Curdlanase,

ein extrazelluläres hefelytisches Enzym von

Streptomyceten

Dissertation der Fakultät für Biologie
Der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von

Norbert Bauer

aus

Erding

_____

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Fiedler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 2002

Inhaltsverzeichnis

A EINLEITUNG 1

B MATERIAL UND METHODEN 8

1 VERWENDETE MIKROORGANISMEN 8
2 MEDIEN 9
2.1 MEDIEN FÜR STREPTOMYCETEN 9
2.1.1 Yokogawa (Yokogawa et al., 1995): 9
2.1.2 DSM Medium 65: 9
2.1.3 NMMP (Hopwood et al., 1985): 9
2.1.4 R2 (Okanishi et al., 1974; Hopwood und Wright, 1978): 9
2.1.5 YEME: 10
2.1.6 Herstellen von RBB-Curdlan Agarplatten: 10
2.2 MEDIEN FÜR ESCHERICHIA COLI 10
2.2.1 LB (Luria Broth; DSM 381): 10
2.2.2 RM (Invitrogen): 10
2.2.3 SOC (Invitrogen): 10
2.3 MEDIEN FÜR HEFEN 10
2.3.1 YM (DSM 186): 10
2.3.2 Methylenblauagar (modifiziert nach Stumm et al., 1977): 11
3 ANZUCHTBEDINGUNGEN 11
3.1 STREPTOMYCETEN 11
3.1.1 Zur Stimulation von Exoenzymen: 11
3.1.2 Zur Präparation von Exoenzymen: 11
3.1.3 Zur Präparation von genomischer DNA: 11
3.2 CELLULOMONAS CELLULANS 12
3.3 ESCHERICHIA COLI 12
3.3.1 Zur Präparation von Plasmiden: 12
3.3.2 Zur Kontrolle der Transformation: 12
3.3.3 Zur Expression von Fremdprotein: 12
3.3.4 Zur Herstellung kompetenter Zellen: 13
3.4 HEFEN: 13
4 BIOCHEMISCHE METHODEN 14
4.1 AUFBRECHEN VON ESCHERICHIA COLI MIT FRENCH PRESS 14
4.2 PRÄPARATION VON SDS-ZELLWÄNDEN 14
4.2.1 Zellaufschluß mit Glasperlen (Schleifer und Kandler, 1967) 14
4.2.2 Entfernung von Membranresten und nicht kovalent gebundenen Proteinen (Braun und Rehn, 1969). 14
4.3 HYDROLYSEN 15
4.3.1 Milde saure Hydrolyse 15
4.3.2 Totalhydrolyse 15
4.3.3 Hydrolyse mit Trifluoressigsäure 15
4.4 PROBENAUFBEREITUNG FÜR GASCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN 15
4.4.1 Reduktion (Albersheim et al., 1967) 15
4.4.2 Acetylierung 15
4.4.3 Analyse 16
4.4.4 Bestimmung des Anteils von SDS-HZW am Trockengewicht von *Streptomyces globisporus*-Kulturen 16
4.5 PROBENAUFBEREITUNG FÜR DEN AMINOSÄURENANALYSATOR (ASA) 16
4.6 PRÄPARATION FÜR TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE (TEM) 17

4.7 PROTEINBESTIMMUNG 17
4.8 GELELEKTROPHORESE 18
4.8.1 Auftrennung von DNA im Agarosegel 18
4.8.2 Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamidgel 18
4.9 FÄRBUNGEN VON PROTEINEN 18
4.9.1 Färbung mit Coomassie Blau R250B 18
4.9.2 Färbung mit Silbernitrat 18
4.10 AKTIVITÄTSTESTS ZUM NACHWEIS DER GLUKANASE 19
4.10.1 Qualitativer, turbidimetrischer Test: 19
4.10.2 Quantitativer, enzymatischer Test (leicht verändert nach Boehringer/Roche): 19
4.10.3 Agarose Lyse Tests 20
4.10.4 Zymogramm: „Curdlanblot“ 21
4.11 WESTERNBLOT 21
4.11.1 Detektion mit Antikörpern 22
4.11.2 Detektion mit dem Nickel-Nitriloessigsäure-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Ni-NTA-HRP; Qiagen) 22
4.11.3 Umsetzung mit Diaminobenzidin 23
4.11.4 Umsetzung mit Luminol 23
4.12 NEUTRALZUCKERBESTIMMUNG (DUBOIS ET AL., 1956) 23
5 CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN 24
5.1 DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE (LEWIS UND SMITH, 1967) 24
5.2 KONVENTIONELLE CHROMATOGRAPHIE 24
5.2.1 Gelfiltration mit Biogel P4 (Bio-Rad) 24
5.2.2 Affinitätschromatographie mit Protein G Sepharose fast flow (Pharmacia) 24
5.2.3 Affinitätschromatographie mit Sepharose Chelating Säule (Pharmacia) 25
5.3 HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGKEITS CHROMATOGRAPHIE (HPLC) 25
5.3.1 Gelfiltration mit Superdex 200 Säulen (Pharmacia) 25
5.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie mit TSK 5PW (TosoHaas) 26
6 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN 27
6.1 STANDARDMETHODEN 27
6.2 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS STREPTOMYCES GLOBISPORUS 27
6.3 DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION (SAMBROOK ET AL., 1989) 28
6.4 SOUTHERNBLOT (SAMBROOK ET AL., 1989) 28
6.5 MARKIERUNG VON DNA-OLIGOMEREN MIT [γ-^{32}P]ATP 29
6.6 DNA-SEQUENZIERUNG 30
6.7 TRANSFORMATION VON ESCHERICHIA COLI 30
6.7.1 Elektroporation: 30
6.7.2 $CaCl_2$-Methode: 31
6.8 BLAU/WEIß-SELEKTION 31
6.9 ANHÄNGEN EINES 3´DESOXYADENOSIN-ÜBERHANGS AN PCR-AMPLIFIKATE 31
6.10 TA-KLONIERUNG (INVITROGEN, CARLSBAD, CA, USA) 32
6.11 EXPRESSION DER REKOMBINANTEN CURDLANASE 32
7 SONSTIGE METHODEN 33
7.1 MUTAGENESE VON STREPTOMYCES GLOBISPORUS 33
7.1.1 Physikalische Methode: Bestrahlung mit UV- Licht 33
7.1.2 Chemische Methode: Alkylierung der DNA mit NG (1-Methyl-3-Nitro-1-Nitro-soguanidin) 33
7.2 SUSPENDIERUNG MIT ULTRASCHALLHOMOGENISATOR 34
7.3 ULTRAFILTRATION 34
7.3.1 Entsalzung mit Zentrifugiereinheiten (Pall Filtron) 34
7.3.2 Entsalzung mit Rührzelle (Amicon) 34
7.3.3 Konzentrierung mit Tangentialfiltration (Pall Filtron) 34
7.4 AMMONIUMSULFATFÄLLUNG 35
7.5 ANTIKÖRPERGEWINNUNG 35

C ERGEBNISSE 36

1 LYTISCHE EIGENSCHAFTEN VON *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 36
1.1 BEOBACHTUNG DER SCHÄDIGUNG VON SACCHAROMYCES CEREVISIAE 36
1.2 IDENTIFIZIERUNG DES MOLEKULAREN ANGRIFFSPUNKTES DER LYSE DER ZELLEN VON SACCHAROMYCES CEREVISIAE 37
1.3 SUCHE NACH ANDEREN LYTISCHEN AKTIVITÄTEN 38
2 STEIGERUNG DER APPARENTEN LYTISCHEN AKTIVITÄTEN 39
2.1 STIMULATOREN 39
2.2 MEDIENOPTIMIERUNG 41
2.3 EINFLUß DER MENGE DES SUBSTRATS 42
2.4 EINFLUß DES POLYMERISATIONSGRADES DES SUBSTRATMOLEKÜLS 42
2.5 SENSIERUNG DES SUBSTRATS 44
3 REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER CURDLANASE 47
3.1 REINIGUNG DER CURDLANASE 47
3.2 ANTIKÖRPERGEWINNUNG UND -REINIGUNG 51
3.3 HEMMUNG DER AKTIVITÄT DURCH ANTIKÖRPER 53
3.4 SEQUENZIERUNG DES PROTEINS 54
3.5 CHARAKTERISIERUNG DER CURDLANASE 55
3.5.1 Charakterisierung der lytischen Aktivität 55
3.5.2 Allgemeine Charakterisierung des Enzyms 56
4 REGULATION DER EXPRESSION DER CURDLANASE 61
4.1 ZEITPUNKT DER EXKRETION DER CURDLANASE 62
4.2 KATABOLIT-REPRESSION 63
4.3 MUTAGENESE VON STREPTOMYCES GLOBISPORUS 67
4.3.1 UV-Licht: 67
4.3.2 NG (1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin) 67
5 SUCHE NACH CURDLANASE-AKTIVITÄT BEI ANDEREN ORGANISMEN 68
5.1 CELLULOMONAS CELLULANS 68
5.2 STREPTOMYCETEN 69
6 IDENTIFIZIERUNG DES FÜR DIE CURDLANASE KODIERENDEN GENS 70
6.1 PCR–EXPERIMENTE 71
6.2 SOUTHERNBLOT-EXPERIMENTE 72
6.3 IDENTIFIZIERUNG EINES GENS VON STREPTOMYCES COELICOLOR FÜR EINE HYPOTHETISCHE CURDLANASE 73
7 KLONIERUNG DES GENS *CUR* VON *STREPTOMYCES COELICOLOR* M145 74
7.1 KONSTRUKTION DES VEKTORS PCUEB 74
7.2 KONSTRUKTION DER EXPRESSIONSVEKTOREN PCUTOPO UND PCUTOPO-HIS 76
7.2.1 Topoisomerase-System 77
7.2.2 Amplifizierung des ORF 15c 77
7.2.3 Klonierung des ORF 15c 78
7.2.4 Transformation in *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen) 79
7.2.5 Expression der Curdlanase 79
7.2.6 Induzierung der Expression der Curdlanase 81
7.2.7 Reinigung der heterolog exprimierten Curdlanase 82
7.2.8 Kinetische Charakterisierung der heterolog exprimierten Curdlanase 84
7.2.9 Vergleich mit kommerziell erhältlichen Lytikasen 85
8 AKTIVITÄT DER CURDLANASE GEGENÜBER ANDEREN HEFEN 87
8.1 HYDROLYSIERBARKEIT DER ZELLWAND 88
8.2 HYDROLYSIERBARKEIT GANZER ZELLEN 88
8.3 WIRKUNG DER CURDLANASE AUF SICH VERMEHRENDE ZELLEN 89

D DISKUSSION 92

E ZUSAMMENFASSUNG 101

F LITERATURVERZEICHNIS 103

G ANHANG A 1

Abkürzungsverzeichnis

ASA	Aminosäurenanalysator
ATCC	American Type Strain Culture Collection, Manassas, VA, USA
ATP	Adenosintriphosphat
bid.	zweifach deionisiert (Seradest-Qualität)
BSA	Rinderserumalbumin
CAP	cAMP- Bindeprotein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GC	Gaschromatographie
HRP	Meerrettich Peroxidase
Inkr.	Inkrement
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
lac	Laktose
LMU	Ludwig Maximilians Universität München
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure (Puffer)
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD_{580}	Optische Dichte gemessen bei λ = 580 nm
ORF	open reading frame = offener Leserahmen
PIPES	1,4 Piperazindiethansulfonsäure
RBB	Remazol Brillant Blue

RBV	Remazol Brillant Violet
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-HZW	mit SDS behandelte Zellwände von *Saccharomyces cerevisiae*
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese
SDS-Zellwände	mit SDS behandelte Zellwände
TES	Tris gepufferte Saline mit EDTA
TM-Puffer	Puffer zur Mutagenese mit NG
U/min	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl-β-D-Galaktosid

A Einleitung

Der Boden stellt ein sehr komplexes Ökosystem dar. Mit bis zu 10^9 Zellen pro Gramm Erde zählen die Streptomyceten zu den dominierenden Organismen in diesem Lebensraum. Der typische, leicht modrige Geruch frisch aufgebrochener Erde beruht auf Geosmin. Dieser Erdgeruch stammt hauptsächlich von ihnen (Madigan et al., 1997). Diese grampositiven Bakterien mit einem GC-Gehalt von 69-73% bilden während des vegetativen Wachstums im Boden ein Substratmycel aus. Der Verbreitung dienen Exosporen (Konidien), die durch Abschnürungen des Luftmycels entstehen. Die Verbreitung der Sporen wird unterstützt an der Oberfläche des Bodens durch Wind oder im Boden durch Wasser und Arthropoden (Locci, 1989). Pfennig konnte 1958 zeigen, daß das vegetative Mycel zu organischen Partikeln (abgestorbene Pflanzen, Tiere, Pilze) hinwächst und später zu kolloidalen Bodenpartikeln weiterwächst. Dort differenziert es sich zum Luftmycel und letztlich zu Ketten von Konidien.

Die Streptomyceten sind ausgezeichnet als Produzenten einer erstaunlichen Vielzahl an Sekundärmetaboliten mit antibiotischen, herbiziden, antithelminthischen, pharmazeutischen und wachstumsfördernden Wirkungen (Chater und Hopwood, 1993). Über die Hälfte aller bekannten Antibiotika werden von Streptomyceten produziert. Zu den bedeutsamsten Produzenten gehören *Streptomyces griseus* (Streptomycin, Actinomycin, Novobiocin), *Streptomyces antibioticus* (Actinomycine), *Streptomyces aureofaciens* (Aureomycin, Tetracyclin), *Streptomyces erythreus* (Erythromycine), *Streptomyces fradiae* (Neomycin B), *Streptomyces griseoflavus* (Novobiocin), *Streptomyces venezuelae* (Chloramphenicol) (Herder, 1994) und *Streptomyces coelicolor* (Actinorhodin, Undecylprodigiosin, Methylenomycin, CDA (Ca^{2+}-abhängiges Antibiotikum)) (Adamidis und Champness, 1992). Als ein Beispiel industrieller Nutzung ist *Streptomyces griseoviridis* zu nennen. Dieser Organismus wird als Biofungizid eingesetzt gegen *Fusarium oxysporum* (Mohammadi, 1994). Ebenso bedeutsam ist auch die Vielzahl an hydrolytischen Exoenzymen, die ihre Produzenten so wichtig machen als Biodegradenten (McCarthy, 1992). Stärke, Cellulose, Chitin, Lignin, Xylan, Keratin und Pektin werden effektiv von mehreren Streptomyceten hydrolysiert (Goodfellow, 1988). Aber auch Huminstoffe oder polyphenolische Tannine (Locci, 1989) werden hydrolysiert und so wieder in den Kreislauf zurückgeführt. Selbst verschiedene Plastikarten können von

Streptomyceten abgebaut werden (Pommer und Lorenz, 1986). Der Abbau dieser Polymere erfolgt meist in einer konzertierten Aktion mehrerer Enzyme (Korn-Wendisch und Kutzner, 1991).

Der Lignocelluloseabbau durch *Streptomyces thermodiastaticus* (Crawford und McCoy, 1972), *Streptomyces antibioticus* (Enger und Sleeper, 1965) und *Streptomyces flavogriseus* (MacKenzie et al., 1984) erfolgt jeweils durch eine Multikomponenten-Cellulase, die aus mehreren Endo- und Exoglukanasen besteht. Ob es sich dabei um ein Cellulosom wie bei *Clostridium thermocellum* handelt, ist unbekannt. Diese extrazelluläre, supramolekulare „Maschine“ kann effizient kristalline Cellulose abbauen (Shoham et al., 1999). Dabei bindet das Cellulosom über ein Ankerprotein an die Zelle. Paare von Cohesinen und Dockerinen stellen die Verbindung zwischen dem Skaffoldin und dem Ankerprotein auf der einen Seite und der Cellulose auf der anderen Seite her. Das Skaffoldin, auch als CipA (Cellulosome integrating protein) bezeichnet, besteht aus mehreren Untereinheiten, die jeweils ein hydrolysierendes Enzym binden. Es erhöht somit die Wahrscheinlichkeit, daß die Hydrolyseprodukte von der Zelle aufgenommen werden können, die es produziert hat. Cellulosome sind auch für andere Clostridienarten beschrieben. Andere Anaerobier, *wie Acetivibrio cellulolyticus* und *Bacteroides cellulosolvens*, scheinen ebenso ein Cellulosom zu produzieren. Bisher wurden nur in einem aeroben Bakterium *Vibrio spec.* Gene für Teile des Cellulosoms gefunden (Shoham et al., 1999). Kristalline Cellulose kann aber auch von einzelnen Enzymen hydrolysiert werden. *Streptomyces reticuli* sekretiert eine Avicelase, die aus einer cellulosebindenden, einer anschließenden Domäne mit unbekannter Funktion und einer katalytischen Domäne besteht (Schrempf und Walter, 1995).

Die Hydrolyseprodukte der oben beschriebenen Abbaumechanismen werden aufgenommen und metabolisiert, sie dienen als Nahrungsquelle. Dies ist für die meisten Exoenzyme die Hauptaufgabe. Chitinasen (Watanabe et al., 1990) und Bakteriolysine (Brönneke, 1994) wirken gleichzeitig auch als Abwehr gegen Nahrungskonkurrenten, indem sie Zellwände von Pilzen und Bakterien auflösen oder zumindest schädigen.

In diesen Zusammenhang müssen auch Glukanasen gestellt werden. Diese Exoenzyme hydrolysieren Glukane, wesentliche Bestandteile von Hefezellwänden,

wie das folgende Modell der Hefezellwand von Georgopapadakou und Tkacz (1995) zeigt:

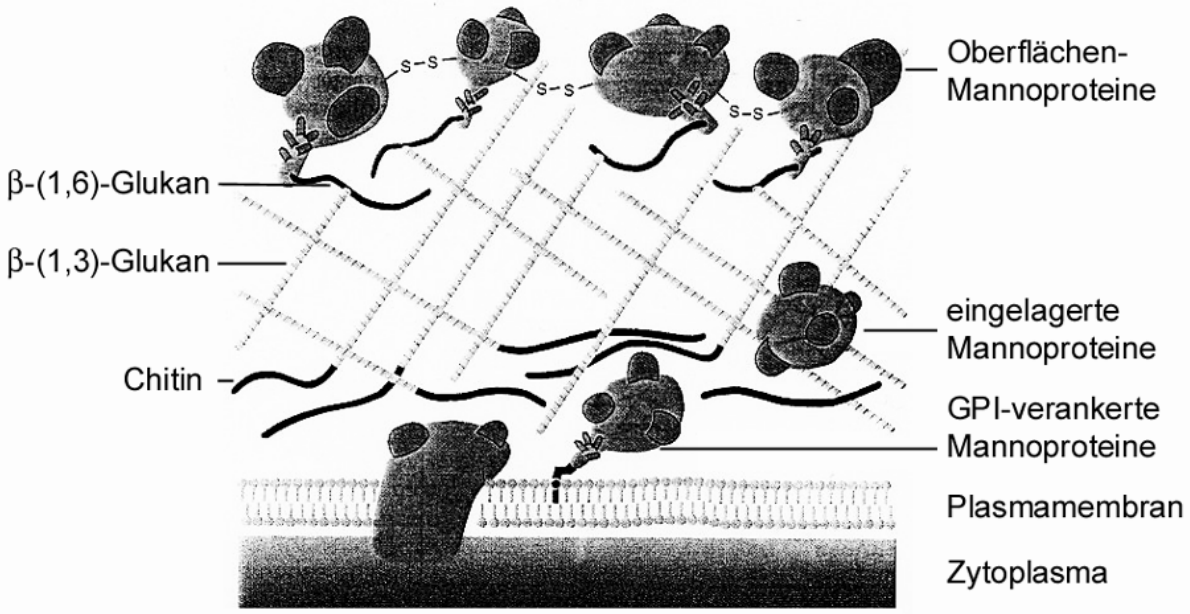


Abbildung 1: Modell des Zellwandaufbaus von *Saccharomyces cerevisiae*
β-Glukan, Chitin und glykosylierte (dargestellt durch die Ausstülpungen) Mannoproteine sind die makromolekularen Hauptbestandteile der Zellwand. Die Oberflächen-Mannoproteine sind über β-(1,6)-Glukanfibrillen an das Netzwerk aus β-(1,3)-Glukan kovalent gebunden. Die Chitinfibrillen stellen die Verbindung zur Plasmamembran her und stabilisieren das Netzwerk zusätzlich

Die Mannoproteine verleihen der Zellwand mit ihren nach außen gerichteten phosphorylierten Seitenketten eine negative Oberflächenladung. Sie sind verantwortlich für Adhäsion und Stofftransport durch die Zellwand und tragen zur Integrität derselben bei. Für die Form und die Stabilität der Zellwand ist hauptsächlich das Glukangerüst verantwortlich. Die Form der Zellwand bleibt erhalten, selbst wenn alle anderen Bestandteile herausgelöst werden (Wicker und Mühlschlegel, 2000). Dies macht die besondere Bedeutung von Glukanasen für die Lyse von Hefen deutlich. Beispiele sind die Glukanase von *Bacillus circulans* WL12 (Tanaka und Phaff, 1965), die Glukanase von *Cellulomonas cellulans* (früher: *Oerskovia xanthineolytica*) (Shen et al., 1991) oder Lytikase von *Arthrobacter luteus* (Produkt von Sigma). Das letzte Beispiel belegt auch die kommerzielle Bedeutung dieser Enzyme.

Eine Sekretion von Exoenzymen, die der Abwehr von Konkurrenten um Nahrung oder Lebensraum dienen soll, ist aber nur dann sinnvoll, d. h. evolutiv erklärbar, wenn die Konkurrenten in der unmittelbaren Nähe, im Diffusionsbereich der

Exoenzyme, vorhanden sind. Tatsächlich wurden entsprechende Induktionssysteme gefunden. Ein gut beschriebenes Beispiel ist das Elicitorsystem bei Pflanzen (Albersheim und Darvill, 1985). Die Abwehrreaktionen der Pflanze, z. B. Transkription und Sekretion von Hydrolasen oder Toxinen, erfolgen erst, wenn ein pathogener Organismus versucht, die Pflanze zu attackieren. Als Auslöser dienen entweder Moleküle der Pflanze, die durch die Aktivität des Pathogens oder der infizierten Pflanze selbst freigesetzt wurden, oder eine Substanz des Pathogens, das auf Grund einer konstitutiven Abwehrreaktion der Pflanze freigesetzt wurde. Die Auslöser gehören den verschiedensten Stoffklassen an. Es können Proteine mit oder ohne enzymatischer Funktion sein (Ricci et al. 1989, Parker et al. 1991), Zucker (Sharp et al. 1984, Kaku et al. 1997) oder Fettsäuren (Bostock et al. 1981, Davis et al. 1986). Sahai und Manocha (1993) beschreiben die Induktion von Chitinasen und anderen hydrolytischen Enzymen als eine koordinierte, oft komplexe und facettenreiche Verteidigung der Pflanze auf einen Angriff von pathogenen Pilzen. Gundlach (1987) konnte erstmals zeigen, daß Zellwände verschiedener grampositiver Bakterien ebenfalls als Elicitoren fungieren können. Die Zellwände lösten bei *Eschscholtzia californica* die *de novo* Synthese von Benzophenanthridin aus. Das Elicitorsystem ist nicht auf das Pflanzenreich beschränkt. Für den Tabakschwärmer *Manduca sexta* konnte gezeigt werden, daß bakterielles Peptidoglykan die Synthese und Sekretion von Lysozym induziert (Dunn und Dai, 1990). Solche Induktionssysteme sind auch für Aktinomyceten beschrieben und können sogar zur Isolation von antibiotikaproduzierenden Aktinomyceten ausgenutzt werden. Die Anreicherung von Bodenmaterial mit Chitin oder Pilzzellwänden führte zu einer Zunahme von antibiotikaproduzierenden Aktinomyceten (Korn-Wendisch und Kutzner, 1991). Versuche von Sneh und Henis (1972) zeigten, daß neben den Antibiotika vor allem hydrolysierende Exoenzyme bei der Abwehr von Pilzen eine wichtige Rolle spielen. Detailliertere Untersuchungen in Mikrokosmen von Vionis et al. (1996) zeigten, daß *Streptomyces lividans* (transformiert mit einem Exochitinasegen von *Streptomyces olivaceoviridis*) diese Exochitinase exprimiert, wenn der Boden mit Krabbenchitin oder noch besser mit Pilzmycel angereichert wird.

Die Induktion sekundärer Metabolite erfolgt aber nicht ausschließlich zur Abwehr von pathogenen oder konkurrierenden Organismen. Die Erschließung von Nahrungsquellen ist eine weitere Möglichkeit. Energiereiche Polymere, die zu groß sind, um direkt aufgenommen zu werden, werden deshalb von Exoenzymen in

kleinere Einheiten gespalten. In diesen Fällen dient oft das Substrat als Induktor für die Expression der Exoenzyme. Die Expression des α-Amylase Gens *aml* von *Streptomyces limosus* wird induziert durch Maltose oder Maltodextrine (Virolle und Bibb, 1988). Die Avicelase von *Streptomyces reticuli* wird durch unlösliche Cellulose (Avicel) induziert (Walter und Schrempf, 1996).

Die Regulation dieser komplexen Stoffwechselleistungen wurde schon vielfach untersucht. Dabei stand im Vordergrund des Interesses das Umschalten von primärem auf sekundären Stoffwechsel, der aber nicht nur die Sekretion von Exoenzymen und Antibiotika, sondern auch die Sporenbildung umfaßt. *Streptomyces coelicolor* und der Streptomycinproduzent *Streptomyces griseus* sind in dieser Hinsicht die am besten untersuchten Vertreter der Aktinomyceten.

Bei *Streptomyces griseus* wurde von Horinouchi, Beppu und Mitarbeitern (1994) ein globales Regulationssystem aufgeklärt. Es basiert auf dem A-Faktor, einem γ-Butyrolacton. Die A-Faktor Synthese wird durch die *afs*-Gene gesteuert, die neben den Syntheseproteinen auch für zwei verschiedene 2-Komponenten-Regulatoren kodieren (AfsK/AfsR und AfsQ1/AfsQ2) (Horinouchi und Beppu, 1992). Der A-Faktor selbst wirkt wie ein bakterielles Hormon. Es dereprimiert das Streptomycin Operon, indem es an das A-Faktor-Bindeprotein AprA bindet. AprA löst sich dadurch von der Regulatorsequenz für ein weiteres, noch unbekanntes Protein. Die Expression dieses Protein X wird dann nicht mehr reprimiert. Dieses Protein X wirkt als Aktivator für die Expression des Streptomycin-Regulatorgens *str*R. Dieses Genprodukt ist wiederum ein Aktivator für das Streptomycinoperon. Bei fast allen Streptomyceten wurden ebenfalls A-Faktor ähnliche Botenstoffe gefunden, die an der Regulation des sekundären Stoffwechsels beteiligt sind (Horinouchi et al., 1983). Die strukturelle Ähnlichkeit des Autoregulators bei *Vibrio fischeri*, der ab einer bestimmten Konzentration eine Biolumineszens auslöst, (Eberhard et al., 1986) und des Konjugationsfaktors bei *Agrobacterium tumefaciens*, der die Übertragung des Ti-Plasmids auf andere Zellen steuert, (Zhang et al., 1993) zeigt die Universalität dieser Molekülklasse als Regulator interzellulärer Kommunikation.

Neben der A-Faktor-abhängigen Regulation des Sekundärstoffwechsels wurde bei *Streptomyces coelicolor* ein weiteres Regulationssystem entdeckt. Mutationen in den *bld*-Genen (so genannt, weil die Kolonien ein kahles (engl.: bald) Aussehen haben) zeigen pleiotrope Effekte, die die Antibiotikaproduktion und die Luftmycelbildung

verhindern und Defekte in der Zell-Zell-Komunikation und der Kohlenstoff-Katabolit-Repression verursachen (Kelemen und Buttner, 1998). Auf Agarplatten mit Vollmedium können Mutanten in einer dieser *bld*-Gene kein SapB Peptid sekretieren, das notwendig ist, um ein Luftmycel auszubilden. Das hydrophobe Peptid lagert sich außen an die Zellwand der Hyphen an und hilft die Oberflächenspannung des wässrigen Milieus zu durchbrechen. Auf diese Weise trägt er zur Ausbildung des Luftmycels bei. Die dabei beteiligten *bld*-Gene codieren für Proteine, die direkt oder indirekt an der Generierung oder Perzeption von extrazellulären Signalen beteiligt sind. Bei der Regulation handelt es sich um eine hierarchische Signalkette. Es konnte gezeigt werden (Nodwell et al., 1996), daß Mutanten sich unidirektional komplementieren können, wenn sie in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander wuchsen. Mutanten, die in der Hierarchie höher stehen, können die Defekte aller niedrigeren Mutanten extrazellulär komplementieren. Auf Minimalmedien mit z. B. Mannit als Kohlenstoffquelle können die *bld*-Mutanten trotz der deregulierten Synthese von SapB Luftmycel ausbilden. Dies deutet darauf hin, daß der Sekundärmetabolismus zusätzlich über andere Regulationssysteme kontrolliert wird. Die Fähigkeit der *bld*-Mutanten auf Minimalmedium ein Luftmycel auszubilden spricht für eine Regulation, die über die Nährstoffversorgung gesteuert wird.

Die Verfügbarkeit und Versorgung der Zellen mit Nährstoffen ist bei vielen, wenn nicht bei allen Bakterien ein entscheidendes Signal zur Regulation des Stoffwechsels. In *Escherichia coli* ist das PTS-System beschrieben (Postma und Lengeler, 1985). Für *Bacillus subtilis* und *Enterococcus faecalis* wurde ebenfalls ein PTS-System beschrieben (Crutz et al., 1990, Deutscher et al., 1993, Reizer et al. 1993). Allerdings scheint der beim PTS-System modulierte cAMP-Spiegel bei den grampositiven Bakterien keine Rolle zu spielen (Botsford und Harman, 1992). Bei Streptomyceten konnte noch kein PTS-System gefunden werden (Hindle und Smith, 1994). Die Katabolit-Repression bei Streptomyceten ist noch nicht endgültig verstanden. Bei *Streptomyces coelicolor* wurde die Substratinduktion und die Katabolit-Repression des Glycerin-Operons genauer untersucht (Hindle und Smith, 1994). Eine zentrale Rolle spielt dabei das lösliche Enzym Glukosekinase und der intrazelluläre GTP-Spiegel. Andere Substrat-induzierbare/Glukose-reprimierbare Systeme, z. B. Agarase (Bibb et al. 1987), α-Amylase (Virolle und Bibb, 1988) oder Chitinase (Robbins et al., 1988) wurden untersucht, aber die regulierenden Gene konnten noch nicht identifiziert werden.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fiedler wurde ebenfalls die Induktion von Sekundärmetaboliten bei Streptomyceten untersucht. Brönneke (1994) konnte in diesem Zusammenhang zeigen, daß bei *Streptomyces globisporus* die *de novo* Synthese des Bakteriolysins Mutanolysin durch Zugabe von bakterieller Zellwand gesteigert werden konnte. Bei der Suche nach anderen hydrolysierenden Exoenzymen wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Strobel (1995) erkannt, daß Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* im Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus* lysiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, diesen Mechanismus der Lyse der Hefezellen näher zu untersuchen. Die dabei entdeckte Curdlanase wurde gereinigt und charakterisiert. Darüber hinaus sollte geklärt werden ob und auf welche Weise die Expression dieses Exoenzyms induziert werden kann. Eine rekombinante Produktion dieses Enzyms ermöglichte im Anschluß Untersuchungen zu Anwendungsmöglichkeiten in Medizin und Technik.

B Material und Methoden

1 Verwendete Mikroorganismen

Hauptgegenstand dieser Arbeit war *Streptomyces globisporus* subspecies *globisporus* ATCC 21553. Darüber hinaus wurden folgende Mikroorganismen benutzt:

Organismus	**Herkunft/Stammnummer**
Streptomyces coelicolor A3(2)	John Innes Foundation, Norwich, UK
Streptomyces coelicolor M145	John Innes Foundation, Norwich, UK
Streptomyces lividans	John Innes Foundation, Norwich, UK/TK 64
Streptomyces flavofuscus	DSM 19908
Streptomyces HZ1	Isolat von Zöller H. (1992), Stammsammlung von Prof. Dr. Fiedler (LMU, Institut für Genetik und Mikrobiologie)
Cellulomonas cellulans	DSM 43881 (früher *Oerskovia xanthineolytica*)
Escherichia coli DH5α	Stammsammlung von Prof. Dr. Böck (LMU, Institut für Genetik und Mikrobiologie)
Escherichia coli SURE	Stratagene
Escherichia coli TOP 10	Invitrogen
Escherichia coli LMG 194	Invitrogen
Saccharomyces cerevisiae	Backhefe der Firma Wieninger
Saccharomyces cerevisiae	Stammsammlung von Prof. Dr. Bandlow (LMU, Institut für Genetik und Mikrobiologie)
Schizosaccharomyces pombe	Stammsammlung von Prof. Dr. Bandlow (LMU, Institut für Genetik und Mikrobiologie)
Candida albicans	ATCC 18804 Stammsammlung von Prof. Dr. Scherer (Technische Universität München, Institut für Mikrobiologie)

Rhodotorula spec.	Stammsammlung von Prof. Dr. Fiedler (LMU, Institut für Genetik und Mikrobiologie)

2 Medien

Die verwendeten Zusätze für Medien und Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, von Oxoid, Sigma oder Merck bezogen. Als Wasser wurde immer deionisiertes Wasser verwendet. Zum Verfestigen der Medien wurde 1,2 % Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

2.1 Medien für Streptomyceten

2.1.1 Yokogawa (Yokogawa et al., 1995):

20,0 g Dextrin, 5,0 g Soja-Pepton, 2,0 g Bacto Pepton, 5,0 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O, 1,0 g NaCl, 1,0 g $MgSO_4$ x 7 H_2O, 0,2 g $CaCl_2$ x 2 H_2O ad 1 l H_2O; pH 7,5

2.1.2 DSM Medium 65:

4,0 g Glukose, 4,0 g Hefeextrakt, 10,0 g Malzextrakt, 2,0 g $CaCO_3$ ad 1 l H_2O; pH 7,2

2.1.3 NMMP (Hopwood et al., 1985):

2,5 g $(NH_4)_2SO_4$, 6,25 g Casaminoacids (Difco), 0,75 g $MgSO_4$ x 7 H_2O, 1,25 ml Minor element solution ($ZnSO_4$ x 7 H_2O, $FeSO_4$ x 7 H_2O, $MnCl_2$ x 2 H_2O, $CaCl_2$ je 1 g/l), 18,75 ml 0,1 M NaH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 6,8, 4 % Kohlenstoffquelle (Glycerin, Asparagin, Arabinose, lösliche Stärke, Mannit, Saccharose) ad 1 l H_2O

2.1.4 R2 (Okanishi et al., 1974; Hopwood und Wright, 1978):

103 g Saccharose, 0,25 g K_2SO_4, 10,12 g $MgCl_2$ x 6 H_2O, 10 g Glukose, 0,1 g Casaminoacids, 2 ml Spurenelementlösung (40 mg $ZnCl_2$, 200 mg $FeCl_3$ x 6 H_2O, 10 mg $CuCl_2$ x 2 H_2O, 10 mg $MnCl_2$ x 4 H_2O, 10 mg $Na_2B_4O_7$ x 10 H_2O, ad 1 l H_2O), 5 g Hefeextrakt, 100 ml TES-Puffer pH 7,2 ad 1 l H_2O

Jeweils 100 ml wurden in Erlenmeyerkolben mit 2,2 % Agar autoklaviert und bei 6°C aufbewahrt. Zum Gebrauch wurde der Agar frisch aufgeschmolzen und versetzt mit: 1 ml 0,5 % KH_2PO_4, 0,4 ml $CaCl_2$ x 2 H_2O, 1,5 ml 20 % L-Prolin, 0,7 ml 1 M NaOH. Nach Zugabe wurde das Medium sofort in Petrischalen gegossen.

2.1.5 YEME:

3,0 g Hefeextrakt, 5,0 g Pepton, 3,0 g Malzextrakt, 10,0 g Glukose, 270,0 g Saccharose ad 1 l H_2O; pH 7,2. Nach dem Autoklavieren wurden 2,0 ml 2,5 M $MgSO_4$ zugegeben.

2.1.6 Herstellen von RBB-Curdlan Agarplatten:

1. Schritt: NMMP-Glycerin Agar wurde autoklaviert und jeweils 10 ml in leere Petrischalen gegossen und auf Raumtemperatur abgekühlt.

2. Schritt: 300 ml NMMP ohne Kohlenstoffquelle, 7,5 g Agar und 75 ml RBB-Curdlan (dialysiert, um Azid zu entfernen) wurden getrennt autoklaviert; anschließend wurden die beiden Lösungen sofort vereinigt und gemischt.

3.Schritt: Jeweils 10 ml der frisch vereinigten Substanzen von Schritt 2 wurden auf die dünnen Platten von Schritt 1 gegossen.

2.2 Medien für Escherichia coli

2.2.1 LB (Luria Broth; DSM 381):

10,0 g Trypton, 5,0 g Hefeextrakt, 10,0 g NaCl ad 1 l H_2O; pH 7,5

2.2.2 RM (Invitrogen):

20 g Casaminoacids (Difco) gelöst in 890 ml H_2O; nach Autoklavieren 100 ml M9-Salze (6% Na_2HPO_4, 3% KH_2PO_4, 0,5% NaCl, 1% NH_4Cl; pH 7,4), 1,0 ml 1M $MgCl_2$, 0,2% Glukose (zur Reprimierung des Fremdgens) oder 0,2% Arabinose (zur Induktion des Fremdgens)

2.2.3 SOC (Invitrogen):

2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glukose

2.3 Medien für Hefen

2.3.1 YM (DSM 186):

3,0 g Hefextrakt, 3,0 g Malzextrakt, 5,0 g Pepton, 10,0 g Glukose ad 1 l H_2O

2.3.2 Methylenblauagar (modifiziert nach Stumm et al., 1977):

200 ml Natriumphosphat-Citrat-Puffer (200 ml 0,1 M NaH_2PO_4, 200 ml 0,1 M Na_2HPO_4, 127 ml 0,1 M Zitronensäure, pH ≅ 6,7), 260 mg Sabouraud Dextrose (Oxoid), 2 g Trypton, 4 g Agar wurden auf 100°C erhitzt, bis der Agar vollständig gelöst war. Beim Abkühlen wurden 6 mg Methylenblau und 10 ml steriles Glycerin zugegeben. Bei ca. 55°C wurden 15 ml Hefezellen (frische Kultur mit einer $OD_{580} \cong 2$) eingemischt.

3 Anzuchtbedingungen

3.1 Streptomyceten

3.1.1 Zur Stimulation von Exoenzymen:

Streptomyceten wurden in 10 ml NMMP-Glycerin-Medium angezogen. Die Anzucht erfolgte in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 30°C in einem Schüttler mit 150 U/min für 4 Tage. Zur Stimulation wurde dem Medium das Stimulationsagens (meist SDS-Zellwände von *Saccharomyces cerevisiae*) in unterschiedlicher Menge vor dem Autoklavieren zugegeben. Das Medium wurde mit Sporen beimpft.

3.1.2 Zur Präparation von Exoenzymen:

Streptomyceten wurden in 750 ml NMMP-Glycerin-Medium angezogen. Die Anzucht erfolgte in 5 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 30°C in einem Schüttler mit 150 U/min für 4 Tage. Zur Stimulation wurde dem Medium das Stimulationsagens in einer Konzentration von 5 mg/ml vor dem Autoklavieren zugegeben. Das Medium wurde mit Sporen beimpft.

Nach erfolgtem Wachstum wurde die Reinheit im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gekühlt und dann zentrifugiert (7.000 x g, 20 min, 10°C). Der Überstand wurde zur Abtrennung von Schaum und nicht sedimentierbarem Mycel durch einen Faltenfilter (Macherey & Nagel) gegossen. Die so gewonnene Enzymlösung, der Kulturüberstand, wurde entweder direkt eingesetzt oder bei Bedarf konzentriert (B.7.3.3).

3.1.3 Zur Präparation von genomischer DNA:

Die Streptomyceten wurden in 100 ml DSM Medium 65 angezogen. Die Anzucht erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben bei 30°C in einem Schüttler mit 150 U/min für 3

Tage. Das Medium wurde mit Sporen beimpft. Die Kultur wurde im Phasenkontrastmikroskop auf Reinheit überprüft. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (7.000 x g; 20 min; 6°C) geerntet.

3.2 Cellulomonas cellulans

Zur Präparation von Exoenzymen wurde dieser Stamm in 100 ml DSM Medium 65 mit 4% Stärke bei 30°C in 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 150 U/min über Nacht angezogen. Beimpft wurde mit Zellen von Platte. Nach erfolgtem Wachstum wurden die Zellen abzentrifugiert (2.000 x g; 15 min; 6°C) und der Überstand in ein neues Gefäß abgegossen.

3.3 Escherichia coli

3.3.1 Zur Präparation von Plasmiden:

Je nach benötigter Menge wurde der entsprechende Stamm in 5, 10, 100 oder 1000 ml LB-Medium, supplementiert mit 100 µg/ml geeignetem Antibiotikum, 16 h bei 37°C und 150 U/min geschüttelt. Beimpft wurde mit Zellen aus Kolonien einer Agarplatte mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens (Zahnstocher). Zur Erhöhung des Plasmidanteils (notwendig nur bei der Cosmid-Präparation) wurde bei einer OD_{580} von 0,6 - 0,8 170 µg/ml Chloramphenicol zugegeben und weitere 16 h inkubiert.

3.3.2 Zur Kontrolle der Transformation:

LB-Medium wurde mit 1,2 % Agar und nach dem Autoklavieren bei ca. 60°C mit 100 µg/ml geeignetem Antibiotikum versetzt. Wenn das Fremdgen unter der Kontrolle des *lac*–Promotors stand, wurden zusätzlich noch 40 µg/ml X-Gal und 0,16 mM IPTG zugegeben. Das Medium wurde in Petrischalen gegossen und nach dem Erkalten wurden 10 bis 100 µl Transformationsansatz ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

3.3.3 Zur Expression von Fremdprotein:

Die Stämme wurden in RM-Medium ohne Glukose, aber mit 0,2 % Arabinose (= induzierende Bedingungen) und 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C, 150 U/min für 16 h inkubiert. Angeimpft wurde mit Zellen aus Kolonien einer Agarplatte mit Hilfe von sterilen Holzstäbchen (Zahnstocher). Nach Wachstum wurden die Zellen auf Eis

abgekühlt und mittels Zentrifugation (3.000 x g; 5 min; 4°C) sedimentiert. Zur Weiterbehandlung wurden sie in geeignetem Puffer suspendiert.

3.3.4 Zur Herstellung kompetenter Zellen:

Für Elektroporation:

E. coli DH5α wurde in 10 ml LB Medium bei 37°C, 150 U/min über Nacht inkubiert. Mit 10 µl dieser Vorkultur wurden 0,5 l LB beimpft und anschließend bei 37°C und 150 U/min inkubiert. Bei einer optischen Dichte (gemessen bei λ=580 nm) von ca. 1 wurde die Kultur auf Eis bis auf ca. 4°C abgekühlt. Anschließend wurde sie bei 4°C zentrifugiert (3.000 x g; 5 min), die Zellen in 0,5 l 10% Glycerin (eiskalt) vorsichtig suspendiert und erneut zentrifugiert (3.000 x g; 5 min; 4°C). Nun wurden die Zellen zweimal in 30 ml 10% Glycerin (eiskalt) gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in geringstmöglichem Volumen in 10% Glycerin (eiskalt) suspendiert und in 40 µl Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese kompetenten Zellen konnten bei –70°C für 4 Wochen gelagert werden.

Für $CaCl_2$-Methode:

E. coli LMG194 wurde in 10 ml LB bei 37°C und 150 U/min über Nacht inkubiert. 10 µl dieser Vorkultur dienten als Inokulat für 0,4 l LB. Dieser Ansatz wurde ebenfalls bei 37°C und 150 U/min inkubiert. Bei einer optischen Dichte OD_{580} = 0,6 wurde die Kultur auf Eis abgekühlt, bei 3.000 x g 5 min zentrifugiert und in 40 ml eiskaltem $CaCl_2$-Puffer (60 mM $CaCl_2$, 15% Glycerin, 10 mM PIPES, pH = 7) vorsichtig suspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf gleiche Weise noch zweimal gewaschen und zuletzt in 4 ml wässriger $CaCl_2$–Lösung suspendiert. Bei –70°C wurden 250 µl Portionen eingefroren und maximal 4 Wochen gelagert.

3.4 Hefen:

Die Hefen wurden in 100 ml oder 1,5 l YM-Medium angezogen. Das Wachstum erfolgte in 500 ml bzw. 5 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 25°C schüttelnd (150 U/min) über Nacht.

4 Biochemische Methoden

4.1 Aufbrechen von Escherichia coli mit French Press

Frisch geerntete Zellen wurden in maximal 4 ml 0,1 M MES-Puffer pH 6,8 auf Eis suspendiert. Diese Zellsuspension wurde in der French Press einem Druck von 12.000 psi ausgesetzt. Durch vorsichtiges Öffnen des Auslaßventils wurde der Druck plötzlich abgelassen und dadurch die Zellen aufgebrochen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt, die Suspension wurde dabei klar. Im Phasenkontrastmikroskop wurde der Aufbruch kontrolliert. Die Zellbruchstücke wurden mittels Zentrifugation (4°C, 5.000 x g, 10 min) abgetrennt. Der Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet.

4.2 Präparation von SDS-Zellwänden

4.2.1 Zellaufschluß mit Glasperlen (Schleifer und Kandler, 1967)

Zur Präparation von Zellwänden wurden die Zellen mit Glasperlen (∅ 0,3 mm; Braun, Melsungen) und etwas $H_20_{bid.}$ vermischt, so daß ein dicker Brei entstand. Nach Zugabe je einer Spatelspitze DNase I und RNase (Boehringer/Roche, Mannheim) wurden die Zellen in einer Zellmühle (Bühler, Tübingen) 15 min unter Wasserkühlung aufgeschlossen. Der Zellaufschluß wurde im Phasenkontrastmikroskop überprüft. Nach komplettem Aufschluß wurde das Zellhomogenat mittels einer Fritte (Schott D 1) abgenutscht und die Zellwände aus dem Zellhomogenat mit einer Kühlzentrifuge (Sorvall, 48.000 x g, 20 min, 4°C) sedimentiert. Dieses Sediment wurde als Rohzellwand definiert.

4.2.2 Entfernung von Membranresten und nicht kovalent gebundenen Proteinen (Braun und Rehn, 1969).

Die Rohzellwand wurde in möglichst wenig Saline suspendiert und unter Rühren auf ca. 90°C erhitzt. Gleichzeitig wurde äquivoluminal 8% iges SDS ebenfalls bis zum Sieden erhitzt. Zellwände und SDS wurden dann in einem 1 l Erlenmeyerkolben vereinigt und 30 min am Siedepunkt unter ständigem Rühren inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Zellwände sedimentiert (20.000 x g; 10 min; 6°C) und lyophilisiert. Diese so erhaltenen Zellwände wurden als SDS-

Zellwände definiert. Die SDS-Zellwände von *Saccharomyces cerevisiae* werden im folgenden als SDS-HZW bezeichnet.

4.3 Hydrolysen

4.3.1 Milde saure Hydrolyse

2 mg getrockneter Probe (z.B. SDS-Zellwände) wurden in 200 µl 2 M HCl aufgenommen und 3 Stunden bei 100°C in einem zugeschmolzenen Glasröhrchen (Fiolax) hydrolysiert. Das Glasröhrchen wurde aufgebrochen und die Probe im Luftstrom getrocknet.

4.3.2 Totalhydrolyse

2 mg getrockneter Probe (z.B. SDS-Zellwände) wurden in 200 µl 4 M HCl aufgenommen und 16 h bei 100°C in zugeschmolzenen Glasröhrchen (Fiolax) hydrolysiert. Das Glasröhrchen wurde aufgebrochen und die Probe im Luftstrom getrocknet.

4.3.3 Hydrolyse mit Trifluoressigsäure

In Anlehnung an die Methode, wie sie von Hartland et al. (1996) beschrieben ist, wurden 100 mg SDS-Zellwände von *Saccharomyces cerevisiae* in 500 µl 2 M Trifluoressigsäure suspendiert und 15 min in zugeschmolzenen Glasröhrchen (Fiolax) bei 100°C inkubiert. Die überschüssige Säure wurde abgeblasen. Dadurch entstanden verschieden lange Glukanketten.

4.4 Probenaufbereitung für gaschromatographische Untersuchungen

4.4.1 Reduktion (Albersheim et al., 1967)

Eine trockene Probe (z.B. hydrolysierte Probe) wurde in 200 µl 1 M NH_4OH gelöst (pH > 7!) und mit 200 µl Natriumborhydrid (20 mg $NaBH_4$/ml 0,1 M NH_4OH) versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1-2 Tropfen Eisessig gestoppt. Es folgten drei Waschungen, wobei die Probe jeweils in 1 ml Methanol aufgenommen und anschließend im Luftstrom getrocknet wurde.

4.4.2 Acetylierung

Nach der Methode von Holligan und Drew (1971) wurde die trockene Probe in 300 µl Pyridin (wasserfrei)/Essigsäureanhydrid (1:1) gelöst und eine Stunde bei 60°C in

einem zugeschmolzenen Glasröhrchen im Dunkeln inkubiert. Nach Abkühlung wurde die Probe dreimal in Chloroform gewaschen. Im letzten Schritt wurde die Probe mit 1 ml Chloroform und 1 ml $H_2O_{bid.}$ versetzt, gut gemischt und zur Phasentrennung bei 1.000 x g 2 min zentrifugiert. Die Chloroformphase wurde vorsichtig abgenommen und im Luftstrom getrocknet.

4.4.3 Analyse

Aliquots der acetylierten Probe wurden – gelöst in Chloroform – in den Gaschromatographen (Packard, Modell 438 mit Flammenionisationsdetektor) injiziert. Die peracetylierten Alditole bzw Polyole wurden in einer 2 x 1.000 mm Glassäule, die mit 3% SP 2340 auf 100/200 Supelcoport (Supelco Inc.) gepackt war, aufgetrennt. Bei der Auftrennung wurde die Säule geheizt: Nach 2 min 140°C stieg die Temperatur mit einer Rate von 6°/min auf 270°C. Diese Temperatur wurde 3 min gehalten. Als Trägergas wurde N_2 5.0 mit einer Fließgeschwindigkeit von 15 ml/min durch die Säule geleitet. Als Brenngase dienten H_2 5.0 (15 ml/min) und synthetische Luft (200 ml/min). Die durch die Ionisierung der Alditole bzw. Polyole hervorgerufenen Spannungsänderungen und die Retentionszeiten wurden von einem Integrator (CR6A von Shimadzu) protokolliert. Durch Vergleich mit geeigneten Standards konnten die Alditole bzw. Polyole bestimmt und quantifiziert werden.

4.4.4 Bestimmung des Anteils von SDS-HZW am Trockengewicht von *Streptomyces globisporus*-Kulturen

Nach Wachstum einer mit SDS-HZW stimulierten Kultur von *Streptomyces globisporus* wurde die Kultur zentrifugiert (5.000 x g; 20 min; 6°C), das Sediment gefriergetrocknet und anschließend gewogen. Dies entspricht dem Gesamttrockengewicht. 2 mg dieses Lyophylisats wurden für die Gaschromatographie aufbereitet. Die festgestellte Menge an Glukose ist proportional zur SDS-HZW-Menge im Lyophylisat. Die Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* besteht zu ca. 47% aus Glukan.

4.5 Probenaufbereitung für den Aminosäurenanalysator (ASA)

2 mg Probe (z. B. SDS-Zellwände) wurde totalhydrolysiert. Dann wurde die getrocknete Probe in 1 ml Dilutionspuffer (4,8 g NaOH, 16,8 g NaCitrat, 8 ml $HCl_{konz.}$, 1 ml Phenol, 20 ml 25% wäßriger Thiodiethanol ad 1 l H_2O, pH 2,2) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf-Cap) überführt. Unlösliche Partikel

wurden abzentrifugiert (2.000 x g; 1 min). Die so aufbereitete Probe wurde in den Aminosäurenanalysator (Biotronic LC 6001) injiziert. Bei der automatischen Aminosäurenanalyse werden Aminosäuren und Aminozucker durch ein Kationenaustauschersystem unter Anstieg von pH, Ionenstärke und Temperatur aufgetrennt. Die apparativen Bedingungen dabei lauten:

Vorwaschsäule: Harz BTC F, 6 x 30 mm

Trennsäule: Trennharz BTC 2710, 4 x 210 mm

Pufferdurchflußrate: 20 ml/h

Ninhydrindurchflußrate: 20 ml/h

Temperatur: T_1: 48,8°C, T_2: 59,2°C, T_3: 64,5°C

Detektion: Absorption gemessen bei λ = 570 nm

Protokollierung: Integrator CR1A von Shimadzu

Die Identifizierung und Quantifizierung der Aminosäuren und Aminozucker erfolgte durch Vergleich mit geeigneten, quantitativen Standards.

4.6 Präparation für Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die zu untersuchenden Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (16.000 x g; 10 min; RT). Das Sediment wurde in 50 Volumen Fixans (2,5% Glutaraldehyd in 75 mM Cacodylat, pH 8,0) suspendiert und auf Eis gekühlt. Diese Präparate wurden von Prof. Dr. Wanner (Ludwig Maximilians Universität München, Institut für Botanik) weiterverarbeitet und fotografiert.

4.7 Proteinbestimmung

Es wurde der BCA Test der Firma Pierce (Produktnummer: 23225) verwendet. Dabei wird die Biuret-Reaktion (Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine) ausgenützt. Das reduzierte Kupferion wird von zwei Molekülen BCA (Bicinchoninsäure) komplexiert. Die Absorption dieses Komplexes wurde bei λ=562 nm gemessen. Als Standard wurde BSA oder IgG verwendet.

4.8 Gelelektrophorese

4.8.1 Auftrennung von DNA im Agarosegel

Agarose (Serva) wurde im $H_2O_{bid.}$ suspendiert (0,8% w/v) und im Mikrowellenofen geschmolzen, durch Zugabe von 1/50 Volumen 50xTAE (141 g Tris + 28,6 ml Essigsäure + 50 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 500 ml $H_2O_{bid.}$) leitfähig gemacht und in ein mit Ethanol gereinigtes Tablett gegossen. Die Taschen wurden durch Einsetzen eines Kammes erzeugt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in eine Pufferkammer gelegt, die mit TAE-Puffer befüllt wurde, bis das Gel gerade bedeckt war. Die DNA wurde mit Auftragspuffer (60% Saccharose, 0,1% Bromphenolblau, 100 mM EDTA) vermischt und in die Taschen pipettiert. Durch Anlegen von Strom (100 mA, 150 V) konnten DNA-Stücke nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die DNA wurde mit UV-Licht sichtbar gemacht, nachdem das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml $H_2O_{bid.}$) für drei Minuten inkubiert worden war.

4.8.2 Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamidgel

Proteine wurden nach der von Laemmli (1970) beschriebenen Methode mit 10% SDS-Polyacrylamidgelen (4% Sammelgel, 10% Trenngel) aufgetrennt. Zuvor wurden die Proben in Auftragspuffer (10% Glycerin, 2% SDS, 1% Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau) 5 min bei 95°C denaturiert.

4.9 Färbungen von Proteinen

4.9.1 Färbung mit Coomassie Blau R250B

Polyacrylamidgele wurden sofort nach Beendigung der Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld in der Färbelösung (1,6 g Coomassie Blau R250B, 415 ml Methanol, 415 ml $H_2O_{bid.}$, 170 ml Essigsäure) 20-30 min inkubiert. Zum Entfärben wurden die Gele in einer Methanol-Wasser-Essigsäure-Lösung (3:6:1) geschüttelt, bis der Hintergrund wieder entfärbt war. PVDF-Membranen (Porablot, Macherey & Nagel) wurden genauso behandelt, außer daß der Methanolanteil in beiden Lösungen auf 40% eingestellt war.

4.9.2 Färbung mit Silbernitrat

Ein Polyacrylamidgel wurde sofort nach Beendigung der Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld eine Stunde im Fixierer (50% Ethanol, 12% Essigsäure, 0,02% Formaldehyd) geschüttelt. Nach dreimaligem 20 min Waschen in 50% Ethanol wurde

das Gel mit Natriumthiosulfat (0,2 g/l) 1 min vorbehandelt, dreimal für 20 s mit $H_2O_{bid.}$ gewaschen und dann 20 min im Silberbad (2 g/l Silbernitrat, 750 µl/l 37% Formaldehyd in $H_2O_{bid.}$) inkubiert. Anschließend wurde das Gel wieder dreimal mit $H_2O_{bid.}$ gewaschen und dabei in eine neue Wanne überführt. Jetzt wurde das Gel solange im Entwickler (60 g/l Natriumcarbonat, 500 µl/l 37% Formaldehyd, 4 mg/l Natriumthiosulfat) inkubiert (5-20 s), bis die ersten Banden sichtbar wurden. Sofort wurde das Gel mit $H_2O_{bid.}$ gewaschen und für 10 min im Stoppbad (50% Ethanol, 12 % Essigsäure) geschwenkt. Abschließend wurde das Gel 20 min in 50% Ethanol gewaschen.

4.10 Aktivitätstests zum Nachweis der Glukanase

4.10.1 Qualitativer, turbidimetrischer Test:

Enzymlösung wurde in einer 1,5 ml Küvette mit 0,1 M MES pH 6,7 auf 900 µl verdünnt. Als Substrat pipettierte man - wenn nicht anders angegeben - 100 µl mit Ultraschallhomogenisator (B.7.2) fein suspendierte SDS-Zellwände von *Saccharomyces cerevisiae* (9 mg/ml). Die Küvette wurde mit Parafilm verschlossen und in der Hand geschüttelt. Dies war Zeitpunkt t = 0. Es folgte eine Inkubation von meist drei Stunden bei 37°C, wobei während der ersten Stunde alle 10 min, anschließend alle 30 min die optische Dichte bei λ = 580 nm im Spektralphotometer (Kontron) gemessen wurde. Unmittelbar vor jeder Messung mußte die Küvette kurz geschüttelt werden, da das Substrat zwischen den Meßzeitpunkten sedimentierte. Die Abnahme der optischen Dichte war ein Maß für die Hydrolyse des β-(1,3)-Glukans und somit für die Aktivität der Curdlanase.

4.10.2 Quantitativer, enzymatischer Test (leicht verändert nach Boehringer/Roche):

Um die Menge an während der Inkubationszeit des turbidimetrischen Tests freigesetzter Glukose exakt zu bestimmen, wurden zum Zeitpunkt t=0 min und t=180 min 100 µl des Reaktionsansatzes entnommen. Die Probe t=0 wurde bis zur Messung bei 6°C zwischengelagert.

In einer 1,5 ml Küvette wurden 890 µl Puffer (0,75 M Triethanolamin, 10 mM $MgSO_4$; pH 7,6), 100 µl 11,5 mM NADP, 100 µl 81 mM ATP und 100 µl Probe zusammenpipettiert, mit Parafilm abgedeckt, durchmischt und bei einer Wellenlänge von 340 nm im Spektralphotometer gemessen. Dies entspricht dem Nullwert (E_0). Zu diesem Ansatz wurden 10 µl einer Lösung von Hexokinase und Glukose-6-phosphat-

Dehydrogenase (HK/G6P-DH: 2 mg HK/ml + 1 mg G6P-DH/ml; Boehringer/Roche) zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min wurde erneut gemessen (E_G). In der Zeit phosphoryliert die Hexokinase vorhandene Glukose zu Glukose-6-phosphat, welches mit Hilfe von G6P-DH zu Glukonat-6-phosphat oxidiert wird. Die Subtraktion $E_G - E_0$ liefert ein Maß für die dabei entstandene $NADPH_2$-Menge. Sie ist direkt proportional zur in der Probe vorhandenen Glukose. Die Formel zur Berechnung lautet:

$$c = \frac{V \times MG}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E = 0{,}343 \times \Delta E \ \text{[g Glukose / l Probenlösung]}$$

Formel: Berechnung der Glukosekonzentration im Reaktionsansatz

V = Testvolumen; MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz; ε = Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm (=6,3); d = Schichtdicke der Küvette [cm]; v = Probenvolumen; c = Konzentration der Glukose; ΔE = Differenz der gemessenen Extinktionswerte $E_G - E_0$

4.10.3 Agarose Lyse Tests

Das Durchmustern von vielen verschiedenen Polymeren erfolgte mittels eines Lysetests auf Objektträgern. Die untersuchten Polymere wurden in Agarose einpolymerisiert. War die Trübung der Agarose durch die unlöslichen Polymere nicht stark genug, wurden gefärbte Polymere eingesetzt (Remazol Brillant Blau oder Violett; Loewe). Dazu wurden Suspensionen verschiedener Polymere zusammen mit 2 %-iger Agarose aufgeschmolzen und jeweils 4 ml auf einen Objektträger mittels Pasteurpipette aufgebracht. In die erstarrte Agarose wurden mit einem an eine Vakuumpumpe angeschlossenem Stahlrohr in regelmäßigen Abständen 3-5 Löcher (∅=2,5 mm) ausgestanzt. In diese Brunnen wurden dann 10 µl Enzymlösung einpipettiert. Die fertigen Objektträger wurden bei 37°C in einer feuchten Kammer, einer festschließenden Plastikschüssel, inkubiert. Zum Schutz vor Kontamination war diese mit 70 % Ethanol angefeuchtetem Filterpapier ausgelegt. Während der Inkubationszeit diffundieren die Enzyme 2-4 mm weit in die Agarose und lysieren dort die eingebetteten Polymere. Nach 12-48 h wurde die Aufklarung des trüben Polymers rund um einen Brunnen vermessen.

4.10.4 Zymogramm: „Curdlanblot“

Bei diesem Verfahren wurde die Renaturierungsfähigkeit der Curdlanase ausgenützt. Proteinlösungen wurden normal (Inkubation mit SDS-Probenpuffer allerdings bei 37°C) im SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf ein Curdlangel geblottet. Das Curdlangel wurde wie andere Polyacrylamidgele gegossen, allerdings mit zwei Unterschieden: 1. ohne Sammelgel; 2. statt 1 mm Dicke nur 0,6 mm, zur Konzentrierung der Proteine und damit präziseren und schärferen Erkennung der lytischen Banden. Der Aufbau der Blotkammer ist in Abb. 2 dargestellt.

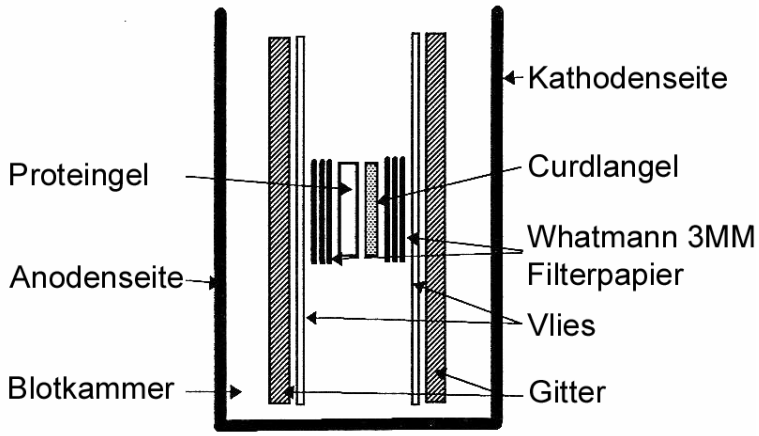


Abbildung 2: Schema einer Blotkammer
Dargestellt ist der Aufbau einer Blotkammer für den „Curdlanblot“. Beim Westernblot wurde statt des Curdlangels eine PVDF-Membran (Porablot, Macherey & Nagel) eingesetzt.

Diese Blotkammer wurde mit einem nativen Blotpuffer (200 mM Glycin; 25 mM Tris/HCl; pH 6,7) gefüllt. Bei 6°C, 30 V, 500 mA wurden die Proteine 20 min geblottet. Dabei wurden ca. 75% der Proteine zwischen 50 kDa und 80 kDa aus dem Proteingel in bzw. durch das Curdlangel geblottet. Dies ergaben Vergleiche von geblotteten mit nicht geblotteten Gelen. Das Curdlangel wurde in 0,1 M MES-Puffer pH 6,8 bei 37°C inkubiert. Nach 30-300 min konnten entfärbte Bereiche detektiert werden. Diese Bereiche wurden lytische Banden genannt und dienten als Nachweis für das Vorhandensein von Curdlanase.

4.11 Westernblot

Um Proteine auf eine PVDF-Membran (Porablot, Macherey & Nagel) zu blotten wurde dieselbe Kammer verwendet wie oben dargestellt. Statt des Curdlangels wurde die PVDF-Membran eingelegt. Diese wurde zuvor in Methanol benetzbar gemacht und anschließend bis zum Einsatz im Blotpuffer äquilibriert. Der Blotpuffer bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol und 0,1% SDS. Der pH

wurde nicht eingestellt und betrug ca. 8,1. Die Blotbedingungen waren: 6°C, 60 V, 2 h, die Stromstärke stieg dabei von 250 mA auf 450 mA. Nach dem Blot wurde die Membran eine Stunde mit 10%-iger Magermilch in TBS abgesättigt. Danach wurde die Membran für die Detektion mit Antikörpern oder mit einem Nickel-Nitriloessigsäure-Konjugat weiterbehandelt.

4.11.1 Detektion mit Antikörpern

Nach der Absättigung erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (5% Magermilch in TBS (0,1 M Tris, 0,9% NaCl, pH 7,4) + 20 µl Antiserum) für mindestens vier Stunden. Nach 5 mal 5 minütigem Waschen mit Tween/TBS (TBS, 1% Tween 20) wurde die Membran drei Stunden mit dem sekundären Antikörper (5% Magermilch in TBS + 10 µl α-Ratte-POD (Antikörper gegen Ratten-IgG, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase) inkubiert. Die Umsetzung erfolgte entweder mit Diaminobenzidin oder mit Luminol. Letzteres ist empfindlicher, die Schwärzung auf dem Röntgenfilm ist dauerhaft und die Membran kann zur Kontrolle z.B. mit Coomassie gefärbt werden.

4.11.2 Detektion mit dem Nickel-Nitriloessigsäure-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Ni-NTA-HRP; Qiagen)

Voraussetzung für diese Methode sind zugängliche, direkt benachbarte Histidine im Protein. Das 31 kDa Protein der bei SDS-PAGE verwendeten Größenstandards ist eine Carboanhydrase. Dieses Enzym hat vier benachbarte Histidinreste und kann deshalb als Positivkontrolle für das Funktionieren dieser Methode verwendet werden. Die Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) besetzt vier der sechs Ligandenbindungsstellen des Nickelkations (Ni^{2+}). Damit bleiben zwei Bindestellen frei, an die benachbarte Histidine gut koordinieren können. Gleichzeitig ist die verwendete Ni-NTA mit der Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Dies macht eine Detektion mit Diaminobenzidin möglich. Chemolumineszenz-Substrate sind laut Hersteller weniger gut geeignet.

Nach dem Westernblot und der Absättigung mit Magermilch wurde die Membran dreimal für 10 min mit Tween/TBS gewaschen. Dann erfolgte eine einstündige Inkubation mit einer 1.000-fach verdünnten Stammlösung des Ni-NTA-HRP Konjugats in Tween/TBS. Nach Waschen mit Tween/TBS (3 mal 5 Minuten) erfolgte die Umsetzung mit Diaminobenzidin.

4.11.3 Umsetzung mit Diaminobenzidin

Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran 5 mal 5 min in 25 ml Tween/TBS gewaschen. Währenddessen wurden 25 mg Diaminobenzidin in 50 ml $H_2O_{bid.}$ mit 0,1% Triton X100 gelöst. Als Katalysator wurden 10–40 µl 30%-iger H_2O_2 dazugegeben. In dieser Lösung wurde die Membran bis zur deutlichen Bräunung der Banden inkubiert (5–20 min). Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Membran mit H_2O gespült wurde. Schwache Banden wurden erst beim Trocknen der Membran sichtbar.

4.11.4 Umsetzung mit Luminol

Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran 3 mal 10 min in 25 ml Tween/TBS gewaschen. Währenddessen wurde eine Chemolumineszenzlösung aus 10 ml Lösung 1 (100 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,5 + 1 Aliquot Luminol-Lsg. (Luminol-Lösung: 0,44 g Luminol in 10 ml DMSO; gelagert als 1 ml Aliquots bei -20°C) + 1 Aliquot para-Cumarsäure (Para-Cumarsäure: 0,15 g in 10 ml DMSO; gelagert als 0,44 µl Aliquots bei -20°C)) + 10 ml Lösung 2 (100 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,5, 60 µl H_2O_2) in einem dunklen Gefäß gemischt. In der Dunkelkammer wurde als erstes Entwickler-, Stop- und Fixierbad (Standardlösungen zur Entwicklung von Röntgenfilmen) hergerichtet, Klarsichtfolie zurechtgelegt und Röntgenfilm zurechtgeschnitten. Die gewaschene Membran wurde mit fertiger Chemolumineszenzlösung überschichtet und 1 min geschüttelt. Die Membran wurde auf eine saubere Platte gelegt, mit Klarsichtfolie abgedeckt und darauf der Röntgenfilm gelegt. Die Expositionsdauer betrug ca. 10 s bis 5 min (je nach der Intensität der Lumineszenz). Der so belichtete Film wurde sofort in das Entwicklerbad getaucht und ca. 1 min darin geschüttelt, dann kurz durch das Stopbad gezogen und für 5 min im Fixierbad hin und her bewegt. Anschließend wurde der Film 5 min im Wasserbad gewaschen und daraufhin getrocknet.

4.12 Neutralzuckerbestimmung (Dubois et al., 1956)

Alle Klassen von Zuckern und Zuckerderivaten können im Bereich von 10 nmol bis 10 µmol mit dieser Methode detektiert werden. Zu 200 µl Probe wurden 200 µl 5% Phenol (w/v in H_2O) pipettiert. Nun wurde 1 ml konzentrierter Schwefelsäure dazugegeben und sofort gründlich auf einem Vortex gemischt. Die dabei

entstehende rot-orange Färbung wurde bei λ=490 nm im Spektralphotometer (Kontron) gemessen. Als Standard wurde Glukose eingesetzt.

5 Chromatographische Methoden

5.1 Dünnschichtchromatographie (Lewis und Smith, 1967)

Die Auftrennung der Hydrolyseprodukte von Curdlan mit 2 M Trifluoressigsäure bzw. von Hefezellwand mit Curdlanase erfolgte auf Kieselgel 60-Platten (Merck). Dazu wurden die löslichen Hydrolyseprodukte in der SpeedVac getrocknet oder lyophilisiert und in 10 µl $H_2O_{bid.}$ gelöst. Die Proben wurden mit Hilfe einer Glaskapillare tropfenweise auf einer Grundlinie aufgetragen. Als Standard wurden 10 µl einer 27 mM Glukoselösung eingesetzt. Die Platte wurde zweimal im Laufmittel Pyridin/Ethylacetat/Eisessig/H_2O im Verhältnis 5:5:1:3 (v/v) entwickelt. Die erste Auftrennung dauerte 6 Stunden, die zweite 3 Stunden. Dazwischen war die Platte getrocknet worden. Die Detektion erfolgte durch Aufsprühen von 1%-igem Phenol in Schwefelsäure und anschließender Veraschung im Trockenschrank (100°C, 10-20 min).

5.2 Konventionelle Chromatographie

5.2.1 Gelfiltration mit Biogel P4 (Bio-Rad)

Die Hydrolyseprodukte von Curdlan (B.4.3.3) wurden nach ihrer Größe über eine Biogel P4-Säule getrennt. Das Gelbett war 115 cm lang und der Durchmesser betrug 1,6 cm. Die Fließgeschwindigkeit wurde auf 0,4 ml/min eingestellt (Econopumpe, Bio-Rad). Als Laufmittel wurde $H_2O_{bid.}$ verwendet. Die gesammelten 3 ml-Fraktionen wurden lyophilisiert und der Neutralzuckergehalt bestimmt.

5.2.2 Affinitätschromatographie mit Protein G Sepharose fast flow (Pharmacia)

Zur Reinigung der Antikörper der Klasse IgG wurden 500 µl des gewonnenen Antiserums (B.7.5) zentrifugiert (16.000 x g, 10 min, 6°C) und der Überstand mit 250 µl Puffer A (20 mM Natriumphosphat pH 7,2) vermischt. Diese Probe wurde auf die Protein G Sepharose fast flow Säule aufgetragen. Die Säule wurde solange mit Puffer A gespült (Econopumpe, Bio-Rad: 0,8 ml/min) bis die Extinktion des Durchlaufs (gemessen bei 280 nm) wieder auf den Ausgangswert zurückging. In diesem Durchlauf befanden sich Antikörper der Klasse IgM und Serumproteine. Die

an Protein G gebundenen Antikörper der Klasse IgG wurden anschließend mit Puffer B (0,1 M Glycin/HCl pH 2,7) eluiert. Durch Vorlage von 1M Tris pH 9,0 im Sammelgefäß wurde das Eluat sofort neutralisiert, um die Antikörper zu stabilisieren. Mittels Ultrafiltration mit Nanosep 50 K (B.7.3.1) wurden die Antikörper der Klasse IgG auf 50 µl konzentriert, entsalzt und in Puffer A überführt.

5.2.3 Affinitätschromatographie mit Sepharose Chelating Säule (Pharmacia)

Die Sepharose Chelating Säule wurde nach Angaben des Herstellers –wenn nicht anders angegeben- mit Ni^{2+}-Ionen beladen. Zur Aufreinigung von Proteinen wurde die Säule in das Econo-System (Bio-Rad) eingebaut. Das System bestand aus einer peristaltischen Pumpe, die auf eine Leistung von 6 ml/min eingestellt wurde, einem Photometer (Detektionswellenlänge 280 nm) und einem externen Schreiber (LKB). Die Chromatographie wurde bei 6°C durchgeführt.

Zur Reinigung der heterolog exprimierten, mit Histidin markierten Curdlanase wurden 50 µl (= 0,5 mg Gesamtprotein) des Rohextraktes einer 100 ml Kultur mit 450 µl Auftragspuffer (25 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 25 mM Tris/HCl pH 7,5) verdünnt und auf eine 5 ml Sepharose Chelating Säule (Pharmacia) aufgetragen. Die Säule wurde solange mit Auftragspuffer gewaschen (10 Säulenvolumina), bis die gemessene Extinktion wieder auf den Ausgangswert gesunken war. Die ersten und die letzten 500 µl des sogenannten Durchlaufes wurden gesammelt. Die angebundenen Proteine wurden mit 5 ml Elutionspuffer (entspricht Auftragspuffer, enthält aber 0,5 M Imidazol) von der Säule eluiert, gesammelt und mittels Ultrafiltration entsalzt und konzentriert (B.7.3.1).

5.3 Hochleistungs-Flüssigkeits Chromatographie (HPLC)

Die verwendete HPLC Anlage von LKB bestand aus der Doppelkopfpumpe LKB 2150, dem Photometer LKB 2151, der Steuereinheit LKB 2152 und der Begasungseinheit LKB 21556 (die Puffer wurden mit He 4.6 begast).

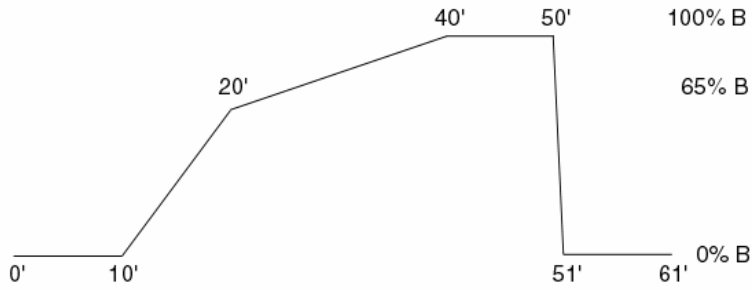
5.3.1 Gelfiltration mit Superdex 200 Säulen (Pharmacia)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer apparenten Größe wurden zwei verschiedene Säulen benutzt: Superdex 200 HiLoad und Superdex 200 HR30/10. Die Superdex 200 HiLoad eignet sich für präparative Zwecke. Sie ist gepackt mit Partikeln einer Größe von ∅=13 µm. Das Gelbett ist 100 cm lang und mißt im

Durchmesser 16 mm. Dadurch kann man die Säule mit mehr Probenmaterial beladen und höhere Fließgeschwindigkeiten (1ml/min) benutzen als bei der HR30/10 (0,5 ml/min). Die zweite Säule Superdex 200 HR30/10 ist mit Partikeln der Größe ∅=9 µm gepackt. Die Gelbettdimensionen sind 30 cm Länge bei einem Durchmesser von 10 mm. Diese Säule trennt wesentlich genauer als die HiLoad und eignet sich deshalb für analytische Zwecke. Als Puffer (eisgekühlt) wurde für beide Säulen 0,15 M Kaliumphosphat pH 6,8 verwendet. Die eluierenden Proteine wurden getrennt nach Absorptionsmaxima manuell in Eis stehenden, sterilen Glasgefäßen gesammelt.

5.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie mit TSK 5PW (TosoHaas)

Die Auftrennung der Proteine auf Grund ihrer unterschiedlichen hydrophoben Eigenschaften bzw. Oberflächen wurde mit der TSK 5PW Säule von TosoHaas durchgeführt. Die Matrix der Säule besteht aus Phenylsepharose. Die Säule wurde mit Puffer A (0,1 M Natriumphosphat, 1,5 M Ammoniumsulfat, pH 6,0) äquilibriert. Proteine, die unter diesen Bedingungen an die Säule binden, wurden mit abnehmender Ammoniumsulfatkonzentration eluiert. Um dies zu erreichen, wurde der Anteil von Puffer B (0,1 M Natriumphosphat, pH 6,0) am Laufmittel erhöht. Die Steuereinheit wurde dazu mit folgendem Gradienten programmiert:



Der Gradient war so eingestellt, daß die Ammoniumsulfatkonzentration der Fraktion, die Curdlanase-Aktivität aufwies, sehr niedrig war. Dies hatte den Vorteil, daß die nachfolgende Entsalzung und Konzentrierung mit Macrosep 10K (B.7.3.1) sehr schnell durchgeführt werden konnte.

6 Molekularbiologische Methoden

6.1 Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie DNA-Präzipitation, Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen, Ligation, Elution von DNA aus Agarosegelen und Dephosphorylierung von DNA wurden nach Sambrook et al. (1989) und Ausubel et al. (1997) durchgeführt. Die verwendeten Enzyme stammten von Boehringer/Roche und MBI und wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet.

6.2 Isolierung genomischer DNA aus Streptomyces globisporus

Es wurde die Methode von Pospiech und Neumann (1995) angewandt. Zum Zeitpunkt der Zellernte befanden sich die Zellen am Beginn der stationären Phase (bei Reinheitskontrolle unter dem Phasenkontrastmikroskop waren die ersten Sporen zu sehen). Nach der Zellernte in einer Kühlzentrifuge und einmaligem Waschen in Saline (0,9% NaCl) wurden die Zellen mit eiskaltem Aceton nachgewaschen (Kutchma, 1997) und 5 min auf Eis gestellt. Das Aceton wurde vorsichtig abgeblasen. Nun wurden die Zellen in SET-Puffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris pH 7,5) suspendiert und eine Stunde mit Lysozym (10 mg/ml) bei 37°C inkubiert. Nach 30 min wurde DNase-freie RNase (200 µg/ml) zugegeben. Es folgte eine dreistündige Proteinase K-Behandlung (0,5 mg/ml, 1% SDS) bei 55°C. Nicht lysierte Zellaggregationen wurden abzentrifugiert (3.000 x g, 5 min, RT) und der Überstand vorsichtig in ein steriles SS34-Rörchen überführt. Das Zelllysat wurde mit 5 M NaCl auf 1,25 M NaCl eingestellt. Anschließend wurden 5 ml Chloroform zugegeben und der Ansatz 30 min vorsichtig gemischt. Nach einer kurzen Zentrifugation zur Phasentrennung (2.500 x g, 10 min, RT) wurde die DNA-beinhaltende wäßrige Phase vorsichtig abgenommen, mit 0,6 Vol Isopropanol versetzt und vorsichtig gemischt. Nach 3 min wurde die DNA mit einer zugeschmolzenen Pasteurpipette aufgespult und in 70%-igem Ethanol gewaschen. Die nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten in der Sterilbank. Dort wurde die aufgespulte DNA im Laminarluftstrom angetrocknet, bis das Ethanol verdunstet war. Als letztes wurde die DNA in 2 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,95) bei 55°C gelöst. Zur Kontrolle und Quantifizierung wurden 5, 10 und 20 µl in einem 0,8%-igem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid (5 µg/ml) inkubiert und unter

UV-Licht fotografiert. Anhand eines mitgeführten Standards konnte die Menge abgeschätzt werden.

6.3 Dichtegradientenzentrifugation (Sambrook et al., 1989)

Zur Herstellung des Dichtegradienten wurden sukzessive 2 ml 40%-ige, 32,5%-ige, 25%-ige, 17,5%-ige, und 10%-ige Saccharose (gelöst in STE-Puffer: 1 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0) in einem 17 ml Zentrifugenröhrchen eingefroren. Auf diese gefrorenen Saccharoseschichten wurde die vorbehandelte DNA pipettiert. 0,3 mg genomische DNA war mit dem Restriktionsenzym Sau3A (30 Units, 2min, 37°C in 600µl Sau3A-Puffer (Boehringer/Roche)) inkubiert worden. Nach einer Hitzeinaktivierung des Enzyms (10 min, 65°C) wurde die DNA mit Ethanol gefällt und in 100 µl TE-Puffer gelöst. Kurz vor dem Auftragen auf den Saccharose-Gradienten wurde die DNA für 5 min bei 65°C inkubiert (zur Auflösung etwaiger Aggregate). Die Auftrennung der verschieden langen DNA-Abschnitte erfolgte mittels Zentrifugation in einem Swing-out-Rotor (DuPont AH 627) für 24 h bei 20°C und 27.000 U/min. Dabei taut die Saccharose auf, der Dichtegradient bildet sich aus und die DNA-Abschnitte ordnen sich entsprechend ihrer Länge im Gradienten an. Nach der Zentrifugation wurde vorsichtig von oben nach unten 0,5 ml Fraktionen mit einer abgeschrägten Spitze herauspipettiert. 10 µl Aliquots dieser Fraktionen wurden in einem 0,8%-igen Agarosegel auf DNA-Gehalt und Größe untersucht. Die Fraktionen mit DNA-Längen von 500 bp bis 2 kbp wurden getrennt gefällt und in TE-Puffer gelöst.

6.4 Southernblot (Sambrook et al., 1989)

DNA-Proben wurden in einem 0,8%-igen Agarosegel aufgetrennt. Dann wurde das Gel in 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH 45 min bei RT inkubiert und damit die DNA denaturiert. Anschließend wurde das Gel kurz mit H_2O gespült und 30 min in 1 M Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,4 mit mehrmaligem Pufferwechsel neutralisiert. Währenddessen wurde die Blotapparatur aufgebaut: Ein Plexiglasquader wurde mit 3MM Filterpapier (Whatman) umwickelt und in ein Tablett gelegt. Dieses Tablett wurde mit 10xSSC-Puffer (1xSSC: 150 mM NaCl, 15 mM Trinatriumcitrat, pH 7,0) bis knapp unter die Oberkante des Quaders gefüllt. Das neutralisierte und markierte Agarosegel wurde auf dem 3MM Filterpapier zentriert und mit einer Lage gefenstertem Parafilm (das Fenster war um 1 cm kürzer und weniger breit als das Agarosegel) abgedeckt. Der Parafilm stellt eine Diffusionsbarriere für den Puffer dar.

Somit war sichergestellt, daß der Puffer durch das Agarosegel diffundieren muß. In dieses Fenster wurde die in SSC-Puffer eingeweichte, auf die Größe des Fensters zurechtgeschnittene und auf die gleiche Weise wie das Agarosegel markierte Nylonmembran gelegt. Jetzt wurde die Membran mit 2 Lagen in SSC-Puffer angefeuchtetem 3MM Filterpapier abgedeckt. Besondere Vorsicht galt dem Vermeiden von Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen. Darauf kamen mehrere Schichten Saugpapier, die wiederum beschwert wurden. Kapillarkräfte sorgen dafür, daß der SSC-Puffer vom Tablett durch das Agarosegel und die Nylonmembran ins Saugpapier gezogen wird. Dabei wird die DNA mittransportiert und lagert sich an der Nylonmembran an, da sie diese nicht durchdringen kann. Dieser Vorgang dauert mehrere Stunden, deshalb wurde die Apparatur über Nacht stehengelassen. Nach dem Blotten wurde die Nylonmembran kurz in 6xSSC-Puffer gewaschen und auf 3MM Filterpapier 20 min bei 80°C getrocknet. Die DNA wurde anschließend mit energiereichem UV-Licht (Biometra UV-Crosslinker) fixiert.

Die so mit DNA beladene Nylonmembran wurde anschließend mit 5 ml 5x Denhardt-Lösung (1xDenhardt-Lösung: 20 mg Ficoll, 20 mg Polyvinylpyrrolidon, 20 mg BSA, ad 100 ml H_2O) und 5 ml ultraschallbehandelter Heringssperma-DNA (suspendiert in Prähybridisierungspuffer: 6xSSC, 0,4% SDS, 20 mM NaH_2PO_4), beides auf 50°C vorgewärmt, für 2,5 h bei 50,3°C im Hybridisierungsofen drehend inkubiert. Diese Temperatur liegt 10° unter der Schmelztemperatur des Primers. Die Hybridisierung erfolgte dann über Nacht im gleichen Puffer, dem nur der frisch radioaktiv markierte (B.6.5), gereinigte Primer dazupipettiert wurde. Nach der Hybridisierung wurde die Nylonmembran solange mit Prähybridisierungspuffer gewaschen (10 min Inkubation bei 40,3°C (= T_m - 20°), bis im Waschpuffer keine Radioaktivität mehr nachweisbar war. Die gewaschene Nylonmembran wurde in Frischhaltefolie gewickelt und zur Kontrolle, ob die Hybridisierung erfolgreich war, mit einem Zählrohr auf Radioaktivität überprüft. Die radioaktive Nylonmembran wurde auf einen Röntgenfilm gelegt und zusammen mit Verstärkerfolien in eine Kassette gespannt. Der Röngtenfilm wurde dann 40 h bei –70°C exponiert. Zuletzt wurde der Film in der Dunkelkammer entwickelt.

6.5 Markierung von DNA-Oligomeren mit [γ-^{32}P]ATP

Für Southernblot-Analysen wurde der int1-Primer (C.6.1) in folgendem Ansatz radioaktiv markiert: 1 µl int1 (≡3 µmol/µl, 4 µl [γ-^{32}P]ATP (6000 Ci/mmol), 12,4 µl H_2O,

0,8 µl T4 Polynukleotidkinase (Roche), 2 µl PNK-Puffer (Roche)). Dieser Ansatz wurde zunächst 45 min bei 37°C, anschließend 10 min bei 68°C inkubiert. Zur Entfernung des verbliebenen [γ-^{32}P]ATP wurde der markierte Primer mit einer Gelfiltrationssäule (1 ml, P 10, Bio-Rad) gereinigt. Bei einer Zentrifugation von 2 min bei 2.000 x g eluiert der markierte Primer, das [γ-^{32}P]ATP verbleibt auf der Säule.

6.6 DNA-Sequenzierung

Plasmide mit Fremd-DNA wurden nach der Methode von Holmes und Quigley (1981) oder mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit von Roche isoliert. Die DyeTerminator Cycle-Sequenzierung mit AmpliTaq®FS erfordert den Einbau von fluoreszensmarkierten Nukleotiden (Prober et al., 1987). Dies geschah mit Hilfe eines PCR-Ansatzes, bei dem zu dem fertigen Premix 1 µg Plasmid-DNA, 10 pmol geeigneter Primer und $H_2O_{bid.}$ (Endvolumen 20 µl) zugegeben wurden. Nach 25 Zyklen im Thermocycler (10 s, 95°C (Aufschmelzen der DNA), 5 s, 60°C (Anlagern von Primern an Einzelstrang-DNA), 4 min, 60°C (Transkribierung)) wurden die amplifizierten DNA-Fragmente durch Fällung gereinigt, in 4 µl Probenpuffer (5 Teile Formamid + 1 Teil 25 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und davon 2 µl auf das Gel aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit ABI Prism™377 DNA Sequenzer Automat von Applied Biosystems/Perkin Elmer.

6.7 Transformation von Escherichia coli

6.7.1 Elektroporation:

DH5α-Zellen wurden mittels Elektroporation transformiert. Die Transformation erfolgte in sogenannten EPO-Küvetten (Bio-Rad). Auf Eis aufgetaute kompetente Zellen wurden in einer EPO-Küvette mit 5-10 ng Plasmid-DNA 5 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Elektropuls von 5-10 ms bei 2 kV bei 800 Ω und 25 µF ausgesetzt (Elektroporator, Bio-Rad). Diese Zellsuspension wurde in 0,5 ml doppeltkonzentriertem LB-Medium (B.2.2.1) 30 min bei 37°C im schnell drehenden Rollodrum inkubiert (Phänotypische Expression zur Etablierung der Antibiotikumresistenz). Diese präinkubierte Suspension wurde in geeigneten Verdünnungen auf LB-Agar (supplementiert mit 100 µg Ampicillin pro ml Medium) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien zur Bewertung der Effizienz ausgezählt.

6.7.2 $CaCl_2$-Methode:

LMG194-Zellen wurden mit der $CaCl_2$-Methode transformiert. Bei dieser Methode werden die Zellen durch Anlagern von $CaCl_2$ aufnahmebereit gemacht.

Zur Transformation wurden 100 µl auf Eis aufgetauter, kompetenter Zellen zum Ligationsansatz (1 µl TOPO-Vektor (C.7.2.3), 4 µl $H_2O_{bid.}$) pipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 2 min bei 42°C und erneute Abkühlung auf Eis. Zur phänotypischen Expression wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und dieser Ansatz 1 h bei 37°C und guter Sauerstoffversorgung inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen in geeigneten Verdünnungen auf LB-Agar (supplementiert mit 100 µg Ampicillin pro ml Medium) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt, um die Transformationseffizienz zu überprüfen.

6.8 Blau/weiß-Selektion

Escherichia coli-Stämme, wie DH5α, JM109 oder SURE, tragen ein unvollständiges Gen für β-Galaktosidase. Ihnen fehlt das α-Komplement. Dadurch können sie das dem Agar beigemengte (B.3.3.2) X-Gal, ein blaues Substrat für die β-Galaktosidase, nicht umsetzen. Die Kolonien erscheinen weiß. Plasmide, wie pUC19, tragen neben dem Gen für eine Antibiotikaresistenz das Gen für das fehlende α-Komplement. Die oben angesprochenen Stämme können durch Aufnahme solcher Plasmide in Gegenwart von dem entsprechenden Antibiotikum wachsen und gleichzeitig X-Gal umsetzen. Die Kolonien werden blau. Wenn das Gen für das α-Komplement durch Einbau von Fremd-DNA in die Sequenz des α-Komplements zerstört wird, können die transformierten Stämme in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums wachsen, aber nicht mehr das blaue Substrat X-Gal umsetzen. Diese Kolonien bleiben weiß. Mit dieser Methode können makroskopisch Kolonien, die die Fremd-DNA tragen, identifiziert werden. Sie können in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums wachsen, bleiben aber weiß.

6.9 Anhängen eines 3´Desoxyadenosin-Überhangs an PCR-Amplifikate

Dazu wurde nach der Amplifikation zum PCR-Ansatz (C.7.2.3) 1 Unit Taq-Polymerase (Eurogentec) pipettiert und für 10 min bei 72°C inkubiert. Die Taq-

Polymerase erzeugt Amplifikate mit einem Desoxyadenosin-Überhang. Sofort anschließend wurde die DNA mit Phenol/Chloroform (1:1, pH 8,0) extrahiert, auf 0,3 M Natriumacetat eingestellt, mit Ethanol gefällt und in soviel $H_20_{bid.}$ gelöst, daß die DNA-Konzentration bei 10 ng/µl lag.

6.10 TA-Klonierung (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Eine sehr schnelle Methode, PCR-Amplifikate in einen Vektor zu inserieren stellt die TA-Klonierung dar. Dabei wird die Template unabhängige Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase ausgenützt, die ein einzelnes Desoxyadenosin am 3´-Ende des Amplifikats anhängt. Der Vektor ist linearisiert und trägt an den Enden ein überhängendes, einzelnes Desoxythymidin. Zusätzlich ist er aktiviert, indem je eine DNA-Topoisomerase an den Enden gebunden ist. Dieses Enzym ligiert das PCR-Amplifikat mit dem Vektor.

Zur Klonierung wurden 4µl (≡25 ng DNA) des PCR-Ansatzes (C.7.2.2) mit 1 µl des TOPO-Vektors vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Zugabe von 1 µl sechsfach konzentrierter Stopp-Lösung (Invitrogen: Unter diesen Bedingungen löst sich die Topoisomerase vom Vektor). Nach 10 s wurde der Ansatz auf Eis gestellt. Direkt im Anschluß wurden kompetente Zellen (Top10, Invitrogen) mit diesem Ansatz transformiert. Dazu wurden 2 µl dieses Ansatzes zu auf Eis aufgetauten Top10-Zellen pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert, bei 42°C für 30 s hitzebehandelt und wieder sofort auf Eis gebracht. Die so transformierten Zellen wurden zur phänotypischen Expression 30 min bei 37°C in 250 µl SOC-Medium (B.2.2) leicht geschüttelt. Anschließend wurden diese Zellen auf mit 50 µg/ml Ampicillin supplementierten LB-Agar ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

6.11 Expression der rekombinanten Curdlanase

Es wurde der pBAD-TOPO ausgewählt, weil dieser neben der TA-Klonierung® und der Ampicillin-Resistenz den induzierbaren Arabinose-Promotor trägt und ein Anhängen von sechs C-terminalen Histidinresten an das Fremdprotein ermöglicht (Anlage 1).

Durch Zugabe von 0,2 % Glukose ins Medium konnte somit die Expression der Curdlanase reprimiert werden und durch Zugabe von L-Arabinose (es wurden

Konzentrationen von 0,00002% bis 0,2% eingesetzt) induziert werden. Durch Verwendung von LMG194-Zellen konnte die basale Expression der Curdlanase auf fast null gedrückt werden.

7 Sonstige Methoden

7.1 Mutagenese von Streptomyces globisporus

7.1.1 Physikalische Methode: Bestrahlung mit UV- Licht

Eine dicht mit sporulierten *Streptomyces globisporus*-Zellen bewachsene Agarplatte wurde mit 10 ml 100 mM $MgCl_2$ überschichtet. Die Sporen wurden mit einem in Ethanol getauchten und abgeflammten Gummispatel abgekratzt. Diese Sporensuspension wurde unter UV-Lampen (λ = 206 nm mit 12 µA oder 6µA bei einem Abstand von 14 cm) positioniert. Nach einer Bestrahlungsdauer von 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 min wurden je dreimal 20 µl der Sporensuspensionen auf einer RBB-Curdlan-Agarplatte ausgebracht und sofort abgedunkelt. Diese Platten wurden bei 30°C vier Tage im Dunkeln inkubiert, auf Wachstum von *Streptomyces globisporus* und Lyse des RBB-Curdlans überprüft. Mutanten, die keinen Lysehof bildeten, wurden gepickt und in 10 ml NMMP-Glycerin (B.2.1.3) vermehrt. Nach vier Tagen wurden die Kulturüberstände dieser Kulturen im turbidimetrischen und enzymatischen Test (B.4.10.1+2) überprüft, ob die Curdlanaseaktivität weiterhin gestört ist.

7.1.2 Chemische Methode: Alkylierung der DNA mit NG (1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin)

10 µl einer Sporensuspension (B.7.1.1) und 10 mg NG wurden in 5 ml TM-Puffer (100 mM Tris, 11 mM Maleinsäure, pH 9,0) 15 min im Ultraschallbad vorbehandelt und anschließend im Wasserbad bei 30°C für weitere 0, 3, 4, 5 und 6 Stunden inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 10 µl und 100 µl zu jedem Zeitpunkt entnommen und auf RBB-Curdlanagar ausplattiert. Nach vier Tagen Inkubation bei 30°C wurden die gewachsenen Kolonien gezählt. Zellen von Kolonien, die keinen Lysehof ausbildeten, wurden in 10 ml NMMP-Glycerin Flüssigmedium (B.2.1.3) vermehrt. Diese Kulturüberstände wurden mittels turbidimetrischen und enzymatischen Test (B.4.10.1+2) auf Aktivität gegenüber Curdlan bzw. Hefezellwänden getestet.

7.2 Suspendierung mit Ultraschallhomogenisator

Die gewünschte Menge unlöslichen Materials (z.B. 9 mg SDS-Zellwände für den turbidimetrischen Test) wurde in einem 12 ml Plastikröhrchen in 6 ml H_2O aufgeschwemmt. Dieses Gemisch wurde mittels Ultraschall (Sonifier von New Brunswick, Microtip, Stufe 7, 60% Intensität, 2 x 60 s, kontinuierlich) im Eisbad suspendiert.

7.3 Ultrafiltration

7.3.1 Entsalzung mit Zentrifugiereinheiten (Pall Filtron)

Proteinlösungen wurden mit Zentrifugiereinheiten verschiedener Ausschlußgrößen (10 K und 30 K) entsalzt und gleichzeitig konzentriert. Die Zentrifugiereinheiten wurden mit der Proteinlösung befüllt und mit der vom Hersteller empfohlenen Beschleunigung bei 6°C zentrifugiert. Das Filtrat wurde auf Eis zwischengelagert. Das Retentat stellte die konzentrierte Probe dar. Die Entsalzung erfolgte durch erneutes Befüllen der Einheit mit $H_2O_{bid.}$ und anschließender Zentrifugation. Das Filtrat wurde mit dem ersten vereinigt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das Retentat wurde in einem kleinen Volumen $H_2O_{bid.}$ gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach erfolgreicher Austestung des Retentats wurde das zwischengelagerte Filtrat verworfen.

7.3.2 Entsalzung mit Rührzelle (Amicon)

Mit der Rührzelle wurden Volumina von 50 ml wegen der größeren Membranoberfläche ($\cong$ 2 cm^2) viel schneller entsalzt als mit den Zentrifugiereinheiten ($\cong$ 50 mm^2). Zusätzlich ist in der Rührzelle ein Stabmagnet, der knapp über dem Boden rotiert und so ein Anlagern der Proteine an die Membran (YM 10K) weitgehend verhindert. Die treibende Kraft ist hierbei nicht die durch die Winkelgeschwindigkeit eines Rotors hervorgerufene Gravitationskraft, sondern der Überdruck von 1,5–2 bar, der durch Einblasen von Stickstoff über der Proteinlösung erzeugt wird.

7.3.3 Konzentrierung mit Tangentialfiltration (Pall Filtron)

Bei diesem Gerät wird die zu filtrierende Proteinlösung tangential an der senkrechten Membran (Oberfläche ca. 30 cm^2) entlang gepumpt. Durch ein Ventil am diesseitigen Ausgang der Filtrationskammer wurde die Ausflußmenge reduziert bis in der

Kammer ein Überdruck von ca. 1 bar herrschte. Dadurch wird die Lösung durch die Membran gepreßt. Der kontinuierliche Strom der Lösung verhindert ein Anlagern der Proteine, die die Membran der Ausschlußgröße von 10.000 D nicht passieren können. Auf diese Weise wurden die Proteine bis auf ein Endvolumen von ca. 40 ml konzentriert.

7.4 Ammoniumsulfatfällung

Eine weitere Methode zur Konzentrierung von Proteinen war die Ausfällung durch Ammoniumsulfat. Dabei wurde einer Proteinlösung soviel Ammoniumsulfat in fester Form zugegeben, bis eine 85%-ige Sättigung erreicht war. Dieser Ansatz wurde - nachdem sich das Ammoniumsulfat gelöst hatte - vier Stunden bei 6°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Proteine wurden mittels Zentrifugation (40.000 x g, 10 min, 6°C) gewonnen. Diese Methode bot den Vorteil, daß die gefällten Proteine in nativer Form über Wochen bei 6°C gelagert werden konnten. Wenn nötig, wurde die Proteinlösung mittels Ultrafiltration (B.7.3.2) entsalzt.

7.5 Antikörpergewinnung

66 µg zur Homogenität gereinigter nativer Curdlanase von *Streptomyces globisporus* reichten aus um eine Ratte zu immunisieren. Mit der Immunisierung wurde die Firma Charles River (Kisslegg, Deutschland) beauftragt. Um etwaige zufällige Kreuzreaktionen ausschließen zu können, wurde 0,1 ml Präimmunserum gewonnen. Es konnten bei einem Westernblot keinerlei Kreuzreaktionen mit 10-fach konzentriertem Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus* detektiert werden. Die Immunisierung erfolgte daraufhin nach dem Standardprotokoll von Charles River. Bei der ersten Injektion wurden 22 µg Curdlanase unter Verwendung von kompletten Freundschen Adjuvans eingesetzt. Nach 28 Tagen und 42 Tagen wurden unter Verwendung von inkompletten Freundschen Adjuvans jeweils weitere 22 µg Curdlanase subkutan injiziert. Nach 49 Tagen wurden der Ratte 0,3 ml Serum entnommen und überprüft, ob bereits genügend Antikörper gegen die Curdlanase gebildet worden waren. Die Austestung verlief positiv, woraufhin die immunisierte Ratte nach 62 Tagen vollständig entblutet und das Antiserum gewonnen wurde.

C Ergebnisse

1 Lytische Eigenschaften von *Streptomyces globisporus*

1.1 Beobachtung der Schädigung von Saccharomyces cerevisiae

Lebensfähige Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* wurden vier Stunden im Kulturüberstand einer vier Tage lang gewachsenen *Streptomyces globisporus*-Kultur bei 37°C schüttelnd inkubiert. Im Phasenkontrastmikroskop wurde der Zustand der Zellen nach der Inkubation kontrolliert. Viele Zellen waren massiv geschädigt, das Zytoplasma trat vielfach an mehreren Stellen aus, teilweise waren nur noch leere Zellhüllen zu erkennen. Dies wurde im Zuge der Diplomarbeit von U. Strobel (Strobel, 1995) beobachtet (s. Abb. 3).

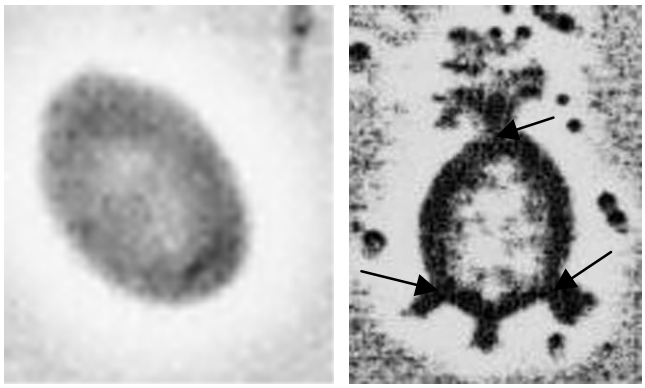


Abbildung 3: Phasenkontrastmikroskopische Bilder von einer Zelle von *Saccharomyces cerevisiae* (1:1000) vor (links) und nach (rechts) 4h Inkubation in Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus*. Die Pfeile deuten auf Löcher in der Zellwand bzw. auf austretendes Zytoplasma

Offensichtlich wurde die Zellwand der Hefe beschädigt.

Dies konnte auch elektronenmikroskopisch gezeigt werden (Aufnahmen von Prof. Dr. Wanner, Institut für Botanik der Universität München). Wie im Bild zu sehen ist (Abb. 4), ist die Zellwand aufgerissen.

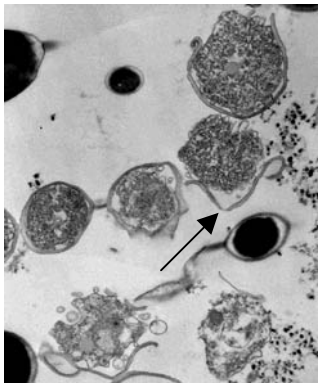


Abbildung 4: *Saccharomyces cerevisiae* nach 22 h Inkubation in Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus*. Aufnahme Prof. Wanner, Inst. für Botanik, LMU München (1: 8000). Der Pfeil zeigt auf die Reste der hydrolysierten Zellwand, darüber befindet sich koaguliertes Zytoplasma

1.2 Identifizierung des molekularen Angriffspunktes der Lyse der Zellen von Saccharomyces cerevisiae

Der Hauptbestandteil der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* ist β-(1,3)-Glukan (Georgopapadakou, 1995). Daneben kommen noch β-(1,6)-Glukan, Chitin und verschiedene Mannoproteine vor (Abb. 1).

Diese glykosylierten Proteine scheiden als strukturgebende Faktoren aus, da die Zellform nach Herauslösen der Proteine intakt bleibt (Wicker, 2000).

Die anderen polymeren Bestandteile wurden eingehend auf Hydrolysierbarkeit durch *Streptomyces globisporus* untersucht:

Chitin, β-(1,6)-Glukan und β-(1,3)-Glukan wurden als farbstoffgekoppelte Polymere RBV-Chitin (Remazol-Brillant-Violett, Loewe), RBB-Pustulan (Remazol-Brillant-Blau, Loewe) und RBB-Curdlan (Loewe) in Agarose-Lyse-Tests (B.4.10.3) eingesetzt. Diese Glykane werden bei Hydrolyse farblos, weil durch die Spaltung der N-Acetylglukosaminkette bzw. Glukosekette der Farbstoff freigesetzt wird. Dies konnte weder bei Chitin noch bei Pustulan beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte Curdlan offenbar hydrolysiert werden. Rund um den in die Agarose eingestanzten Brunnen, der mit Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus* gefüllt war, entstand ein farbloser Hof.

Diese Befunde sprechen für den Abbau des β-(1,3)-Glukans als molekularem Angriffspunkt bei der Lyse der Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*. Zur weiteren Bestätigung wurden SDS-Zellwände von *Saccharomyces cerevisiae* präpariert (B.4.2). Diese Zellwände wurden in einem turbidimetrischen Aktivitätstest (B.4.10.1) als Substrat eingesetzt. Vor und nach dem Test wurde je ein Aliquot für GC-Analysen aufbereitet (B.4.4.1-3). Es wurden zwei Ansätze angelegt, wobei jeweils einer mit 2 M Salzsäure hydrolysiert (B.4.3.1) wurde und die andere nicht. Der Vergleich der Mengen der detektierten monomeren Zucker Glukose und Mannose in den chemisch hydrolysierten Proben vor und nach dem Aktivitätstest zeigte, daß die Proben gut miteinander vergleichbar waren (Tabelle 1).

Proben	Glukose [µM]	Mannose [µM]
vor Aktivitätstest, hydrolysiert	43	5
vor Aktivitätstest, nicht hydrolysiert	0	0
nach Aktivitätstest, hydrolysiert	42	5
nach Aktivitätstest, nicht hydrolysiert	8	0

Tabelle 1: Hydrolyse der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*
0,9 mg SDS-Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* wurden vier Stunden im Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus* inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurden zweimal 10 µl entnommen. Ein Aliquot wurde mit 2 M HCl hydrolysiert, das andere direkt für gaschromatographische Untersuchungen aufbereitet. Die mit Hilfe eines quantitativen Standards berechneten Mengen der detektierten Zucker sind aufgeführt.

Die nicht mit HCl hydrolysierte Probe vor dem turbidimetrischen Test zeigte keinerlei Monomere, die nach dem Test nur Glukose. Dieser Befund bewies, daß ein Enzym des Kulturüberstandes die Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* hydrolysiert und dabei Glukose freisetzt. Dies wurde ausgenutzt, um dem turbidimetrischen Aktivitätstest einen quantitativen Test anschließen zu können. Hierbei wird die durch Hydrolyse des β-(1,3)-Glukans freigesetzte Glukose enzymatisch gemessen (B.4.10.2). Damit stand ein quantitativer Aktivitätstest zur Verfügung, um das Enzym, das die Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* lysiert, nachweisen zu können.

1.3 Suche nach anderen lytischen Aktivitäten

Außer der neuentdeckten Lyse von *Saccharomyces cerevisiae* kennt man von *Streptomyces globisporus* bereits die Hydrolyse von Bakterien mit dem Enzym Mutanolysin (Yokogawa, 1975). Im folgenden wurde untersucht, ob neben den Polymeren β-(1,3)-Glukan und Murein noch weitere, bisher noch nicht untersuchte Polymere durch Exoenzyme von *Streptomyces globisporus* hydrolysiert werden können. Das Hauptaugenmerk war dabei auf Polymere des Bodens, dem natürlichen Habitat von *Streptomyces globisporus* gelegt worden. Auf Chitin und Murein wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet, da hierzu bereits Untersuchungen vorliegen (Brönneke, 1994).

	SDS-HZW	Curdlan	Laminarin	Xylan	Pullulan	Pustulan	Stärke	Gelatine
Bindung	ß 1-3 (ß 1-6)	ß 1-3	ß 1-3 (ß 1-6)	ß 1-4	ß 1-4 (α 1-6)	ß 1-6	α 1-4 (α 1-6)	
Hydrolyse	+	+	(+)	(+)	+	-	+	+

Tabelle 2: Lyse von Polymeren durch Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus*
In Spalten sind die der Hydrolyse ausgesetzten Polymere aufgeführt. In der zweiten Zeile ist die Art der glykosidischen Bindung angegeben. Laminarin und Xylan konnten nur hydrolysiert werden, wenn *Streptomyces globisporus* in Gegenwart von demselben Polymer gewachsen war (SDS-HZW = SDS behandelte Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*)

Wie der Tabelle 2 zu entnehmen ist, werden neben β-(1,3)-Glukan (Curdlan) und SDS-HZW auch noch Stärke (α-(1,4)-Glukan) und Pullulan (β-(1,4)-Glukan) sowie Gelatine, die als Ersatz für Protein eingesetzt wurde, hydrolysiert.

Auffällig war, daß Xylan und Laminarin nur dann hydrolysiert werden konnten, wenn *Streptomyces globisporus* in Gegenwart von demselben Substrat gewachsen war. Laminarin unterscheidet sich von Curdlan nur durch zusätzliche β-(1,6)-Verzweigungen. Die Agarose-Lyse-Tests mit Pustulan zeigen, daß β-(1,6)-Verknüpfungen von dem Enzym, das die Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* lysiert, offenbar nicht angegriffen werden können. Es scheint sich bei dem hefelytischen Enzym um eine spezifische Curdlanase zu handeln.

2 Steigerung der apparenten lytischen Aktivitäten

Im vorigen Kapitel wurde gezeigt, daß verschiedene Polymere durch Exoenzyme von *Streptomyces globisporus* hydrolysiert werden können. Ob diese lytischen Aktivitäten durch Substratzugabe, wie es z. B. für Amylasen in der Literatur beschrieben ist (Chater, 1993), oder durch Zugabe anderer Stimulatoren gesteigert werden können, ist Gegenstand dieses Kapitels.

2.1 Stimulatoren

Zur Aufklärung, welche Strukturen für die Steigerung der apparenten lytischen Aktivitäten bei *Streptomyces globisporus* verantwortlich sind, wurden verschiedene Medienzusätze untersucht. Die Hydrolyse der Polymere wurde in Agarose-Lyse-Tests überprüft (Tab. 3).

Induktoren	SDS-HZW	Curdlan	Laminarin	Xylan	Pullulan	Stärke	Gelatine
Bindung	ß 1-3 (ß 1-6)	ß 1-3	ß 1-3 (ß 1-6)	ß 1-4	ß 1-4	α 1-4 (α 1-6)	
S. cerevisiae Zellwand	+	+	-	-	-	+	-
S. cerevisiae Zellen	+	+	n.d.	n.d.	-	+	-
Curdlan	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	+	-
Laminarin	-	-	+	n.d.	n.d.	+	-
Xylan	-	-	n.d.	+	-	+	-

Tabelle 3: Steigerung der Hydrolyse
In Spalten sind die zu hydrolysierenden Polymere angeordnet, in Zeilen die Medienzusätze, die als Induktoren getestet wurden. In der zweiten Zeile ist die Art der glykosidischen Bindung angegeben. (SDS-HZW = SDS-behandelte Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*; n.d. bedeutet, daß die Induktion der Hydrolyse des entsprechenden Polymers mit dem entsprechenden Induktor nicht getestet wurde)

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, bewirkte die Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* eine gesteigerte Hydrolyse von sich selbst und des β-(1,3)-Glukans Curdlan. Mit Natriumazid abgetötete Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* wirkten vergleichbar. Curdlan wirkte als Induktor für die Hydrolyse der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*, aber nicht von sich selbst. Laminarin wirkte nicht als Induktor für eine Hydrolyse der Hefezellwand, aber als einziger Stimulator für die eigene Hydrolyse. Entsprechendes gilt für Xylan. Auffallend sind die Ergebnisse hinsichtlich des Substrates Stärke. Alle Medienzusätze wirkten verstärkend auf dessen Hydrolysierbarkeit. Die Hydrolysierbarkeit der Gelatine (Substrat für Proteasen) dagegen konnte in keinem Fall gesteigert werden. Bakterielle Zellwände wie sie von Brönneke (1994) eingesetzt wurden, um die Expression von Mutanolysin zu steigern, konnten die Hydrolyse keiner der untersuchten Polymere verstärken und wurden deshalb in der Tabelle nicht aufgeführt.

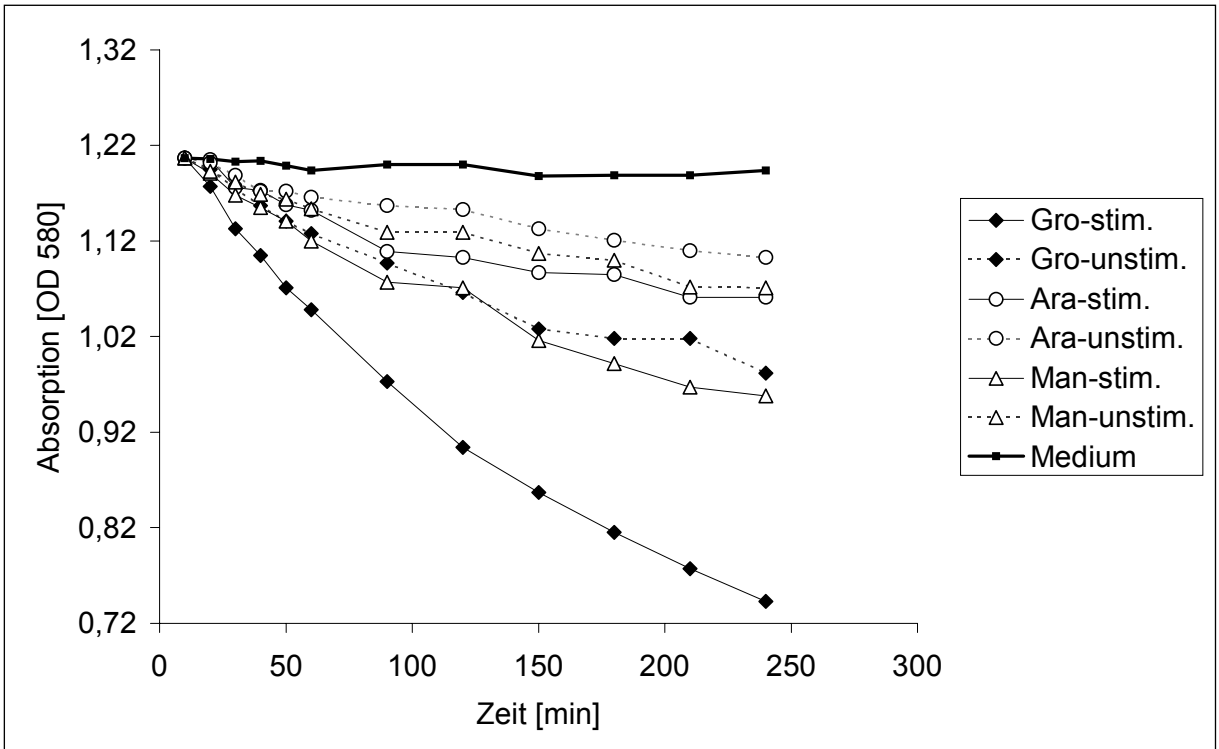
Diese Agarose-Lyse-Tests zeigten deutlich, daß *Streptomyces globisporus* durch Zugabe von bestimmten Polymeren zum Wachstumsmedium dazu stimuliert wird, diese Polymere besser hydrolysieren zu können. Daneben konnten auch pleiotrope Effekte beobachtet werden, vor allem die Stimulierbarkeit der Hydrolyse von Stärke, also die Induzierbarkeit von Amylase.

Genauer untersucht wurde im folgenden die Stimulierung der Hydrolyse von Hefezellwänden, im Detail deren β-(1,3)-Glukan (C.2.2-4). Dabei sollte auch geklärt werden, ob die Steigerung der Aktivität auf die vermehrte Expression des oder der

daran beteiligten Enzyme beruht oder auf eine verbesserte lytische Aktivität des bzw. der Enzyme.

2.2 Medienoptimierung

Frühere Untersuchungen (Brönneke, 1994; Strobel, 1995) hatten gezeigt, daß Minimalmedien besonders geeignet sind, um die Sekretion von Exoenzymen zu untersuchen. Das damals verwendete Yokagawa-Medium (Yokagawa, 1975) enthält Dextrine. Es war somit nicht geeignet zum Nachweis der Curdlanase, da der quantitative Aktivitätstest durch Curdlanase freigesetzte Glukose mißt (im Vorgriff auf später gezeigte Ergebnisse wird die Curdlan-hydrolysierende Aktivität ab jetzt als Aktivität des Enzyms Curdlanase bezeichnet). In dieser Arbeit wurde deshalb das NMMP-Medium nach Hopwood (1985, B.2.1.3), ein zuckerfreies Grundmedium, verwendet. Es wurden verschiedene Kohlenstoffquellen (Arabinose, Glycerin, Mannit) ausgetestet, ob *Streptomyces globisporus* damit wachsen kann. Das Zelltrockengewicht nach 4 Tagen Wachstum variierte zwischen den drei Kohlenstoffquellen weniger als 5%. Zusätzlich wurde die Induzierbarkeit der



Wachstum wurde die Curdlanase-Aktivität im Kulturüberstand bestimmt (B.4.10.1). Im Glycerin-Medium konnte hierbei die Aktivität der Curdlanase am deutlichsten gesteigert werden (Abb. 5). Durch Zugabe von SDS-HZW ins Wachstumsmedium konnte die Aktivität der Curdlanase deutlich gesteigert werden, d.h. das Substrat kann die Aktivität des entsprechenden Enzyms stimulieren.

2.3 Einfluß der Menge des Substrats

Beim Versuch zur Medienoptimierung waren als Stimulator 10 mg SDS-HZW eingesetzt worden. Um den Einfluß der Menge des Stimulators zu untersuchen, wurden 0 mg, 1 mg, 10 mg, 50 mg und 100 mg in 10 ml Kulturen eingesetzt (B.3.1.1). Nach 4 Tagen Wachstum wurde die Hydrolyseaktivität untersucht (B.4.10.1). Je mehr Substrat dem Medium zugesetzt war, desto höher war die gemessene Aktivität. Allerdings glich die Steigerung einer Sättigungskurve, so daß als optimale Substratmenge 50 mg/10 ml Medium festgelegt wurden.

2.4 Einfluß des Polymerisationsgrades des Substratmoleküls

SDS-HZW ist ein großes, wasserunlösliches Molekül. Da es sehr unwahrscheinlich war, daß ein derartiges Molekül der molekulare Auslöser der Stimulation ist, wurde es in verschieden große Einheiten zerlegt. Die präparierten SDS-Zellwände von *Saccharomyces cerevisiae* wurden hierfür mit 2 M Trifluoressigsäure hydrolysiert (B.4.3.3). Die Hydrolyseprodukte wurden mit 500 µl $H_2O_{bid.}$ aufgenommen. Der wasserunlösliche Anteil wurde direkt als Stimulator eingesetzt. Die wasserlöslichen Bruchstücke wurden über eine Gelfiltrationssäule Biogel P4 (Bio-Rad) aufgetrennt (B.5.2.1) und fraktioniert (Abb. 6).

Die Sammelfraktionen Oligomere (Kettenlänge 1-5) und Polymere (Kettenlänge >6) wurden ebenfalls als Stimulatoren eingesetzt. Zum Vergleich wurde der Kulturüberstand einer unstimulierten Kultur und der einer mit SDS-HZW stimulierten Kultur im turbidimetrischen Aktivitätstest mitgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 7 dargestellt. Wie der Grafik zu entnehmen ist, konnten die Medienzusätze Oligomere und Polymere keine Steigerung der hydrolytischen Aktivität hervorrufen. Der wasserunlösliche Anteil der SDS-HZW wirkte schwach induzierend.

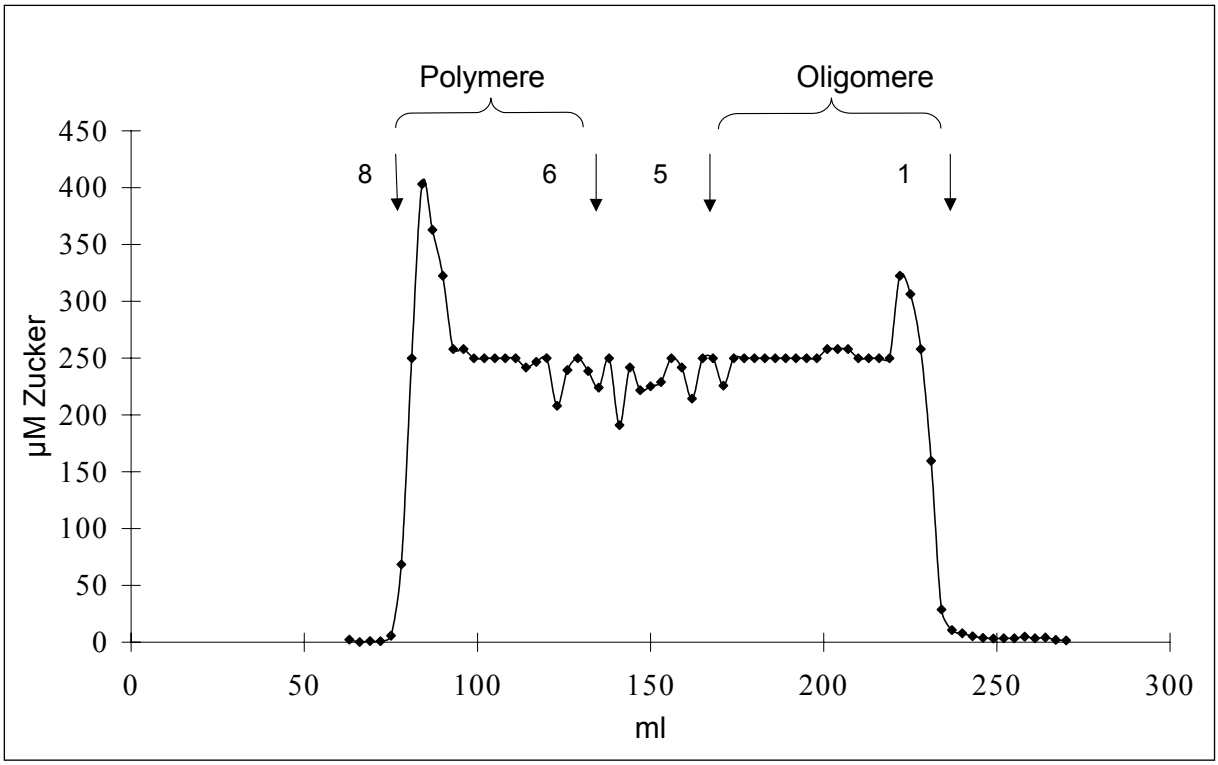


Abbildung 6: Auftrennung der wasserlöslichen Hydrolyseprodukte von SDS-HZW an Biogel P4
Dargestellt ist der Neutralzuckergehalt (B.4.13) der einzelnen Fraktionen. Die Kettenlängen waren mittels Dünnschichtchromatographie (B.5.1) bestimmt worden, wobei Zuckermoleküle der Kettenlänge 1 bis 8 als Standards dienten (Pfeile)

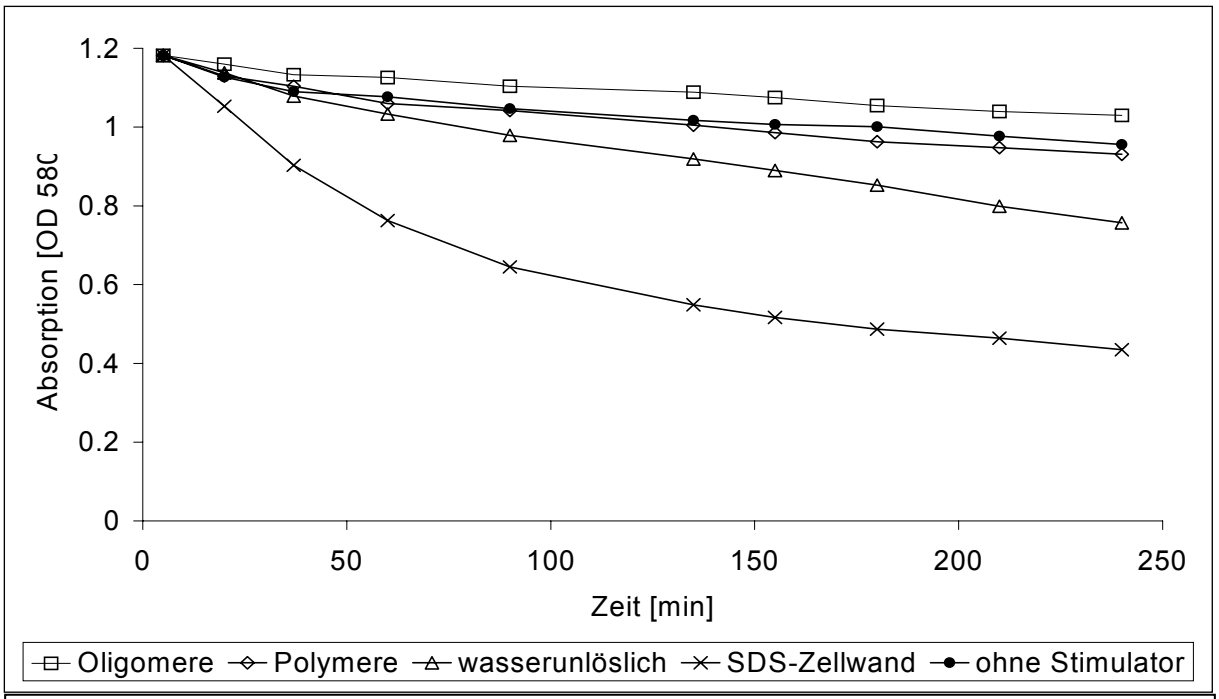


Abbildung 7: Test der Stimulierbarkeit von *Streptomyces globisporus* mit verschiedenen Zellwandbruchstücken
Dargestellt sind die im Kulturüberstand feststellbaren Hydrolyseaktivitäten verschieden stimulierter *Streptomyces globisporus* Kulturen (turbidimetrischer Test)

Daraus kann gefolgert werden, daß die wasserlöslichen, kurzkettigen Hydrolyseprodukte eine wesentliche Eigenschaft der SDS-HZW nicht mehr erfüllen. Dieses Phänomen, daß nur große Moleküle als Stimulatoren wirken können, war ebenso für die Stimulation von Mutanolysin (Brönneke, 1994) gezeigt worden.

2.5 Sensierung des Substrats

Wie erfolgt die Stimulierung der hydrolytischen Aktivität? Denkbar sind folgende Ansätze:

- Konstitutiv exkretierte Enzyme hydrolysieren das Substrat, dabei entstehende Hydrolyseprodukte dienen als Signalmoleküle.
- Direkter Zellkontakt löst eine Stimulierungskaskade aus.

Um gebildete Signalstrukturen zu erkennen, wurde *Streptomyces globisporus* unter induzierenden Bedingungen inkubiert. Der Kulturüberstand, der diese Signalstrukturen beinhalten sollte, wurde entweder direkt als Wachstumsmedium eingesetzt, oder lyophilisiert. Dieses Lyophilisat wurde als Induktor entweder sofort in sterilem NMMP-Glycerin gelöst, oder in frisch angesetztem NMMP-Glycerin gelöst und nach Sterilfiltration oder nach Autoklavieren eingesetzt. Nach Wachstum unter derart stimulierenden Bedingungen wurde die Gesamtproteinmenge des Kulturüberstandes bestimmt (B.4.7) und ein quantitativer Aktivitätstest (B.4.10.2) durchgeführt. Es wurde kein Hinweis gefunden, daß Zwischenprodukte gebildet werden, die als signalgebende Strukturen fungieren können (Abb. 8).

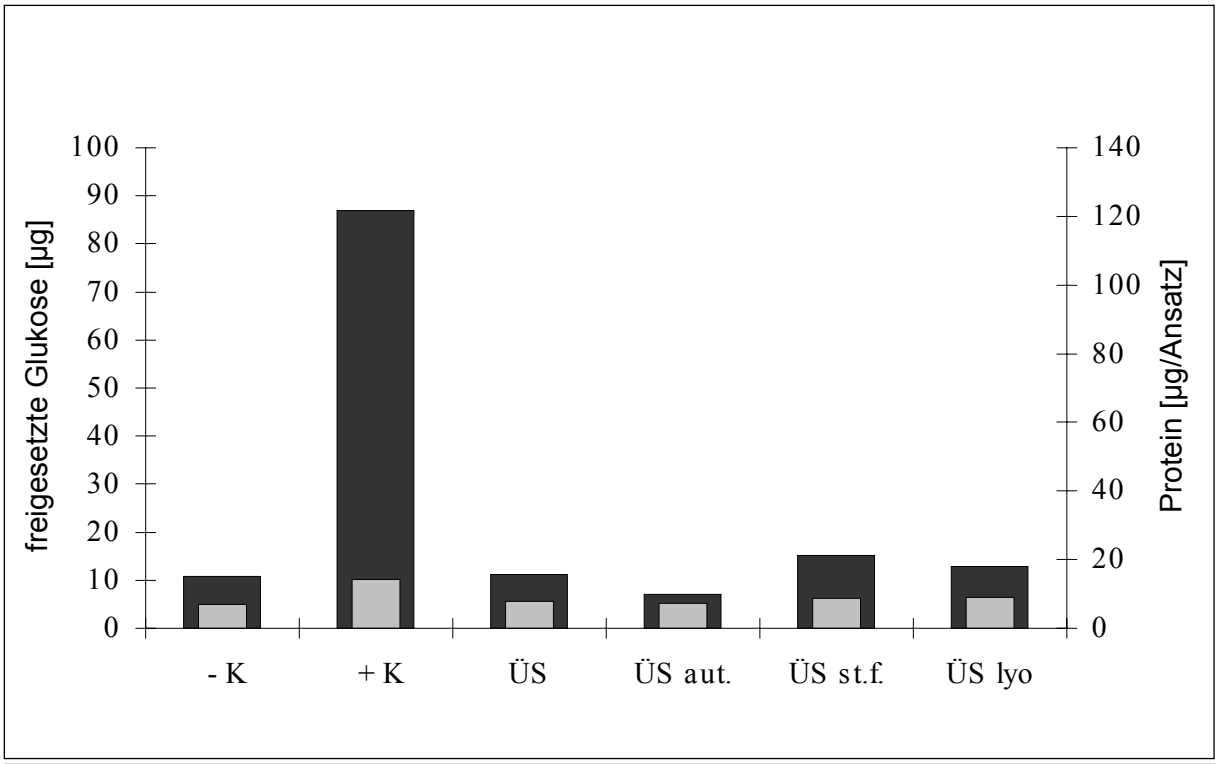


Abbildung 8: Stimulierung der Hydrolyseaktivität durch gebildete Signalstrukturen
Die dunklen Säulen repräsentieren die Aktivität, die hellen die im Aktivitätstest eingesetzte Proteinmenge. –K = ohne Induktor; +K = SDS-HZW als Induktor; ÜS = Kulturüberstand als Medium; ÜS aut = lyophilisierter und autoklavierter Kulturüberstand als Induktor; ÜS st.f. = lyophylisierter und steril filtrierter Kulturüberstand als Induktor; ÜS lyo = lyophylisierter Kulturüberstand als Induktor

Ob ein direkter Zellkontakt zum Substrat eine Aktivitätssteigerung auslösen kann oder sogar notwendig ist, wurde mikroskopisch und mit Aktivitätstests untersucht.

In einer geschüttelten Kultur ist zwar eine ausreichende Sauerstoffversorgung garantiert, es treten aber hohe Scherkräfte auf, die eine etwaige Anlagerung von Mycel an Hefezellen unmöglich machen. Außerdem entsprechen diese Bedingungen nicht den natürlichen Bedingungen im Boden. *Streptomyces globisporus* wurde deshalb bei diesen Versuchen stehend inkubiert. Um den Sauerstoffbedarf weitmöglichst zu decken, erfolgte die Anzucht in Fernbachkolben, die eine große Oberfläche des Mediums ermöglichen. Um authentische mikroskopische Präparate zu erhalten, erfolgte ein Teil der Anzuchten in Glaspetrischalen (∅ 20 cm), in die Objektträger auf einem Drahtgestell gelegt wurden. Nach Wachstum wurde das Medium vorsichtig abgesaugt. Die Objektträger konnten dann mit dem Drahtgestell einfach entnommen werden. Diese Präparate wurden im Phasenkontrastmikroskop untersucht. Diese Versuche wurden in drei Parallelen durchgeführt. Den Kulturmedien wurden als Stimulatoren natriumazidabgetötete *Saccharomyces*

cerevisiae-Zellen oder Polystyrolperlen (∅ 10 µm; Dynal) in gleicher Menge zugesetzt. Die dritte Parallele wurde ohne Zusatz angezogen.

Nach vier Tagen Wachstum konnten im Phasenkontrastmikroskop vielfach von Mycel umwachsene Hefezellen (Abb. 9 links) beobachtet werden. Gleichzeitig konnte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine leicht gesteigerte Aktivität gemessen werden (Tab. 4).

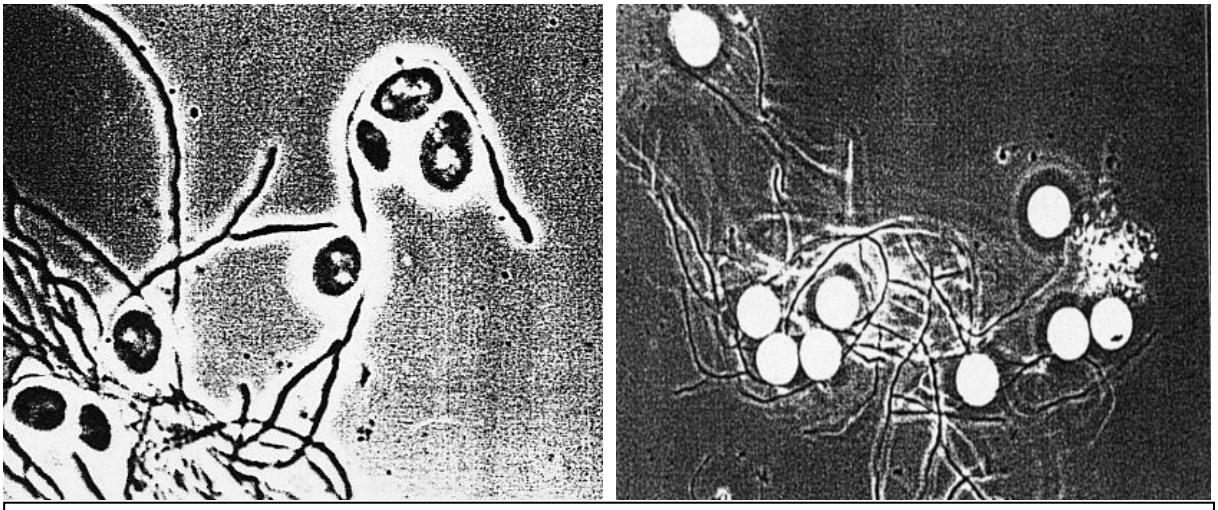


Abbildung 9: Aktivitätssteigerung durch direkten Zellkontakt - Phasenkontrastmikrospkopie
Diese Phasenkontrastbilder (1:1000) zeigen *Streptomyces globisporus* stehend für vier Tage bei 30°C inkubiert. Links in Gegenwart von inaktivierten Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*), rechts von Polystyrolperlen (∅ 10 µm)

Zusatz	ohne	Polystyrolperlen	Hefezellen
Freigesetzte Glukose [µg]	3,8	2,3	7,2

Tabelle 4: Aktivitätssteigerung durch direkten Zellkontakt - Aktivitätsmessung
Dargestellt sind die gemessene Aktivität (Mittelwerte aus fünf Wiederholungen) dreier stehend inkubierter *Streptomyces globisporus*-Kulturen ohne Stimulator, mit Polystyrolperlen oder inaktivierten Hefezellen als Stimulatoren.

Nach Wachstum in Gegenwart der Polystyrolperlen konnte keine Aktivitätssteigerung gemessen werden (Tab. 4), obwohl auch die Perlen umwachsen waren (Abb. 9 rechts). Die Anlagerung des Mycels scheint unspezifisch zu erfolgen.

Ob ein direkter Zellkontakt zur Auslösung einer Stimulation notwendig ist oder sogar aufrechterhalten werden muß, konnte hiermit nicht geklärt werden. Das Ausbleiben einer Aktivitätssteigerung durch Anlagerung des Mycels an Polystyrolperlen läßt aber den Schluß zu, daß ein bloßer physikalischer Kontakt mit den Hefezellen nicht

ausreicht, um eine erhöhte Aktivität der Curdlanase zu stimulieren. Es muß das Substrat Curdlan als intaktes, langes Molekül oder hauptsächlich aus β-(1,3)-Glukan bestehende Zellwand z. B. von *Saccharomyces cerevisiae* als Induktor vorliegen, um die Aktivität der Curdlanase zu steigern.

3 Reinigung und Charakterisierung der Curdlanase

3.1 Reinigung der Curdlanase

Streptomyces globisporus wurde in 1 l Medium (B.2.1.3) unter stimulierenden Bedingungen angezogen. Der Kulturüberstand wurde auf 5,6 ml konzentriert (B.7.3.2+3). Dieses Konzentrat wurde durch präparative Gelfiltration an Superdex 200 HiLoad (B.5.3.1) aufgetrennt. Die aktiven Fraktionen (Abb. 10) von 14 Säulenläufen wurden gesammelt.

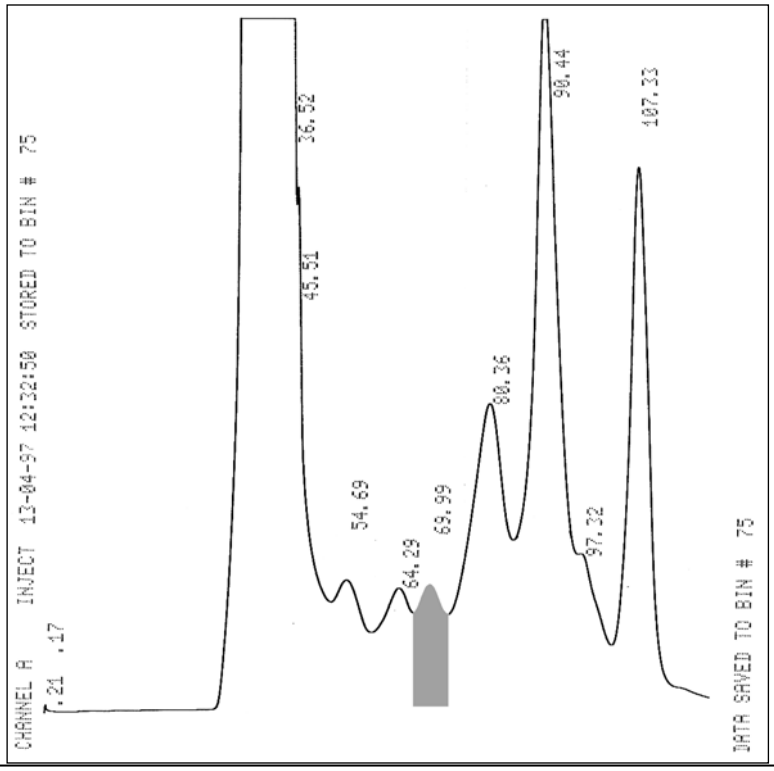


Abbildung 10: Auftrennung der Proteine des Kulturüberstandes an Superdex 200 HiLoad
Dargestellt ist das Elutionsprofil gemessen bei λ=280 nm. Die Fraktion, in der die Hauptaktivität gemessen wurde, ist grau hinterlegt

Die vereinigten Fraktionen wurden mit Ammoniumsulfat präzipitiert (B.7.4) und anschließend mit hydrophober Interaktionschromatographie an TSK 5PW (B.5.3.2)

weiter aufgetrennt. Dabei war der Gradient so gewählt, daß die Curdlanase erst am Ende bei nur noch geringer Ammoniumsulfatkonzentration eluierte (Abb. 11).

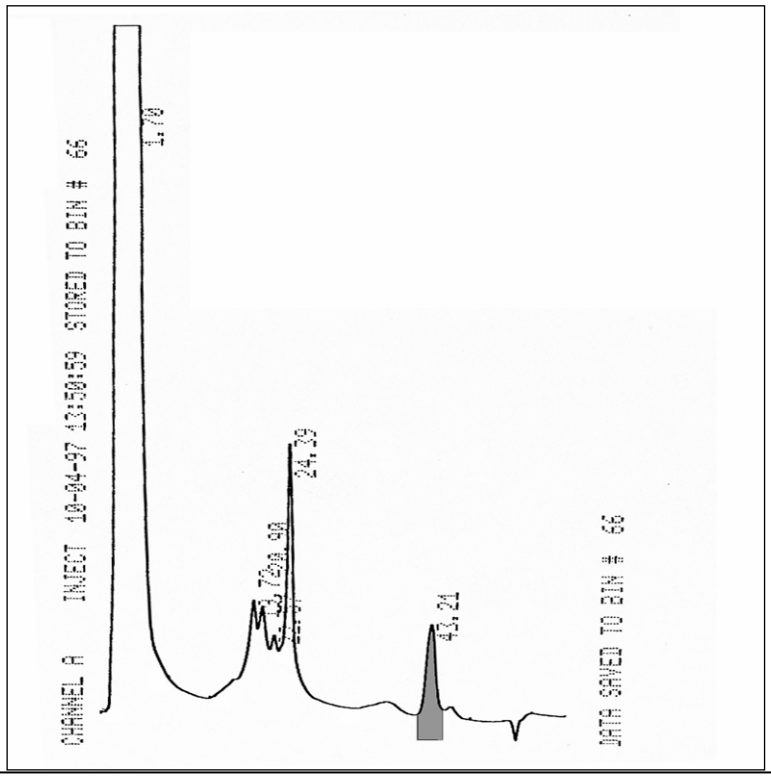


Abbildung 11: Reinigung der Curdlanase: Auftrennung aktiver Fraktionen nach Superdex 200 HiLoad mit Hydrophober Interaktionschromatographie an der Säule TSK5PW (TosoHaas)
Gezeigt ist das Elutionsprofil gemessen bei λ=280 nm. Die Fraktion, in der die Hauptaktivität gemessen wurde ist grau hinterlegt

Diese Fraktion konnte schnell mittels Ultrafiltration (B.7.3.1) entsalzt und auf 100 µl konzentriert werden. Zur Abtrennung der letzten Verunreinigung wurde die Probe einer analytischen Gelfiltration an Superdex 200 HR 10/30 unterzogen (B.5.4.1). Diese Säule trennt Moleküle verschiedener Größe schärfer, als die präparative Superdex 200 HiLoad Säule (Abb. 12).

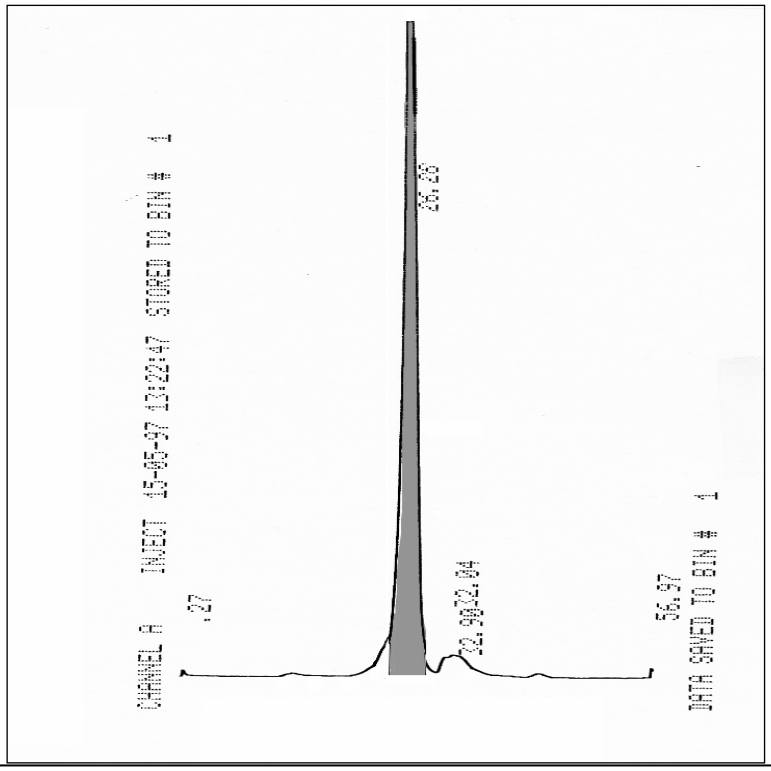


Abbildung 12: Reinigung der Curdlanase: Abtrennung der letzten Verunreinigungen mit Gelfiltrationschromatographie an Superdex 200 HR
Dargestellt ist das Elutionsprofil gemessen bei λ=280 nm. Die Fraktion in der die Aktivität gemessen wurde ist grau hinterlegt

Das Ergebnis war eine bis zur apparenten Homogenität gereinigte Curdlanase. Der Reinigungserfolg wurde mit 10 %iger SDS-PAGE (Abb. 13) und Aktivitätstests überprüft. Die Ergebnisse der quantitativen Aktivitätstests sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt. Als qualitativer Test wurde der sogenannte Curdlanblot (B.4.11) durchgeführt. Dies bot sich an, da die gesammelten Fraktionen zur Überprüfung der Homogenität mit SDS-PAGE aufgetrennt wurden und somit nur noch geblottet werden mußten. Außerdem konnte so auch gezeigt werden, daß nicht mehrere Proteine mit lytischer Aktivität gegenüber Curdlan vorhanden waren. Nach zwei Stunden Inkubation des Curdlangels (B.4.11) war nur eine Lysebande bei 64 kDa detektierbar (Abb. 13).

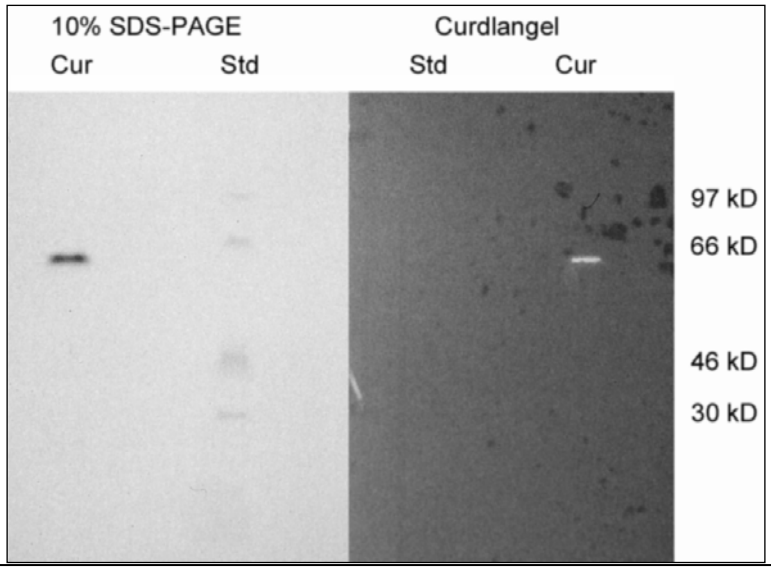


Abbildung 13: Reinigung aktiver Curdlanase: Curdlanblot
Links ist die mit Coomassie gefärbte SDS-PAGE mit 5 µg gereinigter Curdlanase abgebildet. Ein identisches Gel wurde auf das abgebildete Curdlangel geblottet. Das Curdlangel wurde inkubiert, bis eine entfärbte Bande sichtbar wurde. Die Entfärbung muß durch Hydrolyse des RBB-Curdlan entstanden sein, d.h. durch aktive Curdlanase

	Reinigung der Curdlanase			
	Konz. Kultur-überstand	Superdex 200 HiLoad	TSK 5 PW	Superdex 200 HR30/10
Gesamtprotein [µg]	26880	9870	738	420
Gesamtaktivität [µg Glukose]	599	841	2770	2070
Spezifische Aktivität [µg Glukose/µg Protein]	0,02	0,09	3,8	4,9
Anreicherungsfaktor	1	4,5	190	245

Tabelle 5: Reinigung der Curdlanase aus Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus*
Die angegebenen Werte gelten für die aktiven Fraktionen nach dem jeweiligen Reinigungsschritt. Die Gesamtaktivität ist angegeben als µg freigesetzter Glukose im enzymatischen Aktivitätstest

Aus einem Liter Kulturüberstand konnten 420 µg homogene, aktive Curdlanase gereinigt werden. Diese Menge genügte, um Antikörper zu gewinnen und Sequenzierungen des N-Terminus und interner Proteinabschnitte durchzuführen.

3.2 Antikörpergewinnung und -reinigung

Der Nachweis der Curdlanase in Proteinlösungen konnte bis jetzt nur durch Aktivitätstests erfolgen. Einfacher, schneller und direkter ist ein Nachweis mit Hilfe von Antikörpern. Um möglichst wenig gereinigte Curdlanase verwenden zu müssen, sollten die Antikörper aus einer Ratte gewonnen werden. Vor der Immunisierung einer Ratte wurde ein Präimmunserum gewonnen und in einem Westernblot mit den Proteinen des Kulturüberstandes von *Streptomyces globisporus* inkubiert. Die Austestung des Präimmunserums zeigte keine Kreuzreaktionen.

Erst nach diesem Test wurde diese Ratte immunisiert. Die Immunisierung wurde von der Firma Charles River (Kissleg, Deutschland) nach deren Standardprotokoll durchgeführt (B.7.5). Das gewonnene Antiserum wurde mit den mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen des Kulturüberstandes von *Streptomyces globisporus* (20 µg Gesamtprotein) inkubiert. Es reagierte ausschließlich mit einem Protein der Größe 64 kDa, der Curdlanase.

Das Antiserum wurde weiter aufgereinigt, um bestätigen zu können, daß Antikörper der Klasse IgG mit der Curdlanase reagieren und um mit gereinigten Antikörpern statt mit Antiserum arbeiten zu können.

Ein Teil des Antiserums wurde über Affinitätschromatographie an Protein G-4 Sepharose (B.5.2.2) aufgetrennt. Antikörper der Klasse IgG binden an das Protein G der Säule, Antikörper anderer Klassen und Serumproteine nicht.

Konzentrierter Kulturüberstand zweier *Streptomyces globisporus* Kulturen, wovon eine mit SDS-ZW von *Saccharomyces cerevisiae* stimuliert (B.3.1.2) war, wurde mit 10% SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und getrennt mit Antiserum (4 mg Gesamtprotein), IgM-Fraktion nach Protein G-4 Sepharose (3 mg Gesamtprotein) und IgG (16 µg Gesamtprotein) inkubiert.

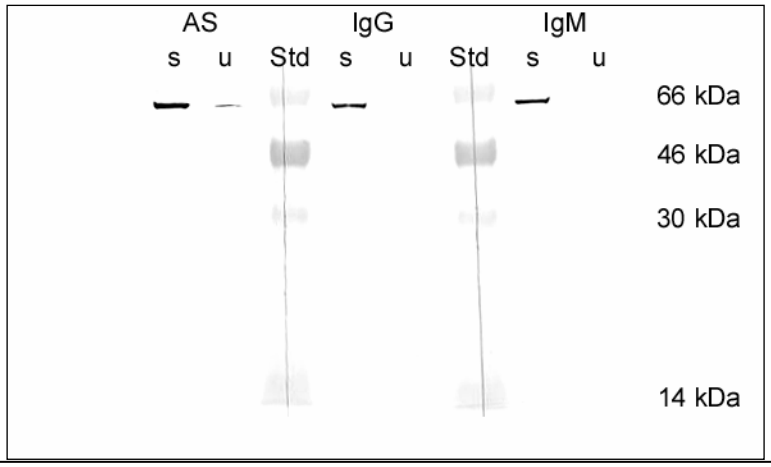


Abbildung 14: Vergleich der Antikörperklassen
Abgebildet ist ein Westernblot von konzentrierten Kulturüberständen von *Streptomyces globisporus*, wobei eine Kultur mit SDS-HZW stimuliert worden war (s = stimuliert, u = unstimuliert). Dieses Paar war dreimal mittels 10%-iger SDS-PAGE aufgetrennt worden. Zwischen zwei Paaren war ein Größenstandard aufgetragen. Nach dem Blotten wurde die Membran jeweils in der Mitte des Größenstandards auseinandergeschnitten (daher stammen die senkrechten Linien) und ein Paar mit 4 mg Antiserum (AS), eins mit 16 µg IgG und das dritte mit 3 mg IgM inkubiert. Die Umsetzung erfolgte mit Diaminobenzidin. Die Proteine des Größenstandards sind sichtbar, weil dieser aus gefärbten Proteinen bestand

Die Antikörper reagierten nur mit Protein auf Höhe von 64 kDa, der Curdlanase (Abb. 14). Das stärkste Signal erzeugte das Antiserum. Die Signale von IgG und IgM waren gleich stark. Es genügten 16 µg IgG, wohingegen von der IgM-Fraktion 3 mg nötig waren. Dieses Ergebnis war erwartet worden, da die IgM-Fraktion nach der Protein G-4 Sepharose zum Großteil aus Serumproteinen und kaum aus Antikörpern der Klasse IgM (s. Immunisierungsprotokoll B.7.5) und als Verunreinigung aus Antikörpern der Klasse IgG besteht. Das deutliche Signal der Reaktionen der IgG-Fraktion mit der Curdlanase zeigte, daß die Antikörper der Klasse IgG gegen die Curdlanase gerichtet sind. Somit standen gereinigte Antikörper zum Nachweis der Curdlanase zur Verfügung.

Zusätzlich wurden der Kulturüberstand einer unstimulierten Anzucht mit dem einer stimulierten Anzucht verglichen. Dazu waren jeweils 20 µg Gesamtprotein aufgetragen worden. Die ca. zehnmal stärkere Bande im Kulturüberstand der stimulierten Kultur demonstriert deutlich, daß die, durch die Zugabe von SDS-HZW ins Wachstumsmedium bewirkte, 10-fache Stimulation der Curdlanase-Aktivität auf eine erhöhte Menge an Curdlanase zurückzuführen ist. Mit diesem Versuch konnte somit die unter C.2.1 gestellte Frage nach dem Grund der gesteigerten hydrolytischen Aktivität eindeutig beantwortet werden. Die Northern-Blot-Untersuchungen von Brönneke (1994) zeigen, daß die gesteigerte Aktivität von

Mutanolysin ebenfalls auf vermehrte Synthese des Enzyms zurückzuführen ist. Die Mutanolysin Synthese wird auf der transkriptionellen Ebene reguliert. Die Expression der Curdlanase scheint in gleicher Weise reguliert zu sein.

3.3 Hemmung der Aktivität durch Antikörper

Mit einem einfachen Versuch sollte getestet werden, ob die Epitope, gegen die die Antikörper gerichtet sind, kritisch sind für die Aktivität der Curdlanase. In einem quantitativen Aktivitätstest wurden 0,5 µg gereinigtes Enzym in Gegenwart von gereinigten IgGs untersucht. Erst ein zehnfacher Überschuß an IgGs (Anzahl der Moleküle) halbierte die Aktivität (Abb. 15). Diese Ergebnisse legten nahe, daß die IgGs weder an der Substratbindestelle noch am aktiven Zentrum binden.

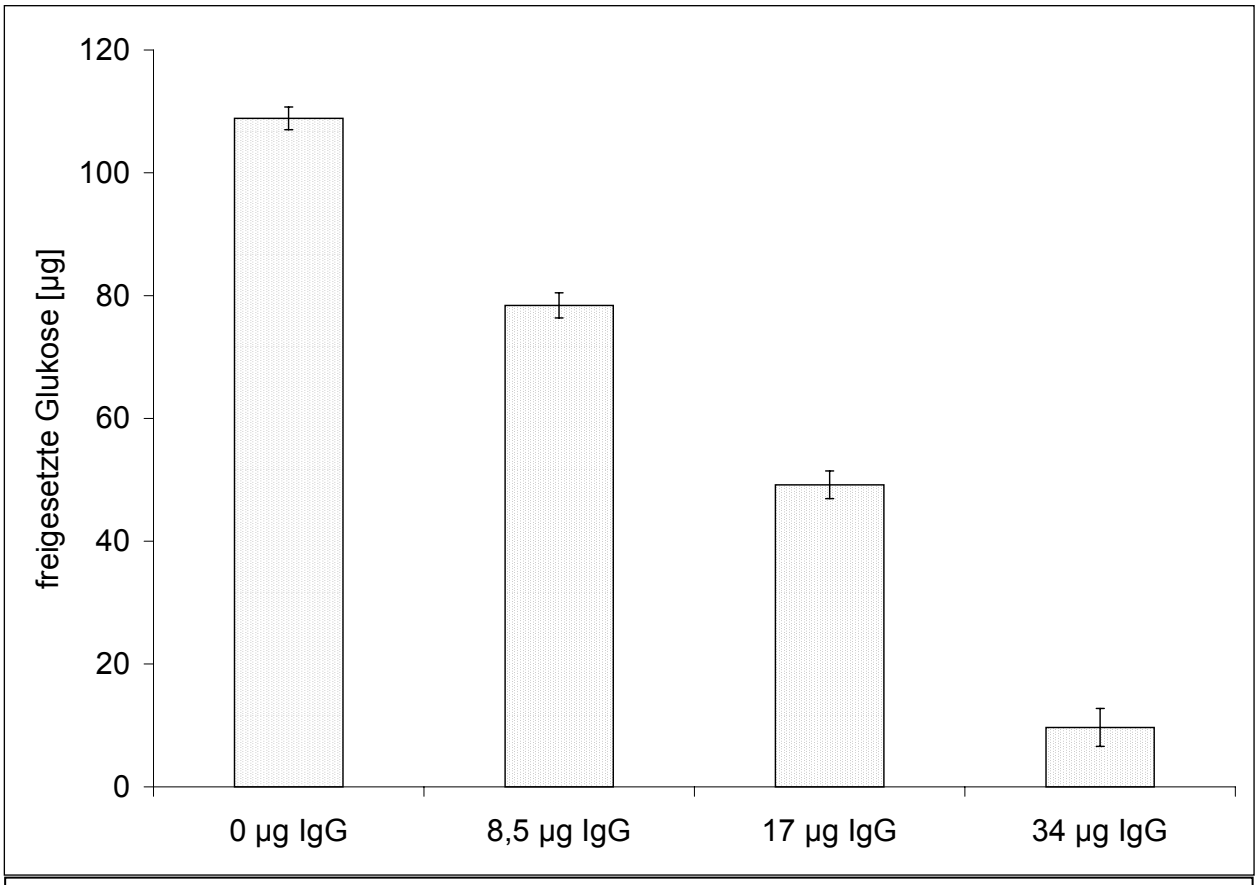


Abbildung 15: Hemmung der Aktivität der Curdlanase durch Antikörper
Dargestellt sind sind die Ergebnisse von Aktivitätstests in Gegenwart verschiedener Mengen IgG. Es wurden 0,5 µg gereinigtes Enzym eingesetzt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus fünf Parallen

3.4 Sequenzierung des Proteins

Mit Informationen über die Sequenz der Curdlanase sollte zum einen überprüft werden, ob ähnliche Proteine bereits beschrieben waren, zum anderen sollten sie benutzt werden das entsprechende Gen zu finden. Dies sollten die Vorraussetzungen sein, um die molekularen Vorgänge der Expression und der Induktion näher untersuchen zu können. Die Sequenzierungen wurden von Dr. Mentele in der Abteilung von Prof. Lottspeich (MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt. Für die N-terminale Sequenzierung wurden die Proteine auf PVDF-Membran geblottet und mit Coomassie-Blau gefärbt (B.4.9.1). Es erfolgte ein Edmanabbau.

Die N-terminale Sequenz wurde bestimmt zu: G T G V G P I E A G G D L G P N V H V F
Mit zusätzlichen internen Sequenzen sollten die Suchmuster verfeinert bzw. ausgedehnt werden. Zusammen mit der N-terminalen Sequenz bilden sie eine Klammer und der dazwischen liegende Bereich kann auf DNA-Ebene mit Hilfe von PCR amplifiert und anschließend sequenziert werden. Dazu wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel immobilisiert. Die Proteine wurden tryptisch verdaut. Folgende Sequenzen beginnend mit Lysin oder Arginin (Trypsin spaltet am Carboxylende beider Aminosäuren) wurden erhalten:

(K oder R) V F V P E K

(K oder R) GDVDGVRLAGLLIDAGTQN

(K oder R) AYDAPNQAAIQNGDTRGGYAAYK

Eine vierte Sequenz beginnend mit Asparagin lautet:

DVVWAGERGRTIFFQNEKAY

Diese Sequenz stimmt in den letzten drei Aminosäuren mit den ersten drei Aminosäuren der dritten der obigen Sequenzen überein. Dies ergäbe eine zusammenhängende Sequenz von 41 Aminosäuren und somit ein gut geeignetes Suchmuster beim Vergleich mit Sequenzen bereits veröffentlichter Enzyme. Alle Sequenzen wurden mit hinterlegten Sequenzen der Proteindatenbanken EMBL und Swissprot mit dem angebotenen BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1990) verglichen. Zu diesem Stadium der Arbeit lagen keine signifikanten Homologien vor.

3.5 Charakterisierung der Curdlanase

Da es sich bei der Curdlanase um ein noch nicht beschriebenes Enzym handelt, sollten deren Eigenschaften genauer untersucht werden. Wichtig sind dabei folgende Eigenschaften:

3.5.1 Charakterisierung der lytischen Aktivität

Polymere können entweder sukzessive von einem oder beiden Enden her abgebaut werden oder durch Spaltungen im Strang zerlegt werden. Um aufzuklären, auf welche Weise das β-(1,3)-Glukan der Hefezellwand hydrolysiert wird, wurden in Parallelansätzen 500 µg Curdlan (Sigma) in 1 ml Kulturüberstand bei 37°C inkubiert. Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten 10 µl-Proben entnommen. Die Ansätze wurden mittels Dünnschichtchromatographie (B.5.1) untersucht (Abb. 16). Nach 10 min Inkubation sind bereits verschieden lange Glukoseketten detektierbar. Mit Zunahme der Inkubationsdauer nimmt die Menge der langkettigen Moleküle immer mehr ab und die der kurzkettigen immer mehr zu, bis nach 80 min fast ausschließlich monomere Glukose zu sehen ist. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß das Glukanmolekül nicht von einem Ende her sukzessive um eine Glukoseeinheit verkürzt wird, sondern daß willkürlich innerhalb des Moleküls gespalten wird. Es handelt sich also beim gefundenen Exoenzym um eine Endo β-(1,3)-Glukanase.

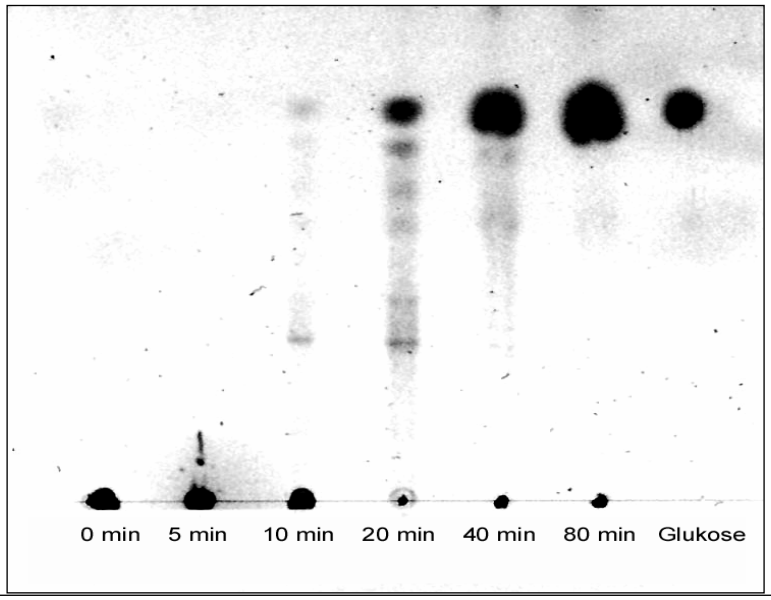


Abbildung 16: Charakterisierung der lytischen Aktivität der Curdlanase
500 µg Curdlan wurden verschieden lang mit Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus* inkubiert, über Kieselgel (P60, Merck) aufgetrennt und mit Phenol/Schwefelsäure sichtbar gemacht. Als Standard sind 50 µg Glukose aufgetragen

3.5.2 Allgemeine Charakterisierung des Enzyms

Das Enzym selbst wurde in vielerlei Hinsicht untersucht und die folgenden Kenngrößen ermittelt: Molekülgröße, Stabilität gegenüber SDS und Proteasehemmern, Langzeit-,Temperatur- und pH-Stabilität, Temperatur- und pH-Optimum und der K_M-Wert bzw. v_{max}.

Die apparente Molekülgröße des denaturierten Proteins wurde im SDS-PAGE zu 64 kDa bestimmt (vgl. Abb. 13). Das native Protein eluierte in der Gelfiltration bei ca. 68 kDa (beide Superdex 200 Säulen wurden mit Markerproteinen kalibriert). Diese Übereinstimmung deutet darauf hin, daß die Glukanase nativ als Monomer vorliegt. Der Curdlanblot (B.4.11) unterstützt diese Aussage.

Die Curdlanase kann nach SDS-Behandlung (15 min, 37°C in SDS-Probenpuffer für die Gelelektrophorese) sich selbst wieder richtig falten. Dies wurde beim Curdlanblot ausgenutzt, um nach einer SDS-PAGE Aktivität zu überprüfen. Nur auf Höhe von 64 kDa entstand eine entfärbte Bande (Abb. 13).

Zur kurzzeitigen Lagerung wurden Kulturüberstände bzw. Anreicherungen der Curdlanase mit Proteasehemmern vor Hydrolyse geschützt. Da die Omp-Decarboxylase von *Bacillus subtilis* bereits durch 1 mM PMSF vollständig gehemmt wird (Switzer und Quinn, 1993), wurden mehrere Proteasehemmer in unterschiedlichen Konzentrationen ausgetestet, ob sie die Curdlanase-Aktivität hemmen. Die Curdlanase reagiert unempfindlich gegenüber den getesteten Proteasehemmern Aprotinin (2 µg/ml), 10 mM PMSF, 500 mM EDTA, 20 mM Dipicolinsäure, 100 mM Iodacetamid und 500 µM Trypsin-Inhibitor (angegeben ist die maximale getestete Konzentration). In Gegenwart der angegebenen Substanzen konnte in Agarosediffusionstests keine Abnahme der Aktivität der Curdlanase beobachtet werden (nicht gezeigt). Die Aktivität der Curdlanase ist somit unabhängig von zweiwertigen Metallionen.

Es wurde auch überprüft, ob die Curdlanase nach drei Stunden unter den Bedingungen des turbidimetrischen Tests noch aktiv ist. Dazu wurden 15 µg Curdlanase unter Standardbedingungen 6 Stunden lang getestet. Einem zweiten Ansatz wurde nach 3 Stunden erneut SDS-HZW zugesetzt. Als Kontrolle wurde einem dritten Ansatz nach 3 Stunden zum ersten Mal SDS-HZW zugesetzt. Bei der Negativkontrolle wurde der Kulturüberstand vor dem Test 10 min bei 100°C inkubiert. Die Menge freigesetzter Glukose wurde nach 0, 3 und 6 Stunden gemessen

(B.4.10.2). Es zeigte sich, daß die Curdlanase unter diesen Bedingungen nach dreistündiger Inkubation eine etwas höhere Aktivität aufweist (Abb. 17).

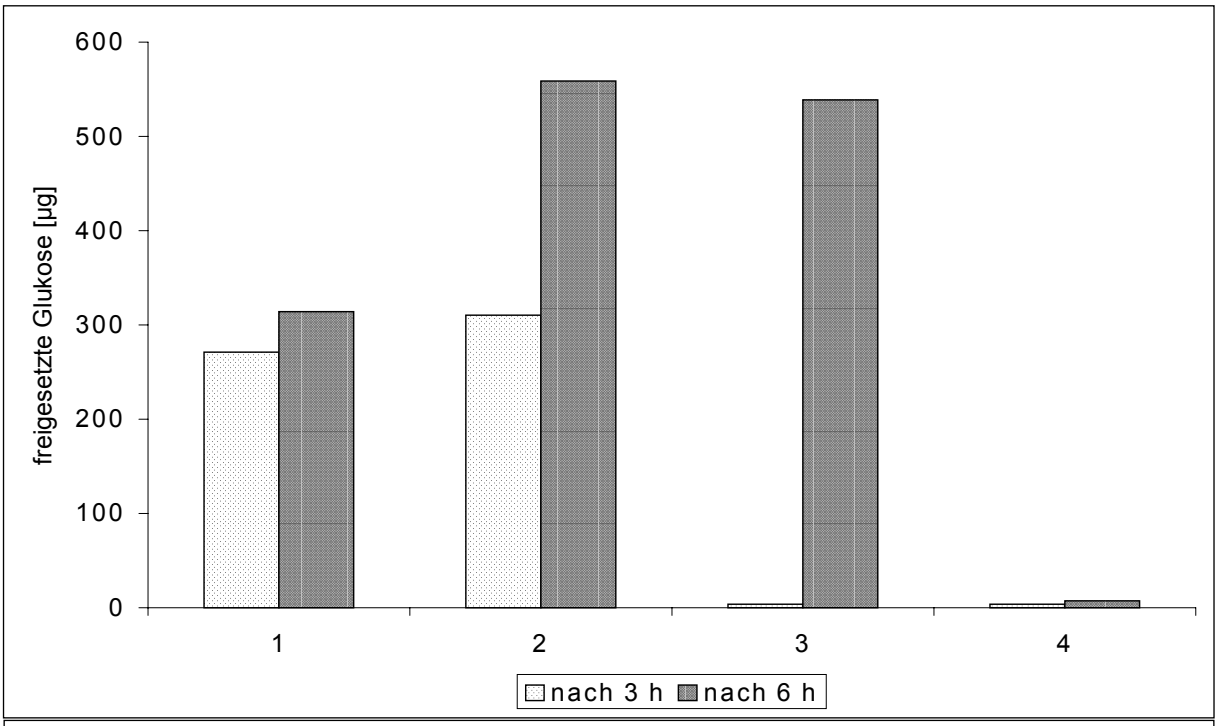


Abbildung 17: Langzeitstabilität der Curdlanase
Dargestellt ist die Aktivität der Curdlanase nach drei bzw. sechs Stunden bei 37°C. Die Probe 1 ist ein Standardansatz, bei 2 wurde nach drei Stunden erneut SDS-HZW zugegeben. Bei Probe 3 wurde erst nach 3 Stunden SDS-HZW zugegeben. Die Probe 4 war die Negativkontrolle

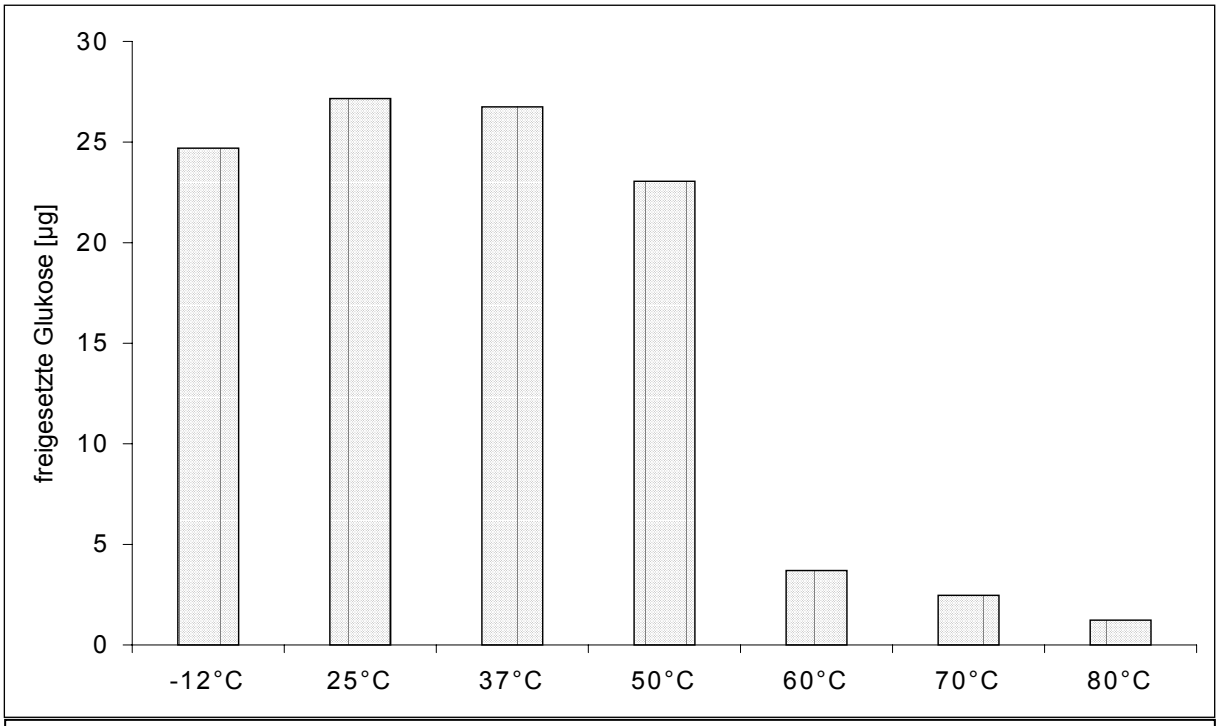


Abbildung 18: Temperaturstabilität der Curdlanase
Die Ansätze wurden bei angegebenen Temperaturen 60 min inkubiert und anschließend bei 37°C auf Aktivität getestet. Dargestellt sind die Ergebnisse der qualitativen Aktivitätstest

Unter den Bedingungen des turbidimetrischen Tests (37°C, pH 6,8) ist die Curdlanase länger als 3 Stunden stabil, wie die Ansätze 2 und 3 der Abb. 17 deutlich zeigen.

Zur Bestimmung der Stabilität über einen weiten Temperaturbereich, der auch die des natürlichen Standortes umfaßt, wurden 1 µg gereinigter Curdlanase 60 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Anschließend wurden alle Ansätze im Wasserbad auf 37°C eingestellt. Dann erfolgte der quantitative Aktivitätstest (B.4.10.2) (Abb. 18).

Eine einstündige Inkubation der Curdlanase beeinträchtigt deren Aktivität über den gesamten Temperaturbereich von –12°C bis 50°C kaum. Erst Temperaturen über 50°C führen zu drastischen Aktivitätseinbußen. Selbst das Einfrieren und anschließendes Auftauen schadet dem Enzym nicht.

Die Stabilität der Curdlanase gegenüber einem weiteren wesentlichen biochemischen Kriterium, der Wasserstoffionenkonzentration, wurde ebenfalls untersucht. Zur Bestimmung wurde 1 µg Curdlanase bei 37°C und den angegebenen pH-Werten in Glycin/HCl-, 0,1 M Phosphat- bzw. Glycin/NaOH–Puffer 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit Hilfe von Zentrifugiereinheiten (Mikrokon, 10K) umgepuffert, um die Aktivität aller Ansätze unter gleichen Bedingungen (0,1 M MES pH 6,7, 37°C) zu messen.

Wie der Abbildung 16 zu entnehmen ist, ist die Curdlanase bei einem pH-Wert von ca. 7 am stabilsten. Bei einer niedrigeren Wasserstoffionenkonzentration existiert bei ca. pH 10 ein zweites Stabilitätsmaximum, das aber niedriger liegt als das Hauptmaximum. Außerhalb des pH-Bereichs zwischen 5 und 10 verliert die Curdlanase sehr deutlich ihre Aktivität.

Nachdem die Grenzen der Stabilität der Curdlanase bzw. ihrer Aktivität abgesteckt waren, wurden die optimalen Bedingungen für die Aktivität der Curdlanase bestimmt.

Das Temperaturoptimum wurde bei sechs definierten Temperaturen in einem Bereich von 15°C bis 50°C getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 gezeigt. Die gemessene Aktivität steigt mit Zunahme der Temperatur, wobei der Anstieg allerdings ab 37°C unter diesen Bedingungen immer geringer wird. Es konnte kein singuläres Maximum festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der abnehmenden Stabilität der Curdlanase bei steigenden Temperaturen wurde als Temperaturoptimum 40°C festgelegt.

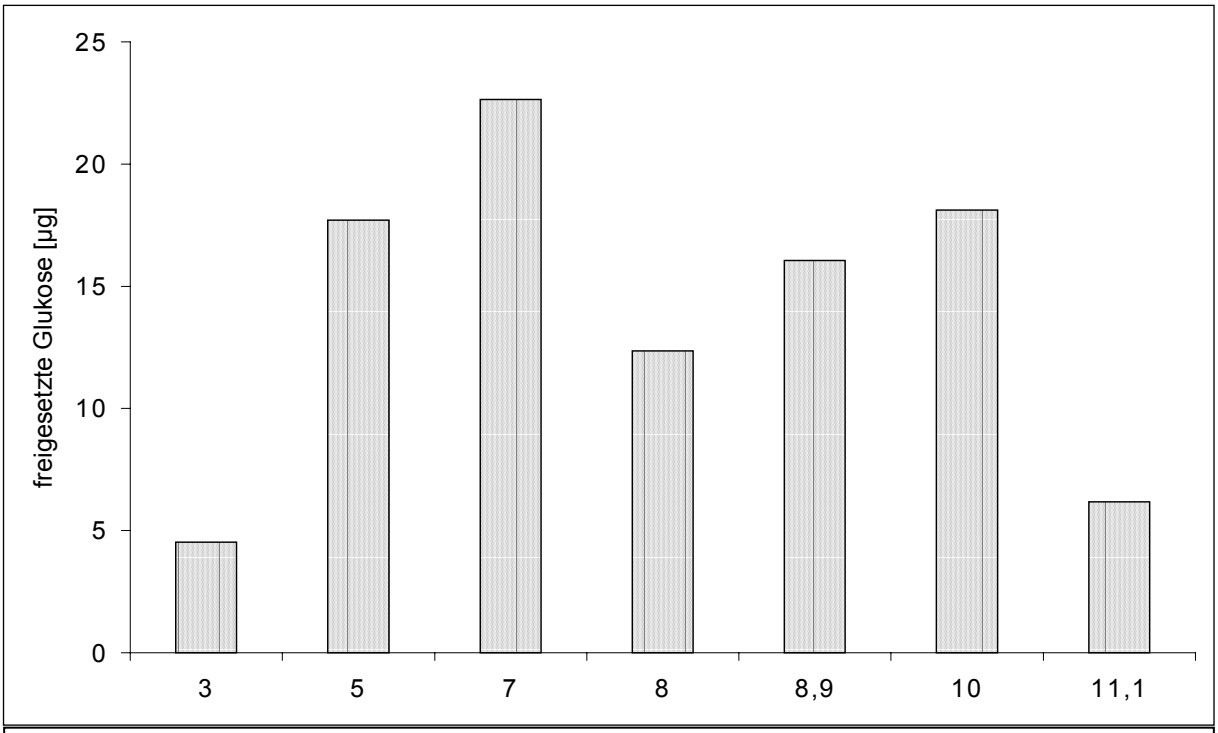


Abbildung 19: pH-Stabilität der Curdlanase
Dargestellt sind die Ergebnisse der Aktivitätstests durchgeführt in 0,1 M MES pH 6,7, nachdem die Proben für 60 min in einem Puffer mit angegebenen pH präinkubiert worden waren

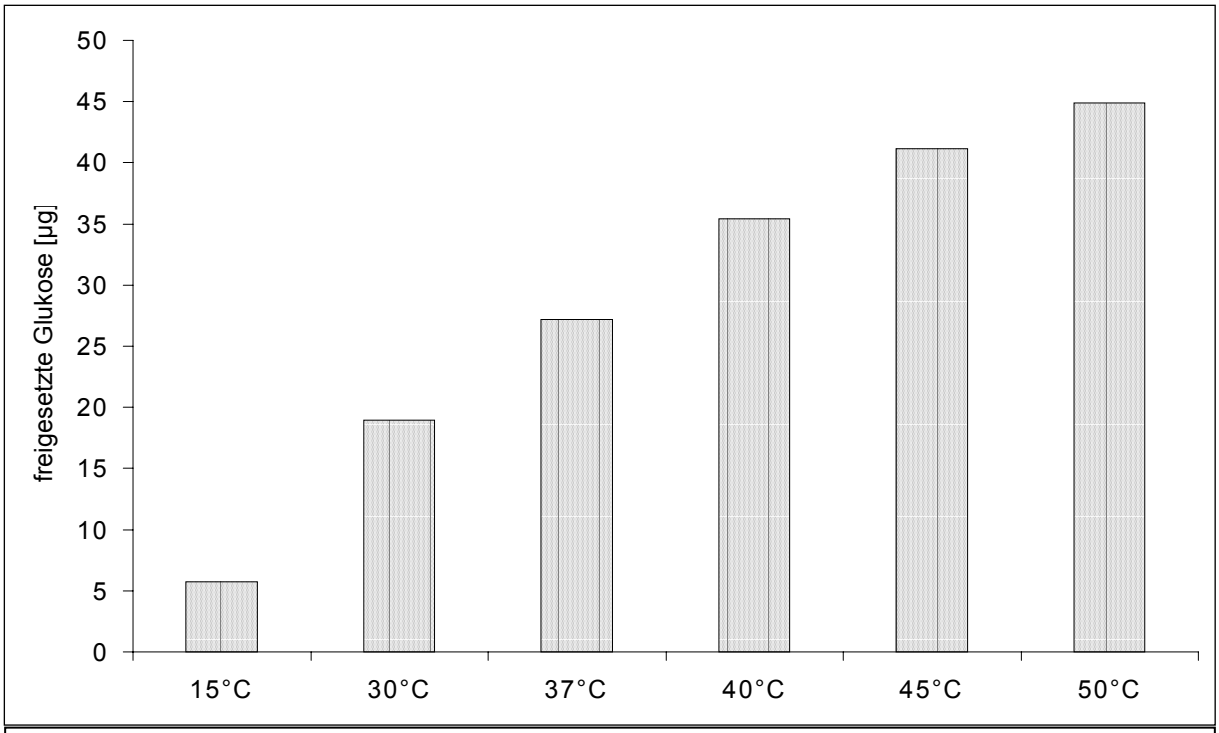


Abbildung 20: Temperaturoptimum der Curdlanase
Dargestellt sind die Ergebnisse der qualitativen Aktivitätstests. Sie wurden bei den jeweils angegebenen Temperaturen durchgeführt

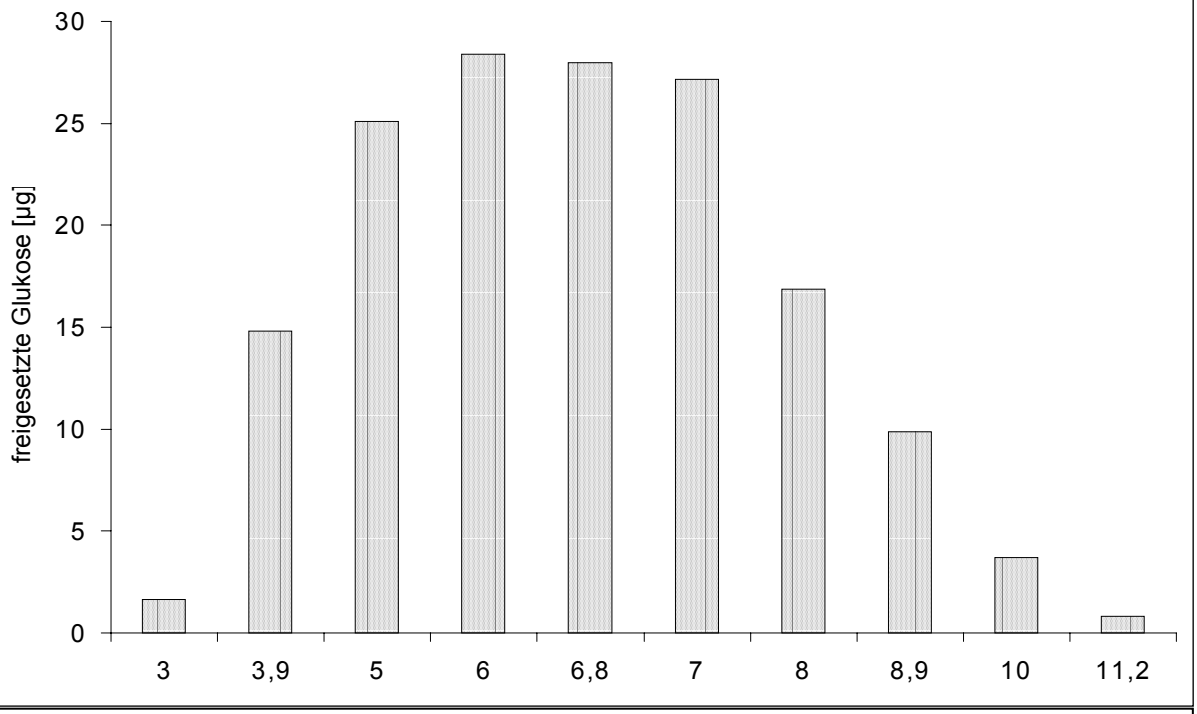


Abbildung 21: pH-Optimum der Curdlanase
Dargestellt sind die Ergebnisse der enzymatischen Aktivitätstests, die bei den angegebenen pH-Werten durchgeführt worden waren

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden Aktivitätstests bei pH-Werten von 3 bis 11,2 durchgeführt. Damit sind beide Stabilitätsmaxima abgedeckt. Abbildung 18 zeigt die gemessenen Aktivitäten. Ihr ist zu entnehmen, daß das pH-Optimum sehr breit ist und zwischen 5 und 7 liegt. Bei niedrigen Wasserstoffionenkonzentrationen ist die Curdlanase zwar stabil (Abb. 19), weist aber keine Aktivität auf.

Unter Beachtung dieser Ergebnisse wurden die Messungen zur Bestimmung der kinetischen Daten unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

40°C, pH 6,7, 3 h in 0,1 M MES-Puffer.
Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit wurden in Vorversuchen die geeigneten Enzym- und Substratkonzentrationen ermittelt, so daß eine Verdopplung der Enzymzugabe eine Verdopplung der Aktivität - gemessen als freigesetzte Glukose - bewirkte. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen sind in Abbildung 22 als Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt.

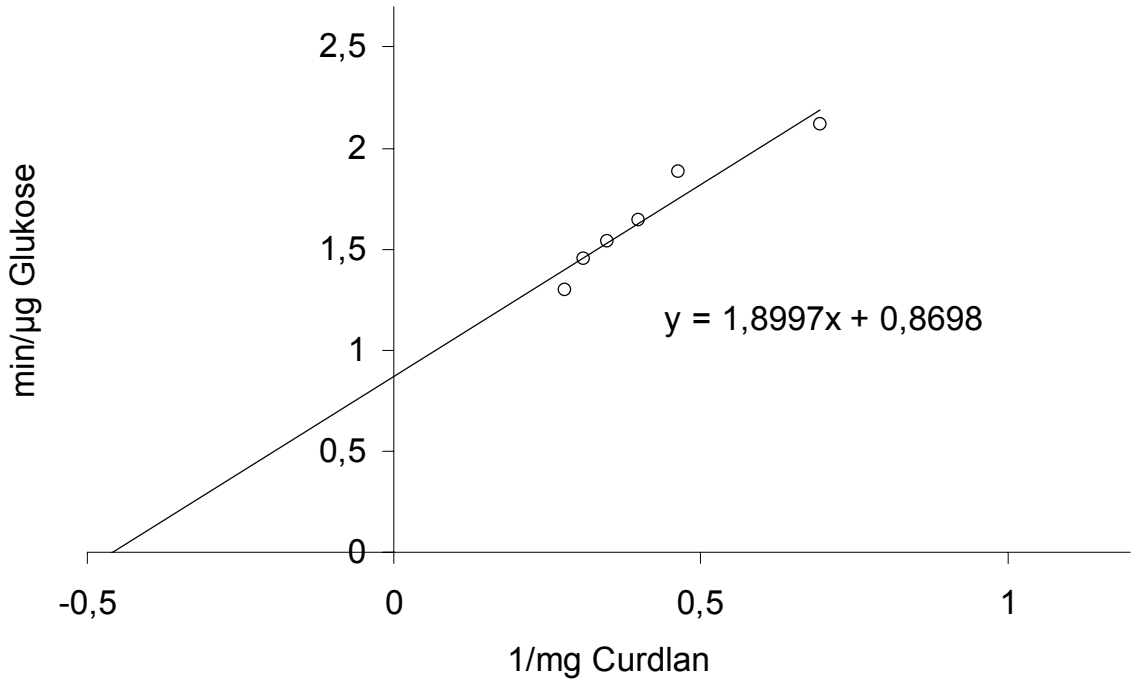


Abbildung 22: Bestimmung von K_M und v_{max} der nativen Curdlanase
Lineweaver-Burk Darstellung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. Die Kennwerte K_M und v_{max} wurden mit Hilfe der Formel für die Ausgleichsgerade errechnet (s. Text)

Die in Abbildung 22 gezeigten Meßwerte ergeben eine Ausgleichsgerade mit einem Bestimmtheitsmaß von R^2=0,925. Daraus läßt sich für die Curdlanase von *Streptomyces globisporus* ein K_M-Wert von 2,2 mg Curdlan errechnen. Die Angabe des K_M-Wertes erfolgte in mg Substrat, weil eine Angabe der Molarität von Polymeren nur ungenau erfolgen kann (schlechte Löslichkeit, verschiedene Kettenlängen). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 2,5 mmol Glukose/min x mg Protein wurde ebenfalls mit Hilfe der Ausgleichsgerade ermittelt.

4 Regulation der Expression der Curdlanase

Der nächste große Themenkomplex war die Regulation der Expression der Curdlanase. Damit in Zusammenhang stehende Fragen konnten nun gestellt werden, da mit den Antikörpern und dem quantitativen Aktivitätstest unter bekannten, optimalen Bedingungen geeignete Nachweismöglichkeiten zur Verfügung standen.

4.1 Zeitpunkt der Exkretion der Curdlanase

Als erstes sollte der Zeitpunkt ermittelt werden, ab dem die Curdlanase exkretiert wird. *Streptomyces globisporus* wurde sowohl unter stimulierenden als auch unter nicht stimulierenden Bedingungen in je drei Parallelen für 1, 2, 3 und 4 Tage inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde jeweils der Kulturüberstand gewonnen und auf Lyse von SDS-HZW untersucht. Die Meßergebnisse sind in Abb. 23 gezeigt.

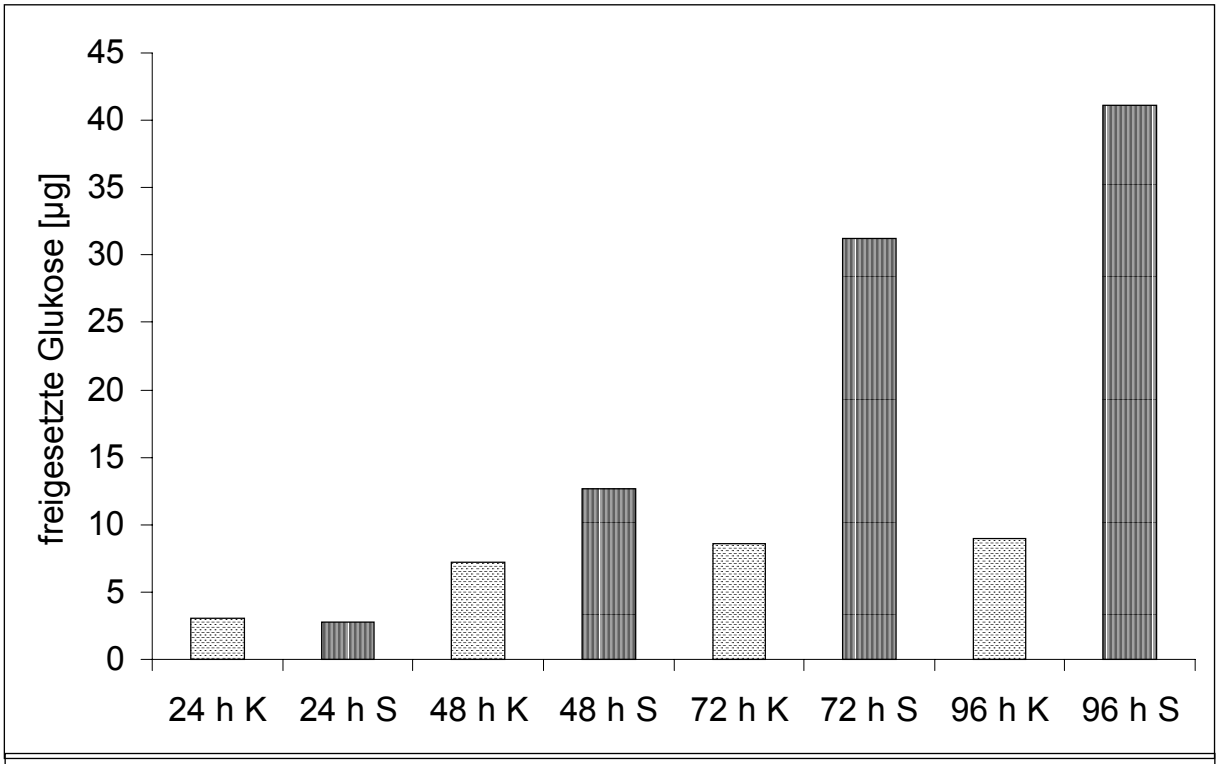


Abbildung 23: Zeitpunkt der Exkretion der Curdlanase
Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Aktivitäten der Kulturüberstände verschieden lang gewachsener *Streptomyces globisporus*-Kulturen. Die hellen Säulen stehen für unstimulierte Kulturen (K), die dunklen für stimulierte (S)

Es zeigte sich, daß die unstimulierten Kulturen (ohne Zugabe von SDS-HZW) nach drei Tagen maximale Aktivität entwickelten. Die Zugabe von SDS-HZW ins Medium erhöhte die Exkretion des lytischen Enzyms um das Mehrfache. Erst während des vierten Tages nahm die Steigerung der Exkretion langsam ab, ohne das Maximum erreicht zu haben. Diese Daten sprechen dafür die Expression der Curdlanase dem Sekundärmetabolismus zuzuordnen. Diese Folgerung wird abgesichert durch die Beobachtung, daß die Sporulation, ein Vorgang, der oft mit der Sekundärstoffproduktion gekoppelt ist (Chater, 1983), nach drei Tagen einsetzte.

Vorversuche hatten gezeigt, daß im Zytoplasma von *Streptomyces globisporus* keine meßbare Aktivität der Curdlanase zu finden sind. Daraus läßt sich folgern, daß der

Zeitpunkt der gemessenen Exkretion auch der Zeitpunkt der Expression ist. Dies ist ein weitere Hinweis darauf, daß die Regulation dieses Enzyms auf Transkriptionsebene erfolgt.

4.2 Katabolit-Repression

Im Zusammenhang mit den vorstehenden Untersuchungen wurden auch das Wachstum von *Streptomyces globisporus* und die Menge der noch nicht abgebauten SDS-HZW verfolgt. Dazu wurde dreimal 100 ml NMMP-Glycerin mit 0,5% SDS-HZW mit Sporen von *Streptomyces globisporus* beimpft. Diesen Parallelkulturen wurden morgens und abends 1 ml Proben entnommen und sowohl das Gesamttrockengewicht als auch der Anteil der SDS-HZW am Gesamttrockengewicht (B.4.4.4) bestimmt. Aus der Differenz Gesamttrockengewicht minus Hefezellwandanteil wurde die Zellmasse errechnet. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 24 dargestellt.

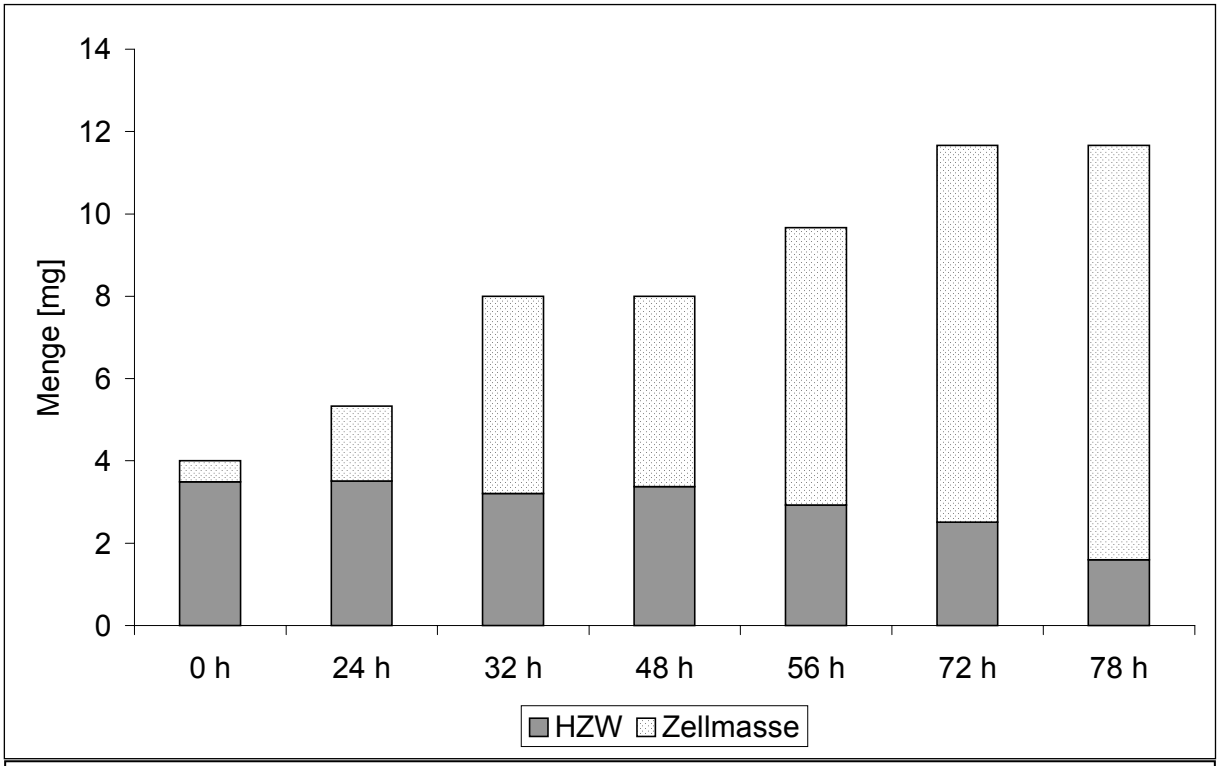


Abbildung 24: Wachstum von *Streptomyces globisporus*
Dargestellt sind der Anteil der SDS-HZW am Gesamttrockengewicht (graue Säulen) und das Trockengewicht der gewachsenen *Streptomyces globisporus*-Zellen (gepunktete Säulen) unterschiedlich lang inkubierter Kulturen

Wie aus der Abbildung 24 ersichtlich ist, bleibt die Menge an SDS-HZW bis 48 h nach Beimpfen konstant. Erst danach nimmt sie kontinuierlich ab. Daraus ist zu folgern, daß ab diesem Zeitpunkt Curdlanase sekretiert wird. Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die Curdlanase dem Sekundärmetabolismus zuzuordnen ist. Die Entwicklung der Zellmasse läßt ein diphasisches Wachstum erkennen. Zwischen 32 h und 48 h verringert sich die Wachstumsgeschwindigkeit. Diese Wachstumspause ist mit Beobachtungen von Neumann et al. (1996) in Einklang zu bringen. In dieser Arbeit wird diese Pause als Entscheidungsphase bezeichnet, während der die ersten regulatorischen Umstellungen in Richtung Sekundärstoffwechsel gestellt werden. Nach 72 h verlangsamt sich das Wachstum erneut, die Kultur geht in die stationäre Phase über.

Zusätzlich zu den Bestimmungen der Trockenmassen wurde der Glukosegehalt und die Curdlanase-Aktivität im Kulturüberstand bestimmt. In der Tabelle 6 sind die erhaltenen Werte zusammengestellt.

Alter der Kultur	**0 h**	**24 h**	**32 h**	**48 h**	**56 h**	**72 h**	**78 h**
Glukose im Kulturüberstand **[mg]**	1,38	1,37	1,40	1,36	0,41	0,12	0
Aktivität der Curdlanase im Kulturüberstand **[µg]**	0	0	0	0,60	1,13	5,08	14,68

Tabelle 6: Zusammenhang von vorhandener Glukose im Kulturüberstand und Aktivität sekretierter Curdlanase im Kulturüberstand
Die Glukose im Medium wurde mit GC bestimmt. Die Curdlanase-Aktivität wurde im enzymatischen Aktivitätstest als freigesetzte Glukose bestimmt. Diese Glukose stammt nicht vom Kulturüberstand, sondern von hydrolysierter SDS-HZW, die im Aktivitätstest zugesetzt war

Trotz glukosefreien Grundmediums wurde im Medium bereits zu Beginn des Wachstums von *Streptomyces globisporus* Glukose detektiert. Diese Verunreinigungen im Medium störten aber den Versuch nicht, im Gegenteil der Effekt der Glukoseabnahme hätte sonst nicht festgestellt werden können. Durch die enzymatische Lyse der SDS-HZW hätte der Glukosegehalt im Medium zunehmen müssen. Tatsächlich nahm der Glukosegehalt ab, und zwar ab dem dritten Tag, als die Lyse der SDS-HZW zunahm (vgl. Tab. 6). In dem Maße, in dem die meßbare Aktivität der sekretierten Curdlanase stieg, nahm die Glukosekonzentration im Medium ab. Es kam also nicht zu einer Anreicherung von Glukose im Medium, sondern zu einer Glukoseabnahme. Es ist davon auszugehen, daß durch Curdlanase-Aktivität produzierte Glukose sofort von *Streptomyces globisporus*

aufgenommen und verstoffwechselt wird. Auch die im Medium vorliegende Glukose wurde ab diesem Zeitpunkt verstärkt aufgenommen. Nach 78 h war der meßbare Glukosegehalt im Medium Null (Tab. 6). Die Glukosekonzentrationen, die im Laufe des Wachstums vorgelegen haben lösten keine Katabolit-Repression aus.

Daß die Expression der Curdlanase tatsächlich aber einer Katabolit-Repression unterliegt, ist in Abb. 25 gezeigt. Zugabe von 47 mg Glukose (diese Menge entspricht der Glukosemenge, die in 100 mg SDS-HZW enthalten ist) in 10 ml Minimalmedium reprimiert die Expression der Curdlanase fast vollständig. Wenn aber die Menge an Glukose halbiert wurde und gleichzeitig 50 mg SDS-HZW zugegeben wurden, war die Expression der Curdlanase gegenüber der Kontrolle dreifach erhöht. Wurde nur SDS-HZW zugesetzt, war die Curdlanase gegenüber der Kultur ohne Zusätze fünffach gesteigert.

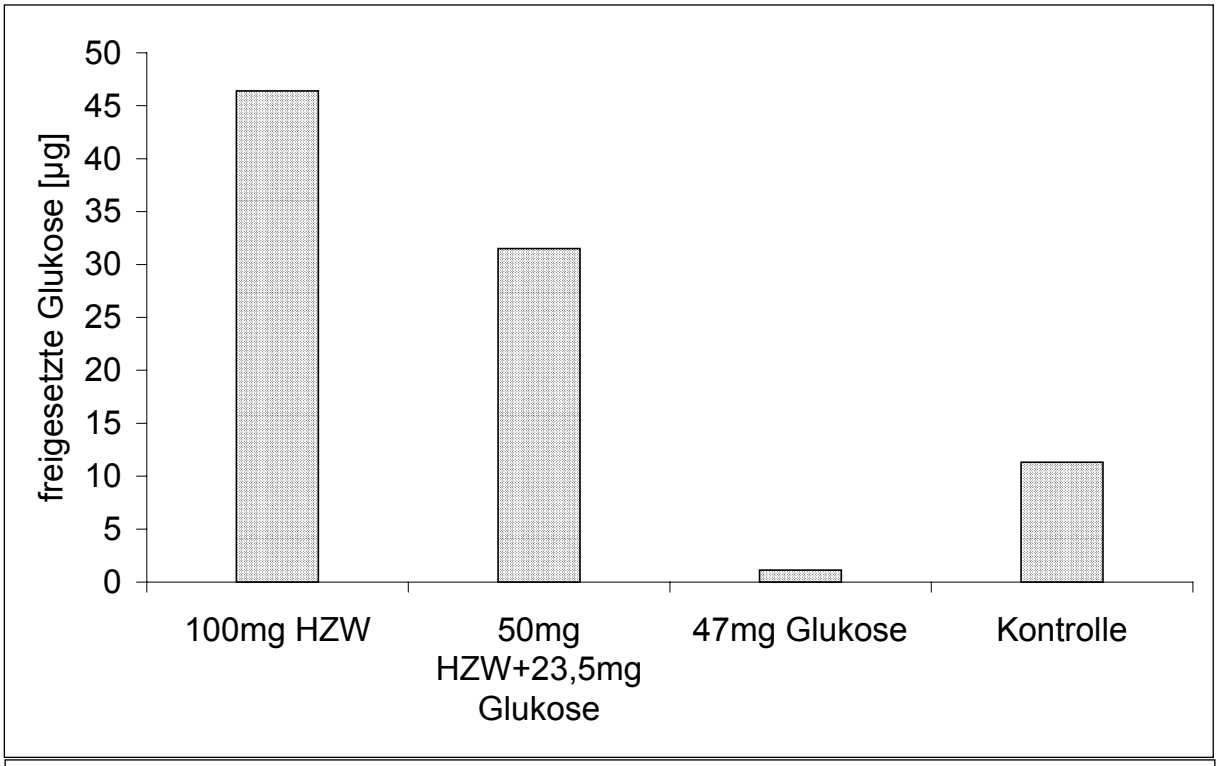


Abbildung 25: Aktivität von Curdlanase in Abhängigkeit von Glukose und HZW im Medium
Dargestellt sind die gemessenen Aktivitäten von Curdlanase in Kulturüberständen von *Streptomyces globisporus*-Kulturen, die mit verschiedenen Medienzusätzen gewachsen waren. Die Kontrolle wuchs ohne Zusätze

Dies ist kein „Alles oder nichts“- Effekt. Es scheint ein gewisses Limit der Glukosekonzentration notwendig zu sein, um als Signal für die Katabolit-Repression auszureichen. Um dieses Limit annähernd zu bestimmen wurde *Streptomyces globisporus* in 10 ml NMMP-Glycerin unter stimulierenden Bedingungen (Zugabe von

50 mg SDS-HZW), aber zusätzlich mit verschiedenen Mengen an Glukose im Medium angezogen. Das Gesamttrockengewicht, der Anteil der SDS-HZW und die Aktivität im Kulturüberstand wurden jeweils bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 26 zusammengefaßt. Am besten wuchs *Streptomyces globisporus* in Gegenwart von 100 mg Glukose. Bei 50 mg Glukose war die Zellmasse etwas geringer, in beiden Fällen war die Menge der SDS-HZW fast identisch und die gemessene Aktivität im Bereich der nicht stimulierten Kontrollkultur. Drastisch verändert waren die Verhältnisse bei 10 mg Glukose im Medium. Die SDS-HZW hatte deutlich abgenommen und die Aktivität war um den Faktor 6,5 erhöht. Der vermutete Schwellenwert liegt demzufolge zwischen 10 mg und 50 mg Glukose in 10 ml Medium. Erst wenn die Glukosekonzentration über diesem Schwellenwert liegt, ist das Signal für die Katabolit-Repression stark genug, um ausgelöst zu werden.

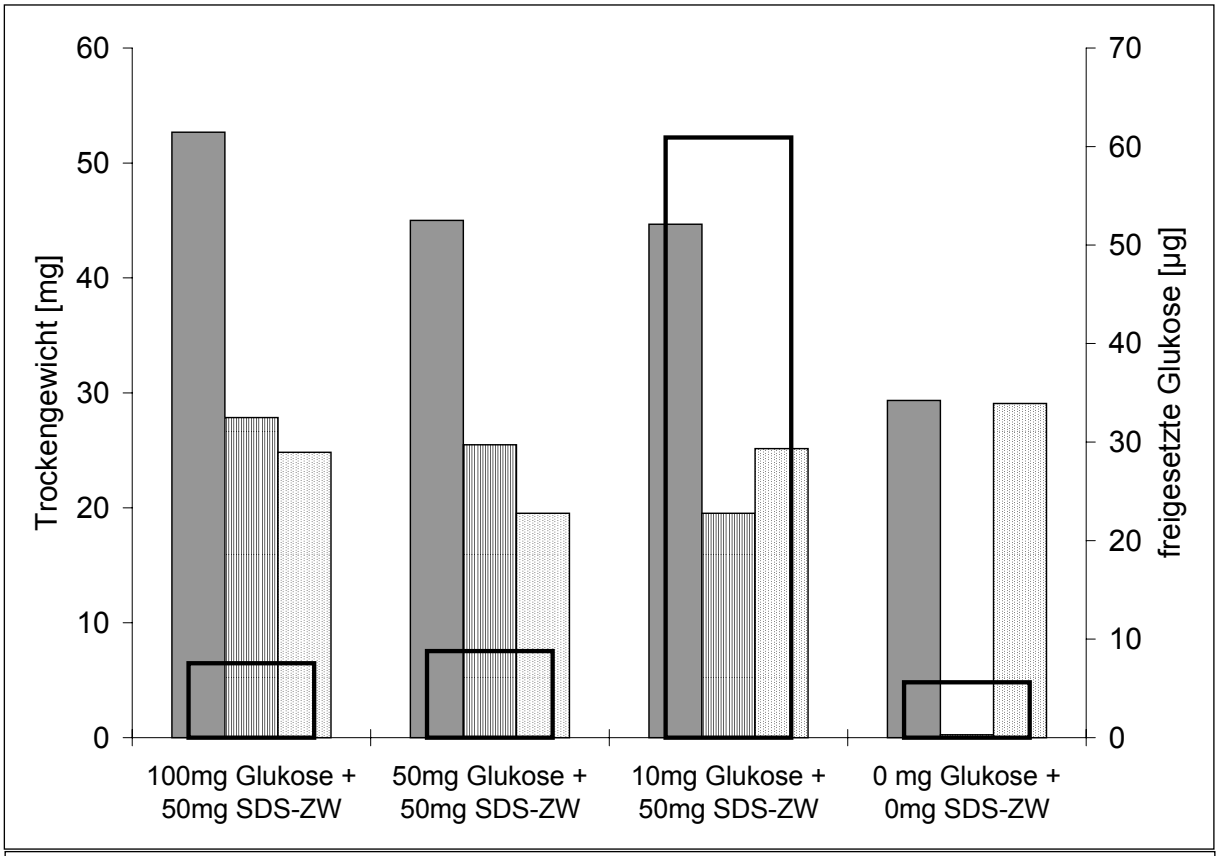


Abbildung 26: Bestimmung des Schwellenwertes für die Katabolit-Repression
Mit SDS-HZW stimulierte Kulturen von *Streptomyces globisporus* wurden in Gegenwart unterschiedlicher Mengen an Glukose inkubiert. Dargestellt sind das Gesamttrockengewicht in mg (dunkelgraue Säulen), der SDS-HZW-Anteil in mg (hellgraue Säulen), die berechnete Menge an Trockengewicht der Zellen von *Streptomyces globisporus* in mg (weiße Säulen) und die im Kulturüberstand gemessene Aktivität in µg (transparente, dickumrahmte Säulen). Als Kontrolle diente eine Kultur, die ohne Zusätze im Medium inkubiert wurde

4.3 Mutagenese von Streptomyces globisporus

Um die Regulation der Expression der Curdlanase oder der Exoenzyme im allgemeinen besser untersuchen zu können (z. B. ist die Curdlanase enzymspezifisch oder global reguliert) wurden Sporen von *Streptomyces globisporus* mutagenisiert. Zur Erzeugung von Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind Curdlan abzubauen, wurden zwei Verfahren angewendet.

4.3.1 UV-Licht:

Die physikalische Methode beruht auf der mutagenen Wirkung von ultraviolettem Licht, vor allem der Bildung von Pyrimidindimeren. Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen wurden Wellenlänge, Bestrahlungsstärke und Bestrahlungslänge variiert (B.7.1.1). Bei einer Wellenlänge von 206 nm, einer Bestrahlungsstärke von 6 µA und einer Bestrahlungsdauer von 3 min wurden 95 % der Sporen abgetötet. Bei dieser Abtötungsrate konnte davon ausgegangen werden, daß die überlebenden Sporen mit hoher Wahrscheinlichkeit mutagenisiert waren (Brackhage, A., Ludwig Maximilians Universität München, Institut für Genetik und Mikrobiologie; persönliche Mitteilung). Unter diesen Bedingungen wurden Sporen von *Streptomyces globisporus* bestrahlt und anschließend auf RBB-Curdlan Agarplatten ausplattiert und bebrütet. Mutanten im Curdlanabbau bildeten keinen Lysehof aus. Rund um eine gewachsene Kolonie blieb der Agar blau. Von 1000 untersuchten Kolonien zeigten drei keinen Lysehof. Diese Kolonien wurden gepickt und in Flüssigmedium (B.2.1.3) angezogen. Der Kulturüberstand dieser Kulturen wurde auf Curdlan- bzw. Hefezellwandabbau hin untersucht. Bei allen drei Kulturen konnte im Kulturüberstand spezifische Aktivität der Curdlanase nachgewiesen werden. Diese Mutationen waren offenbar nicht stabil.

4.3.2 NG (1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin)

Die chemische Methode nützt die DNA-alkylierende Wirkung von NG aus (Madigan, 1997). Unter alkalischen Bedingungen wurden Sporen von *Streptomyces globisporus* mit NG vorbehandelt und anschließend verschieden lang inkubiert (B.7.1.2). Die Inkubation von 6 h bei 30°C entsprach einer letalen Dosis von 99%. Derart behandelte Sporen wurden auf RBB-Curdlan-Agarplatten inkubiert. Kolonien, die keinen Lysehof bildeten, wurden in Flüssigkultur angezogen und auf die Fähigkeit, Curdlan bzw. Hefezellwand zu lysieren, überprüft. 3 von 505 kontrollierten Kolonien zeigten keinen Lysehof auf den RBB-Curdlan-Agarplatten. In Flüssigkultur konnte in allen drei Fällen wiederum spezifische Aktivität der Curdlanase nachgewiesen

werden. Auch diese Mutanten revertierten anscheinend zum Wildtyp, zumindest in Bezug auf Curdlanase-Aktivität.

Es konnte mit beiden Methoden trotz des erheblichen Aufwandes keine stabile Mutante erzeugt werden. Aus zeitlichen Gründen wurden diese Versuche nicht mehr weiterverfolgt.

5 Suche nach Curdlanase-Aktivität bei anderen Organismen

Andere Streptomyceten, vor allem *Streptomyces coelicolor*, von dem eine fast komplette Cosmidbank vorliegt (John Innes Institute, Norwich, UK), wurden auf Curdlanase-Aktivität getestet. Zusätzlich wurde auch *Cellulomonas cellulans*, von dem bekannt ist, daß er Hefen lysieren kann (Shen, 1991), in die Testreihe aufgenommen.

5.1 Cellulomonas cellulans

Cellulomonas cellulans wurde in folgenden Medien (B.3.2) angezogen: DSM 65 mit und ohne Zugabe von 4% Stärke, NMMP-Glycerin, NMMP-Arabinose, NMMP-Asparagin, NMMP-Mannit, NMMP-Saccharose, NMMP-Stärke und NMMP-Glukose in verschiedenen Konzentrationen (0,3%, 0,03%, 0,003%).

Wachstum konnte nur in DSM 65 mit Stärke und in allen NMMP-Glukose Ansätzen erreicht werden. Sehr langsam wuchs *Cellulomonas cellulans* noch in DSM 65 ohne Stärke und in NMMP-Stärke. Dies konnte aber für keine Experimente ausgenutzt werden. Beim Wachstum in DSM 65 mit Stärke reicherte sich sehr viel Glukose im Medium an, dieser Ansatz schied deshalb für Curdlanase-Aktivitätsmessungen aus.

Aus diesen Gründen wurde *Cellulomonas cellulans* in NMMP mit 0,003%, 0,03% und 0,3% Glukose angezogen und der Kulturüberstand gewonnen (B.3.2). Zusätzlich wurden in Parallelansätzen den Medien 50 mg SDS-HZW zugesetzt, um klären zu können, ob unter stimulierenden Bedingungen konstitutiv gebildete Curdlanase oder andere hefelytische Enzyme vermehrt produziert und exkretiert werden.

Der turbidimetrische Test ergab nur für die Ansätze mit 0,03% Glukose leicht erhöhte Werte (Absorptionsabnahme von 0,1; zum Vergleich: bei *Streptomyces globisporus* lagen diese Werte bei 0,5 und mehr). Der enzymatische Test zeigte in allen Ansätzen, daß durch enzymatische Aktivitäten im Kulturüberstand keine Glukose freigesetzt wurde. *Cellulomonas cellulans* sekretiert offenbar keine Curdlanase.

5.2 Streptomyceten

Neben *Streptomyces lividans*, *Streptomyces flavofuscus*, *Streptomyces HZ1* (ein Eigenisolat von H. Zöller (1992)) wurden *Streptomyces coelicolor A3(2)* und *M145* (dieser Stamm ist ein plasmidfreier A3(2), von dem am John Innes Institut die oben genannte Cosmidbank hergestellt wurde) untersucht. Zum Teil wuchsen die Stämme nicht auf dem Medium NMMP-Glycerin, es mußte deshalb auf das Yokogawa-Medium ausgewichen werden. Dies zog die Notwendigkeit nach sich, die Proteine der Kulturüberstände vor den Aktivitätstests mit Ammoniumsulfat (B.7.4) auszufällen und die Proteinlösung zu entsalzen (B.7.3.2). Alle Stämme wurden auch in Gegenwart von 0,5% SDS-HZW angezogen, um eine etwaige Stimulierbarkeit zu überprüfen. Bei allen untersuchten Streptomyceten konnte Curdlanase-Aktivität gezeigt werden, vor allem bei *Streptomyces flavofuscus* und dem Eigenisolat *Streptomyces HZ1*. Die Aktivität in diesen beiden Stämmen konnte auch erheblich durch die Zugabe von 0,5% SDS-HZW ins Medium gesteigert werden (Abb. 27).

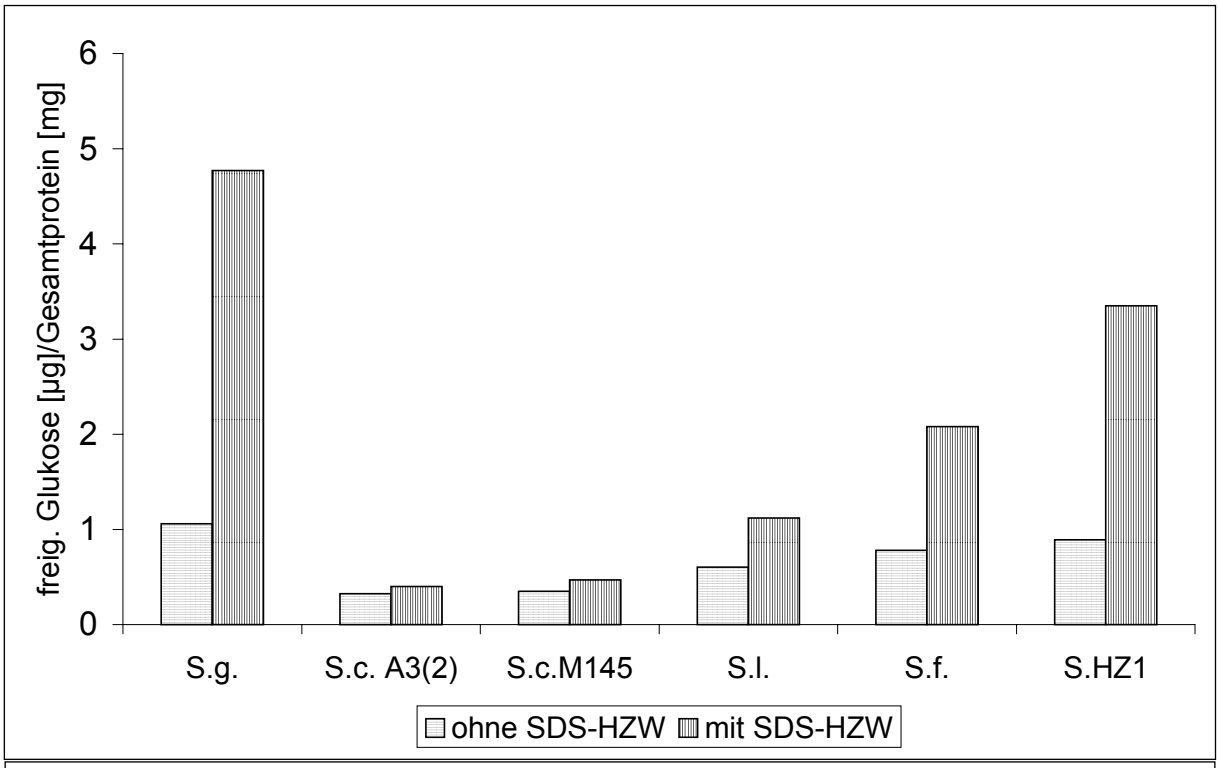


Abbildung 27: Vergleich von Curdlanase-Aktivität bei verschiedenen Streptomyceten
Dargestellt sind die auf Gesamtproteingehalt normierten Aktivitäten verschiedener Streptomyceten, die ohne bzw. mit Zusatz von SDS-HZW gewachsen waren. Normiert bedeutet, daß die im enzymatischem Test gemessene Menge freigesetzter Glukose durch die Gesamtproteinkonzentration des Kulturüberstandes dividiert wurde. S.g. = *Streptomyces globisporus*, S.c.A3(2) = *Streptomyces coelicolor A3(2)*, S.c.M145 = *Streptomyces coelicolor M145*, S.l. = *Streptomyces lividans*, S.f. = *Streptomyces flavofuscus*, S.HZ1 = *Streptomyces HZ1*

Mit den Kulturüberständen der stimulierten Kulturen wurden zusätzlich Westernblots durchgeführt. Eine Kreuzreaktion mit den Antikörpern, die gegen die gereinigte Curdlanase von *Streptomyces globisporus* gerichtet sind, konnte jedoch nur bei den beiden *Streptomyces coelicolor* Stämmen A3(2) und M145 detektiert werden (Abb. 28).

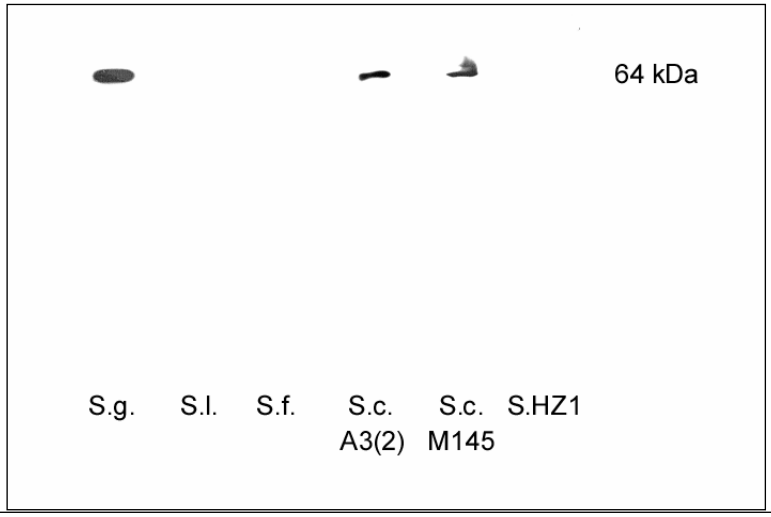


Abbildung 28: Westernblot mit Kulturüberständen verschiedener Streptomyceten
In jeder Spur waren 15 µg Gesamtprotein aufgetragen. Von links nach rechts *Streptomyces globisporus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces flavofuscus*, *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Streptomyces coelicolor* M145, *Streptomyces* HZ1

Streptomyces coelicolor besitzt demnach eine Curdlanase, die der von *Streptomyces globisporus* sehr ähnlich ist. Bei den anderen untersuchten Streptomyceten sind unter anderem folgende Möglichkeiten denkbar:

- Sie haben eine Curdlanase, die von den eingesetzten Antikörpern nicht erkannt wird. Das ist prinzipiell möglich, da die Antikörper scheinbar weder gegen das aktive Zentrum, noch gegen die Substratbindestelle gerichtet sind (Abb. 15)
- Sie exprimieren keine Curdlanase, dafür aber zwei andere Enzyme, eine Exoglukanase und eine Endoglukanase, die zusammen einen Abbau der SDS-HZW bis zu Glukose bewirken
- Sie exkretieren eine Curdlanase, die aber an die Zellwand assoziiert ist und deshalb nicht im Kulturüberstand zu finden war.

6 Identifizierung des für die Curdlanase kodierenden Gens

Mit Hilfe der Aminosäuresequenzen, die von der gereinigten Curdlanase gewonnen worden waren (C.3.4), sollte das entsprechende Gen aus *Streptomyces globisporus*

isoliert werden. Nach der Isolation der genomischen DNA (B.6.2) wurden zwei Strategien verfolgt: 1. Amplifikation des Gens direkt aus der genomischen DNA mittels PCR und 2. Identifikation des Gens mittels Southernblot mit anschließender Subklonierung.

6.1 PCR–Experimente

Aus den Proteinsequenzen wurden die DNA-Sequenzen abgeleitet. Wo dies nicht eindeutig möglich war, wurde beim Primerdesign als Ersatznukleotid Inosin verwendet. Wenn eine Aminosäure nur durch zwei Tripletts codiert ist, wurden beide Nukleotide zu gleichen Teilen eingesetzt (Degeneration der Oligonukleotide). Der hohe GC-Gehalt der Streptomyceten-DNA bedingte hohe Annealing-Temperaturen und zusätzlich die Zugabe von DMSO. Diese Substanz destabilisiert die durch den hohen GC-Gehalt bedingten Sekundärstrukturen und erleichtert somit ein Aufschmelzen der DNA. Nach Vorversuchen zur Optimierung wurden für die PCR–Experimente folgende Bedingungen angewandt:

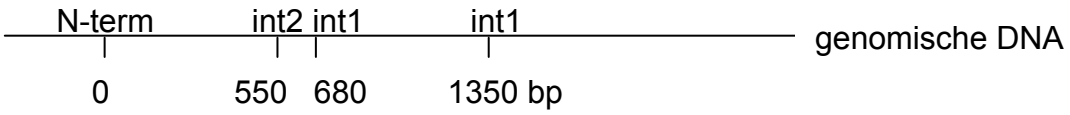
- Thermocycler–Programm (Biometra Personalcycler):

1	94°C	5 min	
2	52°C	1,5 min	
3	72°C	1,5 min	
4	94°C	1 min	4 mal Rücksprung zum 2. Schritt
5	55°C	1,5 min	
6	72°C	1,5 min (Inkr. +5 s)	
7	94°C	1 min	29 mal Rücksprung zum 5. Schritt
8	52°C	1,5 min	
9	72°C	10 min	
10	4°C	∞	

- Reaktionsansatz: 50 ng genomische DNA von *Streptomyces globisporus*; 1,5 mM Mg^{2+}; 10% DMSO; 100 pmol Primer; 1 mM dNTP´s; 1 Unit Goldstar Polymerase; Hotstart (Zugabe der Polymerase nach der ersten Denaturierungsphase)
- Primer: N-term: 5´ GGI CCI TGG GTI CA^{C}_{T} GTI TT (zweifach degeneriert, I steht für Inosin)

- Primer: int1: 5´ GCI GC$^{C}_{T}$ TG$^{A}_{G}$ TTI GGI GC$^{A}_{G}$ TC (achtfach degeneriert)
- Primer: int2: 5´ ACI CC$^{A}_{G}$ TCI AC$^{A}_{G}$ TCI CCI AC (vierfach degeneriert)

Mit der Kombination der Primer N-term + int1 wurden zwei verschieden große Amplifikate erhalten: 680 bp + 1350 bp. Die Kombination N-term + int2 lieferte ein Amplifikat mit 550 bp. Demzufolge sollte die Sequenz von int2 in beiden Amplifikaten von N-term + int1 enthalten sein:



Versuche, mit der Primerkombination N-term+int2 ein 550 bp langes Amplifikat zu bekommen, wenn als Vorlage nicht die genomische DNA, sondern die Amplifikate N-term + int1 verwendet wurden, schlugen fehl. Die anschließende Sequenzierung (AbiPrism 377) der N-term Amplifikate zeigte außerdem, daß der Primer int2 nicht enthalten war. Daraus war zu folgern, daß die Amplifikate nicht die gesuchten waren, sondern unspezifisch vermehrte DNA-Abschnitte. Trotz mehrfach wiederholter Ansätze mit variierenden PCR Programmen mußten diese Versuche erfoglos eingestellt werden.

6.2 Southernblot-Experimente

Die zweite Strategie zur Isolierung des für die Curdlanase codierenden Gens erforderte zunächst das Erzeugen von definierten Teilstücken der chromosomalen DNA von *Streptomyces globisporus*. Dazu wurde diese mit dem Restriktionsenzym Sau3A inkubiert und die entstandenen Teilstücke durch Dichtegradienten-zentrifugation (B.6.3) nach ihrer Größe getrennt. Die so erhaltenen DNA Fraktionen wurden in einem Agarosegel weiter aufgetrennt, mittels Southernblot auf einer Nylonmembran fixiert (B.6.4) und mit frisch mit [γ-^{32}P]ATP markiertem int1-Oligo (B.6.5) hybridisiert. Die DNA-Teilstücke, die das Gen für die Curdlanase tragen, sollten mit dem int1-Oligo interagieren und somit radioaktiv markiert werden. Die Detektion erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilmes mit der Nylonmembran (B.6.4). Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt. Die anschließenden Autoradiographien zeigten jedoch keine reproduzierbaren Spots.

Die Isolierung des für die Curdlanase codierenden Gens aus *Streptomyces globisporus* war unter diesen Umständen offenbar nicht möglich. Deswegen wurde auf das Genom von *Streptomyces coelicolor* ausgewichen. Dieser Organismus exprimiert eine Curdlanase, wie die Antikörperversuche zeigten, ist nah mit Streptomyces globisporus verwandt und es existiert von ihm eine fast vollständige Cosmidbank (Redenbach et al., 1996).

6.3 Identifizierung eines Gens von Streptomyces coelicolor für eine hypothetische Curdlanase

Im Juli 1998 wurde vom Sanger Centre die Sequenz eines Cosmids mit Namen SC8A6 veröffentlicht (Accession: AL031013). Alle Aminosäuresequenzen der gereinigten Curdlanase (C.3.4) wurden mit diesem Cosmid verglichen. Sie zeigten einen hohen Grad an Übereinstimmung (79% Identität; s. Anlage 1) mit dem ORF 15c, der laut Veröffentlichung für ein hypothetisches Exoprotein codiert. Sir D. Hopwood (John Innes Institute, Norwich) stellte uns freundlicherweise das Cosmid SC8A6 zur Verfügung als *E. coli SURE*-Klon mit dem Plasmid supercos, in das das Cosmid SC8A6 einkloniert ist. Dieser Klon wurde in LB-Flüssigmedium mit Ampicillin angezogen, geerntet und zur Präparation eines Zelllysats mit der French Press aufgebrochen (B.4.1). Damit wurden enzymatische Aktivitätstests durchgeführt. Das Zelllysat zeigte keine Curdlanase-Aktivität. Außerdem wurden die Proteine des Zelllysats mittels SDS-PAGE aufgetrennt (B.4.8.2). Der anschließender Westernblot mit den gegen die Curdlanase von *Streptomyces globisporus* gerichteten Antikörpern ist in Abbildung 29 dargestellt. Auf der Höhe von 64 kDa konnten keine spezifischen Kreuzreaktionen entdeckt werden. Wie ebenfalls der Abbildung 29 zu entnehmen ist, wurden unspezifische Kreuzreaktionen bei ca. 92 kDa, ca. 60 kDa, ca. 10 kDa und auf Höhe der Lauffront festgestellt. Dieselben unspezifischen Banden existieren auch in der Kontrolle, *Escherichia coli* SURE ohne 8A6-Insert im Plasmid supercos.

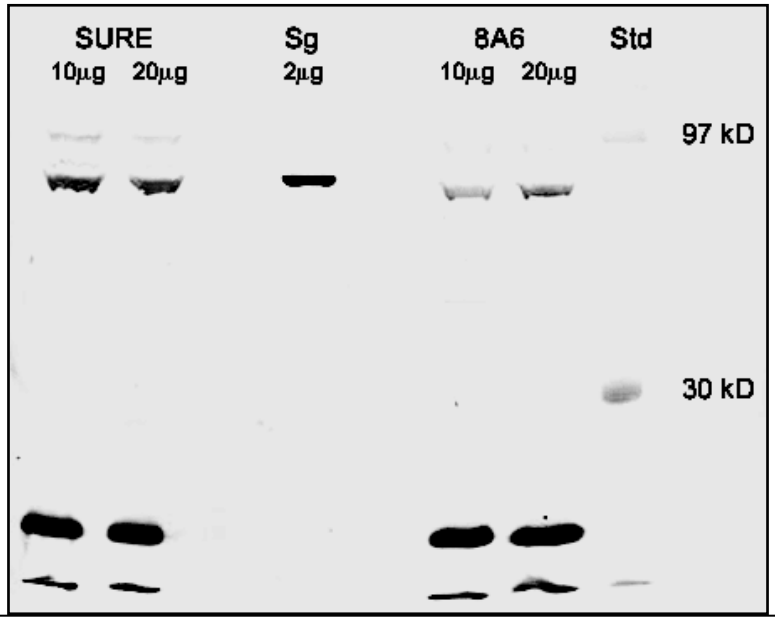


Abbildung 29: Expression von Curdlanase durch *E. coli SURE* + supercos
Westernblot mit Rohextrakten von *E. coli SURE* + supercos und *E. coli SURE* + supercos + 8A6. Aufgetragen wurden zwei verschiedene Konzentrationen, um mittels Mengeneffekt eine etwaige spezifische Reaktion verifizieren zu können. Als Kontrolle wurde die gereinigte Curdlanase von *Streptomyces globisporus* aufgetragen. Die Proteine des Größenstandards sind gefärbt und deshalb schwach sichtbar

Daraus war zu folgern, daß der ORF 15c, der für das hypothetische Exoprotein Curdlanase kodiert, nicht exprimiert wurde.

Der nächste Schritt zur Überprüfung, ob der ORF 15c für eine Curdlanase kodiert, war eine Subklonierung des ORFs 15c in einen Multi-copy-Vektor.

7 Klonierung des Gens *cur* von *Streptomyces coelicolor* M145

7.1 Konstruktion des Vektors pCuEB

Das Cosmid zu präparieren war außerordentlich zeit- und materialaufwendig. Deshalb sollte das hypothetische Curdlanase-Gen in einen Multi-copy-Vektor kloniert werden. Dazu wurde der ORF 15c (1806 Basenpaare) - flankiert von 241 Basenpaaren vor dem Start-Codon und 166 Basenpaaren nach dem Stop-Codon – mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und BamHI herausgeschnitten und in den Vektor pUC19 einkloniert. In Abb. 30 ist das angewandte Vorgehen dargestellt.

Mit diesem Vektor pCuEB wurden *E. coli* DH5α-Zellen mittels Elektroporation (B.6.7.1) transformiert. Der Einbau des ORF 15c-Fragmentes wurde mit Hilfe von

blau/weiß-Selektion kontrolliert (B.6.8). Die Orientierung wurde mit Hilfe der Fragmentlängen nach Restriktionsverdau mit PstI überprüft, trotz der unterschiedlichen Überhänge, die durch die Verwendung des Enzympaares EcoRI/BamHI entstanden sind. PstI schneidet im ORF 15c genau einmal, im Plasmid zweimal. Deshalb entstehen bei unterschiedlicher Orientierung des ORFs im Plasmid verschieden lange Fragmente. Die Plasmide eines Klones, in dem das ORF 15c-Fragment in der richtigen Orientierung einligiert war, wurden isoliert und erneut in *E. coli* DH5α-Zellen transformiert. Dieser Klon wurde CuEB genannt. Der einklonierte ORF 15c dieses Klones wurde ansequenziert (B.6.6). Der Sequenzvergleich mit der veröffentlichten Sequenz von ORF 15c ergab eine Übereinstimmung von >99% (nur 1 Base von 400 war unbestimmt).

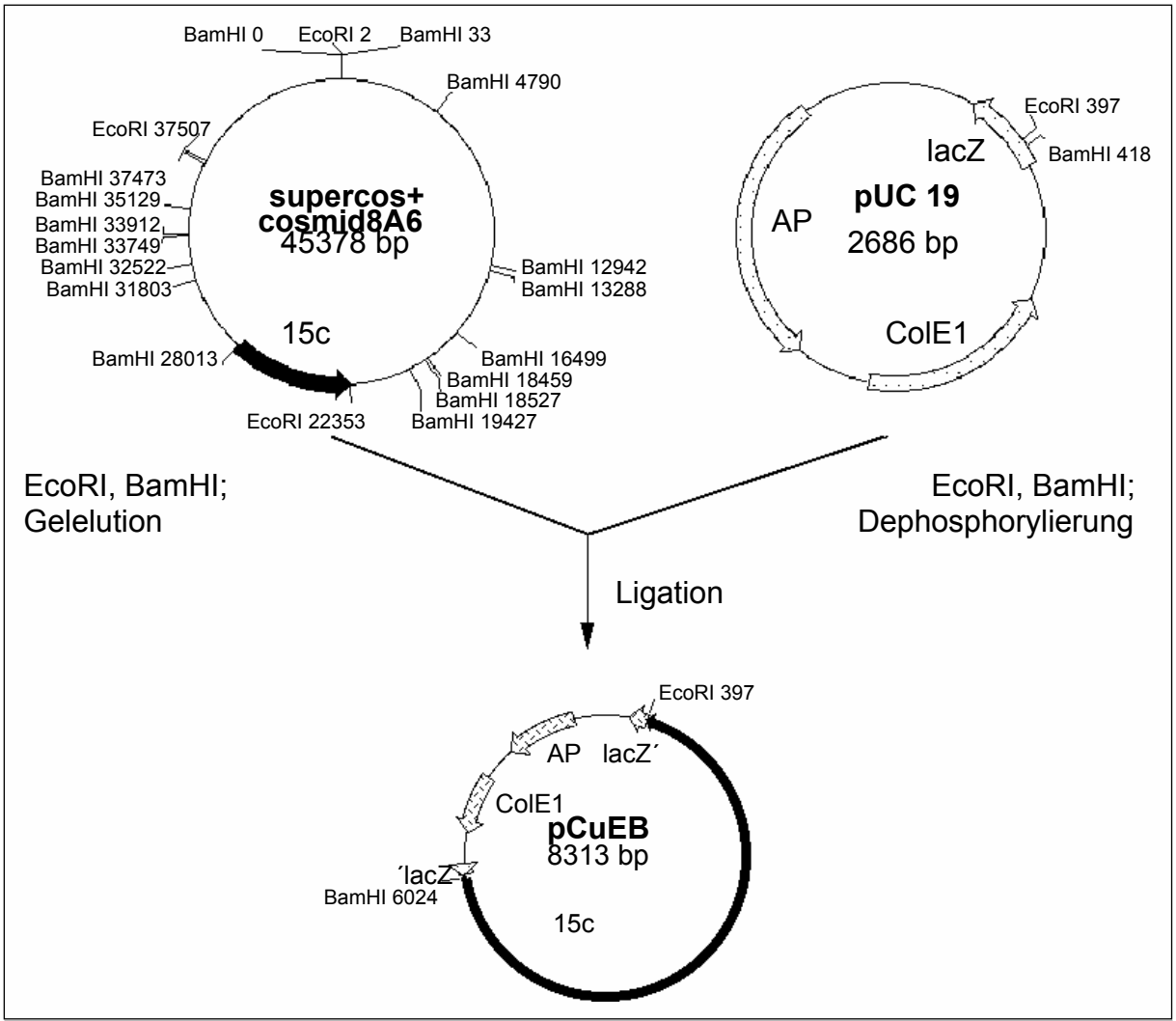


Abbildung 30: Konstruktion des Vektors pCuEB
Der ORF 15c inklusive flankierender Basenpaare wurde in angegebener Weise in pUC19 ligiert (B.6.1)

Der Klon CuEB wurde in einer 100 ml Kultur angezogen. Der Rohextrakt und der Kulturüberstand wurden präpariert. Im Rohextrakt konnte keine Curdlanase-Aktivität detektiert werden. Um zu überprüfen, ob die Curdlanase in einer inaktiven Form exprimiert worden war, wurden sowohl mit dem Rohextrakt als auch mit dem Kulturüberstand ein Westernblot durchgeführt. Zur Kontrolle wurde von *E. coli* DH5α ebenfalls ein Rohextrakt präpariert und in den Westernblot miteinbezogen. Es konnten weder im Rohextrakt noch im Kulturüberstand des Klon CuEB eine spezifische Kreuzreaktion mit den gegen die native Curdlanase von *Streptomyces globisporus* gerichteten Antikörpern festgestellt werden (Abb. 31). Alle erhaltenen unspezifischen Kreuzreaktionen sind ebenso im Kontrollansatz sichtbar. Daraus war zu folgern, daß die Curdlanase mit diesem System nicht exprimierbar war.

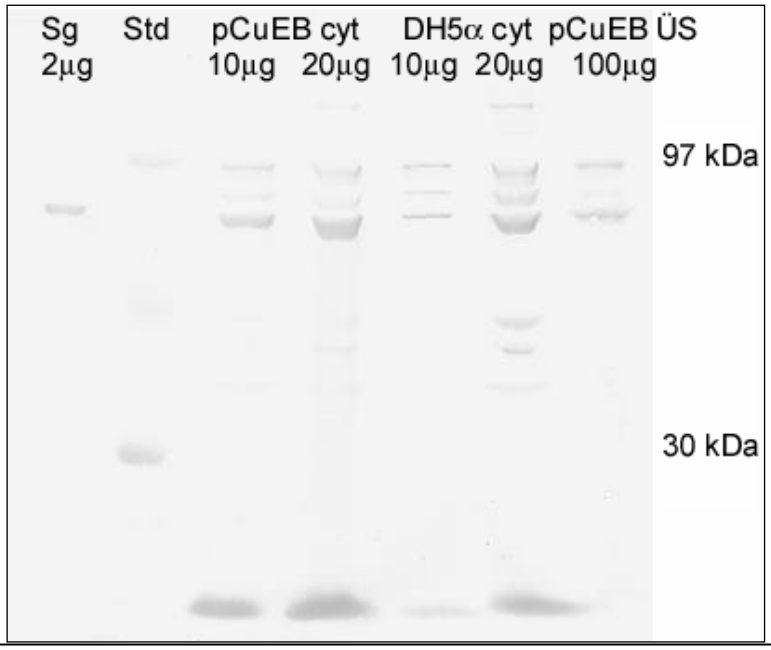


Abbildung 31: Expression von Curdlanase durch *E. coli* DH5α und dem Klon CuEB
Westernblot mit Rohextrakten von *E. coli* DH5α und Klon CuEB und mit Kulturüberstand von Klon CuEB. Aufgetragen wurden zwei verschiedene Konzentrationen, um mittels Mengeneffekt eine etwaige spezifische Reaktion verifizieren zu können. Als Kontrolle wurde die gereinigte Curdlanase von *Streptomyces globisporus* aufgetragen. Die Proteine des Größenstandards sind gefärbt und deshalb teilweise sichtbar

7.2 Konstruktion der Expressionsvektoren pCuTOPO und pCuTOPO-His

Die fehlende Expression der Curdlanase durch den oben beschriebenen Klon CuEB könnte an der Inkompatibilität des Streptomycetenpromotors (der auf den mitklonierten 241 Basenpaaren vor dem ORF 15c liegen sollte; dies wurde nicht

überprüft) oder einer Toxizität der Curdlanase für *E. coli* liegen. Deshalb sollte das Gen unter die Kontrolle eines induzierbaren *E. coli* Promotors gestellt werden.

7.2.1 Topoisomerase-System

Das verwendete pBAD TOPO Plasmid (Invitrogen) (s. Anlage 1) vereinigt mehrere Vorteile:

- es ist geeignet für TA Klonierung: es ist linearisiert und trägt einen einzelnen 3´-Desoxythymidin-Überhang und eine daran gekoppelte Topoisomerase (Shuman, 1994)
- es trägt eine CAP-Bindestelle, damit kann die Transkription des Arabinose-Operons durch den cAMP-Spiegel in der Zelle reguliert werden; d. h. durch Zugabe von Glukose ins Medium kann die Transkription des einklonierten Gens reprimiert werden
- das einklonierte Gen steht unter der Kontrolle des induzierbaren Arabinose-Promotors
- stromabwärts der Klonierungsstelle sind unmittelbar aufeinanderfolgend sechs Histidine und ein Stop-Signal codiert
- Somit läßt sich ein PCR-Amplifikat mit einem einzelnen 3´-Desoxyadenosin-Überhang (die Taq Polymerase erzeugt immer solche Amplifikate) direkt und schnell in das Plasmid ligieren (TA-Klonierung) und die Expression nach Bedarf reprimieren oder induzieren.

7.2.2 Amplifizierung des ORF 15c

Das Plasmid pCuEB wurde als Matrize für die Amplifikation verwendet. Der N-Term-Primer wurde so konstruiert, daß das Start-Codon des ORF 15c im Leserahmen des pBAD TOPO Plasmids liegt. Der C-Term-Primer wurden so gewählt, daß das p-Codon des ORF 15c erhalten blieb. Bei einer zweiten Klonierung sollte ein Polyhistidinschwanz an das Protein angehängt werden. Dafür wurde der C-Term-Primer so gewählt, daß das p-Codon in ein Codon für Leucin (statt TGA $\Rightarrow$ TTA) umgewandelt wurde. Dies hatte zur Folge, daß das Protein um weitere 28 Aminosäuren, die letzten sechs sind Histidinreste, verlängert wurde. In beiden Fällen wurde die PCR mit der Pfu-Polymerase (Promega) durchgeführt. Sie besitzt eine 3´-5´-Exonukleaseaktivität. Diese „Korrekturlesen“ genannte Eigenschaft erhöht die Genauigkeit. Unter folgenden Bedingungen gelang es, jeweils ein einziges,

spezifisches Produkt, d. h. mit der richtigen Länge und den erwarteten Restriktionsschnittstellen, zu erhalten:

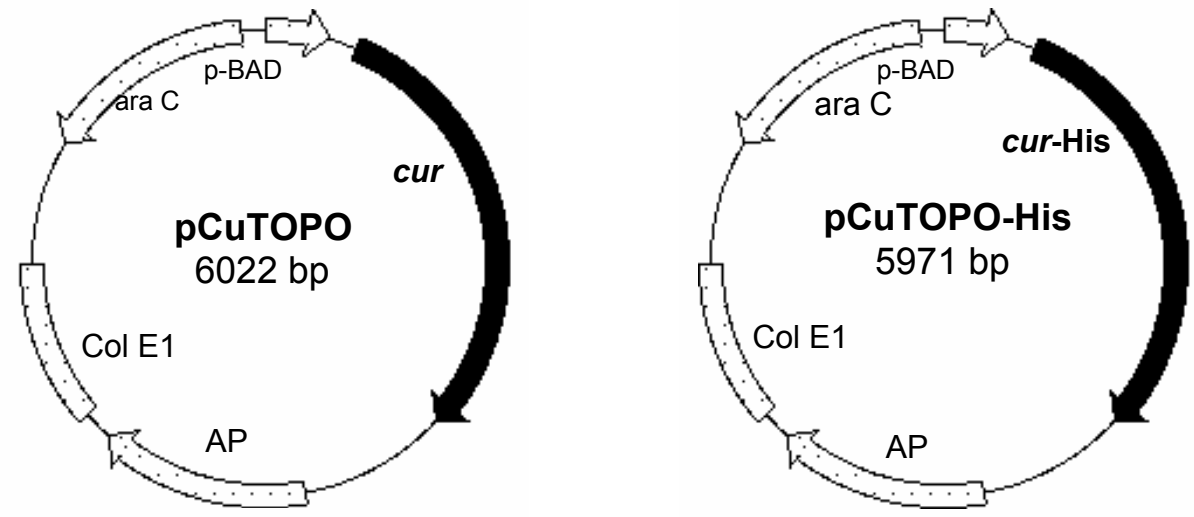
- N-Term-Primer: ACT TTC CGA ACA AGG AGA GCC G
- C-Term-Primer mit p-Codon: GTA CGA CGC ATT CGG CCT TCA
- C-Term-Primer ohne p-Codon: ACG TCC GCC TAA GGG GTA TT
- PCR-Ansatz: 30 ng pCuEB-DNA + 5 µl Puffer + 5 µl DMSO + je 0,5 µl dNTP + 1µl N-Term-Primer +1 µl C-Term-Primer + 1 µl Pfu-Polymerase ad 50 µl $H_2O_{bid.}$
- Thermocycler–Programm (Biometra Personalcycler):

1	95°C	5 min	
2	65°C	2 min	
3	74°C	4 min (Inkr.* 10 s)	*d. h. bei jeder Schleife 10 s Verlängerung
4	95°C	1 min	29 mal Rücksprung zum 2. Schritt
5	65°C	5 min	
6	74°C	20 min	
7	4°C	∞	

Die Amplifikate wurden als *cur* bzw. *cur*-His bezeichnet.

7.2.3 Klonierung des ORF 15c

Die Pfu-Polymerase erzeugt glatte Enden. Dies erforderte ein nachträgliches Anhängen von 3´Desoyxadenosin (B.6.9), um das Amplifikat für die TA-Klonierung kompatibel zu machen. Beide PCR-Amplifikate wurden in einen pBAD TOPO-Vektor kloniert (B.6.10). Es entstanden folgende Plasmide:



7.2.4 Transformation in *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen)

Diese Plasmide wurden in *Escherichia coli* Top10 transformiert (B.6.10) und dann in geeigneten Verdünnungen auf LB-Platten mit 50 µg Ampicillin pro ml Agar ausplattiert. Am nächsten Tag wurden 10 Kolonien zufällig gepickt und über Nacht unter Selektionsdruck (Ampicillin) angezogen. Die Plasmide dieser 10 Kulturen wurden mittels Restriktionsanalyse auf korrekten Einbau des ORF 15c getestet. Im Falle des Plasmids pCuTOPO trugen 8 von 10 Klonen den ORF 15c in der richtigen Orientierung, bei pCuTOPO-His waren es 7 von 10 Klonen. Jeweils eines der so überprüften Plasmide wurde in LMG194-Zellen (Invitrogen) transformiert ($CaCl_2$-Methode; B.6.7.2), um die basale Expression des ORF 15c durch Zugabe von Glukose ins Medium auf fast Null drücken zu können. Wenn dieser ORF tatsächlich für eine Curdlanase kodiert, sollte zumindest im Klon CuTOPO die Curdlanase exprimiert werden.

7.2.5 Expression der Curdlanase

Für die Expressionsstudien wurde als Vektorkontrolle der dem Kit beigefügte TOPO-Vektor verwendet, in den das LacZ-Gen einkloniert war (Invitrogen). Dieser Vektor wurde in LMG194-Zellen nach der $CaCl_2$-Methode transformiert (B.6.7.2). Der so konstruierte lacZTOPO-Klon konnte als Positivkontrolle eingesetzt werden, um zu testen, ob das Expressionssystem funktioniert, und als Negativkontrolle, ob von den Klonen CuTOPO bzw. CuTOPO-His die Curdlanase exprimiert wird, da die β-Galaktosidase eine Molmasse von 120 kDa hat und somit deutlich von der Curdlanase unterschieden werden konnte.

Die Klone lacZTOPO, CuTOPO und CuTOPO-His wurden jeweils in 100 ml Kulturen inkubiert (B.3.3.3). Nach erfolgtem Wachstum wurden die Kulturen auf Eis abgekühlt, zentrifugiert (3.000 x g, 4°C, 5 min), der Überstand konzentriert (Amicon-Rührzelle, 10 kDa) und die Zellen mit der French Press (B.4.1) aufgebrochen Die Rohextrakte aller drei Klone wurden im turbidimetrischen und im quantitativen Test (B.4.10.1+2) auf Aktivität untersucht. In Abb. 32 sind die Ergebnisse des quantitativen Testes dargestellt.

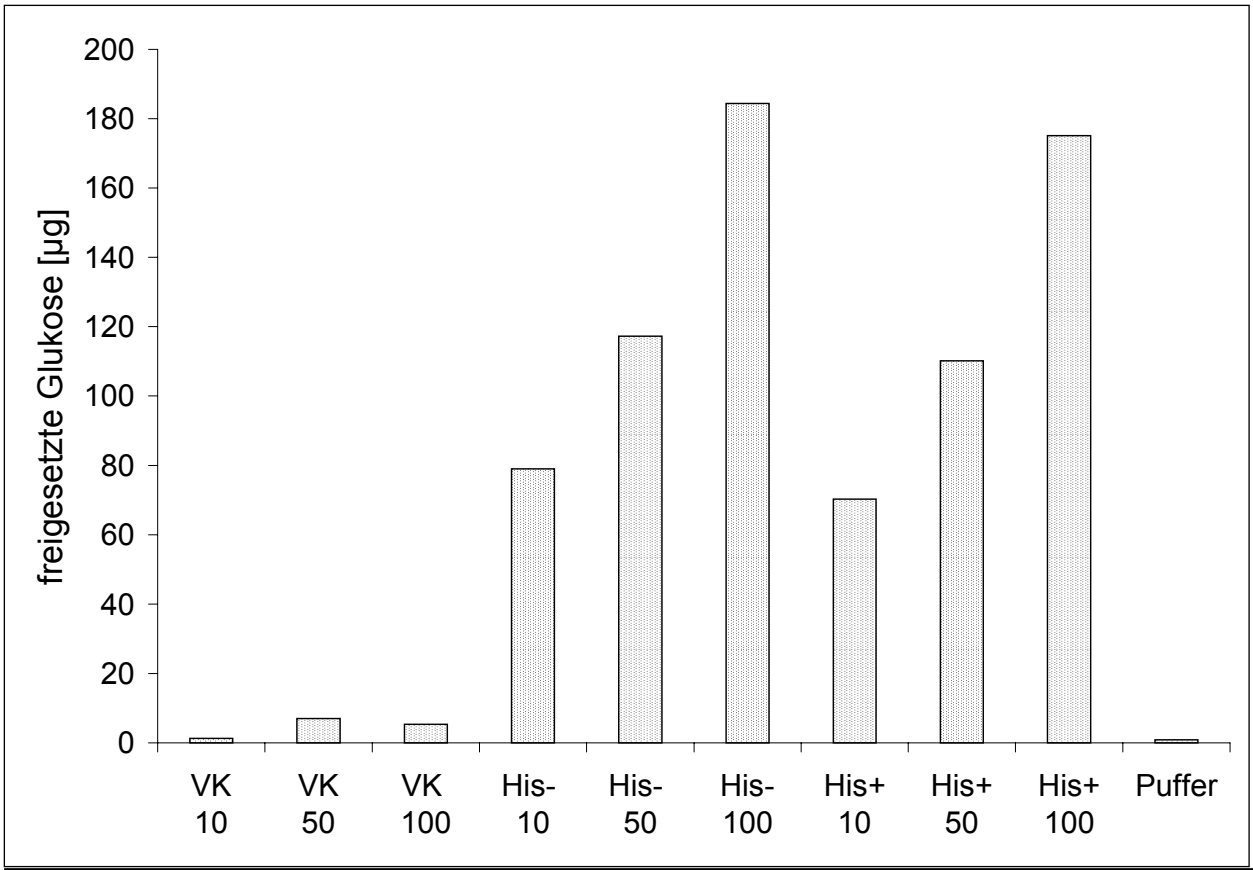


Abbildung 32: Heterolog exprimierte Curdlanase: Messung der Aktivität
Dargestellt sind die Ergebnisse des enzymatischen Aktivitätstests von Rohextrakten der drei Klone (VK = lacZTOPO, His- = CuTOPO, His+ = CuTOPO-His). Es waren jeweils 10, 50 und 100 µg Gesamtprotein eingesetzt worden. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde ein Ansatz nur mit Puffer mitgeführt

Wie die Abbildung 32 zeigt, haben beide Curdlanase-Klone eindeutig Aktivität. Das Anhängen des His-Schwanzes beeinträchtigt diese kaum. Die Vektorkontrolle lacZTOPO zeigt jedoch keine Aktivität. Die sehr niedrigen Werte für die freigesetzte Glukose nehmen nicht durch Erhöhung der eingesetzten Proteinmenge zu. Sie können somit nicht auf eine Curdlanase-Aktivität zurückgeführt werden. Als Beweis, daß der His-Schwanz tatsächlich auch exprimiert wird, wurden die Rohextrakte aller drei Klone mittels Westernblot auf Kreuzreaktionen mit einem Nickel-NTA-HRP-Konjugat (Quiagen) überprüft. Die Abb. 33 zeigt diesen Westernblot.

Abbildung 33: Heterolog exprimierte Curdlanase: Nachweis mittels Histidinschwanz
Rohextrakte der drei Klone (s. Abb. 29) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und mit Nickel-NTA-HRP-Konjugat inkubiert und anschließend mit Diaminobenzidin umgesetzt. Damit werden alle Enzyme mit histidinreichen Abschnitten detektiert

Wie der Abbildung 33 zu entnehmen ist, konnte beim Klon CuTOPO-His eine Bande mit der apparenten Größe von 68 kDa detektiert werden. Diese Bande wurde durch Erhöhung der Proteinmenge entsprechend intensiviert. Im Rohextrakt des Klons CuTOPO ist wegen dem Fehlen des His-Schwanzes keine Kreuzreaktion detektierbar. Bei ca. 32 kDa und in der Lauffront wurden zusätzlichen Banden detektiert. Auf gleicher Höhe befanden sich auch im Klon CuTOPO und in der Vektorkontrolle lacZTOPO ebenfalls Banden. Daraus läßt sich folgern, daß dies chromosomal kodierte Proteine von *E. coli* sind, die histidinreiche Abschnitte tragen.

Die Größe von 68 kDa der detektierten Bande im Rohextrakt von CuTOPO-His entspricht der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Größe von 68.442 Da. Damit stimmt die Größe des detektierten Proteins mit der Erwartung überein. Diese Bande tritt nur im Klon CuTOPO-His auf. Daraus folgt, daß diese Bande der histidinmarkierten Curdlanase entspricht.

7.2.6 Induzierung der Expression der Curdlanase

Um die Induzierung der Curdlanase unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen wurde der Klon CuTOPO über Nacht in RM-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 0,2% Glukose zur Reprimierung der Expression der Curdlanase angezogen. Somit konnten die eigentlichen Testansätze mit frischen Zellen, die noch keine Curdlanase exprimieren, gestartet werden. Mehrere Parallelansätze mit RM-Medium ohne

Glukose wurden mit 100 µl der Übernachtkultur angeimpft und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Bei einer optischen Dichte (λ = 580 nm) von 0,5 wurde jeweils 1 ml Zellsuspension entnommen. Anschließend wurde dem RM-Medium L-Arabinose in verschiedenen Konzentrationen (0,00002% - 0,2%) zugesetzt. Nach vier Stunden wurden erneut je 1 ml der Kulturen geerntet. Die mittels Zentrifugation (3.000 x g, 4°C, 5 min) sedimentierten Zellen wurden in SDS-Probenpuffer 5 min bei 100°C denaturiert und gleichzeitig lysiert. Die Proteine der Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Danach wurde ein Westernblot mit Antikörpern gegen die native Curdlanase von *Streptomyces globisporus* durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Lumineszenz (B.4.12.4) (Abb. 34).

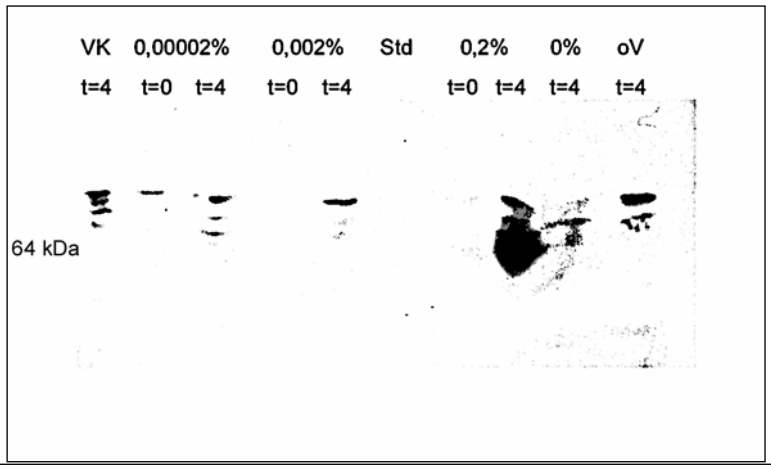


Abbildung 34: Induktion der Expression der Curdlanase im Klon CuTOPO
Dargestellt sind verschieden stark induzierte Kulturen des Klons CuTOPO vor (t=0) und nach (t=4) Induktion. Als Kontrollen dienten der lacZTOPO-Klon (VK) und *E. coli LMG194*-Zellen ohne Vektor (oV). Die Proteine wurden nach dem Blot mit den Antikörpern inkubiert, die gegen die native Curdlanase von *Streptomyces globisporus* gerichtet sind. Die sekundären Antikörper waren mit HRP gekoppelt. Die Detektion erfolgte durch Lumineszenz

Die Abbildung 34 zeigt, daß die Expression der Curdlanase mit 0,2% L-Arabinose induziert werden konnte. Allerdings reagierten die Antikörper auch mit anderen zytoplasmatischen Proteinen von *E. coli*, was eine Identifizierung erschwerte. Der Nachweis mit Nickel-NTA-HRP-Konjugat ist eindeutiger (vgl. Abb. 33). Aus diesem Grund wurde zur Reinigung der heterologen Curdlanase der Klon CuTOPO-His benutzt. Dies hatte den weiteren Vorteil, daß die Reinigung durch Affinitätschromatographie erfolgen konnte.

7.2.7 Reinigung der heterolog exprimierten Curdlanase

Der Klon CuTOPO-His wurde unter induzierenden Bedingungen in einer 100 ml Kultur angezogen, die Zellen wurden geerntet und mit der French Press

aufgebrochen (B.4.1). Im Rohextrakt wurde die Gesamtproteinkonzentration bestimmt (B.4.7). In Portionen von 0,5 mg Gesamtprotein wurde der Rohextrakt auf eine mit Ni^{2+}-beladene Sepharose Chelating Säule (Pharmacia) aufgetragen. Durch Erhöhung des Imidazolgehaltes im Puffer wurde die Histidin-markierte Curdlanase von der Säule eluiert (B.5.3), mittels Ultrafiltration (B.7.3.1) entsalzt und konzentriert. Jeweils 10 solcher Säulenläufe wurden vereinigt. Die Hälfte wurde für einen enzymatischen Aktivitätstest abgezweigt, die andere mit 10% SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung (B.4.9.2) detektiert (Abb. 35).

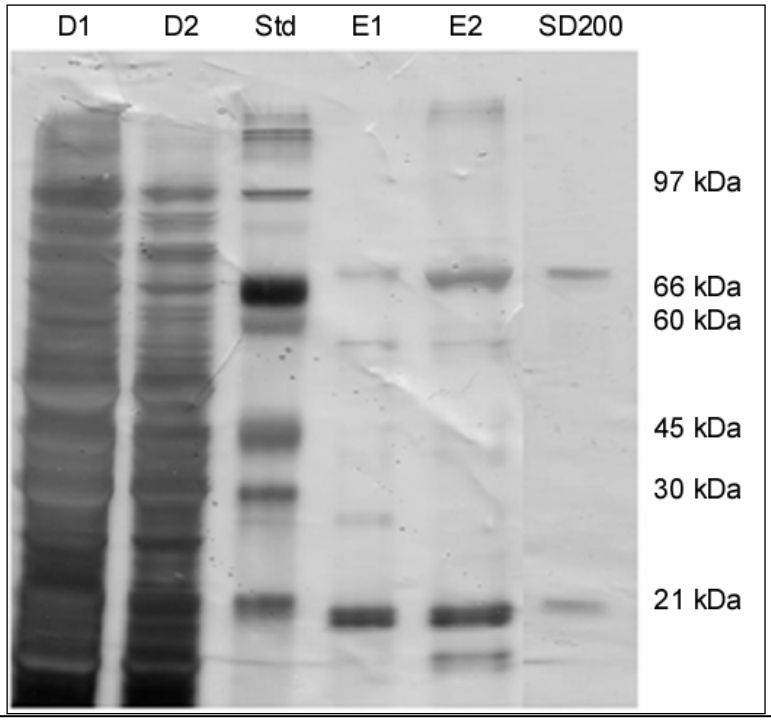


Abbildung 35: Reinigung der heterolog exprimierten Curdlanase
Dargestellt ist die Auftrennung verschiedener Fraktionen nach der Nickelsäule und der anschließenden Superdex 200 HR 30/10 (Diese Spur wurde aus einem anderen Gel ausgeschnitten und im Bild eingefügt). Die Fraktion D1 entspricht den ersten 500 µl Eluat mit Auftragspuffer, die Fraktion D2 den letzten 500 µl. In der Spur E1 ist das Konzentrat der ersten 500µl Eluat mit Elutionspuffer, in der Spur E2 der letzten 500 µl aufgetragen. Die Spur SD200 beinhaltet den Hauptelutionspeak nach der Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR 30/10 (Pharmacia) bei einer Retentionszeit von 25 min. Dies entspricht laut Eichproteinen einer Molmasse von ca. 70 kDa

Wie der Abbildung 35 zu entnehmen ist, konnte mit der Ni^{2+}-Säule die heterolog exprimierte Curdlanase stark angereichert werden. Es wurde versucht eine noch bessere Aufreinigung zu erzielen, indem Nickel nacheinander durch Kobalt, Kupfer und Eisen ersetzt wurde. Diese Metallionen brachten allerdings keine Verbesserung, die beste Anreicherung gelang mit Nickel. Dies machte einen zweiten Reinigungsschritt notwendig. Die gesamte Elutionsfraktion wurde über die Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR30/10 (Pharmacia) weiter aufgereinigt (B.5.4.1).

Die meisten Verunreinigungen konnten dadurch abgetrennt werden. Ein Protein mit der apparenten Größe von 21 kDa ließ sich aber nicht abtrennen. Auch die Zugabe von 1 M Lithiumchlorid zum normalen Puffer oder ein Pufferwechel zu 6 M Harnstoff, gelöst in 0,1 M MES pH 6,7, bewirkten keine bessere Auftrennung. Die beiden Proteine lassen sich offensichtlich nur unter denaturierenden Bedingungen, wie sie bei einer SDS-PAGE vorliegen, voneinander trennen.

Die Recherche mit der Datenbank Colibri (http://genolist.pasteur.fr/Colibri), in der das Genom von *Escherichia coli* gespeichert ist, nach zytoplasmatischen Proteinen mit einem Molmasse von ca. 21 kDa und mindestens zwei aufeinanderfolgenden Histidinresten (Coreinigung mit der Nickelsäule) ergab eine Übereinstimmung: SLYD_ECOLI. Dieses Protein hat ein Molmasse von 20.853 Da, hat eine histidinreiche Domäne und ist beschrieben als eine Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase (Hottenrott, 1997). Es gehört zur FKBP-Typ Ppiase-Familie und ihm wird eine Chaperonfunktion zugesprochen (Swissprot: P30856). Ob auch das 21 kDa Protein, das sich nicht von der Curdlanase abtrennen ließ, eine Chaperonfunktion besitzt, ist Gegenstand der Diskussion.

7.2.8 Kinetische Charakterisierung der heterolog exprimierten Curdlanase

Wie aus der Abbildung 32 ersichtlich ist, beeinträchtigte der Histidinschwanz die Aktivität der Curdlanase nicht meßbar. Außerdem ließ sich das Fusionsprotein leichter reinigen. Aus diesen Gründen wurde die mit His-Schwanz markierte Curdlanase gereinigt und dessen kinetische Parameter bestimmt.

Die in Abbildung 36 gezeigten Werte ergaben eine Ausgleichsgerade mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0{,}997$. Daraus läßt sich für die heterolog exprimierte Curdlanase ein K_M-Wert = 31 mg Curdlan und ein v_{Max} = 6,3 mmol Glukose/min x mg Protein errechnen. Diese kinetischen Parameter wurden mit den der nativen Curdlanase von *Streptomyces globisporus* verglichen. Der K_M-Wert der heterolog exprimierten Curdlanase (die DNA-Sequenz stammt von *Streptomyces coelicolor*!)ist gegenüber den 23 mg Curdlan des nativen Enzyms von *Streptomyces globisporus* somit eine Größenordnung schlechter. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist mit 6,3 mmol Glukose/min x mg Protein ungefähr doppelt so hoch wie die der nativen Curdlanase.

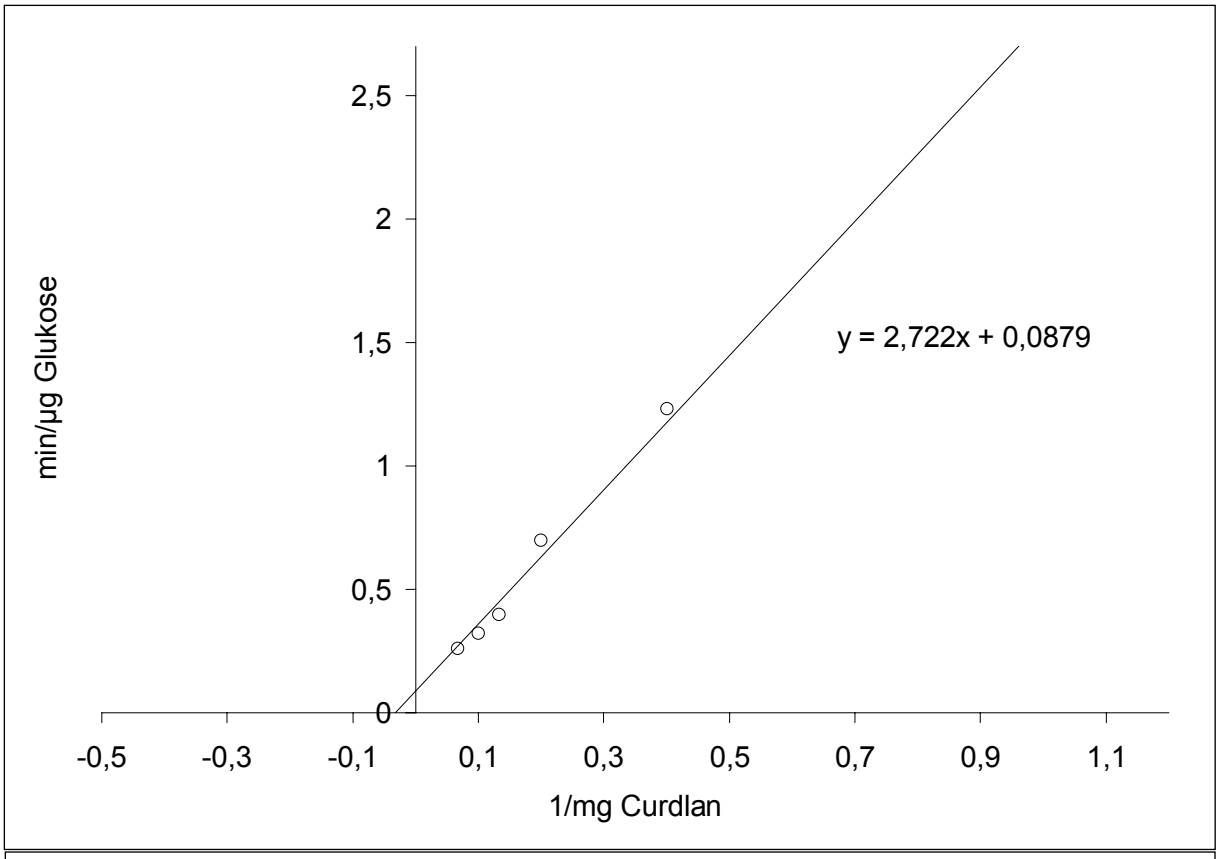


Abbildung 36: Bestimmung von K_M und v_{max} der heterolog exprimierten Curdlanase
Lineweaver-Burk-Darstellung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. Die Kennwerte K_M und v_{max} wurden mit Hilfe der Formel für die im Diagramm angegebene Ausgleichgerade errechnet

7.2.9 Vergleich mit kommerziell erhältlichen Lytikasen

Die Fähigkeit der Curdlanase Hefezellen zu lysieren, wurde in dieser Arbeit hinreichend belegt. Ein Vergleich mit kommerziell erhältlichen hefelytischen Enzympräparationen sollte die Vor- und Nachteile der Curdlanase gegenüber diesen Präparationen aufzeigen.

Bei Sigma sind zwei hefelytische Enzympräparationen erhältlich: Native Lytikase von *Arthrobacter luteus* (angereichert aus Kulturüberstand) und rekombinant in *E. coli* hergestellte Lytikase von *A. luteus*. Bevor deren hydrolytische Aktivität bestimmt wurde, wurden sie zunächst mittels SDS-PAGE auf ihre Homogenität hin getestet. Es stellte sich heraus, daß beide Präparationen mehrere Proteine beinhalten, die native mindestens 4, die rekombinante 2. Ein anschließender Westernblot zeigte, daß die Antikörper, die gegen die Curdlanase von *Streptomyces globisporus* gerichtet sind, mit keinem der Proteine der Lytikase-Präparationen reagierten.

Die hydrolytische Aktivität beider Präparationen wurde mit der rekombinant hergestellten Curdlanase verglichen. Dazu wurde jeweils die gleiche Proteinmenge eingesetzt. Als Substrate wurden SDS-HZW und Curdlan eingesetzt. Der Abbau der SDS-HZW wurde im turbidimetrischen Test verfolgt und anschließend im enzymatischen Test auf freigesetzte Glukose überprüft. Die Hydrolyse des Curdlans konnte wegen dessen schlechter Löslichkeit in wäßrigem Puffer nur auf freigesetzte Glukose hin überprüft werden. Die Abbildung 37 zeigt die Ergebnisse des turbidimetrischen Aktivitätstests. Sie zeigt, daß beide Lytikase-Präparationen die Zellwand wesentlicher schneller und effektiver hydrolysieren als die rekombinante Curdlanase, wobei die Hydrolyse durch die native Lytikase noch stärker ist.

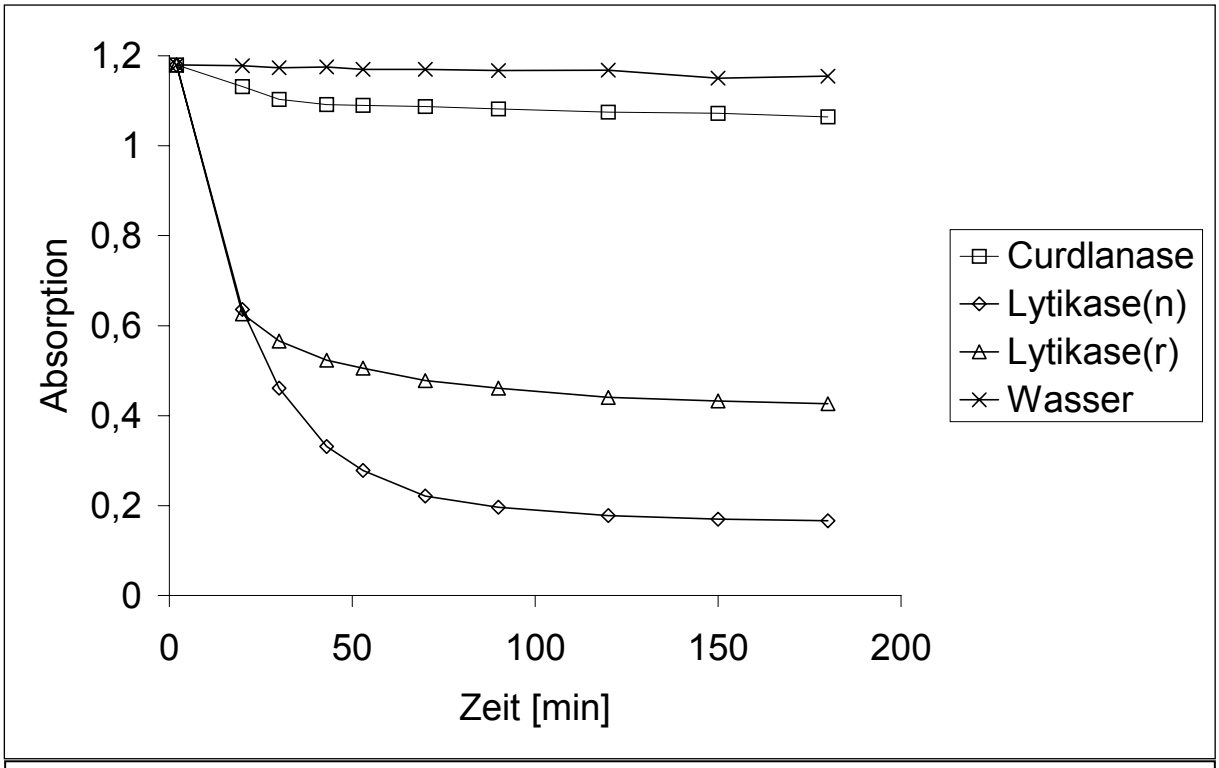


Abbildung 37: Qualitativer Vergleich hefelytischer Enzyme
Dargestellt sind die turbidimetrischen Meßergebnisse beim Abbau von SDS-ZW von *Saccharomyces cerevisiae*; (n) = nativ, (r) = rekombinant

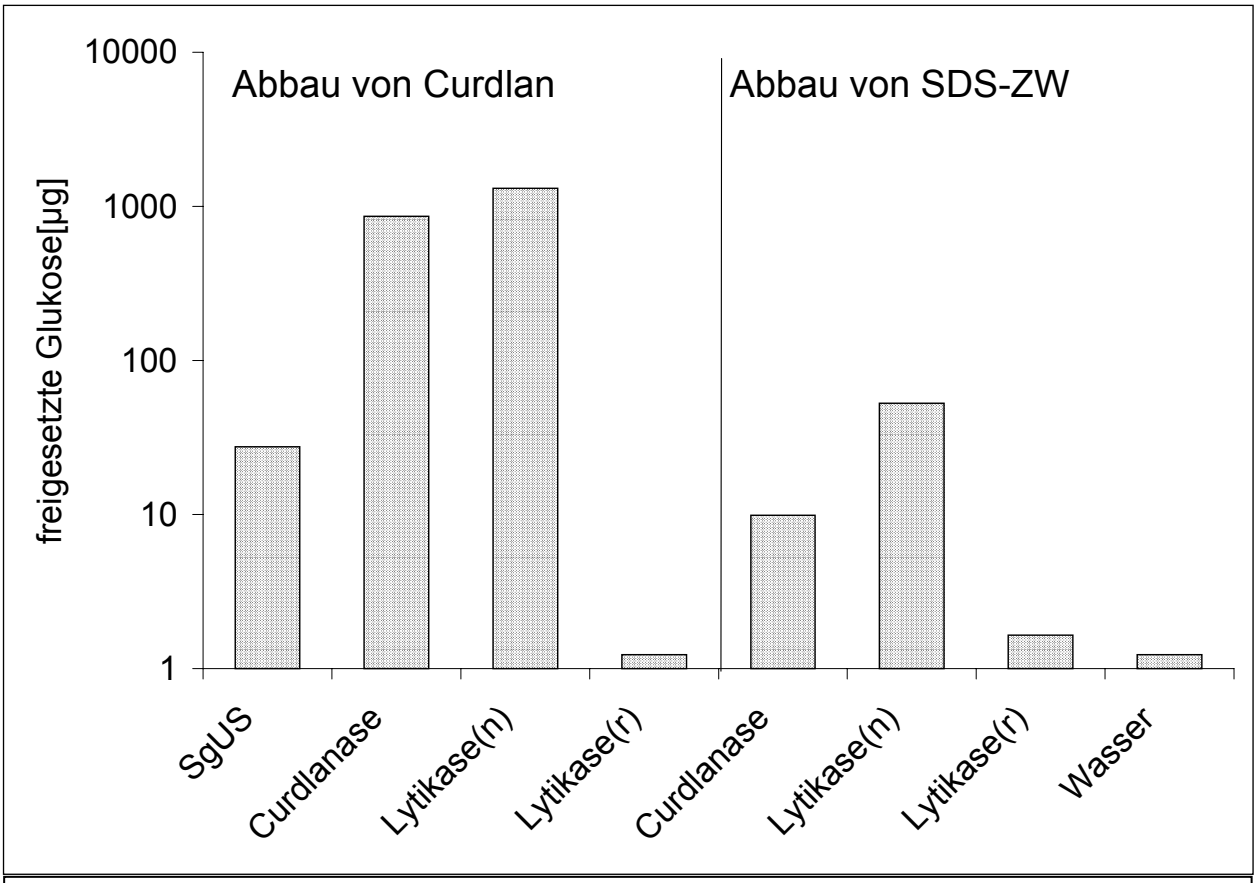


Abbildung 38: Quantitativer Vergleich hefelytischer Enzyme
Dargestellt sind die Ergebnisse des enzymatischen Tests. Wegen der großen quantitativen Unterschiede der Aktivitäten wurde eine logarithmische Skala verwendet. In der linken Hälfte waren 10 mg Curdlan, in der rechten 0,9 mg SDS-ZW von *Saccharomyces cerevisiae* vorgelegt. Die Gesamtproteinmenge betrug in allen Proben 30 µg. Als Kontrolle wurde die Hefezellwand auch mit $H_2O_{bid.}$ inkubiert. Beim Abbau des Curdlans wurde zusätzlich Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus* (SgUS) als Positivkontrolle eingesetzt; (n) = nativ, (r) = rekombinant

Wie in der Abbildung 38 gezeigt, bestätigt der enzymatische Test die Aussagen des turbidimetrischen Tests und erklärt gleichzeitig die stärkere Absorptionsabnahme durch die Hydrolyse der nativen Lytikase. Diese setzte ebenso wie die Curdlanase Glukose frei, was bei der rekombinant hergestellten Lytikase-Präparation nicht der Fall war. Diese Beobachtung legt nahe, daß die Lytikase-Präparationen keine Curdlanase beinhalten, sondern zwei verschiedene Enzyme: Eine Endo-β-(1,3)-Glukanase und eine Exo-β-(1,3)-Glukanase. Letztere scheint der Präparation der rekombinanten Lytikase zu fehlen.

8 Aktivität der Curdlanase gegenüber anderen Hefen

Diese Arbeit wurde angestoßen durch die Beobachtung, daß Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* durch Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus*

lysiert wurden. Nachdem die Ursache aufgeklärt worden war und das verantwortliche Enzym gereinigt und ein sehr ähnliches Enzym aus dem nah verwandten *Streptomyces coelicolor* heterolog exprimiert werden konnte, sollte zum Schluß die Wirkung dieses Enzyms auch auf andere Hefen getestet werden.

Es wurden folgende Hefen ausgewählt: *Schizosaccharomyces pombe* als Vertreter der Spalthefen*; Rhodotorula spec.* als Vertreter der Imperfekten Hefen und *Candida albicans* als medizinisch bedeutsame Hefe.

Die Wirkung der Curdlanase auf diese Hefen wurde in mehreren Ansätzen untersucht: 1. Hydrolysierbarkeit der Zellwand 2. Hydrolysierbarkeit ganzer Zellen und 3. Wirkung auf sich vermehrende Zellen.

8.1 Hydrolysierbarkeit der Zellwand

Zuerst wurden SDS-ZW von *Schizosaccharomyces pombe* und *Candida albicans* präpariert (B.4.2). 0,9 mg dieser SDS-Zellwände wurden mit 30 µg heterolog exprimierter Curdlanase inkubiert. Die Hydrolyse wurde im turbidimetrischen Test verfolgt und die spezifische Aktivität mit dem enzymatischen Test gemessen. Der Vergleich mit der Hydrolyse der Bäckerhefe zeigte, daß die Zellwand beider Hefen im gleichen Umfang hydrolysiert wird (nicht gezeigt).

8.2 Hydrolysierbarkeit ganzer Zellen

Die Hefen wurden in YM-Medium bis zu einer optischen Dichte von 0,7 angezogen. Aus diesen Kulturen wurde 1 ml entnommen und mit 30 µg heterolog exprimierter Curdlanase inkubiert. Im turbidimetrischen Test (B.4.10.1) konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden, da im Photometer tote Zellen von lebenden Zellen nicht unterschieden werden können, solange die toten Zellen nicht platzen. Die Zellwand wurde aber während der Inkubationszeit nicht vollständig abgebaut, was zum Platzen der Zellen geführt hätte. Der enzymatische Test (B.4.10.2) brachte ebenfalls keine brauchbaren Aussagen, da die Hefen selbst Glukanasen (Chaffin et al., 1998) haben, die ebenfalls Glukose als Endprodukt ihrer Hydrolyse produzieren. Auch ein Abtöten der Hefen mit Natriumazid führte zu keiner Verbesserung der Ergebnisse. Die Glukosemenge im Medium vor der Inkubation mit Curdlanase war zu hoch, um einen Anstieg der Glukosemenge messen zu können. Deshalb wurde ein neues Testsystem ausgearbeitet.

8.3 Wirkung der Curdlanase auf sich vermehrende Zellen

In einem Vorversuch sollte gezeigt werden, ob die Curdlanase lebensfähige Hefezellen, allen voran die Zellen von *Candida albicans*, abtöten kann. *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* wurden in YM-Medium bis zu einer optischen Dichte von 0,5 (gemessen bei λ = 580 nm) angezogen. 100 µl dieser Kulturen wurden mit 30 µg Curdlanase inkubiert. Nach 0, 1, 2, 3 und 4 Stunden wurden jeweils 20 µl entnommen, auf YM-Agar ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Kontrolle wurden die Hefen mit inaktivierter Curdlanase (10 min, 100°C) inkubiert. Die Auszählung der Kolonien ergab, daß die Curdlanase Zellen von *Candida albicans* mindestens genauso gut und schnell inaktiviert wie Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*. Die Abnahme der Kolonien in den Kontrollansätzen ist vermutlich auf Autolyse der inkubierten Zellen zurückzuführen. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt.

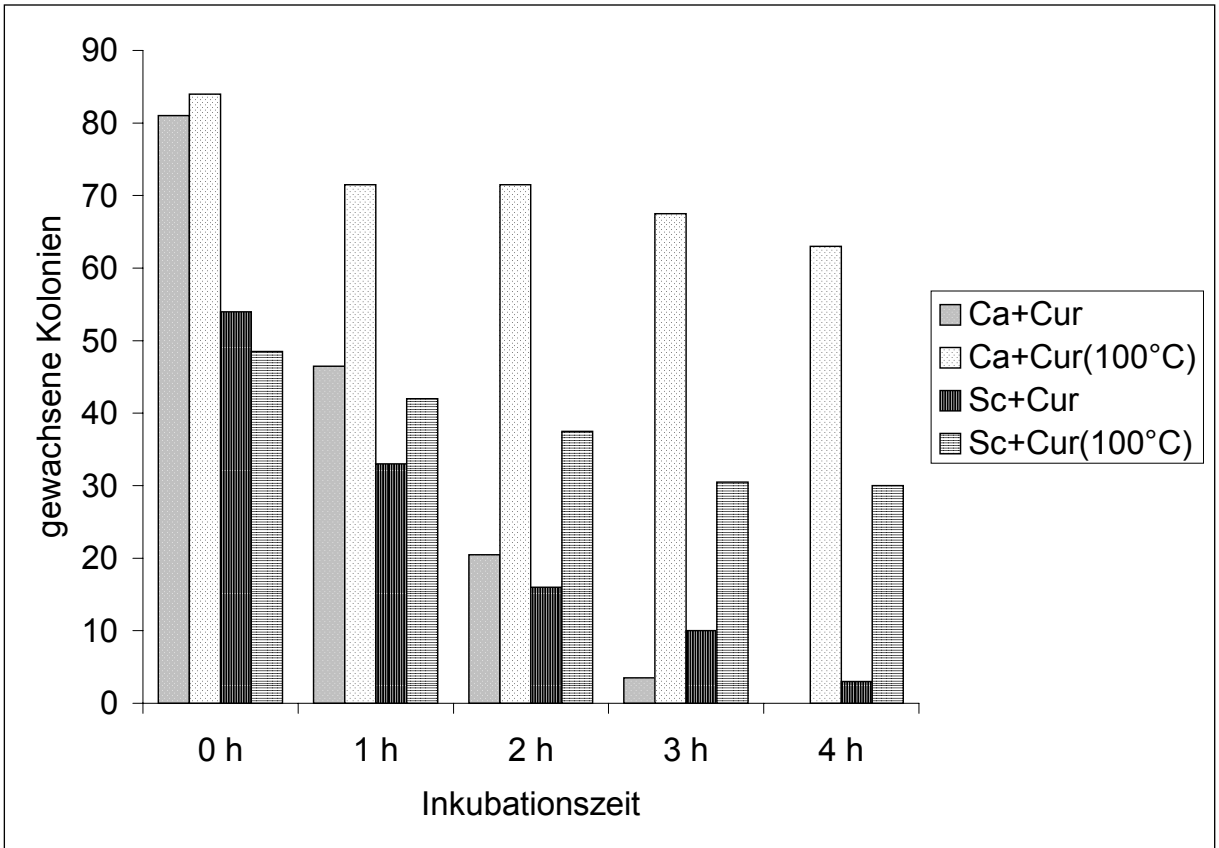


Abbildung 39: Inaktivierung von *Candida albicans* durch Curdlanase
Dargestellt sind die Anzahl der gewachsenen Kolonien von *Candida albicans* bzw. *Saccharomyces cerevisiae* nachdem das Inokulat verschieden lang mit Curdlanase bzw. inaktivierter Curdlanase inkubiert worden war.
Ca = *Candida albicans*, Sc = *Saccharomyces cerevisiae*, Cur = Curdlanase, Cur(100°C) = inaktivierte Curdlanase

Die in Abbildung 39 gezeigte Inaktivierung von *Candida albicans* durch die Curdlanase sollte mit einer zweiten Methode bestätigt werden. Gleichzeitig wurde das Spektrum der untersuchten Hefen ausgeweitet. Es wurden Methylenblauagar-Platten gegossen (B.2.3.2), wobei in den Agar frische Zellen entweder von *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula spec.* oder *Schizosaccharomyces pombe* eingemischt und immobilisiert wurden. Methylenblau kann nur von lebenden Zellen aufgenommen werden. In die Mitte dieser Platten wurde ein Loch von 8 mm Durchmesser eingestanzt. In dieses Loch wurden 30 µg Curdlanase einpipettiert. Anschließend wurden die Platten 2 Tage bei 25°C bebrütet. Die Hefen wuchsen, wenn sie nicht gehemmt wurden, im Agar zu Minikolonien heran, die dunkelblau gefärbt sind.

Wie in Abbildung 40 gezeigt, konnte keine der vier Hefen in unmittelbarer Nähe des Brunnens wachsen. Die Konzentration der Curdlanase war dort zu hoch. Der größte Hof (∅ = 28 mm) entstand bei *Schizosaccharomyces pombe*. Die Spalthefe kann Curdlanase am wenigsten tolerieren. Die Imperfekte Hefe *Rhodotorula spec.* wurde durch Curdlanase ebenfalls im Wachstum gehemmt (∅ = 18 mm). Allerdings scheinen einige Zellen toleranter als andere zu sein, da keine scharfe Grenze erkennbar ist. Der Hof, in dem *Saccharomyces cerevisiae* nicht wachsen konnte hatte einen Durchmesser von 24 mm. *Candida albicans* ist offensichtlich toleranter gegenüber Curdlanase, sie konnte bis zu einem Abstand von wenigen Millimetern zum Brunnen wachsen, dort aber ist eine sehr scharfe Grenze auszumachen. Im Binokular bei einer Vergrößerung von 1:100 konnte man erkennen, daß an dieser Grenze - deutlich am dunklen Ring zu erkennen - die Hefezellen intensiver blau gefärbt waren, aber auch um die Zellen herum war der Agar intensiver blau gefärbt.

Warum die Curdlanase lebende Zellen von *Candida albicans* schlechter hemmen kann als Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*, obwohl die SDS-Zellwände gleich gut hydrolysiert wurden, konnte nicht geklärt werden.

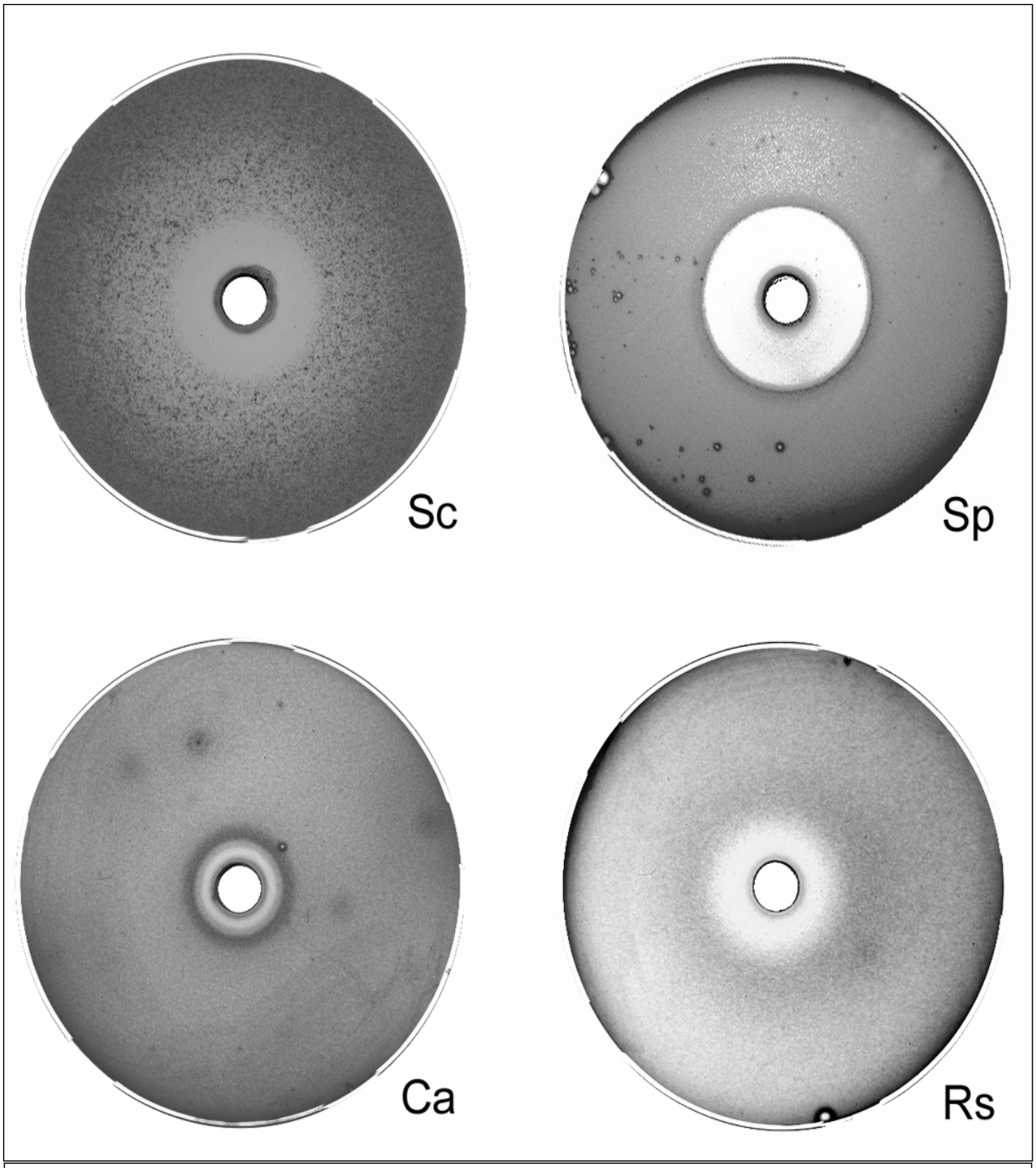


Abbildung 40: Wachstumshemmung von Hefen durch Curdlanase
Methylenblauagarplatten mit eingeschlossenen Hefen wurden zwei Tage bei 25°C bebrütet. Die Hefen wuchsen zu Minikolonien im Agar heran, außer in unmittelbarer Umgebung des Loches in der Mitte. In diesem Loch waren 30 µg Curdlanase einpipettiert worden. (Sc = *Saccharomyces cerevisiae*, Sp = *Schizosaccharomyces pombe*, Ca = *Candida albicans* , Rs = *Rhodotorula spec.* (Bilder in Graustufen abgebildet; die dunklen Ringe am Rand der Löcher sind Schatten, die durch die Beleuchtung beim Fotographieren entstanden und sind nicht auf Hefen zurückzuführen)

D Diskussion

Die Suche nach neuen hydrolytischen Aktivitäten von *Streptomyces globisporus* zeigte, daß Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* geschädigt werden (Strobel, 1995). Dieser Befund wurde in dieser Arbeit aufgegriffen und genauer untersucht. Elektronenmikroskopische Untersuchungen belegten, daß die Zellwand von Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* bei Inkubation mit Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus* zerstört werden. Durch Hydrolyseversuche der einzelnen Bestandteile der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus* konnte gezeigt werden, daß das Stützskelett der Hefezellwand, das β-(1,3)-Glukan, auch als Curdlan bezeichnet, hydrolysiert wird. In einem Zymogramm, dem Curdlanblot, konnte demonstriert werden, daß ein Protein der Größe 64 kDa Curdlan lysieren kann. Daß die Hydrolyse des Curdlan ausreicht die Hefezellwand zu zerstören, wird durch die Aussage von Wicker und Mühlschlegel (2000) gestützt: Das Curdlan reicht aus die Form der Hefezelle zu stabilisieren, auch wenn alle anderen Bestandteile der Hefezellwand entfernt werden. Eine zusätzliche Bestätigung für die Hydrolyse von Glukan wurde durch gaschromatographische Untersuchungen der Hydrolyseprodukte erhalten. Bei der Hydrolyse von Hefezellwand oder von Curdlan durch den Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus* entsteht Glukose.

Diese Beobachtung wurde ausgenutzt, um einen quantitativen Aktivitätstest zum Nachweis der Curdlanase zu entwickeln. Bei diesem Test wird die durch die Aktivität der Curdlanase freigesetzte Glukose enzymatisch gemessen. Um die Curdlanase im Kulturüberstand nachweisen zu können, wurde ein neues glukosefreies Minimalmedium für *Streptomyces globisporus* im Labor eingeführt.

Tests zur Hydrolyse von anderen Glukanen ergaben, daß es sich um eine spezifische Curdlanase handelt. Selbst Laminarin, welches sich nur durch zusätzliche β-(1,6)-Verzweigungen von Curdlan unterscheidet, wurde nicht hydrolysiert. Diese Eigenschaft ist insofern von Bedeutung, als z. B. die hefelytische Glukanase von *Cellulomonas cellulans* Laminarin spaltet (Shen, 1991).

Die Beobachtung, daß Glukose ein Endprodukt der Hydrolyse der Curdlanase ist, legte nahe, daß es sich um eine Exoglukanase handelt. Es zeigte sich aber, daß Curdlan nicht vom Ende her um einzelne Glukoseeinheiten verkürzt wird. Vielmehr

spaltet die Curdlanase zufällig im Curdlanstrang und erst im weiteren Verlauf der Hydrolyse entsteht Glukose.

Aus diesen Ergebnissen muß gefolgert werden, daß eine spezifische Endo-Curdlanase für die Lyse der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* verantwortlich ist.

Nachdem das Enzym aus dem Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus* gereinigt worden war, konnte bestätigt werden, daß die Curdlanase allein dazu ausreicht, die Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* und Curdlan zu lysieren und Glukose freizusetzen. Die Reinigung gelang erst, als im dritten Schritt, einer hydrophoben Interaktionschromatographie, Bedingungen gefunden werden konnten, die Curdlanase stark anzureichern. Ebenfalls entscheidend für die Reinigung war, daß *Streptomyces globisporus* zur Expression der Curdlanase stimuliert werden konnte. Die Curdlanase war im Kulturüberstand einer stimulierten Kultur gegenüber einer unstimulierten um den Faktor 10 angereichert.

Es war bekannt, daß Sekundärmetabolite von Streptomyceten durch exogene Faktoren reguliert werden können (Zeitler, 1993). Für *Streptomyces globisporus* konnte Brönneke (1994) zeigen, daß die Expression von Mutanolysin durch bakterielle Zellwände und Chitin induziert werden kann. Diese Faktoren stimulierten aber nicht die Expression der Curdlanase. Deren Expression konnte durch Hefezellen, Hefezellwände oder Curdlan um das fünf- bis zwölffache gesteigert werden. Die Induktion war abhängig von der Menge des zugesetzten Induktors. Je mehr eingesetzt wurde, desto stärker war die Induktion, allerdings glich die Dosis-Effekt-Kurve einer Sättigungskurve. Andere Glukane, wie das β-(1,6)-Glukan Pustulan oder Laminarin, können die Expression dagegen nicht steigern. Die Regulation der Synthese und Sekretion von Exoenzymen scheint spezifisch zu sein. Auffällig dabei ist, daß nur das jeweilige Substrat oder sehr ähnliche Strukturen eine Stimulation auslösen können. Zusätzliche Belege für diese Aussage lieferten weitere Stimulationsversuche. *Streptomyces globisporus* konnte nur durch Zugabe von Xylan ins Medium zur Sekretion von Xylanase stimuliert werden. Durch Laminarinzugabe konnte eine Laminarinase-Aktivität induziert werden. Diese ist jedoch nicht nachweisbar, wenn *Streptomyces globisporus* ohne Stimulator oder mit Curdlan als Stimulator gewachsen war.

Die Induktion von hydrolytischen Exoenzymen durch Zugabe von Substrat ins Wachstumsmedium wurde schon mehrfach beschrieben (z. B.: Watanabe et al. 1990, Miyashita et al. 1991, Blaak et al. 1993, Brönneke 1994). Wie die Bakterien das Substrat sensieren ist aber noch nicht verstanden. Bei der Suche nach dem molekularen Auslöser für die induzierbare Expression der Curdlanase kam man zu einem erstaunlichen Ergebnis. Nur das unlösliche Glukangerüst der Zellwand konnte die Induktion der Curdlanase auslösen. Sobald der Curdlanstrang so weit verkürzt wurde, bis die Teilstücke löslich waren, konnte mit diesen keine Stimulation mehr erreicht werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen zur Induktion von Mutanolysin bei demselben Organismus (Brönneke, 1994). Die Induktion der Expression von Avicelase bei *Streptomyces griseus* wird ebenfalls nur durch kristalline Cellulose ausgelöst (Walter und Schrempf, 1996). Von Chitinasen (Watanabe et al., 1990) und Cellulasen (Schrempf und Walter, 1995) weiß man, daß sie am Substrat andocken und nur dann hydrolytisch aktiv sind. Diese Beobachtung macht zwar plausibel, daß nur große Moleküle hydrolysiert werden, aber nicht, warum nur große Moleküle induzierende Wirkung besitzen. Es sei denn durch diese Hydrolyse werden Signalstoffe frei, die vom Bakterium sensiert werden, wie es für zelldichteabhängige Regulationen beschrieben ist. Sánchez und Braña (1996) entdeckten bei *Streptomyces clavuligerus*, daß hohe Zelldichten die Produktion von Antibiotika induzierten. Sie verglichen den Effekt der interzellularen Signalwirkung mit Quorum Sensing bei *Myxococcus xanthus*. Die Suche nach zu postulierenden Signalmolekülen im Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus*, der unter induzierenden Bedingungen gewachsen war, ergab jedoch, daß keine wirksamen Signalmoleküle nachgewiesen werden konnten. Bei einem direkten Kontakt von Streptomyceszelle zu Hefezelle wäre der Diffusionsweg so kurz, daß im Medium keine Signalmoleküle akkumulieren. Da aber – wie gezeigt - ein direkter Zell-Zell-Kontakt zur Induktion nicht hinreichend ist, kann auch diese Hypothese für *Streptomyces globisporus* nicht aufrechterhalten werden. Ein direkter Zell-Zell-Kontakt löst auch kein physikalisch bedingtes Signal aus, da gezeigt werden konnte, daß Polystyrolperlen zwar von *Streptomyces globisporus* umwachsen werden, dieser Kontakt aber keine Induktion der Curdlanase hervorruft.

Es konnte somit belegt werden, daß die Induktion von Curdlanase spezifisch durch ihr Substrat ausgelöst wird. Die Frage, wie dieses große Molekül perzeptiert wird,

konnte nur insofern beantwortet werden, als daß eine Spaltung des Substrats in lösliche Bruchstücke die stimulierende Wirkung zerstört.

Die Lyse der Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* läßt den Schluß zu, daß die Expression der Curdlanase eine Abwehrreaktion gegen Nahrungskonkurrenten ist. Nach Mutanolysin (Kawata et al., 1984) ist die Curdlanase ein weiteres Enzym von *Streptomyces globisporus*, das im Zuge einer Abwehrreaktion sekretiert wird. Diese Funktion wurde auch den Chitinasen von *Bacillus circulans WL12* (Watanabe et al., 1990), der Exochitinase von *Streptomyces olivaceoviridis* (Blaak et al., 1993) und der Chitosanase von *Myxobacter AL-1* (*Lysobacter enzymogenes*) (Hedges und Wolfe, 1974) zugesprochen. Die Sekretion dieser Enzyme ist mit dem bereits in der Einleitung angesprochenen Elicitorsystem vergleichbar, auch wenn dieses gegen pathogene Organismen gerichtet ist. Die Abwehr von Nahrungskonkurrenten ist ebenso bedeutsam wie die Abwehr von pathogenen Organismen, da der Kampf um Lebensraum und Nahrung in der Evolution sogar der entscheidendere als der gegen Freßfeinde ist (Begon et al., 1991).

Gleichzeitig setzt die Curdlanase aus dem Curdlan der Hefezellwand Glukose frei, ein sehr schnell metabolisierbarer Zucker. Die Aktivität dieses Exoenzyms stellt somit auch eine Nahrungsquelle bereit. In dieser Funktion ist die Curdlanase mit Cellulasen, Lignocellulasen, Xylanasen oder Proteasen vergleichbar. Verschiedene Streptomyceten exprimieren mehrere dieser Exoproteine und werden deshalb untersucht, ob sie in biotechnologischen Anwendungen etablierbar sind (Ruiz-Arribas et al. 1995). Sie bauen z. B. bei der Papierproduktion unerwünschte Hemicellulose ab und ernähren sich von den Hydrolyseprodukten.

Die Curdlanase erfüllt somit zwei Aufgaben, die es *Streptomyces globisporus* erleichtern, im Boden zu überleben. Andere Polymere, die im Boden vorkommen, wie Pullulan, Stärke und Proteine kann *Streptomyces globisporus* - wie gezeigt - ebenfalls hydrolysieren. Interessanterweise konnten keine Anhaltspunkte für eine Hydrolyse von Chitin gefunden werden, obwohl nahezu alle Streptomyceten chitinolytisch sind (Schrempf, 1993, pers. Mitteilung).

Die Hydrolyse der Polymere und die Verwertung der Hydrolyseprodukte erfordert neben dem hydrolysierenden Exoenzym noch eine Vielzahl weiterer Faktoren. Zu diesen gehören Exkretion, Sensierung des Umwelt, Aufnahme der Nährstoffe und deren Regulation. Die Produktion dieser multifaktoriellen Komplexe braucht Zeit und

Energie. Untersuchungen zum Zeitpunkt der Expression der Curdlanase belegten, daß die Curdlanase erst nach zwei bis drei Tagen am Ende des exponentiellen Wachstums exprimiert wird. In dieser Phase werden auch die ersten Sporen gebildet. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Curdlanase ein Sekundärmetabolit ist. Chater postulierte 1993, daß die Expression von Exoenzymen zum Sekundärstoffwechsel gehört. Dieser unterliegt globalen Regulationsmechanismen. Gut untersucht sind z. B. die A-Faktor abhängige Regulation der Streptomycinsynthese bei *Streptomyces griseus* (Horinouchi und Beppu, 1992) oder die *bld*-Gene bei *Streptomyces coelicolor* (Shoham et al. 1999). Darüber hinaus wurde ein pleiotroper Regulator der Exoenzymsynthese mehrerer Streptomyceten gefunden (Daza et al., 1990).

Gleichzeitig wirkt noch ein weiterer Regelkreis, der von der Verfügbarkeit von Nährstoffen abhängig ist. Ein zentrales Molekül scheint dabei die Glukosekinase zu sein. Dieses zytoplasmatische Enzym reguliert über die Phosphorylierung von Glukose spezifische Regulatoren verschiedener katabolischer Stoffwechselwege (Hindle und Smith, 1994) und wie das Beispiel der bld-Mutanten zeigt (Nodwell et al., 1996; Kelemen und Buttner, 1998), auch den sekundären Stoffwechsel. Dieses Enzym könnte die bei *Streptomyces globisporus* beobachtete Katabolit-Repression steuern. Es konnte gezeigt werden, daß Glukose im Medium nicht generell, aber ab einem bestimmten Schwellenwert die Expression der Curdlanase reprimiert. Dieser Schwellenwert ist notwendig, da das Endprodukt der Curdlanase-Aktivität Glukose ist. Bei den Experimenten zur Katabolit-Repression fiel auf, daß Glukose erst ab dem Zeitpunkt verstärkt aufgenommen wurde, als die Curdlanase exprimiert wurde. Anscheinend wird ein Glukoseaufnahmesystem gleichzeitig zur Curdlanase-Expression hochreguliert oder aktiviert. Die Glukosekinase könnte die Katabolit-Repression auslösen, wenn mehr Glukose importiert wird als für die Glykolyse notwendig ist. Die nicht in die Glykolyse eingespeiste Glukose wird von dieser Glukosekinase phosphoryliert, woraufhin die intrazelluläre Konzentration von Glukosephosphat steigt. Dieses Signal führt letztendlich zur beobachteten Reprimierung der Synthese von Curdlanase. Auch wenn diese Schlußfolgerung sehr spekulativ ist, wird sie von den Ergebnissen zur Expression von Agarase (Kendall und Cullum, 1984; Bibb et al., 1987), α-Amylase (Virolle und Bibb, 1988) und Chitinase (Robbins et al., 1988) gestützt.

Bei den Untersuchungen zur Katabolit-Repression fiel eine verfrühte stationäre Phase auf. Dies ist keine typische Diauxie, wie sie beim Verwertungswechsel verschieden gut abbaubarer Kohlenstoffquellen zu beobachten ist – es lag nur eine sofort metabolisierbare Kohlenstoffquelle vor -, sondern eine Phase in der die Grundlagen für die Synthese von Sekundärmetaboliten gelegt werden. Neumann (1996) konnte am Beispiel der Streptomycinsynthese von *Streptomyces griseus* zeigen, daß es bei *Streptomyces griseus* zwei solcher Entscheidungsphasen gibt. Während der ersten Phase greifen Effektormoleküle (z. B. A-Faktor) in die Regulation ein, während der zweiten ist keine Beeinflussung möglich. Diese Wachstumspause belegt, daß das Umschalten von primären auf sekundären Stoffwechsel sehr komplex ist. Dadurch besitzen die Streptomyceten aber ein feinregulierbares System, das sie befähigt, sich den aktuellen Umweltbedingungen anzupassen.

Die biochemische Charakterisierung der gereinigten Curdlanase zeigte, daß sie sehr gut an das Milieu Boden angepaßt ist. Die Langzeitstabilität (nach 3 Monaten im Kühlschrank war sie immer noch aktiv), die Stabilität bei Temperaturen von –12°C bis 50°C und die Toleranz gegenüber einem weiten pH-Bereich sprechen dafür. Der ermittelte K_M-Wert von 2,3 mg Curdlan /ml liegt im Bereich anderer Glukanasen, wie z. B. der Endo-β-(1,3)-Glukanase von *Aspergillus fumigatus* (Fontaine et al., 1997). Deren K_M-Wert liegt bei 1,2 mg Curdlan /ml.

Die Curdlanase wurde ansequenziert. Die dabei erhaltenen Teilsequenzen zeigten keine Ähnlichkeiten mit bekannten Glukanasen oder anderen Proteinen. Dies war ein weiterer Hinweis, daß die Curdlanase ein bisher noch nicht beschriebenes Enzym ist.

Um neben der spezifischen Aktivität eine weitere Nachweismöglichkeit für die Curdlanase zu bekommen, wurden Antikörper gegen die Curdlanase hergestellt. Die gewonnenen Antikörper reagierten im Kulturüberstand nur mit der Curdlanase. Allerdings zeigten Untersuchungen zur Hemmung der enzymatischen Aktivität der Curdlanase, daß die Antikörper nicht gegen Epitope gerichtet sind, die für die Aktivität wichtig sind. Erst ein zehnfacher Überschuß an IgGs halbierte die Aktivität der Curdlanase.

Das Durchmustern ausgesuchter Organismen auf Curdlanaseaktivität zeigte, daß typische hefelysierende Bakterien, wie *Cellulomonas cellulans* keine Curdlanase besitzen. Alle vier untersuchten Streptomyceten dagegen zeigten

Curdlanaseaktivität. Die Expression und deren Stimulierbarkeit der Curdlanase bei *Streptomyces coelicolor* war nur schwach ausgeprägt. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, daß der notwendige Wechsel des Mediums (*Streptomyces coelicolor* wuchs in dem für *Streptomyces globisporus* optimalen Minimalmedium nicht) dafür verantwortlich ist. *Streptomyces globisporus* zeigte in diesem Ersatzmedium auch eine geringere Curdlanaseaktivität (Ergebnis nicht gezeigt). Nur im Kulturüberstand der beiden Stämme von *Streptomyces coelicolor* reagierte ein Protein mit den Antikörpern, die gegen die Curdlanase von *Streptomyces globisporus* gerichtet sind. Dies war ein Hinweis darauf, daß *Streptomyces coelicolor* eine Curdlanase besitzt, die der von *Streptomyces globisporus* sehr ähnlich ist. Daraufhin wurden die bekannten Aminosäuresequenzen der Curdlanase von *Streptomyces globisporus* mit den fast zeitgleich veröffentlichten Sequenzen einer Cosmidbank von *Streptomyces coelicolor* verglichen. Dabei wurde eine hohe Homologie zu dem ORF 15c, der laut Veröffentlichung für ein hypothetisches Exoprotein kodiert, festgestellt. Wegen dieser genetischen Ähnlichkeit und den Kreuzreaktionen mit den Antikörpern wurde davon ausgegangen, daß der ORF 15c für eine Curdlanase kodiert.

Dieser ORF 15c liegt auf dem Cosmid 8A6, das Sir D. Hopwood freundlicherweise als *Escherichia coli*-Klon zur Verfügung stellte. Eine direkte Expression des ORF 15c mit dem überlassenen Klon schlug fehl. Der ORF 15c wurde inklusive flankierender Bereiche in einen Multi-copy-Vektor kloniert. Auch dieser Klon exprimierte das entsprechende Protein nicht. Erst durch die Klonierung des ORF 15c in einen induzierbaren Vektor gelang die Expression des ORF 15c. Aktivitätstests und Westernblots bestätigten, daß der ORF 15c für eine Curdlanase kodiert. Es gelang somit die heterologe Expression einer Curdlanase von Streptomyceten in *Escherichia coli* in einer aktiven Konformation. Durch eine Punktmutation konnte an diese Curdlanase ohne nennenswerte Aktivitätseinbuße auch ein Histidinschwanz angehängt werden. Die Ausbeute an Curdlanase war allerdings trotz einer Induktion des Expressionsvektors gering. Ein Grund dafür ist der unterschiedliche GC-Gehalt der DNA von Streptomyceten (75%) und *Escherichia coli* (51%). Das Codon CCC für Prolin kommt in der Curdlanase 22 mal vor, *Escherichia coli* würde dieses Codon statistisch maximal neunmal verwenden. Außerdem scheint *Escherichia coli* das Fremdprotein rasch abzubauen. Bei Westernblots mit Rohextrakten der die Curdlanase exprimierenden Klone fiel auf, daß im niedermolekularen Bereich der Blotmembran sehr starke Signale detektierbar waren, die auf Kreuzreaktionen mit

den gegen die Curdlanase von *Streptomyces globisporus* gerichteten Antikörpern zurückzuführen sind (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bei der Reinigung der histidinmarkierten Curdlanase konnte ein Protein mit ca. 21 kDa selbst mit 6 M Harnstoff nicht von der Curdlanase abgetrennt werden. Die Anreicherung dieses Proteins mit der Nickel-Affinitätschromatographie läßt auf mehrere benachbarte Histidinreste schließen. Diese Tatsachen deuten daraufhin, daß es sich bei diesem Protein um das Chaperon SlyD handelt. Da die Curdlanase aus vielen Prolinen besteht und SlyD als Peptidy-Prolyl-Isomerase beschrieben (Hottenrott et al., 1997) ist, dürfte es sich bei dem 21 kDa Protein tatsächlich um SlyD handeln. Eine Ansequenzierung des Proteins zur Bestätigung der Vermutung konnte aus Zeitmangel nicht mehr durchgeführt werden.

Die Anlagerung eines Chaperons könnte den schlechteren K_M-Wert der heterolog exprimierten Curdlanase gegenüber der nativen Curdlanase erklären. Durch das Chaperon könnte die Substratbindestelle nicht mehr frei zugänglich sein. Eine alternative Erklärung ergibt sich aus der Tatsache, daß das Gen für die Curdlanase aus *Streptomyces coelicolor* und nicht aus *Streptomyces globisporus* stammt.

Das Anhängen eines Histidinschwanzes an die Curdlanase machte eine schnelle Reinigung des Enzyms möglich. Dies war notwendig, um die Wirkung des Enzyms auf verschiedene Hefen zu untersuchen.

Alle untersuchten Hefen ließen sich durch die Curdlanase in ihrem Wachstum hemmen. Es konnte nur für *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, daß die Zellen tatsächlich abgetötet werden. Bei *Candida albicans* konnte zwar gezeigt werden, daß die Zellen derart gestört werden, daß sie sich nicht mehr vermehren können, aber nicht daß sie lysiert werden. Dies ist für eine mögliche medizinische Anwendung insofern von Bedeutung, als daß ein Ausbreiten von *Candida albicans* verhindert werden kann. Der Wirkmechanismus der Curdlanase, die Lyse der Zellwand, hätte gegenüber anderen fungistatischen Mitteln, die Biosyntheseleistungen der Hefe verhindern, den Vorteil, daß die Curdlanase nicht von der Hefe aufgenommen werden muß. Darüber hinaus werden immer mehr *Candida albicans*-Stämme bei Patienten gefunden, die gegen eingesetzte Wirkstoffe, z. B. Fluconazol resistent sind (Weig et al., 1998). Die zunehmende Resistenz gegen die bisherigen Antimycotika führte zur Entdeckung der Zellwand als attraktives therapeutisches Ziel, zumal Säugetierzellen keine vergleichbare Struktur aufweisen

(Georgopapadakou und Tkacz, 1995). Ein Grund für die schlechte Behandelbarkeit von Candidosen liegt in Formvariabilität der Hefe. Beim Wechsel von der kommensalen Lebensweise zur pathogenen verändert die Hefe ihre Form und wächst zu sogenannten Keimschläuchen aus. Diese adherieren besser an Säugetierzellen als die typische Hefeform (Mitchell, 1998). Dabei verändert sich die Zusammensetzung der Mannoproteine der Zellwand. Dies erschwert die Immunantwort des Patienten. Fast konstant bleibt aber der Anteil des β-(1,3)-Glukans, dem Stützskelett der Zelle (Chaffin et al., 1998). Die Curdlanase kann demzufolge gleichermaßen gegen alle Formen von *Candida albicans* wirken, ohne daß Nebenwirkungen zu befürchten sind.

Andere Anwendungsmöglichkeiten der Curdlanase sind in der Forschung angesiedelt. Zum einen ist die Herstellung von Sphäroblasten eine unverzichtbare Voraussetzung für viele genetische, aber auch für physiologische Experimente. Zu diesem Zweck werden bereits jetzt käuflich erwerbbare Enzympräparationen verwendet. Eine davon, die Lytikase von *Arthrobacter luteus* wurde mit der Curdlanase verglichen. Die Lytikase, die native als auch die rekombinant hergestellte, lysierten die Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* schneller als die Curdlanase. Allerdings ist die Lytikase kein einzelnes Enzym, sondern ein Gemisch aus mehreren Proteinen. Dieser Nachteil kommt besonders bei Experimenten zum Zellwandaufbau zum Tragen. Zur Aufklärung der Struktur von Zellwänden ist es notwendig gezielt Strukturen aufzulösen, um eindeutige Aussagen über den Aufbau treffen zu können.

Die Curdlanase ist nicht nur ein weiteres Beispiel für ein neues durch Substrat induzierbares Exoenzym bei Streptomyceten. Sie hat auf Grund ihrer spezifischen Wirkungsweise ein gutes Potential als neues Werkzeug in Medizin und Forschung eingesetzt zu werden.

E Zusammenfassung

Ausgehend von der Entdeckung einer neuen hydrolytischen Aktivität von *Streptomyces globisporus*, der Zerstörung der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*, wurde in dieser Arbeit ein neues Enzym, eine Curdlanase, identifiziert, gereinigt und charakterisiert. Dessen Aktivität und Anwendungsmöglichkeiten wurden untersucht. Dabei konnten folgende Ergebnisse erzielt werden.

Die Zerstörung der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* durch *Streptomyces globisporus* erfolgt durch Hydrolyse des β-(1,3)-Glukans. Das hydrolysierende Enzym ist eine spezifische Endo-Curdlanase. Für deren Nachweis wurden qualitative und quantitative Aktivitätstests entwickelt und polyklonale Antikörper gewonnen. Mit diesen Methoden konnte gezeigt werden, daß die Expression der Curdlanase spezifisch durch ihr Substrat um das zehnfache gesteigert werden kann. Als Auslöser für die Stimulation der Curdlanase konnten physikalisch bedingte Signale durch direkten Zell-Zell-Kontakt ausgeschlossen werden. Es konnten keine niedermolekularen Signalstoffe gefunden werden, nur Curdlan und unlösliche Bruchstücke von Curdlan konnten eine Stimulation auslösen. Es wurden noch andere spezifische Induktionen anderer hydrolytischer Aktivitäten von *Streptomyces globisporus* beobachtet.

Die Curdlanase konnte aus dem Kulturüberstand bis zur Homogenität gereinigt werden. Die Charakterisierung ergab, daß das Exoenzym über weite Temperatur- und pH-Bereiche stabil und aktiv ist. Sequenzvergleiche mit anderen Glukanasen zeigten keine signifikanten Homologien. Die Curdlanase ist ein Sekundärmetabolit, dessen Expression einer Katabolit-Repression unterliegt, die ab einer bestimmten Glukosekonzentration im Medium ausgelöst wird. Auch bei anderen Streptomyceten konnte eine Curdlanase-Aktivität nachgewiesen werden, nicht aber bei *Cellulomonas cellulans*, der als hefelytischer Organismus beschrieben ist.

Das Gen für die Curdlanase konnte zwar nicht aus *Streptomyces globisporus* isoliert werden, aber aus einer Cosmidbank von *Streptomyces coelicolor*. Dieses Gen kodiert für ein Enzym, das sowohl mit den Antikörpern gegen die Curdlanase von *Streptomyces globisporus* reagiert, als auch spezifische Curdlanase-Aktivität aufweist. Dieses Gen konnte in *Escherichia coli* exprimiert werden. Das heterolog exprimierte Enzym konnte in aktiver Form gereinigt werden.

Die Curdlanase wirkt dem Wachstum bzw. der Vermehrung von Vertretern der Imperfekten Hefen, Spalthefen und Echten Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Candida albicans*, wirksam entgegen.

F Literaturverzeichnis

Adamidis T., Champness W. 1992. Genetic analysis of *abs*B, a *Streptomyces coelicolor* locus involved in global antibiotic regulation. J. Bacteriol. 174: 4622-4628

Albersheim J.W., Nevins D.J., English P.D., Karr A. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohyd. Res. 5: 340-345

Albersheim P., Darvill A.G. 1985. Oligosaccharine: Zucker als Pflanzenhormone. Spektrum der Wissenschaft 11: 85-93

Altschul S.F., Gish, Warren, Miller, Webb, Myers, Eugene, Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410

Arthur M., Molinas C., Courvalin P. 1992. The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* strain BM 4147. J. Bacteriol. 173: 2582-2591

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidmann J.G., Smith J.A., Struhl K. (Herausgeber), 1997. Current protocols in molecular biology, J. Wiley & sons, Inc., New York

Begon M., Harper J.L., Townsend C.R. 1991. Ökologie, Birkhäuser Verlag, Berlin

Bibb M.J., Jones G.H., Joseph R., Buttner M.J., Ward J.M. 1987. The agarase gene (dagA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): affinity purification and characterization of the cloned gene product. J. Gen. Microbiol. 133: 2089-2096

Blaak H., Schnellmann J., Walter S., Henrissat B., Schrempf H. 1993. Characteristics of an exochitinase from *Streptomyces olivaceoviridis*, its corresponding gene, putative protein domains and relationship to other chitinases. Eur. J. Biochem. 214: 659-669

Bostock R.M., Kuc J.A., Laine R.A. 1981. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. Science 212: 67-69

Botsford J.L., Harman J.G. 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. Microbiol. Rev. 56: 100-122

Braun V., Rehn K. 1969. Chemical characterisation, spatial distribution and function of a lipoprotein (mureinlipoprotein) of the *E. coli* cell wall. Eur. J. Biochem. 10: 426-438

Brönneke V. 1994. Regulation der Exoenzymsynthese von *Streptomyces globisporus* durch exogene Faktoren, Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig Maximilians Universität München

Chaffin W.L., López-Ribot J.L., Casanova M., Gozalbo D., Martínez J.P. 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function and expression. Microbiol. Mol. Biol. Reviews 62: 130-180

Chater K.F. 1983. Morphological and physiological differentiation in *Streptomycetes*, S. 89-115. In: Losick R., Shapiro L. (Herausgeber), Microbial development. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Chater K.F., Hopwood D.A. 1993. *Streptomyces*, S. 83-99. In: Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. (Herausgeber), *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Crawford D.L., McCoy E. 1972. Cellulases of *Thermomonospora fusca* and *Streptomyces thermodiastaticus*. Appl. Microbiol. 24: 150-152

Davis K.R., Darvill A.G., Albersheim P. 1986. Host pathogen interactions; XXX: Characterization of elicitors of phytoalexin accumulation in soybean released from soybean cell walls by endopolygalacturonic acid lyase. Z. Naturforschung 41c: 39-48

Daza A., Gil J.A., Vigal T., Martin J.F. 1990. Cloning and characterization of a gene of *Streptomyces griseus* that increases production of extracellular enzymes in several species of *Streptomyces*. Mol. Gen. Genet. 222: 384-392

Deshpande V., Eriksson K.E., Pettersson B. 1978. Production and purification of 1,4-β-glucosidase enzymes from *Sporotrichum pulverulentum*. Eur. J. Biochem. 90: 191-198

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356

Dunn P.E., Dai W. 1990. Bacterial peptidogycan: a signal for initiation of the bacteria-regulated sysnthesis and secretion of lysozyme in *Manduca sexta*, S: 33-46. In: Alan R. (Herausgeber), Defense molecules. Liss Inc., West Lafayette.

Eberhard A., Widrig C.A., McBath P., Schineller J.B. 1986. Analogs of the autoinducer of bioluminescens in *Vibri fischeri*. Arch. Microbiol. 146(1): 35-40

Enger M.D., Sleeper B.P. 1965. Multiple cellulase system from *Streptomyces antibioticus*. J. Bacteriol. 89: 23-27

Fontaine T., Hartland R.P., Beauvais A., Diaquin M., Latgé J.P. 1997. Purification and characterization of an endo-β-(1,3)-glucanase from *Aspergillus fumigatus*. Eur. J. Biochem. 243: 315-321

Georgopapadakou N.H., Tkacz J.S., 1995. The fungal cell wall as a drug target. Trends Microbiol. 3: 98-104

Goodfellow M., Williams S.T. Mordarski M. 1988. Actinomycetes in biotechnology. Academic Press, San Diego

Gundlach H. 1987. Untersuchungen zur Wirkung mikrobieller Elicitoren auf Zellkulturen von *Eschscholtzia californica*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig Maximilians Universität München

Hartland R.P., Fontaine T., Beauvais A., Debeaupuis J.P., Simenel C., Delepierre M., Latgé J.P. 1996. A sectreted endo-β-glucanosyl-transferase from *Aspergillus fumigatus* that catalyzes the transfer of a segment of β-(1,3)-glucan to another β-(1,3)-glucan molecule. J. Biol. Chem. 271: 26843-26849

Hedges A., Wolfe R.S. 1974. Extracellular enzyme from *Myxobacter* AL-1 that exhibits both β-1,4-glucanase and chitosanase activities. J. Bacteriol. 120: 844-853

Herder 1994. Lexikon der Biologie. Band 8, S. 84. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

Hindle Z., Smith C.P. 1994. Substrate induction and catabolite repression of the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GylR protein. Mol. Microbiol. 12: 737-745

Holligan P.M., Drew E.A. 1971. The routine analysis by gas-liquid chromatography of soluble carbohydrates in extracts of plant tissues; II. Quantitative analysis of

standard carbohydrates and the separation and estimation of soluble sugars and polyols from a variety of plant tissues. New Phytol. 70: 271-283

Holmes D.S., Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114: 193-197

Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieder T., Bruton C. J., Kieser H. M., Lydiate D. J., Smith C. P., Ward J. M., Schrempf H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomycetes* – a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich

Hopwood D.A., Wright H.M. 1978. Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. Mol. Gen. Genet. 162: 307-317

Horinouchi S., Beppu T. 1992. Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomycetes*: A-factor as a microbial hormone and the AfsR protein as a component of a two-component regulatory system. Gene 115: 167-172

Horinouchi S., Beppu T. 1994. A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Mol. Microbiol. 12: 859-864

Horinouchi S., Hara O., Beppu T. 1983. Cloning of a pleiotropic gene that positively controls biosynthesis of A-factor, actinorhodin, and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. J. Bacteriol. 155: 1238-1248

Hottenrott S., Schumann T., Plueckthun A., Fischer G., Rahfeld J.U. 1997. The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. J. Biol. Chem. 272:15697-15701

Kaku H., Shibuya N., Xu P.L., Aryan A.P., Fincher G.B. 1997. N-acetylchitooligosaccharides elicit expression of a single β-(1,3)-glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*). Physiologia Plantarum 100: 111-118

Kawata S., Takemura T., Takase Y., Yokogawa K. 1984. Purification and characterization of N-acetylmuramyl-L-alanine amidase from *Streptomyces globisporus* 1829. Agric. Biol. Chem. 48: 261-269

Kelemen G.H., Buttner M.J. 1998. Initiation of aerial mycelium formation in Streptomycetes. Current opinion Microbiol. 1: 656-662

Kendall K., Cullum J. 1984. Cloning and expression of an extracellular agarase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) in *Streptomyces lividans 66*. Gene 29: 315-321

Kornblum J., Kreiswirth B.N., Projan S.J., Ross H., Novick R.P. 1990. Agr: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*, S. 373-402. In: R. P. Novick (Herausgeber), Molecular biology of the staphylococci. VCH, New York

Korn-Wendisch F., Kutzner H.J., 1991. The family *Streptomycetaceae*. S. 921-995. In: Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H. (Herausgeber), The procaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag, Berlin

Kutchma A.J., Roberts M.A., Knaebel D.B., Crawford D.L. 1997. Small-scale isolation of genomic DNA from *Streptomyces* mycelia or spores. BioTechniques 24: 452-457

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London 227: 680-685

Lewis B.A., Smith F. 1967. Zucker und Derivate. S. 432-468. In: Stahl E., Dünnschichtchromatographie. Springer Verlag, Berlin

Locci R. 1989 *Streptomycetes* and related genera. In: Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J.G. (Herausgeber), Bergey´s manual of systematic bacteriology (Volume 4). William and Wilkens, Baltimore

MacKenzie C.R., Bilous D., Johnson K.G. 1984. Purification and characterization of an exoglucanase from *Streptomyces flavogriseus*. Can. J. Microbiol. 30: 1171-1178

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 1997. Signal transduction and two-component regulatory systems. S. 241-245. In: Brock T.D., Biology of microorganisms. Prentice Hall International, London

McCarthy A.J., Williams S.T. 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. Gene 115: 173-179

Mitchell A.P. 1998. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. Current opinion Microbiol. 1: 687-692

Miyashita K., Fujii T., Sawada Y. 1991. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. J. Gen. Microbiol. 137: 2065-2072

Mohammadi O. 1994. Commercial development of Mycostop biofungicide, S. 282-284. In: Ryder M.H., Stephens P.M., Bowen G.D. (Herausgeber), Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Csiro, Adelaide

Neumann T., Piepersberg W., Distler J. 1996. Decision phase regulation of streptomycin production in *Streptomyces griseus*. Microbiology 142: 1953-1963

Nodwell J.R., McGovern K., Losick R. 1996. An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. Mol. Microbiol. 22: 881-893

Okanishi M., Suzuki K., Umezawa H. 1974. Formation and reversion of streptomycete protoplasts: cultural conditions and morphological study. J. Gen. Microbiol. 80: 389-400

Parker J.E., Schulte W., Hahlbrock K., Scheel D. 1991. An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. Mol. Plant Microbe Interact. 4: 19-27

Pfennig N. 1958. Beobachtungen des Wachstumsverhaltens von *Streptomyceten* auf Rossi-Cholodny-Aufwuchsplatten im Boden. Arch. Mikrobiol. 31: 206-216

Pommer E.H., Lorenz G. 1986. The behaviour of polyester and polyether polyurethanes towards microorganisms. S. 77-86. In: Seal K.J. (Herausgeber), Biodeterioration and biodegradation of plastics and polymers. Biodeterioration Society Occasional Publication 1

Pospiech A., Neumann B., 1995. DNA purification. In: Practical Streptomycetes genetics, preliminary internet edition: http://www.cbs.umn.edu/asirc/whats_new/MAN_C7H7.HTM; im September 2000 unter ISBN 0-7084-0623-8 als Buch erschienen

Postma P.W., Lengeler J.W. 1985. Phosphoenol-pyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. Microbiol. Rev. 49: 232-269

Prober J.M., Trainor G.L., Dam R.J., Hobbs F.W., Robertson C.W., Zagiersky R.J., Cocuzza A.J., Jensen M.A., Baumeister K. 1987. A system for rapid DNA sequencing with flourescent chain-terminating dideoxynucleotides. Science 238: 336-341

Redenbach M., Kieser H.M., Denapaite D., Eichner A., Cullum J., Kinashi H., Hopwood D.A. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. Mol. Microbiol. 21: 77-96

Reichhardt D. 1999. Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen an *Bacillus subtilis* – Das *yux*L-Gen. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig Maximilians Universität München

Ricci P., Bonnet P., Huet J.C., Sallantin M., Beauvais-Cante F., Bruneteau M., Billard V., Michel G., Pernollet J.C. 1989. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. Eur. J. Biochem. 183: 555-563

Robbins P.W., Albright C., Benfield B. 1988. Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase (chitinase 63) in *E. coli*. J. Biol. Chem. 263: 443-447

Ruiz-Arribas A., Fernández-Abalos J.M., Sánchez P., Garda A.L., Santamaría R.I. 1995. Overproduction, purification and biochemical characterization of a xylanase (Xys 1) from *Streptomyces halstedii* JM8. Appl. Envir. Microbiology 61: 2414-2419

Sahai A.S., Manocha M.S. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. FEMS Microbiol. Rev. 11: 317-338

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (Herausgeber) 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

Sánchez L., Braña A.F. 1996. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. Microbiol. 142: 1209-1220

Schleifer K.H., Kandler O. 1967. Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I. Die Aminosäuresequenz des Mureins von *Str. thermophilus* und *Str. faecalis*. Arch. Microbiol. 57: 335-364

Schrempf H., Walter S. 1995. The cellulolytic system of *Streptomyces reticuli*. Int. J. Macromol. 17: 353-355

Sharp J.K., McNeil M., Albersheim P. 1984. The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa(β-D-glucopyranosyl-)-D-glucocitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma*. J. Biol. Chem. 259: 11321-11336

Shen S.H., Chretien P., Bastien L., Slilaty S.N. 1991. Primary sequence of the glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica*. Expression and purification of the enzyme from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 266: 1058-1063

Shibuya N., Ito Y., Kaku H. 1996. Perception of oligochitin (N-acetylchitooligosaccharide) elicitor signal in rice. Biol. of Plant Microbe Interactions: 83-88

Shoham Y., Lamed R., Bayer E:A. 1999. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. Trends Microbiology 7: 275-281

Shuman S. 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using Vaccinia DNA-Topoisomerase. J. Biol. Chem. 269: 32678-32684

Sneh N., Henis Y. 1972. Production of antifungal substances active against *Rhizoctonia solani* in chitin-amended soil. Phytopathol. 62: 595-600

Strobel U. 1995. Die Produktion des bakteriolytischen Enzyms Mutanolysin durch *Streptomyces globisporus* und die Reinigung aus dem Kulturüberstand. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig Maximilians Universität München

Stumm C., Hermans J.M.H., Middlebeek E.J., Croes A.F., DeVries G.J.M. 1977. Killer sensitive relationships in yeasts from natural habitats. Antonie Leeuwenhoek 43: 125-128

Switzer R.L., Quinn C.L. 1993. De novo pyrimidine nucleotide synthesis. S. 343-358. In: Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. (Herausgeber), *Bacillus subtilis* and

other Gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Tanaka H., Phaff H.J. 1965. Enzymatic hydrolysis of yeast cell walls. J. Bacteriol. 89: 1570-1580

Taylor G.R., Guthrie R.K., Shirling E.B. 1990. Serological characterisation of *Streptomyces* species using cell wall immunizing antigens. Can J. Microbiol. 16: 107-115

Vionis A.P., Niemeyer F., Karagouni A.D., Schrempf H. 1996. Production and processing of a 59-Kilodalton exochitinase during growth of *Streptomyces lividans* carrying pCHIO12 in soil microcosms amended with crab or fungal chitin. Appl. Envir. Microbiol. 62: 1774-1780

Virolle M.J., Bibb M.J. 1988. Cloning, characterization and regulation of an α-amylase gene from *Streptomyces limosus*. Mol. Microbiol. 2: 197-208

Walter S., Schrempf H. 1996. Physiological studies of cellulase (avicelase) sysnthesis in *Streptomyces reticuli*. Appl. Env. Microbiol. 62:1065-1069

Watanabe T., Oyanagi W., Suzuki K., Tanaka H. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans WL-12* and importance of chitinase A1 in chitin degradation. J. Bacteriol. 172: 4017-4022

Weig M., Groß U., Mühlschlegel F. 1998. Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection. Trends Microbiol. 6: 468-470

Wicker M., Mühlschlegel F.A. 2000. Die Zellwand von Pilzen. Mykologieforum 2: 18-19

Yokogawa K., Kawata S., Takemura T., Yoshimura Y. 1975. Purification and properties of lytic enzymes from *Streptomyces globisporus* 1829. Agr. Biol. Chem. 39: 1533-1543

Zhang L., Murphy P.H., Kerr A., Tate M.E. 1993. Agrobacterium conjugation and gene regulation by N-acyl-homoserine lactones. Nature 362 (6419): 446-448

Zöller H. 1992. Isolierung und biochemische Charakterisierung eines bakteriolytischen Enzyms aus *Streptomyces HZ 1*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig Maximilians Universität München

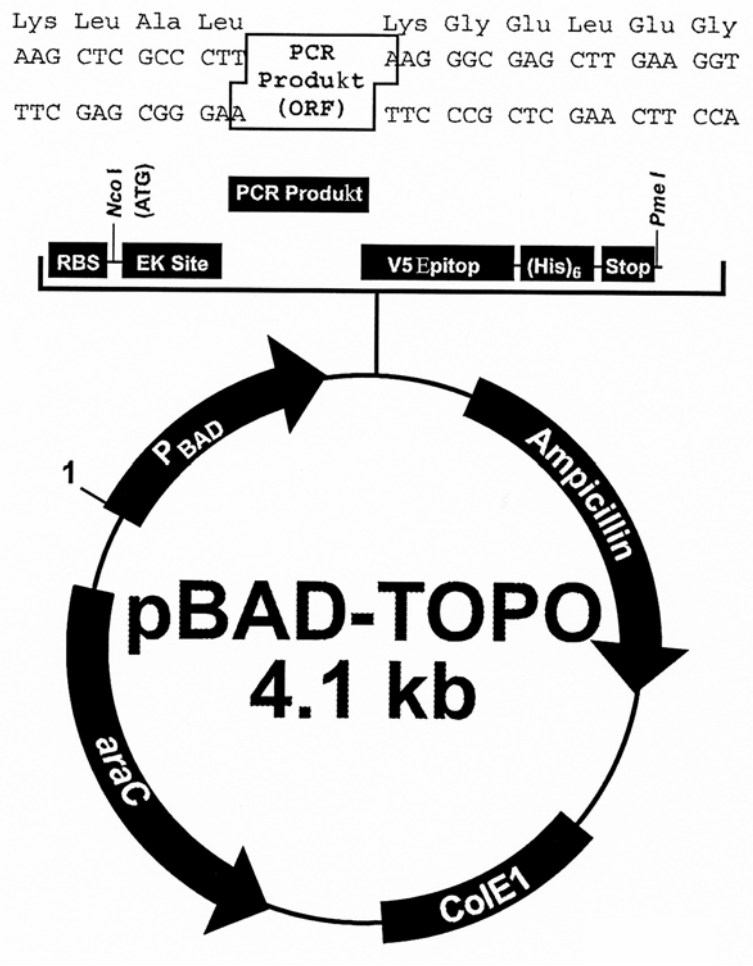
G Anhang

Anhang 1: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von ORF 15c mit den Aminosäuresequenzen der Curdlanase von *Streptomyces globisporus*

Die abgeleitete Aminosäuresequenz stammt von der Cosmidbank von *Streptomyces coelicolor* (Redenbach, 1996). Die Aminosäuresequenzen der Curdlanase von *Streptomyces globisporus* wurden von Herrn Mentele per Edmanverdau bestimmt.

```
ORF 15c       MPSSPTPSPTPSGGAPEPSGVRRRSLLAAAAAAPVLASLAGAGTAAAD
Curdlanase

ORF 15c       SPGGPRALPGGGDLGPNVIVFDPSTANIQRRLDEIFKQQESAQFGTGR
Curdlanase     GTGVGPIEAGGDLGPWVHVF

ORF 15c       YALLFKPGTYNGLNAQLGFYTSIAGLGLSPDDTTINGDVTVDAGWFDG
Curdlanase

ORF 15c       NATQNFWRSAENLALVPVSGTNRWAVSQAAPFRRMHVRGDLNLAPDGY
Curdlanase

ORF 15c       GWASGGYIADSRIDGTVGPYSQQQWYTRDSSVGGWLNAVWNMVFSGVE
Curdlanase

ORF 15c       GAPAQSFPEPPYTTLETTPVSREKPFLYLDGDEYRVFLPEKRTDARGV
Curdlanase                                      VFVPEK

ORF 15c       SWGSGTPRGTSLPLSRFYVARPDDSAATLNQALEEGLHLLLTPGVYRL
Curdlanase

ORF 15c       DRTVDVQRAGTVVLGLGYATLIPDNGVTALKVADVDGVRLAGFLVDAG
Curdlanase                                    KVGDVDGVRLAGLLIDAG

ORF 15c       PVNSATLLEVGPEGASADHSANPTTVQDVFVRIGGAGPGKATTSLVVN
Curdlanase    TQN

ORF 15c       SRHTIVDHTWVWRADHGDGVGWETNRADYGVVVNGDDVLITGLFVEHF
Curdlanase

ORF 15c       NKYDVQWNGERGRTVFFQNEKAYDAPDQAAIQNGSVKGYAAYRVGDDV
Curdlanase       DVVWAGERGRTIFFQNEKAYDAPNQAAIQNGDTRGYAAYK

ORF 15c       TEHEGWGLGSYCYYNVNPSIVQHHGFAAPNRSGVRFHGLLVVSLGGNG
Curdlanase

ORF 15c       QYECVINDTGSPTSGTDTVPSKVVQYP
Curdlanase
```

Anhang 2: pBAD-TOPO-Vektor



Anmerkungen:

Der Vektor ist linearisiert zwischen Base 388 und Base 389. Dies ist die TOPO-Klonierungsstelle.

Länge: 4127 Nukleotide; Arabinose Promotor und regulatorische Elemente: Basen 4-276; pBAD 5`-Primer Bindestelle: Basen 208-227; Ribosomen Bindestelle: Basen 329-332; Start Methionin Codon: Basen 346-348; Poly-Histidin-Region: Basen 454-471; pBAD 3´-Primer Bindestelle: Basen 527-544; rrnB T1 und T2 Transkriptionsterminatoren: Basen 577-734

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Fiedler. Er hat es mir nicht nur ermöglicht diese Doktorarbeit anzufertigen, sondern mich auch in schwierigen Situationen immer wieder aufgemuntert und an entscheidenden Wendepunkten inspirierende Ideen eröffnet. Ohne seine Geduld hätte diese Arbeit nicht in dem Umfang erledigt werden können.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meiner treuen, stets hilfsbereiten Kollegin Dr. Karin Schubert. Was wäre ich ohne Sie gewesen? Ihre Unterstützung war wirklich Gold wert.

Sehr gerne erinnere ich mich an unsere Diplomanden. Zu allererst danke ich Ubald Strobel, dessen Entdeckung meine Arbeit entscheidend beeinflußt hat. Aber auch die anderen, wie z.B. Georg Linsinger und Daniela Reichhardt behalte ich in guter Erinnerung.

Auf keinen Fall will ich an dieser Stelle die Göttinger vergessen: Claudia, Smurf, Holger, Thorsten und Sascha.

Ohne die Tips vom ersten Stock, namentlich von Sam, Markus, Katherina und all den anderen, säße ich heute noch ohne Ergebnisse an der Laborbank. Danke!

Doch den größten Dank bringe ich meiner Frau Petra und meinen Eltern entgegen, die mich in jedweder Hinsicht aufbauten und mir die nötige Ruhe und Entspannung rund um die Doktorarbeit schenkten.

Norbert Bauer

Geburt

19. September 1963

Familienstand

Verheiratet, seit 18. August 1999

Schulbesuch

1974 - 1977: Grundschule
1977 – 1984: Gymnasium

Zivildienst

1984 – 1985: Bayerisches Rotes Kreuz in Fürstenfeldbruck

Vorübergehende Beschäftigungen

1986 – 1987: Wissenschaftlich-technische Aushilfskraft beim Bayerischen Landesamt für Tierzucht in Grub
1987: Porter bei Avon Cosmetics in Northampton, England

Studium

1987 – 1993: Diplombiologie an der LMU München
1994: Projektarbeit bei Prof. Dr. R. Gerstmeier
1994 – 2001: Promotion am Lehrstuhl für Mikrobiologie zum Thema „Curdlanase, ein extrazelluläres hefelytisches Enzym von Streptomyceten“