

**Automatisiertes Hochdurchsatz-Screening nach neuartigen
Biokatalysatoren: Isolierung und biochemische
Charakterisierung einer Glukose-Dehydrogenase**

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Biol. Alexander Basner
aus Paderborn

2013

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
I.1	Einsatz von Enzymen in der Biotechnologie	2
I.2	Metagenomik	4
I.3	Hochdurchsatz-Screening-Verfahren	7
I.4	Glukose-Dehydrogenasen	8
I.5	Glukose-Metabolismus	9
I.6	<i>Short-chain</i> Dehydrogenasen/Reduktasen	11
I.6.1	Topologie der Rossmann-Faltung	14
I.6.2	Allgemeiner Reaktionsmechanismus	17
I.6.3	Anwendungen von Glukose-Dehydrogenasen	19
I.7	Zielsetzung dieser Arbeit	23
II.	Material & Methoden	25
II.1	Chemikalien und Materialien	25
II.2	Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	25
II.3	Nährmedien	27
II.3.1	LB-Medium	27
II.3.2	LB-Medium 2x	27
II.3.3	Autoinduktionsmedium	27
II.3.4	SOC-Medium	28
II.4	Antibiotika und Medienzusätze	29
II.5	Anzuchtverfahren und Stammhaltung	29
II.5.1	Kultivierung	29
II.5.2	Stammkulturen	30
II.5.3	Messung der optischen Dichte	30
II.6	Molekularbiologische Methoden	30
II.6.1	Isolierung von Plasmid-DNA	31
II.6.2	Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	31
II.6.3	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	31
II.6.4	Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	32
II.7	<i>In vitro</i> Modifikation von Nukleinsäuren	32

II.7.1	Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	32
II.7.2	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren.....	32
II.7.3	Amplifikation von DNA durch Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	33
II.7.4	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	34
II.7.5	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	34
II.8	Präparation von Zellrohextrakten	34
II.8.1	Zellaufschluss mit der „French Pressure Cell“	34
II.8.2	Zellaufschluss in Mikrotiterplatten.....	35
II.9	Biochemische und analytische Methoden	36
II.9.1	Quantitative Proteinbestimmung	36
II.9.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen... ..	36
II.9.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen	38
II.9.4	Färbung von Proteinen	38
II.9.5	Nachweis von GDH-Aktivität in Polyacrylamidgelen	39
II.10	Reinigung von Proteinen	39
II.10.1	Metallionen-Affinitätschromatographie	39
II.10.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	39
II.10.3	Größenausschlusschromatographie	41
II.10.4	Bestimmung des Molekulargewichts mittels Gelfiltration.....	41
II.11	Nachweis von GDH-Aktivität mittels DCIP	42
II.12	Nachweis von GDH-Aktivität mit <i>p</i> -Nitrosoanilinen	43
II.12.1	Mediator BM 53.0861	44
II.12.2	Mediator BM 31.1144	45
II.12.3	Aktivitätsbasiertes Hochdurchsatz-Screening von Metagenombanken	46
II.13	Biochemische Charakterisierung.....	47
II.13.1	Nachweis des Co-Faktors	47
II.13.2	Bestimmung der Substratspezifität.....	48
II.13.3	Bestimmung des Temperaturprofils	48
II.13.4	Bestimmung der Temperaturstabilität	48
II.13.5	Bestimmung des pH-Profiles.....	48
II.13.6	Bestimmung der pH-Stabilität.....	49
II.13.7	Bestimmung des Einflusses von Reagenzien	49
II.13.8	Bestimmung der Enzymkinetik	49

II.14	Computerprogramme und Online-Datenbanken	50
III.	Ergebnisse	51
III.1	Etablierung des Hochdurchsatz-Screening-Verfahrens.....	51
III.1.1	Zellaufschluss in 96-well Mikrotiterplatten	51
III.1.2	Hochdurchsatz-Screening der Metagenombank eines Heuaufgusses	51
III.1.3	Spezifität des biochemischen Assays im Hochdurchsatz-Screening.....	53
III.2	Analyse der Metagenombank-Klone 1E5 und 3B11.....	53
III.3	Charakterisierung des Gens <i>gdh1E5</i>	56
III.4	Multipler Sequenzvergleich der GDH1E5 mit verwandten Enzymen	59
III.5	Modellierung der räumlichen Struktur der Glukose-Dehydrogenase 1E5.....	62
III.6	Klonierung und heterologe Expression des Gens <i>gdh1E5</i>	63
III.7	Reinigung der Glukose-Dehydrogenase 1E5	65
III.7.1	Reinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HIC)	65
III.7.2	Reinigung mittels Gelfiltration.....	65
III.7.3	Reinigung mittels Affinitätschromatographie	65
III.8	Bestimmung des apparenten Molekulargewichts der GDH1E5.....	67
III.9	Nachweis von NAD(P) ⁺ als Co-Faktor der GDH1E5	69
III.10	Biochemische Charakterisierung der GDH1E5	70
III.10.1	Aktivität der GDH1E5 in Abhängigkeit vom Substrat.....	70
III.10.2	Bestimmung der Enzymkinetik in Abhängigkeit vom Substrat.....	71
III.10.3	Bestimmung der Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur.....	75
III.10.4	Temperaturstabilität der GDH1E5	76
III.10.5	Bestimmung der Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert	77
III.10.6	pH-Stabilität der GDH1E5	78
III.10.7	Einfluss verschiedener Ionen auf die Aktivität der GDH1E5	79
III.10.8	Einfluss verschiedener Reagenzien auf die Aktivität der GDH1E5.....	80
III.10.9	Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Aktivität der GDH1E5.....	81
IV.	Diskussion	83
IV.1	Metagenombanken	83
IV.1.1	Limitierungen von Metagenombanken.....	84
IV.2	Hochdurchsatz-Screening von Metagenombanken	85
IV.3	Sequenzanalyse der identifizierten Klone	87

IV.4	Herkunft der klonierten Metagenomfragmente	88
IV.5	Identifizierung konservierter Aminosäuren der GDH1E5	90
IV.6	Hinweise auf den katalytischen Reaktionsmechanismus	90
IV.7	Hinweise für die Verwendung von NAD(P) ⁺ als Co-Faktor.....	92
IV.8	Einbindung der GDH1E5 in den Stoffwechsel	93
IV.9	Klonierung und Expression der GDH1E5	94
IV.10	Reinigung der GDH1E5	95
IV.11	Bestimmung des apparenten Molekulargewichts.....	95
IV.12	Biochemische Charakterisierung der GDH1E5	96
IV.12.1	Substratspektrum	97
IV.12.2	Resultate der Enzymkinetik.....	99
IV.12.3	Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der GDH1E5.....	100
IV.12.4	Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität der GDH1E5.....	101
IV.12.5	Einfluss verschiedener Additive auf die Aktivität der GDH1E5	102
IV.13	Mögliche Anwendungsgebiete und Ausblick.....	103
V.	Zusammenfassung	105
VI.	Literaturverzeichnis	107