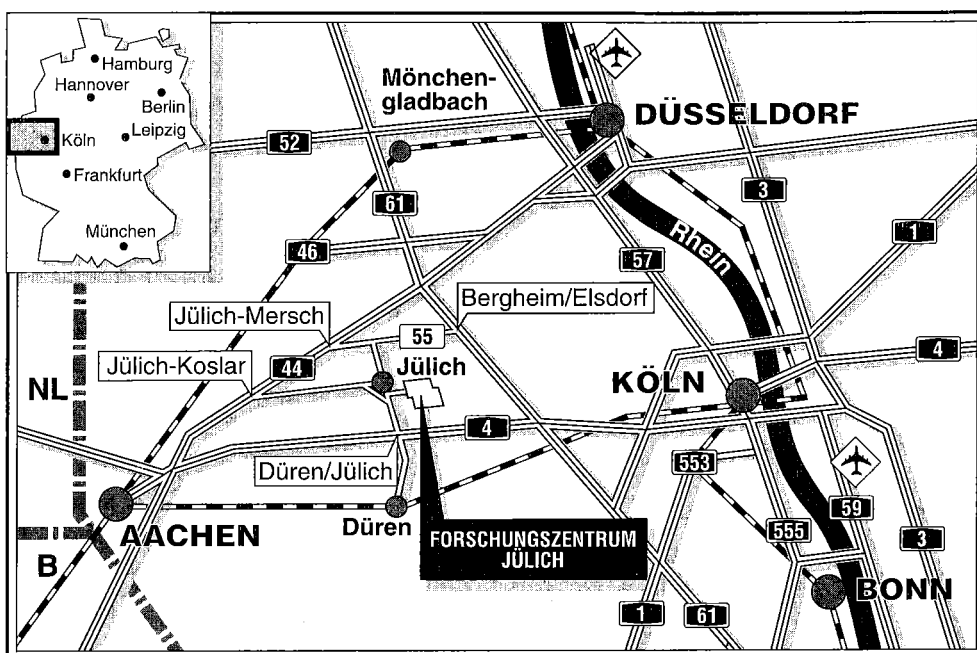


Institut für Biotechnologie

**Molekulargenetische Untersuchungen
der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase
aus *Zymomonas mobilis***

Thomas Wiegert



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3149

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3149

D61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon : 02461/61-61 02 · Telefax : 02461/61-61 03 · Telex : 833 556-70 kfa d

**Molekulargenetische Untersuchungen
der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase
aus *Zymomonas mobilis***

Thomas Wiegert

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	
1. Chemikalien und Enzyme	9
2. Bakterienstämme, Plasmide, Phagen und Oligonukleotide	10
3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	15
4. Molekulargenetische Methoden	17
4.1 Allgemeine genetische und rekombinante DNA Techniken	17
4.2 Oligonukleotidsynthese	19
4.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase Kettenreaktion	19
4.4 DNA-Sequenzierung nach Sanger	21
4.5 TnPhoA-Mutagenese	21
4.6 Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese	21
5. Bestimmung von Enzymaktivitäten	23
5.1 Herstellung zellfreier Rohextrakte	23
5.2 Bestimmung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Aktivität	23
5.3 Bestimmung der Glukonolactonaseaktivität	25
6. Proteinchemische Methoden	25
6.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	25
6.2 'Western-Blot'	25
6.3 Saure kathodische Elektrophorese	26
6.4 Lokalisierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in <i>E. coli</i> durch Trypsinverdaus	26
6.5 Reinigung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	27
6.6 Bestimmung der carboxyterminalen Aminosäure der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	28
6.7 Anreicherung der Glukonolactonase aus <i>Rhodotorula rubra</i>	28
7. <i>In vivo</i> ³⁵ S-Methionin Markierung und Immunfällung	29
8. Denaturierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase und Fluoreszenzspektroskopie	30

III. Ergebnisse	32
1. Untersuchungen zur physiologischen Funktion der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	32
1.1 Charakterisierung des <i>Z. mobilis</i> Stammes ACM3963	32
1.2 Wachstum der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase-Defektmutante <i>Z. mobilis</i> ACM3963 bei hohen Zuckerkonzentrationen	33
1.3 Auswirkung einer cytoplasmatischen Lokalisierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase auf das Wachstum bei hohen Zuckerkonzentrationen	39
2. Expression des Gens der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in <i>E. coli</i> und <i>Z. mobilis</i>	40
3. Untersuchungen zum Export der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in <i>Z. mobilis</i>	44
3.1 Nachweis der Prozessierung und Untersuchungen zum Exportweg der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in <i>Z. mobilis</i>	44
3.2 Charakterisierung von Deletionsmutanten der Signalsequenz der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	45
3.3 Reinigung und Charakterisierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Deletionsmutante $\Delta 32-46$	48
3.4 Untersuchungen zum Export eines Fusionsproteins aus reifer Glukose-Fruktose Oxidoreduktase und Signalsequenz der Glukonolactonase in <i>Z. mobilis</i>	49
4. Untersuchungen zum Export der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in <i>E. coli</i>	53
4.1 Untersuchungen zur Prozessierung und Lokalisierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in <i>E. coli</i>	53
4.2 Untersuchungen zur Funktionalität der Signalsequenz der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in <i>E. coli</i> durch Fusionen mit der alkalischen Phosphatase aus <i>E. coli</i>	55
4.3 Untersuchungen zum Export von Signalsequenz-Austauschmutanten der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in <i>E. coli</i>	57
5. Untersuchungen zur NADP-Bindestelle der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	59
5.1 Denaturierungsexperimente und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Kofaktorbindung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	60
5.2 Analyse der Sekundärstruktur der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	61
5.3 Mutationen in der möglichen Region der NADP-Bindestelle der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	63
5.4 Mutationen in einer konservierten Region der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	65
5.5 Reinigung und Charakterisierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Mutanten GFOR-E180Q und GFOR-C179S	68

IV. Diskussion	71
1. Physiologische Funktion der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	71
2. Export der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	72
3. Charakterisierung der NADP-Bindestelle der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	78
V. Zusammenfassung	85
VI. Literaturverzeichnis	87

Abkürzungen

Abb.	Abbildung	MES	2-(N-Morpholino)ethan-sulfonsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	min	Minuten
bla	Gen der β -Lactamase	NADP(H)	Nikotinamidadenindinukleotid-phosphat
bp	Basenpaare	NAD(H)	Nikotinamidadenindinukleotid
BSA	Rinderserumalbumin	OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen	<i>ompA</i>	Gen des äußeren Membranproteins OmpA
CCCP	Carboxylcyanid-m-chlorophenylhydrazon	Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CM	Carboxymethyl	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DEAE	Diethylaminoethyl	PhoA	alkalische Phosphatase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>phoA</i>	Gen der alkalischen Phosphatase
E	Extinktion	PräGFOR	Vorstufenprotein der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SDS	Natriumdodecylsulfat
g	Erdbeschleunigung	spez.	spezifisch
<i>gfo</i>	Gen der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	Tab.	Tabelle
GFOR	Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	<i>tet</i>	Tetrazyklinresistenzgen
<i>gnl</i>	Gen der Glukonolactonase	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
GNL	Glukonolactonase	U	Unit, Enzymeinheit
h	Stunde	Upm	Umdrehungen pro Minute
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure	UV	Ultraviolett
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	V	Volt
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	WT	Wildtyp
kb	Kilobasen	X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-Galactosid
kDa	Kilodalton	X-Phosphat	5-Bromo-4-Chloro-3-Indloyl-Phosphat
K _M	Michaelis-Menten Konstante		

Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren:

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	R	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutaminsäure	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

I. Einleitung

Das Gram-negative Bakterium *Zymomonas mobilis* wurde zu Beginn dieses Jahrhunderts aus verdorbenem Apfelmost und gärendem Agavensaft isoliert. Seitdem wurde es in vielen zuckerhaltigen Pflanzensäften und in reifendem Honig nachgewiesen (Swings & DeLey, 1977).

Z. mobilis verwertet als einzige Kohlenstoffquellen Glukose, Fruktose oder Saccharose. Der Abbau verläuft ausschließlich fermentativ über den Entner-Doudoroff-Weg und die Pyruvat-decarboxylase und Alkohol-Dehydrogenasen zu Ethanol und CO₂ (Entner & Doudoroff, 1952; Gibbs & deMoss, 1951; Kersters & DeLey, 1968). Aus einem Mol Glukose entstehen dabei nahezu stöchiometrisch zwei Mol Ethanol (Abb.1). Da wegen der geringen Energieausbeute dieses katabolen Abbauweges von einem Mol ATP pro Mol Glukose eine geringe Biomassebildung erfolgt (Sahm et al., 1992), zeigt *Z. mobilis* im Vergleich zur alkoholischen Gärung mit *Saccharomyces cerevisiae* den Vorteil einer um 5 % erhöhten Ethanolausbeute. Die Ethanolbildungsrate ist im Vergleich zur Hefe sechs bis siebenfach gesteigert. *Z. mobilis* toleriert bis zu 13 % Ethanol und einige Stämme wachsen noch mit 40 % Glukose im Medium (Swings & DeLey, 1977; Rogers et al., 1982; Buchholz et al., 1987).

Die Ethanolproduktion mit *Z. mobilis* ist zu den traditionellen Methoden mit Hefe jedoch nur mit Glukose als Substrat konkurrenzfähig. Beim Einsatz preiswerter saccharosehaltiger Substrate wie Melasse oder Zuckerrohrsirup kommt es zu einer unerwünschten Nebenproduktbildung, die den Ethanolertrag herabsetzt. Diese Nebenprodukte sind Levan, ein Fruktosepolymer, das bei der Spaltung der Saccharose durch die extrazelluläre Levansucrase entsteht, Oligosaccharide und hauptsächlich Sorbit (Viikari, 1988; Johns et al., 1992; Doelle et al., 1993). Sorbit wird von *Z. mobilis* in einer Menge von bis zu 11 % der Ausgangssubstrate bei Wachstum auf Saccharose oder Gemischen aus Glukose und Fruktose produziert und nicht weiter verstoffwechselt. Die gebildete Sorbitkonzentration ist dabei proportional zur eingesetzten Zuckerkonzentration (Barraow et al., 1984; Leigh et al., 1984; Viikari, 1984). Sorbit entsteht aus der Reduktion von Fruktose in einer Reaktion, die durch die Glukose-Fruktose Oxidoreduktase katalysiert wird (Zachariou & Scopes, 1986).

In den letzten fünfzehn Jahren wurde der katabole Stoffwechsel von *Z. mobilis* intensiv untersucht, da das Bakterium wegen seiner Ethanolbildungseigenschaften ein großes biotechnologisches Anwendungspotential aufweist. (Rogers et al., 1982; Bringer et al. 1984b, Sahm et al., 1992). Seitdem wurden alle am Zuckerabbau beteiligten Enzyme umfassend charakterisiert und es wurde versucht, den Stoffwechsel von *Z. mobilis* zur Erweiterung des Substrat- und Produktspektrums durch Einbringung heterologer Gene gezielt umzulenken (Sprenger, 1993; Gunasekaran et al., 1994). Mit den daraus gewonnenen Kenntnissen der Genetik dieses Bakteriums ist *Z. mobilis* jedoch auch ein attraktives Modellsystem zur Klärung grundlagenorientierter Fragestellungen (Sprenger et al., 1993). Ein interessantes Untersuchungsobjekt von *Z. mobilis* ist, nicht nur wegen der biotechnologischen Anwendungsmöglichkeiten, die Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR, EC 1.1.99.-). Dieses Enzym ist hinsichtlich der katalytischen Eigenschaften, der Kofaktorbindung und der Lokalisation ungewöhnlich und es wurde bislang

kein vergleichbares Enzym bei anderen Organismen nachgewiesen. Untersuchungen an diesem Enzym können zum grundlegenden Verständnis des Protein-/Kofaktor Exports und der Protein-Kofaktor Wechselwirkung beitragen und damit neue biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten eröffnen.

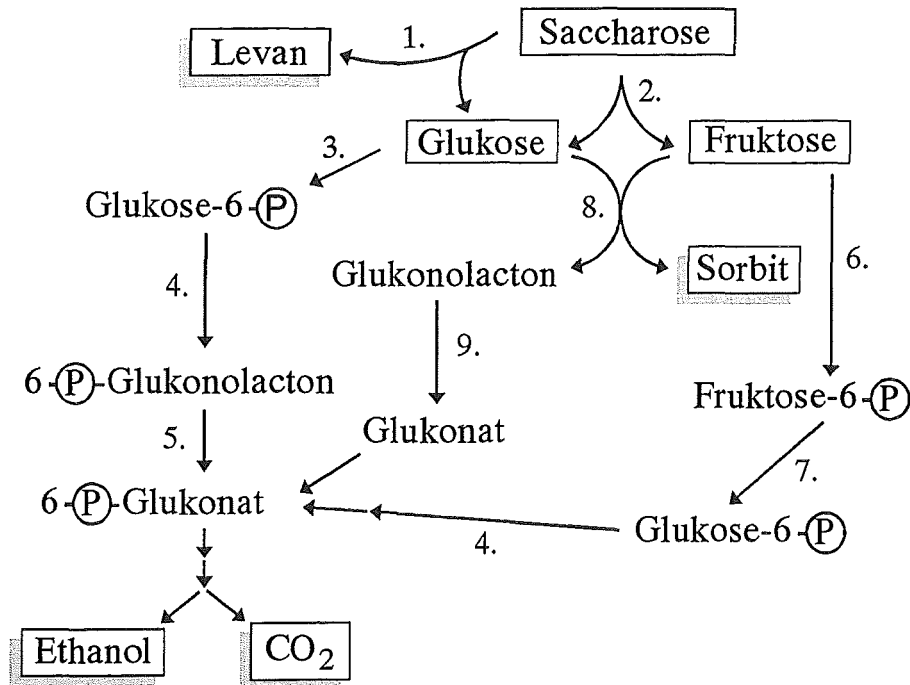


Abb. 1: Vereinfachtes Schema zum katabolen Stoffwechsel von *Z. mobilis*. 1: Levansucrase; 2. Invertase; 3. Glukokinase; 4. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase; 5. 6-Phospho-Glukonolactonase; 6. Fruktokinase; 7. Glukose-6-Phosphat-Isomerase, 8. Glukose-Fruktose Oxidoreduktase; 9. Glukonolactonase.

Eigenschaften und biotechnologische Anwendung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Die periplasmatische GFOR oxidiert Glukose zu Glukonolacton und reduziert Fruktose zu Sorbit in einem 'ping-pong' Mechanismus mit fest gebundenem NADP als Redoxvermittler (Abb. 2). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist die Abdissoziation des Glukonolactons vom Enzym. Unter physiologischen Bedingungen ist die Reaktion irreversibel, da das gebildete Glukonolacton durch eine spezielle Glukonolactonase unter Bildung von Glukonsäure dem Reaktionsgleichgewicht entzogen wird (Zachariou & Scopes, 1986) (Abb. 1). Die Affinität der GFOR für die Substrate ist gering. Der K_M für Fruktose ist schwer zu messen und wurde mit 400 ± 30 mM (Hardman & Scopes, 1988) bzw. 1,4 M (Zachariou & Scopes, 1986) angegeben. Der K_M für Glukose liegt bei $10,8 \pm 0,8$ mM. (Hardman & Scopes, 1988). Fruktose wird vermutlich nur in der offenkettigen Form gebunden, die in wässriger Lösung einen Anteil von 0,5 - 0,7 % ausmacht, wodurch der hohe K_M für Fruktose erklärt werden kann. Glukose wird nur in der β -anomeren Form umgesetzt (Hardman & Scopes, 1988; Hardman et al., 1992; Zachariou & Scopes, 1986). Während Sorbit offensichtlich nicht weiter verstoffwechselt wird, kann die

Glukonsäure phosphoryliert und in den Entner-Doudoroff Weg eingeschleust werden (Strohdeicher et al., 1988).

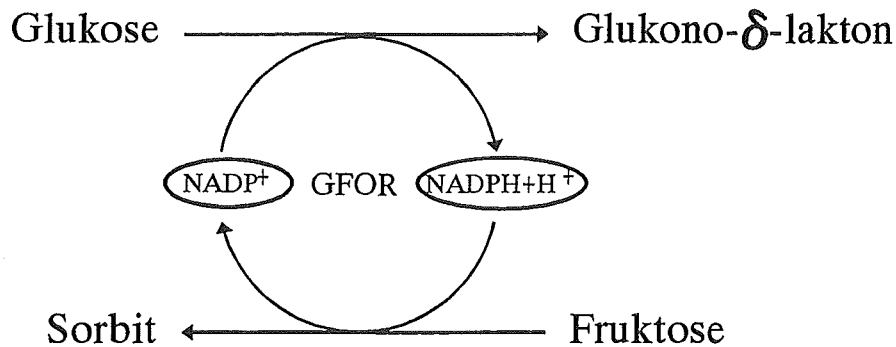


Abb. 2: Vereinfachtes Schema des Reaktionsmechanismus der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR). Der enzymgebundene Kofaktor NADP wird durch die Oxidation der Glukose zu Glukonolacton reduziert und im Gegenzug durch die Reduktion der Fruktose zu Sorbit oxidiert.

Die physiologische Funktion der GFOR war lange unverstanden. Neueste Untersuchungen konnten jedoch zeigen, daß *Z. mobilis* Sorbit durch ein aktives Transportsystem bis zu einer intrazellulären Konzentration von 1 M akkumuliert, wobei Sorbit das Wachstum auf hohen Zuckerkonzentrationen deutlich verbessert. Es wird daher angenommen, daß die GFOR Sorbit als osmoprotektives 'compatible solute' bildet (Loos et al., 1994c).

Der außergewöhnliche Reaktionsmechanismus der GFOR kann ausgenutzt werden, um innerhalb einer FIA-Meßzelle ('Flow Injection Analysis') Glukose-, Fruktose-, Glukonolacton- und Sorbitkonzentrationen zu messen. Dabei wird der GFOR-Kofaktor NADPH mittels eines Lasers bei 360 nm zur Fluoreszenz angeregt. Die Intensität der emittierten Fluoreszenz ist proportional zur Menge an reduziertem Kofaktor und gibt damit den Redoxzustand der GFOR wieder. Der Redoxzustand der GFOR ist wiederum direkt von der Zuckerkonzentration des umgebenden Mediums abhängig (Thorsen et al., 1993; Lee et al., 1994). Eine andere Konstruktion eines Biosensors zur Messung von Saccharose, Glukose oder Fruktose mit ko-immobilisierter GFOR, Glukonolactonase und Invertase beruht auf der Bildung von Glukonsäure aus Glukose. Die Glukonsäurebildung innerhalb der Meßzelle wird über eine pH-Elektrode gemessen (Park et al. 1991; Park et al., 1995).

Die durch die GFOR katalysierte Reaktion kann ebenfalls zur Produktion von Sorbit und Glukonsäure ausgenutzt werden (Rehr et al., 1991). Sorbit findet als Zuckerersatzstoff breite Anwendung in der Lebensmittelindustrie, es ist die Ausgangssubstanz zur Vitamin-C Synthese nach Reichstein & Grussner (1934) und wird wegen seiner hygroskopischen Eigenschaften als Stabilisator in einer Vielzahl von Produkten eingesetzt (Ullmann, 1982). Glukonsäure dient in der Industrie als schonendes Reinigungsmittel und wird als Säuerungsmittel in Nahrungsmitteln verwendet (Ullmann 1982; Rehr & Sahn, 1990). Die unter Anwendung der GFOR entwickelten Methoden zur Herstellung von Sorbit und Glukonsäure bieten Vorteile gegenüber der chemischen

Herstellung dieser Substanzen und anderer fermentativer Verfahren (Chun & Rogers, 1988; Paterson et al., 1988; Rehr & Sahm, 1990; Rehr et al., 1991; Kim & Chun, 1994), z.B. kann bei Verwendung permeabilisierter Zellen von *Z. mobilis* eine Glukose/Fruktose Lösung mit einer hohen Ausbeute von über 98 % zu Glukonsäure und Sorbit umgesetzt werden (Rehr et al., 1991).

Lokalisierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Durch elektronenmikroskopische Untersuchung immunogoldmarkierter Zellen wurde festgestellt, daß sich die GFOR im Periplasma von *Z. mobilis* befindet. (Loos et al., 1991; Aldrich et al., 1992). Ferner ergab ein Vergleich der aus der DNA abgeleiteten Aminosäuresequenz des Gens der GFOR (*gfo*) mit den durch Edman-Abbau nachgewiesenen N-terminalen Aminosäuren des gereinigten Proteins, daß die GFOR offensichtlich in Form einer Vorstufe (PräGFOR) mit einer zusätzlichen aminoterminalen Sequenz von 52 Aminosäuren synthetisiert wird (Kanagasundaram & Scopes, 1992). Dieser Abschnitt besitzt einige Ähnlichkeiten zu bakteriellen Signalsequenzen, die den Export von Proteinen durch die Cytoplasmamembran über den sogenannten Sec-Weg initiieren und danach unter Freisetzung des reifen Proteins abgespalten werden (s. Abb. 3). Eine Signalsequenz von 52 Aminosäuren Länge ist jedoch sehr ungewöhnlich.

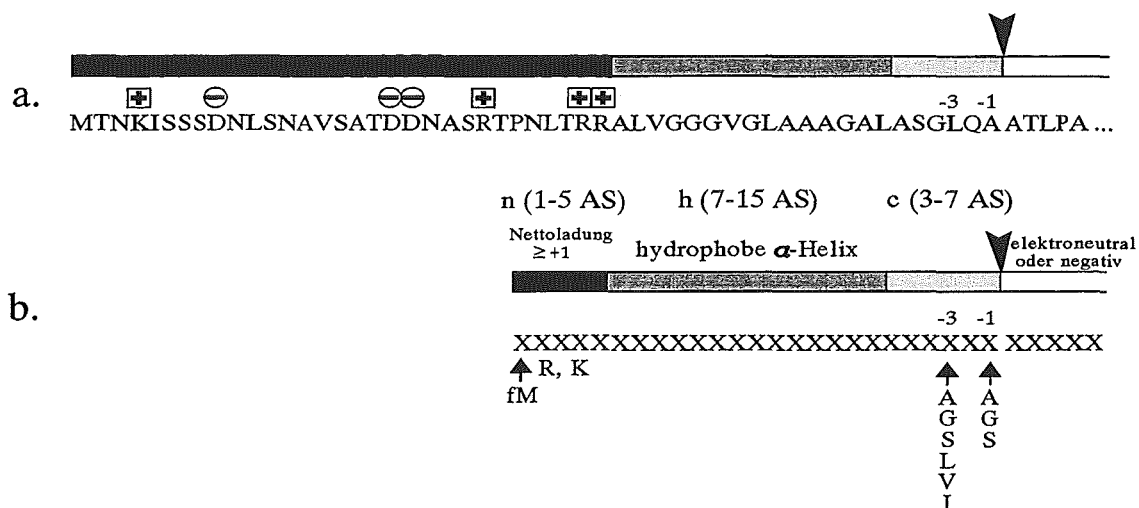


Abb. 3: Signalsequenz der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (a.) im Vergleich zur allgemeinen Struktur von bakteriellen Signalsequenzen (b.) (nach Pugsley, 1993; verändert). Die hypothetische n-, h- und c-Region der GFOR ist schematisch dargestellt. Aminosäuren sind mit dem 1er Code angegeben. fM: Formylmethionin

Eine charakteristische Eigenschaft von Proteinen, die über den Sec-Weg exportiert werden, ist eine aminoterminalen Signalsequenz, z.B. bei *Escherichia coli* mit einer durchschnittliche Länge von ca. 24 Aminosäuren (VonHeijne & Abrahamsén, 1989). Die Signalsequenz bewirkt die Einschleusung des Exportproteins in den Sec-Apparat. Sie wird im Verlauf der Translokation über die Cytoplasmamembran durch eine Signalpeptidase vom Protein abgespalten. Signalsequenzen folgen einem gemeinsamen Bauprinzip mit einer positiv geladenen n-Region (1 - 5 Aminosäuren), einer hydrophoben h-Region (7 - 15 Aminosäuren) und einer mehr polaren c-

Region (3 - 7 Aminosäuren). Während die positiv geladenen Aminosäurereste in Wechselwirkung mit den negativ geladenen Phospholipiden der Membran und dem SecA-Protein stehen, ist die hydrophobe Region für eine Insertion in die Membran verantwortlich (VonHeijne, 1990; deVrije et al., 1990). In der c-Region befindet sich eine Erkennungsstelle für die Signalpeptidase, mit einer typischen -1, -3 Erkennungssequenz (Ala-x-Ala) (von Heijne, 1990). Bei der GFOR-Signalsequenz können auch n-, h und c-Regionen erkannt werden. Die mögliche n-Region ist mit 31 Aminosäuren jedoch außergewöhnlich lang und im hydrophoben Bereich finden sich viele Glycin-Reste, die wegen der helixbrechenden Eigenschaften in der h-Region anderer Signalsequenzen selten sind (s. Abb. 3).

Neben der GFOR sind drei weitere Enzyme von *Z. mobilis* mit einer nur hypothetischen Signalsequenz bekannt. Dabei handelt es sich um die Glukonolactonase (GNL; Kanagasundaram & Scopes, 1992b), die saure Phosphatase (PhoC, Pond et al., 1988) und um ein erst kürzlich beschriebenes mögliches Bindeprotein des Glutamat/Aspartat Aufnahmesystems (GluE, Peekhaus, 1994). Eine tatsächliche Prozessierung und periplasmatische Lokalisierung wurde bislang bei keinem dieser Proteine gezeigt. Eine mögliche Prozessierungsstelle konnte nur bei der Glukonolactonase durch Ansequenzierung des reifen Proteins bestimmt werden. Die möglichen Signalsequenzen der GNL (35 Aminosäuren), PhoC (28 Aminosäuren) und GluE (38 Aminosäuren) sind im Vergleich zu Signalsequenzen anderer Exportproteine Gram-negativer Bakterien zwar ebenfalls lang, aber deutlich kürzer als die der GFOR.

Die extrazellulären Enzyme Invertase und Levansucrase von *Z. mobilis* wurden kürzlich kloniert und sequenziert. Sie besitzen offensichtlich keine aminoterminalen Signalsequenz und werden vermutlich durch einen Sec-unabhängigen Mechanismus sekretiert (Song et al., 1993; Song et al., 1994; Kannan et al., 1995). Es wurden außerdem zwei Gene kloniert, die möglicherweise die Sekretion der Levansucrase und Invertase stimulieren (Kondo et al., 1994; Oda et al., 1994).

Fusionen der 66 N-terminalen Aminosäuren der PräGFOR mit der β -Galaktosidase führten zu einer hohen β -Galaktosidase-Aktivität in *Z. mobilis* (Völler, 1991). Fusionen aus Exportproteinen mit einer Signalsequenz und der β -Galaktosidase sind bei hoher Expression in der Regel letal für die Zelle, da die β -Galaktosidase eine stabile Konformation einnimmt und damit den Translokationskanal des Sec-abhängigen Exportmechanismus verstopft. (Freudl et al., 1988; Lee et al., 1989). Es war damit fraglich, ob die GFOR tatsächlich über den Sec-Weg ins Periplasma exportiert wird. Ebenso konnte in einem 'in vitro' Ansatz, bei der die PräGFOR mittels eines Retikulozytensystems synthetisiert und mit *Z. mobilis* Membranen versetzt wurde, keine deutliche Prozessierung der PräGFOR gezeigt werden (Kanagasundaram & Scopes, 1992). Eine Prozessierung der GFOR, die mit dem Export ins Periplasma gekoppelt ist, wurde daher bislang noch nicht eindeutig nachgewiesen.

Die GFOR ist bislang das einzige beschriebene periplasmatische Enzym mit NADP als Kofaktor. Es sind aber einige andere periplasmatische Proteine mit Kofaktoren bekannt, die am dissimilatorischen Stoffwechsel Gram-negativer Bakterien beteiligt sind (Tab. 1). Diese Proteine sind z.T. löslich oder ragen membrangebunden in den periplasmatischen Raum. Die redoxreakti-

ven Kofaktoren (prosthetische Gruppen) dieser Proteine übertragen, im Gegensatz zum NADPH der GFOR, Elektronen auf Komponenten der Atmungskette.

Tab. 1: Periplasmatische bzw. in den periplasmatischen Raum ragende Proteine mit prosthetischen Gruppen. Die jeweiligen Proteine wurden z.T. bei mehreren Bakterienarten nachgewiesen, sodaß die Auflistung nur beispielhaft ist.

SP: Aminoterminaler Signalpeptid; MoCo: Molybdän-Kofaktor (Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid); Cu: Kupfer-Chromophor; TTQ: Tryptophan-Tryptophylquinon; 4Fe-4S: Eisen-Schwefel Zentrum; PQQ: Pyrroloquinolin-Quinon; UE: Untereinheit.

Protein	Kofaktor	SP	Referenz
Cytochrom <i>c</i> (<i>Paracoccus denitrificans</i>)	Häm	+	Page & Ferguson, 1989
Dimethylsulfoxid-Reduktase (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)	MoCo	+	Yoshida et al., 1991
Nitrat-Reduktase 83kDa-UE (<i>Rhodobacter capsulatus</i>)	MoCo	+	Richardson et al., 1990
N ₂ O-Reduktase (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	Cu	+	Zumft et al, 1988
Glukose Dehydrogenase (<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>)	PQQ	-	Cleton-Jansen et al., 1988
Methanol Dehydrogenase 66 kDa UE (<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1)	PQQ	+	Anderson et al., 1990
Methylamin-Dehydrogenase 13 kDa-UE (<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1)	TTQ	+	Chistoserdov & Lidstrom, 1991
p-Kresol-Methylhydroxylase 60 kDa-UE (<i>Pseudomonas putida</i>)	FAD	-	Kim et al., 1994
Hydrogenase 46 kDa-UE (<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hild.)	4Fe-4S	+	VanDongen et al., 1988

Am besten untersucht ist der Export von *c*-Typ Cytochromen, welche Häm als prosthetische Gruppe kovalent gebunden enthalten. Cytochrome des *c*-Typs befinden sich auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran und sind häufig mit anderen redoxreaktiven Proteinen verbunden. Sie besitzen eine typische aminoterminaler Signalsequenz, die im Verlauf der Translokation abgespalten wird. Das Apoprotein wird über den Sec-Weg ins Periplasma exportiert und erst dort wird unter kovalenter Anbindung des Häms das Holoprotein gebildet. (Thöny-Meyer et al., 1994). Anhand von Cytochrom *c*-Defektmutanten konnten die Gene isoliert werden, die offensichtlich an der Translokation und der Anbindung des Häms an das Cytochrom *c* von *Rhodobacter capsulatus* (*hel*-Gene) und *Bradyrhizobium japonicum* (*cyc*-Gene) beteiligt sind. In diesem komplexen Vorgang sind mindestens 7 Genprodukte involviert, wobei das Häm über einen ABC-Transporter (*helABCD* bzw. *cycVWX*) exportiert wird (Ramseier et al., 1991; Beckmann et al., 1992; Thöny-Meyer et al., 1994). Bei *E. coli* sind vermutlich die Genprodukte von *cydCD* am Häm-Transport beteiligt (Poole et al., 1994).

Über den Exportmechanismus prosthetischer Gruppen anderer periplasmatischer Proteine, die z.B. an einer anaeroben Atmung beteiligt sind, ist wenig bekannt. Bei den meisten dieser Proteine

wurde jedoch eine abspaltbare aminoterminal Signalsequenz nachgewiesen (s. Tab. 1) und es wird angenommen, daß die prosthetischen Gruppen separat vom Apoprotein ins Periplasma transportiert werden (Goodwin & Anthony, 1995).

Kofaktorbindung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Die GFOR ist ein Homotetramer mit 4 Mol NADP als Kofaktor und einer Größe von ca. 160 kDa. Das NADP ist fest an das Enzym gebunden. Eine Ablösung des Kofaktors vom gereinigten Protein erfolgt nur durch Denaturierung mit Perchlorsäure oder SDS (Zachariou & Scopes, 1986; Loos, Dissertation, 1994).

Neben der GFOR sind einige Enzyme mit NAD und wenige mit NADP als fest gebundenem Kofaktor bekannt, die sich in drei Gruppen unterteilen lassen (Tab. 2).

Tab. 2: Einige Enzyme mit NAD(P) als fest gebundenem Kofaktor. Die einzelnen Gruppen sind nach der Art des katalysierten Reaktionsmechanismus festgelegt.

Enzym	Gruppe	Referenz
<u>NAD</u>		
UDP-Galaktose-Epimerase (<i>Escherichia coli</i>)	1	Wilson & Hogness, 1964
CDP-Glukose-Oxidoreduktase (<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)	1	Thorson et al., 1992
Dehydroquinat Synthase (<i>Escherichia coli</i>)	1	Frey, 1987
Urokanase (<i>Pseudomonas putida</i>)	1	Egan & Phillips, 1977
S-Adenosylhomocysteinase (Rinderleber)	1	Palmer & Abeles, 1976
Methanol-Dehydrogenase (<i>Bacillus sp.</i> C1)	2	Vonck et al., 1991
NDMA-Alkohol-Dehydrogenase (<i>Amycolatopsis methanolica</i>)	2	VanOphem et al., 1993
Formaldehyd Dismutase (<i>Pseudomonas putida</i> F61)	3	Kato et al., 1986
Malat-Laktat-Transhydrogenase (<i>Micrococcus lactilyticus</i>)	3	Allen, 1966
<u>NADP</u>		
Methanol-Formaldehyd-Oxidoreduktase (<i>Amycolatopsis methanolica</i>)	2	Bystrykh et al., 1993
" (<i>Mycobacterium gastris</i> MB19)	2	"
Katalase (Rinderleber)	?	Kirkmann & Gaetani, 1984
" (<i>Proteus mirabilis</i>)	?	Jouve et al., 1989
Glukose Fruktose Oxidoreduktase (<i>Zymomonas mobilis</i>)	3	Zacchariou & Scopes, 1986

Das NAD(P) als prosthetische Gruppe dieser Enzyme ist nur katalytisch aktiv und wird nicht wie bei klassischen Dehydrogenasen als Kosubstrat umgesetzt.

Der Reaktionsmechanismus der ersten Gruppe dieser Enzyme wird als 'komplexe Pyridin-Nukletotid-abhängige Transformation' bezeichnet (Frey, 1987). Dabei wird zunächst das gebundene Substrat unter NAD-Reduktion oxidiert und es findet eine Umlagerung (z.B. UDP-

Galaktose-Epimerase) oder Abspaltung (z.B. S-Adenosylhomocysteinase) statt. Das am Enzym verbliebene Substratmolekül wird darauf wieder unter Reoxidation des Kofaktors reduziert (Frey, 1987). Innerhalb dieser Gruppe ist das NAD fest gebunden (z.B. Dehydroquinat Synthase, Urokanase), kann aber auch vom Enzym abdissoziieren (z.B. CDP-Glukose-Oxidoreduktase).

Die zweite Gruppe von Enzymen mit fester NAD(P)-Bindung ist bei Methanol-oxidierenden Bakterien gefunden worden. Die Reduktionsäquivalente aus der Oxidation des Methanol werden hierbei vom NAD(P) auf ein externes Aktivatorprotein (Methanol-Dehydrogenase) oder artifizielle Elektronenakzeptoren wie 4-Nitroso-N,N-dimethylanilin (NDMA) übertragen (NDMA-Oxidoreduktase). Dabei wird vermutet, daß 'in vivo' eine Übertragung der Reduktionsäquivalente auf Komponenten der Elektronentransportkette erfolgt (VanOphem et al., 1993).

Die GFOR kann mit der Formaldehyd-Dismutase und der Malat-Laktat-Transhydrogenase einer Gruppe zugeordnet werden. Der Reaktionsmechanismus dieser Enzyme ähnelt der ersten Gruppe, nur bleibt das Substrat nach der Oxidation nicht am Enzym gebunden, sondern wird durch ein gleiches (Formaldehyd-Dismutase) oder anderes (GFOR, Malat-Laktat-Transhydrogenase) Substratmolekül ersetzt.

Von den Enzymen mit fest gebundenem NAD(P) sind Röntgenstrukturdaten nur von der Katalase aus Rinderleber und der UDP-Galaktose-Epimerase aus *E. coli* vorhanden. Das NADP der Katalase ist in einer ungewöhnlich gefalteten Struktur verankert und es konnte keine direkte katalytische Funktion nachgewiesen werden (Fita & Rosman, 1985). Bei der UDP-Galaktose-Epimerase ist das NAD in gestreckter Form innerhalb einer sogenannten Rossmann-Falte (Rossmann et al., 1975) gebunden. Die besondere Struktur, die die feste Bindung des NAD verursacht, konnte wegen einer zu geringen Auflösung der Röntgenstruktur jedoch noch nicht bestimmt werden (Bauer et al., 1992). Die Art der Kofaktorbindestelle der GFOR ist unbekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die GFOR hinsichtlich der physiologischen Funktion, des Exports ins Periplasma und der NADP-Bindestelle durch molekularbiologische Methoden genauer zu charakterisieren.

- Zu Beginn der Arbeit lagen Hinweise vor, daß die physiologische Funktion der GFOR die Bildung von Sorbit als osmoprotektive Substanz bei Wachstum auf hohen Zuckerkonzentrationen war. Diese Vermutung sollte anhand einer GFOR-Defektmutante überprüft werden.
- Da bislang wenig über die Translokation von Proteinen mit prosthetischen Gruppen bekannt war, sollte der Export und der Exportweg der GFOR ins Periplasma von *Z. mobilis* untersucht werden. Dazu sollte die Prozessierung der GFOR in *Z. mobilis* nachgewiesen und der Exportmechanismus genauer untersucht werden. Zusätzlich sollte eine Expression des *gfo*-Gens in *E. coli* erreicht werden, um Untersuchungen zum Export im heterologen System durchführen zu können.
- Um die strukturellen Voraussetzungen für eine feste NADP-Bindung zu untersuchen, sollte die NADP-Bindestelle der GFOR durch gerichtete Aminosäureaustausche charakterisiert werden. Dazu sollte ein geeignetes System zur Mutagenese und Reinigung rekombinanter GFOR aufgestellt werden.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien und Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien der Firmen Merck AG (Darmstadt), Sigma Chemie (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) verwendet. Biochemikalien und Enzyme, inklusive der zugehörigen Puffer, stammten von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach). Produkte anderer Hersteller sind nachfolgend aufgelistet.

Amersham Life Science, Braunschweig	³⁵ S-Methionin [α- ³⁵ S]-dATP
Amicon Inc., Boulder, USA	Centricon 30 Centriprep 30 YE30 Membran
Biomol, Hamburg	IPTG (kristallin) X-Gal (kristallin)
Biorad, München	Acrylamid Bisacrylamid
Calbiochem-Novabiochem GmbH (Bad Soden)	Pansorbinzellen
Dianova, Hamburg	Geneclean Kit (Bio 101 Inc., La Jolla, USA)
Difco Laboratories, Detroit, USA	Bacto-Trypton Hefe-Extrakt MacConkey Agar Base Methionin Assay Medium
Gibco BRL, Eggenstein	Harnstoff Casein-Hydrolysat
Oxoid Deutschland, Wesel	Gas Generating Kit
Pharmacia LKB, Freiburg	AutoRead™ Sequencing Kit CleanGel-Fertiggele Nativ-Puffer Kit, pH 5,5 DEAE-Sephacel CM-Sephadex NAP™-10 Säulen
Quiagen, Hilden	QuiaEx-Kit
Schleicher & Schüll, Dassel	Nitrocellulose BA85 NL17 Membranfilter 0,45 µm
USB, United States Biochemical Corp., Ohio	Sequenase Version 2.0
5'→3' prime Inc.®, Boulder	PhoA Antikörper

2. Bakterienstämme, Plasmide, Phagen und Oligonukleotide

Herkunft und Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Bezeichnung der genetischen Marker erfolgte dabei nach Bachmann & Low (1980). Die für die molekularbiologischen Arbeiten verwendeten Plasmide und Phagen sind in Tabelle 4 aufgelistet, die verwendeten Oligonukleotide in Tabelle 5.

Tab. 3: Verwendete *E. coli* und *Z. mobilis* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<u><i>Escherichia coli</i></u>		
CA8000	<i>thi⁻ lac⁺</i>	Brickman et al., 1973
DH5	<i>supE hsdR recA endA gyrA thi relA</i>	Low, 1968
DH5α	<i>supE lacU Δ(lacZ)M hsdR recA endA gyrA thi relA</i>	Hanahan, 1983
JM109	<i>recA supE endA hsdR gyrA relA thi (Δlac-proAB) F' traD proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M</i>	Yanish-Perron et al., 1985
S17-1	<i>F⁻ thi endAR hsdR (r⁻m⁺) supE pro lambda⁻ pro::RP4-2</i>	Simon et al., 1983
BW313	<i>dut ung thi1 relA1 spoT1 F'lysA</i>	Kunkel, 1985
CC118	<i>Δ(ara-leu) ΔlacX ΔphoA galE galK thi argE(am) araD rpoB recA rpsE</i>	Manoil & Beckwith, 1985
CC202	CC118/F42 <i>lac zzf-2::TnPhoA</i>	Lloyd & Kadner, 1990
SF120	<i>F⁻ Δlacx galE galK thi rspL (strA) ΔphoA degP (ΔPstI::ΩK^{nr}) ΔompT ptr::ΩCm^r</i>	Baneyx & Georgiou, 1992
<u><i>Zymomonas mobilis</i></u>		
CP4 (ATCC 31821)	Wildtyp	Goncalves de Lima et al., 1972
ZM6 (ATCC 29191)	Wildtyp	Swings & DeLey, 1977
ACM3963	Spontan-Mutante aus ATCC39676	Kirk & Doelle, 1993

Tab. 4: Verwendete und in dieser Arbeit konstruierte Plasmide und Phagen

	Größe	relevante Marker	Referenz
<u>Plasmid</u>			
pUC18/19	2,7 kb	<i>bla lacZα</i>	Vieira & Messing, 1982
pJF118	5,3 kb	<i>bla lacI^q</i>	Fürste et al., 1986
pUC18/19 ^{not}	2,7 kb	<i>bla lacZα</i>	diese Arbeit
pTW18/19	2,7 kb	<i>bla lacZα</i>	diese Arbeit
pBR322	4,4 kb	<i>bla tet</i>	Bolivar et al., 1977
pZVK2 (pZY401)	9,4 kb	<i>bla gfo</i>	Kanagasundaram & Scopes, 1992
pZY431	3,2 kb	<i>bla gfo'</i>	Sprenger & Höll, unveröffentlicht
pZY421	5,0 kb	<i>tet gfo</i>	Völler, 1991
pOA181K8	4,0 kb	<i>bla ompA</i>	Meens, unveröffentlicht
pPA4	4,1 kb	<i>bla 'phoA</i>	Meens, unveröffentlicht
pZY470	4,3 kb	<i>bla gfo</i>	diese Arbeit
pBR322 ^{gnl}	4,9 kb	<i>bla gnl</i>	diese Arbeit
pZY471/471'	4,3 kb	<i>bla gfo</i>	diese Arbeit
pSUP104	9,5 kb	<i>tet cat</i>	Simon et al., 1983
pZY412	13,7 kb	<i>tet gfo</i>	Völler, 1991
pZY414	10,5 kb	<i>tet gfo</i>	diese Arbeit
pZY507	10,1 kb	<i>cat lacI^q</i>	Schilz, 1993
pZY570	11,8 kb	<i>cat lacI^q gfo</i>	diese Arbeit
pZY572	11,7 kb	<i>cat lacI^q ompA_{ss}gfo</i>	diese Arbeit
pJF572	6,8 kb	<i>bla lacI^q ompA_{ss}gfo</i>	diese Arbeit
pZY574	11,6 kb	<i>cat lacI^q gnl_{ss}gfo</i>	diese Arbeit
pZY575	11,8 kb	<i>cat lacI^q gfo_{ss}phoA</i>	diese Arbeit
pZY576	11,8 kb	<i>cat lacI^q gfo_{ss}phoA</i>	diese Arbeit
pZY578	11,5 kb	<i>cat lacI^q phoA_{ss}gfo</i>	diese Arbeit
pZY507 ^{pho}	11,6 kb	<i>cat lacI^q phoA</i>	diese Arbeit
pZY507 ^{PA4}	11,6 kb	<i>cat lacI^q 'phoA</i>	diese Arbeit
<u>Phage</u>			
M13mp18	7,2 kb	<i>lacZα</i>	Yanisch-Perron et al., 1985
M13gfoEP	7,8 kb	<i>gfo'</i>	diese Arbeit
M13gfoPS	7,5 kb	<i>'gfo'</i>	diese Arbeit
M13gfoSK	7,5 kb	<i>'gfo'</i>	diese Arbeit

Kurze Charakterisierung der wichtigsten in dieser Arbeit konstruierten bzw. nicht-veröffentlichten Plasmide und Phagen:

pUC18/19not: NotI linker (TTGCGGCCGCAA, Promega) in SspI-Schnittstelle von pUC18/19 inseriert, dadurch Verlust der SspI-Schnittstelle in pUC18/19.

pTW18/19: Annealing und Phosphorylierung der Oligonukleotide MCS3 und MCS4. Ligation dieser DNA-Kassette in EcoRI/HindIII linearisierte pUC18/19not. Ergibt eine neue 'multiple cloning site' in pUC18/19not (EcoRI, SacI, SspI, EcoRV, SalI).

pZY431: 0,5 kb EcoRI/PstI-Fragment aus pZY421 ligiert in den EcoRI/PstI linearisierten pUC19. Auf dem 0,5 kb-Fragment befinden sich 353 bp des *gfo* 5'-Endes mit dem proximalen *gfo*-Promotor in Gegenrichtung zum *lac*-Promotor.

pZY470: 1,6 kb SspI-Fragment aus pZVK2 ligiert in den SspI/EcoRV linearisierten pTW18. Das auf dem 1,6 kb-Fragment kodierte *gfo*-Gen befindet sich in Leserichtung zum *lac*-Promotor.

pZY471: Entspricht pZY470, dem durch gerichtete Mutagenese mit Oligonukleotid GFOe47 eine Eco47III-Schnittstelle an Position 407 des *gfo*-Gens eingeführt wurde. Die Eco47III-Schnittstelle befindet sich in der DNA-Region, die für die Prozessierungsstelle der GFOR kodiert und erlaubt eine 'in frame' Anklonierung anderer Signalsequenzen.

pZY471': 1,6 kb SacI/SalI-Fragment aus pZY471 inseriert in die SacI/SalI-Schnittstelle in pTW19. Entspricht pZY471 mit dem *gfo*-Gen in Gegenrichtung zum *lac*-Promotor.

pBR322gnl: Amplifizierung des *gnl*-Gens aus *Z. mobilis* CP4 über PCR mit chromosomaler DNA als Matrize und Oligonukleotiden GNLuni und GNLrev. Restriktion des 1,2 kb PCR-Fragments mit HindIII/SalI und Ligation in den HindIII/SalI linearisierten pBR322.

pOA181K8: Entspricht pRD87 (Freudl et al., 1985), dem durch gerichtete Mutagenese eine Eco47III-Schnittstelle eingefügt wurde (pRD87K8; Meens, 1994). Ein 1,3 kb PstI-Fragment aus pRD87K8 wurde in den PstI linearisierten pUC18 kloniert, sodaß das *ompA*-Gen in Leserichtung des *lac*-Promotors liegt. Die Eco47III-Schnittstelle des resultierenden Plasmids pOA181K8 befindet sich in der DNA-Region, die für die Prozessierungsstelle des PräOmpA kodiert und erlaubt eine 'in frame' Anklonierung anderer Signalsequenzen.

pPA4: Amplifizierung des '*phoA*-Gens über PCR mit chromosomaler DNA aus *E. coli* CA8000 als Matrize und Oligonukleotiden Pho4 und Pho5. Klonierung als SmaI/HindIII Fragment in pULS186.

pZY414: 0,5 kb EcoRI/PstI Fragment aus pZY431 und 1,2 kb PstI/SspI-Fragment aus pZVK1 ligiert in den EcoRI/PvuII linearisierten pSUP104.

pZY570: 1,6 kb SacI/SalI-Fragment aus pZY470 ligiert in den SacI/SalI linearisierten pZY507. Das auf dem 1,6 kb-Fragment kodierte *gfo*-Gen mit dem proximalen *gfo*-Promotor liegt in Leserichtung des *tac*-Promotors.

pZY572: 262 bp EcoRI/Eco47III-Fragment aus pOA181K8 ligiert mit einem 4,0 kb EcoRI/Eco47III pZY471'-Fragment. 1,6 kb SalI-Fragment aus dem resultierenden Plasmid (pZY472) ligiert in den SalI linearisierten pZY507. Das auf dem 1,6 kb-Fragment kodierte *ompA_{ssgfo}*-Gen liegt in Leserichtung des *tac*-Promotors.

pJF572: 1,6 kb SalI-Fragment aus pZY472 (s.o.) in SalI linearisierten pJF118. Das auf dem 1,6 kb-Fragment kodierte *ompA_{ssgfo}*-Gen liegt in Leserichtung des *tac*-Promotors.

pZY574: Klonierung des kodierenden DNA-Bereichs der GNL-Signalsequenz über PCR mit pBR322gnl als Matrize und Oligonukleotiden ssGNL1 und ssGNL2. Restriktion des 129 bp-Fragments mit EcoRI/NaeI und Ligation mit einem 4,0 kb EcoRI/Eco47III pZY471'-Fragment. 1,5 kb SacI/SalI-Fragment aus dem resultierenden Vektor (pZY474) ligiert in den SacI/SalI linearisierten pZY507. Das auf dem 1,5 kb-Fragment kodierte *gnl_{ssgfo}*-Gen liegt in Leserichtung des *tac*-Promotors.

pZY575: 361 bp SacI/Eco47III-Fragment aus pZY471 ligiert in den SacI/HpaI linearisierten pPA4. 1,7 kb SacI/HindIII-Fragment aus resultierendem Plasmid (pZY475) in SacI/HindIII linearisierten pZY507.

pZY576: Linearisierung von pZY470 mit PstI. Verdau der 3'-Überhänge mit S1-Nuklease, nachfolgend Restriktion mit SacI und Isolation des 0,4 kb Fragments. Ligation des 0,4 kb 'blunt end'/SacI-Fragments in den SacI/EcoRV linearisierten pPA4. 1,7 kb SacI/HindIII-Fragment des resultierenden Pasmids (pZY476) ligiert in den SacI/HindIII linearisierten pZY507.

pZY578: Klonierung des kodierenden DNA-Bereichs der PhoA-Signalsequenz über PCR mit pZY507phoA als Matrize und Oligonukleotiden Pho6 und Pho7. Restriktion des 113 bp-Fragments mit SacI/NaeI und Ligation mit einem 4,0 kb SacI/Eco47III pZY471'-Fragment. 1,4 kb SacI/SalI-Fragment aus dem resultierenden Vektor (pZY478) ligiert in den SacI/SalI linearisierten pZY507. Das auf dem 1,4 kb-Fragment kodierte *phoA_{ssgfo}*-Gen liegt in Leserichtung des *tac*-Promotors.

pZY507pho: Amplifikation des *phoA*-Gens aus *E. coli* CA8000 mit chromosomaler DNA als Matrize und Oligonukleotiden Pho5 und Pho6. Restriktion des 1,5 kb PCR-Fragments mit SacI/HindIII und Ligation in den SacI/HindIII linearisierten pZY507. Das *phoA*-Gen liegt in Leserichtung des *tac*-Promotors.

pZY507PA4: Ligation des 1,4 kb SacI/HindIII-Fragments aus pPA4 in den SacI/HindIII linearisierten pZY507. Das '*phoA*-Gen liegt in Leserichtung des *tac*-Promotors.

M13gfoEP: 0,6 kb EcoRI/PstI-Fragment aus pZY431 ligiert in den EcoRI/PstI linearisierten M13mp18.

M13gfoPS: 0,3 kb PstI/SphI-Fragment aus pZY470 ligiert in den PstI/SphI linearisierten M13mp18.

M13gfoSK: 0,3 kb SphI/KpnI-Fragment aus pZY470 ligiert in den SphI/KpnI linearisierten M13mp18.

Tab. 5: In dieser Arbeit hergestellte und verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
DEL1	ACCAGCAGGAAGCGTCGCCATAATCCTTGTTTCTTTCTT	Deletion der GFOR Signalsequenz (PCR)
DEL2	TGGCGTACGGGAAGCGTTCATAATCCTTGTTTCTTTCTT	Deletion in n-Region der GFOR Signalsequenz (M13)
DEL3	TGCCTGAAGACCACTGGCGCGACGGGTCAGATTTGG	Deletion der h-Region der GFOR Signalsequenz (M13)
GNLuni	AGAATTCAAGCTTTTTTTTCAAACCTATTTT	Klonierung der GNL (PCR)
GNLrev	TACGAATTGTCGACTGGTGCGAACGGCACA	Klonierung der GNL (PCR)
G90A	GGCATATTTACCCAGAGCGACGATAGCATAACC	GFOR Aminosäureaustausch (M13)
A95G	TAAAATCTGGTTAAGACCATATTTACCCAGACC	GFOR Aminosäureaustausch (M13)
MCS3	AATTCGAGCTCAATATTGTCGATATCGTCGACG	Klonierung neuer multiple cloning site in pUC18/19
MCS4	AGCTCGTCGACGATATCGACAATATTGAGCTCG	Klonierung neuer multiple cloning site in pUC18/19
GFOrev1	TACGGGGATCGACGCCAT	interner <i>gfo</i> -primer (Sequ.)
GFOe47	ACCAGCAGGAAGCGTAGCGCTCTGAAGACCACTGGC	Einbringung einer Eco47III-Schnittstelle an der GFOR-Prozessierungsstelle (M13)
ssGNL2	TAGAATTCGCCGGCCTGAGCTGATCCTGTAAT	Klonierung der GNL Signalsequenz (PCR)
ssGNL1	TAGAATTCGAGCTCGCGGTTAGTTGCAGGAGT	Klonierung der GNL Signalsequenz (PCR)
Pho4	GGGATTTAAATGATATCACGTGTAAACCGGGCTGCTCA GGGCGATAT	Konstruktion pPA4 (PCR)
Pho5	TTTAAAGCTTGGATTCTTATTTAGCCCCAGAGCGGC	Klonierung der PhoA (PCR)
Pho6	ATAAGCTTGAGCTCTGTATTTGTACATGGAGA	Klonierung der PhoA (PCR)
Pho7	ATGAATTCGCCGGCTTTTGTACAGGGGT	Klonierung der PhoA-Signalsequenz (PCR)
C179S	AAGCATGTTATGAGCGAAAAGCCGATG	GFOR Aminosäureaustausch
E180Q	CATGTTATGTGTCAGAAGCCGATGGCA	GFOR Aminosäureaustausch
GFOrev2	GCCCAGTTTACCCAACCTGG	interner <i>gfo</i> -primer (Sequ.)

3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Die verschiedenen Stämme von *E. coli* wurden je nach Versuchsbedingungen in Vollmedium (LB, 2YT) bzw. Minimalmedium (MM) kultiviert.

LB-Vollmedium (Miller 1972)

10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, Aqua dest. ad 1 l

2YT-Medium (Kunkel, 1985)

16 g Bacto-Trypton, 10 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, Aqua dest. ad 1 l

MM-Medium *E. coli* (Tanaka et al., 1967)

Lösung A (10x): 340 mM NaH_2PO_4 , 660 mM K_2HPO_4 , 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Lösung B (100x): 30 mM MgSO_4 , 1 mM CaCl_2 , 1 mM ZnCl_2 , 0,1 mM FeSO_4

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert und danach im entsprechenden Verhältnis gemischt. Als C-Quelle wurde 4 g/l Glycerin zugegeben und mit sterilem Aqua dest. aufgefüllt. Je nach *E. coli* Stamm wurde 2 mg/l Thiamin und bei 'pulse-chase' Experimenten 500 mg/l Methionin-Assay-Medium (Difco) zugesetzt.

Zur Anzucht von *Z. mobilis* wurden folgende Medien verwendet:

Vollmedium (VM) (Bringer et al., 1984)

10 g Hefeextrakt, 1 g KH_2PO_4 , 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g MgSO_4 , Aqua dest. ad 1 l. Als Kohlenstoffquellen wurden je nach Versuch verschiedene Konzentrationen von Glukose, Fruktose oder Saccharose zugesetzt.

Maintenance Medium (MaM) (Kirk & Doelle, 1993)

6 g KH_2PO_4 , 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g Caseinhydrolysat, 2 g Hefeextrakt, 100 g Glukose, Aqua dest ad 1 l. Die Glukose wurde getrennt autoklaviert.

Mineralsalzmedium *Z. mobilis* (MM) (modifiziert nach Fein et al., 1983)

1,98 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 3,48 g KH_2PO_4 , 0,21 g Tri-Na-Citrat, 19,52 g MES Puffer, Aqua dest. ad 779 ml, pH 5,5 mit KOH.

Nach dem Autoklavieren wurden folgende Substanzen aus sterilfiltrierten Stammlösungen zugesetzt: 10 ml $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mg/ml), 10 ml Biotin (0,1 mg/ml), 1 ml Ca-Pantothenat (1 mg/ml), 200 ml Glukose (500 g/l).

Bei 'pulse-chase' Experimenten wurde zusätzlich 500 mg/l Methionin-Assay-Medium (Difco) zugegeben.

Zur Unterscheidung von *E. coli*- und *Z. mobilis*- Zellen nach Konjugation fand folgendes Medium Verwendung:

MacConkey Agar (Miller, 1972)

40 g MacConkey Agar Base (Difco), Aqua dest. ad 1 l.

Die Kohlenstoffquelle wurde getrennt autoklaviert und dem autoklavierten Medium mit einer Endkonzentration von 10 g/l zugegeben.

Zur Herstellung fester Nährböden wurden den Medien 18 g/l Agar zugesetzt.

Zur Selektion auf Antibiotikaresistenz wurden Antibiotika in folgenden Konzentrationen den Medien zugesetzt:

	<i>E. coli</i>	<i>Z. mobilis</i>
Ampicillin	100 mg/l	-
Chloramphenicol	25 mg/l	100 mg/l
Nalidixinsäure	40 mg/l	40 mg/l
Tetrazyklin	15 mg/l	30 mg/l

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte aerob, in Flüssigkulturen unter Schütteln, bei 37°C.

Z. mobilis wurde in verschiedenen Anaerobengefäßen (10 ml: Bellco-Glas-Inc., New Jersey, USA; 50 ml - 2 l: Glasbläserei KFA Jülich) bei 30°C kultiviert. Alle Gefäße wurden mit Butylgummi-Stopfen und Aluminiumbördelkappen verschlossen. Kulturen in 100 ml, 200 ml und 2 l Glaskolben wurden mit sterilen Einwegfiltern (Schleicher & Schüll, Dassel) versehen, um ein Entweichen des gebildeten CO₂ zu ermöglichen.

Die Anzucht von *Z. mobilis* in größerem Maßstab zur Reinigung rekombinanten Proteins erfolgte in 10 l bzw. 20 l Glasflaschen, die mit Wattestopfen verschlossen wurden. Es wurde VM + 10 % Glukose verwendet, welches 10%ig aus einer Übernachtskultur beimpft wurde. Dabei wurden die Kulturen mittels eines Magnetrührers bei niedrigen Umdrehungen gerührt. Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von ca. 5 mittels Zentrifugation geerntet.

Die Fermentation von *Z. mobilis* ZM6 zur Gewinnung großer Mengen an Zellmasse zur Reinigung der GFOR erfolgte in einer Fermentationseinheit der Firma Chemap. Diese bestand aus einem 30 l Fermenter für die Vorkultur, der über eine sterilisierbare Transferleitung mit einem 300 l Fermenter verbunden war. Bei beiden Fermentern konnten die Kulturparameter über eine separate Steuereinheit (Siemens, München) kontrolliert und geregelt werden. Die Anzucht von *Z. mobilis* ZM6 erfolgte in Vollmedium (5 g/l Hefeextrakt) mit 15 % Glukose-1-Hydrat (Dextrose). Der pH-Wert des Mediums wurde während der Fermentation mit NaOH auf 5,5 geregelt.

Die Fermentationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Arbeitsvolumen:	25 l (Vorfermenter)
	250 l (Hauptfermenter)
pH-Titrationsmittel:	5 N NaOH
Antischaummittel	4 % Polypropylenglykol
Rührerdrehzahl	150 Upm

Der Vorfermenter wurde mit 10 % einer *Z. mobilis* ZM6 Übernachtskultur beimpft. Die Vorkultur wurde nach 8 h in den Hauptfermenter überführt, welcher nach ca. 10 h am Ende der exponentiellen Wachstumsphase abgeerntet wurde. Die Abtrennung der Zellmasse erfolgte mittels eines Separators (Westfalia Separatoren AG, Oelde). Die Feuchtzellmasse wurde eingefroren und bei -70°C gelagert.

4. Molekulargenetische Methoden

4.1 Allgemeine genetische und rekombinante DNA Techniken

Allgemeine genetische und rekombinante DNA-Techniken wurden, wenn nicht extra aufgeführt, nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook et al., 1989).

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem 'GeneClean'-Kit der Firma Dianova (Hamburg) bzw. mit dem 'QiaEx'-Kit der Firma Qiagen (Hilden) laut den Angaben der Hersteller.

Konjugation von *Z. mobilis* und *E. coli*: Rekombinante Plasmide wurden über Konjugation von *E. coli* nach *Z. mobilis* überführt, da bislang keine andere effiziente Methode etabliert werden konnte. Als Donor diente dabei der *E. coli* Stamm S17-1, der ein chromosomal-integriertes Derivat des Plasmids RP4 enthält. RP4 besitzt Transfer (*tra*)-Gene, die für die Mobilisierung von Plasmiden mit RP4-spezifischer *mob*-Region notwendig sind (Simon et al., 1983). Als Pendelvektoren wurden dabei ausschließlich Abkömmlinge des Plasmids pSUP104 verwendet (Simon et al., 1983.)

Zur Konjugation wurden 2 ml LB-Medium + Antibiotikum mit 50 µl einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* S17-1 Donorstamms beimpft und bis zur einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 bei 37°C geschüttelt. Die gesamte Kultur wurde abzentrifugiert und mit 1 ml VM + 2 % Glukose gewaschen.

Der *Z. mobilis* Rezipientenstamm wurde in 10 ml VM + 10 % Glukose ebenfalls bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 angezogen, abzentrifugiert und mit VM gewaschen.

Die Zellen von Donor- und Rezipientenstamm wurden in jeweils 150 µl VM suspendiert und vermischt. Die Inkubation erfolgte in 2 ml Eppendorgefäßen, die mit Parafilm verschlossenen

wurden, bei Raumtemperatur. Als Kontrollansätze wurden Donor- und Rezipientenstamm einzeln mit je 150 μ l VM versetzt. Nach 5 - 6 h wurden die Zellen abzentrifugiert und in 200 μ l VM resuspendiert. Davon wurden 100 μ l unverdünnt und je 100 μ l in 10facher bzw. 100facher Verdünnung in VM auf VM-Platten mit Nalidixinsäure und dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Konjugationsplatten wurden über 3 - 6 Tage anaerob bei 30°C inkubiert. Einzelne Bakterienkolonien wurden danach zur Unterscheidung von *E. coli* und *Z. mobilis* auf VM-Platten + Antibiotikum und parallel auf MacConkey-Nährboden ausplattiert. Auf MacConkey-Platten kann *Z. mobilis* wegen der darin enthaltenen Gallensalze bzw. dem Kristallviolett nicht wachsen.

Präparation von Plasmid- und M13-Phagen-DNA aus *E. coli*: Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach einer modifizierten Methode nach Birnboim & Doly (1979) und Ish-Horowitz & Burke (1981) durchgeführt (Sambrook et al., 1989). In kleinem Maßstab wurden Plasmide aus 2 - 4 ml ('Minipräps'), in größerem Maßstab aus 50 ml ('Midipräps') Übernachtskulturen isoliert. Midipräparationen wurden durch zusätzliche Isopropanol- und LiCl-Fällung weiter aufgereinigt. Die Isolierung der replikativen Doppelstrang-DNA des M13-Phagen erfolgte aus Kulturen, die nicht älter als 6 h waren, nach der oben beschriebenen Methode für Plasmid DNA. Einzelstrang-DNA wurde aus 4 ml Kulturüberstand nach Sambrook et al. (1989) isoliert.

Präparation von Plasmid DNA aus *Z. mobilis*: Die Präparation von Plasmid-DNA aus *Z. mobilis* erfolgte durch alkalischen Aufschluß mit anschließender DNA-Fällung und Aufreinigung mittels LiCl und Isopropanol (Sambrook et al., 1989) aus 50 ml Übernachtskulturen in VM mit Antibiotikazusatz. In Abwandlung enthielt der Lysepuffer (Lösung 1) zusätzlich frisch gelöstes Lysozym (10 mg/ml) und die Inkubationszeiten zur Lyse der Zellen wurden auf jeweils 30 min ausgedehnt. Die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- und Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktionen wurden jeweils dreimal durchgeführt.

Präparation chromosomaler DNA aus *Z. mobilis* : Die Präparation chromosomaler DNA aus *Z. mobilis* erfolgte nach der Methode von Eddy et al. (1988). 1 g Feuchtzellmasse wurde in 0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA suspendiert, mit 12 mg/ml Lysozym versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch mehrere Gefrier/Tau-Zyklen aufgeschlossen, wobei nach 2 Zyklen 25 ml 1 % SDS, 0,1 M Tris/HCl pH9 zugegeben wurde. Nach der Lyse wurde mehrmals mit gleichen Volumina Phenol und Phenol/Chloroform (25:25) extrahiert. Die chromosomale DNA im Überstand wurde schließlich mit 2 Volumenteilen Ethanol gefällt und in der hochmolekularen Form an einem Glasstab aufgewickelt. Nach Lösen der DNA in TE-Puffer und RNase-Verdau wurde erneut mehrmals mit Phenol/Chloroform extrahiert bis keine weiße Interphase mehr sichtbar war. Die Lösung wurde danach mit 5 M NaAcetat bis zu einer Endkonzentration von 2,5 M versetzt und die chromosomale DNA mit 2 Volumenteilen

Isopropanol präzipitiert und auf einen Glasstab aufgewickelt. Die chromosomale DNA wurde schließlich in TE-Puffer gelöst und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Präparation chromosomaler DNA aus *E. coli*: Chromosomale DNA aus *E. coli* wurde nach einer Methode isoliert, die eigentlich für *Z. mobilis* entwickelt worden war (Byun et al., 1986), sich aber als sehr geeignet für *E. coli* erwiesen hat. 100 ml einer Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (JA14, 10', 8000 Upm, 4°C) und das Pellet mit 100 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen. Nach Rezentrifugation wurde das Pellet suspendiert (100 mM EDTA, 10 % Glycerin, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0) mit 10 mg Lysozym versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µg/ml Proteinase K erfolgte eine Inkubation bei 50°C über Nacht. Die chromosomale DNA wurde darauf mit 2 Volumenteilen EtOH gefällt, an einem Glasstab aufgewickelt, zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet.

4.2 Oligonukleotidsynthese

Die für die Polymerase-Kettenreaktion und M13 gerichtete Mutagenese benötigten Oligonukleotide wurden mit einem DNA-Synthesizer der Firma Pharmacia-LKB, Freiburg (Gene-Assembler Plus) nach der Phosphoramidit Methode (Caruthers et al., 1987) hergestellt. Verwendet wurden dabei Chemikalien der Firmen Pharmacia, Rathburn Chemicals Ltd (Walkerburn) und Roth (Karlsruhe). Die Synthese erfolgte im 0,2 µmol Maßstab unter Abspaltung der letzten Tritylgruppe. Nach der Synthese wurden die Oligonukleotide über Nacht durch Inkubation in 25 % Ammoniak bei 50°C vom Säulenmaterial getrennt und deren Schutzgruppen abgespalten. Die Reinigung und Umpufferung erfolgte über eine Gelfiltration mit Sephadex-G 25 Fertigsäulen (NAP10 Säulen, Pharmacia) nach Herstellerangabe. Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

4.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion

Definierte DNA-Fragmente wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion ('Polymerase Chain Reaction', PCR, Mullis & Faloona, 1987) amplifiziert. Im Gesamtvolumen von 100 µl wurden ca. 0,1 pmol Matrizen-DNA, jeweils ca. 10 pmol Oligonukleotid-Primer, jeweils 100 µMol dATP, dCTP, dGTP und dCTP, 10 µl Reaktionspuffer und 5 U Taq-Polymerase vermischt. Als Reaktionspuffer wurde der vom Hersteller der Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim; Promega/Serva, Heidelberg; Pharmacia, Freiburg) mitgelieferte 10x-Puffer verwendet. Die PCR-Reaktionsansätze wurden mit 50 µl Paraffinöl überschichtet. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte in entsprechenden Geräten (DNA-Incubator I, Bioexcellence/Biozym Diagnostik, Hameln; DNA-Thermal-Cycler, Cetus/Perkin-Elmer). Es wurden 30 Reaktions-Zyklen mit folgenden Temperaturen und Inkubationszeiten durchgeführt:

Denaturierung der Matrizen-DNA	1,5 min	94°C
Anlagerung der Primermoleküle	1,5 min	45 - 55°C
Taq-Polymerase-Reaktion	2,5 min	70°C

Die Reaktionsprodukte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und mit 2 Volumen-
teilen Ethanol und 1/5 Volumenteilen 4 M LiCl über Nacht bei -20°C gefällt.

Die Deletion des für die Signalsequenz der GFOR kodierenden Genbereichs wurde nach einer
PCR-'Mega-Primer' Methode durchgeführt (Ogel & McPherson, 1992). Dazu wurde im ersten
PCR-Ansatz das Plasmid pZY431 und die Oligonukleotide DEL1 und M13-'universe' eingesetzt.

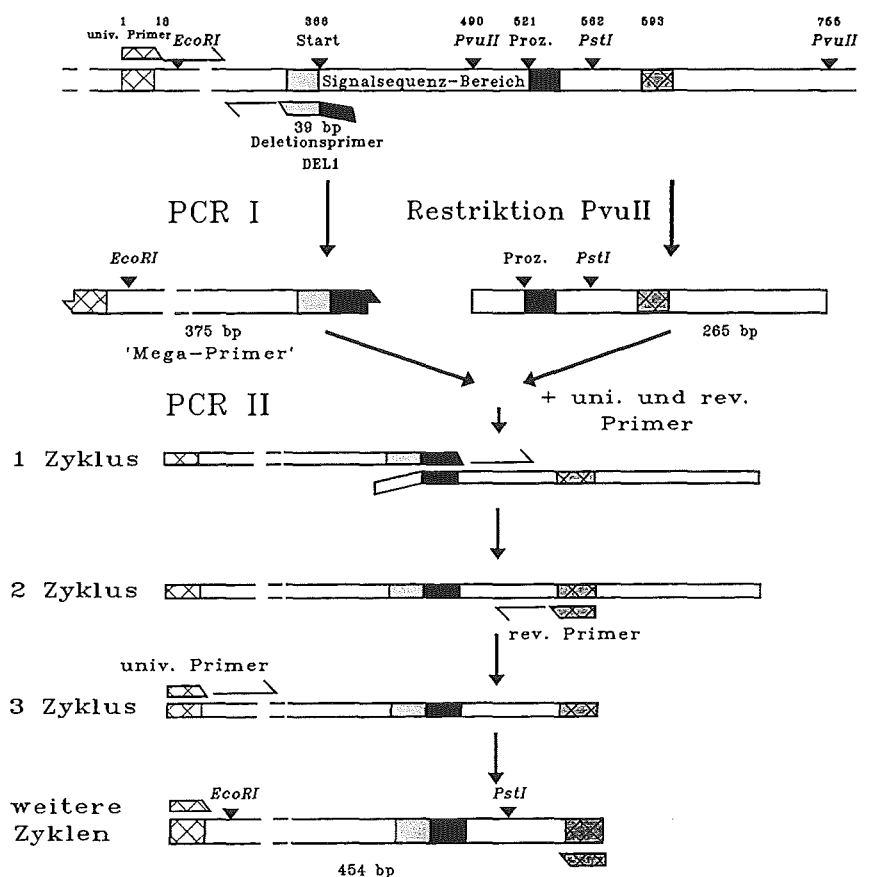


Abb. 4: Deletion des Signalsequenz-kodierenden Genbereichs der Glukose Fruktose Oxidoreduktase nach der Methode von Ogel & McPherson, 1992: Im ersten PCR-Schritt (PCR I) wurde mit einem Deletionsprimer (DEL 1) ein 'Mega-Primer' hergestellt, der im zweiten PCR-Schritt (PCR II) eingesetzt wurde. Weitere Erklärungen siehe Text. (Proz.: Spaltstelle der Signalpeptidase).

Das erhaltene 375 bp Fragment ('Mega-Primer') wurde isoliert und im zweiten PCR-Ansatz mit einem 265 bp PvuII-Fragment aus pZY431 und den M13-'universe' und -'reverse' Primern inkubiert. Das erhaltene 454 bp Fragment wurde mit EcoRI/PstI nachgeschnitten und in den entsprechend EcoRI/PstI linearisierten pZY431 ligiert. Die Deletion wurde über Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Danach erfolgte die Klonierung als SspI/PstI-Fragment in den Vektor pZY470.

4.4 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Terminationsmethode von Sanger et al. (1977) mit M13-Einzelstrang-DNA oder alkalisch denaturierter Plasmid-DNA als Matrize.

Die routinemäßige Sequenzierung wurde mit dem 'Automated Laser Fluorescent (A.L.F.) DNA-Sequencer' (Pharmacia/LKB, Freiburg) durchgeführt (Ansorge et al., 1986). Die Sequenzreaktion erfolgte mit dem 'AutoRead™ Sequencing Kit' (Pharmacia/LKB, Freiburg) mit den darin enthaltenen fluoreszenzmarkierten M13/pUC 'universe- und reverse-sequencing primern' nach Herstellerangabe.

Die Sequenzierung von mutagenisierten DNA-Abschnitten des kompletten *gfo*-Gens, die von den M13/pUC-primern nicht mehr erfaßt werden konnten, wurde mit radioaktiv markiertem $\alpha^{35}\text{S}$ -ATP und selbst hergestellten Oligonukleotid-Primern nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Für die Sequenzreaktion wurde das Kit 'Sequenase-Version 2.0' (USB, Cleveland Ohio) verwendet.

4.5 TnPhoA Mutagenese

Zur Untersuchung der Lokalisation der GFOR in *E. coli* wurde eine TnPhoA-Mutagenese nach Manoil & Beckwith (1985) durchgeführt. Hierbei wird das in das Chromosom eines *E. coli* Stammes (CC202) integrierte Transposon Tn5 verwendet, das das Gen der alkalischen Phosphatase aus *E. coli* (*phoA*) ohne dessen Promotor und den kodierenden DNA-Abschnitten der Signalsequenz und der ersten fünf Aminosäuren des reifen Proteins trägt. Setzt sich das Transposon in richtiger Orientierung und Leseraster in ein Gen, so entsteht eine Fusion, die für ein Hybridprotein kodiert. Die alkalische Phosphatase kann nur im Periplasma die richtige Konformation einnehmen, d.h. das Hybridprotein zeigt nur PhoA-Aktivität wenn eine Fusion z.B. mit einer Signalsequenz eingetreten ist (Manoil & Beckwith, 1985). Der Nachweis der Aktivität kann direkt auf Agarplatten mit 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat (X-Phosphat) erfolgen, da sich entsprechende Bakterienkolonien blau färben.

Das Plasmid pZY570 mit dem *gfo*-Gen wurde in *E. coli* CC202 transformiert und auf LB-Platten mit 300 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin (zur Induktion der Transposition; Tn5 trägt eine Kanamycinresistenz), 25 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol, 40 $\mu\text{g/ml}$ X-Phosphat und 1 mM IPTG ausplattiert. Zur Selektion von Plasmiden mit integriertem TnPhoA wurden aus blauen Kolonien dieses Ansatzes die Plasmide isoliert, in *E. coli* CC118 transformiert und auf LB-Platten mit 30 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin, 25 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol, 40 $\mu\text{g/ml}$ X-Phosphat und 1 mM IPTG ausplattiert.

4.6 Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese mittels 'in vitro' synthetisierter Oligonukleotide erfolgte nach der Methode von Kunkel (1985) mit Hilfe des DNA-Einzelstrang Phagen M13mp18. Bei dieser Methode wird der zu mutagenisierende DNA-Abschnitt in die M13-DNA kloniert und im *E. coli*

Stamm BW313 unter Zugabe von Uridin zum Medium amplifiziert. BW313 besitzt einen Defekt in der dUTPase (*dut*) und Uracil-DNA-Glykosylase (*ung*) und ermöglicht dadurch einen stabilen Einbau von Uracil in die Phagen-DNA, welche als Einzelstrang aus dem Kulturüberstand isoliert werden kann. Diese uracilhaltige Einzelstrang-DNA wird als Matrize zur 'in vitro'-Synthese des Gegenstrangs mit einem Oligonukleotid mit der gewünschten Mutation benutzt. Nach Transfektion der entstandenen Doppelstrang-DNA nach *E. coli* JM109 wird durch dessen Uracil-DNA-Glykosylase der ursprüngliche uracilhaltige DNA-Strang abgebaut. Es kommt somit zu einer Anreicherung von Phagen, die den DNA-Abschnitt mit der gewünschten Mutation enthalten. Diese Methode wurde zum Austausch einzelner Basen und zur Deletion größerer DNA-Abschnitte durch 'loop out' verwendet.

Herstellung uracilhaltiger Einzelstrang-DNA: 5 ml 2YT Medium mit 0,25 µg/ml Uridin wurde mit 50 µl einer BW313 Übernachtskultur und einem Einzelplaque des entsprechenden M13-Klons beimpft und bei 37 °C geschüttelt. Nach 5-6 h wurden 3 ml des Überstands in 250 ml 2YT mit 0,25 µg/ml Uridin und 5ml BW313 überführt, 15 min bei 37°C inkubiert und darauf bei 37°C geschüttelt. Nach 5 - 6 h wurden die Kulturen zentrifugiert (JA10, 15 min, 8000 Upm, 4°C), der Überstand erneut zentrifugiert und danach zur Fällung der Phagen mit 45 ml 20 % PEG 6000, 2,5 M NaCl vermischt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Phagen wurden darauf abzentrifugiert (JA10, 15 min, 8000 Upm, 4°C) und der Niederschlag in 3 ml kaltem TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) suspendiert. Es folgte eine je zweimalige Phenol-, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- (25:24:1) und Chloroform/Isoamylalkohol- (24:1) Extraktion. Die Einzelstrang-DNA wurde mit 1/10 Volumenteilen 3 M NaAcetat, 1/10 Volumenteilen 0,1 M MgAcetat und 2 Volumenteilen Ethanol 2 h bei -70°C gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in der SpeedVac getrocknet.

Phosphorylierung von Oligonukleotiden: Die zur Mutagenese benötigten Oligonukleotide wurden an den freien 5'-Hydroxylgruppen phosphoryliert. Dazu wurden 200 pmol Oligonukleotid, 1mM ATP, 5 U T4-Polynukleotid-Kinase und 3 µl 10x T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer (NEB) in einem Gesamtvolumen von 30 µl 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde danach durch zweiminütiges Erhitzen auf 90°C gestoppt.

Mutagenesereaktion: In einem Annealingansatz wurden 0,2 pmol uracilhaltige DNA als Matrize, 10 pmol des phosphorylierten Oligonukleotids, 1 µl 10x Annealing-Puffer (500 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 200 mM Tris/HCl pH7,5) und H₂O ad 10 µl gemischt. Der Ansatz wurde in einem DNA-Thermal-Cycler (Cetus/Perkin-Elmer) 5 min auf 80°C erhitzt, über 50 min auf 30°C abgekühlt und danach mindestens 4 min bei 4°C inkubiert. In einem Kontrollansatz erfolgte die Inkubation ohne Oligonukleotid. Zur 'in vitro' Synthese des komplementären DNA-Stranges wurde der Annealing- bzw. Kontrollansatz mit 1,4 µl Synthese-Ligationspuffer (50 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 100 mM Tris/HCl pH 8,0) 1 µl 10x dNTP/ATP-Mix (je 5 mM dGTP, dATP, dTTP und dCTP und 10 mM ATP), 3 U T4-DNA-Polymerase und 1 U T4-DNA-Ligase (beide

Enzyme von Boehringer, Mannheim) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei 25°C und darauf für 2 h bei 37°C. Nach der Reaktion wurde mit TE-Puffer auf 100 µl aufgefüllt und je 10 µl zur Kontrolle auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen bzw. nach *E. coli* JM109 transformiert. Die Transformationsausbeute des Mutageneseansatzes im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Oligonukleotid sollte dabei mindestens um den Faktor 10 höher liegen. Von den erhaltenen Einzelplaques des Mutageneseansatzes wurde Einzelstrang-DNA präpariert und diese durch Sequenzierung auf die gewünschte Mutation untersucht.

Die nach dieser Methode erhaltenen mutagenisierten Abschnitte des *gfo*-Gens wurden in den Vektor pZY470 zur Komplettierung des *gfo*-Gens zurückgebracht. Die entsprechende Mutation wurde erneut durch Sequenzierung des pZY470-Derivats bestätigt.

5. Bestimmung von Enzymaktivitäten

5.1 Herstellung zellfreier Rohextrakte

Der Zellaufschluß in kleinem Maßstab erfolgte routinemäßig mittels Glasperlen und einer Kugelmühle (Retsch, Haan). Dazu wurden die jeweiligen Kulturen abzentrifugiert und mit 1/4 Volumen kaltem Puffer (40 mM K-MES, pH6,4) gewaschen. Ca. 250 mg der Feuchtzellen wurden in 500 µl Puffer suspendiert und in ein Eppendorffgefäß mit 1 g Glasperlen (Ø 0,1 - 0,25 mm) gegeben. Der Aufschluß erfolgte dann in -20°C vorgekühlten Einsätzen der Retsch-Mühle bei 100 % Leistung über 6 min. Zelltrümmer wurden 30 min bei 13000 Upm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Der Proteingehalt der Rohextrakte wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt, wobei Rinderserumalbumin als Eichsubstanz diente.

5.2 Bestimmung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase-Aktivität

Der qualitative Nachweis der GFOR-Aktivität wurde mittels Indikatorplatten nach einer abgewandelten Methode von Völler (1991) durchgeführt. Der Test beruht auf dem Nachweis der Säurebildung durch die GFOR mittels eines pH-Indikators. Die GFOR-Indikatorplatten hatten folgende Zusammensetzung:

- I. 0,4 M Glukose
0,8 M Fruktose, Aqua dest. ad 500 ml
- II. 10 mM K-MES, pH 6,4
18 g Agarose, Aqua dest. ad 500 ml

I. und II. wurden getrennt autoklaviert, auf 50°C abgekühlt und vermischt. Nach Zugabe von 2 ml 1 % Methylrot-Natriumsalz in Ethanol wurden dünne Agarplatten gegossen.

Auf diese GFOR-Indikatorplatten wurde mit sterilen Zahnstochern Zellmaterial von bis zu 50 Bakterien-Einzelkolonien aufgebracht. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde 500 µl Chloroform in den Deckel getropft, die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 30°C inkubiert. Die Glukonsäurebildung konnte bei *Z. mobilis* nach ca. 1 h, bei *E. coli* nach 3 - 6 Stunden durch

Ausbildung roter Diffusionshöfe erkannt werden. Auf die zusätzliche Ausplattierung von Glukonolactonase wurde verzichtet, da das durch die GFOR gebildete Glukonolacton sehr instabil ist und mit der Zeit spontan zur Glukonsäure hydrolysiert.

Der quantitative Test auf GFOR-Aktivität erfolgte nach der Methode von Zachariou & Scopes (1986). Der Test beruht ebenfalls auf dem Nachweis gebildeter Glukonsäure. Als pH-Indikator wird p-Nitrophenol eingesetzt.

Als Hilfsenzym wurde in Abwandlung die Glukonolactonase aus *Rhodotorula rubra* verwendet. Die Glukonolactonase aus *Z. mobilis* ist nur durch aufwendige Proteinreinigung von der GFOR zu trennen. *R. rubra* besitzt dagegen keine GFOR-Aktivität, sodaß für den Enzymtest eine lediglich angereicherte, nicht vollständig saubere Glukonolactonase eingesetzt werden kann.

Die Reaktion wurde bei 30°C durchgeführt und mit einem Shimadzu Spektralphotometer 160A bei 400 nm verfolgt. Reaktionsansatz (in 1 ml Küvetten):

	Endkonz.
0,25 ml 40 mM K-MES-Puffer, pH 6,4	10 mM
0,25 ml 1,6 M Glukose	0,4 M
0,25 ml 3,2 M Fruktose	0,8 M
23 µl p-Nitrophenol (1 mg/ml)	23 µg/ml
10 µl Glukonolactonase (500 U/ml)	5 U/ml
Aqua bidest. ad 950 - 995 ml	
mischen und bei 30°C vorinkubieren, dann Start mit	
5 - 50 µl Rohextrakt	

Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 3 - 5 min verfolgt und die Aktivität aus einem linearen Bereich der Extinktionsänderung berechnet. Die Extinktionsänderung sollte dabei zwischen 0,04 und 0,1 pro min betragen. Zur Berechnung der Aktivität wurde die Extinktionsänderung pro mMol gebildeter Säure anhand einer Eichung mit HCl bestimmt.

$$\text{Berechnung:} \quad \text{U/mg} = \frac{n * V}{t * c * v}$$

n = gebildete Säuremenge [µmol]

V = Volumen des Reaktionsansatzes [ml]

t = Zeit [min]

c = Proteinkonzentration [mg/ml]

v = Volumen an eingesetztem Rohextrakt [ml]

5.3 Bestimmung der Glukonolactonaseaktivität

Der Nachweis der Glukonolactonase-Aktivität von *Rhodotorula rubra* erfolgte ebenfalls photometrisch anhand der Säurebildung aus Glukonolacton mit p-Nitrophenol als Indikator (Zachariou & Scopes, 1986).

	Endkonz.
0,25 ml 40 mM K-MES-Puffer, pH 6,4	10 mM
100 µl 30 mM Glukonolacton	30 mM
23 µl p-Nitrophenol (1 mg/ml)	23 µg/ml
Aqua bidest. ad 950 - 995 ml	
mischen, Start mit	
5 - 50 µl Rohextrakt bzw. Probe	

Die Extinktionsabnahme des p-Nitrophenol wurde bei 400 nm über 2 min verfolgt. Die Messung erfolgte bei 30 °C. Da das Glukonolacton sehr instabil ist und spontan zu Glukonsäure hydrolysiert, mußte die Extinktionsabnahme mit einem entsprechenden Leerwert ohne Zugabe von Glukonolactonase korrigiert werden. Die Aktivität der Glukonolactonase wurde anhand einer Eichgeraden mit HCl nach der unter II.5.2 aufgeführten Gleichung berechnet.

6. Proteinchemische Methoden

6.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in 12,5%igen Polyacrylamidgelen nach einer Standardmethode (Lämmli, 1970). Vor dem Auftragen wurden die Proteine mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert.

Als Molekulargewichtsstandards wurden 'Combithek' Eichproteine (Boehringer Mannheim) oder der 'prestained marker' SDS-7B (Sigma, München) benutzt.

6.2 'Western Blot'

Der immunologische Nachweis einzelner Proteine erfolgte nach der Methode von Towbin et al. (1979). Die über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im Elektroblob-Verfahren unter Verwendung einer Trans-Blot™ Kammer (Biorad) auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Der Blot erfolgte dabei in Tris/Glycin Puffer (25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM Glycin) bei 30 V für 3 h im Kühlraum bei 4 °C. Nach Transfer der Proteine wurde die Nitrocellulosemembran zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen 1 h bei 37 °C in Lösung I geschüttelt. Darauf erfolgte die Inkubation mit den spezifischen Antikörpern über Nacht bei Raumtemperatur oder 1 h bei 37 °C. Die Antikörper wurden dazu 1:1000 in Lösung II verdünnt. Nach zweimaligem Waschen mit Lösung II (30 min)

wurde die Membran 1 h bei 37 °C mit Peroxidase-gekoppeltem Anti Kaninchen IgG (1:1000 in Lösung II) inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit Lösung II (je 30 min) entfernt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte dann durch Zugabe von Lösung III.

Lösung I: 3 % BSA Fraktion V; 0.9 % NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 7.5

Lösung II: 0.3 % BSA Fraktion V; 0.9 % NaCl; 0.1 % Tween 20; 10 mM Tris/HCl pH 7.5

Lösung III: 60 mg 4-Chlor-1-naphtol; 20 % Ethanol; 0.15 % Perhydrol; 25 mM Tris/HCl pH 7.5

Verwendete polyklonale Antikörper: Anti-GFOR (Loos et al., 1991)

Anti-PhoA (5'→3' prime Inc.[®], Boulder)

Anti-OmpA (von Dr. K.L. Schimz)

6.3 Saure kathodische Elektrophorese

Die nicht denaturierende Gelelektrophorese zum Nachweis der nativen GFOR wurde mit 10%igen 'CleanGel'-Fertiggelen und dem Nativ-Puffer-Kit pH 5,5 der Firma Pharmacia (Freiburg) in einer Horizontal-Gelelektrophorese-Apparatur (Multiphor II; LKB/Pharmacia, Freiburg) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Anreicherung der GFOR wurde der Rohextrakt verschiedener *Z. mobilis* Stämme 1:1 mit DEAE-Sephacel (äquilibriert mit 50 mM Tris/HCl pH 7,5) versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Dabei wurde der Hauptteil der Proteine mit einem pI unter 7,5 an den Anionentauscher gebunden, die GFOR verblieb im Überstand. Jeweils ca. 20 µg des im Überstand verbliebenen Proteins wurde auf die rehydratisierten Gele aufgetragen.

6.4 Lokalisierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in *E. coli* durch Trypsinverdaus

Die Lokalisierung der GFOR in *E. coli* erfolgte durch Permeabilisierung der Zellen mit anschließendem Verdau periplasmatischer Proteine durch die Protease Trypsin (Zimmermann & Wickner, 1982).

100 ml LB-Medium + 25 mg/l Chloramphenicol wurde mit 0,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5/pZY570 beimpft und 2 h bei 37 °C geschüttelt. Nach 2 h wurde bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,1 IPTG zugegeben (1 mM) und für 2 h weiterinkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 wurden 50 ml der Zellen abzentrifugiert und mit kalter 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Nach Rezentrifugation wurde das Pellet in 2 ml kalter 0,9%iger NaCl suspendiert und 2 ml Permeabilisierungspuffer (40 % Saccharose, 20 mM EDTA, 60 mM Tris/HCl pH 8,0) zugegeben. 0,5 ml dieser Suspension wurde mit 50 µl Trypsin (10 mg/ml in 0,9 % NaCl) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurden 0,5 ml der Suspension ohne Trypsinzugabe bei Raumtemperatur stengelassen. Der Verdau wurde durch Zugabe von

100 μ l Trypsin-Inhibitor (10 mg/ml in 0,9 % NaCl) gestoppt. In den Kontrollansatz wurde nach Zugabe des Trypsin-Inhibitors 50 μ l Trypsin-Lösung gegeben. Beide Proben wurden für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen mit einer 1:1 Mischung aus Saccharose/EDTA/Tris- und Trypsin-Inhibitor-Lösung gewaschen. Die Pellets wurden darauf in 200 μ l Lämmli-Probenpuffer suspendiert und 5 min bei 95 °C erhitzt. Je 50 μ l der Lösung wurde auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

6.5 Reinigung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Die Reinigung der GFOR erfolgte mit einigen Änderungen nach der von Loos (1994) beschriebenen Methode. Es wurde nach mehreren Versuchen auf das Zweiphasensystem verzichtet, da es zu einem hohen Verlust an GFOR-Aktivität kam.

420 g Feuchtzellen von *Z. mobilis* ZM6 wurden in 600 ml 10 mM K-MES pH 7,5 suspendiert. Die Zellen wurden in einer auf 2 °C vorgekühlten Glasperlenmühle (Dyno Mill, Typ KDL mit 500 ml Aufsatz, W.A. Bachofer Maschinenfabrik, Basel; Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,3 mm) aufgeschlossen. Die Mühle wurde mit 3000 Upm betrieben, wobei die Zellsuspension mit einer Geschwindigkeit von ca. 50 ml/min viermal durchgepumpt wurde. Vor dem letzten Durchgang wurde der viskosen Zellsuspension 2 mg/l DNase zugegeben. Verbleibende Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (Beckmann Zentrifuge J2-21, Rotor JA 10; 30 min, 4 °C, 8000 Upm), der Überstand dekantiert und ultrazentrifugiert (Beckmann L8-70M, Rotor Ti 45; 4 h, 4 °C, 40000 Upm).

Der Überstand wurde filtriert (8 μ m Filter) und mit einer Flußgeschwindigkeit von 2 ml/min auf eine DEAE-Sephacel Anionentauschersäule (Gelvolumen ca. 500 ml; äquilibriert mit Puffer I) gepumpt, welche mit einer CM-Sephacel Kationentauschersäule (Gelvolumen ca. 100 ml; äquilibriert mit Puffer I) verbunden war. Nach dem Auftrag wurden die Säulen mit ca. 1 l Puffer I gewaschen. Darauf wurde die Kationentauschersäule abgekoppelt und erneut mit 250 ml Puffer I gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem steigenden NaCl-Gradienten von 0 - 200 mM bei einer Flußrate von 2 ml/min und einem Gesamtvolumen von 450 ml. Die nach Aktivität vereinten Fraktionen wurden mit einer Ultrafiltrationseinheit (Amicon Inc., Beverly; YE 30 Membran) gegen Puffer II dialysiert und auf ca. 25 ml eingeeengt.

Die so erhaltene Lösung wurde mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,25 ml/min auf eine Sephacryl S-200 Gelfiltrationssäule (äquilibriert mit Puffer II) aufgetragen. Als Laufmittel diente Puffer II bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,25 ml/min. Die nach Aktivität vereinten Fraktionen wurden gegen Puffer III dialysiert (YE 30) und auf ca. 30 ml eingeeengt. Darauf erfolgte eine zweite Kationenaustausch-Chromatographie mittels einer Fraktogel-EMD-SO₃ Fertigsäule (Merck; mit Puffer III äquilibriert). Eluiert wurde mit einem steigenden NaCl-Gradienten von 0 - 150 mM bei einer Flußgeschwindigkeit von 2 ml/min.

Entsprechende Fraktionen wurden auf GFOR-Aktivität und Reinheit im SDS-Polyacrylamidgel untersucht und vereint. Es erfolgte eine Ultrafiltration (Centriprep 30; Amicon Inc., Beverly),

wobei die GFOR-Fractionen gegen Puffer IV dialysiert und auf ca. 5 ml konzentriert wurden. Die GFOR-Lösung wurde 1:1 mit sterilem Glycerin vermischt und bei -20 °C aufbewahrt.

Puffer I: 0,5 mM DTT; 10 mM K-MES pH 7,5

Puffer II: 0,5 mM DTT; 10 mM K-MES; 30 mM NaCl;
2 mM MgCl₂; 0,01 % SDS, pH 6,5

Puffer III: 0,5 mM DTT; 10 mM K-HEPES pH 7,8

Puffer IV: 1 mM DTT; 40 mM K-MES pH 6,5

Die Reinigung mutagenisierter GFOR erfolgte im Prinzip nach dem oben beschriebenen Protokoll. Es wurde von 20 - 50 g Feuchtzellen ausgegangen, die in 30 - 75 ml Puffer I suspendiert wurden. Zum Zellaufschluß wurde 20 ml Zellsuspension mit 25 ml vorgekühlten Glasperlen (Durchmesser 0,1 - 0,25 mm) in 50 ml Falcon Tubes intensiv geschüttelt (insgesamt ca. 10 min mit zwischenzeitlicher Kühlung auf Eis). Der Überstand wurde ultrazentrifugiert (s.o.) und den einzelnen Chromatographieschritten unterzogen. Auf eine Gelfiltration konnte verzichtet werden. Wegen der besseren Pufferung bei pH-Werten über 7,0, wurde in den einzelnen Puffern K-HEPES statt K-MES verwendet.

6.6 Bestimmung der carboxyterminalen Aminosäure der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Die Bestimmung der carboxyterminalen Aminosäure der GFOR erfolgte durch Verdau mit Carboxypeptidase Y (Boehringer, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Gereinigte GFOR wurde auf 50 mM Na-Citrat pH 6,0 umgepuffert und auf 16 mg/ml konzentriert. Zu 250 µl der Lösung wurde 2,5 µl 10%iges SDS pipettiert, gemischt und 5 min bei 70 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 50 µl Carboxypeptidase Y (0,4 mg/ml) zugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur inkubiert. Direkt nach Zugabe der Carboxypeptidase Y und nach bestimmten Zeitintervallen wurden 50 µl Proben entnommen, in 40%ige kalte TCA pipettiert und auf Eis gestellt. Die Proben wurden darauf abzentrifugiert und der Überstand mittels 'reversed phase HPLC' auf Aminosäuren untersucht. Für die Analyse wurden die Aminosäuren automatisch einer Vorsäulenderivatisierung mit o-Phtalaldehyd unterzogen. (Vorsäule: Lichrosorb RP-18; Hauptsäule Lichrospher RP 18; Eluenten: 0,1 M Natriumacetat pH 7,2/ Methanol; Flußrate 0,5 ml/min). Flüssigchromatograph (HP1090) und UV-Detektor (HP1046) stammten von der Firma Hewlett Packard. Steuerung und Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit einem Personal Computer (Vectra 486/33; Software HP Chem. Station, Hewlett Packard).

6.7 Anreicherung der Glukonolactonase aus *Rhodotorula rubra*

Die für die quantitative Bestimmung der GFOR-Aktivität notwendige Glukonolactonase wurde aus *Rhodotorula rubra* (DSM 70403) isoliert.

Dazu wurden 300 g Feuchtzellen in 350 ml Puffer I suspendiert und wie unter II.6.5 beschrieben aufgeschlossen, abzentrifugiert und ultrazentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde mit ca. 300 ml DEAE-Sephacel (äquilibriert mit Puffer I) versetzt und 1 h auf Eis gerührt. Die Suspension wurde in einem großen Büchnertrichter abgenutscht und mehrmals mit Puffer II gewaschen. Das proteinbeladene DEAE-Sephacel wurde dann in geeigneter Verdünnung in eine Säule gefüllt und das gebundene Protein mit einem NaCl-Gradienten (100 - 350 mM) eluiert. Das Protein der nach Aktivität vereinten Fraktionen wurde mit 80 % Ammoniumsulfat gefällt, abzentrifugiert und bei 4 °C aufbewahrt.

Puffer I: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mg DNase;

2 mM Mercaptopropandiol; 0,2 mM PMSF

Puffer II: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 5 mM Mercaptopropandiol; 100 mM NaCl

7. *In vivo* ³⁵S-Methionin Markierung und Immunfällung ('pulse-chase')

Der Export der GFOR in *E. coli* und *Z. mobilis* wurde anhand der Prozessierung im 'pulse-chase' Experiment untersucht. Die Markierung von Proteinen mit nachfolgender Fällung durch einen spezifischen Antikörper erfolgte nach den Vorschriften von Gebert et al. (1988), Ito et al. (1981) und Shuman et al. (1980). Folgende Lösungen wurden benötigt:

'chase' Lösung: 1 ml L-Methionin (20 mg/ml), 50 µl Chloramphenicol (40 mg/ml in 50 % Ethanol)

Lysepuffer 1: 2 % SDS, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8.0

Lysepuffer 2: 2 % Triton X-100, 0,15 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8.0

Waschpuffer 1: 1 % Triton X-100, 1 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0

Waschpuffer 2: 0,1 % SDS, 0,5 M LiCl, 50 mM Tris HCl pH 8.0

Waschpuffer 3: 50 mM Tris/HCl pH 8.0

E. coli:

4 ml *E. coli* MM-Medium (+ Thiamin, + Glycerin, + Met Assay Medium) wurden mit 100 µl einer MM-Übernachtskultur beimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,25 geschüttelt. Vor der Markierung wurden die Kulturen mit Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 in einem Volumen von 2 ml eingestellt (große Eppendorfgefäße) und bei 30 °C inkubiert. Je nach Versuchsansatz wurde für 2 min mit 1mM IPTG induziert. Die Markierung erfolgte mit jeweils 3,5 µl ³⁵S-L-Methionin (10µCi/µl; Amersham Buchler, Braunschweig) bei 30 °C. Nach einer Minute wurden 52µl 'chase'-Lösung zugegeben. Je nach Versuchsanordnung wurden zur Inhibierung der Translokation kurz vor dem 'chase' (10 - 30 s) 3 mM Natriumazid bzw. 0,1 mM

CCCP hinzugefügt. Zu den jeweiligen 'chase'-Zeiten wurden je 0,5 ml des Markierungsansatzes in 0,15 ml kalte 40%ige TCA pipettiert, gevortext und auf Eis gestellt.

Die Fällung der Proteine erfolgte über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C. Nach Zentrifugation (30 min, 13000 Upm, 4 °C) wurden die Pellets mit 1 ml Aceton (-20 °C) gewaschen und in der Speed Vac 5 Minuten getrocknet. Die Niederschläge wurde darauf sorgfältig in 30 µl Lysepuffer 1 suspendiert und 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach Zugabe von je 970 µl Lysepuffer 2 wurden verbliebene Zelltrümmer abzentrifugiert (30 min, 10000 Upm, 4 °C) und der Überstand vorsichtig in jeweils ein neues Eppendorf-Gefäß dekantiert.

Zur Immunpräzipitation wurden je 10 µl des jeweiligen Antikörpers zugegeben und 2 h bei 30 °C inkubiert. Die Fällung des Antigen-Antikörper Komplexes erfolgte mit je 100 µl fixierten *Staphylococcus aureus* Zellen (Pansorbin, 10 % w/v; Calbiochem) für 1 h auf Eis mit mehrmaligem Schütteln. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in Folge mit jeweils 0,5 ml Waschpuffer 1, 2 und 3 gewaschen und schließlich in je 30 µl 2x-Lämmli-Puffer suspendiert und bei 95 °C für 5 min erhitzt. Nach Zentrifugation wurde der gesamte Probenüberstand auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde nach dem Lauf für eine Stunde fixiert (Methanol, H₂O, Essigsäure, 45:45:10) und anschließend für 30 min in 'Amplify' (Amersham Buchler GmbH, Braunschweig) geschüttelt. Nach Trocknung des Gels unter Vakuum erfolgte die Exposition eines Röntgenfilms (Kodak, XAR-5) bei -70°C.

***Z. mobilis*:**

Folgende Änderungen zu der oben beschriebenen Methode erwiesen sich als notwendig zur effizienten *in vivo* ³⁵S-Met-Markierung von *Z. mobilis* Zellen:

4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *Z. mobilis* ACM3963 in MM-Medium (10% Glukose, + Met-Assay-Medium) mit einer OD₆₀₀ von 0,25 wurde mit 7 µl ³⁵S-L-Met (10 µCi/µl) über 5 Minuten markiert. Je nach Versuchsansatz wurde vor der Markierung für 5 min mit 1mM IPTG induziert. Der 'chase' erfolgte mit 104 µl 'chase'-Lösung. Zu den jeweiligen 'chase'-Zeiten wurden 1 ml Proben entnommen und in 300 µl 40%ige kalte TCA pipettiert. Nach der Proteinfällung und dem Waschen mit Aceton wurde der Niederschlag zunächst in 10 µl 100 mM Na₂CO₃ gelöst, wodurch noch verbliebene TCA neutralisiert und die nachfolgende Lyse der Zellen verbessert wurde.

Da die Markierung von *Z. mobilis* CP4 im Vergleich zu ACM3963 deutlich schlechter war, wurden dem Markierungsansatz von CP4 jeweils 1,5 ml Proben entnommen und aufgearbeitet.

8. Denaturierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase und Fluoreszenzspektroskopie

Zur Denaturierung und fluoreszenzspektroskopischen Analyse wurden 6 mg/ml gereinigte GFOR mittels Ultrafiltration (Centriprep 30; Amicon Inc., Beverly) auf 25 mM Na-Phosphat, pH 6,4 umgepuffert. Zur Oxidation bzw. Reduktion des enzymgebundenen NADP wurden 75 µl der

GFOR Lösung mit 25 μ l 1,6 M Glukose bzw. 3,2 M Fruktose 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Denaturierung der GFOR erfolgte mit 6 M Guanidin-Hydrochlorid, 25 mM Na-Phosphat, pH 6,4 bzw. 8 M Harnstoff, 25 mM Na-Phosphat, pH6,4 mit einer GFOR-Endkonzentration von 30 μ g/ml. Die Fluoreszenzspektren wurden in einem Spex Fluoro Max™ (Spex Industries Inc., Edison N.J.) bei 20 °C bzw. einem AMINCO SPF-500 (American Instr. Comp., Maryland) Spekralfuorometer bei Raumtemperatur aufgenommen. Es wurde jeweils das Differenzspektrum aus der Probe und einer Blindprobe mit Puffer ohne GFOR berechnet.

Zum Nachweis der NADP-Ablösung nach Denaturierung der GFOR wurden 100 μ l mit Glukose reduzierter GFOR (4,5 mg/ml) mit 900 μ l 6,7 M Guanidin-HCl, 25 mM Na-Phosphat, pH6,4 versetzt und 30 min bei 30 °C inkubiert. In einem Kontrollansatz wurde die GFOR nur mit Na-Phosphat-Puffer ohne Guanidin-HCl verdünnt. Die Proben wurden darauf mittels Centricon 30 (30 kDa 'cut off'; Amicon Inc., Beverly) ultrafiltriert. Das Filtrat und der Überstand wurden fluorometrisch bei Anregungswellenlängen von 280 nm und 340 nm auf Protein- und NADPH-Gehalt untersucht.

III. Ergebnisse

1. Untersuchungen zur physiologischen Funktion der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden, daß Sorbit einen positiven Einfluß auf das Wachstum von *Z. mobilis* bei hohen Glukose- oder Fruktosekonzentrationen hat, und daß *Z. mobilis* ein spezielles Transportsystem für die cytoplasmatische Akkumulation von Sorbit besitzt (Loos, Dissertation 1994; Loos et al., 1994c). Die physiologische Funktion der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) war dabei offensichtlich die Bereitstellung von Sorbit als 'compatible solute'. Dies sollte nun durch die Untersuchung von GFOR-Defektmutanten bewiesen werden.

1.1 Charakterisierung des *Z. mobilis* Stammes ACM3963

Z. mobilis ACM3963 ist ein physiologisch nicht näher charakterisierter Stamm, der bei Wachstum in Medium mit Saccharose als Kohlenstoffquelle kein Sorbit mehr bildete (Kirk & Doelle, 1993). Es war bislang nicht gezeigt worden, ob es sich bei diesem Stamm möglicherweise um eine GFOR-Defektmutante handeln könnte. *Z. mobilis* ACM3963 wurde deshalb hinsichtlich der GFOR-Aktivität und der Ausbildung von GFOR-Protein untersucht.

Es zeigte sich, daß ACM3963 auf Indikatorplatten und im photometrischen Test keine GFOR-Aktivität aufwies (s. Tab. 6). Um festzustellen, ob die fehlende enzymatische GFOR-Aktivität auf einen Verlust an GFOR-Protein zurückzuführen war, wurden die Proteine des zellfreien Rohextrakts von *Z. mobilis* ACM3963 über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot immunologisch mit spezifischen GFOR-Antikörpern auf den GFOR-Gehalt untersucht. Es zeigte sich, daß mit Rohextrakt aus Zellen von ACM3963 im Western Blot nur eine sehr schwache GFOR-spezifische Bande sichtbar war (s. Abb. 5, Spur 1). Da der offensichtliche GFOR-Defekt von *Z. mobilis* ACM3963, außer aus einer Mutation im Gen der GFOR (*gfo*), z.B. auch aus einem Regulationsdefekt resultieren konnte, wurde versucht, den GFOR-Defekt von *Z. mobilis* ACM3963 durch Einbringung des klonierten *gfo*-Gens aufzuheben. Das klonierte *gfo*-Gen lag dazu auf dem *E. coli* / *Z. mobilis* Pendelvektor pSUP104 vor (pZY412; Völler, 1991) und wurde mittels der entsprechenden *E. coli* S17-1 Stämme über Konjugation nach *Z. mobilis* ACM3963 gebracht. Die resultierende Transkonjugante ACM3963/pZY412 zeigten eine Komplementation des GFOR-Defekts im Vergleich zum Kontrollstamm ACM3963/pSUP104 (s. Tab. 6 und Abb. 5), womit bewiesen wurde, daß es sich bei *Z. mobilis* ACM3963 um einen GFOR-negativen Stamm mit einem Defekt im chromosomal kodierten *gfo*-Gen handelte.

Tab. 6: Spezifische Aktivität der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) in zellfreien Rohextrakten verschiedener rekombinanter *Z. mobilis* Stämme bezogen auf das Gesamtzellprotein. Die Anzucht erfolgte über Nacht in Vollmedium mit 10 % Glukose und 30 mg/l Tetrazyklin. Die dargestellten Aktivitäten sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Ansätzen. ACM3963: Spontanmutante, die bei Wachstum auf Saccharose kein Sorbit bildete; CP4: Wildtypstamm; pSUP104: Kontrollplasmid; pZY412: Plasmid mit kloniertem Gen der GFOR. n.n.: nicht nachweisbar.

	Stamm	GFOR-Aktivität [U/mg]
1.	ACM3963	n.n.
2.	ACM3963 /pSUP104	n.n.
3.	ACM3963 /pZY412	22
4.	CP4 /pSUP104	2,0

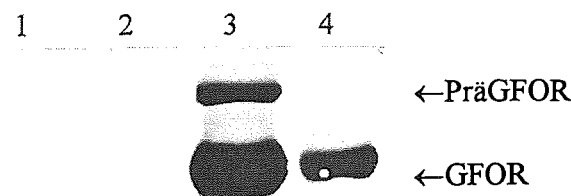


Abb. 5: 'Western Blot' mit spezifischen Antikörpern zum Nachweis der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in zellfreien Rohextrakten verschiedener *Z. mobilis* Stämme (s.Tab. 6). Es wurde jeweils 50 µg Gesamtzellprotein aufgetragen. Spuren 1-4: siehe Numerierung in Tabelle 6.

1.2 Wachstum der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase-Defektmutante *Z. mobilis* ACM3963 bei hohen Zuckerkonzentrationen

In Medium mit mehr als 15 % Glukose hatte zum Kulturmedium zugegebenes Sorbit einen deutlich positiven Einfluß auf das Wachstum von *Z. mobilis* ZM6. Es war daher anzunehmen, daß das bei Wachstum auf hohen Saccharosekonzentrationen durch die GFOR gebildete Sorbit als osmoprotektive Substanz wirkt (Loos et al., 1994c).

Eine GFOR-Defektmutante sollte bei Kultivierung in Medium mit hoher Glukose/Fruktose- bzw. hoher Saccharose-Konzentration zumindest mit einer verlängerten Adaptations-Phase wachsen, da bei fehlender GFOR-Aktivität vermutlich kein Sorbit gebildet werden kann. Dieses langsamere Wachstum sollte durch das klonierte *gfo*-Gen aufgehoben werden können.

Um diese physiologische Funktion der GFOR zu beweisen, wurde das Wachstum der GFOR-Defektmutante *Z. mobilis* ACM3963 und der Mutante mit dem klonierten *gfo*-Gen (ACM3963/pZY412) bei hohen Zuckerkonzentrationen untersucht.

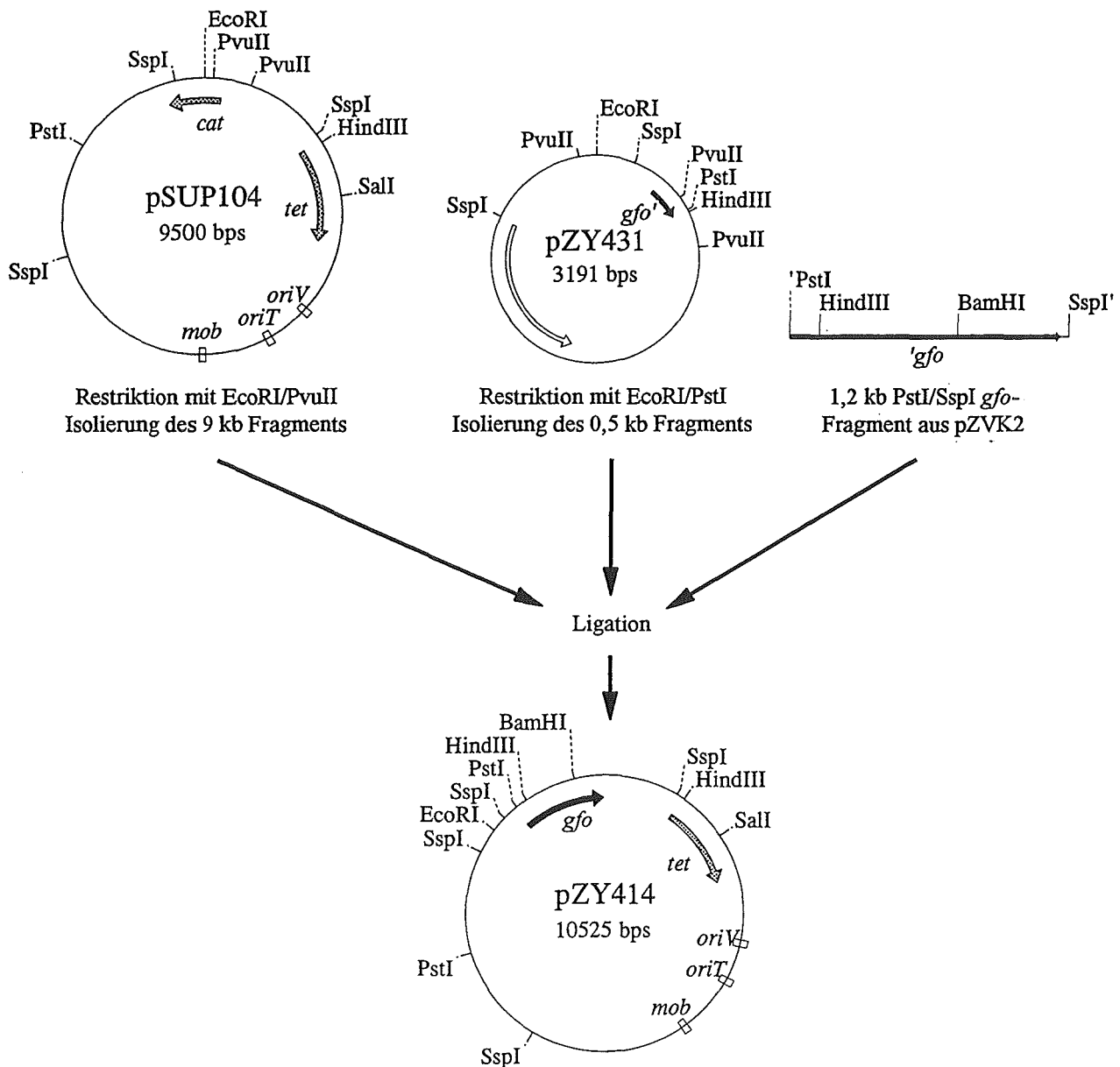


Abb. 6: Schema der Konstruktion des Plasmids pZY414 zur moderaten Expression des *gfo*-Gens in *Z. mobilis* ACM3963. Es erfolgte eine Ligation mit drei Fragmenten. Das 0,5 kb *EcoRI*/*PstI*-Fragment aus pZY431 trägt das 5'-Ende des *gfo*-Gens mit nur dem proximalen der beiden *gfo*-Promotoren. In gleicher Weise wurde das Plasmid pZY414DEL3 konstruiert, bei dem der auf dem 0,5 kb- *EcoRI*/*PstI*- Fragment kodierende *gfo*-Genbereich des hydrophoben Teils der Signalsequenz über M13-Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese deletiert worden war.

cat: Gen für Chloramphenicoltransacetylase; *bla*: Gen für β -Lactamase; *tet*: Tetrazyklin-Resistenzgen; *gfo*: Gen der GFOR; *gfo'*: 5'-Ende des *gfo*-Gens; '*gfo*': 3'-Ende des *gfo*-Gens; *mob*: Erkennungsstelle für RP4 spezifische Transferfunktionen; *oriT*: Replikationsursprung für den Transfer; *oriV*: vegetativer Replikationsursprung.

Es wurde festgestellt, daß ACM3963/pZY412 in Vollmedium mit Konzentrationen von 10 % Glukose/ 10 % Fruktose im Vergleich zu ZM6/pSUP104 über einen Zeitraum von 8 Tagen nicht anwuchs. Um auszuschließen, daß dieser Wachstumsdefekt auf einen zusätzlichen Stress durch

die hohe GFOR-Expression zurückzuführen war, mußte eine geringere Expression des klonierten *gfo*-Gens in *Z. mobilis* ACM3963 erreicht werden. Deshalb wurde das Plasmid pZY414 verwendet (Konstruktion s. Abb. 6), welches im Gegensatz zu pZY412 das *gfo*-Gen mit nur einem der beiden beschriebenen *gfo*-Promotoren (Kanagasundaran & Scopes, 1992) trägt.

Im Enzymtest und Western Blot zeigte *Z. mobilis* ACM3963/pZY414 GFOR-Aktivitäten und -Proteinmengen, die mit *Z. mobilis* ZM6 oder CP4 vergleichbar waren (s. Tab. 7 und Abb. 7).

Tab. 7: Spezifische Aktivität der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) in zellfreien Rohextrakten verschiedener *Z. mobilis* Stämme bezogen auf das Gesamtzellprotein. Die Anzucht erfolgte über Nacht in Vollmedium mit 10 % Glukose und 30 mg/l Tetrazyklin. Die dargestellten Aktivitäten sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Ansätzen. ACM3963: GFOR-Defektmutante; ZM6: Wildtypstamm; pSUP104: Kontrollplasmid; pZY414: Plasmid mit kloniertem Gen der GFOR; pZY414DEL3: Plasmid mit kloniertem Gen der GFOR mit Deletion im Bereich der Signalsequenz. n.n.: nicht nachweisbar.

	Stamm	GFOR-Aktivität [U/mg]
1.	ACM3963 / pSUP104	n.n.
2.	ACM3963 / pZY414	2,0
3.	ACM3963 / pZY414DEL3	1,9
4.	ZM6 / pSUP104	2,2

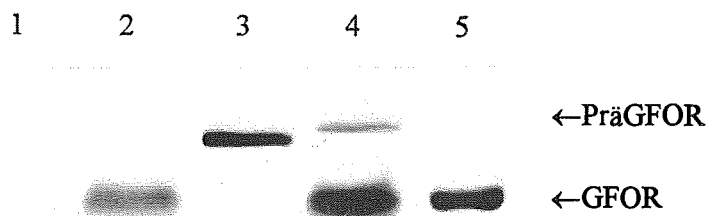


Abb. 7: Western Blot mit spezifischen Antikörpern zum Nachweis der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) in zellfreien Rohextrakten verschiedener *Z. mobilis* Stämme. Es wurde jeweils 50 µg Gesamtzellprotein aufgetragen. Spuren 1 - 4: siehe Numerierung in Tabelle 7; 5: gereinigte GFOR

Es wurden Wachstumsversuche mit *Z. mobilis* ACM3963/pSUP104 (GFOR-Defektmutante mit Kontrollvektor) und ACM3963/pZY414 (GFOR-Defektmutante mit kloniertem *gfo*-Gen) im Vergleich zu *Z. mobilis* ZM6/pSUP104 (Wildtypstamm mit Kontrollvektor) in Vollmedium mit 12,5 % Glukose/ 12,5 % Fruktose (entspricht jeweils 0,7 M) bzw. Vollmedium mit 30 % Saccharose (0,83 M) durchgeführt. Die Konzentration von 12,5 % Glukose/ 12,5 % Fruktose wurde gewählt, da *Z. mobilis* ZM6 bei einem gleichen osmotischen Stress (25 % Glukose) ohne Sorbitzugabe mit einer deutlich verlängerten Adaptations-Phase anwuchs (Loos et al., 1994). Die Sorbitbildung durch GFOR-Aktivität müßte sich bei diesen Konzentrationen also positiv auf das

Wachstum auswirken. Bei Verwendung von Saccharose im Medium kann der osmotische Stress für *Z. mobilis* nicht genau bestimmt werden. In 'Batch'-Fermentationen mit *Z. mobilis* kommt es durch die Aktivität der extrazellulären Invertase und Levansucrase zu einer schnellen Hydrolyse von Saccharose, sodaß die Glukose- und Fruktose-Konzentrationen zunächst sprunghaft ansteigen (Lee et al., 1981). Saccharose wurde aus diesem Grund mit 30 % (0,83 M) im Vergleich zum Glukose/Fruktose Gemisch (gesamt 1,4 M) in einer geringeren Osmolarität eingesetzt.

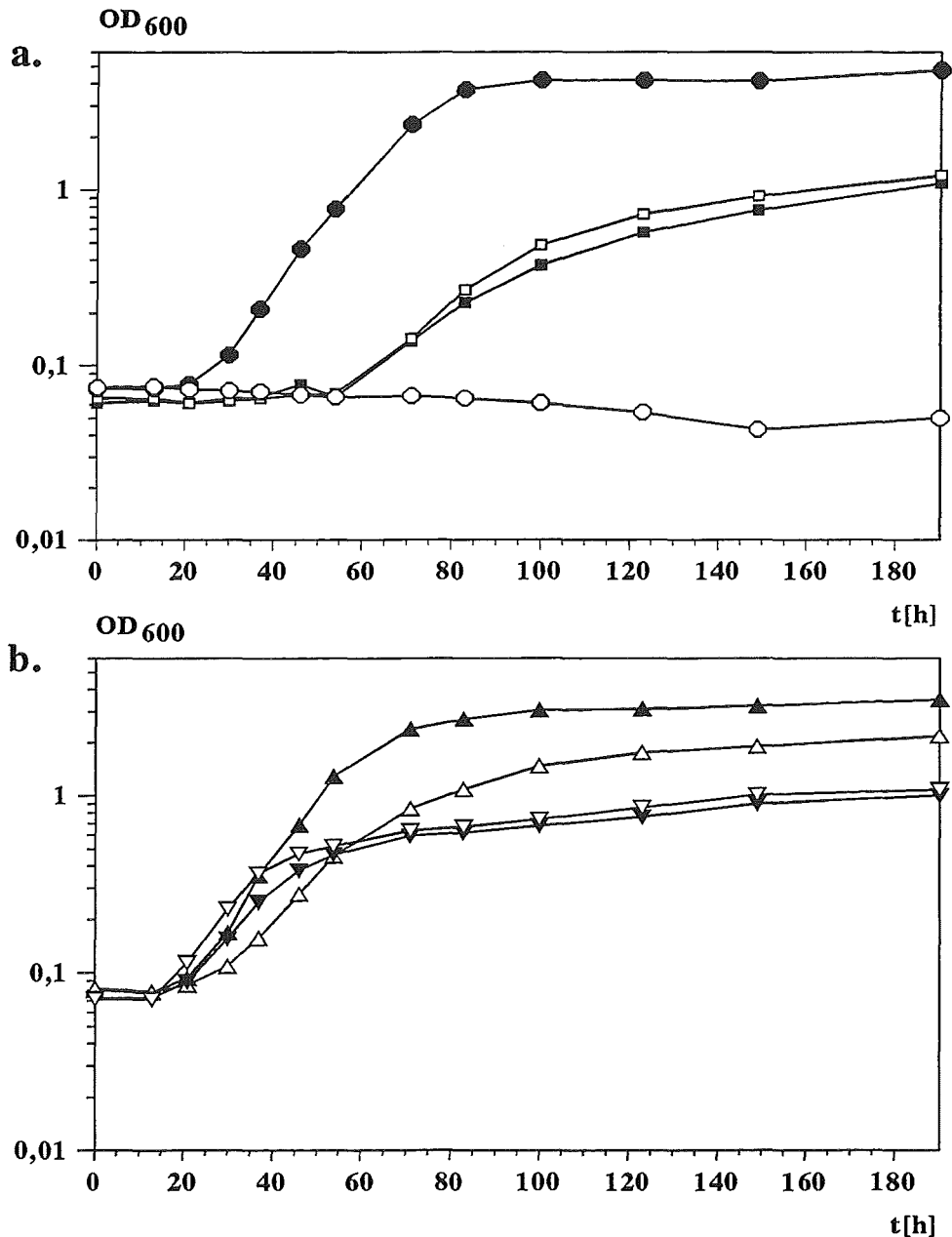


Abb. 8: Wachstum verschiedener rekombinanter Stämme von *Z. mobilis* in Vollmedium mit 12,5 % Glukose und 12,5 % Fruktose. ACM3963: Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) Defektmutante, ZM6: Wildtypstamm. pSUP104: Kontrollplasmid; pZY414: kloniertes Gen der GFOR; pZY414DEL3: kloniertes Gen der GFOR mit Deletion in der Signalsequenz. Geschlossene Symbole: Zugabe von 50 mM Sorbit zum Medium.

a.: ○ : ACM3963/pSUP104; □ : ACM3963/pZY414
b.: △ : ACM3963/pZY414DEL3; ▽ : ZM6/pSUP104

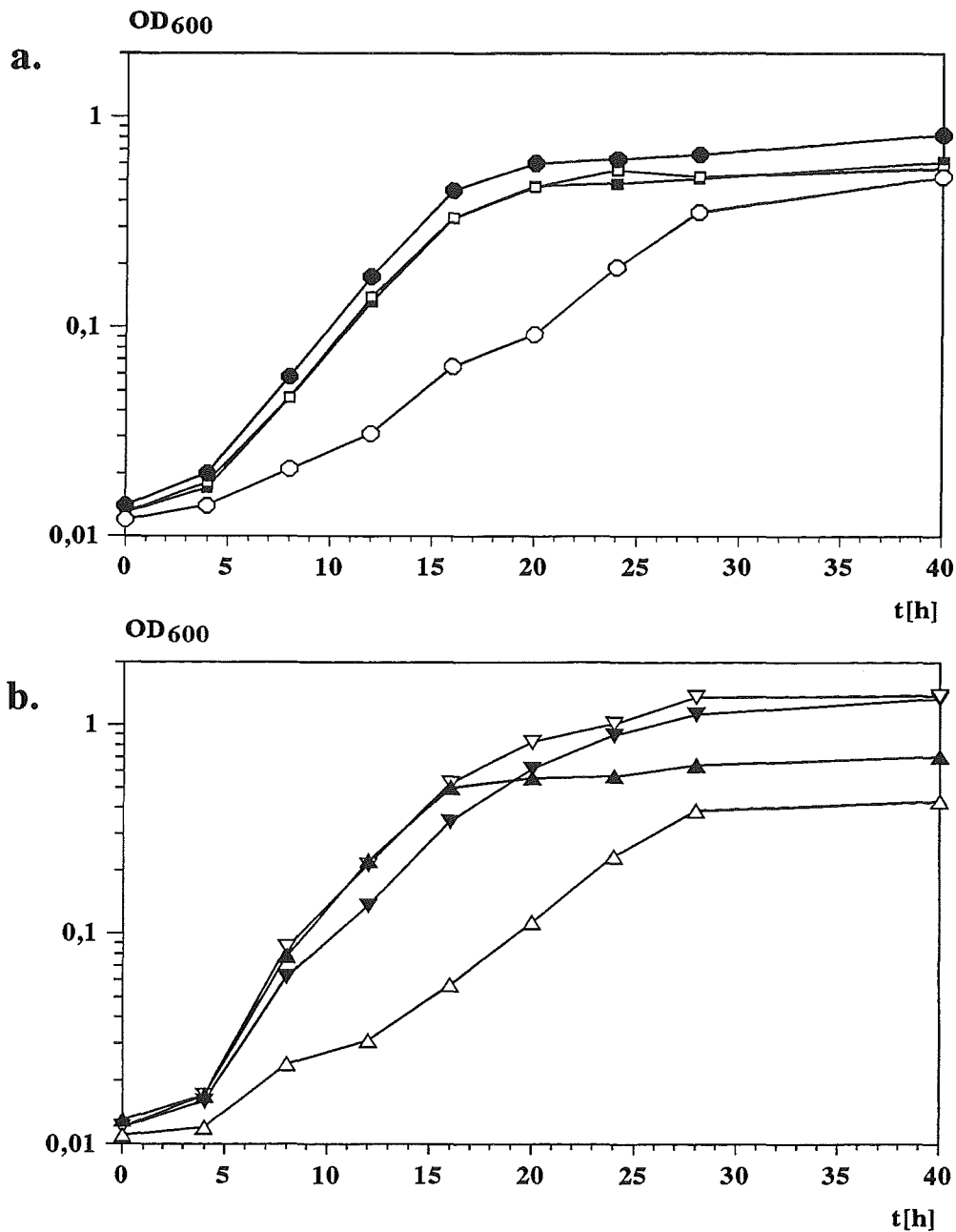


Abb. 9: Wachstum verschiedener rekombinanter Stämme von *Z. mobilis* in Vollmedium mit 30 % Saccharose. ACM3963: Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) Defektmutante, ZM6: Wildtypstamm. pSUP104: Kontrollplasmid; pZY414: kloniertes Gen der GFOR; pZY414DEL3: kloniertes Gen der GFOR mit Deletion in der Signalsequenz. Geschlossene Symbole: Zugabe von 50 mM Sorbit zum Medium.

a.: ○ : ACM3963/pSUP104; □ : ACM3963/pZY414

b.: △ : ACM3963/pZY414DEL3; ▽ : ZM6/pSUP104

Das Wachstum wurde anhand der OD₆₀₀ bestimmt. Am Ende der Versuche wurde der Sorbitgehalt im Kulturüberstand gemessen. Die Ergebnisse von jeweils zwei unabhängigen Wachstumsexperimenten sind in Abb. 8 und 9 und Tab. 8 wiedergegeben.

Es wurde deutlich, daß ACM3963/pSUP104 in Vollmedium mit 12,5 % Glukose/ 12,5 % Fruktose nur bei Supplementation mit 50 mM Sorbit wachsen konnte und hierbei nicht in der Lage war, zusätzliches Sorbit zu bilden (s. Tab. 8). Die GFOR-Defektmutante mit dem klonier-

ten *gfo*-Gen (ACM3963/pZY414) zeigte beim Wachstum in Vollmedium mit 12,5 % Glukose/ 12,5 % Fruktose zwar eine verlängerte Adaptations-Phase, wuchs aber dann auch ohne zusätzliches Sorbit im Medium und hatte am Ende des Versuchs durch die plasmidkodierte GFOR-Aktivität ca. 60 mM Sorbit im Kulturüberstand gebildet. Auffällig war, daß *Z. mobilis* ACM3963/pSUP104 bei Sorbitzugabe im Vergleich zu *Z. mobilis* ACM3963/pZY414 und ZM6/pSUP104 eine insgesamt höhere OD₆₀₀ erreichte (Abb. 8).

In Vollmedium mit 30 % Saccharose wuchs *Z. mobilis* ACM3963/pSUP104 auch ohne Sorbitzugabe, was durch den geringeren osmotischen Wert dieses Mediums erklärt werden kann. Im Vergleich zum Wachstum mit Sorbitzugabe bzw. zu *Z. mobilis* ACM3963/pZY414 war die Wachstumsrate jedoch deutlich geringer (Abb. 9). *Z. mobilis* ACM3963/pZY414 bildete bei Wachstum in Vollmedium mit 30 % Saccharose deutlich weniger Sorbit (ca. 5 mM) als *Z. mobilis* ZM6/pSUP104 (ca. 117 mM) (Tab. 8), was auf mögliche Unterschiede in der GFOR-Aktivität oder aber in der Invertase- oder Levansucrase-Aktivität deutet.

Tab. 8: Sorbitkonzentration in mM im Kulturüberstand nach Ende der Wachstumsversuche mit verschiedenen rekombinanten Stämmen von *Z. mobilis* in Vollmedium mit 12,5 % Glukose/ 12,5 % Fruktose bzw. 30 % Saccharose. ACM3963: Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) Defektmutante, ZM6: Wildtypstamm. pSUP104: Kontrollplasmid; pZY414: kloniertes Gen der GFOR; pZY414DEL3: kloniertes Gen der GFOR mit Deletion in der Signalsequenz. Die Sorbitkonzentration wurde enzymatisch mittels Sorbitdehydrogenase bestimmt. +: 50 mM Sorbit im Medium; n.n.: nicht nachweisbar.

Stamm	12,5 % Glukose/ 12,5 % Fruktose	30 % Saccharose
ACM3963/pSUP104	n.n.	n.n.
ACM3963/pSUP104 +	51,2 ± 0,1	47,0 ± 3,8
ACM3963/pZY414	61,8 ± 0,1	4,8 ± 0,5
ACM3963/pZY414 +	108,8 ± 1,2	56,1 ± 2,3
ACM3963/pZY414DEL3	11,7 ± 0,4	0,3 ± 0,02
ACM3963/pZY414DEL3 +	62,4 ± 1,5	53,6 ± 2,3
ZM6/pSUP104	142,7 ± 0,3	117,1 ± 5,8
ZM6/pSUP104 +	184,0 ± 3,2	178,0 ± 0,2
(Medium +	51,0 ± 0,5	47,7 ± 0,3)

Zusammengefaßt zeigt der Vergleich des Wachstums des GFOR negativen Stamms *Z. mobilis* ACM3963/pSUP104 mit den GFOR positiven Stämmen *Z. mobilis* ACM3963/pZY414 (kloniertes *gfo*-Gen) und *Z. mobilis* ZM6/pSUP104 (chromosomal kodiertes *gfo*-Gen) bei Kultivierung ohne Sorbitzugabe deutlich, daß die GFOR-Aktivität zur Sorbitbildung notwendig ist und das die Sorbitbildung das Wachstum bei hohen Zuckerkonzentrationen ermöglicht bzw. verbessert.

1.3 Auswirkung einer cytoplasmatischen Lokalisierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase auf das Wachstum bei hohen Zuckerkonzentrationen

Der Grund für die periplasmatische Lokalisierung der GFOR kann sein, daß, bedingt durch die geringere Affinität des Glukosefacilitators für Fruktose (Weißer et. al, 1995), nur im Periplasma ausreichend hohe Fruktosekonzentrationen zur effektiven Sorbitbildung vorhanden sind. Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, wurde das Wachstumsverhalten einer cytoplasmatischen GFOR-Variante bei hohen Zuckerkonzentrationen untersucht. Die cytoplasmatische GFOR-Variante wurde mittels Oligonukleotid-gerichteter Mutagenese durch Deletion des hydrophoben Bereichs der GFOR-Signalsequenz hergestellt (vergl. III.3.2). Der hydrophobe Bereich einer Signalsequenz ist essentiell für die Membraninsertion der Signalsequenz und damit zur Translokation des Exportproteins. Deletionen innerhalb dieses hydrophoben Bereichs verursachen einen Translokationsdefekt des jeweiligen Proteins (Gennity et al., 1990).

Es wurde ein Plasmid hergestellt (pZY414DEL3) das, bis auf die definierte Deletion des für den hydrophoben Signalsequenzbereich kodierenden *gfo*-Genabschnitts, mit pZY414 identisch war (s. Abb. 6). Die GFOR-Defektmutante *Z. mobilis* ACM3963 zeigte nach Einbringung des Plasmids pZY414DEL3 eine ähnliche GFOR-Aktivität wie ACM3963/pZY414 (s. Tab. 7). Im Western-Blot war nur eine Bande des verkürzten GFOR-Vorstufenproteins sichtbar und keine reife GFOR (s. Abb. 7). Das Unterbleiben der Prozessierung des Vorstufenproteins war dabei ein guter Hinweis für die cytoplasmatische Lokalisierung.

Das Wachstum von ACM3963/pZY414DEL3 auf hohen Zuckerkonzentrationen wurde parallel zu den unter III.1.2 beschriebenen Wachstumsexperimenten mit den gleichen Bedingungen untersucht. Es zeigte sich, daß ACM3963/pZY414DEL3 auf Vollmedium mit 12,5 % Glukose/ 12,5 % Fruktose auch ohne Supplementation mit Sorbit wachsen konnte, jedoch mit einer geringeren Wachstumsrate (s. Abb. 8). Am Ende des Wachstumsversuchs hatte ACM3963/pZY414DEL3 nur ca. 20 % der Sorbitmenge von ACM3963/pZY414 produziert (s. Tab. 8). Auf Vollmedium mit 30 % Saccharose zeigte ACM3963/pZY414DEL3 ohne Sorbitzugabe eine ähnlich verminderte Wachstumsrate wie ACM3963/pSUP104 und hatte im Medium nur 0,3 mM Sorbit gebildet (s. Tab. 8).

Die periplasmatische Lokalisierung der GFOR ist damit essentiell für eine effektive Sorbitbildung.

2. Expression des Gens der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in *E. coli* und *Z. mobilis*

Das ursprünglich von Kanagasundaram & Scopes (1992) isolierte Gen der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (*gfo*-Gen) lag auf den Vektoren pZVK2 (Kanagasundaram & Scopes, 1992), pZY421 und pZY412 (beide M. Völler, 1991) vor.

Um die molekulargenetischen Untersuchungen zum GFOR-Export und zur NADP-Bindstelle durchführen zu können, sollte das 1,3 kb *gfo*-Gen umklontiert werden.

Dabei wurden mehrere Anforderungen an das zu konstruierende Plasmid gestellt. Zunächst sollte eine Expression des *gfo*-Gens in *E. coli* ermöglicht werden, da die Expression des *gfo*-Gens in *E. coli* bislang erfolglos (Kanagasundaram & Scopes, 1992) bzw. so niedrig war, daß geringe Mengen der GFOR nur im Western Blot, nicht aber im Enzymtest, nachgewiesen werden konnten (Völler, 1991). Zur Vereinfachung der Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese und anderer Klonierungen sollten auf dem Plasmid viele Restriktionsschnittstellen des *gfo*-Gens singulär bleiben. Außerdem sollte das Plasmid einfach zu sequenzieren sein und das *gfo*-Gen sollte von diesem Plasmid in einen Pendelvektor kloniert werden können, der einen Transfer mutierter *gfo*-Allele nach *Z. mobilis* erlaubte.

Da kein Plasmid mit geeigneten Schnittstellen zur Verfügung stand, wurde die singuläre SspI-Schnittstelle des Plasmids pUC18 durch Insertion eines NotI-Linkers entfernt und durch komplementäre Oligonukleotide eine neue multiple Klonierstelle in den EcoRI/HindIII linearisierten pUC18 eingefügt. In das resultierende Plasmid (pTW18) wurde das *gfo*-Gen als SspI-Fragment aus pZVK2 (Kanagasundaram & Scopes, 1992) kloniert (s. Abb. 10).

Mit dem erhaltenen Plasmid pZY470 mit dem *gfo*-Gen in Leserichtung des *lac*-Promotors wurde in *E. coli* eine GFOR-Aktivität von bis zu 2 U/mg Gesamtprotein erreicht. Von diesem Plasmid konnte das *gfo*-Gen als Kassette in den Vektor pZY507 (Schilz, 1993) kloniert werden. Das Plasmid pZY507 ist ein Derivat des Pendelvektors pSUP104 (Simon et al., 1983) und kann durch Konjugation nach *Z. mobilis* übertragen werden. Neben einer Chloramphenicolresistenz trägt pZY507 den *tac*-Promotor und das Gen des *lac*-Repressors (*lacI^q*). Gene, die in Leserichtung des *tac*-Promotors kloniert werden, können auch in *Z. mobilis* durch den Zusatz von IPTG zum Medium in ihrer Expression reguliert werden (Schilz, 1993). Das *gfo*-Gen wurde als SacI/SalI-Fragment in die singulären SacI/SalI-Schnittstellen von pZY507 kloniert (s. Abb. 10). Der resultierende Vektor pZY570 besaß den großen Vorteil, daß durch den starken *tac*-Promotor eine Expression des *gfo*-Gens sowohl in *E. coli* als auch in *Z. mobilis* erfolgte (s. Tab. 9) und deshalb Untersuchungen in beiden Organismen mit dem gleichen Vektorhintergrund zuließ. In *Z. mobilis* wurde mit pZY570 nach IPTG-Induktion eine ca. 30 Mal höhere GFOR-Aktivität als mit dem gleichen Vektor in *E. coli* gemessen (s. Tab. 9).

Western Blots machten deutlich, daß die geringere GFOR-Aktivität in *E. coli* DH5/pZY570 bezogen auf das Gesamtzellprotein aus einer geringeren GFOR-Proteinmenge resultierte (s. Abb. 11). Zudem zeigte sich hier, daß in *E. coli* hauptsächlich die PräGFOR vorlag und, direkt über einer sehr schwachen Bande in Höhe der reifen GFOR, eine zusätzliche Bande sichtbar war (Abb. 11).

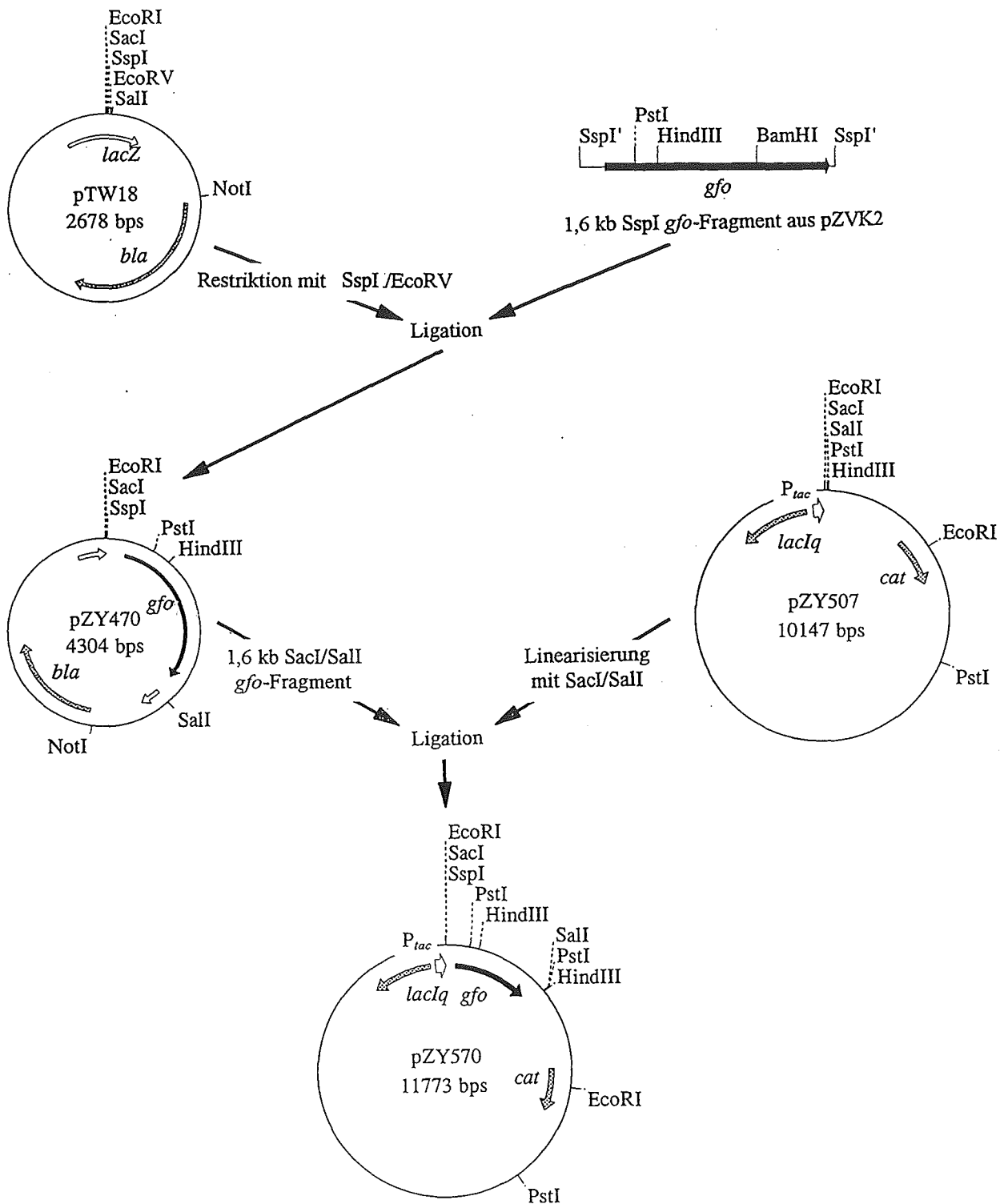


Abb. 10: Schema der Konstruktion der Vektoren pZY470 und pZY570. Der Ausgangsvektor pTW18 entstammte pUC18, dem mittels synthetischer Oligonukleotide eine neue 'multiple cloning site' eingebaut wurde und dessen *SspI*-Schnittstelle durch Insertion eines *NotI*-'Linkers' entfernt wurde. *lacZ*: Gen der β -Galaktosidase; *lacIq*: Gen des lac-Repressors; *P_{tac}*: *tac*-Promotor. Andere Bezeichnungen siehe Abb. 6.

In *Z. mobilis* kam es durch eine hohe Überexpression des *gfo*-Gens durch IPTG-Zugabe zur Kultur zu einer massiven Anhäufung der Prä-GFOR (s. Abb. 11).

Tab. 9: Spezifische Aktivität der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) in zellfreien Rohextrakten rekombinanter *E. coli* DH5, *Z. mobilis* CP4 (Wildtyp) und *Z. mobilis* ACM3963 (GFOR Defektmutante) bezogen auf das Gesamtzellprotein. Die Kulturen von *E. coli* wurden, wenn angegeben, bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,25 mit 1 mM IPTG versehen und 2 - 3 h weiterinkubiert. *Z. mobilis* wurde in Vollmedium mit 10 % Glukose und 100 mg/l Chloramphenicol über Nacht kultiviert, die IPTG-Zugabe erfolgte bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,4. Die angegebenen Aktivitäten sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Ansätzen. n.n.: nicht nachweisbar. pZY507: Kontrollplasmid, pZY570: kloniertes Gen der GFOR.

Stamm			GFOR-Aktivität [U/mg]	
			-IPTG	+IPTG
<i>E. coli</i>	DH5	/ pZY507	n.n. (1)	n.n. (2)
	DH5	/ pZY570	n.n. (3)	0,7 (4)
<i>Z. mobilis</i>	ACM3963	/ pZY507	n.n. (6)	n.n. (7)
	ACM3963	/ pZY570	11 (8)	25 (9)
	CP4	/ pZY507	1,7	1,9
	CP4	/ pZY570	15	31

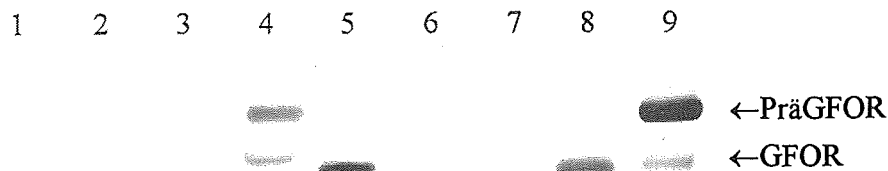


Abb. 11: Western Blot mit spezifischen Antikörpern zum Nachweis der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) in zellfreien Rohextrakten verschiedener *E. coli* DH5- und *Z. mobilis* ACM3963-Stämme. 1, 2: DH5/pZY507; 3, 4: DH5/pZY570; 5: gereinigte GFOR; 6, 7: ACM3963/pZY507; 8, 9: ACM3963/pZY570. Bei 2, 4, 7 und 9 erfolgte die Kultivierung unter IPTG-Zugabe (vergl. Tab. 9). In den Spuren 1 bis 4 wurden jeweils 100 µg Protein, in 6 bis 8 wurden jeweils 25 µg Protein und in Spur 9 wurde 10 µg Protein aufgetragen.

Das Plasmid pZY470 wurde im weiteren Verlauf als Klonierungs-, pZY570 als Expressionsvektor verwendet. Zur M13-Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese wurde das 5'-Ende des *gfo*-Gens als SspI/PstI-, PstI/SphI- und SphI/KpnI-Fragmente in M13mp18 kloniert. Die DNA-Sequenzierung der erhaltenen M13-Insertionen ergab einige Abweichungen zur veröffentlichten DNA-Sequenz des *gfo*-Gens (Kanagasundaram & Scopes, 1992). Die auf diesen Befund später durchgeführte Sequenzierung des gesamten *gfo*-Gens zeigte zusätzliche Abweichungen im Bereich des 3'-Endes, unter anderem eine Verschiebung des Translations-Stopkodons (Loos, Dissertation,

1994). Die neue Sequenz des *gfo*-Gens wurde in der vorliegenden Arbeit auf Proteinebene durch Bestimmung des carboxyterminalen Aminosäurerests (Tyrosin statt Glycin) mittels Carboxypeptidase Y-Verdau und anschließender HPLC-Analyse bestätigt (s. Abb. 12). Die Unterschiede zwischen der veröffentlichten und der neu ermittelten *gfo*-Sequenz beruhen daher vermutlich auf Fehlern in der von Kangasundaram & Scopes (1992) veröffentlichten Sequenz. Deshalb wurde nur die neu ermittelte DNA-Sequenz als Grundlage für weitere Arbeiten verwendet.

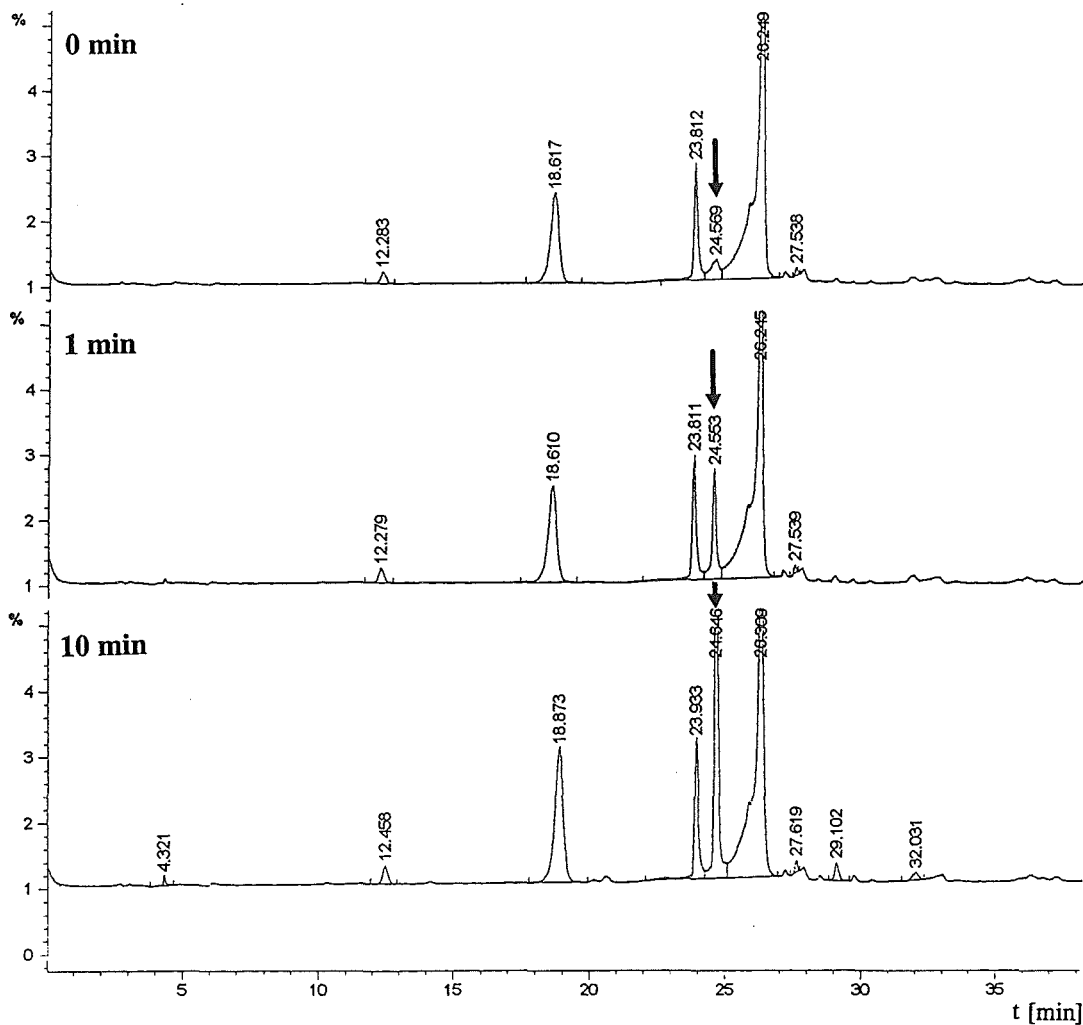


Abb. 12: Elutionsprofile der 'reversed phase' HPLC zur Analyse der carboxyterminalen Aminosäure der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) nach Carboxypeptidase-Y Verdau. Gereinigte GFOR wurde über verschieden lange Zeiträume mit Carboxypeptidase-Y inkubiert, welche spezifisch carboxyterminale Aminosäuren abspaltet. Nach Inkubation wurden die Proben zur Proteinfällung in kalte Trichlor-essigsäure pipettiert, abzentrifugiert und der Überstand zur Aminosäureanalyse einer 'reversed phase' HPLC unterzogen. Die Retentionszeiten für Glycin lag bei ca. 18,6 min und für Tyrosin bei ca. 24,5 min. Die Zunahme des Tyrosin Peaks mit zunehmender Inkubationsdauer (0, 1 und 10 min) mit Carboxypeptidase-Y ist deutlich sichtbar (mit Pfeil markiert). Die anderen Signale resultierten aus nicht definierten Substanzen der Reaktionslösungen.

3. Untersuchungen zum Export der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in *Z. mobilis*

Die GFOR ist mit der 52 Aminosäure langen möglichen Signalsequenz und dem fest gebundenen NADP ein sehr ungewöhnliches Exportprotein. Es sollte daher untersucht werden, ob die GFOR unter Beteiligung des Sec-Wegs ins Periplasma von *Z. mobilis* transportiert wird, und ob ein Zusammenhang zwischen der ungewöhnlichen Signalsequenz und dem Einbau bzw. Export des Kofaktors besteht.

3.1 Nachweis der Prozessierung und Untersuchungen zum Exportweg der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in *Z. mobilis*

Die Umwandlung der PräGFOR zur reifen GFOR (Prozessierung) war mittels eines 'in vitro' Verfahrens mit Retikulozyten nicht deutlich nachzuweisen (Kanagasundaram & Scopes, 1992). Im folgenden wurde deshalb die 'pulse-chase' Technik zur näheren Untersuchung des GFOR-Exports für *Z. mobilis* etabliert.

Es wurde eine für *E. coli* beschriebene Methode verwendet, die für eine effiziente 'in vivo' ³⁵S-Methionin Markierung von *Z. mobilis* abgewandelt wurde. Die *Z. mobilis* GFOR-Defektmutante ACM3963 war dabei besonders geeignet, da dieser Stamm im Vergleich zum *Z. mobilis* Wildtypstamm CP4 eine ca. zehnmal höhere Einbaurate an ³⁵S-Met zeigte.

Bei 'pulse-chase'-Experimenten werden exponentiell wachsende Zellen 'in vivo' über einen bestimmten Zeitraum mit ³⁵S-Methionin markiert ('pulse'). Durch Zugabe von Methionin und Chloramphenicol wird die Markierung gestoppt ('chase') und zu verschiedenen Zeitpunkten ('chase'-Zeiten) werden Proben entnommen. Die Zellen der Proben werden lysiert und das zu untersuchende Protein wird durch Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern von anderen Proteinen getrennt. Die Proben werden darauf über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie analysiert.

In Abbildung 13 ist das Ergebnis von 'pulse-chase' Experimenten mit *Z. mobilis* ACM3963/pZY570 wiedergegeben. Es waren deutlich Banden auf Höhe der PräGFOR und der GFOR zu erkennen, die sich im Verlauf der 'chase'-Zeiten veränderten.

Eine Abnahme der Intensität der PräGFOR-Bande und eine Zunahme der GFOR-Bande war deutlich sichtbar. Die Prozessierung war in Versuchen ohne IPTG-Zugabe nach ca. 20 Minuten abgeschlossen, während bei hoher Überexpression des *gfo*-Gens durch IPTG-Zugabe nach 20 min 'chase'-Zeit noch ein großer Anteil PräGFOR sichtbar war. Die Umwandlung der GFOR aus der GFOR-Vorstufe war damit gezeigt.

Um auszuschließen, daß die beobachtete Prozessierung auf eine cytoplasmatische Proteolyse zurückzuführen war, wurde der Einfluß von Carboxylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) im 'pulse chase'-Experiment untersucht. Das Protonophor CCCP depolarisiert die Cytoplasmamembran und hemmt damit unter anderem die von der 'proton motive force' angetriebene Sec-abhängige Proteintranslokation (Bakker & Randall, 1984). Der inhibierende Effekt von CCCP auf den Export der GFOR war anhand der fehlenden Prozessierung der PräGFOR sichtbar (s. Abb.

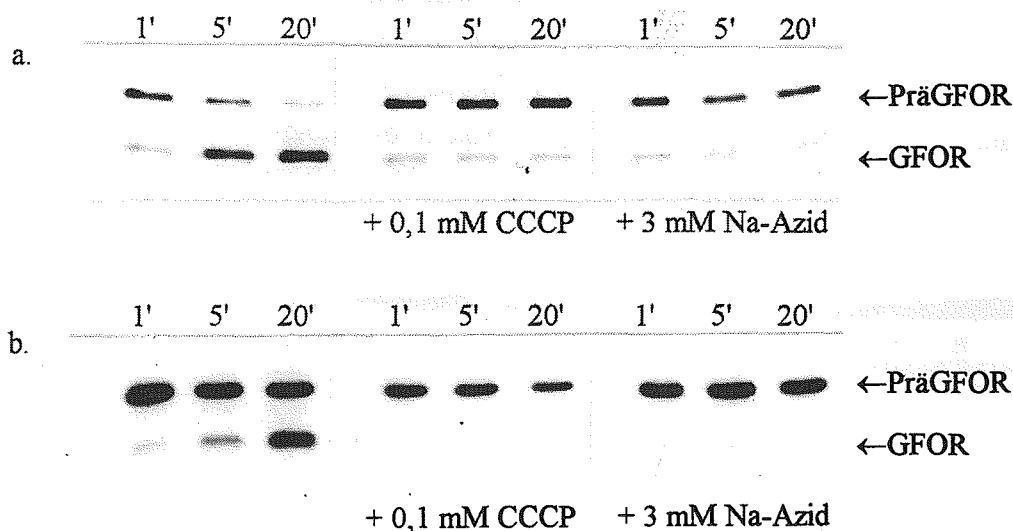


Abb. 13: Prozessierungskinetik der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) im 'pulse-chase' Experiment mit *Z. mobilis* ACM3963/pZY570 (GFOR-Defektmutante mit kloniertem Gen der GFOR) bei 'chase'-Zeiten von 1, 5 und 20 min. a: keine Zugabe von IPTG, b: Zugabe von IPTG 5 min vor dem 'pulse' mit ^{35}S -Met. 0,1 mM CCCP (Mitte) bzw. 3 mM Natriumazid (rechts) wurden unmittelbar vor der 'chase'-Lösung zupipettiert.

13). Zusätzlich wurde der Einfluß von Natriumazid (Na-Azid) auf die Prozessierung der GFOR untersucht. Natriumazid inhibiert die Translokations-ATPase-Aktivität des SecA-Proteins und dadurch spezifisch den Sec-abhängigen Proteinexport (Oliver et al., 1990; Fortin et al., 1990). Die Prozessierung der GFOR wurde deutlich durch Natriumazid gehemmt (s. Abb. 13). Ein Transport des GFOR-Proteins über den Sec-abhängigen Exportweg ist damit sehr wahrscheinlich.

3.2 Charakterisierung von Deletionsmutanten der Signalsequenz der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Durch die Charakterisierung von Deletionsmutanten der Signalsequenz sollte geklärt werden, ob die ungewöhnlich lange GFOR-Signalsequenz eine spezifische Funktion beim Einbau oder Export des Kofaktors NADP ausübt. Eine Abhängigkeit zwischen Kofaktoreinbau und Apoproteinexport bei Gram-negativen Bakterien ist z.B. bei c-Typ Cytochromen bekannt (Thöny-Meyer et al., 1994) und wird bei anderen Proteinen, wie der Dimethylsulfoxid-Reduktase aus *Rhodobacter sphaeroides*, postuliert (Masui et al., 1992).

Es wurden drei verschiedene Deletionen konstruiert, die schematisch in Abbildung 14 wiedergegeben sind.

Zunächst wurde mittels einer PCR-Methode (Ogel & McPherson, 1992; s. Abb. 4) der gesamte für die GFOR-Signalsequenz kodierende DNA-Bereich deletiert und das ATG-Startkodon an die Prozessierungsstelle versetzt (D2 - 52; DEL1). Die daraus resultierende Export-defekte GFOR-Variante sollte Aufschluss darüber geben, ob eine cytoplasmatische GFOR NADP(H) fest bindet und enzymatische Aktivität entwickeln kann, d.h., ob NADP(H)-Einbau und enzymatische

Aktivität zwangsläufig mit einem Export gekoppelt sein müssen. Die entsprechende Mutante *Z. mobilis* ACM3963/pZY570DEL1 zeigte eine deutlich verringerte enzymatische Aktivität von ca. 3 % im Vergleich zur Wildtypsituation in ACM3963/pZY570, wobei die geringere Aktivität im Rohextrakt aus einer geringeren Menge an GFOR-Protein resultierte (s.Tab. 10 und Abb. 15).

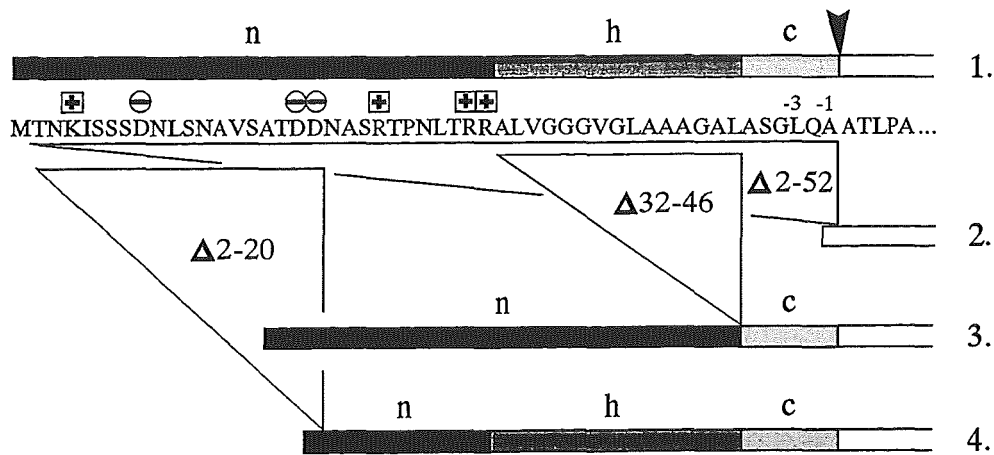


Abb. 14: Schematische Darstellung der konstruierten Deletionsmutanten der Glukose Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) Signalsequenz.

1.: Signalsequenz der GFOR; 2.: Deletion DEL1 ($\Delta 2 - 52$); 3.: Deletion DEL3 ($\Delta 32 - 46$); 4. Deletion DEL2 ($\Delta 2 - 20$). Die Prozessierungsstelle der WT-GFOR-Signalsequenz ist mit einem Pfeil markiert. Ladungen der Aminosäuren der n-Region sind ebenfalls aufgeführt.

'Pulse chase' Experimente zeigten, daß die GFOR $\Delta 2-52$ stabil war und im Verlauf der 'chase' Zeiten nicht abgebaut wurde (s.Abb.16). Die Deletion der Signalsequenz hatte also offensichtlich keinen deutlichen Einfluß auf die spezifische Aktivität bezogen auf die GFOR-Proteinmenge, und damit keinen Einfluß auf die NADP-Anbindung. Offensichtlich wurde durch die Deletion die Transkription oder Translation des *gfo*-Gens gestört.

Diese Ergebnisse wurden durch die Konstruktion einer zweiten GFOR-Deletionsmutante bestätigt. Dabei wurde durch M13-Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese der postulierte hydrophobe Bereich der GFOR-Signalsequenz deletiert ($\Delta 32 - 46$, DEL3; s.Abb. 14). Da der hydrophobe Bereich einer Signalsequenz für den Membrandurchtritt verantwortlich ist (Gennity et al., 1990), sollte hierdurch ebenfalls eine cytoplasmatische GFOR-Variante entstehen. Der entsprechende *Z. mobilis* Stamm ACM3963/pZY570DEL3 zeigte im Vergleich zu ACM3963/pZY570 keine deutlich veränderte GFOR-Aktivität bezogen auf das Gesamtzellprotein (s. Tab. 10). Im Western Blot konnte nur das durch die Deletion verkürzte GFOR-Vorstufenprotein (PräGFOR) detektiert werden (s. Abb. 15). Im 'pulse-chase'-Experiment war erwartungsgemäß keine Prozessierung der verkürzten PräGFOR sichtbar (s.Abb. 16).

Tab. 10: Spezifische Aktivität der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) in zellfreien Rohextrakten rekombinanter *Z. mobilis* ACM3963 bezogen auf das Gesamtzellprotein. Die Anzucht erfolgte über Nacht in Vollmedium mit 10 % Glukose und 100 mg/l Chloramphenicol. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 erfolgte die Zugabe von 1 mM IPTG. ACM3963: GFOR-Defektmutante; pZY570: Plasmid mit kloniertem Gen der GFOR bzw. Genen mit Deletionen im Signalsequenzbereich (vergl. Abb 14); pZY574: Plasmid mit Fusion des Signalsequenzbereichs der Glukonolactonase mit der reifen GFOR. Die angegebenen Aktivitäten sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Ansätzen

Stamm	GFOR-Aktivität [U/mg]
3. ACM3963 /pZY570	25
4. ACM3963 / pZY570DEL1	0,8
5. ACM3963 / pZY570DEL2	20
6. ACM3963 / pZY570DEL3	25
7. ACM3963 / pZY574	2,4

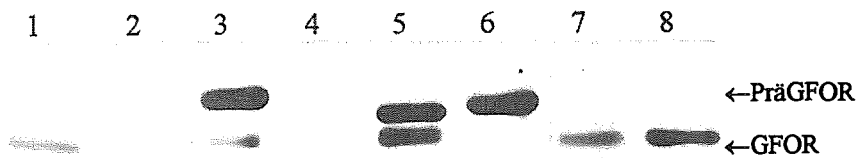


Abb. 15: Western Blot mit spezifischen Antikörpern zum Nachweis der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) in zellfreien Rohextrakten verschiedener *Z. mobilis* Stämme. In Spur 1 - 6 wurden jeweils ca. 10 µg zellfreier Rohextrakt aufgetragen, 25 µg in Spur 7. ACM3963: GFOR-Defektmutante; CP4: Wildtypstamm. 1.: CP4/pZY507; 2.: ACM3963/pZY507 ; 8.: gereinigte GFOR; 3. - 7.: siehe Numerierung in Tabelle 10.

Vergleicht man die GFOR-Signalsequenz mit der postulierten allgemeinen Struktur prokaryotischer Signalsequenzen (v. Heijne & Abrahamsen, 1989), so fällt vor allem die verlängerte n-Region aus dem Rahmen (Abb. 3). Um die Funktion dieser langen n-Region beim Export der GFOR zu untersuchen, wurde der für die 19 N-terminalen Aminosäuren der n-Region der GFOR-Signalsequenz kodierende Genbereich deletiert (s. Abb. 14). Die Deletion wurde wiederum durch M13-Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese durchgeführt. Die GFOR-Aktivität des *Z. mobilis* GFOR-Defektstammes mit dem klonierten *gfo*-Gen mit der entsprechenden Deletion (ACM3963/pZY570DEL2) ist in Tabelle 10 angegeben. Im zellfreien Rohextrakt wurde im Vergleich zur Wildtypsituation nur eine geringfügig niedrigere GFOR-Aktivität gemessen.

Im 'Western Blot' war eine durch die Deletion verkürzte PräGFOR und eine prozessierte GFOR sichtbar (s. Abb. 15). In 'pulse chase'-Experimenten wurde deutlich, daß die PräGFOR Δ 2-20 mit einer ähnlichen Kinetik wie die WT-PräGFOR prozessiert wurde (s. Abb. 16). Damit war offensichtlich der aminoterminal Bereich der n-Region der GFOR-Signalsequenz für einen Export der GFOR nicht absolut essentiell.

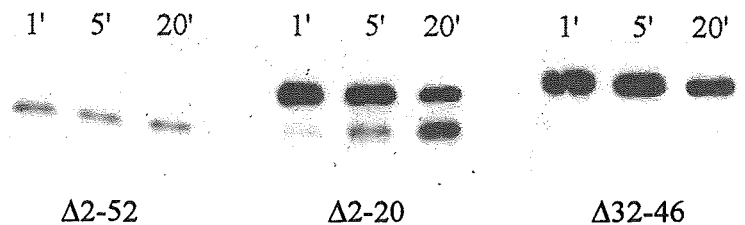


Abb. 16: Untersuchung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Deletionsmutanten *Z. mobilis* ACM3963/pZY570DEL1 (Δ 2-52; links), DEL2 (Δ 2-20; Mitte) und DEL3 (Δ 32-46; rechts) im 'pulse-chase' Experiment bei 'chase'-Zeiten von 1, 5, 20 und 60 min. Den Ansätzen wurde 5 min vor der Markierung 1 mM IPTG zugegeben.

3.3 Reinigung und Charakterisierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Deletionsmutante Δ 32-46

Die Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Deletionsmutante Δ 32-46 (GFOR Δ 32-46) wurde aus ACM3963/pZY570DEL3 gereinigt (s. Tab. 11 und Abb. 17). Das gereinigte Protein hatte mit ca. 180 U/mg eine ähnliche spezifische Aktivität wie die WT-GFOR. Der Kofaktor blieb während der Reinigung ebenfalls fest am Enzym gebunden. Der Export der GFOR bzw. das Vorhandensein der GFOR-Signalsequenz sind damit offensichtlich nicht Voraussetzung für eine korrekte, feste NADPH-Anbindung und die Ausbildung enzymatischer Aktivität.

Tab. 11: Anreicherungs-schritte der Reinigung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Deletionsmutante Δ 32-46 aus *Z. mobilis* ACM3963/pZY570-DEL3. Die Kultivierung erfolgte unter Zugabe von 0,5 mM IPTG.

	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Protein ges. [mg]	Aktivität [U/ml]	spez. Akt. [U/mg]	Anreicherung [Faktor]	Ausbeute [U ges.]	%
Rohextrakt nach Ultrazentrifugation	50	19,8	990	713	36	1	35600	100
DEAE-Sephacel + 1. EMD-SO ₃	34	5	170	730	146,2	4	24800	70
2. EMD-SO ₃	4,2	18,1	76	3300	182	5	13900	39

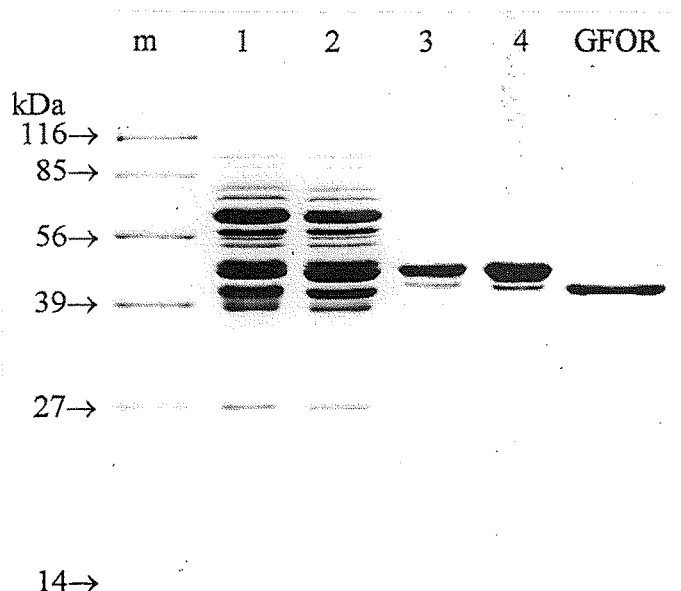


Abb. 17: SDS-Polyacrylamidgel zur Darstellung der Effizienz der verschiedenen Schritte zur Reinigung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Deletionsmutante $\Delta 32-46$. 1: Rohextrakt; 2. Rohextrakt nach Ultrazentrifugation; 3: vereinte Fraktionen nach gekoppelter Anionen-/Kationenaustausch Chromatographie (DEAE-Sephacel/ Fractogel-EMD-SO₃); 4: vereinte Fraktionen nach zweiter Kationenaustausch-Chromatographie; 5: gereinigte GFOR. Die Bande in Höher der reifen GFOR in Spur 4 war ebenfalls im 'Western-Blot' mit spezifischen GFOR-Antikörpern sichtbar. Es handelt sich vermutlich um ein Abbauprodukt der GFOR $\Delta 32-46$.

3.4 Untersuchungen zum Export eines Fusionsproteins aus reifer Glukose-Fruktose Oxidoreduktase und Signalsequenz der Glukonolactonase in *Z. mobilis*

Um festzustellen, ob die GFOR-Signalsequenz funktionell durch eine andere Signalsequenz ersetzt werden kann, wurden Signalsequenzaustausche vorgenommen. Die GFOR Signalsequenz wurde dabei durch die postulierte Signalsequenz der *Z. mobilis* Glukonolactonase (GNL, Kanagasundaram & Scopes, 1993) und der des äußeren Membranproteins OmpA und der im Periplasma lokalisierten alkalischen Phosphatase (PhoA) aus *E. coli* ersetzt.

Durch M13-Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese wurde am kodierenden *gfo*-Genbereich der Prozessierungsstelle eine Eco47III-Schnittstelle eingeführt, die eine direkte Fusion der kodierenden Genbereiche der OmpA-, PhoA- und GNL-Signalsequenzen mit dem der reifen GFOR ermöglichte (s. Abb. 18). Das resultierende Plasmid pZY471 mit dem *gfo*-Gen in Leserichtung des *lac*-Promotors unterschied sich von pZY470 nur in der Eco47III-Schnittstelle im Bereich der Prozessierungsstelle, was auf Aminosäureebene einen Austausch von Ala⁵² zu Ser bedeutete. Ein Austausch des Ala an Position -1 der Prozessierungsstelle zu Ser dürfte dabei keine Auswirkung auf die Prozessierung durch die Signalpeptidase haben, da gemäß der -3 -1 Regel für Prozessierungsstellen (VonHeijne, 1983) ein Ser an dieser Stelle erlaubt ist.

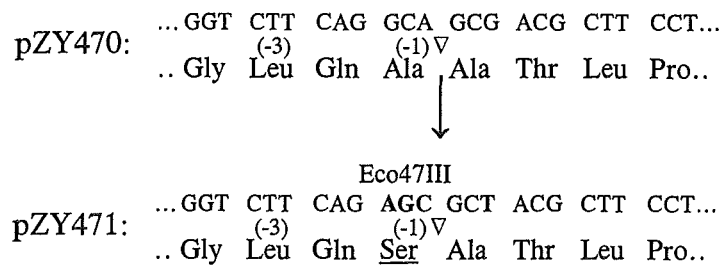


Abb. 18: Aminosäure- und Nukleotidsequenz im Bereich der Prozessierungstelle der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase bei den Plasmiden pZY470 und pZY471. In pZY471 wurde an der Prozessierungsstelle (Pfeil) durch M13-Oligonukleotid gerichtete Mutagenese eine Eco47III-Schnittstelle eingeführt.

Der *ompA*-Signalsequenzbereich stammte von Plasmid pOA181K8 (s. Tab. 4). Die Gene *phoA* und *gnl* wurden mittels PCR aus chromosomaler DNA von *E. coli* CA8000 bzw. *Z. mobilis* CP4 kloniert und daraus dann ebenfalls mittels PCR die Signalsequenzbereiche mit den jeweiligen Restriktionsschnittstellen amplifiziert. Der Erfolg sämtlicher Mutageneseschritte und Klonierungen wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Bei der Sequenzierung des 5'-Endes des *gnl*-Gens wurde eine Abweichung zur veröffentlichten Sequenz (Kanagasundaram & Scopes, 1992b) festgestellt. An Position 226 wurde statt eines C ein G ermittelt, was auf Aminosäureebene zu einem Austausch von Glutamat nach Glutamin führt. Dieser Austausch kann darauf zurückzuführen sein, daß das *gnl*-Gen aus *Z. mobilis* CP4 isoliert wurde und die veröffentlichte Sequenz von *Z. mobilis* ZM6 stammt.

Der Austausch des *OmpA*- gegen den *GFOR*- kodierenden Signalsequenzbereich mit Vektor pZY471 war nicht möglich, denn nach Ligation der entsprechenden Fragmente wurden keine Transformanten mit dem richtigen Konstrukt erhalten. Vermutlich führte die unmittelbare Position des *ompA*-Signalsequenzbereichs in Leserichtung des *lac*-Promotors zu einer überhöhten Expression des Fusionsproteins, die letal für die Zellen war. Die Letalität der Überexpression von Exportproteinen ist ein bekanntes Phänomen und resultiert aus der Blockierung des Translokationsapparats ('jamming'), welches den Export essentieller Proteine unterbindet (Freudl et al., 1986). Deshalb wurde der Vektor pZY471' konstruiert und für die weiteren Klonierungsschritte verwendet. Das Plasmid pZY471' entspricht pZY471, nur liegt hier das *gfo*-Gen entgegen der Leserichtung des *lac*-Promotors. Mit pZY471' konnte der Austausch der Signalsequenzbereiche durchgeführt werden (s. Abb. 19).

Die so konstruierten Hybridgene wurden als Kassette in pZY507 in Leserichtung des *tac*-Promotors kloniert. Die in den erhaltenen Plasmiden pZY572 (*ompA_{ssgfo}*), pZY578 (*phoA_{ssgfo}*) und pZY574 (*gnl_{ssgfo}*) kodierten Signalsequenzen und der Übergang zur reifen *GFOR* sind in Abbildung 20 dargestellt. Es ist festzuhalten, daß durch die Methode der Signalsequenzaustausche im Vergleich zum WT-*gfo* Gen ebenfalls der Promotorbereich und die Ribosomenbindestelle verändert wurden, wodurch eine unterschiedliche Expression der Gene resultieren kann.

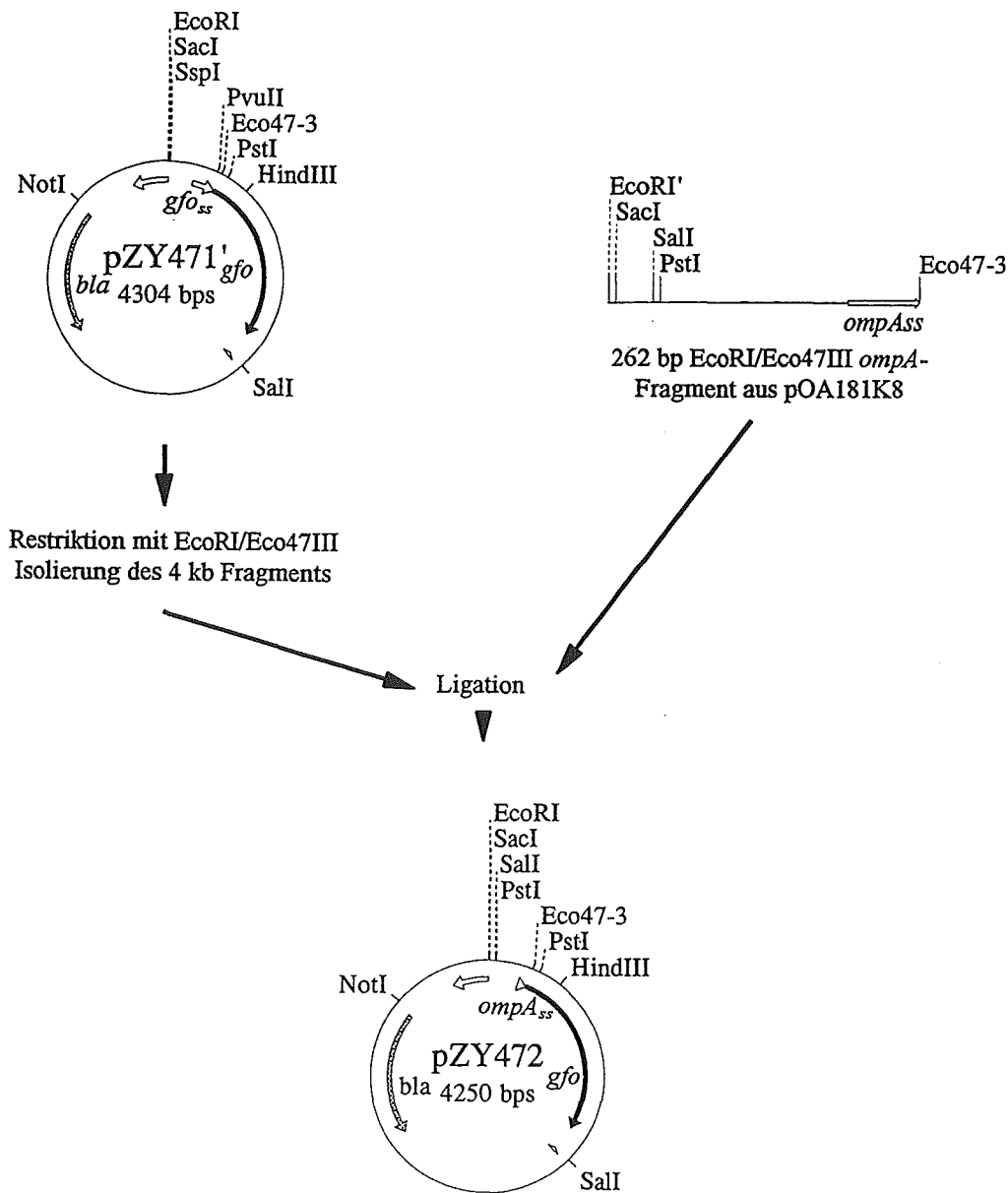


Abb. 19: Austausch des kodierenden DNA Bereichs der Signalsequenz der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase gegen die Bereiche anderer Signalsequenzen am Beispiel der OmpA-Signalsequenz. Die Eco47III-Schnittstelle erlaubte eine 'in frame' Klonierung. Die Bereiche der anderen Signalsequenzen wurden über PCR mit EcoRI/NaeI- (GNL) bzw. SacI/NaeI-Restriktionsschnittstellen kloniert. Die Hybridgene der erhaltenen Plasmide pZY472 (*ompA_{ss}gfo* = OmpA-Signalsequenzbereich fusioniert an den DNA-Bereich der reifen GFOR), pZY478 (*phoA_{ss}gfo*) und pZY474 (*gnl_{ss}gfo*) wurden auf SacI/SalI Fragmenten in das Plasmid pZY507 in Leserichtung des *tac*-Promotors kloniert. *ompA_{ss}*: Genbereich der OmpA-Signalsequenz; *gfo_{ss}*: Genbereich der GFOR-Signalsequenz.

Die Übertragung von pZY574 nach *Z. mobilis* ACM3963 verlief problemlos. Die Transkonjugante ACM3963/pZY574 zeigte nach Kultivierung mit IPTG eine GFOR-Aktivität von ca. 2,4 U/mg Gesamtzellprotein, wobei im Western-Blot hauptsächlich prozessierte GFOR sichtbar war (s. Tab. 10 und Abb. 15). Im 'pulse-chase' Experiment mit ACM3963/pZY572 zeigte sich eine deutliche Prozessierung des GNL_{SS}GFOR-Hybridproteins zur reifen GFOR (s. Abb. 21).

Um auszuschließen, daß die sichtbare Prozessierung aus einer cytoplasmatischen Proteolyse resultierte, wurde in einem Parallelansatz 3 mM Natriumazid zugegeben. Da die Prozessierung durch das Natriumazid gehemmt wurde (s. Abb. 21), fand offensichtlich eine Sec-abhängige Translokation der GFOR mit der GNL-Signalsequenz in *Z. mobilis* statt. Die GFOR-Signalsequenz konnte somit in ihrer Funktion durch eine kürzere *Z. mobilis* Signalsequenz ersetzt werden, ohne den Export, den Kofaktoreinbau oder die enzymatische Aktivität zu beeinträchtigen.

4. Untersuchungen zum Export der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in *E. coli*

Nachdem erstmals eine deutliche Expression des *gfo*-Gens in *E. coli* erreicht werden konnte (s. III.2), wurde der Export bzw. die Lokalisierung der GFOR in diesem heterologen System untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob der *E. coli* Sec-Apparat in der Lage ist, den Export der GFOR zu vermitteln.

4.1 Untersuchungen zur Prozessierung und Lokalisierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in *E. coli*

Zur Untersuchung des Exports der GFOR in *E. coli* wurden zunächst 'pulse-chase' Experimente mit einem Stamm mit dem plasmidkodierten WT-*gfo*-Gen (DH5/pZY570) durchgeführt (s. Abb. 22). Dabei konnte über einen Zeitraum von 30 Minuten keine deutliche Prozessierung der PräGFOR festgestellt werden.

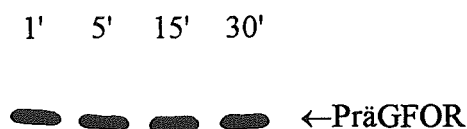


Abb. 22: 'Pulse-chase'-Experiment mit *E. coli* DH5/pZY570 (WT-*gfo*-Gen) zur Untersuchung der Prozessierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in *E. coli* mit 'chase'-Zeiten von 1, 5, 15 und 30 min. 2 min vor dem 'chase' wurde 1 mM IPTG zugegeben, markiert wurde über 1 min.

Die fehlende Prozessierung war dabei kein Nachweis, sondern nur ein Hinweis für die cytoplasmatische Lokalisierung der GFOR in *E. coli*. Möglicherweise war nur die Prozessierung gestört, z.B. da durch die ungewöhnliche Länge der GFOR-Signalsequenz die Prozessierungsstelle für die *E. coli* Signalpeptidase nicht zugänglich sein könnte. Zur Untersuchung der Lokalisierung der GFOR in *E. coli* wurden deshalb Trypsinverdaus periplasmatischer Proteine nach der Methode von Zimmermann & Wickner (1982) durchgeführt. Bei dieser Methode wird die äußere Membran von *E. coli* Zellen permeabilisiert, so daß die extern zugegebene Protease Trypsin ins Periplasma gelangen und die dortigen Proteine abbauen kann. Ein Western Blot eines entsprechenden Trypsinverdaus ist in Abbildung 23 wiedergegeben. Die GFOR wurde in Rohextrakten von *E. coli* DH5/pZY570 zu einem hauptsächlichen Abbauprodukt gespalten (Spur 1). Bei permeabilisierten Zellen konnte jedoch keine deutliche Verminderung der GFOR-spezifischen Banden bei Trypsinzugabe festgestellt werden (Spur 3). Der Erfolg des Trypsinverdaus wurde anhand von OmpA kontrolliert, einem Protein der äußeren Membran von *E. coli*, welches eine mit Trypsin abspaltbare periplasmatische Domäne besitzt.

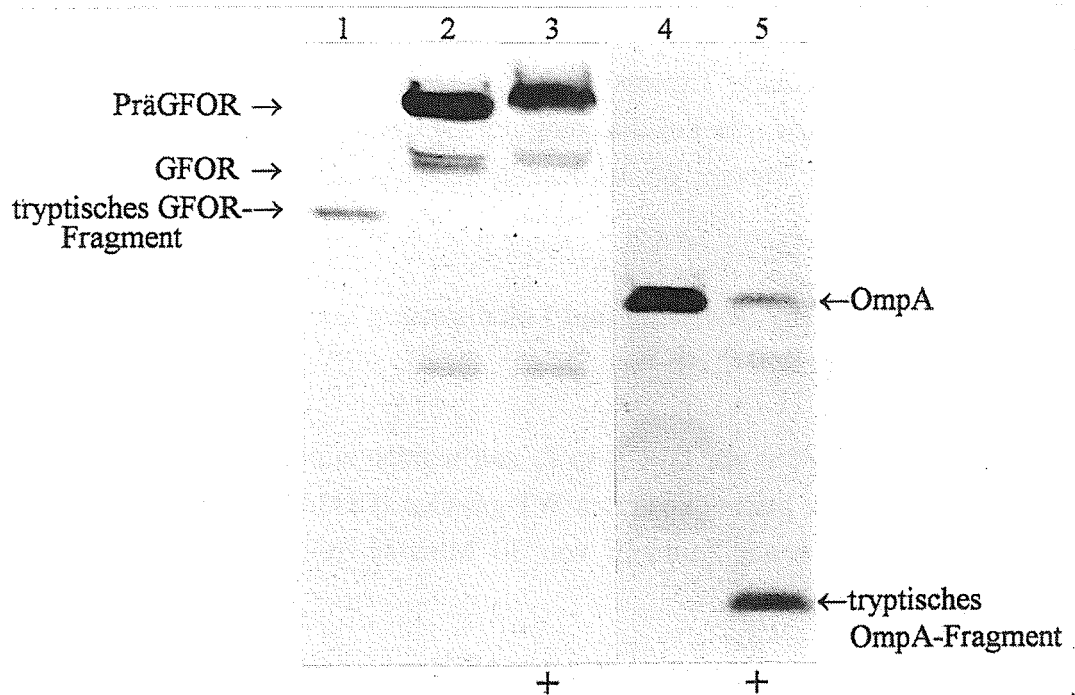


Abb. 23: Lokalisierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) in *E. coli* DH5/pZY570 mittels Trypsinverdaus. Die linke Seite des 'Western Blots' (Spur 1-3) wurde mit GFOR-, die rechte Seite (Spur 4, 5) mit OmpA-spezifischen Antikörpern entwickelt. 1: Rohextrakt mit Trypsin behandelt; 2, 4: permeabilisierte Zellen; 3, 5: permeabilisierte Zellen mit Trypsin behandelt. +: Zugabe von Trypsin.

In den permeabilisierten Zellen wurde der periplasmatische Teil des OmpA bei Trypsinzugabe abgebaut. Im 'Western Blot' war dieses durch das fast vollständige Verschwinden der OmpA-Bande und durch das Auftauchen eines durch die äußere Membran geschützten tryptischen OmpA-Fragments erkennbar (Spur 4 und 5). Die GFOR war bei *E. coli* damit offensichtlich nicht im Periplasma lokalisiert, da sie vor dem Trypsinverbau geschützt blieb. Die im 'Western Blot'

sichtbaren prozessierten Banden der GFOR resultierten damit offensichtlich aus einer unspezifischen cytoplasmatischen Proteolyse.

4.2 Untersuchungen zur Funktionalität der Signalsequenz der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in *E. coli* durch Fusionen mit der alkalischen Phosphatase aus *E. coli*

Im Folgenden sollte festgestellt werden, warum die GFOR in *E. coli* nicht ins Periplasma exportiert wurde. Es war möglich, daß die GFOR-Signalsequenz in *E. coli* nicht funktionell war, oder daß die PräGFOR sich in einer translokationsinkompetent-gefalteten Form befand. Dieses sollte durch eine Fusion der GFOR-Signalsequenz mit der signalsequenzlosen alkalischen Phosphatase (PhoA) aus *E. coli* untersucht werden. Ein entsprechendes Fusionsprotein besitzt nur dann PhoA-Aktivität, wenn es ins Periplasma exportiert werden kann, da die PhoA nur dort eine korrekte Faltung annimmt (Derman & Beckwith, 1991).

Die Transposon (TnPhoA) Mutagenese mit *E. coli* CC202/pZY570 (*E. coli* mit chromosomal integriertem TnPhoA und kloniertem Gen der GFOR) zur Herstellung von Fusionen mit der PhoA nach Manoil & Beckwith (1985) führte zu keinen PhoA-positiven Klonen. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurden durch direkte Klonierung Fusionsproteine aus GFOR-Signalsequenz und signalsequenzloser PhoA hergestellt (Plasmide pZY575 und pZY576; s. Abb. 24).

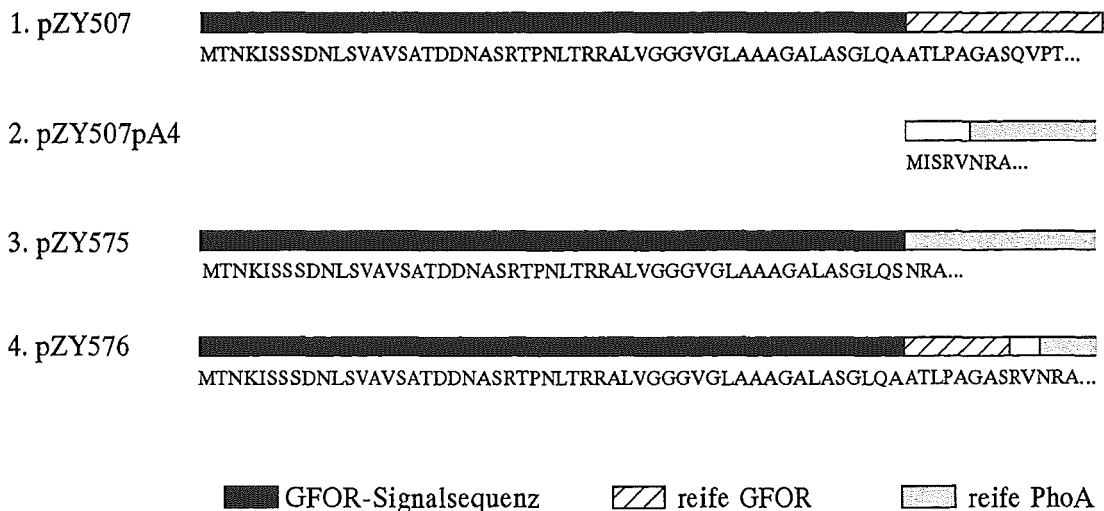


Abb. 24.: Aminoterminaler Bereich der Fusionsproteine aus Signalsequenz der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase und der reifen alkalischen Phosphatase (GFOR_{SS}PhoA) im Vergleich zur PräGFOR und der signalsequenzlosen PhoA. 1.: PräGFOR (pZY570); 2.: signalsequenzlose PhoA (pZY507PA4) 3.: Fusion aus GFOR-Signalsequenz und signalsequenzloser PhoA (pZY575); 4.: Fusion aus GFOR-Signalsequenz und den ersten 8 Aminosäuren der GFOR mit der signalsequenzlosen PhoA (pZY576).

Zur Konstruktion wurde der Vektor pPA4 verwendet. Das Plasmid pPA4 besitzt im DNA-Bereich, der für den Aminoterminus der reifen PhoA kodiert, singuläre Schnittstellen, die eine 'in

frame' Anklonierung von z.B. Signalsequenzbereichen ermöglichen. Bedingt durch die Konstruktion von pPA4 fehlen der signalsequenzlosen PhoA die ersten 9 Aminosäuren des reifen Proteins. Exportierte PhoA-Fusionsproteine sind jedoch noch aktiv, wenn bis zu 14 Reste des Aminoterminus der reifen PhoA fehlen (Hoffmann & Wright, 1985). Fusionen aus der Signalsequenz der Lipase aus *Staphylococcus hyicus* und der PhoA, die durch Klonierung mit Plasmid pPA4 hergestellt worden waren, zeigten deutliche PhoA-Aktivität und wurden prozessiert (J. Meens, persönliche Mitteilung).

Bei der Fusion in pZY576 blieben zwischen GFOR-Signalsequenz und signalsequenzloser PhoA die ersten 8 Aminosäuren der reifen GFOR erhalten. Als Kontrolle wurde das Gen der signalsequenzlosen PhoA aus pPA4 und das über PCR isolierte komplette phoA-Gen in den Vektor pZY507 kloniert (pZY507PA4 als Negativkontrolle bzw. pZY507phoA als Positivkontrolle). Die entsprechenden Plasmide wurden in den PhoA negativen *E. coli* Stamm CC118 transformiert und die PhoA-Aktivität im Plattentest mit X-Phosphat als chromogenem Modells substrat nachgewiesen.

Es zeigte sich, daß nur der Kontrollstamm *E. coli* CC118/pZY507phoA blaue Kolonien und damit aktive PhoA ausbildete, die ins Periplasma exportiert wurde. Auch bei Wachstum mit 1 mM IPTG waren bei *E. coli* CC118/pZY575, CC118/pZY576 und CC118/pZY507PA4 keine PhoA-Aktivitäten zu erkennen.

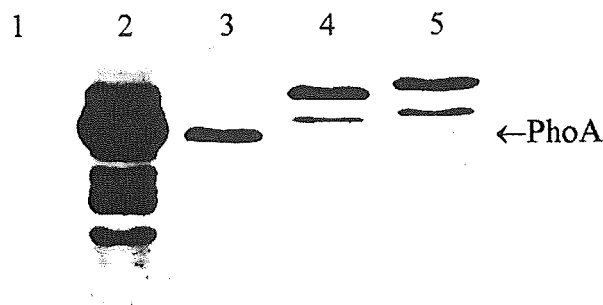


Abb. 25.: 'Western-Blot' mit PhoA-spezifischen Antikörpern zum Nachweis der Fusionsproteine aus Signalsequenz der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase und signalsequenzloser alkalischer Phosphatase (PhoA) in zellfreien Rohextrakten aus *E. coli* CC118 (PhoA Defektmutante) mit verschiedenen Plasmiden (s. Abb. 24). Es wurden gleiche Gesamtproteinmengen aufgetragen. 1: CC118/pZY507; 2: CC118/pZY507phoA; 3: CC118/pZY507PA4; 4: CC118/pZY575; 5: CC118/pZY576. Bei CC118/pZY507phoA sind wegen der Überladung der PhoA Abbaubanden sichtbar.

Im Western Blot wurde deutlich, daß *E. coli* CC118/pZY575 und CC118/pZY576 wie erwartet im Vergleich zu CC118/pZY507phoA eine größere PräPhoA bildeten, wobei es sich um die Fusionsproteine aus GFOR-Signalsequenz und reifer PhoA handelte (s. Abb. 25). Ähnlich wie im Western Blot mit *E. coli* DH5/pZY570 (WT-PräGFOR, s. Abb. 23, Spur 2) war zwischen der Bande des Vorstufenproteins und der sehr schwachen Bande des reifen Proteins eine zusätzliche Bande sichtbar, die vermutlich ein cytoplasmatisches Abbauprodukt des Präproteins darstellt.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß die GFOR-Signalsequenz offensichtlich zum *E. coli* Exportapparat inkompatibel ist und weder den Export der GFOR noch den Export eines Fusionsproteins aus GFOR-Signalsequenz und PhoA effektiv initiierten kann

4.3 Untersuchungen zum Export von Signalsequenz-Austauschmutanten der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in *E. coli*

Da die GFOR-Signalsequenz keinen Export der GFOR in *E. coli* vermittelte, wurden die Signalsequenz-Austauschmutanten (s. III.3.4) bezüglich des Exportverhaltens der GFOR in *E. coli* untersucht. Dazu wurden 'pulse-chase' Experimente mit *E. coli* DH5/pZY572 (OmpA_{ss}GFOR), DH5/pZY578 (PhoA_{ss}GFOR) und DH5/pZY574 (GNL_{ss}GFOR) durchgeführt.

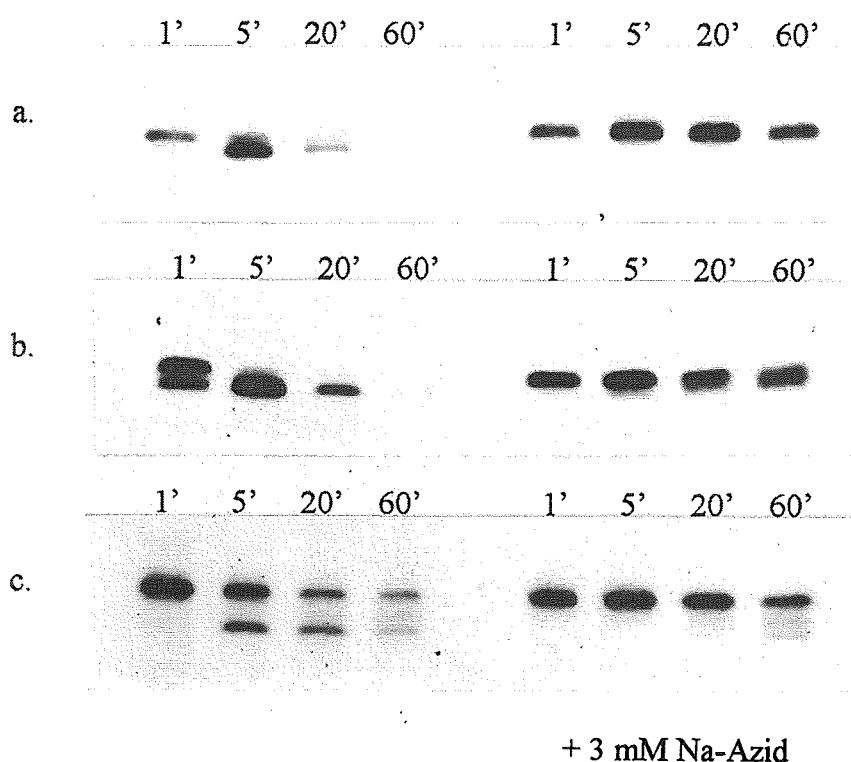


Abb. 26: 'Pulse-chase'-Experimente zum Nachweis des Exports der Fusionsproteine aus den Signalsequenzen des OmpA-Proteins (OmpA_{ss}), der alkalischen Phosphatase (PhoA_{ss}) und der Glukonolactonase (GNL_{ss}) mit der signalsequenzlosen Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) in *E. coli*. a.: DH5/pZY572 (OmpA_{ss}GFOR); b.: DH5/pZY578 (PhoA_{ss}GFOR); c.: DH5/pZY574 (GNL_{ss}GFOR). In Parallelansätzen wurde kurz vor dem 'chase'-Puffer 3 mM Natriumazid zur Inhibierung der Sec-abhängigen Translokation zugegeben.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 26 wiedergegeben. Es wurde deutlich, daß mit der OmpA- und PhoA-Signalsequenz eine schnelle Prozessierung der GFOR-Hybridproteine erfolgte. Die somit ins Periplasma von *E. coli* exportierte GFOR war jedoch nicht stabil und wurde im Verlauf einer Stunde fast vollständig abgebaut. Die cytoplasmatischen Prä-Formen waren dagegen stabil, was durch Hemmung des Exports mit Natriumazid gezeigt werden konnte. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit der GNL-Signalsequenz erhalten, nur verlief dort die Prozes-

sierung langsamer und es waren nach 60 min 'chase'-Zeit auch bei Natriumazid Zugabe prozessierte Banden sichtbar, die vermutlich aus einem cytoplasmatischen Abbau resultierten.

Um einen Nachweis für die periplasmatische Proteolyse der prozessierten GFOR in *E. coli* zu erbringen, wurde der *E. coli* Stamm SF120 eingesetzt. SF120 besitzt einen Defekt in drei Proteasen des Periplasmas bzw. der äußeren Membran (OmpT, DegP, Protease III; Baneyx & Georgiou, 1992). Da SF120 eine chromosomale Chloramphenicol-Resistenz besitzt, mußte das Gen des OmpA_{SS}GFOR-Fusionsproteins in den Vektor pJF118 (s. Tab. 4) kloniert werden.

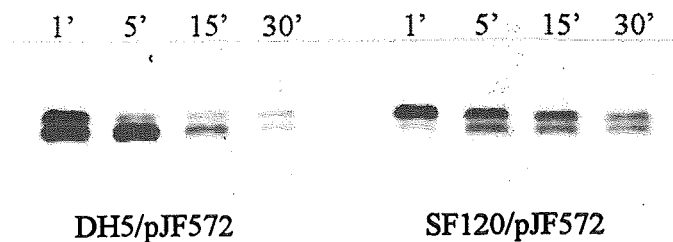


Abb. 27: 'Pulse-chase'-Experiment zum Nachweis der periplasmatischen Proteolyse der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) in *E. coli*. Es wurde das Verhalten des Fusionsproteins aus OmpA-Signalsequenz und signalsequenzloser GFOR (pJF572) in *E. coli* DH5 und SF120 untersucht. *E. coli* SF120 ist defekt in drei Proteasen des Periplasmas bzw. der äußeren Membran.

Das resultierende Plasmid pJF572 wurde in SF120 transformiert und das Verhalten des OmpA_{SS}GFOR-Fusionsproteins in *E. coli* SF120 im Vergleich zu DH5 im 'pulse-chase' Experiment untersucht (s. Abb. 27). Es zeigte sich, daß die prozessierte GFOR in *E. coli* SF120 deutlich stabiler war. Die von *E. coli* exportierte GFOR ist somit offensichtlich instabil und für Proteasen leicht zugänglich. Diese Proteolyse beruht sehr wahrscheinlich auf einer falschen Faltung der GFOR im Periplasma von *E. coli*, was auf einen fehlenden Einbau des Kofaktors zurückzuführen sein könnte. Möglicherweise fehlt *E. coli* der Mechanismus zum Export des Kofaktors, der für eine stabile Faltung der GFOR notwendig ist.

5. Untersuchungen zur NADP-Bindestelle der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Bei der Isolierung der GFOR war deutlich geworden, daß während der gesamten Reinigungsprozedur keine Ablösung des Kofaktors NADP(H) vom Enzym erfolgte und zur Aktivität der GFOR kein externes NADP(H) notwendig war. Ferner war festgestellt worden, daß das NADP(H) nur durch Denaturierung des Enzyms mit SDS (Loos, 1994a) oder Perchlorsäure abgelöst werden konnte (Zachariou & Scopes, 1986). Eine Denaturierung mit 8 M Harnstoff / 0,1 M Mercaptoethanol war nicht möglich, ebenso konnte in NMR-spektroskopischen Messungen kein Austausch des enzymgebundenen NADP(H) durch externes ^{13}C -NADP(H) beobachtet werden (Loos, 1994a). Die Struktur der NADP-Bindestelle ist unbekannt und bislang konnten keine Ähnlichkeiten zu anderen Dinukleotid-bindenden Enzymen festgestellt werden.

5.1 Denaturierungsexperimente und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Kofaktorbindung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Da bislang nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob das fest gebundene NADP(H) der GFOR kovalent oder nicht-kovalent gebunden ist, wurden Denaturierungsexperimente mit der GFOR durchgeführt. Die Denaturierung der GFOR wurde anhand der Proteinfluoreszenz verfolgt. Bei der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung von Proteinen werden die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin mit kurzwelligem Licht zur Fluoreszenz angeregt. Dabei besitzt Trp die höchste Quantenausbeute bei Absorption und Emission, sodaß bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm fast ausschließlich Trp-Fluoreszenz sichtbar ist. Aus der Wellenlänge des emittierten Fluoreszenzlichts lassen sich Rückschlüsse auf die Faltung des jeweiligen Proteins ziehen. So kommt es bei einer Denaturierung, aufgrund des Übergangs der Trp-Reste aus einer unpolaren in eine polare Umgebung, zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums zu langwelligeren Bereichen (Schmid, 1989).

Es wurden zunächst Fluoreszenz-Emissionsspektren der nativen GFOR aufgenommen. Dazu wurde der enzymgebundene Kofaktor der GFOR durch Inkubation mit Glukose reduziert bzw. mit Fruktose oxidiert. Die Fluoreszenzspektren reduzierter und oxidiertter GFOR sind in Abbildung 28a wiedergegeben. Es zeigte sich ein Maximum der Proteinfluoreszenz bei ca. 310 nm. Reduzierte GFOR besaß aufgrund des gebundenen NADPH ein zusätzliches Fluoreszenzmaximum bei ca. 450 nm. Offensichtlich kam es hierbei zu einem Transfer der von den aromatischen Aminosäuren absorbierten Lichtenergie auf das gebundene NADPH, welches ein Absorptionsmaximum bei ca. 340 nm besitzt. Bei einem Vergleich des Fluoreszenzspektrums von enzymgebundenem mit freiem NADPH in gleicher Konzentration wurde deutlich, daß freies NADPH bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm eine sehr viel geringere Fluoreszenzintensität und eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums um 7 nm zum langwelligen Bereich aufwies (Abb. 28a). Fluoreszenzintensität und -maximum des enzymgebundenen NADPH waren bei Anregungswellenlängen von 280 nm und 340 nm jeweils gleich.

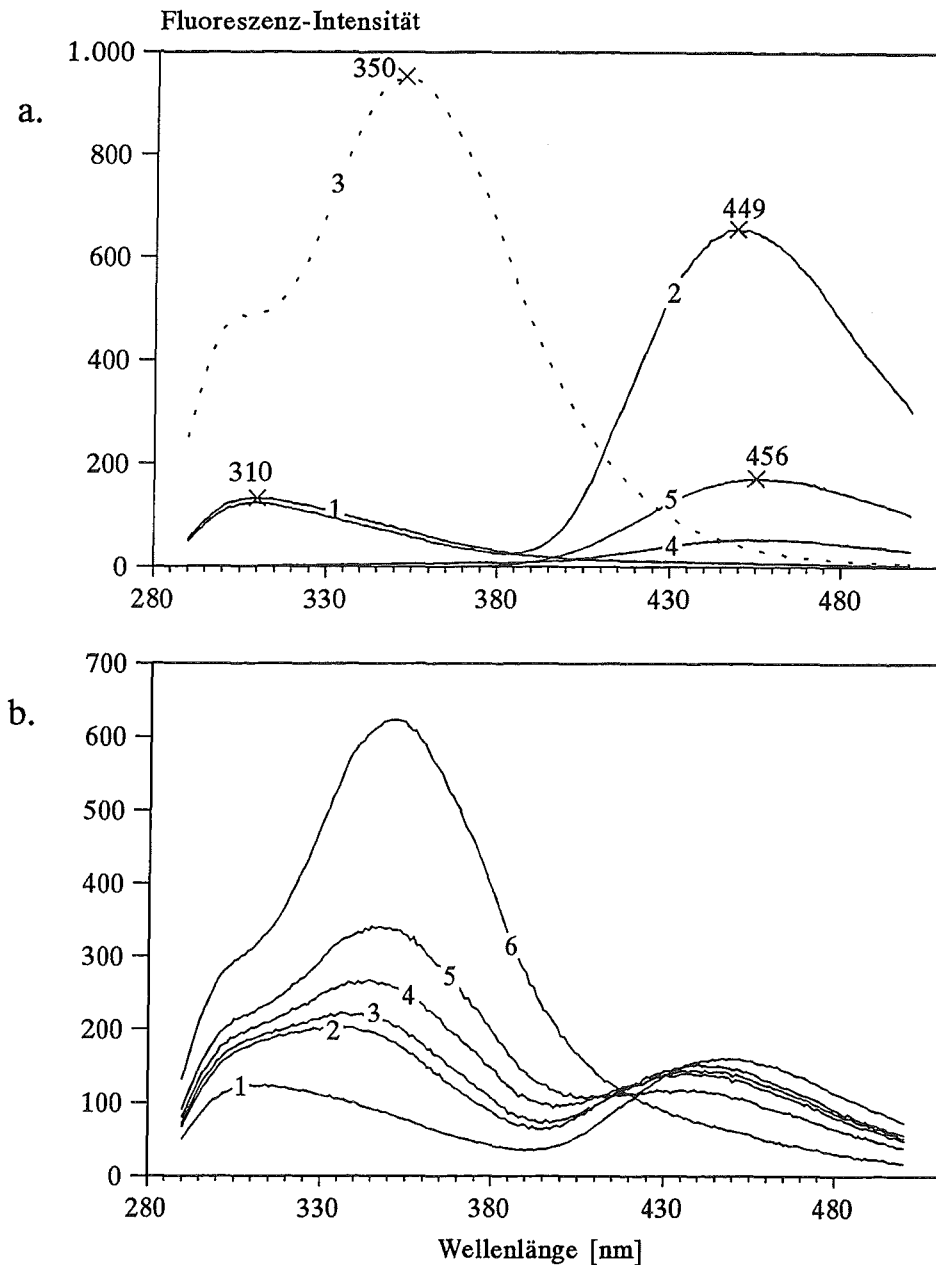


Abb. 28: Fluoreszenz-Emissionsspektren der nativen im Vergleich zur denaturierten Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) (a.) und Kinetik der GFOR-Denaturierung mit Harnstoff (b.). Es wurden jeweils 30 $\mu\text{g/ml}$ gereinigte GFOR eingesetzt (190 nMol). Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Fluoreszenzemission wurde bei 300 - 500 nm gemessen. Die Küvette war auf 20 °C temperiert.

a.: 1: native, oxidierte GFOR, 2: native, reduzierte GFOR, 3: GFOR in 6 M Guanidin-HCl, 4: 750 nMol NADPH, 5: 7,5 μMol NADPH.

b.: 1: native GFOR; 2 bis 6: GFOR in 8 M Harnstoff, Aufnahme der Spektren in Zeitabständen von 5 min (2), 20 min (3), 1 h (4), 2 h (5), zusätzlich 30 min bei 30 °C inkubiert (6).

Nach Denaturierung der GFOR mit 6 M Guanidin-Hydrochlorid wurde bei Anregung bei 280 nm ein Maximum der Proteinfluoreszenz bei ca. 350 nm gemessen, wobei keine deutliche NADPH-Fluoreszenz mehr nachzuweisen war. Auffällig war dabei die um ein vielfaches gesteigerte Fluoreszenzintensität der aromatischen Aminosäuren (s. Abb. 28a). Nach Denaturierung reduzier-

ter GFOR mit 6 M Guanidin-Hydrochlorid und anschließender Ultrafiltration (30 kDa Ausschlußgrenze) der Lösung konnte NADPH mittels Fluoreszenzspektroskopie im Filtrat nachgewiesen werden, nicht jedoch Protein. Bei der Denaturierung mit 6 M Guanidin-Hydrochlorid kam es somit zu einer Ablösung des Kofaktors vom Enzym. Daraus läßt sich schließen, daß das NADP tatsächlich nicht-kovalent an das Protein der GFOR gebunden ist. Die Denaturierung der GFOR war ebenfalls mit 8 M Harnstoff (Abb. 28b) oder 50 mM Citrat pH 2,3 (nicht gezeigt) möglich, verlief aber mit einer langsameren Kinetik.

5.2 Analyse der Sekundärstruktur der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Bei einem Vergleich der erneut ermittelten GFOR DNA-Sequenz und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz (s. III.2) mit allen im HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources; Datenbank Heidelberg, DKFZ) verfügbaren Protein- und Gendatenbanken (Stand 11/94) konnten erstmals gegen Ende der vorliegenden Arbeit signifikante Ähnlichkeiten zu Bereichen meist erst kürzlich veröffentlichter Sequenzen anderer Enzyme festgestellt werden. Einige dieser Enzyme sind bislang noch hypothetisch, d.h. die Aminosäuresequenz wurde aus einer DNA-Sequenz abgeleitet, das Protein konnte aber bislang noch nicht nachgewiesen bzw. isoliert werden. Die Übereinstimmungen der Sequenzen mit der GFOR beschränkten sich größtenteils auf die aminoterminalen Hälfte. Auffällig war, daß einige dieser Proteine offensichtlich die Oxidation einer glukoseähnlichen Verbindung katalysieren. Ein Vergleich der GFOR- mit den Aminosäuresequenzen eines Teils dieser Proteine ist in Abbildung 29 wiedergegeben.

Die meisten Übereinstimmungen zeigte eine aus einem DNA-Abschnitt (*orf334*) abgeleitete Aminosäuresequenz eines Genorts aus *Rhizobium meliloti*. In diesem Genort (*moc*) sind Enzyme kodiert, die am Abbau von Rhizopinen beteiligt sind. Die Funktion von ORF334 ist noch unbekannt, die Sequenz ähnelt aber MocA. MocA ist vermutlich eine Dehydrogenase, die die Oxidation des Rhizopins 3-o-Methyl-scyloinosamin katalysiert (Rossbach et al., 1994). Eine analoge Reaktion, die Oxidation von myoInosit, katalysieren die Inosit-Dehydrogenase (IDH) aus *Bacillus subtilis* (Ramaley et al., 1979) und vermutlich das Genprodukt von *strI* (StrI) das an der Streptomycinbiosynthese bei *Streptomyces griseus* beteiligt ist (Mansouri & Piepersberg, 1991). Die Oxidation von Galaktose durch die Galaktose-Dehydrogenase (GalDH) aus *Pseudomonas fluorescens* (Blachnitzky et al., 1974) ist ebenfalls eine Reaktion, die mit der Oxidation der Glukose durch die GFOR vergleichbar ist. 'Linco' ist eine aus der DNA abgeleitete Aminosäuresequenz eines noch unbekannten Proteins, welches bei der Biosynthese des Aminoglykosid-Antibiotikums Lincomycin bei *Streptomyces lincolnensis* eine Rolle spielt (Peschke et al., 1994). Die BvRed (Biliverdinreduktase aus Ratteniere; Fakhrai & Maines, 1992) und die DDP-DH (4,5-Dihydro-4,5-dihydroxyphtalsäure-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida*; Nomura et al., 1992) sind dagegen nicht an der Oxidation einer glukoseähnlichen Verbindung beteiligt.

	1						α	50
GFOR	MTN	KISSDN	LSNAVSATDD	NASRTPNLTR	RALVGGGVGL	AAAGALASGL		
	51						βA	100
							$\Delta \circ \circ \bullet \bullet \bullet \circ$	
GFOR	QAATLPAGAS	QVPTTPAGRP	MPYAIRPMPE	DRRFGYAIVG	LGKYALNQIL			
MocA				MTRFRLGLVG	AGRMGQVHVR			
DDP-DH			...MASHAES	TARLRLGVVG	LGRA FTLML			
ORF334				MDLVRFGIIG	TAAIAVEKVI			
GalDH				MQPIRLGLVG	YGKIAQDQHV			
StrI				...MRVGIVG	AGRMGRLHAR			
BvRed			MDAEP	KRKFGVGVVG	VGRAGSVRLR			
IDH				.MSLRIGVIG	TGAIGKEHIN			
Linco				.MTHRCGIIG	TGLQATRRVR			
				..*.*	* .			
	101		βB	αC				150
			$\circ \circ (-)$					
GFOR	PGFAGCQHSR	IEALVSGNAE	KAKIVAAEYG	VDPRKIYDYS	NFDKIAKDPK			
MocA	AAAESSLVEI	AAV ADPIAA	SRLNLAGNGI	KT....YETA	.GDMI EAGE			
DDPDH	PTFLADRRVQ	LVGACDPREQ	ARRQFERDFD	APA.....YE	TIEDLAADSN			
Orf334	PSMLSAEGLE	VVAIASRDL	RARAAATRF	IGRS....YG	SYDEILADPE			
GalDH	P.....	..AINANPAF	TLVSVATQGK	PCPGVENFQS	LGELLENGPP			
StrI	TLLELPDPPD	LVVHDVDP D	GAHRLAQELA	AGTKA QVTV	ERELADTVTK			
BvRed	DLKDPRSAAF	LNLIGFVSRR	ELGSLDEVRO	I.....	SLEDALRSQE			
IDH	RITNKLSGAE	IVAVTDVNQE	AAQKVVEQYQ	LNATV...YP	NDDSLADEN			
Linco	ALIEAADAEP	VRVAGATPDT	TKGVRAEHGL	NAVADWR-EL	VADDGI----			
					* ..			
	151	βC	αD	βD	αE			200
GFOR	IDAVYIILPN	SLHAEFAIRA	FKAGKHMCE	KPMATSVADC	QRMIDAAKAA			
MocA	VDGVLIATPS	NTHVDTVADI	AARGLPILCE	KPCGVTAEEA	RKAADVAERY			
DDPDH	VDALYIASPH	QFHAETHRIA	AANRKHVLVE	KPMALSLDEC	DRMIADCAEA			
Orf334	IEAVYIPLPN	HLHVHWAIRA	AEAGKHVLCE	KPLALDVEEL	SRLIDCRDRT			
GalDH	VDAIAFCTPP	QGRFALVQQA	LAAGKHVLVE	KPPCATLGKA	ALWIKREQAS			
StrI	ADAIVVATPA	TQRRAPLLAA	ARAGLPVFCE	KPLTADETEA	AELVEA..LA			
BvRed	IDVAYICES	SSHEDYIRQF	LQAGKHVLVE	YPMTLSFAAA	QELWELAAQK			
IDH	VDAVLVTSWG	PAHESSVLKA	IKAQKYVFCE	KPLATTAEGC	MRIVEEEIKV			
Linco	-DVVFVCVRP	ICTRDD--AS	LRAGKHVLCE	KPLARTADEA	DEMCRVARAT			
	..*.	.	. . .***.*.*	**				
	201	βE	αF	βF				250
GFOR	NKKLMIGYRC	HYDPMNRAAV	KLIRENQLGK	LGMVTTDNSD	VMDQNDPAQQ			
MocA	KVHLQIGYWR	RFVPELKQLR	DDIRAGLLGN	LYLVSCFQW.	..DEAPPANS			
DDPDH	GVKLIVGHCH	SFDTPYLRT	ELIGSGEFGA	VKMIQALN..	YTDYLQRP			
Orf334	GRRIQEAVMI	RAHPQWDEIF	DIVASGEIGE	VRAI....QG	VFTEVNLDPK			
GalDH	AP...CSPCI	AYAPAIAAAR	DWLATRTLQS	...VOIDWKE	DVRKWHPGQA			
StrI	HTRLHVGFQR	RCDPEYQRLR	ELIAAGELGR	VLLVRCTAFD	HRPPADA...			
BvRed	GRVLHEEHVE	LLMEFEFELR	REVLGKELLK	GSLRFTASPL	EEERFGFPAF			
IDH	GKRLV.....	QV	GFMRRYDSGY	VQLKEALDNH	VNGehCAHRN			
Linco	GRVL-GCGFN	HRHHPALPRS	ATASPAESWA	APCGRAPYGI	AGRDGYEREW			

Abb. 29 (vorhergehende Seite): Vergleich der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Aminosäuresequenz mit Aminosäuresequenzen anderer, z.T. hypothetischer Proteine. Es ist jeweils nur der aminoterminal Bereich der Proteine wiedergegeben, der vermutlich eine Dinukleotid-bindende Domäne darstellt. MocA/Orf334: mögliche Rhizopin-Dehydrogenasen aus *Rhizobium meliloti* (Rossbach et al., 1994); DDP-DH: Phtalsäure-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* (Nomura et al., 1992); GalDH: Galaktose-Dehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* (Sperka et al., 1989); StrI: mögliches Protein der Streptomycinbiosynthese aus *Streptomyces griseus* (Mansuori & Piepersberg, 1991); BvRed: Biliverdin-Reduktase aus Ratten-Niere (Fakhrai & Maines, 1992); IDH: Inosit-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* (Fujita et al., 1991); Linco: mögliches Protein der Lincomycinbiosynthese aus *Streptomyces lincolnensis* (Peschke et al., 1994). Konservierte Bereiche sind fett gedruckt, Aminosäuren die in mindestens 7 der Sequenzen übereinstimmen sind mit einem Stern markiert, chemisch ähnliche Aminosäuren sind mit einem Punkt markiert. Die Position einer möglichen 'fingerprint'-Sequenz ist wie in Abb. 40 über der GFOR-Sequenz markiert. Das Ergebnis der Sekundärstrukturvorhersage der GFOR nach der im Text beschriebenen Methode ist ebenfalls über der GFOR-Sequenz wiedergegeben.

Konservierte Aminosäuren der beschriebenen Sequenzen befinden sich in unmittelbarer Nähe des Aminoterminus, wobei der glycinreiche Teil einer möglichen 'fingerprint'-Sequenz Gly-Xxx-Gly-Xxx-Xxx-Ala/Gly einer NAD/NADP-Bindestelle (Wierenga et al., 1985) zu erkennen ist (s. Abb. 29). Bei der GFOR befindet sich vor einer solchen möglichen 'fingerprint'-Sequenz das 52 Aminosäure lange Signalpeptid und eine prolinreiche Region aus 37 Aminosäuren. 66 bis 77 Aminosäuren nach der möglichen 'fingerprint'-Sequenz ist eine hochkonservierte Region zu erkennen, deren Konsensus Ala-Gly-Lys-His/Pro-Val-Xxx-Cys/Val-Glu-Lys-Pro lautet. Weiter zum Carboxyterminus besitzen die Proteine wenige Sequenzhomologien.

Trotz der geringen Übereinstimmungen innerhalb der Aminosäuresequenzen, wurde auf Grundlage des Sequenzvergleichs versucht, eine Sekundärstrukturvorhersage der GFOR durchzuführen, die bislang keine auswertbaren Ergebnisse ergeben hatte. Bei der angewandten Methode nach Rost & Sander (1993) werden die Sekundärstruktureinheiten eines Proteins aus dem Vergleich zu ähnlichen Proteinen mittels eines neuronalen Netzes berechnet (Rost & Sander, 1993). Das Ergebnis dieser Berechnung ist ebenfalls in Abbildung 29 wiedergegeben. Die GFOR besitzt demnach innerhalb der aminoterminalen Hälfte der Aminosäuresequenz im Wechsel α -Helices und β -Faltblätter, deren Abfolge sehr der Sekundärstruktur von NAD/NADP-Bindestellen nach Art der 'Rossmann-Falte' (Rossmann et al., 1975) ähnelt.

5.3 Mutationen in der möglichen Region der NADP-Bindestelle der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Um festzustellen, ob die Reste Gly⁹⁰ und Ala⁹⁵ der GFOR-Aminosäuresequenz Teil eines 'fingerprints' einer Dinukleotidbindestelle nach Rossmann sind, wurden diese Reste ortsgerichtet zu Ala⁹⁰ bzw. Gly⁹⁵ mutiert (s. Abb. 30). Der Austausch G90A sollte dabei die Drehwinkel ϕ und ψ des α -C-Atoms so einschränken, daß ein 'turn' an dieser Stelle verhindert wurde und es damit zu einer Destabilisierung der Rossmann-Falte und zu einem Defekt in der NADP-

Anbindung kam. Der Austausch A95G sollte zu einer Verringerung der Enzymaktivität führen und eventuell die Affinität zum NADP herabsetzen, sodaß möglicherweise die feste Bindung beeinflußt wurde.

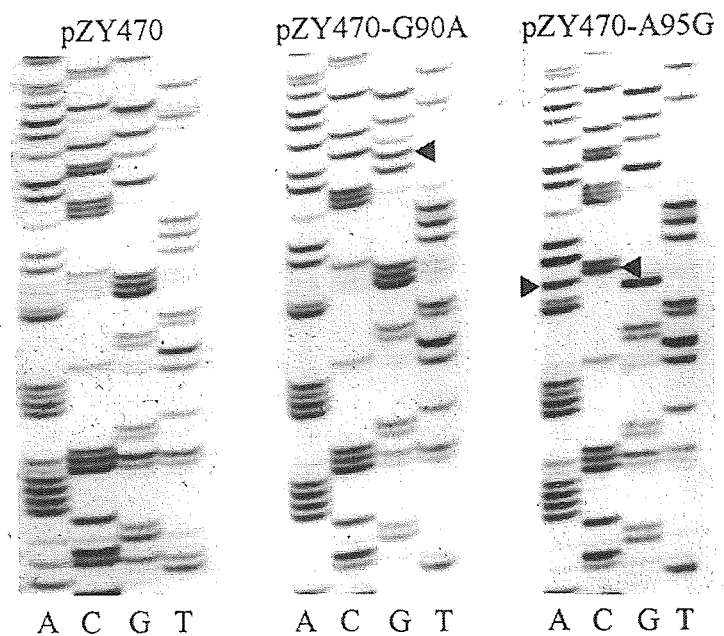


Abb. 30: DNA-Sequenz in den Bereichen der Basenaustausche G90A (GGT→GCT) und A95G (GCC→GGT) des mutagenisierten Gens der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase im Vergleich zur WT-Sequenz. Es wurde der Gegenstrang sequenziert; mutierte Basen sind mit einem Pfeil markiert. Die Austausche und Klonierungen wurden wie unter II. beschrieben durchgeführt.

Tab. 12: Spezifische Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) Aktivität in Rohextrakten rekombinanter *Z. mobilis* ACM3963 (GFOR-Defektmutante) Stämme bezogen auf das Gesamtzellprotein. Die Anzucht erfolgte über Nacht in Vollmedium mit 10 % Glukose + 100 mg/l Chlormamphenicol. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 wurde 1 mM IPTG zugegeben. pZY570: Plasmid mit kloniertem Gen der GFOR bzw. mit dem Gen der GFOR mit den angegebenen Aminosäureaustausch-Mutationen. (Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen).

	Stamm	GFOR-Aktivität [U/mg]
1.	ACM3963 /pZY570	25
2.	ACM3963 / pZY570-G90A	10
3.	ACM3963 / pZY570-A95G	21
4.	ACM3963 / pZY570-C179S	19
5.	ACM3963 / pZY570-E180Q	0,8

Die GFOR-Aktivitäten der *Z. mobilis* ACM3963 Stämme mit dem entsprechend mutierten *gfo*-Gen auf Plasmid pZY570 sind in Tabelle 12 wiedergegeben. Mit *Z. mobilis* ACM3963/pZY570-G90A wurde im Vergleich zu *Z. mobilis* ACM3963/pZY570 eine ca. 2,5fach geringere GFOR-

Aktivität gemessen. Im Western Blot zeigte sich dabei, daß die geringere GFOR-Aktivität mit einer geringeren GFOR-Proteinmenge einherging (s. Abb. 31). *Z. mobilis* ACM3963/pZY570-A95G besaß im Vergleich zu *Z. mobilis* ACM3963/pZY570 nur eine unwesentlich niedrigere GFOR-Aktivität. Unterschiede in der Proteinmenge waren im Western Blot nicht deutlich.

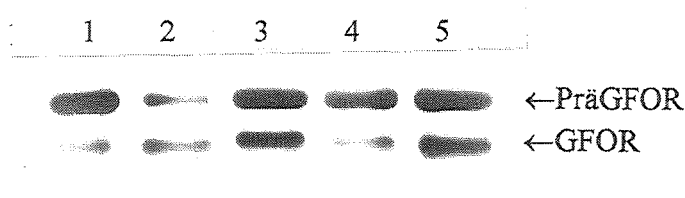


Abb. 31: Western Blot mit GFOR-spezifischen Antikörpern zum Nachweis der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in Rohextrakten verschiedener *Z. mobilis* Stämme (s.Tab.12). Es wurden jeweils ca. 10 µg Protein aus zellfreiem Rohextrakt aufgetragen. Spur 1 - 5: siehe Numerierung in Tabelle 12.

Die Stabilität der beiden mutierten Proteine wurde im 'pulse-chase'-Experiment untersucht. In beiden Fällen wurden im Vergleich zur Wildtypsituation bei 'chase'-Zeiten von einer Minute ähnliche Mengen Protein detektiert. Im Verlauf der chase-Zeiten kam es zu einem signifikanten Abbau des G90A-Proteins (s. Abb. 32), sodaß nach 60 min chase-Zeit eine deutlich schwächere Bande auf Höhe der prozessierten GFOR sichtbar war. Die GFOR-A95G blieb über eine Stunde stabil. Im Vergleich zur WT-GFOR war eine schnellere Prozessierung des Vorstufenproteins zu beobachten.

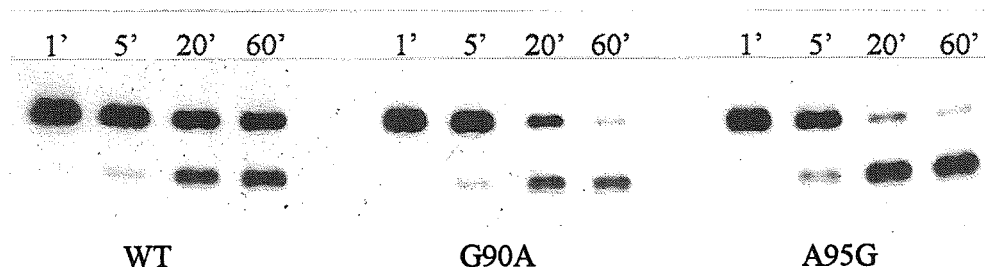


Abb. 32: Untersuchung der Stabilität der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Mutanten G90A und A95G im Vergleich zur WT-GFOR im 'in vivo pulse-chase' Experiment mit *Z. mobilis* ACM3963/pZY570, ACM3963/pZY570-G90A und ACM3963/pZY570-A95G. 5 min vor der Markierung wurde 1 mM IPTG zu den Kulturen gegeben.

5.4 Mutationen in einer konservierten Region der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Proteine mit Sequenzähnlichkeiten zur GFOR sind, soweit bekannt, ausschließlich Dehydrogenasen mit NAD oder NADP als Kofaktor. Dabei katalysierten die hypothetischen Rhizopin-Dehydrogenasen MocA und Orf334, das hypothetische Protein der Streptomycinbiosynthese StrI, die Inosit-Dehydrogenase IDH und die Galaktose-Dehydrogenase GalDH die Oxidation einer

glukoseähnlichen Verbindung. Die im Vergleich zu diesen Proteinen erkennbare Region Ala-Gly-Lys-His/Pro-Val-Xxx-Cys/Val-Glu-Lys-Pro befindet sich, setzt man eine Rossmann-Falte voraus, in der Nikotinamid-bindenden Hälfte der Bindestelle. Es konnte sich damit um einen Bereich handeln, der entweder aus Gründen der Kofaktorbindung und/oder der Substrat-Bindung bzw. -Umsetzung konserviert ist. Dieses wurde im folgenden durch gerichtete Mutagenese zweier Aminosäuren dieser Konsensussequenz der GFOR untersucht.

Cys¹⁷⁹ wurde zu Ser (C179S) und Glu¹⁸⁰ zu Gln (E180Q) mutiert (s. Abb. 33). Der Austausch C179S sollte konservativ sein, sodaß Größe und Polarität der Aminosäure 179 erhalten blieben. Es sollte damit festgestellt werden, ob das Cystein an dieser Stelle möglicherweise Teil einer Disulfidbrücke ist, oder ob das Cystein eine katalytische Funktion besitzt.

Beim Austausch E180Q wurde unter Beibehaltung der ungefähren Größe der Aminosäure die negative Ladung entfernt. Es sollte untersucht werden, ob diese Ladung bei der NADP-Bindung oder bei der Substrat-Bindung bzw. -Umsetzung eine Funktion besitzt.

Die GFOR-Aktivitäten der mutagenisierten Stämme sind in Tabelle 12 wiedergegeben. Im Rohextrakt von *Z. mobilis* ACM3963/pZY570-C179S konnte im Vergleich zu ACM3963/pZY570 nur eine geringfügig veränderte GFOR-Aktivität bezogen auf das Gesamtzellprotein gemessen werden. *Z. mobilis* ACM3963/pZY570-E180Q zeigte im Vergleich zu ACM3963/pZY570 eine drastisch verringerte GFOR-Aktivität von nur ca. 3 %. Im Western-Blot war dabei zu sehen, daß beide Mutanten im Vergleich zur Wildtypsituation ähnliche GFOR-Proteinmengen bildeten (s. Abb. 31).

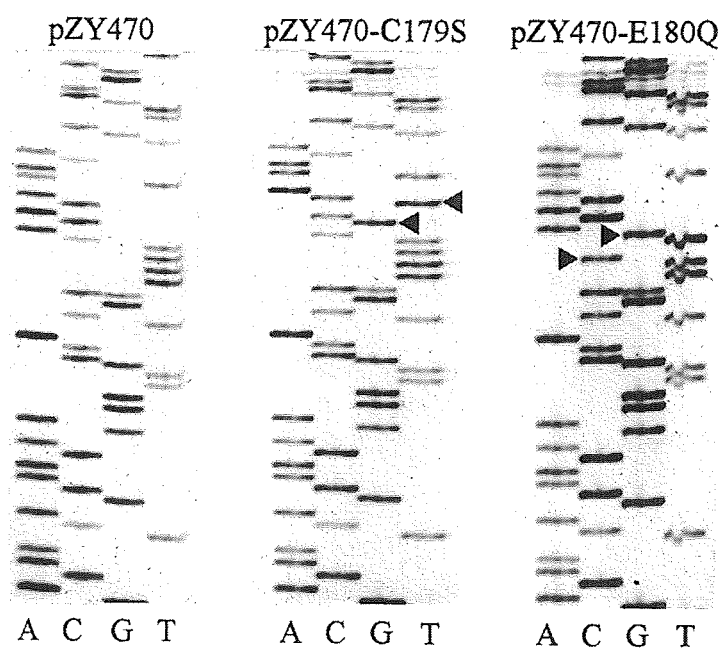


Abb. 33: DNA-Sequenz in den Bereichen der Basenaustausche C179S (TGT→AGC) und E180Q (GAA→CAG) des mutagenisierten Gens der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase im Vergleich zur WT-Sequenz. Es wurde der Gegenstrang sequenziert; mutierte Basen sind mit einem Pfeil markiert. Die Austausche und Klonierungen wurden wie unter II. beschrieben durchgeführt.

Da die geringe spezifische Aktivität der GFOR-E180Q unter anderem aus einer Beeinträchtigung der Kofaktorbindung resultieren konnte, wurde zellfreier Rohextrakt von *Z. mobilis* ACM3963/pZY570-E180Q im Vergleich zu ACM3963/pZY570 und ACM3963/pZY570-C179S über native Gelelektrophorese analysiert. Im nativen Gel kann durch Anregung der NADPH-Fluoreszenz proteingebundenes NADPH direkt nachgewiesen werden. Im Vergleich zu *Z. mobilis* ACM3963/pZY570 waren im nativen Gel mit Rohextrakten von *Z. mobilis* ACM3963/pZY570 fünf zusätzliche Proteinbanden sichtbar (Abb. 34a), die nach Inkubation des Gels in Glukoselösung zur Fluoreszenz angeregt werden konnten (Abb. 34b). Es handelte sich bei allen diesen Banden somit um GFOR, die offensichtlich bedingt durch die Überproduktionsbedingungen Heterotetramere aus Vorstufe und reifem Protein ausbildete (s. Abb. 34). Das Wanderungsverhalten der GFOR-E180Q war im Vergleich zur WT-GFOR und GFOR-C179S signifikant verändert. Bei der GFOR-E180Q konnte nach Inkubation des Gels in Glukoselösung, zur Reduktion des enzymgebundenen NADP der GFOR, keine NADPH-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die durch native Gelelektrophorese isolierte GFOR-E180Q hatte damit offensichtlich kein NADPH gebunden. Neben der Änderung des isoelektrischen Punkts durch den Ladungsaustausch der Mutation E180Q könnte das veränderte Wanderungsverhalten der GFOR-E180Q im nativen Gel durch das Fehlen des Kofaktors erklärt werden.

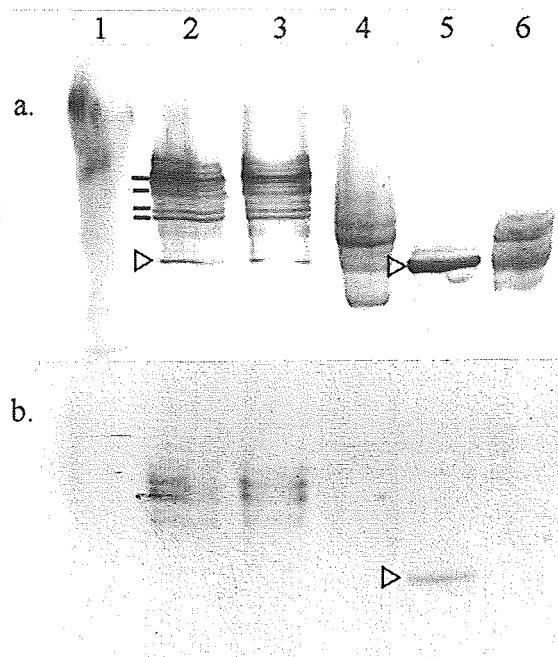


Abb. 34: Native saure Gelelektrophorese mit Rohextrakten rekombinanter *Z. mobilis* ACM3963 (GFOR-Defektmutante) zum Nachweis der nativen Größe und der NADP-Bindung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR) Mutanten C179S und E180Q. Zur Anreicherung der GFOR wurde der Rohextrakt mit DEAE-Sephacel, (50mM Tris/HCl pH 7,5) inkubiert. Es wurde je 20 µg des Überstands aufgetragen. 1: ACM3963/pZY507 (Kontrollvektor), 2: ACM3963/pZY570 (kloniertes Gen der GFOR), 3: ACM3963/pZY570-C179S, 4: ACM3963/pZY570-E180Q, 5. gereinigte GFOR (2 µg), 6: gereinigte GFOR-E180Q (2 µg). A: Coomassie gefärbt, B: Zymogramm, NADPH-Fluoreszenz nach Inkubation des ungefärbten Gels in 40 mM K-MES, 400 mM Glukose pH6,4; Anregung der Fluoreszenz bei 340 nm. Native GFOR: ▷; mögliche Heterotetramere: -

Um die Stabilität der GFOR-E180Q zu untersuchen, wurden 'pulse-chase'-Experimente durchgeführt. Die GFOR-E180Q war dabei über einen Zeitraum von einer Stunde stabil (s. Abb. 35).

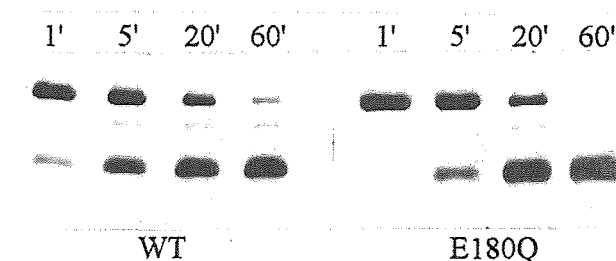


Abb. 35: Untersuchung der Stabilität der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Mutante GFOR-E180Q im Vergleich zur WT-GFOR im 'in vivo pulse-chase' Experiment mit *Z. mobilis* ACM3963/pZY570 und ACM3963/pZY570-E180Q. Es wurde kein IPTG zu den Kulturen gegeben.

5.5 Reinigung und Charakterisierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Mutanten GFOR-E180Q und GFOR-C179S

Zur genaueren Analyse wurde die GFOR-E180Q aus *Z. mobilis* ACM3963/pZY570-E180Q gereinigt. Die verschiedenen Reinigungsschritte sind in Abbildung 36 wiedergegeben.

Nach Elution des Proteins von der ersten Kationentauschersäule konnte in allen Fraktionen keine GFOR-Aktivität mehr gemessen werden, obwohl im SDS-Page mit entsprechenden Fraktionen ausgeprägte Banden im Bereich der GFOR zu sehen waren. Nach Zugabe von 1 mM NADP oder NADPH zum Enzymtest konnten in diesen Fraktionen geringe GFOR-Aktivitäten gemessen werden.

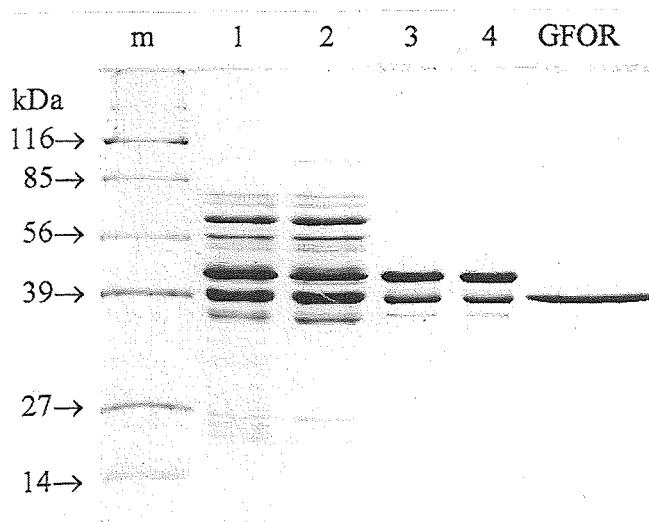


Abb. 36: SDS-Polyacrylamidgel zur Darstellung der Effizienz der verschiedenen Schritte zur Reinigung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Mutante GFOR-E180Q. 1. zellfreier Rohextrakt; 2. nach Ultrazentrifugation; 3. nach gekoppelter Anionen-/Kationenaustausch-Chromatographie; 4. nach zweiter Kationenaustausch-Chromatographie. Die Reinigung erfolgte wie unter II.6.5 beschrieben mit einer Ausbeute von ca. 130 mg Protein.

Im Western Blot mit GFOR-spezifischen Antikörpern wurden alle im SDS-Page sichtbaren Banden des gereinigten Proteins detektiert, sodaß es sich bei diesem Protein tatsächlich um die GFOR-E180Q handelte. Das Protein bestand dabei aus PräGFOR, prozessierter GFOR und einer geringen Menge eines GFOR-Abbauproduktes (s. Abb. 36, Spur 4). Die große Menge der PräGFOR resultierte dabei aus der Überexpression des *gfo*-E180Q-Gens durch IPTG-Zugabe zur Kultur.

Die spezifische Aktivität der gereinigten GFOR-E180Q mit ca. 1,5 U/mg war im Vergleich zur WT-GFOR (ca. 200-250 U/mg) um den Faktor 150 erniedrigt. Enzymatische Aktivität konnte nur bei Zugabe von Glukose, Fruktose und NADP oder NADPH im Enzymtest gemessen werden. Ca. 10 μ M NADPH im Enzymtest reichten aus, um ca. 1,5 μ M GFOR-E180Q mit dem Kofaktor abzusättigen und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Im Enzymtest nur mit Glukose als Substrat und einem Überschuss an NADP (1 mM) war keine Glukonsäurebildung meßbar. Diese Daten weisen darauf hin, daß das NADP als Kofaktor und nicht als Kosubstrat wirkt. Die GFOR-E180Q entwickelte nur mit NADP(H) enzymatische Aktivität, nicht aber mit NAD(H), sodaß die Präferenz der GFOR für NADP(H) bei der Mutante E180Q erhalten blieb.

Bei einer Gelfiltration über eine geeichte Sephadex-G-200 Säule besaß die GFOR-E180Q im Vergleich zur WT-GFOR ein in etwa gleiches Elutionsvolumen und damit eine ähnliches natives Molekulargewicht (s. Abb. 37). Damit lag die GFOR-E180Q als Tetramer vor.

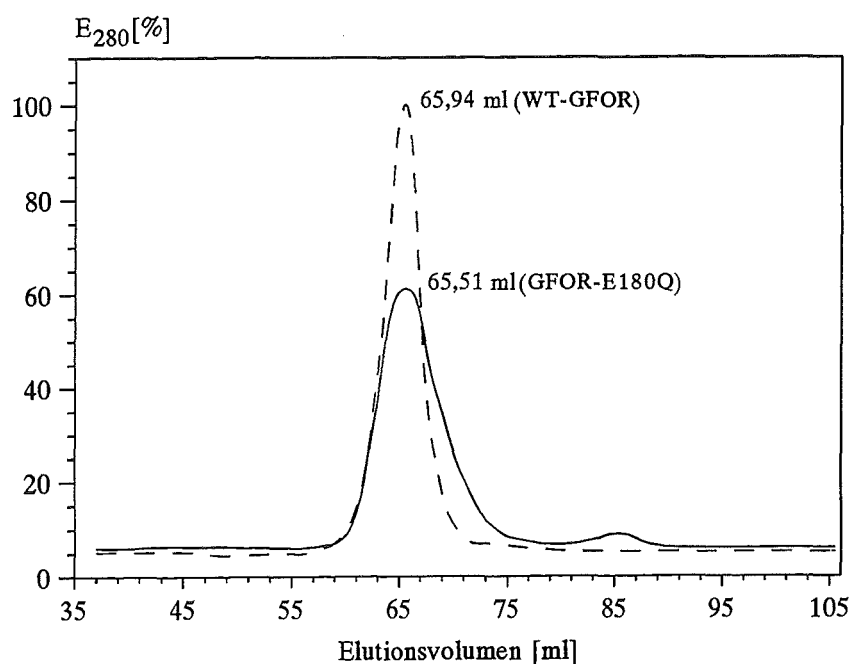


Abb. 37: Bestimmung des nativen Molekulargewichts der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Mutante GFOR-E180Q im Vergleich zur WT-GFOR mittels Gelfiltration an Sephadex G-200. Die Säule war mit Proteinstandards geeicht. Das Elutionsvolumen der GFOR-E180Q und WT-GFOR entsprach einem ungefähren Molekulargewicht von 150 kDa.

In fluoreszenzspektroskopischen Messungen bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm war mit der GFOR-E180Q im Gegensatz zur WT-GFOR nach vorheriger Inkubation mit Glukose erwartungsgemäß keine Emission von NADPH-Fluoreszenz bei 450 nm meßbar.

Die Daten zeigen, daß durch die Mutation E180Q die feste NADP-Bindung der GFOR und die katalytische Funktion beeinträchtigt wurde, die native tetramere Struktur aber erhalten blieb.

Die GFOR-C179S wurde ebenfalls gereinigt (Abb. 38), da mit Kristallen dieses Proteins wegen der ungeraden Anzahl an Cysteinresten möglicherweise eine Schwermetallderivatisierung vereinfacht wird (U. Ermler, mündl. Mitteilung). Um homogene reife GFOR zu erhalten, wurde *Z. mobilis* ACM3963/pZY570-C179S ohne IPTG-Zugabe kultiviert.

Die gereinigte GFOR-C179S hatte eine ähnliche spezifische Aktivität wie die WT-GFOR und den Kofaktor NADP(H) fest gebunden.

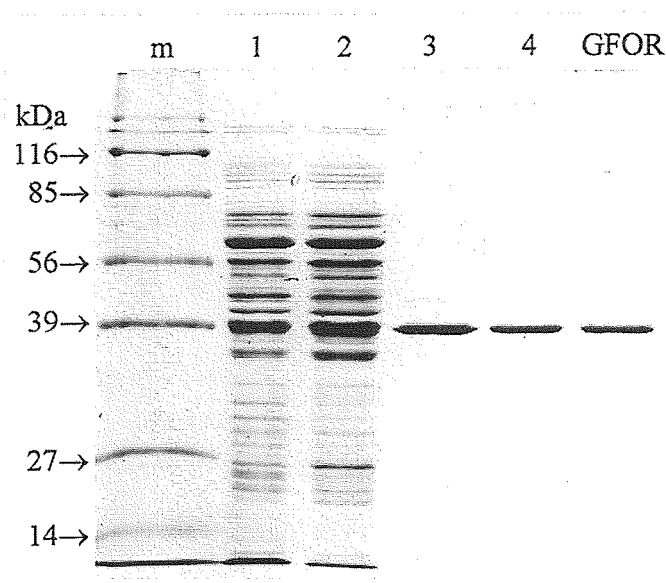


Abb. 38: SDS-Polyacrylamidgel zur Darstellung der Effizienz der verschiedenen Schritte zur Reinigung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Mutante GFOR-C180S Reinigung. 1. zellfreier Rohextrakt; 2. nach Ultrazentrifugation; 3. nach gekoppelter Anionen-/Kationenaustausch-Chromatographie; 4. nach zweiter Kationenaustausch-Chromatographie. Die Reinigung erfolgte wie unter II.6.5 beschrieben mit einer Ausbeute von ca. 80 mg Protein.

IV. Diskussion

1. Physiologische Funktion der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Die physiologische Funktion der GFOR ist offensichtlich die Bildung von Sorbit als 'compatible solute' bei Wachstum auf hohen Zuckerkonzentrationen (Loos et al., 1994c).

Z. mobilis ACM3963 konnte als GFOR-Defektmutante identifiziert werden. ACM3963 war von Kirk & Doelle (1993) als Spontanmutante aus einer Dauerkultur von *Z. mobilis* ATCC39676 isoliert worden. Dabei war eine ständige Subkultivierung von ATCC39676 in Vollmedium mit 10 % Glukose über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr durchgeführt worden (Kirk, persönliche Mitteilung). Offensichtlich hatte der Verlust der GFOR Expression einen positiven Einfluß auf das Wachstum unter diesen Kultivierungsbedingungen, sodaß eine spontane GFOR Defektmutante sich in der Population durchsetzen konnte. Setzt man voraus, daß die einzige Aufgabe der GFOR die Bildung von Sorbit aus Fruktose ist, so besitzt das Enzym bei Wachstum auf Glukose als einziger Kohlenstoffquelle keine Funktion. Die GFOR macht ca. 1 % des Gesamtzellproteins von *Z. mobilis* aus, wobei das Enzym konstitutiv vorhanden ist (Zacchariou & Scopes, 1986). GFOR Defektmutanten haben vermutlich deshalb einen Vorteil bei Wachstum auf Glukose, da sie keine GFOR mehr synthetisieren und exportieren müssen, die bei Wachstum auf Glukose keine Funktion besitzt. Bei Wachstum von *Z. mobilis* auf natürlichen Substraten wie Pflanzensäften können sich solche Mutationen jedoch nicht durchsetzen, da hier hohe Saccharosekonzentrationen vorliegen und damit die Sorbitbildung durch die GFOR von entscheidender Bedeutung ist.

Der Einfluß von Sorbit auf das Wachstum von *Z. mobilis* ACM3963 war deutlich, da mit 12,5 % Glukose/12,5 % Fruktose ohne Sorbitzugabe über einen Zeitraum von 190 h kein Wachstum beobachtet werden konnte. Bei externer Sorbitzugabe oder durch Einbringung einer plasmidkodierten GFOR-Aktivität wurde der Wachstumsdefekt aufgehoben. Die postulierte physiologische Funktion der GFOR konnte somit bestätigt werden.

Die periplasmatische Lokalisierung der GFOR bedeutet einen hohen Aufwand für *Z. mobilis*, da zum einen die GFOR und der Kofaktor NADP ins Periplasma exportiert werden und zum anderen ein aktives Transportsystem zur cytoplasmatischen Akkumulation des periplasmatisch gebildeten Sorbits notwendig ist. Es wurde angenommen, daß die periplasmatische Lokalisierung zusammen mit dem hohen K_M -Wert für Fruktose entscheidend für die physiologische Funktion der GFOR ist (Loos et al., 1994c). In der Natur ist Saccharose die Hauptkohlenstoffquelle für *Z. mobilis*. Saccharose wird durch die extrazellulären Enzyme Invertase und Levansucrase hydrolysiert (O'Mullan et al., 1990; Preziosi et al., 1990). Dabei entstehen Glukose und Fruktose und durch die Aktivität der Levansucrase zusätzlich Oligosaccharide und das Fruktosepolymer Levan (Viikari, 1988; Johns et al., 1992). Durch die Polymerisierung ist der Anteil der Fruktose im Vergleich zur Glukose geringer. Glukose und Fruktose werden durch den Glukose-Facilitator ins Cytoplasma transportiert, dabei ist die Affinität des Transporters für Fruktose ca. zehnmal niedriger als für Glukose (Weißer et al., 1995). Fruktose ist deshalb nur bei hohen Saccharosekonzentrationen

trationen und nur im Periplasma von *Z. mobilis* für eine ausreichende Sorbitbildung durch die GFOR verfügbar.

Anhand der cytoplasmatischen GFOR-Variante, die durch eine Deletion innerhalb der GFOR-Signalsequenz hergestellt wurde ($\Delta 32-46$; DEL3), konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die periplasmatische Lokalisierung der GFOR tatsächlich zur effizienten Sorbitbildung notwendig ist. Bei Kultivierung in 12,5 % Glukose/ 12,5 % Fruktose hatte die cytoplasmatische Lokalisierung der GFOR zwar keinen Einfluß auf das Wachstum, es wurde aber bei gleicher enzymatischer Aktivität deutlich weniger Sorbit gebildet. Bei Kultivierung mit 30 % Saccharose wirkte sich die cytoplasmatische Lokalisierung der GFOR auch auf das Wachstum aus, da hier wegen der noch geringeren Verfügbarkeit der Fruktose nur sehr wenig Sorbit durch die cytoplasmatische GFOR gebildet werden konnte. Die Notwendigkeit der periplasmatischen Lokalisierung der GFOR ist damit experimentell bestätigt.

Z. mobilis ACM3963 erreichte bei Wachstum mit 12,5 % Glukose/ 12,5 % Fruktose und 50 mM Sorbit insgesamt höhere Zelldichten als mit dem klonierten *gfo*-Gen oder als ein *Z. mobilis* Wildtypstamm. Dieses könnte aus der Bildung von Glukonsäure durch die GFOR-Aktivität zurückzuführen sein, die entweder zu einer schnellen Ansäuerung des Mediums und/oder zu einem Redoxungleichgewicht im Stoffwechsel von *Z. mobilis* führt. Durch die GFOR-Reaktion können Reduktionsäquivalente entzogen werden, da bei einem Abbau von einem Mol der gebildeten Glukonsäure statt zwei nur ein Mol NADH entsteht. Durch dieses Redoxungleichgewicht im Gärungsstoffwechsel kann es zur Anhäufung von Dihydroxyaceton oder Acetaldehyd kommen. Diese Substanzen üben einen toxischen Effekt auf das Wachstum von *Z. mobilis* aus (Bringer et al., 1984; Viikari, 1988).

2. Export der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Es war bislang unklar, ob die 52 Reste umfassende N-terminale Aminosäuresequenz der GFOR tatsächlich für den Export der GFOR verantwortlich ist. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Export der GFOR und die Funktion der aminoterminalen Sequenz untersucht. Dazu wurde die 'pulse-chase'-Technik für *Z. mobilis* etabliert.

Eine Prozessierung der PräGFOR war in 'pulse-chase'-Experimenten mit *Z. mobilis* deutlich sichtbar. Damit konnte erstmals gezeigt werden, daß 'in vivo' eine Umwandlung der GFOR-Vorstufe zur reifen GFOR erfolgt.

Um herauszufinden, ob diese Prozessierung mit einem Export der GFOR und damit mit einer spezifischen proteolytischen Abspaltung der Signalsequenz durch die Signalpeptidase im Periplasma verbunden ist, wurde die Wirkung von CCCP und Natriumazid im 'pulse-chase'-Experiment untersucht. Das elektrochemische Membranpotential ist unter anderem für einen Sec-abhängigen Proteinexport essentiell. Eine Depolarisierung der Membran durch Protonophore blockiert die Translokation und damit die Prozessierung (Bakker & Randall, 1984). Das Protonophor CCCP verursachte in einer Konzentration von 0,1 mM eine vollständige Hemmung der

GFOR-Prozessierung. Der gleiche hemmenden Effekt wurde mit 3 mM Natriumazid beobachtet, welches die ATPase Translokationsaktivität des SecA-Proteins und damit spezifisch die Sec-abhängige Proteintranslokation inhibiert (Oliver et al., 1990; Fortin et al., 1990).

Eine Hemmung der GFOR-Prozessierung konnte ebenfalls durch die Deletion der Aminosäuren 32 bis 46 der hypothetischen h-Region der GFOR-Signalsequenz erreicht werden. Die h-Region ist nach dem 'Unlooping' Modell (de Vrije et al., 1990) für die Insertion der Signalsequenzen in die Cytoplasmamembran verantwortlich, wodurch die Translokation initiiert wird.

Aus diesen Daten und den strukturellen Ähnlichkeiten der GFOR-Signalsequenz zu anderen prokaryontischen Signalsequenzen kann geschlossen werden, daß die GFOR unter Beteiligung des Sec-Apparates ins Periplasma exportiert wird.

Es stellte sich damit die Frage, wie und zu welchem Zeitpunkt der Kofaktor NADP an das Apoprotein gebunden wird und ob die ungewöhnlich lange Signalsequenz der GFOR eine spezifische Funktion beim Kofaktor/Apoprotein Export besitzt. Die Deletion der gesamten Signalsequenz (DEL1, Δ 2-52) bzw. des hydrophoben Bereichs (DEL3, Δ 32-46) sollte klären, ob die GFOR bereits im Cytoplasma aktiv ist. Die Deletion der gesamten Signalsequenz hatte dabei eine drastische Verminderung der GFOR-Menge im Rohextrakt zur Folge, die vermutlich auf eine Störung der Transkription oder Translation zurückzuführen war. Verminderte Proteinsyntheseraten, die durch Deletionen oder Mutationen vor allem in der n-Region von Signalsequenzen hervorgerufen werden, wurden mehrfach beschrieben (Hall et al., 1983; Inouye et al., 1982; Puziss et al., 1989). Die daraus aufgestellte Hypothese, daß die Translokation mit der Translation gekoppelt ist, konnte bislang nicht bestätigt werden. Im Falle des Maltosebindepoteins (MBP) wurde gezeigt, daß die durch eine Deletion der Aminosäuren 2 bis 8 in der n-Region verminderte MBP-Biosynthese aus einer Änderung der mRNA-Sekundärstruktur im Bereich der Ribosomenbindestelle resultierte (Puzzis et al., 1992). Ähnliches könnte auch bei der DEL1 Mutation der GFOR der Fall sein.

Abgesehen von der gebildeten Proteinmenge waren sowohl die Deletionsmutante DEL1 als auch DEL3 enzymatisch aktiv. Die gereinigte GFOR Δ 32-46 (DEL3) hatte den Kofaktor wie die WT-GFOR fest gebunden und zeigte eine vergleichbare spezifische Aktivität. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung zu der Beobachtung, daß die über native Gelelektrophorese aufgetrennte PräGFOR NADP bereits gebunden enthält (Loos et al., 1993). Die cytoplasmatische GFOR ist also schon in der Lage, NADP fest zu binden.

Durch Klonierung des *gfo*-Gens in Leserichtung starker Promotoren wurde erstmals eine Expression aktiver GFOR in *E. coli* erreicht. Es ist daher unwahrscheinlich, daß die cytoplasmatisch vorliegende GFOR auf einen spezifischen Faktor zur NADP-Anbindung angewiesen ist, wie es von Kanagasundaram & Scopes (1992) vermutet wurde. Die NADP-Bindung der GFOR erfolgt somit spontan bzw. unter Mitwirkung unspezifischer Chaperone. Warum von Kanagasundaram & Scopes (1992) keine Expression des *gfo*-Gens trotz eines starken *gfo*-spezifischen mRNA-Signals beobachtet wurde, kann nicht eindeutig erklärt werden.

Die GFOR unterscheidet sich damit hinsichtlich der Anbindung des Kofaktors von anderen Exportproteinen, die eine prosthetische Gruppe besitzen. Die Apoproteine der c-Typ Cytochrome

z.B. binden den Kofaktor Häm nicht im Cytoplasma, sondern nach dem Export ins Periplasma, wobei erst hier unter Beteiligung spezifische Helferproteine eine kovalente Verknüpfung auftritt (Thöny-Meyer et al., 1994). Bei der N_2O -Reduktase aus *Pseudomonas stutzeri* sind drei Genprodukte bekannt, die für den periplasmatischen Einbau des Kupfer-Chromophors notwendig sind (Zumft et al., 1990). Die Kofaktoren der Methanol- und Methylamin-Dehydrogenasen werden ebenfalls erst im Periplasma an das jeweilige Apoprotein gebunden (Goodwin & Athony, 1995). Aus der Tatsache, daß die GFOR bereits im Cytoplasma NADP binden kann, läßt sich nicht schließen, daß das Protein zusammen mit dem Kofaktor über die Membran exportiert wird. Es ist jedoch anzunehmen, daß im Periplasma von *Z. mobilis* kein freies NADP vorkommt. Im Periplasma Gram-negativer Bakterien konnten bislang keine freien Nukleotide wie z.B. ATP nachgewiesen werden. Ferner befinden sich im Periplasma Phosphatasen (Rosen, 1987; Wülfing & Plückthun, 1994), was auch für *Z. mobilis* beschrieben wurde (Pond et al., 1989; Baoudene-Assali et al., 1993; Gomez & Ingram, 1995).

Proteine, die über den Sec-Weg transportiert werden, können nicht in einer kompakten Faltung durch den Translokationskanal geschleust werden (Pugsley, 1993). Bei einer Fusion der cytoplasmatischen β -Galaktosidase (β -Gal) oder Dihydrofolatreduktase (DHFR) an ein Exportprotein und einer hohen Expression dieses Fusionsproteins kam es zu einer Blockierung der Proteinsekretion durch die stabile Konformation der DHFR bzw. der β -Gal (Lee et al., 1989; Freudl et al., 1988). Ebenso konnte in 'in vitro' Experimenten gezeigt werden, daß durch die Translokation eines PräOmpA-DHFR Fusionsproteins eine partielle Entfaltung der DHFR verursacht wurde, die einen Export ermöglichte. Bei einer stabilen Faltung der DHFR durch Zugabe des Kofaktors NADH und des Substratanalogon Methotrexat trat diese Entfaltung nicht auf und es erfolgte damit auch kein Export (Arkowitz et al., 1993). Im Gegensatz dazu war ein Export von Proteinen mit limitierter Sekundärstruktur möglich, was z.B. an der Translokation eines biotinylierten Proteins (Reed & Cronan, 1991) oder des OmpA mit einer artifiziell eingefügten Disulfidbrücke gezeigt wurde (Tani et al., 1990).

Es ist daher unwahrscheinlich, daß die GFOR zusammen mit dem Kofaktor NADP in einer stabil gefalteten Konformation exportiert wird. Es müssen daher beim Export der GFOR in *Z. mobilis* Voraussetzungen vorliegen, die eine stabile cytoplasmatische Faltung des Proteins verhindern.

Signalpeptide können die Rückfaltung von denaturierten Präproteinen verlangsamen (Park et al., 1988; Liu et al., 1989) und haben deshalb vermutlich auch 'in vivo' einen Einfluß auf die Faltungsgeschwindigkeit der Präproteine (Pugsley, 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb zunächst angenommen, daß die ungewöhnliche lange Signalsequenz der PräGFOR das Protein spezifisch in einer translokationskompetenten Form hält und 'in vivo' eine Anlagerung des NADP verhindert. Ebenso war möglich, daß die verlängerte n-Region mit einer spezifischen anderen Komponente in Wechselwirkung steht und damit den Export der GFOR vermittelt. Eine Verkürzung der n-Region um 19 Aminosäuren hatte jedoch keinen deutlichen Einfluß auf die Prozessierungskinetik und die enzymatische Aktivität der GFOR. Zudem konnte die GFOR-Signalsequenz funktionell durch die 35 Aminosäurereste umfassende Signalsequenz der Glukono-

lactonase ersetzt werden. Eine spezifische Aufgabe der GFOR-Signalsequenz im Zusammenhang mit der Kofaktoranbindung oder dem Kofaktorexport kann damit ausgeschlossen werden.

Auffallend war jedoch die langsame Prozessierungskinetik der PräGFOR in *Z. mobilis*. Bei einer ca. fünffachen Überexpression des *gfo*-Gens mit Plasmid pZY570 ohne IPTG-Zugabe zur Kultur war nach einer Markierungszeit von 5 min und einer chase Zeit von 20 min noch keine vollständige Prozessierung zu beobachten. Im Vergleich dazu werden Exportproteine, wie z.B. das PräOmpA-Protein von *E. coli*, auch bei Überexpression innerhalb einer sehr viel kürzeren Zeit prozessiert (R. Freudl, persönliche Mitteilung). Dieses könnte bedeuten, daß die ungewöhnliche GFOR-Signalsequenz eine Verlangsamung des Exports verursacht. Dieser insgesamt langsame Export könnte auch der Grund dafür sein, daß eine Fusion aus GFOR und β -Galaktosidase (Völler, 1991) in *Z. mobilis* nicht letal wirkte, da der Exportapparat nicht vollständig blockiert wurde.

Weitere Hinweise geben die Untersuchungen zum GFOR-Export im heterologen System *E. coli*. 'Pulse-chase'-Experimente, Trypsinverdaus und Fusionen mit der alkalischen Phosphatase zeigten, daß die authentische Signalsequenz der GFOR keinen meßbaren Export in *E. coli* vermittelt. Da in Trypsinverdaus zur Lokalisierung der GFOR kein deutlicher Abbau der drei GFOR-spezifischen Banden stattfand, ist auch auszuschließen, daß die GFOR in *E. coli* exportiert aber nicht prozessiert wird. Die im 'Western-Blot' sichtbare zusätzliche Bande zwischen PräGFOR und GFOR entsteht damit vermutlich aus einem cytoplasmatischen Abbau der PräGFOR durch unspezifische Proteasen, und nicht wie ursprünglich vermutet aus einer falschen Prozessierung durch die Signalpeptidase (Völler, 1991). Die GFOR Signalsequenz ist daher offensichtlich mit dem Sec-Apparat von *E. coli* nicht kompatibel.

Ähnliches wurde bei der Methylamin-Dehydrogenase aus *Methylobacterium extorquens* AM1 beobachtet. Die kleine Untereinheit dieses Proteins besitzt eine ungewöhnliche Signalsequenz von 57 Aminosäuren Länge mit vier positiven Ladungen in der c-Region und trägt als Kofaktor Tryptophan-Tryptophyl-Quinon (TTQ). In *E. coli* war ebenfalls keine deutliche Prozessierung des Proteins sichtbar und PhoA-Fusionen waren nicht aktiv. Die Autoren vermuten, daß diese ungewöhnliche Signalsequenz den Export des Proteins verlangsamt und so die Synthese des TTQ aus zwei intrinsischen Typtophanresten ermöglicht wird (Chistoserdov & Lidstrom, 1991).

Bei einer Fusion der GFOR mit den Signalsequenzen der PhoA und des OmpA kam es zu einer schnellen Prozessierung der Fusionsproteine, wobei aber die exportierte GFOR schnell proteolytisch abgebaut wurde. Diese Proteolyse beruht mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einer instabilen Konformation der GFOR im Periplasma von *E. coli*. Diese falsche Faltung könnte entweder durch die Einführung falscher Disulfidbrücken (Alksne et al., 1995), oder durch die Abwesenheit des Kofaktors NADP(H) verursacht werden. Eine beschleunigte Proteolyse von Apoproteinen, denen der Kofaktor fehlt, wurde bereits in mehreren Fällen beschrieben (Brandsch et al., 1989; Jaenicke, 1987; Saijo & Tanaka, 1995).

Die ermittelten Daten können zu einem hypothetischen Modell des GFOR-Exports zusammengefaßt werden (s. Abb. 39). Die ungewöhnliche GFOR Signalsequenz verursacht eine

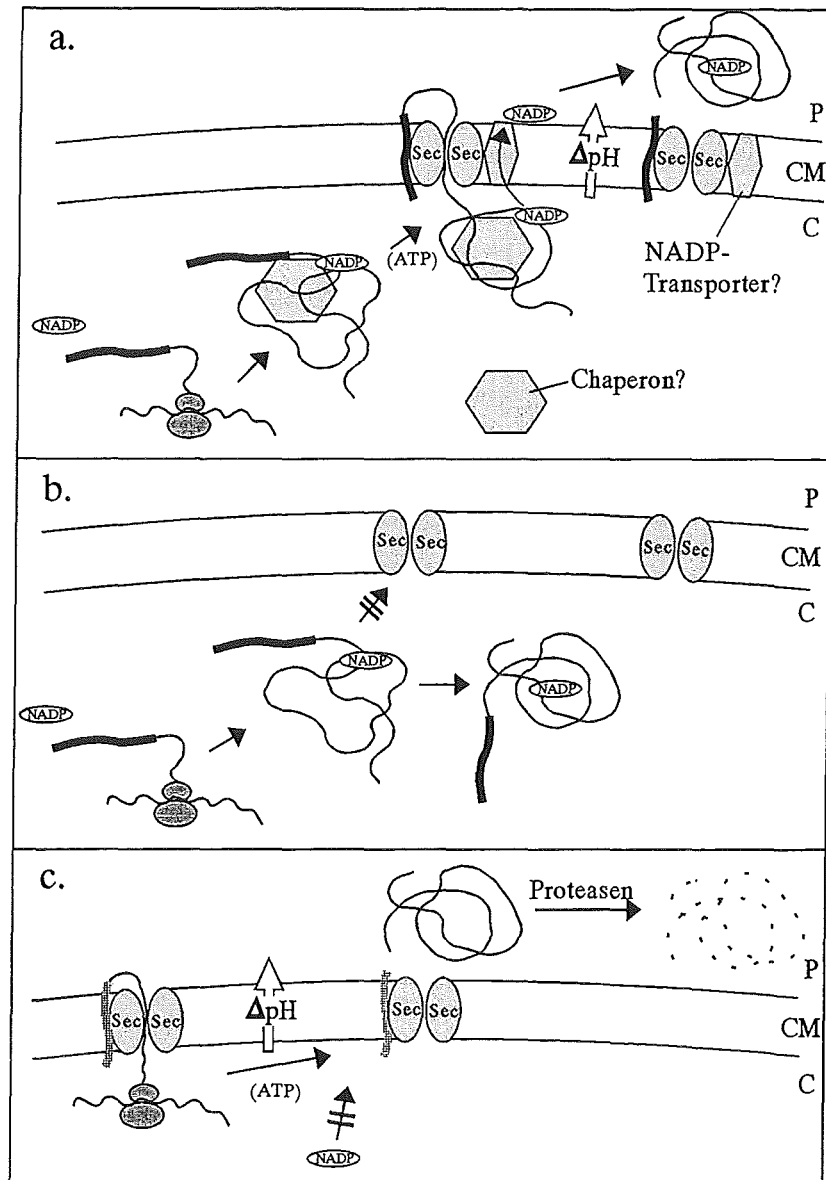


Abb. 39: Hypothetisches Modell zum Export der GFOR. Durch die ungewöhnliche Signalsequenz der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase kommt es zu einer Verzögerung des Exports in *Z. mobilis*, die eine Anlagerung an spezifische Faktoren wie z.B. ein Chaperon oder eine integrale Membrankomponente ermöglicht (a). In *E. coli* ist ein Export der GFOR wegen der nicht vorhandenen spezifischen Faktoren und/oder der ungewöhnlichen GFOR-Signalsequenz nicht möglich (b). Erst durch den Austausch der GFOR-Signalsequenz gegen die Signalsequenzen der PhoA, des OmpA oder der GNL wird die GFOR in *E. coli* exportiert, aber wegen des fehlenden NADP falsch gefaltet und proteolytisch abgebaut (c). P: Periplasma; CM: Cytoplasmamembran; C: Cytoplasma.

Verlangsamung des Exports in *Z. mobilis*, sodaß die Translokation posttranslational verläuft. Durch die Verkürzung der Signalsequenz um 19 Aminosäuren oder den Austausch gegen die ebenfalls reaktiv lange GNL-Signalsequenz wurde dabei die Verzögerung nicht deutlich beeinflusst, was an einer ähnlichen Prozessierungskinetik zu erkennen ist. Durch die Verzögerung

des Exports kommt es zu einer Anlagerung der PräGFOR an ein spezifisches Chaperon und/oder eine integrale Komponente der Cytoplasmamembran, die den Export der GFOR vermittelt und möglicherweise mit dem Export des NADP(H) abstimmt. Bei dieser Membrankomponente könnte es sich dabei um einen ABC-Transporter handeln, der das NADP(H) separat vom Apoprotein transportiert, wie es beim Häm-Transporter beim Cytochrom-*c* Export der Fall ist (Thöny-Meyer et al., 1994). Alternativ könnte es sich um ein Chaperon oder eine zusätzliche Komponente des Sec-Wegs handeln, die einen Export des Proteins zusammen mit dem NADP(H) ermöglicht. Da *E. coli* diese zusätzlichen Faktoren zum Export des Kofaktors fehlen, ist der Export mit der authentischen GFOR-Signalsequenz nicht möglich und bei einem Austausch der Signalsequenz kommt es wegen des Mangels an NADP(H) im Periplasma zu einer falschen Faltung und zum Abbau der exportierten GFOR. Die offensichtliche Letalität der PhoA_{SS}GFOR- und der OmpA_{SS}GFOR-Fusionen in *Z. mobilis* kann durch eine effizientere Wechselwirkung der kurzen Signalsequenzen mit dem *Z. mobilis* Sekretionsapparat erklärt werden, der durch die Überexpression der Fusionsproteine blockiert wird. Daß die *Z. mobilis* Signalsequenzen nicht völlig inkompatibel zum *E. coli* Exportapparat sind, zeigt dabei die Funktionalität der GNL-Signalsequenz in *E. coli*. Um dieses zu bestätigen, müßten jedoch mehr Informationen zum Export anderer Proteine in *Z. mobilis* vorliegen. Die Translokation heterologer Exportproteine wurde in *Z. mobilis* bislang wenig untersucht (Misawa et al., 1988; Okamoto et al., 1994).

Eine sehr attraktive Vorstellung zur Translokation der GFOR ist die Kopplung des Exports von Apoprotein und Kofaktor, da so das Verhältnis von exportiertem NADP und Protein aufeinander abgestimmt ist und kein freies NADP ins Periplasma transportiert werden müßte. Eine solche Kopplung wird beim Cytochrom-*c* Export in Bakterien vermutet, da bei *Rhodobacter capsulatus* die Gene des ABC-Transporters des Häm in unmittelbarer Nähe der Gene für SecD und Sec F liegen (Beckman & Kranz, 1993; Thöny-Meyer et al., 1994). Diese relative Nähe der Gene sagt jedoch nichts über eine tatsächliche Kopplung beim Export aus. Bei der Dimethylsulfoxid-Reduktase, einem Enzym mit dem den Dinukleotiden sehr ähnlichen Molybdän-Kofaktor (MoCo; Johnson et al., 1990), wird ein Export des Apoproteins nur mit Molybdän im Medium beobachtet. Mutanten mit einem Defekt in der Synthese des MoCo sind nicht in der Lage das Apoprotein zu prozessieren, sondern akkumulieren es in der Membran (Yoshida et al., 1991; Masui et al., 1992).

Möglicherweise wird durch die Anbindung der Kofaktoren eine Konformationsänderung des Apoproteins verursacht, die den Export mit einer Art intrinsischer Translokationsenergie beschleunigt. Diese Annahme wird durch das "Brownian Ratchet" Modell (Simon et al., 1992) unterstützt. Dieses Modell besagt, daß die Proteintranslokation durch die 'Brownsche'-Molekularbewegung angetrieben wird, wobei die Bewegung und damit die Translokation durch chemische Unterschiede bzw. Prozesse auf der periplasmatischen Seite (z.B. Prozessierung, Disulfidbrücken-Bildung oder Kofaktorbindung) in eine Richtung gelenkt wird (Simon et al., 1992). Das Cytochrom *c*₂ Apoprotein aus *Rhodobacter sphaeroides* wird offensichtlich sogar bei einer vollständigen Deletion der Signalsequenz ins Periplasma exportiert (Brandner & Donohue, 1994). Obwohl dieser Export vermutlich unphysiologisch ist, kann hier ein Mechanismus wie

beim mitochondriellen Import des Cytochrom *c* nicht ausgeschlossen werden. Beim mitochondriellen Import wird das signalsequenzlose Apoprotein durch ein Helferprotein in der äußeren Mitochondrienmembran integriert und der Import unabhängig vom Membranpotential durch eine Konformationsänderung durch Anbindung des Häm angetrieben (Hartl et al., 1989).

3. Charakterisierung der NADP-Bindestelle der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase

Die Ablösung des Kofaktors NADP(H) von der GFOR war nach Denaturierung mit Perchlorsäure (Zachariou & Scopes, 1986) und SDS (Loos, 1994a), nicht jedoch mit 8 M Harnstoff beobachtet worden (Loos, 1994a). Dieses ist ungewöhnlich, da Harnstoff eine höhere Denaturierungskapazität als SDS oder extreme pH-Werte besitzt (Jaenicke & Rudolph, 1989). Es ist bekannt, daß hohe SDS-Konzentrationen und saure pH-Konditionen starke kovalente Bindungen wie z.B. Peptidbindungen aufbrechen (Rittenhouse & Marcus, 1984). Daher war bislang nicht auszuschließen, daß das NADP(H) in einer kovalenter Form an die GFOR gebunden ist. In der vorliegenden Arbeit konnte die Denaturierung der GFOR durch 6 M Guanidin-Hydrochlorid oder 8 M Harnstoff im Fluoreszenzspektrum anhand der Verschiebung des Proteinfluoreszenzmaximums von 310 nach 350 nm verfolgt werden. Dabei kam es zu einer Ablösung des Kofaktors NADP(H) vom Enzym, was zeigt, daß NADP(H) nicht-kovalent an die GFOR gebunden ist. Die Denaturierung der GFOR mit Harnstoff verlief dabei in einer langsamen Kinetik und unterstreicht die offensichtlich kompakte Faltung der GFOR.

Das Spektrum der intrinsischen Proteinfluoreszenz der nativen GFOR ist durch das fest gebundene NADP(H) ungewöhnlich. Im Vergleich zur denaturierten GFOR war nur ein schwacher Proteinfluoreszenzpeak zu erkennen, wobei bei vorheriger Reduktion des Kofaktors durch Inkubation der GFOR mit Glukose zusätzlich ein ausgeprägter Peak bei 450 nm auftrat, welcher auf die NADPH-Fluoreszenz zurückzuführen war. Der Peak der GFOR-NADPH-Fluoreszenz war dabei im Vergleich zu äquimolaren Mengen von freiem NADPH sehr viel größer und um 7 nm verschoben. Der Nikotinamidring des NAD(P) besitzt bei 280 nm kein Absorptionsmaximum, dementsprechend wird bei Anregung bei dieser Wellenlänge auch wenig Fluoreszenz bei 450 nm emittiert (Roskoski, 1987). Es muß daher bei der GFOR ein Energietransfer von aromatischen Aminosäuren auf den Kofaktor stattfinden, was eine räumliche Nähe voraussetzt (Stryer, 1978). Durch die Proteinumgebung ist das Fluoreszenzmaximum des gebundenen NADPH der GFOR verschoben, was ebenfalls beim fest gebundenem NAD der Malat-Laktat-Transhydrogenase beobachtet wurde (Allen, 1966). Der Energietransfer von absorbierter Lichtenergie von aromatischen Aminosäuren auf NADH findet auch bei der UDP-Galaktose-Epimerase statt, wobei die emittierte Fluoreszenz stark polarisiert ist. Dieses deutet darauf hin, daß der Nikotinamidring des fest gebundenen NAD der UDP-Galaktose-Epimerase im Gegensatz zum Nikotinamid in anderen Dehydrogenasen starr gebunden und in engem Kontakt zur Proteinumgebung vorliegt (Frey, 1987). Bei der Aldose-Reduktase, einem Enzym mit ebenfalls fest gebundenem NADP, wurde gezeigt, daß der Nikotinamidring des Kofaktors durch 'π-Stacking' mit einem Tyrosinrest fixiert

ist. Eine räumliche Nähe des Nikotinamidrings zu aromatischen Aminosäuren ist ebenfalls bei der Glutathion-Reduktase, der Quecksilber-Reduktase und der Dihydrofolatreduktase bekannt (Borhani et al., 1992). Die fluoreszenzspektroskopischen Daten der GFOR deuten deshalb darauf hin, daß der Nikotinamidring möglicherweise ebenfalls starr gebunden und durch aromatische Aminosäuren fixiert ist.

In früheren Arbeiten war nur eine geringe Übereinstimmung der GFOR-Aminosäuresequenz mit einer Glutamin Synthase in einem Bereich von 20 Aminosäuren beschrieben worden (Kanagasundaram & Scopes, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurden durch Sequenzierung des 5'-Endes des *gfo*-Gens Unterschiede zur veröffentlichten DNA-Sequenz (Kanagasundaram & Scopes, 1992) ermittelt. Die auffälligste Abweichung war dabei das Fehlen dreier Basen, welches eine komplette Veränderung der Aminosäuresequenz an Position 111 - 119 zur Folge hatte. Die auf diesen Befund erneut durchgeführte DNA-Sequenzierung des gesamten *gfo*-Gens zeigte zusätzliche Abweichungen in der abgeleiteten GFOR-Aminosäuresequenz (Loos, 1994, Dissertation). Ein Vergleich dieser neu ermittelten GFOR-Aminosäuresequenz mit Protein- und Gen-Datenbanken ergab erstmals signifikante Ähnlichkeiten zu anderen, zum Teil erst kürzlich veröffentlichten Sequenzen. Bei diesen Proteinen handelte es sich, soweit eine Funktion bekannt ist, ausschließlich um NAD- bzw. NADP-abhängige Dehydrogenasen.

Bei einem Vergleich der GFOR mit diesen Dehydrogenasen wurden konservierte Bereiche in der N-terminalen Hälfte der Aminosäuresequenzen deutlich. Dabei konnten eine mögliche 'fingerprint'-Region einer NAD(P)-Bindestelle (Wierenga et al., 1985; Wierenga et al., 1986; s. Abb. 40) nach Rossmann (Rossmann et al., 1974; Rossmann, et al., 1975) und ein konserviertes Motiv mit der Sequenz Ala-Gly-Lys-His/Pro-Val-Xxx-Cys/Val-Glu-Lys-Pro (Xxx steht für eine beliebige Aminosäure) erkannt werden.

Die nach Rost et al. (1993) durchgeführte Sekundärstrukturvorhersage der aminoterminalen Hälfte der GFOR zeigte alternierende α -Helices und β -Faltblattstrukturen. Diese Struktur und das Vorhandensein einer möglichen 'fingerprint'-Sequenz läßt vermuten, daß es sich bei der NADP-Bindestelle der GFOR um eine, wenn auch abgewandelte, Rossmann-Falte handeln könnte (s. Abb. 40).

Die Rossmann-Falte als Dinukleotid-bindende Domäne besteht aus vier α -Helices und sechs Strängen mit einer parallelen β -Faltblattstruktur. Drei gestreckte Bereiche des β -Faltblattes sind durch zwei α -Helices verbunden (β A, α B, β B, α C, β C) und bilden die adeninbindende Hälfte der Bindungstasche. Die anderen drei Stränge des β -Faltblattes sind entweder durch α -Helices oder weniger definierte Strukturen miteinander verknüpft (Lactat-Dehydrogenase: β D, α D, α E, β E, α F, β F) und stellen die redoxreaktive Nikotinamid- bzw. Isoalloxazin-bindende Hälfte der Falte dar. Der Kofaktor ist in einer gestreckten Form verankert (Rossmann et al., 1974,; Rossmann et al., 1975). Enzyme mit einer Rossmann-Falte zeigen z.T. nur geringe Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz. Charakteristisch ist jedoch eine 'fingerprint'-Sequenz im Bereich von β A α B β B, die ein gutes Indiz für eine Dinukleotidbindestelle nach Rossmann ist (Wierenga et al., 1985; Wierenga et al., 1986; Hanukoglu & Gutfinger, 1989; Bork & Grunewald, 1990).

	βA						αB										loop	βB															
NAD:	β	β	β	β	β	β	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	β	β	β	β	β	β									
NADP:	x	x	x	x	x	G	x	G	x	x	G	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	D										
						(A)																	(H, R, K)										
	Δ	◦		◦		●		●			●			◦		◦				◦	◦		-										
R	<u>R</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>X</u> ₅	<u>I</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>A</u>
83			90				95																105	111								119	

- klein und hydrophob
- Δ basisch oder hydrophil
- Glycin
- sauer (D,E)

Abb. 40: Der Aminosäure 'fingerprint' von NAD-Bindestellen der Kategorie I (Wierenga et al., 1985). αB ist die pyrophosphatbindende Helix mit einem positiven Dipolmoment am Aminoterminus ('glycinreiche Region'). Das erste Glycin induziert einen turn. Das zweite Glycin liegt am direkten Aminoterminus von αB und steht in direktem Kontakt mit der Pyrophosphatbrücke des Dinukleotids (Hol, 1978). Es bildet eine Wasserstoffbrücke zum negativ geladenen Rest am Ende von βB , dessen Carboxylgruppe wiederum über H-Brücken die 2' und 3' Hydroxylgruppen der Adenin-Ribose bindet (indirekte Erkennung). Um ausreichend Raum für diese Bindung zu schaffen ist das dritte Glycin notwendig (Baker, et al. 1992). Bei NADP-Bindestellen ist das dritte Glycin durch ein Alanin ersetzt (Hanukoglu & Gutfinger, 1989). Im Bereich des Endes von βB befinden sich statt eines Aspartats oder Glutamats positiv geladene Aminosäurereste. Das Alanin induziert eine ca. 80° Drehung der Bindung zwischen dem ersten Glycin und der folgenden Aminosäure. Dadurch entsteht eine direkte H-Brücke zwischen dem zweiten Glycin und dem Ringsauerstoff der Adenin- Ribose (direkte Erkennung) (Baker et al., 1992; Mittl et al., 1993; Mittl et al., 1994). Die Region der GFOR mit einem möglichen 'fingerprint' Bereich ist unterhalb des Schemas wiedergegeben. Aminosäuren, die der Position entsprechen sind fettgedruckt, verschobene Positionen sind unterstrichen.

NADP-bindende Enzyme wie z.B. die Glutathion-Reduktase (Ermler & Schulz, 1991) oder die 6-Phosphogluconat Dehydrogenase (Adams et al., 1994) zeigen eine typische Rossmann-Falte. Andere Enzyme mit NADP als Kosubstrat, wie die Isocitrat-Dehydrogenase (Hurley et al., 1991) oder die Aldose-Reduktase (Rondeau et al., 1992; Borhani et al., 1992) besitzen dagegen ein anderes Bindemotiv. Interessant ist vor allem die Aldose-Reduktase, da dieses Enzym mit der Reduktion von Glukose zu Sorbit eine zur GFOR vergleichbare Reaktion katalysiert. Die Aldose-Reduktase besteht im Gegensatz zu den Enzymen mit einer Rossmann-Falte aus einer Domäne mit einem ' α/β -barrel', ähnlich der Triosephosphat-Isomerase (Rondeau et al., 1992).

Der auffälligste Unterschied der GFOR-Sekundärstrukturvorhersage im Vergleich zu gut untersuchten NAD(P)-Bindestellen, wie z.B. der Lacat-Dehydrogenase, war das Fehlen der ersten Helix (αB ; Abb. 40), wobei diese normalerweise durch einen Helix-Dipolmoment mit dem Phosphodiester des NAD(P) in Wechselwirkung tritt und damit entscheidend für die Kofaktorbinding ist (Hol, 1978). Da eine Wahrscheinlichkeit der Sekundärstrukturvorhersage von 70 % nur bei einem Vergleich zwischen Sequenzen mit hoher Übereinstimmung in der Primärstruktur

gegeben ist (Rost et al., 1993), kann eine α -Helix an dieser Position nicht ausgeschlossen werden.

Die röntgenkristallographische Aufklärung der Struktur der GFOR wird in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Ermler/ M. Merckel (Arbeitsgruppe Prof. Michel, Max-Planck Institut für Biophysik, Frankfurt) durchgeführt. Die Kristallisation und Aufnahme nativer Datensätze war dabei erfolgreich (Loos et al., 1995). Zur weiteren Herstellung von Kristallen wurde in der vorliegenden Arbeit die Wildtyp-GFOR aus *Z. mobilis* ZM6 bis zur Homogenität gereinigt. Ein Schwermetallderivat der GFOR mit den entsprechenden Streuungseigenschaften zur Auflösung des Phasenproblems der Röntgenstrukturanalyse konnte bislang jedoch nicht erhalten werden (Dr. Ermler, persönliche Mitteilung). Deshalb wurde versucht, die hypothetisch an der NADP-Bindung beteiligten Aminosäuren durch gerichtete Mutagenese so auszutauschen, daß eine mögliche 'Rossmann-Falte' identifiziert werden könnte.

In der Literatur sind eine Reihe von Aminosäureaustauschen zur Charakterisierung von Dinukleotid-Bindestellen beschrieben worden. Die meisten dieser Mutationen beziehen sich dabei auf den Austausch geladener Reste oder mehrerer Aminosäuren am Ende von β B, da sich bei NAD-Bindestellen hier eine negativ-, und bei den meisten NADP-Bindestellen positiv geladene Aminosäurereste befinden (Chen et al., 1992; Huang et al., 1990; Haeffner-Gormley et al., 1991; Haeffner-Gormley et al., 1992; Clermont et al., 1993; FanFan et al., 1991; Metzger & Hollenberg, 1995). Der Austausch dieser Reste hat Auswirkung auf die Affinität zum Kofaktor, so daß Veränderungen des K_M -Wertes für NAD(P) gemessen werden können. In einigen Fällen führte der Austausch eines negativ geladenen Restes bei NAD-bindenden Enzymen zu einer höheren Affinität zu NADP (Corbier et al., 1990; Feeney et al., 1990). Durch Austausch mehrerer Aminosäuren im Bereich von β B und des dritten Aminosäurerests der glycinreichen Region des 'fingerprints' konnte sogar eine Umwandlung der Koenzymspezifität vom NADP zum NAD und umgekehrt erreicht werden (Perham et al., 1991; Bocanegra et al., 1992; Nishiyama et al., 1993). Diese Mutationen wurden jedoch auf der Grundlage von Röntgenstrukturdaten oder dem Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen nah verwandten Enzymen mit unterschiedlicher Koenzymspezifität durchgeführt, Voraussetzungen, die für die GFOR nicht gegeben waren.

Da die GFOR am Ende des möglichen β B-Strangs keine positiven Aminosäurereste besitzt, war eine Mutation in diesem Bereich zur Identifizierung der NADP-Bindestelle nicht möglich.

Eine Alternative zur Identifizierung einer Dinukleotidbindestelle sind Mutationen im glycinreichen Teil des 'fingerprints'. Da die ersten beiden Glycinreste in der Regel hochkonserviert sind, kam es bei einer Mutation in diesem Bereich zu einer völligen Inaktivierung des jeweiligen Enzyms (DeHoop et al. 1992; Gomi et al., 1989; Thatcher, 1980; Wierenga & Hol, 1983). An dritter Stelle des 'fingerprint'-Bereichs findet sich bei NADP-bindenden Enzymen ein Alanin. Mutationen an dieser Stelle hatten verschiedene Auswirkungen. Entweder kam es bei einem Austausch an dieser Stelle ebenfalls zur Inaktivierung des Enzyms (DeHoop et al., 1992; Gomi et al., 1992) oder im Fall der Glutathion-Reduktase bei einem Austausch von Ala $\rightarrow$ Gly zu einer Erhöhung der Affinität zum NAD (Erniedrigung des K_M) bei gleichzeitiger Erniedrigung der Wechselzahl (k_{cat}) für NAD und NADP (Scrutton et al., 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mutationen Glycin an Position 90 zu Alanin (G90A) und Alanin an Position 95 zu Glycin (A95G) durchgeführt, um festzustellen, ob diese Reste tatsächlich Teil eines 'fingerprints' und damit an der Kofaktorbindung beteiligt sind.

Der Austausch G90A führte zu einer Verminderung der GFOR-Aktivität, wobei im Western Blot deutlich wurde, daß die geringere Aktivität mit einer geringeren GFOR-Proteinmenge einherging. Im 'pulse-chase'-Experiment zeigte sich, daß die GFOR-G90A im Verlauf einer Stunde deutlich abgebaut wurde. Das Protein war demnach destabilisiert und hatte eine geringere biologische Halbwertszeit als die WT-GFOR.

Enzyme mit fest gebundenen Kofaktoren sind in dessen Abwesenheit labiler und unterliegen einem schnelleren proteolytischen Abbau (Brandsch et al., 1989). Die geringere Stabilität der GFOR-G90A kann deshalb aus einer geringeren Affinität zum Kofaktor NADP resultieren.

Die GFOR-G90A zeigte jedoch Enzymaktivität. Bei anderen Enzymen führte der Austausch des ersten Glycins eines möglichen 'fingerprints' zu einer völligen Inaktivierung. Es ist daher auch möglich, daß der Austausch G90A nur die allgemeine Stabilität des Enzyms beeinflusste und nicht aus einer geringeren Affinität zum NADP resultierte. Auf der anderen Seite befindet sich bei der Formiat-Dehydrogenase schon beim Wildtypenzym an erster Stelle der glycinreichen Region statt eines Glycins ein Alanin (Lamzin et al., 1992), so daß auch bei der GFOR der Austausch G90A nicht zwangsläufig zu einer Inaktivierung führen mußte.

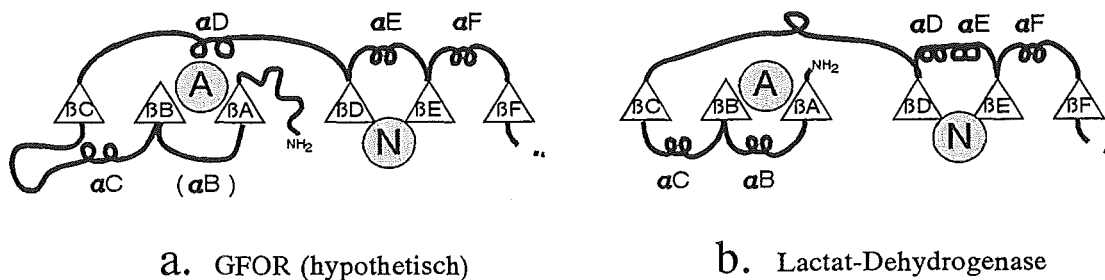


Abb. 41: Hypothetisches Modell zur Struktur der NADP(H)-Bindestelle der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase (GFOR, a.) im Vergleich zur bekannten NAD-Bindestelle der Lactat-Dehydrogenase aus *Squalus acanthias* (LDH, b; nach Rossmann et al., 1975). Es handelt sich vermutlich um eine $\beta\alpha\beta$ -Dinukleotidbindende Domäne innerhalb der aminoterminalen Hälfte der GFOR (Rossmann-Falte), die sich im Vergleich z.B. zur LDH durch einen verlängerten Aminoterminus mit einer prolinreichen Region auszeichnet. Die Helix αB konnte in den Sekundärstrukturanalysen der GFOR nicht gefunden werden (?). N: Nikotinamid-bindender; A: Adenin-ribose-bindender Teil

Der Austausch A95G hatte keine erkennbare Auswirkung auf die Aktivität und Stabilität der GFOR. Da der Kofaktor der GFOR fest gebunden ist, konnten keine K_M -Wert Bestimmungen durchgeführt werden, um Aussagen über eine veränderte Affinität zum NAD(P) zu machen. Die GFOR-A95G wurde jedoch im 'pulse-chase'-Experiment schneller prozessiert. Der GFOR-Export könnte beschleunigt werden, wenn eine stabile Faltung des Proteins im Cytoplasma verhindert

wird oder wenn es im Verlauf des Exports zu einer schnelleren Entfaltung des Präproteins kommt (s.o.). Beides könnte durch eine verringerte Affinität zum NADP verursacht werden.

Die Daten der Primär- und Sekundärstruktur, der Aminosäureaustausche und die Sequenzübereinstimmungen zu anderen Dehydrogenasen sprechen zusammengefaßt für eine Dinukleotid-bindende Rossmann-Falte als Domäne in der aminoterminalen Hälfte der GFOR (s. Abb. 41), ohne eine genaue Röntgenstrukturanalyse ist dieses jedoch hypothetisch.

Die Mutationen Cystein an Position 179 zu Serin (C179S) und Glutamat an Position 180 zu Glutamin (E180Q) in der im Vergleich zu anderen Dehydrogenasen konservierten Region der GFOR wurden durchgeführt, um die Funktion dieses Bereichs zu untersuchen. Einige der Dehydrogenasen mit Sequenzübereinstimmungen zur GFOR katalysieren die Oxidation einer Verbindung, die der Glukose sterisch sehr ähnlich ist. Deshalb wurde angenommen, daß es sich hier um einen konservierten Bereich zur Substratanbindung bzw. -umsetzung handelt.

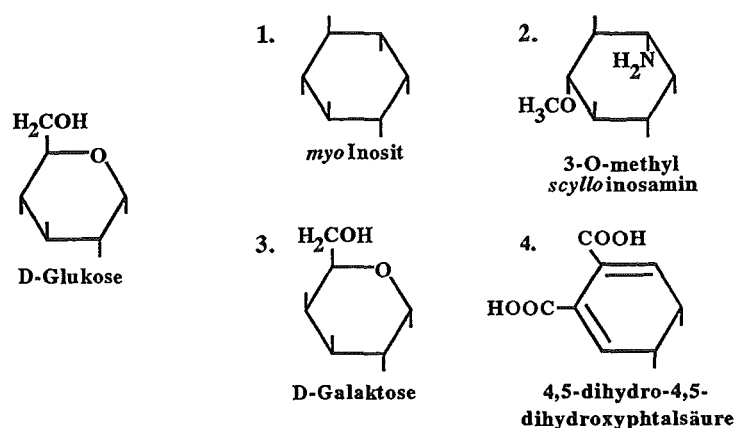


Abb. 42: Substrate der Dehydrogenasen, die im Vergleich zur Glukose-Fruktose Oxidoreduktase das konservierte Aminosäuremotiv AGKH/PVxC/VEKP aufweisen. 1. Inosit-Dehydrogenase (*B. subtilis*), 2. Rhizopin-Dehydrogenase (*R. melilotii*), 3. Galaktose-Dehydrogenase (*P. fluorescens*), 4. Dihydroxyptalsäure-Dehydrogenase (*P. putida*). Die aufgeführten Substrate sind der Glukose sterisch ähnlich. (Referenzen s. Abb. 29).

Es wurde schon früher spekuliert, daß Cysteinreste der GFOR, und besonders Cys179, katalytisch aktiv sind, da die GFOR sehr empfindlich gegenüber SH-Reagenzien wie p-Chlormercuribenzoat (pCMBS) und Quecksilberchlorid ist (Loos, 1994a). Der Austausch dieses Cysteins führte jedoch nicht zu einer deutlich verminderten GFOR-Aktivität. Kristalle der GFOR-C179S verhielten sich gegenüber Methylquecksilberacetat stabiler als die WT-GFOR (M. Merckel, pers. Mitteilung). Es ist deshalb möglich, daß die Inaktivierung der GFOR durch SH-reaktive Quecksilberverbindungen auch aus einer Destabilisierung der Tertiärstruktur resultiert. Die dTDP-Glukose-Oxidoreduktase aus *Salmonella typhimurium* z.B., ein Enzym mit fest gebundenem NAD, zerfällt bei Behandlung mit Quecksilberverbindungen in die Untereinheiten und verliert den Kofaktor (Zarkowsky et al., 1970).

Die GFOR-E180Q zeigte nur eine sehr geringe spezifische Aktivität im zellfreien Rohextrakt. Das durch native Gelelektrophorese getrennte Protein und die gereinigte GFOR-E180Q hatten dabei offensichtlich den Kofaktor NADP verloren, obwohl über Gelfiltration gezeigt wurde, daß die native tetramere Struktur der GFOR erhalten blieb. Das Glu180 hat damit entscheidenden Einfluß auf die Bindungsaffinität zum NADP(H). Im Vergleich zur GFOR-G90A war das Protein jedoch stabil und unterlag im 'pulse-chase' Experiment keinem proteolytischen Abbau. Damit ist bei dieser Mutante die stabile Faltung offensichtlich nicht beeinträchtigt.

Die GFOR-E180Q zeigte im Enzymtest keine klassische Dehydrogenase-Aktivität mit NADP als Kosubstrat, da mit Glukose und NADP (ohne Fruktose) im Testansatz keine meßbare Glukonsäurebildung erfolgte. Außerdem reichten geringe Mengen an NADP um eine Enzymaktivität der GFOR-E180Q wiederherzustellen. Damit wurde einmal gebundenes und reduziertes NADP nicht mehr durch externes NADP ausgetauscht. Die Bindung des Kofaktors war daher fest, und die Ablösung erfolgte vermutlich nur im Verlauf der Elektrophorese bzw. der Reinigung. Unter dieser Annahme resultiert die geringe spezifische Aktivität der GFOR-E180Q nicht alleine aus der schwächeren Bindung des Kofaktors, sondern z.B. ebenfalls aus einer Beeinträchtigung der katalytischen Funktion oder der Substratbindung. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, daß alle Enzyme mit dem beschriebenen konservierten Motiv eine zyklische Verbindung umsetzten, die z.T. der Glukose sterisch sehr ähnlich ist (s. Abb. 42). Möglicherweise sind die Aminosäuren des Motivs an der Bindung dieser zyklischen Verbindungen beteiligt. Die GFOR-E180Q läßt sich nur zusammen mit NADP(H) kristallisieren (M. Merckel, pers. Mitteilung). Deshalb ist diese GFOR-Mutante möglicherweise geeignet, das Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse durch Kokristallisation mit jodierten NADP-Analoga zu lösen.

Wie die vorliegenden Arbeiten gezeigt haben, erfolgt der Export der GFOR über den allgemeinen Sec-Weg, wobei die ungewöhnlich lange Signalsequenz der GFOR vermutlich eine Verlangsamung des GFOR-Exports verursacht und für den NADP-Transport offensichtlich weitere Faktoren notwendig sind. Die für *Z. mobilis* etablierten Methoden der 'pulse-chase'-Technik und die Möglichkeit der Expression des *gfo*-Gens und mutierter Allele in *E. coli* und *Z. mobilis* haben die Voraussetzungen geschaffen, um in weiteren Arbeiten zu versuchen, die zusätzlichen Komponenten des Exportweges der GFOR bzw. des Kofaktors NADP zu bestimmen. Obwohl in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, daß die NADP-Bindestelle der GFOR mit hoher Wahrscheinlichkeit eine $\beta\alpha\beta$ -Dinukleotid-bindende Domäne (Rossmann-Falte) darstellt, sind weitere Untersuchungen notwendig. Die erstmals für *Z. mobilis* angewandte Methode zur Mutagenese und Reinigung rekombinanter Proteine aus einem Defektstamm für das entsprechende Protein erlaubt in Zukunft, weitere Mutantenproteine der GFOR zu charakterisieren, um die für die feste NADP-Anbindung verantwortliche Struktur aufzuklären. Vornehmliches Ziel muß dabei sein, die Auflösung der Röntgenstruktur der GFOR zu ermöglichen, indem z.B. durch Einführung zusätzlicher Cysteinreste eine Schwermetallderivatisierung vereinfacht wird.

V. Zusammenfassung

Das Gram-negative, obligat fermentative Bakterium *Zymomonas mobilis* besitzt mit der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase ein ungewöhnliches periplasmatisches Enzym mit NADP(H) als fest gebundenem Kofaktor, welches die Oxidation von Glukose zu Glukonolacton und die Reduktion von Fruktose zu Sorbit katalysiert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neben der physiologischen Funktion, den Export und die Kofaktorbindestelle der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase zu untersuchen.

- Mit Hilfe einer Glukose-Fruktose Oxidoreduktase Defektmutante wurde bewiesen, daß die physiologische Funktion der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase die Bildung von Sorbit als osmoprotektive Substanz bei Wachstum auf hohen Saccharose bzw. Glukose/Fruktose Konzentrationen ist. Anhand einer cytoplasmatischen Signalsequenz-Mutante der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase konnte festgestellt werden, daß die periplasmatische Lokalisierung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase zur effizienten Sorbitbildung notwendig ist.
- Untersuchungen zum Export der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase ergaben, daß die Translokation ins Periplasma über den Sec-Weg erfolgt. Die Signalsequenz der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase konnte am Aminoterminal um 19 Aminosäuren verkürzt bzw. durch die Signalsequenz der Glukonolactonase ersetzt werden, ohne die Prozessierung und damit den Export der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase signifikant zu beeinflussen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die ungewöhnliche Länge der Signalsequenz von 52 Aminosäuren keine spezifische Funktion beim Protein-/Kofaktorexport der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase besitzt. Mutanten mit Deletionen innerhalb der Signalsequenz zeigten, daß die Glukose-Fruktose Oxidoreduktase bereits im Cytoplasma NADP(H) fest binden und enzymatische Aktivität entwickeln kann.
- Unter Verwendung starker Promotoren konnte in *E. coli* eine Expression des Gens der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase bis zu einer Aktivität von 2 U/mg Gesamtzellprotein erreicht werden. Das Enzym wurde in *E. coli* jedoch nicht ins Periplasma exportiert, da vermutlich die Signalsequenz mit dem *E. coli* Translokationsapparat inkompatibel ist. Bei einem Austausch der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase-Signalsequenz gegen die Signalsequenzen des OmpA-Proteins und der alkalischen Phosphatase aus *E. coli* und der Glukonolactonase aus *Z. mobilis* kam es zu einem Export der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in *E. coli*. Die exportierte Form der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase war im Periplasma von *E. coli* jedoch nicht stabil und wurde proteolytisch abgebaut. Vermutlich fehlt *E. coli* ein Faktor zum Export des NADP(H), sodaß in Abwesenheit des NADP(H) eine stabile Faltung des Enzyms nicht möglich ist.

- Sekundärstrukturanalysen und die gerichtete Mutagenese innerhalb einer Glycin-reichen 'fingerprint'-Region weisen darauf hin, daß die aminoterminalen Hälfte der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase eine $\beta\alpha\beta$ -Dinukleotid-bindende Domäne (Rossmann-Falte) darstellt. Im Vergleich zu anderen NAD(P)-bindenden Dehydrogenasen wurde im Nikotinamid-bindenden Teil der möglichen Rossmann-Falte der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase das konservierte Aminosäuremotiv Ala-Gly-Lys-His/Pro-Val-X-Cys/Val-Glu-Lys-Pro (X steht für eine beliebige Aminosäure) erkannt. Alle Proteine mit diesem Motiv katalysieren die Reduktion einer zyklischen Verbindung, die z.T. der Glukose sterisch sehr ähnlich ist. Das Aminosäuremotiv ist daher vermutlich Teil der Substratbindestelle. Der Austausch des Glutamatrests (Position 180 der Aminosäuresequenz der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase) zu Glutamin innerhalb dieses Motivs führte zu einer Verminderung der spezifischen Aktivität der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase und zu einem Verlust der festen NADP-Bindung. Das Glutamat 180 ist damit sowohl für die katalytische Funktion als auch für die feste NADP-Bindung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase essentiell.

VI. Literaturverzeichnis

- Adams, M.J., Ellis, G.H., Gover, S., Naylor, C.E. & Phillips, C. (1994) "Crystallographic study of coenzyme, coenzyme analogue and substrate binding in 6-phosphogluconate dehydrogenase: implications for NADP specificity and the enzyme mechanism." *Structure*, 2: 385-393
- Aldrich, H.C., McDowell, L., De F.S. Barbosa, M., Yomano, L.P., Scopes, R.K. & Ingram, L.O. (1992) "Immunocytochemical localization of glycolytic and fermentative enzymes in *Zymomonas mobilis*." *J. Bacteriol.* 174(13): 4504-4508
- Alksne, L.E., Keeney, D. & Rasmussen, B.A. (1995) "A mutation in either *dsbA* or *dsbB*, a gene encoding a component of a periplasmic disulfidebond-catalyzing system, is required for high-level expression of the *Bacteroides fragilis* metallo- β -lactamase, CcrA, in *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* 177(2): 462-464
- Allen, S.H.G. (1966) "The isolation and characterization of malate-lactate transhydrogenase from *Micrococcus lactilyticus*." *J. Biol. Chem.* 241(22): 5266-5277
- Anderson, D.J., Morris, C.J., Nunn, D.N., Anthony, C. & Lidstrom, M.E. (1990) "Nucleotide sequence of the *Methylobacterium extorquens* AM1 *moxF* and *moxJ* genes involved in methanol oxidation." *Gene* 90: 173-179
- Ansorge, W. (1986) "A non-radioactive automated method for DNA sequence determination." *J. Biochem. Biophys. Methods* 13: 315
- Arkowitz, R.A., Joly, J.C. & Wickner, W. (1993) "Translocation can drive the unfolding of a preprotein domain." *EMBO J.* 12(1): 243-253
- Bachmann, B.J. & Low, B.J. (1980) "Linkage map of *Escherichia coli* K12." *Microbiol. Rev.* 44: 1-56
- Baker, P.J., Britton, K.L., Rice, D.W., Rob, A. & Stillman, T.J. (1992) "Structural consequences of sequence patterns in the fingerprint region of the nucleotide binding fold." *J. Mol. Biol.* 228: 662-671
- Bakker, P. & Randall, L.L. (1984) "The requirement for energy during export of β -lactamase in *Escherichia coli* is fulfilled by the total protonmotive force." *EMBO J.* 3: 895-900
- Baneyx, F. & Georgiou, G. (1992) "Degradation of secreted proteins in *Escherichia coli*." *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 665: 301-308
- Baoudene-Assali, F., Baratti, J. & Michel, G.P.F. (1993) "Purification and properties of a phosphate-irrepressible membrane bound alkaline phosphatase from *Zymomonas mobilis*." 139: 229-235
- Barrow, K.D., Collins, J.G., Leigh, D.A., Rogers, P.L. & Warr, R.G. (1984) "Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 225-232

- Bauer, A.J., Rayment, I., Frey, P.A., & Holden, H.M. (1992) "The molecular structure of UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli* determined at 2,5 Å resolution." *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 12: 372-381
- Beckman, D.L. & Kranz, R.G. (1993) "Cytochromes *c* biogenesis in a photosynthetic bacterium requires a periplasmic thioredoxin-like protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2179-2183
- Beckman, D.L., Trawick, D.R. & Kranz, R.G. (1992) "Bacterial cytochromes *c* biogenesis." *Genes Devel.* 6: 268-283
- Birktoft, J.J., Rhodes, G. & Banaszak, L.J. (1989): "Refined crystal structure of cytoplasmic malate dehydrogenase at 2,5 Å resolution." *Biochem.* 28: 6065-6081
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523
- Blachnitzky, E.O., Wengenmeyer, F. & Kurz, G. (1974) "D-galactose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. Purification, properties and structure." *Eur. J. Biochem.* 47: 235-250
- Bocanegra, J., Scrutton, N.S. & Perham, R.N. (1993) "Creation of an NADP-dependent pyruvate dehydrogenase multienzyme complex by protein engineering." *Biochem.* 32(11): 2737-2740
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. & Falkow, S. (1977) "Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system." *Gene* 2: 95-113
- Borhani, D.W., Harter, T.M. & Petrash, J.M. (1992) "The crystal structure of the aldose reductase:NADPH binary complex." *J. Biol. Chem.* 267(34): 24841-24847
- Bork, P. & Grunwald, C. (1990) "Recognition of different nucleotide-binding sites in primary structures using a property-pattern approach." *Eur. J. Biochem.* 191: 347-358
- Bradford, M.M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brandner, J.P. & Donohue, T.J. (1994) "The *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c*₂ signal peptide is not necessary for export and heme attachment." *J. Bacteriol.* 176(3): 602-609
- Brandsch, R., Bichler, V. & Krauss, B. (1989) "Binding of FAD to 6-hydroxy-D-nicotine oxidase apoenzyme prevents degradation of the holozyme." *Biochem. J.* 258: 187-192
- Bringer, S., Finn, R.K. & Sahm, H. (1984a) "Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*." *Arch. Microbiol.* 139: 376-381
- Bringer, S., Sahm, H. & Swyzen, W. (1984b) "Ethanol production by *Zymomonas mobilis* and its application on an industrial scale." *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 14: 311-319

- Brickman, E., Soll, L. & Beckwith, J. (1973) "Genetic characterization of mutations which affect catabolite-sensitive operons in *Escherichia coli*, including deletions of the gene for adenyl cyclase." J. Bacteriol. 116: 582-587
- Buchholz, S.E., Dooley, M.M. & Eveleigh, D.E. (1987) "*Zymomonas* - an alcoholic enigma." TIBTECH 5: 199-203
- Bystrykh, L.B., Govorukhina, N.I., VanOphem, P.W., Hektor, H.J., Dijkhuizen, L. & Duine, J.A. (1993) "Formaldehyde dismutase activities in Gram-positive bacteria oxidizing methanol." J. Gen. Microbiol. 139: 1979-1985
- Bystrykh, L.V., Vonck, J., VanBruggen, E.F.J., VanBeeumen, J., Samyn, B., Govorukhina, N.I., Arfman, N., Duine J.A. & Dijkhuizen, L. (1993) "Electron microscopic analysis and structural characterization of novel NADP(H)-containing methanol-N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductases from the Gram-positive methylotrophic bacteria *Amycolatopsis methanolica* and *Mycobacterium gastri* MB19
- Byun, M.O.-K., Kaper, J.B. & Ingram, L.O. (1986) "Construction of a vector for the expression of foreign genes in *Zymomonas mobilis*." J. Industr. Microbiol. 1: 9-15
- Caruthers, M.H., Barone, A.D., Beaucage, S.L., Dodds, D.R., Fisher, E.F., McBride, L.J., Matteucci, M., Stabinsky, Z., Tang, J.Y. (1987) "Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method." Meth. in Enzymol., 154: 287-313
- Chen, Z., Lee, W.R. & Chang, S.H. (1991) "Role of aspartic acid 38 in the cofactor specificity of *Drosophila* alcohol dehydrogenase." Eur. J. Biochem. 202: 263-267
- Chistoserdov, A.Y. & Lidstrom, M.E. (1991) "The small-subunit polypeptide of methylamine dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1 has an unusual leader sequence." J. Bacteriol. 173(18): 5909-5913
- Chun, U.H. & Rogers, P.L. (1988) "The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*." Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 19-24
- Clermont, S., Corbier, Mely, Y., Gerard, D., Wonacott, A. & Brantlant (1993) "Determinants of coenzyme specificity in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: role of the acidic residue in the fingerprint region of the nucleotide binding fold." Biochem. 32: 10178-10184
- Corbier, C., Clermont, S., Billard, P., Skarzynski, T., Brantlant, C., Wonacot, A. & Brantlant, G. (1990) "Probing the coenzyme specificity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases by site-directed mutagenesis." Biochem. 29: 7101-7106
- DeHoop, M., Asgeirsdottir, Blaauw, M. Veenhuis, M. Cregg, J. Gleeson, M. & Ab, G. (1991) "Mutations in the FAD-binding fold of alcohol oxidase from *Hansenula polymorpha*." Protein Engineering 4(7): 821-829
- Derman, A.I. & Beckwith, J. (1991) "*Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm." J. Bacteriol. 173(23): 7719-7722

- DeVries, G.E., Arfman, N., Terpstra, P. & Dijkhuizen, L. (1992) "Cloning, expression, and sequence analysis of the *Bacillus methanolicus* C1 methanol dehydrogenase gene." J. Bacteriol. 174(16): 5346-5333
- DeVrije, G.J., Betenburg, A.M., Killan, J.A. & deKruijff, B. (1990) "Lipid involvement in protein translocation in *Escherichia coli*." Mol. Microbiol. 4(1). 143-150
- Doelle, H.W., Kirk, L., Crittenden, R., Toh, H. & Doelle, M.B. (1993) "*Zymomonas mobilis* - Science and industrial application." Crit. Rev. Biotechnol. 13(1): 57-98
- Egan, R.M. & Phillips, A.T. (1977) "Presence of a tightly bound NAD⁺ in urocanase of *Pseudomonas putida*." J. Biol. Chem. 252(16): 5701-5707
- Eddy, C.K., Smith, O.H. & Noel, K.D. (1988) "Cosmid cloning of five *Zymomonas trp* genes by complementation of *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida trp* mutants." J. Bacteriol. 170: 3158-3163
- Entner, N. & Doudoroff, M. (1952) "Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*." J. Biol. Chem. 196: 853-862
- Ermler, U. & Schulz, G.E. (1991) "The three-dimensional structure of glutathione reductase from *Escherichia coli* at 3.0 Å resolution." Proteins: Structure, Function, and Genetics 9: 174-179
- Fakhrai, H. & Maines, M.D. (1992) "Expression and characterization of a cDNA for rat kidney biliverdin reductase." J. Biol. Chem. 267(6): 4023-4029
- Fan Fan, J., Lorenzen, A. & Plapp, B.V. (1991) "An aspartate residue in yeast alcohol dehydrogenase I determines the specificity for coenzyme." Biochem. 30: 6379-6401
- Feeney, R., Clarke, A.R. & Holbrook, J.J. (1990) "A single amino acid substitution in lactate dehydrogenase improves the catalytic efficiency with an alternative coenzyme." Biochem. Biophys. Res. Comm. 166(2): 667-672
- Fein, J.E., Charley, R.C., Hopkins, K.A., Lavers, B. & Lawford, H.G. (1983) "Development of a simple defined medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*." Biotechnol. Letters 5(1): 1-6
- Fita, I. & Rossmann, M.G. (1985) "The NADPH binding site of beef liver catalase." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1604-1608
- Fortin, Y., Phoenix, P. & Drapeau, G.R. (1990) "Mutations conferring resistance to azide in *Escherichia coli* occur primarily in the *secA* gene." J. Bacteriol. 172: 6607-6610
- Freudl, R., Schwarz, H., Stierhoff, Y.D., Gamon, K., Hindenach, I. and Henning, U. (1986) "An outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* K-12 undergoes a conformational change during export." J. Biol. Chem. 261, 11355-11362
- Freudl, R., Schwarz, H., Kramps, S., Hindennach, I. and Henning, U. (1988) "Dihydrofolate reductase (mouse) and β -galactosidase (*Escherichia coli*) can be translocated across the plasma membrane of *E. coli*." J. Biol. Chem. 263: 17084-17091

- Frey, A.F. (1987) "Complex pyridine nucleotide-dependent transformations." in "Pyridine nucleotide coenzymes, Part B." Eds. Dolphin, D., Poulson, R. & Avramovic', O.; Wiley, N.Y.: 461-512
- Fujita, Y., Shindo, K., Miwa, Y. & Yoshida, K. (1991) "*Bacillus subtilis* inositol dehydrogenase-encoding gene (*idh*): sequence and expression in *Escherichia coli*." Gene 108: 121-125
- Fürste, J.P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M. & Lanka, E. (1986) "Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector." Gene 48: 119-131
- Gebert, J.F., Overhoff, B., Manson, M.D., Boos, W. (1988) "The chemosensory transducer of *Escherichia coli* assembles into the cytoplasmic membrane via a SecA-dependent process." J. Biol. Chem. 263: 16652-16660
- Gennity, J., Goldstein, J. & Inouye, M. (1990) "Signal peptide mutants of *Escherichia coli*." J. Bioenerg. Biomembr. 22(3): 233-269
- Gibbs, M. & DeMoss, R. (1951) "Ethanol formation in *Pseudomonas lindneri*." Arch. Biochem. Biophys. 343: 478-479
- Gierasch, L.M. (1989) "Signal sequences." Biochem. 28(3): 923-930
- Goodwin, P.M. & Anthony, C. (1995) "The biosynthesis of periplasmic electron transport proteins in methylotrophic bacteria." Microbiology 141: 1051-1064
- Gomez, P.F. & Ingram, L.O. (1995) "Cloning, sequencing and characterization of the alkaline phosphatase gene (*phoD*) from *Zymomonas mobilis*." FEMS Microbiol. Letters 125: 237-246
- Gunasekaran, P., Kannan, T.R., Ananthalakshmy, V.K. & Amutha, R. (1994) "Molecular biology and genetics of *Zymomonas mobilis*." Indian J. Microbiol. 34(3): 159-185
- Gomi, T., Date, T., Ogawa, H., Fujioka, M., Aksamit, R.R., Backlund, P.S. & Cantoni, G. L. (1989) "Expression of rat liver S-Adenosylhomocysteinase cDNA in *Escherichia coli* and mutagenesis at the putative NAD-binding site." J. Biol. Chem., 264(27): 16138-16142
- Goncalves de Lima, O., Schumacher, I.E. & de Arango, J.M. (1972) "New observations about the antagonistic effects of *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*." Rev. Inst. Antibiot. Univ. Recife. 12: 57-69
- Haeffner-Gormley L., Chen, Z., Zalkin, H. & Colman, R.F. (1991) "Evaluation of cysteine 283 and glutamic acid 284 in the coenzyme binding site of *Salmonella typhimurium* glutamate dehydrogenase by site-directed mutagenesis and reaction with the nucleotide analogue 2-((4-Bromo-2,3-dioxobutyl)thio)-1,N6-ethenoadenosine 2', 5'-bisphosphate." J. Biol. Chem. 266(9): 5388-5394
- Haeffner-Gormley, L. Chen, Z. Zalkin, H. & Colman, R. (1992) "Importance of lysine-286 at the NADP site of glutamate dehydrogenase from *Salmonella typhimurium*." Biochem. 31: 7807-7814

- Hall, M.N., Gabay, J. & Schwartz, M. (1983) "Evidence for a coupling of synthesis and export of an outer membrane protein in *Escherichia coli*." EMBO J. 2: 15-19
- Hanahan, D. (1983) "Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J. Mol. Biol. 166: 557-580
- Hanukoglu, I. & Gutfinger T. (1989) "DNA sequence of adrenodoxin reductase. Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases." Eur. J. Biochem. 180: 479-484
- Hardman, M.J. & Scopes, R.K. (1988) "The kinetics of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*." Eur. J. Biochem. 179: 203-209
- Hardman, M.J., Tsao, M. & Scopes, R.K. (1992) "Changes in the fluorescence of bound nucleotide during the reaction catalyzed by glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*." Eur. J. Biochem. 205: 715-720
- Hartl, F.-U., Pfanner, N., Nicholson, D.W. & Neupert, W. (1989) "Mitochondrial protein import." Biochim. Biophys. Acta 988: 1-45
- Hoffman, C.S. & Wright, A. (1985) "Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: an approach for studying protein secretion." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5107-5111
- Hol, W.G.J., VanDuijnen, P.T. & Berendsen, H.J.C. (1978) "The α -helix dipole and the properties of proteins." Nature 273: 443-446
- Huang, S., Appleman, J.R., Tan, X., Thompson, P.D., Blakley, R.P., Venkataraghavan (1990) "Role of lysine-54 in determining cofactor specificity and binding in human dihydrofolate reductase." Biochem. 29: 8063-8069
- Hurley, J.H., Dean, A.M., Koshland, D.E. & Stroud, R.M. (1991) "Catalytic mechanism of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase: implications from the structure of magnesium-isocitrate and NADP⁺ complexes." Biochem. 30: 8671-8678
- Inouye, S., Soberon, X., Franceschini, T., Nakamura, K., Itakura, K. & Inouye, M. (1982) "Role of positive charge on the amino-terminal region of the signal peptide in protein secretion across the membrane." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3438-3441
- Ish-Horowitz, D. & Burke, J.F. (1981) "Rapid efficient cosmid cloning." Nucl. Acids Res. 9: 2989-2998
- Ito, K., Bassford, P.J., Beckwith, J. (1981) "Protein localization in *E. coli*: Is there a common step in the secretion of periplasmic and outer-membrane proteins?" Cell 24: 707-717
- Izard, J.W. & Kendall, D.A. (1994) "Signal peptides: exquisitely designed transport promoters." Mol. Microbiol. 13(5): 765-773
- Jaenicke, R. (1987) "Folding and association of proteins." Prog. Biophys. Mol. Biol. 49: 117-237
- Jaenicke, R. & Rudolph, R. (1989) "Folding proteins." in "Protein structure, a practical approach." Ed. Creighton, T.E.; IRL Press, Oxford: 251-285

- Johns, M.R., Greenfield, P.F. & Doelle, H.W. (1992)** "Byproducts from *Zymomonas mobilis*." Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 44: 97-121
- Johnson, J.L., Bastian, N.R. & Rajagopalan, K.V. (1990)** "Molybdopterin guanine dinucleotide: a modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* f.sp. *denitrificans*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3190-3197
- Jouve, H.M., Beaumont, F., Leger, I., Foray, J. & Pelmont, J. (1989)** "Tightly bound NADPH in *Proteus mirabilis* PR catalase." Biochem. Cell. Biol. 67: 271-277
- Kanagasundaram, V. & Scopes, R.K. (1992a)** "Cloning, sequence analysis, and expression of the structural gene encoding glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*." J. Bacteriol. 174(5): 1439-1447
- Kanagasundaram, V. & Scopes, R.K. (1992b)** "Isolation and characterization of the gene encoding gluconolactonase from *Zymomonas mobilis*." Biochim. Biophys. Acta 1171: 198-200
- Kannan, R., Mukundan, G., Ait-Abdelkader, N., Augier-Magro, V., Barrati, J. & Gunasekaran, P. (1995)** "Molecular cloning and characterization of the extracellular sucrose gene (*sacC*) of *Zymomonas mobilis*." Arch. Microbiol. 163: 195-204
- Kato, N., Yamagami, T., Shimao, M. & Sakazawa (1986)** "Formaldehyde dismutase, a novel NAD-binding oxidoreductase from *Pseudomonas putida* F61." Eur. J. Biochem. 156: 59-64
- Kerstens, K. & DeLey, J. (1968)** "The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria." Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 31: 393-406
- Kim, J., Fuller, J.F., Cecchini, G. & McIntire, W.S. (1994)** "Cloning, sequencing, and expression of the structural genes for the cytochrome and flavoprotein subunits of p-cresol methylhydroxylase from two strains of *Pseudomonas putida*." J. Bacteriol. 176(29): 6349-6361
- Kim, W.K. & Chun, U.H. (1994)** "L-Sorbose production from glucose and fructose using *Zymomonas mobilis* and *Gluconobacter suboxydans* in a two-stage fed-batch reactor." Process Biochem. 29: 277-283
- Kirk, L.A. & Doelle, H.W. (1993)** "Rapid ethanol production from sucrose without by-product formation." Biotechnol. Letters 15(9): 985-990
- Kirkman, H.N. & Gaetani, F. (1984)** "Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4343-4347
- Kondo, Y., Toyoda, A., Fukushi, H., Yanase, H., Tonomura, K., Kawasaki, H. & Sakai, T. (1994)** "Cloning and characterization of a pair of genes that stimulate the production and secretion of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase and invertase." Biosci. Biotech. Biochem., 58(3): 526-530
- Kubiseki, T.J., Hyndman, D.J., Morjana, N.A. & Flynn, T.G. (1992)** "Studies on pig muscle aldose reductase. Kinetic mechanism and evidence for a slow conformational change upon coenzyme binding." J. Biol. Chem. 267(10): 6510-6517

- Kunkel, T.A. (1985) "Rapid and efficient site specific mutagenesis without phenotypic selection." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492
- Lämmli, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-685
- Lamzin, V.S., Aleshin, A.E., Strokopytov, B.V., Yukhnovich, M.G., Popov, V.O., Harutyunyan, E.H. & Wilson, K.S. (1992) "Crystal structure of NAD-dependent formate dehydrogenase." *Eur. J. Biochem.* 206: 441-452
- Lee, C., Li, P., Inouye, H., Brickman, E.R. & Beckwith, J. (1989) "Genetic studies on the inability of the β -galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane." *J. Bacteriol.* 171: 4609-4616
- Lee, K.J., Skotnicki, M.L., Tribe, D.E. & Rogers, P.L. (1981) "The kinetics of fructose and sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*." *Biotechnol. Letters* 3: 207-212
- Lee, S.-J., Saleemuddin, M., Scheper, T., Loos, H. & Sahm, H. (1994) "A fluorometric fiber-optic biosensor for dual analysis of glucose and fructose using glucose-fructose oxidoreductase isolated from *Zymomonas mobilis*." *J. Biotechnol.* 36: 39-44
- Leigh, D., Scopes, R.K. & Rogers, P.L. (1984) "A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobilis*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 413-415
- Liu, G., Topping, T.B. & Randall, L.L. (1989) "Physiological role during export for the retardation of folding by the leader peptide of maltose binding protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9213-9217
- Lloyd, A.D. & Kadner, R.J. (1990) "Topology of the *Escherichia coli* *uhpT* sugar-phosphate transporter analyzed by using TnPhoA fusions." *J. Bacteriol.* 172: 1688-1693
- Loos, H. (1994a) "Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase aus *Zymomonas mobilis*." Dissertation, Düsseldorf
- Loos, H., Ermler, U., Sprenger, G.A. & Sahm, H. (1994b) "Cristallization and preliminary x-ray analysis of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*." *Protein Science* 3(12): 2447-2449
- Loos, H., Krämer, R., Sahm, H. & Sprenger, G.A. (1994c) "Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection." *J. Bacteriol.* 176(24): 7688-7693
- Loos, H., Sahm, H. & Sprenger, G.A. (1993) "Glucose-fructose oxidoreductase, a periplasmic enzyme of *Zymomonas mobilis*, is active in its precursor form." *FEMS Microbiol. Letters* 107: 293-298
- Loos, H., Völler, M., Rehr, B., Stierhof, Y.-D., Sahm, H. & Sprenger, G.A. (1991) "Localisation of the glucose-fructose oxidoreductase in wild type and overproducing strains of *Zymomonas mobilis*." *FEMS Microbiol. Letters* 84: 211-216

- Low, B. (1968)** "Formation of merodiploids with a class of *rec⁻* recipient strains of *Escherichia coli* K12." Proc. Natl. Acad. Sci. 60: 160-167
- Manoil, C. & Beckwith, J. (1985)** "TnPhoA: a transposon probe for protein export signals." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8129-8133
- Mansuori, K. & Piepersberg, W. (1991)** "Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of five genes, strFGHIK, including a phosphatase gene." Mol. Gen. Genet. 228: 459-469
- Masui, H., Fukase, Y. & Satoh, T. (1992)** "Accumulation on the cytoplasmic membrane of the precursor to dimethyl sulfoxide reductase in molybdenum cofactor -deficient mutants of *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*." Plant Cell Physiol. 33(4): 463-469
- Metzger, M.H. & Hollenberg, C.P. (1995)** "Amino acid substitutions in the yeast *Pichia stipidis* xylitol dehydrogenase coenzyme-binding domain affect the coenzyme specificity." Eur. J. Biochem. 228: 50-54
- Miller, J. (1972)** "Experiments in molecular genetics." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Misawa, N., Okamoto, T. & Nakamura, K. (1988)** "Expression of a cellulase gene in *Zymomonas mobilis*." J. Biotechnol. 7: 167-178
- Mittl, P.R.E., Berry, A., Scrutton, N.S., Perham, R.N. and Schulz G.E. (1994)** "Anatomy of an engineered NAD-binding site." Protein Science 3:1504-1514
- Mittl, P.R.E., Berry, A., Scrutton, N.S., Perham, R.N. and Schulz G.E. (1993)** "Structural differences between wild-type NADP-dependent glutathione reductase from *Escherichia coli* and a redesigned NAD-dependent mutant." J. Mol. Biol. 231:191-195
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987)** "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Meth. in Enzymol. 155: 335-350
- Nishiyama, M., Birktoft, J. & Beppu, T. (1993)** "Alteration of coenzyme specificity of malate dehydrogenase from *Thermus flavus* by site-directed mutagenesis." J. Biol. Chem. 268(7): 4656-4660
- Nomura, Y., Nakagawa, M., Ogawa, N., Harashima, S. & Oshima, Y. (1992)** "Genes in PHT plasmid encoding the initial degradation pathway of phthalate in *Pseudomonas putida*." J. Ferm. Bioengineer. 74(6): 333-344
- Oda, Y., Yanase, H., Kato, N. & Tonomura, K. (1994)** "Liberation of sucrose hydrolyzing enzymes from cells by the *zliS* gene product that mediates protein secretion in *Zymomonas mobilis*." J. Ferm. Bioengineer. 77(4): 419-422
- Ogel, Z.B. & McPherson, M.J. (1992)** "Efficient deletion mutagenesis by PCR." Protein engineering 5(5): 467-468

- Okamoto, T., Yamano, S., Ikeaga, H. & Nakamura, K. (1994) "Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*." Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 563-568
- Oliver, D.B., Cabelli, R.J., Dolan, K.M. & Jarosik, G.P. (1990) "Azide-resistant mutants of *Escherichia coli* alter the SecA protein, an azide-sensitive component of the protein export machinery." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8227-8231
- O'Mullan, P., Szakacs-Dobozi, M. & Eveleigh, D.E. (1991) "Identification of the saccharolytic enzymes of *Zymomonas mobilis*." Biotechnol. Letters 13: 137-141
- Page, M.D. & Ferguson, S.J. (1989) "A bacterial c-type cytochrome can be translocated to the periplasm as an apo form; the biosynthesis of cytochrome *cd*₁ (nitrite reductase) from *Paracoccus denitrificans*." Mol. Microbiol. 3(5): 653-661
- Palmer, J.L. and Abeles, R.H. (1979) "The mechanism of action of S-Adenosylhomocysteinase." J. Biol. Chem. 254(4): 1217-1226
- Park, S., Liu, G., Topping, T.B., Cover, W.H. & Randall, L.L (1988) "Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence." Science 239: 1033-1035
- Park, J.-K., Shin, M.-C., Lee, S.-G. & Kim, H.-S. (1995) "Flow injection analysis of glucose, fructose, and sucrose using a biosensor constructed with permeabilized *Zymomonas mobilis* and invertase." Biotechnol. Prog. 11: 58-63
- Park, J.-K., Ro, H.-S. & Kim, H.-S. (1991) "A new biosensor for specific determination of sucrose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* and invertase." Biotechnol. Bioeng. 38: 217-223
- Paterson, S.L., Fane, A.G. & Fell, C.J.D. (1988) "Sorbitol and gluconate production in a hollow fibre membrane reactor by immobilized *Zymomonas mobilis*." Biocatalysis I: 217-229
- Peekhaus, N. (1994) "Molekularbiologische Untersuchungen zur Glutamataufnahme in *Zymomonas mobilis* und *Escherichia coli*." Dissertation Universität Düsseldorf
- Perham, R. N., Scrutton, N.S. & Berry, A. (1991) "New enzymes for old: redesigning the coenzyme and substrate specificities of glutathione reductase." BioEssays 13(10): 515-525
- Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H.Z. & Piepersberg, W. (1994) unveröffentlicht (EMBL X79146)
- Pond, J.L., Eddy, C.K., MacKenzie, K.F., Conway, T., Borecky, D.J. & Ingram, L.O. (1989) "Cloning, sequencing, and characterization of the principal acid phosphatase, the *phoC*⁺ product, from *Zymomonas mobilis*." J. Bacteriol. 171(2): 767-774
- Poole, R.K., Gibson, F. & Wu, G. (1994) "The *cydD* gene product, component of a heterodimeric ABC transporter, is required for assembly of periplasmic cytochrome *c* and of cytochrome *bd* in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol. Letters 117: 217-224

- Preziosi, L., Michel, G.P.F. & Baratti, J. (1990)** "Sucrose metabolism in *Zymomonas mobilis*: production and localization of sucrase and levansucrase activities." *Can. J. Microbiol.* 36: 159-163
- Pugsley, A.P. (1993)** "The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria." *Microbiol. Rev.* 57(1): 50-108
- Puziss, J.W., Fikes, J.D. & Bassford, P.J. (1989)** "Analysis of mutational alterations in the hydrophilic segment of the maltose-binding protein signal peptide." *J. Bacteriol.* 171: 2302-2311
- Puziss, J.W., Harvey, R.J. & Bassford, P.J. (1992)** "Alterations in the hydrophilic segment of the maltose-binding protein (MBP) signal peptide that affect either export or translation of MBP." *J. Bacteriol.* 174(20): 6488-6497
- Ramaley, R., Fujita, Y. & Freese, E. (1979)** "Purification and properties of *Bacillus subtilis* inositol dehydrogenase." *J. Biol. Chem.* 254(16): 7684-7690
- Ramseier, T.M., Winteler, H.V. & Hennecke H. (1991)** "Discovery and sequence analysis of bacterial genes involved in the biogenesis of *c*-type cytochromes." *J. Biol. Chem.* 266(2): 7793-7803
- Randall, L.L. & Hardy, S.J.S. (1995)** "High selectivity with low specificity: how SecB has solved the paradox of chaperone binding." *TIBS* 20: 65-69
- Reed, K.E. & Cronan, J.E. (1991)** "*Escherichia coli* exports previously folded and biotinated protein domains." *J. Biol. Chem.* 266: 11425-11428
- Rehr, B. & Sahm, H. (1990)** "Bildung von Sorbit und Gluconsäure mit dem Ethanolproduzierenden Bakterium *Zymomonas mobilis*." *Forum Mikrobiologie*, 166-169
- Rehr, B., Wilhelm, C. & Sahm, H. (1991)** "Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 144-148
- Reichstein, T. & Grussner, A. (1934)** "A good synthesis of L-ascorbic acid (vitamin C). *Helv. Chim. Acta*, 17: 311-328
- Richardson, D.J., McEwan, A.G., Page, D., Jackson, J.B. & Ferguson, S.J. (1990)** "The identification of cytochromes involved in the transfer of electrons to the periplasmic NO₃⁻ reductase of *Rhodobacter capsulatus* and resolution of a soluble NO₃⁻-reductase-cytochrome-*c*₅₅₂ redox complex." *Eur. J. Biochem.* 194: 263-270
- Rittenhouse, J. & Marcus, F. (1984)** "Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers." *Anal. Biochem.* 138: 442-448
- Rogers, P.L., Lee, K.J., Skotnicki, M.L. & Tribe, D.E. (1982)** "Ethanol production by *Zymomonas mobilis*." *Adv. Biochem. Eng.* 23: 37-84
- Rondeau, J.M., Tête-Favier, F., Podjarny, A., Reyman, J.M., Barth, P., Biellmann, J.-F. & Moras, D. (1992)** "Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase." *Nature* 355: 469-472

- Rosen, B.P. (1987)** "ATP-coupled solute transport systems." in "*Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology.*" Ed. Neidhardt, F.C.; Washington DC, American Society for microbiology, pp. 760-767
- Roskoski, R. (1987)** "Determination of pyridine nucleotides by fluorescence and other optical techniques." in "Pyridine nucleotide coenzymes, Part B." Eds. Dolphin, D., Poulson, R. & Avramovic, O.; Wiley, N.Y.: 173-188
- Rossmann, M.G., Liljas, A., Brändén & Banaszak, L.J. (1975)** "Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases." *Enzymes*, 3rd Ed. 11: 61-102
- Rossmann, M.G., Moras, D. & Olsen, K.W. (1974)** "Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein." *Nature* 250: 194-199
- Rossbach, S., Kulpa, D.A., Rossbach, U. & DeBruijn, F.J. (1994)** "Molecular and genetic characterization of the rhizopine catabolism (*rocABRC*) genes of *Rhizobium meliloti* L5-30." *Mol. Gen. Genet.* 245: 11-24
- Rost, B. & Sander, C. (1993)** "Prediction of protein secondary structure at better than 70 % accuracy." *J. Mol. Biol.* 232:584-599
- Sahm, H., Bringer-Meyer, S. & Sprenger, G. (1992)** "The genus *Zymomonas mobilis*." in "The procaryotes." Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 2287-2301
- Saijo, T. & Tanaka, K. (1995)** "Isoalloxazine ring of FAD is required for the formation of the core in the Hsp60-assisted folding of medium chain acyl-CoA dehydrogenase subunit into the assembly competent conformation in mitochondria." *J. Biol. Chem.* 270(4): 1899-1907
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989)** "Molecular cloning." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977)** "DNA sequencing with chain termination inhibitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Schiebel, E., Driessen, A.J.M., Hartl, F.-U. & Wickner, W. (1991)** " $D\mu_{H^+}$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase." *Cell* 64: 927-939
- Schilz, S. (1993)** "Entwicklung von Vektorsystemen zur regulierten Verminderung der Pyruvatdecarboxylase-Aktivität in *Zymomonas mobilis*." Diplomarbeit RWTH Aachen
- Schmid F.X. (1989)** "Spectral methods of characterization protein conformation and conformational changes." in "Protein structure, a practical approach." Ed. Creighton, T.E.; IRL Press, Oxford: 251-285
- Scrutton, N.S., Berry, A. & Perham, R.N. (1990)** "Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering." *Nature* 343: 38-43
- Shuman, H.A., Silhavy, T.J. & Beckwith, J. (1980)** "Labelling of proteins with β -galactosidase by gene fusions." *J. Biol. Chem.* 255: 168-174

- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983) "A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria." *Biotechnology* 1: 784-790
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983) "Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulations of Gram negative bacteria." in "Molecular genetics of the bacteria-plant interaction." ed. Pühler, A., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg 98-106
- Simon, S.M., Peskin, C.S. & Oster, G.F. (1992) "What drives the translocation of proteins?" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3770-3774
- Song, K.-B., Joo, H.-K., & Rhee, S.-K. (1993) "Nucleotide sequence levansucrase gene (*levU*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC10988)." *Biochim. Biophys. Acta* 1173: 320-324
- Song, K.-B., Lee, S.-K., Joo, H.-K. & Rhee, S.-K. (1994) "Nucleotide and derived amino acid sequences of an extracellular sucrase gene (*invB*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC10988)." *Biochim. Biophys. Acta* 1219: 163-166
- Sperka, S., Zehelein, E., Fiedler, S., Fischer, S., Sommer, R. & Buckel, P. (1989) "Complete nucleotide sequence of *Pseudomonas fluorescens* D-galactose-dehydrogenase gene." *Nucl. Acids Res.* 17(13): 5402
- Sprenger, G.A. (1993) "Approaches to broaden the substrate and product range of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* by genetic engineering. " *J. Biotechnol.* 27: 225-237
- Sprenger, G.A., Typas, M.A. & Drainas, C. (1993) "Genetics and genetic engineering of *Zymomonas mobilis*. " *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 17-24
- Strohdeicher, M., Schmitz, B., Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. (1988) "Formation and degradation of gluconate by *Zymomonas mobilis*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 378-382
- Stryer, L. (1978) "Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler." *Ann. Rev. Biochem.* 7: 819-846
- Swings, J. & DeLey, J. (1977) "The biology of *Zymomonas mobilis*." *Bacteriol. Rev.* 41: 1-46
- Tanaka, H., Lerner, S.A., Lin, E.C.C: (1967) "Replacement of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol." *J. Bacteriol.* 93: 642-648
- Tani, K. & Mizushima, S. (1991) "A chemically cross-linked nonlinear proOmpA molecule can be translocated into everted membrane vesicles of *Escherichia coli* in the presence of the proton motive force." *FEBS Letters* 285: 127-131
- Thatcher, D.R. (1980) "The complete amino acid sequence of three alcohol dehydrogenase alloenzymes from the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.* 187:875-886
- Thöny-Meyer, L., Ritz, D. & Hennecke, H. (1994) "Cytochrome *c* biogenesis in bacteria: a possible pathway begins to emerge." *Mol. Microbiol.* 12(1): 1-9

- Thordsen, O., Lee, S.-J., Degelau, A., Scheper, T., Loos, H., Rehr, H. & Sahm, H. (1993) "A model system for a fluorometric biosensor using permeabilized *Zymomonas mobilis* or enzymes with protein confined dinucleotides." *Biotechnol. Bioengineer.* 42: 387-393
- Thorson, J.S., Oh, E. & Liu, H. (1992) "Studies of complex pyridine nucleotide-dependent transformations: structure and cofactor binding correlation CDP-D-glucose oxidoreductase." *J. Am. Chem. Soc.* 114: 6941-6942
- Tokuda, H. (1994) "Biochemical characterization of the presecretory protein translocation machinery of *Escherichia coli*." *FEBS Letters* 346: 65-68
- Towbin, H.T., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354
- Ullmann (1982) "Zucker, Zuckeralkohole und Gluconsäure." in "Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie, 4. Auflage 24: 772-775, Verlag Chemie, Weinheim
- VanDongen, W., Hagen, W., van den Berg, W. & Veeger, C. (1988) "Evidence for an unusual mechanism of membrane translocation of the periplasmic hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough), as derived from expression in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiol. Letters* 50: 5-9
- VanOphem, P.W., VanBeeumen, J. & Duine J.A. (1993) "Nicotinoprotein [NAD(P)-containing] alcohol/aldehyde oxidoreductases. Purification and characterization of a novel type from *Amycolatopsis methanolica*." *Eur. J. Biochem.* 212: 819-826
- Varley, P.G. (1994) "Fluorescence spectroscopy." *Methods in Molecular Biology* Vol. 22; Eds. Jones, C., Mulloy, B. & Thomas A.H.; Humana Press Inc., Totowa, N.J.: 203-244
- Vieira, J. & Messing, J. (1982) "The pUC plasmids, and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers." *Gene* 19: 259-268
- Viikari, L. (1984) "Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 118-123
- Viikari, L. (1988) "Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*." *Crit. Rev. Biotechnol.* 7(3): 237-261
- Völler, M.E. (1991) "Untersuchungen zur Genetik der Sorbit/Glukonsäure-Bildung bei dem anaeroben Bakterium *Zymomonas mobilis*." Diplomarbeit RWTH Aachen
- Vonck, J., Arfman, N., DeVries, G.E., VanBeeumen, J., VanBruggen, E.F.J. & Dijkhuizen, L. (1991) "Electron microscopic analysis and biochemical characterization of a novel methanol dehydrogenase from the thermotolerant *Bacillus* sp. C1." *J. Biol. Chem.* 266(6): 3949-3954
- VonHeijne, G. (1983) "Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites." *Eur. J. Biochem.* 133: 17-21
- VonHeijne, G. (1990) "The signal peptide." *J. Membrane Biol.*, 115: 195-201

- VonHeijne, G. & Abrahmsén, L. (1989) "Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts." FEBS Letters 244(2): 439-446
- Weißer, P., Krämer, R. Sahm, H. & Sprenger, G.A. (1995) "Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action." J. Bacteriol. 177(11): 3351-3354
- Wierenga, R.K. & DeHol, W.G.J. (1983) "Predicted nucleotide binding properties of p21 protein and its cancer-associated variant." Nature 302: 842-844
- Wierenga, R.K., DeMaeyer, M.C.H. & Hol, W.G.J. (1985) "Interaction of pyrophosphate moieties with α -helices in dinucleotide binding proteins." Biochem. 24: 1346-1357
- Wierenga, R.K., Terpstra, P. & Hol, W.G.J. (1986) "Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint." J. Mol. Biol. 187: 101-107
- Wilson, D.B. & Hogness, D.S (1964) "The enzymes of the galactose operon in *Escherichia coli*. I. Purification and characterization of uridine diphosphogalactose-4-epimerase." J. Biol. Chem. 239(8): 2469-2481
- Wülfing, C. & Plückthun, A. (1994) "Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*." Mol. Microbiol. 12(5): 685-692
- Yanish-Perron, C., Viera, J. & Messing, J. (1985) "Improved phage M13 cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene 33: 103-119
- Yoshida, Y., Takai, M., Satoh, T. & Takami, S. (1991) "Molybdenum requirement for translocation of dimethyl sulfoxide reductase to the periplasmic space in a photodenitrifier, *Rhodobacter sphaeroides* f.sp. *denitrificans*." J. Bacteriol. 173(11): 3277-3281
- Zacchariou, M. and Scopes, R.K. (1986) "Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production." J. Bacteriol. 167(3): 863-869
- Zarkowsky, H., Lipkin, E. & Glaser, L. (1970) "The mechanism of 6-deoxyhexose synthesis." J. Biol. Chem. 245(24): 6599-6606
- Zimmermann, R. & Wickner, W. (1982) "Energetics and intermediates of the assembly of protein OmpA into the outer membrane of *Escherichia coli*." J. Biol. Chem. 258: 3920-3925
- Zumft, W.G., Viebrock-Sambale, A. & Barun, C. (1990) "Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. Genes for copper-processing and properties of the deduced products, including a new member of the family of ATP/GTP-binding proteins." Eur. J. Biochem. 192: 591-599

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich GmbH angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. C. P. Hollenberg danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Vor allem bedanke ich mich bei Herrn Dr. G. A. Sprenger für seine ständige Diskussionsbereitschaft und Ratschläge, die diese Arbeit begleitet haben.

Insbesondere möchte ich mich bei den (ehemaligen) Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe Doris Dohmen-Olma, Birgit Laufer, Ina Reipen, Stephan Schilz, Uli Schörken, Gerda Sprenger und Peter Weißer für das gute Arbeitsklima bedanken.

Allen Mitgliedern der Proteinsekretionsgruppe gilt mein Dank, vor allem Herrn PD Dr. R. Freudl für seine Diskussionsbereitschaft und seinen fachlichen Rat, Herrn Dr. K. L. Schimz für sein Interesse und manche technische Raffinesse und Herrn Dr. J. Meens für gute Tips und die Überlassung der Plasmide pOA181K8 und pPA4.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. L. Kirk von der University of Queensland (Brisbane, Australien) für die Überlassung des *Z. mobilis* Stammes ACM3963, Dr. R. Seckler vom Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie der Universität Regensburg für die Hilfe bei den fluoreszenzspektroskopischen Messungen und H. Paschold für die Hilfe bei der *Z. mobilis* Großfermentation.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie 1 danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Diese Arbeit wurde in Teilen durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Jül-3149
November 1995
ISSN 0944-2952