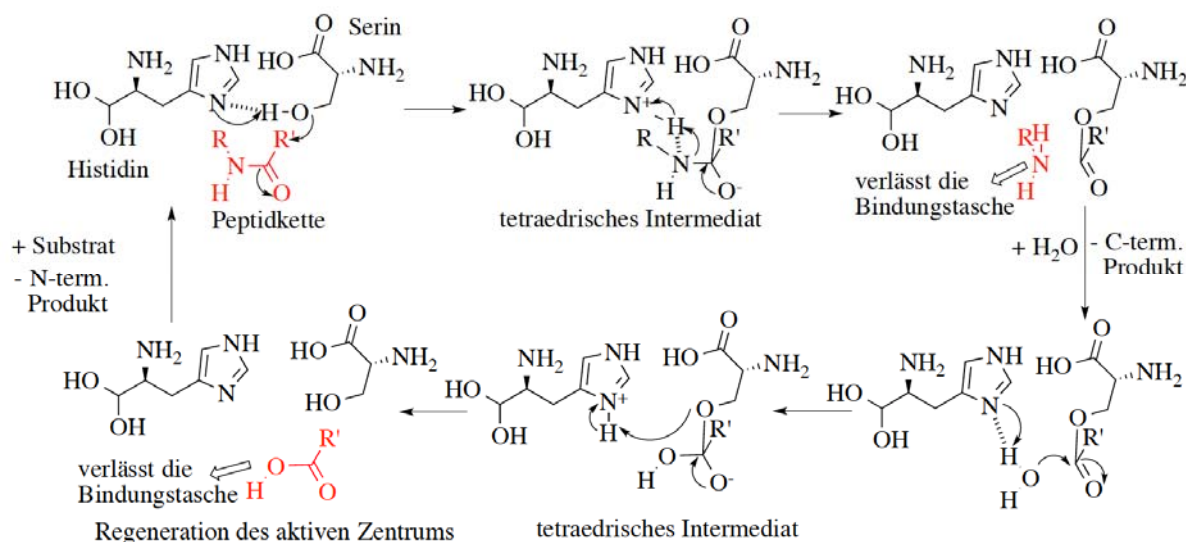


Abbildung 5: Genereller Reaktionsmechanismus für Serin-Proteasen

Im Gegensatz zu den anderen beschriebenen Enzymen werden Proteasen direkt für die Anwendung in Waschmitteln, in Nahrungsmitteln, in der Pharmaziebranche, in der Lederbearbeitung und -verarbeitung, in der medizinischen Diagnose, der Müllaufbereitung und Silbergewinnung verwendet und bilden somit etwa 40% aller verkauften Enzyme (55).

Wie für nahezu alle Enzyme wird durch die Veränderung der Reaktionsbedingungen das katalytische Gleichgewicht in die entgegengesetzte Richtung verschoben. Mit der Folge, daß Proteasen in wasserfreiem Medium, wie zum Beispiel in organischen Lösungsmitteln, in der Lage sind, Peptide zu synthetisieren (56). Der Einsatz von Proteasen zur Peptidsynthese ist mit einer erheblichen Vereinfachung und daraus folgenden Kostenersparnis zu derzeitigen Methoden verbunden, was zu einem weiteren Aspekt ihres hohen industriellen Nutzen und Wertes führt.

### 3.1.4 $\beta$ -Galaktosidasen

Die Klasse der  $\beta$ -Galaktosidasen [E.C. 3.2.1.23] stellt Enzyme dar, welche endständige Zuckerreste von galaktosidischen Biomolekülen abbauen. Dies sind Biomoleküle, welche Glykoside, bestehend aus Galaktose, enthalten, wie folgende Abbildung zeigt.



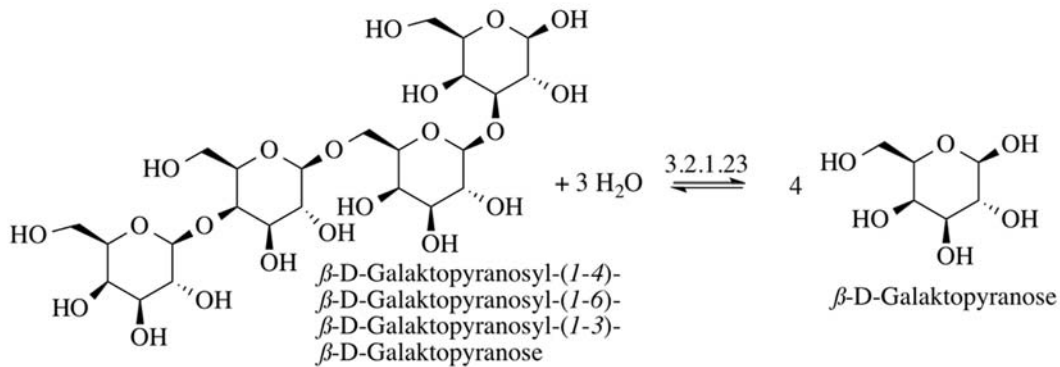


Abbildung 6: Reaktionsschema der  $\beta$ -Galaktosidase

Die Klasse der  $\beta$ -Galaktosidasen wird innerhalb der Mikrobiologie und Biochemie als Modellenzym zur Untersuchung der Genexpression sowie Genregulation genutzt, aufgrund der Katalyse von zwei verschiedenen Farbreaktionen (57). Die erste dieser Farbreaktionen ist der Umsatz von 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal) zu einem blauen Indigofarbstoff (5,5-Dibrom-4,4-dichlor-indigo), wie folgende Abbildung zeigt.

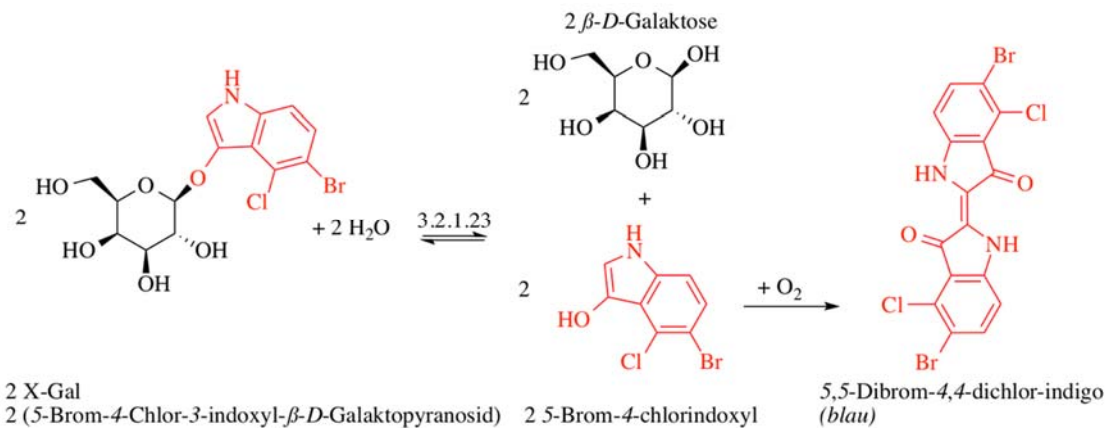


Abbildung 7: Umsatz von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) mittels  $\beta$ -Galaktosidase zu 5-Brom-4-chlorindoxyl welches nach Oxidation an der Luft und Dimerisierung den blauen Farbstoff 5,5-Dibrom-4,4-dichlor-indigo ergibt

Eine weitere wichtige Farbreaktion, katalysiert bei der Klasse der  $\beta$ -Galaktosidasen ist der Umsatz von *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG) zu dem gelben Farbstoff *o*-Nitrophenol, dargestellt in der folgenden Abbildung.

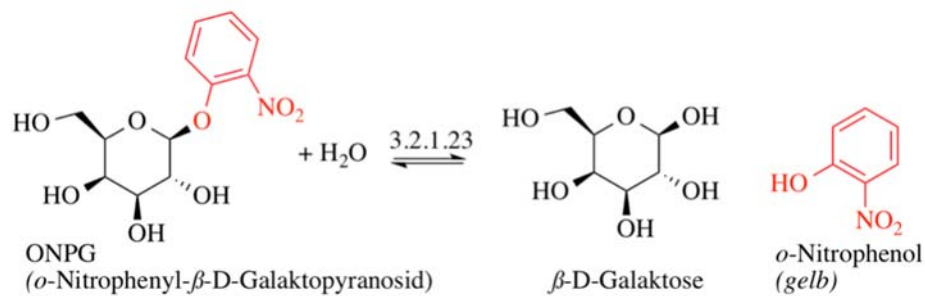


Abbildung 8: Umsatz von ONPG (*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) mittel  $\beta$ -Galaktosidase zum gelben Farbstoff *o*-Nitrophenol

Für die vorliegende Arbeit wurde eine halophile  $\beta$ -Galaktosidase untersucht, welche im Gegensatz zu den anderen Genen nicht aus den RSBP stammt, sondern aus dem moderat halophilen Organismus *Haloferox lucentense* (58) (bgaH).

### 3.2 Strategien der Anpassung halo-thermophiler Mikroorganismen

Extremozyme aus halo-thermophilen Mikroorganismen bieten die Möglichkeit eines Einsatzes in Reaktionen, die sowohl unter hohen Temperaturen als auch unter erhöhten Konzentrationen von organischen Lösungsmitteln ablaufen.

Die Anpassung von halo-thermophilen Mikroorganismen an ihre Umwelt ist kaum untersucht. Anhand von Anpassungsstrategien halophiler sowie thermophiler Organismen können jedoch Schlüsse auf die Anpassung von halo-thermophilen Organismen getroffen werden.

#### 3.2.1 Thermophile Adaption

Da keine molekulare Möglichkeit besteht erhöhten Temperaturen entgegenzuwirken, hat dieser Selektionsdruck einen direkten Einfluß auf das vollständige Proteom des Organismus, da sich Proteine ohne entsprechende Anpassung irreversibel entfalten, was zur Aggregation führt (59). Die häufigsten Adaptionen in thermophilen Proteinen dienen der Erhöhung der strukturellen Festigkeit durch eine Erhöhung der Anzahl an intra- sowie intermolekularen Interaktionen (12, 42). Dies erfolgt sowohl durch eine Erhöhung der Anzahl an Disulfidbrücken, Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen als auch durch eine höhere Anzahl an hydrophoben Aminosäuren in der Kernregion (12, 42). Zur Erhöhung der Kompaktheit werden des Weiteren zur exponierte hydrophober Reste an der Proteinoberfläche reduziert (12, 42). Ein weiterer Effekt der zur erhöhten Stabilität des

Proteins führt, ist die Verankerung der Termini (N und C) über Wasserstoffbrückenbindungen. Darüber hinaus, in seltenen Fällen, die Nutzung von unüblichen Metallen in der Struktur, welche eine bessere Bindung zu den Aminosäurekettenresten im aktiven Zentrum eingehen können und somit strukturstabilisierend wirken (12). Zudem kann eine Erhöhung des Oligomerisierungszustands, durch einen daraus folgenden Anstieg der Interaktionen und Verringerung der exponierten Oberflächen, eine Verbesserung der thermischen Stabilität zur Folge haben (12).

### 3.2.2 Halophile Adaption, *salt in* versus *compatible solutes*

Im Gegensatz zu thermischem Streß entwickelten Organismen, welche in halophilen Lebensräumen angesiedelt sind, zwei verschiedene Methoden diesem evolutionären Selektionsdruck entgegenzuwirken.

Die meisten halophilen Bakterien, sowie methanogene Archaeen oder die einzelligen Algen des Genus *Dunaliella*, sind in der Lage das Cytosol der Zelle auf niedriger, mesophiler, Salzkonzentration zu halten und damit der osmotischen Lyse vorzubeugen (60). Dies erfolgt durch die Synthese von Aminosäurederivaten wie Glycin, Betain oder Ectoin, den sogenannten *compatible solutes*, in Kombination mit verschiedenen Ionenpumpen (60). Der Vorteil dieser Methode ist nicht nur eine Adaption an ein breites Spektrum von verschiedenen Salzkonzentration, sondern auch das Umgehen einer tiefgreifenden Änderung des Proteoms (60, 61).

Im Gegensatz zur *compatible solutes* Strategie ist es halophilen Mikroorganismen ebenfalls möglich, den osmotischen Druck durch die hohe äußere NaCl-Konzentration durch eine Anreicherung von KCl im Cytosol, in derselben molaren Menge wie dem äußeren NaCl auszubalancieren (60). Diese Strategie bedingt die vollständige Adaption des Proteoms, was den Vorteil hat, daß keine zusätzlichen Substanzen wie *compatible solutes* gebildet werden müssen, und weniger Energie für Ionenpumpen benötigt wird. Jedoch können diese Organismen generell nicht unter niedrigen Salzbedingungen überleben und ihre Proteine entfalten bei niedrigen Salzkonzentrationen (60). Die *salt in*-Strategie ist weiter verbreitet in der Domäne der Archaeen und vor allem in der Familie der *Halobacteriaceae* zu finden, zu

denen Organismen wie *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloalcalophilum* und *Natronococcus* gehören.

Die Adaptionsmechanismen der Proteine aus halophilen Organismen, welche die *salt in* Strategie benutzen, zeigen als Hauptmerkmal einen sauren, isoelektrischen Punkt, welcher durch eine negative Oberfläche halophiler Proteine bedingt ist (43, 44, 62). Dies ist in der geringen Menge an ungebundenem, freiem Wasser in Salzlösungen begründet. Eine negative Proteinoberfläche ist in der Lage positiv geladene und hydratisierte Ionen zu koordinieren und dadurch eine hoch geordnete Wasserhülle mit mehreren Lagen aufzubauen (43, 44). Des Weiteren kann die negative Proteinoberfläche durch elektrostatische Abstoßung der Proteinaggregation vorbeugen (43, 44). Zum Erhalt der geordneten Wasserhülle sowie der negativen Oberflächenladung ist des Weiteren eine Reduktion von Lysin-Resten im generellen ersichtlich, sowie eine Reduktion an hydrophoben Oberflächen (43, 44, 62).

In manchen Fällen können hierzu zusätzliche negativ geladene Peptidketten in das Protein eingebaut sein (62). Des weiteren werden durch die erhöhte Ionenstärke in Salzlösungen hydrophobe Interaktionen gestärkt und Salzbrücken geschwächt. Eine weitere Anpassung halophiler Enzyme ist daher die Reduktion von hydrophoben Interaktionen (62), sowie die Erhöhung der Anzahl an inter- sowie intramolekularer Salzbrücken (43).

### **3.3 Red Sea Brine pools als natürliches Habitat von Thermo-Halophilen**

Weltweit gibt es mehrere Habitate, welche entweder eine hohe Temperatur oder einen hohen Salzgehalt aufzeigen. Die Kombination aus beiden Extremem ist deutlich weniger verbreitet. Die 25 verschiedenen Solebecken am Grunde des Roten Meeres (63), die sogenannten *Red Sea Brine pools* (RSBP) sind ein interessantes Habitat zur Untersuchung halo-thermophiler Organismen.

#### **3.3.1 Entstehung und Lage**

Die RSBP befinden sich am Grund der nördlichen Teil des Roten Meeres entlang der tektonischen Plattengrenzen der Arabischen- und Afrikanischen-Platte, welche sich voneinander weg bewegen (20, 64-66). Während der letzten Eiszeit im Messinium vor etwa 7,2 bis 5,3 Millionen Jahren hat sich der Meeresspiegel soweit abgesenkt, daß das Rote Meer von seiner Verbindung über den Golf von Aden zum Indischen Ozean getrennt wurde, was

ein Austrocknen mit daraus resultierender Ablagerung von Salzschieben zur Folge hatte (67). Anhaltende plattentektonische Bewegungen führten zur Freisetzung dieser Salzablagerungen (20). Meerwasser löste die freiliegenden Salzablagerungen und die entstehende Salzsole sammelte sich, aufgrund ihrer erhöhten Dichte, im nächstliegenden Tal an indem sie wegen ihrer hohen Dichte stabil blieb (68).

Ein Teil der RSBP besitzt neben des erhöhten Salzgehaltes eine erhöhte Temperatur, welche auf vulkanische Aktivitäten zurückzuführen ist (69, 70). Da die Freisetzung von heißer Salzsole in Schüben erfolgt und die hohe Dichte der Salzsole ein Durchmischen erschwert, bilden sich stufenartigen Schichten innerhalb dieser RSBPs aus (20). Die Entdeckung der RSBP erfolgte während der schwedischen RV *Albatross* Expedition (1947-1948) (71). Bedingt durch die harschen Bedingungen sowie der sehr geringen Anzahl an Mikroorganismen, wurde nach den erste Probenentnahmen von einem sterilen Lebensraum ausgegangen (72).

### **3.3.2 Charakteristiken von *Discovery*, *Atlantis II* und *Kebrüt***

Die Gene, welche in dieser Arbeit behandelt werden, stammen von den drei Solebecken *Discovery*, *Atlantis II* und *Kebrüt*. Folgende Abbildung zeigt deren Lage und weiterer Solebecken im Roten Meer:

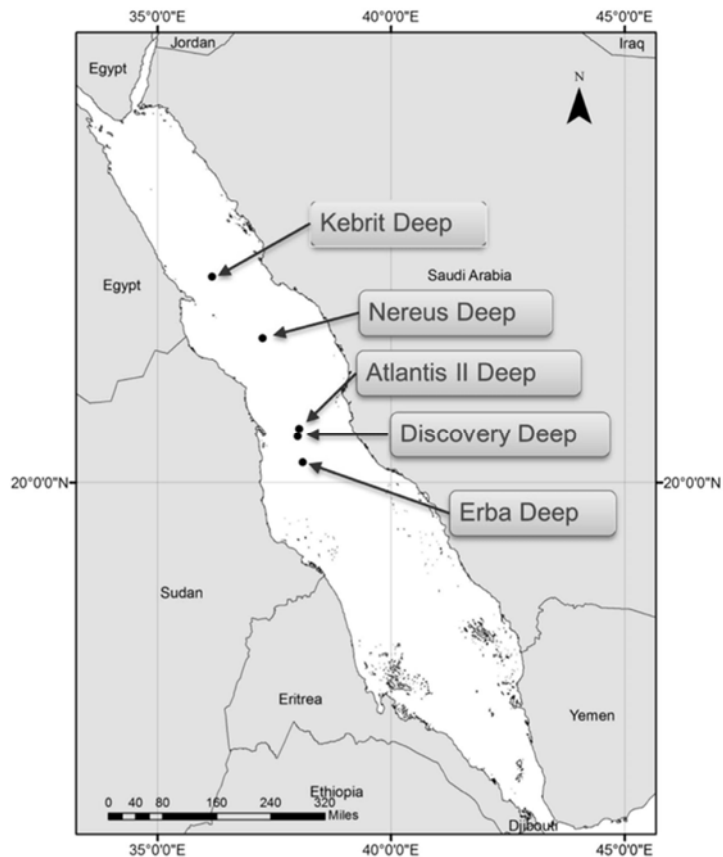


Abbildung 9: Lage verschiedener Solebecken des Roten Meeres in der Nord-Süd Achse (Abbildung 1 aus (73)). Die untersuchten RSBP Gene dieser Arbeit stammen aus *Kebrit*, *Atlantis II*, und *Discovery*

Von den 25 RSBP ist *Atlantis II* mit einer Fläche von 60 km<sup>2</sup> und einer Tiefe von 200 m das Größte (20, 74). Aufgrund vulkanischer Aktivität (63) in Kombination mit verschiedenen dichten Salzsichten ergibt sich ein stufenweiser Temperaturgradient von ungefähr 67°C in der untersten, ersten Schicht mit dem höchsten Salzgehalt (~ 5,3 M an Chloridionen) und 52°C in der obersten, dritten Schicht mit dem geringsten Salzgehalt (~ 2,0 M an Chloridionen). Oberhalb davon verläuft ein Gradient über ungefähr 100 m bis der Salzgehalt dem von Meerwasser (~ 0,6 M an Chloridionen) entspricht (75, 76).

Der RSBP *Discovery*, welcher ungefähr 3 km südwestlich von *Atlantis II* liegt (75) und eine Fläche von etwa 12 km<sup>2</sup> aufweist (77), zeigt ein Solebecken mit einheitliche Salzgehalt von ~ 5,0 M an Chloridionen an und weist eine einheitliche Temperatur von 45°C auf (75).

Folgende Abbildung zeigt die geographische Lage von *Atlantis II* und *Discovery*.

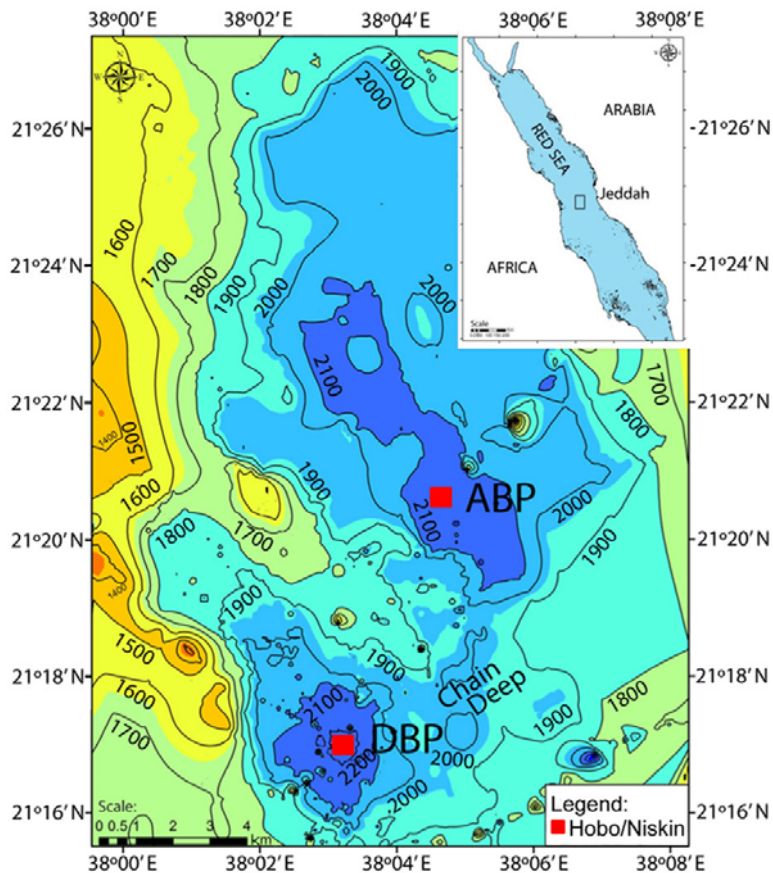


Abbildung 10: Geographische Lage der RSBP *Atlantis II* (ABP) und *Discovery* (DBP) (Abbildung 1 aus (63))

*Kebrit* mit einer Größe von ungefähr 2,5 km<sup>2</sup> (77) liegt weiter nördlich und weist, wie *Discovery*, ein Solebecken mit konstantem Salzgehalt auf, welches ähnlich zu dem von *Atlantis II* und *Discovery* eine Konzentration von ~ 5 M an Chloridionen sowie eine stabile, jedoch geringere Temperatur von 23,4°C (75) hat.

Für alle drei Solebecken deuten Probenahmen darauf hin, daß die Kohlenwasserstoffe hauptsächlich aus der thermischen Degeneration von organischer Materie stammen (78).

Wie bereits erwähnt unterscheiden sich die drei Solebecken *Kebrit*, *Atlantis II* und *Discovery* nicht nur durch ihre verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften voneinander sondern auch durch ihre Lage bei verschiedenen Tiefen am Meeresgrund. Folgende Abbildung zeigt die gemessenen Parameter von Salzgehalt und Temperatur während der Probenentnahme dieser RSBP bei der entsprechenden Tiefe auf. Die Daten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich Stingl (*University of Florida*) zur Verfügung gestellt.

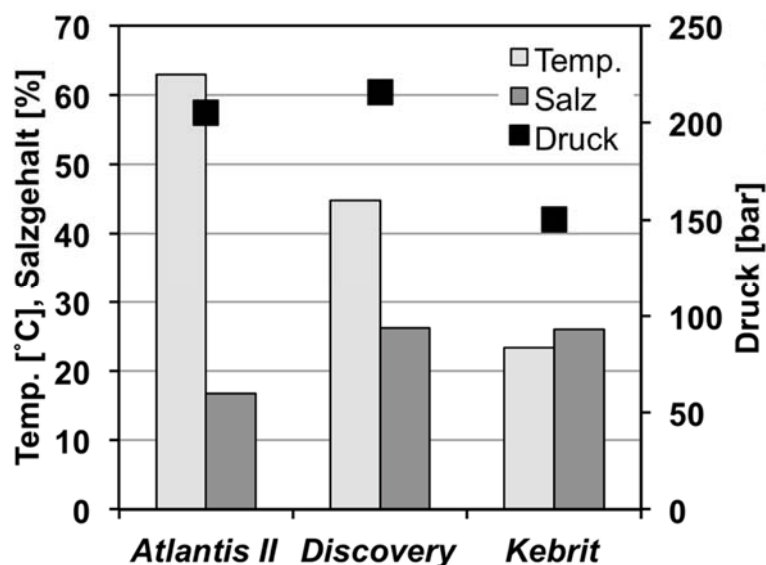


Abbildung 11: Temperatur, Salzgehalt und vorherrschender Druck während der Probenentnahme für die drei RSBP *Atlantis II*, *Discovery* und *Kebrit*

Der Salzgehalt der Brine Pools ist in % w/v angegeben. Berechnet man hiervon den molaren Gehalt von NaCl, welches mit Abstand den größten Teil der verschiedenen Salze darstellt (20), ergeben sich für die untersuchten Tiefen molare NaCl Konzentration von: 3,0 M für *Atlantis II* und 4,7 M für *Discovery* und *Kebrit*.

### 3.4 Methoden der Enzymgewinnung

#### 3.4.1 Historischer Ansatz

Der historische Ansatz der Enzymgewinnung erfolgt in drei Schritten, i) der Anzucht von Einzelkolonien nach der Probenentnahme aus dem jeweiligen Lebensraum, ii) der experimentellen Analyse der Proteinfunktion sowie iii) der Isolation des Zielproteins.

Es zeigte sich jedoch früh, daß jeder dieser drei Schritte mit verschiedenen Problemen verbunden ist. So ist bereits seit 1911 bekannt, daß im Vergleich zu mikroskopisch gezählten Mikroorganismen aus zum Beispiel einer Wasserprobe, nur ein verschwindend geringer Anteil, ungefähr 0,001 – 0,1% (79) unter Laborbedingungen zum Wachstum zu bringen ist (80). Der Hauptgrund hierfür liegt in der oft sehr begrenzten Verträglichkeit von Mikroorganismen zu bestimmten physikalischen oder chemischen Parametern, welche schwer im Labor nachzumachen sind sowie der oft unbekannteren Symbiose mit anderen Organismen (81, 82).



Im zweiten Schritt, nach der erfolgreichen Isolierung von den oft sehr langsam wachsenden Mikroorganismen, erfolgt die biochemische Charakterisierung der gewünschten Zielreaktion. Dies kann relativ einfach sein, wie im Fall von sekretierten Proteasen, beispielsweise durch das Auftauchen von klaren Kreisen um die Kolonien auf mit Casein vermengten Agarplatten (56), oder Proteine, welche Farbreaktionen im Zellysate erzeugen können, wie zum Beispiel  $\beta$ -Galaktosidasen (83).

Die Charakterisierung kann jedoch auch hochkomplex sein, zum Beispiel für Enzyme, welche komplexere, störungsanfälliger Nachweismethoden haben, oder unter den untersuchten Bedingungen nicht exprimieren.

Ähnliches trifft für den dritten Schritt, der Isolierung und Aufreinigung des Zielproteins zu. Das Zielprotein verfügt über keine Reinigungssequenzen was aufwendige mehrstufige Reinigungsschritte erforderlich macht, bei denen nach jedem Schritt erst die Proteinfraction, welche das Zielprotein enthält, über Aktivitätstest bestimmt werden muß (83).

### **3.4.2 Genom-basierte Methoden**

Innerhalb der letzten Jahre haben kultivierungsunabhängige Methoden an Einfluß gewonnen. Die bekannteste Methode ist die Nutzung des Metagenoms, welche in die zwei Kategorien funktionsbasiert und sequenzbasiert eingeordnet werden kann.

Der funktionsbasierte Ansatz geht von der Klonierung zufälliger DNA-Sequenzen aus einem bestimmten Lebensraum in Expressionsstämme wie *E. coli* aus. Anschließend erfolgt eine großflächige Durchmusterung der Genprodukte dieser Bibliotheken, meist im Ganzzellverfahren, mittels verschiedener Methoden auf Funktion und abschließender Sequenzierung der aktiven Gene (84). Im Gegensatz zu traditionellen Ansätzen ist bei dieser Methode keine Anzucht des Ausgangsorganismus nötig, jedoch liegen die Hauptprobleme dieser Methode in der Identifikation eines geeigneten Expressionsorganismus sowie geeigneter Durchmusterungs-Methoden (84). Aus Gründen der einfachen Durchmusterung bilden daher Enzyme wie Lipasen und Esterasen den Hauptteil an gefundenen Enzymen mittels dieser Methode (85).

Im Gegensatz hierzu wird beim sequenzbasierten Ansatz metagenomische DNA aus dem jeweiligen Lebensraum fragmentiert, sequenziert und mittels verschiedener Algorithmen assembliert (84). Diese Methode hat durch die rapide Entwicklung des *next generation*

*sequencing* deutlich an Popularität gewonnen, jedoch zeigt die Komplexität der Sequenzdaten sowohl Probleme in deren Analyse als auch bei der weiteren bioinformatischen Verarbeitung (84, 86). Als Resultat ist es zum Beispiel mittels Metagenomanalyse kaum möglich, vollständige Genome zu erhalten. Dies ist in der hohen Heterogenität sequenzierter DNA sowie geringen Konzentration an manchen Genomen begründet (87). Des Weiteren ist es nicht möglich, DNA-Kontaminationen aus dem Lebensraum, aus welchem das Metagenom entnommen wurde, zu vermeiden (88, 89).

Der Durchbruch der Einzelzellsequenzierung umgeht, durch die physikalische Separierung der Zellen vor der Sequenzierung, einen Großteil der Probleme des sequenzbasierten Ansatzes der Metagenomanalyse (90-92). So wird nicht nur die Anzahl an Kontaminationen, welche aus dem Lebensraum der Einzelzelle stammen, reduziert, es ist auch leichter möglich, nach der Sequenzierung, anhand des Vergleichs des Codon-Gebrauchs, GC-Gehalts und weiterer Parameter, Kontaminationen bioinformatisch zu entfernen. Da meist mehrere Zellen eines Stammes isoliert und sequenziert werden, können des weiteren durch Vergleiche, sowohl Kontaminationen leichter entfernt als auch Sequenzierungsfehler leichter korrigiert werden. Die Nutzung dieser Methode hat sich in den letzten Jahren deutlich vereinfacht, da mehrere Kitsysteme zur Isolation von Zellen sowie der Amplifikation des genetischen Materials einer Einzelzelle verfügbar wurden (93).

Nach der Assemblierung von vollständigen Genomen oder Teil-Genomen folgen die bioinformatische Annotation der Gene, sowie die Expression in geeigneten Expressionssystemen. Beide Schritte zeigen gute Ergebnisse für mesophile Organismen, wurden jedoch kaum für extremophile Organismen untersucht (13, 27). Auf der anderen Seite wurden innerhalb der letzten Jahre mehrere vielversprechende bioinformatische Ansätze entwickelt, wie zum Beispiel der *profile and pattern matching algorithm* (PPMA), die speziell für die Annotation von Genen sind, welche aus Organismen stammen, die wenig verwandt zu bekannten Organismen sind (26, 27, 94, 95). Auch wurden genetisch erweiterte *E. coli* Expressionsstämme entwickelt, welche deren Nutzung für die Expression von Genen aus weit entfernter Organismen ermöglicht. Zudem wurden neue Expressionssysteme, basierend auf zum bespiel halophilen Mikroorganismen entwickelt.

### 3.5 Expression thermo-halophiler Gene in *E. coli*

*E. coli* ist aufgrund nativer Eigenschaften sowie entwickelter Methoden einer der am häufigsten genutzten Expressionsstämme. Positive Aspekte für die Nutzung von *E. coli* sind seine hohe genetische Stabilität (96), seine kurze Generationszeit (97), die Vielzahl an etablierten molekularbiologischen Methoden (98) sowie seine vollständige Sequenzierung (96).

Die Nutzbarkeit dieses intensiv erforschten und ertragreichen Expressionsstamms für die Expression von Genen aus Extremophilen hängt von zwei Faktoren ab.

Der erste Faktor bezieht sich auf die Unterschiede im Codon-Gebrauch, da diese einen deutlichen Einfluß auf den Expressionserfolg haben können (99). *E. coli* zeigt hierbei 17 selten genutzte Codons, deren korrespondierende tRNA entweder über Plasmide oder genomisch integrierte Gene ko-exprimiert werden kann (100). Da diese Optimierung jedoch sequenzabhängige Sekundärstrukturen der mRNA, welche bei vielen Organismen mit hohem GC Gehalt vorkommen, nicht beeinflußt, kann generell davon ausgegangen werden, daß eine Codon-Optimierung des Zielgens eine höhere Proteinausbeute ergibt (100, 101).

Der zweite Faktor ist die richtige Faltung der Zielproteine während und nach der Genexpression. Dies ist vor allem abhängig vom Aufbau des Zielproteins an sich, beziehungsweise dessen Adaption zum jeweiligen Lebensraum des Ursprungsorganismus. Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, sind die Hauptadaptionen für thermophile Proteine eine Erhöhung der Proteinfestigkeit durch Anstieg intramolekularer Kräfte, was faltungsfördernd ist. So zeigt *E. coli* eine gute Expression einer Vielzahl an thermophilen Proteinen (29). Es konnte sogar gezeigt werden, daß die geringe Stabilität der *E. coli* Proteine zur hitzebasierten Reinigung von thermophilen Proteinen genutzt werden kann (102).

Halophile Proteine stellen durch ihre meist sehr negativ geladene Oberfläche (Abschnitt 3.2), welche eine Vielzahl an positiv geladenen Ionen koordinieren kann, ein komplexeres Ziel für die Expression in *E. coli* aufgrund dessen verhältnismäßig geringer cytosolischen Salzkonzentration dar. Die erste erfolgreiche Expression eines halophilen Gens in *E. coli* erfolgte 1993, zwar in inaktiver Form, die jedoch durch Salzzugabe wiederhergestellt werden konnte (103). Generell zeigen Expressionsversuche halophiler Gene in *E. coli* teilweise Erfolg, führen jedoch meist zur Bildung von unlöslichen Einschlußkörpern oder inaktivem Protein (30, 31).

### 3.6 Das halophile Expressionssystem *Haloferax volcanii*

Innerhalb der letzten Jahre wurden extremophile Expressionsorganismen verfügbar, wie der moderat halophile Expressionsstamm *Haloferax volcanii* (32).

#### 3.6.1 Herkunft und Eigenschaften

*Haloferax volcanii* wurde aus dem Toten Meer isoliert, in welchem eine NaCl-Konzentration von 2 M und eine MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 1,4 M vorherrschen (104). Wachstumsanalysen zeigten, daß eine Mindestkonzentration von 1 M NaCl nötig ist und die Temperatur die Salztoleranz beeinflußt. So sind 1,7 M NaCl ideal bei 30°C und 4 M NaCl verlangsamen das Wachstum drastisch, wohingegen bei 40°C eine NaCl-Konzentration von 2,5 M bevorzugt wird und ein gutes Wachstum bis 4 M NaCl ersichtlich ist (104). Spätere Analysen zeigten, daß sich das Temperaturoptimum bei 45°C befindet und Temperaturen bis 49°C toleriert werden (105). Die bevorzugte Salzkonzentration von *Haloferax volcanii* bleibt bei 2,5 M NaCl und ein Bereich von 1,7 – 4,1 M NaCl wird noch toleriert (106). Interessanterweise bevorzugt *Haloferax volcanii* unter Laborbedingungen deutlich geringere MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen von 0,2 M, als dem natürlichen Vorkommen im Toten Meer (104).

Die Zellen zeigen die Form von tiefgezogenen Scheiben mit einer Größe von etwa 1 – 2 µm auf (104, 107), wie folgende Abbildung zeigt.

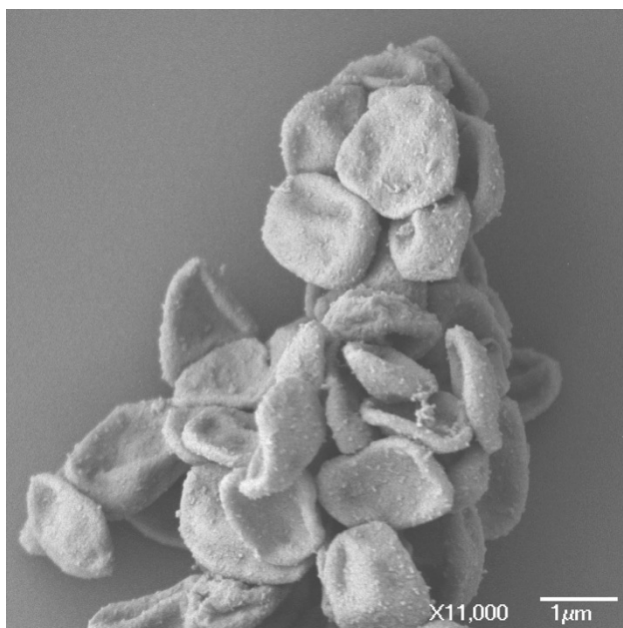


Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Haloferax volcanii* aus (108) [27.03.2017]

Bereits während der initialen Analyse fiel die hexagonale Oberflächenstruktur mit Abständen von ungefähr 13 nm auf (104), welche in späteren Analysen als äußerst stabile kristalline Zellwand, dem sogenannten S-Layer, welcher aus vernetzten Glykoproteinen in Form von Hexagonen besteht (109), beschrieben wurde. Diese stabile äußere Schicht kann jedoch durch die Zugabe von EDTA und dem verbundenen Entzug von  $Mg^{2+}$ -Ionen aufgelöst werden, wodurch die Zellen eine runde Form annehmen (109), was eine Zelltransformation erleichtert (32). Die typische Rotfärbung der Zellen stammt von Carotinoiden, welche zum Schutz vor UV-Strahlung ausgebildet werden (110).

Die vollständige Sequenzierung von *Haloferax volcanii* zeigt eine Gesamtgenomgröße von 4.012.900 Basenpaaren (bp). Diese sind auf ein Hauptchromosom mit 2.847.757 bp, die drei kleinere Chromosomen pHV 1 mit 85.092 bp, pHV 3 mit 437.906 bp und pHV 4 mit 635.786 bp, sowie auf das Plasmid pHV 2 mit 6359 bp verteilt (36). Im Durchschnitt zeigt das Genom einen GC-Gehalt von 65% und 4063 vorhergesagte Gene (36). Interessanterweise zeigt *Haloferax volcanii* über 20 Genomkopien während der exponentiellen Wachstumsphase und 12 während der stationären Phase (111). Ein postulierter Grund für diese hohe Anzahl an Genomkopien ist die Nutzung der DNA als Phosphatspeicher (112). Zur Adaption an die hohen Salzkonzentrationen des natürlichen Lebensraums von *Haloferax volcanii* nutzt dieser die *salt in*-Strategie (Abschnitt 3.2.2) und kann hierbei bis zu 4 M KCl ins Cytosol pumpen (36, 113). Die resultierende Änderung des Proteoms durch Ausbildung einer negativen Oberfläche zeigt sich durch den durchschnittlichen isoelektrischen Punkt von  $pI = 5,16$  der vorhergesagten *Haloferax volcanii* Gene (36).

*Haloferax volcanii* ist durch die Ausbildung von Flagellen mobil und kann sich mittels Pili an Oberflächen anheften, wobei eine Deletion der pilB3-C3 Gene die Fähigkeit der Adhäsion aufhebt (114).

### 3.6.2 Genetische Modifikationen

Der genutzte *Haloferax volcanii*-Stamm H1424 zeigt verschiedene genetische Modifikationen im Vergleich zum sequenzierten Wild-Typ-Stamm DS2 (39). Dies ist wichtig, um als Expressionsorganismus in Kombination mit dem Expressionsplasmid pTA963 genutzt werden zu können, wie folgende Tabelle darstellt:

Tabelle 1: Genetische Modifikationen des *Haloferax volcanii* H1424 Expressionsstammes sowie dem korrespondierenden Plasmid pTA963

Lokalisation	Genotyp	Nutzen
<i>Haloferax volcanii</i>	$\Delta$ pHV2	Entfernung des pHV2 Plasmids zur Nutzung dessen Replikationsursprungs für Transformationsplasmide (115)
H1424	$\Delta$ pyrE2	Die Deletion des Gens der Orotsäure-Phosphoribosyltransferase, welche zum Aufbau von Uracil nötig ist, wurde genutzt um einen Selektionsmarker einzuführen (116)
	$\Delta$ hdrB	Die Deletion des Gens der Dihydrofolatreduktase, welche eine zusätzliche Funktion als Thymidylatsynthase zum Aufbau von Thymidin hat, wurde genutzt um einen Selektionsmarker für Komplexmedien (welche Uracil enthält) einzuführen (32, 40)
	Nph-pitA	Austausch des nativen und Histidin-reichen <i>pitA</i> Gens, welches bei der His <sub>6</sub> -tag basierten Immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) koeluiert mit dem Homolog aus <i>Natronomonas pharaonis</i> (32, 117)
	$\Delta$ mrr	Deletion des Gens eines Restriktionsenzym, welches methylierte GATC Sequenzen schneidet, wie sie zum Beispiel aus Standard <i>E. coli</i> Stämmen erhalten werden (32, 118)
	cdc48d-Ct	Eine um den Histidin reichen C-terminalen Abschnitt gekürzte Variante des essentiellen cdc48d Gens zur Verringerung der Koelution mittels IMAC (39)
Plasmid pTA963	pHV2	Replikationsursprung des nativen pHV2 Plasmids, welches eine Anzahl von ~6 Kopien pro Zelle erzeugt (119)
	p.tna::his tag	Tryptophan induzierter Promotor von der nativen Tryptophanase aus <i>Haloferax volcanii</i> , welcher regulierbar ab 1 mM L-Tryptophan Genexpression initiiert, die bis ~ 4 mM ansteigt (41) mit anschließendem His <sub>6</sub> -tag vor der

---

-----	Klonierungsstelle (32).
pyrE2	Selektionsmarker: Rückgabe der Orotsäure-Phosphoribosyl-transferase zum Aufbau von Uracil (116)
hdrB	Selektionsmarker: Rückgabe der Thymidylatsynthase zum Aufbau von Thymidin (40)

---

Für Klonierungsarbeiten in *E. coli* verfügt das 8340 bp große pTA963-Plasmid über einen ColE1-Replikationsursprung und eine Ampicillin-Resistenz (32) wie in Abbildung 59 im Anhang dargestellt. Zur Unterdrückung einer ungewollten Verlängerung des Expressionsprodukts ist die Expressionskassette durch die zwei Terminatoren, den rRNA Terminator t.L11e (120) sowie dem synthetischen Terminator t.Syn flankiert (32).

### 3.7 Methodische Grundlagen

Dieser Abschnitt beschreibt die Grundlagen spezieller Methoden und Techniken, welche in dieser Arbeit neben den üblichen biochemischen sowie biotechnologischen Methoden angewendet wurden.

#### 3.7.1 Sequenz und Ligations unabhängige Klonierung – SLIC

Bei üblichen Klonierungen wird um ein Zielgen in einen Zielvektor zu transferieren, zuerst das Zielgen mittels mehrerer Primer amplifiziert. Diese Primer fügen die nötigen Schnittstellen für Restriktionsenzyme sowohl am 3' Ende als auch am 5' Ende der Zielgensequenz ein. Der Zielvektor und das Amplifikationsprodukt werden anschließend mit denselben Restriktionsenzymen verdaut. Anschließend erfolgt eine simple Reinigung der DNA-Fragmente und eine aufwendige Gelextraktion des Zielvektors, bevor in der finalen Reaktion durch komplementär überlagernde Fragmente mit anschließender Ligation, Zielvektor und Zielgen vereinigt werden.

Diese Methode benötigt neben verschiedensten Enzymen und dem Faktor Zeit, vor allem komplementäre Einzelschnittstellen für Restriktionsenzyme auf dem Vektor. Zudem dürfen sich keine dieser Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme auf dem Zielgen befinden.

Um diese Einschränkungen zu umgehen wurde in dieser Arbeit die SLIC- (*sequence- and ligation-independent cloning*) Klonierung (121) verwendet. Bei dieser Methode wird ein

Restriktionsenzym gewählt, welches eine Einzelschnittstelle in der richtigen Region des Zielvektors aufzeigt. Das Zielgen wird anschließend mit Primern amplifiziert, die wie folgt aufgebaut sind:

- Der 3'-Primer besteht aus einer Sequenz des Zielvektors vor der gewählten Schnittstellenregion, gefolgt von der eigentliche Schnittstellensequenz und dem Beginn des Zielgens.
- Der 5'-Primer besteht aus dem Ende des Zielgens, gefolgt von der gewählten Sequenz der Schnittstelle sowie einen Teil der 5' Sequenz des Zielvektors nach der gewünschten Schnittstelle.

Nach Verdau des Zielvektors, der einfachen Reinigung aus dem Reaktionspuffer und der Reinigung der Zielsequenz, erfolgt für wenige Minuten eine Inkubation mit der T4-Polymerase bei Raumtemperatur. Während dieser Inkubation ist die Exonukleasefunktion der T4-Polymerase, welche ausschließlich in 3' → 5'-Richtung abläuft, bevorzugt aktiv. Teile der komplementären doppelsträngigen DNA des Zielgens und des Zielvektors werden hierbei abgebaut. Anschließend erfolgt eine längere Inkubation auf Eis, wodurch sich die komplementären Enden des Zielgens und Zielvektors überlagern. Nach der Transformation in *E. coli* erfolgt von diesem eine automatische Reparatur der Einzelstrangbrüche.

### 3.7.2 *SUMO-tag*

Der *SUMO-tag* ist ein entfernbare Proteinanhang, welcher genutzt wird, um die Proteinreinheit und die Proteinlöslichkeit zu erhöhen, und um Zielproteine von zum Beispiel Reinigungs-tags zu befreien.

Hierfür wird die Gensequenz des *SUMO-tags* meist zwischen *His<sub>6</sub>-tag* und der Zielproteinsequenz kloniert. Nach der Genexpression und der IMAC basierten Reinigung wird das Zielprotein mittels der SUMO-Protease Ulp verdaut. Die SUMO-Protease Ulp erkennt spezifisch die Tertiärstruktur des Ubiquitin ähnlichen (UBL) Proteins SUMO (122) und nicht wie die meisten anderen Proteasen eine bestimmte Aminosäuresequenz (123). Die genutzte SUMO-Protease Ulp ist hierbei ein rekombinantes Fragment der Ulp1 (Ubl-specific protease 1) aus *Saccharomyces cerevisiae* (124). Nach Abschluß des Verdaus des gereinigten Zielproteins mit der SUMO-Protease erfolgt eine zweite IMAC-Reinigung. Hierbei



verbleiben die unspezifisch gebundenen Proteine, der ursprüngliche His<sub>6</sub>-tag an welchen der Großteil des SUMO-tags gebunden ist, sowie der SUMO-Protease die ebenfalls mit einem His<sub>6</sub>-tag versehen ist, an der Säule. Das gereinigte Protein findet sich in der mobilen Phase mit lediglich einer zusätzlichen Aminosäure (Serin), welche nach Verdau am Protein verbleibt.

### 3.7.3 Proteinkristallographie

Die erste Kristallstruktur von Myoglobin mit einer Auflösung von 6 Å wurde bereits 1958 gelöst (125) und bis heute wurden 106.307 Proteinstrukturen mittels Röntgenstrukturanalyse in der *Protein-Data Bank* (PDB) (126) hinterlegt<sup>1</sup>. Das Verständnis der dreidimensionalen Struktur von Proteinen hat das Verständnis von Enzymen revolutioniert und in der Summe zu 14 Nobelpreisen geführt (127).

Die Proteinkristallographie basiert hierbei nahezu ausschließlich auf der Beugung von Röntgenstrahlen an den Elektronen eines Moleküls. Durch die gleichmäßigen Wiederholungen von Molekülstrukturen innerhalb der Einheitszelle und deren dreidimensionale Wiederholung innerhalb eines Proteinkristalls, können dreidimensionale Beugungsbilder erhalten werden. Je nach Orientierung des Kristalles im Röntgenstrahl wird hierdurch die Streuung der Röntgenstrahlen verstärkt oder aufgehoben. Dieses Muster ist durch die Geometrie der Einheitszelle sowie der Wellenlänge des Röntgenstrahls, welcher so lang sein sollte wie die chemischen Bindungen, bestimmt. Jedoch wird die Effektivität der Interferenz der Röntgenstrahlung in jede Richtung und dadurch die Intensität jedes gebeugten Strahls von der Konstellation aller Atome innerhalb einer Einheitszelle bestimmt. Die Richtung der gebeugten Strahlen ist somit von der Form sowie Symmetrie der Einheitszelle bestimmt und die Intensitäten des Beugungsbilds ergeben die Position aller Atome innerhalb der Zelle. Je größer die Einheitszelle, desto mehr Reflektionen werden erhalten. Da jedoch sowohl die Position eines einzelnen Atoms innerhalb der Einheitszelle die Intensitäten der Strahlenbeugung aller weiterer Atome beeinflusst, als auch die Intensität jeder Einzelreflektion durch die Position aller Atome innerhalb der Einheitszelle bestimmt ist, kann im Gegensatz zu anderen Methoden nur die komplette Struktur und nicht nur ein Teil davon gelöst werden.

---

<sup>1</sup> Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do> [23.02.2017]

Begründet in der Symmetrie eines Kristalls sollten sich manche Reflektionen im Beugungsbild an verschiedenen Stellen wiederholen und dadurch identische Intensitäten haben. Die durchschnittliche Anzahl der einzelnen symmetriebedingten Reflektionen wird als Redundanz bezeichnet. Unterschiede in diesen Reflexen deuten auf Meßfehler oder Fehler im Kristall hin und können zu deren Korrektur verwendet werden. Je höher die Redundanz, desto besser können die Einzelintensitäten definiert werden. Die Summe aller dieser Redundanzen innerhalb eines Kristalls wird als  $R_{\text{merge}}$  (oder  $R_{\text{sym}}$  oder  $R_{\text{int}}$ ) bezeichnet und gibt einen Hinweis auf die Qualität des erhaltenen Beugungsbildes.

Jede Reflektion ist durch ihre Amplitude und ihre Phase bestimmt. Das erhaltene Beugungsbild stellt jedoch ausschließlich die Intensität dar, welche mit der Amplitude korreliert. Basierend auf der etablierten Beugungs-Theorie können die Reflexionsamplituden sowie Phasen der streuenden Elemente, hier der Elektronenverteilung in dem asymmetrischen Teil der Einheitszelle, mittels Fourier-Transformation, der sogenannten Strukturfaktoren (*F-values*), bestimmt werden. Da das Beugungsbild eines Proteinkristalls zu komplex ist und somit zu viele Variablen liefert, um die Phase direkt zu bestimmen, gibt es verschiedene Methoden der initialen Phasenbestimmung. Eine der zwei meist genutzten Methoden ist die Addition von stark streuenden Atomen an bestimmten Positionen innerhalb der Einheitszelle. Dies erfolgt zum Beispiel durch die Nutzung von Seleno-Methionin anstelle von Methionin während der Genexpression, oder durch einen Schwermetallersatz bei welchem der Kristall in Schwermetalllösungen eingeweicht wird. Die zweite Methode ist der bioinformatische Vergleich des erhaltenen Beugungsbildes zu bereits kristallographisch gelösten, strukturell ähnlichen Proteinen. Beide Methoden können genügend Informationen für die fehlenden Variablen liefern. Die erhaltene ungefähre Elektronendichteverteilung kann durch Wiederholung der Datenanalyse mit verfeinerten Variablen verbessert werden.

In die erhaltene Elektronendichte werden anschließend die Atome der Ausgangssequenz des Zielproteins eingefügt und deren Orientierung so lange verfeinert, bis die beste Übereinstimmung zwischen den beobachteten Reflexionsamplituden ( $F_{\text{obs}}$ ) und denen aus der Berechnung der eingefügten Sequenz ( $F_{\text{calc}}$ ) gefunden ist. Diese Übereinstimmung wird im sogenannten R-Faktor, der global für die Gesamtstruktur steht, definiert.

*[Der Großteil dieses Abschnitts bezieht sich auf eigenen Messungen und die Quelle (127)]*

### 3.7.4 Kleinwinkelröntgenstreuung - SAXS

Die Kleinwinkelröntgenstreuung (*small angle x-ray scattering*, SAXS) wird genutzt, um Strukturen sowie Interaktionen von biologischen Makromolekülen in Lösung zu analysieren. Das Grundprinzip der SAXS-Messung beruht hierbei auf den Informationen, welche aus der elastischen Streuung von Röntgenstrahlen an Molekülen in Lösung durch Analyse der Intensität des gestreuten Strahles als eine Funktion des Streuwinkels (128) gewonnen werden. Während eines Streuexperiments wird daher eine Lösung mit dem Zielprotein mit Röntgenstrahlen einer Wellenlänge von ungefähr  $\lambda = 0,15$  nm bestrahlt. Die Streuungsintensität (I) wird als Funktion der Impulsübertragung  $s$  dargestellt, wobei  $s = 4 * \pi * \sin(\theta) * \lambda^{-1}$  und  $2 * \theta$  dem Winkel zwischen dem Streuungsereignis und dem gestreuten Strahl entspricht. Die Streuung des Lösungsmittels wird anhand einer Leerprobenmessung davon abgezogen. Die zufällige Verteilung und Orientierung der Partikel in der Lösung resultieren in einer isotropen Intensitätsverteilung, welche für eine monodisperse Lösung von nicht miteinander agierenden Partikeln proportional zur Streuung eines einzelnen Partikels, gemittelt über alle möglichen Orientierungen ist. Die reine Partikelstreuung ist hierbei proportional zum quadratischen Unterschied zwischen den Elektronendichten des Lösungsmittels und der eigentlichen Probe.

Die folgende Abbildung zeigt den Informationsgehalt anhand berechneter SAXS-Kurven für 25 Proteine mit verschiedenen Molekulargewichten.

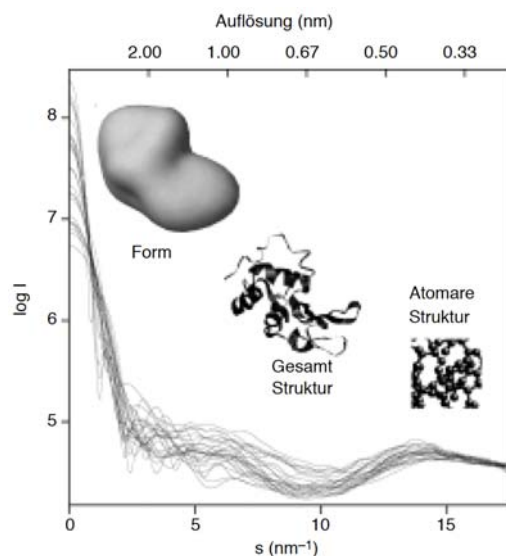


Abbildung 13: Darstellung des Informationsgehalts von SAXS-Streuungskurven. Die Kurven sind berechnet für 25 verschiedene Proteine mit molekularen Massen zwischen 10 und 300 kDa. Die Streuintensitäten ( $I$ ) sind logarithmisch gegen die Impulsübertragung ( $s$ ) dargestellt, beziehungsweise gegen die räumliche Auflösung ( $\Delta = 2\pi s^{-1}$ ) (Übersetzt aus (129))

SAXS-Messungen und röntgenkristallographische Messungen finden im reziproken Raum statt. Somit stellen die erhaltenen Beugungsbilder nicht das direkte Bild des Kristallgitters dar, sondern das Bild des reziproken Gitters. Hierbei korreliert eine detailliertere Auflösung mit Daten gemessen bei höheren Streuwinkeln. Der Vergleich der Strukturen zeigt, daß bei geringen Streuwinkeln, welche einer Auflösung von ungefähr 2 – 3 nm entsprechen, große Unterschiede in den Kurven ersichtlich sind, begründet in den relativ großen Unterschieden der Form der betrachteten Moleküle. Bei mittlerer Auflösung (2 – 0,5 nm) werden die Unterschiede geringer und in der Feinauflösung ( $< 0,5$  nm) sind sich die Kurven sehr ähnlich. Somit kann SAXS genutzt werden, um das Gros an strukturellen Unterschieden zu ermitteln, wie zum Beispiel Oligomerisierungszustände, sowie um die Form und die Quartär- und Tertiärstrukturen aufzuzeigen. SAXS ist jedoch nicht nutzbar für die Auflösung atomarer Strukturen.

[Der Großteil dieses Abschnitts bezieht sich auf eigenen Messungen und die Quelle (129)]

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Generelle Arbeitsschritte und Geräte

#### 4.1.1 Sterilisierung

Die Ausrüstung wurde durch Erhitzen im Autoklaven bei 121°C für 30 min sterilisiert. Zur Sterilisation von Lösungen (einschließlich Medien) wurden diese für 20 min bei 121°C autoklaviert. Sterilisierung von Oberflächen und Geräten welche nicht zum Autoklavieren geeignet waren wurden mit 70% v/v 2-Propanol gereinigt. Lösungen mit kleinem Volumen, oder wenn diese nicht hitzestabil waren, wurden steril filtriert (0,2 µm Membran, Millipore, Merck EMD, Darmstadt, Deutschland).

#### 4.1.2 Experimentelle Bedingungen und Chemikalien

Mikrobielle Arbeiten wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Experimente wurden, wenn nicht anders beschrieben bei Raumtemperatur durchgeführt. Chemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad p.a. (*pro Analysis*) genutzt und von Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA bezogen, falls nicht anders beschrieben. Medien wurden mit VE-H<sub>2</sub>O angesetzt, chemische Lösungen mit doppelt destilliertem H<sub>2</sub>O [ddH<sub>2</sub>O] (MilliQ, Millipore, Merck EMD, Darmstadt, Deutschland). Lösungen und Puffer genutzt für Chromatographie verfahren wurden sterilfiltriert um Partikel zu entfernen.

Zur Entfernung von Sauerstoff wurden Puffer für mindestens 60 min L<sup>-1</sup> mit Argon gespült und Materialien wurden für mindestens 30 min in der Eingangsschleuse der *Glovebox* mit Stickstoff gespült.

#### 4.1.3 Lagerung

Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelagert. Medium, Platten und Transformationslösungen wurden bei 4°C gelagert.

Gereinigtes Protein wurde, wenn nicht anders beschrieben, stets bei maximal 4°C gehalten. Langzeitlagerung von gereinigtem Protein erfolgte bei -80°C, nachdem das Protein zuerst mit

flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Nach der Lagerung wurden die Proteine bei Raumtemperatur bis 4°C aufgewärmt.

Langzeitlagerung von Mikroorganismen erfolgte bei -80°C, nach schockfrieren mittels flüssigem Stickstoff.

#### 4.1.4 Universell eingesetzte Geräte

Spezifische Geräte werden im Folgetext angegeben. Generell und vielseitig verwendete Geräte sind in der folgenden Liste aufgeführt.

Tabelle 2: Häufig verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<u>Zentrifugen</u>	
mini Spin plus	Eppendorf (Eppendorf, Deutschland)
5430R mit den Einstätzen: F-35-6-30 und FA-45-24-11-HS	Eppendorf (Eppendorf, Deutschland)
Allegra <sup>®</sup> X-15R mit dem Einsatz: SX4750A	Beckmann Coulter (Brea, CA, USA)
Avanti <sup>®</sup> J-26XP mit den Einsätzen: JLA 8.1 und JA-25.50	Beckmann Coulter (Brea, CA, USA)
<u>Inkubatoren</u>	
New Brunswick <sup>™</sup> Excella <sup>®</sup> E25	Eppendorf (Eppendorf, Deutschland)
New Brunswick <sup>™</sup> Innova 42	Eppendorf (Eppendorf, Deutschland)
Labnet 311 DS	Labnet (Edison, NJ, USA)
<u>Autoklaven</u>	
GE6610 EC-1	Getinge (Gothenburg, Schweden)
MLS-3781L	Panasonic (Kadoma, Osaka, Japan)
<u>Gefrierschränke</u>	
MED Plus	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Ultima II	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
<u>Photospektrometer</u>	
Jasco V670 mit VWR RC-10 Kühleinheit	Jasco (Tokyo, Japan), VWR (Radnor, PA, USA)

Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis mit 18 Cellholder und Julabo EH und F12 Wasserbad	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) Julabo (Seelbach, Deutschland)
<u>Plattenlesegeräte</u>	
Spark™ 10M	Tecan (Männedorf, Schweiz)
infinite M200	Tecan (Männedorf, Schweiz)
infinite M1000	Tecan (Männedorf, Schweiz)
<u>Wagen</u>	
Extend ED4202S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
CPA324S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
<u>Weitere Geräte</u>	
<u>Pipettensätze:</u> Research® Plus (2,5; 10; 20; 100; 200; 1000; 5000 µL)	Eppendorf (Eppendorf, Deutschland)
<u>Temperierter Schüttler:</u> thermomixer C	Eppendorf (Eppendorf, Deutschland)
<u>Glovebox:</u> KAUST IST 300 special	Inertec AG (Grenchen, Schweiz)
<u>Schüttler:</u> New Brunswick™ Excella E2 Platform Shaker	Eppendorf (Eppendorf, Deutschland)
<u>Vortexer:</u> Vortex Mixer	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
<u>pH-Meter:</u> Lab 870 mit pH electrode BlueLine 15pH ID	Schott SI Analytics (Xylem, Rye Brook, NY, USA)
<u>Magnetrührer:</u> MR Hei-Standard mit EKT Hei-Con	Heidolph (Schwabach, Germany)

## 4.2 Medien, Puffer und Lösungen

### Säuren und Basen zur Einstellung des pH der Puffer

Tabelle 3: Säure und Base Standardlösungen

Name	Menge
1 M NaOH	4,0 g NaOH in 100 mL VE-H <sub>2</sub> O
10 M NaOH	40 g NaOH in 100 mL VE-H <sub>2</sub> O (Achtung, heiß)

1 M KOH	5,6 g KOH in 100 mL VE-H <sub>2</sub> O
1 M HCl	8,3 mL 37% v/v HCl Lösung in 100 mL VE-H <sub>2</sub> O

---

#### 4.2.1 Medien für *E. coli*

##### Kultivierungsmedium LB-Broth

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde das Komplexmedium *Lysogen Broth* (LB) (130) nach der Miller Formulierung mit doppelter Menge NaCl genutzt. Selektionsmarker wurden passend der entsprechenden Plasmide gewählt (siehe Anhang).

Zur Selektion von Einzelkolonien wurden LB-Broth Agar-Platten erstellt und zu einer Schichtdicke von ~ 1 cm in Petrischalen gegossen.

Tabelle 4: LB-Broth Medium und LB-Agar Platten, Zusammensetzung und Herstellung. Der Wert in eckigen Klammern entspricht der Zielkonzentration im Medium

Komponente	Menge
Pepton	10 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	5 g L <sup>-1</sup>
NaCl	10 g L <sup>-1</sup> [170 mM]
1 M NaOH	auf pH 7,0
Für Platten: Agar	20 g L <sup>-1</sup>
Autoklavieren und Auskühlen bis Temperatur < 60°C	
Selektionsmarker	Ampicillin (Amp) 100 mg L <sup>-1</sup> Chloramphenicol (Cm) 25 mg L <sup>-1</sup> Kanamycin (Kan) 50 mg L <sup>-1</sup>

##### Medium zur Langzeitlagerung von *E. coli* Zellen bei -80°C

Zur Verringerung der Bildung von Eiskristallen wurde das LB-Broth Medium, wie vorher beschrieben erstellt, nur enthält das Medium 30% v/v Glycerin (Zugabe vor dem Autoklavieren). Zur weiteren Reduzierung des Stresses auf die Zellen wurde kein Selektionsmarker hinzugegeben.



Medium nach Zelltransformation - SOC

Zur Erhöhung der Transformationseffizienz, durch Streß Verringerung wurde SOC Medium nach der Zelltransformation verwendet.

Tabelle 5: SOC Medium. Der Wert in eckigen Klammern entspricht der Zielkonzentration im Medium

Komponente	Menge
Pepton	20 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	5 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	2,5 g L <sup>-1</sup> [10 mM]
NaCl	2 g L <sup>-1</sup> [10 mM]
KCl	190 mg L <sup>-1</sup> [2,5 mM]
1 M NaOH	auf pH 7,0
Autoklavieren und auskühlen bis Temp. < 30°C	
0,5 M Glukose Stocklösung (90 g L <sup>-1</sup> Glukose, steril filtriert)	40 mL L <sup>-1</sup> [20 mM]

#### 4.2.2 Medien für *Haloferax volcanii*

##### Hv-YPC zur Anzucht von *Haloferax volcanii*

Zur Kultivierung der verwendeten *Haloferax volcanii* Stämme H1424 und H1895 wurde das Komplexmedium Hv-YPC verwendet (37). Zur Erhöhung der Zelldichte im Rührkesselreaktor wurde in Zusammenarbeit mit Eva Strillinger (TUM) das modifizierte Hv-YPC+ Medium erstellt (131). Beide Stämme sind außerstande das Nukleosid Desoxythymidin sowie die Nukleinbase Uracil zu erzeugen, was als Selektionsmarker verwendet wird und durch die entsprechenden Gene auf den Expressionsplasmiden pTA963 oder pTA1228 komplettiert wird. Das Komplexmedium enthält Uracil, wodurch die Selektion auf Desoxythymidin beschränkt wird.

Zur optimalen Löslichkeit des Hv-YPC Mediums besteht dieses aus folgenden drei Komponenten.

## MATERIAL UND METHODEN

---

Tabelle 6: Hv-YPC Medium Bestandteil A: 28% w/v Salzwasser

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
VE-H <sub>2</sub> O (warm)	800 mL
NaCl	240 g L <sup>-1</sup> [4,1 M]
MgCl <sub>2</sub>	14 g L <sup>-1</sup> [150 mM]
MgSO <sub>4</sub>	17 g L <sup>-1</sup> [140 mM]
KCl	7 g L <sup>-1</sup> [100 mM]
1 M Tris-HCl pH 7,5 (121 g L <sup>-1</sup> , eingestellt mit 1 M HCl)	20 mL L <sup>-1</sup> [20 mM]
VE-H <sub>2</sub> O	auf 1 L

Tabelle 7: Hv-YPC Bestandteil B: 10x YPC

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Hefeextrakt	50 g L <sup>-1</sup>
Pepton	10 g L <sup>-1</sup>
Casaminsäure	10 g L <sup>-1</sup>
1 M KOH	17,6 mL L <sup>-1</sup> ( $\hat{=}$ pH 7,5)

Tabelle 8: Hv-YPC Medium

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
VE-H <sub>2</sub> O	294 mL L <sup>-1</sup>
28% w/v Salzwasser (Tabelle 6)	600 mL L <sup>-1</sup> [18% w/v]
10x YPC (Tabelle 7)	100 mL L <sup>-1</sup> [1x]
Autoklavieren und auskühlen bis Temp. < 57°C	
0,5 M CaCl <sub>2</sub> Lösung (55,5 g L <sup>-1</sup> , autoklaviert)	6 mL L <sup>-1</sup> [3mM]
<b>Selektion</b> (für Anzucht ohne Plasmid)	Thymidin 40 mg L <sup>-1</sup>

Tabelle 9: Hv-YPC Agarplatten

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
VE-H <sub>2</sub> O	294 mL L <sup>-1</sup>
28% w/v Salzwasser (Tabelle 6)	600 mL L <sup>-1</sup> [18% w/v]
Agar	15 g L <sup>-1</sup>
<b>Komplettes Lösen des Agars mittels Mikrowelle</b>	
10x YPC (Tabelle 7)	100 mL L <sup>-1</sup> [1x]
Autoklavieren und abkühlen bis Temp. < 57°C	
0,5 M CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (120 g L <sup>-1</sup> , autoklaviert)	6 mL L <sup>-1</sup> [3 mM]
<b>Selektion</b> (für Anzucht ohne Plasmid)	Thymidin 40 mg L <sup>-1</sup>

Zur Anzucht von *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor wurde das modifizierte Hv-YPC+ Medium genutzt (131).

Tabelle 10: Hv-YPC+ zur Nutzung im Rührkesselreaktor

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
NaCl	144 g L <sup>-1</sup> [2,5 M]
MgCl <sub>2</sub>	8,43 g L <sup>-1</sup> [89 mM]
KCl	4,2 g L <sup>-1</sup> [56 mM]
Hefeextrakt	15 g L <sup>-1</sup>
Pepton	1 g L <sup>-1</sup>
Casaminsäure	3 g L <sup>-1</sup>
VE-H <sub>2</sub> O	auf 880 mL
Autoklavieren und abkühlen bis Temp. < 57°C	
1 M MgSO <sub>4</sub> (120 g L <sup>-1</sup> , autoklaviert)	85 mL L <sup>-1</sup> [85 mM]
0,5 M CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (120 g L <sup>-1</sup> , autoklaviert)	6 mL L <sup>-1</sup> [6 mM]
1 M Tris HCl pH 7,5 (121 g L <sup>-1</sup> eingestellt mit HCl, autoklaviert)	12 mL L <sup>-1</sup> [12 mM]
60% w/v Natriumlactat (steril)	8,33 mL L <sup>-1</sup> [0,5% w/v]
1 M NH <sub>4</sub> Cl (53,5 g L <sup>-1</sup> , autoklaviert)	5 mL L <sup>-1</sup> [5 mM]

1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (174,2 g L <sup>-1</sup> , autoklaviert)	1,62 mL L <sup>-1</sup> [1,6 mM]
1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (136,1 g L <sup>-1</sup> , autoklaviert)	376 μL L <sup>-1</sup> [0,48 mM]

Tabelle 11: Lösung zum autoklavieren des Rührkesselreaktors mit Sonden

Komponente	Menge
NaCl	17,5 g L <sup>-1</sup> [300 mM]
KCl	7,5 g L <sup>-1</sup> [100 mM]
Tris	1,2 g L <sup>-1</sup> [10 mM]
1 M HCl	auf pH 7,5

### Expressionsinduktion

Die Expressionsinduktion erfolgte mit *L*-Tryptophan welches in Salzwasser gelöst wurde um eine osmotische Lyse der Zellen zu verhindern.

Tabelle 12: 27 mM *L*-Tryptophan Stocklösung zur Expressionsinduktion

Komponente	Menge
28% w/v Salzwasser (Tabelle 6)	600 mL L <sup>-1</sup> [18% w/v]
<i>L</i> -Tryptophan	5,5 g L <sup>-1</sup> [27 mM]

Die *L*-Tryptophan Stocklösung kann bis zu einer Woche bei 4°C gelagert werden.

### Medium zur Langzeitlagerung von *Haloferax volcanii* Zellen bei -80°C

Zur Langzeitlagerung wurde das Hv-YPC Medium (Tabelle 8) vor Autoklavierung mit 20% v/v Glycerin vermenegt.

### **4.2.3 Lösungen zur Zelltransformation von *E. coli***

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden folgende Lösungen verwendet.

Tabelle 13: *SOB* Medium

Komponente	Menge
Hefeextrakt	5 g L <sup>-1</sup>
Trypton	20 g L <sup>-1</sup>
NaCl	0,6 g L <sup>-1</sup> [10,3 mM]
KCl	0,2 g L <sup>-1</sup> [2,7 mM]
MgCl <sub>2</sub>	0,95 g L <sup>-1</sup> [10 mM]
MgSO <sub>4</sub>	1,2 g L <sup>-1</sup> [10 mM]
Autoklavieren	

Tabelle 14: *CCMB80* Puffer

Komponente	Menge
CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	17,0 g L <sup>-1</sup> [77,5 mM]
MnCl <sub>2</sub>	2,5 g L <sup>-1</sup> [20 mM]
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,95 g L <sup>-1</sup> [10 mM]
KCH <sub>3</sub> COO	1,0 g L <sup>-1</sup> [10 mM]
Glycerin	100 mL L <sup>-1</sup> [10% v/v]
Autoklavieren	

#### 4.2.4 Lösungen zur Zelltransformation von *Haloferax volcanii*

Zur Transformation von *Haloferax volcanii* mit einem Zielplasmid wurden folgende Lösungen verwendet. Ziel der Lösungen ist es Sphaeroplasten, also Zellen ohne Zellwand zu erzeugen, welche in der Lage sind rekombinante DNA aufzunehmen.

Tabelle 15: Gepufferte Sphaeroplast Lösung [A]

Komponente	Menge
NaCl	58,4 g L <sup>-1</sup> [1 M]
KCl	2,0 g L <sup>-1</sup> [27 mM]
1 M Tris-Base pH 8,5 (121g L <sup>-1</sup> , eingestellt mit 1 M NaOH)	50 mL L <sup>-1</sup> [50 mM]

Saccharose	150 g L <sup>-1</sup> [15% (w/v)]
Sterilfiltration	

Tabelle 16: Ungepufferte Sphaeroplast Lösung [B]

Komponente	Menge
NaCl	58,4 g L <sup>-1</sup> [1 M]
KCl	2,0 g L <sup>-1</sup> [27 mM]
Saccharose	150 g L <sup>-1</sup> [15% (w/v)]
1 M NaOH	auf pH 7.5
Sterilfiltration	

Tabelle 17: Sphaeroplasten Verdünnungslösung [C]

Komponente	Menge
28% w/v Salzwasser (Tabelle 6)	767 mL L <sup>-1</sup> [21% w/v]
Saccharose	150 g L <sup>-1</sup> [15% w/v]
0,5 M CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (120 g L <sup>-1</sup> )	7,5 mL L <sup>-1</sup> [3,75 mM]
Sterilfiltration	

Tabelle 18: Regenerationslösung [D]

Komponente	Menge
28% w/v Salzwasser (Tabelle 6)	600 mL L <sup>-1</sup> [17% w/v]
10x YPC (Tabelle 7)	100 mL L <sup>-1</sup> [1x]
Saccharose	150 g L <sup>-1</sup> [15% w/v]
0,5 M CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (120 g L <sup>-1</sup> )	6,0 mL L <sup>-1</sup> [3 mM]
Sterilfiltration, Aliquots (25mL), lichtempfindlich	

Tabelle 19: Transformanden Verdünnungslösung [E]

Komponente	Menge
28% w/v Salzwasser (Tabelle 6)	600 mL L <sup>-1</sup> [17% w/v]

Saccharose	150 g L <sup>-1</sup> [15% w/v]
0,5 M CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (120 g L <sup>-1</sup> )	6,0 mL L <sup>-1</sup> [3 mM]
Sterilfiltration	

Tabelle 20: 0,5 M EDTA [F]

Komponente	Menge
0,5 M EDTA	146 g L <sup>-1</sup>
10 M NaOH	auf pH 8,0

#### 4.2.5 Lösungen für DNA basiertes Arbeiten

Aus Sicherheitsgründen wurde in dieser Arbeit auf den DNA interkalierenden und höchstwahrscheinlich mutagenen Phenanthridin-Farbstoff Ethidiumbromid verzichtet. Anstelle von diesem wurde der Cyanin-Farbstoff SYBR Green I (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) verwendet.

Tabelle 21: 10x DNA Auftragspuffer

Komponente	Menge
Glycerin	500 mL L <sup>-1</sup> [50% v/v]
Xylencyanol	2,5 g L <sup>-1</sup> [0,25% w/v]
Bromphenol Blau	2,5 g L <sup>-1</sup> [0,25% w/v]
SYBR Green I	30 mL L <sup>-1</sup> [3,0% v/v]
TE-Puffer (Tabelle 22)	auf 1 L

Tabelle 22: TAE-Puffer

Komponente	Menge
Tris-Base	4,8g L <sup>-1</sup> [40 mM]
EDTA	0,29 g L <sup>-1</sup> [1 mM]
Essigsäure (Konz.)	1,142 mL [20 mM]
1 M NaOH	auf pH 8,2

Tabelle 23: 1kb DNA Leiter (peqLab)

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
1kb Leiter Vormischung	100 $\mu\text{L}$ 600 $\mu\text{L}^{-1}$
6x DNA Auftragspuffer (peqLab)	100 $\mu\text{L}$ 600 $\mu\text{L}^{-1}$
SYBR Green I	1,8 $\mu\text{L}$ 600 $\mu\text{L}^{-1}$ [0,3% v/v]
MilliQ-ddH <sub>2</sub> O	398 $\mu\text{L}$ 600 $\mu\text{L}^{-1}$

#### 4.2.6 Lösungen für Protein basiertes Arbeiten

Die Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zur Darstellung gereinigter Proteine und als initialen Schritt für Western Blots mit folgenden Puffern genutzt. Zur Darstellung von tryptophanreichen Proteinen wurde die färbefreie Methode mittels TCE (2,2,2-Trichloroethanol) nach Ladner (132) verwendet. Für Proteine mit geringem Tryptophangehalt oder falls das SDS-Gel für Western Blots genutzt wurde, wurde eine Coomassie basierte Färbung nach Fairbanks (133) verwendet.

#### Lösungen zur Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese

Tabelle 24: SDS-Sammelgel [4%]

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
SDS-Sammelgelpuffer (Tabelle 25)	2,5 mL 5 mL <sup>-1</sup>
VE-H <sub>2</sub> O	1,945 mL 5 mL <sup>-1</sup>
40% w/v Acrylamid Lösung	0,5 mL 5 mL <sup>-1</sup> [4% v/v]
10% v/v APS Lösung	50 $\mu\text{L}$ 5 mL <sup>-1</sup> [0,1% v/v]
TEMED	5 $\mu\text{L}$ 5 mL <sup>-1</sup> [0,1% v/v]

Tabelle 25: SDS-Sammelgelpuffer

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
1 M Tris-HCl (121,4 g L <sup>-1</sup> eingestellt mit HCl)	250 mL L <sup>-1</sup> [250 mM]
SDS (Natriumdodecylsulfat)	2 g L <sup>-1</sup> [0,2% w/v]



Tabelle 26: SDS-Trenngel [10%]

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
40% w/v Acrylamide Lösung	2,5 mL 5 mL <sup>-1</sup> [10% v/v]
VE-H <sub>2</sub> O	4,945 mL 5 mL <sup>-1</sup>
Trenngelpuffer (Tabelle 27)	2,5 mL 5 mL <sup>-1</sup>
10% v/v APS Lösung	50 µL 5 mL <sup>-1</sup> [0,1% v/v]
TEMED	5 µL 5 mL <sup>-1</sup> [0,1% v/v]
<i>Optional für Vorfärbung</i>	
2,2,2-Trichloroethanol	50µl 5 mL <sup>-1</sup> [0,5% v/v]

Tabelle 27: SDS-Trenngelpuffer

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
2 M Tris-Base pH 8,8 (242 g L <sup>-1</sup> eingestellt mit 1 M NaOH)	667 mL L <sup>-1</sup> [1,5 M]
SDS (Natriumdodecylsulfat)	4 g L <sup>-1</sup> [0,4% w/v]

Tabelle 28: SDS Laufpuffer

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Glycin	14,4 g L <sup>-1</sup> [192 mM]
1 M Tris-Base pH 8,3 (121 g L <sup>-1</sup> eingestellt mit 1 M NaOH)	25 mL L <sup>-1</sup> [25 mM]
SDS (Natriumdodecylsulfat)	1 g L <sup>-1</sup> [0,1% w/v]

Tabelle 29: Coomassie Färbelösung

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Coomassie Blau R-250	25 mg 10 mL <sup>-1</sup> [0,25% w/v]
Methanol	4,5 mL 10 mL <sup>-1</sup> [45% v/v]
Essigsäure (Konz.)	0,9 mL 10 mL <sup>-1</sup> [9% v/v]

Tabelle 30: Entfärbelösung

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Methanol	500 mL L <sup>-1</sup> [50% v/v]
Essigsäure (Konz.)	100 mL L <sup>-1</sup> [10% v/v]

Tabelle 31: SDS-Auftragspuffer

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
1 M Tris-HCl pH 6,8 (121 g L <sup>-1</sup> eingestellt mit HCl)	6 mL 100 mL <sup>-1</sup> [60 mM]
Glycerin	30 mL 100 mL <sup>-1</sup> [30% v/v]
Saccharose	10 g 100 mL <sup>-1</sup> [10% w/v]
SDS (Natriumdodecylsulfat)	5 g 100 mL <sup>-1</sup> [5% w/v]
BME ( $\beta$ -Mercaptoethanol)	3 mL 100 mL <sup>-1</sup> [3% v/v]
Bromphenol Blau	~20 mg 100 mL <sup>-1</sup> [0,02% w/v]

### Lösungen für Western-Blot

Tabelle 32: Western Blot Transfer Puffer

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
10x TB-Stock (Tabelle 33)	100 mL L <sup>-1</sup> [1x]
Methanol	200 mL L <sup>-1</sup> [20% v/v]

Tabelle 33: 10x TB-Stock

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Tris-Base	30,3 g L <sup>-1</sup> [250 mM]
Glycin	144 g L <sup>-1</sup> [1,92 M]
Eigen pH der Komponenten	8,3

Tabelle 34: 10x WB Waschpuffer, TBST

Komponente	Menge
1 M Tris-HCl pH 7,4 (121 g L <sup>-1</sup> eingestellt mit HCl)	100 mL [100 mM]
NaCl	90 g L <sup>-1</sup> [1,54 M]
Tween-20	5 mL L <sup>-1</sup> [0,5% v/v]

Tabelle 35: WB Blockier-Puffer [TBST+]

Komponente	Menge
Fettfreies Milchpulver	5 g L <sup>-1</sup> [5% w/v]
10x TBST (Tabelle 34)	100 mL L <sup>-1</sup> [1x]

Puffer zur Proteinreinigung

Tabelle 36: Ni-NTA Puffer A (0,5 - 2 M NaCl)

Komponente	Menge
NaCl	8,8 g L <sup>-1</sup> [0,15 M] – 117 g L <sup>-1</sup> [2,0 M]
HEPES	4,8 g L <sup>-1</sup> [20 mM]
Imidazol	0,7 g L <sup>-1</sup> [10 mM]
1 M NaOH	auf pH 7,5
Sterilfiltration zur Entfernung von Partikeln	
Falls angemerkt wurden 10% v/v Glycerin zugefügt	

Tabelle 37: Ni-NTA Puffer B (0,5 - 2 M NaCl)

Komponente	Menge
NaCl	29 g L <sup>-1</sup> [0,5 M] – 117 g L <sup>-1</sup> [2,0 M]
HEPES	4,8 g L <sup>-1</sup> [20 mM]
Imidazol	20,4 g L <sup>-1</sup> [300 mM]
1 M NaOH	auf pH 7,5
Sterilfiltration zur Entfernung von Partikeln	

Falls angemerkt wurden 10% v/v Glycerin zugefügt

Tabelle 38: Modifizierter Ni-NTA Reinigungspuffer A und B zur Reinigung von SP\_A

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
NaCl	29 g L <sup>-1</sup> [500 mM]
1 M Tris-HCl pH 7,4 (121 g L <sup>-1</sup> eingestellt mit HCl)	25 mL L <sup>-1</sup> [25 mM]
Imidazol	A): 1,4 g L <sup>-1</sup> [20 mM] B): 35 g L <sup>-1</sup> [500 mM]
1 M NaOH	auf pH 7,4
Sterilfiltration zur Entfernung von Partikeln	
Glycerin	100 mL L <sup>-1</sup> [10% v/v]

Tabelle 39: Protein-Lagerpuffer

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
NaCl	29 g L <sup>-1</sup> [0,5 M] – 117 g L <sup>-1</sup> [2,0 M]
HEPES	2,4 g L <sup>-1</sup> [10 mM]
1 M NaOH	auf pH 7,5

Puffer zur Proteinreinigung der SUMO Protease in *E. coli*

Tabelle 40: SUMO Protease Reinigungspuffer A und B

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
NaCl	29 g L <sup>-1</sup> [0,5 M]
Tris	18 g L <sup>-1</sup> [150 mM]
Imidazol Puffer A	1,4 g L <sup>-1</sup> [20 mM]
Imidazol Puffer B	34 g L <sup>-1</sup> [500 mM]
Glycerin	100 mL L <sup>-1</sup> [10% v/v]
1 M HCl	auf pH 7,4
Sterilfiltration zur Entfernung von Partikeln	

Tabelle 41: SUMO Lagerpuffer

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
NaCl	8,8 g L <sup>-1</sup> [150 mM]
Tris	6,1 g L <sup>-1</sup> [50 mM]
Glycerin	100 mL L <sup>-1</sup> [10% v/v]
1 M HCl	auf pH 7,4
DTT	15,4 mg [1 mM]
IGEPAL	10 mL [1% v/v]

Lösungen zur Ni-NTA Säulenregenerierung

Tabelle 42: Ni-NTA Stripping Puffer

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g L <sup>-1</sup> [20 mM]
NaCl	29,2 g L <sup>-1</sup> [500 mM]
EDTA	146,1 g L <sup>-1</sup> [500 mM]
10 M NaOH	auf 7,4
Sterilfiltration zur Entfernung von Partikeln	

Puffer zur Aktivitätsbestimmung

Tabelle 43: ADH Aktivitätspuffer

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
KCl	223,7 g L <sup>-1</sup> [3,0 M]
Glycin	8,4 g L <sup>-1</sup> [50 mM]
NAD <sup>+</sup>	8,0 g L <sup>-1</sup> [12 mM]
1 M NaOH	auf pH 10,0

Tabelle 44: ADH-BME-Aktivitätspuffer

Komponente	Menge
KCl	149,1 g L <sup>-1</sup> [2,0 M]
1 M Tris-HCl pH 7,7 (121 g L <sup>-1</sup> eingestellt mit HCl)	50 mL [50 mM]
$\beta$ -Mercaptoethanol	70,2 $\mu$ L L <sup>-1</sup> [1 mM]
NAD <sup>+</sup>	2,7 g L <sup>-1</sup> [4 mM]

Tabelle 45:  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitätspuffer

Komponente	Menge
NaCl	146,1 g L <sup>-1</sup> [2,5 M]
1 M Tris-HCl pH 7,2 (121 g L <sup>-1</sup> eingestellt mit HCl)	50 mL [50 mM]
10 mM MnCl <sub>2</sub> (2,0 g L <sup>-1</sup> MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O)	1 mL [10 $\mu$ M]
$\beta$ -Mercaptoethanol	1 mL L <sup>-1</sup> [1% v/v]

### Lösungen zur Proteinkristallisation

Initiale Untersuchung der Kristallbildung von Proteinen wurde im *sitting drop* Verfahren mit folgende Puffer Sets der NeXtal Systems<sup>2</sup> von Qiagen (Venlo, Niederlande) durchführt.

- *Classics Suite (Screen 3)*
- *Classics II Suite (Screen 4)*
- *JCSG+ Suite (Screen 5)*
- *PEGs Suite (Screen 8)*
- *PEGs II Suite (Screen 9)*
- *AmSO<sub>4</sub> Suite (Screen 12)*

Für die spätere Feinjustierung der Durchmusterungen wurden folgende Puffer verwendet.

---

<sup>2</sup> Puffer Zusammensetzung:

<http://www.qiagen.com/products/protein/crystallization/compositiontables/default.aspx> [04.02.17]

Tabelle 46: Puffer zur Feinjustierung der Standard Kristallisationspuffer

Ziel-Komponente
50% v/v MPD (2-Methyl-2,4-pentandiol)
2 M Magnesiumacetat ( $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) ( $284,8 \text{ g L}^{-1}$ )
1 M Dimethylarsinsäure, pH 6,5 ( $138,0 \text{ g L}^{-1}$ , eingestellt mit 1M NaOH/HCl)

### 4.3 Mikroorganismen und gentechnische Arbeiten

#### 4.3.1 Mikroorganismen und Stämme

Tabelle 47: Verwendete Stämme und ihr Genotyp

Zweck	Stamm	Genotyp	Herkunft
Klonierung (hohe Transformations- effizienz)	<b><i>E. coli One Shot</i></b> <sup>®</sup>	F <sup>-</sup> mcrA $\Delta$ (mrr- hsdRMS-mcrBC)	ThermoFisher Scientific –
	<b>TOP10</b>	$\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str <sup>r</sup> ) endA1 nupG $\lambda$ -	Invitrogen (Waltham, MA, USA)
	<b><i>E. coli DH5<math>\alpha</math></i></b> <sup>TM</sup>	F <sup>-</sup> $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) phoA supE44 $\lambda$ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1	
	<b><i>E. coli XL1-Blue</i></b>	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F <sup>-</sup> proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

Methylierungsfreie DNA zur Erhöhung der Transformations-effizienz von <i>Haloferax volcanii</i>	<i>E. coli dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup></i>	ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) Tet <sup>S</sup> endA1 rspL136 (Str <sup>R</sup> ) dam13::Tn9 (Cam <sup>R</sup> ) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2	NEB (Ipswich, MA, USA)
Codon optimierter <i>E. coli</i> Stamm zur Expression rekombinanter Gene mit, ursprünglich eukaryotischer, hier archaeer Codonnutzung	<i>E. coli</i> BL21- <b>CodonPlus(DE3)-RIPL</b>	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> ompT hsdS( <sub>RB<sup>-</sup> MB<sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> galλ(DE3) endA Hte [argU proL Cam<sup>r</sup>] [argU ileY leuW Strep/Spec<sup>r</sup>]</sub>	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
Expression rekombinanter Gene	<i>Haloferax volcanii</i> <b>H1424</b>	ΔpyrE2 ΔhdrB Δmrr Nph-pitA cdc48d-Ct	(39)
Biofilm freie Expression rekombinanter Gene (zur Nutzung im Rührkesselreaktor)	<i>Haloferax volcanii</i> <b>H1895</b>	ΔpyrE2 ΔhdrB Δmrr Nph-pitA cdc48d-Ct ΔpilB3C3	Kombination von H1424 (39) und H53 (134). Erstellt in Zusammenarbeit mit Dr. Thorsten Allers ( <i>University of Nottingham</i> ) und Eva Strillinger (TUM)



### 4.3.2 Verwendete Vektoren und Primer

Tabelle 48: Verwendete Vektoren

Name	Organismus	Verwendung	Selektionsmarker
pTA941	<i>Haloferax volcanii</i>	Vektor zur Verfügung gestellt von Dr. Thorsten Allers, mit dem <i>bgaH</i> Gen, Abbildung 57 im Anhang	hdrB (Thymidin) in <i>Hfx. volcanii</i> (40), AmpR (Ampicillin Resistenz) in <i>E. coli</i>
pTA1228	<i>Haloferax volcanii</i>	Vektor zur Verfügung gestellt von Dr. Thorsten Allers, zur Expression von <i>bgaH</i> unter dem <i>p.tnaA</i> Promotor, Abbildung 58 im Anhang	Resistenz) in <i>E. coli</i>
pTA963 (32)	<i>Haloferax volcanii</i>	Expressionsvektor zur Verfügung gestellt von Dr. Thorsten Allers, Abbildung 59 im Anhang	
pEX-K	<i>E. coli</i>	Transportvektor der Firma Eurofins für die <i>E. coli</i> optimierten RSBP Gene, Abbildung 60 im Anhang	NeoR/KanR (Neomycin und Kanamycin Resistenz) in <i>E. coli</i>
pET-3a	<i>E. coli</i>	Expressionsvektor für die <i>Haloferax volcanii</i> Codon optimierten RSBP Gene in <i>E. coli</i> (Addgene, Cambridge, MA, USA), Abbildung 61 im Anhang	AmpR (Ampicillin Resistenz) in <i>E. coli</i>
pRSET A	<i>E. coli</i>	Expressionsvektor für das geänderte, <i>E. coli</i> Codon optimierte SP_A-Konstrukt mit C-terminalem <i>his6-tag</i> für <i>E. coli</i> . Zur Verfügung gestellt von Dr. Michael Groll (TUM), Abbildung 64 im Anhang	AmpR (Ampicillin Resistenz) in <i>E. coli</i>
pET28b-SUMO	<i>E. coli</i>	Expressionsvektor für die <i>E. coli</i> optimierten AF_D, AZ_A und SP_A	AmpR (Ampicillin Resistenz) in <i>E. coli</i>

		Gene mit N-terminaler SUMO Proteaseschnittstelle. Zur Verfügung gestellt von Dr. Michael Groll (TUM), Abbildung 62 im Anhang	
pDest17	<i>E. coli</i>	Expressionsvektor für die Expression des ADH Gens YqhD aus <i>E. coli</i> , zur Verfügung gestellt von Dr. Gerlind Sulzenbacher ( <i>Architecture et fonction des macromolécules biologiques, Universités d'Aix-Marseille</i> ), Abbildung 63 im Anhang	AmpR (Ampicillin Resistenz) in <i>E. coli</i>

---

Tabelle 49: Promotor Sequenzen der verwendeten Expressions-Vektoren

<b>Vektor</b> [Organismus, Promotor]	<b>Promotor Sequenz [5' – 3']</b>
pET-3a, pRSET, pET- 28b-SUMO, pDest17 [ <i>E. coli</i> , T7]	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
pTA963 und pTA1228 [ <i>Haloferax volcanii</i> , p.tnaA]	GCC CGT TCT CGT CGC GCT CTC GAA GCT GTT TCT CGC GCG CTC GCG TCC TCG AAA GTG ACA TCG CTC GAC CGG TGG TCG TCG GCG GTC GCT GAA GTC GGC TCG TGG CGA GAA CGG AAC AGC CGG CGA CAC CGA TGC ACA CAC CAG TCC ACG AGC GCC GAA AAC CGG GCG TAG CCC CTC GAT TTT CCG CCT GCC GAT TAC TTC ACA TTC GCG GAC CTA TTG CGC A

Verwendete Primer

Tabelle 50: Verwendete Primer-Sequenzen.  $T_m^*$  gibt die Schmelztemperatur der an die DNA Sequenz bindenden Basenpaare wieder. Kursiv = Vektorspezifische Sequenz, Fett = Restriktionsschnittstelle, normal = Genspezifische Sequenz, Unterstrichen = Änderung der Gensequenz (Einführung eines *his<sub>6</sub>-tags* für SP\_A beziehungsweise Mutation in ADH/D1)

Name	Funktion	Sequenz [5' - 3']	$T_m$
AFD_F_sumo	Klonierung des AF_D Gens in den Vektor	<i>CAC AGA GAA CAG ATT GGT <b>GGA</b></i> <b>TCC</b> ATG GAG TTC CGC CAC AAC	60°C
AFD_R_sumo	pET28b-SUMO ( <i>E. coli</i> ), mittels SLIC Klonierung	<i>GCG GCC GTT ACT AGT <b>GGA TCC</b></i> TTA CAG CGA TTT GCG GAA G	60°C
AZA_F_sumo	Klonierung des AZ_A Gens in den Vektor	<i>CAC AGA GAA CAG ATT GGT <b>GGA</b></i> <b>TCC</b> ATG GAG CTC AAA TTC TTT	58°C
AZA_R_sumo	pET28b-SUMO ( <i>E. coli</i> ), mittels SLIC Klonierung	<i>CAC</i> <i>GCG GCC GTT ACT AGT <b>GGA TCC</b></i> TTA GGA GAC TTT CAG CAC AC	53°C
SPA_F_sumo	Klonierung des SP_A Gens in den Vektor	<i>CAC AGA GAA CAG ATT GGT <b>GGA</b></i> <b>TCC</b> ATG AGC AAG AAA ACG AAC	61°C
SPA_R_sumo	pET28b-SUMO ( <i>E. coli</i> ), mittels SLIC Klonierung	<i>TTC G</i> <i>GCG GCC GTT ACT AGT <b>GGA TCC</b></i> TTA TTC GAC CGT AGG CAA GC	60°C
pTA963_F	Überprüfung	<i>AGC CCC TCG ATT TTC CGC CTG</i>	62°C
pTA963_REV	erfolgreicher Klonierung im Vektor pTA963 für <i>Haloferax volcanii</i>	<i>ATG ACC ATG ATT ACG CCA AG</i>	53°C
pRSET- SP_A-HisF	Änderung des <i>His<sub>6</sub>-tags</i> von SP_A von N- terminal zu C-terminal	<i>CTT TAA GAA GGA GAT ATA <b>CAT</b></i> <b>ATG</b> ATG AGC AAG AAA ACG AAC	53°C
pRSET- SP_A-HisR	im Vektor pRSET (mittels SLIC Klonierung)	CT GCA GAT CTC GAG CTC <b>GGA</b> <b>TCC</b> TTA <u>GTG ATG GTG ATG GTG</u> <i>ATG GGCTTCGACCGTAGGCAAGC</i>	55°C

T7	Überprüfung	<i>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG</i>	53°C
T7 term	erfolgreicher Klonierung in die <i>E. coli</i> Vektoren: pRSET A, pET-3a, pET28b-SUMO, pDest17	<i>CTA GTT ATT GCT CAG CGG T</i>	55°C
ADH/D1- H227A	Mutation des Histidins an Position 277 zu Alanin des Mn-ADH/D1 Gens in pTA963 zur Expression in <i>Haloferax</i> <i>volcanii</i> (mittels <i>QuickChange</i> Mutagenese)	<i>CCA CGC CAT GGC <u>CGC</u> CCC CAT</i> <i>CAG CGG C</i>	81°C
ADH/D1- V161A	Mutation des Valins an Position 161 zu Alanin des Mn-ADH/D1 Gens in pTA963 zur Expression in <i>Haloferax</i> <i>volcanii</i> (mittels <i>QuickChange</i> Mutagenese)	<i>CCC CCT ACG CCG <u>CCA</u> TCA CCA</i> <i>ACC C</i>	78°C

### 4.3.3 Verwendete Restriktionsenzyme

Tabelle 51: Verwendete Restriktionsenzyme. Der Zirkumflex (^) stellt die Restriktionsstelle des Enzyms dar. Y = Pyrimidinbasen (C oder T), R = Purinbasen (A oder G)

Name	Erkennungssequenz	Hersteller
BamHI	5'...G <sup>^</sup> GATCC...3' 3'...CCTAG <sup>^</sup> G...5'	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

NdeI	5'...CA <sup>^</sup> TATG...3' 3'...GTAT <sup>^</sup> AC...5'	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
NotI	5'...GC <sup>^</sup> GGCCGC...3' 3'...CGCCGG <sup>^</sup> CG...5'	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
XbaI	5'...T <sup>^</sup> CTAGA...3' 3'...AGATC <sup>^</sup> T...5'	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
DpnI	5'...GA(CH <sub>3</sub> ) <sup>^</sup> TC...3' 3'...CT <sup>^</sup> A(CH <sub>3</sub> )G...5'	Teil des <i>Quick Mutagenese Kits</i> (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
FspAI	5'...RTGC <sup>^</sup> GCA...3' 3'...YACG <sup>^</sup> CGTR...5'	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)

#### 4.3.4 Gen Synthese

Die RSBP Gene, optimiert für die Expression in *E. coli* [AF\_D, AZ\_A und SP\_A] wurden von Eurofins Scientific (Luxembourg) und optimiert für *Haloferax volcanii* von Gene Art (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bezogen. Die *E. coli* optimierten Gene wurden im Vektor pEX-K und für *Haloferax volcanii* in dem vorab zur Verfügung gestellten Vektor pTA963 geliefert.

#### 4.3.5 Mikrobiologische Methoden

##### Handhabung von *E. coli* Zellen

Arbeiten mit *E. coli* erfolgten stets unter sterilen Bedingungen mit sterilen Medien (autoklaviert oder steril filtriert) und sterilen Gefäßen. Die Anzucht von *E. coli* Stämmen erfolgte in LB-Medium (Tabelle 4) bei 37°C und 140 U min<sup>-1</sup>. Selektionsmarker wurden den Zielplasmiden (Tabelle 48) entsprechend gewählt. Das Wachstum wurde spektroskopisch anhand der optischen Dichte (1 cm Schichtdicke) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600nm</sub>) bestimmt. Medium sowie Agarplatten wurde bei Raumtemperatur bis zu drei Monaten gelagert, beziehungsweise mit Selektionsmarkern bei 4°C bis zu einem Monat. Zellkulturen, oder Kolonien auf Agarplatten wurden bei 4°C bis zu einem Monat aufbewahrt. Für Langzeitlagerung wurden Cryo-Stocks erstellt. Hierzu wurden 15 mL *E. coli* Zellen, ausgehend von einer Einzelkolonie, bis zur logarithmischen Phase angezogen (OD<sub>600nm</sub> = 0,4

– 0,6) und bei 4.500 xg für 10min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL LB Medium mit 30% v/v Glycerin vermischt, in *Cryo Tubes* (Nunc, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) transferiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### Handhabung von *Haloferax volcanii* Zellen

Obwohl *Haloferax volcanii* keine sterile Handhabung benötigt, wurden alle Arbeiten stets unter sterilen Bedingungen mit sterilen Medien (autoklaviert oder steril filtriert) und sterilen Gefäßen durchgeführt um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. *Haloferax volcanii* Stämme wurden in Hv-YPC Medium (Tabelle 8) angezogen, bei 45°C und 140 U min<sup>-1</sup>, wenn nicht anders beschrieben. Zur Anzucht der untransformierten Zellen wurde dem Medium Thymidin zugegeben. Das Wachstum wurde spektroskopisch anhand der optischen Dichte (1 cm Schichtdicke) bei einer Wellenlänge von 650 nm (OD<sub>650nm</sub>) bestimmt. Medium sowie Agarplatten wurde bei Raumtemperatur bis zu drei Monaten gelagert, beziehungsweise bei 4°C bis zu sechs Monaten. Zellkulturen, oder Kolonien auf Agarplatten wurden bei Raumtemperatur bis zu einem Monat aufbewahrt. Für Langzeitlagerung wurden Cryo-Stocks erstellt. Hierzu wurden 15 mL *Haloferax volcanii* Zellen, ausgehend von einer Einzelkolonie, bis zur logarithmischen Phase angezogen (OD<sub>600nm</sub> = 0,4 – 0,6) und bei 4.500 xg für 10min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL 20% v/v Glycerin Hv-YPC Medium gelöst, in *Cryo Tubes* (Nunc, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) transferiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### Ermittlung der Biotrockenmasse von *Haloferax volcanii*

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurde ein 1,5 mL *Eppendorf* Reagenzgefäß für 48 h bei 80°C getrocknet und anschließend die exakte Masse bestimmt. Anschließend wurden 1 mL gut durchmischter Zellsuspension in dieses 1,5 mL *Eppendorf* Reagenzgefäß gefüllt und bei 13.000 xg für 10 min abzentrifugiert. Nach sorgfältigem abnehmen des Überstands wurde das Pellet für 48 h bei 80°C getrocknet, bevor es mit 1% w/v NaCl Lösung gewaschen wurde um Salzreste zu entfernen und erneut für 48 h bei 80°C getrocknet wurde. Anschließend wurde das *Eppendorf* Reagenzgefäß erneut gewogen.

#### Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Als Vorkultur wurden 5 mL LB-Medium (Tabelle 4) mit *E. coli* inokuliert und über Nacht bei  $140 \text{ U min}^{-1}$  und  $37^\circ\text{C}$  in einem konischen Zentrifugenbecher (15 mL) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 100 mL SOB Medium (Tabelle 13) mit 1 mL der Vorkultur inokuliert und in einem 500 mL Schüttelkolben bei  $140 \text{ U min}^{-1}$  und  $37^\circ\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,4 – 0,6 inkubiert. Nach Inkubation über 10 min auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert,  $4.500 \text{ xg}$ , 8 min,  $4^\circ\text{C}$ . Das Pellet wurde in CCMB80 Puffer (40 mL, Tabelle 14) resuspendiert. Nach Inkubation über 30 min auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert,  $1.600 \text{ xg}$ , 8 min,  $4^\circ\text{C}$ . Das Pellet wurde in CCMB80 Puffer (4 mL) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die resultierende Zelllösung wurde in Fraktionen von  $100 \mu\text{L}$  in gekühlte (auf Eis) Eppendorf Reagenzgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Nach der ersten Inkubation auf Eis wurde darauf geachtet, daß die Zellen nicht wärmer als  $4^\circ\text{C}$  wurden. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt.

#### Erzeugung elektro-kompetenter *E. coli* Zellen

1 L LB-Medium (Tabelle 4) wurde mit *E. coli* inokuliert und bei  $140 \text{ U min}^{-1}$  und  $37^\circ\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,4 – 0,6 inkubiert. Nach Inkubation über mindestens 30 min auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert,  $4.500 \text{ xg}$ , 15 min,  $4^\circ\text{C}$ . Das Pellet wurde mit 40 mL vorgekühltem und sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und erneut abzentrifugiert,  $4.500 \text{ xg}$ , 15 min,  $4^\circ\text{C}$ . Das Pellet wurde in vorgekühltem sterilen 20% v/v Glycerin (40 mL) gelöst, für 45 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert  $1.600 \text{ xg}$ , 8 min,  $4^\circ\text{C}$ . Das Pellet wurde in vorgekühltem sterilen 20% v/v Glycerin (10 mL) gelöst und in Fraktionen von  $100 \mu\text{L}$  in gekühlte (auf Eis) Eppendorf Reagenzgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Nach der ersten Inkubation auf Eis wurde darauf geachtet daß die Zellen nicht wärmer als  $4^\circ\text{C}$  wurden. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt.

#### 4.3.6 Klonierung

##### Plasmidpräparation – *E. coli*

Zur Präparation von Plasmiden aus *E. coli* wurde das *peqGold Plasmid Miniprep Kit II* (peQlab, Erlangen, Germany) nach Herstellerangaben genutzt. Für Plasmide mit hoher Replikationsanzahl wurden 15 mL eines Plasmid tragenden *E. coli* Stamms in selektivem LB-Medium (Tabelle 4) bei 37°C und 140 U min<sup>-1</sup> über Nacht angezogen und für Plasmide mit geringer Replikationszahl 45 mL. Die Plasmid Elution erfolgte mit sterilem ddH<sub>2</sub>O (100 µL), welches zuvor auf 60°C erhitzt wurde. Falls nötig wurde die DNA Lösung in einer SAVANT SPD 2010 Speed Vac (Thermo Scientific, Waltham, CA, USA) konzentriert.

##### DNA Isolation – *Haloferax volcanii*

Zur Isolation von genomischer und Plasmid DNA aus *Haloferax volcanii* wurde dem Protokoll des Halohandbooks (135) gefolgt. Hierzu wurden 1,5 mL dichter Zellkultur bei maximaler Geschwindigkeit in einem Eppendorf Reaktionsgefäß für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde komplett entfernt und das Pellet wurde in 400 µL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, was eine Zellyse zur Folge hatte. Proteine welche an die DNA banden wurden durch 10 minütige Inkubation der Lösung bei 70°C denaturiert. Die Lösung konnte direkt zu Sequenzierungs- oder PCR-Zwecken genutzt werden.

##### Spektroskopische Bestimmung der DNA Konzentration

Konzentration und Reinheit von DNA wurde aus der Absorption der DNA Lösung bei 260 nm ( $A_{260\text{nm}}$ ) und  $A_{280\text{nm}}$  photometrisch mittels des Nanodrop 2000c Spektrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Wobei  $A_{260\text{nm}}$  die DNA Menge repräsentiert und  $A_{280\text{nm}}$  die Proteinmenge. Reine DNA sollte daher einen Quotienten von  $A_{280\text{nm}} A_{260\text{nm}}^{-1}$  von  $1,8 \pm 0,2$  zeigen.

##### Polymerase Kettenreaktion - PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (136) wurde zur Vervielfältigung von DNA genutzt, sowie zur Überprüfung erfolgreicher Klonierung (Kolonie-PCR).



Zur DNA Vervielfältigung wurde die *Phusion*<sup>®</sup> *High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB, Ipswich, USA) nach Herstellerangaben genutzt. Zur Vervielfältigung von GC reichen DNA Abschnitten wurde der GC Puffer genutzt, sowie 4% v/v DMSO.

Tabelle 52: PCR Mix – DNA Vervielfältigung [50µL]

Komponente	Menge
5x <i>Phusion HF</i> oder <i>GC</i> Puffer	10 µL [1x]
10 mM dNTPs	1 µL [200 µM]
Ausgangs DNA	100 ng
2 U µL <sup>-1</sup> <i>Phusion DNA Polymerase</i>	0,5 µL [1 U]
25 µM Vorwärts Primer	1,0 µL [0,5 µM]
25 µM Rückwärts Primer	1,0 µL [0,5 µM]
DMSO	2,0 µL [4% v/v]
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 µL

Im Falle der Kolonie-PCR wurde eine PCR direkt auf Zellen (*E. coli*) oder Zelllysate (*Haloferax volcanii*) durchgeführt. Als Polymerase wurde die *Taq DNA Polymerase* in Form des *Taq 2x Master Mix* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Zur Vervielfältigung GC reicher DNA Sequenzen wurde 4% v/v DMSO hinzugefügt.

Tabelle 53: DNA Mix - Kolonie PCR [25µL]

Komponente	Menge
ddH <sub>2</sub> O	11,0 µL ( <i>E. coli</i> ) beziehungsweise 8,0µL ( <i>Hfx. volcanii</i> )
Ausgangs DNA	Mit Pipette abgeschabte Zellen ( <i>E. coli</i> ) oder 3,0 µL DNA Extrakt ( <i>Hfx. volcanii</i> )
DMSO	1 µL [4% v/v]
25 µM Vorwärts Primer	0,25 µL [0,25 µM]
25 µM Rückwärts Primer	0,25 µL [0,25 µM]
2x <i>Taq mix</i> (Polymerase, Puffer, dNTPs)	12,5 µL [1x]

Für beide Arten der PCR wurde als Anlagerungstemperatur der Primer, im Falle von DMSO Zugabe 58°C gewählt, ansonsten die geringere Schmelztemperatur der verwendeten Primerpaare (Tabelle 50). Ebenso wurde im Falle von GC reichen Sequenzen die Elongationszeit auf 1,5 min kbp<sup>-1</sup> verlängert. Es wurden 34 Zyklen gewählt. Die PCR wurde entweder in einem Bio-Rad C1000<sup>TM</sup> *thermal cycler* oder Bio-Rad T100<sup>TM</sup> *thermal cycler* durchgeführt (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

In beiden Arten der PCR wurde ihr Erfolg mittels Agarose Gelelektrophorese bestimmt. Primer, dNTPs, Polymerase und andere Verunreinigungen, entstanden durch die PCR, wurden mit dem *PCR purification kit* (Qiagen, Venlo, Niederlande), nach Herstellerangaben entfernt. Die DNA wurde mit sterilem ddH<sub>2</sub>O, welches auf 60°C vorgewärmt wurde, eluiert.

### Agarosegelelektrophorese

Agarosegele wurde mit 1% w/v Agarose in TAE Puffer (Tabelle 22) erstellt und in eine *Mini-Sub Cell GT Cell* (Bio-Rad, Hercules, MA, USA) gegeben, welche mit TAE Puffer gefüllt wurde. Die mittels 10x DNA Ladepuffer (Tabelle 21) versetzte DNA wurde für 35 min bei 140 V in einem *PowerPac<sup>TM</sup> Universal Power Supply* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) aufgetrennt. Als Referenz wurde die peQLab 1kb DNA Leiter (peQLab, Erlangen, Deutschland (Tabelle 23) verwendet. Nach Auftrennung wurden die Gele nach Herstellerangaben in einem VersaDoc 5000 MP Gel Imaging System mit UV Transilluminator (Bio-Rad, Hercules, MA, USA) entwickelt.

Analytische Gele wurden mit 10 µL beziehungsweise 20 µL DNA (in Ladepuffer) versetzt, je nach Kammgröße. Gele wurden mittels dem *Imaging Versa Doc 4000MP System* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) analysiert.

Präparative Gele wurden durch die Vereinigung von 4 Taschen des kleinen Gelkammes mittels *tesa* Streifen (tesa, Norderstedt, Deutschland) erstellt. Die resultierende Kammer wurde mit bis zu 2 µg DNA beladen.

### Gelextraktion von DNA

Zielgene nach PCR Amplifikation oder Restriktionsverdau, wurden präparativ aufgetrennt. Das Gel wurde auf einem UV-Leuchttisch (UVP, Upland, CA, USA) mit der energetisch ärmsten Belichtung illuminiert (365 nm). Die Zielbande wurde schnellstmöglich mit einem

Skalpell (VWR, Radnor, PA, USA) ausgeschnitten (Belichtungszeit  $\leq 3$  Sek.). Die DNA wurde aus dem Gel mittels des *peqGold Cycle Pure Kits* (peQlab, Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert. Zum Schmelzen der Agarose wurde hierzu eine Temperatur von 63°C gewählt. Elution erfolgte mit 50  $\mu$ L auf 60°C vorgewärmtem, ddH<sub>2</sub>O. Die Lösung wurde anschließend in einer SAVANT SPD 2010 Speed Vac (Thermo Scientific, Waltham, CA, USA) konzentriert.

#### Restriktionsverdau

Zum Verdau der Ziel-DNA wurden 10 U Restriktionsenzym (Tabelle 51) mit den in den Herstellerangaben definierten Puffern, per  $\mu$ g DNA eingesetzt und bei 37°C über Nacht verdaut. Die DNA Konzentration betrug maximal 4  $\mu$ g DNA per 100  $\mu$ L Ansatz. Im Falle von *NdeI* und *BamHI* wurde ein Doppelverdau durchgeführt. Die resultierenden Fragmente wurden entweder mittels Gelextraktion oder, im Falle vom Verdau von PCR Fragmenten, dem *PCR purification kit* (Qiagen, Venlo, Niederlande) gereinigt.

#### DNA-Ligation

Ligation von DNA erfolgt mittels 20 U der T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) nach Herstellerangaben. Das Verhältnis von Vektor zu Ziel-DNA war 1:3 mit 0,075 pmol Vektor (ungefähr 100 ng) und 0,025 pmol Ziel-DNA. Die Reaktion wurde im 10  $\mu$ L Maßstab für 16 h bei 16°C durchgeführt.

#### SLIC – Sequence and ligation independent cloning

Ziel dieser Methode ist eine Sequenz- sowie Ligationsunabhängige Klonierung, des Ziel-Gens aus Vektor A in Vektor B. SLIC Klonierung wurde in dieser Arbeit verwendet um die für eine Expression in *E. coli* Codon optimierten Gene AF\_D, AZ\_A sowie SP\_A aus dem Transportvektor (pEX-K) in den Expressionsvektor mit SUMO-Protease Schnittstelle (pET28b-SUMO) zu transferieren.

Die SLIC Klonierung basiert auf einem finalen Assemblierungsschritt bei welchem eine DNA Polymerase mit Exonukleasefunktion verwendet wird, die T4 DNA Polymerase. Die T4 DNA Polymerase baut sowohl Teile der komplementären doppelsträngigen DNA des

Zielgens und Zielvektors ab und erzeugt *sticky ends* und fügt zudem die komplementär überlagernden Fragmente zusammen, wie von Li und Elledge beschrieben (121).

Kurz dargestellt:

1. PCR des Zielgens mit passenden Primern welche Teile des Zielgens, einer Restriktionsschnittstelle (hier *BamHI*) und des Zielvektors (pET28b-SUMO) enthält. Als DNA-Templat wird der Ursprungsvektor (pEX-K) genutzt.
2. Nach Abschluß der PCR erfolgte der Verdau des Ursprungsvektors (pEX-K) mittels eines Restriktionsenzym welches nicht innerhalb der Zielgene schneidet, hier *XbaI*.
3. Restriktionsverdau des Zielvektors mittels derselben Restriktionsschnittstelle der Primer, hier *BamHI*.
4. Reinigung aller DNA Sequenzen mittels des *peqGOLD Cycle-Pure Kits* (VWR-peQlab, Radnor, PA, USA) nach Herstellerangabe, um kurze DNA Fragmente welche die Assemblierung stören (Primer) zu entfernen und vorherige Puffer sowie Enzyme (aus der PCR und dem Restriktionsverdau) zu entfernen.
5. Assemblierung: Der gereinigte Zielvektor (100 ng) sowie das gereinigte Zielgen (40 ng) werden mit den entsprechenden Puffern (1x BSA, 1% v/v NEB buffer 2) sowie der T4 DNA Polymerase (Final 1,5 U) in einem 10 µL Ansatz vermengt und für 140 Sek. bei Raumtemperatur und anschließend 10 min auf Eis inkubiert.
6. Anschließend erfolgt die Transformation in chemisch kompetente Zellen mit 7 µL der Reaktionsmischung.

### QuickChange Mutagenese

Zur Erzeugung spezifischer Mutanten wurde das *QuickChange Site-Directed Mutagenese Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), leicht modifiziert, nach Herstellerangaben verwendet. Die passenden Primer (Tabelle 50) wurden mit dem *QuickChange Primer Design* Programm (Abschnitt 4.6) erstellt. Zu Beginn wurde eine PCR mit den komplementären Primern auf dem methylierten Ausgangsplasmid erstellt. Hierzu wurden 100 ng Ausgangs-DNA in einem 50 µL Ansatz angesetzt. Aufgrund des hohen GC Gehalts wurde der PCR 4% v/v DMSO zugefügt.

Tabelle 54: QuickChange Mutagenese PCR

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
10x <i>QuikChange Multi reaction buffer</i>	5 µL [1x]
Ausgangs DNA	100 ng
Mutations-Primerpaar	[je 100 ng]
dNTP mix	2,0 µL
DMSO	2,0 µL [4% v/v]
<i>QuikChange Multi enzyme blend</i>	2,0 µL
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 µL

Als Anlagerungstemperatur wurden 68°C gewählt und basierend auf dem hohen GC Gehalt wurde die Elongationszeit um 50% auf 45 Sek. kbp<sup>-1</sup> verlängert. Eine Verringerung der Verlängerungstemperatur von 72°C auf 68°C, sowie eine Verkürzung der Zyklen von 35 auf 18 verbesserten die PCR Effizienz.

Das Ausgangsplasmid wurde mit 2 µL des mitgelieferten DpnI Restriktionsenzym (Tabelle 51) nach Herstellerangaben über 3 h verdaut. Anschließend wurden 50 µL an chemisch kompetenten *E. coli* Zellen mit 3 µL der Verdauungslösung transformiert.

#### Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde bis zu 5 µL Ziel-DNA (ungefähr 150 ng DNA) zu je 50 µL der Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock der Zellen für 45 Sek. bei 42°C in einem *ThermoMixer*<sup>®</sup> C (Eppendorf, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), mit direkt anschließender Inkubation für 10 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit 850 µL LB-Medium (Tabelle 4) oder derselben Menge an SOC Medium (Tabelle 5) versetzt und für 1 h bei 37°C und 300 U min<sup>-1</sup> inkubiert. Abschließend wurden 100 µL der Zellsuspension auf selektiven Agarplatten (Tabelle 4) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die verbleibenden 900 µL der transformierten Zellen wurden über Nacht bei 4°C gelagert. Trat kein Wachstum auf den Agarplatten auf, wurden die sedimentierten Zellen erneut ausplattiert.

Die DNA von Einzelzellen wurden mittels Kolonie PCR amplifiziert und sequenziert. Aus derselben Kolonie wurde im Falle einer positiven Sequenzierung eine Stammkultur erstellt.

### Transformation elektro-kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation von elektro-kompetenten Zellen wurde der Bio-Rad *Gene Pulser Xcell* mit *PC module* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mit Elektroporationsküvetten (2 mm Spalte) von VWR (Radnor, PA, USA), nach Herstellerangaben mit 2,5 kV genutzt. Hierzu wurden 50  $\mu\text{L}$  elektro-kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und in die vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Anschließend wurden die Ziel-DNA (max. 3,5  $\mu\text{L}$  des Ligations-Mix [ $\sim 35$  ng DNA], beziehungsweise bis zu 5  $\mu\text{L}$  an Plasmid DNA [ $\sim 150\text{ng}$ ]) zu den Zellen hinzugefügt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 850  $\mu\text{L}$  SOC Medium (Tabelle 5) aufgenommen und für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  und  $300\text{ U min}^{-1}$  inkubiert. Die weiteren Schritte waren analog zur Transformation chemisch kompetenter Zellen.

### Transformation von *Haloferax volcanii*

Die Transformation sowie die Erstellung kompetenter *Haloferax volcanii* Zellen erfolgte wie im Vorfeld beschrieben (37, 135). Hierzu wurden 10 mL *Haloferax volcanii* Zellkultur bis zu einer  $\text{OD}_{650\text{nm}}$  von 0,8 bei  $45^\circ\text{C}$  und  $140\text{ U min}^{-1}$  in, mit Thymidin versetztem Hv-YPC Medium (Tabelle 8) angezogen. Im Gegensatz zu *E. coli* wurden alle Schritte mit ungekühlten Lösungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend bei  $4.500\text{ xg}$  für 8 min abzentrifugiert und das Pellet in 2 mL gepufferter Sphaeroplast Lösung [A] (Tabelle 15) aufgenommen und in ein 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und erneut abzentrifugiert,  $4.500\text{ xg}$ , 8 min. Das Pellet wurde in 600  $\mu\text{L}$  gepufferter Sphaeroplast Lösung [A] aufgenommen. Von dieser Lösung wurden für jede folgende Transformation 200  $\mu\text{L}$  in ein neues 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde ein 20  $\mu\text{L}$  Tropfen der 0,5 M EDTA Lösung [F] (Tabelle 20) an die Außenseite des Gefäßes gegeben und dieses vorsichtig und mehrmals invertiert zum Mischen. Anschließend folgte eine Inkubation über 10 min zur Bildung von Sphaeroplasten. Währenddessen wurde die Plasmid-DNA vorbereitet indem 10  $\mu\text{L}$  dam<sup>-</sup> DNA mit einer Konzentration zwischen 1 – 2  $\mu\text{g}$  mit 15  $\mu\text{L}$  ungepufferter Sphaeroplast Lösung [B] (Tabelle 16) sowie 5  $\mu\text{L}$  der 0,5 M EDTA Lösung [F] (Tabelle 20) vermennt wurden. Nach Ablauf der vorherigen Inkubation von 10 min wurde die DNA-Mixtur in derselben Weise zu den Zellen zugegeben wie die EDTA Lösung. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Währenddessen wurde durch Mischen von 180  $\mu\text{L}$  PEG 600 mit

120  $\mu\text{L}$  ungepufferter Sphaeroplast Lösung [B] (Tabelle 16) bis zur kompletten Homogenisierung, eine 60% v/v PEG 600 Lösung erstellt. Nachdem die 5 min Inkubation beendet war wurden 250  $\mu\text{L}$  der 60% v/v PEG 600 Lösung in derselben Weise wie die EDTA Lösungen zur Zelllösung hinzugegeben und 10 mal invertiert mit anschließender Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 1,5 mL Sphaeroplasten-Verdünnungslösung [C] (Tabelle 17) zugegeben, mehrmals invertiert zum Mischen und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem anschließendem Abzentrifugieren der Zelllösung (4.500 xg, 8 min) wurde der Überstand vollständig entnommen, und 1 mL Sphaeroplast Regenerationslösung [C] (Tabelle 17) zum Pellet gegeben. Das Pellet wurde dann mittels einer abgeschnittenen 1000  $\mu\text{L}$  Pipettenspitze als Ganzes von der Gefäßwand gelöst und die Lösung mit Pellet in ein 15 mL Kulturröhrchen mit luftdurchlässigem Deckel (*Culture Tubes, Plastic with Dual-Position Caps*, VWR Radnor, PA, USA) überführt, ohne das Pellet weiter zu lösen. Die Lösung wurde ungestört für 1,5 – 2 h bei 45°C inkubiert, bevor das Pellet durch Anstoßen des Kulturröhrchens resuspendiert wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 3 – 4 h bei 45°C und langsamem Schütteln. Anschließend wurde die Zelllösung in ein 2 mL *Eppendorf Reaktionsgefäß* überführt und abzentrifugiert (4.500 xg, 8min). Das Pellet wurde in 1 mL Transformanden Verdünnungslösung [E] (Tabelle 19) gelöst. Anschließend wurden die Zellen auf Hv-YPC Agarplatten (Tabelle 9) in 100  $\mu\text{L}$  Lösung per Platte ausplattiert und für mindestens 5 Tage bei 45°C inkubiert.

### DNA Sequenzierung

Sequenzierung von DNA erfolgte entweder im *Bioscience-Core-lab* der *King Abdullah University of Science and Technology* (KAUST, Thuwal, KSA), oder bei *Eurofins* (Martinsried, Deutschland), nach Vorgaben des jeweiligen Instituts. Die Sequenzierungsprimer (Tabelle 50) wurden separat zur Verfügung gestellt. Die Richtigkeit der Sequenz wurde mittels Überlagerung der erhaltenen und der zu erwartenden DNA Sequenz überprüft (Abschnitt 4.6).

### 4.3.7 Genexpression und Zellaufschluss

#### Genexpression und Zellaufschluss in *E. coli* im Schüttelkolben

Für die Expression nicht toxischer Gene wurde das gewünschte Volumen an Zelllösung in selektivem LB-Medium (Tabelle 4) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 bei 37°C und 140 U min<sup>-1</sup> angezogen. Die Expression rekombinanter Gene wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte für mindestens 6 h, üblicherweise über Nacht. Für toxische Proteine, einschließlich der Protease SP\_A erfolgte die Induktion bei einer OD<sub>600nm</sub> von 1,5 über 3 h. Nach der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (4.500 xg, 30min, 4°C) und entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C gelagert und anschließend auf Eis für die Weiterverwendung aufgetaut.

Das Zellpellet wurde in vorgekühltem Ni-NTA Puffer A mit 0,5 M NaCl (Tabelle 36) resuspendiert (5 mL Puffer pro 1 g Zellpellet) und es wurden 10 mM DNase sowie 1 mM Pefabloc beziehungsweise *cOmplete<sup>TM</sup> Protease Inhibitor* (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) zugegeben. Bei der Genexpression der Protease SP\_A wurde teilweise auf eine Zugabe von Proteaseinhibitor verzichtet. Die Lösung wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mittels eines *Cell-Disruptors* (Constant Systems LTD, Low March, England) bei 2.000 bar und 4°C in drei Zyklen aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde bei 45.000 xg über 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde direkt zur Proteinreinigung weiterverwendet. Die Reinigung der SUMO Protease erfolgt in leicht abgeänderter Weise und ist im Folgetext beschrieben (Abschnitt 4.4.3).

#### Genexpression in *Haloflex volcanii* H1424 und H1895 im Schüttelkolben

Ausgehend von der initialen Beschreibung der Genexpression, bereitgestellt von Dr. Thorsten Allers, ursprungswerte in eckigen Klammern, wurde das folgende Expressionsschema entwickelt.

Das gewünschte Volumen an Zelllösung wurde in Hv-YPC Medium (Tabelle 8) bis zu einer OD<sub>650nm</sub> von 0,5 [0,02] bei 45°C und 140 U min<sup>-1</sup> angezogen. Die erste Induktion erfolgte mit 3 mM [1,3 mM] L-Tryptophan (Tabelle 12), gefolgt von einer Temperaturverringerung auf 42°C. Im Falle der Expression von Genen aus dem RSBP *Kebrit* wurde anschließend die Temperatur auf 32°C reduziert. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>650nm</sub> von 0,8 [0,4], ungefähr 16 h inkubiert, bevor die zweite Induktion mit 6 mM [3 mM] L- Tryptophan



(Tabelle 12) erfolgte. Die Zellen wurden anschließend für weitere 4 h [1 h] inkubiert. Nach der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (4.500 xg, 30min, 4°C) und entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C gelagert und anschließend auf Eis für die Weiterverwendung aufgetaut.

#### Genexpression in *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor

In Zusammenarbeit mit Eva Strillinger (TUM) und Dr. Thorsten Allers (*University of Nottingham*) wurde der biofilmfreie *Haloferax volcanii* Expressionsstamm H1895 erzeugt (durch Deletion der Gene Hvo\_1033 und Hvo\_1034) und folgendes Protokoll zur Genexpression im Rührkesselreaktor entwickelt (131).

Das gewünschte Volumen an Zelllösung (0,5 – 2,0 L) wurde in Hv-YPC+ Medium (Tabelle 10) im Rührkesselreaktor (DasGip, Eppendorf, Eppendorf, Deutschland) über bis zu einer OD<sub>650nm</sub> von 0,4, was in etwa 3 g<sub>cdw</sub> L<sup>-1</sup> entspricht, angezogen, mit einer gelösten Sauerstoffkonzentration von > 50%, einem konstanten pH von 7,4 (eingestellt mittels NaOH und HCl), 45°C und einer Rührerdrehzahl zwischen 400 – 1200 U min<sup>-1</sup>. Anschließend erfolgte die erste Induktion mit 6 mM L-Tryptophan (Tabelle 12), sowie eine Verringerung der Temperatur auf 42°C. Die Zellen wurden für weitere 16 h inkubiert bevor die zweite Induktion mit 3 mM L-Tryptophan (Tabelle 12) erfolgte. Nach 4 h Inkubation wurden die Zellen geerntet. Nach der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (4.500 xg, 30 min, 4°C) und entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C gelagert und anschließend auf Eis für die Weiterverwendung aufgetaut.

Der exakte Aufbau sowie die Handhabung des Rührkesselreaktors ist im Folgetext erklärt.

#### Zellaufschluss von *Haloferax volcanii* H1895 und H1424

Das Zellpellet wurde in vorgekühltem Ni-NTA Puffer A mit 2,0 M NaCl (Tabelle 36) resuspendiert (5 mL Puffer pro 1 g Zellpellet) und 1 mM *Pefabloc* beziehungsweise *cOmplete*<sup>TM</sup> Protease Inhibitor (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) hinzugefügt. Im Falle der Protease SP\_A wurde der Modifizierte Ni-NTA Puffer (Tabelle 38) für Zellaufschluss und Reinigung verwendet, sowie wenn angemerkt auf den Proteaseinhibitor verzichtet. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall in einem Q500 System (QSONICA, Newtown, CT,

USA) mit einer 1,9 cm Probe (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit 30% Amplitude und 50% Pulszeit, bei 1 min Gesamtzeit pro 1 mL Zellaufschluss.

Der Zellaufschluss wurde bei 45.000 xg über 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde direkt zur Proteinreinigung weiterverwendet.

Alternativ wurden zwei weitere Methoden zum Zellaufschluss verwendet welche jedoch sowohl in einem geringeren Anteil an aufgeschlossenen Zellen als auch einem erhöhten Verbrauch an DNase resultieren.

i) Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator: Das Zellpellet wurde in vorgekühltem Ni-NTA Puffer A mit 2 M NaCl (Tabelle 36) resuspendiert (15 mL Puffer pro 1 g Zellpellet) und es wurden 300 mM DNase sowie 1 mM Pefabloc beziehungsweise *cOmplete<sup>TM</sup> Protease Inhibitor* (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) zugegeben. Die Lösung wurde für mindestens 60 min auf Eis inkubiert bis die Lösung keine Viskosität mehr zeigte. Die Zellen wurden mittels eines *Cell-Disruptors* (Constant Systems LTD, Low March, England) bei 2.700 bar und 4°C in drei Zyklen aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde bei 45.000 xg über 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde direkt zur Proteinreinigung weiterverwendet.

ii) Zellaufschluss mittels Gefrierzyklen: Das Zellpellet wurde in vorgekühltem Ni-NTA Puffer A mit 2 M NaCl (Tabelle 36) resuspendiert (10 mL Puffer pro 1 g Zellpellet) und es wurden 300 mM DNase sowie 1 mM Pefabloc beziehungsweise *cOmplete<sup>TM</sup> Protease Inhibitor* (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) zugegeben. Die Zellen wurden über 6 Zyklen bei -20°C gefroren und anschließend bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Zellaufschluss wurde bei 45.000 xg über 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde direkt zur Proteinreinigung weiterverwendet.

### **4.3.8 *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor**

#### Satzverfahren von *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor

In einem analytischen DasGip Reaktor (DasGip, Eppendorf, Eppendorf, Deutschland) mit maximal 8 x 2,0 L Rührkesselreaktoren und mitgelieferter Software wurden verschiedene Wachstums sowie Genexpressionsstudien durchgeführt. Falls nicht anderweitig beschrieben erfolgte die Kultivierung in 1 L, bei 45°C, pH 7,4 und 50% an gelöstem Sauerstoff. Der

Reaktor wurde mit einer Rührerdrehzahl im Bereich von 400 – 1200 U min<sup>-1</sup> im aeroben Batch Verfahren genutzt. Der Sauerstoffgehalt wurde über Rührerdrehzahl, Luftfluß (maximal 40 L h<sup>-1</sup>) und Einspeisung von reinem Sauerstoff (O<sub>2</sub>) automatisch geregelt. Die Einstellung des pHs erfolgte durch automatische Regelung mit 2 M NaOH sowie 2 M HCl (Tabelle 3). Zur Unterdrückung von Schaumbildung wurde automatisch eine 0,05% v/v Antischaum Lösung (Antifoam A) zugegeben. Das Zellwachstum wurde photometrisch im Reaktor bei OD<sub>600nm</sub> und nach Probenentnahme bei OD<sub>650nm</sub> überprüft. Das verwendete DasGip Rührkesselreaktorsystem bestand aus folgenden Komponenten. Steuerungscomputer mit der Software *DASGIP control 4.0 revision 622*.

Module: 2x DasGip *OD4* (Analyse der OD<sub>600nm</sub>), 2x DasGip *PH4 PO4 RD4* (Kontrolle von pH, Redox, sowie Füllstands Sensoren), 2x DasGip *GA4* (Abgasanalyse), 4x DasGip *MP8* (Zuflußpumpen, jeweils 4 pro Reaktor), 8x DasGip *MX4/4* (Gaszufuhr), 2x DasGip *BioBlock* (zur Temperaturkontrolle sowie Halterung der Reaktoren), 8x *SR1500ODLS* (500 – 2000 mL) *overhead stirrer bottle* (die eigentlichen Reaktorgefäße), 2x *TC4SC4* (Steuerung der Temperatur sowie der Rührergeschwindigkeit).

Sensoren: 8x DasGip OD Sensor (Detektion der OD<sub>600nm</sub>), 8x DasGip pH Elektrode (pH Sensor), 8x DasGip Redox Elektrode (Analyse des Redoxpotentials für anaerobe Kultivierung), 8x DasGip pO<sub>2</sub> Elektrode (Analyse des gelösten Sauerstoffs), 8x DasGip level Sensor (Analyse des Füllstands zur Kontrolle von Schaumbildung).

Jeder Reaktor verfügte über zwei 6-Blatt-Scheibenrührer welche im Abstand von 4 cm angebracht waren. Folgende Abbildung zeigt einen schematischen Überblick des Reaktoraufbaus für einen Reaktor.

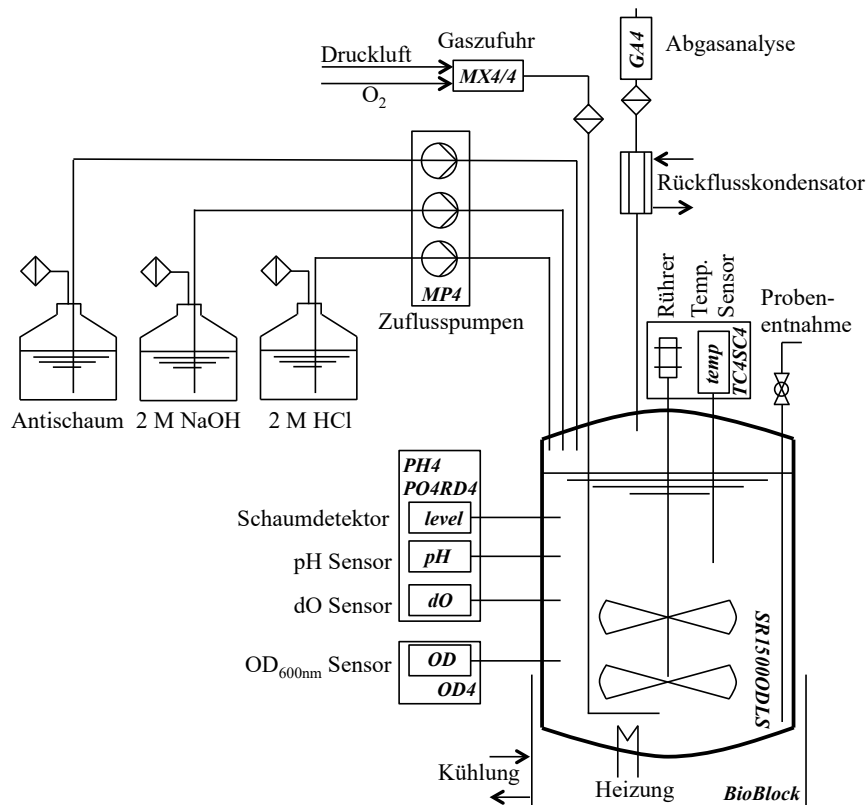


Abbildung 14: Schematischer Aufbau eines Rührkesselreaktors des genutzten DasGip Systems im aeroben Satzverfahren. In kursiv sind die Herstellerbezeichnungen der jeweiligen Komponenten angegeben

### Versuchsdurchführung der *Haloferax volcanii* H1895 Anzucht im Rührkesselreaktor

Aufgrund des hohen Salzgehaltes der verwendeten Hv-YPC (Tabelle 8) und Hv-YPC+ Medien (Tabelle 10) wurde der Rührkesselreaktor ohne pH- und pO<sub>2</sub>-Sonde mit VE-H<sub>2</sub>O gefüllt autoklaviert. Nach der Autoklavierung wurde das VE-H<sub>2</sub>O verworfen und der Reaktor mit sterilem Medium gefüllt. Anschließend wurden die zuvor, nach DasGip Herstellerangaben kalibrierten pH und pO<sub>2</sub>-Sonden mit 70% v/v 2-Propanol sterilisiert und mit ddH<sub>2</sub>O gespülten Sonden in den Reaktor transferiert. Nach Temperierung des Reaktors wurde das Inokulum zugegeben. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur OD<sub>650nm</sub> Bestimmung entnommen.

Nach Abschluß der Kultivierung wurde das Medium entnommen und separat autoklaviert. Der Rührkesselreaktor wurde mit Autoklavierpuffer (Tabelle 11) gefüllt, autoklaviert und anschließend manuell gereinigt.

## 4.4 Proteinreinigung und analytische Methoden

### 4.4.1 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie – Ni-NTA

Die zu reinigenden Genkonstrukte in dieser Arbeit waren mit einem His<sub>6</sub>-tag versehen, was eine Reinigung mittels Immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) mit Ni<sup>2+</sup> als immobilisiertes Kation ermöglichte.

Der Zielprotein enthaltende Überstand des Zelllysats nach der Genexpression (siehe vorherigen Abschnitt) wurde entweder direkt genutzt und bei 4°C auf eine in korrespondierendem Ni-NTA Puffer A (Tabelle 36) equilibrierte 5 mL *HisTrap*<sup>TM</sup> Säule (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) mit einer Flußrate von maximal 1,5 mL min<sup>-1</sup> geladen. Hierzu wurde ein *ÄKTAprime plus System* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) genutzt, welches ebenfalls im Vorfeld in korrespondierendem Ni-NTA Puffer A (Tabelle 36) equilibriert war. Zur Abtrennung von Verunreinigungen wurde ein Gradient von 0 – 50% v/v Ni-NTA Puffer B (Tabelle 37) mit einer Fraktionsgröße von 2 mL gefahren. Zur initialen Reinigung der Säule folgte ein anschließender Elutionsschritt mit 100% v/v Puffer B. Durch einen online UV-Detektor des verwendeten *ÄKTAprime plus Systems* wurde, durch eine Absorption bei 280 nm, die Elution von verschiedenen Proteinen dargestellt. Im Falle der Protease SP\_A wurde der Modifizierte Ni-NTA Puffer (Tabelle 38) für Zellaufschluss und Reinigung verwendet.

Nach Abschluß der Reinigung wurde das System mit ddH<sub>2</sub>O gespült und unter 20% v/v Ethanol gesetzt. Nach jeder Proteinreinigung wurde die 5 mL *HisTrap*<sup>TM</sup> Säule gereinigt. Hierzu wurde die Säule entgegen der normalen Flußrichtung an eine Peristaltikpumpe (Watson Marlow 101U/R, Cornwall, UK) mit maximal 5 mL min<sup>-1</sup> Flußrate angeschlossen. Die Säule wurde anschließend mit Stripping Puffer (Tabelle 42) gespült, bis die Färbung verschwand. Anschließend wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen an partikelfreiem ddH<sub>2</sub>O gespült. Anschließend wurde die Säule unter partikelfreies 1 M NaOH (Tabelle 3) gesetzt und über 2 h mit 0,1 mL min<sup>-1</sup> Flußrate gespült und darauffolgend mit 4 Säulenvolumen partikelfreiem ddH<sub>2</sub>O gespült. Anschließend erfolgte eine Reinigung mit partikelfreiem 30% v/v 2-Propanol über 2 Säulenvolumen bevor die Säule so lange mit ddH<sub>2</sub>O gespült wurde bis der pH des Eluats neutral war. Zur neuen Beladung der Säule mit Ni-Ionen wurde diese mit 2 Säulenvolumen partikelfreiem 200 mM NiSO<sub>4</sub> (52,6 g NiSO<sub>4</sub> x 6 H<sub>2</sub>O L<sup>-1</sup>) gespült.

Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit partikelfreiem ddH<sub>2</sub>O bis das ungebundene Ni<sup>2+</sup> von der Säule gewaschen war. Die Säule wurde unter 20% v/v Ethanol gesetzt und bei 4°C gelagert.

#### 4.4.2 Pufferaustausch – Dialyse

Zum Austausch von Puffern wurde die Proteinlösung für Volumen größer 5 mL in Zelluloseschläuche transferiert (*Dialysis Tubing cellulose membrane avg. Flat*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit einer Rückhaltung von Proteinen (*molecular weight cut off*, MWCO) > 14 kDa. Kleinere Volumina wurden in *Slide-A-Lyzer™ MINI* Dialyse Geräten (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit einem MWCO von 10 kDa transferiert. Proben wurden über Nacht bei 4°C in vorgekühltem Zielpuffer mit einem Volumenverhältnis von > 1<sub>Proteinlösung</sub> : 1000<sub>Dialyselösung</sub> dialysiert

#### 4.4.3 SUMO Protease

Zwischen His<sub>6</sub>-tag und den Zielproteinen wurde teilweise eine SUMO-Protease-Bindestelle, Smt3p aus *Saccharomyces cerevisiae* eingefügt. Nach der Proteinreinigung des Zielgens wurden mit Hilfe einer 1:100 Verdünnung der mit His<sub>6</sub>-tag versehenen SUMO Protease, Ulp1, aus *Saccharomyces cerevisiae*, zum gereinigten Zielprotein, während der Dialyse in den Ni-NTA Puffer A mit entsprechender Salzkonzentration, 500 mM (Tabelle 36) über Nacht verdaut. Anschließend erfolgte eine zweite Ni-NTA Reinigung, wobei nun der entfernte His<sub>6</sub>-tag, die SUMO-Protease und alle unspezifisch bindenden Proteine an die Säule binden sollten und das Zielprotein in der mobilen Phase zu finden sein sollte. Nach Verdau verbleibt ein Serin am N-terminus des Zielproteins.

Das SUMO-Proteasegen wurde für 24 h bei 20°C nach einer Induktion bei OD<sub>600nm</sub> = 0,5 mit 1 mM IPTG, in *E. coli* exprimiert. Der Zellaufschluss erfolgte ohne Zugabe des Proteaseinhibitors *Pefabloc* beziehungsweise *cOmplete™ Protease Inhibitor* (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz). Die Reinigung der SUMO-Protease erfolgte mit SUMO-Protease Reinigungspuffern A und B (Tabelle 40) und das Protein wurde direkt im Anschluß gegen SUMO Lagerpuffer dialysiert (Tabelle 41). Die Proteinlösung wurde bei 4.500 xg für 15 min bei 4°C zentrifugiert um Aggregate zu entfernen. Das resultierende Protein im Überstand wurde auf 0,4 – 0,6 mg mL<sup>-1</sup> konzentriert und in Fraktionen von 1 mL in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 4.4.4 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde genutzt um die Reinheit sowie die Größe von gereinigten Proteinen zu ermitteln, sowie als Grundlage für Western Blots. Gele mit einer Schichtdicke von 0,75 mm wurden mit einem *Mini-PROTEAN® Tetra Cell System* von Bio-Rad erstellt (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Hierzu wurde zuerst das Trenngel (Tabelle 26), gefolgt vom Sammelgel (Tabelle 24), mit Kamm, in den Kammern nach Herstellerangaben erstellt. Die Proteinauftrennung erfolgte entweder bei einer Stromstärke von 40 mA Gel<sup>-1</sup> für 35 min in SDS-Laufpuffer (Tabelle 28), oder für Publikationsabbildungen und Western Blots bei 40 V Gel<sup>-1</sup> für 1 h und 30 min. Zur Energieversorgung wurde ein *PowerPac™ Universal Power Supply* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) verwendet. Zur Kontrolle der Proteingröße wurde in eine Tasche jedes Gels 10 µL des Proteinstandards *peQlab Protein Marker I* (peQlab, Erlangen, Deutschland) zugegeben. Für Gele, die später für einen Western Blot eingesetzt werden sollten, wurde dieser Proteinstandard durch einen vorgefärbten (*PageRuler™ prestained protein ladder*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), oder mit His<sub>6</sub>-tag versehen Standard (*Bench Mark™ his-tagged Protein Standard*, Invitrogen, Karlsbad, USA) ersetzt. Vor dem Probenauftrag wurde die Proteinlösung im Verhältnis von 10:1 oder höher mit SDS-Auftragspuffer (Tabelle 31) sowie ddH<sub>2</sub>O vermennt, um eine Proteinkonzentration von 3 mg mL<sup>-1</sup> zu erreichen und für mindestens 15 min bei 95°C inkubiert. Es wurden 10 µL (= 30 µg) Proteinlösung aufgetragen. Zur Analyse von Pellets wurde ~1 µL Pellet in 180 µL ddH<sub>2</sub>O gelöst vor Zugabe des SDS-Auftragspuffers.

Nach der Proteinauftrennung wurden die TCE behandelten Gele in einem *Gel Doc™ EZ Gel Documentation System* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) entwickelt und analysiert. TCE freie Gele wurden für 5 min in ~ 50°C warmer Coomassie Färbelösung (Tabelle 29) gefärbt und anschließend für 3x 10 min in ~ 50°C warmer Entfärbelösung (Tabelle 30) entfärbt und anschließend mit VE-H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Dokumentation wurden Scans der SDS-Gele erstellt (*HP scanjet 5590*, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA).

#### 4.4.5 Western-Blot

Western Blot wurde in einer *MiniTrans-Blot Zelle®* (Bio-Rad, Hercules, MA, USA) durchgeführt.

Nach Auftrennung der Proteine in einer TCE-freien SDS-PAGE wurde das ungefärbte Gel 3x für 10 min in ddH<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur gewaschen, um überschüssiges Salz aus den Proben zu entfernen. Anschließend wurde das Gel für 10 – 15 min in WB Transfer Puffer (Tabelle 32) inkubiert. Die Westernblot Membran einschließlich des Übertragungspapiers wurde in Form eines *Blotting Sandwich Immobilon-P systems* mit PVDF Membran (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) bezogen. Die *Immobilon-P* Membran wurde für 15 Sek. in Methanol aktiviert und für 2 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden sowohl die Membran als auch die Übertragungspapiere für 2 min in Transfer Puffer equilibriert. Anschließend wurde das Übertragungssandwich sowie die Blot Zelle nach Herstellerangaben erstellt (Kathode, Schwamm, Übertragungspapier, SDS-Gel, *Immobilon-P* Membran, Übertragungspapier, Schwamm, Anode). Die Kammer wurde mit Transferpuffer, Magnetrührer und Eisblock gefüllt und die Übertragung fand bei 4°C über 1 h 15 min bei 350 mA für ein Gel und bei 1 h 50 min und 350 mA bei 2 Gelen statt. Zur Energieversorgung wurde ein *PowerPac™ Universal Power Supply* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) verwendet. Nach dem Transfer wurde das SDS-Gel zur Überprüfung des Transfer Erfolges gefärbt. Die Western Blot-Membran wurde in ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

Zur immunologischen Detektion wurde die Western Blot Membran für 1 h bis über Nacht in Blockier-Puffer (Tabelle 35) bei 4°C und langsamen Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz in 1x TBST (Tabelle 34) gewaschen. Im Anschluß wurde die Membran in 1x TBST mit einer 1:5.000 Verdünnung an Primärantikörper gegen His<sub>6</sub>-tag (6x-His Tag Monoclonal Antibody, 4A12E4, Thermo Fisher, Waltham, CA, USA) gegeben und für 1 h bis über Nacht bei 4°C und langsamem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran 4x für je 5 min mit frischem 1x TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Blockier-Puffer (Tabelle 35) mit einer 1:4.000 Verdünnung an Sekundärantikörper gegen Maus welcher mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) fusioniert war (Ziege Anti-Maus IgG (H+L) Antikörper, HRP (62-6520), Thermo Fisher, Waltham, CA, USA) gegeben und für 1 h bei 4°C und langsamem Schütteln inkubiert. Anschließend folgten 4 Waschschrte in frischem 1x TBST für jeweils 5 min.

Zur Chemilumineszenzdetektion wurde die *Clarity™ Western ECL Blotting Substrate* (Bio-Rad, Hercules, MA, USA) in einem Verhältnis von 1:1 zu einem Endvolumen von 3 mL gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf



die Membran geträufelt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Signal wurde mittels einem *VersaDoc 5000 MP Gel Imaging System* mit UV Transilluminator (Bio-Rad, Hercules, MA, USA) im Modus *chemiluminescent detection Ultra* für 3 min bei maximaler Apertur aufgenommen.

#### 4.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration und Proteinkonzentrierung

Die spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration basierte auf dem Lambert-Beerschen Gesetz.

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} * c * d$$

Gleichung 1: Das Lambert-Beersche Gesetz

$E_{\lambda}$  = Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge,  $\varepsilon_{\lambda}$  = Extinktionskoeffizient bei einer bestimmten Wellenlänge,  $c$  = Proteinkonzentration [ $\text{mol L}^{-1}$ ],  $d$  = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers.

Die Messung erfolgte in einem *Nanodrop 2000c* Spektrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) bei einer Wellenlänge von 280 nm mit Messungen bei den Schichtdicken 1,0 sowie 0,05 mm. Der Extinktionskoeffizient für das Zielprotein bei 280 nm, sowie die molekulare Masse wurde mittels *Protparam* (Abschnitt 4.6), basierend auf der Aminosäuresequenz berechnet. Durch Angabe des Extinktionskoeffizienten sowie der molekularen Masse wurde die Proteinkonzentration in  $\text{mg mL}^{-1}$  durch das mitgelieferte Computerprogramm, basierend auf der Absorptionsdifferenz zur Leerprobe berechnet.

Um die Proteinkonzentration für Folgeanwendungen zu erhöhen, wurde die Proteinlösung in Konzentratoren (Amicon Ultracel<sup>®</sup> Merck Millipore, Billerica, MA, USA) mit einem MWCO von 10 kDa transferiert und bei 4.500 xg und 4°C zentrifugiert bis die gewünschte Konzentration erreicht war.

#### 4.4.7 Trypsin-Verdau zur Proteinidentifizierung

Der Trypsin Verdau wurde mit Hilfe des analytischen Kernlabors an der *King Abdullah University of Science and Technology* durchgeführt. Ausgewählte Banden eines mit Coomassie gefärbten SDS-Gels, ohne TCE, wurden mit einem Skalpell (VWR, Radnor, PA, USA) ausgeschnitten und zum Verdau mit 200 ng Trypsin (Worthington Biochemical Corp.,

Lakewood, NJ, USA) nach Thomas et al. (137) vorbereitet. Die Detektion der Peptidfragmente sowie ihre Sequenzierung erfolgten an einem *LTQ Orbitrap* Massenspektrometer (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) nach Thomas et al. (137).

#### 4.4.8 Protein Massenbestimmung mittels MALDI-TOF

Die Matrix unterstützte Laser Ionisation (*matrix assisted laser desorption/ionization* - MALDI) mit Flugzeitanalyse (*time of light* - TOF) wurde zur genauen Bestimmung von Proteinmassen genutzt. Hierzu wurde zur Zielproteinlösung ( $\sim 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) 0,1% v/v TFA (Trifluoressigsäure) zugegeben und diese anschließend nach Herstellerangaben mit C4 ZipTips (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) entsalzt. Salzfremde Proteine wurden in einer 1:1 oder 1:10 Verdünnung mit gesättigter  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) Matrix in 30%, v/v ACN (Acetonitril) und 0,1%, v/v TFA gemischt und auf eine Edelstahl-Trägerplatte geträufelt (Bruker Daltonic GmbH, Leipzig, Deutschland). Nachdem die Probe getrocknet war, wurden Massenspektren nach Herstellerangaben an einem *microflex MALDI-TOF* Massenspektrometer (Bruker, Daltonic GmbH, Leipzig, Deutschland) gemessen. Die Messungen wurden mit der mitgelieferten *Flex analysis 3.0* Programm (B Bruker, Daltonic GmbH, Leipzig, Deutschland) prozessiert. Vor der Proteinmessung wurde eine Kalibrierung des Gerätes mit dem *Proteinstandard II* (Bruker, Daltonic GmbH, Leipzig, Deutschland), bestehend aus Trypsinogen (23.982 Da), Protein A (einfach geladen 44.614 Da und doppelt geladen 22.307 Da) in HCCA Matrix durchgeführt. Für jeden Kalibrierungsschritt wurden 1.000 Laser Schüsse im linearen positiven Modus mit 5x 200 Schuß pro Probe aufgenommen. Die Zielproteine wurden auf dieselbe Weise gemessen.

#### 4.4.9 Protein Massenbestimmung mittels LC-ESI-MS/TOF

Für die Flüssigkeitschromatographie (*liquid chromatography* - LC) gekoppelte Elektrospray Ionisation (*electrospray ionization* - ESI) gefolgt von einer Massenbestimmung durch Flugzeitanalyse (MS/TOF) wurde 0,04 mM Proteinlösung gegen 5% v/v ACN (Acetonitril) und 0,1% v/v Ameisensäure dialysiert. Die dialysierte Proteinprobe wurde mittels eines *Agilent 1260 HPLC Systems* mit einer *Advantage<sup>TM</sup> 300<sup>+</sup>* C4 Säule (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) aufgetrennt. Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von  $0,5 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$  und einem Gradienten auf 80% v/v ACN in 8 min.

Die Massenbestimmung erfolgte anschließend durch direkte Injektion in ein BRUKER *maXis HD*<sup>TM</sup> ESI-TOF (Bruker, Daltonics GmbH, Leipzig, Deutschland) nach Herstellerangaben.

#### 4.4.10 Gefriertrocknung

100  $\mu$ L gereinigte Proteinlösung wurde in einem *benchtop K lyophiliser* von VirTis (SP Scientific, Warminster, USA) bei einer Kondensatortemperatur von  $-95^{\circ}\text{C}$  und einem Vakuum von 5  $\mu$ bar über 2 h bei Raumtemperatur gefriergetrocknet. Vor dem Gefriertrocknen wurde sowohl die Proteinlösung als auch der Probenhalter in flüssigem Stickstoff gefroren. Um einen Verlust der Proteinlösung beim aufbauen des Vakuums zu verhindern wurde das Eppendorfreaktionsgefäß (Eppendorf, Deutschland) mit der Proteinlösung durch Whatman<sup>®</sup> Filterpapier (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) verschlossen. Vor der Proteinaktivitätsmessung wurde die Proteinlösung durch Zugabe derselben Menge von ddH<sub>2</sub>O wie dem entfernten Wasser wiederhergestellt.

### 4.5 Enzymcharakterisierung

#### 4.5.1 Ermittlung der Enzymaktivität – ADH

Aktivitätsmessungen wurden wie in einer früheren Arbeit beschrieben (30) durchgeführt. Hierzu wurden für den oxidativen Schritt der Reaktion der ADH-Aktivitätspuffer (Tabelle 43) verwendet und 0,35  $\mu$ M an ADH, in entsprechendem Lagerpuffer (Tabelle 39), mit 4% v/v Substrat eingesetzt, falls nicht anders beschrieben. Für die Untersuchung des Einflusses verschiedener Metallionen auf die Aktivität wurde das Protein vor der Messung für 30 min bei Raumtemperatur mit 20 fachen Überschuß (molar) an, in ddH<sub>2</sub>O gelösten Metallsalzen, inkubiert (Abschnitt 4.5.3). Im Falle von sauerstoffempfindlichen Metallen [ $\text{Fe}^{2+}$ ] erfolgte die Aktivitätsbestimmung in einer *Glovebox* unter Stickstoffatmosphäre mit sauerstofffreien Puffern (Verdrängung des Sauerstoffs durch blubbern mit Argon Gas für 20 min).

Um den Einfluß von  $\beta$ -Mercaptoethanol (BME) auf die Enzymaktivität zu bestimmen wurden Reaktionsansätze wie in einer früheren Arbeit beschrieben (138) durchgeführt. Hierzu wurden Reaktionsansätze im ADH-BME-Aktivitätspuffer (Tabelle 44) mit 0,35  $\mu$ M an ADH, in entsprechendem Lagerpuffer (Tabelle 39) und 4% v/v Substrat, falls nicht anders beschrieben durchgeführt.

Falls nicht anderweitig beschrieben wurden die Reaktionen bei einer Temperatur der Reaktionslösung von 60°C durchgeführt. Für verschiedene Durchmusterungen wurden die einzelnen Bedingungen wie angegeben geändert. Als Kontrolle fungierten dieselben Ansätze ohne Substrat, Kofaktor oder Enzym.

#### 4.5.2 NAD[P](H) Umsatz bezogene Berechnung der spezifischen Aktivität

Zur Aktivitätsbestimmung wurde der Umsatz von NAD[P]<sup>+</sup> zu NAD[P]H spektroskopisch über die Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 340 nm nach folgenden Gleichungen bestimmt.

$$sE_A = \frac{\Delta NAD[P](H) * V_R}{\Delta t * v * c_p}$$

Gleichung 2: Ausgangsgleichung zur Ermittlung der spezifischen Aktivität über den Umsatz von NAD[P]<sup>+</sup> zu NAD[P]H

$sE_A$  = Spezifische Aktivität des Enzyms in U mg<sup>-1</sup>

$\Delta NAD[P](H)$  = Konzentrationsänderung des Kofaktors NAD[P]<sup>+</sup> zu NAD[P]H in  $\mu$ M

$V_R$  = Reaktionsvolumen in  $\mu$ L

$\Delta t$  = Verstrichene Zeit in Minuten

$v$  = Volumen des eingesetzten Proteins in  $\mu$ L

$c_p$  = Konzentration des eingesetzten Proteins in mg L<sup>-1</sup>

Zur spektroskopischen Bestimmung der Konzentrationsänderung des Kofaktors wurde die Gleichung wie folgt abgeändert.

$$E_A \left[ \frac{U}{mL} \right] \equiv E_A \left[ \frac{mol}{min * L} \right] = \frac{\Delta A_{340nm}}{\Delta t [min]} * \frac{V_{total} [mL]}{v_{Protein} [mL] * \epsilon_{NAD[P]H,340nm} \left[ \frac{L}{mol * cm} \right] * d [cm]}$$

Gleichung 3: Aktivität des Enzymes basierend auf dem NAD[P](H) Umsatz

$E_A$  = Aktivität des Enzyms in U mL<sup>-1</sup> (1 U = Umsatz von 1  $\mu$ mol NAD[P]<sup>+</sup> zu NAD[P]H min<sup>-1</sup>)

$\Delta A_{340nm}$  = Absorptionsänderung bei 340 nm (bedingt durch den Kofaktorumsatz)

$V_{total}$  = Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes in mL

$V_{\text{Protein}}$  = Volumen der eingesetzten Proteinlösung  
 $\epsilon_{\text{NAD[P]H},340\text{nm}}$  = Extinktionskoeffizient des oxidierten Kofaktors bei 340nm =  $6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$   
 $d$  = Länge des Strahlengangs, 1 cm für Photometer, 0,56 cm für Plattenleser (96-Well Platte mit 200 $\mu\text{L}$  gefüllt)

Zur Umrechnung in die spezifische Aktivität wurde die erhaltene Aktivität durch die Proteinkonzentration dividiert.

$$sE_A \left[ \frac{U}{\text{mg}} \right] = \frac{E_A \left[ \frac{U}{\text{mL}} \right] \text{ (aus Gleichung 3)}}{c_p \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]}$$

Gleichung 4: Spezifische Aktivität

$E_A$  = Aktivität des Enzyms in  $U \text{ mL}^{-1}$  (siehe Gleichung 3)  
 $c_p$  = Konzentration des eingesetzten Proteins in  $\text{mg L}^{-1}$

Michaelis-Menten-Kinetik Analyse erfolgte durch Messung der Aktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Die erhaltenen Werte wurden mit dem Programm *Graphpad Prism* (Abschnitt 4.6) mit Nutzung der nicht linearer Regression und der Standardeinstellung für Michaelis-Menten Kinetik, analysiert.

### 4.5.3 Metallentfernung und Austausch

Um den Anteil an Metallen im Protein zu verringern wurde das Protein (in Lagerpuffer) zweimal dialysiert. Zunächst gegen Lagerpuffer mit entsprechender Salzkonzentration (Tabelle 39) und mit 10 mM EDTA Anteil, anschließend gegen Lagerpuffer ohne EDTA.

Zum Austausch des Metalls im aktiven Zentrum wurde das metallfreie Protein für 30 min bei Raumtemperatur mit 20 fachen Überschuß an gewünschtem Metall inkubiert. Folgende Metallsalze wurden aufgrund ihres typischen Vorkommens in Proteinen beziehungsweise ähnlichen Ionenradien zu häufig vorkommenden Metallen gewählt und in einer 10 mM Lösung in ddH<sub>2</sub>O eingesetzt: MgCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, FeC<sub>2</sub>O<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, YCl<sub>3</sub>, SmCl<sub>3</sub>, HoCl<sub>3</sub>,

Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Im Falle von Sauerstoffsensitiven Metallen [Fe<sup>2+</sup>] erfolgte der Metallaustausch in einer *Glovebox* unter Stickstoffatmosphäre, mit sauerstofffreien Puffern.

#### **4.5.4 Einfluß organischer Lösungsmittel und Salz auf die Enzymaktivität**

Der Einfluß organischer Lösungsmittel wurde analysiert, indem direkt vor der Aktivitätsmessung die angegebene Menge an DMSO, Methanol oder THF (Tetrahydrofuran) zur Reaktionslösung gegeben und gemischt wurde. Als Kontrolle wurde dieselbe Menge Aktivitätspuffer (Tabelle 43) zur Reaktion gegeben.

Zur Analyse der Reaktivierung durch Salz wurde das Protein gegen Lagerpuffer (Tabelle 39) mit der angegebene Menge an Salz dialysiert. Das dialysierte Protein wurde anschließend in Aktivitätspuffer (Tabelle 43) mit der angegebenen Salzkonzentration gegeben, mit Metall Ionen inkubiert. Die Aktivität wurde nach der Substrat und Kofaktorzugabe gemessen (Abschnitt 4.5.1).

#### **4.5.5 Produktbestimmung – GC-MS**

Der Umsatz von Produkt zu Substrat wurde gaschromatographisch an einem *Agilent Technology 7890A* GC System mit *5975C inert XL EI/CI MSD* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) Messeinheit und einer *J&W HP-5ms Ultra* Inert Säule, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µM (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) ermittelt. Das folgende Temperaturprogramm wurde verwendet: 3 min konstant bei 80°C, gefolgt von einem Temperaturgradienten auf 280°C bei 25°C min<sup>-1</sup> und einem finalen Schritt für 6 min bei 280°C. Als Probe wurde ein enzymatischer Umsatz im 10 mL Ansatz wie im Vorfeld beschrieben durchgeführt (Abschnitt 4.5.1). Das Produkt wurde durch dreimaliges Ausschütteln mit je 10 mL Ethylacetat aus der wäßrigen Phase extrahiert. Zur Entfernung von Verunreinigung vor der Messung wurde die organische Phase, welche das Produkt enthält, anschließend durch eine Pasteur Pipette mit Silica-Säule und MgSO<sub>4</sub> gespült.

#### **4.5.6 Stabilitätsmessungen**

Zur Bestimmung der Proteininstabilität unter verschiedenen organischen Lösungsmitteln wurde die Proteinlösung bei einer finalen Konzentration von 0,35 µM in Lagerpuffer (Tabelle 39) mit den angegebenen Konzentrationen der angegebenen organischen Lösungsmittel bei

Raumtemperatur inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Enzymaktivität wurde wie im Vorfeld beschrieben (Abschnitt 4.5.1) bestimmt.

Zur Ermittlung der Proteinstabilität unter verschiedenen Salzkonzentrationen wurde die Proteinlösung gegen die angegebenen Konzentrationen an NaCl dialysiert. Anschließend wurde die Enzymaktivität direkt oder nach Zugabe verschiedener Lösungsmittelmengen und Arten wie im Vorfeld beschrieben (Abschnitt 4.5.1) bestimmt.

Die Temperaturstabilität des Proteins wurde durch Inkubation des Proteins in Lagerpuffer (Tabelle 39) bei den angegebenen Temperaturen durchgeführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proteinproben entnommen und die Enzymaktivität wie im Vorfeld beschrieben (Abschnitt 4.5.1) bestimmt.

#### **4.5.7 Aggregationstemperatur**

Zur Bestimmung der Aggregationstemperatur wurde ein *stargazer 2<sup>TM</sup>* (Harbinger Biotechnology and Engineering Corporation, Toronto, Canada) nach Herstellerangaben verwendet. Das System bestimmt die Aggregationstemperatur, durch schrittweises Erhitzen der Proteinprobe und gleichzeitiger optischer Analyse der Aggregationsbildung. Hierzu wurde das gereinigte Protein mit Lagerpuffer (Tabelle 39) auf eine finale Konzentration von 1 mg mL<sup>-1</sup> eingestellt und für 30 min mit den Angegeben Mengen der Angegebenen Metallionen bei Raumtemperatur inkubiert.

#### **4.5.8 Ermittlung der Enzymaktivität – $\beta$ -Galaktosidase**

Der Transformationserfolg der  $\beta$ -Galaktosidase wurde untersucht, indem eine 10 mg mL<sup>-1</sup> X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) Lösung, gelöst in DMF (Dimethylformamid) auf die Agarplatte mit den transformierten Kolonien gesprüht wurde. Eine blaue Färbung der Zellen nach ~ 24 h Inkubation zeigte den Transformationserfolg.

Aktivitätsbestimmung der halophilen  $\beta$ -Galaktosidase in Zellsuspension wurde photometrisch wie in einer früheren Arbeit beschrieben (131) durchgeführt. Für den Ansatz im 1 mL Maßstab wurden 700  $\mu$ L  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitätspuffer (Tabelle 45) mit 100  $\mu$ L Zellsuspension sowie 100  $\mu$ L 2% v/v Triton X-100 vermennt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Zelllyse inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ L einer 8 mg L<sup>-1</sup> ONPG (*ortho*-Nitrophenyl-*para*-Galaktosid) Lösung (in  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitätspuffer, Tabelle 45) gestartet. Die Absorptionsänderung bei 405 nm

wurde photometrisch über 30 min bestimmt, wie in einer früheren Arbeit beschrieben (135). Die Hintergrundaktivität von Zellen ohne exprimierte  $\beta$ -Galaktosidasen wurde von der Messung subtrahiert.

#### 4.5.9 ONPG Umsatz bezogene Berechnung der spezifischen Aktivität

Die spezifische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase für den Umsatz von ONPG (*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) zum Farbstoff ONP (*o*-Nitrophenol) erfolgte auf ähnlicher Weise wie in einer früheren Arbeit beschrieben (135).

$$sE_A \left[ \frac{U}{OD_{650nm}} \right] = \frac{\Delta A_{405nm}}{\Delta t [min]} * \frac{V_{total} [mL]}{v_{Hfx.Zellen} [mL] * \epsilon_{ONP,405nm} \left[ \frac{L}{mol * cm} \right] * d [cm] * OD_{650nm}}$$

Gleichung 5: spezifische Aktivität  $\beta$ -Galaktosidase

$sE_A$	= Spezifische Aktivität des Enzyms in U $OD_{650nm}^{-1}$ [1 U = Umsatz von 1 $\mu$ mol ONPG zu ONP $min^{-1}$ ]
$\Delta A_{405nm}$	= Absorptionsänderung bei 405 nm (bedingt durch den ONPG Umsatz)
$V_{total}$	= Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes in mL
$v_{Hfx.Zellen}$	= Volumen der eingesetzten Zelllösung (0,1 mL)
$\epsilon_{ONP,405nm}$	= Extinktionskoeffizient für <i>o</i> -nitrophenol bei 405 nm = 3.300 $M^{-1} cm^{-1}$ (83)
$d$	= Länge des Strahlengangs, 1 cm
$OD_{650nm}$	= Maß für die Zelldichte

#### 4.5.10 Ermittlung der Proteaseaktivität

Die Ermittlung der Proteaseaktivität erfolgte über die Freisetzung eines Azo-Farbstoffes in das Medium nach Hydrolyse des Substrates Azocasein durch die Protease. Der Farbstoff wurde spektroskopisch im Medium bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert. Hierzu wurden 100  $\mu$ L Zellysat beziehungsweise verschiedene Menge an gereinigtem Protein in Lagerpuffer (Tabelle 39) mit einer 1% w/v Azocaseinlösung, mit 50 mM Natriumhydrogencarbonat ( $NaHCO_3$ ) und 10% v/v Glycerin in Lagerpuffer mit verschiedenen Salzkonzentrationen und unterschiedlichem pH für 30 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mittels 600  $\mu$ L einer 10% v/v



TCA Lösung gestoppt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13.000 xg für 5 min und 4 °C wurden 800 µL des Überstands mit 200 µL 1,8 M NaOH Lösung vermischt und die Absorption bei 405 nm bestimmt.

#### 4.5.11 Größenausschlusschromatographie

Das Molekulargewicht sowie Oligomerisierungszustände von halophilen Zielproteinen wurden mittels Größenausschlusschromatographie an einer *Superdex*<sup>TM</sup> 200 10/300 Säule (GE-Healthcare, Little Chalfont, UK) in einer *ÄKTAPurifier UP10* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) bestimmt. Das System und die Säule wurden mit einem 2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,9) equilibriert, wie von Timpson et al. in einer früheren Arbeit beschrieben (30). Das Zielprotein wurde auf eine Konzentration von 67,7 µg mL<sup>-1</sup> in Protein Lagerpuffer mit 2 M NaCl (Tabelle 39) verdünnt und 200 µL dieser Lösung wurden auf die Säule geladen und bei einer Flußrate von 0,5 mL min<sup>-1</sup> analysiert. Da kein halophiler Proteinstandard verfügbar ist wurde ein kommerziell verfügbarer Standard von Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) bestehend aus Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Blue Dextra (5 kDa) unter demselben Hochsalz-Laufpuffer wie die Zielproteine analysiert und die Elutionszeiten bestimmt.

#### 4.5.12 Kleinwinkel-Röntgenstreuung - SAXS

Die Kleinwinkel-Röntgenstreuung (*small angle x-ray scattering*, SAXS) wurde zur Bestimmung des Oligomerisierungszustands sowie zur Strukturanalyse des Zielproteins in Lösung in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Stefan Arold (*King Abdullah University of Science and Technology*) verwendet. Die Messungen erfolgten am Synchrotron SOLEIL (*French national synchrotron facility*, Saint-Aubin, Frankreich) im *Swing Labor* der zugehörigen Strahlenführung des Synchrotrons mit einem Energiebereich zwischen 5-17 keV mit ~2 eV Auflösung. Proteinlösungen wurden entweder bei Raumtemperatur, 10°C, oder bei 60°C gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit verschiedenen Salzkonzentrationen und Pufferzugaben in Reihen zwischen 3 und 19 mg mL<sup>-1</sup> aufgenommen.

Für die Messungen wurde eine Röntgenstrahlwellenlänge von  $\lambda = 1,03 \text{ \AA}$  genutzt. Der Abstand zwischen Probe und Detektor betrug 1,8 m was zu einer Impulsübertragung in der Größenordnung zwischen  $0,01 \text{ \AA}^{-1} < s < 0,5 \text{ \AA}^{-1}$  führte wobei  $s = 4 * \pi * \sin(\theta) * \lambda^{-1}$  und  $2 * \theta$  dem Streuwinkel entsprach. Pro Messung wurden zwischen 30 – 50 µL Proteinlösung

mittels eines Roboters in eine Quarzkapillare zur Messung injiziert. Für jede Messung wurden drei verschiedene Verdünnungen derselben Probe gemessen sowie 2 Pufferleerproben. Die Protein und Pufferdaten wurden gemittelt und das Puffersignal von den Proteindaten mittels einer im *Swing* Labor zur Verfügung gestellten Computerprogramm subtrahiert. Die Daten der einzelnen Messungen wurden mit dem *ATSAS Software Paket* (139) skaliert und überlagert, sowie zur Bestimmung der *Guinier Plots* und den Abstandverteilungen. *FOXS* (140) wurde genutzt um ein SAXS Modell der Struktur zu berechnen und dieses mit den gemessenen SAXS Kurven zu vergleichen.

Folgende Lösungen von Mn-ADH/D1 wurden eingesetzt: 60°C: ADH/D1 dialysiert in 2 M NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,5; 10°C: ADH/D1 dialysiert gegen 2 M NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,5; EDTA-BME: ADH/D1 dialysiert gegen EDTA und anschließend gegen 2 M KCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,7, 1 mM BME; pH 10: ADH/D1 dialysiert gegen EDTA und anschließend gegen 3 M KCl, 50 mM Glycin, pH 10,0; Niedrig Salz: ADH/D1 dialysiert gegen EDTA anschließend gegen 50 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5; Hochsalz: ADH/D1 dialysiert gegen 2 M NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,5, mit 1 mM NADP<sup>+</sup>.

#### **4.5.13 Circular dichroismus (CD)**

CD Messungen dienen der Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen. Hierzu wurde ein *Jasco J-815* CD Spektrometer (Jasco, Tokyo, Japan) verwendet. Die Proteinlösung wurde auf 0,5 mg mL<sup>-1</sup> und eine finale Konzentration von 40 mM NaCl, 400 µM HEPES, pH 7,5 verdünnt. Messungen erfolgten in einer Quarzküvette mit einer Strahlengänglänge von 0,2 mm, bei 30°C wie in einem früheren Artikel beschrieben (141). Zur Bioinformatischen Vorhersage des Sekundärstrukturgehalts wurde das Programm *K2D3* genutzt (Abschnitt 4.6).

#### **4.5.14 Kristallisationsbedingungen und Erzeugung meßbarer Kristalle**

Die Identifizierung von Bedingungen zur Kristallbildung erfolgte in zwei Stufen. Zuerst wurde der Einfluß kommerziell verfügbarer Puffer untersucht, welche verschiedene Komponenten aufzeigen. Im zweiten Schritt folgte eine Feinjustierung der besten Bedingungen, indem die einzelnen Komponenten der Puffer variiert wurden (Tabelle 46).

Zur Vorbereitung der Proteine nach der Reinigung wurde zuerst die Proteinlösung von Metallen durch Dialyse gegen 10 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) in Lagerpuffer mit 2 M NaCl (Tabelle 39) befreit. Anschließend wurde das Protein gegen Lagerpuffer mit

einer NaCl Konzentration  $\leq 500$  mM dialysiert. Es folgte eine Konzentration des Proteins auf  $> 12$  mg mL<sup>-1</sup>.

Die Durchmusterung gegen kommerzielle Puffer erfolgte im *sitting drop* Verfahren in einer 96-Well Platte mit 3 Plätzen für *sitting drops* je Schacht. Die Schächte wurden mit einer Mischung von 0,1  $\mu$ L, 0,2  $\mu$ L und 0,4  $\mu$ L Proteinlösung in jeweils 0,2  $\mu$ L Pufferlösung für die *sitting drops* sowie 25  $\mu$ L Pufferlösung im Pufferbecken gefüllt. Zum Ansetzen der Platten wurde ein *Crystal Phoenix* (ARI – Art Robbins Instruments, Sunnyvale, CA, USA) unter einer Atmosphäre mit  $\geq 85\%$  Luftfeuchtigkeit verwendet. Die Platten wurden mit Folie luftdicht verschlossen und bei 20°C inkubiert. Das Entstehen von Kristallen wurde mikroskopisch (Stemi 305, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) analysiert.

Anschließend wurde die Pufferbedingung, unter welcher sich Kristalle (oder Sphärolithe) ausbildeten manuell reproduziert mit Variationen in Konzentration der einzelnen Pufferbestandteile. Es wurden Kristallansätze im *hanging drop* Verfahren mit 2  $\mu$ L Proteinlösung und 2  $\mu$ L Puffer sowie 500  $\mu$ L Puffer im Schacht in einer 24 Well Platte erstellt. Die *hanging drops* wurden an Glasplättchen angebracht mit welchen die Puffergefüllten Schächte luftdicht abgeschlossen wurden.

Geeignete Kristalle wurden mit Hilfe von Schlaufen *CryoLoop*<sup>TM</sup> (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) manuell eingefangen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Falls nötig wurde den Kristallen kurz vor dem Ernten ein Frostschutzmittel der *CryoPro* Reihe (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) zugegeben.

#### **4.5.15 Ermittlung der Röntgenbeugung von Proteinkristallen**

Initiale Tests von gefrorenen Proteinkristallen wurden in einem *Bruker CuK $\alpha$*  Anlage mit rotierender Anode bei einer Wellenlänge von 1,54 Å gemessen, unter einem Stickstofffluß bei 100 K (Oxford Cryo Systems, Long Hanborough, UK). Zeigten Kristalle unter dieser Bedingung gute Beugungsbilder wurden sie an einem Synchrotron, entweder der *Beamline X06SA* des SLS (Swiss Light Source, Villingen Schweiz) oder der *Beamline Proxima 1* (SOLEIL, French national synchrotron facility, Saint-Aubin, Frankreich) bei einer Wellenlänge von 1,00 Å gemessen. Die Intensitäten der Röntgenbeugung wurden mittels des Programms *XDS* (142) festgelegt und mittels *XSCALE* (142) eine datenreduzierte Elektronendichtekarte erstellt. Zur Erzeugung der 3 D Struktur von AF\_D wurde *MoRDa* als

Teil der CCP4 Programm Suit (143) mit den Koordinaten der 1,3-Propantriol Dehydrogenase von *K. pneumonia* (3BFJ) (144) genutzt. Die Strukturverfeinerung erfolgte mit REFMAC5, als Teil der als Teil der CCP4 Programm Suit (143) mittels Translation/Libration/Screw (TLS) Verfeinerung.

#### 4.6 Programme und ihre Nutzung

Neben den gängigen Programmen welche mit dem Equipment geliefert werden, sowie den Betriebssystem Mac OSX und Windows und Microsoft Office wurden folgende Programme genutzt:

- E.C. Nummern wurden aus der *Braunschweig Enzym Datenbank* (BRENDA) (145) bezogen.
- DNA Sequenzvergleiche zur Homologieanalyse bekannter Proteine wurde mittels des online Programms *basic local alignment search tool* (BLAST) der *U.S. National Library of Medicine* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchgeführt.
- Die Analyse der Codon Nutzung von *Haloferax volcanii* wurde mit dem Programm *CUSP(1e)* als Teil der *Nucleic:Codon usage* Befehlsgruppe, von EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite) (146) durchgeführt.
- Der Codongebrauch wurde mittels des online Programms *java Codon adaptation tool* (JCat) (147) optimiert.
- Vektorkarten wurden mit *SnapGene Viewer 3.3.1* von GSL Biotech LLC (Chicago, IL, USA) erstellt.
- DNA Sequenzen wurden mit *A plasmid Editor ApE v2.0.47* von M. Wayne Davis bearbeitet.
- Primer wurde mittels des Programms *OligoAnalyzer 3.1* (©2013) von *Integrated DNA Technologies, Inc* (Coralville, IA, USA) auf Schmelzpunkt und Schlaufenbildung untersucht.
- Restriktionsschnittstellen in Genen wurden mit des online Programms *NEB Cutter 2.0* von *New England Biolabs* (Ipswich, MA, USA) identifiziert [<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>].

- DNA Sequenzvergleiche wurden mit des online Programms von *UniProt* (<http://www.uniprot.org/align/>) oder für mehrere Sequenzen *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) von EMBL-EBI durchgeführt.
- Proteaseschnittstellen wurden mittels des online Programms *PeptideCutter* (ExpPASy) analysiert ([http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/)).
- Enzymkinetiken wurden mittels *Prism 6 for Mac OS X* (GraphPad Software, Inc.) analysiert.
- Generelle Informationen über Proteinsequenzen wurden mit des online Programms *ProtParam* (ExpPASy) analysiert (<http://web.expasy.org/protparam/>).
- Das Programm K2D3 (148) wurde zur Vorhersage von Sekundärstrukturelementen basierend auf CD-Messungen genutzt (<http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~andrade/k2d3//index.html>).
- Zur Erzeugung von Primern für die Generierung von Genmutanten wurde das online Programm *QuickChange Primer Design* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) genutzt (<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>).
- Chemische Verbindungen wurden mit *ChemBioDraw* 14.0 (CambridgeSoft Corporation, PerkinElmer, Inc) erstellt.
- Phylogenetische Stammbäume wurden mittels *MEGA 7* (149) erstellt.

#### Kristallographische Programme

- Proteinstrukturen wurden von der *Protein Data Bank* (RCSB, PDB) bezogen (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)
- Theoretische Fluoreszenz und Absorptionssignale für Metalle im Kristall während einer Wellenlängenanalyse wurden von der online Datenbank *X-ray Absorption Edges* ([http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/AS\\_periodic.html](http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/AS_periodic.html)) bezogen.
- Nach Messung des Proteinkristalls wurden die Intensitäten der Röntgenbeugung mittels des Programms *XDS* (142) festgelegt und mittels *XSCALE* (142) eine Daten reduzierte eine Elektronendichtekarte erstellt.
- Die von der Messung resultierende Elektronendichtekarte (.mtz) wurde entweder mittels der *MoRDa – Automatic Molecular Replacement Pipeline* (BioMEX solutions) oder *REFMAC5*, beides Teile der *CCP4* (V7.0) – *Collaborative*

*Computational Project No. 4 Software for Macromolecular X-Ray Crystallography Software Suit (143)* anhand von Homologiemodellen zu bereits gelösten Strukturen erstellt, mittels Translation/Libration/Screw (TLS) Verfeinerung.

- Das PyMOL *Molecular Graphics System* (V 1.8) (Schrödinger, LLC) wurde genutzt um Abbildungen zu erstellen, sowie Oberflächenladungen zu berechnen.
- Zur Darstellung der Oberflächenladungen wurde das online Programm PDB2PQR (150) ([http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr\\_2.1.1/](http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.1.1/)) in Kombination mit dem PyMOL *plugin* APBS (151) genutzt.
- Sequenzbasierte homologe Strukturen wurden mittels des online Programms *I-Tasser On-line server*, V5.0 (152), *SWISS-MODEL* (153) und *PDBsum* (154) erhalten.
- Strukturbasierte Homologe wurden mittels des online Programms *DALI server* (155) sowie *PDBe Fold v2.59* (156) erhalten.
- Hochmolekulare Interaktionen wurden mit dem online Programm *PDBe Pisa* (156) (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) berechnet.
- Salzbrücken wurden mittels des online Programms *ESBRI* (157) (<http://bioinformatiungefahrisea.cnr.it/ESBRI/introduction.html>) berechnet.
- Oberflächenexponierte Aminosäurereste wurden mittels dem *Swiss PDB viewer* 4.1 (158) ermittelt. Hierzu wurden Reste ausgewählt welche  $\geq 5.000\%$  *surface accessibility* zeigen.
- Das Proteinvolumen wurde mit dem Programm *ProteinVolume 1.0* (159) ermittelt.
- Weitere Berechnungen sowie die Addition und Orientierung von Wasserstoffen erfolgte mit dem Programm *Yet Another Scientific Artificial Reality Application YASARA* (16.9.23). Generell wurden vor Energieminimierungen der pKa des Proteins für einen pH von 7,5 und einem Salzgehalt von 12% w/v NaCl berechnet. Für Simulationen wurde das *AMBER14 force field* genutzt. Zum Modellieren der offenen Struktur von Mn-ADH/D1 wurde die homologe Struktur 4qgs genutzt mit folgenden Parametern: Modellierungsgeschwindigkeit: langsam, Anzahl der PSI-BLAST Iterationen während der Vorlagen suche (*PsiBLASTs*): 3, Höchster zulässiger (PSI-)BLAST E-Wert um als Vorlage zulässig zu sein (*EValue Max*): 0.5, Maximale Anzahl an Vorlagen (*Templates Total*): 1, Maximale Anzahl an Vorlagen mit derselben Sequenz (*Templates SameSeq*): 1, Höchster Oligomerisierungszustand

(*OligoState*): 1 (*monomeric*), Höchstmaß an Varianten der *Alignments* pro Vorlage:  
(*Alignments*): 5, Maximale Anzahl an Konformationen untersucht pro Schlaufe  
(*LoopSamples*): 200, Maximale Anzahl an Aminosäuren welche zu Termini  
hinzugefügt werden (*TermExtension*): 10. Die dimere Struktur der offenen Form  
wurde durch Überlagerung der modellierten Monomere mit dem gemessenen Dimer  
und anschließender Energieminimierung erzeugt.

## 5 Expression halophiler Gene

### 5.1 *E. coli* und *Haloferax volcanii* als Expressionssysteme

Um ein geeignetes Expressionssystem zur Herstellung verschiedener Gene aus den Solebecken des Roten Meeres zu identifizieren, wurde folgende Liste an Kriterien erstellt, welche der Zielorganismus erfüllen sollte:

1. Wachstumsbedingungen ähnlich der ausgewählten Solebecken
  - a. Hohe Salzkonzentrationen  $\geq 2$  M
  - b. Temperaturtoleranz bis zu 45°C
2. Biotechnologisch nutzbar
  - a. Nicht pathogen
  - b. Generationszeit  $\leq 5$  Stunden
  - c. DNA-Transformations-Systeme (Vektoren)
  - d. Selektierbare Marker
  - e. Reinigungssequenzen verfügbar für rekombinante Proteinreinigung
  - f. Induzierbare Promotoren für hohe Ausbeute rekombinanter Proteine

Basierend auf dieser Liste wurde *Haloferax volcanii* als Expressionssystem ausgewählt.

Das neuartige halophile Expressionssystem *Haloferax volcanii* zeigt ideale Toleranzen gegenüber der gewünschten Temperatur sowie Salzkonzentrationen, da sein natürliches Habitat ähnliche Bedingungen aufweist. *Haloferax volcanii* ist einfach kultivierbar, nicht pathogen, sequenziert, bietet verschiedene Promotoren zur Induktion, ist leicht transformierbar und hat ein relativ stabiles Genom. Der Stamm H1424 wurde gewählt, da er ein *Gen-Knockout* enthält, welches die Reinigung von Proteinen mit His<sub>6</sub>-tag erleichtert und in Kombination mit dem Vektor pTA963 und einem weiteren *Gen-Knockout* eine antibiotikafreie Selektion durch Abhängigkeit von Thymidin ermöglicht. Des Weiteren trägt pTA963 den derzeit stärksten bekannten Promotor (ptna.A) für *Haloferax volcanii*, welcher mittels Tryptophan aktiviert wird.



Als Referenzsystem wurde *E. coli* gewählt. Als eines der meistgenutzten Expressionssysteme bietet es enorme Vorteile in der biotechnologischen Nutzbarkeit, toleriert jedoch weder die gestellten Bedingungen für Temperatur noch von Salz. Als Zielstamm wurde der T7 basierende *E. coli* BL21-Gold(DE3) in Kombination mit pET-Vektoren gewählt, da es sowohl für Klonierungsanwendungen als auch für die Proteinausbeute optimiert ist.

Folgende Tabelle (Tabelle 55) gibt einen Überblick über die wichtigsten Eigenschaften der beiden Expressionssysteme:

Tabelle 55: Vergleich der Charakteristiken der *E. coli* und *Haloferax volcanii* Expressionssysteme. Als Temperaturtoleranz wurde der Bereich zwischen dem Wendepunkt der Wachstumskurve bis hin zur maximalen Temperatur gewählt

	<i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3)	<i>Haloferax volcanii</i> H1424
Ideale Wachstumstemperatur	37°C (160)	45°C (105)
Temperaturbereich	19 - 41°C (161)	31 - 49°C (105)
pI (Proteine)	Peaks bei 5,0 und 10,3 (113)	Peak bei 4,1 (36)
Ideale NaCl-Konzentration	9 mM (0,5 g L <sup>-1</sup> ) – 170 mM (10 g L <sup>-1</sup> ) (162)	2,5 M (144 g L <sup>-1</sup> ) (106)
NaCl-Bereich	0,00 M - 0,85 M (163)	1,7 - 4,1 M (106)
Generationszeit	~ 20 min	~ 3 h
Genomgröße	4,6 Mbp (96)	4,0 Mbp (Chromosom + 4 Plasmide) (36)
Genetische Stabilität	Gut	Ausreichend (164)
Steriler Umgang	Wichtig	Nicht nötig
Codon Nutzung	Spezifisch für <i>E. coli</i>	Δ zu <i>E. coli</i> ; ~ zu <i>Halobacterium</i> sp. NRC-1
Expressionsplasmide	Vielzahl, zum Beispiel pET28b	pTA963 (32)
Selektionsmarker	Tetracyclin und Kanamycin (pET28b)	Thymidin (hdrB) und Uracil (pyrE2) (32)
Induktion	IPTG (T7) 0,5 mM	Tryptophan (p.tnaA) [~ 3mM] (32)
Rührkesselreaktor	Ja	Nein

## 5.2 Ermittlung der Codon-Nutzung

Da die ausgewählten Gene der RSBP nur *in silico* verfügbar sind, war es nötig, diese als ersten Schritt synthetisch zu erzeugen. Um die Expressionsausbeute zu erhöhen, sollte der Codongebrauch des zu exprimierenden Gens dem des Expressionssystems entsprechen. Da verschiedene Organismen einen unterschiedlichen Codongebrauch aufzeigen und dieser für das gewählte thermo-halophile Expressionssystem *Haloferax volcanii* nicht verfügbar war, wurde dieser basierend auf den annotierten Genen des Hauptchromosoms ermittelt, wie nachfolgende Tabelle zeigt.

Tabelle 56: Ermittelter Codon-Gebrauch von *Haloferax volcanii* DS2 im Vergleich zum gängigen *E. coli* B-Stamm

<i>Hfx. volcanii</i> DS2 [ <i>E. coli</i> B]				
Aminosäure	Codon	Nutzung in%	Codon	Nutzung in%
A (Ala)	GCA	10 [21]	GCG	<b>46 [36]</b>
	GCC	30 [28]	GCT	14 [15]
C (Cys)	TGC	<b>55 [58]</b>	TGT	45 [45]
D (Asp)	GAC	<b>77 [34]</b>	GAT	23 [66]
E (Glu)	GAA	39 [62]	GAG	<b>61 [38]</b>
F (Phe)	TTC	<b>78 [39]</b>	TTT	22 [61]
G (Gly)	GGA	20 [10]	GGG	21 [18]
	GGC	<b>36 [41]</b>	GGT	23 [30]
H (His)	CAC	<b>62 [44]</b>	CAT	38 [56]
I (Ile)	ATA	18 [7]	ATT	23 [48]
	ATC	<b>59 [44]</b>		
K (Lys)	AAA	37 [77]	AAG	<b>63 [23]</b>
L (Leu)	CTA	7 [3]	CTT	14 [11]
	CTC	<b>45 [12]</b>	TTA	4 [14]
	CTG	20 [45]	TTG	11 [15]
M (Met)	ATG	<b>100 [100]</b>		
N (Asn)	AAC	<b>75 [43]</b>	AAT	25 [57]
P (Pro)	CCA	14 [18]	CCG	<b>50 [61]</b>

	CCC	21 [6]	CCT	16 [14]
Q (Gln)	CAA	34 [35]	CAG	<b>67 [65]</b>
R (Arg)	AGA	5 [5]	CGC	24 [40]
	AGG	7 [4]	CGG	22 [11]
	CGA	<b>25 [5]</b>	CGT	16 [35]
S (Ser)	AGC	14 [25]	TCC	16 [14]
	AGT	8 [16]	TCG	<b>44 [20]</b>
	TCA	9 [11]	TCT	10 [15]
T (Thr)	ACA	12 [11]	ACG	<b>46 [27]</b>
	ACC	28 [47]	ACT	14 [14]
V (Val)	GTA	11 [14]	GTG	20 [43]
	GTC	<b>51 [18]</b>	GTT	18 [25]
W (Trp)	TGG	<b>100 [100]</b>		
Y (Tyr)	TAC	72 [31]	TAT	28 [69]
* (Stop)	TAA	12 [64]	TGA	<b>62 [27]</b>
	TAG	26 [9]		

Wie aus der Tabelle ersichtlich, unterscheidet sich der Codon-Gebrauch zwischen *Haloferax volcanii* DS2 und *E. coli* B deutlich.

Basierend auf dem ermittelten Codon-Gebrauch von *Haloferax volcanii* DS2 konnte die Synthese der Zielgene erfolgen.

### 5.3 Nomenklatur und Gen-Design

#### 5.3.1 Nomenklatur

Die Gensequenzen der verwendeten Gene basierten auf den Ergebnissen der bioinformatischen Analyse der RSBP-Gene mittels des *profile and pattern matching algorithm* (PPMA) (26). Um einen Überblick der zu exprimierenden Gene zu gewährleisten, wurde folgende, basierend auf Vorarbeiten des PPMA die generell nutzbare 3-Buchstaben-Kodierung verwendet: [1][2]\_[3].

Der erste Buchstabe [1][2][3] entspricht dem Anfangsbuchstaben der annotierten Enzymfunktion, zum Beispiel A für Alkoholdehydrogenase. Der zweite Buchstabe [1][2][3] beschreibt, falls annotiert, den ersten Buchstaben des wahrscheinlichsten aktiven Metalls, entsprechend des Periodensystems, zum Beispiel F für Eisen (lateinisch *ferrum*). Falls kein Metall bekannt ist, wurde der erste Buchstabe der zweiten Silbe der Enzymfunktion verwendet zum Beispiel P für Serin-Protease. Der dritte Buchstabe [1][2][3] gibt Auskunft über den Ursprung des Gens, zum Beispiel D für das Solebecken *Discovery*.

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Nomenklatur aller verwendeten Gene, einschließlich derer, welche nicht aus den RSBP stammen.

Tabelle 57: Nomenklatur der verwendeten Gene, die korrespondierende Enzymart, das annotierte Metall und der Gen-Ursprung. DH = Dehydrogenase, Red. = Reduktase

Abkürzung	Enzym	Metall	Ursprung	Enzym Typ
AF_D	Alkohol-DH	Fe	<i>Discovery</i>	ADH
AZ_A	Alkohol-DH	Zn	<i>Atlantis II</i>	ADH
PD_A	Prephenat-DH	-	<i>Atlantis II</i>	Ene-Reduktase
DR_A1	Dihydrodipicolinat-Red.	-	<i>Atlantis II</i>	Ene-Reduktase
DR_A2	Dihydrodipicolinat-Red.	-	<i>Atlantis II</i>	Ene-Reduktase
DR_D	Dihydrodipicolinat-Red.		<i>Discovery</i>	Ene-Reduktase
DR_K	Dihydrodipicolinat-Red.		<i>Kebrit</i>	Ene-Reduktase
HP_D	Halolysin-Protease	-	<i>Discovery</i>	Protease
SP_A	Serin-Protease		<i>Atlantis II</i>	Protease
bgaH	beta-Galaktosidase	-	<i>Hfx. lucentense</i>	Reporter

### 5.3.2 Generelles Gendesign am Beispiel *E. coli*

Die verwendeten Gene wurden so gestaltet, daß sie möglichst einfach zwischen verschiedenen Plasmiden transferiert werden beziehungsweise modifiziert werden konnten. Um eine möglichst simple Proteinreinigung zu gewährleisten, wurden alle RSBP-Genkonstrukte mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-tag versehen. Basierend auf den Schnittstellen in den Zielvektoren, wurde der Codon Gebrauch so gewählt, daß in allen RSBP-Genen keine

*NdeI*, *FspAI* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen in den zu exprimierenden Gensequenzen entstanden. Die *FspAI*-Sequenz wurde zwischen Genanfang und *His<sub>6</sub>-tag* platziert um i) eine Änderung des Tags zu ermöglichen, ii) einen Linker zwischen dem geladenen und unter Umständen strukturverändernden *His<sub>6</sub>-tag* und dem eigentlichen Zielprotein zu gewährleisten und iii) die Zugänglichkeit des *His<sub>6</sub>-tags* zur Säule durch einen größeren Abstand zum Protein N-Terminus zu erhöhen.

Folgende Abbildung zeigt den generellen Aufbau aller RSBP-Genkonstrukte.

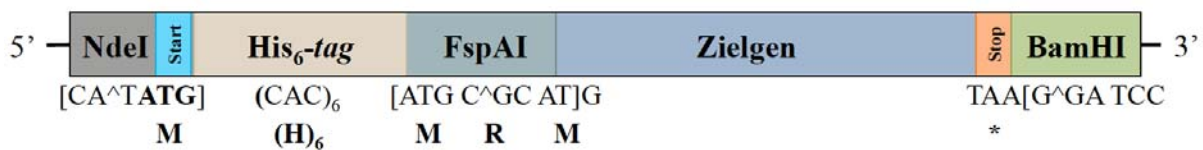


Abbildung 15: Schema des Gen-Designs der RSBP Genkonstrukte

Für die Expression in *E. coli* wurden die Gene der Alkohol Dehydrogenasen AF\_D, AZ\_A sowie der Protease SP\_A Codon optimiert. Im Laufe der Arbeit wurde zusätzlich ein N-terminaler SUMO-tag zwischen dem *His<sub>6</sub>-tag* und dem Zielgen für die drei *E. coli* Codon optimierten Gene gesetzt. Des Weiteren wurde der *His<sub>6</sub>-tag* für die *E. coli* Codon-optimierte Protease SP\_A C-terminal gesetzt. Für die Expressionstests der weiteren RSBP-Gene wurden Gensequenzen genutzt, welche für eine Expression in *Haloferax volcanii* optimiert waren. Diese Sequenzen wurden in den pET-3a Vektor kloniert und im *E. coli* Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL exprimiert, welcher fünf zusätzliche tRNAs trägt und somit in der Lage ist Gene mit, der für *E. coli* unüblicher Codon-Nutzung, zu exprimieren.

### 5.3.3 *Haloferax volcanii*

Für die Genexpression der RSBP-Gene in *Haloferax volcanii* wurde dasselbe Gendesign - wie für *E. coli* beschrieben - verwendet. Die Gene wurden jedoch für den Codon-Gebrauch in *Haloferax volcanii* optimiert und in den Vektor pTA963 transferiert.

Für die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase war keine Gensynthese erforderlich. Das bgaH-Gen aus *Haloferax lucifense*, welches als reines Reporterkonstrukt genutzt werden sollte, wurde aus dem zur Verfügung gestellten pTA941-Vektor, welcher keine *hdrB* Selektion aufweist, in den pTA1228-Vektor transferiert, welcher ein um Restriktionsschnittstellen erweitertem pTA963-Vektor mittels der Restriktionsenzyme *NdeI* und *NotI* entspricht. Um die maximale

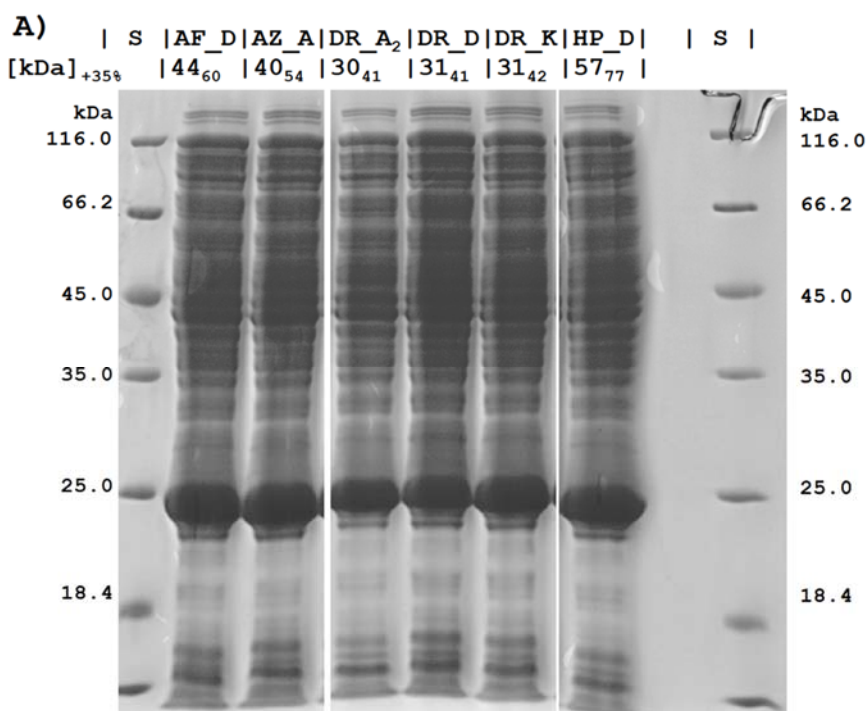
Aktivität des Reporterkonstrukts zu gewährleisten, wurde auf jegliche Art an Reinigungssequenz verzichtet.

## 5.4 Expression in *E. coli*

Die Genexpression in *E. coli* erfolgte für zwei verschiedenen Varianten der Zielgene. Erstens mit Genen, welche für eine Expression in *Haloferax volcanii* optimiert waren, in einem Codon-erweiterten *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL Stamm und zweitens mit Genen, welche für die Codon Nutzung in *E. coli* optimiert waren.

### 5.4.1 Expressionsanalyse der RSBP-Gene im Codon erweiterten *E. coli*-Stamm

Die Expressionsanalyse, der für die Codon-Nutzung in *Haloferax volcanii* optimierten Gene, erfolgte im codonerweiterten *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Hierbei wurden folgende RSBP Gene untersucht: Der ADHs AF\_D und AZ\_A, der Dihydrodipicolinat-Reduktasen DR\_A2, DR\_D, DR\_K sowie der Protease HP\_D, jeweils im Vektor pET-3a.



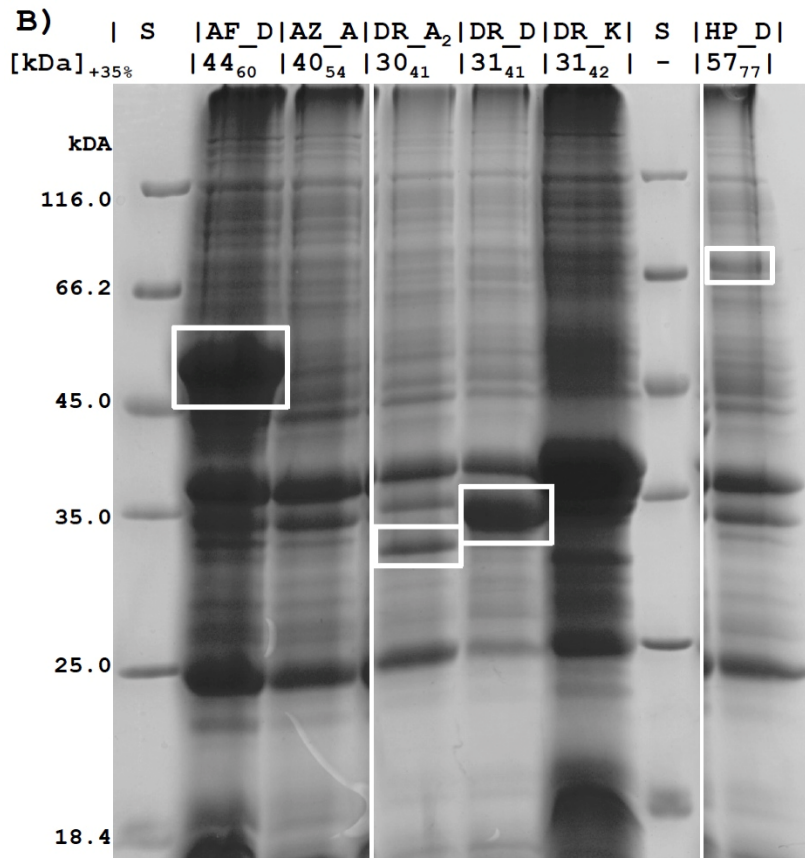


Abbildung 16: SDS-PAGE der Expressionsanalyse von *Haloferax volcanii* Codon-Gebrauch optimierter Gene im codonerweiterten *E. coli*-Stamm. A) Überstand nach Zelllyse, B) Pellet nach Zelllyse. S = Standard

Die Expressionsanalyse zeigte, daß keine Überexpression der untersuchten RSBP-Gene in löslicher Form stattfand. Bei den Genen AF\_D, DR\_A<sub>2</sub>, DR\_D und HP\_D fand eine Überexpression statt, welche in unlöslichen Aggregaten endete. Aufgrund der sehr hohen Expression von AF\_D wurde eine Proteinreinigung nach Expression durchgeführt, welche bestätigte, daß AF\_D ausschließlich in aggregierter Form vorlag.

#### 5.4.2 Alkoholdehydrogenasen aus *Discovery* und *Atlantis II*

Die Expression der *E. coli* Codon-Gebrauch optimierten ADH-Gene AF\_D aus dem Red-Sea-Solebecken *Discovery* und AZ\_A aus *Atlantis II* wurde in einem Vektor mit SUMO-Protease-Bindestelle bei 20°C und 37°C durchgeführt. Das Ziel der SUMO-Protease-Bindestelle und einer verringerten Expressionstemperatur war eine Löslichkeitserhöhung der Proteine. Folgende Abbildung zeigt das Resultat der SDS-PAGE nach der Expression.

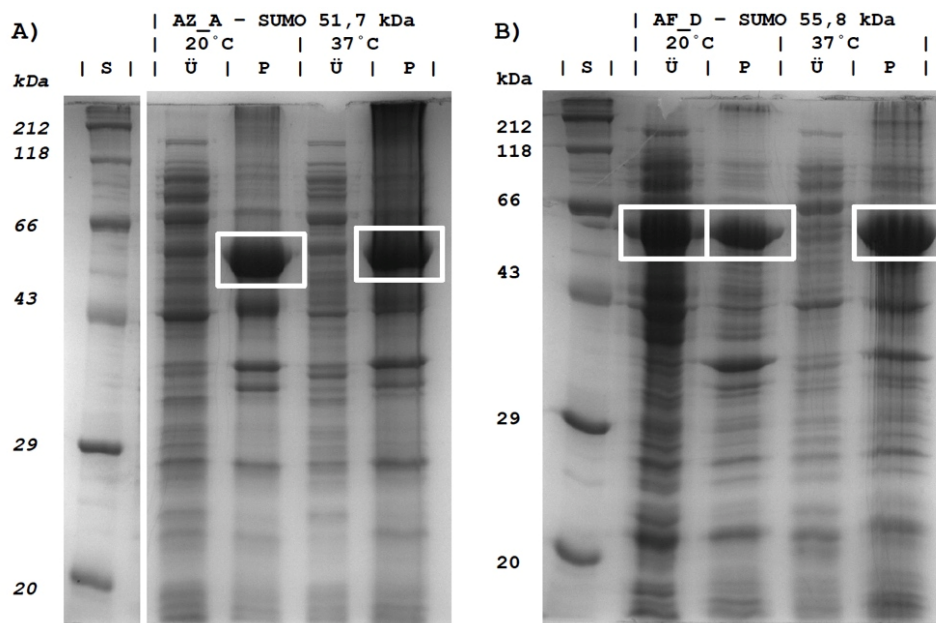


Abbildung 17: SDS\_PAGE nach Genexpression der *E. coli* Codon-Gebrauch optimierten Gene AZ\_A und AF\_D in *E. coli*. A) AZ\_A, B) AF\_D, S: Proteinstandard, Ü: Überstand nach Zelllyse, P: Pellet nach Zelllyse

Die SDS-PAGE nach Expression beider ADH-Gene in *E. coli* zeigte zwar eine starke Überexpressionsbande, diese trat jedoch in nicht-löslicher Form im Zellpellet auf.

### 5.4.3 Protease aus *Atlantis II*

Die Expression des für *E. coli* Codon-gebrauch optimierten SP\_A-Gens der RSBPs wurde analog zur Expression der ADHs durchgeführt, mit Verwendung einer SUMO-Protease-Bindestelle sowie bei 20°C und 37°C. Folgende Abbildung zeigt das Resultat der SDS-PAGE nach der Expression.



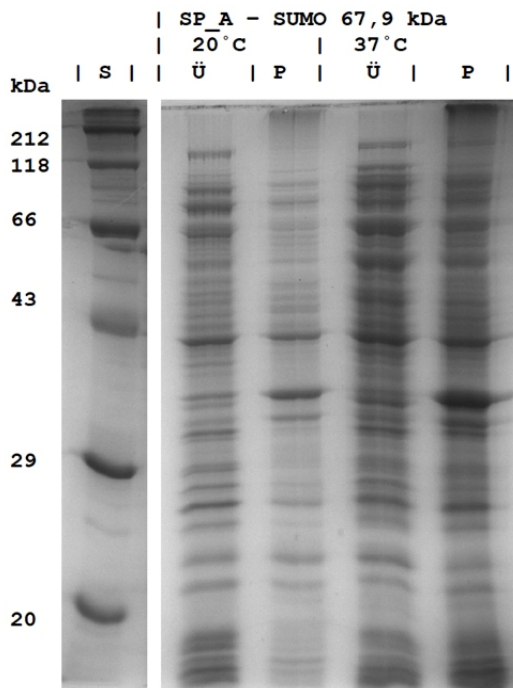


Abbildung 18: SDS PAGE nach Genexpression des *E. coli* Codon-Gebrauch optimierten Gens SP\_A in *E. coli*. S: Proteinstandard, Ü: Überstand nach Zellyse, P: Pellet nach Zellyse

Im Gegensatz zur Expression der ADH Gene in *E. coli* zeigte die Expression des SP\_A-Gens keine Überexpression. Jedoch wies die Zellkultur ein extrem verringertes Wachstum nach Induktion auf, was für eine Proteinaktivität spricht.

Aus diesem Grund wurde eine zweite Expression durchgeführt, bei welcher die Induktion für kurze Zeit (3 h) bei einer höheren Zelldichte ( $OD_{600nm} = 1,5$ ) erfolgte. Um eine korrekte Faltung des Proteins zu ermöglichen, wurden der Zellaufschluss sowie alle weiteren Schritte bei 2 M NaCl durchgeführt. Die Reinigung des Proteins wies einen klaren Elutionspeak auf und die SDS-PAGE stellte eine klare Bande dar, welche mit  $\sim 17$  kDa eine zu geringe Masse aufzeigte. Das eluierte Protein wurde mit der SUMO-Protease verdaut und erneut mittels Ni-NTA gereinigt. Die SDS-PAGE der mobilen Phase zeigte keine Bande mit der erwarteten Masse.

Die erhaltene Bande bei  $\sim 17$  kDa deutete auf einen Eigenverdau von SP\_A hin. Aus diesem Grund wurde eine weitere Reinigung bei 0,5 M NaCl und einem Überschuß an Proteaseinhibitor durchgeführt. Die resultierende SDS-PAGE stellte sowohl die Bande bei  $\sim 17$  kDa dar als auch eine weitere Bande mit der zu erwartenden Masse.

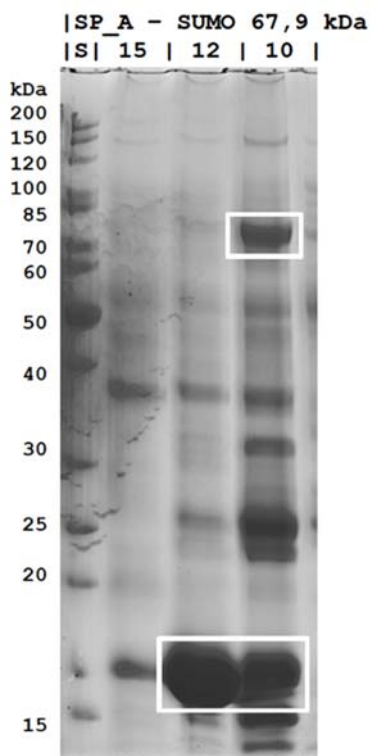


Abbildung 19: Reinigung des exprimierten, Codon-Gebrauch optimierten, SP\_A SUMO Gens in *E. coli*

Die Peptidsequenzierung der markierten Banden ergab für die obere Bande 26% Sequenzüberstimmung mit dem gesamten SUMO-SP\_A-Gen mit Fragmenten über die gesamte Proteinlänge. Das untere Fragment hingegen zeigte eine 81%tige Sequenzübereinstimmung mit dem SUMO-tag sowie der ersten vier Aminosäuren der SP\_A. Dies schließt eine SUMO-Proteaseaktivität aus, welche eine Aminosäure vor der Proteinsequenz schneidet und daher kein Peptid enthalten sollte, welches länger, als die Zielsequenz mit einem Serin davor ist. Diese längere Sequenz deutet auf einen N-terminalen Eigenverdau der SP\_A hin.

Aus diesem Grund wurde ein neues SP\_A-Konstrukt, ohne N-terminale Modifikation, jedoch mit C-terminalem His<sub>6</sub>-tag erstellt. Dies erfolgte mittels SLIC Klonierung in den Vektor pRSET.

Die SDS-PAGE nach Expression und Reinigung des SP\_A-His<sub>6</sub> Konstrukts sowie einer Western-Blot Analyse, stellten eine Proteinbande mit der richtigen Masse dar, wenn auch mit geringer Expression.

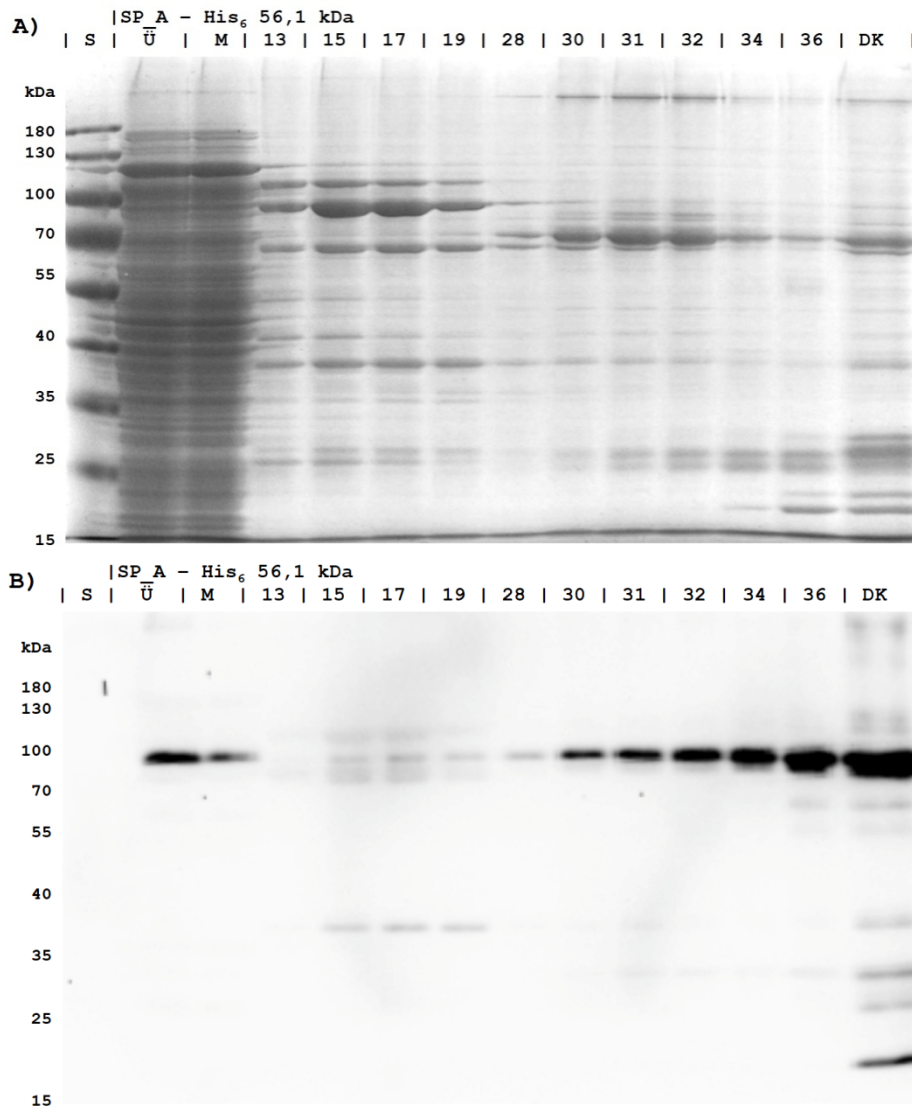


Abbildung 20: A) SDS-PAGE, B) Western-Blot; Nach Expression und Reinigung des SP\_A-His<sub>6</sub>-Konstrukts, Codon-optimiert für *E. coli*. S = Standard, Ü = Überstand nach Zellyse, M = mobile Phase der Proteinreinigung, DK = SP\_A nach Dialyse und Konzentration. Mit einem pI von SP\_A-His<sub>6</sub> von 4,58 und daraus resultierender negativer Ladung wird eine Proteinmasse um bis zu +35% (= 75 kDa) erwartet

Nach Vereinigung der Elutionsfraktionen, anschließender Dialyse und Konzentrierung, zeigte das Protein (Spalte DK, Abbildung 20) auf dem SDS-PAGE keine merkliche Erhöhung der Hauptbande. Allerdings war eine deutliche Verstärkung der Nebenbanden feststellbar, sowie das auftreten einer Bande um ~ 17 kDa, welche auf den Anti-His<sub>6</sub>-Antikörper im Westernblot reagierte. Beides suggerierte eine verbleibende Aktivität der SP\_A. Nach einer Lagerung über wenige Stunden bei 4°C, sowie nach Dialysen oder Aktivitätstest, kam es zum, Eigenverdau der Protease. Daher wurde eine Untersuchung der Proteaseaktivität im Zellysyt

im direkten Anschluß an die Expression durchgeführt. Dies erfolgte in Puffern mit je 3 M, 2 M, 1 M oder 0,2 M NaCl bei 40, 50 und 60 °C, sowie in einem 2,0 M NaCl Puffer, bei denselben Temperaturen jedoch mit den pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9 und pH 10. Die Experimente zeigten keine Proteaseaktivität.

#### 5.4.4 Diskussion

Obwohl der Codon-erweiterte *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL-Stamm nur die Erweiterungen der tRNA-Gene für Arginin (AGA und AGG), Isoleucin (ATA), Prolin (CCC) und Leucin (CTA) trägt, war er in der Lage, Gene, welche für den Codon-Gebrauch von *Haloferax volcanii* optimiert waren, zu exprimieren. Dies war erstaunlich, da die erweiterte Codon-Nutzung nur teilweise mit dem ermittelten Codon-Gebrauch für *Haloferax volcanii* (Tabelle 56) übereinstimmte. Dieser Unterschied könnte auch der Grund für das Ausbleiben einer Überexpression der Gene AZ\_A und DR\_K sein. Ein Indiz hierfür ist die starke Überexpression von AZ\_A nach Codon-Optimierung für *E. coli*.

Die Bildung von unlöslichen Aggregaten der exprimierten Gene in *E. coli* ist höchstwahrscheinlich auf den deutlichen Unterschied in der zytosolischen Konzentration von NaCl und KCl zurückzuführen, da beide Salze in *E. coli* in deutlich geringeren Mengen präsent sind, als in halophilen Organismen. Das Fehlen dieser Gegenionen zu der häufig negativ geladenen Oberfläche von halophilen Proteinen, kann zur Aggregation während der Proteinfaltung führen.

Die Serin-Protease SP\_A der RSBP zeigte weder eine Aggregation noch eine Überexpression. Allerdings ließ die Verringerung des Wachstums nach Expression auf Enzymaktivität schließen, welche negative Folgen für die Expressionszellen hatte. Die Expression bei höherer Zelldichte führte zu mehr Proteinausbeute, jedoch neigte SP\_A zum Eigenverdau während der Expression und Reinigung und somit zum Verlust des N-terminalen His<sub>6</sub>-tags, was eine Reinigung verhinderte. Das C-terminale Konstrukt zeigte unter geringer Salzkonzentration und einem Überschuß an Proteaseinhibitor eine Expressionsbande mit der zu erwartenden Masse. Da die Proteinaktivität jedoch nicht vollständig verhindert werden konnte, hielt der Eigenverdau der SP\_A unter den untersuchten Bedingungen an, was eine genaue Bestimmung der Aktivität verhinderte.

Eine breitgefächerte Mixtur an Proteaseinhibitoren könnte helfen, ausreichende Mengen an Protein für eine strukturelle Charakterisierung zu erzeugen.

### 5.5 Expression in *Haloferax volcanii*

Die Genexpression in *Haloferax volcanii* erfolgte sowohl mit verschiedenen RSBP-Genen als auch mit einer  $\beta$ -Galaktosidase, welche als Reporter-Gen zur Verbesserung des Induktionsprotokolls in *Haloferax volcanii* genutzt werden sollte.

#### 5.5.1 Initiale Expressionsanalyse

Zur experimentellen Überprüfung der Eignung von *Haloferax volcanii* als Expressionssystem von Genen aus den RSBPs wurden verschiedene Vorexperimente durchgeführt. Das Ziel dieser Experimente war es, ausreichende Mengen an gelöstem Protein zu erzeugen. Folgende Tabelle zeigt einen Überblick der zu diesem Zeitpunkt bekannten Induktionsprotokolle.

Tabelle 58: Induktionsprotokolle für *Haloferax volcanii*, basierend auf bekannter Literatur sowie Informationen von Dr. Thorsten Allers. Die OD bezieht sich auf Messungen bei einer Wellenlänge von 650 nm. ET = Expressionstemperatur

ET [°C]	1. Induktion			2. Induktion			Quelle
	OD	Trp, [mM]	Inkubation [h]	OD	Trp, [mM]	Inkubation [h]	
45	-	14,7 $\times 10^{-3}$	1	-	-	-	Tripepi <i>et al.</i> , 2012 (165)
45	-	5	5	-	-	-	Lestini <i>et al.</i> , 2013 (166)
45	nach 24 h	5	7	-	-	-	Timpson <i>et al.</i> , 2012 (30)
45	-	5	48	-	-	-	Liliensiek <i>et al.</i> , 2013 (167)
42	-	1	5 - 6	0,5	3	1	Allers <i>et al.</i> , 2010 (35)
45	0,3	3	16	-	1	4	Information von Dr. Allers

Basierend auf vorherigen Publikationen sowie Informationen von Dr. Thorsten Allers, wurde ein 2-stufiges Induktionsprotokoll genutzt. Verschiedene RSBP-Gene wurden hierzu im 100 mL Maßstab in Schüttelkolben bei verschiedenen Temperaturen, sowie verschiedenen Mengen an Induktionsmittel bei verschiedenen Zelldichten exprimiert. Da keine Überexpressionsbanden sichtbar waren, wurden Western-Blots zur Visualisierung der Expressionen genutzt. Der hohe Salzgehalt der Proteinlösung wirkte sich negativ auf den Transfer der Proteine auf die Western-Blot Membran aus, sowie auf die Interaktion mit Antikörpern. Daher wurde das übliche Western-Blot Protokoll um Initiale 3 Waschschrte der SDS-PAGE in ddH<sub>2</sub>O erweitert.

Es zeigte sich, daß eine Expression bei 45°C zur erhöhten Aggregationsbildung führte. Daher wurde eine Temperaturverringernach der ersten Induktion auf 42°C durchgeführt. Für Gene aus dem relativ kühlen RSBP *Kebrit* (26°C) zeigte eine Temperaturerniedrigung auf 32°C nach Induktion die besten Ergebnisse.

Des Weiteren zeigte eine erste Induktion bei einer OD<sub>650nm</sub> von 0,5 mit 3 mM L-Tryptophan sowie eine zweite Induktion nach 15 h Inkubation mit derselben Menge an L-Tryptophan (3 mM), gefolgt von 4 h Inkubation, die beste Proteinausbeute.

Basierend auf diesem Protokoll wurden 6 ausgewählte RSBP-Gene im 100 mL Maßstab in Schüttelkolben exprimiert und die Menge an exprimiertem Genprodukt sowie die Löslichkeit mittels Western-Blot bestimmt.

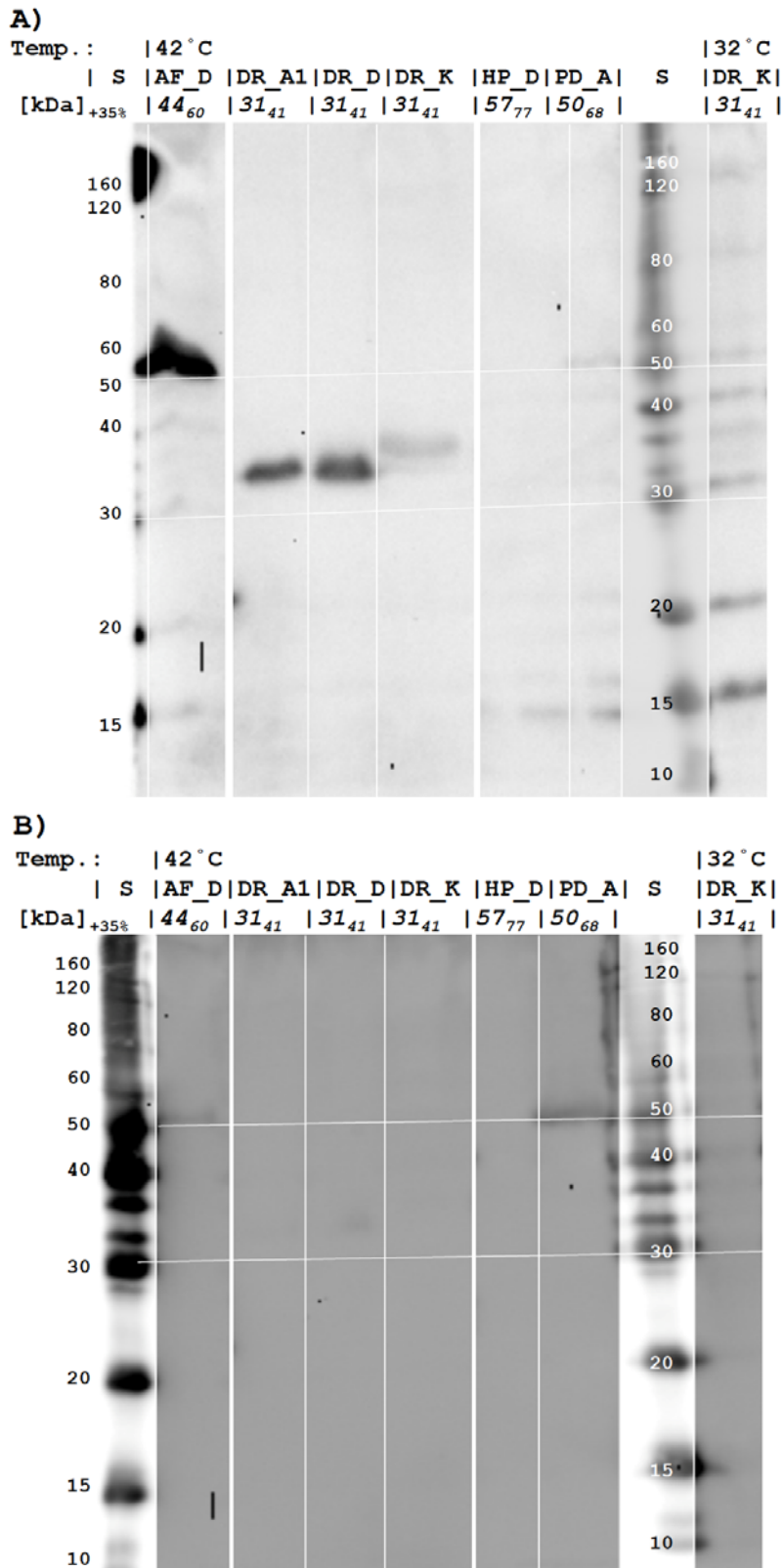


Abbildung 21: Expressionsanalyse verschiedener RSBP Gene in *Haloferax volcanii* mittels Western-Blot. A) Überstand des Zelllysats nach Zentrifugation, B) Zellpellet. S = Proteinstandard

Die Western-Blot Analyse zeigte, daß unter den untersuchten Bedingungen eine Expression aller Gene außer HP\_D stattfand (Abbildung 21 A und B). Nach Induktion der *Haloferax volcanii* Zellen mit HP\_D fand ein teilweise Lyse der Zellen statt und das Wachstum stagnierte. Die Gene AF\_D, DR\_A1, DR\_D zeigten eine gute Expression in löslicher Form, da Proteinbanden ausschließlich im Überstand (A) und nicht im Zellpellet (B) detektierbar waren. DR\_K zeigte einen ähnlichen Trend jedoch bei deutlich geringerer Proteinmenge. Die Temperaturreduktion während der Genexpression zeigte keinen Einfluß auf die Expression von DR\_K. PD\_A wies eine geringe Expression auf, wahrscheinlich in unlöslicher Form.

### 5.5.2 Alkoholdehydrogenasen aus *Discovery* und *Atlantis II*

Die Alkoholdehydrogenase AF\_D wies bereits bei den Voruntersuchungen eine hohe lösliche Expression im Schüttelkoben auf. Die Nutzung desselben Induktionsprotokolls wie in den Voruntersuchungen zeigte eine finale Zelldichte nach der Expression von  $OD_{650nm} = 2,0$  und eine Proteinausbeute im Schüttelkolben von  $7,4 \text{ mg L}^{-1}$  gereinigtem Protein. In Zusammenarbeit mit Eva Strillinger (TUM) konnte die Proteinausbeute auf  $109,2 \text{ mg L}^{-1}$  im Rührkesselreaktor erhöht werden. Weitere Information sind im Folgetext beschrieben.

Die Alkoholdehydrogenase AZ\_A wurde auf dieselbe Weise wie AF\_D zuerst im Schüttelkolben und später im Rührkesselreaktor exprimiert, jedoch mit geringeren Ausbeuten von  $0,9 \text{ mg L}^{-1}$  im Schüttelkolben und  $20,7 \text{ mg L}^{-1}$  im Rührkesselreaktor. Ebenso waren mehrere Nebenbanden nach der Ionenaustauschchromatographie ersichtlich. Weitere Arbeiten an diesem Enzym führte M. Sc. Anastassja Akal (TUM-KAUST) durch.

Folgender Abschnitt stellt die Expression von AF\_D und AZ\_A im Rührkesselreaktor als Satzkultivierung dar.

#### Satzkultivierung von *Haloferax volcanii* H1895

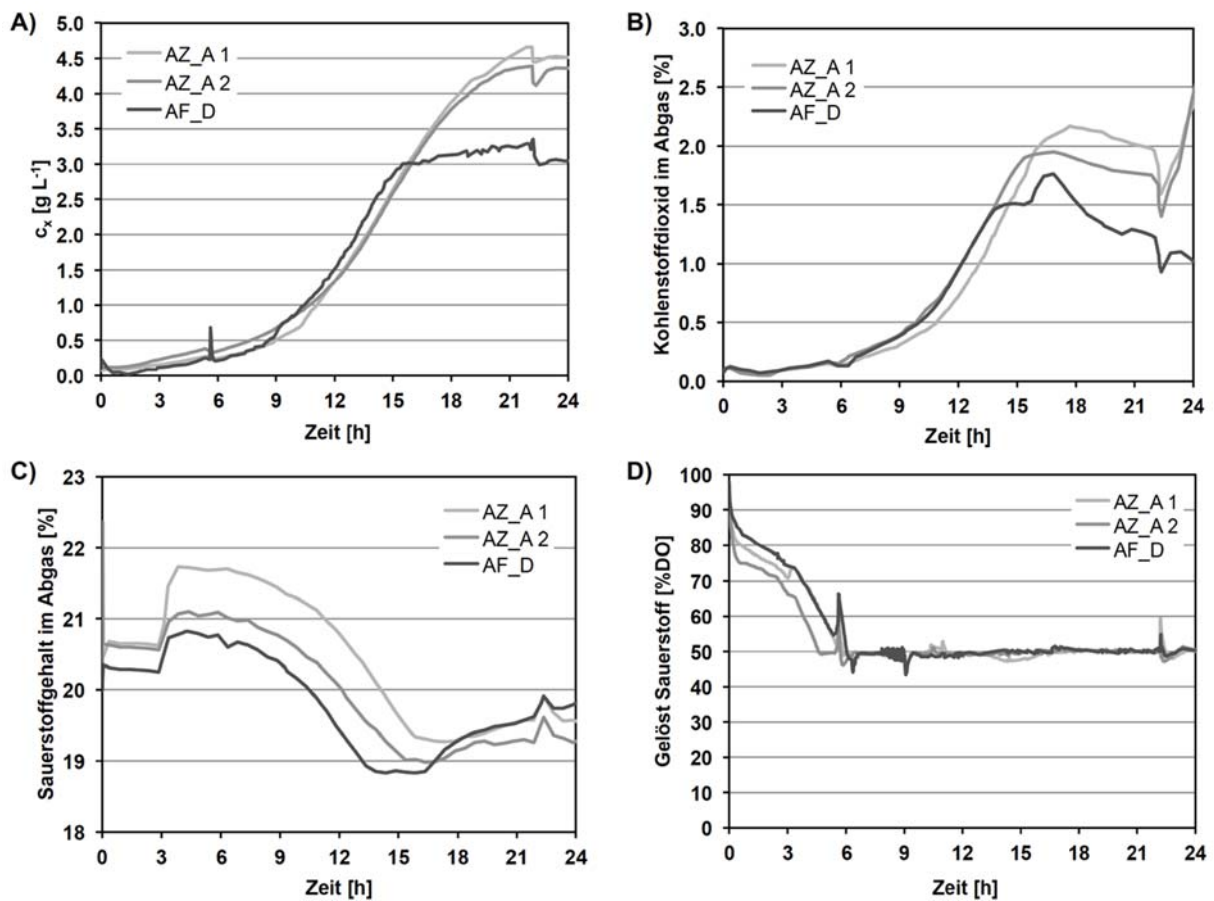
Zu Beginn dieser Arbeit wurde mit dem *Haloferax volcanii* Stamm H1424 gearbeitet. Dieser wie ein gutes Wachstum und Genexpression im Rührkesselreaktor auf, erzeugte jedoch starke Biofilmbildung, welche sowohl die Sonden blockierte als auch die Zellernte erschwerte. Daher wurde der in Zusammenarbeit mit Eva Strillinger (TUM) und Dr. Thorsten Allers (*University of Nottingham*) entwickelte H1895 Stamm, welcher auf dem H1424 Stamm



basiert und zusätzlich den Knockout der Gene pilB3C3 (Hvo\_1033 und Hvo\_1034) trug, genutzt.

### 2 L Rührkesselreaktor

Der *Haloferax volcanii* H1895 Stamm wurde in einem Parallelrührkesselreaktor-System zur Expression der RSBP-Gene genutzt. Im Folgenden ist eine typische Expression der RSBP Gene am Beispiel der ADHs AF\_D und AZ\_A dargestellt. Die Zellanzucht erfolgte in Hv-YPC-Medium mit einer ersten Induktion mit 3 mM L-Tryptophan nach 5 h Inkubation und einer zweiten Induktion mit 6 mM L-Tryptophan nach 15 h sowie einer finalen Inkubation von 3 h, bei 45°C.



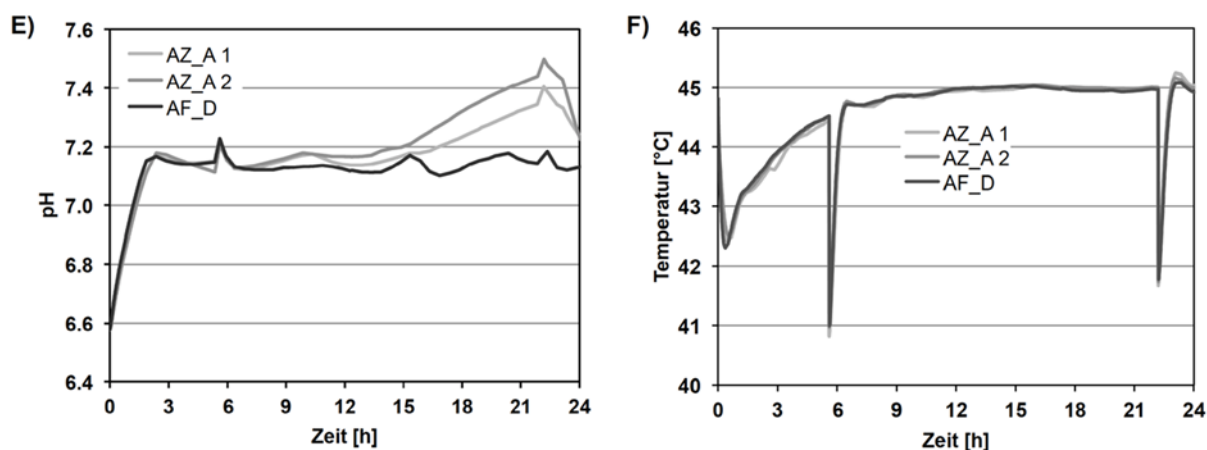


Abbildung 22: Anzucht von *Haloferax volcanii* H1895 im 2 L Rührkesselreaktor in 3 parallelen Ansätzen mit Expression der RSBP Gene AZ\_A (2x) und AF\_D. Die x-Achse gibt die Zeit nach dem Animpfen an. A) Biotrockenmasse, B) CO<sub>2</sub> Gehalt im Abgas, C) O<sub>2</sub> Gehalt im Abgas, D) Gelöster Sauerstoff im Medium, E) Titrationsmittelzugabe (negative Werte entspricht der Zugabe von Säure, positive Werte der Zugabe von Base), F) Temperatur im Reaktor mit Peaks, welche die Zugabe der Induktionslösung darstellen

Die Anzucht von *Haloferax volcanii* im Rührkesselreaktor zeigte generell ähnliche Tendenzen in den ermittelten Parametern für die Duplikate der AZ\_A Expression (AZ\_A 1 und AZ\_A 2), welche Unterschiede zur Expression von AF\_D darstellten. So wiesen AZ\_A exprimierende *Haloferax volcanii* Zellen eine höhere Biotrockenmasse als AF\_D, bei gleicher Wachstumsrate während der exponentiellen Phase auf (Abbildung 22 A). Der Kohlendioxidgehalt des Abgases nahm bei AZ\_A exprimierenden *Haloferax volcanii* Zellen nach der zweiten Induktion zu und fiel bei den AF\_D exprimierenden *Haloferax volcanii* Zellen ab (Abbildung 22 B). Die Menge an verbrauchtem Sauerstoff reduzierte sich in beiden Fällen nach Erreichen der stationären Phase, jedoch stärker für AF\_D exprimierende *Haloferax volcanii* Zellen (Abbildung 22 C). Die Gelöstsauerstoffkonzentration war auf  $\geq 50\%$  eingestellt und wurde (Abbildung 22 D) durch Regelung der Rührerdrehzahl bei konstantem Begasungsvolumen konstant gehalten (Vergleiche hierzu Abbildung 65 B und D im Anhang). Zur Aufrechterhaltung des Sollwertes von pH 7,2 (Vergleiche hierzu Abbildung 65 A im Anhang) wurden zu den AF\_D exprimierenden *Haloferax volcanii* Zellen ausschließlich Base zugegeben, wohingegen die AZ\_A exprimierenden *Haloferax volcanii* Zellen ab einer Inkubationszeit von 14,5 h ihren Metabolismus so änderten, so daß eine Säurezugabe nötig wurde (Abbildung 22 E). Weitere hier nicht dargestellte Satzversuche zeigten, daß im späteren Verlauf (> 24 h Inkubation) auch AF\_D exprimierende *Haloferax volcanii* Zellen eine Säurezugabe benötigen. Die Temperatur fiel am Anfang der Inkubation

durch Zugabe des Inokulums und bei den beiden Induktionsschritten auf max. 41°C ab, blieb im Durchschnitt jedoch bei 44°C (Abbildung 22 F).

Weitere Prozeßgrößen sind in Abbildung 65 im Anhang dargestellt. Dazu gehören der pH während der Anzucht, die Flußraten der Begasung und - des Abgases sowie die Rührerdrehzahl.

Nach Abschluß der Expression wiesen die AZ\_A exprimierenden *Haloferax volcanii* Zellen eine höhere Zellmasse als die AF\_D exprimierenden Zellen auf. Nach der Proteinreinigung hingegen war eine deutlich erhöhte Proteinausbeute von AF\_D gegenüber AZ\_A ersichtlich. Folgende Abbildung stellt die SDS-PAGE von AF\_D und AZ\_A nach Reinigung dar.

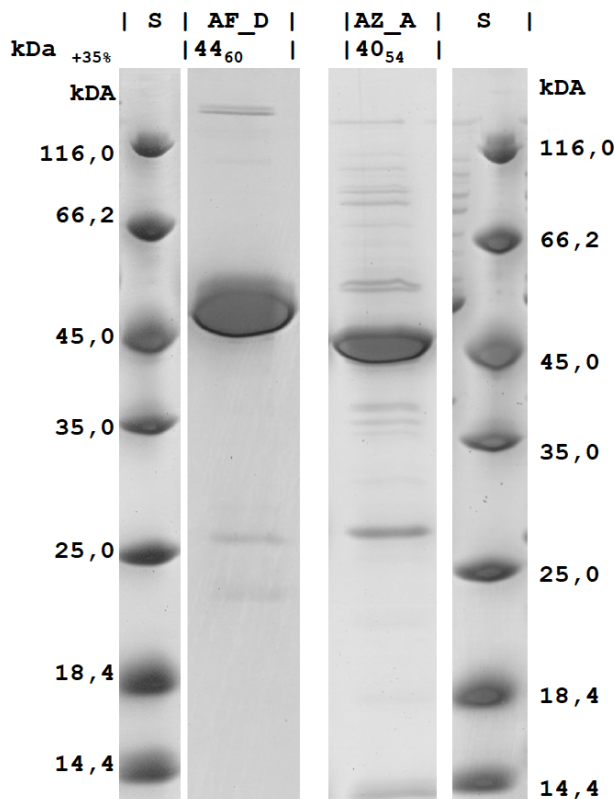


Abbildung 23: SDS-PAGE, AF\_D und AZ\_A exprimiert in *Haloferax volcanii* im Rührkesselreaktor, nach Reinigung mittels Ni-NTA. S = Standard

### 5.5.3 Ene-Reduktasen aus *Discovery*, *Atlantis II* und *Kebrit*

Die Dihydrodipicolinat-Reduktasen DR\_A1 (aus *Atlantis II*) und DR\_D (aus *Discovery*) wiesen eine gute Expression in löslicher Form in den Voruntersuchungen auf. Daher erfolgten größere Expressionsansätze, welche in Zusammenarbeit mit Eva Strillinger (TUM) durchgeführt wurden. Nach Expression und Reinigung kamen für DR\_A1 zwei verschiedene Proteine in Frage, wie folgende Abbildung darstellt:

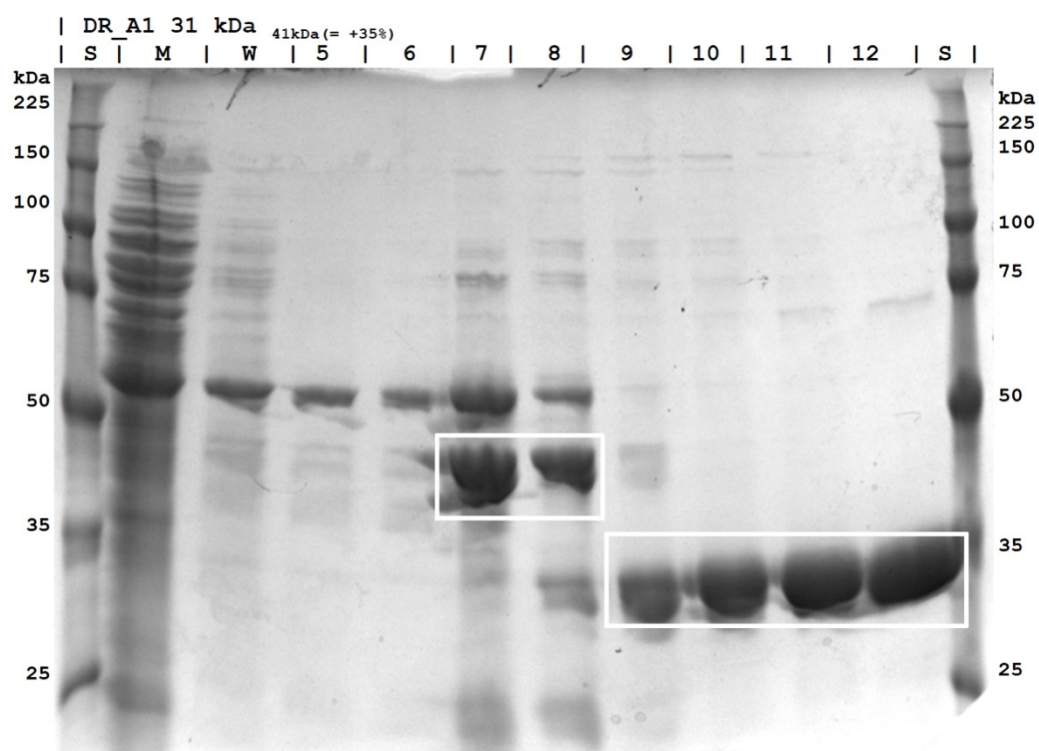


Abbildung 24: SDS-PAGE der Reinigung von DR\_A1 nach Expression in *Haloferax volcanii*. S = Standard, M = mobile Phase, W = Waschschrift

Die markierten Proteine wurden tryptisch verdaut und die Peptidsequenzanalyse ergab für Fraktionen 7 und 8 eine Sequenzübereinstimmung von 36% und für die Banden 9 – 12 von 92%.

Die finale Expressionsmengen im Rührkesselreaktor waren  $135 \text{ mg L}^{-1}$  für DR\_A1 sowie  $63,2 \text{ mg L}^{-1}$  an DR\_D in reiner Form. Weitere Arbeiten mit diesen Proteinen erfolgten durch Eva Strillinger (TUM) und es zeigte sich, daß sowohl DR\_A1 so wie DR\_D aktiv sind und das aromatische Substrat Citroconsäure Anhydrid in guten Mengen umsetzen.

Da, basierend auf den initialen Tests, DR\_K nur in geringen Mengen exprimiert, wurden weitere Arbeiten an DR\_K eingestellt, um die Erfahrungsgewinne der Expression sowie Aktivitätsanalysen von DR\_A1 und DR\_D zu nutzen. Untersuchung der DR\_A1 wurden nicht durchgeführt, da eine hohe Sequenzähnlichkeit zu DR\_A1 besteht.

Da die Prephenat Dehydrogenase PD\_A im initialen Expressionstest hauptsächlich unlöslich exprimiert, wurden keine weiteren Expressionsversuche durchgeführt.

#### 5.5.4 Proteasen aus *Discovery* und *Atlantis II*

Da eine Induktion der Expression der Protease HP\_D aus *Discovery* eine Zellyse zur Folge hatte, wurde eine Expressionsanalyse von SP\_A durchgeführt. Die Zellen zeigten nach Induktion eine deutliche Verringerung des Wachstums auf. Das auftreten leichter Proteinbanden nach der Proteinreinigung lassen auf eine geringe Genexpression in *Haloferax volcanii* schließen, wobei sich die Hauptbanden unterhalb der erwarteten Masse befanden.

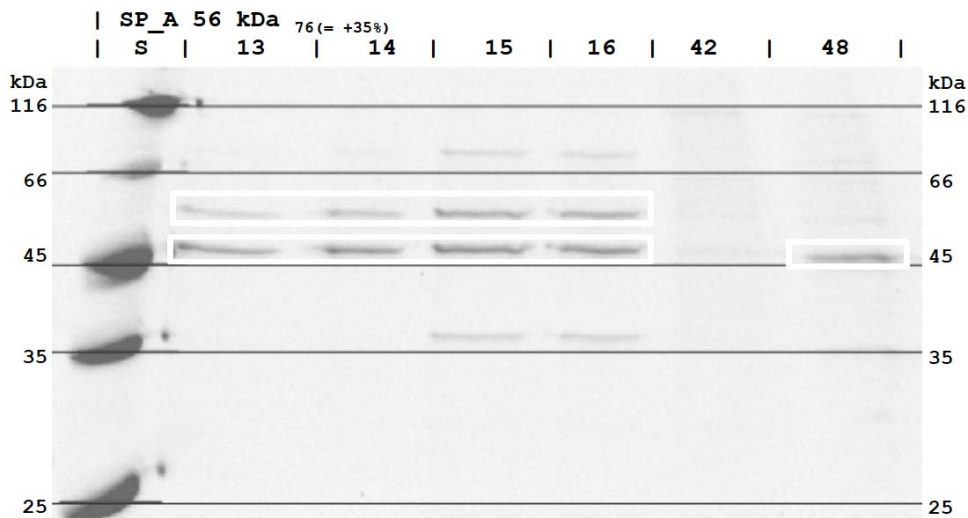


Abbildung 25: SDS-PAGE von SP\_A nach Expression in *Haloferax volcanii* und Reinigung. S = Standard

Eine Proteinelution fand sowohl innerhalb des Gradienten (Fraktionen 13 – 16) als auch im abschließenden Waschschrift mit ddH<sub>2</sub>O (Fraktion 48) statt. Tryptischer Verdau der markierten Banden wies bis zu 44% Sequenzübereinstimmung auf, wobei ausschließlich Sequenzen ab Aminosäure 55 detektiert werden konnten.

Um den toxischen Effekt der SP\_A-Genexpression zu kompensieren, wurde das Expressionsprotokoll für SP\_A auf eine Einzelinduktion bei einer Zelldichte von  $OD_{650nm} = 1,4$  mit 6 mM Tryptophan für 5 h bei 40°C modifiziert. Dies resultierte in einer erhöhten Proteinmenge mit einer zu geringen Masse. Um den Eigenverdau zu reduzieren, erfolgte eine Expression unter denselben Bedingungen, bei welcher die Proteinreinigung bei einer verringerten NaCl-Konzentration von 500 mM (kompensiert mit 10% v/v Glycerin) und geändertem Puffersystem (Tabelle 38) durchgeführt wurde. Während der Reinigung fand eine Proteinelution innerhalb des Gradienten und dem Waschschrift statt. Nachfolgende Abbildung verdeutlicht in Bildform die Bande mit der richtigen Masse im Waschschrift.

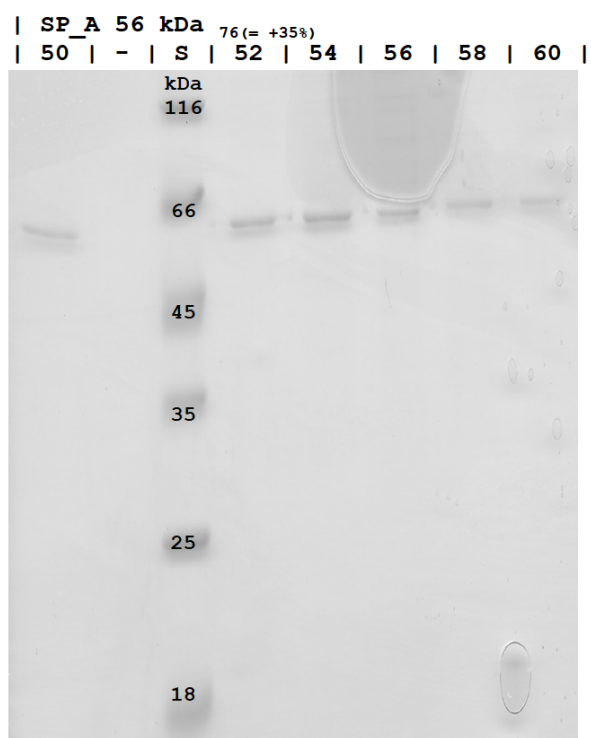


Abbildung 26: SDS-PAGE des Waschschrifts von SP\_A nach Expression in *Haloferax volcanii* und Reinigung bei einer verringerten NaCl Konzentration von 500 mM, kompensiert mittels 10% v/v Glycerin. S = Standard

Die Aktivitätsmessungen der Fraktionen des Waschschrifts wiesen Proteinaktivität auf. Das dargestellte Gel stammt von einem 10 L Expressionsansatz und hatte eine finale Proteinausbeute von  $\sim 1 \text{ mg L}^{-1}$ . Eine Genexpression mit Zugabe von Proteaseinhibitoren resultierte, nach der Proteinreinigung, in einer Proteinbande auf der SDS-PAGE mit der erwartenden Masse. Die Zugabe von Proteaseinhibitoren resultierte jedoch in einem deutlich

verringerten Wachstum von *Haloferax volcanii*, sowie im Ausbleiben einer Proteaseaktivität nach der Reinigung.

### 5.5.5 $\beta$ -Galaktosidase von *Haloferax lucentense*

Die  $\beta$ -Galaktosidase aus *Haloferax lucentense* wurde als Reporter-Gen zur einfachen Detektion der Genexpression in *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor verwendet. Zur Nutzung unter dem gewählten Promotor *p.tnaA* wurde das Gen aus dem zur Verfügung gestellten Vektor pTA941 erfolgreich in den Vektor pTA1228 kloniert. Die erfolgreiche Klonierung des aktiven Konstrukts in *Haloferax volcanii* wurde mittels Aktivitätstests des Zellysats durchgeführt. Es zeigte sich, daß zwar eine geringe Hintergrundexpression unter dem Promotor *p.tnaA* durch natives Tryptophan in der Zelle stattfand, diese jedoch nur ~ 5.4% der Gesamtinduktion des hier verwendeten Induktionsprotokolls in Schüttelkolben (Abschnitt 5.5.1) entsprach. Die einfachen Aktivitätsmessungen im Zellysat, nach Expression der  $\beta$ -Galaktosidase wurden in Zusammenarbeit mit Eva Strillinger (TUM) genutzt, um das Induktionsprotokoll von *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor zu verbessern (131).

### 5.5.6 Diskussion

#### Satzkultivierung im Rührkesselreaktor

Daß *Haloferax volcanii* eine relativ geringe Sauerstoffzufuhr benötigt, welche in Schüttelkolben ohne Schikane bei  $\geq 50\%$  v/v Füllmenge bei der getesteten Drehzahl und Exzentrizität gegeben ist, beweisen die Vorversuche im Schüttelkolben. Analysen im Rührkesselreaktor mit 80% gelöstem Sauerstoff (Luftsättigung) bestätigten diese Beobachtung, weshalb weitere Versuche im Rührkesselreaktor bei 50% Luftsättigung stattfanden. Da in hypersalinen Lebensräumen ein sehr geringer Sauerstoffgehalt vorherrscht (168), besteht kein Selektionsdruck auf eine gute Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezien. Dies könnte ein Grund für das reduzierte Wachstum von *Haloferax volcanii* bei hohen Sauerstoffkonzentrationen sein.

Die Genexpression im Rührkesselreaktor wurde vor Vollendung des modifizierten Hv-YPC+ Mediums sowie verbesserten Expressionsprotokolls, welches in Zusammenarbeit mit Eva Strillinger (TUM) erstellt wurde (131), durchgeführt. Aus diesem Grund wurde das normale Hv-YPC Medium sowie eine leicht modifizierte Variante des in Abschnitt 5.5.1 vorgestellten

Induktionsprotokolls genutzt. Die Untersuchung des Zellwachstums während der Genexpression von AF\_D und AZ\_A wies ein generell erhöhtes Wachstum der AZ\_A exprimierenden *Haloferax volcanii* Zellen auf, mit daraus resultierender erhöhtem Sauerstoffverbrauch und CO<sub>2</sub>-Generation sowie einer früheren Umstellung des Metabolismus, welcher zu alkalischen Metaboliten führt. Detaillierte Analysen der Produktion von Metaboliten im Rührkesselreaktor (131), zeigte, daß zu Beginn der Anzucht vor allem die Produktion von Acetat, wahrscheinlich aus dem metabolischen Intermediat Acetyl-CoA mittels der Acetyl-CoA synthetase (169) für eine Ansäuerung des Mediums sorgte und im späteren Verlauf (~ 15 h) vor allem bei der Expression von AZ\_A, eine Erhöhung des Ammoniakgehaltes, wahrscheinlich aufgrund der Metabolisierung von Proteinen (131) sichtbar wird. Beide Trends finden in gleichem Maße bei AF\_D exprimierenden *Haloferax volcanii* Zellen statt, jedoch findet die Erhöhung des Ammoniakgehaltes erst bei einem deutlich späteren Zeitpunkt (~ 24 h) statt.

#### Genexpression in *Haloferax volcanii*

Da *Haloferax volcanii* zu Beginn dieser Arbeit in der Literatur nur sehr begrenzt zur Expression von rekombinanten Genen beschrieben wurde und die Arbeit an halophilen Organismen im Labor neu gestartet wurde, wurden nahezu alle Standardprotokolle überarbeitet. Hierbei bereitete die hohe Salzkonzentration vor allem bei Elektrophorese und Proteininteraktionen (SDS-PAGE und Western-Blot) sowie Klonierungsarbeiten nach DNA-Isolation Probleme. Während der Klonierung zeigte der hohe GC Anteil Probleme bei der PCR, Restriktionsverdau sowie Ligation. Generell wurden Waschschriffe, erhöhte Verdünnungen salzhaltiger Proben, sowie längere Inkubationszeiten eingeführt, um diese Probleme zu umgehen.

Wie in vorherigen Arbeiten beschrieben, führt der negative isoelektrische Punkt der meisten halophilen Proteine zu einer Verlangsamung während der Elektrophorese, was sie im Durchschnitt mit einer Masse bis zu zusätzlichen 35% auf der SDS-PAGE erscheinen läßt (31). Aus diesem Grund wurden Massen bis zu 35% (Tabelle 65) auf den SDS-Gelen für weitere Arbeitsschritte mit in Betracht gezogen.

Voruntersuchungen zur Expressionssteigerung führten zu einem zweistufigen Induktionsprotokoll mit einer ersten Induktion von 3 mM L-Tryptophan bei einer OD<sub>650nm</sub>



von 0,5 mit 3 mM L-Tryptophan, gefolgt von einer Temperaturerniedrigung auf 42°C sowie eine zweite Induktion nach 15 h Inkubation mit derselben Menge an L-Tryptophan (3 mM), gefolgt von 4 h Inkubation. Dieses Induktionsprotokoll stellte sich als universell für alle untersuchten Gene außer SP\_A heraus. Interessanterweise führte eine detaillierte Analyse der Expression im Rührkesselreaktor, welche in Zusammenarbeit mit Eva Strillinger (TUM) durchgeführt wurde, zu einem ähnlichen Protokoll, dessen Hauptunterschied eine Verdopplung der L-Tryptophankonzentration während der zweiten Induktion ist (131). Folgende Tabelle gibt einen Überblick über den Expressionserfolg der untersuchten Gene in *Haloferax volcanii* wieder.

Tabelle 59: Übersicht Genexpression in *Haloferax volcanii*. Expression im Rührkesselreaktor erfolgte analog zu (131)

Gen	Löslich	Expression und Konzentration	Enzymaktivität
AF_D	✓	Schüttelkolben: 7,4 mg L <sup>-1</sup> Rührkesselreaktor: 109,2 mg L <sup>-1</sup>	✓
AZ_A	✓	Schüttelkolben: 0,9 mg L <sup>-1</sup> Rührkesselreaktor: 20,7 mg L <sup>-1</sup>	✓
PD_A	✗	<i>unlöslich (Western Blot Untersuchung)</i>	
DR_A1	✓	Rührkesselreaktor: 134,9 mg L <sup>-1</sup>	✓
DR_A2		<i>nicht getestet (hohe Sequenzähnlichkeit zu DR_A1)</i>	
DR_D	✓	Rührkesselreaktor: 63,2 mg L <sup>-1</sup>	✓
DR_K	✓	<i>geringe lösliche Expression (Western Blot Untersuchung)</i>	
HP_D	(✓)	Zellyse nach Induktion	✓ (Induktion löste Zellyse aus)
SP_A	✓	Schüttelkolben: ~ 1 mg L <sup>-1</sup> , aufgrund von Eigenverdau	✓ (Aktiv und Eigenverdau)
bgaH	(✓)	<i>keine Reinigung erforderlich</i>	✓ (Detektion der Genexpression in <i>Haloferax volcanii</i> H1895)

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist exprimierten alle untersuchten Gene in *Haloferax volcanii*. Hierbei exprimierten sechs Gene in löslicher Form, ein Gen in unlöslicher Form und die Protease HP\_D und bgaH in unbekannter Form, da diese Enzyme aktiv sind kann jedoch

davon ausgegangen werden, daß sie in löslicher Form exprimieren. Alle löslich exprimierenden Gene, welche mit His<sub>6</sub>-tag versehen waren wiesen einen guten Reinigungserfolg auf, bis auf die Protease HP\_D. Die fünf gereinigten Gene zeigten Enzymaktivität wobei dies im Falle von SP\_A in geringer Proteinausbeute resultierte, welche zum Eigenverdau neigte. Die Protease HP\_D exprimierte in aktiver Form was jedoch in vollständiger Zelllyse resultierte. Die restlichen untersuchten Gene, AF\_D, AZ\_A, DR\_A1, DR\_D und bgaH exprimierten gut und in aktiver Form, ohne signifikanten Effekt auf *Haloferax volcanii*.

Aus der Gesamtheit der Expressionsversuche konnte der Nutzen von *Haloferax volcanii* zur Expression verschiedener Gene und einfachen Reinigung der resultierenden Proteine aus Regionen mit hoher Salzkonzentration und erhöhter Temperatur gezeigt werden.

## **5.6 Proteinreinigung aus *Haloferax volcanii* am Beispiel der ADH/D1**

Zu Beginn dieser Arbeit lagen kaum Protokolle zur Reinigung von halophilen Proteinen mittels Ni-NTA Säulen vor und es war unklar, ob eine Reinigung bei 4°C durchgeführt werden konnte. Aus diesem Grund wurden, mehrere Vorexperimente der stark exprimierenden AF\_D, die später auf ADH/D1 umbenannt wurde durchgeführt. Im Folgetext wird das finale Reinigungsprotokoll, welches für die Reinigung weiterer halophiler Proteine genutzt wurde, dargestellt.

### **5.6.1 Zellaufschluss**

Zum Zellaufschluss wurden drei verschiedene Methoden untersucht. Als erstes wurde ein Hochdruckhomogenisator verwendet. Trotz Vorinkubation der Zelllösung mit DNase war die Viskosität der Lösung sehr hoch, was nur durch relative hohe Zugaben von DNase und starker Verdünnung kompensiert werden konnte. Des Weiteren war der Erfolg des Zellaufschlusses trotz Nutzung des Maximaldrucks und einem Zellaufschluss in drei Zyklen unzureichend.

Als zweite Methode wurden Gefrierzyklen verwendet, bei denen die Zelllösung, nach Zugabe von DNase, über mehrere Zyklen langsam gefroren und wieder aufgetaut wurde. Auch hier war der Zellaufschluss unzureichend und es mußten große Mengen an DNase eingesetzt werden.

Als dritte Methode wurde ein Zellaufschluss mittels Ultraschall durchgeführt. Da Ultraschall DNA schert wurde auf die Zugabe von DNase verzichtet. Zwar mußte um die Zellen vollständig aufzuschließen und die genomische DNA zu scheren die Gesamtpulszeit, sowie Intensität im Vergleich zu *E. coli* deutlich erhöht werden, jedoch resultierte dies in einem annähernd vollständigen Zellaufschluss sowie einem kompletten Scheren der DNA.

### **5.6.2 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie**

Zur Verringerung einer potentiellen Proteolyse und Aggregation der Zielproteine wurde die Affinitätschromatographie für eine Nutzung bei 4°C optimiert. Hierzu wurde die Salzkonzentration im Puffer auf 2,0 M im Gegensatz zu den 2,5 M im Hv-YPC Medium eingestellt um Ausfällung von NaCl bei der geringen Temperatur vorzubeugen. Für Proteine aus dem RSBP *Kebrit* mit einem Salzgehalt von > 4 M wurden 10% v/v Glycerin zur Kompensation des verringerten Salzgehaltes zugegeben.

Die für Ni-Beads Reinigung in *Haloferax volcanii* vorgeschlagene Menge von 20 mM Imidazol in Puffer A wurde aufgrund der verringerten Temperatur auf 10 mM reduziert.

Die Beladung der Säule erfolgte bei verschiedenen Flußraten sowie mit bis zu 3 Zyklen. Die beste Proteinbindung wurde bei einem einmaligen Auftrag mit einer Flußrate von max. 1,5 mL min<sup>-1</sup> erreicht. Die Elution erfolgte nach dem vollständigen Auftragen des Proteins entweder mit einem direkten Gradienten mit einer Steigung von 2% v/v Puffer B min<sup>-1</sup> oder, wie im Falle von ADH/D1 mit einer vorherigen direkten Erhöhung auf 11% Puffer B (= 43 mM Imidazol) zur Entfernung von Verunreinigung, mit anschließendem Gradienten bis zur Zielprotein-Elution. Folgende Abbildung zeigt ein typisches Elutionsdiagramm der Reinigung von ADH/D1.

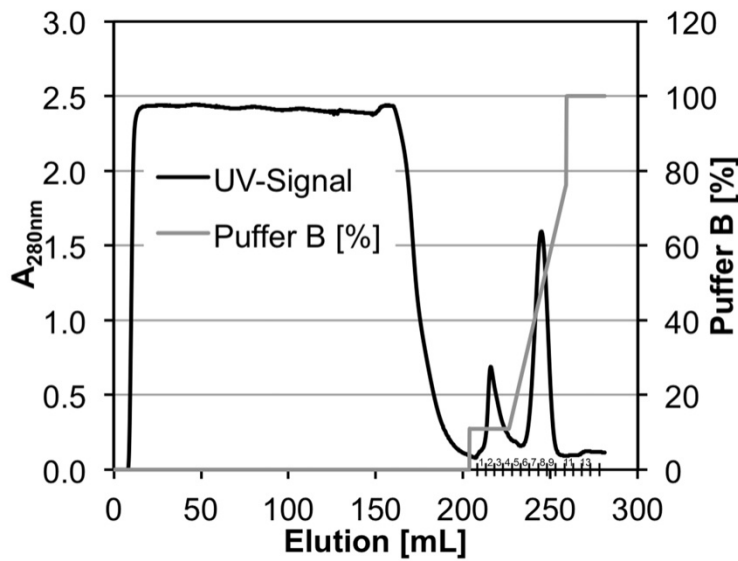


Abbildung 27: Elutionsdiagramm einer Reinigung von ADH/D1 nach Expression in *Haloferax volcanii*. Unspezifisch gebundene Proteine eluieren bei 43 mM Imidazol wohingegen das Zielprotein in reiner Form als separater Pik bei höheren Imidazolkonzentrationen eluiert

Zu erkennen ist zum einen die klare Trennung von unspezifisch gebundenem Protein, das bei 11% Puffer B eluiert und zum anderen das spezifisch gebundene Protein mit einer Elution bei höheren Imidazolkonzentrationen.

Zur Visualisierung der Genexpression wurde die Proteinmenge nach Elution bestimmt, die Verdünnung für die Hauptfraktion auf 30  $\mu\text{g}$  Protein pro Geltasche berechnet und die weiteren Fraktionen entsprechend der Verdünnung der Hauptfraktion verdünnt, wie in folgender Abbildung dargestellt.

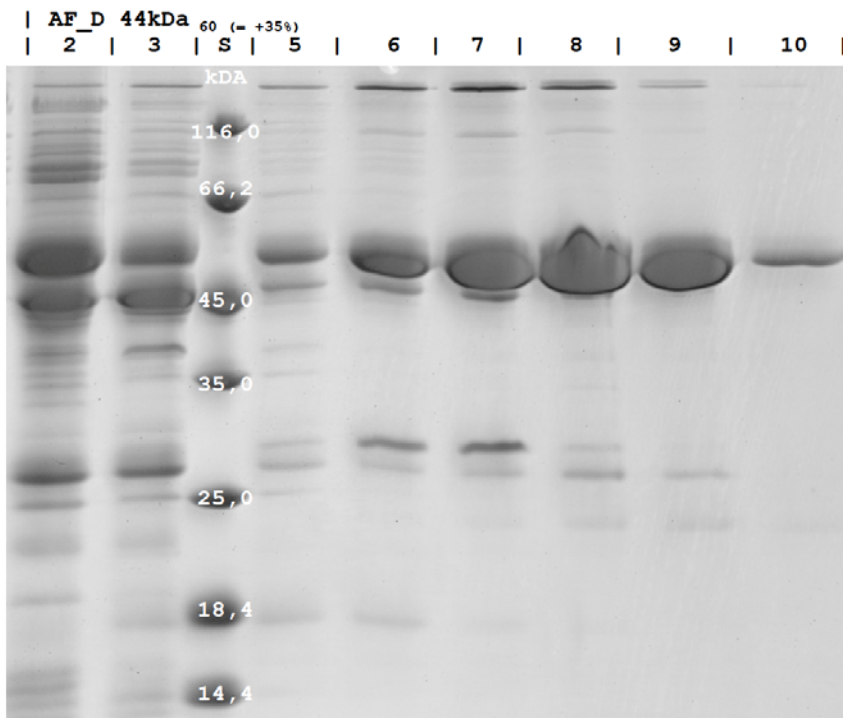


Abbildung 28: SDS-PAGE nach Proteinreinigung von ADH/D1 in *Haloferax volcanii*

Die SDS-PAGE zeigt, daß im ersten Elutionspeak (Fraktionen 2 – 5) bereits Zielprotein verloren geht. Dies wird jedoch durch die hohe Reinheit des zweiten Elutionspeaks (Fraktionen 6 – 10) kompensiert.

### 5.6.3 Protein Verifizierung

Die exakte Masse des Proteins wurde sowohl mittels MALDI-TOF, als auch LC-ESI/MS ermittelt. Hierbei ergaben sich die Massen von 44.308 Da im einfach geladenen und 22.156 Da (= 44.312 Da) im doppelt geladenen Peak der MALDI-TOF Messungen (Vergleiche dazu Abbildung 66 im Anhang), sowie 44.308 Da im ersten Teil, und 44.309 Da im zweiten Teil des Hauptelutionspeaks der LC-ESI/MS Massenbestimmung (Vergleiche dazu Abbildung 67 im Anhang). Die erhaltenen Werte liegen innerhalb der Messtoleranz der Instrumente zur theoretischen Masse von 44.310,9 Da von AF\_D.

Ein tryptischer Verdau mit anschließender Peptidsequenzierung wies eine Sequenzübereinstimmung von 86% nach, wie in folgender Abbildung dargestellt:

1	MHHHHHMR^M	EFR^HNLPSDD	IIFGSGTLEK^	IGEETK^K^WGD	K^AILVTGK^SN
51	MK^K^LGFLADA	IDYLESAGVE	TVHYGEIEPN	PTTTVVDEGA	EIVLEEGCDV
101	VVALGGGSSM	DAAK^GIAMVA	GHSAEER^DIS	VWDFAPEGDK^	ETK^PITEK^TL
151	PVIAATSTSG	TGSHVTPYAV	ITNPETK^GK^P	GFGNK^HSFPK^	VSIVDIDILK^
201	EMPPR^LTAIT	GYDVFSHVSE	NLTAK^GDHPT	ADPLAIR^AIE	YVTEYLLR^AV
251	EDGEDIK^AR^E	K^MAVADTYAG	LSNTISGTTL	R^HAMAHPISG	YYPDISHGQA
301	LASISVPIME	HNIENGDEK^T	WER^YSR^IAVA	LDASK^PVDNT	R^QAASK^AVDG
351	LK^NLLR^SLDL	DK^PLSELGVE	EEK^IPEMTEG	AFIYMGGGIE	ANPVDVSK^ED
401	VK^EIFR^K^SL				

Abbildung 29: Identifizierte Fragmente nach tryptischem Verdau und Peptidsequenzierung anhand der Aminosäuresequenz von AF\_D. Der Zirkumflex (^) stellt die 41 theoretischen Trypsinproteaseschnittstellen dar. In schwarz sind die gefundenen Sequenzen dargestellt

Die fehlenden Sequenzabschnitte sind für die Peptidsequenzierung entweder zu lang oder zu kurz.

#### 5.6.4 Diskussion

Die Versuche zeigten, daß sich ein Zellaufschluss mittels Ultraschall am besten geeignet hatte. Dies ist darauf zurückzuführen, daß *Haloferax volcanii* über eine äußerst stabile kristalline Zellwand, den sogenannten S-Layer, verfügt, welcher aus vernetzten Glykoproteinen in Form von Hexagonen besteht (109) und die Zellyse erschwert. Des Weiteren beinhaltet jede *Haloferax volcanii* Zelle über 20 Genomkopien während der exponentiellen Wachstumsphase sowie 12 Genomkopien während der stationären Phase (111). In der Gesamtheit besteht das *Haloferax volcanii* Genom aus 4.012.900 Basenpaaren (36). Der genutzte Expressionsstamm verfügt zwar über eine Deletion des nativen pHV2 Plasmids (6.359 bp), der Replikationsursprung wurde jedoch für den pTA963 Vektor genutzt. Somit konnte bei Proteinreinigung am Ende der exponentiellen Phase von ungefähr 16 x 4 Millionen bp = 64 Millionen Basenpaaren an DNA pro Zelle ausgegangen werden. *E. coli* zeigt eine ähnliche Genomgröße von 4.639.221 (K-12) (96), jedoch deutlich weniger Kopien, mit 6,8 in der exponentiellen Phase und 2,5 in der Verzögerungsphase (170). Somit konnte bei der Proteinreinigung am Ende der exponentiellen Phase von ungefähr 4,7 x 4 Millionen bp = 19 Millionen Basenpaaren an DNA pro Zelle ausgegangen werden. Dies entspricht in etwa 1/3 der DNA Menge von *Haloferax volcanii* in der gleichen Wachstumsphase. Dieser

Mengenunterschied mit dem deutlichen Abfall der Aktivität von handelsüblichen DNAsen in Hochsalzpuffer machte einen Zellaufschluss mittels Ultraschall zur Methode der Wahl, da hierbei eine Scherung der DNA stattfindet.

Die Anwendung der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie bei 4°C hatte den Vorteil einer geringeren Proteolyse, zeigte jedoch eine weitere Verringerung der Bindespezifität des His<sub>6</sub>-tags an die Säule, welche bereits durch die hohe Ionenstärke des eingesetzten NaCl verringert war. Da hohe Salzkonzentrationen hydrophobe Interaktionen fördern und dadurch eine höhere Anzahl an unspezifischen Bindungen entstehen, wurde mindestens 10 mM Imidazol in Puffer A eingesetzt. Da Imidazol ebenso mit der spezifischen Bindung in Konkurrenz steht und der Proteinauftrag bei 4°C erfolgte, wurde die Flußrate auf 1,5 mL min<sup>-1</sup> verringert, um genügend Proteinauftrag zu gewährleisten. Wie in der SDS-PAGE für ADH/D1 ersichtlich, waren 43 mM Imidazol nötig um den Großteil der unspezifisch bindenden Verunreinigungen zu entfernen, was im Gegenzug zu einem relativ hohen Verlust an Zielprotein führte. Die Proteinmenge für die SDS-PAGE wurde vor dem Auftrag auf maximal 30 µg Protein pro Tasche verdünnt, da die hohe Salzkonzentration anderweitig zu starken Verzerrungen des Laufmusters führte.

Die Analyse der Massen sowie das Ergebnis der Peptidsequenzierung verifizierten den Erhalt des Zielproteins AF\_D.

## 6 Charakterisierung der Mn-ADH/D1 aus *Discovery*

Die Bezeichnung Mn-ADH/D1 entspricht der ADH/D1 (im Vorfeld AF\_D) mit Mangan ( $Mn^{2+}$ ) im aktiven Zentrum.

### 6.1 Aktivität und Stabilität

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchung von verschiedenen Parametern auf die Aktivität sowie Stabilität von ADH/D1 aufgeführt.

#### 6.1.1 Metallabhängigkeit

ADH/D1 wies eine initiale Aktivität von  $0,4 \text{ U mg}^{-1}$  auf. Basierend auf Sequenzvergleichen (BLAST, Abschnitt 4.6) sowie der Ursprungsannotation (26) wurde ADH/D1 als eisenbindendes Protein eingestuft. Um die Metallabhängigkeit zu testen erfolgte als erster Schritt, zur Entfernung von Metall-Ionen aus Expression oder Reinigung, eine Dialyse der ADH/D1 Proteinlösung entgegen einem EDTA beinhaltenen Puffer. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit verschiedenen  $Fe^{2+}$  Salzen unter anaeroben Bedingungen, bevor die Aktivität bestimmt wurde. Die Inkubation mit EDTA reduzierte die Initiale Aktivität auf  $0,1 \text{ U min}^{-1}$ , was eine Entfernung von gebundenem Metall suggeriert. Die Zugabe von Eisen (II) hatte keine Erhöhung der Aktivität zur Folge. Anhand dieser Tatsache wurde in einem weiteren Schritt der Einfluß von weiteren Metallsalzen mit ähnlichem Ionenradius und Koordination der Substituenten auf die Aktivität von ADH/D1 untersucht. Die folgende Abbildung veranschaulicht die gewonnenen Ergebnisse.



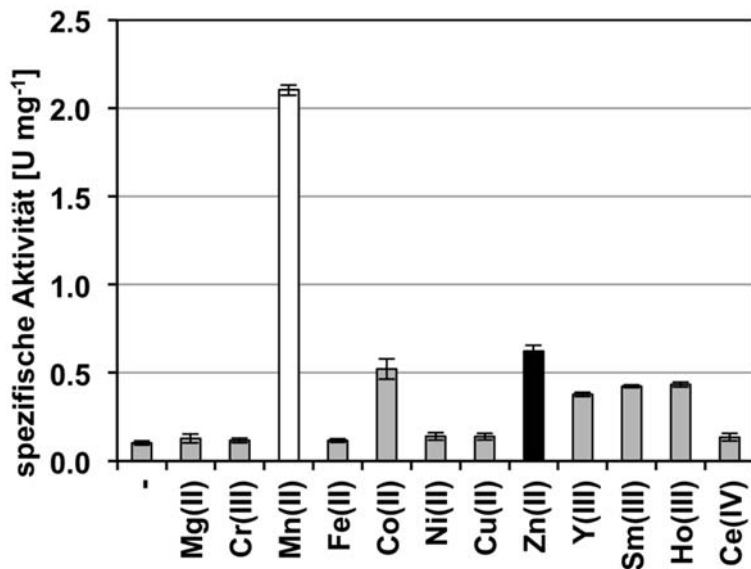


Abbildung 30: Aktivität von ADH/D1 mit verschiedenen Metallsalzen. - = metallfreies Protein, nach Inkubation mit EDTA

Die untersuchten Lanthanide hatten, bis auf  $\text{Ce}^{4+}$ , einen Anstieg an Aktivität um den Faktor 4 – 5 im Verhältnis zum metallfreien (-) Protein zur Folge.  $\text{Co}^{2+}$  erhöhte die Aktivität um den Faktor 5 und  $\text{Zn}^{2+}$  um das 6-fache.  $\text{Mn}^{2+}$  wies die höchste Aktivierung (Faktor 21) auf 2,1 U  $\text{mg}^{-1}$  auf.

### 6.1.2 Kofaktor-Abhängigkeit

Mn-ADH/D1 zeigte sowohl Aktivität im oxidativen Schritt, mit den Kofaktoren  $\text{NAD}^+$  als auch  $\text{NADP}^+$ , wenn auch die Aktivität mit  $\text{NADP}^+$  (0,1 U  $\text{mg}^{-1}$ ) deutlich geringer war als mit  $\text{NAD}^+$  (1,6 U  $\text{mg}^{-1}$ ). Wurden die Kofaktoren im Verhältnis 1:1 gemischt, ergab sich eine Verringerung der Aktivität um den Faktor 4, im Verhältnis zur Aktivität mit  $\text{NAD}^+$ , was auf eine starke Bindung des  $\text{NADP}^+$  Kofaktors schließen läßt.

Die maximale Substratumsetzung der mit  $\text{Mn}^{2+}$  substituierten ADH/D1 (Mn-ADH/D1) sowie der mit  $\text{Zn}^{2+}$  substituierten ADH/D1 (Zn-ADH/D1) ergab einen Anstieg der Aktivität mit ansteigender  $\text{NAD}^+$  Konzentration bis zu 10 mM. Obwohl Mn-ADH/D1 stets eine höhere Aktivität aufwies, war die relative Aktivität der von Zn-ADH/D1 bei  $\text{NAD}^+$  Konzentrationen von  $\leq 5$  mM höher, wie folgende Abbildung darstellt:

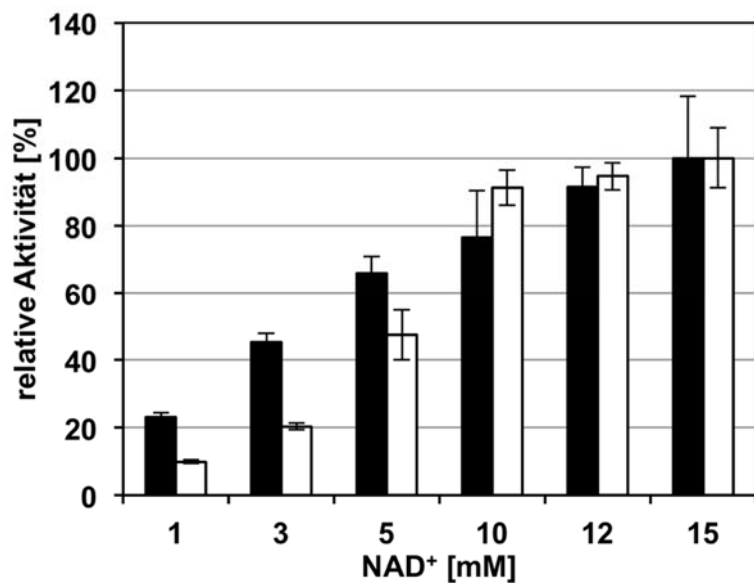


Abbildung 31: Relative Aktivität von Mn-ADH/D1 (weiß) und Zn-ADH/D1 (schwarz) bei verschiedenen NAD<sup>+</sup> Konzentrationen

### 6.1.3 Temperaturabhängigkeit

Die Temperaturabhängigkeit wurde in einem Bereich von 20 – 80°C untersucht. Dabei fiel eine maximale Aktivität bei 70 – 75°C für Mn-ADH/D1 und Zn-ADH/D1 auf, wie nachfolgende Abbildung darstellt:

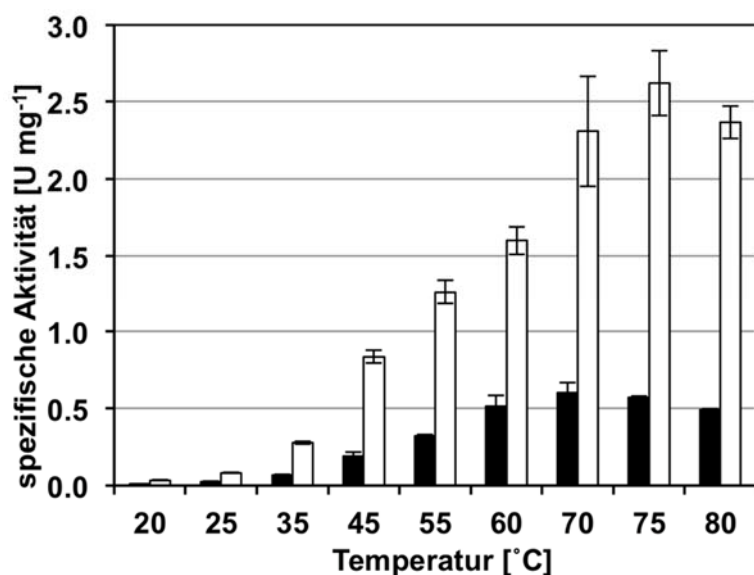


Abbildung 32: Spezifische Aktivität von Mn-ADH/D1 (weiß) und Zn-ADH/D1 (schwarz) bei verschiedenen Temperaturen

Zusammenfassend läßt sich erkennen, daß sich die Aktivität bei einer Temperatur von 80°C verringert und bei höheren Temperaturen eine Aggregation einsetzt.

Weitere Untersuchungen zur Aggregatbildung legten den Schluß nahe, daß die Aggregationstemperaturen sowohl vom gebundenen Metallion, als auch von dessen Konzentration abhängig sind. So ergab sich für Zn-ADH/D1 bei einem Protein zu Metall-Verhältnis von 1:4 und 1:9 die höchste Aggregationstemperatur von 70°C. Höhere Metallkonzentrationen führten zu einer Abnahme bis auf 63°C für ein Verhältnis von 1:44. Für Mn-ADH/D1 hingegen stieg die Aggregationstemperatur mit zunehmender Metallkonzentration bis zu einem Verhältnis von 1:13 mit 74°C an. Mn-ADH/D1 tolerierte höhere Metallkonzentrationen bis zu einem Verhältnis von 1:22 (siehe Abbildung 33).

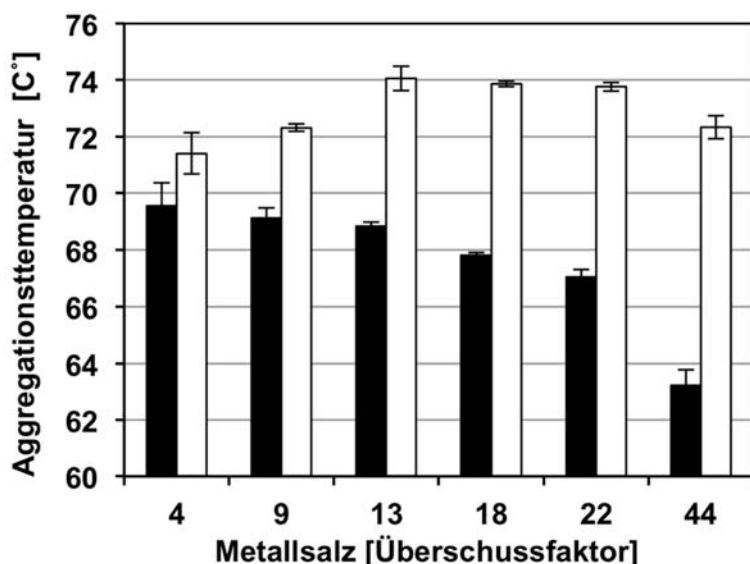


Abbildung 33: Aggregationstemperatur von Mn-ADH/D1 (weiß) und Zn-ADH/D1 (schwarz) bei verschiedenem Überschuß des korrespondierenden Metallsalzes

Die Inkubation von Mn-ADH/D1 in Lagerpuffer bei verschiedenen Temperaturen zeigte keine Verringerung der Aktivität über die ermittelten 6 h Inkubation, bei Inkubationen unterhalb von 40°C. Bei Temperaturen bis einschließlich 50°C wies Mn-ADH/D1 über 50% Aktivität nach 6 h Inkubation auf. Höhere Temperaturen hatten einen stärkeren Abfall der Aktivität zu Folge, so daß bei Temperaturen von 70°C oder höher die Aktivität nach 30 min um bis zu 85% abfiel und keine Aktivität mehr nach 60 min meßbar war. Folgende Abbildung stellt die relative Aktivität von Mn-ADH/D1 nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen dar:

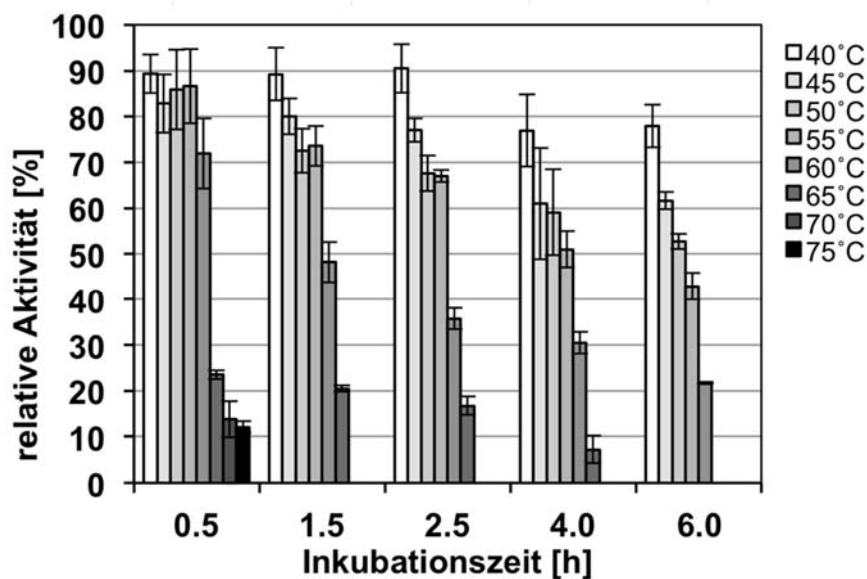


Abbildung 34: Relative Aktivität von Mn-ADH/D1 nach Inkubation über verschiedene Zeiträume bei verschiedenen Temperaturen

#### 6.1.4 Einfluß des pH

Der optimale pH für ADH/D1 liegt im basischen Bereich, unabhängig von  $Zn^{2+}$ - oder  $Mn^{2+}$ -Bindung. Im Falle von Mn-ADH/D1 kommt es zu einer stufenartigen Aktivierung um pH 9,6, mit einer konstanten Aktivität bis pH 10,2, gefolgt von einer stufenartigen Deaktivierung um 70% bei pH 10,4. Für Zn-ADH/D1 ist ein ähnliches Aktivierungsprofil erkennbar, jedoch ist sowohl die Aktivierung als auch Deaktivierung weniger scharfkantig, dargestellt in folgender Abbildung.

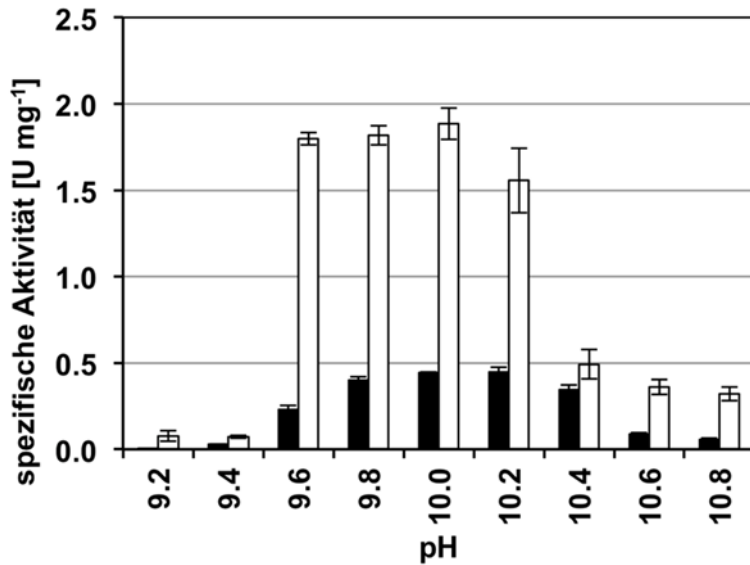


Abbildung 35: Spezifische Aktivität von Mn-ADH/D1 (weiß) und Zn-ADH/D1 (schwarz) bei unterschiedlichem pH

Es zeigte sich, daß die Zugabe von 1 mM des Reduktionsmittels  $\beta$ -Mercaptoethanol (BME) den pH-Bereich, in welchem Aktivität der Mn-ADH/D1 ersichtlich war, änderte. Die BME-Zugabe verlagerte den pH für maximale Aktivität auf 9,5 und erweiterte so den aktiven pH-Bereich um den Faktor 4 auf pH 8,5 bis 10,5, wie folgende Abbildung zeigt:

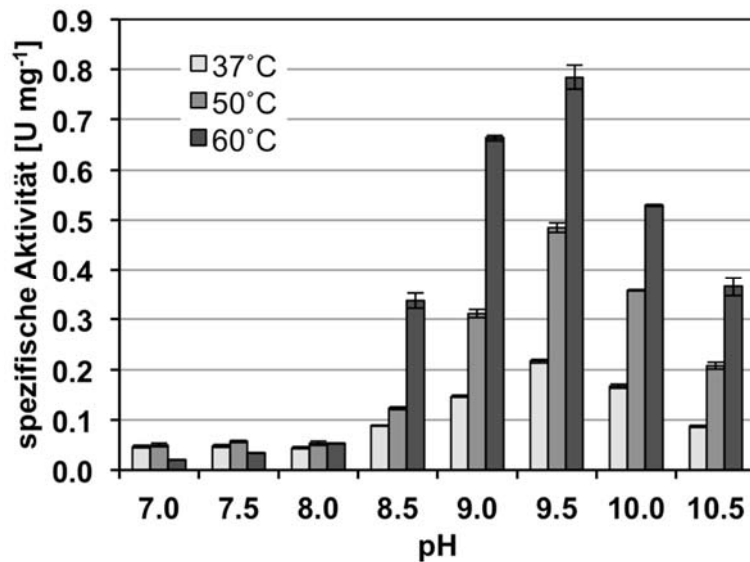


Abbildung 36: Spezifische Aktivität von Mn-ADH/D1 bei verschiedenen pH und Temperaturen nach Zugabe von 1 mM des Reduktionsmittels  $\beta$ -Mercaptoethanol (BME)

Die BME-Zugabe reduzierte bei den gemessenen Temperaturen die Aktivität der ADH/D1 um ~ 35%.

### 6.1.5 Salzabhängigkeit

ADH/D1 wies Aktivität sowohl in NaCl als auch KCl auf. Ansteigend mit höheren Salzkonzentrationen und einem Maximum zwischen 3,0 – 4,0 M KCl. Zn-ADH/D1 erreichte die maximale Aktivität bei 2,0 M KCl ( $0,5 \text{ U mg}^{-1}$ ), wohingegen Mn-ADH/D1 die maximale Aktivität bei 3,0 M KCl ( $1,6 \text{ U mg}^{-1}$ ) erreichte, dargestellt in folgender Abbildung:

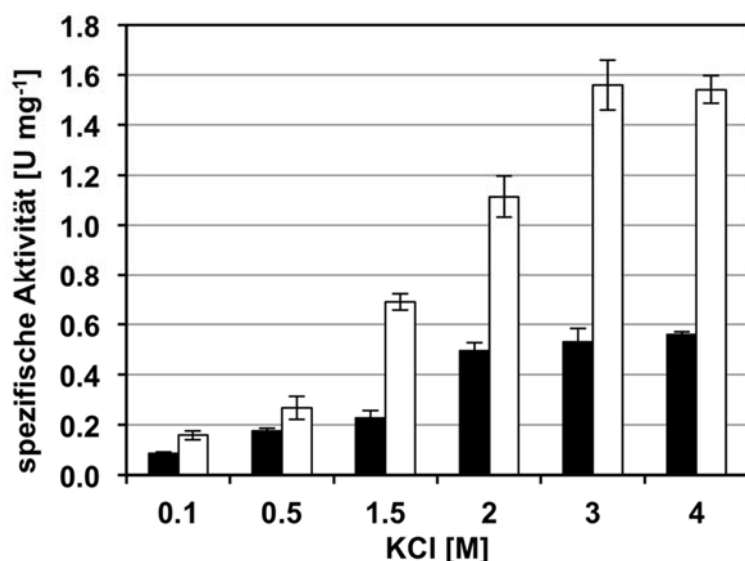


Abbildung 37: Spezifische Aktivität von Mn-ADH/D1 (weiß) und Zn-ADH/D1 (schwarz) bei verschiedenen KCl-Konzentrationen

Die Salzstabilität von ADH/D1 wurde durch Inkubation bei Raumtemperatur in Lagerpuffer mit verschiedenen NaCl Konzentrationen zwischen 500 mM bis 3,0 M ermittelt. Es zeigten sich keine deutlichen Unterschiede in der Stabilität zwischen den untersuchten Salzkonzentrationen und Mn-ADH/D1 wies nach 24 h Inkubation bei 500 mM NaCl 65% Aktivität auf (Vergleiche dazu Abbildung 68 im Anhang).

Nach Dialyse von ADH/D1, entgegen ddH<sub>2</sub>O, trat ein vollständiger Verlust der Aktivität in salzfreiem Aktivitätspuffer auf. Tests in normalem Aktivitätspuffer mit 3 M KCl führten zur vollständigen Aktivitätsrückgewinnung. Ähnliche Ergebnisse waren sichtbar bei Dialyse in Lagerpuffer mit 50 mM und 500 mM NaCl und bei Aktivitätstests in Puffern mit 50 mM beziehungsweise 500 mM KCl.

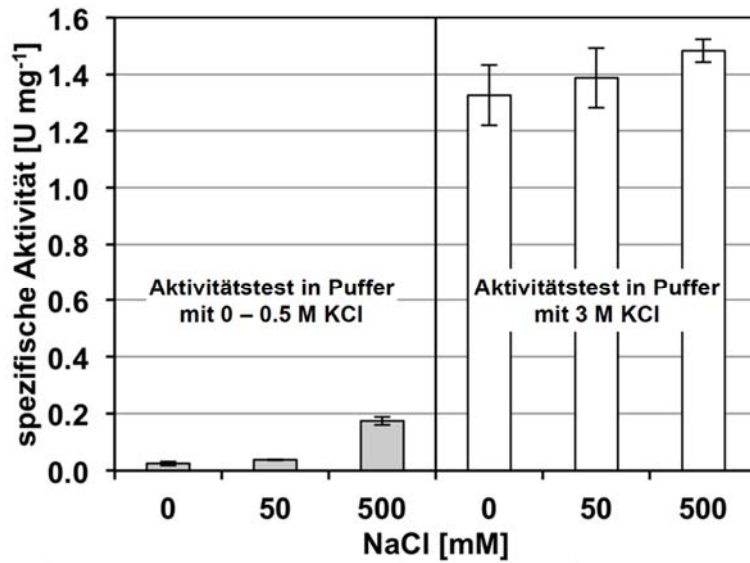


Abbildung 38: Spezifische Aktivität von Mn-ADH/D1 dialysiert in Lagerpuffer mit 0 - 500 mM NaCl und anschließender Aktivitätsbestimmung in Puffer mit 0 - 500 mM KCl (grau) beziehungsweise 3 M KCl (weiß)

### 6.1.6 Gefriertrocknung

Basierend auf der hohen Salzstabilität von ADH/D1 und der resultierenden hohen Toleranz gegenüber wenig freiem Wasser wurde die Stabilität von ADH/D1 gegenüber Wasserentzug mittels Gefriertrocknung untersucht. ADH/D1 zeigte hierbei einen vollständigen Erhalt der Enzymfunktion nach Gefriertrocknung, wie folgende Abbildung darstellt.

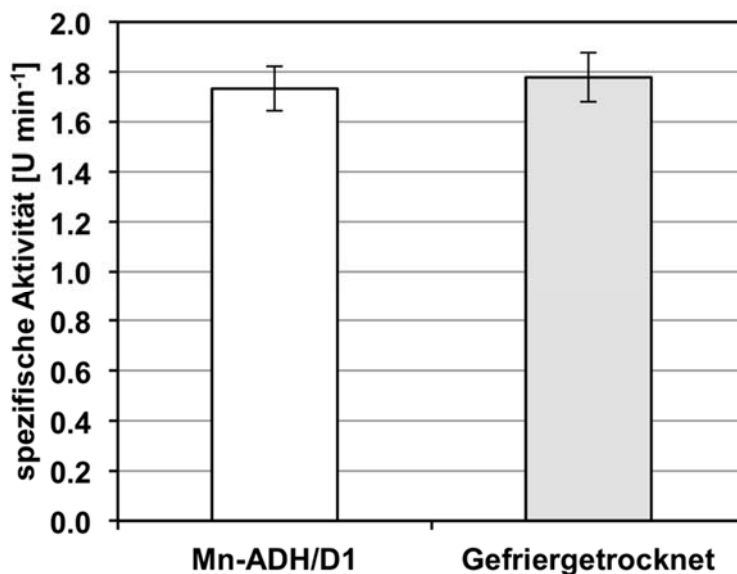


Abbildung 39: Spezifische Aktivität von Mn-ADH/D1 vor (weiß) und nach (grau) der Gefriertrocknung

### 6.1.7 Substratspektrum und Michaelis-Menten-Kinetik

Analyse des Substratumsatzes führten zu dem Ergebnis, daß Mn-ADH/D1 langkettige primäre Alkohole, wie Zimtalkohol ( $1,57 \text{ U mg}^{-1}$ ) oder Prenol ( $1,32 \text{ U mg}^{-1}$ ), gegenüber kürzeren, wie Butanol ( $0,6 \text{ U mg}^{-1}$ ) oder Ethanol ( $0,04 \text{ U mg}^{-1}$ ) bevorzugt. Des Weiteren konnte eine geringe Aktivität für den sekundären Alkohol Cyclohexanol ( $0,04 \text{ U mg}^{-1}$ ) gemessen werden. Eine ähnliche Tendenz ist für Zn-ADH/D1 ersichtlich, jedoch mit geringerer Aktivität, wie folgende Abbildung, sowie Tabelle 66 darstellen.

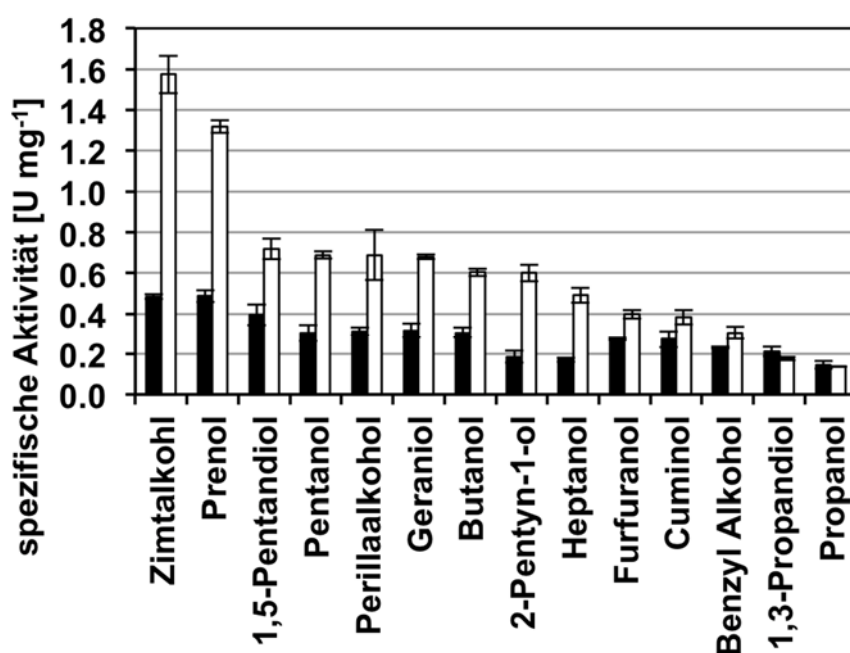


Abbildung 40: Spezifische Aktivität von Mn-ADH/D1 (weiß) und Zn-ADH (schwarz) mit verschiedenen Substraten

Im Durchschnitt wies Mn-ADH/D1 für alle untersuchten Substrate eine um den Faktor 1,9 höhere Aktivität auf als Zn-ADH/D1 (bei  $60^\circ\text{C}$  und  $4 \text{ \% v/v}$  Substrat). Interessanterweise variierte der Einfluß der Aktivierung zwischen  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ . So zeigte Mn-ADH/D1 eine maximal um den Faktor 4 erhöhte Aktivität gegenüber Zn-ADH/D1, jedoch für 4 Substrate bis zu 40% weniger Aktivität. Die geringere Aktivität der Mn-ADH/D1 war nur bei sehr langsam umgesetzten Substraten sichtbar mit einer maximale Aktivität der Zn-ADH/D1 von  $0,21 \text{ U mg}^{-1}$  beim Umsatz von 1,3-Propandiol.

Neben der indirekten Bestimmung des Substratumsatzes über die Absorption des Kofaktors, erfolgte eine direkte Bestimmung mittels GC-MS, welche den Umsatz von Zimtalkohl zu Zimtaldehyd nachwies (Vergleiche dazu Abbildung 69 im Anhang).



Die Analyse der Michaelis-Menten-Kinetik Parameter der zwei schnell umgesetzten Substrate Zimtalkohol und Prenol sowie dem langsamer umgesetzten 1,3-Propandiol zeigte, daß die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ), die Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}$ ) sowie die kinetische Spezifität ( $k_{\text{cat}} K_M^{-1}$ ) für Mn-ADH/D1 höher als für Zn-ADH/D1 ist. Die Michaelis-Menten Konstante ( $K_M$ ) hingegen ist niedriger für Zn-ADH/D1, wobei dies auf dem geringeren  $V_{\max}$  basiert. Folgende Tabelle stellt die ermittelten Michaelis-Menten Parameter dar:

Tabelle 60: Michaelis-Menten-Kinetik Parameter von ADH/D1 mit den 3 Substraten Zimtalkohol, Prenol und 1,3-Propandiol

<b>Substrat</b>	<b>Aktives Metall</b>	<b><math>V_{\max}</math> [U mg<sup>-1</sup>]</b>	<b><math>K_M</math> [M]</b>	<b><math>k_{\text{cat}}</math> [s<sup>-1</sup>]</b>	<b><math>k_{\text{cat}} K_M^{-1}</math> [M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>]</b>
Zimtalkohol	Mn <sup>2+</sup>	1,77±0,09	8,1±1,6 x 10 <sup>-4</sup>	231,4±11,0	28,6±7,1 x 10 <sup>4</sup>
	Zn <sup>2+</sup>	0,45±0,03	5,6±1,6 x 10 <sup>-4</sup>	11,7±0,7	2,1±0,7 x 10 <sup>4</sup>
Prenol	Mn <sup>2+</sup>	2,12±0,05	17,4±3,5 x 10 <sup>-3</sup>	274,5±24,2	15,8±4,6 x 10 <sup>3</sup>
	Zn <sup>2+</sup>	0,66±0,19	5,8±1,4 x 10 <sup>-3</sup>	17,1±1,2	3,0±0,9 x 10 <sup>3</sup>
1,3-Propandiol	Mn <sup>2+</sup>	0,85±0,06	17,2±2,6 x 10 <sup>-2</sup>	110,3±8,4	6,4±1,4 x 10 <sup>2</sup>
	Zn <sup>2+</sup>	0,50±0,01	5,5±0,4 x 10 <sup>-2</sup>	12,9±0,3	2,4±0,2 x 10 <sup>2</sup>

Die Abbildung 70 im Anhang verweist auf die jeweiligen Messkurven, welche zur Bestimmung der Kinetik genutzt wurden. Daraus ergibt sich, daß der gewählte Fit, welcher einer 1-Substrat-1-Enzym Reaktion aufgrund einer Kofaktorkonzentration im Überschuß folgt, den Messverlauf gut darstellt.

### 6.1.8 Einfluß von Lösungsmitteln

Die Analyse des Einflusses von Lösungsmitteln auf die Aktivität von Mn-ADH/D1 zeigte, daß ~ 60% beziehungsweise ~ 47% Aktivität nach Zugabe von 10% v/v DMSO in 1 – 4 M KCl beziehungsweise 30% v/v DMSO in 1 – 3 M KCl erhalten blieben. Methanolzugabe reduzierte die Aktivität deutlicher auf 33%, für die Zugabe von 10% v/v Methanol in 1 – 4 M KCl und auf 28% in 30% v/v Methanol in 1 – 2 M KCl. Bei geringer Salzkonzentration (0,1

M KCl) hingegen erhöhte sich die Aktivität von Mn-ADH/D1 bei 10% v/v DMSO auf 221% und bei 30% v/v DMSO auf 178%, wie folgende Abbildung wiedergibt:

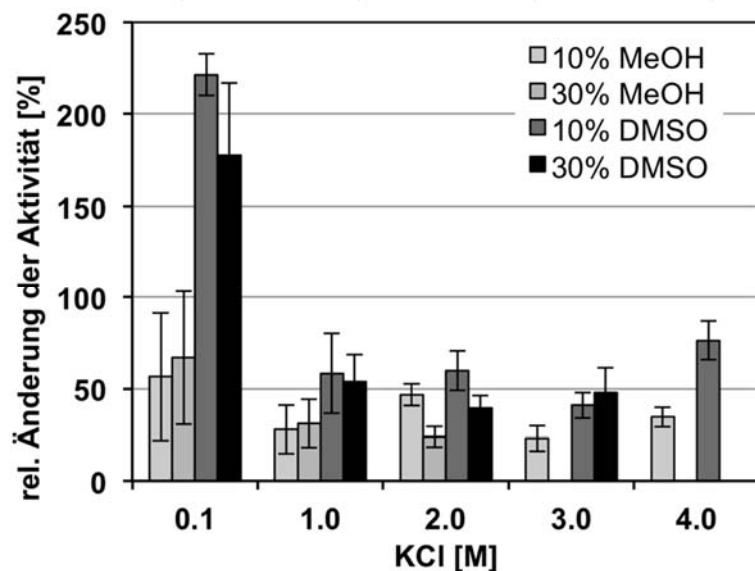


Abbildung 41: Relative Änderung der Aktivität von Mn-ADH/D1 nach Zugabe von 10% v/v oder 30% v/v DMSO beziehungsweise Methanol bei verschiedenen KCl Konzentrationen

Die Untersuchung der Stabilität von Mn-ADH/D1 bei 10% v/v beziehungsweise 30% v/v an DMSO, Methanol oder ACN in 2 M NaCl ergab einen Aktivitätserhalt von 90 – 95% bei beiden Konzentrationen von DMSO nach 16 h Inkubation, beziehungsweise 80 – 90% nach 23 h Inkubation bei Raumtemperatur. Für Methanol ergaben beide untersuchten Konzentrationen einen Anstieg an Aktivität. Nach Zugabe von 10% v/v ACN verblieben >80% Aktivität nach 32 h Inkubation, wohingegen 30% v/v ACN bereits nach 1 h Inkubation die Aktivität auf ungefähr 30% reduzierten.

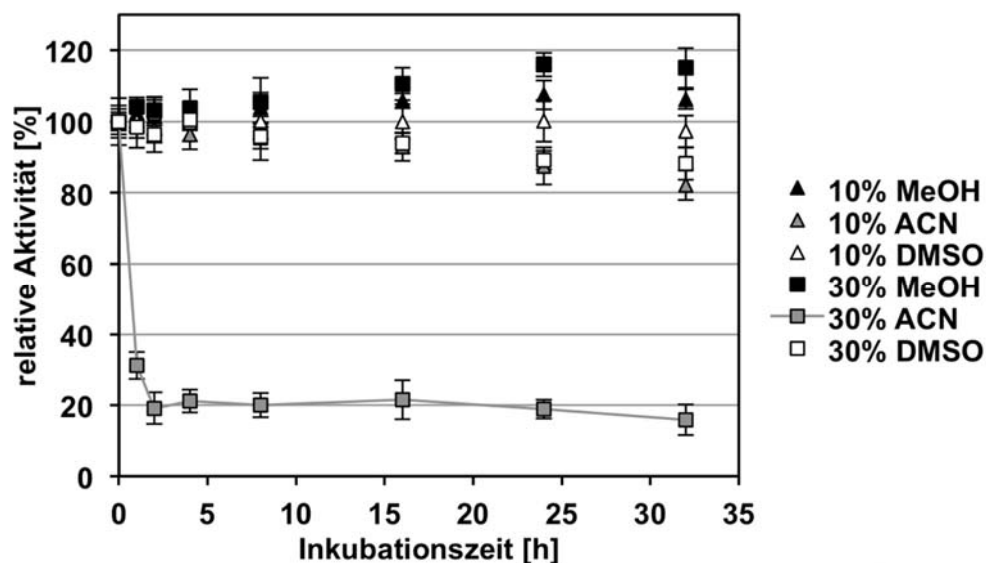


Abbildung 42: Relative Aktivität von Mn-ADH/D1 nach Inkubation von bis zu 32 h bei Raumtemperatur in 2 M NaCl Puffer nach Zugabe von 10% v/v beziehungsweise 30% v/v DMSO, Methanol oder ACN

## 6.2 Strukturelle Charakterisierung der Mn-ADH/D1 aus *Discovery*

Der folgende Abschnitt gibt die strukturelle Untersuchung der Mn-ADH/D1 wieder.

### 6.2.1 Sekundärstruktur und Oligomerisierung

Die Sekundärstruktur von ADH/D1 wurde mittels CD-Messungen bestimmt. Es ergab sich ein typischer Kurvenverlauf für ein Protein, das einen hohen  $\alpha$ -Helix Anteil besitzt, mit einem positiven Peak unterhalb von 200 nm, sowie einen negativen Peak mit zwei Tiefpunkten bei 208 sowie 222 nm. Eine bioinformatische Auswertung des Spektrums ergab einen voraussichtlichen Anteil von 70,4%  $\alpha$ -Helix und 5,38%  $\beta$ -Faltblatt.

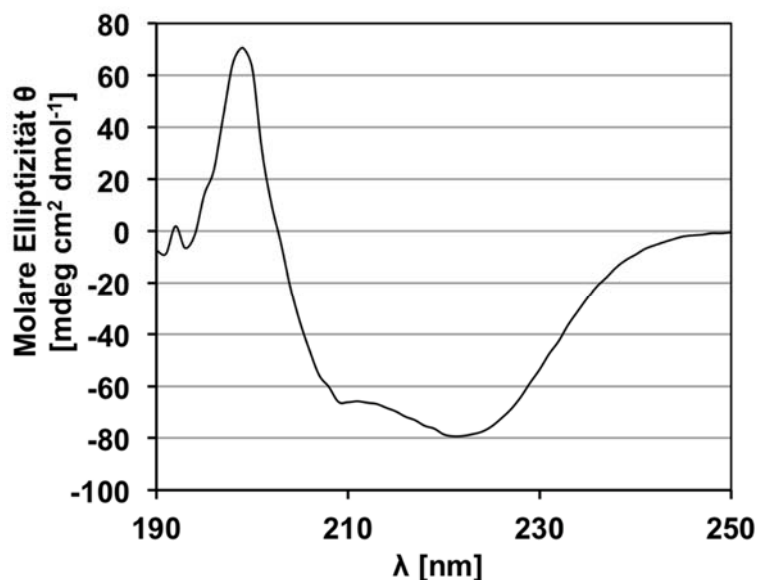


Abbildung 43: Spektrum der CD-Messung von ADH/D1 mit typischer Signatur eines  $\alpha$ -Helix-reichen Proteins

Um eine möglichst native Form des Oligomers zu erhalten wurde zur Bestimmung des Oligomerisierungszustands eine analytische Größenausschlusschromatographie unter Hochsalzbedingungen durchgeführt. Dabei fiel auf, daß ADH/D1 nach Dialyse mit EDTA, die native Form, sowie Mn-ADH/D1 bei ungefähr 75 kDa und Zn-ADH/D1 bei 93 kDa eluieren. Die erhaltenen Massen lassen auf eine dimere Form schließen, welche eine theoretische Masse von 88,6 kDa aufweist.

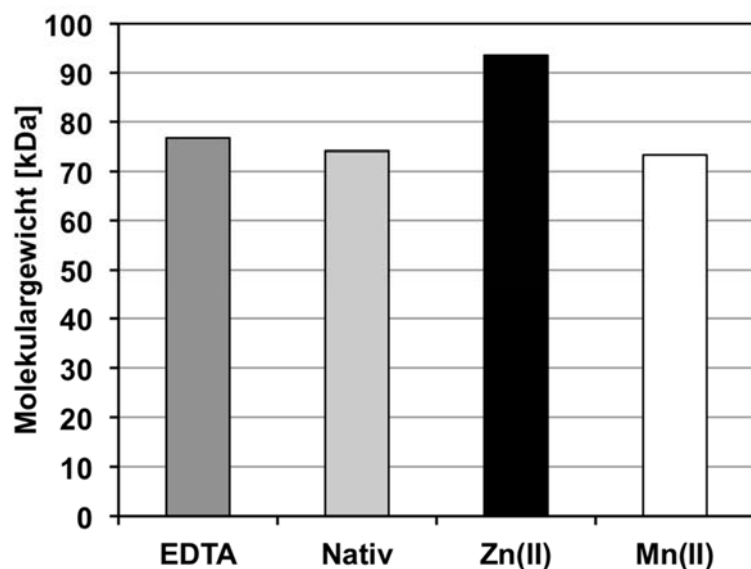


Abbildung 44: Größenausschlusschromatographie von ADH/D1 nach Dialyse gegen EDTA, in nativer Form, Zn-ADH/D1 und Mn-ADH/D1

Die Kleinwinkelröntgenstreuung (*small angle X-ray scattering*, SAXS) wurde genutzt, um den Oligomerisierungszustand von ADH/D1 in Lösung unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen (Vergleiche hierzu Tabelle 67 im Anhang). ADH/D1 lag unter allen untersuchten Bedingungen als Dimer vor. Somit führten weder eine Dialyse entgegen EDTA-Puffer, Zugabe von BME, verschiedene Salzbedingungen, verschiedene pH, Vorinkubation bei 50°C, Messung bei 60°C, NADP<sup>+</sup> Zugabe noch Kombinationen dieser Bedingungen zu einer Änderung des Oligomerisierungszustands. Interessanterweise ergaben sich jedoch signifikante Unterschiede der aus SAXS-Messungen erhaltenen Strukturvorhersage zur ermittelten Struktur, auf die im Folgenden eingegangen wird.

### 6.2.2 Kristallisationsbedingungen

Zur kristallographischen Bestimmung der Proteinstruktur erfolgte eine Ermittlung der Kristallisationsbedingungen mit Ansätzen im *sitting drop* Verfahren mit sechs verschiedenen Kristallisationspuffer-Sätzen, mit einem Umfang von je 96 Puffern bei verschiedenen Proteinkonzentrationen, Metall- und Kofaktorzugaben. Voruntersuchungen ergaben, daß der Salzgehalt der Proteinlösung nicht höher als 300 mM NaCl sein sollte, da es sonst zur Bildung von Salzkristallen kommt. Mehrere Bedingungen wiesen gut geformte Kristalle auf, welche jedoch nicht beugten. Eine weitere Bedingung zeigte sehr dünne Kristallplättchen, welche jedoch verzwillingt waren und somit nicht gelöst werden konnten. Mehrere Feinselektionen dieser Bedingung im *hanging drop* Verfahren unter Abänderung der Konzentration der einzelnen Komponenten ergaben die folgende Bedingung, unter welcher sich Kristalle ohne Verzwillingung bildeten:

- *Hanging drop* mit 2 µL Proteinlösung sowie 2 µL Pufferlösung je Tropfen, sowie 500 µL Pufferlösung im Reservoir
- Zusammensetzung Proteinlösung: EDTA-behandelte ADH/D1 Lösung (Ausgangskonzentration 20 mg mL<sup>-1</sup>), dialysiert in Lagerpuffer mit 50 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,5, Zugabe von 1 mM NADH (aus 100 mM Stock in ddH<sub>2</sub>O), Zugabe von 1mM MnCl<sub>2</sub> (aus 100 mM Stock in ddH<sub>2</sub>O)
- Pufferzusammensetzung: 150 mM Magnesiumacetat, 28 – 30% v/v MPD (2-Methyl-2,4-pentandiol), 100 mM Natriumkacodylat

Unter Inkubation bei 20°C traten Kristalle nach 24 h auf, wuchsen jedoch weiter bis ungefähr Tag sechs (Vergleiche dazu Abbildung 72 im Anhang).

### 6.2.3 Kristallstruktur

Messungen der Kristalle der rekombinant exprimierten ADH/D1 mit MnCl<sub>2</sub> und NADH Zugabe ergaben ein Beugungsbild mit einer Auflösung von 1,95 Å. Das 3D-Modell des Kristalls wurde durch einen molekularen Austausch mit der beschriebenen Struktur der 1,3-Propaniol Dehydrogenase von *K. pneumonia* (3BFJ) erstellt welche eine Sequenzidentität von 31,9% hat. Das finale Modell umfaßt Aminosäure 1 bis 400 der Mn-ADH/D1 Struktur sowie drei weitere Aminosäuren des Linkers und N-terminalen His<sub>6</sub>-tags. Die Struktur des Monomers besteht aus zwei Domänen, wobei die C-terminale Domäne komplett aus  $\alpha$ -Helices besteht (Position 186 – 400) und die N-terminale aus einem  $\beta$ -Faltblatt gefolgt von einer  $\alpha/\beta$ -Rossmann Faltung, mit 6 parallelen  $\beta$ -Faltblättern. Zwei Monomere bilden ein eng gepacktes Dimer, bei welchem das N-terminale  $\beta$ -Faltblatt mit dem nachfolgenden, ersten  $\beta$ -Faltblatt der Rossmann Faltung des jeweils anderen Monomers, interagiert. Weitere Interaktionen stammen von Helix 2 und 3 der C-terminalen Domänen. Die Interaktionsfläche stellt mit 1.560 Å<sup>2</sup> 10,4% der Gesamtoberfläche des Monomers dar.

Die beiden Domänen des Monomers bilden einen ungefähr 26 Å langen Kanal, in dessen Zentrum sich das aktive Zentrum mit gebundenem Metall befindet. Der Kanal ist so aufgebaut, daß von einer Seite das Substrat und von der anderen Seite der Kofaktor binden kann. Das Metall ist von der C-terminalen und der Kofaktor von der N-terminalen Domäne gebunden.

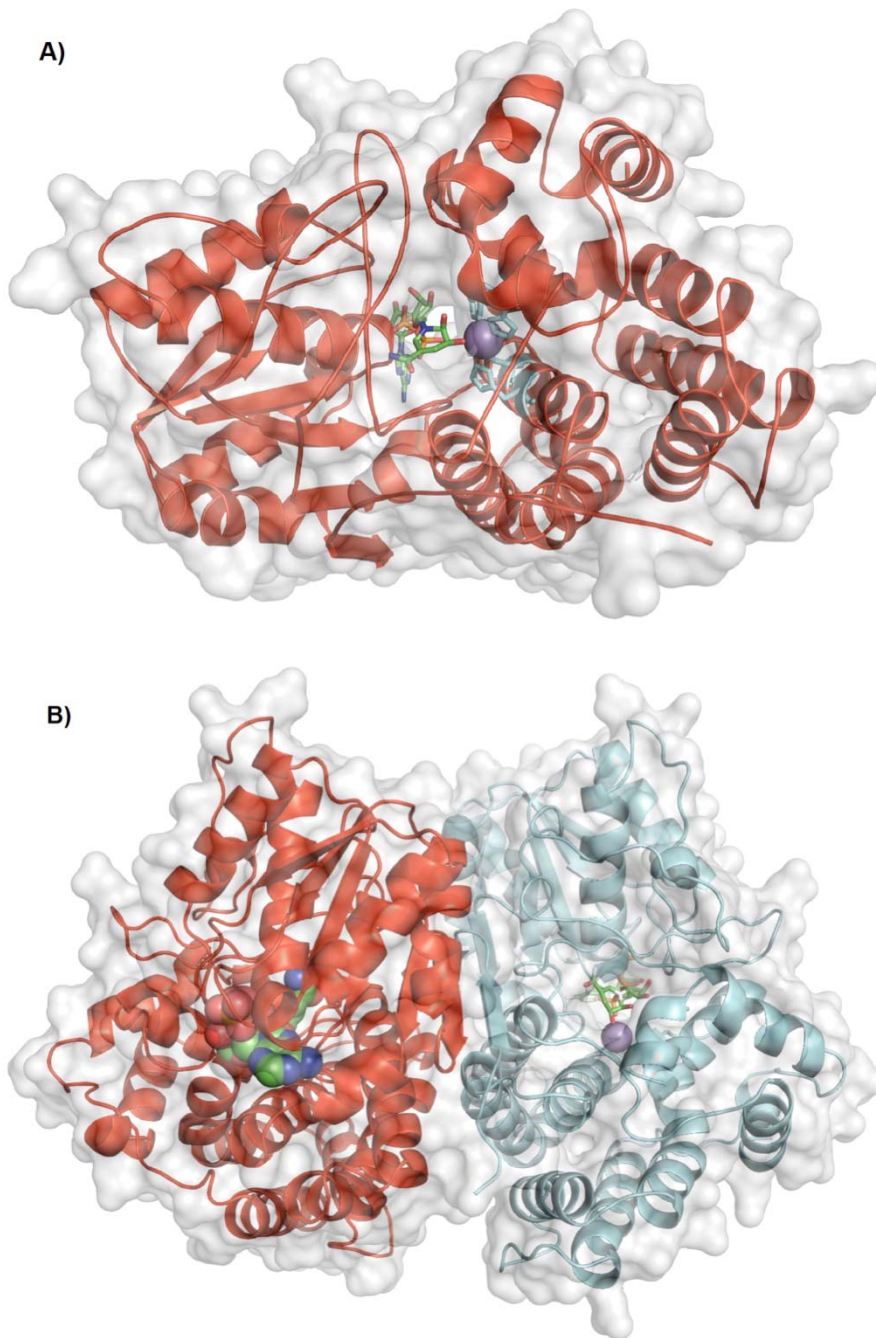


Abbildung 45: Kristallstruktur von Mn-ADH/D1 in Cartoon Darstellung und überlagerter Elektronendichte mit gebundenem Kofaktor (grün) und Mn<sup>2+</sup> (violett), A) Monomer mit Blick in den Substratkanal, sowie Darstellung der metallkoordinierenden Aminosäuren (hellblau) B) Dimer

#### 6.2.4 Homologe

Um die erhaltene Struktur mit bekannten Strukturen zu vergleichen wurde eine Liste an Homologen anhand von 2 strukturbasierten sowie 3 sequenzbasierten Programme erstellt.

Basierend auf dieser Liste wurden die 11 ähnlichsten strukturbasierenden Homologen ausgewählt, wobei Strukturen von Mutanten desselben Proteins beziehungsweise mit verschiedenen Substraten gebunden, sowie verschiedene ADHs desselben Organismus ausgeklammert wurden, um Organismus-spezifische Effekte für spätere Vergleiche zu vermeiden. Zusätzlich wurde die offene Variante der *E. coli* ADH YqhD (4qgs) zu den Homologen aufgenommen. Die folgende Tabelle zeigt die ermittelten Homologen:



CHARAKTERISIERUNG DER MN-ADH/D1 AUS DISCOVERY

Tabelle 61: Homologe zur ADH/D1. \* = Strukturbasiert, \*\* = Sequenzbasiert, M = Monomer, H2 = Homodimer, H10 = Homotrimer, H10 = Homotrimer, RMSD = Abweichung vom quadrat. Mittel.

#	PDB ID	DA-LI*	PDB eFold*	I-TAS SER**	SWISS-Model**	PDB sum**	rmsd [Å]	Enzym	Ligand & aktives Metall	Ursprungsorganismus	Typ
1	<b>3ox4</b> [2xH2]	1	3	-	-	5	1,9	Fe abhängige ADH (3owo partiell geschlossen)	NAD <sup>+</sup> , Fe <sup>2+</sup>	<i>Zymomonas mobilis</i> (Sphingomonadales)	mesophil
2	<b>1rrm</b> [H2]	2	2	-	2	1	2,0	Laktaldehyd Reduktase (geschlossen)	Zn <sup>2+</sup> , APR	<i>Escherichia coli</i> (Enterobacterales)	mesophil
3	<b>3owo</b> [2xH2]	3	4	2	5	6	1,9	Fe abhängige ADH 2 (3ox4 offen)	Fe <sup>2+</sup>	<i>Zymomonas mobilis</i> (Sphingomonadales)	mesophil
4	<b>3bfj</b> [2xH10]	4	1	1	1	4	2,1	1,3 Propandiol Oxidored. (offen)	Fe <sup>2+</sup>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Enterobacterales)	mesophil
5	<b>4fr2</b> [M]	5	5	3	3	3	2,1	1,3 Propandiol DH (offen)	Ni <sup>2+</sup>	<i>Oenococcus oeni</i> (Bacilli)	mesophil
6	<b>1vlj</b> [H2]	6	6	6	4	8	2,2	Butanol DH (geschlossen)	NADP <sup>+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	<i>Thermotoga maritima</i> (Thermotogales)	hyperthermophil
7	<b>1o2d</b> [M]	7	7	8	9	9	1,9	Fe enthaltende ADH (geschlossen)	NADP <sup>+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	<i>Thermotoga maritima</i> (Thermotogales)	hyperthermophil
8	<b>1oj7</b> [2xH2]	8	9	7	8	7	2,3	Hypothetische Oxidoreduktase YqhD (4qgs geschlossen)	NZQ, Zn <sup>2+</sup>	<i>Escherichia coli</i> (Enterobacterales)	mesophil
9	<b>3zdr</b> [H2]	9	[13]	4	6	2	2,8	Bifunktionelle ADH (offen)	Zn <sup>2+</sup>	<i>Geobac. thermoglucosidasius</i> (Bacilli)	thermophil
10	<b>3w5s</b> [H2]	10	8	-	[13]	[12]	1,8	Maleylacetat Red. (offen & geschlossen)	-	<i>Rhizobium</i> sp. MTP (Rhizobiales)	mesophil
11	<b>3jzd</b> [H2]	[11]	10	9	[11]	[11]	2,3	Mutmaßliche ADH (geschlossen)	NAD <sup>+</sup>	<i>Ralstonia eutropha</i> (Burkholderiales)	mesophil
12	<b>4qgs</b> [M]	15	-	-	7	10	3,1	ADH YqhD (1oj7 offen)	Zn <sup>2+</sup>	<i>Escherichia coli</i> (Enterobacterales)	mesophil

Neun homologe Strukturen stammten von mesophilen Organismen, eine von einem thermophilen Organismus (ADH Domäne einer bifunktionalen ADHE DH; 3zdr) und zwei ADHs (1vlj und 1o2d) stammen von einem hyperthermophilen Organismus. Halophile Homologe wurden nicht gefunden. Im Gegensatz zum archaealen Ursprung von ADH/D1 stammen alle Homologe von Bakterien ab (Tabelle 68). Die homologen ADHs wiesen eine Abweichung vom quadratischen Mittel (*root mean square deviation*, rmsd) zwischen 1,9 Å und 2,3 Å zur ADH/D1 auf und zeigten ähnliche Sekundärstrukturen im Monomer sowie Oligomerisierungsstellen im Dimer, wie folgende Abbildung wiedergibt:

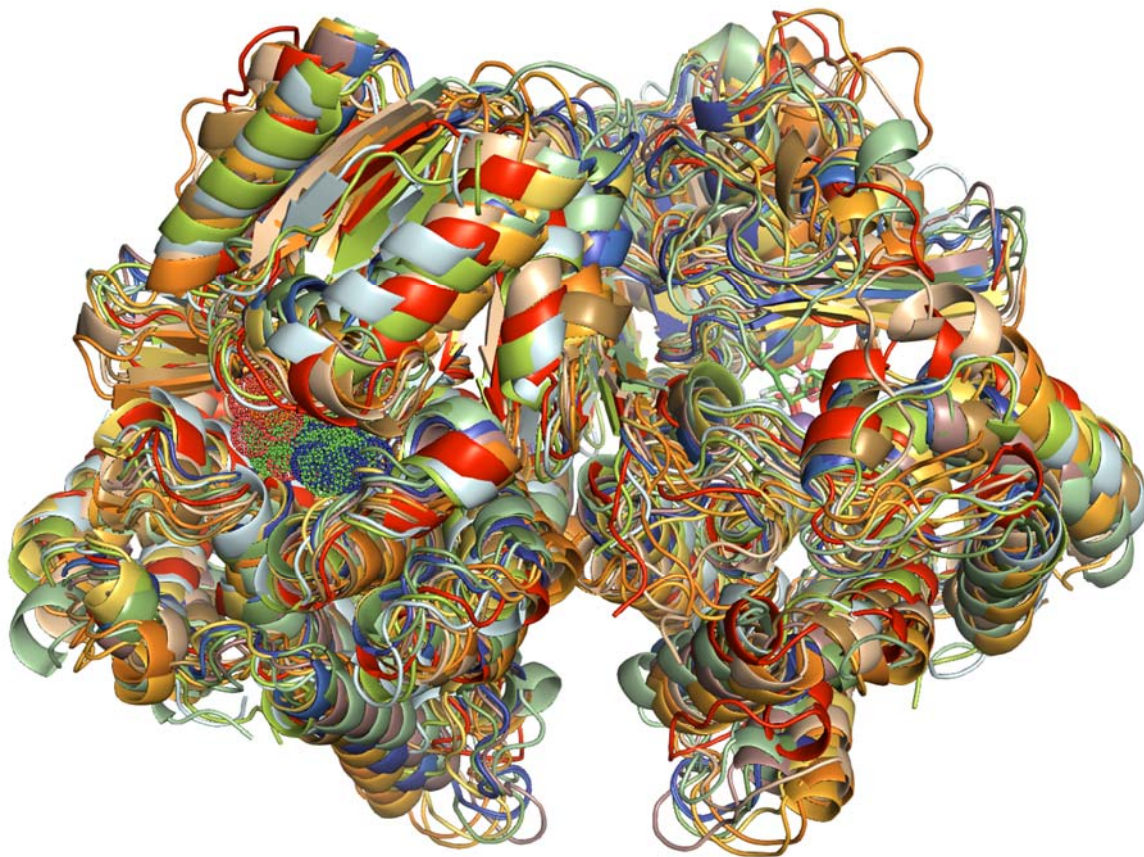


Abbildung 46: Überlagerungen der Cartoon Darstellungen von ADH/D1 mit seinen Homologen als Dimere mit gebundenem Kofaktor. Die folgende Farbkodierung wurde für alle Abbildung der Homologe genutzt: ADH/D1: rot, 3ox4: blau, 1rrm: gelborange, 3owo: marineblau, 3bfj: dunkel-Lachs, 4fi2: dunkelbraun, 1vlj: Weizen, 1o2d: Sand, 1oj7: Orange, 3zdr: hellgrün, 3w5s: hellcyan (geschlossen), grüncyan (offen), 3jzd: Limette, 4qgs: hellorange

### 6.2.5 Metallbindung und YqhD

Wie aus den Aktivitätstest hervorgegangen, wies ADH/D1 im Gegensatz zu seiner Klassifizierung als Eisen-bindende ADH die höchste Aktivität mit  $Mn^{2+}$  auf.

Eine Analyse der Elektronendichtekarte erhalten von der Messung des ADH/D1 Proteinkristalles stellte eine Elektronendichte für ein Metall dar, welches von den Stickstoffatomen der Histidine 208, 273 und 288, sowie der Carboxylgruppe der Asparaginsäure an Position 204 koordiniert wird. Die Elektronendichte des Metallions paßte jedoch weder für  $Fe^{2+}$  noch  $Fe^{3+}$ , ergab aber eine gute Anpassung für  $Mn^{2+}$  (Vergleiche dazu Abbildung 73 im Anhang). Das Vorhandensein von  $Mn^{2+}$  in den Kristallen wurde zudem durch Messungen der Absorption und Fluoreszenz des Kristalls über einen breiten Röntgenstahl-Wellenlängenbereich im Synchrotron bestätigt. Hierbei ist für Mn ein Signal bei 6,54 keV zu erwarten, welches sehr gut mit dem gemessenen Signal von 6,55 keV übereinstimmt. Diese Fehlannotierung wird im Vergleich mit den homologen Strukturen deutlich, da von den zwölf strukturellen Homologen (offene und geschlossene Form), welche von zehn verschiedenen Proteinen stammen, zwei Proteine  $Fe^{2+}$  im aktiven Zentrum zeigen, zwei weitere  $Fe^{3+}$ , drei  $Zn^{2+}$  und eines  $Ni^{2+}$ . Bei zwei weiteren Homologen wurde kein Metall detektiert. In der Summe zeigen somit weniger als die Hälfte der Strukturen eine Eisenbindung.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zwischen dem aktiven Zentrum von Mn-ADH/D1 und der ADH aus *E. coli* YqhD (1oj7 und 4qgs) (Abbildung 48) wurde dieses Gen in *E. coli* exprimiert, SDS-PAGE (Vergleiche dazu Abbildung 71 im Anhang) und seine Aktivität mit verschiedenen Metallionen untersucht. Der publizierte Puffer enthält BME und YqhD wies Aktivität bei pH 7,7 auf. Da BME mit Metallionen reagiert, wurde derselbe Puffer ohne BME eingesetzt, bei welchem YqhD jedoch keine Aktivität zeigte. Durch Erhöhung des pH auf pH 10 war es möglich, eine YqhD-Aktivität ohne BME zu erhalten. Folgende Abbildung gibt den Einfluß verschiedener Metallionen auf die Aktivität von YqhD wieder:

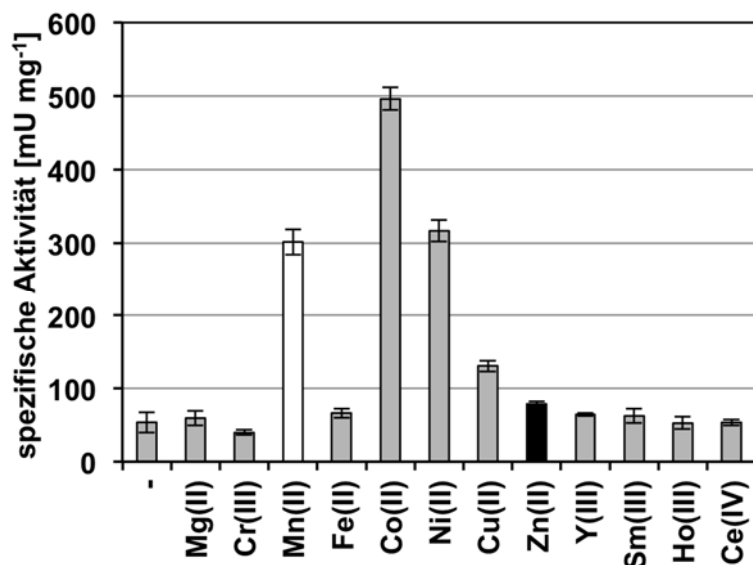


Abbildung 47: Spezifische Aktivität der ADH YqhD aus *E. coli* mit verschiedenen Metallionen. Mn<sup>2+</sup> in weiß und Zn<sup>2+</sup> in schwarz

YqhD hatte weder einen Anstieg der Aktivität mit Fe<sup>2+</sup>, noch zeigten Mg<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Y<sup>3+</sup>, Sm<sup>3+</sup>, Ho<sup>3+</sup>, Ce<sup>4+</sup> einen positiven Effekt. Interessanterweise hatte jedoch auch Zn<sup>2+</sup>, beschrieben in beiden Kristallstrukturen von YqhD, kaum einen Effekt auf die Aktivität. Im Gegensatz fand jedoch eine starke Aktivierung durch Cu<sup>2+</sup> (Faktor 2), Ni<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup> (je Faktor 5) und Co<sup>2+</sup> (Faktor 8) statt, was erneut auf eine Fehlannotierung der Gruppe der eisenabhängigen ADHs hindeutet.

### 6.2.6 NZQ-Kofaktor

Die genaue Analyse der Struktur zeigte, daß an Position 5 und 6 des Nikotinamidrings des NADPH Kofaktors jeweils eine Hydroxylierung in *S,S*-Konfiguration stattfand und somit den Kofaktor NADPH(OH)<sub>2</sub> ergab, welcher im weiteren als NZQ bezeichnet wird. Nachdem ausschließlich NADH zur Proteinlösung während der Kristallisation gegeben wurde, mußte die Modifizierung entweder aus der Expression in *Haloferax volcanii* stammen oder das Resultat einer Selbsthydroxylierung von Mn-ADH/D1 sein.

Bisher gibt es noch keine Veröffentlichungen von Proteinen aus *Haloferax volcanii*, die eine NZQ Modifizierung beschreiben. Die einzige bekannte Struktur mit NZQ ist die ADH YqhD aus *E. coli* (1oj7). Interessanterweise haben diese ein sehr ähnliches aktives Zentrum mit denselben metallkoordinierenden Aminosäuren, wie folgende Abbildung darstellt:

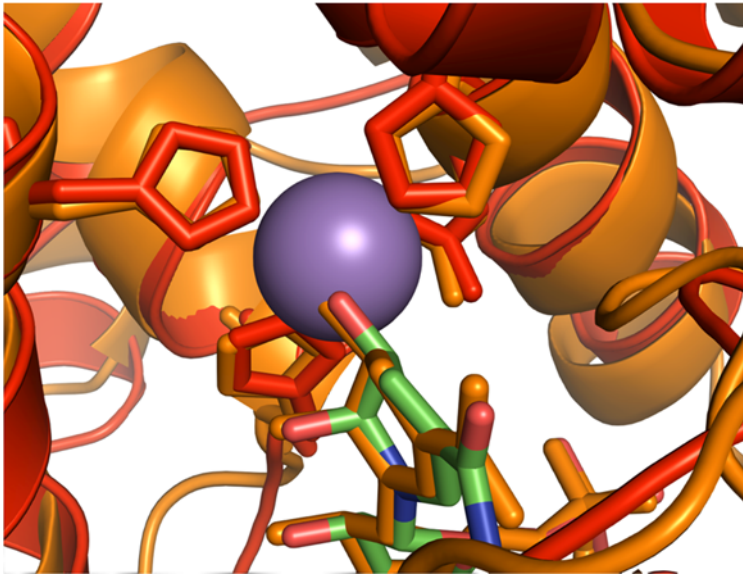


Abbildung 48: Cartoon-Darstellung der Überlagerung der aktiven Zentren von Mn-ADH/D1 (rot) und der *E. coli* ADH YqhD (Orange). Der NZQ Kofaktor von Mn-ADH/D1 ist in grün dargestellt, der von YqhD in orange. Die Metalle sind als Sphären dargestellt und das größere  $Mn^{2+}$  (von Mn-ADH/D1) überdeckt das kleinere  $Zn^{2+}$  (von YqhD). Folgende Aminosäurereste sind an der Metallkoordination beteiligt: D<sub>204</sub> H<sub>208</sub> H<sub>273</sub> H<sub>288</sub> von Mn-ADH/D1 und D<sub>194</sub> H<sub>198</sub> H<sub>267</sub> H<sub>281</sub> von YqhD. Die metallkoordinierenden Reste sind als Stäbe dargestellt

Die Ähnlichkeit der aktiven Zentren legt nahe, daß Mn-ADH/D1 in der Lage sein könnte, unter aeroben Bedingungen eine Selbsthydroxylierung durchzuführen.

Da NZQ mehr Wasserstoffbrückenbindung als NADP eingehen kann, sollte der Austausch dieses Kofaktors langsamer stattfinden und somit allgemein die Reaktion verringern. Aus diesem Grund wurde eine Messung der Aktivität von Mn-ADH/D1 parallel unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen durchgeführt. Das Ergebnis war, daß die Reaktion unter aeroben Bedingungen langsamer abläuft, was die Bildung des NZQ Kofaktors nahelegt, wie folgende Abbildung zeigt:

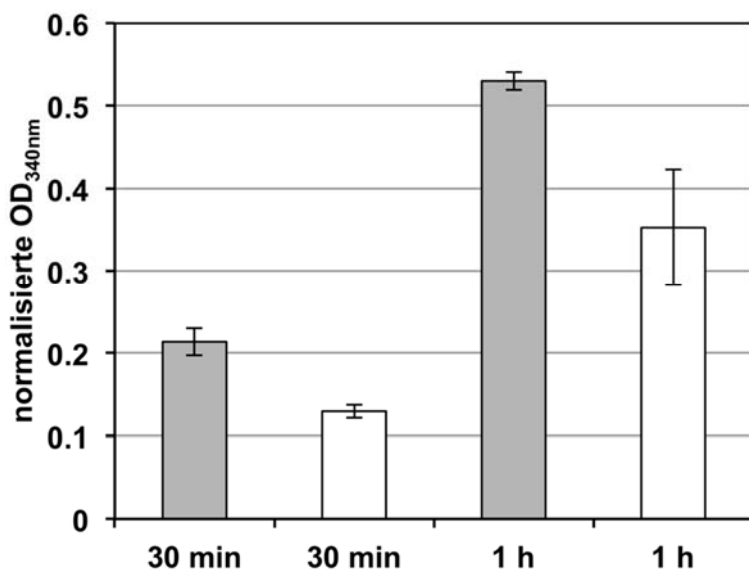


Abbildung 49: Normalisierte Aktivität als Indikator für den Substratumsatz von Mn-ADH/D1 mit NADP<sup>+</sup> unter aeroben (weiß) sowie anaeroben Bedingungen (grau). Der langsamere Substratumsatz unter aeroben Bedingungen ist ein Indiz für die Selbsthydroxylierung von NADP zu NZQ

### 6.2.7 Die Mn-ADH/D1-H277A Mutante

Eine detaillierte Analyse der Elektronendichtekarte der Mn-ADH/D1 Kristallstruktur zeigte, daß NZQ eine Wasserstoffbrückenbindung mit Histidin 277 aufbaut. Da bereits für das NZQ in YqhD eine Rieske-Dioxygenase-Aktivität mit O<sub>2</sub> als potentieller Mechanismus für die *cis*-Dihydroxylierung des NADPHs vorgeschlagen wurde, erfolgte eine molekulardynamische Simulation der Koordination von O<sub>2</sub> im aktiven Zentrum. Mn<sup>2+</sup> ist in der Lage im aktiven Zentrum in Kombination mit H277 ein Sauerstoffmolekül (O<sub>2</sub>) so koordinieren daß eine *cis*-Dihydroxylierung stattfinden kann.

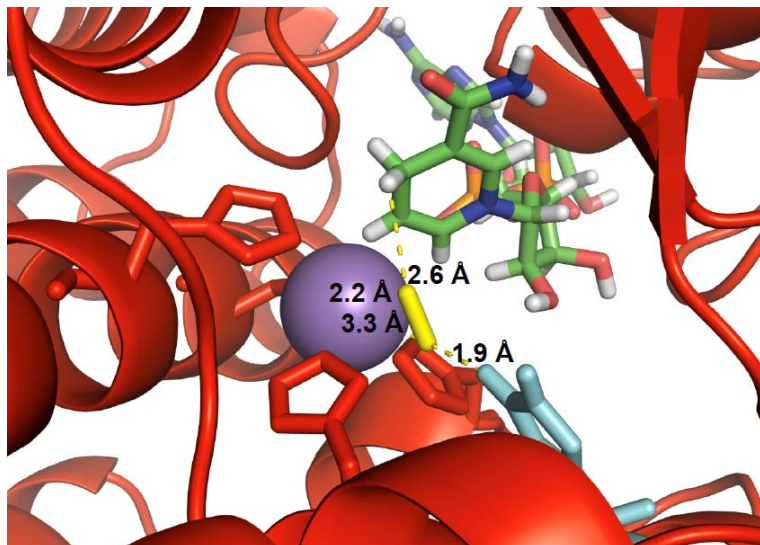


Abbildung 50: Koordination von Sauerstoff (O<sub>2</sub>, gelb) von H277 (hellblau) und Mn<sup>2+</sup> (violett) in der Nähe des NADP Kofaktors (grün) was eine *cis*-Dihydroxylierung ermöglicht.

Aus diesem Grund wurde eine Mutante der ADH/D1 erstellt, in welcher das Histidin 277 zu einem Alanin mutiert wurde: Mn-ADH/D1-H277A. Die in *Haloferax volcanii* exprimierte Mutante hatte nach Reinigung eine um ~4,5 Fach verringerte Aktivität zum native Protein (Vergleiche dazu Abbildung 74 im Anhang). Nach Kristallisation der Mutante, unter denselben Bedingungen wie der Wildtyp, zeigte sich, daß ADH/D1 keinen NZQ Kofaktor enthält. Ein Vergleich der Mn-ADH/D1 Struktur mit der Struktur von YqhD ergab, daß dieses ein Histidin (H271) an derselben Stelle, mit derselben Orientierung wie das H277 von ADH/D1 aufweist.



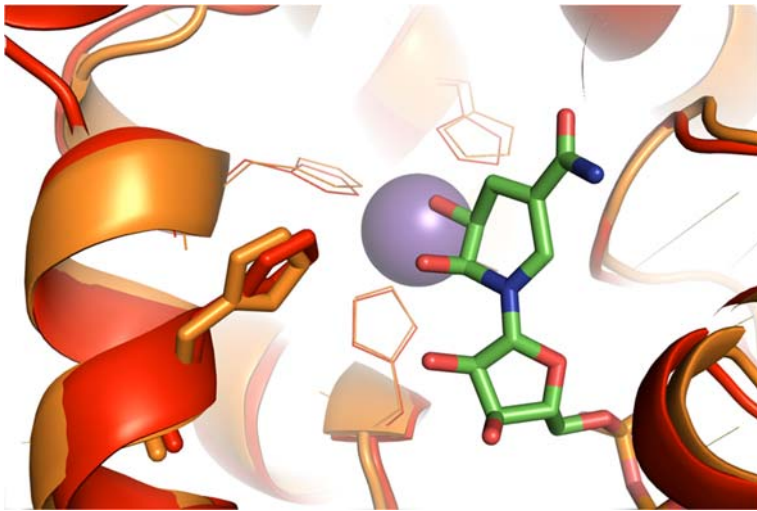


Abbildung 51: Cartoon-Repräsentation von Mn-ADH/D1 (rot) und YqhD (orange) mit dem Kofaktor NZQ (grün, Stab), Mn<sup>2+</sup> (violett), den Metall koordinierenden Resten (Linien) sowie dem H277 (Mn-ADH/D1) und H271 (YqhD) als Stäbe

### 6.2.8 Konformationsänderung

Basierend auf den Aktivitätsmessungen schienen destabilisierende Einflüsse wie erhöhte Temperatur oder BME-Zugabe die Aktivität von ADH/D1 zu aktivieren beziehungsweise zu erhöhen. Der Grund hierfür wurde auf struktureller Ebene analysiert. Jedes Monomer von ADH/D1 besteht aus zwei Domänen, welche wie zwei Hälften einer Muschel angeordnet sind. Die relative Orientierung dieser Domänen variiert zwischen den homologen Strukturen und ermöglicht einen offenen sowie einen geschlossenen Zustand. Die ausgewählten homologen Strukturen bestehen aus sechs Strukturen, welche vollständig geschlossen sind, sechs welche vollständig geöffnet sind, sowie eine partiell geschlossene Struktur. Basierend auf den geöffneten Strukturen wurde eine Modellierung von ADH/D1 in offener Form erstellt. Folgende Abbildung stellt die Überlagerungen der offenen sowie geschlossenen Formen der Homologe mit ADH/D1 sowie seiner modellierten offenen Form dar.



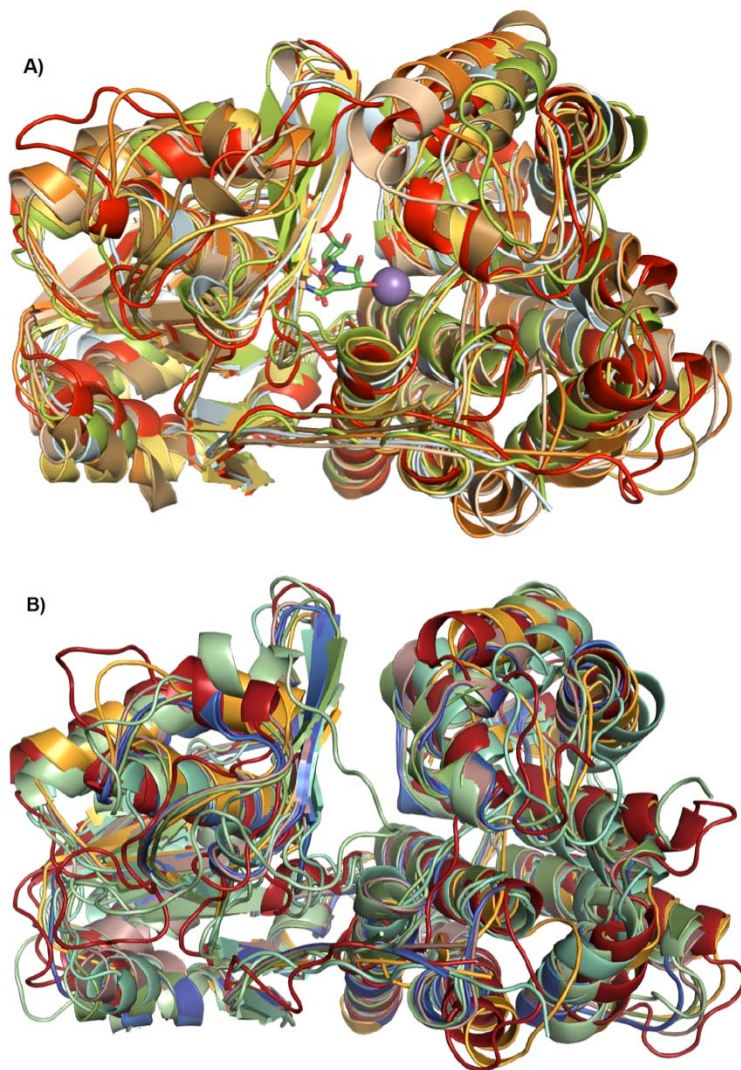


Abbildung 52: Cartoon-Repräsentierung der Kristallstruktur von ADH/D1 und seinen Homologen in ihren 2 Konformationsstadien. A) Geschlossenen Form, bestehen aus ADH/D1, 1rrm, 1vlj, 1o2d, 1oj7, 3w5s-geschlossen sowie 3jzd. B) Geöffnete Form, bestehen aus einer modellierten ADH/D1 (feuerrot) sowie den offenen und partiell geschlossenen Strukturen von 3ox4, 3owo, 3bfj, 4fr2, 3zdr, 3w5s-offen sowie 4qgs

Die Strukturen der ADH aus *E. coli* YqhD (1oj7 und 4qgs) sowie die Struktur der Maleylaktat-Reduktase aus *Rhizobium* sp. MTP (3w5s) sind von besonderem Interesse, da sie dasselbe Protein sowohl in offener als auch geschlossener Konformation darstellen. Keine der ADH Strukturen in geöffneter Form zeigte einen gebundenen Kofaktor. Der limitierte Raum in der geschlossenen Bindungstasche sowie die Anzahl sowie Stärke der Interaktionen zwischen Kofaktor und Enzym in offener und geschlossener Form (Tabelle 69) legen eine Konformationsänderung zum Kofaktoraustausch nahe. Hierbei ergab die partiell

geschlossene Form der Fe abhängigen ADH aus *Z. mobilis* (3ox4) die geringste Anzahl an Interaktionen.

### 6.2.9 Nachweis der Konformationsänderung von ADH/D1

Da der NZQ Kofaktor in Mn-ADH/D1 aufgrund seiner Größe und Bindungsstärke nur durch ein Öffnen der Struktur ausgetauscht werden kann, wurde Mn-ADH/D1 gegen Puffer mit oder ohne, oxidiertem oder reduzierten, NAD(P)H bei 50°C für 3 h inkubiert. Die Temperaturerhöhung während der Dialyse sollte hierbei das Öffnen der Struktur fördern. Anschließend wurden die Proteinlösungen kristallisiert, wobei teilweise Kofaktoren zum Ansatz gegeben wurden. In der Summe wurden sieben Strukturen von Mn-ADH/D1 unter sieben verschiedenen Bedingungen mit einer Auflösung zwischen 1,9 und 2,5 Å aufgenommen, sowie eine Struktur der Mn-ADH/D1-H277A Mutante, auf die später eingegangen wird.

Von den sieben untersuchten Bedingungen zeigte sich ein vollständiger oder teilweiser Kofaktoraustausch in 2 Fällen, wenn während der Dialyse, bei 50°C, 1 mM NADP<sup>+</sup> zugegeben wurde, wie folgende Tabelle in den Experimenten sechs und sieben darstellt.

Tabelle 62: Kristallographische Ergebnisse nach Versuchen zum Austausch des Kofaktors von Mn-ADH/D1

#	Protein	Dialyse	Kristallisations- ansatz	Kofaktor in der Struktur
1	Mn-ADH/D1	-	NADH	NZQ
2		3h, 50°C	NADH	NZQ
3		3h, 50°C, NAD <sup>+</sup>	-	NZQ
4		3h, 50°C, NAD <sup>+</sup>	NADPH	NZQ
5		3h, 50°C, NADH	-	NZQ
6		3h, 50°C, NADP <sup>+</sup>	-	NADP <sup>+</sup>
7		3h, 50°C, NADP <sup>+</sup>	NADPH	NZQ/NADP Mischung
8	Mn-ADH/D1- H277A	-	-	NADPH

Der Kofaktoraustausch des stark gebundenen und verhältnismäßig sperrigen NZQ legt eine Konformationsänderung nahe.

Um diese Hypothese weiter zu stützen und da kristallographisch keine offene Struktur der Mn-ADH/D1 ermittelt werden konnte, wurden SAXS Messungen durchgeführt. Im Vorfeld der Messungen wurde Mn-ADH/D1 entweder bei 50°C in verschiedenen Pufferlösungen inkubiert, mit EDTA behandelt, in verschiedenen Pufferlösungen dialysiert, BME hinzugefügt, während der Messung auf bis zu 60°C erhitzt oder es erfolgte eine Kombination dieser Bedingungen. Alle erhaltenen SAXS Daten zeigten eine dimere Form von Mn-ADH/D1 und des weiteren, daß die relativ große Interaktionsfläche der Monomere zur Bildung des Dimers dieses selbst unter harschen Bedingungen stabilisiert. Detaillierte Analysen zeigten signifikante Abweichungen zwischen den experimentell erhaltenen und strukturell vorhergesagten SAXS Daten, was ein dynamisches Verhalten des Dimers in Lösung suggeriert. Aus diesem Grund wurden Strukturmodelle des Monomers und Dimers, je mit offener Domäne ohne Kofaktor, oder geschlossener Domäne mit Kofaktor, sowie Mischungen davon erstellt. Da die Kristallstruktur keine His<sub>6</sub> Reinigungssequenz enthält, wurde diese zum Modell hinzugefügt. Der Vergleich der erhaltenen SAXS Daten mit den Vorhersagen der verschiedenen Modelle zeigte, daß in Lösung zwei Versionen des Mn-ADH/D1 Dimers koexistieren: i) beide Domänen geschlossen mit gebundenem Kofaktor, sowie ii) eine Domäne geschlossen mit gebundenem Kofaktor, sowie eine offene Domäne ohne Kofaktor (Tabelle 70). Genauere Bestimmungen über den Einfluß der einzelnen Bedingungen auf die Verteilung der Versionen des Dimers waren mit den ermittelten Daten nicht möglich.

## 6.3 Diskussion

### 6.3.1 Metallionen

Die genaue Analyse der Grundlage für die Annotation von ADH/D1 als eisen-abhängige ADH zeigte, daß dies auf der Übereinstimmung der ADH/D1-Sequenz mit den konservierten Sequenzmustern der PrositeIDs (171) PS00913 (*Iron-containing alcohol dehydrogenases signature I*) und PS00060 (*Iron-containing alcohol dehydrogenases signature II*) basiert, welche nur geringe Spezifität mit hohen Fehlvorhersagen aufweisen. Auch wiesen die

meisten der Homologen kein Eisen-Ion in ihrem aktiven Zentrum auf, was bereits mehrfach beschrieben wurde und daher vorgeschlagen wurde, die Gruppe der eisenabhängigen ADHs in Familie III der metallabhängigen Polyol Dehydrogenasen (F3MDPD) umzubenennen (172). Im Nachhinein überrascht daher auch nicht, daß ADH/D1 andere Ionen als Eisen bevorzugt, wobei jedoch die Nutzung von Mangan besonders ist, weil es die erste manganabhängige ADH beschreibt.

Um den evolutionären Ursprung der Koordination von  $Mn^{2+}$  bei ADH/D1 zu analysieren, wurde das Vorkommen von Mangan, Zink sowie Eisen im RSBP *Discovery* analysiert und es zeigte sich ein deutlicher Überschuß an Mangan, wie folgende Tabelle darstellt:

Tabelle 63: Konzentration von Fe, Mn und Zn in und um den RSBP *Discovery*

Probenentnahme	Tiefe (m)	Fe ( $\mu M$ )	Mn ( $\mu M$ )	Zn ( $\mu M$ )
Rotes Meer ( <i>Thetis Deep</i> )	-	0,002- 0,057 (69)	spuren (64)	0,005- 0,188 (69)
Tiefenwasser oberhalb der Salzsole	1.800 (173)	< 1,8 (173)	<1,8 (173)	-
Interphase zwischen Tiefenwasser und Salzsole	2.028 (173)	< 1,8 (173)	173,5 $\pm$ 15,1 (173)	-
Salzsole	2.114 (173)	12,9 $\pm$ 2,3 (173)	89,7 $\pm$ 43,1 (173)	15 (174)- 17 (175)

Ebenso ergab die Analyse des Einflusses verschiedener Metallionen auf die ADH aus *E. coli*, YqhD, welche ein sehr ähnliches aktives Zentrum zeigt, die Bevorzugung anderer Metalle als dem annotierten Eisen, auch wenn nicht Mangan an erster Stelle stand.

Das komplette Ausbleiben einer Aktivität mit Eisen kann durch die folgenden zwei Faktoren begründet werden: Erstens oxidiert  $Fe^{2+}$  sehr schnell in Gegenwart von Sauerstoff. Zwar wurden die Experimente unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt, dennoch enthält diese 5 ppm an Restsauerstoff. Zweitens ist es möglich, daß Eisen in keiner aktiven Form an das Zentrum bindet, wie für andere ADHs beschrieben (172), oder auch wie die ADH YqhD aus *E. coli* deutlich weniger Aktivität mit Mangan zeigt als ADH/D1, trotz nahezu identischem aktivem Zentrum.

Es zeigte sich somit, daß evolutionär bedingte minimale Änderungen der Struktur es ADHs ermöglicht, je nach Verfügbarkeit von Metall-Ionen in ihrem Umfeld eine Feinjustierung zugunsten erhöhter Aktivität mit einem bestimmten Metallion vorzunehmen.

### 6.3.2 Kofaktor und NZQ

ADH/D1 zeigte eine erhöhte Aktivität mit  $\text{NAD}^+$  im Vergleich zu  $\text{NADP}^+$  unter den untersuchten Bedingungen. Der Grund hierfür ist, daß im Falle eines Substrat sowie Kofaktorüberschusses der Austausch des Kofaktors der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Reaktion ist und somit ein schlechter bindender Kofaktor eine schnellere Reaktion ermöglicht. Unter nativen Bedingungen kann davon ausgegangen werden, daß entweder die Kofaktorkonzentration und/oder die Substratkonzentration deutlich geringer sind und somit die Bildung des Enzym-Substrat-Kofaktor-Komplexes der geschwindigkeitslimitierende Schritt ist, wodurch eine stärkere Bindung des Kofaktors einen evolutionären Vorteil bietet.

Die Bildung des NZQ Kofaktors ist höchstwahrscheinlich auf eine Selbsthydroxylierung der Mn-ADH/D1 wenn Sauerstoff vorhanden ist zurückzuführen, was sowohl die Aktivitätsunterschiede unter aeroben und anaeroben Bedingungen darstellen, als auch die modellierte Sauerstoffkoordination mittels Histidin 277 und das Ausbleiben einer Selbsthydroxylierung in der Mn-ADH/D1 H277A Mutante. Basierend auf dem sauerstofffreien Ursprung von ADH/D1, dem RSBP *Discovery*, lag kein evolutionärer Selektionsdruck für eine Schutzmechanismus gegen Sauerstoff vor. Der vorgeschlagene Mechanismus der aromatischen *cis*-Dihydroxylierung entspricht einer Abwandlung des Mechanismus der bakteriellen Rieske-Dioxygenase, welche über Sauerstoffaktivierung Diole von aromatischen Substanzen bildet, jedoch mit Eisen im aktiven Zentrum (138), wie folgende Abbildung darstellt.

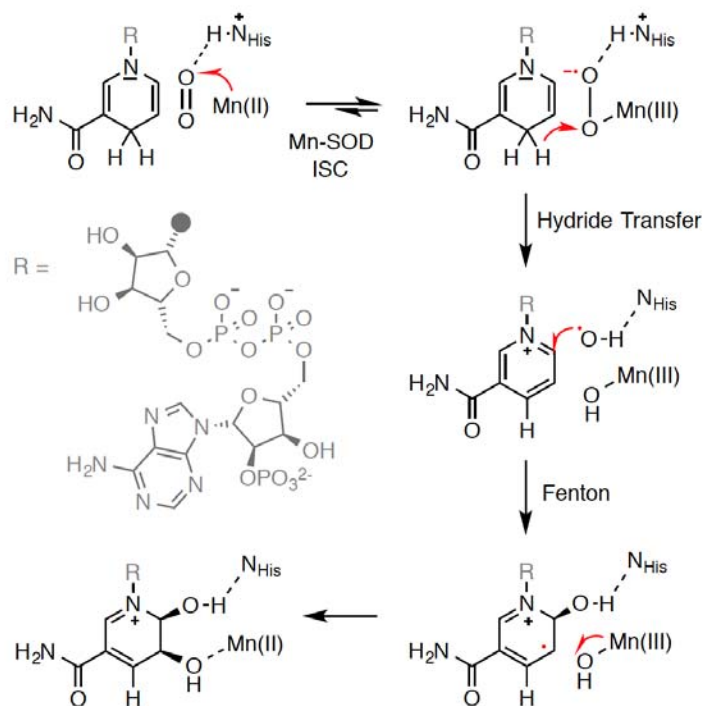


Abbildung 53: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der NADPH Dihydroxylierung in Mn-ADH/D1.  $N_{\text{His}}$  = Stickstoffatom des Histidin 277. ISC = *inter system crossing*, Mn-SOD = Mangan abhängige Superoxid-Dismutase

Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus basiert auf der Koordination eines Sauerstoffmoleküls unter aeroben Bedingungen mit Hilfe des Stickstoffs des Histidin an Position 277 (H277) sowie dem  $Mn^{2+}$  im aktiven Zentrum der Mn-ADH/D1. Eine Wasserstoffbrückenbindung zum H277 ermöglicht es einem Sauerstoffmolekül im Triplett Zustand an das *high spin* ( $S = 6$ )  $Mn^{2+}$  Ion im aktiven Zentrum von ADH/D1 zu binden. Es findet ein Elektronentransfer vom  $Mn^{2+}$  Ion mittels *inter system crossing* (ISC) zum Sauerstoffatom statt. Hierbei gleicht die Geometrie des durch Elektronentransfer geformten Superoxids der des Intermediates von Mangan abhängigen Superoxiddismutasen (Mn-SOD), jedoch mit einem Sauerstoffatom nahe des hydridischen H-Atoms von NADPH. Im Anschluß daran findet ein Hydridtransfer (Transfer von 2 Elektronen) statt, welcher die Spaltung der O-O Bindung fördert und zur Bildung eines freien Hydroxid-Radikals führt. Die Spaltung der O-O Bindung wird hierbei durch den ziehenden Effekt der Wasserstoffbrückenbindung an H277 unterstützt. Ein Fenton-Radikal-Angriff der Hydroxidgruppe am C6 des Nikotinamid-Rings bildet ein Radikal am C5 aus. Nachdem ein Hydroxid welches an ein  $Mn^{3+}$  Zentrum gebunden ist, radikalische Eigenschaften haben sollte, kann von einer niedrigen Barriere für

die Bildung einer C-O Bindung ausgegangen werden, was zu Ausbildung des *cis*-dihydroxylierten NZQ Liganden führt.

### 6.3.3 Destabilisierung zur Aktivitätssteigerung der ADH/D1

Es zeigte sich, daß destabilisierende Agenzien sowie ein hoher pH oder die Zugabe von BME die Aktivität der ADH/D1 wie auch der YqhD steigerten. Basischer pH interferiert hierbei mit Salzbrücken durch Umsetzung von positiv geladenen Ammoniumionen zu neutral geladenen Aminen. Da weder ADH/D1 noch YqhD über Disulfidbindungen verfügen ist der aktivierende Einfluß von BME wahrscheinlich auf seinen destabilisierenden Effekt durch Reaktion mit Aldehyden oder Keton (wie in den Aminosäuren Asparagin und Glutamin) zurückzuführen. Auch hat das von BME in wäßriger Lösung freigesetzte H<sub>2</sub>S einen destabilisierenden Effekt durch *sulphydration* von Cysteinen (R-SH zu R-SSH).

Die erhöhte relative Aktivität durch den Einsatz von Zink im aktiven Zentrum (Zn-ADH/D1) bei geringen Temperaturen, sowie die generell höhere Aktivität der Zn-ADH für bestimmte Substrate, kann durch einen geringer stabilisierenden Effekt des Zn<sup>2+</sup> in ADH/D1 erklärt werden, was zu einer erhöhten Flexibilität und dadurch besseren Aktivität unter bestimmten Bedingungen führt. Der destabilisierende Effekt von Zn<sup>2+</sup> wurde zudem durch die erhöhte Masse bei der Größenausschlusschromatographie und der verringerten Aggregationstemperatur im Verhältnis zu Mn-ADH/D1 sowie der weiteren Verringerung dieser durch höhere Konzentrationen ersichtlich.

Dazu kommt, daß die höhere Aktivität von ADH/D1 bei höheren Temperaturen von 75°C im Gegensatz zu ihrer kurzen Lagerstabilität unter diesen Bedingungen einen weiteren Effekt, wobei Destabilisierung zur Aktivitätserhöhung führte.

### 6.3.4 Molekulare Basis der Salz- und Temperaturstabilität von Mn-ADH/D1

Erhöhte Salzkonzentrationen verringern verfügbares Wasser, erhöhen hydrophobische Interaktionen und verringern ionische Interaktionen (43, 44, 62). Erhöhte Temperaturen hingegen erhöhen die Proteinflexibilität aufgrund Brownscher Molekularbewegung (59). Ein thermohalophiles Enzym muß daher die molekularen Kräfte so balancieren, daß es steif genug ist, um bei hohen Temperaturen nicht zu entfalten und flexibel genug bleibt, um nicht bei hohen Salzkonzentrationen inaktiviert zu werden oder hydriert zu bleiben.

ADH/D1 ist eine der ersten Struktur aus einem thermohalophilen Habitat. Um die Adaptionen der ADH/D1 zu ihrem Habitat zu untersuchen, wurde die ADH/D1 Struktur im Vergleich zu ihren zehn strukturell nächstverwandten Homologen (Tabelle 61) erforscht. Obwohl die Ursprungsorganismen entfernt verwandt sind (Vergleiche dazu Abbildung 75 im Anhang), konnte gezeigt werden, daß eine Adaption für Hochsalz- oder Hochtemperaturumgebungen keine großen strukturellen Änderungen benötigt, resultierend in der hohen Ähnlichkeit der Sekundärstrukturen (Abschnitt 6.2.4).

Ein Vergleich der Proteinladung hingegen ergab, daß ADH/D1 im Vergleich zu seinen Homologen nicht nur den negativsten isoelektrischen Punkt mit  $pI_{\text{Protein}} = 4,81$  besitzt, sondern auch die negativste Oberflächenladung, mit  $pI_{\text{Oberfläche}} = 4,71$  und daraus resultierender niedriger Oberflächenhydrophobizität. Die einzige positiv geladene Oberfläche von ADH/D1 ist am Eingang der Kofaktorbindungstasche zur Koordination der negativ geladenen Phosphatgruppe des NADP(H) Kofaktors, wie in nahezu allen Homologen. Folgende Abbildung stellt die Oberflächenladung von ADH/D1 sowie seiner Homologen dar:



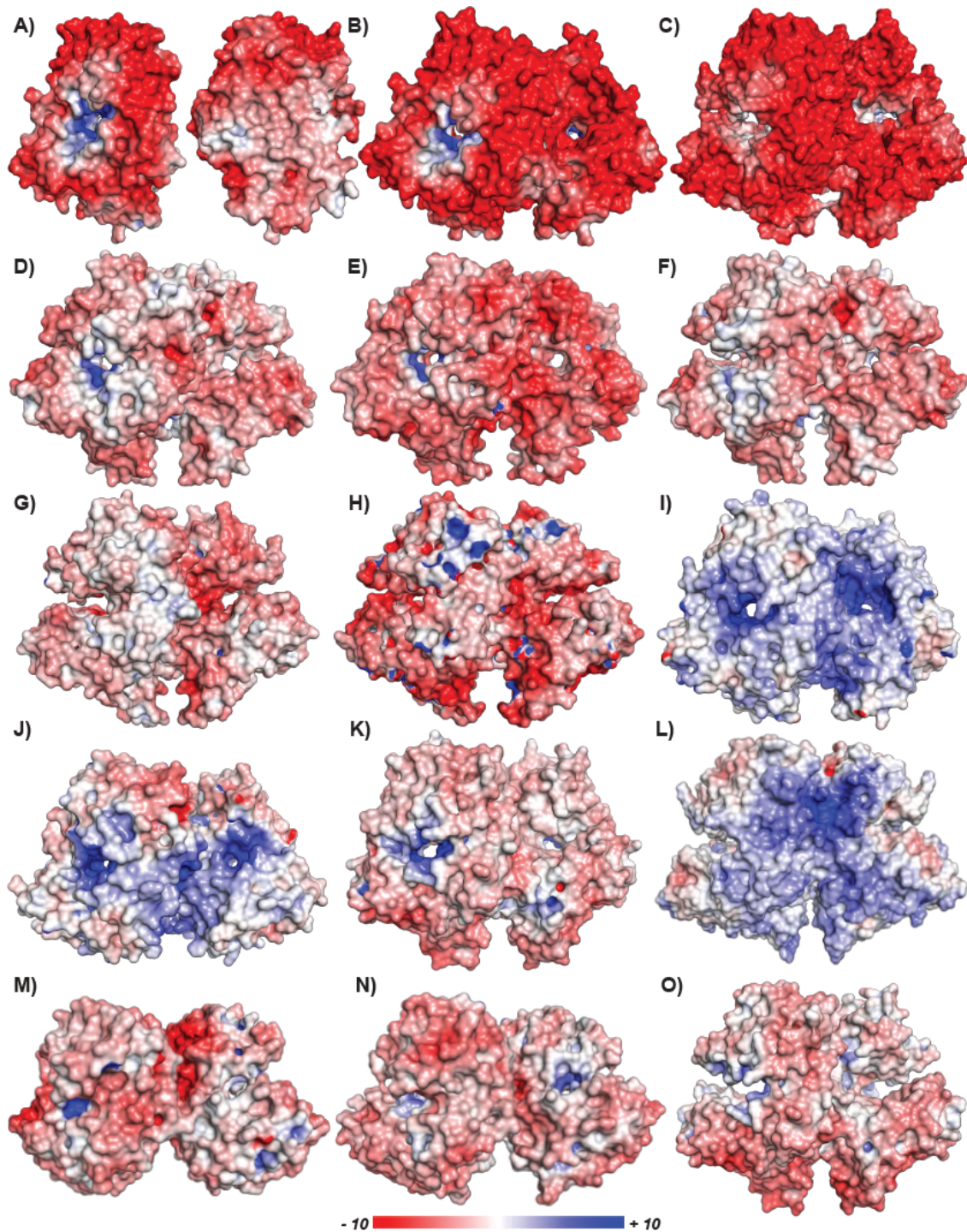


Abbildung 54: Oberflächenladung von ADH/D1 und seinen Homologen. Negative Oberflächenladung ist in rot dargestellt, positive in blau. A) Darstellung des ADH/D1 Monomers mit Blick von der positiv geladenen Kofaktorbindungstasche (links) sowie der neutral geladenen Dimerisierungsfläche (rechts). B) Darstellung der geschlossenen Konfiguration des ADH/D1 Dimers. C) Modellierter Struktur der offenen Konfiguration des ADH/D1 Dimers. D) bis O) zeigen die Oberflächenladungen der dimeren Strukturen der Homologen. D) 3ox4, E) 1rrm, F) 3owo, G) 3bfj, H) 4fr2, I) 1vlj, J) 1o2d, K) 1oj7, L) 3zdr, M) 3w5s, N) 3jzd, O) 4qgs. Die Einheiten der Ladungen sind:  $\text{kcal} (\text{mol} \times \text{Elektron})^{-1}$  (gegen salzfreien Puffer)

Die Anzahl an negativ geladenen Aminosäuren, vor allem Glutaminsäure, ist deutlich höher für ADH/D1 als die seiner Homologen mesophilen Ursprungs und leicht höher als die seiner thermophilen Homologen (Tabelle 71). Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß Glutaminsäure eine sehr gute Wasserbindung aufweist (44). Negativ geladene Oberflächenaminosäuren binden hydrierte Ionen und bilden dadurch eine Lösungsmittelhülle, was Aggregation verhindert und das Protein in Lösung hält (44, 176). Die negativ geladene Oberfläche wird als eines der Hauptadaptionen für halophile Proteine gesehen, da sie eine hoch geordnete Lösungsmittelschicht erlaubt (44). Eine typische Adaption zur Erhöhung der negativen Oberflächenladung sowie besseren Strukturierung der Wasserhülle ist eine Reduktion an Lysin-Resten von halophilen Proteinen gegenüber mesophilen Proteinen (44, 62). Im Gegensatz zu diesem Trend hat ADH/D1 deutlich mehr Lysin-Reste als seine mesophilen Homologen, jedoch weniger als seine thermophilen (Tabelle 72). Lysin-Reste tendieren dazu, geordnete Wasserhüllen zu stören falls sie nicht größtenteils vergraben sind, wie aus den Strukturen mancher halophilen Proteine ersichtlich (44). Dies ist nicht der Fall für ADH/D1 (Vergleiche dazu Abbildung 76 im Anhang). ADH/D1 folgt dem halophilen Trend, hydrophobe Aminosäuren (F, I, L) zu reduzieren und grenzwertig hydrophobe Aminosäuren (S,T) zu erhöhen, um die Verstärkung hydrophober Interaktionen durch Salz auszubalancieren (43, 44). Dem üblichen Trend von halophilen Enzymen, die eingesparten Aminosäuren durch kleine Aminosäuren zu ersetzen, folgt ADH/D1 nicht.

Im Einklang mit generellen Trends zur Thermoadaptation weist ADH/D1 eine Verringerung von Cystein-Resten und Serin-Resten auf, jedoch ohne diese thermolabilen Reste mit Arginin oder Tyrosin zu ersetzen, welche weitreichende Interaktionen erzeugen. ADH/D1 zeigte mehrere strukturelle Eigenschaften, welche bekannt für thermophile Proteine sind. ADH/D1 hat eine höhere Anzahl an  $\alpha$ -Helices als der Durchschnitt der Homologen (Tabelle 74) und sowohl der C-Terminus als auch der N-Terminus sind mit der Struktur verankert. Im Vergleich zu seinen Homologen hat ADH/D1 die höchste Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen im Monomer sowie die höchste Anzahl an Salzbrücken im Dimer (Tabelle 73).

Eine Besonderheit der Mn-ADH/D1 Struktur ist die Anordnung beider Domänen des Monomers in einer Weise, daß sich eine Wasserstoffbrückenbindung in der geschlossenen

Form ausbilden kann. Folgende Abbildung stellt einen möglichen Reaktionsmechanismus mit Konformationsänderung dar.

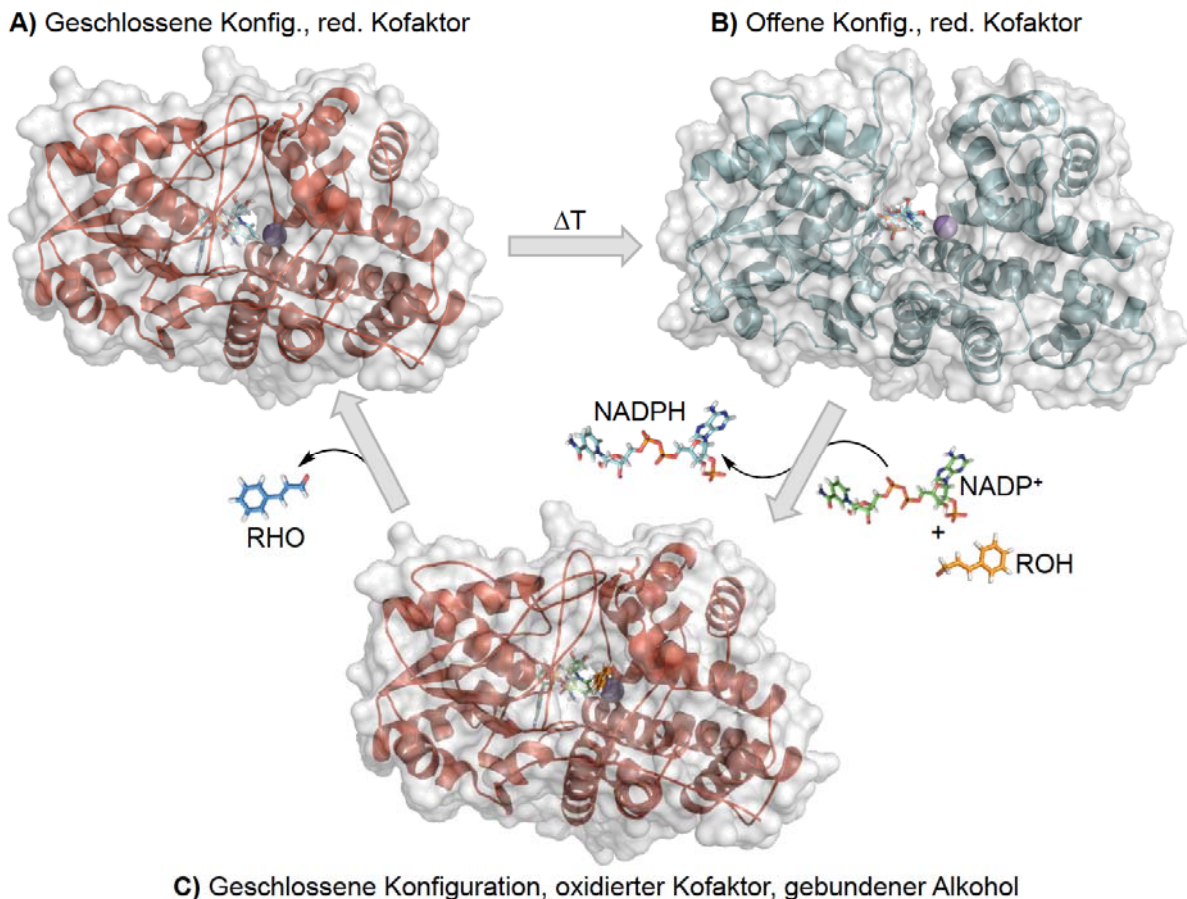


Abbildung 55: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus zum Kofaktoraustausch. A) Die rote Struktur in Cartoon-Darstellung zeigt Mn-ADH/D1 in geschlossener Konfiguration, stabilisiert über eine Wasserstoffbrückenbindung der Domänen (gelb). B) Destabilisierende Faktoren wie erhöhte Temperatur führen zu einer temporären Konformationsänderung, die in der offenen Form (Cyan) mündet, in welcher ein Kofaktoraustausch möglich ist. C) Nach Austausch des Kofaktors geht die Struktur in ihre stabilere, geschlossene Konformation zurück, und nach Substratbindung findet der Umsatz, in diesem Falle der Oxidation eines Alkohols (ROH) zu einem Aldehyd (RHO), statt

Das Auftreten einer offenen sowie geschlossenen Form wurde bereits für eine ADH aus dem Pferd (177) sowie eine strukturell ähnliche ADH aus Hefe (178) beschrieben. Jedoch ist keine Überlagerung der Struktur dieser ADHs mit der ADH/D1 oder einer ihrer Homologe möglich.

Weitere strukturelle Adaptionen finden sich in der Bevorzugung von Mangan als aktives Metall, da die relativ starke Bindung von  $Mn^{2+}$  die Struktur stabilisiert und dadurch ihre Thermostabilität erhöht, wie bereits für andere Proteine beschrieben (12, 179).

Zusammenfassend weist Mn-ADH/D1 spezifische Eigenschaften auf, welche für die Stabilisierung in halophilen als auch thermophilen Proteinen beschrieben wurden, in Kombination mit einzigartigen Adaptionen, wie dem Verschließen der Domäne durch eine Wasserstoffbrückenbindung oder ein anderes Metall im aktiven Zentrum. Basierend auf diesen Eigenschaften zeigt Mn-ADH/D1 eine hohe Salzstabilität, mit korrelierender Lösungsmitteltoleranz sowie einer hohen Stabilität gegenüber erhöhter Temperatur. Folgende Tabelle gibt einen Überblick der Adaptionen.

Tabelle 64: Typische Charakteristika zur Adaption thermophiler und halophiler Proteine im Vergleich zu ihren mesophilen Homologen sowie Mn-ADH/D1s Adaption im Vergleich zu seinen mesophilen Homologen

<b>Charakteristik</b>	<b>Halophil</b>	<b>Thermophil</b>	<b>Mn-ADH/D1</b>
Oberflächenladung	negativ (43, 44, 62)	gleich (180)	negativ
Lösungsmittelhülle	Hoch geordnet, mehrere Lagen (43, 44)	-	geordnet
Hydrophobe Oberflächen	verringert (43, 44, 62)	leicht verringert (12) oder gleich (180)	verringert
Geladene Reste an Oberfläche	erhöht (62)	gleich (180)	erhöht
<i>Asp. und Glu. (neg. geladen)</i>	erhöht (44, 62)	gleich (12, 180)	erhöht
<i>Phe, Ile und Leu (hydrophob)</i>	verringert (43, 44, 62)	gleich (12, 180)	verringert
<i>Ser und Thr (grenzwertig hydrophob)</i>	erhöht (43, 44)	gleich (12, 180)	erhöht
<i>Gly, Ala (klein)</i>	erhöht (43)	gleich (12, 180)	gleich
<i>Lys (positiv geladen)</i>	verringert (43, 44, 62) und vergraben, daher geordnet (44)	-	gleich
<i>Cys und Ser (Interaktionen auf kurze Distanz und Thermolabil)</i>	-	verringert (180)	gleich
<i>Arg und Tyr (Interaktionen auf</i>	-	erhöht (180)	gleich

<i>kurze und lange Distanz)</i>			
Salzbrücken ( <i>Intra- und Intermolekular</i> )	erhöht (43)	deutlich erhöht (IP Netzwerke) (12, 180)	deutlich erhöht
Wasserstoffbrückenbindungen ( <i>Intra- und Intermolekular</i> )	gleich (62)	erhöht (12), erhöht zwischen Seitenketten (180)	erhöht
Hydrophobe Interaktionen	geschwächt (62)	leicht erhöht (12)	gleich
Gesamtstruktur	gleich (62)	gleich (12, 180)	gleich
Anzahl an Aminosäuren	kann durch negativ geladene Peptide erhöht sein (62)	gleich (12, 180)	gleich
Sekundärstruktur	gleich (62)	mehr $\alpha$ -Helices (180)	gleich da hoher $\alpha$ -Helix Gehalt
Oligomerisierung	gleich (62)	teilweise erhöht (12) hauptsächlich gleich (180)	gleich, jedoch äußerst robust
Flexibilität der Struktur	erhöht durch elektrostatische Abstoßung (43)	deutlich verringert (12, 180)	gleich, da bereits rigide
Einfluß von Salzentfernung	Entfaltung (43, 60)	-	bleibt stabil
Metallionen	gleich (62)	kann zugunsten stabilisierender Ionen geändert sein (12)	geändert
Packungsvolumen	gleich (62)	gleich (12, 180)	gleich
N- und C-Terminus	-	verankert (12)	verankert

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

Die Erforschung extremophiler Organismen und ihrer Proteine ist von hohem wissenschaftlichen sowie industriellen Interesse, um die Grenzen des Lebens im Allgemeinen zu verstehen sowie einen breiteren Einsatz von Enzymen in der Biotechnologie zu ermöglichen (13, 20).

Enzyme aus halo-thermophilen Mikroorganismen spielen hierbei eine wichtige Rolle (13), da ihre Stabilität unter erhöhten Temperaturen und Salzkonzentrationen mit der daraus resultierenden Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln den Einsatz in einer Vielzahl von industriellen Prozessen ermöglichen könnte (22). Trotz des hohen Potentials extremophiler Enzymen stammen die meisten im industriellen Maßstab eingesetzte Proteine aus Pilzen oder mesophilen Bakterien (6). Gründe für die Zurückhaltung gegenüber den extremophilen Proteinen sind der meist schwierige Zugang zu ihren Lebensräumen und die geringen Zelldichten vor Ort (25). Ein weiteres Problem liegt im naturgetreuen Nachahmen der Wachstumsbedingungen im Labor (13).

Zellkulturfreie Methoden zur Analyse von Extremophilen, wie die Nutzung von Metagenomen oder die Sequenzierung von Einzelzellgenomen, besitzen ein hohes Potential für ihre Untersuchung und Nutzung (90-92). Bisher konnten jedoch kaum Gene aus zellkulturfreien Methoden exprimiert und charakterisiert werden. Dies wird hauptsächlich mit unzuverlässigen Annotationsmethoden und dem Fehlen geeigneter Expressionssysteme begründet (13).

In dieser Arbeit wurden Gene von halo-thermophilen Mikroorganismen aus den *Red Sea brine pools* (RSBP) zur Expression funktioneller Proteine in verschiedenen Expressionssystemen genutzt und anhand der biochemischen und strukturellen Untersuchung einer ausgewählten ADH die Adaption von Enzymen an die harschen Bedingungen dieser Habitate untersucht.

Als Grundlage der vorliegenden Arbeit dienten Einzelzellgenome aus drei der 25 halo-thermophilen RSBP, den Salzsoleseen am Grunde des Roten Meeres (20). Diese Seen zeigen wesentliche Unterschiede in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften. So ergeben



sich zum Beispiel Unterschiede bei der Temperatur (22,6°C – 68,2°C), dem Salzgehalt (2,6 – 5,6 M NaCl) und der Konzentration an Metallsalzen (20). In Vorarbeiten wurden Flüssigproben aus diesen Salzsoleseen entnommen, die enthaltenen Mikroorganismen über Anfärben der DNA identifiziert und mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) aussortiert und vereinzelt. Nach Lyse der Einzelzellen wurde ihr jeweiliges Genom amplifiziert, sequenziert und initial annotiert. Anschließend erfolgte eine zweite Genannotation mit dem neu entwickelten *profile and pattern matching algorithm* (PPMA), um industriell und wissenschaftlich interessante Gene aus den RSBP-Proben zu identifizieren (26).

Proteine aus extremophilen Habitaten zeigen verschiedene spezifische Adaptionen ihrer Aminosäurekette, welche, vor allem bei halophilen Adaptionen zu Problemen bei der Expression in üblichen Expressionsstämmen wie *E. coli* führen können (30-32). In dieser Arbeit sollte daher die Expression einer Auswahl der mittels PPMA identifizierten RSBP Gene (26) in *E. coli* als Referenzsystem untersucht werden. Zudem war die Eignung des neuen, moderat halophilen Expressionsorganismus *Haloferax volcanii* (32) zur Erzeugung von funktionellen thermo-halophilen RSBP Proteinen zu untersuchen. Hierzu wurde zu Beginn die Codon-Nutzung von *Haloferax volcanii* ermittelt (Vergleiche dazu Abschnitt 5.2) und Genkonstrukte basierend auf der ermittelten Codon-Nutzung mit N-terminalem His<sub>6</sub>-tag erstellt. Zur Untersuchung der Expression dieser Gene in *E. coli* wurde ein Codon-erweiterter *E. coli* Stamm genutzt um sechs RSBP Gene zu exprimieren (2x ADH: AF\_D, AZ\_A; 3x Dihydrodipicolinat Reduktasen: DR\_A2, DR\_D, DR\_K; eine Halolysin-Protease: HP\_D). Alle Gene bis auf eine ADH (AZ\_A) und eine Dihydrodipicolinat Reduktase (DR\_K) zeigten Überexpression, jedoch ausschließlich in unlöslicher Form (Vergleiche hierzu Abschnitt 5.4.1). Die Genexpression derselben ADHs und einer Serin-Protease (SP\_A) mittels für *E. coli* Codon-Nutzung optimierten Genen ergab eine Expression aller drei Gene, wobei die ADHs in unlöslicher Form auftraten (Vergleiche hierzu Abschnitt 5.4.2) und für die Serin-Protease ein Eigenverdau des Proteins auftrat (Vergleiche dazu Abschnitt 5.4.3).

Zur Genexpression in *Haloferax volcanii* wurde zu Beginn ein allgemein anwendbares Expressionsprotokoll erstellt, um die Proteinausbeuten zu erhöhen. Auf der Grundlage von

diesem Protokoll fand eine Western-Blot basierte initiale Untersuchung der Genexpression von sechs ausgewählten RSBP-Genen statt (die ADH: AF\_D; 3x Dihydrodipicolinat Reduktasen: DR\_A1, DR\_D, DR\_K; die Halolysin-Protease: HP\_D; die Prephenat Dehydrogenase: PD\_A) (Vergleiche dazu Abschnitt 5.5.1). Hierbei zeigten sowohl die ADH AF\_D sowie die zwei Dihydrodipicolinat-Reduktasen (DR\_A1 und DR\_D) gute Expression in löslicher Form. Anschließend wurde die Expression der ADHs AF\_D und AZ\_A in *Haloferax volcanii* H1895 im Rührkesselreaktor untersucht (Vergleiche dazu Abschnitt 5.5.2). Um die Proteinausbeute weiter zu verbessern, wurde in Zusammenarbeit mit Eva Strillinger (TUM) im Rührkesselreaktor ein  $\beta$ -Galaktosidase Reporter gen (bgaH) zur Analyse der Expressionsniveaus herangezogen (Vergleiche dazu Abschnitt 5.5.5). Das gewonnene Wissen wurde für die Expression der RSBP Gene AF\_D und AZ\_A (131), sowie DR\_A1 und DR\_D im Rührkesselreaktor angewendet (Vergleiche dazu Abschnitt 5.5.3). Nach Optimierung der Zellanzucht im Rührkesselreaktor in Kombination mit einem weiterentwickelten Medium sowie einem angepaßtem Induktionsprotokoll konnte die Proteinausbeute von AF\_D im Vergleich zum Schüttelkolben um den Faktor 28 erhöht werden (131).

Die Untersuchung der Expression weiterer Gene fand im Schüttelkolben statt und von den insgesamt acht in *Haloferax volcanii* überprüften RSBP-Genen zeigten alle Gene Expression, sechs davon in aktiver Form (Vergleiche dazu Abschnitt 5.5.6). Die zu Anfang der Arbeit gewählte N-terminale Konjugation eines His<sub>6</sub>-tags mit den Zielgenen ermöglichte eine unkomplizierte und einfache Reinigung der ADH AF\_D (Vergleiche dazu Abschnitt 5.5) und vier weiteren Genprodukte. Aus der Gesamtheit der Expressionsversuche ergibt sich die sehr gute Eignung von *Haloferax volcanii* zur Expression verschiedener Gene aus Regionen mit hoher Salzkonzentration und erhöhter Temperatur sowie einfachen Reinigung der resultierenden Proteine.

Verschiedene Strategien zur Adaption von Proteinen an thermophile oder halophile Habitate konnten in jüngster Zeit aufgeklärt werden. So erfolgt am häufigsten eine Anpassung thermophiler Proteine durch eine Erhöhung der strukturellen Festigkeit (12, 42) während für halophile Proteine die Ausbildung einer negative Oberflächenladung (43, 44, 62) dominiert. Bis dato liegen kaum biochemische und strukturelle Informationen zu halo-thermophilen



Proteinen vor. Um Adaptionsmechanismen dieser Proteinklasse zu identifizieren, wurde eine halo-thermophile ADH sowohl biochemisch als auch strukturell charakterisiert. Die ADH AF\_D (in ADH/D1 umbenannt) wurde ausgewählt da sie bei der im Vorfeld mit dem PPM Algorithmus durchgeführten Annotation ein besonders hohes Ranking aufwies. Das Gen dieser ADH entstammt dem Einzelzellgenomen eines Archaeon aus dem Solebecken des Roten Meeres *Discovery*, welches aus einer Tiefe von 2.141 m, bei 44,8°C und 26,2% Salzgehalt stammt (Vergleiche dazu Abschnitt 6).

Entgegen der Annotation als eisenabhängige ADH zeigte sich, daß ADH/D1 die erste manganabhängige ADH ist, ein thermophiles Temperaturoptimum von 75°C aufweist, eine halophile Aktivität bis hin zur Salzsättigung zeigt und eine Inkubation mit 30% v/v an verschiedenen Lösungsmitteln toleriert. Anhand der Expression und der Untersuchung der Einwirkungen verschiedener Metallionen auf die Aktivität der strukturell ähnlichen ADH aus *E. coli* YqhD, konnten in dieser Arbeit weitere Belege für die wahrscheinliche Fehlannotation mehrerer ADHs innerhalb der Gruppe eisenabhängiger ADHs im Bezug auf ihr aktives Metall gefunden werden. Ähnliche Resultate wurden ebenfalls für weitere Proteine dieser Gruppe beschrieben (172). Anhand der verfügbaren Metallsalze im RSBP *Discovery* ist eine evolutionäre Anpassung von ADH/D1 zur vorherrschenden hohen Mangankonzentration naheliegend, wobei ADH/D1 mit anderen Metallen, eine - deutlich verringerte - Aktivität aufweist.

Weitere Charakterisierungen der ADH/D1 zeigten sowohl die hohe Lagerstabilität bei verschiedenen Temperaturen, Lösungsmitteln und Salzgehalten, das breite Substratspektrum, gute Michaelis-Menten-Kinetik Parameter für Zimtalkohol wie eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) von  $1,77 \pm 0,09$  U  $mg^{-1}$ ; eine Michaelis-Menten Konstante ( $K_M$ ) von  $8,1 \pm 1,6 \times 10^{-4}$ , eine Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) von  $231,4 \pm 11,0$  s<sup>-1</sup> und eine kinetischen Spezifität ( $k_{cat} K_M^{-1}$ ) von  $28,6 \pm 7,1 \times 10^4$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Des Weiteren zeigte ADH/D1 keinerlei Aktivitätsverlust nach Gefriertrocknung, es konnte der Einfluß von  $\beta$ -Mercaptoethanol auf die Aktivität bei verschiedenen pH für ADH/D1 sowie YqhD nachgewiesen werden und ADH/D1 zeigte eine für halophile Proteine unübliche vollständige Reaktivierung nach Dialyse gegen Wasser durch Salzzugabe.

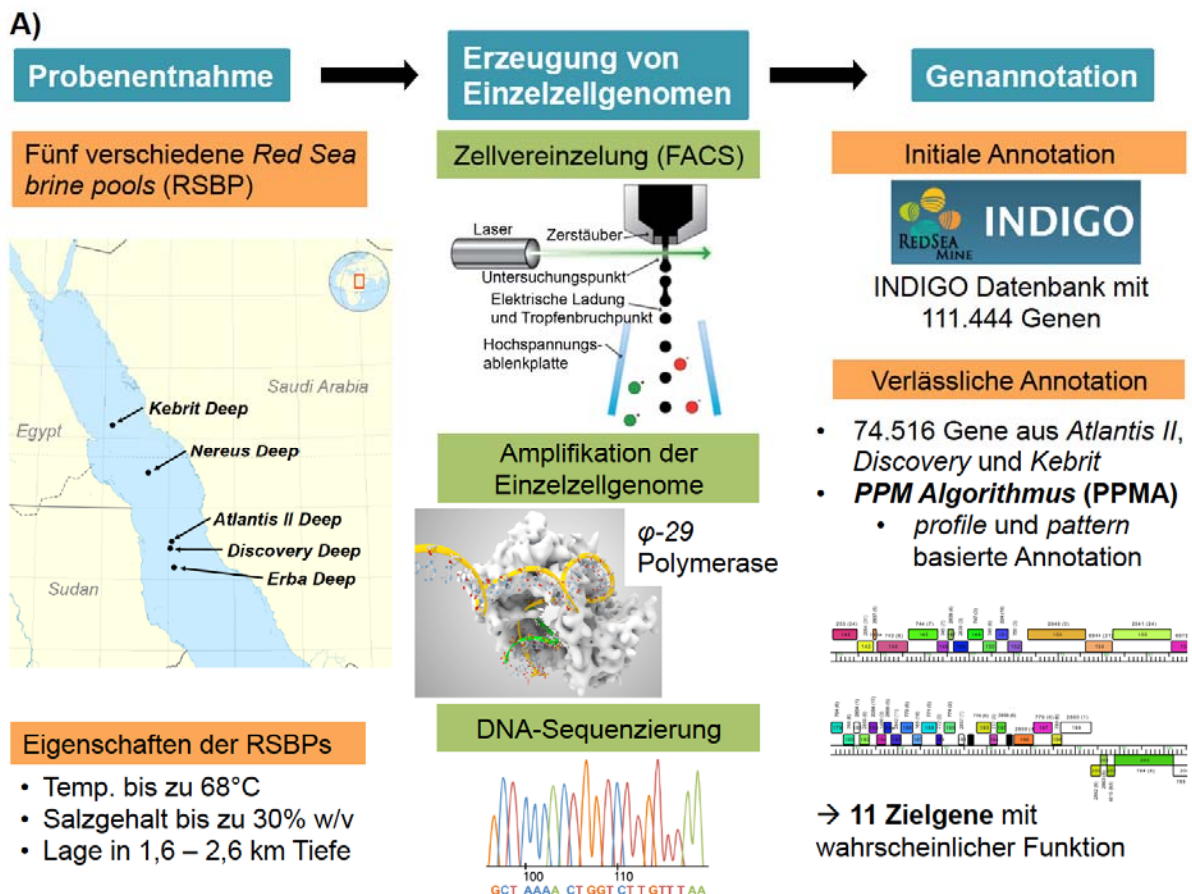
Anhand verschiedener Kristallstrukturen mit einer Auflösung von bis zu 1,95 Å konnten sowohl der bisher nur einmal zuvor identifizierte Kofaktor *cis*-5,6-dihydroxy-NADPH (NZQ)

als auch die Bindung von Mangan im aktiven Zentrum nachgewiesen werden. Strukturbasierte Modellierungen und Aktivitätstests unter anaeroben Bedingungen, legte eine Koordination von Sauerstoff durch H277 in Kombination mit dem Mangan ( $Mn^{2+}$ ) im aktiven Zentrum nahe. Die strukturelle Charakterisierung der NZQ freien ADH/D1-H277A Mutante (1,85 Å) unterstützen diese Hypothese. Basierend auf der ermittelte Koordination des Sauerstoffs über H277, sowie die Stereoselektivität der NADPH Hydroxylierung zu NZQ konnte eine neue Art der Sauerstoffaktivierung vorgeschlagen werden.

Der Vergleich der erhaltenen Struktur der ADH/D1, welche eine der ersten von halothermophilen Proteine darstellt, mit Strukturen von mesophilen und thermophilen Homologen ermöglichte die Beschreibung der Adaptionenmechanismen der ADH/D1 an die extremen Bedingungen im Solebecken *Discovery*. Der Vergleich ergab, daß ADH/D1 selektive Eigenschaften beschriebener Adaptionenstrategien von halophilen und thermophilen Proteinen kombiniert, welche es ermöglichen, die molekularen Kräfte so zu balancieren, daß es einerseits steif genug ist, um bei hohen Temperaturen nicht zu entfalten (12, 180) und andererseits auch bei hohen Salzkonzentrationen die für eine Aktivität nötige Flexibilität aufweist (43) (Vergleiche hierzu Tabelle 64). So zeigt ADH/D1 verankerte Termini und eine im Vergleich zu seinen Homologen, erhöhte Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen, was typisch für thermophile Proteine ist (12, 180). Des Weiteren verfügt ADH/D1 über eine stark negativ geladene Oberfläche, die typisch für halophile Proteine ist (43, 44, 62). Neben diesen üblichen Adaptionen zu thermophilen- beziehungsweise halophilen-Umgebungen weist ADH/D1 weitere, unübliche Eigenschaften zum Funktionserhalt auf. Sowohl biochemische größenausschlusschromatographische Messungen als auch strukturelle Messungen der Kleinwinkelröntgenstreuung ergaben, daß ADH/D1 ein extrem stabiles Dimer bildet. Eine Monomerisierung findet weder unter hoher Temperatur, noch unter verschiedener Salzgehalten, noch bei unterschiedlichem pH, oder durch Zugabe von EDTA oder  $\beta$ -Mercaptoethanol statt. Des Weiteren bestätigten Messungen der Röntgenkleinwinkelstreuung der ADH/D1, was strukturelle Vergleiche der untersuchten Homologe nahelegten: Eine konformelle Änderung der Domänen des Monomers zum Kofaktoraustausch. Im Gegensatz zu seinen Homologen besitzt ADH/D1 eine Wasserstoffbrückenbindung, welche in geschlossener Form die Domänen stabilisiert. Neben dem potentiellen evolutionären Vorteil

der Nutzung von Mangan im aktiven Zentrum wurde zudem ein strukturstabilisierender Effekt des Metalls durch Aggregationsexperimente bestätigt.

Das nachfolgende Schaubild bietet einen Überblick über die Thematik der vorliegenden Arbeit. Teil A) der Abbildung 56 veranschaulicht die Vorarbeiten von der Probenentnahme bis zur verlässlichen Annotation von Zielgenen aus Einzelzellgenomen. Teil B) der Abbildung 56 illustriert die in dieser Promotion durchgeführten Arbeitsschritte von der Genexpression verschiedenerer RSBP Gene über die biochemische Charakterisierung der ADH/D1 bis zur Aufklärung der Proteinstruktur.



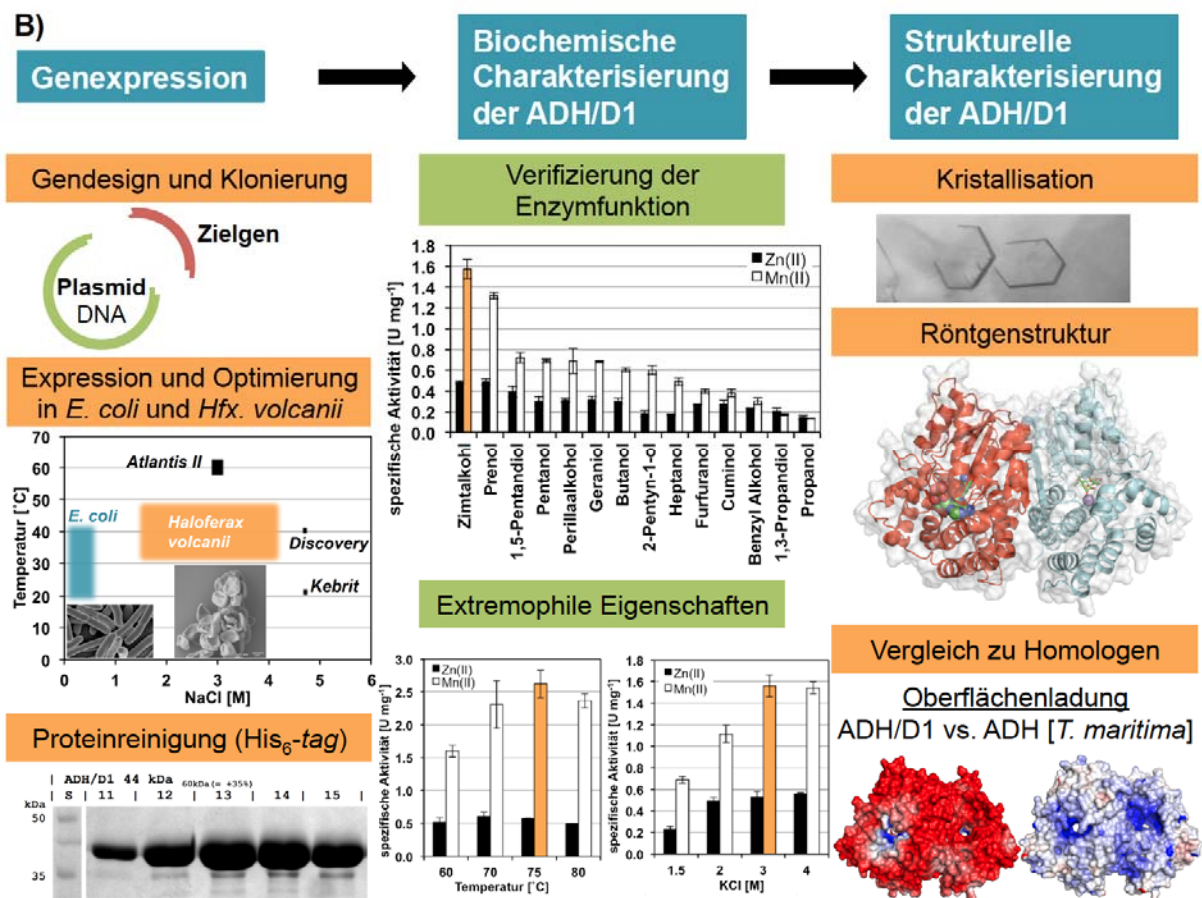


Abbildung 56: Überblick der Thematik der vorliegenden Arbeit, von der Probenentnahme bis zur Kristallstruktur. A) Vorarbeiten zu dieser Arbeit wie Probenentnahme aus den verschiedenen Solebecken des Roten Meeres, Erzeugung von Einzelzellgenomen und die Annotation dieser Genome mittels des *PPM Algorithmus* (PPMA), resultierend in den 11 Ausgangsgenen B) Arbeitsschritte und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einschließlich der Genexpressionsanalyse verschiedener *Red Sea Brine Pool* (RSBP) Genen in *E. coli* und *Haloferax volcanii*, der biochemische Charakterisierung der Alkoholdehydrogenase aus dem RSBP *Discovery* (ADH/D1) sowie der Aufklärung der Struktur dieses Enzyms und der Vergleich zu strukturellen Homologen

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die besondere Eignung des *Haloferax volcanii* Expressionssystem zur Expression halo-thermophiler Gene im Schüttelkolben und Rührkesselreaktor und zeigt den Nutzen von Genen die über zellkulturfreie Methoden gewonnen wurden auf.

Die biochemische Untersuchung der ADH/D1 ergab eine neue extremophile ADH, deren hohe Temperatur- und Lösungsmittelstabilität von Interesse für eine industrielle Nutzung sind. In Kombination mit der strukturellen Untersuchung wurden verschiedene Mechanismen zur Adaption dieses halo-thermophilen Proteins identifiziert. Anhand des Vergleichs mit homologen ADHs konnte eine Domänenöffnung für alle ADHs dieser Gruppe zum

Kofaktoraustausch gezeigt werden. Weiterhin ergibt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit die generelle Frage, ob Proteine im Labor oder in der Industrie generell mit dem für sie idealen Metall genutzt werden. Zumindest waren die Annotationen der untersuchten ADH/D1 und des weiterhin getesteten Homologes aus *E. coli* YqhD in Bezug auf das Metallion im aktiven Zentrum unkorrekt und nur der Austausch gegen ein anderes, „ungewöhnliches“ Metall wie  $Mn^{2+}$  oder  $Co^{2+}$  ermöglichte hohe Aktivitäten.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit bieten eine Grundlage zur direkten Erforschung und Nutzung weiterer gut exprimierender Gene aus den RSBP und ähnlichen Habitaten, sowie zur mutationsbasierte Substraterweiterung der ADH/D1 für industriell wichtige sekundäre Alkohole, basierend auf der gelösten Struktur. Des Weiteren kann die Nutzung von *Haloferax volcanii* als alternatives Expressionssystem sowie die spezifischen Adaptionen der ADH/D1 dabei helfen, neue Enzyme zu finden und derzeitig verwendete zu verbessern.

## Literaturverzeichnis

1. J. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*. (W.H. Freeman and Company, 2002).
2. J. Eichler, Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol Adv* **19**, 261-278 (2001).
3. J. Parkot, H. Groger, W. Hummel, Purification, cloning, and overexpression of an alcohol dehydrogenase from *Nocardia globerula* reducing aliphatic ketones and bulky ketoesters. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 1813-1820 (2010).
4. J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, P. Blum, D. B. Berkowitz, Use of a robust dehydrogenase from an archaeal hyperthermophile in asymmetric catalysis-dynamic reductive kinetic resolution entry into (S)-profens. *J Am Chem Soc* **132**, 5930-5931 (2010).
5. D. Giacomini, P. Galletti, A. Quintavalla, G. Gucciardo, F. Paradisi, Highly efficient asymmetric reduction of arylpropionic aldehydes by horse liver alcohol dehydrogenase through dynamic kinetic resolution. *Chem Commun (Camb)*, 4038-4040 (2007).
6. S. Elleuche, C. Schroder, K. Sahm, G. Antranikian, Extremozymes--biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* **29**, 116-123 (2014).
7. R. A. Herbert, A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends Biotechnol* **10**, 395-402 (1992).
8. P. Gatti-Lafranconi *et al.*, Evolution of stability in a cold-active enzyme elicits specificity relaxation and highlights substrate-related effects on temperature adaptation. *J Mol Biol* **395**, 155-166 (2010).
9. K. S. Siddiqui *et al.*, A novel approach for enhancing the catalytic efficiency of a protease at low temperature: reduction in substrate inhibition by chemical modification. *Biotechnol Bioeng* **103**, 676-686 (2009).
10. A. Mukhopadhyay, A. K. Dasgupta, K. Chakrabarti, Enhanced functionality and stabilization of a cold active laccase using nanotechnology based activation-immobilization. *Bioresource Technol* **179**, 573-584 (2015).
11. J. A. Coker, Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. *FI000Res* **5**, (2016).
12. C. Vieille, G. J. Zeikus, Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol R* **65**, 1-43 (2001).
13. F. Sarmiento, R. Peralta, J. M. Blamey, Cold and Hot Extremozymes: Industrial Relevance and Current Trends. *Front Bioeng Biotechnol* **3**, 148 (2015).
14. K. Takai *et al.*, Cell proliferation at 122 degrees C and isotopically heavy CH<sub>4</sub> production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *P Natl Acad Sci USA* **105**, 10949-10954 (2008).
15. C. Baker-Austin, M. Dopson, Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol* **15**, 165-171 (2007).

16. K. Takai *et al.*, Alkaliphilus transvaalensis gen. nov., sp. nov., an extremely alkaliphilic bacterium isolated from a deep South African gold mine. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1245-1256 (2001).
17. C. Kato *et al.*, Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1510-1513 (1998).
18. W. V. Ng *et al.*, Genome sequence of Halobacterium species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12176-12181 (2000).
19. N. Yoshida *et al.*, Acidianus manzaensis sp. nov., a novel thermoacidophilic archaeon growing autotrophically by the oxidation of H<sub>2</sub> with the reduction of Fe<sup>3+</sup>. *Curr Microbiol* **53**, 406-411 (2006).
20. A. Antunes, D. K. Ngugi, U. Stingl, Microbiology of the Red Sea (and other) deep - sea anoxic brine lakes. *Environmental microbiology reports* **3**, 416-433 (2011).
21. "Enzymes Market By Type (Industrial, Specialty), By Product (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases), By Application (Food & Beverages, Detergents, Animal Feed, Textile, Paper & Pulp, Nutraceutical, Personal Care & Cosmetics, Wastewater, Research & Biotechnology, Diagnostics, Biocatalyst) And Segment Forecasts To 2024," (2016).
22. G. A. Sellek, J. B. Chaudhuri, Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme Microb Tech* **25**, 471-482 (1999).
23. L. M. Longo, J. Lee, M. Blaber, Simplified protein design biased for prebiotic amino acids yields a foldable, halophilic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2135-2139 (2013).
24. M. Di Giulio, A comparison of proteins from Pyrococcus furiosus and Pyrococcus abyssi: barophily in the physicochemical properties of amino acids and in the genetic code. *Gene* **346**, 1-6 (2005).
25. M. Ferrer, O. Golyshina, A. Beloqui, P. N. Golyshin, Mining enzymes from extreme environments. *Curr Opin Microbiol* **10**, 207-214 (2007).
26. S. W. Grötzinger *et al.*, Mining a database of single amplified genomes from Red Sea brine pool extremophiles—improving reliability of gene function prediction using a profile and pattern matching algorithm (PPMA). *Extreme Microbiology* **5**, 134 (2014).
27. I. Alam *et al.*, INDIGO—INtegrated Data Warehouse of MICrobial GenOMes with Examples from the Red Sea Extremophiles. *PloS one* **8**, e82210 (2013).
28. P. Bakke *et al.*, Evaluation of Three Automated Genome Annotations for Halorhabdus utahensis. *Plos One* **4**, (2009).
29. D. C. Demirjian, F. Moris-Varas, C. S. Cassidy, Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 144-151 (2001).
30. L. M. Timpson *et al.*, Characterization of alcohol dehydrogenase (ADH12) from Haloarcula marismortui, an extreme halophile from the Dead Sea. *Extremophiles* **16**, 57-66 (2012).
31. R. Karan, M. D. Capes, P. DasSarma, S. DasSarma, Cloning, overexpression, purification, and characterization of a polyextremophilic beta-galactosidase from the Antarctic haloarchaeon Halorubrum lacusprofundi. *BMC Biotechnol* **13**, 3 (2013).
32. T. Allers, S. Barak, S. Liddell, K. Wardell, M. Mevarech, Improved Strains and Plasmid Vectors for Conditional Overexpression of His-Tagged Proteins in Haloferax volcanii. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 1759-1769 (2010).

33. O. Blecher, S. Goldman, M. Mevarech, High Expression in Escherichia-Coli of the Gene Coding for Dihydrofolate-Reductase of the Extremely Halophilic Archaeobacterium Haloferax-Volcanii - Reconstitution of the Active Enzyme and Mutation Studies. *European Journal of Biochemistry* **216**, 199-203 (1993).
34. H. Connaris, J. B. Chaudhuri, M. J. Danson, D. W. Hough, Expression, reactivation, and purification of enzymes from Haloferax volcanii in Escherichia coli. *Biotechnology and Bioengineering* **64**, 38-45 (1999).
35. T. Allers, Overexpression and purification of halophilic proteins in Haloferax volcanii. *Bioeng Bugs* **1**, 288-290 (2010).
36. A. L. Hartman *et al.*, The Complete Genome Sequence of Haloferax volcanii DS2, a Model Archaeon. *Plos One* **5**, (2010).
37. T. Allers, H. P. Ngo, M. Mevarech, R. G. Lloyd, Development of additional selectable markers for the halophilic Archaeon Haloferax volcanii based on the leuB and trpA genes. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 943-953 (2004).
38. C. Norais *et al.*, Genetic and physical mapping of DNA replication origins in Haloferax volcanii. *Plos Genet* **3**, 729-743 (2007).
39. A. Stroud, S. Liddell, T. Allers, Genetic and biochemical identification of a novel single-stranded DNA-binding complex in Haloferax volcanii. *Frontiers in microbiology* **3**, (2012).
40. R. Ortenberg, O. Rozenblatt-Rosen, M. Mevarech, The extremely halophilic archaeon Haloferax volcanii has two very different dihydrofolate reductases. *Mol Microbiol* **35**, 1493-1505 (2000).
41. A. Large *et al.*, Characterization of a tightly controlled promoter of the halophilic archaeon Haloferax volcanii and its use in the analysis of the essential cct1 gene. *Molecular Microbiology* **66**, 1092-1106 (2007).
42. C. J. Reed, H. Lewis, E. Trejo, V. Winston, C. Evilia, Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea* **2013**, 373275 (2013).
43. R. Karan, M. D. Capes, S. DasSarma, Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquat Biosyst* **8**, (2012).
44. K. L. Britton *et al.*, Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile Haloferax mediterranei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4846-4851 (2006).
45. P. Anastas, N. Eghbali, Green chemistry: principles and practice. *Chem Soc Rev* **39**, 301-312 (2010).
46. J. P. Rasor, E. Voss, Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Appl Catal a-Gen* **221**, 145-158 (2001).
47. M. F. Reid, C. A. Fewson, Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol* **20**, 13-56 (1994).
48. W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 120-126 (2004).
49. K. Goldberg, K. Schroer, S. Lutz, A. Liese, Biocatalytic ketone reduction--a powerful tool for the production of chiral alcohols-part II: whole-cell reductions. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 249-255 (2007).
50. T. Yakushi, K. Matsushita, Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 1257-1265 (2010).



51. R. Stuermer, B. Hauer, M. Hall, K. Faber, Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 203-213 (2007).
52. J. W. Yang, M. T. Hechavarria Fonseca, N. Vignola, B. List, Metal-free, organocatalytic asymmetric transfer hydrogenation of alpha,beta-unsaturated aldehydes. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 108-110 (2004).
53. J. D. Cirillo, T. R. Weisbrod, A. Banerjee, B. R. Bloom, W. R. Jacobs, Jr., Genetic determination of the meso-diaminopimelate biosynthetic pathway of mycobacteria. *J Bacteriol* **176**, 4424-4429 (1994).
54. D. Christendat, V. C. Saridakis, J. L. Turnbull, Use of site-directed mutagenesis to identify residues specific for each reaction catalyzed by chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 15703-15712 (1998).
55. R. Gupta, Q. K. Beg, P. Lorenz, Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**, 15-32 (2002).
56. R. Karan, S. P. Singh, S. Kapoor, S. K. Khare, A novel organic solvent tolerant protease from a newly isolated *Geomicrobium* sp. EMB2 (MTCC 10310): production optimization by response surface methodology. *N Biotechnol* **28**, 136-145 (2011).
57. M. Santillan, M. C. Mackey, Quantitative approaches to the study of bistability in the lac operon of *Escherichia coli*. *J R Soc Interface* **5 Suppl 1**, S29-39 (2008).
58. M. L. Holmes, M. L. Dyall-Smith, Sequence and expression of a halobacterial beta-galactosidase gene. *Molecular Microbiology* **36**, 114-122 (2000).
59. S. J. Tomazic, A. M. Klibanov, Mechanisms of irreversible thermal inactivation of *Bacillus* alpha-amylases. *J Biol Chem* **263**, 3086-3091 (1988).
60. A. Oren, Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* **4**, 2 (2008).
61. A. Ventosa, J. J. Nieto, A. Oren, Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol R* **62**, 504-544 (1998).
62. G. Graziano, A. Merlino, Molecular bases of protein halotolerance. *Biochim Biophys Acta* **1844**, 850-858 (2014).
63. Y. Wang *et al.*, Autotrophic microbe metagenomes and metabolic pathways differentiate adjacent Red Sea brine pools. *Sci Rep* **3**, 1748 (2013).
64. M. C. Pierret, N. Clauer, D. Bosch, G. Blanc, C. France-Lanord, Chemical and isotopic (Sr-87/Sr-86, delta O-18, delta D) constraints to the formation processes of Red-Sea brines. *Geochim Cosmochim Acta* **65**, 1259-1275 (2001).
65. N. Augustin *et al.*, The rifting to spreading transition in the Red Sea. *Earth Planet Sc Lett* **395**, 217-230 (2014).
66. E. Gurvich, *Metalliferous sediments of the world ocean: fundamental theory of deep-sea hydrothermal sedimentation*. (2006).
67. M. B. Cita, Exhumation of Messinian evaporites in the deep-sea and creation of deep anoxic brine-filled collapsed basins. *Sedimentary Geology* **188**, 357-378 (2006).
68. S. DasSarma, P. DasSarma, in *eLS*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2012).
69. L. Karbe, *Hot brines and the deep sea environment*. Red Sea (AJ Edwards, and SM Head (Oxford: Pergamon Press), Great Britain, 1987), vol. 1.
70. S. DasSarma *et al.*, Genomic perspective on the photobiology of *Halobacterium* species NRC-1, a phototrophic, phototactic, and UV-tolerant haloarchaeon. *Photosynth Res* **70**, 3-17 (2001).

71. L. J. N. G. K. F. F. Bruneau, *Physical and chemical methods*. Reports of the Swedish Deep Sea Expedition (Göteborg, 1953), vol. 3.
72. S. Watson, J. Waterbury, in *Hot Brines and Recent Heavy Metal Deposits in the Red Sea*, E. Degens, D. Ross, Eds. (Springer Berlin Heidelberg, 1969), chap. 27, pp. 272-281.
73. R. Mwirichia *et al.*, Metabolic traits of an uncultured archaeal lineage--MSBL1--from brine pools of the Red Sea. *Sci Rep* **6**, 19181 (2016).
74. U. Stingl, D. K. Ngugi, L. Thompson, A. Antunes, M. Cahill, Mikrobielle Ökologie des Roten Meeres. *BIOspektrum* **18**, 582-586 (2012).
75. M. Schmidt *et al.*, High-resolution methane profiles across anoxic brine-seawater boundaries in the Atlantis-II, Discovery, and Kebrit Deeps (Red Sea). *Chem Geol* **200**, 359-375 (2003).
76. P. Anschutz, G. Blanc, P. Stille, Origin of Fluids and the Evolution of the Atlantis-Ii Deep Hydrothermal System, Red-Sea - Strontium Isotope Study. *Geochim Cosmochim Acta* **59**, 4799-4808 (1995).
77. M. Hartmann, J. C. Scholten, P. Stoffers, F. Wehner, Hydrographic structure of brine-filled deeps in the Red Sea—new results from the Shaban, Kebrit, Atlantis II, and Discovery Deep. *Marine Geology* **144**, 311-330 (1998).
78. E. Faber *et al.*, Methane in Red Sea brines. *Organic geochemistry* **29**, 363-379 (1998).
79. R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, Phylogenetic Identification and in-Situ Detection of Individual Microbial-Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews* **59**, 143-169 (1995).
80. J. Amann, Die direkte Zählung der Wasserbakterien mittels des Ultramikroskops. *Centralbl Bakteriol* **29**, 381-384 (1911).
81. E. J. Stewart, Growing Unculturable Bacteria. *J Bacteriol* **194**, 4151-4160 (2012).
82. J. J. Morris, R. Kirkegaard, M. J. Szul, Z. I. Johnson, E. R. Zinser, Facilitation of robust growth of *Prochlorococcus* colonies and dilute liquid cultures by "Helper" heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 4530-4534 (2008).
83. M. L. Holmes *et al.*, Purification and analysis of an extremely halophilic beta-galactosidase from *Haloferax alicantei*. *Bba-Protein Struct M* **1337**, 276-286 (1997).
84. M. Rashid, U. Stingl, Contemporary molecular tools in microbial ecology and their application to advancing biotechnology. *Biotechnology Advances* **33**, 1755-1773 (2015).
85. D. Reyes-Duarte, M. Ferrer, H. García-Arellano, in *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*, G. Sandoval, Ed. (Humana Press, Totowa, NJ, 2012), pp. 101-113.
86. T. Thomas, J. Gilbert, F. Meyer, Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp* **2**, 3 (2012).
87. M. Albertsen *et al.*, Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat Biotechnol* **31**, 533-538 (2013).
88. C. Rinke *et al.*, Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics. *Nat Protoc* **9**, 1038-1048 (2014).
89. R. Schmieder, R. Edwards, Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets. *PLoS One* **6**, e17288 (2011).

90. T. Kvist, B. K. Ahring, R. S. Lasken, P. Westermann, Specific single-cell isolation and genomic amplification of uncultured microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**, 926-935 (2007).
91. Y. Marcy *et al.*, Dissecting biological "dark matter" with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11889-11894 (2007).
92. A. Raghunathan *et al.*, Genomic DNA amplification from a single bacterium. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3342-3347 (2005).
93. K. R. Chi, Singled out for sequencing. *Nature Methods* **11**, 13-17 (2014).
94. T. Tatusova *et al.*, NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res* **44**, 6614-6624 (2016).
95. S. Das, C. A. Orengo, Protein function annotation using protein domain family resources. *Methods* **93**, 24-34 (2016).
96. F. R. Blattner *et al.*, The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12. *Science* **277**, 1453-1462 (1997).
97. L. D. Plank, J. D. Harvey, Generation Time Statistics of Escherichia-Coli-B Measured by Synchronous Culture Techniques. *J Gen Microbiol* **115**, 69-77 (1979).
98. B. van den Burg, Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 213-218 (2003).
99. G. Lithwick, H. Margalit, Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation. *Genome Res* **13**, 2665-2673 (2003).
100. N. A. Burgess-Brown *et al.*, Codon optimization can improve expression of human genes in Escherichia coli: A multi-gene study. *Protein Express Purif* **59**, 94-102 (2008).
101. H. Goodarzi, N. Torabi, H. S. Najafabadi, M. Archetti, Amino acid and codon usage profiles: adaptive changes in the frequency of amino acids and codons. *Gene* **407**, 30-41 (2008).
102. M.-K. Lee, J. M. González, F. T. Robb, Extremely thermostable glutamate dehydrogenase (GDH) from the freshwater archaeon Thermococcus waiotapuensis: cloning and comparison with two marine hyperthermophilic GDHs. *Extremophiles* **6**, 151-159 (2002).
103. F. Cendrin, J. Chroboczek, G. Zaccai, H. Eisenberg, M. Mevarech, Cloning, sequencing, and expression in Escherichia coli of the gene coding for malate dehydrogenase of the extremely halophilic archaeobacterium Haloarcula marismortui. *Biochemistry* **32**, 4308-4313 (1993).
104. M. F. Mullakhanbhai, H. Larsen, Halobacterium volcanii spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Arch Microbiol* **104**, 207-214 (1975).
105. J. L. Robinson *et al.*, Growth kinetics of extremely halophilic archaea (family halobacteriaceae) as revealed by arrhenius plots. *J Bacteriol* **187**, 923-929 (2005).
106. F. J. M. Mojica, F. Charbonnier, G. Juez, F. Rodriguezvalera, P. Forterre, Effects of Salt and Temperature on Plasmid Topology in the Halophilic Archaeon Haloferax-Volcanii. *J Bacteriol* **176**, 4966-4973 (1994).
107. A. Naor, P. Lapierre, M. Mevarech, R. T. Papke, U. Gophna, Low species barriers in halophilic archaea and the formation of recombinant hybrids. *Curr Biol* **22**, 1444-1448 (2012).
108. <https://biobabel.wordpress.com/tag/haloferax-volcanii/>. (2012), vol. 2017.

109. M. Sumper, E. Berg, R. Mengele, I. Strobel, Primary structure and glycosylation of the S-layer protein of *Haloferax volcanii*. *J Bacteriol* **172**, 7111-7118 (1990).
110. A. Oren, Microbial diversity and microbial abundance in salt-saturated brines: Why are the waters of hypersaline lakes red? *Natural Resources and Environmental Issues* **15**, 247-255 (2009).
111. S. Breuert, T. Allers, G. Spohn, J. Soppa, Regulated polyploidy in halophilic archaea. *PLoS One* **1**, e92 (2006).
112. K. Zerulla *et al.*, DNA as a phosphate storage polymer and the alternative advantages of polyploidy for growth or survival. *PLoS One* **9**, e94819 (2014).
113. S. P. Kennedy, W. V. Ng, S. L. Salzberg, L. Hood, S. DasSarma, Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome Res* **11**, 1641-1650 (2001).
114. R. N. Esquivel, M. Pohlschroder, A conserved type IV pilin signal peptide H-domain is critical for the post-translational regulation of flagella-dependent motility. *Mol Microbiol* **93**, 494-504 (2014).
115. D. Wendoloski, C. Ferrer, M. L. Dyall-Smith, A new simvastatin (mevinolin)-resistance marker from *Haloarcula hispanica* and a new *Haloferax volcanii* strain cured of plasmid pHV2. *Microbiology* **147**, 959-964 (2001).
116. G. Bitan-Banin, R. Ortenberg, M. Mevarech, Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the *pyrE* gene. *J Bacteriol* **185**, 772-778 (2003).
117. E. Bab-Dinitz, H. Shmueli, J. Maupin-Furlow, J. Eichler, B. Shaanan, *Haloferax volcanii* PitA: an example of functional interaction between the Pfam chlorite dismutase and antibiotic biosynthesis monooxygenase families? *Bioinformatics* **22**, 671-675 (2006).
118. M. L. Holmes, S. D. Nuttall, M. L. Dyallsmith, Construction and Use of Halobacterial Shuttle Vectors and Further-Studies on *Haloferax* DNA Gyrase. *J Bacteriol* **173**, 3807-3813 (1991).
119. R. L. Charlebois, W. L. Lam, S. W. Cline, W. F. Doolittle, Characterization of pHV2 from *Halobacterium volcanii* and its use in demonstrating transformation of an archaeobacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8530-8534 (1987).
120. L. C. Shimmin, P. P. Dennis, Conserved sequence elements involved in regulation of ribosomal protein gene expression in halophilic archaea. *J Bacteriol* **178**, 4737-4741 (1996).
121. M. Z. Li, S. J. Elledge, SLIC: a method for sequence- and ligation-independent cloning. *Methods Mol Biol* **852**, 51-59 (2012).
122. S. Muller, C. Hoege, G. Pyrowolakis, S. Jentsch, SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 202-210 (2001).
123. E. Mossessova, C. D. Lima, Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell* **5**, 865-876 (2000).
124. S. J. Li, M. Hochstrasser, A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* **398**, 246-251 (1999).
125. J. C. Kendrew *et al.*, A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **181**, 662-666 (1958).
126. H. M. Berman *et al.*, The protein data bank. *Nucleic acids research* **28**, 235-242 (2000).

127. A. Wlodawer, W. Minor, Z. Dauter, M. Jaskolski, Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J* **275**, 1-21 (2008).
128. J. Lipfert, S. Doniach, Small-angle X-ray scattering from RNA, proteins, and protein complexes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**, 307-327 (2007).
129. D. I. Svergun, M. H. Koch, Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 654-660 (2002).
130. G. Bertani, Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**, 293-300 (1951).
131. E. Strillinger, S. W. Grotzinger, T. Allers, J. Eppinger, D. Weuster-Botz, Production of halophilic proteins using *Haloferax volcanii* H1895 in a stirred-tank bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 1183-1195 (2016).
132. C. L. Ladner, J. Yang, R. J. Turner, R. A. Edwards, Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal Biochem* **326**, 13-20 (2004).
133. G. Fairbanks, T. L. Steck, D. F. Wallach, Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617 (1971).
134. M. Tripepi, R. N. Esquivel, R. Wirth, M. Pohlschröder, *Haloferax volcanii* cells lacking the flagellin FlgA2 are hypermotile. *Microbiology* **159**, 2249-2258 (2013).
135. M. Holmes *et al.*, *The Halohandbook Protocols for haloarcheal genetics*. (2009), pp. 144.
136. K. B. Mullis, F. A. Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350 (1987).
137. L. Thomas, C. Marondedze, L. Ederli, S. Pasqualini, C. Gehring, Proteomic signatures implicate cAMP in light and temperature responses in *Arabidopsis thaliana*. *J Proteomics* **83**, 47-59 (2013).
138. G. Sulzenbacher *et al.*, Crystal structure of *E. coli* alcohol dehydrogenase YqhD: evidence of a covalently modified NADP coenzyme. *J Mol Biol* **342**, 489-502 (2004).
139. M. V. Petoukhov *et al.*, New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* **45**, 342-350 (2012).
140. D. Schneidman-Duhovny, M. Hammel, J. A. Tainer, A. Sali, FoXS, FoXSDock and MultiFoXS: Single-state and multi-state structural modeling of proteins and their complexes based on SAXS profiles. *Nucleic Acids Res* **44**, W424-429 (2016).
141. S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, How to study proteins by circular dichroism. *Bba-Proteins Proteom* **1751**, 119-139 (2005).
142. W. Kabsch, Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-132 (2010).
143. M. D. Winn *et al.*, Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 235-242 (2011).
144. D. Marcal, A. T. Rego, M. A. Carrondo, F. J. Enguita, 1,3-Propanediol dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae*: decameric quaternary structure and possible subunit cooperativity. *J Bacteriol* **191**, 1143-1151 (2009).
145. I. Schomburg *et al.*, BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments. *Nucleic Acids Res* **32**, D431-433 (2004).
146. S. A. Olson, EMBOSS opens up sequence analysis. European Molecular Biology Open Software Suite. *Brief Bioinform* **3**, 87-91 (2002).
147. A. Grote *et al.*, JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Research* **33**, W526-W531 (2005).

148. C. Louis-Jeune, M. A. Andrade-Navarro, C. Perez-Iratxeta, Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra (vol 80, pg 374, 2012). *Proteins* **80**, 2818-2818 (2012).
149. S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870-1874 (2016).
150. T. J. Dolinsky *et al.*, PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res* **35**, W522-525 (2007).
151. N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, J. A. McCammon, Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10037-10041 (2001).
152. A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **5**, 725-738 (2010).
153. M. Biasini *et al.*, SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* **42**, W252-258 (2014).
154. R. A. Laskowski, V. V. Chistyakov, J. M. Thornton, PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **33**, D266-268 (2005).
155. L. Holm, P. Rosenstrom, Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* **38**, W545-549 (2010).
156. S. Velankar *et al.*, PDBe: Protein Data Bank in Europe. *Nucleic Acids Res* **39**, D402-410 (2011).
157. S. Costantini, G. Colonna, A. M. Facchiano, ESBRI: a web server for evaluating salt bridges in proteins. *Bioinformatics* **3**, 137-138 (2008).
158. N. Guex, M. C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723 (1997).
159. C. R. Chen, G. I. Makhatadze, ProteinVolume: calculating molecular van der Waals and void volumes in proteins. *BMC Bioinformatics* **16**, 101 (2015).
160. M. P. Doyle, J. L. Schoeni, Survival and growth characteristics of Escherichia coli associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 855-856 (1984).
161. E. V. Raghubeer, J. R. Matches, Temperature range for growth of Escherichia coli serotype O157: H7 and selected coliforms in E. coli medium. *Journal of clinical microbiology* **28**, 803-805 (1990).
162. G. Sezonov, D. Joseleau-Petit, R. D'Ari, Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth. *J Bacteriol* **189**, 8746-8749 (2007).
163. J. Hrenovic, T. Ivankovic, Survival of Escherichia coli and Acinetobacter junii at various concentrations of sodium chloride. *EurAsian Journal of Biosciences*, (2009).
164. K. Brügger *et al.*, Mobile elements in archaeal genomes. *FEMS Microbiology Letters* **206**, 131-141 (2002).
165. M. Tripepi *et al.*, N-Glycosylation of Haloferax volcanii Flagellins Requires Known Agl Proteins and Is Essential for Biosynthesis of Stable Flagella. *J Bacteriol* **194**, 4876-4887 (2012).
166. R. Lestini *et al.*, Intracellular dynamics of archaeal FANCM homologue Hef in response to halted DNA replication. *Nucleic Acids Res* **41**, 10358-10370 (2013).

- 
167. A. K. Liliensiek, J. Cassidy, G. Gucciardo, C. Whitely, F. Paradisi, Heterologous overexpression, purification and characterisation of an alcohol dehydrogenase (ADH2) from Halobacterium sp. NRC-1. *Molecular biotechnology* **55**, 143-149 (2013).
  168. A. Oren, Anaerobic Growth of Halophilic Archaeobacteria by Reduction of Fumarate. *J Gen Microbiol* **137**, 1387-1390 (1991).
  169. C. Brasen, P. Schönheit, Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea. *Archives of Microbiology* **175**, 360-368 (2001).
  170. V. Pecoraro, K. Zerulla, C. Lange, J. Soppa, Quantification of ploidy in proteobacteria revealed the existence of monoploid, (mero-)oligoploid and polyploid species. *PLoS One* **6**, e16392 (2011).
  171. C. J. A. Sigrist *et al.*, New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic acids research* **41**, D344-D347 (2013).
  172. S. N. Ruzheinikov *et al.*, Glycerol dehydrogenase. structure, specificity, and mechanism of a family III polyol dehydrogenase. *Structure* **9**, 789-802 (2001).
  173. S. Bougouffa *et al.*, Distinctive microbial community structure in highly stratified deep-sea brine water columns. *Appl Environ Microbiol* **79**, 3425-3437 (2013).
  174. R. R. Brooks, I. R. Kaplan, M. N. A. Peterson, in *Hot Brines and Recent Heavy Metal Deposits in the Red Sea: A Geochemical and Geophysical Account*, E. T. Degens, D. A. Ross, Eds. (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1969), pp. 180-203.
  175. L. G. Danielsson, D. Dyrssen, A. Graneli, Chemical Investigations of Atlantis Ii and Discovery Brines in the Red-Sea. *Geochim Cosmochim Ac* **44**, 2051-2065 (1980).
  176. M. Mevarech, F. Frolow, L. M. Gloss, Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys Chem* **86**, 155-164 (2000).
  177. B. V. Plapp, Conformational changes and catalysis by alcohol dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* **493**, 3-12 (2010).
  178. S. B. Raj, S. Ramaswamy, B. V. Plapp, Yeast alcohol dehydrogenase structure and catalysis. *Biochemistry* **53**, 5791-5803 (2014).
  179. C. Vieille, K. L. Epting, R. M. Kelly, J. G. Zeikus, Bivalent cations and amino-acid composition contribute to the thermostability of *Bacillus licheniformis* xylose isomerase. *Eur J Biochem* **268**, 6291-6301 (2001).
  180. S. Kumar, C. J. Tsai, R. Nussinov, Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng* **13**, 179-191 (2000).

## Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
% (v/v)	Volumen Prozent
% (w/w)	Massen Prozent
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADH/A1	ADH/A1 Alkoholdehydrogenase aus dem Solebecken <i>Atlantis II</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O (MilliQ, Millipore, Merck EMD, Darmstadt, Deutschland)
DH	Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DO	Dissolved oxygen, Gelöstsauerstoffkonzentration
DR/A1	Dihydrodipicolinat Reduktase aus dem Solebecken <i>Atlantis II</i>
DR/D1	Dihydrodipicolinat Reduktase aus dem Solebecken <i>Discovery</i>
DRSBP	<i>Deep Red Sea Brine Pools</i>
5-FOA	5-Fluoroorotic Säure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMAC	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
k <sub>cat</sub>	Wechselzahl
LB	Lysogen Broth
M <sub>w</sub>	Molekulare Masse
NAD	Nikotinamid Adenin Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotinamid Adenin Dinukleotid (reduzierte Form)
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat (reduzierte Form)
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion



SDS	Sodium dodecyl Sulfat
TEMED	Tetramethylethyldiamid
Tris	Tris(hydroxymethyl) Aminomethan
U	Enzymeinheit $U = \mu\text{mol min}^{-1}$

---

# Anhang

## Plasmid-Karten

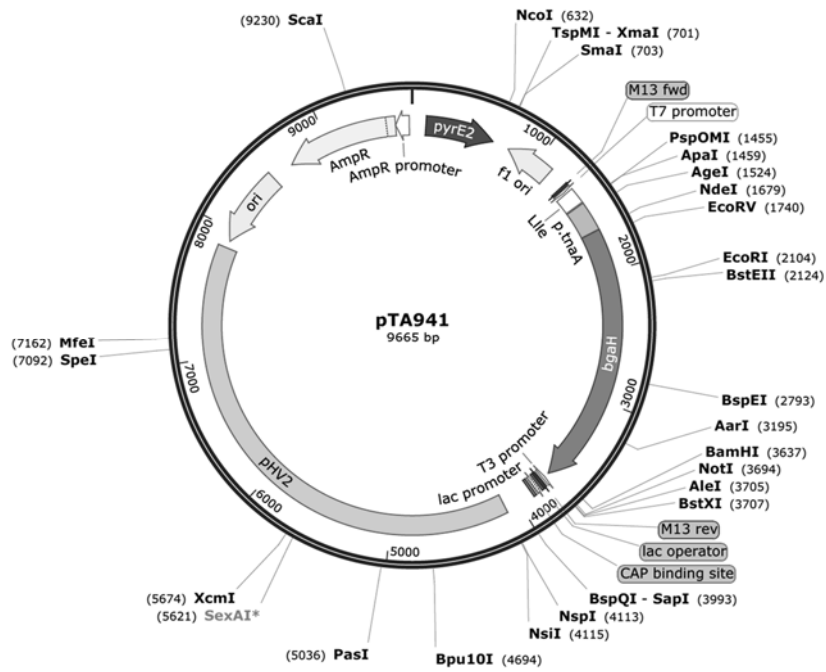


Abbildung 57: pTA941 Vektor gesponsert von Prof. Dr. Thorsten Allers mit dem Gen bgaH, genutzt zum Gentransfer

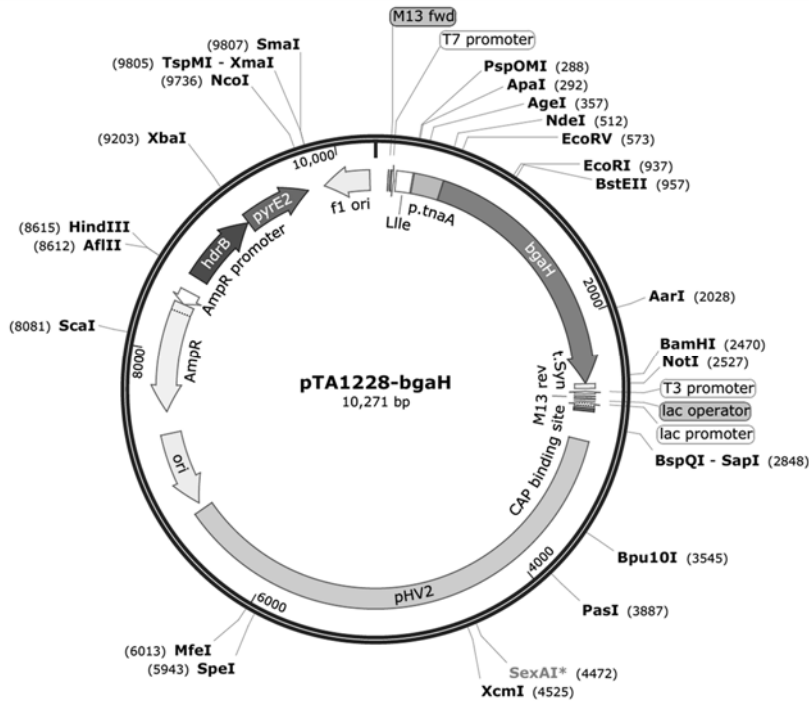


Abbildung 58: Expressionsvektor pTA1228-bgaH zur Bestimmung der Genexpression in *Haloferax volcanii*

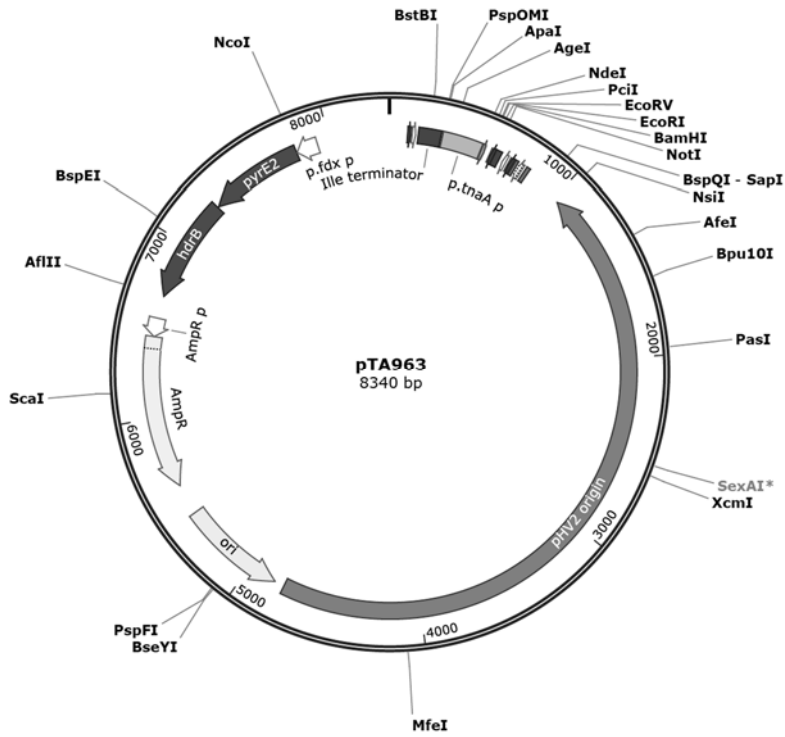


Abbildung 59: Expressionsvektor pTA963 zur Genexpression in *Haloferax volcanii*

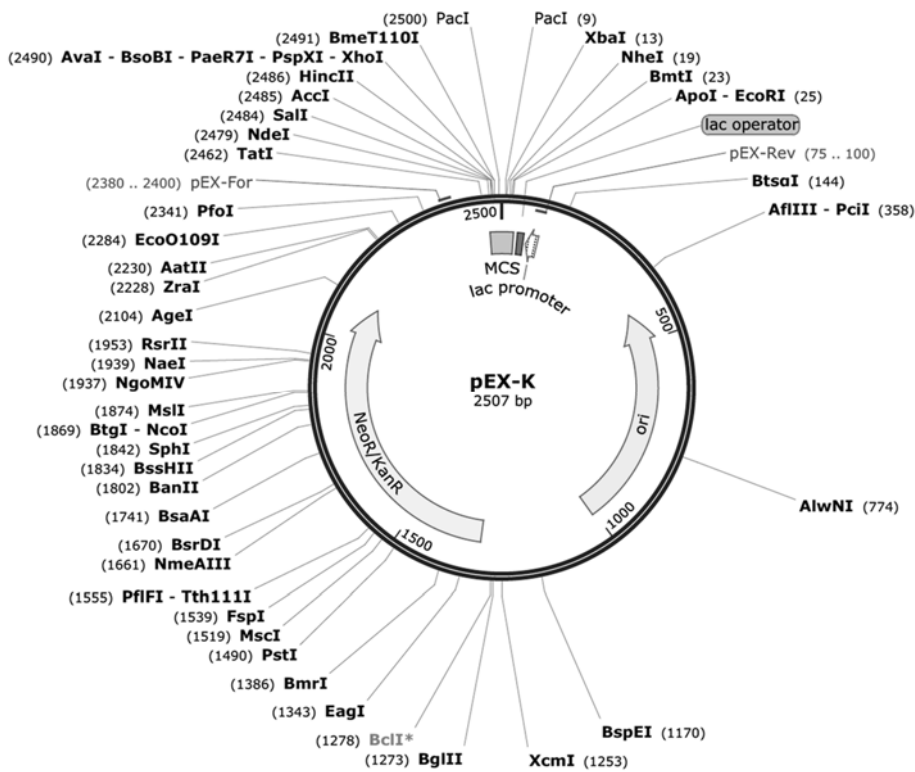


Abbildung 60: Transportvektor der *E. coli* optimierten RSBP Gene von Eurofins

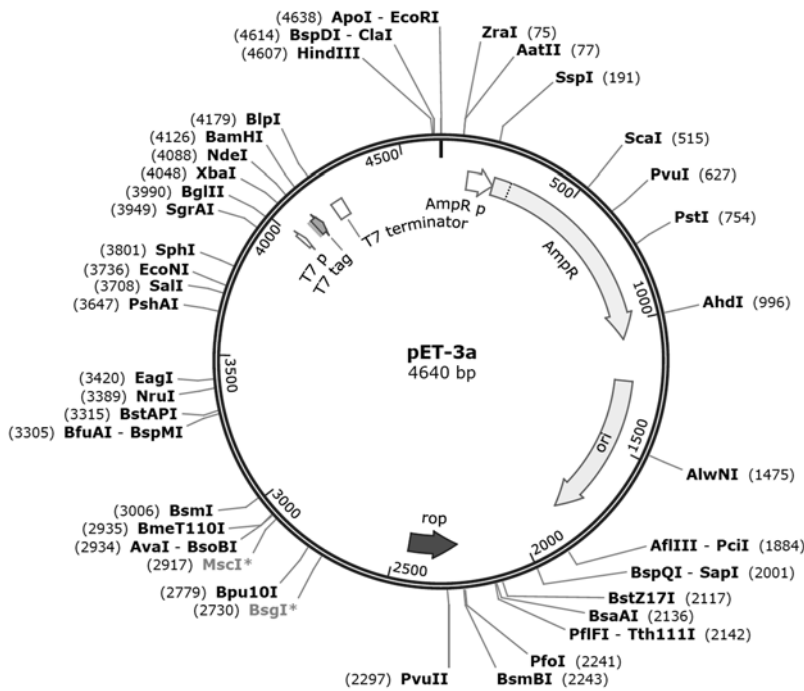


Abbildung 61: pET-3a Vektor zur Genexpression in *E. coli*

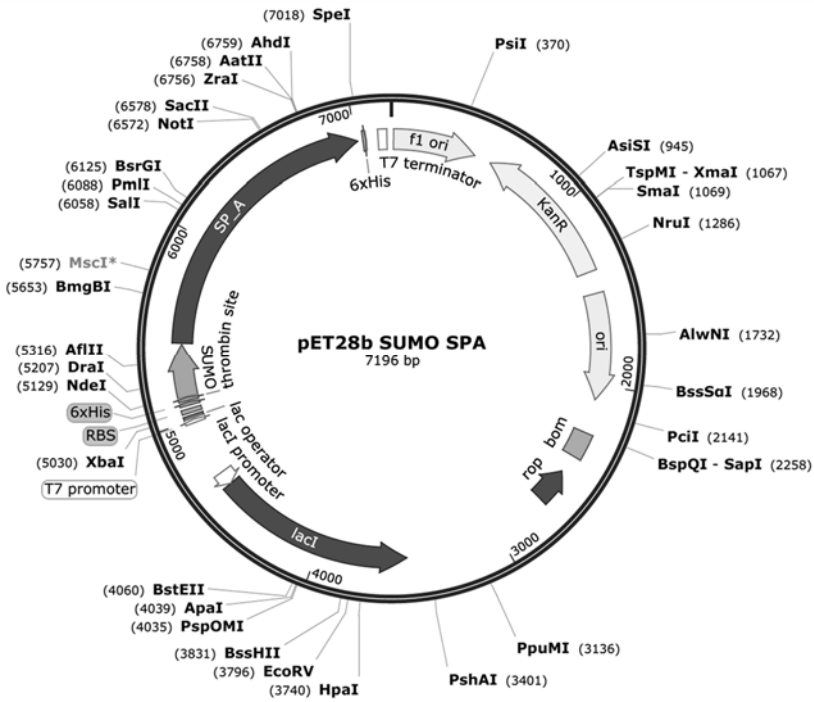


Abbildung 62: pET28b-SUMO Vektor mit SP\_A Gen zur Expression in *E. coli*

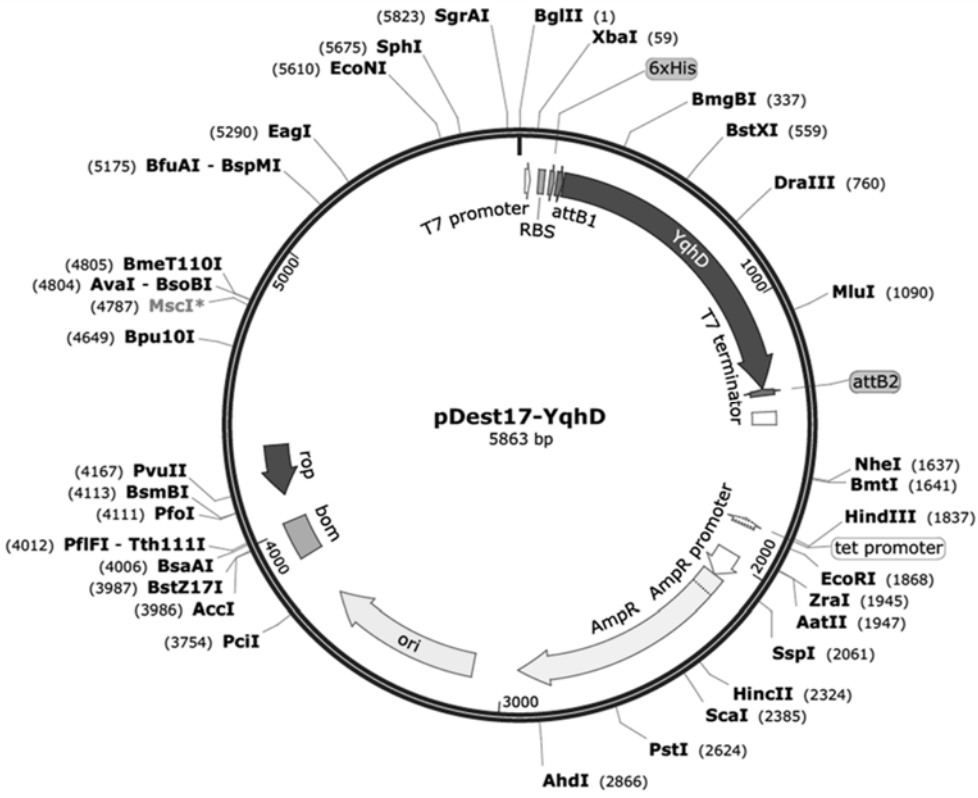


Abbildung 63: pDEST17 Vektor mit der *E. coli* ADH YqhD

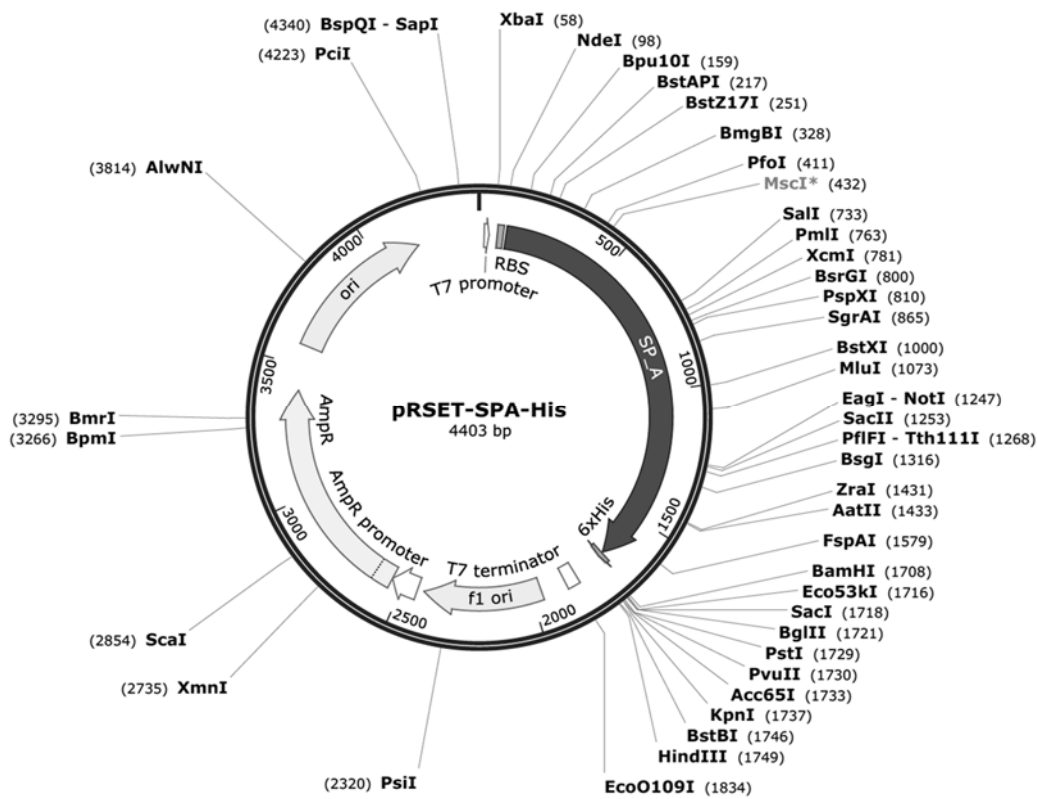


Abbildung 64: pRSET Vektor mit SP\_A und C-terminalem His<sub>6</sub>-tag

## Weitere Informationen zu den Expressionsprodukten der verwendeten Gene

Tabelle 65: Detaillierte Informationen zu Größe, Masse und Ladung der erstellten Expressionsprodukte

<b>Name</b>	<b>Molekulare Masse (Da)</b>	<b>Molekulare Masse +35% (kDa)</b>	<b>Anzahl Aminosäuren</b>	<b>Isoelektrischer Punkt</b>
His6-AF_D	44311	59,82	409	5,11
His6-AZ_A	40169	54,23	361	5,26
His6-PD_A	50073	67,60	443	7,26
His6-DR_A1	30648	41,37	284	7,81
His6-DR_A2	30074	40,60	281	6,23
His6-DR_D	30724	41,48	284	5,61
His6-DR_K	30895	41,71	286	5,52
His6-HP_D	57082	77,06	543	4,13
His6-SP_A	56436	76,19	536	4,61
bgaH	74474	100,54	663	4,53
<b>Mit His6-SUMO-tag</b>				
His6-SUMO-AF_D	56563	76,36	519	5,09
His6-SUMO-AZ_A	52420	70,77	471	5,20
His6-SUMO-SP_A	68687	92,73	646	4,69
His6-SUMO-AF_D	56563	76,36	519	5,09
<b>C-Terminaler His6-tag</b>				
SPA-His6	56087	75,72	534	4,58
<b><i>E. coli</i> ADH</b>				
His6-YqhD	43943	-	403	6,05
<b>ADH/D1 H277A Mutante</b>				
His6-AF_D-H277A	44245	59,73	409	5,07

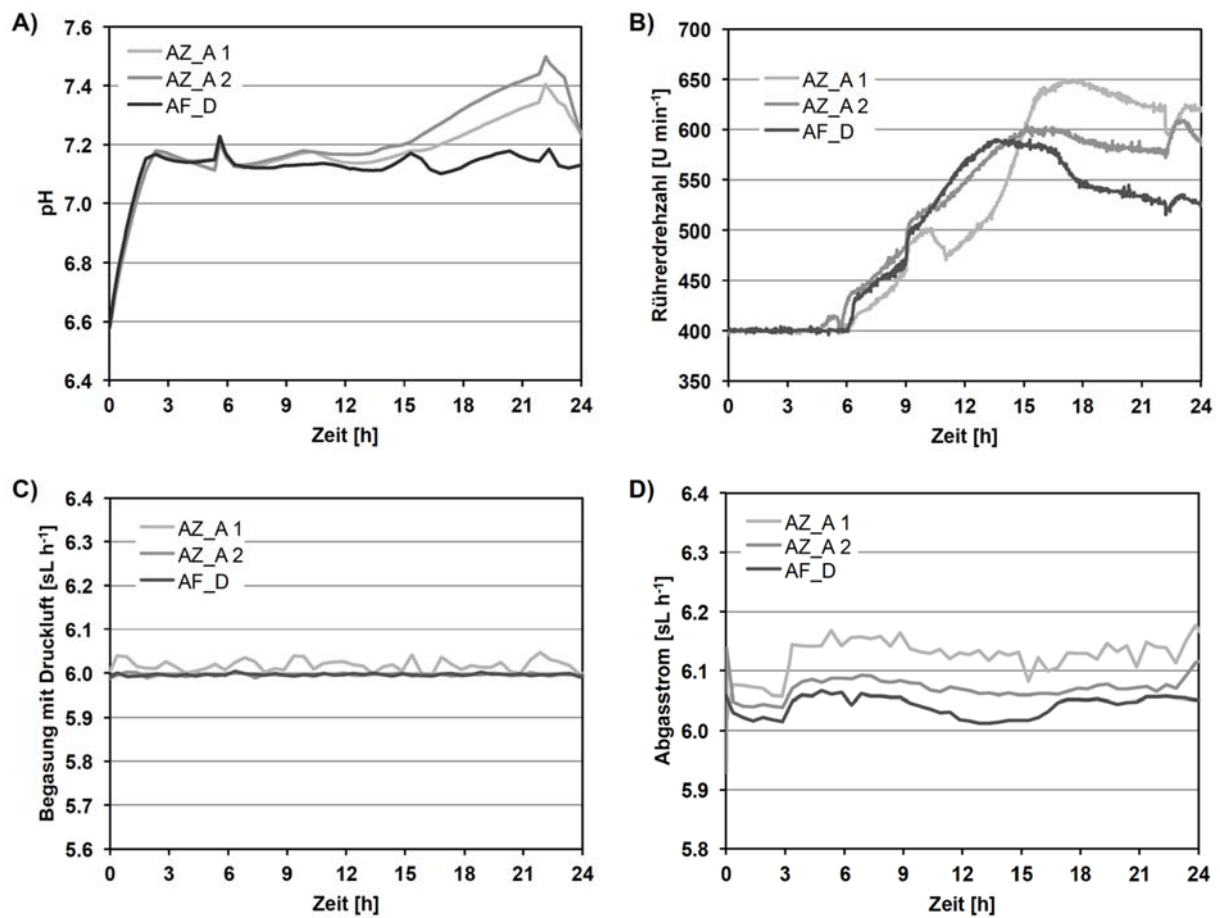
Expression von *Haloferax volcanii* im 2 L Rührkesselreaktor

Abbildung 65: Weitere Parameter zur Anzucht von *Haloferax volcanii* H1895 im 2 L Rührkesselreaktor in 3 parallelen Ansätzen mit Expression der RSBP Gene AZ\_A (2x) und AF\_D. Die E-Achse gibt die Zeit nach dem Animpfen an. A) Veränderung des pH in den Rührkesselreaktoren, B) Rührerdrehzahl zur Kontrolle des Sauerstoffgehalts in Lösung, C) Flußrate der Begasung, D) Flußrate des Abgases



### Weitere Messung zu AF\_D

Im folgenden sind weitere Messungen zur Charakterisierung von AF\_D dargestellt, welche aus Platzgründen nicht im Haupttext erscheinen.

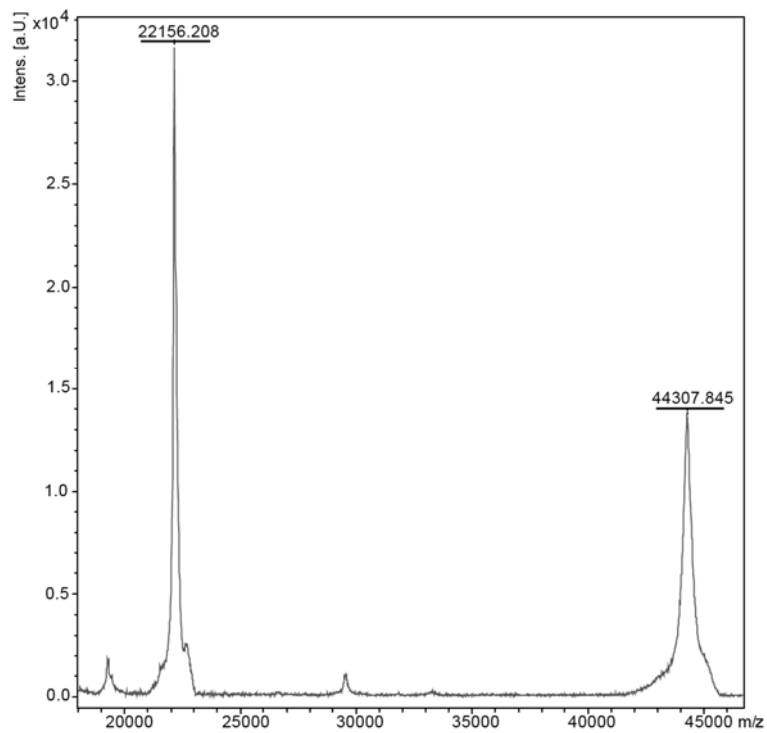


Abbildung 66: Ergebnis MALDI-TOF, AF\_D

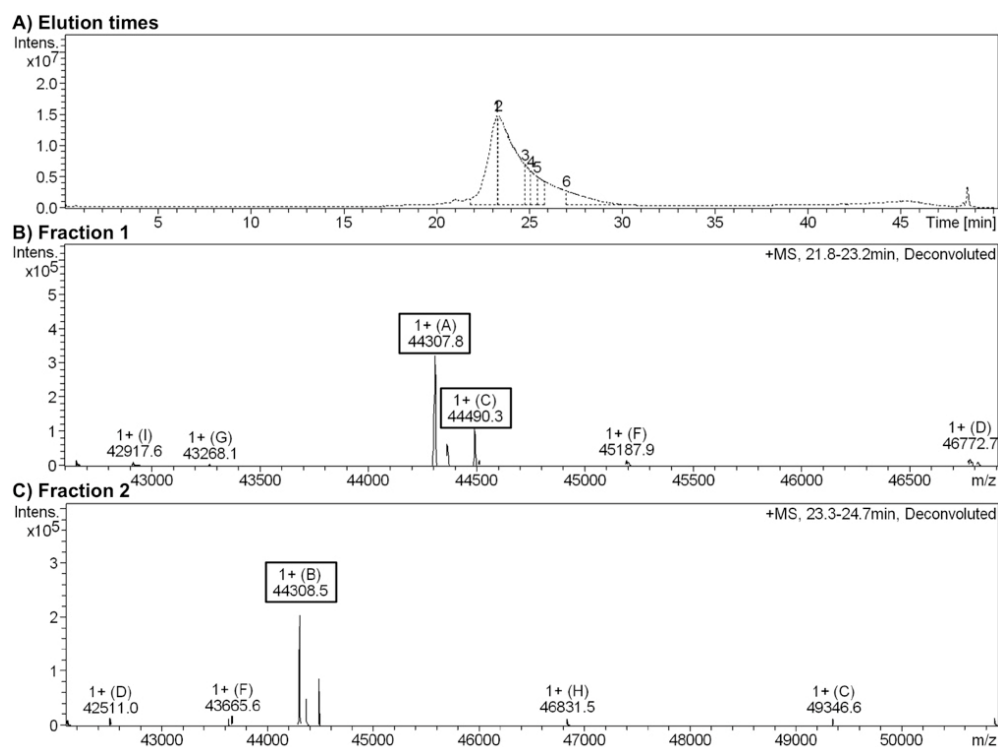


Abbildung 67: LC-ESI/MS Ergebnisse der Massenbestimmung von AF\_D

Tabelle 66: Substratumsatz aller untersuchter Substrate von Mn-ADH/D1 und Zn-ADH/D1

#	Name	Mn <sup>2+</sup> [U mg <sup>-1</sup> ]	Zn <sup>2+</sup> [U mg <sup>-1</sup> ]	Aktivierung durch Mn <sup>2+</sup> [x Fach]
1	Zimtalkohol	1,57 ± 0,09	0,49 ± 0,01	3,2
2	Prenol	1,32 ± 0,03	0,49 ± 0,03	2,7
3	1,5-Pentandiol	0,72 ± 0,05	0,39 ± 0,05	1,8
4	Pentanol	0,69 ± 0,02	0,30 ± 0,04	2,3
5	Perillaalkohol	0,69 ± 0,12	0,31 ± 0,02	2,2
6	Geraniol	0,68 ± 0,01	0,32 ± 0,03	2,1
7	Butanol	0,60 ± 0,02	0,31 ± 0,03	1,9
8	2-Pentyn-1-ol	0,60 ± 0,04	0,18 ± 0,03	3,3
9	Heptanol	0,49 ± 0,04	0,17 ± 0,01	2,9
10	Furfuranol	0,40 ± 0,02	0,27 ± 0,00	1,5
11	Cuminol	0,38 ± 0,03	0,27 ± 0,04	1,4

12	Benzylalkohol	$0,30 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,01$	1,3
13	<i>l</i> ,3-Propandiol	$0,18 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,02$	0,9
14	Propanol	$0,14 \pm 0,00$	$0,15 \pm 0,02$	0,9
<hr/>				
15	Nerol	$0,14 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,02$	1,4
16	Nicotinylalkohol	$0,11 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,02$	1,2
17	Phenylethylalkohol	$0,11 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$	1,8
18	Glycerol	$0,04 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,02$	0,6
19	Ethanol	$0,04 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,00$	0,8
20	Cyclohexanol	$0,04 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$	4,0
<hr/>				
21	Methanol			
22	2-Methyl-2-Propanol			
23	2-Butanol			
24	Sorbitol			
25	<i>l</i> -Phenylethanol			
26	3-Methyl-3-Pentanol		kein Umsatz	
27	2,3-Butandiol			
28	3-Buten-2-ol			
29	3-Octanol			
30	3-Pentanol			
31	Pentaerythritol			

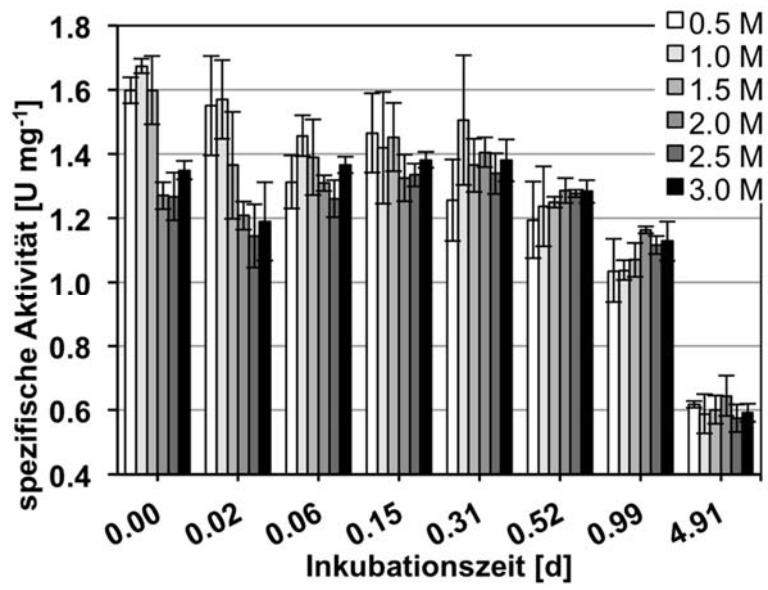


Abbildung 68: Spezifische Aktivität von Mn-ADH/D1 nach Inkubation bei Raumtemperatur für verschiedene Zeiträume unter verschiedenen NaCl-Konzentrationen

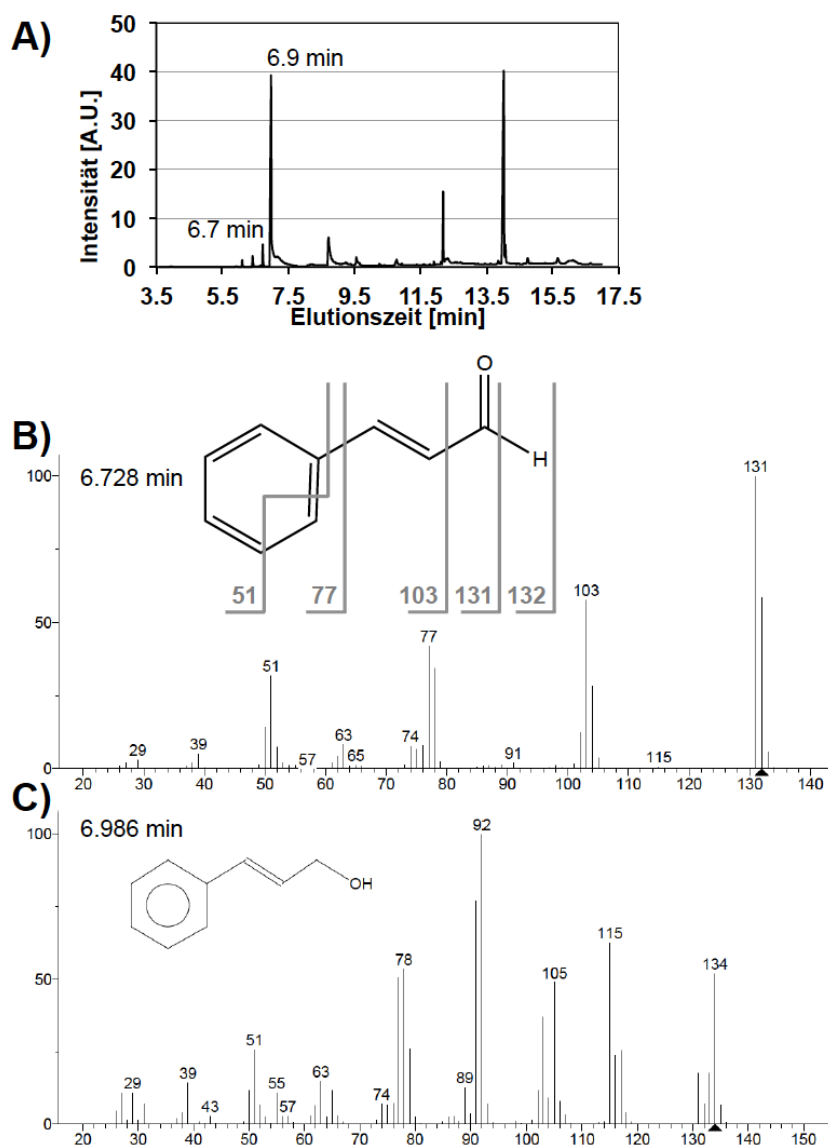


Abbildung 69: Nachweis des Umsatzes von Zimtalkohol zu Zimtaldehyd mittels GC-MS. A) = Elutionsprofil der gaschromatographischen Auftrennung des hydrophobischen Anteils der Reaktionslösung, B) Massenspektrometrische Analyse des Peaks bei 6,728 min, der Zimtaldehyd darstellt und C) Massenspektrometrische Analyse des Peaks bei 6,986 min, welcher Zimtalkohol darstellt

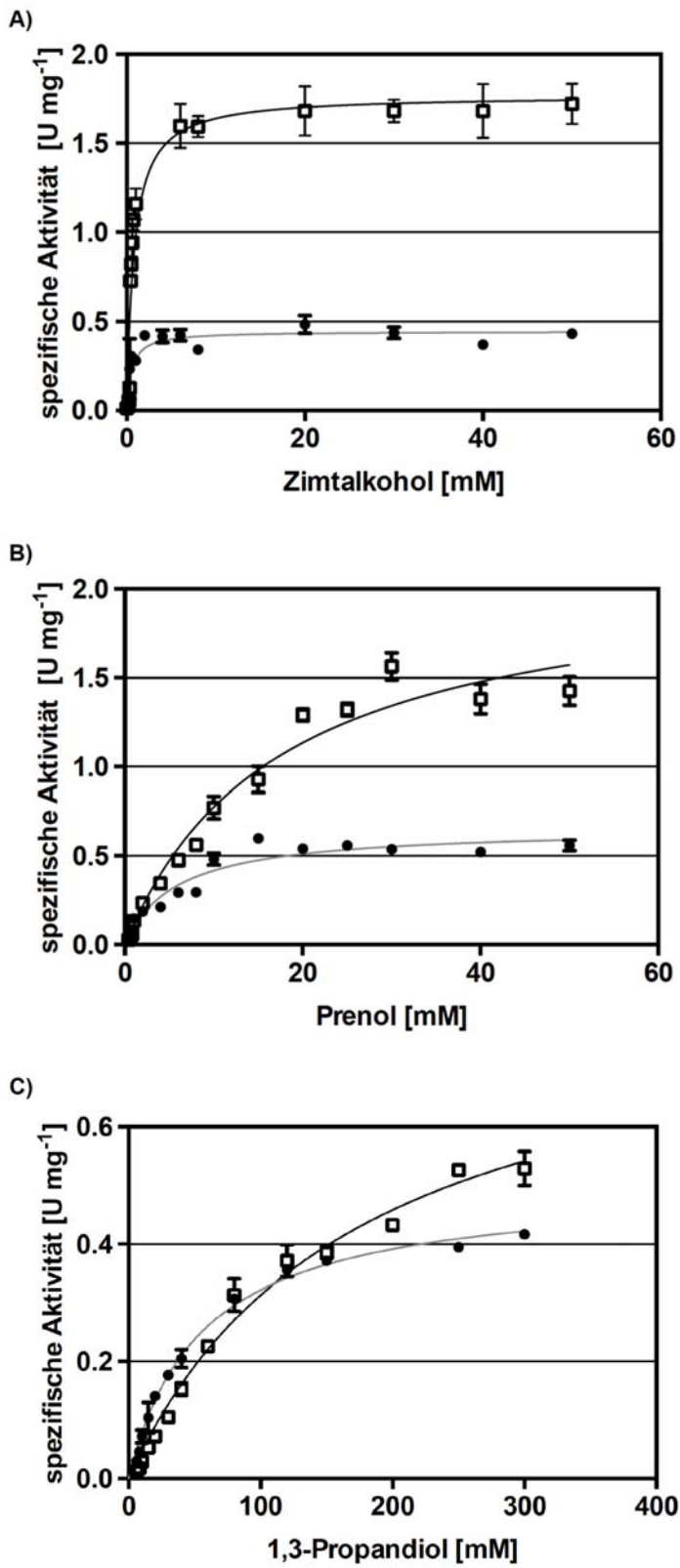


Abbildung 70: Meßkurven zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik Parameter von Mn-ADH/D1 (weiß) und Zn-ADH/D1 (schwarz) mit den 3 Substraten: A) Zimtalkohol, B) Prenol und C) 1,3-Propandiol

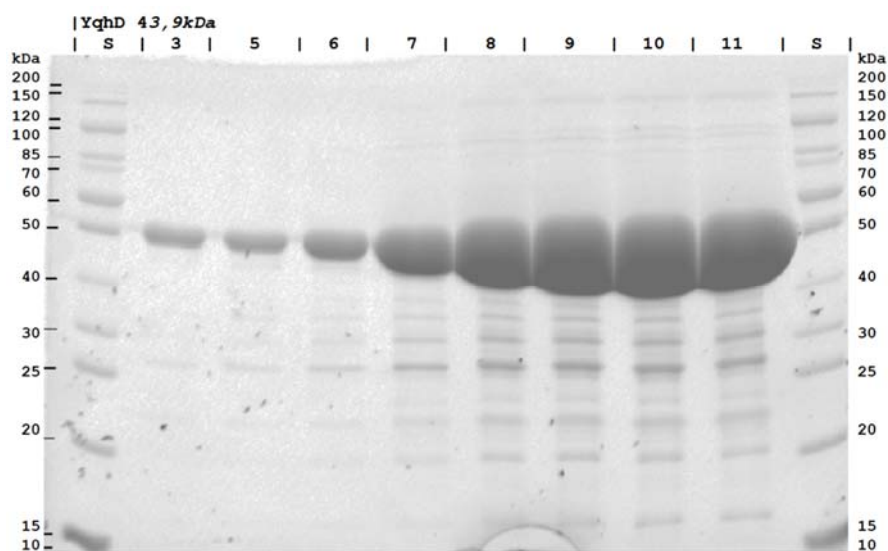


Abbildung 71: SDS-PAGE der Expression von YqhD in *E. coli*, mit einer Ausbeute von 58 mg L<sup>-1</sup> in Schüttelkolben

Tabelle 67: Untersuchte Bedingungen während SAXS zur Analyse des Oligomerisierungszustands von ADH/D1

#	Bedingungen	Konzentration [mg mL <sup>-1</sup> ]	Oligo- merisierung
01	Lagerpuffer	4,5, 9,3, 18,7	
02	Lagerpuffer, Messung bei 60°C	4,6	
03	Lagerpuffer mit 5 mM NADP <sup>+</sup>	7,7, 15,4	
04	EDTA dialysiert in Lagerpuffer mit BME Zugabe	3,0, 15,5	
05	EDTA dialysiert in Lagerpuffer mit BME Zugabe, für 3 h bei 50°C vorinkubiert	4,8	
06	EDTA dialysiert in Lagerpuffer mit 50mM NaCl	8,5	Dimer
07	EDTA dialysiert in Lagerpuffer mit 50mM NaCl, für 3 h bei 50°C vorinkubiert	3,0, 11,0	
08	Aktivitätspuffer	8,6, 17,2	
09	Aktivitätspuffer mit NADP <sup>+</sup>	7,8, 15,5	
10	EDTA dialysiert in Aktivitätspuffer	3,0, 12,6	

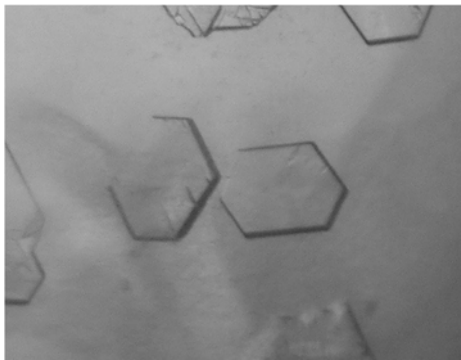


Abbildung 72: Repräsentative hexagonale Mn-ADH/D1 Kristalle

Tabelle 68: Klassifizierung der Ursprungsorganismen der strukturellen Homologe zu ADH/D1

<b>Name</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>
<b>Domäne</b>	Bacteria	Bacteria	Bacteria
<b>Abteilung</b>	Proteobacteria	Proteobacteria	Proteobacteria
<b>Klasse</b>	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Alphaproteobacteria
<b>Ordnung</b>	Enterobacterales	Enterobacterales	Sphingomonadales
<b>Familie</b>	Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae	Sphingomonadaceae
<b>Gattung</b>	Escherichia	Klebsiella	Zymomonas
<b>Spezies</b>	Escherichia coli	Klebsiella pneumoniae	Zymomonas mobilis
<b>Name</b>	<i>Rhizobium sp. MTP</i>	<i>Ralstonia eutropha</i>	<i>Oenococcus oeni</i>
<b>Domäne</b>	Bacteria	Bacteria	Bacteria
<b>Abteilung</b>	Proteobacteria	Proteobacteria	Firmicutes
<b>Klasse</b>	Alphaproteobacteria	Betaproteobacteria	Bacilli
<b>Ordnung</b>	Rhizobiales	Burkholderiales	Lactobacillales
<b>Familie</b>	Rhizobiaceae	Burkholderiaceae	Leuconostocaceae
<b>Gattung</b>	Rhizobium/Agrobacterium Gruppe	Cupriavidus	Oenococcus
<b>Spezies</b>	Rhizobium sp. MTP	Cupriavidus necator	Oenococcus oeni
<b>Name</b>	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>		<i>Thermatoga maritima</i>
<b>Domäne</b>	Bacteria		Bacteria
<b>Abteilung</b>	Firmicutes		Thermatogae



---

<b>Klasse</b>	Bacilli	Thermotogae
<b>Ordnung</b>	Bacillales	Thermotogales
<b>Familie</b>	Bacillaceae	Thermotogaceae
<b>Gattung</b>	Geobacillus	Thermatoga
<b>Spezies</b>	Geobacillus thermoglucosidasius	Thermatoga maritima

---

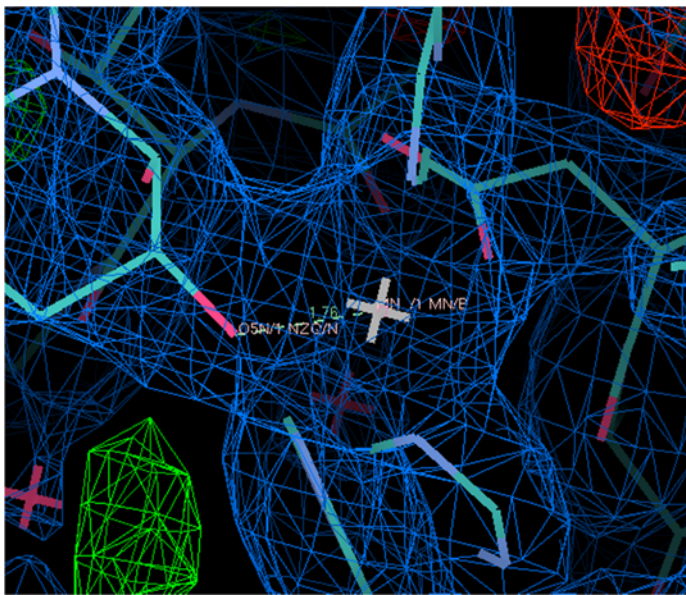


Abbildung 73: Elektronendichtekarte des aktiven Zentrums der Mn-ADH/D1. Auf Position des grauen Kreuzes wurde  $Mn^{2+}$  als aktives Metall gesetzt und es gab weder übrige Elektronendichte (grün) noch benötigte  $Mn^{2+}$  zu viel Elektronendichte (rot)

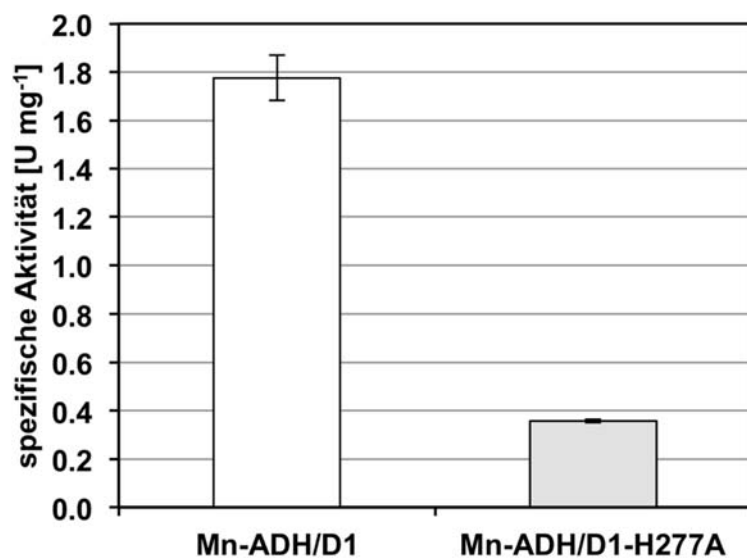


Abbildung 74: Vergleich der Aktivität von Mn-ADH/D1 und der Mutante Mn-ADH/D1 H277A

Tabelle 69: Interaktionen von Mn-ADH/D1 und seinen Homologen zu ihren Kofaktoren

Enzym	Kofaktor	Kontakte
		<i>Wasserstoffbrückenbindungen</i>
Mn-ADH/D1	NZQ	<b>26</b>
<i>Homolog Mittelwert</i>		<i>16 ± 4</i>
3ox4 ( <i>3owo</i> partiell geschlossen)	NAD	11
1rrm	APR	13
3owo ( <i>3ox4</i> offen)	-	-
3bfj	-	-
4fr2	-	-
1vlj [ <i>thermophil</i> ]	NADP	19
1o2d [ <i>thermophil</i> ]	NADP	20
1oj7 ( <i>4qgs</i> offen)	NZQ	19
3zdr [ <i>thermophil</i> ]	-	-
3w5s ( <i>geschlossen</i> )	-	-
3w5s ( <i>offen</i> )	-	-
3jzd	NAD	15
4qgs ( <i>1oj7</i> offen)	-	-
Mn-ADH/D1 ( <i>offen</i> )	NZQ	5

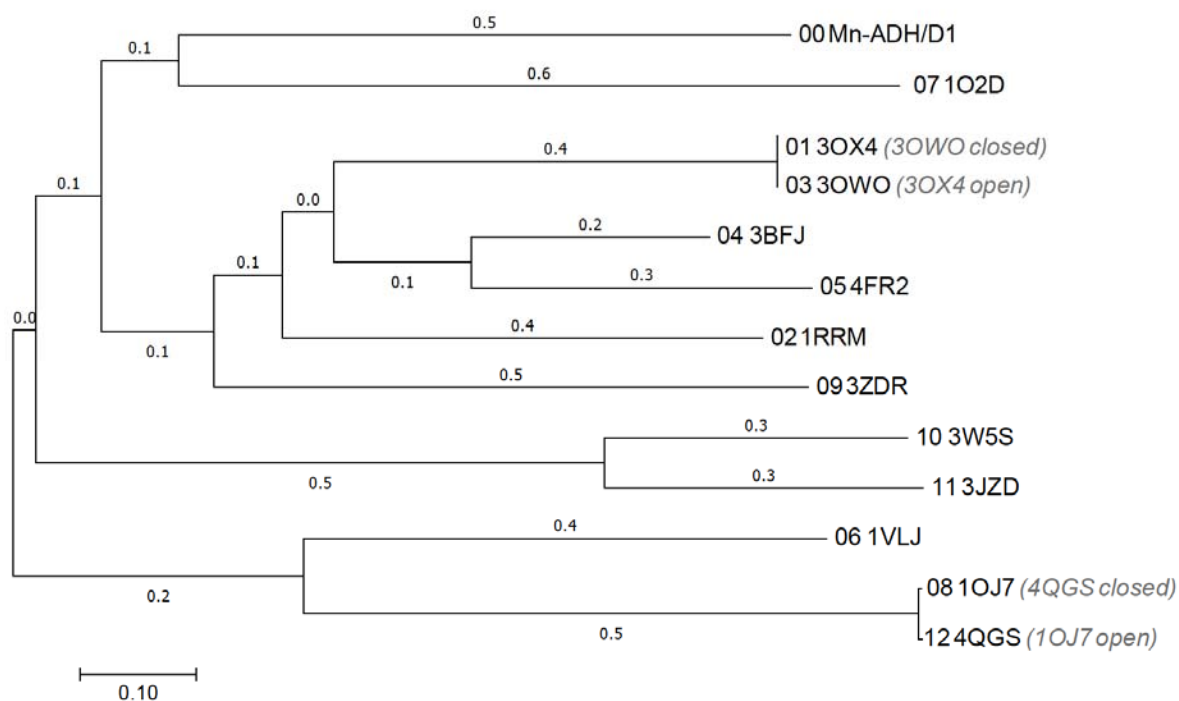


Abbildung 75: Phylogenetischer Stammbaum, der die Verwandtschaft von Mn-ADH/D1 zu seinen Homologen darstellt

Tabelle 70: Ergebnis des Vergleichs der SAXS Daten mit den Vorhersagen für die angegebenen Mn-ADH/D1 Dimer-Konfigurationen, welche mit His<sub>6</sub>-tag modelliert wurden. Zu = Geschlossen

	<b>2x Zu mit NZQ</b>	<b>2x Zu</b>	<b>1x Zu mit NZQ 1x Offen mit NZQ</b>	<b>1x Offen 1x Zu mit NZQ</b>	<b>2x Offen</b>	<b>2x Offen mit NZQ</b>	<b>Bester Chi - Wert</b>
<b>60°C</b>							
1-Zustand	<b>2,38</b> <b>(3,14)</b>	3,57 (4,40)	3,81 (4,54)	3,11 (3,61)	6,00 (9,73)	6,41 (7,44)	(3,14)
2-Zustände		x		x			(2,23)
3-Zustände	x	x			x		(2,12)
<b>10°C</b>							
1-Zustand	3,38 (4,48)	4,63 (7,61)	3,04 (4,78)	<b>2,65</b> <b>(3,11)</b>	5,97 (7,13)	5,40 (6,98)	(3,11)

ANHANG

---

2-Zustände	x				x		(2,76)
------------	---	--	--	--	---	--	--------

3-Zustände	x			x	x		(2,73)
------------	---	--	--	---	---	--	--------

---

**EDTA**

**BME**

1-Zustand	2,48	3,41	2,51	<b>2,17</b>	4,77	4,37	(2,46)
-----------	------	------	------	-------------	------	------	--------

	(3,08)	(4,68)	(3,44)	<b>(2,46)</b>	(6,65)	(5,14)	
--	--------	--------	--------	---------------	--------	--------	--

2-Zustände	x				x		(2,10)
------------	---	--	--	--	---	--	--------

3-Zustände	x	x		x			(2,09)
------------	---	---	--	---	--	--	--------

---

**pH 10**

1-Zustand	1,36	1,52	1,38	<b>1,31</b>	1,56	1,57	(1,58)
-----------	------	------	------	-------------	------	------	--------

	(1,63)	(1,77)	(1,72)	<b>(1,58)</b>	(1,88)	(1,94)	
--	--------	--------	--------	---------------	--------	--------	--

2-Zustände		x		x			(1,76)
------------	--	---	--	---	--	--	--------

3-Zustände		x	x			x	(1,75)
------------	--	---	---	--	--	---	--------

---

**Niedrig**

**Salz**

1-Zustand	15,91	18,97	10,30	<b>10,14</b>	21,25	14,46	(11,62)
-----------	-------	-------	-------	--------------	-------	-------	---------

	(19,31)	(27,33)	(12,32)	<b>(11,62)</b>	(25,10)	(15,56)	
--	---------	---------	---------	----------------	---------	---------	--

2-Zustände	x			x			(12,08)
------------	---	--	--	---	--	--	---------

3-Zustände	x			x		x	(11,98)
------------	---	--	--	---	--	---	---------

---

**Hochsalz**

1-Zustand	<b>4,03</b>	6,21	12,56	9,66	14,93	19,08	(6,32)
-----------	-------------	------	-------	------	-------	-------	--------

	<b>(6,32)</b>	(6,88)	(14,51)	(13,01)	(27,22)	(22,13)	
--	---------------	--------	---------	---------	---------	---------	--

2-Zustände	x	x					(5,36)
------------	---	---	--	--	--	--	--------

3-Zustände							-
------------	--	--	--	--	--	--	---

---

Tabelle 71: Verteilung der Oberflächen exponierten Aminosäuren von ADH/D1 und seinen Homologen. Deutliche Unterschiede sind fett hervorgehoben. Zu = geschlossen

	<b>Mn-ADH/D1</b>	<b>Average</b>	<b>3ox401</b>	<b>Trm</b>	<b>3bjq4</b>	<b>4tr205</b>	<b>1vlj06</b>	<b>1o2d07</b>	<b>1oj708</b>	<b>3zdr09</b>	<b>3v5s1</b>	<b>3zjfd11</b>
			<i>3owo[β] zu</i>				<i>thermophil</i>	<i>thermophil</i>	<i>4qgs[12] zu</i>	<i>thermophil</i>		
<b>AS Anzahl</b>	457	449 ± 20	460	459	453	473	436	414	467	464	427	435
<b>pI</b>	<b>4,74</b>	<b>6,45 ± 1,38</b>	5,81	5,26	6,24	5,25	<b>9,08</b>	6,09	6,11	8,89	5,69	6,06
<b>Aminosäure</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Ala [A]	<b>2,8</b>	<b>8,6 ± 4,2</b>	10,9	10,5	8,2	6,3	6,2	1,9	7,5	4,7	14,3	15,6
Cys [C]	0,4	0,3 ± 0,3	0,7	0,9	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,5	0,0
Asp [D]	10,3	7,7 ± 1,4	8,9	9,2	7,7	8,9	6,0	8,2	8,1	8,2	5,2	6,4
Glu [E]	<b>15,3</b>	<b>9,4 ± 2,9</b>	6,1	8,3	7,5	9,3	14,0	15,0	8,1	9,9	8,2	7,8
Phe [F]	1,3	2,1 ± 1,1	2,4	1,7	3,1	2,7	2,3	1,9	0,9	4,3	0,7	1,4
Gly [G]	9,2	9,4 ± 2,4	9,8	12,2	8,8	8,2	10,1	7,5	10,3	4,3	11,9	11,3
His [H]	2,4	2,8 ± 0,8	2,6	2,2	2,6	3,4	2,3	2,4	4,5	3,4	1,6	2,5
Ile [I]	4,6	3,0 ± 1,0	1,7	2,8	3,1	4,9	3,7	3,9	3,2	2,6	1,4	2,3
Lys [K]	<b>11,8</b>	<b>9,3 ± 5,3</b>	10,4	6,5	6,6	11,0	<b>17,4</b>	<b>15,5</b>	7,7	<b>13,8</b>	2,8	1,4
Leu [L]	4,8	6,6 ± 1,8	8,3	4,8	9,7	7,6	3,7	5,8	7,1	5,0	7,5	6,7
Met [M]	1,3	2,2 ± 0,8	3,0	2,0	2,4	1,7	1,4	1,0	2,1	3,9	2,6	2,3
Asn [N]	3,9	4,3 ± 1,9	6,1	4,4	5,5	6,3	3,9	4,8	6,2	2,8	1,2	1,8
Pro [P]	6,1	6,0 ± 1,8	4,6	5,9	5,1	4,9	4,6	4,3	5,6	6,5	9,4	9,0
Gln [Q]	<b>0,4</b>	<b>3,2 ± 1,6</b>	2,6	2,2	4,4	3,0	<b>1,4</b>	<b>0,5</b>	5,4	5,6	3,0	3,7

ANHANG

Arg [R]	4,6	6,4 ± 2,7	2,6	7,4	7,5	2,5	5,0	6,3	6,4	6,0	8,9	11,5
Ser [S]	6,3	4,4 ± 1,1	5,2	3,5	2,9	4,4	3,9	6,8	3,6	4,7	4,4	4,8
Thr [T]	6,1	5,5 ± 1,3	6,1	5,2	6,6	5,9	2,8	5,6	6,2	4,5	7,5	4,8
Val [V]	3,7	4,9 ± 1,3	5,9	7,0	4,2	5,1	6,0	3,1	3,4	4,1	6,1	3,9
Trp [W]	1,3	0,7 ± 0,6	0,0	1,7	0,4	0,4	1,6	0,7	0,9	0,4	0,5	0,5
Tyr [Y]	3,1	3,1 ± 1,1	2,2	1,7	3,1	3,4	3,9	4,8	2,8	4,7	2,3	2,3
- geladen												
(D, E)	<b>25,6</b>	<b>17,0 ± 3,1</b>	15,0	17,4	15,2	18,2	<b>20,0</b>	<b>23,3</b>	16,3	<b>18,1</b>	13,3	13,3
+ geladen												
(R, K)	<b>16,4</b>	<b>15,6 ± 4,1</b>	13,0	13,9	14,1	13,5	<b>22,5</b>	<b>21,8</b>	14,1	<b>19,8</b>	11,7	11,7
hydrophob												
(F, I, L)	10,7	<b>11,7 ± 3,9</b>	12,4	9,4	15,9	15,2	9,6	11,6	11,1	11,9	9,6	10,3

Tabelle 72: Verteilung der Aminosäuren von ADH/DI sowie seinen Homologen. Zu = geschlossen

	Mn-ADH/DI	Average	3ox401 3owo[3] zu	1rrm	3bfg4	4tr205	1vlj06 thermophil	1o2d07 thermophil	1oj708 4qgs[12] zu	3zdr09 thermophil	3wz51	3jzd11
AS Anzahl	400	385 ± 20	383	386	387	392	395	360	399	424	362	358
pI	4,84	6,03 ± 0,89	5,49	5,04	5,94	5,29	6,70	5,79	5,87	8,21	5,87	6,08
Aminosäure	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Ala [A]	9,3	12,4 ± 3,6	14,6	13,5	13,7	10,7	9,4	6,4	10,8	10,6	16,0	18,7

Cys [C]	0,3	0,8 ± 0,5	1,6	1,0	1,0	0,8	0,3	0,6	0,3	0,5	1,1	1,4
Asp [D]	6,8	5,3 ± 1,1	6,3	6,7	5,4	6,1	4,3	5,3	5,8	5,4	3,3	4,2
Glu [E]	9,5	6,4 ± 1,6	4,4	5,7	4,9	6,9	9,1	9,4	6,0	5,9	6,1	5,9
Phe [F]	2,3	3,0 ± 1,1	2,9	2,3	3,1	3,1	3,5	4,2	2,8	5,0	1,4	1,4
Gly [G]	8,8	8,7 ± 1,6	8,4	10,6	8,3	8,2	9,4	7,8	8,8	5,2	10,8	9,8
His [H]	2,8	2,5 ± 0,5	2,3	2,3	2,6	2,6	1,8	1,9	3,5	2,8	2,5	2,8
Ile [I]	7,5	5,7 ± 1,5	4,7	6,7	6,5	6,9	8,6	4,7	5,5	5,7	3,6	4,5
Lys [K]	7,0	5,8 ± 2,9	6,5	4,1	4,1	7,1	9,9	9,2	5,5	8,0	1,9	1,4
Leu [L]	6,8	9,1 ± 1,5	9,7	7,3	9,6	8,4	7,1	10,0	10,8	7,5	11,6	9,5
Met [M]	2,5	3,2 ± 0,9	4,4	3,4	3,4	3,6	2,0	3,3	2,0	4,7	3,0	2,2
Asn [N]	3,0	3,8 ± 1,6	5,5	3,9	5,9	5,9	3,8	3,1	4,0	3,1	1,1	2,0
Pro [P]	5,3	5,1 ± 1,0	4,2	4,9	4,7	4,8	3,8	4,7	4,8	6,1	6,6	6,4
Gln [Q]	0,5	2,1 ± 0,9	1,8	1,8	2,6	2,3	1,3	0,3	3,5	3,1	2,2	2,2
Arg [R]	3,0	4,1 ± 1,6	1,8	4,4	4,7	2,6	3,3	3,9	4,0	3,8	5,8	7,3
Ser [S]	7,3	4,5 ± 1,2	5,5	2,3	3,4	4,8	5,1	6,4	3,5	4,7	4,7	4,5
Thr [T]	7,0	5,7 ± 1,0	5,2	6,0	5,7	5,6	3,5	6,4	7,0	5,2	7,2	5,6
Val [V]	7,3	7,9 ± 0,8	7,8	9,3	7,2	6,9	9,1	8,3	7,5	7,5	7,7	7,0
Trp [W]	0,8	0,7 ± 0,5	0,0	1,0	0,3	0,3	1,5	0,8	1,3	0,5	0,6	0,6
Tyr [Y]	2,8	3,0 ± 0,7	2,3	2,6	3,1	2,6	3,3	3,3	2,8	4,7	2,8	2,8
- geladen	16,3	11,7 ± 2,7	10,7	12,4	10,3	13,0	13,4	14,7	11,8	11,3	9,4	10,1





ANHANG

1vlj [ <i>thermophil</i> ]	337	24	<b>2625</b>	101	22	39,0	21	9	230	37	7	-0,1
1o2d [ <i>thermophil</i> ]	323	24	2418	62	15	11,0	8	0	132	22	7	0,0
1oj7 (4qgs geschlossen)	329	26	2352	74	13	39,7	27	5	<b>240</b>	<b>45</b>	15	<b>4,1</b>
3zdr [ <i>thermophil</i> ]	272	27	2518	<b>102</b>	<b>40</b>	56,2	12	6	<b>240</b>	34	0	0,0
3w5s	301	11	1802	43	15	19,7	20	2	199	38	6	2,1
3w5s ( <i>offen</i> )	298	15	1786	45	21	24,0			231	34	-6	-2,2
3jzd	309	13	1710	40	25	20,8	16	9	231	34	-6	0,6
4qgs (1oj7 <i>offen</i> )	303	35	2221	84	23	29,4	23	4	222	30	<b>16</b>	0,0
Mn-ADH/D1 ( <i>offen</i> )	335	<b>40</b>	1741	40	6	7,2	7	7	-140	16	5	0

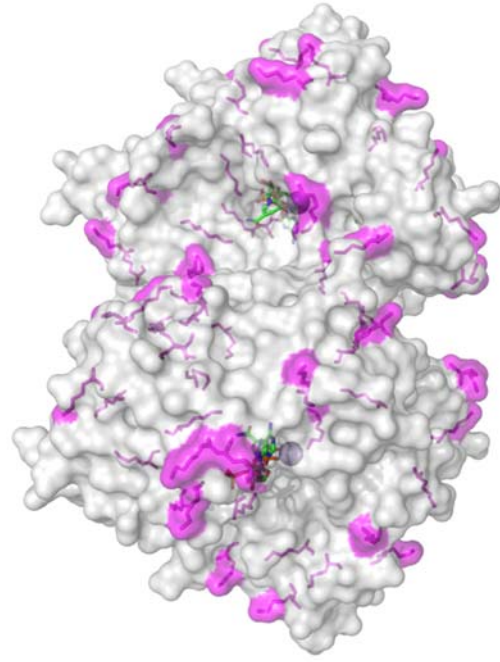


Abbildung 76: Verteilung und Orientierung der Lysin-Reste (Magenta) im ADH/D1 Dimer. Es ist deutlich ersichtlich, daß ein Großteil der Lysine oberflächenexponiert ist

Tabelle 74: Sekundärstrukturgehalt von Mn-ADH/D1 sowie seinen Homologen. M = Monomer, D = Dimer

Enzym	$\alpha$ Helix		$\beta$ Faltblatt		Kehre		Windung		3-10 Helix	
	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D
Mn-ADH/D1	56,3	56,3	11,2	12,7	<b>5,0</b>	<b>5,0</b>	25,6	24,1	2,0	2,0
<i>Homolog Durchschnitt</i>	52,7	52,9	12,6	13,7	8,5	8,5	24,1	23,0	2,2	2,0
	$\pm 2,2$	$\pm 2,1$	$\pm 1,6$	$\pm 1,7$	$\pm 1,8$	$\pm 1,5$	$\pm 3,2$	$\pm 3,2$	$\pm 1,9$	$\pm 1,6$
3ox4 (3owo teilweise geschlossen)	52,9	54,3	13,6	14,9	8,1	8,0	24,3	21,6	1,0	1,2
1rrm	53,8	54,0	13,0	14,3	10,6	<b>10,7</b>	21,6	20,0	1,0	1,0
3owo (3ox4 offen)	53,7	53,9	13,6	14,9	7,9	8,0	22,8	21,6	2,1	1,6
3bfj	52,1	52,2	13,1	14,1	9,9	8,9	24,9	24,2	0,0	0,5
4fr2	50,4	50,4	10,7	11,7	9,4	9,4	27,4	26,4	2,1	2,1
1vlj [ <i>thermophil</i> ]	50,5	51,0	12,6	13,3	5,5	7,0	26,9	25,8	4,5	2,9
1o2d [ <i>thermophil</i> ]	53,1	53,1	13,7	14,5	6,1	6,1	21,2	21,3	<b>5,9</b>	<b>5,0</b>
1oj7 (4qgs geschlossen)	50,8	50,5	<b>14,9</b>	<b>15,3</b>	9,5	9,1	22,6	22,3	2,3	2,8
3zdr [ <i>thermophil</i> ]	50,6	50,6	8,7	9,7	6,9	6,9	<b>30,3</b>	29,3	3,5	3,5
3w5s	<b>57,4</b>		13,7		9,1		19,7		0,0	
3w5s (offen)	55,4	<b>57,0</b>	12,6	14,9	11,4	9,7	20,6	18,4	0,0	0,0
3jzd	55,6	55,4	13,3	14,4	10,2	<b>10,7</b>	20,9	19,5	0,0	0,0
4qgs (1oj7 offen)	52,1	52,1	11,3	12,1	7,4	7,4	25,8	25,0	3,4	3,4
Mn-ADH/D1 (offen)	45	44,9	9,2	9,5	<b>13,0</b>	9,5	29,5	<b>33,6</b>	3,2	2,5