



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Hamburg University of Applied Sciences

# Bachelorarbeit

## Reinigung und Kristallisation der Laktonasen GqqA und QsdR1

Fakultät Life Sciences  
Studiendepartment Biotechnologie

vorgelegt von  
Lukas Pönitzsch  
Matrikelnummer: [REDACTED]

Hamburg, 13. Dezember 2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker (HAW Hamburg)
2. Gutachterin: M. Sc. Nadine Werner (Universität Hamburg)

Diese Bachelorarbeit wurde betreut und erstellt in den Laboren des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg, sowie im Laboratorium für Strukturbiologie von Infektionen und Entzündungen des Deutschen Elektronen-Synchrotrons (DESY) am Standort Hamburg-Bahrenfeld.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Titel „Reinigung und Kristallisation der Laktonasen GqqA und QsdR1“ ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, den 13. Dezember 2017

Lukas Pönitzsch

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich zuerst Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker für die Betreuung und das Gutachten dieser Arbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt Frau M. Sc. Nadine Werner, die es mir ermöglicht hat diese Arbeit zu verfassen. Sie hat mich mit viel Geduld in die Thematik eingearbeitet und mir großes Vertrauen entgegengebracht. Auch wenn mal wieder nichts funktioniert hat, war sie mit konstruktiver Kritik und Lösungsvorschlägen an meiner Seite. Daher möchte ich mich an dieser Stelle nochmals für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein besonders lieber Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern, die mir die Möglichkeit zum Studium gegeben haben, sowie meinem Bruder, für die Unterstützung während meines Studiums.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden, die mir jederzeit zur Seite standen und während meines Studiums immer ein offenes Ohr für mich hatten.

# Inhaltsverzeichnis

|         |   |      |
|---------|---|------|
| I.      | Abkürzungsverzeichnis .....                                     | vi   |
| II.     | Einheiten und Symbole .....                                     | viii |
| 1.      | Einleitung .....  | 1    |
| 1.1     | Zell-Zell-Kommunikation: Quorum Sensing .....                   | 2    |
| 1.1.1   | Gram-negative QS-Systeme .....                                  | 3    |
| 1.1.2   | Gram-positive QS-Systeme .....                                  | 5    |
| 1.2     | Inhibierung der Zell-Zell-Kommunikation: Quorum Quenching ..... | 6    |
| 1.2.1   | Enzymatischer Abbau von AHLs .....                              | 6    |
| 1.3     | Laktonasen .....  | 8    |
| 1.3.1   | QsdR1 .....   | 10   |
| 1.3.2   | GqqA .....  | 11   |
| 1.4     | Strukturaufklärung rekombinant hergestellter Proteine .....     | 12   |
| 1.5     | Aufgabenstellung .....  | 12   |
| 2.      | Material und Methoden .....                                     | 13   |
| 2.1     | Materialien .....   | 13   |
| 2.1.1   | Chemikalien .....   | 13   |
| 2.1.2   | Bakterienstämme .....   | 14   |
| 2.1.3   | Plasmidvektor .....   | 15   |
| 2.1.4   | Medien, Puffer und Lösungen .....                               | 15   |
| 2.1.5   | Geräte .....  | 19   |
| 2.2     | Methoden .....  | 21   |
| 2.2.1   | Molekularbiologische Methoden .....                             | 21   |
| 2.2.1.1 | Herstellung kompetenter Zellen .....                            | 21   |
| 2.2.1.2 | Plasmidpräparation .....  | 21   |
| 2.2.1.3 | Hitzeschock-Transformation .....                                | 24   |
| 2.2.1.4 | Kultivierung des Inokulums .....                                | 24   |
| 2.2.1.5 | Glycerolstock .....   | 24   |
| 2.2.1.6 | Rekombinante Genexpression .....                                | 25   |
| 2.2.1.7 | OD <sub>600</sub> -Messung .....                                | 26   |
| 2.2.2   | Proteinbiochemische Methoden .....                              | 26   |
| 2.2.2.1 | Proteinkonzentrationsmessung mittel NanoDrop Lite .....         | 26   |
| 2.2.2.2 | Ultraschall-Zellaufschluss .....                                | 27   |
| 2.2.2.3 | Puffer Screening .....  | 27   |
| 2.2.2.4 | Membranzentrifugation .....                                     | 27   |
| 2.2.2.5 | Affinitätschromatographie .....                                 | 28   |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.2.2.6 | Regeneration der NiNTA-Matrix.....     | 29 |
| 2.2.2.7 | Größenausschlusschromatographie.....   | 29 |
| 2.2.2.8 | SDS-PAGE .....                         | 30 |
| 2.2.3   | Biophysikalische Methoden .....        | 31 |
| 2.2.3.1 | Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....   | 31 |
| 2.2.3.2 | Circulardichroismus-Spektroskopie..... | 32 |
| 2.2.3.3 | Proteinkristallisation .....           | 33 |
| 3.      | Ergebnisse und Diskussion.....         | 35 |
| 3.1     | QsdR1 .....                            | 35 |
| 3.2     | GqqA .....                             | 40 |
| 4.      | Zusammenfassung .....                  | 54 |
| III.    | Abbildungsverzeichnis .....            | 55 |
| IV.     | Tabellenverzeichnis.....               | 58 |
| V.      | Literaturverzeichnis.....              | 59 |

## I. Abkürzungsverzeichnis

|                   |  |
|-------------------|--|
| AHL               | Acyl-Homoserinlaktone                            |
| AI                | Autoinducer                                      |
| Amp               | Ampicillin                                       |
| APS               | Ammoniumperoxodisulfat                           |
| ATP               | Adenosintriphosphat                              |
| bp                | Basenpaare                                       |
| BSA               | Bovines Serum Albumin                            |
| CV                | Column volume; Säulenvolumen                     |
| dH <sub>2</sub> O | demineralisiertes Wasser                         |
| DLS               | Dynamische Lichtstreuung                         |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                           |
| DPD               | 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion                     |
| DTT               | Dithiothreitol                                   |
| E                 | Elutionsfraktion                                 |
| EDTA              | Ethylendiamintetraessigsäure                     |
| EHEC              | enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>     |
| ft                | flow through; Durchfluss                         |
| His               | Histidin   |
| IPTG              | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid               |
| LB                | Lysogeny broth                                   |
| M                 | Protein-Marker                                   |
| MCS               | multiple cloning site                            |
| NiNTA             | Nickel-Nitrilotriessigsäure                      |
| OD <sub>600</sub> | optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm |
| PDB               | Proteindatenbank                                 |
| QS                | Quorum sensing                                   |
| QQ                | Quorum quenching                                 |
| RNA               | Ribonukleinsäure                                 |

|        |   |
|--------|---|
| R-THMF | [(2R,4S)-2-Methyl-2,3,3,4-tetrahydroxy-tetrahydrofuran] |
| SAM    | S-Adenosylmethionin                                     |
| SDS    | sodium dodecyl sulfate                                  |
| S-THMF | [(2S,4S)-2-Methyl-2,3,3,4-tetrahydroxy-tetrahydrofuran] |
| TEMED  | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin                        |
| TRIS   | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                         |

## II. Einheiten und Symbole

|          |                       |
|----------|-----------------------|
| A        | Ampere                |
| Da       | Dalton                |
| <i>g</i> | Gravitationskonstante |
| g        | Gramm                 |
| h        | Stunde                |
| L        | Liter                 |
| M        | Molare Masse          |
| min      | Minute                |
| m        | Meter                 |
| Pa       | Pascal                |
| rpm      | rounds per minute     |
| s        | Sekunde               |
| V        | Volt                  |
| W        | Watt                  |
| °C       | Grad Celsius          |
| %        | Prozent               |
| °        | Winkelgrad            |

|       |       |           |
|-------|-------|-----------|
| k     | Kilo  | $10^3$    |
| m     | Milli | $10^{-3}$ |
| $\mu$ | Mikro | $10^{-6}$ |
| n     | Nano  | $10^{-9}$ |



## 1. Einleitung

Im frühen 19. Jahrhundert vertraten die Wissenschaftler noch die Annahme, dass Bakterien isolierte, einzellige Individuen darstellen und in strikt solitärer Lebensweise existieren. Dabei folgen sie ihrem eigenen Programm, dessen einzige Aufgabe darin besteht, sich zu vermehren. Eine Kommunikation zwischen Bakterienzellen wurde zu dieser Zeit ausgeschlossen. 1942 lieferten jedoch Untersuchungen an den marinen Leuchtbakterien, *Photobacterium fischeri*, erste Erkenntnisse über ein multizelluläres Verhalten, was auf die Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation hindeutete [1].

1965 erforschte Alexander Tomasz das Gram-positiven Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (früher *Pneumococcus*). Er entdeckte ein Zellprodukt, welches als notwendiger Faktor für die genetische Kompetenz diente [2]. Heute ist dieses Produkt als modifiziertes Oligopeptid identifiziert, welches Gram-positive Bakterien für die Inter- und Intraspezieskommunikation als Autoinducer benutzen [3].

1970 konnte eine Zell-Zell-Kommunikation (Quorum Sensing) bei den Gram-negativen Bakterien *Vibrio fischeri* nachgewiesen werden. Chemische Signale dienten dabei der Kommunikation und gemeinschaftlichen Koordination, welches in gemeinsamen Aktivitäten (Biolumineszenz) mündete [4]. Trotz dieser bemerkenswerten Ergebnisse gewann das Arbeitsgebiet der Zell-Zell-Kommunikation nur langsam an Popularität. Es dauerte einige Zeit, bis sich die Vorstellung durchsetzen konnte, dass die Kommunikation zwischen Individuen nicht mehr allein den höheren Organismen zugeschrieben wird, sondern auch eine interzellulare Kommunikation zwischen Bakterien besteht.

Anfang der 90er Jahre gewann das Gebiet durch Untersuchungen an *Pseudomonas aeruginosa*, ein Gram-negatives und humanpathogenes Bakterium zunehmend an Bedeutung. Heute gilt die Zell-Zell-Kommunikation als die wichtigste interzelluläre Signalreaktion zwischen Bakterien [5]. In der modernen Wissenschaft kommt dem bakteriellen Quorum Sensing, hinsichtlich neuer Therapieansätze eine entscheidende Bedeutung zu, da die Ausprägung von Virulenzfaktoren, zum Beispiel von humanpathogenen Bakterien, oft unter QS-Kontrolle steht.

## 1.1 Zell-Zell-Kommunikation: Quorum Sensing

Der Begriff Quorum Sensing (QS) beschreibt die Fähigkeit von Bakterien, untereinander mit Hilfe bestimmter Signalmoleküle, so genannter Autoinducer (AI) zu kommunizieren. Durch diese AI-Moleküle können Bakterien die Expression bestimmter Gene in Abhängigkeit der Zelldichte regulieren [6]. Die Autoinducer werden von den Zellen ständig produziert und in das umgebende Medium abgegeben. Durch die Amphiphilie der Signalmoleküle wird die Penetration durch die Zellmembran erleichtert. Die Konzentration der Signalmoleküle steigt in Abhängigkeit von der Zelldichte proportional an. Bei hohen Konzentrationen von AI-Molekülen, binden diese an die in den Zellen ebenfalls exprimierten Rezeptorproteine. Die entstandenen Autoinducer-Rezeptorprotein-Komplexe interagieren mit spezifischen DNA-Regionen und beeinflussen so die Expression bestimmter Gene [7]. Für bakterielle Populationen wird so die Regulation von unterschiedlichen Expressionsmustern bei niedrigen oder hohen Zelldichten ermöglicht.

Sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien haben die Fähigkeit zum Quorum-Sensing, um verschiedene physiologische Aktivitäten zu regulieren. Dazu gehören Prozesse wie Symbiose, Virulenz, Motilität, Sporulation, Konjugation, Antibiotika-Produktion oder Biofilmbildung. Diese Kommunikationssysteme lassen sich im Allgemeinen in zwei Kategorien unterteilen.

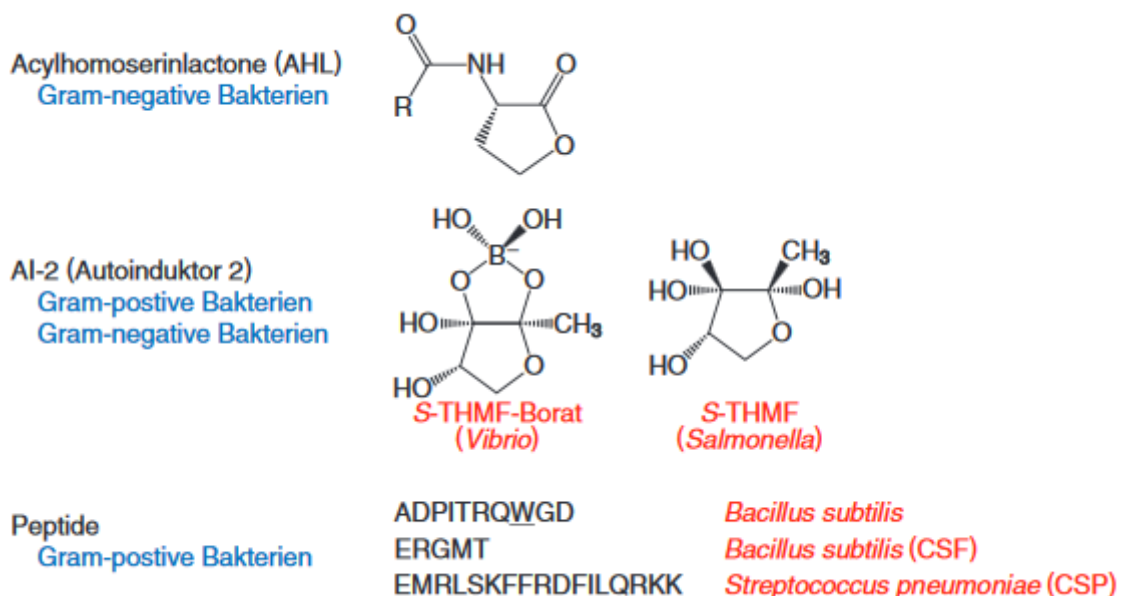


Abbildung 1: Vorkommen und Struktur wichtiger Signalmoleküle in Bakterien. Die Struktur der Gram-positiven Peptide ist durch die Abfolge der Aminosäuren dargestellt. CSF: competence and sporulation factor; CSP: competence-stimulating peptide; Quelle: [11]

Gram-negative Bakterien nutzen überwiegend N-Acyl-Homoserinlaktone (AHLs), während Gram-positive Bakterien prozessierte Oligopeptide verwenden (Abb. 1) [9]. Außerdem wurde ein weiteres spezieübergreifendes QS-System entdeckt. Das Autoinducer-2 (AI-2) System verwendet Furanosylborat als Signalmolekül (Abb. 1). Es wurde sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien detektiert [10]. Die Besonderheit dieses Systems ist, dass sehr viele Bakterienarten das Signalmolekül bilden, aber nur sehr wenige einen passenden Rezeptor entwickeln. Diese Diskrepanz lässt sich damit begründen, dass AI-2 ein Abbauprodukt darstellt, das sich von S-Adenosylmethionin (SAM) ableitet. SAM ist ein wichtiger Donor für Methylgruppen und wird nach der Transmethylierung zu 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion (DPD) detoxifiziert. In wässriger Lösung bilden sich aus DPD zwei zyklische Formen, S-THMF und R-THMF, die miteinander im chemischen Gleichgewicht stehen. S-THMF ist es möglich, in Anwesenheit von Borsäure, einen Komplex zu bilden (S-THMF-borat). Einige Bakterien haben entsprechende Rezeptoren entwickelt und nutzen auf diese Weise das Abbauprodukt als Signalmolekül [11]. Bei enterohämorrhagischen *Escherichia coli*-Stämmen (EHEC) wurde ein weiteres AI-Molekül isoliert, welches als Autoinducer-3-Molekül (AI-3) bezeichnet wird. AI-3 aktiviert Virulenz-Gene, sowie Flagellen- und Motilitätsgene. Die genaue Struktur ist bislang nicht bekannt [12].

### 1.1.1 Gram-negative QS-Systeme

Gram-negative Bakterien benutzen überwiegend AHLs als Signalmoleküle. Diese AHLs bestehen aus einem Homoserinlaktone-Ring, welcher über eine Peptidbindung mit einer Kohlenwasserstoffkette mit einer Länge von C4 bis C18 verbunden ist (Abb. 1). Diese C-Kette, welche in der Abbildung 1 als R dargestellt wird, kann noch eine Modifikation, vorrangig am C3 tragen. Diese Modifikation ist zum Beispiel eine Oxo-Gruppe oder Hydroxygruppe. Diese AHLs werden dann als 3-Oxo- bzw. 3-Hydroxy-AHLs bezeichnet [13].

Das bis heute bekannteste Gram-negative QS-System ist die Regulierung der Biolumineszenz bei dem marinen Leuchtbakterium *Vibrio fischeri*. Das Bakterium lebt in der Natur im freien Meerwasser oder als Symbiont in Lichtorganen von Fischen und Weichtieren, in denen es zu sehr hohen Zelldichten anwächst und so die Lumineszenz ausgelöst wird [14]. Der Wirtsorganismus zieht Nutzen aus der Lichtemission und stellt den Bakterien im Gegenzug innerhalb der Lichtorgane Nährstoffe zur Verfügung. Außerhalb der Organe, im freien

Meerwasser liegen nur sehr geringe Zelldichten vor, wodurch keine Lumineszenz induziert wird [15]. Als Signalmolekül benutzt *Vibrio fischeri* 3-oxo-C6-HSL. Dies wird von dem LuxI-Protein konstitutiv synthetisiert und diffundiert durch die Zellwand aus der Zelle heraus. Bei niedriger Zelldichte wird das Molekül in das umliegende Medium abgegeben, um einen Konzentrationsausgleich zu erreichen. Es diffundiert daher nicht in größeren Mengen in die Zelle zurück. Bei hoher Zelldichte und einem proportionalen Anstieg des AI-Moleküls im umliegenden Medium, gelangt viel in die Zelle zurück. Durch eine geringe Konzentration des Signalmoleküls werden die Lumineszenz-Gene nur schwach transkribiert. Wenn eine bestimmte Schwellenkonzentration in der Zelle erreicht ist, binden die Signalmoleküle an ihr Rezeptorprotein LuxR. Dieser Komplex bindet an der lux-Box, die in der LuxI-Promotorregion lokalisiert ist und, die die Transkription des Lux-Operons aktiviert (Abb. 2). So wird die Expression des luxICDABE-Operons initiiert. Neben den für die Lumineszenz benötigten Genen kodiert das lux-Operon auch das luxI-Gen. Eine gesteigerte Transkription der Lumineszenz-Gene führt somit durch eine positive Feedback-Regulation zu einer Verstärkung der eigenen Signalmolekülproduktion [16].

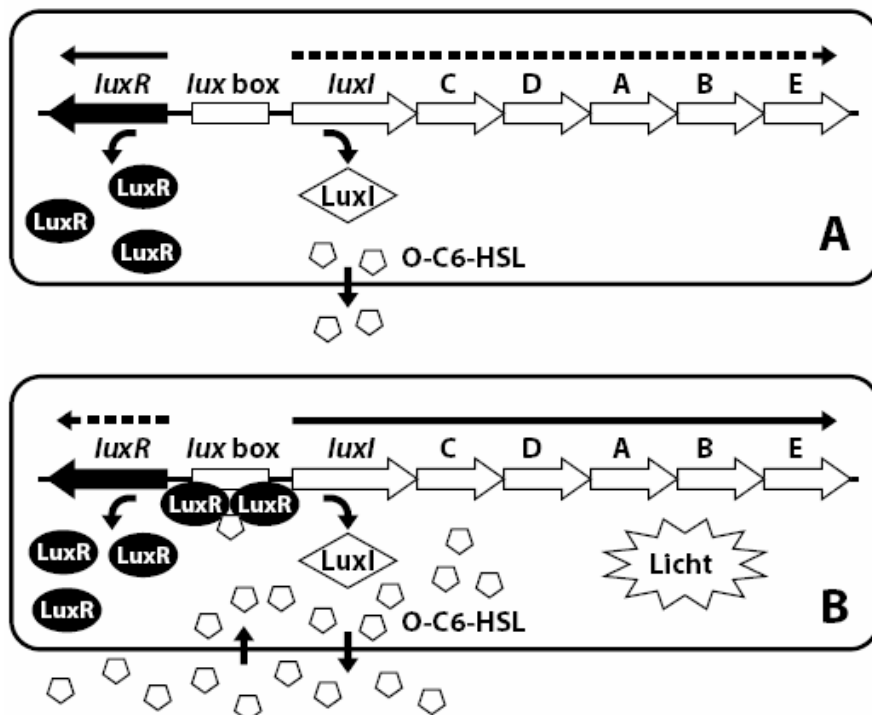


Abbildung 2: Zelldichte-abhängige QS-Regulation der Lumineszenz bei *Vibrio fischeri*. A: Durch eine geringe Konzentration des Signalmoleküls werden die Lumineszenz-Gene luxCDABE nur schwach transkribiert. B: Bei einer hohen Konzentration des Signalmoleküls wird eine Schwellenwert-Konzentration erreicht. Die Signalmoleküle binden an das luxR. Die gesteigerte Transkription der luxCDABE-Gene führt zur Lichtemission. Quelle: <http://3.bp.blogspot.com/-XdfgazUiVbg/TdJwXLoGjTI/AAAAAAAAABXo/rM3wHesPFHc/s1600/lux-vibrio-quorum.gif>

### 1.1.2 Gram-positive QS-Systeme

Gram-positive Bakterien nutzen prozessierte Peptide als Signalmoleküle. Diese AI-Moleküle unterscheiden sich sehr stark untereinander in der Abfolge der Aminosäuren (Abb. 1) [17]. Der generelle Ablauf des QS-Systems bei Gram-positiven Bakterien wird im Folgenden beschrieben.

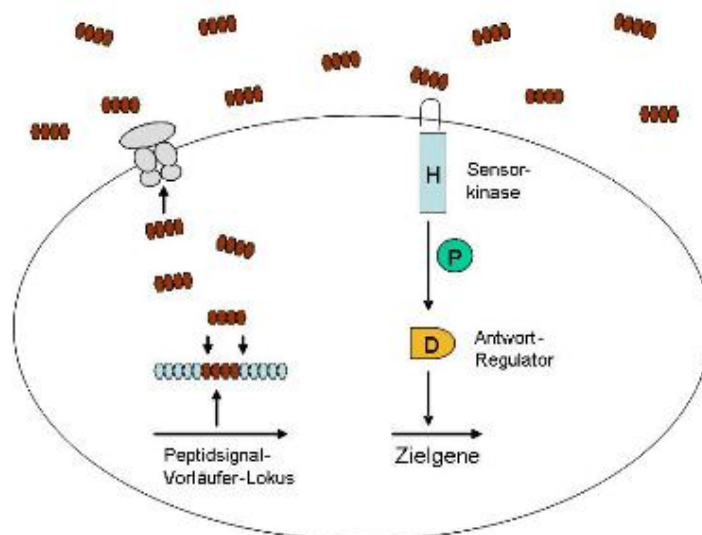


Abbildung 3: Allgemeines QS-Modell für Gram-positive Bakterien. Aus einem synthetisierten Signalpeptid-Vorläufer-Protein wird das Signalpeptid (Braun) geschnitten. Dieses wird über einen ABC-Transporter (Grau) aus der Zelle transportiert. Bei einer hohen Konzentration des Signalpeptids wird dieses von einer Histidin-Sensorkinase detektiert. Die Sensor-Kinase autophosphoryliert einen Histidinrest (H), die Phosphatgruppe (P) wird an einen Arspartatrest (D) eines Antwort-Regulators übertragen. Dieser aktiviert die Transkription der Zielgene. Quelle: [9]

Zunächst wird ein Peptidsignal-Vorläufer-Protein synthetisiert. Aus diesem wird durch Spaltung das Signalpeptid gewonnen. Über einen ABC-Transporter wird das Peptid unter Verbrauch von ATP in das umgebende Medium abgegeben. Ab einer gewissen Schwellenkonzentration wird das Signalpeptid von dem Histidin-Sensorkinase-Komplex eines 2-Komponenten-Signalsystems detektiert. Es folgt eine Phosphorylierungskette, die in der Phosphorylierung eines Regulator-Proteins endet. Dabei wird ein Histidinrest der Sensorkinase autophosphoryliert und die Phosphatgruppe anschließend an einen Arspartatrest des Antwort-Regulator-Proteins übertragen (Abb. 3). Durch die Phosphorylierung wird der Regulator aktiviert, welcher an die DNA bindet und die Transkription von QS kontrollierten Zielgenen verändert [9, 17, 18].

## 1.2 Inhibierung der Zell-Zell-Kommunikation: Quorum Quenching

Durch QS-Systeme können diverse Bakterienspezies miteinander kommunizieren und so Aufgaben wie die Bildung von Biofilmen oder die Ausprägung von Virulenzfaktoren koordinieren. So kann ein kompetitiver Vorteil innerhalb ihres Lebensraumes erlangt werden. Daher haben einige Organismen Mechanismen entwickelt, um dem QS entgegenzuwirken und den erlangten Vorteil der Bakterien wieder auszugleichen. Diese Hemmung der interzellulären Kommunikation wird Quorum Quenching (QQ) genannt und spielt eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen verschiedenen Prokaryonten sowie zwischen Pro- und Eukaryonten [19]. In den vergangenen Jahren wurden mehrere Wege identifiziert, die zu einer Inhibition von Quorum Sensing führen. Es können zum Beispiel QQ-Enzyme produziert werden, welche die Signalmoleküle enzymatisch spalten oder chemisch verändern. Außerdem kann die Signalweiterleitung durch die Produktion von Analoga, welche an AHL-Rezeptoren binden, verhindert werden. Eine weitere, bisher unerforschte, Methode basiert auf der Repression von QS-Genen durch den Einsatz von small RNAs [20]. Die enzymatische Spaltung der Signalmoleküle stellt den am weitesten verbreiteten und am besten untersuchten Mechanismus dar. Deshalb wird im Folgenden genauer auf diese Gruppe eingegangen.

### 1.2.1 Enzymatischer Abbau von AHLs

Es gibt zwei bekannte Mechanismen, mit denen AHLs gespalten und somit inaktiviert werden können. Zum einen kann der Laktoring gespalten werden, zum anderen kann eine Hydrolyse der Peptidbindung stattfinden. Laktonasen und Decarboxylasen hydrolysieren den Laktoring, sodass ein Acyl-Homoserin (Acyl-HS) als Spaltprodukt entsteht. Acylasen und Deaminasen hydrolysieren die Peptidbindung im AHL. Es entstehen eine Fettsäure und das Homoserinlaktone (HSL) als Spaltprodukte (Abb. 4) [21].

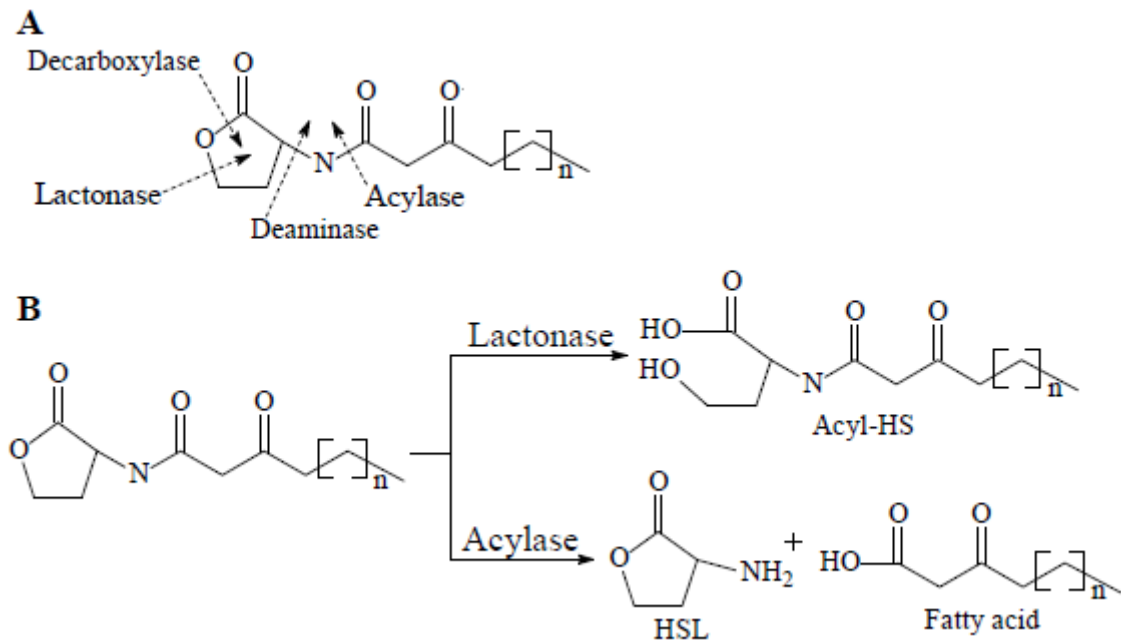


Abbildung 4: A: Die Grundstruktur eines Acylhomoserinlaktons und die dazugehörigen möglichen Schnittstellen für Enzyme. B: Spaltungsmechanismen der Laktonasen und Acylasen. Laktonasen öffnen den Laktonring, sodass Acyl-Homoserin (Acyl-HS) als Spaltprodukt entsteht. Acylasen hydrolysieren die Peptidbindung. So wird das AHL in seine Bestandteile zerlegt. Es entstehen ein Homoserinlakton (HSL) und eine Fettsäure. Quelle [30], verändert

Der Mechanismus der enzymatischen Spaltung ist in verschiedenen Bakterienarten verbreitet, jedoch bis jetzt nur bei den Acylasen und Laktonasen ausreichend beschrieben. Als bekanntes Beispiel für eine Acylase dient die Acyl-Homoserinlacton-Acylase AiiD aus dem Bakterium *Ralstonia eutropha* oder QuiP aus *Pseudomonas aeruginosa* [22, 23].

Bekannte Laktonasen sind unter anderem AiiA aus *Bacillus sp.* oder AttM aus *Agrobacterium tumefaciens* [24, 25].

Die Fähigkeit, AHLs abzubauen, ist in der Natur weit verbreitet. Nicht nur Bakterien, sondern auch Menschen, Pilze und Pflanzen haben diese Möglichkeit. Dies spielt besonders in Bereichen starker Interaktionen mit Bakterien, wie im Lungengewebe beim Menschen, eine große Rolle. So könnte durch den richtigen Einsatz von z.B. Laktonasen, die AI-Konzentration minimiert werden und Krankheiten durch pathogene Keime verhindert werden. Dies stellt einen Therapieansatz ohne den Einsatz von Antibiotika dar.

### 1.3 Laktonasen

Laktonasen, zu denen auch die im Folgenden betrachteten Acyl-Homoserin-Laktonasen gehören, sind Metalloproteine, welche von vielen Bakterienarten gebildet werden. Sie interagieren mit AHLs, die als Signalmoleküle beim QS genutzt werden. Laktonasen spalten den Laktonring der AHLs, hydrolytisch auf eine reversible Weise. Das veränderte QS-Signalmolekül ist nicht mehr fähig an den Zielrezeptor zu binden, wodurch die Kommunikation zwischen Bakterienarten zum Erliegen kommt oder stark beeinträchtigt wird [21].

Im Allgemeinen werden die Laktonasen in drei Superfamilien eingeteilt, basierend auf Ähnlichkeiten zu Amidasen, Paraoxonasen und Metallo- $\beta$ -Laktamasen.

Eine der bekanntesten Laktonasen ist AiiA aus dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus thuringiensis*. Es reguliert die Expression von Virulenzgenen in *Erwinia carotovora*, einem pflanzenpathogenen Bakterium [26].

Die Struktur des aktiven Zentrums einer Metallo- $\beta$ -Laktamase-ähnlichen Laktonase, zu denen auch AiiA gehört ist im Folgenden dargestellt (Abb.5).

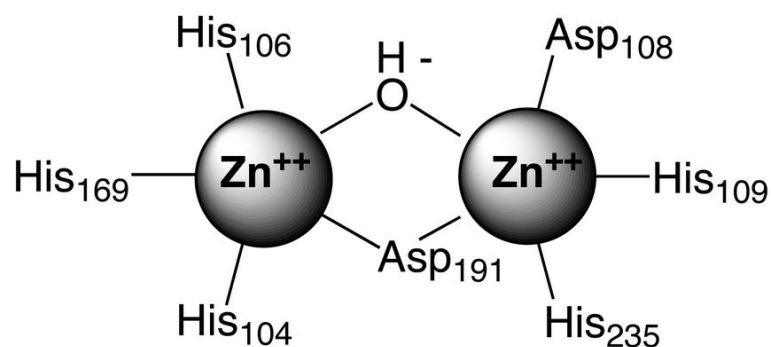


Abbildung 5: Struktur des aktiven Zentrums einer Metallo- $\beta$ -Laktamase-ähnlichen Laktonase, produziert von verschiedenen *Bacillus*-Spezies. Im Zentrum befindet sich eine zweikernige Zink-Bindungsstelle. Das Zn1 (Links) wird von fünf Aminosäureresten Histidin 104, 106 und 169, sowie das gemeinsam gebundene Hydroxidion und Aspartat 191 koordiniert. Das Zn2 (Rechts) ist ebenfalls fünffach koordiniert. Neben dem Hydroxidion und Aspartat 191 sind Histidin 109 und 235, sowie Aspartat 108 an der Kordination beteiligt. Quelle: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bi050050m>

Durch die EXAFS-Spektroskopie (extended X-ray absorption fine structure) konnte die Art und Anzahl der Liganden am chemischen Element Zink bestimmt werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Anwesenheit der zweikernigen Zink-Gruppe im aktiven Zentrum essentiell für die Faltung und katalytische Aktivität ist [27].



Aus diesen Ergebnissen wurden Ansätze zum genauen Funktionsmechanismus der Metallo- $\beta$ -Laktamase-ähnlichen Laktonasen gewonnen. Bis heute sind nicht alle aufgekommene Fragen zum Funktionsprinzip geklärt. In Abbildung 6 wird ein Vorschlag erläutert.

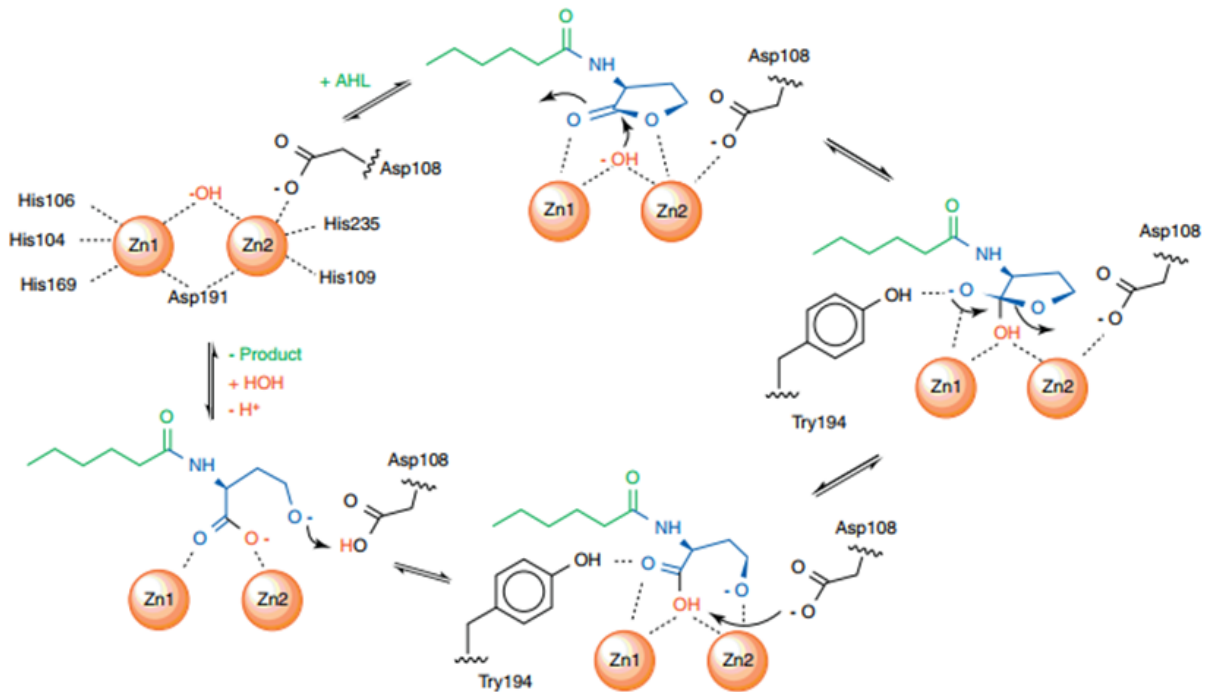


Abbildung 6: Chemischer Mechanismus der Metallo- $\beta$ -Laktamase-ähnlichen Laktonase AiiA. Eine zweikernige Zinkionengruppe an der aktiven Bindungsstelle benutzt beide Zinkionen für die Katalyse der hydrolytischen Spaltung des Laktonrings. Quelle: [28]

Das AHL (grün) bindet im aktiven Zentrum der Laktonase. Das Hydroxidion greift die Carbonylgruppe des Laktonrings (blau) an. Dies führt zu einem tetraedrischen Addukt, welches durch Zn1 und der Phenolseitenkette des benachbarten Tyrosin 194 stabilisiert wird. Dieses Tyrosin ist nicht in der Metallo- $\beta$ -Laktamase Superfamilie vorhanden, wurde jedoch in vielen Laktonasen identifiziert. Der Zusammenbruch des tetraedrischen Addukts führt zu einer Abstoßung des Sauerstoffs, welches wahrscheinlich als Anion vom Zn2 stabilisiert wird. Der Aspartat 108-Rest, der ursprünglich an das Zn2 ligiert war, nimmt eine alternative Konformation ein. Das Zn2 wird freigesetzt und die Seitenkette neu positioniert, um ein Proton von der neu gebildeten Carboxygruppe zur Abgangsgruppe transportieren zu können. Dieser Protonentransfer führt zur Bildung des N-Acyl-Homoserins mit geöffnetem Ring, welches eine zweizahnige Brücke zwischen den Metallionen durch seine Carboxylatgruppe bilden kann. Die Produktfreigabe und die Regeneration des Startenzym vervollständigen den katalytischen Kreislauf (Abb. 6.) [28].

### 1.3.1 QsdR1

QsdR1 ist ein Protein aus dem Gram-negativen Bakterium *Rhizobium sp.* Strain NGR234, welches mit AI-1-Signalmolekülen interagiert. Es wurde erstmals im Jahre 2011 identifiziert und wird der Superfamilie der Metallo- $\beta$ -Laktamasen zugeordnet, da es ein bivalentes Metallion ( $Zn^{2+}$ ) zur Aktivität benötigt. Ein 960 Basenpaare (bp) langes offenes Leseraster auf dem bakteriellen Plasmid pNGR234b codiert für ein 321 Aminosäure langes und 35 kDa schweres Protein, dem QsdR1 (quorum sensing signal degrading enzyme from *R*hizobium *s*p. Strain NGR234). Tests an *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in Bezug auf die Biofilmbildung in LB-Medium oder des Schwärmverhaltens auf Gelnährböden bestätigten die Laktonasewirkung von QsdR1. Die genaue Struktur, sowie der Wirkmechanismus an AI-1-Signalmolekülen sind noch nicht erforscht. Trotzdem konnte, basierend auf der Proteinsequenz, eine Prognose der 3D-Struktur mit dem Programm Swiss-Model erstellt werden (Abb. 7) [29].

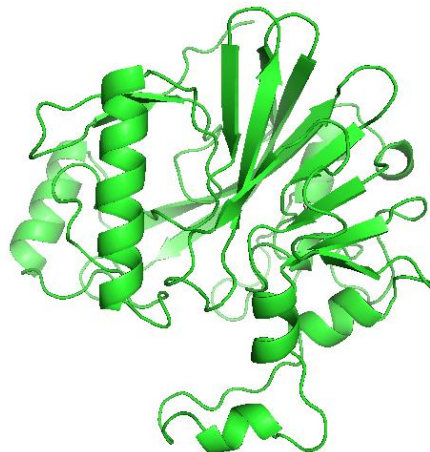
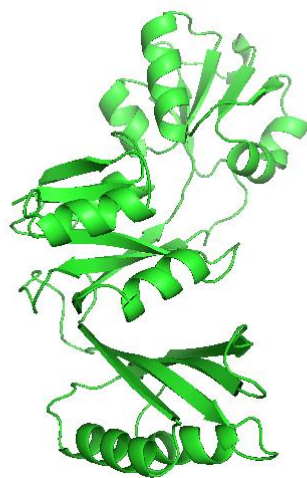


Abbildung 7: Berechnetes Modell der Laktonase QsdR1. Ein Pfeil stellt ein  $\beta$ -Faltblatt dar, während eine Helix eine  $\alpha$ -Helix abbildet. Programm: Swiss Model; Quelle: <https://swissmodel.expasy.org/>

### 1.3.2 GqqA

Das Protein GqqA wurde erstmals, im Jahre 2016, aus dem Gram-negativen Essigsäurebakterium *Komagateibacter europaeus* Strain CECT 8546 isoliert. In der Natur wächst das Bakterium an der Grenzschicht zwischen dem Ethanol, welches zu Essigsäure oxidiert wird, und der Luft. Sie bilden eine Kahmhaut, welche unter anderem aus Cellulose besteht. Ein 846 bp langes offenes Leseraster codiert für ein 281 Aminosäure langes und 30 kDa schweres Protein, dem GqqA. Untersuchungen des rekombinanten GqqA Proteins an *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, in Bezug auf das Schwärmverhalten, stellen eine typische Laktonaseaktivität fest. Sequenzierungen ergaben jedoch eine strukturelle Ähnlichkeit zu Prephenatdehydratasen (PDT). Generell sind PDTs in der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren, wie Phenylalanin, involviert. Dabei setzen sie Prephenat zu Phenylpyruvat um. Um GqqA auf eine mögliche PDT-Aktivität zu testen, wurde ein Complementation-Assay mit *pheA-E.coli*-Mutanten durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass kein Wachstum auf M9-Minimalmedium möglich war und erst nach Zugabe von Phenylalanin stattfand. Dieses Resultat zeigte, dass die Aktivität von GqqA nicht mit der eines PDTs übereinstimmte. In der Aminosäuresequenz von GqqA wurden keine typischen Domänen, wie sie in Laktonasen oder anderen AHL-degradierenden Molekülen vorkommen, identifiziert. Die genaue Struktur und der Wirkmechanismus an QS-Signalmolekülen sind noch nicht aufgeklärt. Trotzdem konnte, basierend auf der Proteinsequenz, eine Prognose der 3D-Struktur mit dem Programm Swiss-Model erstellt werden (Abb. 8) [30].



**Abbildung 8:** Berechnetes Modell der Laktonase GqqA. Ein Pfeil stellt ein  $\beta$ -Faltblatt dar, während eine Helix eine  $\alpha$ -Helix abbildet. Programm: Swiss Model; Quelle: <https://swissmodel.expasy.org/>

## 1.4 Strukturaufklärung rekombinant hergestellter Proteine

Um die dreidimensionale Struktur eines Proteins aufklären zu können, wird häufig die Methode der Röntgenstrukturanalyse verwendet. Aktuell sind über 90 % aller in der Protein Datenbank (PDB) hinterlegten Strukturen der Röntgenkristallographie zuzuschreiben. Eine gelungene Proteinkristallisation ist maßgeblich für den Erfolg der Strukturaufklärung. Dafür bedarf es einer stabilen und konzentrierten Proteinlösung, in welcher die Proteine monodispers vorliegen. Polydisperse Proteinlösungen liefern keine genauen Ergebnisse, weil aus unterschiedlichen Konformationen oder gar Aggregaten keine geordnete Kristallgitterstruktur entsteht [31].

Aus den erhaltenen Messdaten kann ein Strukturvorschlag erstellt werden. Daraus ergeben sich weitere Informationen in Hinblick auf die Funktion des Proteins oder des genauen Wirkmechanismus. So können potentiell neue Wirkstoffe entwickelt werden.

## 1.5 Aufgabenstellung

Laktonasen sind Metalloproteine, welche von vielen Bakterienarten gebildet werden und mit AHLs, welche als Signalmoleküle beim QS genutzt werden, interagieren. Durch Kenntnis von Struktur, Funktion und Wirkmechanismus können möglicherweise Einsatzgebiete der Laktonasen ermittelt werden. Dies könnte in neuen Therapieansätzen gegen Infektionen münden, ohne dabei auf Antibiotika zurückgreifen zu müssen.

Hierzu ist es zunächst nötig die Proteinproduktion des Zielproteins mit den zu Verfügung stehenden Mitteln zu etablieren. Dabei sollen die Arbeitsschritte sowohl auf molekularbiologischer als auch auf proteinbiochemischer Ebene mit modernen Verfahren kontrolliert und nachvollzogen werden. Es soll eine möglichst detaillierte Charakterisierung des Zielproduktes mit den zur Verfügung stehenden Methoden erfolgen. Anschließend ist es die Aufgabe durch Anwendung geeigneter Techniken die Produktion von Proteinkristallen sicherzustellen.

In dieser Arbeit wird der Fokus auf die Herstellung, Reinigung und Kristallisation der Zielproteine gelegt.

## 2. Material und Methoden

In den folgenden Unterkapiteln sind die verwendeten Versuchsmaterialien aufgeführt. Im Anschluss werden die einzelnen Methoden erläutert, die für die Arbeit verwendet werden.

### 2.1 Materialien

Die folgenden Unterkapitel stellen eine Auflistung der unterschiedlichen Versuchsmaterialien dar.

#### 2.1.1 Chemikalien

In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten Chemikalien mit ihrer CAS-Nummer und dem Hersteller aufgeführt.

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien**

| Chemikalie   | Hersteller  | CAS-Nummer |
|--|---|------------|
| 30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung Rotiphorese Gel 30 | Carl Roth GmbH + Co. KG                             |            |
| Agar-Agar, bakteriologisch                                   | Carl Roth GmbH + Co. KG                             | 9002-18-0  |
| Ammoniumperoxodisulfat                                       | Merck KGaA  | 7727-54-0  |
| Ampicillin Natriumsalz                                       | Carl Roth GmbH + Co. KG                             | 69-52-3    |
| Bernsteinsäure   | AppliChem GmbH                                      | 150-90-3   |
| BisTris  | Carl Roth GmbH + Co. KG                             | 6976-37-0  |
| Coomassie-Brilliantblau                                      | AppliChem GmbH                                      | 6104-58-1  |
| di-Kaliumhydrogenphosphat                                    | Carl Roth GmbH + Co. KG                             | 7758-11-4  |
| Dithiothreitol   | AppliChem GmbH                                      | 3483-12-3  |
| Ethanol  | VWR Chemicals BDH Prolabo<br>VWR International, LLC | 64-17-5    |
| Essigsäure   | VWR Chemicals BDH Prolabo<br>VWR International, LLC | 64-19-7    |
| Ethylendiamintetraessigsäure                                 | AppliChem GmbH                                      | 60-00-4    |
| Glycerin   | Carl Roth GmbH + Co. KG                             | 56-81-5    |
| Glycin   | AppliChem GmbH                                      | 56-40-6    |

| Chemikalie                           | Hersteller  | CAS-Nummer |
|--------------------------------------|---|------------|
| Harnstoff                            | AppliChem GmbH                                      | 57-13-6    |
| HEPES                                | VWR Chemicals BDH Prolabo<br>VWR International, LLC | 7365-45-9  |
| Imidazol                             | AppliChem GmbH                                      | 288-32-4   |
| Isopropanol                          | Carl Roth GmbH + Co. KG                             | 67-63-0    |
| Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid   | Carl Roth GmbH + Co. KG                             | 367-93-1   |
| Kaliumdihydrogenphosphat             | Carl Roth GmbH + Co. KG                             | 7778-77-0  |
| LB-Medium (Lennox)                   | Carl Roth GmbH + Co. KG                             |            |
| β-Mercaptoethanol                    | Carl Roth GmbH + Co. KG                             | 60-24-2    |
| Natriumchlorid                       | VWR Chemicals BDH Prolabo<br>VWR International, LLC | 7647-14-5  |
| Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat | VWR Chemicals BDH Prolabo<br>VWR International, LLC | 13472-35-0 |
| Natriumdodecylsulfat                 | Carl Roth GmbH + Co. KG                             | 151-21-3   |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin     | AppliChem GmbH                                      | 110-18-9   |
| Trinatriumcitrat                     | Carl Roth GmbH + Co. KG                             | 68-04-2    |
| TRIS PUFFERAN                        | Carl Roth GmbH + Co. KG                             | 77-86-1    |
| TRIS-hydrochlorid PUFFERAN           | Carl Roth GmbH + Co. KG                             | 1185-53-1  |

### 2.1.2 Bakterienstämme

Zur Plasmidisolierung und der anschließenden Expression des rekombinanten Zielproteins wurden folgende Zellstämme, welche in der Tabelle 2 zu sehen sind, eingesetzt.

**Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme, deren Genotyp und Referenz.**

| Bezeichnung              | Genotyp  | Referenz                              |
|--------------------------|--|---------------------------------------|
| <i>E. coli</i> DH5α      | F- Φ80lacZΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-</i>    | Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB+</i> ]K-12(λS) | Novagen (Merck KGaA)                  |

### 2.1.3 Plasmidvektor

Der verwendete Plasmidvektor ist in der Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendeter Plasmidvektor zur Expression

| Bezeichnung | Resistenzen | Fusion-tag                                    | Induktor | Referenz             |
|-------------|-------------|---|----------|----------------------|
| pET-21a(+)  | Ampicillin  | T7-tag (N-terminal)<br>6xHis-tag (C-terminal) | IPTG     | Novagen (Merck KGaA) |

### 2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

Die im Folgenden aufgelisteten Nährmedien wurden zur Kultivierung von *E. coli* verwendet. Hierfür wurden sie für 30 min bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 2 bar dampfsterilisiert. Im Allgemeinen wurden alle Medien, Puffer und Lösungen in dH<sub>2</sub>O gelöst.

Tabelle 4: Verwendete Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

| Medium               | pH-Wert | Bestandteile | Konzentration         |
|----------------------|---------|--------------|-----------------------|
| LB-Agar              | 7.0     | Agar-Agar    | 15 g L <sup>-1</sup>  |
|                      |         | Trypton      | 10 g L <sup>-1</sup>  |
|                      |         | Hefeextrakt  | 5.0 g L <sup>-1</sup> |
|                      |         | NaCl         | 5.0 g L <sup>-1</sup> |
| LB-Bouillon (Lennox) | 7.0     | Trypton      | 10 g L <sup>-1</sup>  |
|                      |         | Hefeextrakt  | 5.0 g L <sup>-1</sup> |
|                      |         | NaCl         | 5.0 g L <sup>-1</sup> |

Die folgende Tabelle 5 zeigt die zu Selektionszwecken eingesetzte Antibiotika-Stammlösung.

Tabelle 5: Eingesetzte Antibiotika-Stammlösung

| Antibiotikum | Lösungsmittel     | Konzentration           | Anmerkung             |
|--------------|-------------------|-------------------------|-----------------------|
| Ampicillin   | dH <sub>2</sub> O | 100 mg mL <sup>-1</sup> | Temperaturempfindlich |

Die Antibiotikum-Stammlösung wurde bei -20 °C gelagert.

Im Folgenden ist die verwendete Induktor-Stammlösung aufgeführt.

**Tabelle 6: Eingesetzte Induktor-Stammlösung**

| Induktor | Lösungsmittel     | Konzentration |
|----------|-------------------|---------------|
| IPTG     | dH <sub>2</sub> O | 1 M           |

Die Induktor-Stammlösung wurde bei -20 °C gelagert.

In der folgenden Tabelle 7 ist die verwendete Säulen-Matrix aufgeführt.

**Tabelle 7: Verwendete Matrix für die Affinitätschromatographie**

| Matrix | Ligand     | Bindungskapazität        | Referenz    |
|--------|------------|--------------------------|-------------|
| NiNTA  | 6x His-tag | 5-10 mg mL <sup>-1</sup> | Qiagen N.V. |

In der folgenden Tabelle 8 sind die Puffer für Zellaufschlüsse und Reinigungssysteme aufgelistet.

**Tabelle 8: Puffer und Lösungen für Zellaufschlüsse und Proteinreinigung**

| Bezeichnung                             | pH-Wert | Bestandteile                                  | Konzentration             |
|---|---------|---|---------------------------|
| Lysis-Puffer<br>(NiNTA-Matrix)          | 8.0     | Natriumdihydrogenphosphat<br>NaCl<br>Imidazol | 50 mM<br>300 mM<br>10 mM  |
| Wasch-Puffer<br>(NiNTA-Matrix)          | 8.0     | Natriumdihydrogenphosphat<br>NaCl<br>Imidazol | 50 mM<br>300 mM<br>20 mM  |
| Elutionspuffer<br>(NiNTA-Matrix)        | 8.0     | Natriumdihydrogenphosphat<br>NaCl<br>Imidazol | 50 mM<br>300 mM<br>250 mM |
| Regenerationslösung 1<br>(NiNTA-Matrix) |         | Guanidinium-HCL<br>Essigsäure                 | 6.0 M<br>0.2 M            |
| Regenerationslösung 2<br>(NiNTA-Matrix) |         | SDS   | 2.0 % (w/v)               |



| Bezeichnung                             | pH-Wert | Bestandteile  | Konzentration     |
|---|---------|---|-------------------|
| Regenerationslösung 3<br>(NiNTA-Matrix) |         | Ethanol   | 25 % (v/v)        |
| Regenerationslösung 4<br>(NiNTA-Matrix) |         | Ethanol   | 50 % (v/v)        |
| Regenerationslösung 5<br>(NiNTA-Matrix) |         | Ethanol   | 75 % (v/v)        |
| Regenerationslösung 6<br>(NiNTA-Matrix) |         | Ethanol   | 100 %             |
| Regenerationslösung 7<br>(NiNTA-Matrix) | 8.0     | EDTA  | 100 mM            |
| Regenerationslösung 8<br>(NiNTA-Matrix) |         | NiSO <sub>4</sub>   | 100 mM            |
| Gelfiltrationspuffer<br>GqqA 1 (ÄKTA)   | 7.4     | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>Elutionspuffer<br>(NiNTA-Matrix) | 1 M<br>50 % (v/v) |
| Gelfiltrationspuffer<br>GqqA 2 (ÄKTA)   | 5.0     | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>NaCl                             | 1 M<br>150 mM     |
| Gelfiltrationspuffer<br>QsdR1 (ÄKTA)    | 7.2     | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>NaCl                             | 1 M<br>150 mM     |

Die folgenden aufgeführten Puffer wurden für das Puffer Screening eingesetzt.

**Tabelle 9: Verwendete Puffer für das Puffer-Screening**

| Bezeichnung              | pH-Wert | Konzentration |
|--------------------------|---------|---------------|
| HEPES                    | 7.0     | 100 mM        |
| HEPES                    | 7.5     | 100 mM        |
| HEPES                    | 8.0     | 100 mM        |
| Dikaliumhydrogenphosphat | 5.0     | 100 mM        |
| Dikaliumhydrogenphosphat | 6.0     | 100 mM        |
| Dikaliumhydrogenphosphat | 7.0     | 100 mM        |
| Natriumcitrat            | 4.7     | 100 mM        |
| Natriumcitrat            | 5.5     | 100 mM        |
| BisTris                  | 6.5     | 100 mM        |

Folgende Puffer und Lösungen wurden für die SDS-PAGE verwendet.

**Tabelle 10: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE**

| <b>Bezeichnung</b>                                     | <b>pH-Wert</b> | <b>Bestandteile</b>  | <b>Konzentration</b>  |
|--|----------------|--|---|
| 10x Elektrodenpuffer                                   | 8.3            | Tris Base<br>Glycin<br>SDS   | 30.3 g L <sup>-1</sup><br>144 g L <sup>-1</sup><br>10 g L <sup>-1</sup> |
| Probenpuffer   | 6.8            | TRIS-HCl<br>Glycerin<br>SDS<br>Bromphenolblau  | 0.5 M<br>50 %<br>10 % (w/v)<br>0.5 % (w/v)                              |
| Sammelgel-Puffer                                       | 6.8            | Tris Base  | 0.5 M   |
| Trenngel-Puffer  | 8.8            | Tris Base  | 1.5 M   |
| Ansatz 4 % Sammelgel für 4 Gele im Multiple Gel Caster | 6.8            | 9.2 mL H <sub>2</sub> O<br>2.0 mL<br>Acrylamid-Stammlösung<br>3.8 mL Sammelgel-Puffer<br>150 µL 10 % SDS<br>15 µL TEMED<br>75 µL 10 % APS    |   |
| Ansatz 12 % Trenngel für 4 Gele im Multiple Gel Caster | 8.8            | 10.2 mL H <sub>2</sub> O<br>12.0 mL<br>Acrylamid-Stammlösung<br>7.5 mL Sammelgel-Puffer<br>300 µL 10 % SDS<br>15 µL TEMED<br>150 µL 10 % APS |   |
| Färbelösung  |                | Isopropanol<br>Essigsäure<br>Coomassie Blau  | 25 % (v/v)<br>10 % (v/v)<br>1.0 g L <sup>-1</sup>                       |
| Entfärbelösung   |                | Essigsäure   | 20 % (v/v)  |
| APS-Lösung   |                | Ammoniumperoxodisulfat   | 10 % (w/v)  |

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Geräte aufgelistet.

## 2.1.5 Geräte

Tabelle 11: Verwendete Geräte

| Gerät  | Bezeichnung                          | Hersteller   |
|--|--------------------------------------|--|
| ÄKTA   | ÄKTA purifier                        | Amerspharmacia biotech                               |
| Analysenwaage-1                              | Quintix 224-1S                       | Sartorius Lab Instruments<br>GmbH & Co. KG           |
| Analysenwaage-2                              | CP 2245-OCE                          | Sartorius Lab Instruments<br>GmbH & Co. KG           |
| Autoklav                                     | VX-120                               | Systec GmbH  |
| DLS-Messgerät                                | SpectroSize 300                      | Xtal Concepts GmbH                                   |
| Doppel-<br>Elektrophoresekammer,<br>vertikal | Mighty Small II 8 x 9 cm gels        | Hoefer Inc.  |
| Gefrierschrank                               | Premium NoFrost                      | Liebherr   |
| Kühlschrank                                  | Comfort                              | Liebherr   |
| Kühl-Tischzentrifuge                         | Centrifuge 5415 R                    | Eppendorf AG   |
| Kühlzentrifuge-1                             | 5804R                                | Eppendorf AG   |
| Kühlzentrifuge-2                             | Multifuge X3R                        | Heraeus  |
| Magnetrührer                                 | VMS-A                                | VWR Peqlab<br>VWR International, LCC                 |
| Nanodrop-1                                   | NanoDrop Lite<br>Spectrophotometer   | Thermo Fisher Scientific Inc.                        |
| Nanodrop-1                                   | 2000C                                | peQLab Biotechnologie GmbH                           |
| Photometer                                   | CO8000                               | Biochrom WPA Biowave                                 |
| pH-Meter                                     | SevenEasy                            | Mettler-Toledo Inc.                                  |
| Rollenschüttler                              | RS-TR05                              | Phoenix Instrument GmbH                              |
| Scanner                                      | DS-5500                              | Epson  |
| Schüttelinkubator-klein                      | KS 3000 i control                    | IKA  |
| Schüttelinkubator-groß                       | Innova 44 Incubator Shaker<br>Series | New Brunswick Scientific Co.,<br>Inc. (Eppendorf AG) |

| <b>Gerät</b>             | <b>Bezeichnung</b>   | <b>Hersteller</b>                          |
|--------------------------|----------------------|--|
| SDS-Power-Supply         | peqlab EV231         | VWR Peqlab<br>VWR International, LCC       |
| Thermomixer              | Thermomixer® comfort | Eppendorf AG                               |
| Tischzentrifuge          | MiniSpin plus        | Eppendorf AG                               |
| Ultraschall-Sonifizierer | Sonifier 250         | Branson Ultrasonics Corp.                  |
| Waage                    | TE3102S              | Sartorius Lab Instruments<br>GmbH & Co. KG |
| Wärmeschrank             |                      | Binder                                     |

## 2.2 Methoden

In den folgenden Unterkapiteln werden die Methoden und Analysen, die für die Arbeit durchgeführt wurden, näher erläutert.

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

In der Natur sind viele Bakterien in der Lage genetisches Material aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Dies geschieht allerdings nur mit geringer Effizienz. Um die DNA-Aufnahme zu steigern wurden verschiedene Verfahren entwickelt, die die Permeabilität der Zellmembranen kurzzeitig erhöht. Ein Verfahren, um kompetente Zellen herstellen zu können, ist die Calciumchlorid-Methode [32]. Hierfür wurden 400 mL LB-Medium z.B. mit dem Bakterienstamm *E. coli* BL21(DE3) inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> in Höhe von 0.6 kultiviert (37 °C, 180 rpm). Die Kultur wird auf 4 °C gekühlt und bei 3000g für 10 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zweimal in 100 mL Calciumchloridlösung suspendiert und zentrifugiert (4 °C, 3000g, 10 min). Das Pellet wird erneut in 10 mL Calciumchloridlösung suspendiert und in 50 µL Aliquote aufgeteilt. Diese werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert [33].

#### 2.2.1.2 Plasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dabei werden die Lipide der Zelle durch die Verwendung von Detergenzien verseift und damit lysiert. Störende RNA wird durch Ribonukleasen degradiert und genomische DNA durch die Anwesenheit eines chaotropen Salzes gefällt. Durch anschließende Reinigung über eine Kieselgelsäule wird die Reinheit erhöht [34].

Zunächst wurden 5 mL LB-Medium mit einer Kolonie aus einer *E. coli* DH5α-Plattenkultur, mit enthaltenem Plasmid, inokuliert und für 12 h kultiviert (37 °C, 180 rpm). Diese Kultur wurde zentrifugiert (20 °C, 5000g, 10 min), um das Pellet zu erhalten. Die Isolation des Plasmids erfolgte mithilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit 1 (VWR, Radnor, US-PA). Dafür wurde das Pellet in 250 µL einer Lösung, die Ribonuklease A enthält, suspendiert und mit 250 µL einer Lösung aus SDS und Natriumhydroxid gemischt. Nach zwei Minuten Inkubation bei

20 °C erfolgte die Zugabe von 350 µL einer Lösung aus Guanidiniumchlorid und Essigsäure. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (20 °C, 10000g, 10 min). Der Überstand wurde in eine PerfectBind DNA-Säule, welche im Kit enthalten ist, überführt und diese erneut für eine Minute zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde 500 µL einer Lösung aus Guanidiniumchlorid und 2-Propanollösung zugegeben und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Im letzten Waschschrift werden 750 µL einer Ethanol-haltigen Lösung auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde für eine bessere Reinigung wiederholt. Unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen wird die Säule ohne eine Zugabe von Lösungen trocken zentrifugiert. Im letzten Schritt folgt die Elution der Plasmid-DNA, durch Zugabe von 50 µL dH<sub>2</sub>O. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Die benutzte *E. coli* DH5α-Plattenkultur, mit enthaltenem pET21a-Plasmid wurde von Prof. Dr. Wolfgang Streit (Universität Hamburg, Hamburg, DE) zur Verfügung gestellt.

In das Plasmid wurde über NdeI- und XhoI-Restriktionsschnittstellen das codierende Gen für die Laktonase GqqA bzw. QsdR1 ligiert. Es besitzt einen f1 Bakteriophagen Replikationsursprung, sowie einen pBR322 ori (origin of replication, z. dt. Replikationsursprung). Der pBR322 ori führt zu einer hohen Plasmidkopienanzahl, womit es sich um ein high-copy-Plasmid handelt. Die Ampicillinresistenz wird durch das auf dem Plasmid liegende Gen (Ap), für die β-Laktamase, vermittelt. Die für den lac-Repressor codierende Sequenz(lacI) befindet sich zwischen den Basen 714-1793 (Abb. 9).

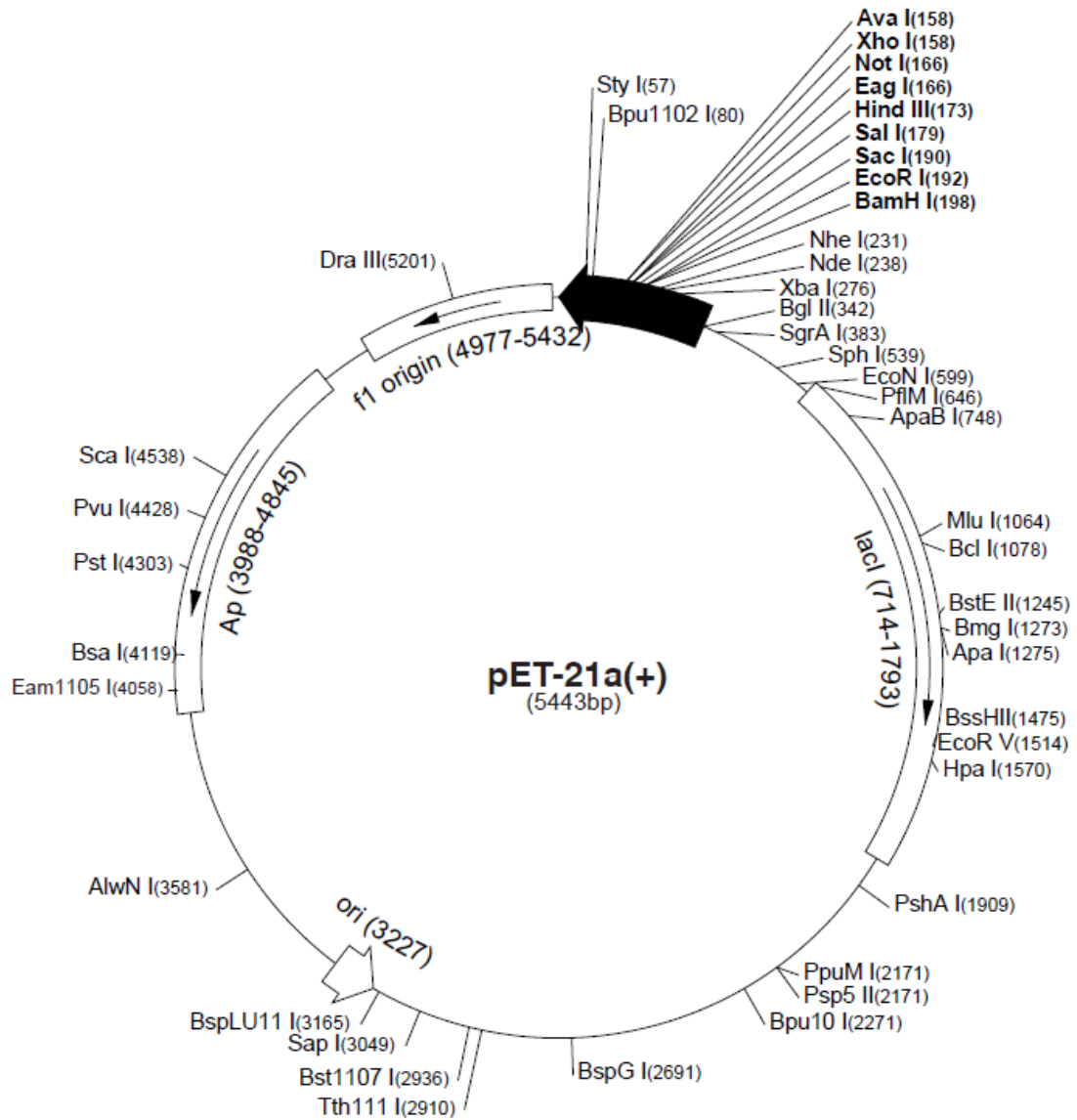


Abbildung 9: Vektorkarte des 5443 bp langen pET21a(+)-Plasmids. Quelle: [https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET\\_vectors/pET-21a-d\\_MAP.pdf](https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-21a-d_MAP.pdf)

### ***2.2.1.3 Hitzeschock-Transformation***

Um die Transformationseffizienz chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen zu erhöhen, können diese in Gegenwart der zu transformierenden DNA einem Hitzeschock ausgesetzt werden. Für die Transformation des Vektors in die geeigneten Expressionszellen, werden zunächst die hitzekompetenten *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wird 1 µL der Plasmid-DNA hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach weiteren 15 min auf Eis wird der Ansatz einem Hitzeschock von 42 °C für 40 s ausgesetzt. Die Zellwände werden durchlässig und der Vektor kann in die Zelle aufgenommen werden. Nach dem Hitzeschock wird der Transformationsansatz erneut für 2 min auf Eis gekühlt und steriles LB-Medium (500 µL) hinzugegeben. Der Ansatz wurde erneut bei 37 °C und 300 rpm für eine Stunde im Thermoblock inkubiert. Anschließend werden 200 µL entnommen und auf eine LB-Agar-Platte mit Ampicillin als Selektionsbedingung ausplattiert. Die Platten werden bei 37 °C für ca. 18 h inkubiert.

### ***2.2.1.4 Kultivierung des Inokulums***

Für die Vorkultur werden 50 mL LB-Medium verwendet. Hinzu kommen 50 µL Ampicillin zu Selektionszwecken. Sind geeignete Kolonien gewachsen, können diese mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte entnommen werden und so das LB-Medium zu einer Vorkultur angeimpft werden. Die Vorkultur wird nun bei 37 °C für ca. 18 h inkubiert. Die Zellsuspension ist dann stark getrübt und hat ungefähr eine OD<sub>600</sub> von 2,0.

### ***2.2.1.5 Glycerolstock***

Für eine längerfristige Lagerung von Bakterienstämmen, können Glycerolstocks angelegt werden. Dazu werden 850 µL der Vorkultur mit 150 µL 99 %igem Glycerol vermischt und bei -80 °C eingefroren. So bleibt die genetische Information unverändert erhalten.



### 2.2.1.6 Rekombinante Genexpression

In der Biotechnologie stellt die gezielte Proteinsynthese, durch Expressionssysteme, eine der wichtigsten Anwendungen dar. Dabei wird häufig der Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) verwendet, welcher zur rekombinanten Überexpression von Zielgenen das T7-Expressionssystem nutzt [35].

In dem in Abbildung 10 dargestellten Expressionssystem stehen das *E. coli*-Genom und die Plasmid-DNA in Zusammenhang. Der lac-Repressor, hergestellt durch das lacI-Gen bindet an den lac-Operator im Genom, sowie am lac-Operator des T7-Promotors auf dem Plasmid. Dadurch können die *E. coli* RNA Polymerase und die T7 RNA Polymerase nicht an ihre Promotoren binden (Abb. 10). Erst bei der Induktion mit Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird dies möglich. IPTG bindet an den Repressor, wodurch die Konformation leicht verändert wird. Die Bindungsaffinität sinkt, sodass die *E. coli* RNA Polymerase an den lac-Promotor im Genom binden kann und das T7-Gen-1 transkribiert und translatiert wird. Die entstandene T7 RNA Polymerase kann sich ungehindert an den T7-Promotor anschließen. So kommt es zu einer Transkription des Zielproteins (Abb. 10) [36].

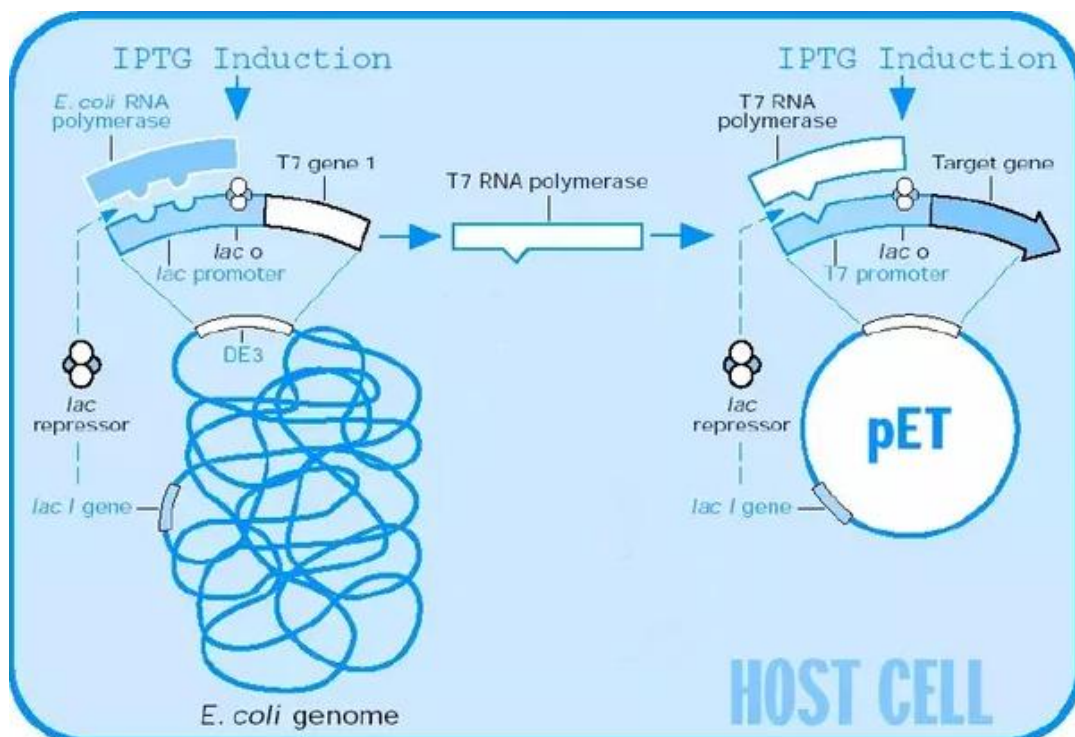


Abbildung 10: Expressionssystem des Bakterienstammes *E. coli* BL21 (DE3). Quelle: <https://qph.ec.quoracdn.net/main-qimg-c275a89fe194771430d810cec3c504da>

Für die Expression wird ein 5 L-Kolben mit einem Liter sterilem LB-Medium gefüllt und mit 1 mL Ampicillin als Selektionsbedingung versetzt. Durch die Größe des Kolbens wird eine ausreichende Sauerstoffversorgung sichergestellt. Hinzu kommen 25 mL der Vorkultur. Die Expression findet in einem Schüttelinkubator mit 170 rpm bei 37 °C statt. Sobald die optische Dichte (OD) der Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm einen Wert zwischen 0,6 – 0,8 erreicht, kann diese mit 1 mL 1 M IPTG induziert werden. Die Zellsuspension wird für 3 h bei 37 °C inkubiert. Auch eine Expression über Nacht ist möglich. Hierbei muss die Temperatur jedoch auf 18 °C gesenkt werden, bei gleichbleibender Schüttelfrequenz. Die Ernte der Zellen erfolgt durch Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C für 1 h. Das Zellpellet kann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren werden.

#### ***2.2.1.7 OD<sub>600</sub>-Messung***

Um die optische Dichte einer Bakterienkultur zu bestimmen, wird photometrisch die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Als Blindprobe dient steriles LB-Medium.

Die Referenz wird gemessen und gegen Null abgeglichen. Anschließend wird 1 mL der Kultur abgenommen und in einer Küvette gemessen. Der gemessene Wert entspricht der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

### **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

#### ***2.2.2.1 Proteinkonzentrationsmessung mittel NanoDrop Lite***

Beim NanoDrop Lite wird zuerst eine Referenzprobe gemessen. Dazu werden 2 µL Wasser auf die Messlinse pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Diese Messung erfolgt zweimal um einen zutreffenden Leerwert zu gewährleisten. Anschließend folgt die Messung der Proteinlösung. Es werden 2 µL auf die Messlinse pipettiert.

Die detektierte Absorption wird automatisch mit Hilfe der Auswertungseinheit verrechnet und als Konzentration in mg ml<sup>-1</sup> ausgegeben.

### ***2.2.2.2 Ultraschall-Zellaufschluss***

Das Pellet aus 1 L Kulturlösung wird von -20 °C auf Raumtemperatur aufgetaut. Ist das Pellet flüssig können 10 mL des Lysis-Puffers hinzugegeben werden. Zum Aufbrechen der Plasmamembranen und der damit folgenden Zelllyse wird Ultraschall eingesetzt. Sonifiziert wird für 1 min mit anschließender Pause von 1 min durch kurze Ultraschall-Impulse. Fünf Zyklen werden durchgeführt, um möglichst alle Zellen zu lysieren. Mit Hilfe einer Kühlzentrifuge werden die Zelltrümmer bei 4 °C mit 16000 rpm für 60 min abzentrifugiert. Bei löslichen Proteinen wird der Überstand abdekantiert und weiterverarbeitet, während das Sediment verworfen wird. Unlösliche Proteine befinden sich hingegen im Sediment, sodass in diesem Fall damit weitergearbeitet werden müsste.

### ***2.2.2.3 Puffer Screening***

Das Puffer Screening gibt Aufschluss über die Stabilität des Zielproteins in verschiedenen Puffersystemen bei unterschiedlichen pH-Werten. Hierbei wird zuerst, mithilfe eines Kristallisationsroboters, ein breites Spektrum an Puffern in Linbro-Platten gescreent. Die vielversprechendsten Puffer werden für weitere Untersuchungen ausgewählt. Dafür wird das gereinigte Protein in 50 µL Ansätze aliquotiert und bei 4 °C für ca. 18 h dialysiert. Die verschiedenen Puffer sind in der Tabelle 8 aufgelistet. Anschließend wird die Stabilität des Proteins durch die Methode der dynamischen Lichtstreuung überprüft.

### ***2.2.2.4 Membranzentrifugation***

Zur Konzentration proteinhaltiger Lösungen, werden VIVASPIN Konzentratoren verwendet. Diese werden mit dH<sub>2</sub>O gespült, bevor die Proteinlösung in den oberen Bereich gegeben wird. Anschließend wird bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert, bis die gewünschte Konzentration erreicht wird. Die Zentrifugalkraft presst dabei Flüssigkeit durch die Membran, während das Protein zurückbleibt. Zwischendurch wird die Lösung immer wieder mittels invertieren durchmischt.

### 2.2.2.5 Affinitätschromatographie

Für die Affinitätschromatographie wird eine Handtropfsäule mit Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) verwendet. Es handelt sich also um eine Metallchelate-Chromatographie. NTA ist ein Komplexbildner, welcher in wässrigen Lösungen Komplexbindungen mit Metallionen bildet. Die Nickelionen, die an den Beads der Säule gebunden sind, besitzen eine hohe Affinität zu Histidin. Die mit dem Ultraschallaufschluss gewonnene Probe, wird nach dem Sedimentieren der Zellreste auf die gravity-flow Säule aufgetragen. Das Zielprotein besitzt eine Polyhistidin-Markierung, weshalb es mit hoher Affinität an die Nickelionen bindet, um von Verunreinigungen gesäubert werden zu können. Die Säule wird bei 4 °C für 1 h auf einem Rollenmischer inkubiert. Der Durchfluss wird als Probe für die SDS-PAGE gesammelt. Es folgen zwei Waschstschritte mit einem Waschpuffer, welcher eine geringe Konzentration an Imidazol besitzt. Der Imidazolring entspricht strukturell der Histidinseitenkette, weshalb es mit dieser um die Bindungsstelle am Nickel konkurriert (Abb. 11) [37].

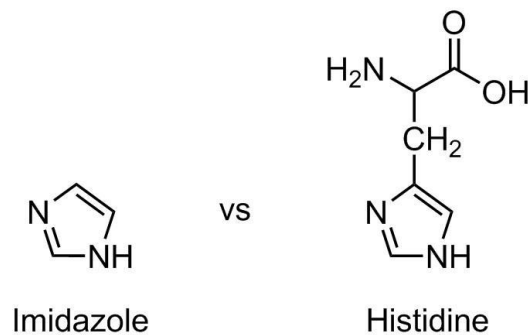


Abbildung 11: Strukturen von Imidazol und Histidin. Der Imidazolring und die Histidinseitenkette sind strukturell sehr ähnlich und konkurrieren damit stark um die Bindungsstelle am Nickel. Quelle: [http://2015.igem.org/Team:Freiburg/Project/Protein\\_Purification](http://2015.igem.org/Team:Freiburg/Project/Protein_Purification)

Geringe Konzentrationen von Imidazol im Waschpuffer sorgen für eine Elution von unspezifisch an der Matrix gebundenen Proteinen. Die Proteine mit dem Polyhistidinrest binden jedoch sehr stark an der Matrix, sodass eine geringe Imidazolkonzentration von 20 mM im Waschpuffer die Bindungen nicht lösen kann. Zum Waschen werden jeweils 4 mL Waschpuffer auf die Säule gegeben. Auch die Waschfraktionen werden als Probe für die SDS-PAGE gesammelt. Um das Zielprotein zu eluieren, werden 5 mL des Elutionspuffers auf die Säule gegeben. Dieser besitzt eine Imidazolkonzentration von 250 mM. Bei dieser Konzentration wird das Protein von der Matrix verdrängt. Auch die Elutionsfraktion wird gesammelt und eine Probe für die SDS-PAGE verwendet.

### *2.2.2.6 Regeneration der NiNTA-Matrix*

Wenn sich die NiNTA-Agarose nach mehrmaligen Gebrauch von einer bläulichen Färbung zu einer braun-grauen gewechselt hat, ist eine Regeneration der NiNTA-Matrix nötig. Dafür wird die Säule zuerst mit 2 column volume (CV) Regenerationslösung 1 gewaschen und mit 5 CV dH<sub>2</sub>O gespült. Die Regenerationslösung 1 enthält Guanidiniumhydrochlorid, wobei es sich um ein chaotropes Salz handelt. Dies bewirkt die Entfernung von Einschlusskörpern, sowie einer vollständigen Entfaltung von Proteinen, wodurch diese solubilisiert werden. Weiteres Waschen mit 3 CV 2 % SDS denaturiert weitere Proteine, welche sich noch auf der Matrix befinden können. Im nächsten Schritt wird die Säule nach einem Stufengradienten gewaschen. Dabei wird jeweils 1 CV Ethanol von 25 % bis 75 %, in 25 % Schritten auf die Säule gegeben. Anschließend wird mit 100 %igem Ethanol 5 CV gewaschen, bevor der Gradient wieder gesenkt wird. Die Säule wird mit 1 CV dH<sub>2</sub>O gespült. Mit den folgenden 5 CV EDTA werden die Nickelionen von der Matrix gewaschen. EDTA ist ein Komplexbildner, welcher stabile Komplexe mit den Nickelionen ausbildet und diese so von der NTA-Matrix entfernt. Nach einer erneuten Spülung mit 2 CV dH<sub>2</sub>O wird die Säule mit 2 CV 100 mM NiSO<sub>4</sub> neu beladen. Mit 2 CV dH<sub>2</sub>O wurden die ungebundenen Nickelionen abgespült. Im letzten Schritt wird nochmals mit 2 CV der Regenerationslösung 1 gespült. Die Säule kann anschließend für die nächste Chromatographie äquilibriert werden oder in 20 % Ethanol gelagert werden.

### *2.2.2.7 Größenausschlusschromatographie*

Die Größenausschlusschromatographie ist ein Verfahren, um Moleküle abhängig von ihrem Molekulargewicht und ihrer Form voneinander zu trennen. Die Proteinlösung wird auf eine Säule mit geeigneter Matrix gegeben. Kleine Moleküle dringen in die Poren der stationären Phase ein, wodurch ihre Retentionszeit gegenüber größeren Molekülen erhöht ist, und sie später eluieren. Die Größenausschlusschromatographie wurde mit Hilfe eines ÄKTA-purifizier-Systems durchgeführt. Als stationäre Phase diente eine Superose 6 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, Uppsala, SE). Vor jedem Lauf wurde die Säule zunächst mit einem Säulenvolumen dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit einem Säulenvolumen des jeweiligen Puffers (siehe Tabelle 8) äquilibriert. Die auf 1 mL konzentrierte Probe wurde mit Hilfe einer

Probenschleife injiziert. Der maximale Druck von 3 MPa wurde eingestellt und die spezifische Absorption des Eluats bei einer Wellenlänge von 254 nm und 280 nm aufgezeichnet.

Die Elutionsfraktionen, die eine Absorption aufwiesen, wurden anschließend mittels der SDS-PAGE analysiert.

#### **2.2.2.8 SDS-PAGE**

Die "Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis" beruht auf dem Prinzip des Siebeffekts. Größere Makromoleküle benötigen im elektrischen Feld eine längere Zeit zur Anode als kleinere Moleküle. Das SDS-Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Das Sammelgel besitzt eine Konzentration von 4 %, während das Trenngel mit 10 % deutlich höher angesetzt wird um eine stärkere Trennung zu gewährleisten. Die Polymerisation des Bisacrylamids wird durch die Substanzen APS und TEMED ermöglicht. Dabei wirkt APS als Radikalstarter und TEMED als Stabilisator der Radikale. Das polymerisierte Bisacrylamid bildet ein Molekularsieb aus, dessen Porengröße über die Konzentration eingestellt werden kann. Die Proteine wandern aufgrund ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel, wodurch eine Auftrennung erfolgt. Zur Vorbereitung der Proben wurden 10 µL Probe mit 10 µL Probenpuffer vermischt und für 10 min bei 95 °C im Hitzeblock denaturiert. Es kommt zur Reduzierung der Disulfidbrücken, sodass die Proteine in ihrer Sekundärstruktur vorliegen. Außerdem lagert sich das negativ geladene SDS an die hydrophoben Bereiche des Proteins an und überdeckt damit seine Eigenladung. Durch die Veränderung des Proteins wird sichergestellt, dass die Wanderungsgeschwindigkeit nur von der Größe der Proteine abhängig ist und nicht von dessen Struktur oder Eigenladung. Ein Volumen von 20 µL der denaturierten Probe wird in die Taschen des Gels gefüllt. Um die Größe der Probenproteine abschätzen zu können, wird in eine freie Tasche 5 µL eines Markerstandards pipettiert. Das Gel wurde in einer mit SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben und die Betriebsparameter mit 25 mA, 50 W, 250 V und einer ungefähren Laufzeit von 1,5 h eingestellt.

Der Molekulargewichtsstandard zur Identifizierung der Größe der Banden besteht aus folgenden Proteinen:  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli* (116,0 kDa), BSA aus Rinderserum (66,2 kDa), Ovalbumin aus Hühnereiweiß (45,0 kDa), Lactat-Dehydrogenase aus

Schweinemuskulatur (35,0 kDa), RNase Bsp981 aus *E. coli* (25,0 kDa),  $\beta$ -Lactoglobulin aus Kuhmilch (18,4 kDa) und Lysozym aus Hühnereiweiß (14,4 kDa).

Zur Visualisierung der Proteine auf dem Polyacrylamidgel wird dieses im Anschluss mit einer Coomassie-Blau-Färbelösung für ca. 1 h gefärbt. Die Entfärbung des Gels erfolgt mit 20 % Essigsäure. Zur besseren Visualisierung und Analyse wird das Gel eingescannt.

## 2.2.3 Biophysikalische Methoden

### 2.2.3.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Methode der dynamischen Lichtstreuung wird zur Charakterisierung von Proteinen in einem Lösungsmittel verwendet. Hierbei wird die Lösung, welche sich in einer Quarzküvette befindet, in einem definierten Winkel mit monochromatischem Laserlicht bestrahlt. Die dabei entstehende Streuung kann gemessen werden. Das Streulicht, das durch die Brownsche Molekularbewegung fluktuiert, wird zeitlich analysiert und ermöglicht einen mathematischen Zugang zum Diffusionskoeffizienten. Unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes, welches eingegeben wird, lässt sich der hydrodynamische Radius errechnen.

Der hydrodynamische Radius ist über die Stokes-Einstein-Gleichung definiert [38].

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

**Gleichung 1:** Berechnung des hydrodynamischen Radius  $R_H$  über den Diffusionskoeffizienten  $D$  mit  $k_B$  = Boltzmann-Konstante,  $T$  = Temperatur,  $\eta$  = Viskosität.

Aus den erhaltenen hydrodynamischen Radien können sowohl die molekulare Masse als auch der Aggregationszustand der Moleküle in der Lösung abgeleitet werden. Außerdem kann die Lösung auf ihre Dispersität untersucht werden, was in Hinblick auf folgende Kristallisationsversuche von essentieller Bedeutung ist. Eine Polydispersität des Zielproteins führt dazu, dass sich das Protein nicht kristallisieren lässt.

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius wurden 15  $\mu$ L der zu untersuchenden Lösung in eine Quarzküvette überführt und in einem SpectroSize 300-Gerät der Firma Xtal Concepts analysiert. Die Proteinlösung muss vorher für ca. 1 h bei 4 °C mit 16000g zentrifugiert werden um große Aggregate zu sedimentieren. An der DLS-Software wurden die

Untersuchungsparameter wie Proteinkonzentration, Lösungsmittel oder Additive eingegeben. Es erfolgten für jede Probe 20 Messungen mit einer Dauer von 20 s. Aber auch Langzeitmessungen über mehrere Stunden wurden durchgeführt.

### *2.2.3.2 Circular dichroismus-Spektroskopie*

Die CD-Spektroskopie ist eine Methode zur Untersuchung der optisch aktiven Moleküle mit zirkular polarisiertem Licht. Daraus können Vorhersagen über die Sekundärstrukturzusammensetzung von Proteinen in Lösung getroffen werden. Anhand der Lage der Absorptionsmaxima und –minima einer Proteinlösung über einen bestimmten Wellenlängenbereich kann der Gehalt an  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen abgeschätzt werden [39]. Während  $\alpha$ -Helices ein Absorptionsminimum in einem Wellenlängenbereich von 208 nm sowie 222 nm und ein Absorptionsmaximum bei 190 nm aufweisen, liegt bei dem  $\beta$ -Faltblatt das Minimum bei 215 nm und das Maximum bei 195 nm.

Die Messungen wurden an einem J-815 CD-Spektrometer der Firma Jasco durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben und die jeweiligen Blindproben wurden in einer Quarzküvette, mit einer Schichtdicke von 1 mm in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 260 nm und einer Temperatur von 20 °C vermessen.



### 2.2.3.3 Proteinkristallisation

Ein entscheidender Schritt für die Strukturaufklärung von Proteinen durch Röntgendiffraktion ist die Kristallisation der Proteine. Die Qualität der Kristalle hat einen großen Einfluss auf die folgende Messung. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Kristallisation, am häufigsten wird die zur Dampfdiffusion zählende Hanging-drop-Methode verwendet (Abb. 12). Die Kristallisation erfolgt in einem Tropfen, der an der Unterseite eines Deckgläschens über einem 500  $\mu\text{L}$  Reservoir aus Präzipitantlösung (Mutterlösung) hängt.

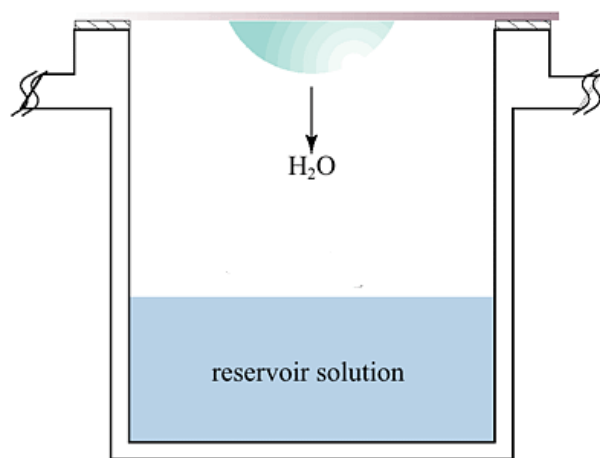


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Hanging-drop-Methode: Über einer Reservoirlösung hängt ein Tropfen aus Protein- und Präzipitantlösung an einem Deckglas. Durch Diffusion steigt die Proteinkonzentration im Tropfen an, bis sich Kristalle bilden können.

Quelle:<http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/m230d/Crystallization/tipsandtricks.html>

In dem Tropfen werden Präzipitantlösung (1  $\mu\text{L}$ ) und Proteinlösung (1  $\mu\text{L}$ ) vermischt. Der Innenraum des Wells ist komplett mit Silikon abgedichtet, sodass keine Verdunstung der Flüssigkeit nach außen stattfindet. Die Präzipitantkonzentration in der Mutterlösung ist höher als die im Tropfen, was zur Diffusion von Flüssigkeit aus dem Tropfen in die Mutterlösung führt. Dadurch steigen im Tropfen die Präzipitant- und Proteinkonzentration an. Gelangt die Proteinkonzentration in den gesättigten Bereich, ist eine Kristallkeimbildung möglich (Abb. 13). Dies kann bei extrem unterschiedlichen Bedingungen passieren. Die Platten werden bei 18  $^{\circ}\text{C}$  oder 4  $^{\circ}\text{C}$  gelagert und regelmäßig unter einem Mikroskop auf Kristallwachstum überprüft.

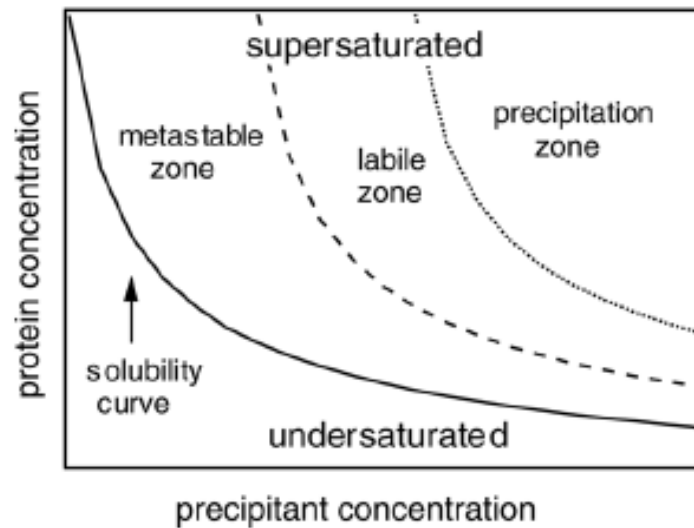


Abbildung 13: Phasendiagramm der Proteinkristallisation: Die Kristallisation hängt von den Konzentrationen des Proteins und Präzipitants ab. Nur im gesättigten Bereich ist eine Kristallbildung möglich. Quelle: Asherie N., "Protein crystallization and phase diagrams", Science Direct, Methods 34 266-272 (2004)

Nur etwa 10 % der Kristallisationsexperimente führen zu messbaren Proteinkristallen. Es ist auch heute noch nicht möglich, Kristallisationsbedingungen vorauszusagen. Jedes Protein benötigt eine spezielle Pufferzusammensetzung. Die Kristallisation ist zudem abhängig von der Konzentration des Präzipitants, pH-Wertes, Temperatur und Zugabe von Additiven. Aber auch die Konzentration des Proteins selbst hat Auswirkungen. Wenn Proteine aggregieren, ist eine Kristallisation nicht möglich. In diesem Fall können mit molekularbiologischen Verfahren Mutationen eingefügt werden, um die Aggregation zu verhindern. Die Zugabe von Cofaktoren, Inhibitoren oder Antikörperfragmenten bei der Kristallisation kann ebenfalls helfen [40].

Eine andere Möglichkeit der Dampfdiffusion bietet die Sitting-Drop-Methode. Dabei hängt der Tropfen nicht an einem Deckgläschen über der Mutterlösung sondern befindet sich auf einer Brücke darüber. Dadurch wird eine Automatisierung mit Kristallisationsrobotern möglich.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse aufgeführt und näher diskutiert. Das schrittweise Vorgehen bei der Bearbeitung der Thematik ist für die Laktonasen QsdR1 und GqqA identisch.

#### 3.1 QsdR1

Im ersten Schritt muss das Zielprotein, anhand vorangegangener Arbeiten, mithilfe rekombinanter Genexpression im *E. coli* BL21 (DE3)-Expressionsstamm produziert werden. Hierfür wird eine *E. coli* DH5 $\alpha$ -Plattenkultur mit enthaltenem QsdR1-codierendem pET21a-Plasmid von Prof. Dr. Wolfgang Streit (Universität Hamburg, Hamburg, DE) zur Verfügung gestellt. Durch erfolgreiche Plasmidpräparation kann etwa 5,5  $\mu$ g Plasmid-DNA isoliert werden. Für die anschließende Produktion des Zielproteins wird das QsdR1-codierende pET21a-Plasmid in den *E. coli* BL21 (DE3)-Expressionsstamm transformiert und auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen. Die über Nacht gewachsenen Kolonien werden mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und zur Inokulation der Test-Vorkulturen verwendet. Die Proteinproduktion erfolgt nach der Induktion mit 1 M IPTG über einen Zeitraum von 1,5 h. Um zu überprüfen ob das Zielprotein hergestellt wird, sind Proben aus den Vorkulturen entnommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden (Abb. 14). In fünf von sechs Vorkulturen wurde eine Bande bei ca. 35 kDa erhalten. Dies gibt Aufschluss über eine funktionierende Produktion von QsdR1, welches ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa aufweist. Auffällig ist jedoch, dass die gesuchten Banden blasser als die Banden von Fremdproteinen sind. Dies deutet auf eine geringe Konzentration des Zielproteins in der Vorkultur hin. Die Vorkultur Nr. 2 ist nicht angewachsen. Dementsprechend sind keine Banden zu sehen (Abb. 14).

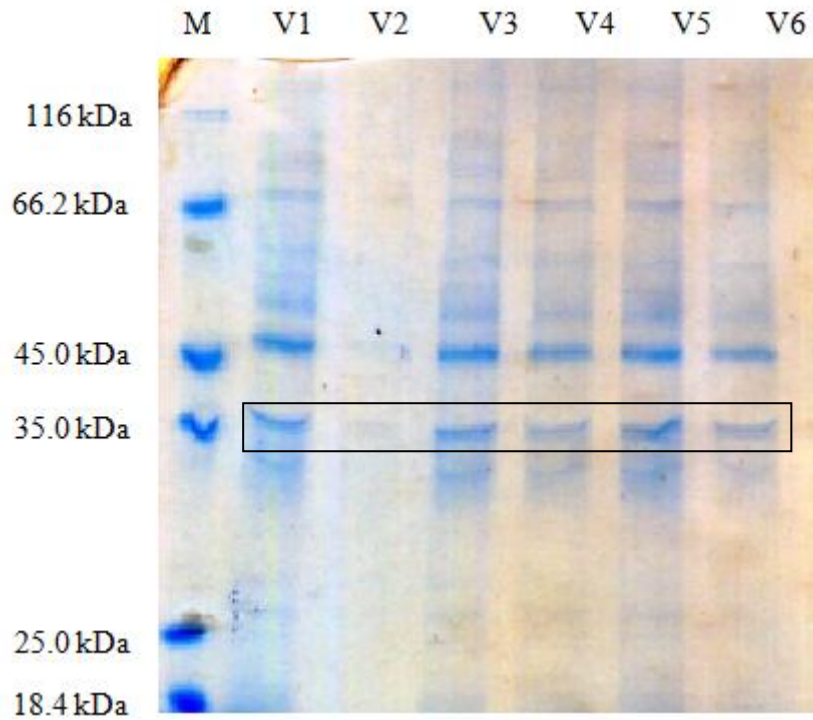


Abbildung 14: SDS-PAGE-Analyse der Vorkulturproben. Es wurden 4  $\mu\text{L}$  des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu\text{L}$  der Proben aus den Vorkulturen (V). Das Zielprotein ist schwarz markiert.

Das Problem der niedrigen Konzentration des Zielproteins soll durch eine längere Expressionsdauer gelöst werden. Zum Beimpfen wird die Vorkultur Nr. 3 verwendet. Die Expressionsdauer beträgt 3 h. Wieder sind Proben für die SDS-PAGE-Analyse aus den Hauptkulturen entnommen wurden (Abb. 15).

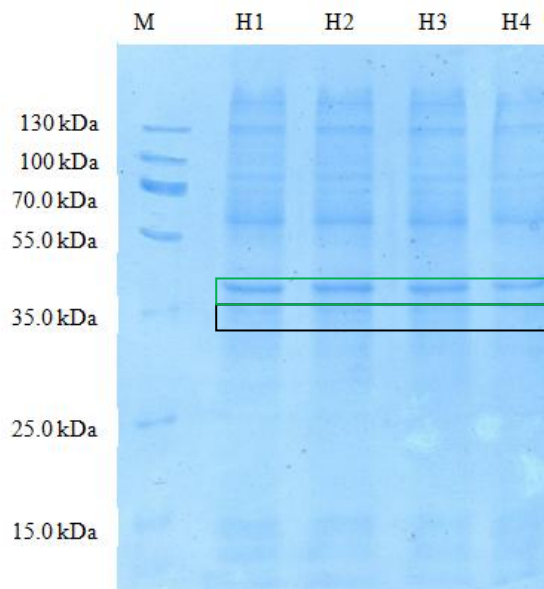


Abbildung 15: SDS-PAGE-Analyse der Hauptkulturen. Es wurden 4  $\mu\text{L}$  des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu\text{L}$  der Proben aus den Hauptkulturen (H). Die Banden des Zielproteins sind schwarz markiert. Andere Proteinfragmente bei 45 kDa sind grün markiert.

Das Ergebnis der sichtbaren Banden stellte sich nicht wie erwartet dar. Die Bande des Zielproteins (schwarz) bei ca. 35 kDa ist trotz längerer Expressionszeit nur sehr schwach zu erkennen, während die Banden anderer Proteinfragmente (grün) wie zum Beispiel bei ca. 45 kDa deutlicher werden. Da das Zielprotein aber enthalten ist, kann mit den erhaltenen Pellets aus der Expression weitergearbeitet werden. Nach dem Zellaufschluss, mittels Ultraschall, wird die Suspension über eine NiNTA-Matrix gereinigt (Abb. 16).

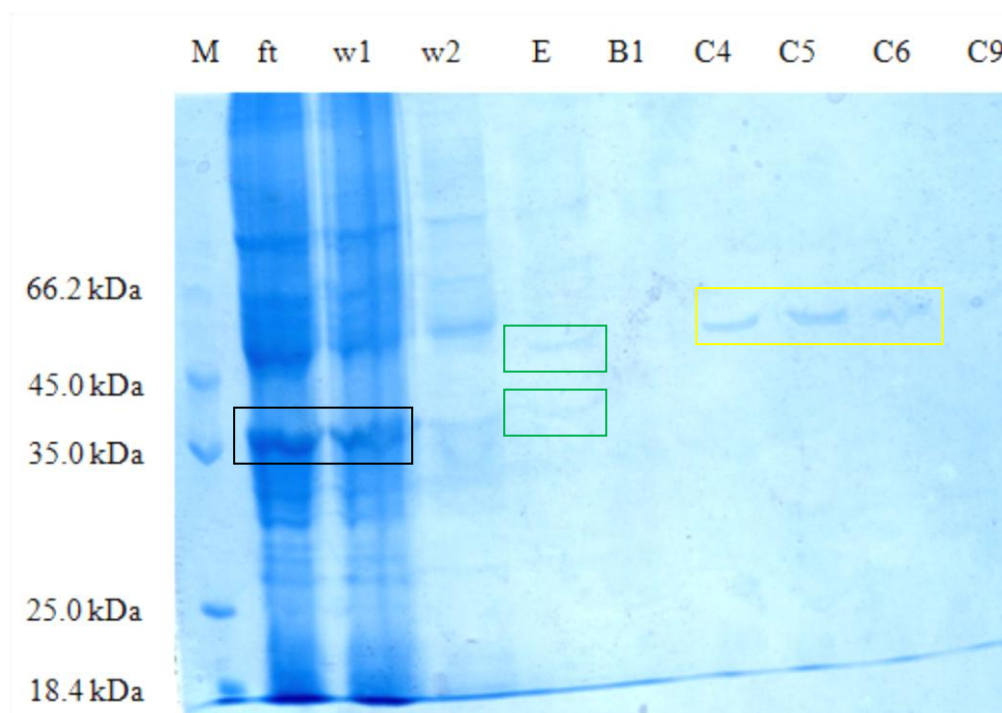
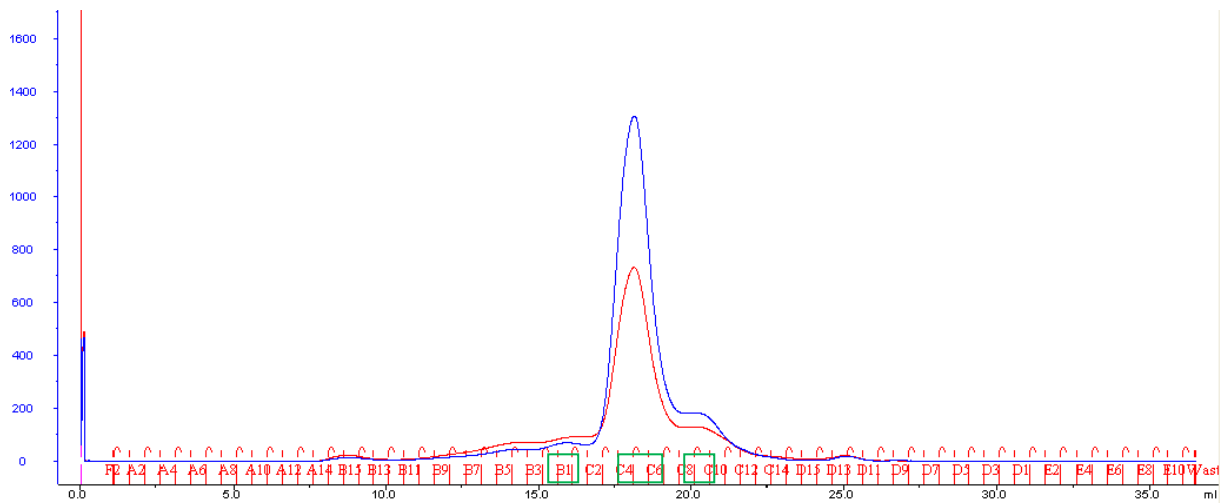


Abbildung 16: SDS-PAGE-Analyse der NiNTA- und ÄKTA-Reinigung. Es wurden 4  $\mu\text{L}$  des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 10  $\mu\text{L}$  der Proben aus dem Durchfluss (ft), Waschschritt (w), Elution (E), sowie den Fraktionen aus der ÄKTA-Reinigung (B und C). Das Zielprotein im Durchfluss und Waschschritt 1 wurde schwarz markiert. Grün markierte Banden stellen das Zielprotein und ein anderes Proteinfragment in der Elutionsfraktion dar. Die gelb markierten Banden sind das falsche Proteinfragment nach der ÄKTA-Reinigung aus den Fraktionen C4, C5 und C6.

Die Ergebnisse der Affinitätschromatographie waren nicht so wie erwartet. Schon beim Durchfluss (ft) konnte eine starke Bande (schwarz) an der 35 kDa Markierung ermittelt werden. Dies deutet darauf hin, dass das Zielprotein nicht an die Matrix gebunden hat. Auch bei dem ersten Waschschritt (w1) wird ein großer Teil des Zielproteins heraus gespült. Dies geschieht obwohl die Matrix der Chromatographiesäule in einem guten Zustand (bläuliche Farbe) ist und ausreichend Zeit von ca. 1.5 h zur Bindung gegeben wird. Als Resultat sind in der Elutionsfraktion (E) nur sehr blasse Banden (grün) bei 35 kDa und 45 kDa zu erkennen (Abb. 16). Da das SDS-Gel erst nach der kompletten Reinigung des Proteins angefertigt wurde, wurde zunächst mit dem nächsten Reinigungsschritt, der ÄKTA-Größenausschlusschromatographie, fortgefahren (Abb. 17)



**Abbildung 17: Chromatogramm der ÄKTA-Größenausschlusschromatographie.** Auf der y-Achse wird die Absorption zwischen 0 und 1600 in 200er Schritten in mAU dargestellt. Die x-Achse stellt die Retentionsvolumina von 0 bis 35 in mL dar. Zusätzlich sind auf der x-Achse die aufgefangenen Fraktionen angezeigt. Die blaue Linie zeigt die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm, während die rote Linie die Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm zeigt. Die überprüften Fraktionen B1, C4, C5, C6 und C9 sind grün markiert.

Um den gesamten Peak des Chromatogramms abzudecken werden Proben aus den Fraktionen B1, C4, C5, C6 und C9 (grün markiert) für die SDS-PAGE-Analyse genommen (Abb. 17). Der höchste Peak von ca. 1350 mAU bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde bei den Fraktionen C4, C5 und C6 gemessen. Die sichtbaren Banden der Fraktionen liegen bei ca. 45 kDa (gelb markiert) und entsprechen daher nicht dem Molekulargewicht des Zielproteins. Die Schultern des Peaks werden außerdem untersucht, um dort das möglicherweise enthaltene Zielprotein identifizieren zu können. Die Fraktionen B1 und C9 bringen jedoch keine sichtbaren Banden hervor (Abb. 16). Dies liegt womöglich an der sehr geringen Konzentration der enthaltenen Proteine.

Durch die Betrachtung dieser Ergebnisse ist es naheliegend, dass das Problem schon am Anfang des Expressionsschrittes entsteht. Die SDS-Gele der Vor- und Hauptkultur zeigen nur sehr dünne und wenig ausgeprägte Banden. Die Expression des Zielproteins läuft nur in einer sehr geringen Intensität ab. Dadurch ist die letztendliche Konzentration von QsdR1 sehr niedrig. Um die Expression des Zielproteins zu steigern, werden weitere Tests durchgeführt. Verschiedene Konzentrationen an IPTG werden in Vorkulturen induziert und weitere Proben für die SDS-PAGE-Analyse nach 1,5 h genommen (Abb. 18).

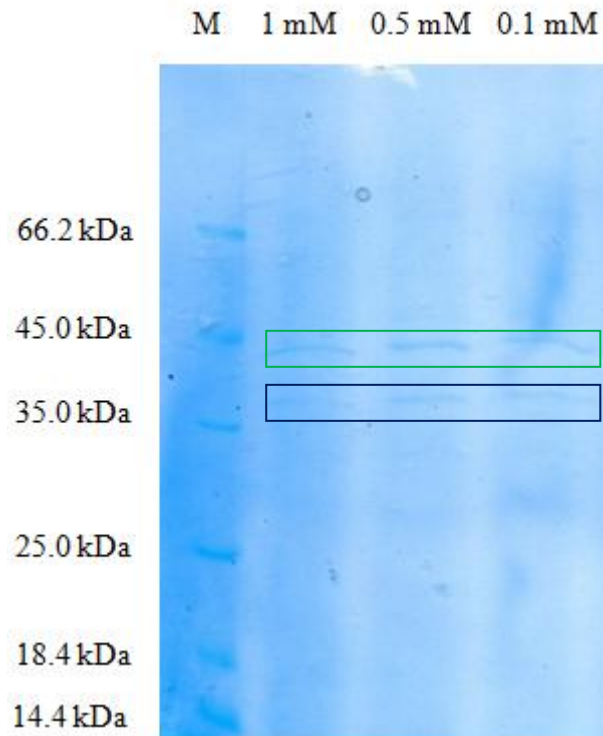


Abbildung 18: SDS-PAGE-Analyse der Vorkulturen mit unterschiedlichen Induktionskonzentrationen. Es wurden 4  $\mu\text{L}$  des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu\text{L}$  der Proben aus den Vorkulturen. In die verschiedenen Vorkulturen wurde IPTG induziert welches eine Endkonzentration von 1 mM, 0,5 mM und 0,1 mM besaß.

Anhand der Bandenstärke des Zielproteins (schwarz) bei 35kDa und eines weiteren Proteinfragments (grün) bei 45 kDa konnte kein Unterschied bei der Induktion mit verschiedenen Konzentrationen von IPTG erkannt werden. Auch nach mehrmaligen Wiederholungen der Transformation in frische *E. coli* BL21 (DE3)-Bakterien bestand das Problem bis zuletzt weiterhin.

### 3.2 GqqA

Um Kristallisationsversuche mit der Laktonase GqqA durchführen zu können, muss zunächst ein zuverlässiger Herstellungsprozess mit anschließender funktionierender Reinigung sichergestellt werden. Hierfür wird eine *E. coli* DH5 $\alpha$ -Plattenkultur mit enthaltenem GqqA-codierendem pET21a-Plasmid von Prof. Dr. Wolfgang Streit (Universität Hamburg, Hamburg, DE) zur Verfügung gestellt. Durch erfolgreiche Plasmidpräparation konnte etwa 4  $\mu$ g Plasmid-DNA isoliert werden. Für die anschließende Produktion des Zielproteins wird das GqqA-codierende pET21a-Plasmid in den *E. coli* BL21 (DE3)-Expressionsstamm transformiert und auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen. Die über Nacht gewachsenen Kolonien werden mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und zur Inokulation einer Vorkultur verwendet. Jeweils 25 mL der Vorkultur werden zum Beimpfen zweier Hauptkulturen benutzt. Außerdem wird ein Glycerolstock angelegt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 wird jeweils 1 mL 1 M IPTG in die Hauptkulturen induziert. Nach einer Expressionsdauer von 3 h bei 37 °C und 200 rpm werden die Zellen geerntet. Außerdem werden Proben für die SDS-PAGE-Analyse genommen um das Vorhandensein des Zielproteins zu verifizieren (Abb. 19).

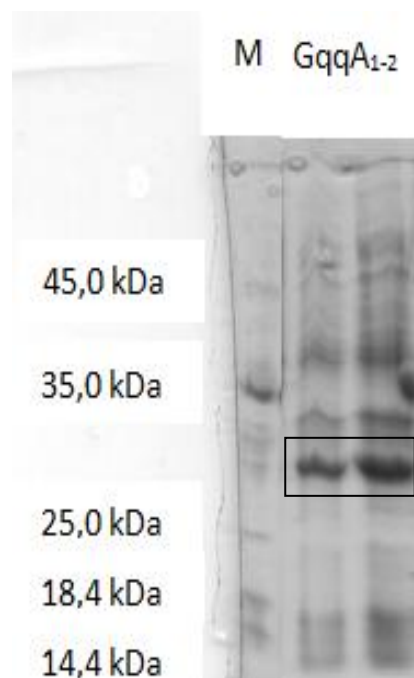
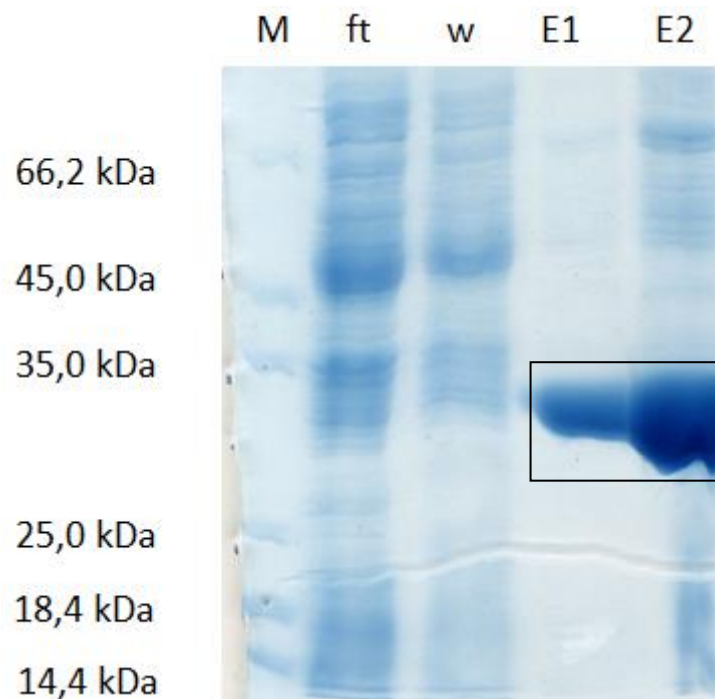


Abbildung 19: SDS-PAGE-Analyse der Hauptkulturen. Es wurden 4  $\mu$ L des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu$ L der Proben aus den Hauptkulturen (GqqA<sub>1</sub> und GqqA<sub>2</sub>). Das Zielprotein ist schwarz markiert.



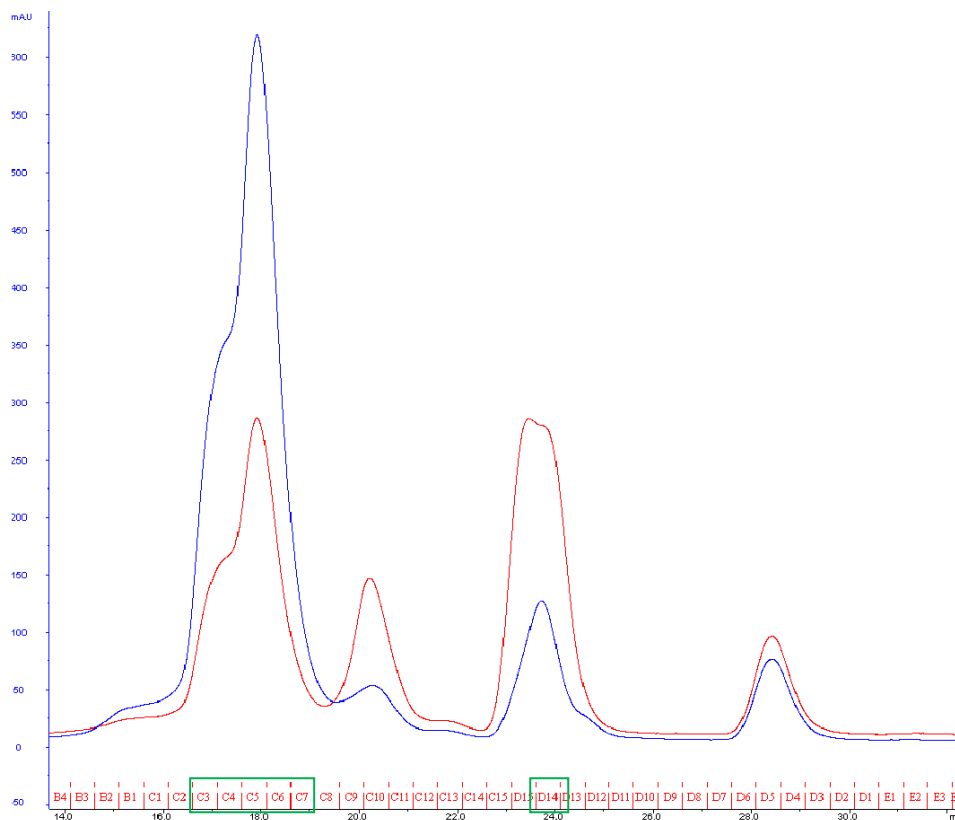
Es sind deutliche Banden bei der erwarteten Größe von ca. 30 kDa zu sehen. Dies deutet auf eine starke Expression des Zielproteins hin. Die geernteten Pellets können somit für das weitere Vorgehen verwendet werden. Die Reinigung beginnt mit der Affinitätschromatographie mittels NiNTA-Matrix. Die Reinigung wird überprüft, indem Proben des Durchflusses, des Waschschruttes und der Elution für eine SDS-PAGE-Analyse genommen werden (Abb. 20).



**Abbildung 20:** SDS-PAGE-Analyse der NiNTA-Affinitätschromatographie. Es wurden 4  $\mu\text{L}$  des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu\text{L}$  der Proben aus dem Durchfluss (ft), Waschschritt (w), Elution (E). Das Zielprotein mit einer molekularen Masse von ca. 30 kDa wurde in den Elutionsfraktionen schwarz markiert.

Das Ergebnis der NiNTA-Affinitätschromatographie stellt sich als nahezu optimal dar. Im Durchfluss (ft) kann nur eine blasse Bande bei 30 kDa identifiziert werden (Abb. 20). Dies deutet darauf hin, dass der größte Teil des Zielproteins an die Matrix gebunden hat. Auch beim Waschschritt (w) wird das Zielprotein nicht heraus gespült. Problematisch sind jedoch die Elutionsfraktionen. Während im ersten Elutionsschritt (E1) nur das Zielprotein eluiert wird, zeigt das Bandenbild der zweiten Elutionsprobe (E2) Proteinfragmente mit anderen molekularen Massen (Abb. 20). Bei der Probe E2 handelt es sich um eine konzentrierte Probe von E1. Durch die höhere Konzentration werden mehrere Banden fremder Proteinkomplexe sichtbar. Um die Reinheit des Proteins zu erhöhen, wird eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Die Elutionsfraktion wird mittels Membranzentrifugation auf 1 mL konzentriert und über eine Probenschleife in das ÄKTA-System injiziert. Als stationäre Phase diente eine Superose 6 Increase 10/300 GL.

Die ersten Versuche fanden mit dem Gelfiltrationspuffer GqqA 1 (siehe Tabelle 8) bei Raumtemperatur statt (Abb. 21).



**Abbildung 21:** Chromatogramm der ÄKTA-Größenausschlusschromatographie. Auf der y-Achse wird die Absorption zwischen -50 und 600 in 50er Schritten in mAU dargestellt. Die x-Achse stellt die Retentionsvolumina von 14 bis 32 in mL dar. Zusätzlich sind auf der x-Achse die aufgefangenen Fraktionen angezeigt. Die blaue Linie zeigt die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm, während die rote Linie die Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm zeigt. Die überprüften Fraktionen C3, C4, C5, C6 und C7, sowie D14 sind grün markiert.

Das Chromatogramm zeigte zwar wie erwartet mehrere Peaks, diese werden jedoch nicht ausreichend voneinander getrennt. Gerade der größte Peak, welcher evtl. das Zielprotein darstellt, besitzt große Schultern, sodass hier auch Fremdproteine eluieren. Unter der Annahme, dass das Zielprotein in der höchsten Konzentration vorhanden ist, werden von den Fraktionen des größten Peaks (C3, C4, C5, C6, C7) Proben für die SDS-PAGE genommen. Auch der zweitgrößte Peak wurde über die Fraktion D14 untersucht (Abb. 22).

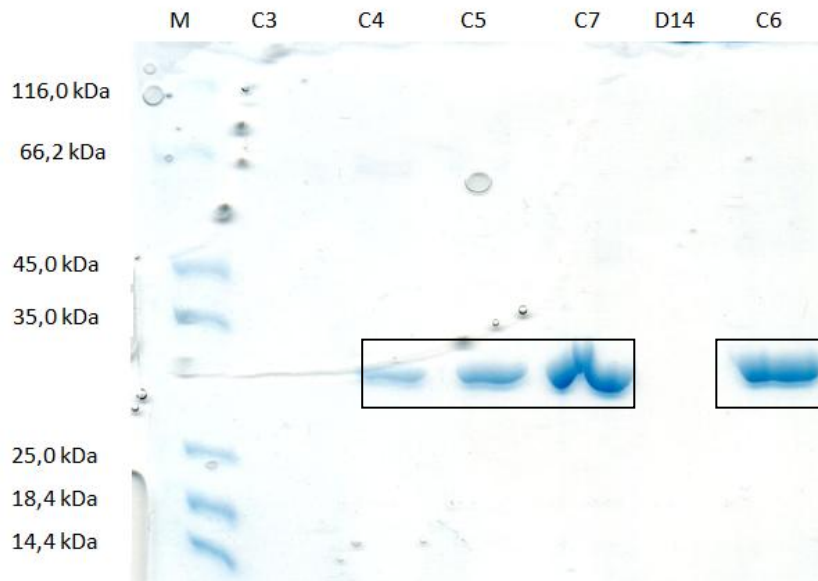


Abbildung 22: SDS-PAGE-Analyse der ÄKTA-Reinigung. Es wurden 4  $\mu\text{L}$  des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu\text{L}$  der Proben aus den Fraktionen der ÄKTA-Reinigung. Das Zielprotein (schwarz markiert) wurde in den Fraktionen C4, C5, C6 und C7 bei ca. 30 kDa identifiziert. In den Fraktionen C3 und D14 konnten keine Banden sichtbar gemacht werden.

Das Zielprotein (schwarz markiert) kann in den Fraktionen des größten Peaks bei ca. 30 kDa identifiziert werden. Die vordere Schulter des größten Peaks wird über die Fraktion C3 untersucht. Es wurden jedoch keine Banden sichtbar, was auf eine geringe Konzentration von Protein in dieser Fraktion hindeutet. Das gleiche Phänomen kann bei der Fraktion D14 entdeckt werden. Das Bandenbild der Fraktionen C4, C5, C6 und C7 deuten auf ein gereinigtes Zielprotein hin. Es sind keine fremden Proteinfragmente zu erkennen. Die Fraktionen werden zusammengeführt und auf eine Konzentration von ca.  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  konzentriert. Auffällig war, dass die Lösung sehr weit eingeeengt werden muss, um auf diese Konzentration zu gelangen. Das Zielprotein ist also nur in einer geringen Konzentration enthalten. Um die Stabilität des Proteins in Lösung zu überprüfen, wird die Methode der dynamischen Lichtstreuung verwendet. Hierfür wird 15  $\mu\text{L}$  der Proteinlösung luftblasenfrei in eine Quarzküvette pipettiert. Es wird eine Langzeitmessung von ca. 22 h durchgeführt. Doch schon nach 3 h kann ein enormer Anstieg der Polydispersität beobachtet werden (Abb. 23).

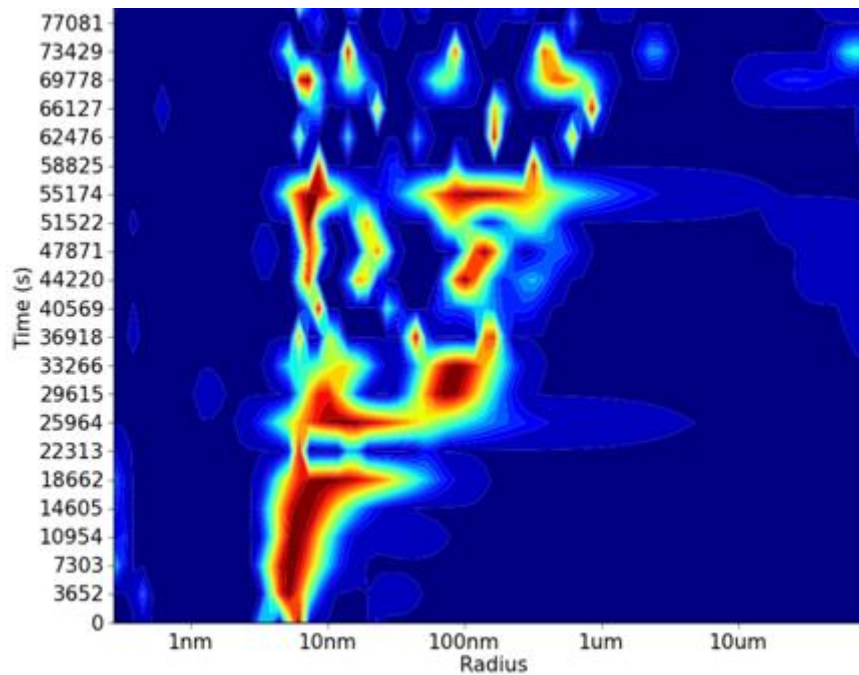


Abbildung 23: DLS-Messung für die Stabilitätsbetrachtung der Laktonase GqqA mit dem Gelfiltrationsspuffer GqqA 1. Auf der y-Achse ist die Dauer der Messung in Sekunden zu erkennen. Die x-Achse zeigt den hydrodynamischen Radius.

Aus den Messsignalen kann geschlossen werden, dass das Protein in dem benutzen Puffersystem nicht stabil vorliegt. Spätestens ab einer Dauer von 10000 s ist kein klarer hydrodynamischer Radius mehr zu erkennen. Möglicherweise haben sich Aggregate aus den Zielproteinen oder andere enthaltende Fremdproteine, die mit der SDS-PAGE nicht nachzuweisen waren, gebildet. Für eine Kristallisation wird monodisperses Protein benötigt, weshalb das Protein stabilisiert werden muss. Eine mögliche Ursache für die geringe Stabilität könnte der Elutionspuffer sein. Aus diesem Grund wird ein besser geeigneter Elutionspuffer gesucht. Dafür wird ein Puffer screening durchgeführt. Die verschiedenen Dialysepuffer sind in der Tabelle 9 aufgelistet. Mittels der dynamischen Lichtstreuung werden die Proteinlösungen auf ihre Stabilität hin überprüft (Abb. 24 und 25).

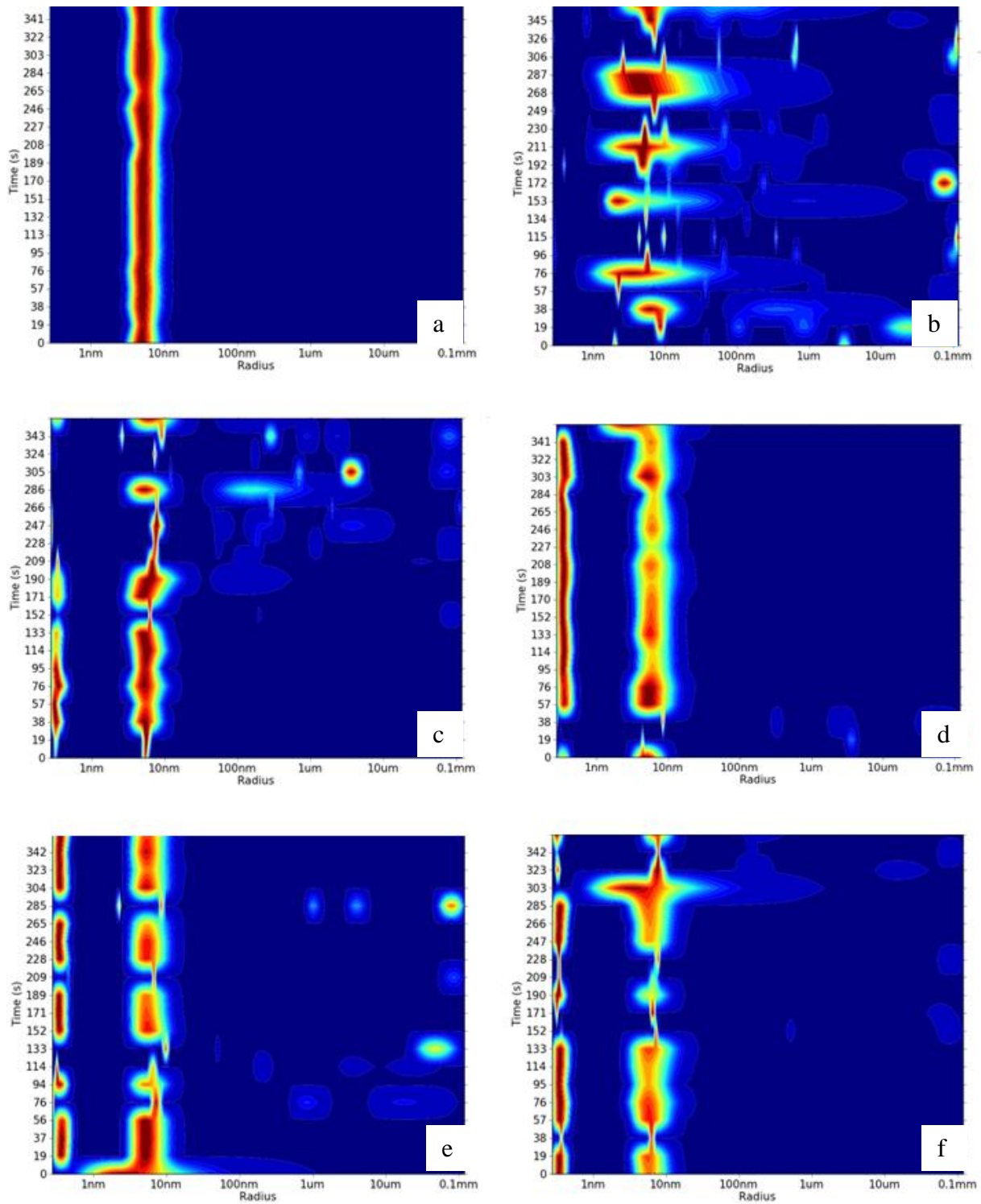


Abbildung 24: DLS-Messung für die Stabilitätskontrolle der Laktonase GqqA mit verschiedenen Puffersystemen. a: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 5,0; b: unbehandelte Kontrollprobe von GqqA; c: BisTris pH 6,5; d: HEPES pH 7,0; e: HEPES pH 7,5; f: HEPES pH 8,0; Auf der y-Achse ist die Dauer der Messung in Sekunden zu erkennen. Die x-Achse zeigt den hydrodynamischen Radius.

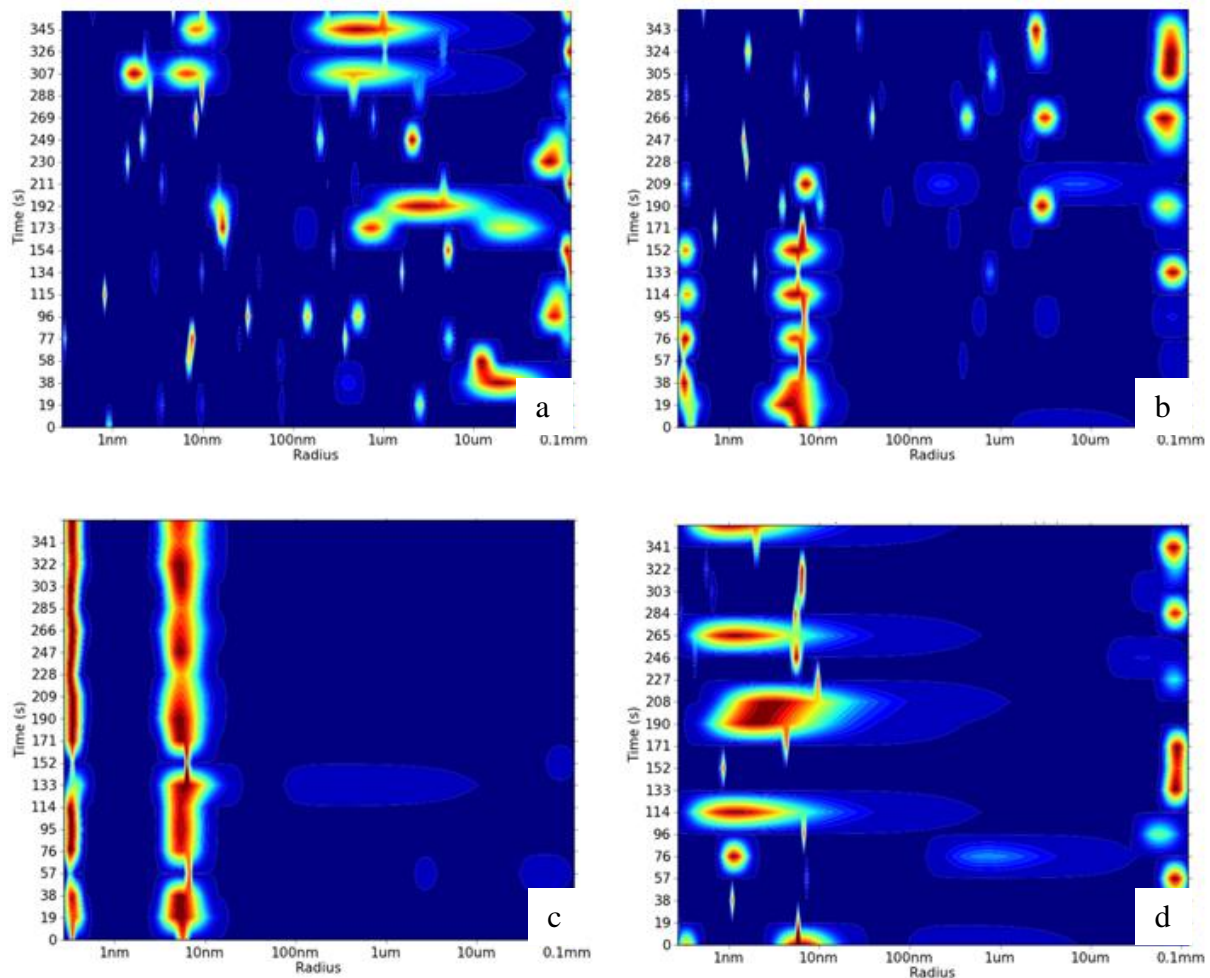


Abbildung 25: DLS-Messung für die Stabilitätskontrolle der Laktonase GqqA mit verschiedenen Puffersystemen. a:  $K_2HPO_4$  pH 6,0; b:  $K_2HPO_4$  pH 7,0; c: Natriumcitrat pH 4,7; d: Natriumcitrat pH 5,2; Auf der y-Achse ist die Dauer der Messung in Sekunden zu erkennen. Die x-Achse zeigt den hydrodynamischen Radius.

Das mit Abstand beste Ergebnis kann durch das Puffersystem  $K_2HPO_4$  pH 5,0 erzielt werden (Abb. 24, a). Dort ist der hydrodynamische Radius über die gesamte Messzeit stabil, was bedeutet, dass das Protein als monodisperse Lösung vorliegt. Bei den anderen Puffersystemen kommt es zu Aggregation, sodass das Protein in diesen vermutlich nicht stabil ist. Auffällig ist, die große Bedeutung des pH-Wertes des Puffersystems. Während bei dem Puffersystem  $K_2HPO_4$  pH 5,0 das Protein stabil bleibt, hat das gleiche Puffersystem mit dem pH-Wert 6,0 oder 7,0 (Abb. 25, a und b) keinen stabilisierenden Einfluss. Anhand dieser Ergebnisse wird der Gelfiltrationspuffer ausgewechselt. Für die folgenden Reinigungen wird der Gelfiltrationspuffer GqqA 2 (siehe Tabelle 8), welcher einen anderen pH-Wert besitzt, verwendet. Außerdem wurde die Gelfiltration im Folgenden bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde ein neuer Versuch der Reinigung begonnen. Von jedem Reinigungsschritt wurden Proben für die SDS-PAGE genommen (Abb. 26).

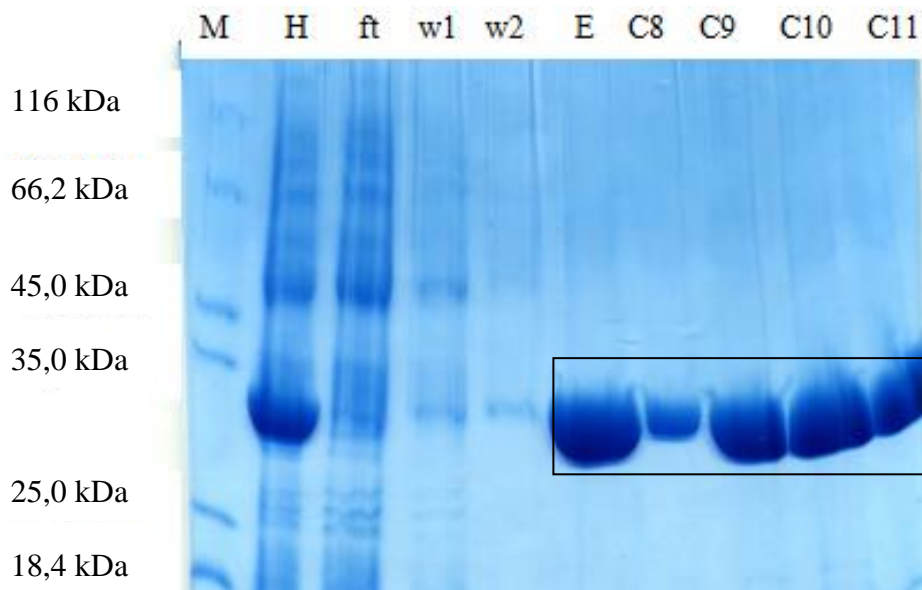


Abbildung 26: SDS-PAGE-Analyse der Hauptexpressionskultur (H), NiNTA-Affinitätschromatographie und der Fraktionen nach der ÄKTA-Größenausschlusschromatographie. Es wurden 4  $\mu\text{L}$  des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu\text{L}$  der Proben aus dem Durchfluss (ft), Waschschrift (w) und Elution (E), sowie aus den Fraktionen C8, C9, C10 und C11. Das Zielprotein mit einer molekularen Masse von ca. 30 kDa wurde in der Elution, sowie in den ÄKTA-Fraktionen schwarz markiert.

Die Probe der Hauptkultur bestätigt, dass das Zielprotein GqqA während der Expression gebildet wird. Die Proben des Durchflusses und der Waschschriffe zeigen, dass fremde Proteinfragmente nicht an die Matrix binden und leicht heraus gespült werden können. In der Elutionsfraktion ist nur eine Bande zu sehen, was auf eine funktionierende Reinigung hindeutet. Auch die Dicke der Bande deutet auf eine hohe Konzentration des Zielproteins hin. Im anschließenden Schritt wird die Elutionsfraktion auf 1 mL eingengt und über eine 1 mL Probenschleife in das ÄKTA-Gerät injiziert. Bei der Größenausschlusschromatographie wurde ein hoher Peak mit einer leichten Schulter erhalten (Abb.27).

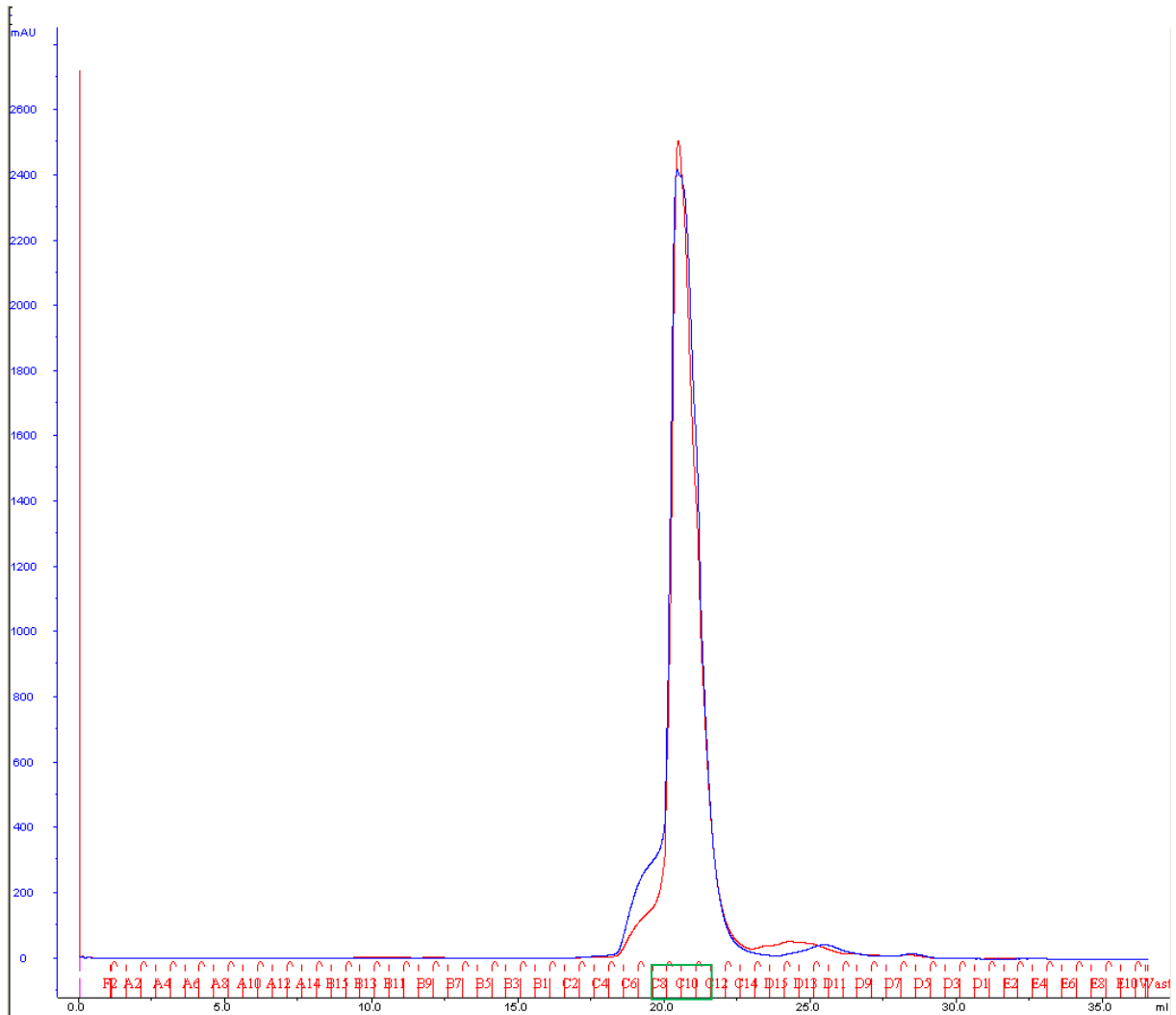
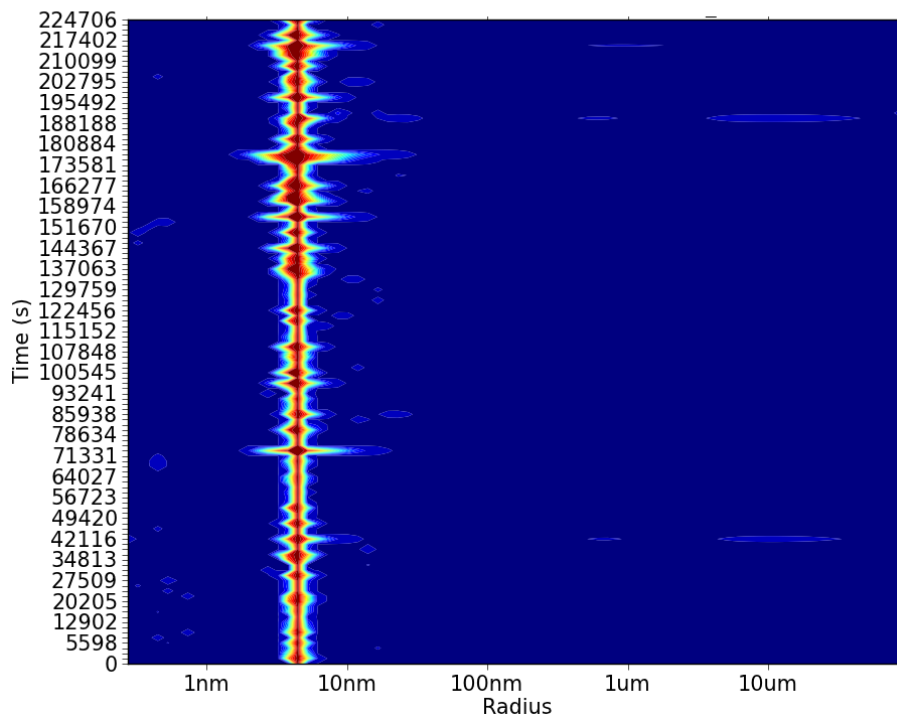


Abbildung 27: Chromatogramm der ÄKTA-Größenausschlusschromatographie. Auf der y-Achse wird die Absorption zwischen 0 und 2600 in 200er Schritten in mAU dargestellt. Die x-Achse stellt die Retentionsvolumina von 0 bis 35 in mL dar. Zusätzlich sind auf der x-Achse die aufgefangenen Fraktionen angezeigt. Die blaue Linie zeigt die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm, während die rote Linie die Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm zeigt. Die überprüften Fraktionen C8, C9, C10 und C11 sind grün markiert.

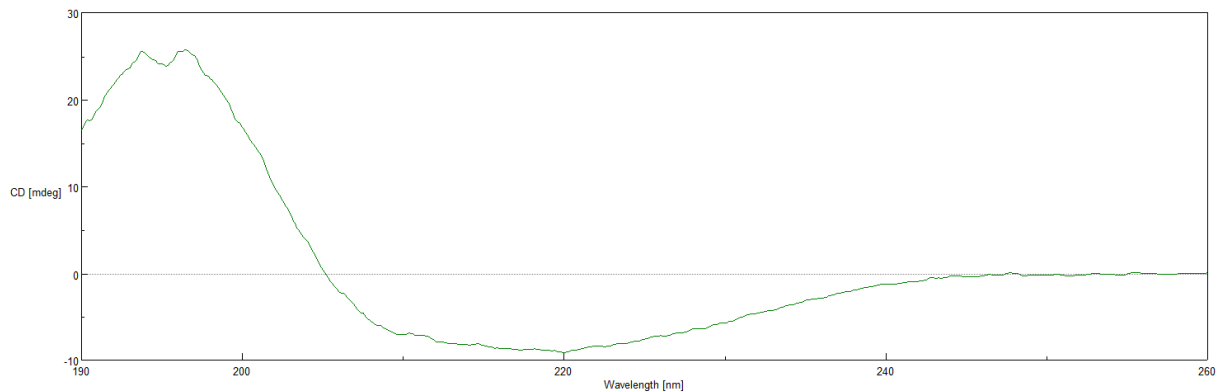
Das Senken der Temperatur von Raumtemperatur auf 4 °C, sowie die Auswechslung des Gelfiltrationspuffers brachten einen vollen Erfolg. Unter der Annahme, dass der größte Peak das Zielprotein darstellt, werden die Fraktionen C8, C9, C10 und C11 (grün markiert) mittels SDS-PAGE auf das Zielprotein hin analysiert (Abb. 26). Die Dicke der Banden (schwarz markiert) in den jeweiligen Fraktionen deutet auf eine hohe Konzentration des Zielproteins hin. Andere Banden, durch fremde Proteinfragmente, können nicht sichtbar gemacht werden. Die Fraktionen werden zusammengeführt und auf  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  konzentriert. Die Proteinlösung wird mittels dynamischer Lichtstreuung über 62 h auf ihre Stabilität hin überprüft (Abb. 28).





**Abbildung 28: DLS-Messung für die Stabilitätsbetrachtung der Laktonase GqqA mit dem Gelfiltrationspuffer GqqA 2. Auf der y-Achse ist die Dauer der Messung in Sekunden zu erkennen. Die x-Achse zeigt den hydrodynamischen Radius.**

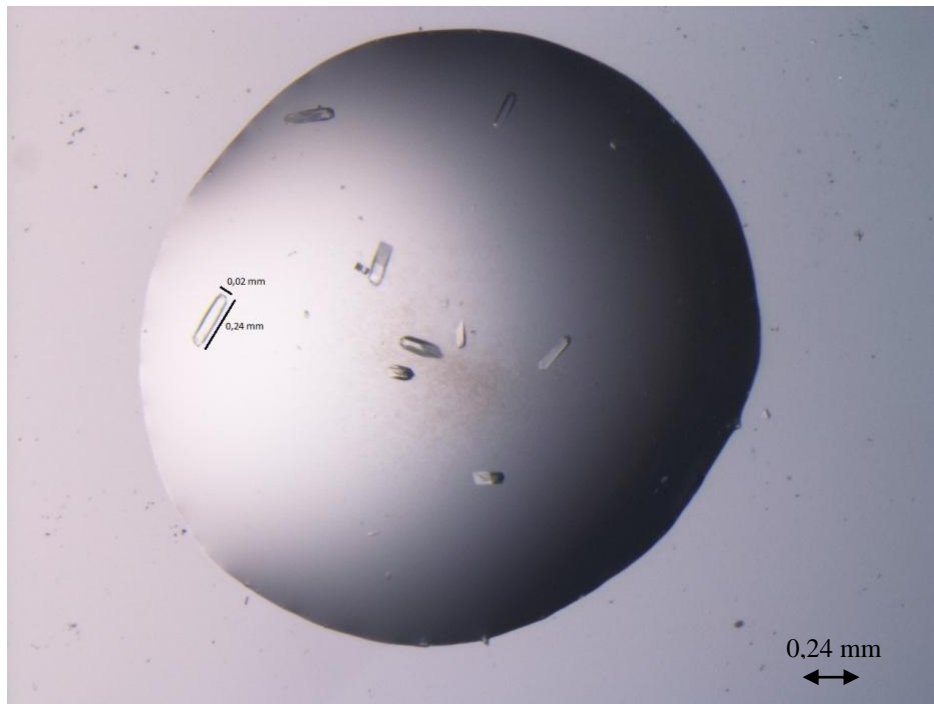
Die Optimierung des Puffersystems erhöht die Stabilität des Proteins in der Lösung deutlich. Es kann eine dünne Messlinie beim Radius, mit nur leichter Fragmentbildung, beobachtet werden. Die DLS-Software kann mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion einen durchschnittlichen hydrodynamischen Radius von 4,5 nm errechnen. Das Ergebnis deutet auf eine stabile und monodisperse Proteinlösung hin. Zur weiteren strukturellen Untersuchung des Proteins werden CD-spektroskopische Messungen durchgeführt. Die Proteinkonzentration beträgt hierfür  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Es werden 10 Proteinspektren über einen Wellenlängenbereich von 190-260 nm aufgenommen und akkumuliert. Zusätzlich werden vom korrespondierenden Messpuffer je fünf Spektren aufgenommen und anschließend vom Proteinsignal subtrahiert. Die CD-Messungen kann einen gefalteten Zustand des gereinigten Proteins verifizieren (Abb. 29).



**Abbildung 29:** CD-spektroskopische Untersuchung nach erfolgreicher Reinigung von GqqA. Die y-Achse gibt die molare Elliptizität pro Aminosäurerest in  $\text{mdeg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$  an. Die x-Achse zeigt die Wellenlänge von 190-260 nm in einem Abstand von 20 nm. Das Spektrum zeigt ein Maximum bei 195 nm. Außerdem sind ein Nulldurchgang bei 205 nm und ein Minimum bei 220 nm zu erkennen.

Eine Sekundärstrukturvorhersage nach dem Algorithmus von Yang gibt einen  $\alpha$ -helikalen Anteil von 70,6 % vor, während 0 % als  $\beta$ -Faltblattstruktur vorliegen. Die restlichen 29,4 % werden den Turnstrukturen zugeordnet. Diese Werte passen jedoch nicht mit anderen Strukturvorhersagen, wie z.B. vom Internetprogramm DichroWeb, überein. Die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung und der CD-Spektroskopie zeigen, dass das Protein in einem gefalteten Zustand in einer monodispersen Lösung vorliegt. Dies bildet die Voraussetzung für weitere Untersuchungen, wie zum Beispiel die Proteinkristallisation.

Aus vorangegangenen Screeningversuchen, die mit Hilfe des Pipettierroboters Honeybee 961 (Genomic Solutions, USA) unter der Verwendung von kommerziellen Kristallisations-Screens in 96-Well sitting-drop-Platten angesetzt wurden, konnte eine initiale Bedingung für die Kristallisation gefunden werden. Hierbei wurde die Dampfdiffusions-Methode angewendet. Das beste Ergebnis brachte hierbei 0,8 M Natriumsuccinat pH 7. Dieser Präzipitant wird mit Variierung der Molarität oder des pH-Wertes in Hanging-drop-Platten weiter untersucht. Die Screeningbedingungen kann auf 0,55 M – 0,68 M Natriumsuccinat verfeinert werden. Die zugehörigen pH-Werte belaufen sich in einem Bereich von 5-7. Eine erste größere Kristallbildung kann mit der Bedingung 0,65 M Natriumsuccinat pH 6 erreicht werden (Abb. 30). Hierbei beträgt die Proteinkonzentration  $5,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Außerdem wird die Platte bei Raumtemperatur gelagert.



**Abbildung 30:** Lichtmikroskopische Aufnahme des Kristallisationsansatzes von GqqA. Mit dem Präzipitant 0,65 M Natriumsuccinat pH 6,0 und einer Temperatur von 18 °C können erste Kristalle erhalten werden. Der schwarz markierte Kristall misst eine Größe von 0,02 mm x 0,24 mm.

Auch wenn der Kristall auf dem ersten Blick optimal aussieht, stellen sich bei weiteren Untersuchungen mit der Röntgenstrukturanalyse heraus, dass er von minderer Qualität ist. Aus den erhaltenen Datensätzen kann keine Struktur ermittelt werden. Aus diesem Grund ist eine weitere Optimierung der Kristallisationsbedingung nötig. Dafür wird das Protein auf  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  konzentriert und die Platten bei Raumtemperatur gelagert. Die Kristalle sind jedoch alle sehr verwachsen und weisen keine scharfen Kanten auf (Abb. 31). Für eine Röntgenanalyse sind sie damit unbrauchbar.

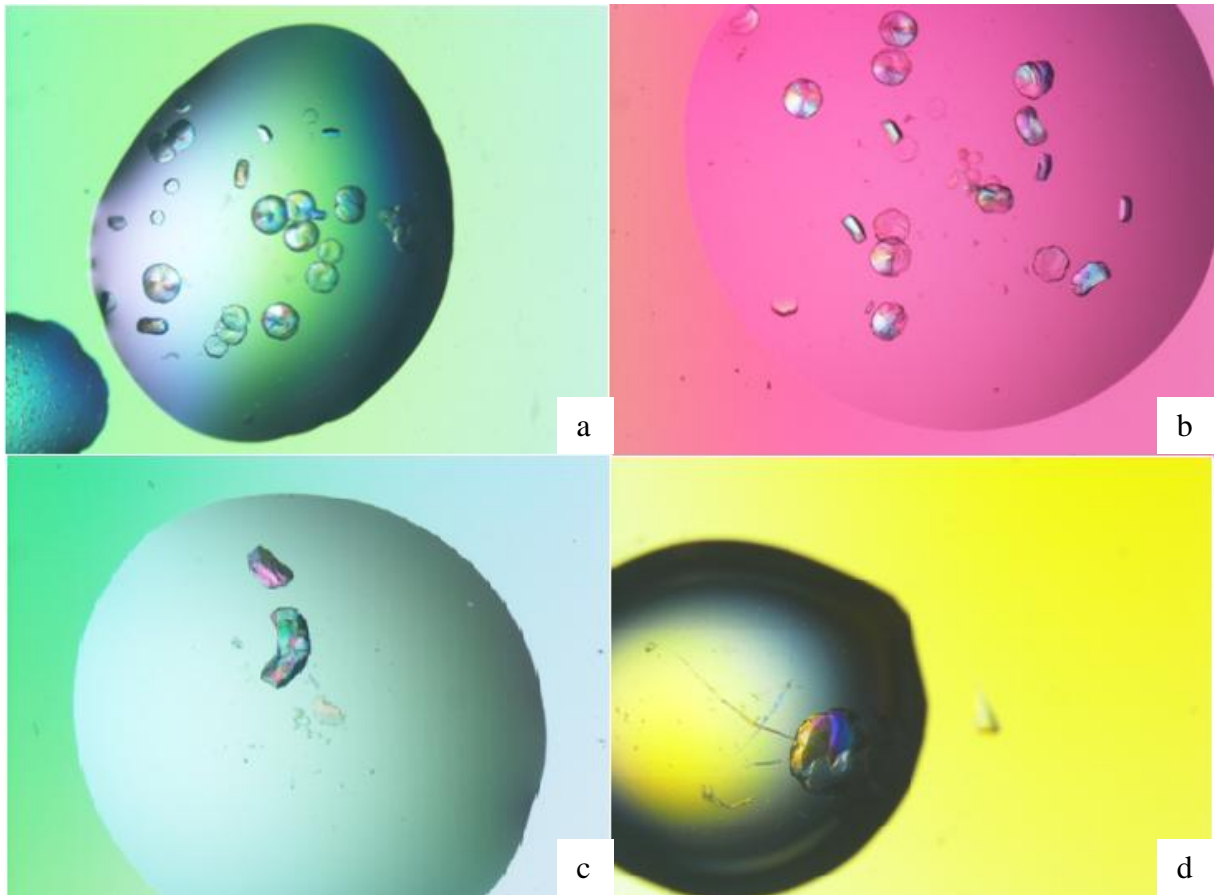
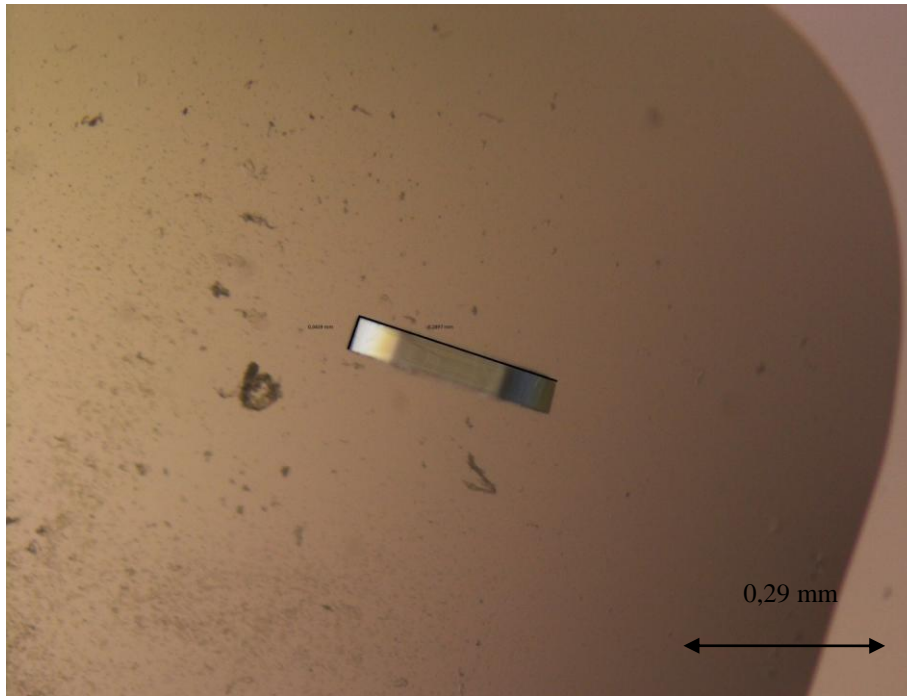


Abbildung 31: Lichtmikroskopische Abbildungen von Kristallisationsansätzen von GqqA. a: 0,64 M Na-Succinat pH 6; b: 0,65 M Na-Succinat pH 6; c: 0,67 M Na-Succinat pH 6,5; d: 0,68 M Na-Succinat pH 6,5

Nach weiterer Optimierung der Kristallisation können Kristalle erhalten werden, die für eine Messung mittels Röntgenstrahlen optimal erscheinen. Die Kristallisationsbedingungen sind hierbei 0,66 M Natriumsuccinat mit einem pH-Wert von 7 (Abb. 32). Außerdem wird die Proteinlösung auf  $10,7 \text{ mg mL}^{-1}$  konzentriert und die Platte bei Raumtemperatur für eine Woche gelagert.



**Abbildung 32: Lichtmikroskopische Aufnahme des Kristallisationsansatzes von GqqA. Mit dem Präzipitant 0,66 M Natriumsuccinat pH 7,0 und einer Temperatur von 20 °C konnte ein gut definierter Einkristall produziert werden. Der schwarz markierte Kristall misst eine Größe von 0,0439 mm x 0,2897 mm.**

Dieser Kristall zeigt scharfe Kanten und eine optimale Größe um ihn mittels Röntgenanalyse zu untersuchen. Gute Ergebnisse sind dadurch zwar nicht garantiert, werden jedoch sehr wahrscheinlich. Dies konnte aber nicht mehr während dieser Arbeit durchgeführt werden.

## 4. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurden unterschiedliche Vorgehensweisen für die Expression und Reinigung der Laktonasen GqqA und QsdR1 getestet. Weiterhin wurden Ansätze für eine folgende Proteinkristallisation gesucht, welche für eine Struktur-Funktionsanalyse benötigt wird.

Das Bearbeiten der Laktonase QsdR1 stellte sich dabei als schwierig heraus. QsdR1 konnte zwar erfolgreich mittels pET21a(+)-Plasmid in den *E. coli* BL21 (DE3)-Expressionsstamm transformiert werden, wurde jedoch bei einer anschließenden Expression nur in geringen Mengen produziert. Unterschiedliche IPTG Konzentrationen beim Induzieren der Expressionskulturen brachten kein besseres Ergebnis. Eine Reinigung mit diesen niedrigen Mengen an Zielprotein führte zu keinem Erfolg.

Die Produktion und Reinigung der Laktonase GqqA war erfolgreicher. Das GqqA-codierende pET21a(+)-Plasmid konnte erfolgreich in den *E. coli* BL21 (DE3)-Expressionsstamm transformiert werden. Die Expression mit diesem Vektor stellte, durch den C-terminalen 6xHis-tag, für die anschließende Reinigung mittels NiNTA-Matrix einen großen Vorteil dar. Durch einen weiteren Reinigungsschritt mittels der ÄKTA-Größenausschlusschromatographie mit einem  $K_2HPO_4$ -Elutionspuffer pH 5,0 konnte die Laktonase in einer hohen Konzentration über einen Zeitraum von mindestens 60 h ohne signifikanten Stabilitätsverlust gelagert werden. Desweiteren konnten Kristallisationsbedingungen gefunden werden, welche geeignete Kristalle für eine anschließende Strukturanalyse hervorbrachten.

Mit einem Blick auf die Ergebnisse dieser Arbeit wird aber auch deutlich, dass einige Vorgehen in Zukunft weiter optimiert werden können. Gerade bei der Laktonase QsdR1 muss der Schritt der Expression hinterfragt werden. Möglicherweise liefern andere Expressionsparameter oder ein anderer Expressionsstamm bessere Ergebnisse.

Bei der Laktonase GqqA bedarf es nur noch geringer Optimierung bei der Kristallisation. Hierbei könnten bei der Proteinkristallisation einzelne Parameter weiter untersucht werden. Daraus könnten optimalere Kristalle mit regelmäßiger Form und scharfen Kanten entstehen, welche zu besseren Ergebnissen bei der Röntgenanalyse führen könnten.

### III. Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Vorkommen und Struktur wichtiger Signalmoleküle in Bakterien. Die Struktur der Gram-positiven Peptide ist durch die Abfolge der Aminosäuren dargestellt. CSF: competence and sporulation factor; CSP: competence-stimulating peptide; Quelle: [11]

**Abbildung 2:** Zelldichte-abhängige QS-Regulation der Lumineszenz bei *Vibrio fischeri*. A: Durch eine geringe Konzentration des Signalmoleküls werden die Lumineszenz-Gene luxCDABE nur schwach transkribiert. B: Bei einer hohen Konzentration des Signalmoleküls wird ein Schwellenwert-Konzentration erreicht. Die Signalmoleküle binden an das luxR. Die gesteigerte Transkription der luxCDABE-Gene führt zur Lichtemission. Quelle: [http://3.bp.blogspot.com/-](http://3.bp.blogspot.com/-XdfgazUiVbg/TdJwXLoGjTI/AAAAAAAAABXo/rM3wHesPFHc/s1600/lux-vibrio-quorum.gif)

[XdfgazUiVbg/TdJwXLoGjTI/AAAAAAAAABXo/rM3wHesPFHc/s1600/lux-vibrio-quorum.gif](http://3.bp.blogspot.com/-XdfgazUiVbg/TdJwXLoGjTI/AAAAAAAAABXo/rM3wHesPFHc/s1600/lux-vibrio-quorum.gif)

**Abbildung 3:** Allgemeines QS-Modell für Gram-positive Bakterien. Aus einem synthetisierten Signalpeptid-Vorläufer-Protein wird das Signalpeptid (Braun) geschnitten. Dieses wird über einen ABC-Transporter (Grau) aus der Zelle transportiert. Bei einer hohen Konzentration des Signalpeptids wird dieses von einer Histidin-Sensorkinase detektiert. Die Sensor-Kinase autophosphoryliert einen Histidinrest (H), die Phosphatgruppe (P) wird an einen Arspartatrest (D) eines Antwort-Regulators übertragen. Dieser aktiviert die Transkription der Zielgene. Quelle: [9]

**Abbildung 4:** A: Die Grundstruktur eines Acylhomoserinlaktons und die dazugehörigen möglichen Schnittstellen für Enzyme. B: Spaltungsmechanismen der Laktonasen und Acylasen. Laktonasen öffnen den Laktonring, sodass Acyl-Homoserin (Acyl-HS) als Spaltprodukt entsteht. Acylasen hydrolysieren die Peptidbindung. So wird das AHL in seine Bestandteile zerlegt. Es entstehen ein Homoserinlakton (HSL) und eine Fettsäure. Quelle [30], verändert

**Abbildung 5:** Struktur des aktiven Zentrums einer Metallo- $\beta$ -Laktamase-ähnlichen Laktonase, produziert von verschiedenen *Bacillus*-Spezies. Im Zentrum befindet sich eine zweikernige Zink-Bindungsstelle. Das Zn1 (Links) wird von fünf Aminosäureresten Histidin 104, 106 und 169, sowie das gemeinsam gebundene Hydroxidion und Aspartat 191 koordiniert. Das Zn2 (Rechts) ist ebenfalls fünffach koordiniert. Neben dem Hydroxidion und Aspartat 191 sind Histidin 109 und 235, sowie Aspartat 108 an der Koordination beteiligt. Quelle: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bi050050m>

**Abbildung 6:** Chemischer Mechanismus der Metallo- $\beta$ -Laktamase-ähnlichen Laktonase AiiA. Eine zweikernige Zinkion-Gruppe an der aktiven Bindungsstelle benutzt beide Zinkionen für die Katalyse der hydrolytischen Spaltung des Laktonrings. Quelle: [28]

**Abbildung 7:** Berechnetes Modell der Laktonase QsdR1. Ein Pfeil stellt ein  $\beta$ -Faltblatt dar, während eine Helix eine  $\alpha$ -Helix abbildet. Programm: Swiss Model; Quelle: <https://swissmodel.expasy.org/>

**Abbildung 8:** Berechnetes Modell der Laktonase GqqA. Ein Pfeil stellt ein  $\beta$ -Faltblatt dar, während eine Helix eine  $\alpha$ -Helix abbildet. Programm: Swiss Model; Quelle: <https://swissmodel.expasy.org/>

**Abbildung 9:** Vektorkarte des 5443 bp langen pET21a(+)-Plasmids. Quelle: [https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET\\_vectors/pET-21a-d\\_MAP.pdf](https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-21a-d_MAP.pdf)

**Abbildung 10:** Expressionssystem des Bakterienstammes *E.coli* BL21 (DE3). Quelle: <https://qph.ec.quoracdn.net/main-qimg-c275a89fe194771430d810cec3c504da>

**Abbildung 11:** Strukturen von Imidazol und Histidin. Der Imidazolring und die Histidinseitenkette sind strukturell sehr ähnlich und konkurrieren damit stark um die

Bindungsstelle am Nickel. Quelle:  
[http://2015.igem.org/Team:Freiburg/Project/Protein\\_Purification](http://2015.igem.org/Team:Freiburg/Project/Protein_Purification)

**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Hanging-drop-Methode: Über einer Reservoirlösung hängt ein Tropfen aus Protein- und Präzipitantlösung an einem Deckglas. Durch Diffusion steigt die Proteinkonzentration im Tropfen an, bis sich Kristalle bilden können.

Quelle:<http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/m230d/Crystallization/tipsandtricks.html>

**Abbildung 13:** Phasendiagramm der Proteinkristallisation: Die Kristallisation hängt von den Konzentrationen des Proteins und Präzipitants ab. Nur im gesättigten Bereich ist eine Kristallbildung möglich. Quelle: Asherie N., "Protein crystallization and phase diagrams", Science Direct, Methods 34 266-272 (2004)

**Abbildung 14:** SDS-PAGE-Analyse der Vorkulturproben. Es wurden 4  $\mu$ L des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu$ L der Proben aus den Vorkulturen (V). Das Zielprotein ist schwarz markiert.

**Abbildung 15:** SDS-PAGE-Analyse der Hauptkulturen. Es wurden 4  $\mu$ L des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu$ L der Proben aus den Hauptkulturen (H). Die Banden des Zielproteins sind schwarz markiert. Andere Proteinfragmente bei 45 kDa sind grün markiert.

**Abbildung 16:** SDS-PAGE-Analyse der NiNTA- und ÄKTA-Reinigung. Es wurden 4  $\mu$ L des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 10  $\mu$ L der Proben aus dem Durchfluss (ft), Waschschrift (w), Elution (E), sowie den Fraktionen aus der ÄKTA-Reinigung (B und C). Das Zielprotein im Durchfluss und Waschschrift 1 wurde schwarz markiert. Grün markierte Banden stellen das Zielprotein und ein anderes Proteinfragment in der Elutionsfraktion dar. Die gelb markierten Banden sind das falsche Proteinfragment nach der ÄKTA-Reinigung aus den Fraktionen C4, C5 und C6.

**Abbildung 17:** Chromatogramm der ÄKTA-Größenausschlusschromatographie. Auf der y-Achse wird die Absorption zwischen 0 und 1600 in 200er Schritten in mAU dargestellt. Die x-Achse stellt die Retentionsvolumina von 0 bis 35 in mL dar. Zusätzlich sind auf der x-Achse die aufgefangenen Fraktionen angezeigt. Die blaue Linie zeigt die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm, während die rote Linie die Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm zeigt. Die überprüften Fraktionen B1, C4, C5, C6 und C9 sind grün markiert.

**Abbildung 18:** SDS-PAGE-Analyse der Vorkulturen mit unterschiedlichen Induktionskonzentrationen. Es wurden 4  $\mu$ L des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu$ L der Proben aus den Vorkulturen. In die verschiedenen Vorkulturen wurde IPTG induziert welches eine Endkonzentration von 1 mM, 0,5 mM und 0,1 mM besaß.

**Abbildung 19:** SDS-PAGE-Analyse der Hauptkulturen. Es wurden 4  $\mu$ L des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu$ L der Proben aus den Hauptkulturen (GqqA<sub>1</sub> und GqqA<sub>2</sub>). Das Zielprotein ist schwarz markiert.

**Abbildung 20:** SDS-PAGE-Analyse der NiNTA-Affinitätschromatographie. Es wurden 4  $\mu$ L des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu$ L der Proben aus dem Durchfluss (ft), Waschschrift (w), Elution (E). Das Zielprotein mit einer molekularen Masse von ca. 30 kDa wurde in den Elutionsfraktionen schwarz markiert.

**Abbildung 21:** Chromatogramm der ÄKTA-Größenausschlusschromatographie. Auf der y-Achse wird die Absorption zwischen -50 und 600 in 50er Schritten in mAU dargestellt. Die x-Achse stellt die Retentionsvolumina von 14 bis 32 in mL dar. Zusätzlich sind auf der x-Achse die aufgefangenen Fraktionen angezeigt. Die blaue Linie zeigt die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm, während die rote Linie die Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm zeigt. Die überprüften Fraktionen C3, C4, C5, C6 und C7, sowie D14 sind grün markiert.



**Abbildung 22:** SDS-PAGE-Analyse der ÄKTA-Reinigung. Es wurden 4  $\mu\text{L}$  des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu\text{L}$  der Proben aus den Fraktionen der ÄKTA-Reinigung. Das Zielprotein (schwarz markiert) wurde in den Fraktionen C4, C5, C6 und C7 bei ca. 30 kDa identifiziert. In den Fraktionen C3 und D14 konnten keine Banden sichtbar gemacht werden.

**Abbildung 23:** DLS-Messung für die Stabilitätsbetrachtung der Laktonase GqqA mit dem Gelfiltrationsspuffer GqqA 1. Auf der y-Achse ist die Dauer der Messung in Sekunden zu erkennen. Die x-Achse zeigt den hydrodynamischen Radius.

**Abbildung 24:** DLS-Messung für die Stabilitätskontrolle der Laktonase GqqA mit verschiedenen Puffersystemen. a:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 5,0; b: unbehandelte Kontrollprobe von GqqA; c: BisTris pH 6,5; d: HEPES pH 7,0; e: HEPES pH 7,5; f: HEPES pH 8,0; Auf der y-Achse ist die Dauer der Messung in Sekunden zu erkennen. Die x-Achse zeigt den hydrodynamischen Radius.

**Abbildung 25:** DLS-Messung für die Stabilitätskontrolle der Laktonase GqqA mit verschiedenen Puffersystemen. a:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 6,0; b:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7,0; c: Natriumcitrat pH 4,7; d: Natriumcitrat pH 5,2; Auf der y-Achse ist die Dauer der Messung in Sekunden zu erkennen. Die x-Achse zeigt den hydrodynamischen Radius.

**Abbildung 26:** SDS-PAGE-Analyse der Hauptexpressionskultur (H), NiNTA-Affinitätschromatographie und der Fraktionen nach der ÄKTA-Größenausschlusschromatographie. Es wurden 4  $\mu\text{L}$  des Markers (M) aufgetragen, sowie jeweils 20  $\mu\text{L}$  der Proben aus dem Durchfluss (ft), Waschschrift (w) und Elution (E), sowie aus den Fraktionen C8, C9, C10 und C11. Das Zielprotein mit einer molekularen Masse von ca. 30 kDa wurde in der Elution, sowie in den ÄKTA-Fraktionen schwarz markiert.

**Abbildung 27:** Chromatogramm der ÄKTA-Größenausschlusschromatographie. Auf der y-Achse wird die Absorption zwischen 0 und 2600 in 200er Schritten in mAU dargestellt. Die x-Achse stellt die Retentionsvolumina von 0 bis 35 in mL dar. Zusätzlich sind auf der x-Achse die aufgefangenen Fraktionen angezeigt. Die blaue Linie zeigt die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm, während die rote Linie die Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm zeigt. Die überprüften Fraktionen C8, C9, C10 und C11 sind grün markiert.

**Abbildung 28:** DLS-Messung für die Stabilitätsbetrachtung der Laktonase GqqA mit dem Gelfiltrationsspuffer GqqA 2. Auf der y-Achse ist die Dauer der Messung in Sekunden zu erkennen. Die x-Achse zeigt den hydrodynamischen Radius.

**Abbildung 29:** CD-spektroskopische Untersuchung nach erfolgreicher Reinigung von GqqA. Die y-Achse gibt die molare Elliptizität pro Aminosäurerest in  $\text{mdeg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$  an. Die x-Achse zeigt die Wellenlänge von 190-260 nm in einem Abstand von 20 nm. Das Spektrum zeigt ein Maximum bei 195 nm. Außerdem sind ein Nulldurchgang bei 205 nm und ein Minimum bei 220 nm zu erkennen.

**Abbildung 30:** Lichtmikroskopische Aufnahme des Kristallisationsansatzes von GqqA. Mit dem Präzipitant 0,65 M Natriumsuccinat pH 6,0 und einer Temperatur von 18 °C können erste Kristalle erhalten werden. Der schwarz markierte Kristall misst eine Größe von 0,02 mm x 0,24 mm.

**Abbildung 31:** Lichtmikroskopische Abbildungen von Kristallisationsansätzen von GqqA. a: 0,64 M Na-Succinat pH 6; b: 0,65 M Na-Succinat pH 6; c: 0,67 M Na-Succinat pH 6,5; d: 0,68 M Na-Succinat pH 6,5

**Abbildung 32:** Lichtmikroskopische Aufnahme des Kristallisationsansatzes von GqqA. Mit dem Präzipitant 0,66 M Natriumsuccinat pH 7,0 und einer Temperatur von 20 °C konnte ein gut definierter Einkristall produziert werden. Der schwarz markierte Kristall misst eine Größe von 0,0439 mm x 0,2897 mm.

## IV. Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Verwendete Chemikalien .....                                       | 13 |
| Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme, deren Genotyp und Referenz.....        | 14 |
| Tabelle 3: Verwendeter Plasmidvektor zur Expression .....                     | 15 |
| Tabelle 4: Verwendete Nährmedien zur Kultivierung von <i>E.coli</i> .....     | 15 |
| Tabelle 5: Eingesetzte Antibiotika-Stammlösung .....                          | 15 |
| Tabelle 6: Eingesetzte Induktor-Stammlösung .....                             | 16 |
| Tabelle 7: Verwendete Matrix für die Affinitätschromatographie .....          | 16 |
| Tabelle 8: Puffer und Lösungen für Zellaufschlüsse und Proteinreinigung ..... | 16 |
| Tabelle 9: Verwendete Puffer für das Puffer-Screening .....                   | 17 |
| Tabelle 10: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE .....                        | 18 |
| Tabelle 11: Verwendete Geräte .....   | 19 |

## V. Literaturverzeichnis

- [1] Doudoroff M. Studies on the Luminous Bacteria: I. Nutritional Requirements of Some Species, with Special Reference to Methionine. *J Bacteriology* 44: 451-459 (1942)
- [2] Tomasz A. Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature* 208: 155-159 (1965)
- [3] Pestova E. V., Havarstein L. S., Morrison D. A. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiology* 21: 853-862 (1996)
- [4] Nealson K.H., Platt T., Hastings J.W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriology* 104: 313-322 (1970)
- [5] Gambello M.J., Iglewski B.H. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriology* 173: 3000-3009 (1991)
- [6] Fuqua W. C., Winans S. C., Greenberg E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriology* 176: 269-275 (1994)
- [7] Keller L., Surette M. G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiology* 4: 249-258 (2006)
- [8] Ng W. L., Bassler B. L. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review Genetic* 43: 197-222 (2009)
- [9] Miller M. B., Bassler B. L. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* Vol. 55: 165-199 (2001)
- [10] Xavier K. B., Bassler B. L. LuxS Quorum sensing: more than just a numbers game. *Current opinion in microbiology* Vol.6 No 2: 191-197 (2003)
- [11] Rundgespräche Forum Ökologie, Bd. 45 »Die Sprache der Moleküle – Chemische Kommunikation in der Natur«, S. 117-128. (2016) Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München
- [12] Sperandio V., Torres A. G., Kaper J. B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Molecular Microbiology* Vol. 43 No 3: 809-821 (2003)

- [13] Kumari A., Pasini P., Deo S. K., Flomenhoft D., Shashidhar H., Daunert S. Biosensing systems for the detection of bacterial quorum signaling molecules. *Annual Review Chem.* 78: 7603-7609 (2006)
- [14] Boettcher K.J., Ruby E.G. Detection and quantification of *Vibrio fischeri* autoinducer from symbiotic squid light organs. *J Bacteriology* 177: 1053-1058 (1995)
- [15] Lee K.H., Ruby E.G. Detection of the Light Organ Symbiont, *Vibrio fischeri*, in Hawaiian Seawater by using lux Gene Probes. *Applied Environmental Microbiology* 58: 942-947 (1992)
- [16] Eberhard A., Burlingame A.L., Eberhard C., Kenyon G.L., Nealson K.H., Oppenheimer N.J. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20: 2444-2449 (1981)
- [17] Taga M., Bassler B. Chemical communication among bacteria. *PNAS* Vol. 100: 14549-14545 (2003)
- [18] Bassler B. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* 2:582–587 (1999)
- [19] Zhang L.H. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci* 8(5):238-244 (2003)
- [20] Svenningsen S. L., Waters C. M., Bassler B. L. A negative feedback loop involving small RNAs accelerates *Vibrio cholerae*'s transition out of quorum-sensing mode. *Genes and Development* Vol. 22 No 2: 226-238 (2008)
- [21] Dong Y. H., Zhang L. H. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiology* 43: 101-109 (2005)
- [22] Huang J. J., Han J. I., Zhang L. H., Leadbetter J. R. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied Environmental Microbiology* 69: 5941-5949 (2003)
- [23] Lin Y. H., Xu J. L., Hu J., Wang L. H., Ong S. L., Leadbetter J. R., Zhang L. H. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiology* 47: 849-860 (2003)
- [24] Dong Y. H., J. L. Xu, X. Z. Li, L. H. Zhang AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Science* 97: 3526-3531 (2000)

- [25] Haudecoeur E., M. Tannieres, A. Cirou, A. Raffoux, Y. Dessaux, D. Faure Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 529-537 (2009)
- [26] Momb J., Wang C., Liu D., Thomas P. W., Petsko G. A., Guo H., Ringe D, Fast W. Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 2. Substrate modeling and active site mutations *Biochemistry*. 47 (29): 7715–7725 (2008)
- [27] Thomas P. W., Stone E. M., Costello A. L., Tierney D. L., Fast W. The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein. *Biochemistry*. 44 (20): 7559–7569 (2005)
- [28] Walter F., P. A. Tipton The enzymes of bacterial census and censorship. *Trends in Biochemical Sciences*, 37,1 (2012)
- [29] D. Krysiak, C. Schmeisser, S. Preuß, J. Riethausen, M. Quitschau, S. Grond, and W. R. Streit Involvement of Multiple Loci in Quorum Quenching of Autoinducer I Molecules in the Nitrogen-Fixing Symbiont *Rhizobium (Sinorhizobium)* sp. Strain NGR234, *Applied and Environmental Microbiology* p. 5089–5099 (2011)
- [30] M. J. Valera, A. Más GqqA, a novel protein in *Komagataeibacter europaeus* involved in bacterial quorum quenching and cellulose formation *Microbial cell factories* 15: 88 (2016)
- [31] Geerlof A., Brown J., Coutard B., Egloff M. P., Enguita F. J., Fogg M. J., Gilbert R. J. C. Groves M. R., Haouz A., Nettleship J. E., Nordlund P., Owens R. J., Ruff M., Sainsbury S., Svergun D. I., Wilmanns M. The impact of protein characterization in structural proteomics, *Acta Crystallographica Section D* Vol. 62, p. 1125-1136 (2006)
- [32] Transformation in Bornscheuer U., Streit W. (Hrsg.): *RÖMPP Online : Biotechnologie und Gentechnik*. Version 3.72. Stuttgart : Georg Thieme Verlag (2017)
- [33] Mandel M., Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecularbiology* 53 Nr. 1, S. 159–162 (1970)
- [34] Bimboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA *Nucleic Acids Research* 7 Nr. 6, S. 1513–1523 (1979)
- [35] Kuzmine I., Martin C. T. Pre-steady-state kinetics of initiation of transcription by T7 RNA polymerase: A new kinetic model *Journal of molecularbiology* 305 Nr. 3, S. 559–566 (2001)
- [36] Pa S., Malcolm B. A. Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). *BioTechniques* 29 Nr. 6, S. 1234–1238 (2000)

- [37] Hochuli E., Schlunegger U. P. (Hrsg.) Genetically designed affinity chromatography using a novel metal chelate absorbent. Berlin (Springer-Verlag), p. 217-239 (1989)
- [38] Atkins P., Paula J. Atkins's physical chemistry. (2013)
- [39] Fasman G. D. Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. Verlag in New York (1996)
- [40] Asherie N. Protein crystallization and phase diagrams. Science Direct Methods 34 p. 266-272 (2004)