

Institut für Biotechnologie 1 (IBT-1)

***Einfluss des NAD(H) Pools  
auf die Produktivität bei  
Ganzzellbiotransformationen***

*Florian Heuser*





***Einfluss des NAD(H) Pools  
auf die Produktivität bei  
Ganzzellbiotransformationen***

*Florian Heuser*

**Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4259**

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie 1 (IBT-1) Jül-4259

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2007)

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)  
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

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

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: [zb-publication@fz-juelich.de](mailto:zb-publication@fz-juelich.de)

Teile der vorliegenden Dissertation erschienen in folgender Publikation:

Heuser F, Schroer S, Lütz S, Bringer-Meyer S, Sahm H (2007). Enhancement of the NAD(P)(H) Pool in *Escherichia coli* for Biotransformation. *Eng. Life Sci.* **7** (4): 343-353.



## Abstract

The aim of this work was to limit the intracellular NAD turnover and to increase the intracellular NAD concentration in *Escherichia coli* in order to construct a strain characterized by higher productivity and improved long-term stability in the reductive whole-cell biotransformation. To this end, first the genes *yrfE* and *yjaD* were deleted, which code for the NADH-pyrophosphatases that probably play a part in intracellular NAD degradation. After deletion of these genes, the specific activity of the NADH-pyrophosphatase in the raw extract was reduced by 70 %. By overexpressing the genes *pncB* and *nadE* from the NAD biosynthesis it was possible to double the intracellular NAD concentration. The joint overexpression of the two genes increased the NAD pool by a factor of seven.

A recombinant strain of *E. coli* for obtaining D-mannitol from D-fructose was the reference system for studying whether the mutations in the NAD metabolism influenced the long-term stability of whole-cell transformations. Here, D-fructose was reduced to D-mannitol by a mannitol dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides*. The cofactor NADH was regenerated by a formate dehydrogenase from *Mycobacterium vaccae* N10. The uptake of D-fructose was made possible by a glucose facilitator from *Zymomonas mobilis*. In the present study, it was found that during the biotransformation the cells lost NAD(H) via a permeabilized cell membrane. The cause of cell permeabilization was found to be an accumulation of D-mannitol in the cell, which led to bursting of the cell due to increased osmotic pressure. By cloning a putative mannitol transport gene from *L. pseudomesenteroides*, it was possible to increase the long-term stability of the recombinant *E. coli*, so that after three days of biotransformation the mannitol yield was increased by 20 %.





## Abkürzungsverzeichnis

Adh	Alkohol-Dehydrogenase	MOPS	4-Morpholin-propansulfonsäure
ADP	Adenosindiphosphat		
AMP	Adenosinmonophosphat	MTT	3-[4,5-Dimethylthiazolyl-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ATP	Adenosintriphosphat		
CCCP	Carbonylcyanid-3-chlorophenylhydrazon	NAD(P)	Nikotinamidadenin-dinukleotid(phosphat)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NAPRTase	Nikotinsäure-phosphoribosyltransferase
DTT	Dithiothreitol		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	ORF	Open Reading Frame
FAD	Flavinadenindinukleotid	Ppa	anorg. Pyrophosphatase
Fdh	Formiat-Dehydrogenase	PES	Phenazinethosulfat
		PRPP	Phosphoribosyl-pyrophosphat
Gdh	Glukose-Dehydrogenase	PPi	Pyrophosphat
Glf	Glukosefacilitator	PTS	Phosphotransferasesystem
IPTG	Isopropylthiogalaktosid		
		SDS	Sodiumdodecylsulfat
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
KPi	Kaliumphosphat		
MAA	Methylacetoacetat	U	Unit/μmol Substrat x min <sup>-1</sup>
Map	Mannitolpermease		
Mdh	Mannitol-Dehydrogenase	ZTG	Zelltrockengewicht
MHB	(R)-Methyl-3-hydroxybutanoat		



# Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung .....	1
1.	Reduktive Biokatalyse mit ganzen Zellen.....	1
2.	Stabilität von Nikotinamid Adenin Dinukleotid Kofaktoren .....	2
3.	NAD <sup>+</sup> Biosynthese und Recycling .....	4
4.	Zielsetzung dieser Arbeit .....	7
II.	Material und Methoden .....	9
1.	Organismen und Plasmide.....	9
2.	Chemikalien und Reagenzien.....	14
3.	Nährmedien, Puffer und Medienzusätze .....	14
4.	Genexpression in <i>E. coli</i> .....	17
5.	DNA Isolierung .....	18
6.	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	18
7.	DNA Restriktion und Ligation .....	18
8.	Agarosegel-Elektrophorese .....	18
9.	Isolierung von <i>E. coli</i> -Membranproteinen .....	19
10.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	19
11.	Identifizierung von Protein mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie .....	19
12.	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	20
13.	DNA-Sequenzierung .....	20
14.	Deletion des NADH-Pyrophosphatasegens <i>yrfE</i> in <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	21
15.	Deletion des NADH-Pyrophosphatasegens <i>yjaD</i> in <i>E. coli</i> BL21(DE3) mit Hilfe des Vektors pKO3.....	21
16.	Genomische Integration des Nikotinsäurephosphoribosyl-Transferase-Gens <i>pncB</i> in <i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yrfE</i> .....	22
17.	Kompetente Zellen und DNA-Transfer.....	22
18.	Zellaufschluss.....	23
19.	Bestimmung von Enzymaktivitäten und Proteinkonzentrationen .....	23
20.	Bestimmung der intrazellulären NAD(H) Konzentration .....	25
21.	Bestimmung von D-Fruktose und D-Mannitol mittels HPLC .....	26
22.	Quantifizierung von Ketonen und chiralen Alkoholen mittels Gaschromatographie ..	27
23.	Bestimmung der intrazellulären D-Mannitolkonzentration .....	27
24.	Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes bei <i>E. coli</i> .....	28
25.	Ganzzell-Biotransformation .....	28
III.	Ergebnisse .....	30
1.	Erhöhung und Stabilisierung des NAD(H)-Pools in <i>E. coli</i> .....	30
1.1	NAD(H)-Abbau in <i>E. coli</i> .....	30
1.2	Deletion der NADH-Pyrophosphatasegene <i>yrfE</i> und <i>yjaD</i> .....	32
1.3	Überexpression von Genen des NAD(H)-Recyclingstoffwechselweges .....	36
1.4	Genomische Integration von <i>pncB</i> .....	40
1.5	Überexpression der anorganischen Pyrophosphatase <i>ppa</i> .....	41
1.6	Überexpression der Gene <i>nadB</i> und <i>nadA</i> aus der NAD(H) <i>de novo</i> Synthese... 43	
2.	Auswirkung der NAD(P)(H)-Pool Erhöhung auf die Produktivität bei Ganzzellbiotransformationen .....	45
2.1	D-Mannitolproduktivität der Stämme <i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yrfE</i> und <i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yrfE</i> $\Delta$ <i>yjaD</i> mit Plasmiden pET24a(+)- <i>fdh-mdh</i> ; pZY507- <i>glf</i> .....	46
2.2	D-Mannitolproduktivität von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pCDF- <i>fdh-mdh</i> ; pZY507- <i>glf</i> ; pET24a(+)- <i>pncB</i> mit Überexpression von <i>pncB</i> .....	48
2.3	D-Mannitolproduktivität von <i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yrfE</i> $\Delta$ <i>yjaD</i> : <i>pncB</i> pET24a(+)- <i>fdh-mdh</i> ; pZY507- <i>glf</i> .....	51

2.4	D-Mannitolproduktivität von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pCDF- <i>fdh-mdh-nadE</i> ; pET24a(+)- <i>pncB</i> ; pZY507- <i>glf</i> .....	54
2.5	Einfluss des NAD(P)(H)-Pools auf die Geschwindigkeit der Biotransformation von Methylacetoacetat zu ( <i>R</i> )-Methyl-3-hydroxybutanoat .....	55
3.	Ursachen für das Sinken der intrazellulären NAD(H)-Konzentration in der Ganzzellbiotransformation .....	58
3.1	Nachweis von extrazellulärem NAD(H) bei der Ganzzellbiotransformation .....	59
3.2	Einfluss des Formiats auf die Stabilität des NAD(H)-Pools .....	60
3.3	Beteiligung der Formiat-Dehydrogenase an der Zellpermeabilisierung .....	63
3.4	Einfluss der CO <sub>2</sub> -Entwicklung auf die Zellstabilität und die Rolle des Glukose- Facilitators .....	66
3.5	Einfluss der Mannitol-Dehydrogenase auf die Zellpermeabilisierung .....	67
3.6	Bestimmung der intrazellulären D-Mannitolkonzentration .....	69
3.7	Klonierung einer putativen Mannitolpermease aus <i>L. pseudomesenteroides</i> .....	71
3.8	Biotransformation unter Expression eines putativen Mannitolexporter-Gens .....	73
IV.	Diskussion .....	76
1.	NAD(H) Turnover in nicht-wachsenden Zellen von <i>Escherichia coli</i> .....	76
2.	Überexpression von Genen der NAD(H)-Synthese .....	78
3.	Einfluss eines erhöhten NAD(P)(H)-Pools auf die reduktive Biotransformation....	80
4.	Ursachen für die Zellpermeabilisierung in der D-Fruktose-D-Mannitol- Biotransformation.....	83
V.	Zusammenfassung .....	86
VI.	Literatur .....	87

# I. Einleitung

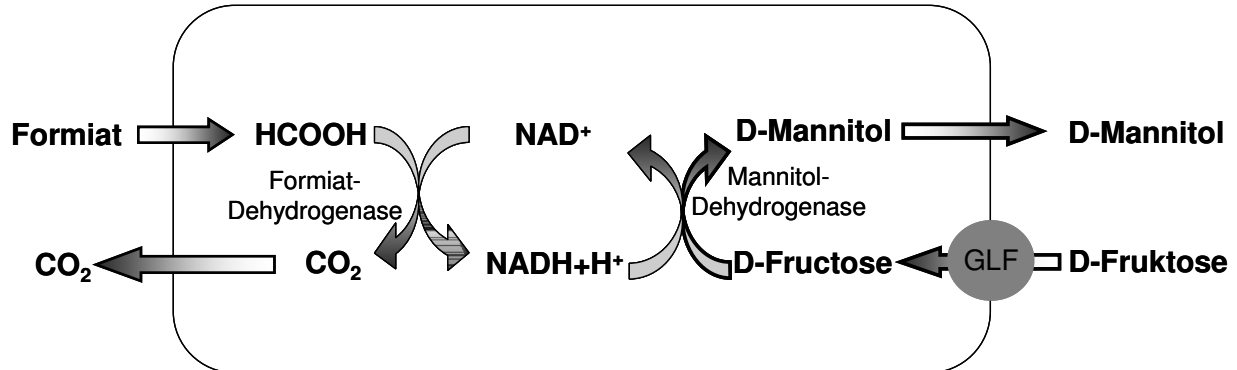
## 1. Reduktive Biokatalyse mit ganzen Zellen

Das Interesse an enzymatischen Stoffumwandlungen in industriellen Prozessen nimmt gegenwärtig stark zu (Faber, 2000; Koeller und Wong, 2001; Schmid, et al., 2001; Zhao, et al., 2002). Oxidoreduktasen, welche die asymmetrische Reduktion von Carbonylgruppen zu Alkoholen und Aminen oder die Oxygenierung von Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen katalysieren, stehen im Blickpunkt der chemischen Industrie (Li et al., 2002; Stewart, 2001).

Der Einsatz ganzer Zellen anstelle isolierter Enzyme hat eine Reihe von Vorteilen: Eine aufwendige Isolierung der Enzyme entfällt und das Produkt lässt sich leichter von ganzen Zellen abtrennen (Buchholz und Gröger, 2006). Häufig weisen die Enzyme in ihrer natürlichen Umgebung eine größere Stabilität auf. Schließlich haben die Zellen einen natürlichen Kofaktorpool; bei Verwendung isolierter Enzyme müssen häufig Kofaktoren hinzugefügt werden, wodurch sich diese Prozesse verteuern. Die meisten Oxidoreduktasen benötigen Pyridinnukleotide als Kofaktoren. Bei der Verwendung isolierter Enzyme wäre ein Einsatz stöchiometrischer Mengen an NAD(P)H aus ökonomischen Gründen nicht sinnvoll (van der Donk und Zhao, 2003). Daher wird in industriellen Prozessen eine Kofaktor verbrauchende Reaktion stets mit einer regenerierenden Reaktion gekoppelt. Diese Redoxreaktion kann unter Umständen durch das Produktionsenzym allein katalysiert werden, häufig ist jedoch eine Kopplung an ein weiteres Enzym notwendig (Buchholz und Gröger, 2006). Beispiel für eine monoenzymatische Katalyse ist die Reduktion von Ketonen zu chiralen Alkoholen mittels einer Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*. Die Regeneration des Kofaktors NADPH wird hierbei durch die Oxidation von Isopropanol gewährleistet. Die Alkohol-Dehydrogenase aus *L. brevis* zeichnet sich durch eine hohe Lösungsmitteltoleranz und eine hohe spezifische Enzymaktivität aus (Schubert et al., 2002). Bei Verwendung eines gekoppelten Enzymsystems werden häufig Formiat-Dehydrogenase aus *Candida boidinii* (Bommarius et al., 1994; Bommarius et al., 1998) oder *Mycobacterium vaccae* N10 (Kaup et al., 2004), Glukose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* (Zhang et al., 2006) und Phosphit-Dehydrogenase aus *Pseudomonas stutzeri* (Costas et al., 2001; Vrtis et al., 2001) zur Kofaktorregenerierung verwendet. Vorteil der Formiat-Dehydrogenase gegenüber den anderen Kofaktor-Regenerationssystemen ist, dass das Reaktionsprodukt CO<sub>2</sub> gasförmig aus dem System entweicht und es somit nicht von dem gewünschten Produkt

abgetrennt werden muss. Ferner ist der Einsatz einer Formiat-Dehydrogenase gerade für solche Reaktionen geeignet, die thermodynamisch ungünstig sind.

Ein möglicher Nachteil bei der Verwendung ganzer Zellen für die Biokatalyse ist die Trennung von Substrat und Enzym durch die Zellmembran. Diese stellt teilweise eine unüberwindliche Barriere für das Substrat dar, so dass die Zellen permeabilisiert werden müssen, um dem Substrat die Membranpassage zu ermöglichen. Die Permeabilisierung der Zellmembranen führt aber zu einem Verlust der intrazellulären Kofaktoren. Teilweise kann der Transport des Substrats durch die Überexpression eines Transportgens verbessert werden. Dieses gelang bei der Biotransformation von D-Fruktose zu D-Mannitol mit ganzen Zellen von *E. coli*. Da D-Fruktose bei *E. coli* durch das Phosphotransferase-System aufgenommen wird (Kornberg et al., 2000), liegt die D-Fruktose in *E. coli* in der phosphorylierten Form vor und ist somit nicht für die Mannitol-Dehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* nutzbar. Durch die Überexpression eines Glukose-Facilitators aus *Zymomonas mobilis* wurde ein diffusionsabhängiger Transport der D-Fruktose über die Membran ermöglicht (Kaup et al., 2004).



**Abb. 1:** Schema des rekombinanten *E. coli* Stammes BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* zur Gewinnung von D-Mannitol.

Fdh: Formiat-Dehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* N10.

Mdh: Mannitol-Dehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides*

GlF: Glukose-Facilitator aus *Zymomonas mobilis*.

## 2. Stabilität von Nikotinamid Adenin Dinukleotid Kofaktoren

Sowohl die reduzierte als auch die oxidierte Form der Pyridinnukleotide ist in wässriger Lösung instabil. Während NAD(P)H in basischer Lösung stabil ist, ist NAD(P)<sup>+</sup> in saurer

Umgebung stabil (Lowry et al., 1961; Wong und Whitesides, 1981). Nukleophile Reagenzien wie z.B. Phosphat können zu einem Abbau von  $\text{NAD(P)}^+$  führen. Phosphatkonzentrationen, wie sie natürlicherweise in der Zelle vorliegen, könnten zum Abbau von 50 % der intrazellulären  $\text{NAD(P)}^+$  Konzentration nach 50 h in ruhenden Zellen von *E. coli* beitragen (Wong und Whitesides, 1981). Als hauptverantwortlich für die Instabilität des Pyridinnukleotidpools werden jedoch Enzyme angesehen, die  $\text{NAD(P)}^+$  metabolisieren.  $\text{NAD}^+$ -Pyrophosphorylasen und -Phosphatasen tragen zu 80 % der  $\text{NAD}^+$  abbauenden Aktivität bei, die im Rohextrakt von Hefe vorgefunden wird (Takei et al., 1966). Die Stabilität von Pyridinnukleotiden ist von Organismus zu Organismus unterschiedlich. Gewöhnlich werden Halbwertszeiten zwischen 10 und 50 h für wachsende Zellen gemessen. Die Stabilität ist zudem von den Kultivierungsbedingungen abhängig (Temperatur, Kohlenstoffquelle etc.) (Schütz, 1984). Bei *Salmonella typhimurium* wurde eingehend untersucht, welche Enzyme für den NAD-Turnover verantwortlich sind (Park et al. 1988, Park et al. 1989, Falconer et al. 1984). Im Rohextrakt ist die Aktivität einer NAD-Pyrophosphatase hauptverantwortlich für den Abbau von NAD(H). Nach Deletion des Gens *pnuE*, welches für eine NAD-Pyrophosphatase kodiert, wurde keine NAD-Pyrophosphatase-Aktivität mehr im Rohextrakt vorgefunden. Die Deletion des Gens hatte jedoch keine Auswirkungen auf den NAD(H)-Turnover ganzer Zellen (Park et al. 1988). Die NAD-Pyrophosphatase von *S. typhimurium* ist mit der Zellmembran assoziiert und vermutlich an der Aufnahme von extrazellulärem NAD(H) beteiligt (Falconer et al. 1984). Die NAD-Pyrophosphatase ist das entscheidende Enzym für die Wiederverwertung des Purinringes von NAD, denn Mutanten, denen dieses Enzym fehlt, können nicht auf NAD als Purinquelle wachsen (Park et al. 1988). Ferner wurde die NAD-abhängige DNA-Ligase als hauptverantwortlich für den intrazellulären NAD(H)-Turnover in *S. typhimurium* vermutet (Falconer et al. 1984). Eine Substitution des entsprechenden Gens durch die ATP-abhängige DNA-Ligase des Phagen T4 hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf den NAD(H) Turnover (Park et al. 1989). Bislang ist somit nicht bekannt, welche Enzyme für den NAD(H)-Turnover in *S. typhimurium* verantwortlich sind. Die Beobachtung, dass die Halbwertszeiten von NAD(H) bei Wachstum unter aeroben Bedingungen und unter anaeroben Bedingungen stark variieren, könnte einen Hinweis darauf liefern, welche Funktion der NAD(H)-Turnover hat. Für *S. typhimurium* beträgt die Halbwertszeit von NAD(H) unter aeroben Bedingungen 90 min und unter anaeroben Bedingungen 330 min. Demzufolge könnte der NAD(H)-Turnover mit einem Schutz der Zelle vor Schädigung der Membran oder der DNA durch Sauerstoff zusammenhängen, wobei es zu einem Abbau und einer Neusynthese von NAD(H) käme (Park et al., 1989). Sowohl *S.*



*typhimurium* als auch *E. coli* können exogenes NAD nutzen, doch scheinen signifikante Unterschiede im Abbau von NAD zu bestehen (Park et al. 1988). In *E. coli* kommt es nie zu einer Akkumulation von Nikotinamidmononucleotid, welches ein Abbauprodukt von NAD-Pyrophosphatasen ist. Deswegen wurde vermutet, dass NAD hauptsächlich über Glykohydrolasen in ADP-Ribose und Nikotinamid gespalten wird, welches dann zu Nikotinsäure hydrolysiert wird (Ferro und Olivera, 1987; Foster und Moat; 1980). Allerdings konnte bislang keine Aktivität für NAD-Glykohydrolase in *E. coli* nachgewiesen werden (Penfound und Foster, 1996). Im Gegensatz zu anderen Autoren (Ferro und Olivera, 1987; Foster und Moat; 1980) gehen Hillyard et al. (1981) davon aus, dass der Turnover von NAD in *E. coli* vorwiegend über NAD-Pyrophosphatasen läuft. Die Tatsache, dass das Abbauprodukt der NAD-Pyrophosphatasen, Nikotinamidmononucleotid, in *E. coli* nicht akkumuliert (Park et al. 1988), könnte mit hohen *in vivo* Aktivitäten der Enzyme Nikotinamidmononucleotid-Deamidase bzw. Nikotinamidmononucleotid-Glykohydrolase erklärt werden, welche Nikotinamidmononucleotid metabolisieren.

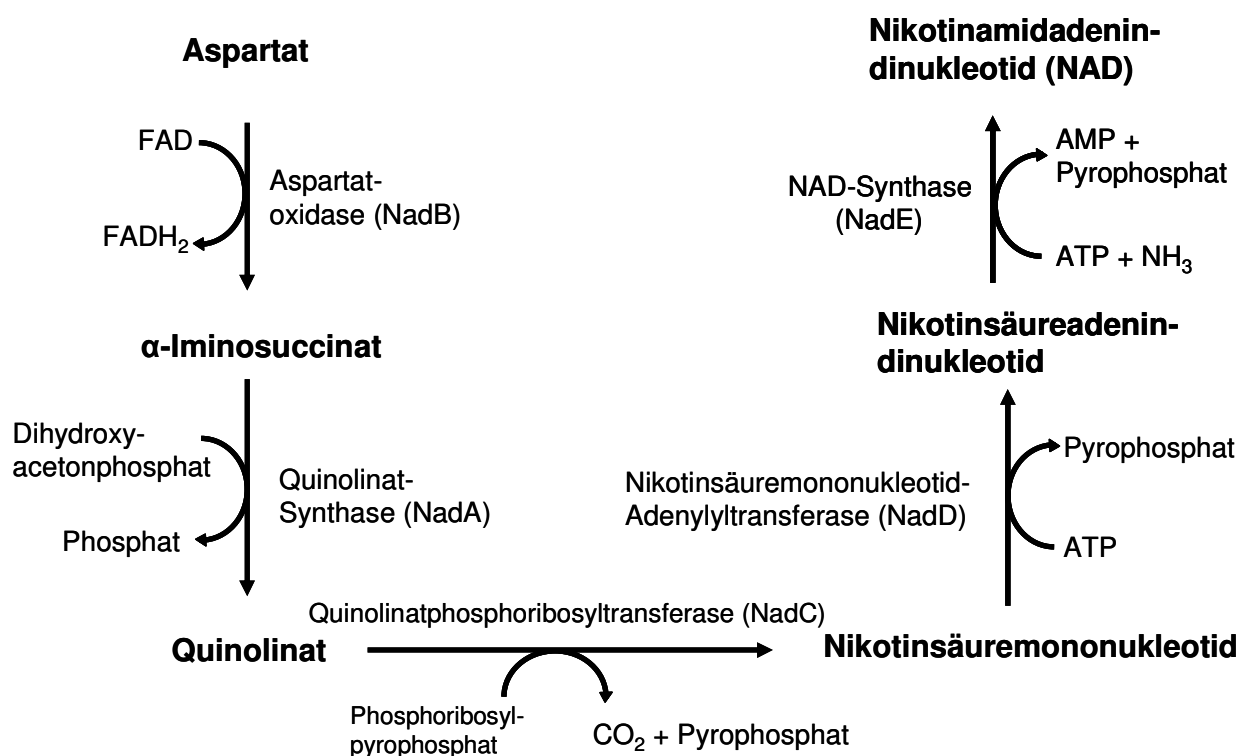
### 3. NAD<sup>+</sup> Biosynthese und Recycling

Die Kofaktoren NAD(H) und NADP(H) sind an 17 % aller enzymatisch klassifizierten Reaktionen beteiligt (You, 1985). Neben seiner Rolle bei Redoxreaktionen ist NAD(H) an der DNA-Ligation (Gellert et al., 1968; Olivera et al., 1968), der ADP-Ribosylierung von Proteinen (Moss et al., 1979), der Protein-Deacetylierung (Starai et al., 2002) und der Vitamin B<sub>12</sub> Biosynthese beteiligt (Maggio-Hall und Escalante-Semerena, 2003).

Bei der *de novo* Synthese von NAD(H) in *E. coli* wird im ersten Schritt Aspartat mittels einer Aspartat-Oxidase (Genprodukt von *nadB*) zu  $\alpha$ -Iminosuccinat oxidiert, wobei FAD zu FADH<sub>2</sub> oxidiert wird.  $\alpha$ -Iminosuccinat wird mit Dihydroxyacetonphosphat mittels einer Quinolinat-Synthase (Genprodukt von *nadA*) zu Quinolinat kondensiert. Durch eine Quinolinat-Phosphoribosyltransferase (kodiert durch *nadC*) wird ein Ribosylrest von Phosphoribosylpyrophosphat auf Quinolinat übertragen und es entsteht Nikotinsäuremononucleotid. Mittels Nikotinsäuremononucleotid-Adenylyltransferase (Genprodukt von *nadD*) wird ein Adenylylrest von ATP auf Nikotinsäuremononucleotid übertragen, was zur Bildung von Nikotinsäureadeninucleotid führt. Im letzten Schritt wird die Nikotinsäuregruppe ammonifiziert, was zur Bildung von NAD führt. Diese Reaktion wird durch die NAD-Synthase katalysiert, welche durch das Gen *nadE* kodiert wird (Penfound und

Foster, 1996). Die *de novo* Synthese unterliegt einer Endprodukthemmung durch NAD. Bei ausreichend hohem NAD-Spiegel bindet NAD an das Regulatorprotein NadR, was daraufhin an die Operatorregionen der Gene *nadB* und *nadA* bindet und deren Expression unterbindet (Penfound und Foster 1999) (Abb. 2).

Die NAD *de novo* Synthese geht bei den meisten Bakterien von Aspartat aus (Penfound und Foster 1996). Bei Eukaryoten erfolgt die NAD *de novo* Synthese jedoch ausgehend von Tryptophan (Rongvaux et al. 2003). Allerdings sind auch Bakterien bekannt, die NAD ausgehend von Tryptophan synthetisieren (Kurnasov et al. 2003).

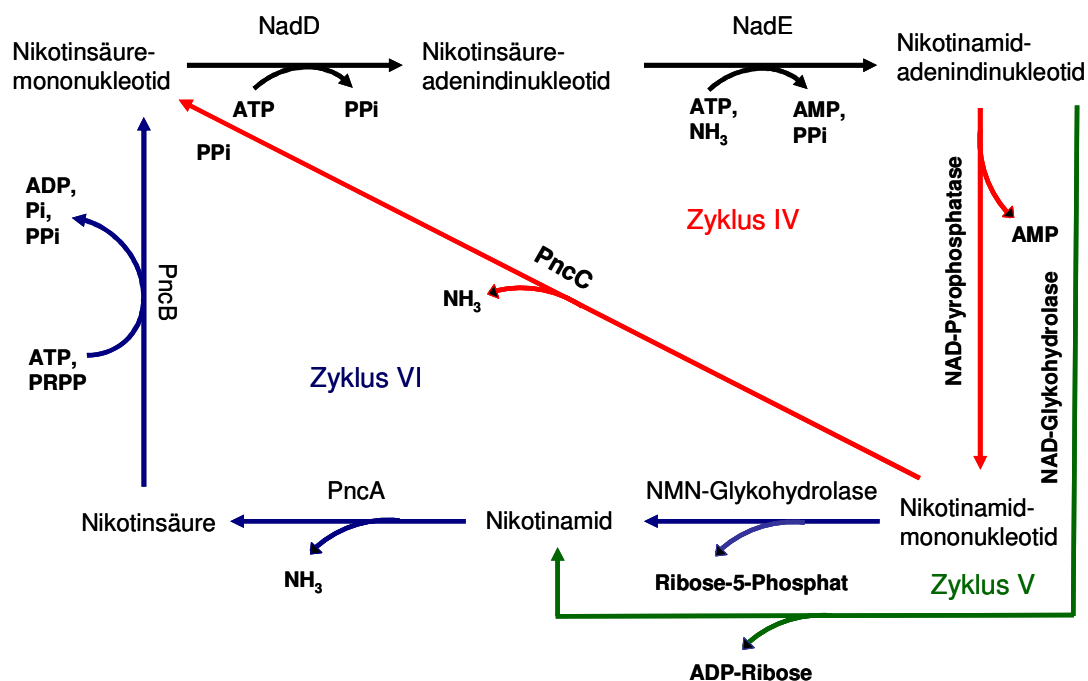


**Abb. 2:** Stoffwechselweg für die *de novo* Synthese von NAD in Bakterien.

Die Existenz eines Pyridinnukleotidzyklus, welcher Bruchstücke des NAD-Abbaus der Neusynthese zuführt, wurde zuerst von Gholson (1966) vorgeschlagen. Penfound und Foster (1996) unterscheiden drei verschiedene Zyklen des Recyclings von NAD. *In vivo* Experimente belegten, dass 80 bis 90 % von intrazellulärem NAD über den Pyridinnukleotidzyklus IV recycelt werden, welcher über vier enzymatische Schritte NAD abbaut und neusynthetisiert (Andreoli et al., 1969; Foster et al., 1980; Hillyard et al., 1981; Manlapaz-Fernandez und Olivera, 1973): Zunächst wird NAD über eine Pyrophosphatase in

Nikotinamidmononukleotid und AMP gespalten. Nikotinamidmononukleotid wird mittels einer Deamidase unter Abspaltung von Ammonium zu Nikotinsäuremononukleotid. Nikotinsäuremononukleotid wird über die Genprodukte von *nadD* und *nadE* wieder in NAD überführt

Auch in den Pyridinnukleotidzyklen V und VI erfolgt das NAD-Recycling über Nikotinsäuremononukleotid. Der Zyklus VI besteht aus sechs enzymatischen Schritten, wobei NAD zunächst mittels Pyrophosphatasen in Nikotinamidmononukleotid und AMP gespalten wird. Nikotinamidmononukleotid wird dann mittels einer Glykohydrolase in Nikotinamid und Ribose-5-Phosphat gespalten. Nikotinamid wird über eine Deamidase zu Nikotinsäure. Diese wird mittels einer Nikotinsäurephosphoribosyltransferase zu Nikotinsäuremononukleotid ribosyliert, wobei ATP verbraucht wird (Penfound und Foster, 1996). Zyklus V unterscheidet sich von Zyklus VI darin, dass NAD nicht über eine Pyrophosphatase, sondern eine Glykohydrolase in Nikotinamid und ADP-Ribose gespalten wird (Abb. 3).



**Abb. 3:** NAD kann auf vier unterschiedlichen Wegen recycelt werden, Pyridinnukleotidzyklus IV (rot), -zyklus V (grün), -zyklus VI (blau).

*NadD*: Nikotinsäure-Adenylyltransferase; *NadE*: NAD-Synthase; *PncA*: Nikotinamid-Deamidase; *PncB*: Nikotinsäurephosphoribosyltransferase; *PncC*: Nikotinamidmononukleotid-Deamidase; NMN: Nikotinamid; PPRP: Phosphoribosylpyrophosphat; PPI: Pyrophosphat; Pi: Phosphat.

Auch der Recyclingweg von NAD wird über das Regulatorprotein NadR kontrolliert (Penfound und Foster, 1996). NAD bindet dabei an NadR, wodurch eine Konformationsänderung eintritt, welche die Bindung von NadR an die Operatorregion von *pncB* ermöglicht (Grose et al., 2005). Der Operatorregion vor *pncB* hat eine sechsfach niedrigere Affinität zu NadR als die Operatorregion vor *nadA* (Penfound und Foster, 1999). Dies bedeutet, dass einem Recycling des Nikotinatgrundgerüsts der Vorrang vor einer NAD *de novo* Synthese gegeben wird. Das Expressionslevel des *pncB*-Gens ist die Schaltstelle für die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration. Durch Überexpression des Gens kommt es zu einer Erhöhung der NAD(H)-Konzentration (Wubbolts et al., 1990; San et al., 2002). Welchen Einfluss das Expressionslevel der Gene *nadD* und *nadE* auf die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration hat, ist bislang nicht bekannt.

Der Verlauf des NAD-Turnovers in *E. coli* konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Hillyard et al. (1981) argumentieren für einen Abbau von NAD vorwiegend über NAD-Pyrophosphatasen. Bisher konnten zwei Gene in *E. coli* annotiert werden, welche für NAD(H)-Pyrophosphatasen kodieren: *yrfE* und *yjaD*. YjaD ist gekennzeichnet durch eine hohe Präferenz für NADH, wobei der  $K_M$ -Wert 50-fach niedriger ist als für  $NAD^+$ . Die spezifische Aktivität für das gereinigte Enzym wurde mit 7,6 Units  $mg^{-1}$  Protein angegeben (Frick und Bessman, 1995). Für YrfE wurde eine spezifische Aktivität von 21 Units  $mg^{-1}$  Protein für das gereinigte Enzym gemessen (O'Handley, et al., 1998). Für *E. coli* liegen keine Literaturdaten vor, wie sich die Deletion dieser Gene auf die Stabilität von NAD(H) in ruhenden Zellen und die spezifische Aktivität von NADH-Pyrophosphatasen im Rohextrakt auswirkt.

#### 4. Zielsetzung dieser Arbeit

Bei der Biotransformation von D-Fruktose zu D-Mannitol mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Konzentration des Kofaktors NAD(H) innerhalb weniger Stunden stark abnimmt (Kaup, 2004). Ziel dieser Arbeit war es deshalb herauszufinden, wie es zu dieser Abnahme des NAD(H)-Pools kommt und Strategien zu entwickeln, um diese Abnahme zu verhindern. Als Ursache für die Abnahme des NAD(H)-Pools wurden zunächst die NAD(H) metabolisierenden Enzyme vermutet. Folglich sollten die entsprechenden Gene in *E. coli* deletiert werden. Durch die Überexpression von Genen des NAD(H)-Syntheseweges sollte

außerdem der NAD(H)-Pool erhöht werden. Ferner sollte untersucht werden, ob ein erhöhter NAD(H)-Pool zur Steigerung der Produktivität und zu einer Erhöhung der Langzeitstabilität des Biotransformationssystems beiträgt.

## II. Material und Methoden

### 1. Organismen und Plasmide

Folgende Stämme wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

**Tab. 2.1:** In dieser Arbeit verwendete Stämme von *Escherichia coli*.

Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80 <i>dlacZ</i> M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ <sup>-</sup> <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Plasmidamplifikation	(Hanahan, 1983); Invitrogen
BL21(DE3) Star	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm rne 131</i> (DE3)	Expression/ Ganzzell- Biotransformation	(Studier und Moffatt, 1986); Novagen
Tuner(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm lacY1</i> (DE3)	Expression/Ganzzell- Biotransformation	Novagen
XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 relA1</i> $\lambda$ <sup>-</sup> <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup> lacZ</i> $\Delta$ M15 Tn10(Tc <sup>r</sup> )]	Plasmidamplifikation Expression	(Bullock et al., 1987)

Es wurden Deletionsmutanten der Gene *yjaD* und *yrfE* im Stamm *E. coli* BL21(DE3) konstruiert. Ferner wurde eine Mutante konstruiert, bei der das *pncB* Gen an die Stelle von *yjaD* genomisch integriert wurde (Tab. 2.2).

**Tab. 2.2:** Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Mutanten von *E. coli* BL21(DE3).

Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
BL21(DE3) $\Delta$ <i>yrfE</i>	markerlose Mutante von BL21(DE3), Deletion des <i>yrfE</i> -Gens	Ganzzellbiotransformation	eigene Arbeit
BL21(DE3) $\Delta$ <i>yjaD</i>	markerlose Mutante von BL21(DE3), Deletion des <i>yjaD</i> -Gens	Ganzzellbiotransformation	eigene Arbeit
BL21(DE3) $\Delta$ <i>yrfE</i> $\Delta$ <i>yjaD</i>	markerlose Mutante von BL21(DE3), Deletion der Gene <i>yrfE</i> und <i>yjaD</i>	Ganzzellbiotransformation	eigene Arbeit
BL21(DE3) $\Delta$ <i>yrfE</i> $\Delta$ <i>yjaD</i> :: <i>pncB</i>	markerlose Mutante von BL21(DE3), Deletion der Gene <i>yrfE</i> und <i>yjaD</i> , genomische Integration des <i>pncB</i> -Gens an den Genort von <i>yjaD</i>	Ganzzellbiotransformation	eigene Arbeit

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

**Tab. 2.3:** In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmide	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
pACBSR <sup>1)</sup>	pBAD18-Kan-Derivat <sup>2)</sup> ; <i>I-SceI</i> ; lambda red genes <sup>3)</sup> ; <i>P<sub>ara</sub></i> ; <i>p15A</i>	Hilfsvektor Gendeletierung	zur <sup>1)</sup> (Herring et al., 2003) <sup>2)</sup> (Guzman et al., 1995)

			3) (Datsenko und Wanner, 2000)
pBBR1-MCS2	<i>Kan<sup>R</sup>, lacI, lacZ, P<sub>lac</sub>, pBBR1 replicon</i>	Expressionsplasmid	(Kovach et al., 1995)
pBBR1-MCS2-map	pBBR1-MCS2-Derivat, Expression eines putativen Mannitol-Transporters aus <i>L. pseudomesenteroides</i>	Expression	eigene Arbeit
pBTac1	<i>Amp<sup>R</sup>, P<sub>lac</sub>, lacI</i>	Expressionsplasmid	Boehringer Mannheim GmbH
pBTac-LBadh-gdh	pBTac Derivat, <i>adh, gdh</i>	Expression	Wacker Chemie AG, München
pCDF-Duet1	<i>lacI; Sm<sup>R</sup>; 2 x P<sub>T7</sub>; CloDF13</i>	Expressionsplasmid	Novagen
pCDF-nadA	pCDF-Duet-1 Derivat, <i>nadA</i>	Expression	eigene Arbeit
pCDF <i>nadD nadE</i>	pCDF-Duet-1 Derivat, <i>nadD, nadE</i>	Expression	eigene Arbeit
pCDF- <i>nadE</i>	pCDF-Duet-1 Derivat; <i>nadE</i>	Expression	eigene Arbeit
pCDF- <i>fdh</i>	pCDF-Duet-1 Derivat, <i>fdh</i>	Expression	Martha Chmielus
pCDF- <i>fdh-mdh</i>	pCDF-Duet-1 Derivat; <i>fdh; mdh</i>	Expression	(Kaup, 2004)
pCDF- <i>fdh-mdh-nadE</i>	pCDF- <i>fdh-mdh</i> Derivat; <i>nadE</i>	Expression	eigene Arbeit
pCDF- <i>ppa</i>	pCDF-Duet-1 Derivat; <i>ppa</i>	Expression	eigene Arbeit
pET24a(+)	<i>Kan<sup>R</sup>; lacI; P<sub>T7</sub>; ColE1</i>	Expressionsplasmid	Novagen
pET24a(+)- <i>fdh-mdh</i>	pET24a(+) Derivat; <i>fdh-mdh</i>	Expression	(Kaup, 2004)



## Material und Methoden

	<i>fdh; mdh</i>		
pET24a(+)- <i>mdh</i>	pET24a(+) <i>mdh; Kan<sup>R</sup>, lacI</i>	Derivat; Expression	(Kaup, 2004)
pET24a(+)- <i>pncB</i>	pET24a(+) <i>pncB</i>	Derivat; Expression	eigene Arbeit
pKO3	<i>cat; sacB; pSC101; M13</i>	Gendeleterierungsvektor	(Link et al., 1997)
pKO3- $\Delta yjaD$	pKO3 $\Delta yjaD$	Derivat; Deletion von <i>yjaD</i>	eigene Arbeit
pKO3- $\Delta yjaD$ - <i>pncB</i>	pKO3- $\Delta yjaD$ Derivat; <i>pncB</i>	Deletion von <i>yjaD</i> , genomische Integration von <i>pncB</i>	eigene Arbeit
pRSF-Duet1	<i>lacI; Kan<sup>R</sup>; 2 x P<sub>T7</sub>; RSF1030</i>	Expressionsplasmid	Novagen
pRSF- <i>nadB</i>	pRSF-Duet-1 Derivat; <i>nadB</i>	Expression	eigene Arbeit
pRSF- <i>nadD</i>	pRSF-Duet-1 Derivat; <i>nadD</i>	Expression	eigene Arbeit
pUC19	<i>lacZ; bla; pMB1</i>	Genklonierung	Fermentas
pUC19- $\Delta yrfE$	pUC19 $\Delta yrfE$	Derivat; Deletion von <i>yrfE</i>	eigene Arbeit
pZY507- <i>glf</i>	pACYC <i>lacI<sup>q</sup>, Cm<sup>R</sup>; P<sub>tac</sub>; P15A</i>	Derivat; <i>glf</i> ; Expression	(Weisser et al., 1995)

Folgende Oligonukleotide wurden in der Arbeit verwendet (Tab. 2.4):

**Tab. 2.4:** Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in 5'-3' Leserichtung angegeben. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Komplementäre DNA-Abschnitte sind kursiv dargestellt.

	Klonierung von <i>map</i> in pBBR1-MCS2
<i>map_fw_XhoI</i>	TATATA <u>CTCGAGG</u> TCGTTAAGGTTGGTGGCGAAGAGG

<i>map_rev_XmaI</i>	TATATACCCGGGTTAATTACCAACATCTATTGCCTG
	Klonierung von <i>nadA</i> in pCDF-Duet1
<i>fw_nadA_NdeI</i>	TATACATATGAGCGTAATGTTTGATCC
<i>rev_nadA_BglII</i>	TATAAGATCTTTATCCACGTAGTGTAGC
	Klonierung von <i>nadE</i> in pCDF-Duet1/pCDF- <i>fdh-mdh</i>
<i>nadE-NcoI-fw</i>	ATATCCATGGCATTGCAACAACAAATAATA
<i>nadE-EcoRI-rev</i>	TATTGGAATTCCTTACTTTTTCCAGAAATCATCGAAA
	Klonierung von <i>ppa</i> in pCDF-Duet1
<i>fw_ppa_NcoI</i>	TATACCATGGGCTTACTCAACGTCCCTG
<i>rev_ppa_HindIII</i>	TATAAAGCTTTTATTTATTCTTTGCGCGCTCGAAGGAGG
	Klonierung von <i>pncB</i> in pET24a(+)
<i>pncB-EcoRI-fw</i>	TTTTGAATTCTACGACGCTACTGC
<i>pncB-HindIII-rev</i>	TTTTAAGCTTAACTGGCTTTTTTAATA
	Konstruktion von $\Delta yjaD$ und Klonierung in pKO3
stromaufwärts <i>yjaD-XmaI-fw</i>	TATACCCGGGCTTCCAGCGCCTCGCCG
stromaufwärts <i>yjaD-SacI-SphI-rev</i>	TGTTGAGCTCTATAGCATGCGGCAGCTCTTGCACTACCTTTG
stromabwärts <i>yjaD-SphI-SacI-fw</i>	GCCGCATGCTATAGAGCTCAACATGATACTGACCGCCTG
stromabwärts <i>yjaD-BamHI-rev</i>	TATAGGATCCAACCAATCAGCGGCACTTC
	Klonierung von <i>pncB</i> in pKO3- $\Delta yjaD$
<i>pncB-SphI-fw</i>	ATATGCATGCTCCCGCGAAATTAATACG
<i>pncB-SacI-rev</i>	TATAGAGCTCATCCGGATATAGTTCCTCC
	Klonierung von <i>nadB</i> in pRSF-Duet1
<i>fw_nadB_NcoI</i>	TATACCATGGATACTCTCCCTGAAC
<i>rev_nadB_PstI</i>	ATATCTGCAGTTATCTGTTTATGTAATG
	Klonierung von <i>nadD</i> in pRSF-Duet1/pCDF- <i>nadE</i>
<i>nadD-NdeI-fw</i>	GGAATTCATATGAAATCTTTACAGGCTCTGTTTGG

<i>nadD-EcoRV-</i> <i>rev</i>	ATAT <u>GATATCT</u> CAGCGATACAAGCCTTGTTGGTTAAT
	Konstruktion von $\Delta yrfE$ und Klonierung in pUC19
stromaufwärts- <i>yrfE-fw</i>	<i>TGTTAAGTTTAGTGGATGGGCGTGGGATCT</i> ATGCTGTG
stromaufwärts <i>yrfE-BamHI-2</i> x I-SceI- <i>rev</i>	TATAGGATCCTAGGGATAACAGGGTAATTAGGGATAACAGGGTAAT TCAACGGCGCTACGTTCTTC
stromabwärts <i>yrfE-EcoRI-2</i> x I-SceI- <i>fw</i>	TATAGA <u>AATTC</u> TAGGGATAACAGGGTAATTAGGGATAACAGGGTAAT GGATTGGCTTTGATGATCACC
stromabwärts <i>yrfE-rev</i>	<i>CCCATCCACTAAACTTAAACAATGCGTGAAGTTTGCCTGATGC</i>

## 2. Chemikalien und Reagenzien

Es wurden Chemikalien der Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Sigma Chemie (Deisendorf) und Difco Laboratories (Detroit, USA) in p.A.-Qualität verwendet. Biochemikalien und Enzyme mit den zugehörigen Puffern wurden von Roche Diagnostics (Mannheim), New England Biolabs (Frankfurt) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die *Escherichia coli* Stämme BL21(DE3) und Tuner(DE3) stammten von Novagen (EMD Biosciences, Inc., Novagen Brand, Madison, USA), der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  wurde von Invitrogen (Karlsruhe) geliefert. Die Plasmide pET24a(+), pCDF-Duet1 und pRSF-Duet1 wurden von Novagen (EMD Biosciences, Inc., Novagen Brand, Madison, USA) bezogen. Der Vektor pUC19 stammte von Fermentas (Leon-Rot, Deutschland). Der DNA-Größenmarker stammte von der Firma Promega (Madison, USA). Oligonukleotide wurden durch Operon (Köln) synthetisiert.

## 3. Nährmedien, Puffer und Medienzusätze

Für die Anzucht von *E. coli* in einem komplexen Medium wurde das Luria-Bertani (LB) Medium (Miller, 1972) verwendet. Zur Laktose-vermittelten Induktion der Genexpression wurde das „Overnight-Express-Medium“ (Novagen) benutzt. Für die Anzucht von *E. coli* unter definierten Bedingungen wurde MOPS supplementiertes definiertes Medium von der Firma TEKnova (USA) bezogen, was eine Modifikation des Mediums darstellt, das durch

Neidhardt et al. (1974) beschrieben wurde. Pro Liter definierten Mediums wurden 100 ml einer MOPS gepufferten Lösung, 10 ml einer 0,132 M di-Kalium-Phosphat-Lösung, 100 ml einer Nukleinbasen haltigen Lösung, 40 ml einer Supplement-Lösung und 10 ml 40 % (w/v) Glukose mit 740 ml doppelt destilliertem sterilem Wasser vermengt. Die Zusammensetzung des MOPS gepufferten Mediums, der Nukleinbasen haltigen Lösung und der Supplement-Lösung ist in Tabelle 2.5 dargestellt. Die einzelnen Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

Für die Lagerung von DNA und Proteinextrakten sowie für deren elektrophoretische Auftrennung wurden Puffer verwendet, die von Sambrook et al. (2000) beschrieben wurden.

**Tab. 2.5:** Komponenten, die zur Herstellung des MOPS supplementierten definierten Mediums benötigt wurden.

---

**Zehnfach konzentriertes MOPS gepuffertes Medium** (pro 500 ml)

---

83,72 g MOPS

7,17 g Tricine

wurden in ca. 300 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst.

Der pH wurde auf 7,4 mit 10 M KOH-Lösung eingestellt.

Das Volumen wurde auf 440 ml eingestellt.

0,028 g  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  wurde in 10 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst und der MOPS/Tricine-Lösung zugefügt.

50 ml 1,9 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$

10 ml 0,276 M  $\text{K}_2\text{SO}_4$

0,25 ml 0,02 M  $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$

2,1 ml 2,5 M  $\text{MgCl}_2$

100 ml 5 M NaCl

0,2 ml 5000 x Spurenelemente

(pro 50 ml, steril filtriert)

0,009 g Ammonium Molybdat

0,062 g Borsäure

0,018 g Kobaltchlorid

0,006 g Kupfersulfat

0,040 g Manganchlorid

0,007 g Zinksulfat

387 ml doppelt destilliertes Wasser, steril filtrieren.

---

**Zehnfach konzentrierte Nukleinbasen haltige Lösung (pro Liter)**

---

0,270 g Adenin

0,222 g Cytosin

0,224 g Uracil

0,302 g Guanin

wurden in 0,015 M KOH gelöst und steril filtriert.

---

**25-fach konzentrierte Supplement-Lösung (pro 2 Liter)**

---

1,8 g Tyrosin wurden in einem Liter 0,01 M KOH gelöst.

0,069 g p-Aminobenzoessäure,

0,069 g p-Hydroxybenzoessäure,

0,077 g 2,3-Dihydroxybenzoessäure wurden in 25 ml 0,02 M KOH gelöst.

Folgende Vitamine und L-Aminosäure wurden in 400 ml Wasser gelöst:

0,169 g Thiamin/HCl

0,238 g Ca<sup>2+</sup>Pantothenensäure

3,56 g Alanin

4,22 g Asparagin

3,00 g Aspartat

0,72 g Cystein

5,56 g Glutamat

0,45 g Glutamin

3,00 g Glycin

2,10 g Histidin

2,60 g Isoleucin

5,28 g Leucin

3,66 g Lysin

1,50 g Methionin

3,32 g Phenylalanin

2,30 g Prolin

21,0 g Serin

2,38 g Threonin

1,04 g Tryptophan

3,52 g Valin

Die Lösungen wurden vereinigt, mit doppelt destilliertem Wasser auf 2 Liter aufgefüllt und steril filtriert.

Zur Selektionierung Antibiotika resistenter *E. coli* Stämme wurden Antibiotika in folgender Konzentration (Tab. 2.6) den Nährmedien zugesetzt:

**Tab. 2.6:** Antibiotika, die zur Selektion den Medien zugesetzt wurden.

Antibiotikum	Stammlösung (mg ml <sup>-1</sup> )	Endkonzentration (µg ml <sup>-1</sup> )
Ampicillin (Na-Salz)	75 in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	50 - 75
Chloramphenicol	35 in EtOH (96 %)	30 - 50
Kanamycin (-Sulfat)	50 in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	20 - 50
Streptomycin (-Sulfat)	50 in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	50 - 100
Tetracyclin(-Hydrochlorid)	12,5 in EtOH (70 %)	12,5

#### 4. Genexpression in *E. coli*

Zur Induktion der Genexpression über Laktose-induzierbare Promotoren wurde entweder Isopropylthiogalaktosid (IPTG) oder ein Laktose-haltiges kommerzielles Induktionsmedium (Novagen) benutzt. Die Induktion der Genexpression mittels IPTG erfolgte in LB-Medium (Donovan et al., 1996). Hierzu wurde eine Hauptkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 angesetzt, welche aus einer Vorkultur beimpft wurde. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurden 700 µM IPTG hinzugesetzt. Im Falle von *E. coli* Tuner(DE3) wurden niedrigere IPTG-Konzentrationen eingesetzt (50 – 200 µM), um eine schwächere Geninduktion zu erreichen. Die Expression homologer Gene von *E. coli* erfolgte bei 37°C und 170 Upm für 4 h, die Expression heterologer Gene (*fdh*, *mdh*, *glf*, *map*) erfolgte bei 27 °C und 170 Upm für 4 h (Kaup, 2004). Das „Overnight Express Medium“ wurde nach Angaben des Herstellers (Novagen) zubereitet. Ca. 10 Einzelkolonien wurden in 50 ml des Mediums resuspendiert und die Zellanzucht unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Zur vollständigen Genexpression waren in der Regel 16 h ausreichend.

## 5. DNA Isolierung

Plasmidisolierungen wurden mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep-Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten erfolgte mit dem QiaexII Gel Extraction Kit oder dem High Pure PCR Product Purification Kits (Roche Diagnostics, Mannheim).

## 6. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm bestimmt (NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen). Der Reinheitsgrad der DNA wurde über den Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  (Proteinverunreinigungen) und  $E_{260}/E_{230}$  ermittelt, wobei ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 einen hohen Reinheitsgrad angab (Gallagher and Desjardins 2007).

## 7. DNA Restriktion und Ligation

Die zu verdauende DNA wurde mit 0,1 Volumen des entsprechenden, vom Hersteller mitgelieferten Puffers (10 x konzentriert) gemischt. Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden dem Ansatz 2 – 10 U Enzym zugesetzt, wobei der Volumenanteil der Enzymlösung auf Grund des enthaltenen Glycerins unter 0,1 bleiben musste. Es folgte eine Inkubation für 1 – 4 h bei der für das Enzym geeigneten Temperatur.

Ein typischer Ligationsansatz bestand aus ca. 200 ng PCR-Produkt, ca. 50 ng Vektor-DNA, T4-DNA-Ligase-Puffer und T4-DNA-Ligase bei einer Aktivität von 1 U. Der Ansatz wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Volumen von 10  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert (Mülhardt 2000).

## 8. Agarosegel-Elektrophorese

Die Elektrophoresen wurden in horizontalen Flachbettapparaturen durchgeführt. Es wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 1% Agarose (w/v) gegossen. Als Puffer-System diente Tris-Acetat-EDTA Puffer, pH 7,6. 5 Volumenanteile DNA-Lösung wurden mit einem Volumenanteil Ladepuffer (Fermentas) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt. Anschließend wurde das Gel in

einer Ethidiumbromidlösung ( $2,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ , 20 min) gefärbt und in  $\text{H}_2\text{O}$  entfärbt (ca. 10 min). Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert (Image Master<sup>®</sup> VDS-System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

## 9. Isolierung von *E. coli*-Membranproteinen

10 ml Übernachtskulturen, die in Overnight Express Medium (Novagen) induziert worden waren, wurden in 50 ml Falcon Tubes zentrifugiert (4 min, 8.000 Upm, 4°C) und mit 5 ml Tris/HCl, pH 7,5, gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml 30 mM Tris/HCl, pH 8,0, suspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss durch Ultraschall (UP 200 S, Dr. Hielscher GmbH, Teltow; Amplitude 60 %; Cycle 0,6) über 6 min. Nach Sedimentation der Zelltrümmer (15 min, 15.300 Upm, 4°C) wurde der Überstand einer Ultrazentrifugation unterzogen (60 min, 45.000 Upm, 4°C, Beckmann 50 TI-Rotor). Das Membransediment wurde nun mit 1 ml 1 M Kaliumacetat gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend zur Solubilisierung der Membranproteine in 200  $\mu\text{l}$  1 % Triton X-100; 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, aufgenommen und sorgfältig resuspendiert. Der Proteingehalt wurde nach Bradford (1976) bestimmt.

## 10. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Analyse, ob klonierte Gene exprimiert wurden, wurde Zellrohextrakt in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Hierzu wurden die Proteine zuvor in  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$  Bromphenolblau, 8 % SDS, 40 % Glycerin, 40 mM DTT und 250 mM Tris/HCl, pH 6,8 in  $\text{H}_2\text{O}$  denaturiert (Laemmli, 1970). Die SDS-Polyacrylamidgele setzten sich aus einem Sammelgel (4 % Acrylamid w/v, pH 6,8) und einem Trenngel (11,5 % Acrylamid w/v, pH 8,9) zusammen (Laemmli, 1970). Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Sammelgel bei 10 mA und im Trenngel bei 20 mA. Die Färbung der Gele erfolgte mit PageBlue<sup>™</sup> Protein Staining Solution (Fermentas).

## 11. Identifizierung von Protein mittels MALDI-TOF

### Massenspektrometrie

Die Identifizierung von Proteinen erfolgte mittels Peptidmassen-, „Fingerprint“-Analyse (Fountoulakis und Langen, 1997; Nouwens et al., 2000; Schaffer et al., 2001). Dazu wurden



die Banden aus den SDS-Gelen ausgeschnitten, zweimal für je 15 min in 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  gewaschen und für 20 min in der Vakuumentrifuge getrocknet. Zur Rehydrierung wurden die Gelstücke für 30 min in 2 ml 3 mM Tris/HCl, pH 8,8 mit  $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  Trypsin inkubiert. Anschließend wurden  $4 \text{ } \mu\text{l}$  3 mM Tris/HCl, pH 8,8 hinzugefügt und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elution der tryptisch gespaltenen Peptide aus der Gelmatrix erfolgte durch Inkubation mit  $9 \text{ } \mu\text{l}$  Wasser für 15 min, gefolgt von der Zugabe von  $7,5 \text{ } \mu\text{l}$  30 %igen Acetonitrils (v/v) in 0,1 % (w/v) Trifluoressigsäure und weiteren 10 min Inkubation bei Raumtemperatur.

Zur MALDI-TOF-MS Analyse wurden  $0,5 \text{ } \mu\text{l}$  Probe in  $0,5 \text{ } \mu\text{l}$  Matrix ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-trans-Zimtsäure in 50 % (v/v) Acetonitril und 0,25 % (w/v) Trifluoressigsäure) auf einer Probenplatte kokristallisiert (Vorm und Mann, 1994). Die Kalibrierung, Messung und Auswertung erfolgte wie durch Schaffer et al. (2001) beschrieben.

## 12. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA Fragmenten mittels PCR wurde der High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs) eingesetzt. Die PCR wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt mit der Ausnahme, dass die Annealingtemperatur  $5^\circ\text{C}$  niedriger gewählt wurde als die Schmelztemperatur der Primer.

## 13. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1982). Hierzu wurde das BigDyeTerminator Kit V3.1 von Applied Biosciences (USA) verwendet. Die Markierung der Oligonukleotide erfolgte hierbei durch fluoreszenzmarkierte Nucleosidtriphosphate im PCR-Ansatz. Als Sequenzierprimer wurden die Primer verwendet, mit denen zuvor das entsprechende DNA-Fragment amplifiziert worden war. Nach der Sequenzierungsreaktion wurde der Ansatz mit dem DyeEx-Kit von Qiagen gereinigt. Die Auftrennung und Detektion der Oligonukleotide erfolgte mittels des ABI Prism<sup>®</sup> 3100 Avant (Hitachi, Japan).

## 14. Deletion des NADH-Pyrophosphatasegens *yrfE* in *E. coli*

### BL21(DE3)

500 bp stromaufwärts und stromabwärts des *yrfE*-Gens wurden mit Hilfe der Primer „*yrfE*-f“ und „*yrfE*-BamHI-2 x I-SceI-r“ bzw. „*yrfE*-r“ und „*yrfE*-EcoRI-2 x I-SceI-f“ (Tab. 2.4) amplifiziert. Die äußeren Primer besaßen jeweils 2 Schnittstellen für das Restriktionsenzym I-SceI, welches nicht im *E. coli* Genom schneidet. Die Fragmente wurden durch einen 21 bp komplementären Überhang mittels *cross-over* PCR (Link et al. 1997) zu einem 1 kb Fragment vereint und dieses über die BamHI- und EcoRI-Schnittstellen in den Vektor pUC19 kloniert. Das resultierende Plasmid pUC19 $\Delta$ *yrfE* wurde zusammen mit dem Plasmid pACBSR (Scarab Genomics, Madison, USA) in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Rekombination wurde nach Angaben des Herstellers (Scarab Genomics) durchgeführt. Die zur Rekombination erforderlichen Gene, welche vom Phagen Lambda stammten und auf dem Plasmid pACBSR kodiert waren, wurden mittels Arabinose induziert (Murphy, 1988). Das Plasmid kodierte zusätzlich für die Restriktionsendonuklease I-SceI, welche den Vektor pUC19 $\Delta$ *yrfE* intrazellulär linearisierte, wodurch das Deletionskonstrukt freigesetzt wurde (Herring et al., 2003). Nach erfolgter Rekombination wurde mittels Kolonie-PCR auf Deletionsmutanten von *yrfE* gescreent. Das PCR-Produkt wurde sequenziert, um die Deletion zu beweisen.

## 15. Deletion des NADH-Pyrophosphatasegens *yjaD* in *E. coli*

### BL21(DE3) mit Hilfe des Vektors pKO3

Zur Deletion des NADH-Pyrophosphatasegens *yjaD* wurden 500 bp stromaufwärts und 500 bp stromabwärts des Gens mittels der Primer „*yjaD*-XmaI-f“ und „*yjaD*-SacI-SphI-r“ bzw. „*yjaD*-SphI-SacI-f“ und „*yjaD*-BamHI-r“ amplifiziert. Die Fragmente wurden durch einen 23 bp-Linker mittels *cross-over* PCR (Link et al., 1997) zu einem 1 kb Fragment vereinigt und in den Vektor pKO3 kloniert. Die Rekombination erfolgte wie durch Link et al. (1997) beschrieben. Zunächst wurde auf genomische Integration des Vektors auf LB-Medium mit Chloramphenicol bei 43° C selektiert. Zellen, die das Plasmid nicht genomisch integriert hatten, wurden inhibiert, da das Plasmid pKO3 einen hitzesensitiven Replikationsursprung besitzt. Integrationsmutanten wurden auf LB-Platten mit 5 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Da der Vektor pKO3 für eine Levansaccharase kodiert, welche den Fruktoseanteil der Saccharose polymerisiert, können Zellen, die den Vektor genomisch integriert haben nicht wachsen, da das Fruktosepolymer das Wachstum der Zellen inhibiert (Gay et al., 1985).

Somit wurde auf ein zweites *Cross-Over* selektiert, welches zum Verlust des Vektors führte. Die Deletion wurde mittels Kolonie-PCR verifiziert und das PCR-Produkt sequenziert.

### 16. Genomische Integration des Nikotinsäurephosphoribosyl-Transferase-Gens *pncB* in *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE*

Die Transkription und Translation des *pncB* Gens, welches für eine Nikotinsäurephosphoribosyltransferase kodiert, steht im Vektor pET24a(+)-*pncB* unter Kontrolle des T7-Promotors und T7-Terminators (Studier et al. 1990). Zur genomischen Integration des *pncB*-Gens in *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* unter Kontrolle des T7-Promotors wurde *pncB* samt Promotor und Terminator aus pET24a(+)-*pncB* amplifiziert. Hierzu wurden die Primer „*pncB*-*SphI*-fw“ und „*pncB*-*SacI*-rev“ verwendet, welche Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *SphI* bzw. *SacI* besaßen. Bei der Generierung des Deletionskonstruktes  $\Delta$ *yjaD* (II.15) waren die komplementären Enden der beiden 500 bp-Fragmente so konstruiert worden, dass bei der *cross-over* PCR inmitten des Produktes Schnittstellen für *SphI* und *SacI* entstanden. Das *pncB*-Gen wurde nun über diese Schnittstellen in den Vektor pKO3 $\Delta$ *yjaD* integriert. In dem daraus resultierenden Vektor pKO3 $\Delta$ *yjaD*::*pncB* wurde das *pncB* Gen von 500 bp Fragmenten stromaufwärts und stromabwärts des *yjaD*-Gens flankiert, worüber mittels homologer Rekombination die Deletion von *yjaD* und die genomische Integration von *pncB* erfolgte (Link et al. 1997). Durch Kolonie-PCR wurden Integrianten identifiziert und das PCR-Produkt sequenziert.

### 17. Kompetente Zellen und DNA-Transfer

Die Herstellung kompetenter Zellen sowie deren Transformation mit Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983). Zur Ausprägung der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz wurden die Zellen nach der Transformation 45 min in SOC-Medium inkubiert (Sambrook, 2000), bevor die Selektion auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz erfolgte. Alternativ, wenn z.B. zwei oder drei Plasmide gleichzeitig transformiert werden sollten, erfolgte die Transformation mittels Elektroporation. Die Präparation der Zellen und die Elektroporation wurden nach der Methode von Dower et al. (1988) durchgeführt. Für die Elektroporation wurden Küvetten mit einem Durchmesser von 2 mm der Firma Biorad verwendet. Die Elektroporation wurde mit dem MicroPulser<sup>TM</sup> von Biorad durchgeführt, wobei eine Spannung von 2,5 kV angelegt wurde.

## 18. Zellaufschluss

Zellpellets wurden in dem Puffer resuspendiert, der im nachfolgenden Enzymtest zum Einsatz kam, und durch Ultraschall im Eisbad für 4 min aufgeschlossen (Beschallungszyklus 0,5; Amplitude 55). Hierzu wurde der Ultraschallprozessor UP200S der Firma Hielscher Ultrasonics GmbH (Stuttgart) verwendet. Nach dem Aufschluss wurden die Proben auf Eis gekühlt. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation bei 20.000 g für 60 min und 4°C. Der Überstand diente als Rohextrakt zur Analyse von Enzymaktivitäten. Sofern für den Enzymtest erforderlich wurde der Rohextrakt mittels einer PD-10 Säule nach Angaben des Herstellers (Amersham Biosciences, England) entsalzt.

## 19. Bestimmung von Enzymaktivitäten und Proteinkonzentrationen

Enzymaktivitäten werden in Einheiten (Units; U) angegeben, wobei 1 U als 1  $\mu\text{mol}$  umgesetztes Substrat pro Minute definiert ist. Die spezifische Aktivität wird in  $\text{U mg}^{-1}$  Protein angegeben. Für photometrische Messungen wurde das Spectrophotometer DU640 der Firma Beckman (USA) verwendet.

Zur Bestimmung der NADH Pyrophosphatase Aktivität wurde der Rohextrakt in 50 mM Tris/HCl Puffer, pH 8,5 mit 20 mM  $\text{MgCl}_2$  und 2 mM NADH bei 37 °C inkubiert (Frick und Bessman, 1995). Nach 0, 10, 20 und 30 Minuten wurden Proben genommen und das Enzym durch Hitze (95°C) inaktiviert. Präzipitiertes Protein wurde durch Zentrifugation (10 min, 13.000 Upm) entfernt und der Überstand durch Filtern (Millipore Sterilfilter, Ausschlußvolumen 0,2  $\mu\text{m}$ ) von Mikropartikeln gereinigt. Das bei der Hydrolyse von NADH freigesetzt AMP wurde mittels HPLC quantifiziert. (Frick und Bessman, 1995).

Die Aktivität der Nikotinsäurephosphoribosyl-Transferase wurde bestimmt, indem das bei der Reaktion gebildete ADP nachgewiesen wurde (Vinitsky und Grubmeyer, 1993). ADP reagierte mit Phosphoenolpyruvat mittels Phosphoenolpyruvatkinase zu ATP und Pyruvat. Pyruvat wurde mittels Laktat-Dehydrogenase zu Laktat oxidiert, wobei das gebildete NADH photometrisch erfasst wurde ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) Der Reaktionsansatz setzte sich aus 4,5 mM ATP, 1,5 mM Phosphoribosyl-Pyrophosphat, 45 mM Kaliumphosphat, pH 7,5, 45 mM Tris/HCl, pH 7,5 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,15 mM Nikotinsäure, 4 mM Phosphoenolpyruvat, 0,2 mM

NADH, 13 U Laktat-Dehydrogenase und 13 U Pyruvatkinase zusammen (Vinitsky und Grubmeyer, 1993). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Nikotinsäure gestartet.

Die NAD-Synthase katalysiert die Aminierung von Nikotinsäureadeninindinukleotid zu NAD<sup>+</sup>. Die Aktivität des Enzyms wurde über die Bildungsrate von NAD<sup>+</sup> bestimmt, welches nach Bernofsky und Swan quantifiziert wurde. (Bernofsky und Swan, 1973). Für die NAD-Synthasereaktion wurden 2 mM Nikotinsäureadeninindinukleotid, 2 mM ATP, 10 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl und 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,5 eingesetzt (Nessi et al., 1995).

Nicotinsäuremononukleotid-Adenylyltransferase katalysiert die Adenylierung von Nicotinsäuremononukleotid zu Nicotinsäureadeninindinukleotid. Die Aktivität des Enzyms wurde über die Bildungsrate von Nicotinsäureadeninindinukleotid bestimmt. Nicotinsäureadeninindinukleotid wurde nach der HPLC-Methode zur Bestimmung von Pyridinnukleotiden (II.20) quantifiziert. Im Enzymtest wurden 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM Nicotinsäuremononukleotid, 2 mM ATP und 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 eingesetzt (Mehl et al., 2000).

Die Bestimmung der Enzymaktivität der Pyrophosphatase wurde in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 4 mg ml<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 7,5 mg ml<sup>-1</sup> KCl und 2 mM Pyrophosphat durchgeführt (Heinonen und Lahti, 1981). Das hierbei freigesetzt Phosphat wurde mittels des EnzChek Phosphate Assay Kits (Invitrogen, Karlsruhe) quantifiziert. Hierbei wurde Phosphat enzymatisch an 2-Amino-6-mercapto-7-methyl-purin gekoppelt, was zu einer Verschiebung des Absorptionsoptimums des Purins von 330 nm zu 360 nm führte, welches photometrisch ermittelt wurde (Webb, 1992).

Die Aktivität der NADPH abhängigen Alkohol-Dehydrogenase wurde in 100 mM Phosphat-Puffer, pH 6,5 mit 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Methylacetoacetat und 0,25 mM NADPH gemessen. Der Abbau von NADPH wurde photometrisch erfasst ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Tan 2006).

Die Glukose-Dehydrogenase-Aktivität wurde in 100 mM Phosphat-Puffer, pH 6,5 mit 0,2 M Glukose und 2 mM NAD<sup>+</sup> bestimmt. Die Bildung von NADH wurde photometrisch nachgewiesen (Fujita et al. 1977).

Die Aktivität der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* ATCC 12291 wurde durch Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> mit D-Fruktose als Substrat bestimmt (Hahn, et al. 2003; Schneider und Giffhorn, 1989). Der Testansatz enthielt 100 mM KPi-Puffer, pH 6,5, 200 µM NADH und 200 mM D-Fruktose.

Die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase aus *M. vaccae* N10 wurde durch die Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH ermittelt (Galkin et al., 1995; Schütte et al., 1976). Der Testansatz enthielt 100 mM KPi-Puffer, pH 6,5, 2 mM NAD<sup>+</sup> und 200 mM Na-Formiat.

Die Proteinkonzentration des Rohextraktes wurde nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Biorad Protein Assay Kit nach Herstellerangaben mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt.

## 20. Bestimmung der intrazellulären NAD(H) Konzentration

Die intrazellulären Pyridinnukleotidkonzentrationen wurden zum einen mittels eines enzymatischen Verfahrens gemessen, zum anderen wurde eine HPLC-Methode zur Quantifizierung etabliert.

Enzymatisches Verfahren: Die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration wurde mittels eines kinetischen, photometrischen Verfahrens nach Bernofsky und Swan (1973), (modifiziert durch San et al. (2002) und Moritz (2000)) bestimmt. Ein *E. coli* Zellpellet, dessen Feuchtgewicht vorab bestimmt worden war, wurde mittels Ultraschall aufgeschlossen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt. 50 µl des Überstandes wurden zur photometrischen NAD(H) Bestimmung in eine Küvette mit 300 µl H<sub>2</sub>O und 600 µl Reaktionslösung (0,2 M Bicine, pH 8,0, 16 % Ethanol p.a., 13 mM EDTA, 1,4 mM 3-[4,5-Dimethylthiazolyl-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) und 5,5 mM Phenazin-ethosulfat (PES)) gegeben (Bernofsky und Swan, 1973). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl *Saccharomyces cerevisiae* Alkohol-Dehydrogenase III (1 mg ml<sup>-1</sup>) gestartet. NADH wurde in einem Redoxzyklus durch PES oxidiert und NAD<sup>+</sup> durch Alkohol-Dehydrogenase reduziert. Von dem reduzierten PES wurden die Elektronen auf MTT übertragen, welches zu der Bildung von Formazan führte. Die Bildung von Formazan, welches ein Absorptionsmaximum bei 570 nm hatte, wurde photometrisch detektiert. Die Geschwindigkeit der Formazanbildung war abhängig von der Konzentration von NAD(H) in

der Probe. Die NAD(H)-Konzentration in der Probe wurde mittels einer Eichgeraden bestimmt. Zur Bestimmung des Fehlers wurde stets ein interner Standard mitgeführt. Die NAD(H)-Konzentration wurde in nmol pro mg Zelltrockengewicht angegeben, wobei 1 g Zellfeuchtgewicht 0,145 g Zelltrockenmasse entsprachen (Kaup, 2004). Das Zelltrockengewicht ist hierbei eine genauere Bezugsgröße als das Zellvolumen, weil dieses stark von der Osmolarität des Mediums abhängig ist (Alemohammad und Knowles, 1974).

HPLC Methode: Für die Quantifizierung der verschiedenen Nukleotide wurden ca. 100 mg Zellfeuchtgewicht in 1 ml 0,5 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,0 mit 1 mM EDTA und 1 ml Methanol resuspendiert (Lundin und Thore, 1975). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei jeder zweiten Probe ein interner Standard von 100  $\mu\text{M}$  NAD<sup>+</sup> zugesetzt wurde. Nach Zugabe von 2ml Chloroform wurden die Nukleotide durch zweistündige Rotation auf einem Schüttler extrahiert. Nach Zentrifugation (4.000 Upm, 10 min) wurde die Methanolphase von der Chloroformphase getrennt und durch Filtration gereinigt. 10  $\mu\text{l}$  hiervon wurden auf eine Supelcosil LC-18-T Säule (Supelco, Taufkirchen) aufgetragen. Die Trennung der Nukleotide erfolgte mittels eines Gradienten aus einem Puffer A mit 100 mM KPi, pH 6,0 und 4 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat und einem Puffer B, der sich zu 70 % aus Puffer A und zu 30 % aus Methanol zusammensetzte bei einem pH von 7,5 (Kundeninformation Supelco). Der Gradient wurde nach Angaben des Säulenherstellers (Supelco, Taufkirchen) zur Trennung von Nukleotiden gefahren. Die absolute Trenndauer betrug 24 min. Die Flußrate betrug 1,5 ml min<sup>-1</sup>.

Zur Differenzierung zwischen der reduzierten und der oxidierten Form der Pyridinnukleotide wurde ein Verfahren zur selektiven Zerstörung jeweils einer der beiden Spezies angewendet. Dies wurde durch zwei getrennte Extraktionen erreicht (Gutmann, 1992; Theobald et al., 1993). Bei saurer Extraktion mit Perchlorsäure (pH 1,0, 7 min, 55°C) bleibt NAD<sup>+</sup> stabil, während NADH vollständig zerstört wird. Bei alkalischer Extraktion in ethanolischer Kalilauge (25% v/v Ethanol, pH 12,4, 3 min, 55°C) bleibt NADH stabil, während NAD<sup>+</sup> vollständig zerstört wird (Kaplan et al., 1951; Lowry et al., 1961; Moritz, 2000). Die Neutralisation der Zellextrakte erfolgte mit 1 M HCl bzw 5 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

## 21. Bestimmung von D-Fruktose und D-Mannitol mittels HPLC

Die Bestimmung der D-Fruktose- und D-Mannitolkonzentrationen erfolgte mittels HPLC durch einen Brechungsindexdetektor (Hitachi, Japan). Zur Trennung der Substanzen wurde

eine HPX-87C Säule der Firma Biorad mit den Maßen 300 x 7,8 mm verwendet. Die Trennung erfolgte bei einer Betriebstemperatur von 70°C. Die Durchflussrate betrug 0,6 ml min<sup>-1</sup>, wobei H<sub>2</sub>O als mobile Phase diente (Kaup, 2004).

## 22. Quantifizierung von Ketonen und chiralen Alkoholen mittels Gaschromatographie

Die chiralen Alkohole bzw. Ketone Methylacetoacetat und (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat wurden mittels Gaschromatographie bestimmt. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte mit der Säule vom Typ Permabond Carbowax 20 M (50 m x 0,32 mm Innendurchmesser, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) in einem Gaschromatographen vom Typ CP-3380 (Varian, USA) unter Verwendung eines Temperaturgradienten. Die Ofentemperatur wurde 6 min bei 70°C eingestellt und anschließend über 8 min bei einer Steigerungsrate von 25°C pro Minute auf 160°C hochgeheizt. Die Detektion der Substanzen erfolgte mit einem Flammen-Ionisations-Detektor. Stets wurden 50 mM n-Butanol als interner Standard mitgeführt (Kihumbu et al. 2002).

## 23. Bestimmung der intrazellulären D-Mannitolkonzentration

200 µl Zellsuspension der OD<sub>600</sub> von 5,0 wurden in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben, das 30 µl 20 % Perchlorsäure und 70 µl Silikonöl der Dichte 1,04 g/cm<sup>3</sup> (Wacker, Burghausen) enthielt (Klingenberg und Pfaff 1977). Durch 30 s Zentrifugation sedimentierten die Zellen in der Perchlorsäure und wurden sofort aufgeschlossen. Die Perchlorsäurephase wurde von der Ölphase getrennt und in der Vakuumzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) getrocknet. Ein interner Standard von 50 µg Ribitol wurde hinzugefügt. Anschließend wurden die Zucker in 500 µl Ethanol aufgenommen, wobei Salze zurückblieben. Es folgte eine Zentrifugation bei 20.000 g und 4°C für 30 min, wonach der Überstand in ein GC-Röhrchen überführt wurde. Ethanol wurde dann bei 65°C unter einem Luftstrom verdampft. Die Derivatisierung der Zucker erfolgte durch Zugabe von 35 µl einer Methoxylaminlösung (20 mg ml<sup>-1</sup> in Pyridin gelöst) und Inkubation bei 30°C für 90 min unter Schütteln. Anschließend wurden die Zucker silyliert durch Zugabe von 65 µl N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoroacetamid und Inkubation für 1 h bei 65°C (Marin et al. 2006). Die Analyse der Proben erfolgte mittels des Gaschromatographen TraceGC (ThermoFinnigan, Mailand). Als Säule diente der Typ FS-Supreme (30 m x 0,25 mm, Chromatographie Service,



Langerwehe, Deutschland). Injektor- und Detektortemperatur wurden auf 300°C eingestellt und die Auftrennung der Substanzen wurde durch einen linearen Temperaturgradienten von 60°C bis 320°C mit einer Heizrate von 30°C pro Minute und isothermalen Plateaus bei 280°C und 320°C für 3 bzw. 5 min erreicht (Marin et al., 2006).

### 24. Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes bei *E. coli*

Das Prinzip der Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes beruht darauf, dass die schwache Säure Benzoat nur in der protonierten Form membrangängig ist. Wenn außen ein niedrigerer pH-Wert vorherrscht als in der Zelle, akkumuliert die deprotonierte Form in der Zelle (Kelle et al., 1996). Durch die Verwendung <sup>14</sup>C-markierten Benzoats konnte die intrazelluläre Aktivität ins Verhältnis zur extrazellulären Aktivität gesetzt werden. Da der äußere pH Wert bei 6,5 konstant gehalten wurde, konnte der intrazelluläre pH-Wert über die Formel  $\text{pH}_{\text{innen}} - \text{pH}_{\text{außen}} = \Delta\text{pH} = \log [\text{Benzoat}_{\text{innen}}]/[\text{Benzoat}_{\text{außen}}]$  berechnet werden (Kashket, 1985). 20 µl einer 0,55 mM <sup>14</sup>C-Benzoat-Lösung der Aktivität 3,12 mCi mmol<sup>-1</sup> wurden zu 700 µl Zellen der OD<sub>600</sub> von 3,0 zugegeben und bei 30°C für 30 s inkubiert. Davon wurden 3 x 200 µl in Silikonölröhrchen überführt und zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden in ein Szintilationsgefäß überführt. Das Pellet wurde in 200 µl Wasser aufgenommen und ebenfalls vollständig in ein Szintilationsröhrchen überführt. Nach Zugabe von 5 ml Szintilationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität in einem Szintilationszähler der Firma Beckman gemessen (Ebbighausen et al., 1989). Um den Anteil an Benzoat zu bestimmen, der sich im periplasmatischen Bereich der Zellen ansammelte, wurde dieser Versuch wiederholt, wobei der Zellsuspension 50 µM Carbonylcyanid-3-chlorophenylhydrazon (CCCP) zugesetzt wurde. CCCP hebt den Protonengradienten auf, daher sollte die Aktivität von Benzoat intrazellulär wie extrazellulär gleich sein (Zilberstein et al. 1982). Leicht erhöhte intrazelluläre Aktivität weist auf Benzoat hin, welches im Periplasma unspezifisch gebunden wurde. Die Messwerte wurden um diesen Fehler korrigiert.

### 25. Ganzzell-Biotransformation

Es wurden Biotransformationen zur Reduktion von D-Fruktose zu D-Mannitol und von Methylacetoacetat zu (*R*)-Methyl-3-Hydroxybutanoat durchgeführt.

Biotransformation von D-Fruktose zu D-Mannitol (Kaup, 2004): Formiat-Dehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* N10, Mannitol-Dehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* und ein Glukose-Facilitator aus *Zymomonas mobilis* wurden in *E. coli* BL21(DE3) bzw. Tuner(DE3) überexprimiert. Anschließend wurden die Zellen zu 20 g Zellfeuchtgewicht l<sup>-1</sup> in 100 mM KPi-Puffer, pH 6,5 resuspendiert, der 250 mM Na-Formiat und 500 mM D-Fruktose enthielt. Die Biotransformation wurde unter pH-statischen Bedingungen durchgeführt, wobei mit einem Gemisch aus 3 M D-Fruktose und 3 M Ameisensäure titriert wurde. Die pH-Kontrolle erfolgte mittels des TIM856 Titration Manager von Radiometer (Villeurbanne, Frankreich). Die Biotransformation wurde unter leichtem Rühren und bei 30°C durchgeführt.

Zur Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Entwicklung während der Biotransformation wurde ein Gerät zur Abgasanalytik benutzt (DASGIP, Jülich). Die Zellsuspension wurde dabei mit einem definierten Gasgemisch bei konstantem Volumenstrom begast, wobei in allen Versuchen ein Volumenstrom von 6 l Gas h<sup>-1</sup> eingestellt wurde. Zur Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Entwicklung beim Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh*; (pZY507-*glf*) wurde mit 70 % Stickstoff und 30 % Sauerstoff begast. Der Sauerstoff wurde in diesem System benötigt, um NAD<sup>+</sup> über die Atmungskette zu regenerieren, da diesem Stamm die Mannitol-Dehydrogenase fehlte. Beim Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* wurde dagegen mit reinem Stickstoff begast. Sauerstoff hätte in diesem Fall die Mannitolausbeute vermindert, weil Atmungskette und Mannitol-Dehydrogenase dann um NADH konkurriert hätten.

Biotransformation von Methylacetoacetat zu (R)-Methyl-3-hydroxybutanoat (Schroer et al., 2007): Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*, Glukose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* und ein Glukose-Facilitator aus *Z. mobilis* wurden in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Anschließend wurden die Zellen zu 20 g Zellfeuchtgewicht l<sup>-1</sup> in 100 mM KPi-Puffer, pH 6,0 resuspendiert, der 40 mM Methylacetoacetat und 200 mM D-Glukose enthielt. Die Biotransformation wurde bei 30°C unter leichtem Rühren durchgeführt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 1 M KOH-Lösung konstant gehalten.

### III. Ergebnisse

#### 1. Erhöhung und Stabilisierung des NAD(H)-Pools in *E. coli*

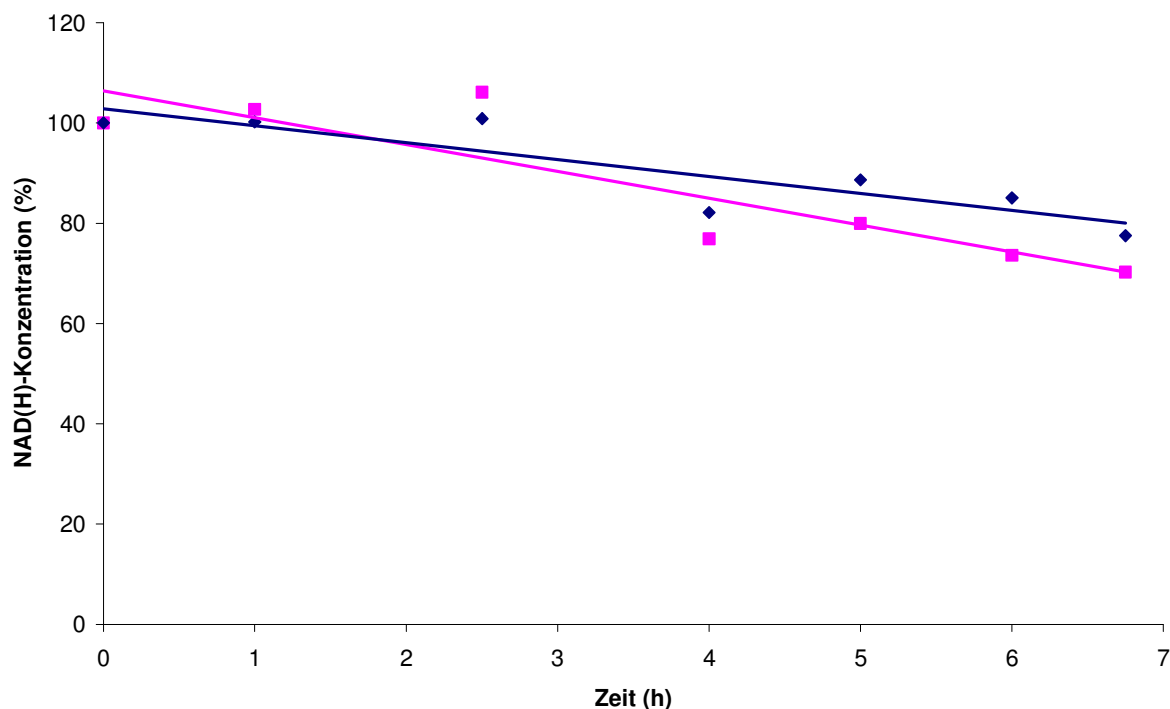
##### 1.1 NAD(H)-Abbau in *E. coli*

Der NAD(H)-Turnover in *E. coli* erfolgt hauptsächlich über die Spaltung der Pyrophosphatbindung im NAD(H)-Molekül, während bei eukaryotischen Zellen wie z.B. der menschlichen Zelllinie die Spaltung der Nikotinamid-Ribose-Bindung vorherrscht (Hillyard et al., 1981). Der Großteil der NAD(H) abbauenden Aktivität ist mit der Zellmembran verknüpft und wirkt auf extrazelluläres NAD(H) (Falconer et al., 1984). Der Abbau von intrazellulärem NAD(H) ist im Vergleich dazu in *E. coli* gering, wobei eine Halbwertszeit für NAD(H) von zwei Stunden ermittelt wurde (Manlapaz-Fernandez und Olivera, 1973). Dies bedeutet, dass bei wachsenden Zellen von *E. coli* innerhalb von zwei Stunden 50 % des NAD(H)-Pools abgebaut und wieder neu synthetisiert wurden.

Um abschätzen zu können, mit welcher Aktivität der enzymatische Abbau von NAD(H) in *E. coli* BL21(DE3) abläuft, wurde zellfreier Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) hergestellt und der Abbau von NAD<sup>+</sup> bzw. NADH *in vitro* gemessen. Es sollte festgestellt werden, ob es einen Unterschied im Abbau der oxidierten und der reduzierten Form des Pyridinnukleotids gab. Ein verstärkter Abbau der reduzierten Form könnte vermuten lassen, dass die NADH-Pyrophosphatasen YjaD und YrfE mit Präferenz für NADH maßgeblichen Anteil am NAD(H)-Turnover haben (Abb. 3.1).

Vor Beginn des Versuches war der Stamm *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pET24a(+)-*fdh-mdh* transformiert worden, welches für eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Formiat-Dehydrogenase und eine D-Fruktose-abhängige Mannitol-Dehydrogenase kodierte. Die Bildung der Enzyme wurde durch IPTG induziert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und mit dem daraus gewonnenen Rohextrakt der Enzymtest durchgeführt. Zur Bestimmung des NADH-Abbaus wurden im Enzymtest 250 mM Na-Formiat eingesetzt, welches durch die Formiat-Dehydrogenase oxidiert wurde, wobei NADH gebildet wurde. Im Test lag die NADH-Konzentration stets über 90 %, was experimentell überprüft wurde. Zur Bestimmung des NAD<sup>+</sup>-Abbaus in Rohextrakt wurden im Enzymtest 50 mM D-Fruktose zugegeben, welches über die Mannitol-Dehydrogenase zu D-Mannitol reduziert wurde, wobei NAD<sup>+</sup> gebildet

wurde. Im Test lag die  $\text{NAD}^+$ -Konzentration stets über 80 %, was ebenfalls experimentell ermittelt wurde.

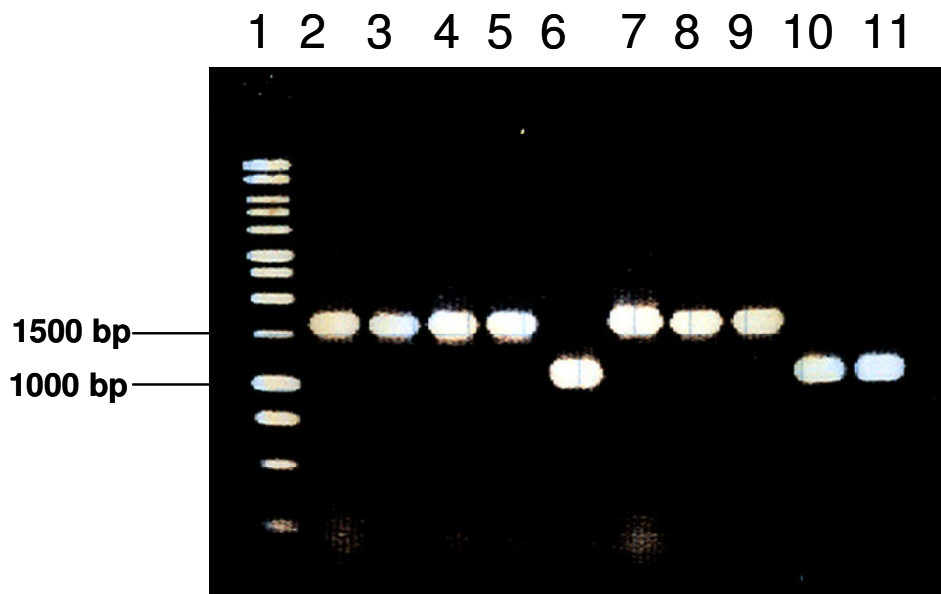


**Abb. 3.1:** Abbau von NAD(H) durch Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*. (■) NADH-Konzentration (%), (◆)  $\text{NAD}^+$ -Konzentration (%).

Nach Inkubation von 100  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  bzw. NADH für 7 h waren 30 % des NADH und 22 % des  $\text{NAD}^+$  abgebaut. Daraus errechnete sich eine spezifische Aktivität von 5,8  $\text{mU mg}^{-1}$  Protein für den Abbau von  $\text{NAD}^+$  und 7,9  $\text{mU mg}^{-1}$  Protein für den Abbau von NADH. Demnach konnten keine signifikanten Unterschiede für den Abbau von NADH bzw.  $\text{NAD}^+$  durch Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh* festgestellt werden. Da NADH nicht wesentlich schneller als  $\text{NAD}^+$  abgebaut wurde, lieferte dieser erste Versuch keinen Hinweis darauf, dass NADH-spezifische Pyrophosphatasen einen starken Anteil am NAD(H)-Turnover haben. Durch Deletion der Gene *yrfE* und *yjaD*, welche für NADH-Pyrophosphatasen kodieren, sollte untersucht werden, ob sich die Aktivität des NADH-Abbaus im Rohextrakt änderte.

## 1.2 Deletion der NADH-Pyrophosphatasegene *yrfE* und *yjaD*

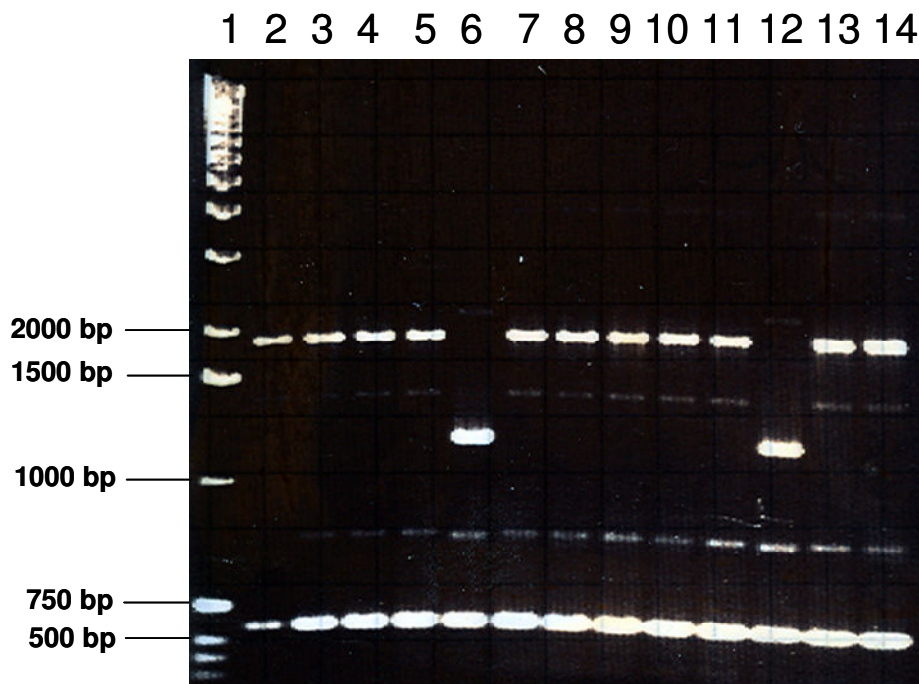
Wegen der Vermutung, dass NADH-Pyrophosphatasen maßgeblich für den intrazellulären NAD(H)-Turnover verantwortlich sind (Hillyard et al., 1981), wurden die beiden annotierten NADH-Pyrophosphatasegene *yrfE* und *yjaD* deletiert. Zunächst wurde eine selektionsmarkerfreie Mutante des Gens *yrfE* erzeugt. Hierzu wurden die Basenpaare 3.523.611 bis 3.524.171 im Genom von *E. coli* BL21(DE3) deletiert. Da das angewandte Verfahren zur Deletion des Gens als sehr effizient beschrieben wurde (Herring et al., 2003), wurde auf jegliches Selektionssystem verzichtet. Mittels Primer „*yrfE*-*Bam*HI-2x I-*Sce*I-rev“ und „*yrfE*-*Eco*RI-2x I-*Sce*I-fw“ wurde auf Deletionsmutanten selektiert. Insgesamt wurden 206 Klone mittels Einzelzell-PCR untersucht, ehe eine Deletionsmutante von *yrfE* identifiziert werden konnte. Das PCR-Produkt des deletierten Gens war um 561 bp kleiner als das des Wildtyps (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2:** Das *yrfE*-Gen (Größe 561 bp) wurde mit 500 bp Überhängen stromaufwärts und stromabwärts aus *E. coli* BL21(DE3) amplifiziert. Die Größe der PCR-Produkte wurde im Agarosegel überprüft. In den Abschnitten 2-5 und 7-9 sind PCR Produkte des *yrfE*-Wildtypgens abgebildet. Abschnitte 6, 10 und 11 zeigen PCR-Produkte des deletierten *yrfE*-Gens. In Abschnitt 1 ist eine 1 kb DNA-Leiter aufgetragen.

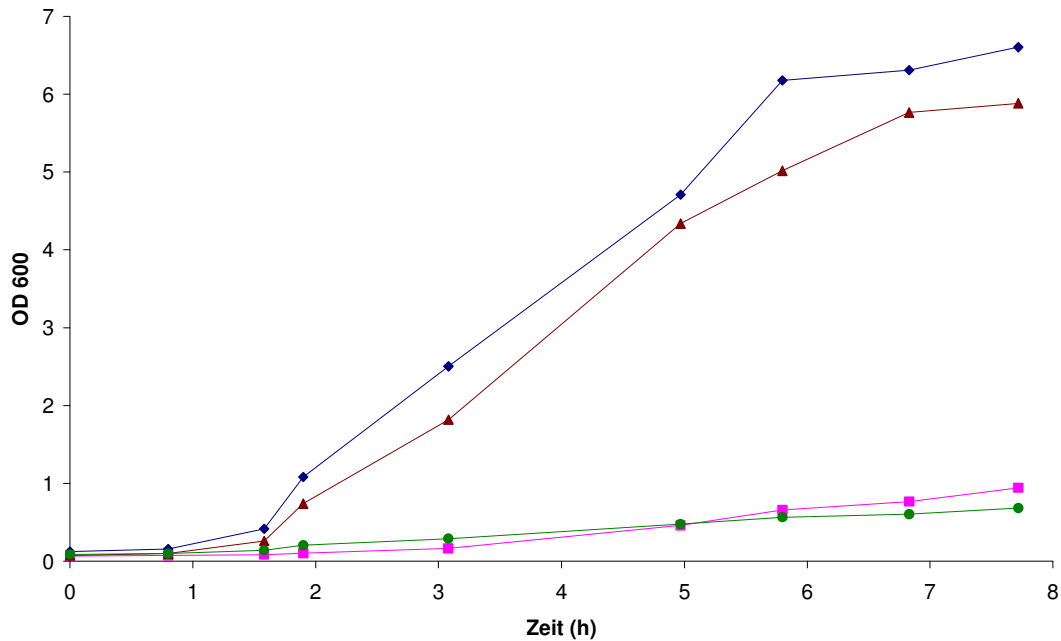
Das Gen *yjaD* wurde sowohl in *E. coli* BL21(DE3) als auch in *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* deletiert. Die Deletion umfasste die Basenpaare 4.194.926 bis 4.195.699. Das Screening auf Deletionsmutanten erfolgte mittels der Primer „*yjaD*-*Xma*I-fw“ und *yjaD*-*Bam*HI-rev. Nach Deletion war das PCR-Produkt um 774 Basenpaare kleiner als das PCR-Produkt des Wildtyp-

Allels (Abb. 3.3). Das PCR-Produkt wurde sequenziert, wodurch die Deletion bewiesen werden konnte.



**Abb. 3.3:** Das *yjaD*-Gen wurde mit 500 bp Überhängen stromaufwärts und stromabwärts aus *E. coli* BL21(DE3) (Abschnitte 2-7) und *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* (Abschnitte 8-14) amplifiziert und die Größe der PCR-Produkte im Agarosegel ermittelt. Die um ca. 700 bp kleineren PCR-Produkte in den Abschnitten 6 und 12 deuteten an, dass bei diesen Klonen die Deletion des *yjaD*-Gens erfolgreich verlaufen war. In Abschnitt 1 wurde eine 1 kb DNA-Leiter aufgetragen.

Zur phänotypischen Charakterisierung der Doppelmutante wurden Wachstumskurven von *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* und *E. coli* BL21(DE3) in LB-Medium und in Mineralmedium aufgenommen. Die Zellanzucht erfolgte in 50 ml Erlenmeyerkolben unter Schütteln (170 Upm), so dass aerobe Bedingungen hergestellt wurden. Es wurde kein signifikanter Unterschied im Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* festgestellt (Abb. 3.4). Demnach haben die Deletionen der Gene *yrfE* und *yjaD* keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *E. coli*. Daraus folgert, dass die Aktivität dieser Enzyme nicht essenziell für *E. coli* ist oder aber durch andere Enzyme übernommen werden kann.



**Abb. 3.4:** Wachstumskurven von *E. coli* BL21(DE3) in Mineralmedium (■) und Komplexmedium (◆) bzw. *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* in Mineralmedium (●) und Komplexmedium (▲).

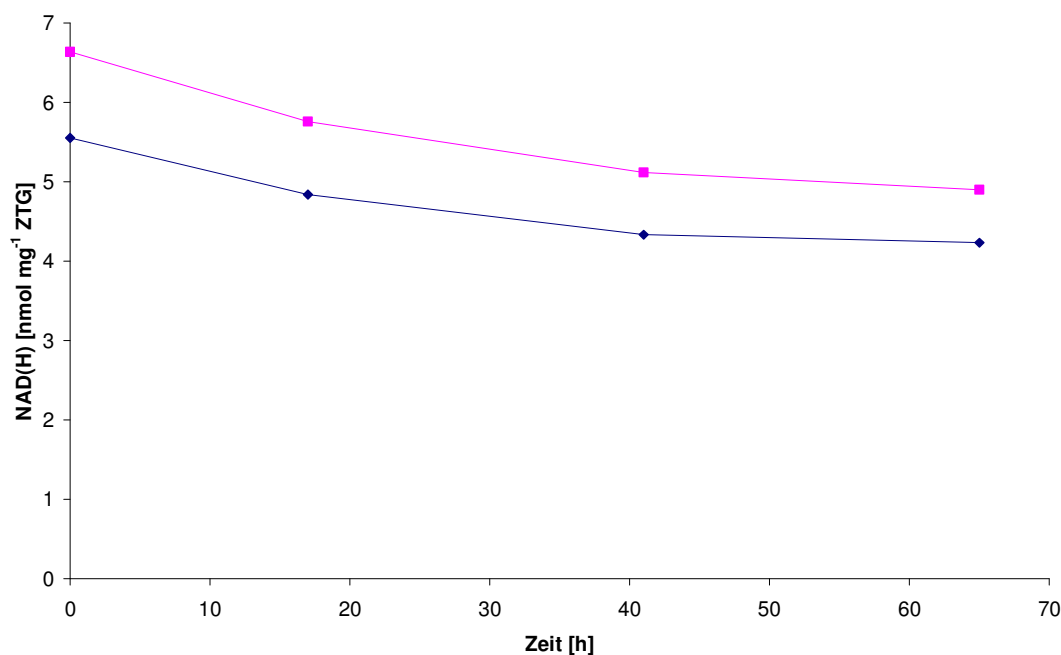
NADH-Pyrophosphatasen katalysieren die Spaltung von NADH in AMP und Nikotinsäuremononukleotid. Die NADH-Pyrophosphataseaktivität wurde in Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) und den Deletionsmutanten bestimmt, indem die gebildete Menge an AMP pro Zeiteinheit mittels HPLC quantifiziert wurde. Des Weiteren wurde der Einfluss der Deletionen auf die Größe des NAD(H)-Pools untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

**Tab. 3.1:** NADH-Pyrophosphatase-Aktivitäten und NAD(H)-Poolgrößen in *E. coli* BL21(DE3) und verschiedenen NADH-Pyrophosphatase-Deletionsmutanten.

Stamm	NADH-Pyrophosphatase (mU mg <sup>-1</sup> Protein)	NAD(H)-Poolgröße (nmol mg <sup>-1</sup> Zelltrocken- gewicht)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	4,6	7,0
<i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yrfE</i>	2,1	6,4
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) $\Delta$ <i>yjaD</i>	2,0	8,4
<i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yrfE</i> $\Delta$ <i>yjaD</i>	1,4	7,2

Die NADH-Pyrophosphatase-Aktivität konnte bei den Stämmen *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* und *E. coli* BL21 (DE3) $\Delta$ *yjaD* um ca. 50 % reduziert werden. Die Doppelmutante zeigte nur noch 30 % der Aktivität des Wildtyps. Die NAD(H)-Konzentration war bei keiner der Deletionsmutanten signifikant erhöht.

Nachdem eine Reduktion der NADH-Pyrophosphatase-Aktivität im Rohextrakt der Deletionsmutanten festgestellt werden konnte, wurde nun untersucht, ob die Mutationen auch Auswirkungen auf die NAD(H)-Stabilität in ruhenden Zellen haben. Hierzu wurden die Zellen von *E. coli* BL21(DE3) bzw. *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,5 bei 30° C über einen Zeitraum von drei Tagen inkubiert und die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration bestimmt (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5:** NAD(H)-Konzentrationen ruhender Zellen von *E. coli* BL21(DE3) (◆) bzw. *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* (■) während der Inkubation in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,5 bei 30°C.

In *E. coli* BL21(DE3) sank die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration von 5,6 nmol mg<sup>-1</sup> Zelltrockengewicht auf 4,2 nmol mg<sup>-1</sup> Zelltrockengewicht und in *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* von 6,6 nmol mg<sup>-1</sup> Zelltrockengewicht auf 4,9 nmol mg<sup>-1</sup> Zelltrockengewicht nach drei Tagen. Dieses Experiment zeigte, dass der Abbau von intrazellulärem NAD(H) in ruhenden Zellen relativ langsam verläuft im Gegensatz zum

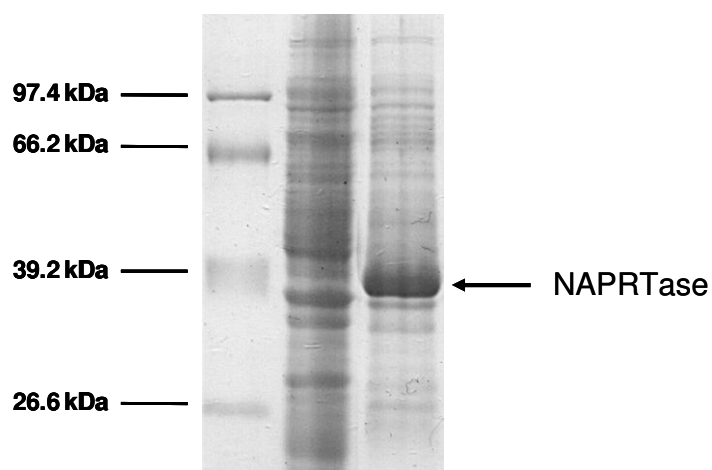


Abbau von NAD(H) im Rohextrakt. Die Abbaurate von intrazellulärem NAD(H) war in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* vergleichbar. Demnach wurde durch die Deletion der NAD(H)-Pyrophosphatasegene *yrfE* und *yjaD* keine signifikante Stabilisierung des NAD(H)-Pools in ruhenden Zellen erreicht.

### 1.3 Überexpression von Genen des NAD(H)-Recyclingstoffwechselweges

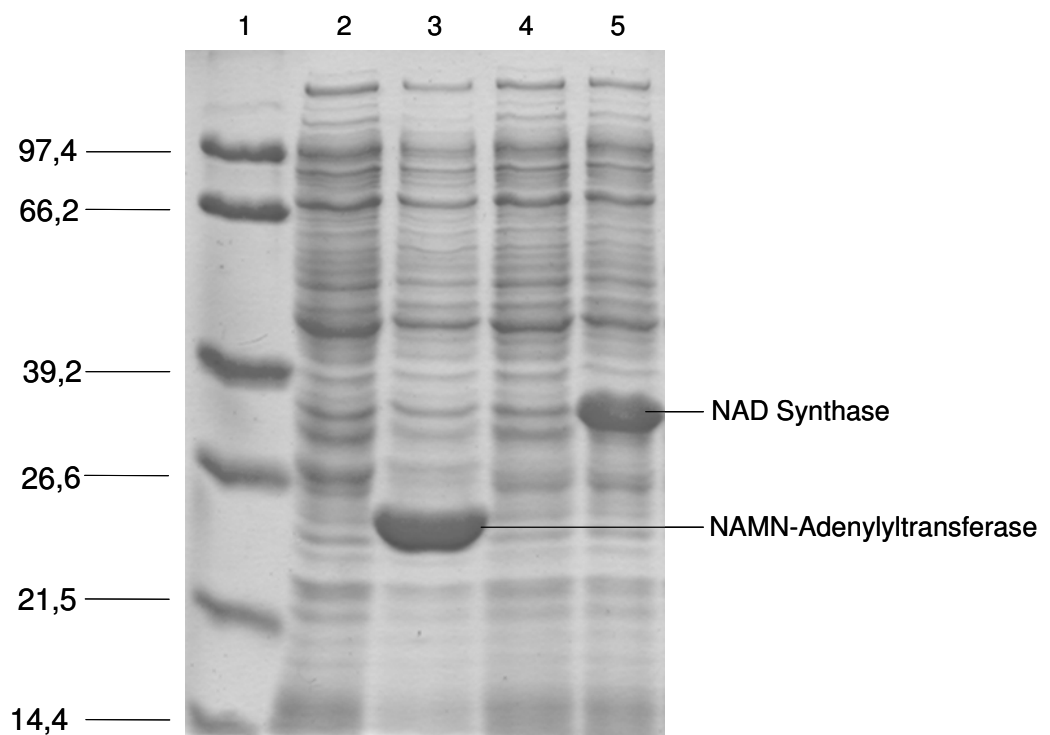
Das ursprüngliche Ziel war die Regeneration von NAD(H) während der Biotransformation über den Recyclingweg, indem den Zellen in Form von Nikotinsäure ein Vorläufersubstrat angeboten werden sollte. Um eine effiziente Nutzung der Nikotinsäure zu gewährleisten, wurde untersucht, ob die Enzymaktivität der drei Proteine des Recyclingweges, Nikotinsäurephosphoribosyltransferase (kodiert durch *pncB*), Nikotinsäuremononucleotid-Adenylyltransferase (kodiert durch *nadD*) und NAD-Synthase (kodiert durch *nadE*) die NAD(H)-Synthese limitieren. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die Gene *pncB*, *nadD* und *nadE* kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Der Einfluss der Überexpression auf die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration wurde untersucht.

Das Strukturgen von *pncB* wurde im Vektor pET24a(+) im Stamm *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Die Auftrennung von Rohextrakt aus *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*pncB* im SDS-PAGE lieferte eine zusätzliche Bande gegenüber der Kontrolle bei ca. 40 kD. Die Größe des Proteins korrespondierte mit der experimentell für PncB bestimmten Größe von 43 kD (Wubbolts et al., 1990) und der theoretisch ermittelten Größe von 45,897 kD (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6:** SDS-PAGE von Rohextrakt aus *E. coli* BL21(DE3) (Mitte) und *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*pncB* (rechte Spur), Molekulargewichtsmarker (linke Spur). Die ausgeprägte Proteinbande bei ca. 40 kD stimmt mit der Molekulargewichtsgröße der Nikotinsäurephosphoribosyltransferase überein.

Die Gene *nadD* und *nadE* wurden im Vektor pRSF bzw. pCDF in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Abb. 3.7 zeigt ein SDS-PAGE-Gel, in dem Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) pRSF/ pRSF-*nadD*/ pCDF/ pCDF-*nadE* aufgetrennt wurde. Die Überexpression von *nadD* führte zur Bildung eines Proteins in großer Konzentration mit einer Größe von 23 kD. Die Größe des Proteins korrespondierte mit der theoretisch ermittelten Größe von 24,528 kD. Nach Überexpression von *nadE* kam es zur Bildung eines Proteins mit einer Größe von 36 kD, welches etwas größer war als das theoretisch vorausgesagte Molekulargewicht von 30,637 kD.



**Abb. 3.7:** Rohextrakt aus *E. coli* BL21(DE3) pRSF (Spur 2), pRSF-*nadD* (Spur 3), pCDF (Spur 4), pCDF-*nadE* (Spur 5) wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Überexpression von *nadD* kam es zur Bildung eines Proteins, welches eine Bande bei 23 kD lieferte und mit der Größe der Nikotinsäuremononukleotid-Adenylyltransferase übereinstimmte. Die Überexpression von *nadE* führte zur Bildung eines Proteins der Größe von 36 kD, welche mit der Größe der NAD-Synthase übereinstimmte. Molekulargewichtsmarker (Spur 1).

Nach Überexpression von *pncB* wurde eine Enzymaktivität der Nikotinsäurephosphoribosyltransferase von  $0,2 \text{ U mg}^{-1}$  Protein gemessen. Im Ausgangsstamm konnte die Nikotinsäurephosphoribosyltransferase-Aktivität nicht bestimmt werden, weil das

enzymatische Verfahren für die geringe Aktivität zu unempfindlich war. In der Literatur wurde die Aktivität des Enzyms häufig mit Hilfe radioaktiv markierter [ $^{14}\text{C}$ ]-Nikotinsäure ermittelt. Es wurde von Enzymaktivitäten zwischen  $0,1 \text{ mU mg}^{-1}$  und  $0,2 \text{ mU mg}^{-1}$  Protein berichtet (Baecker et al., 1978; Foster et al., 1979a; Foster et al., 1979b; Wubbolts et al., 1990).

Nach Überexpression von *nadD* wurde für die Nikotinsäuremononukleotid-Adenylyltransferase eine Aktivität von  $5,8 \text{ U mg}^{-1}$  Protein gemessen. Die Aktivität der Kontrolle lag unter  $0,01 \text{ U mg}^{-1}$  Protein. Demnach war die Aktivität etwa um den Faktor 600 gesteigert worden. Literaturdaten, die sich auf die Verwendung [ $^{14}\text{C}$ ]-markierten Substrats stützen, gingen von einer Enzymaktivität von  $0,9 \text{ mU mg}^{-1}$  Protein der Nikotinsäuremononukleotid-Adenylyltransferase aus (Hughes et al., 1983).

Nach Überexpression von *nadE* betrug die Aktivität der NAD-Synthase  $1,5 \text{ U mg}^{-1}$  Protein. Die Aktivität der Kontrolle war kleiner als  $0,01 \text{ U mg}^{-1}$  Protein. (Tabelle 3.2). Die Aktivität des Enzyms war durch Überexpression von *nadE* um den Faktor 150 gesteigert.

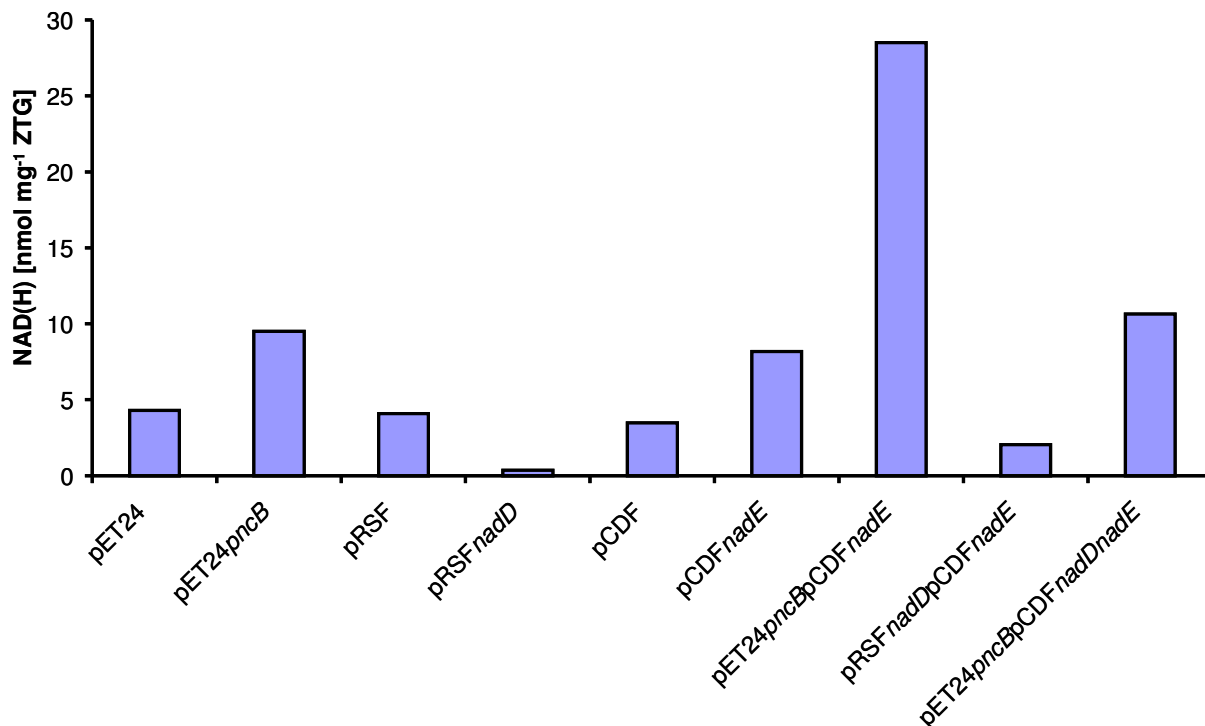
**Tab. 3.2:** Spezifische Enzymaktivität der Genprodukte von *pncB*, *nadD* und *nadE* in *E. coli* BL21(DE3).

Enzyme	Spezifische Enzymaktivität ( $\text{U mg}^{-1}$ zellfreies Protein)	
	Kontrollstamm	rekombinanter Stamm
NAD-Synthase (NadE)	0,01	1,5
NAMN-Adenylyltransferase (NadD)	0,01	5,8
NAPRTase (PncB)	n.d.*	0,2

\* n.d.: nicht detektiert

Der Einfluss der Überexpression der Gene *nadD*, *nadE* und *pncB* auf den NAD(H)-Pool wurde untersucht, wobei die Gene einzeln und in Kombination überexprimiert wurden. Wie für *pncB* bereits gezeigt werden konnte (Wubbolts et al., 1990), führte die Überexpression des Gens zu einer NAD(H)-Pool-Erhöhung, die bis zu fünffach größer war als beim Wildtyp. Über den Einfluss der Überexpression der Gene *nadD* und *nadE* auf den NAD(H)-Pool war

bislang nichts bekannt. Die Überexpression der drei Gene einzeln und in Kombination erlaubte die Identifizierung von Flaschenhälsen bei der NAD(H)-Synthese (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8:** NAD(H)-Poolgrößen von *E. coli* BL21(DE3) nach Überexpression der Gene *pncB*, *nadD* und *nadE* einzeln und in Kombination. Die Zellen wurden in LB-Medium angezogen. Die Quantifizierung der Nukleotide erfolgte mittels HPLC.

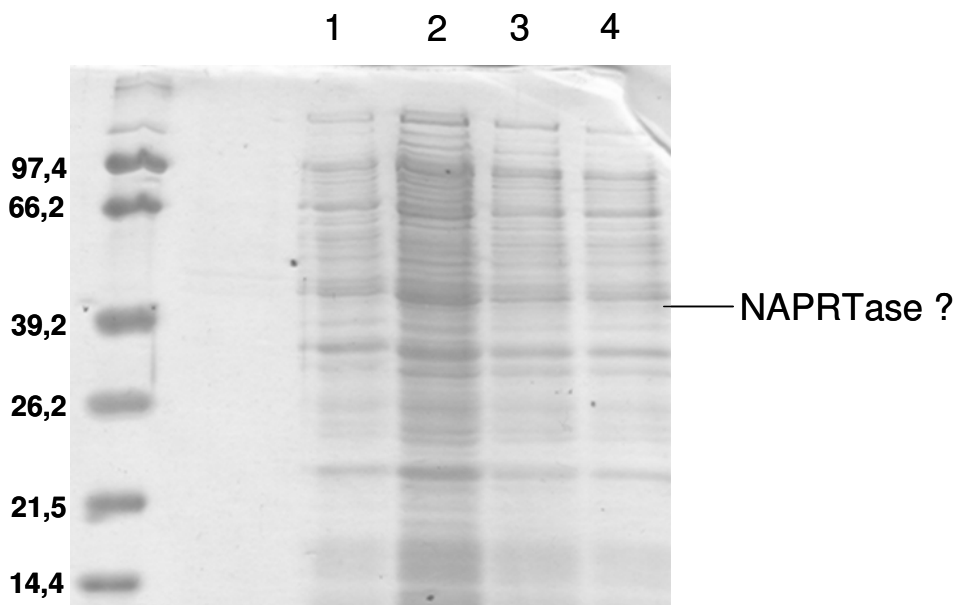
Bei den Kontrollstämmen *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)/pCDF/pRSF wurden NAD(H)-Konzentrationen zwischen 3,5 und 4,3 nmol mg<sup>-1</sup> ZTG gemessen. Die Überexpression von *pncB* und *nadE* führte jeweils zu einer Verdopplung des NAD(H)-Pools auf 9,5 bzw. 8,2 nmol mg<sup>-1</sup> ZTG. Die Überexpression von *nadD* bewirkte eine Absenkung des NAD(H)-Spiegels auf 0,4 nmol mg<sup>-1</sup> ZTG. Auch in Kombination mit *nadE* und *pncB* hatte *nadD* einen negativen Einfluss auf die Größe des NAD(H)-Pools. Die größte Steigerung der NAD(H)-Poolgröße wurde bei der gemeinsamen Überexpression von *pncB* und *nadE* erreicht, wobei 28,5 nmol mg<sup>-1</sup> ZTG gebildet wurden.

Aus diesem Experiment konnte geschlossen werden, dass die natürlichen Expressionslevel von *pncB* und *nadE* die NAD(H)-Poolgröße limitieren und dass durch Aktivitätssteigerung der Enzyme höhere intrazelluläre NAD(H)-Konzentrationen erzielt werden können. Der Effekt der NAD(H)-Poolabsenkung durch *nadD*-Überexpression deutete daraufhin, dass unter natürlichen Bedingungen eine ausgewogene Balance zwischen den Expressionsleveln dieser

Gene bestehen muss, da der Pool für gewöhnlich keinen großen Schwankungen unterliegt und üblicherweise eine Konzentration von 3-7 nmol mg<sup>-1</sup> ZTG aufweist (Wubbolts et al., 1990).

#### 1.4 Genomische Integration von *pncB*

Das hohe Expressionslevel von *pncB* beeinträchtigte die Expressionsrate heterologer Gene, welches sich negativ auf die Aktivität der entsprechenden Gene in der Biotransformation auswirkte. Deshalb wurde *pncB* in den Genort von *yjaD* genomisch integriert. Hierzu wurde das Gen samt T7-Promotor und T7-Terminator aus dem Vektor pET24a(+)-*pncB* amplifiziert und über homologe Rekombination gegen *yjaD* substituiert. Nach erfolgter Integration war die Expressionsrate des Gens stark reduziert (Abb. 3.9), so dass im SDS-Gel gegenüber der Kontrolle keine überzählige Bande identifiziert werden konnte.



**Abb. 3.9:** SDS-PAGE von Rohextrakt aus *E. coli* BL21(DE3) nach genomischer Integration von *pncB*. Spur 1: Proteinextrakt aus *E. coli* BL21(DE3). Spuren 2-4: Proteinextrakt aus drei verschiedenen Mutanten von *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD*::*pncB*. Nach genomischer Integration war das Expressionslevel von *pncB* stark reduziert. Molekulargewichtsmarker (linke Spur).

Die Untersuchung des NAD(H)-Pools von *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD*::*pncB* ergab eine Konzentration von 18,7 nmol mg<sup>-1</sup> ZTG, was in etwa genauso groß war wie die Konzentration in *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*pncB* (Tabelle 3.3). Somit war nicht das Expressionslevel von *pncB*, sondern die Verfügbarkeit von Substraten in diesem Fall der limitierende Faktor für die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration. Des Weiteren wurde untersucht, ob die genomische Integration von *pncB* auch die NADP(H)-Konzentration beeinflusste. Es wurde

eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von 0,4 auf 0,9 nmol mg<sup>-1</sup> Zelltrockengewicht gemessen. Bei einem Cytoplasmavolumen von ungefähr 2 µl mg<sup>-1</sup> Zelltrockengewicht in Abhängigkeit von der Osmolarität des Mediums (Cayley et al., 2000) entspräche die NADP(H)-Konzentration des Wildtyps 0,2 mM. Dieser Wert stimmt gut mit Literaturangaben überein (Penfound und Foster, 1996). Eine Abhängigkeit der NADP(H)-Poolkonzentration von der NAD(H)-Poolkonzentration wurde bereits von einer anderen Arbeitsgruppe postuliert (Lundquist und Olivera, 1971).

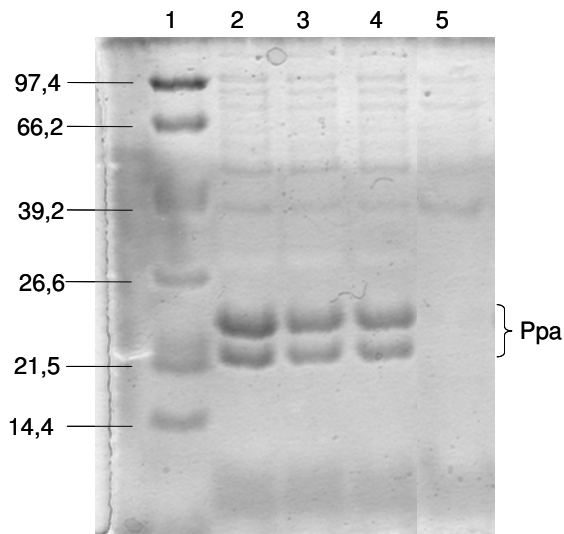
**Tab. 3.3:** NAD(P)(H)-Poolgrößen von *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD::pncB*, *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)*pncB* und *E. coli* BL21(DE3).

	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yrfE</i> $\Delta$ <i>yjaD::pncB</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET24a(+) <i>pncB</i>
NAD(H)-Pool [nmol mg <sup>-1</sup> ZTG]	7,6	18,7	20,3
NADP(H)-Pool [nmol mg <sup>-1</sup> ZTG]	0,4	0,9	nicht bestimmt

### 1.5 Überexpression der anorganischen Pyrophosphatase *ppa*

Bei den Reaktionen, die durch PncB, NadD und NadE katalysiert werden, wird jeweils Pyrophosphat freigesetzt. Im folgenden Versuch wurde deshalb untersucht, ob die Überexpression der anorganischen Pyrophosphatase die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration erhöht, indem sie das freigesetzte Pyrophosphat hydrolysiert und somit das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite von NAD(H) verschiebt. Die Beeinflussung des Reaktionsgleichgewichtes durch Hydrolyse von Pyrophosphat wird z.B. bei der PCR-Technik verwendet, weil Pyrophosphat die DNA-Polymerase inhibiert, was zum Abbau von DNA bei erhöhten Temperaturen führen kann (Pantazaki et al., 2002; Tabor und Richardson, 1990). Die anorganische Pyrophosphatase von *E. coli* hydrolysiert Pyrophosphat und mit geringer Effizienz auch Tri- und Tetrapolyphosphate. Für die Aktivität des Enzyms ist die Anwesenheit von Magnesiumionen essentiell. Es wurde eine Aktivität von 2,6 U mg<sup>-1</sup> Protein in Rohextrakt von *E. coli* K12 ermittelt (Josse, 1966). Das Gen *ppa* wurde im Vektor pCDF in

*E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Abb. 3.10 zeigt ein SDS-PAGE-Gel, in dem Rohextrakte von *E. coli* BL21(DE3) pCDF bzw. *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*ppa* aufgetrennt wurden.



**Abb. 3.10:** SDS-PAGE von Rohextrakten aus *E. coli* BL21(DE3) pCDF (Spur 5) bzw. *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*ppa* (Spuren 2-4). Molekulargewichtsmarker (Spur 1).

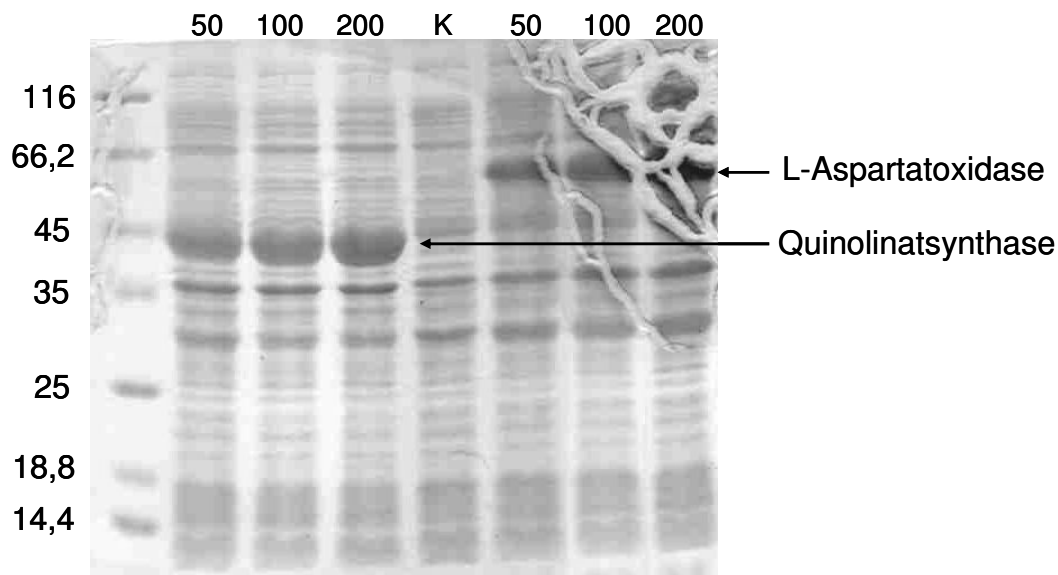
Nach Überexpression von *ppa* traten im Polyacrylamidgel zwei Banden bei 19,8 kD und 23,2 kD auf, welche in der Kontrolle nicht vorhanden waren. Das theoretische Molekulargewicht der Pyrophosphatase aus *E. coli* liegt bei 19,704 kD. Beide Proteinbanden wurden aus dem Gel isoliert und tryptisch verdaut. Die Analyse der Fragmente mittels MALDI-TOF ergab, dass es sich bei beiden Fragmenten um das gleiche Protein handelte. Das Massenspektrum stimmte mit dem theoretisch für Ppa ermittelten Massenspektrum überein, so dass es sich bei diesem Protein um Ppa handelte. Bei der Bande von 19,8 kD handelte es sich wahrscheinlich um ein Abbauprodukt des Proteins.

Nach Überexpression von *ppa* wurde eine Enzymaktivität von  $386 \text{ U mg}^{-1}$  Protein gemessen. Die Aktivität war um den Faktor 154 gegenüber der Kontrolle erhöht, bei der  $2,5 \text{ U mg}^{-1}$  Protein gemessen wurden. Die Aktivität des Enzyms im Wildtyp stimmte mit vorhergehenden Messungen überein (Josse, 1966). Die Analyse des NAD(H)-Pools von *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*ppa* ergab keine Erhöhung gegenüber der Kontrolle. Aufgrund der hohen natürlichen Aktivität der Pyrophosphatase in *E. coli* muss davon ausgegangen werden, dass die Aktivität dieses Enzyms nicht limitierend ist, so dass eine Überexpression ohne Effekt blieb.

## 1.6 Überexpression der Gene *nadB* und *nadA* aus der NAD(H) *de novo* Synthese

Die Gene *nadB* und *nadA*, deren Genprodukte L-Aspartatoxidase und Quinolinatsynthase die beiden ersten Schritte der NAD(H) *de novo* Synthese katalysieren, unterliegen beide einer strikten Kontrolle durch den Regulator NadR (Penfound und Foster, 1999). Durch Überexpression beider Gene konnte eine hohe Steigerung der Bildung von Quinolinat erzielt werden. Da die Expressionslevel von *nadB* und *nadA* die Quinolinatsynthese limitieren, wäre es auch denkbar, dass die NAD(H) *de novo* Synthese durch die Aktivität dieser Enzyme limitiert wird. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Überexpression der beiden Gene auch eine Steigerung der intrazellulären NAD(H)-Konzentration bewirken könnte. Hierzu wurde das Gen *nadA* in den Vektor pCDF und *nadB* in den Vektor pRSF kloniert. Da beide Vektoren voneinander unterschiedliche Replikationsursprünge besaßen, war eine gekoppelte Expression beider Gene in *E. coli* BL21(DE3) möglich. Zunächst wurden beide Gene einzeln exprimiert. Da die Zellen jedoch über Nacht nicht im „Overnight Express Medium“ anwachsen konnten, wurde vermutet, dass eine zu starke Expression der Gene möglicherweise das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) inhibierte. Deshalb wurden die Plasmide in den Stamm *E. coli* Tuner(DE3) transformiert, bei dem durch Gabe unterschiedlicher Konzentrationen an IPTG das Expressionslevel der Gene *nadA* und *nadB* variiert werden konnte (Abb. 3.11). Der Stamm *E. coli* Tuner(DE3) ist im *lacY*-Gen mutiert, welches für eine Untereinheit der Laktose-Permease kodiert. Die Laktose-Permease ist essentiell für das Wachstum von *E. coli* auf Laktose (Beckwith, 1987) und ist auch für den Transport von IPTG in die Zelle verantwortlich (Hansen et al., 1998). Durch die Ausschaltung des Transporters gelangt IPTG konzentrationsabhängig in die Zelle.

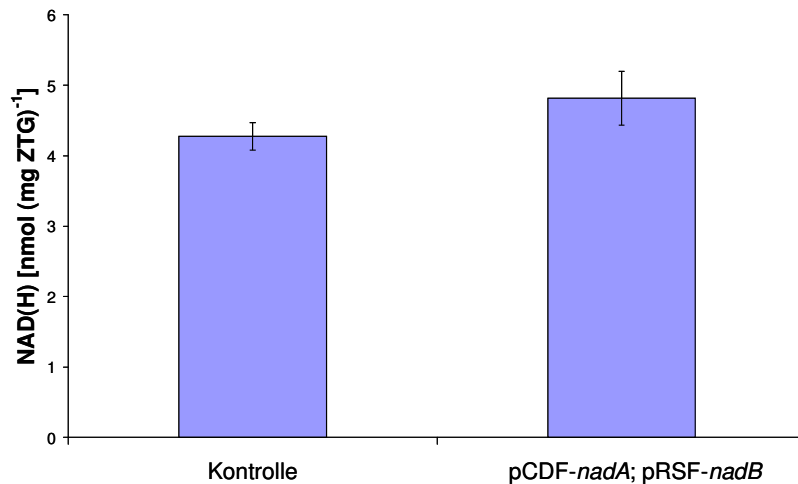




**Abb. 3.11:** SDS-PAGE von Rohextrakten der Stämme *E. coli* Tuner(DE3) pCDF-*nadA* bzw. pRSF-*nadB*. Die Induktion der Genexpression erfolgte mit IPTG-Konzentrationen zwischen 50 und 200  $\mu$ M. K = Kontrolle mit Leervektor.

Im SDS-PAGE wurde nach Expression von *nadA* ein Protein im Größenbereich zwischen 35 und 45 kD gebildet. Die Größe dieses Proteins stimmte gut mit der anhand der Aminosäuresequenz ermittelten theoretischen Größe von 38,2 kD überein. Nach Überexpression von *nadB* wurde ein Protein gebildet, das im Gel etwas unterhalb der 66,2 kD Bande lief. Die Größe dieses Proteins stimmte ebenfalls gut mit der anhand der Aminosäuresequenz ermittelten theoretischen Größe von 60,3 kD überein. Folglich weist die SDS-PAGE-Analyse darauf hin, dass die Gene *nadA* und *nadB* erfolgreich transkribiert und translatiert wurden.

Die Gene wurden anschließend daraufhin untersucht, ob eine Überexpression eine Erhöhung des NAD(H)-Pools bewirken konnte. Hierzu wurden die Gene sowohl einzeln als auch in Kombination überexprimiert. Weder bei der Überexpression der einzelnen Gene noch bei der Überexpression beider Gene konnte eine signifikante NAD(H)-Pool-Erhöhung gemessen werden (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12:** NAD(H)-Poolgrößen von *E. coli* Tuner(DE3) pCDF; pRSF bzw. *E. coli* Tuner(DE3) pCDF-*nadA*; pRSF-*nadB* nach Induktion der Genexpression für 4 h mittels 700 µM IPTG.

Wie durch die Arbeit von Flachmann et al. (1988) gezeigt wurde, bewirkt die gekoppelte Überexpression der Gene *nadA* und *nadB* eine 15-fache Steigerung der Quinolinatbildung. Demzufolge ist die natürliche Aktivität dieser Enzyme *in vivo* limitierend. Durch Überexpression beider Gene konnte jedoch keine NAD(H)-Pool-Erhöhung erreicht werden. Dies kann daran liegen, dass die Aktivitäten der nachfolgenden Enzyme NadC, NadD und NadE limitierend sind. Für die NAD<sup>+</sup>-Synthese konnte gezeigt werden, dass die natürliche Aktivität dieses Enzyms für die NAD<sup>+</sup>-Synthese limitierend ist, da eine Überexpression eine Verdopplung der NAD(H)-Poolgröße bewirkte.

Im nachfolgenden Abschnitt sollte untersucht werden, wie sich die NAD(P)(H)-Pool stabilisierenden bzw. NAD(P)(H)-Pool erhöhenden Mutationen auf die Produktivität der reduktiven Ganzzellbiotransformation auswirkten.

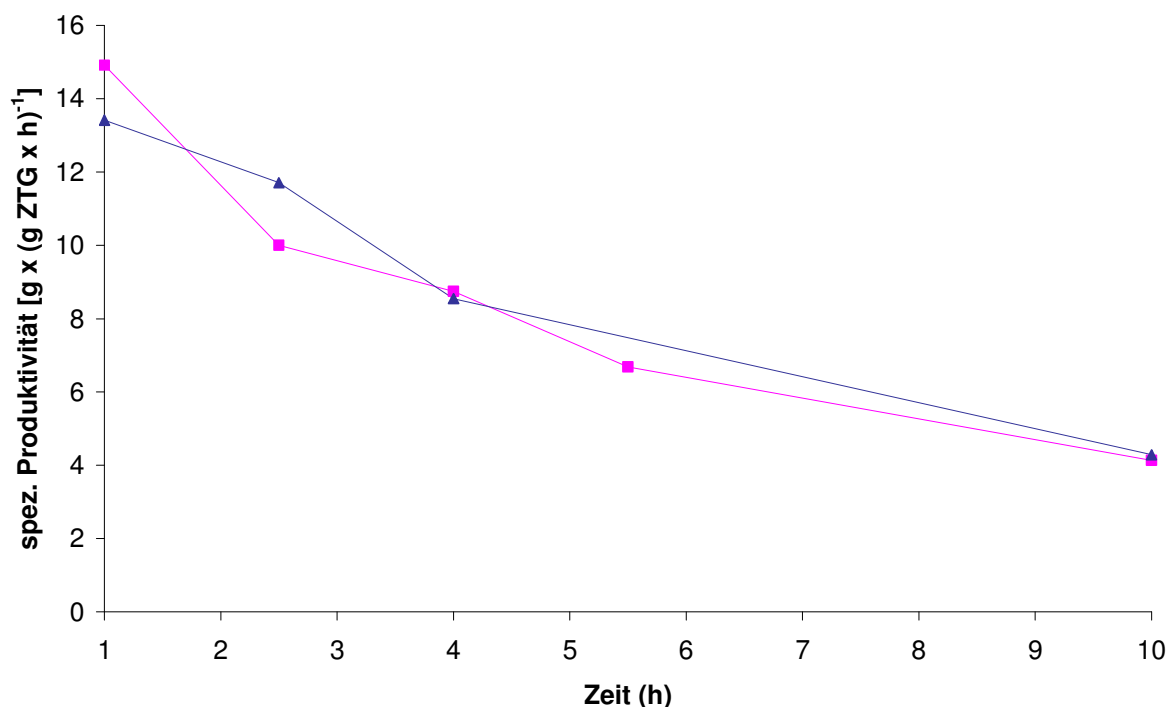
## 2. Auswirkung der NAD(P)(H)-Pool Erhöhung auf die Produktivität bei Ganzzellbiotransformationen

Bei der Mannitolbiotransformation mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* sank die Ausgangsproduktivität schon nach 6 h um 50 % (Kaup, 2004). Dieser Produktivitätsabfall wurde auf den intrazellulären NAD(H)-Abbau zurückgeführt. Die Limitierung durch NAD(H) konnte durch Supplementierung mit extrazellulärem NAD<sup>+</sup>

bestätigt werden (Kaup, 2004), da daraufhin die Produktivität wieder anstieg. Durch die Erhöhung des NAD(H)-Pools, welche durch Überexpression der Gene *pncB* und *nadE* erreicht wurde, konnte der NAD(H)-Pool um das Siebenfache gesteigert werden. Die Stämme mit erhöhtem NAD(H)-Pool sollten dementsprechend länger eine hohe Produktivität bei Ganzzellbiotransformationen behalten.

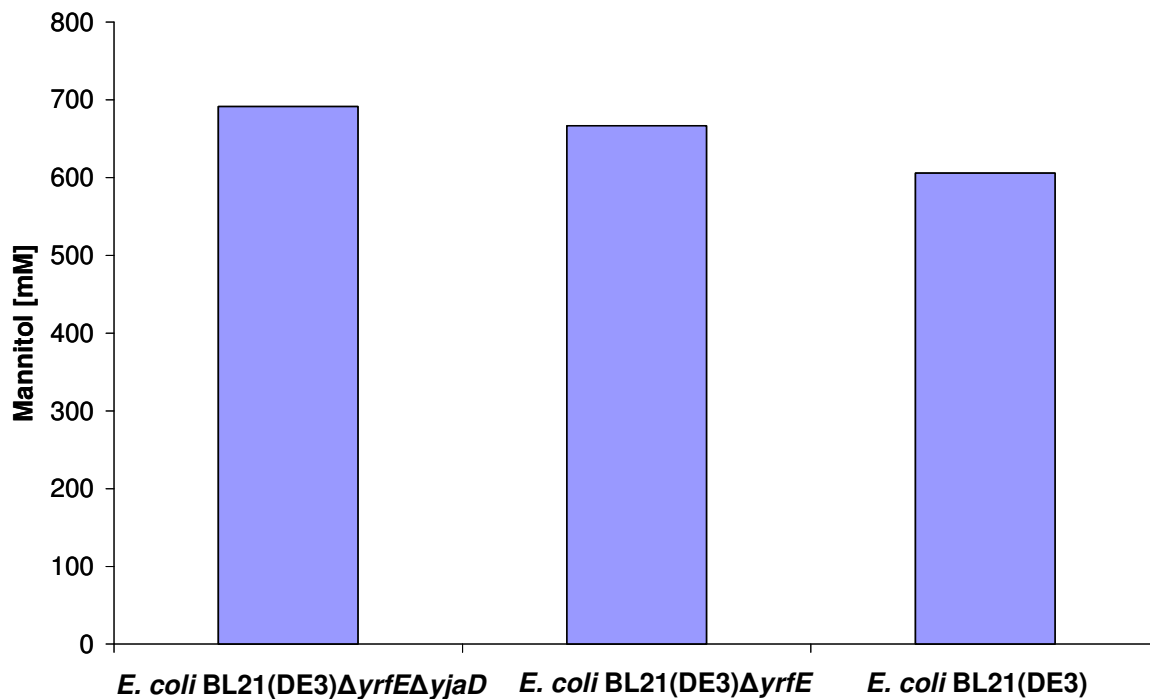
## 2.1 D-Mannitolproduktivität der Stämme *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* und *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* mit Plasmiden pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf*

Die Deletionsmutanten der NADH Pyrophosphatasen *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* und *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* wurden in der Ganzzellbiotransformation zur D-Mannitolgewinnung daraufhin getestet, ob eine stabilere Produktion über einen längeren Zeitraum damit möglich wäre. Hierzu wurden die Plasmide pET24a(+)-*fdh-mdh* und pZY507-*glf* in die Stämme transformiert. Die Biotransformation wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Über einen Zeitraum von 10 h wurden Proben genommen, um die gebildete D-Mannitolmenge zu quantifizieren. Daraus wurde die spezifische Produktivität ermittelt (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13:** Spezifische D-Mannitolproduktivität ( $\text{g} \times (\text{g} \text{ Zelltrockengewicht} \times \text{h})^{-1}$ ) der Stämme *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* (■), *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* (▲) mit den Plasmiden pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf*.

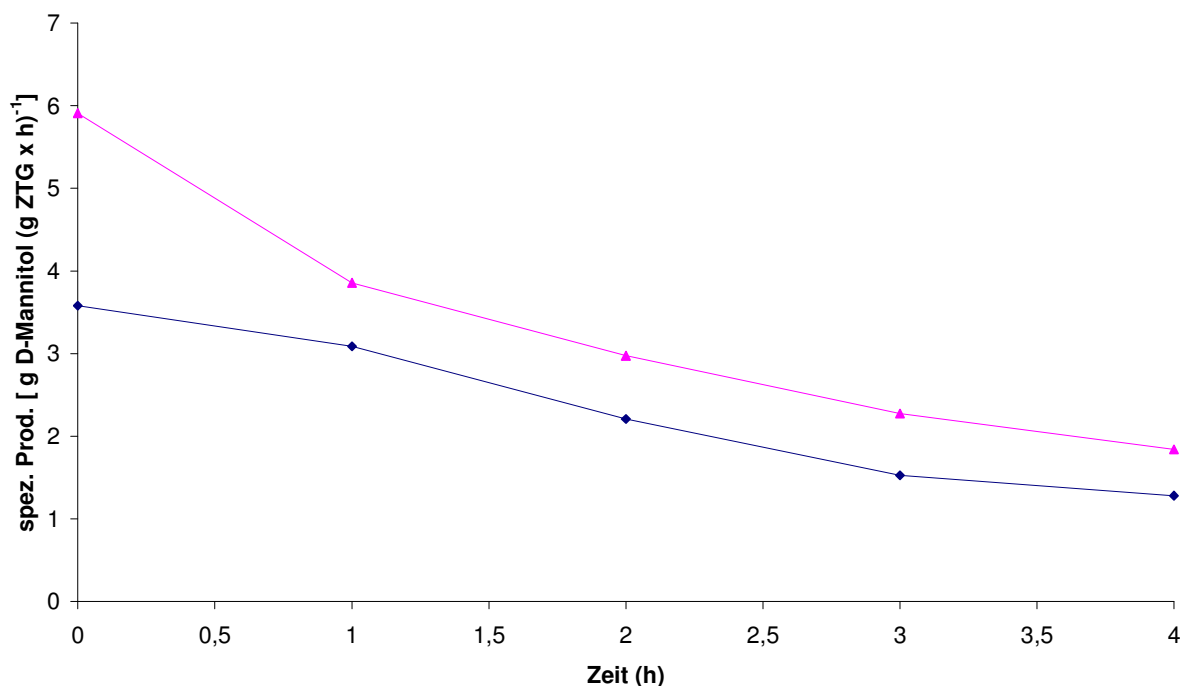
Die Stämme *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* und *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* entwickelten hohe Anfangsproduktivitäten von 15 bzw. 13,5 g D-Mannitol x (g Zelltrockengewicht x h)<sup>-1</sup>. Nach 10 h Biotransformation hatte die Doppeldeletionsmutante  $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* 690 mM D-Mannitol, die Einfachdeletionsmutante  $\Delta$ *yrfE* 670 mM D-Mannitol und der Stamm *E. coli* BL21(DE3) 605 mM D-Mannitol (Kaup, 2004) gebildet (Abb. 3.14). Demnach wurde die Produktivität durch Deletion der beiden Gene nicht signifikant gesteigert. Nach 6 h Biotransformation hatten sowohl Einfach- als auch Doppeldeletionsmutanten ca. 50 % ihrer spezifischen Aktivität verloren, was auch bei *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* zu beobachten war (Kaup, 2004). Da der NAD(H)-Pool die Langzeitproduktivität der D-Mannitolbiotransformation limitierte, konnte demnach durch die Deletion der beiden NADH-Pyrophosphatasegene keine signifikante Stabilisierung des NAD(H)-Pools erreicht werden.



**Abb. 3.14:** D-Mannitolmengen (mM), welche durch die Stämme *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* und *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* mit Plasmiden pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* nach 10 h Biotransformation gebildet wurden.

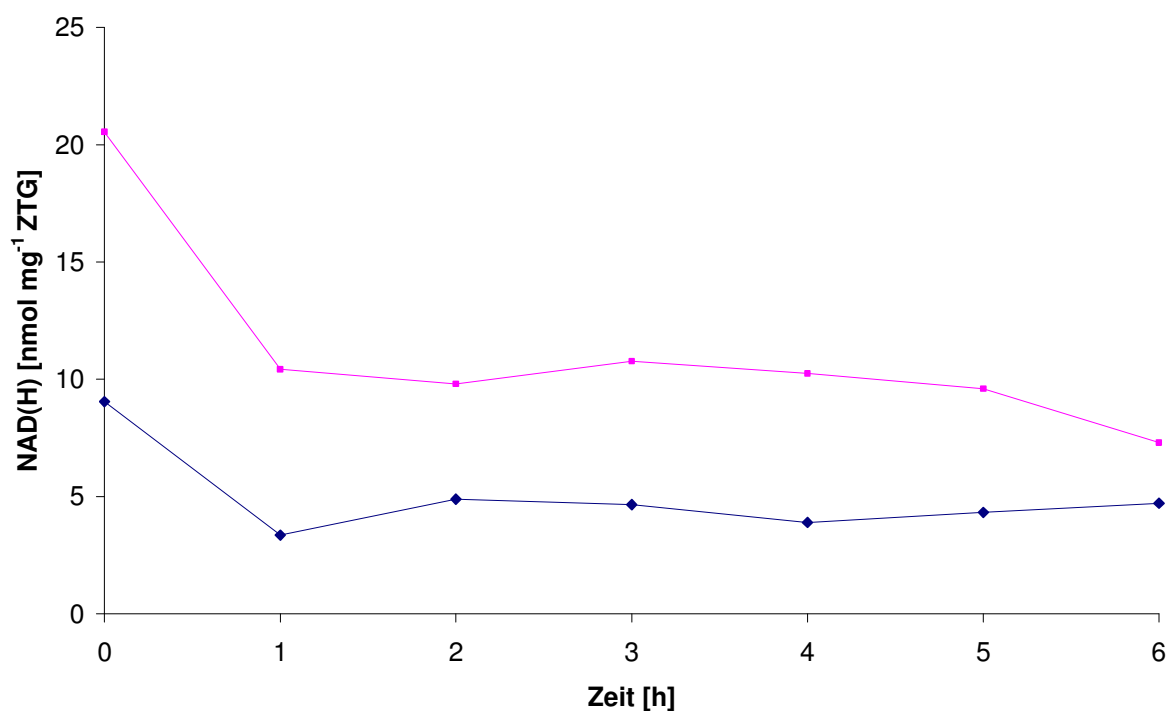
## 2.2 D-Mannitolproduktivität von *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh*; pZY507-*glf*; pET24a(+)-*pncB* mit Überexpression von *pncB*

Durch die Überexpression des *pncB*-Gens im Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*pncB* konnte eine Verdopplung der intrazellulären NAD(H)-Konzentration erzielt werden (Abb. 3.8). Nun sollte untersucht werden, wie sich der erhöhte NAD(H)-Pool auf die D-Mannitolbildung in der Biotransformation auswirkte. Hierzu wurde pET24a(+)-*pncB* mit den Plasmiden pCDF-*fdh-mdh* und pZY507-*glf* in den Stamm *E. coli* BL21(DE3) kotransformiert. Der Einfluss des erhöhten NAD(H)-Pools auf die Produktivität wurde untersucht (Abb. 3.15). Die Biotransformation wurde unter nicht pH-statischen Bedingungen im Erlenmeyerkolben (30° C, 170 Upm) durchgeführt. Durch den Verbrauch von Formiat kam es mit der Zeit zu einer Alkalisierung des Mediums bis auf pH 7,5. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, dass nur die Säure die Zellmembran passieren kann, während dass Formiatanion nicht membrangängig ist (Cherrington et al., 1991). Der  $pK_S$  von Ameisensäure beträgt 3,7. Durch die Alkalisierung des Mediums sank folglich der membrangängige Säureanteil, so dass intrazellulär weniger Formiat zur Verfügung stand, weshalb die Produktivität sank.



**Abb. 3.15:** Spezifische D-Mannitolproduktivität der Stämme *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* ohne (■) und mit Plasmid pET24a(+)-*pncB* (◆), (Biokatalyse im Schüttelkoben, nicht pH-statisch).

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* erreichte in der ersten Stunde eine Produktivität von 5,9 g D-Mannitol (g Zelltrockengewicht x h)<sup>-1</sup>. Die Anfangsproduktivität des Stammes mit *pncB*-Überexpression lag anfänglich bei 3,6 g D-Mannitol (g Zelltrockengewicht x h)<sup>-1</sup>. Die niedrigen Produktivitäten beider Stämme im Vergleich zu vorab gemessenen Produktivitäten (Abb. 3.13) waren auf niedrigere Aktivitäten der Formiat-Dehydrogenase und der Mannitol-Dehydrogenase zurückzuführen. Die Produktivität beider Stämme fiel mit fortlaufender Inkubationsdauer gleichermaßen ab, wobei die Produktivität des Stammes ohne *pncB*-Überexpression stets höher war. Es wurde vermutet, dass das Sinken der Produktivität zum einen mit dem Verlust an NAD(H) zusammenhing, zum anderen die Produktivität durch die langsame Alkalisierung des Mediums fiel. Die Konzentration des NAD(H)-Pools wurde über den Verlauf der Biotransformation ermittelt (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16:** NAD(H)-Pool von *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* ohne (♦) und mit Überexpression von *pncB* (■) in der Biotransformation (Biokatalyse im Schüttelkolben unter nicht pH-statischen Bedingungen).

Zu Beginn der Biotransformation lag der NAD(H)-Pool beim Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh*; pZY507-*glf*; pET24a(+)-*pncB* bei 20 nmol mg<sup>-1</sup> Zelltrockengewicht und bei *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* bei 9 nmol mg<sup>-1</sup> Zelltrockengewicht. Innerhalb der ersten Stunde fiel der Pool bei beiden Stämmen um ca. 50 % und stabilisierte

sich für die folgenden Stunden auf diesem Niveau. Dieses Experiment zeigte deutlich, dass die Überexpression von *pncB* zu einer Erhöhung des NAD(H)-Pools geführt hatte und dass auch über einen langen Zeitraum der Biotransformation ein erhöhter NAD(H)-Pool aufrechterhalten werden konnte. Allerdings war die Produktivität des Stammes mit *pncB*-Überexpression deutlich niedriger. Ein Vergleich der Enzymaktivitäten der Fdh und der Mdh aus verschiedenen Biotransformationsexperimenten zeigte, dass bei Überexpression von *pncB* stets die Aktivität der Fdh vermindert war. Es wurde vermutet, dass das hohe Expressionsniveau von *pncB* sich negativ auf das Expressionslevel der *fdh* auswirkte (Tabelle 3.4). Im Vergleich zu anderen Biotransformationen, die unter pH-statischen Bedingungen durchgeführt wurden, stabilisierte sich in diesem Experiment der NAD(H)-Pool nach einer Stunde. Dieses hing mit der Alkalisierung des Mediums und dem damit zusammenhängenden Rückgang der Produktivität zusammen.

**Tab. 3.4:** Enzymaktivitäten der Mannitol-/ Formiat-Dehydrogenase und der Nikotinsäurephosphoribosyl-Transferase in *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh*; pZY507-*glf*; pET24a(+)-*pncB* (*fmg* + *pncB*) bzw. *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* (*fmg*).

Messung	Mannitol- Dehydrogenase (U mg <sup>-1</sup> Protein)		Formiat- Dehydrogenase (U mg <sup>-1</sup> Protein)		NAPRTase (U mg <sup>-1</sup> Protein)	
	<i>fmg</i> + <i>pncB</i>	<i>fmg</i>	<i>fmg</i> + <i>pncB</i>	<i>fmg</i>	<i>fmg</i> + <i>pncB</i>	<i>fmg</i>
1	6,3	7,6	0,72	1,73	n.b.	n.b.
2	2,06	1,02	0,46	0,71	n.b.	n.b.
3	2,09	2,57	0,3	0,42	0,01	n.d.
4	3,07	2,37	0,34	0,74	0,02	n.d.
5	4,0	2,78	0,38	0,4	0,02	n.d.

n.b.: nicht bestimmt, n.d.: nicht detektiert

In mehreren Biotransformationen konnte gezeigt werden, dass *pncB*-Überexpression das Expressionsniveau der *fdh* herabsetzte. Aufgrund der niedrigen Fdh-Aktivitäten konnte somit nicht geklärt werden, ob der erhöhte NAD(H)-Pool einen positiven Effekt auf die Produktivität hatte. Deshalb wurde beschlossen, das *pncB*-Gen ins Genom von *E. coli*

BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* zu integrieren, um das Expressionslevel von *pncB* herabzusetzen. Hierzu wurde das Gen samt T7-Promotor aus dem Vektor pET24a(+)-*pncB* amplifiziert und in den Genlocus von *yjaD* integriert. Somit wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD*::*pncB* konstruiert.

### 2.3 D-Mannitolproduktivität von *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD*::*pncB* pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf*

Durch genomische Integration von *pncB* wurde das Ziel verfolgt, einen Stamm zu konstruieren, der sowohl einen erhöhten NAD(H)-Pool aufwies und zudem die gleichen Expressionslevel für die *fdh* und die *mdh* aufwies wie der Stamm *E. coli* BL21(DE3). Es konnte gezeigt werden, dass der Stamm *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD*::*pncB* die gleiche NAD(H)-Pool-Konzentration aufwies wie der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*pncB* (Tabelle 3.3). Das Expressionslevel von *pncB* konnte soweit gesenkt werden, dass die Expressionslevel der Formiat-Dehydrogenase und der Mannitol-Dehydrogenase nicht mehr vermindert waren (Tabelle 3.5).

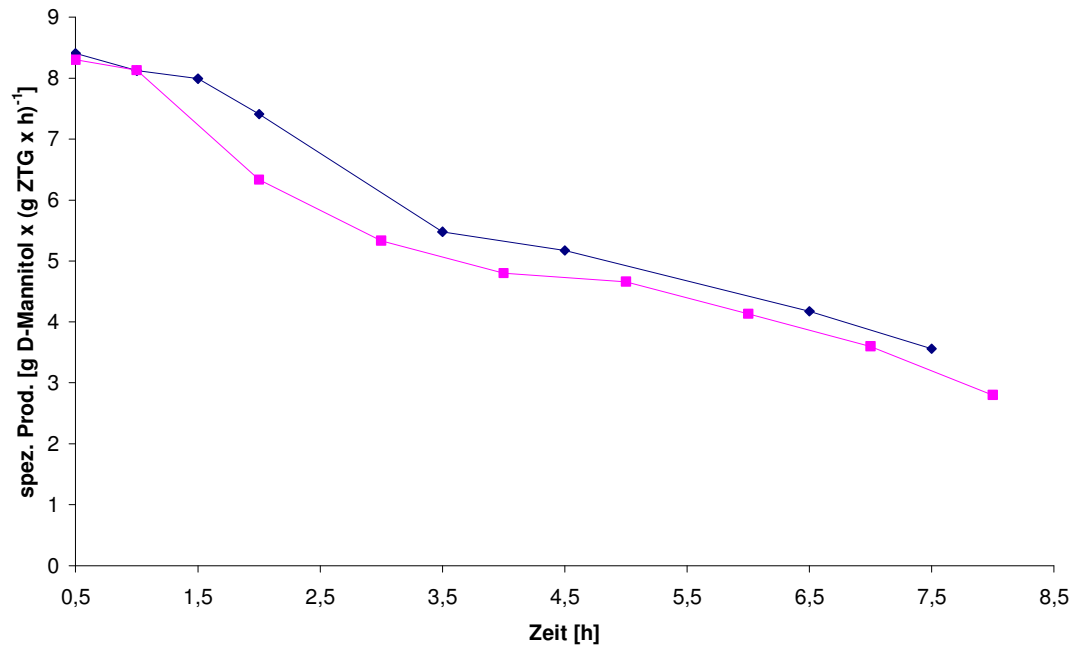
**Tab. 3.5:** Aktivitäten der Formiat-Dehydrogenase und der Mannitol-Dehydrogenase in *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD*::*pncB* pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* und *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf*.

Stamm	Formiat-Dehydrogenase (U mg <sup>-1</sup> Protein)	Mannitol-Dehydrogenase (U mg <sup>-1</sup> Protein)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yrfE</i> $\Delta$ <i>yjaD</i> :: <i>pncB</i> pET24a(+)- <i>fdh-mdh</i> ; pZY507- <i>glf</i>	1,2	8,9
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET24a(+)- <i>fdh-mdh</i> ; pZY507- <i>glf</i>	1,3	9,5

Mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD*::*pncB* pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* sollte nun untersucht werden, ob durch den erhöhten NAD(H)-Pool eine höhere D-Mannitolproduktivität erzielt würde und ob die Produktivität über einen längeren Zeitraum im

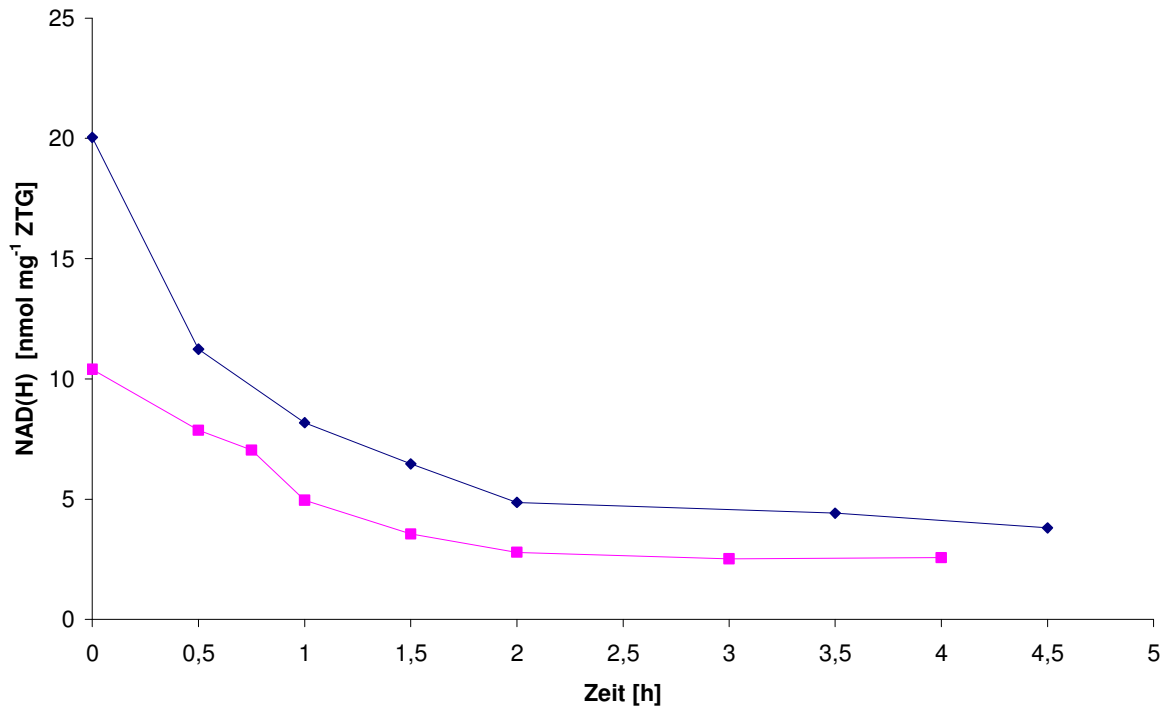


Vergleich zu *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* stabil gehalten werden könnte (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17:** D-Mannitolproduktivität der Stämme *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD*::*pncB* pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* (◆) und *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* (■).

Die Erhöhung des NAD(H)-Pools durch genomische Integration von *pncB* führte nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Produktivität. Die ähnlichen Produktivitäten beider Stämme verdeutlichten, dass durch genomische Integration von *pncB* das Ziel erreicht werden konnte, die Enzymaktivitäten und somit die Produktivitäten beider Stämme anzugleichen. Die Produktivität beider Stämme fiel gleichermaßen schnell ab. Dies deutete an, dass die NAD(H)-Poolerhöhung nicht zu einer Stabilisierung der Produktivität geführt hatte. Parallel zu den D-Mannitolproduktivitäten wurden auch die NAD(H)-Poolgrößen beider Stämme bestimmt (Abb. 3.18).



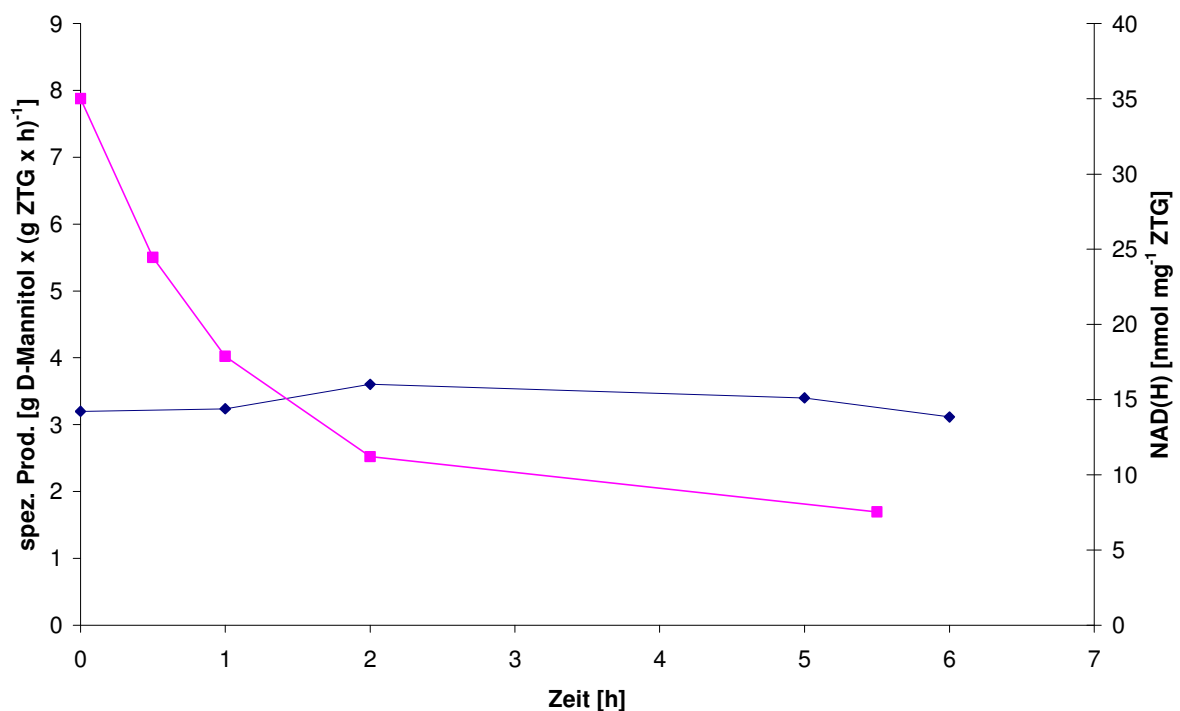
**Abb. 3.18:** NAD(H)-Pool der Stämme *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yaD*::*pncB* pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* (♦) und *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* (■) in der Biotransformation unter pH-statischen Bedingungen.

Sowohl bei *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yaD*::*pncB* pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* als auch bei *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* fiel der NAD(H)-Pool nach 2 h um 70 % ab, woraufhin sich die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration stabilisierte. Der stärkere Abfall der NAD(H)-Konzentration im Vergleich zu Abb. 3.16 ist darauf zurückzuführen, dass der pH-Wert konstant bei 6,5 gehalten wurde, wodurch der Anteil membranpermeablen protonierten Formiats hochgehalten wurde. Dies äußerte sich in einer höheren Produktivität als auch in einem stärkeren Verlust an NAD(H). Dieses Ergebnis lieferte ein Indiz dafür, dass die Höhe der Produktivität mit dem Sinken des NAD(H)-Pools im Zusammenhang stand. Über den gesamten Zeitraum der Biotransformation konnte ein erhöhter NAD(H)-Pool durch *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yaD*::*pncB* pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* aufrechterhalten werden. Trotz des erhöhten NAD(H)-Pools konnte die Produktivität weder erhöht noch stabilisiert werden. Der NAD(H)-Pool lag mit 5 bzw 3 nmol mg<sup>-1</sup> Zellrockengewicht nach 2 h, welches bei einem angenommenen Cytoplasmavolumen von 2  $\mu$ l mg<sup>-1</sup> Zellrockengewicht (Cayley et al., 2000) 2,5 bzw 1,5 mM entspricht, deutlich über den  $K_M$ -Konzentrationen, welche für die Formiat-Dehydrogenase (0,0035 mM; Galkin et al., 1995) und die Mannitol-Dehydrogenase (0,093 mM; Kaup 2004) bestimmt wurden. Somit kommt es zur Limitierung

durch NAD(H), obwohl der Gesamtpool an NAD(H) in der Zellpopulation noch ausreichen müsste, um maximale Produktivitäten zu erreichen. Im nachfolgenden Experiment sollte der *E. coli* Stamm getestet werden, bei dem durch Überexpression der Gene *pncB* und *nadE* die größte NAD(H)-Poolsteigerung erzielt werden konnte.

#### 2.4 D-Mannitolproduktivität von *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh-nadE*; pET24a(+)-*pncB*; pZY507-*glf*

Die gekoppelte Überexpression der Gene *nadE* und *pncB* hatte die NAD(H)-Poolgröße um den Faktor sieben erhöht. Nun wurde bestimmt, welchen Einfluss ein so hoher NAD(H)-Pool auf die Produktivität von D-Mannitol hatte. Hierzu wurden die Gene *fdh*, *mdh*, *glf*, *pncB* und *nadE* in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert und eine Biotransformation unter Standardbedingungen durchgeführt. Dabei wurden die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration und die D-Mannitolproduktivität pro Zeiteinheit quantifiziert (Abb. 3.19).



**Abb. 3.19:** D-Mannitolproduktivität (♦) und NAD(H)-Poolgröße (■) des Stammes *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh-nadE*; pET24a(+)-*pncB*; pZY507-*glf*.

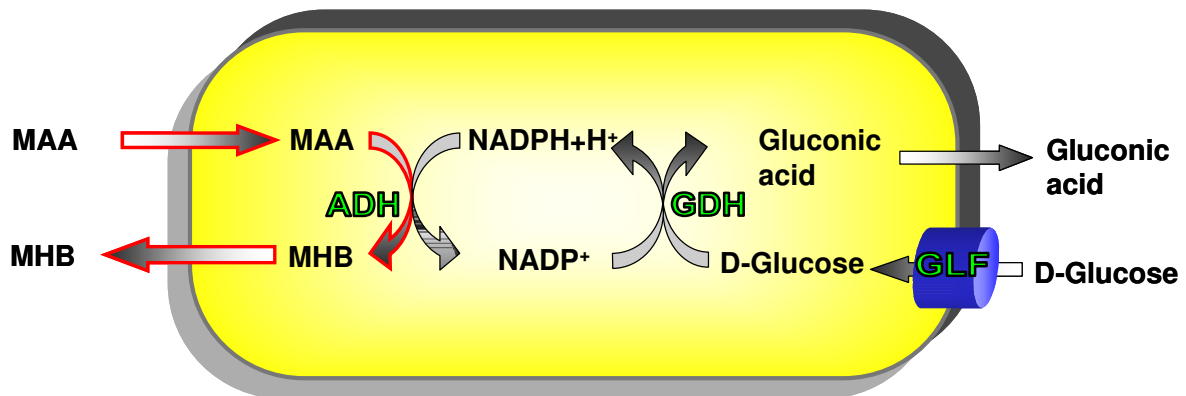
Die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration von *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh-nadE*; pZY507-*glf*; pET24a(+)-*pncB* betrug zu Beginn der Biotransformation 35 nmol mg<sup>-1</sup> ZTG. Auch bei diesem Stamm fiel der NAD(H)-Pool stark ab und erreichte nach 5,5 h eine Größe

von 7,5 nmol mg<sup>-1</sup> Zelltrockengewicht. Über einen Zeitraum von 6 h wurden nahezu konstante Produktivitäten von ca. 3 g D-Mannitol (g Zelltrockengewicht x h)<sup>-1</sup> erreicht. Die Anfangsproduktivität war jedoch deutlich vermindert gegenüber dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf*, der eine Anfangsproduktivität von 8 g D-Mannitol (g Zelltrockengewicht x h)<sup>-1</sup> erreichte (Abb. 3.17). Da bereits bei Überexpression von *pncB* ein Sinken der Aktivitäten der Formiat-Dehydrogenase und der Mannitol-Dehydrogenase festgestellt wurde (Tab. 3.4), war anzunehmen, dass durch die zusätzliche Überexpression von *nadE* die Aktivitäten der Produktionsenzyme noch stärker sanken, wodurch die niedrige Produktivität zu erklären ist. Die stabile Produktivität über den Zeitraum von 6 h deutete an, dass es in diesem Zeitraum nicht zu einer Limitierung der Produktivität durch NAD(H) kam.

## 2.5 Einfluss des NAD(P)(H)-Pools auf die Geschwindigkeit der Biotransformation von Methylacetoacetat zu (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat

Bei der Biotransformation von D-Fruktose zu D-Mannitol durch den Stamm *E. coli* BL21(DE3)Δ*yrfE*Δ*yjaD*::*pncB* pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* konnte keine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden, obwohl die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration verdoppelt werden konnte. Der Grund hierfür lag in den niedrigen K<sub>M</sub>-Werten der Formiat-Dehydrogenase für NAD<sup>+</sup> und der Mannitol-Dehydrogenase für NADH, welche weit unterhalb der intrazellulären NAD(H)-Konzentration lagen. Im Gegensatz zur Formiat-Dehydrogenase mit einem K<sub>M</sub>-Wert von 0,035 mM (Galkin et al., 1995) hatte die Glukose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis*, welche zur Kofaktorregenerierung bei der Biotransformation von Methylacetoacetat zu (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat eingesetzt wurde hohe K<sub>M</sub>-Werte von 0,23 mM für NAD<sup>+</sup> und 0,26 mM für NADP<sup>+</sup> (Fujita et al., 1977). Bei einer NAD<sup>+</sup>-Konzentration von 0,8 mM und einer NADP<sup>+</sup>-Konzentration von 0,05 mM in *E. coli* (Penfound und Foster 1996) müsste eine Erhöhung der intrazellulären NAD(P)(H)-Konzentration zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit führen. Die Reduktion von Methylacetoacetat zu (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat wurde durch eine Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* katalysiert. Dieses Enzym besaß einen K<sub>M</sub>-Wert von 1,6 mM für NADH und 0,0038 mM für NADPH (Tan, 2006). Wegen des niedrigen K<sub>M</sub>-Wertes der Alkohol-Dehydrogenase für NADPH ist davon auszugehen, dass der in diesem Biotransformationssystem genutzte Kofaktor vorzugsweise NAD(P)(H) ist. Da

unphosphorylierte D-Glukose Substrat der Glukose-Dehydrogenase ist, D-Glukose jedoch überwiegend über das spezifische Glukose-Phosphotransferase-System phosphoryliert in die Zelle gelangt (Postma, 1996), wurde auch hier neben der Alkohol-Dehydrogenase und der Glukose-Dehydrogenase der Glukosefacilitator aus *Zymomonas mobilis* überexprimiert (Abb. 3.20).



**Abb. 3.20:** Biotransformationssystem zur Reduktion von Methylacetoacetat zu (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat mittels Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*. Die Kofaktorregenerierung erfolgte über Glukoseoxidation mittels der Glukose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis*. Der Import unphosphorylierter Glukose wurde durch den Glukosefacilitator aus *Zymomonas mobilis* ermöglicht.

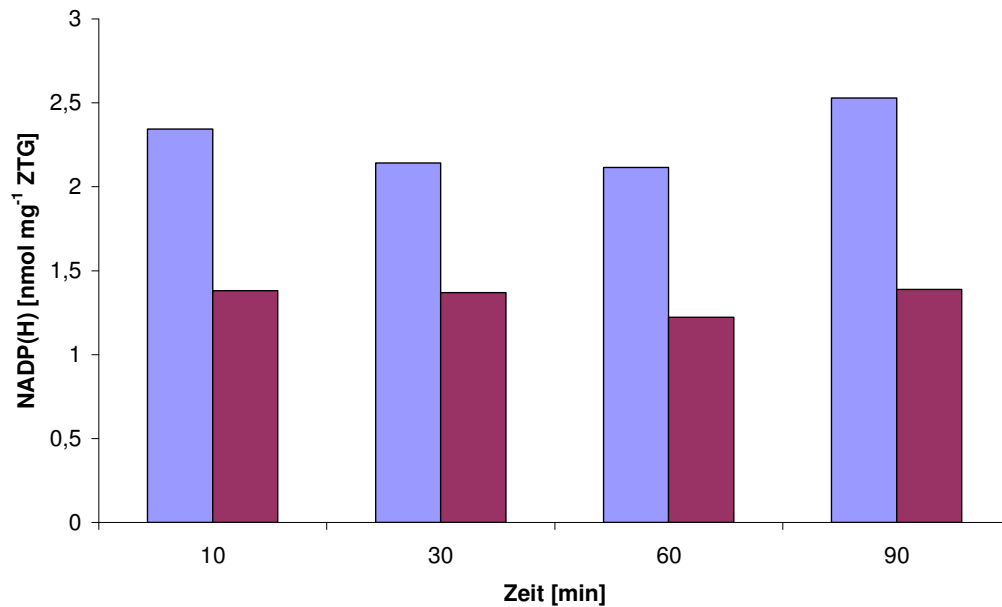
Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ yrfE $\Delta$ yaD::pncB pBTac-Lbadh-gdh; pZY507-glf sollte aufgrund der doppelt so hohen NADP(H)-Konzentration von 0,45 mM im Vergleich zu *E. coli* BL21(DE3) pBTac-Lbadh-gdh; pZY507-glf mit 0,2 mM NADP(H) eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit in der Biotransformation von Methylacetoacetat zu (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat leisten. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden fünf vergleichende Biotransformationen mit beiden Stämmen durchgeführt. Gleichzeitig wurden die Enzymaktivitäten der Glukose-Dehydrogenase und der Mannitol-Dehydrogenase bestimmt, um ausschließen zu können, dass Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit aus unterschiedlichen Enzymaktivitäten resultierten. Zusätzlich wurde eine Biotransformation durchgeführt, bei der die Zellen nicht induziert wurden, um die unspezifische Aktivität der Methylacetoacetatreduktion zu bestimmen (Tab. 3.6).

**Tab. 3.6:** Darstellung von Enzymaktivitäten der Alkohol-Dehydrogenase und der Glukose-Dehydrogenase sowie der spezifischen (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat (MHB)-Produktivität in fünf voneinander unabhängigen Biotransformationen. In der ersten Spalte ist die Reihenfolge der Biotransformationen zusammen mit einem Kontrollexperiment, bei dem nicht-induzierte Zellen verwendet wurden, aufgetragen. Spalte 2 enthält die *in vitro* Enzymaktivitäten der Glukose-Dehydrogenase der Stämme *E. coli* BL21(DE3) pBTac-*Lbadh-gdh*; pZY507-*glf* (Nr. 1) und *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yaD*::*pncB* pBTac-*Lbadh-gdh*; pZY507-*glf* (Nr. 2) mit dem Kofaktor NADP<sup>+</sup>. In Spalte 3 sind die *in vitro* Enzymaktivitäten der Alkohol-Dehydrogenase für beide Stämme aufgetragen. Spalte 4 zeigt die spezifische MHB-Produktivität des nicht mutierten Stammes (Nr. 1) und des Stammes mit erhöhtem NADP(H)-Pool (Nr. 2).

Biotransformation	Gdh/NADP <sup>+</sup> (U mg <sup>-1</sup> Protein)		Adh/NADPH (U mg <sup>-1</sup> Protein)		Spez. Produktivität [mmol MHB (g ZTG) <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	
	1	2	1	2	1	2
1	1,60	2,30	12,00	22,00	4,83	11,55
2	4,40	4,90	14,90	7,10	4,43	5,29
3	4,26	4,20	18,70	18,97	7,70	7,34
4	4,72	4,13	24,62	23,71	7,44	5,68
5	4,21	4,05	22,89	22,26	5,00	4,34
Kontrolle	0,04	0,04	0,21	0,23	0,74	0,84

In Biotransformation Nr. 1 und Nr. 2 erzielte der Stamm *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yaD*::*pncB* pBTac-*Lbadh-gdh*; pZY507-*glf* höhere Produktivitäten als der Kontrollstamm. In Biotransformation Nr. 3 bis Nr. 5 waren die Produktivitäten von *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yaD*::*pncB* pBTac-*Lbadh-gdh*; pZY507-*glf* gegenüber der Kontrolle leicht erniedrigt. In Biotransformation Nr. 3 hatten beide Stämme nahezu identische Aktivitäten der Adh und der Gdh. Hier war die Produktivität beider Stämme identisch. Daraus muss geschlossen werden, dass der große Produktivitätsunterschied in Biotransformation Nr. 1 in erster Linie auf divergierende Enzymaktivitäten zurückzuführen war. In diesem Biotransformationssystem war der NADP(H)-Pool offensichtlich nicht der limitierende Faktor. Wahrscheinlich wurde die Produktivität in erster Linie durch den Import der Metabolite limitiert, vermutlich D-Glukose, weil die Glukose-Dehydrogenase einen sehr hohen  $K_M$ -Wert für D-Glukose von 42,9 mM besitzt (Fujita et al., 1977).

Während der Biotransformation wurden Zellproben eingefroren, bei denen später die intrazelluläre NADP(H)-Konzentration bestimmt wurde. Es zeigte sich, dass bei *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD::pncB* pBTac-*Lbadh-gdh*; pZY507-*glf* der NADP(H)-Pool über den gesamten Zeitraum der Biotransformation gegenüber der Kontrolle erhöht war. Der NADP(H)-Pool war über einen Zeitraum von 90 min stabil (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21:** NADP(H)-Pool ruhender Zellen von *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD::pncB* pBTac-*Lbadh-gdh*; pZY507-*glf* (blaue Balken) und *E. coli* BL21(DE3) pBTac-*Lbadh-gdh*; pZY507-*glf* (rote Balken) bei der Biotransformation von Methylacetoacetat zu (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat.

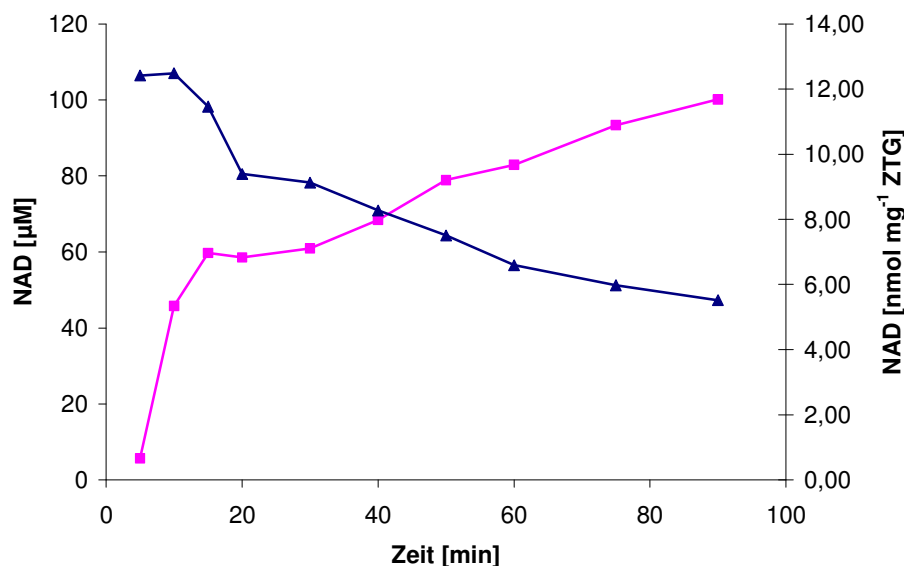
### 3. Ursachen für das Sinken der intrazellulären NAD(H)-Konzentration in der Ganzzellbiotransformation

Aus vorhergehenden Experimenten konnte geschlossen werden, dass hohe Produktivitäten mit einem schnellen Verlust an NAD(H) verbunden waren. Durch das Ansteigen der Mannitolproduktivität nach Supplementieren von NAD<sup>+</sup> konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass der NAD(H)-Pool die Langzeitproduktivität begrenzt (Kaup, 2004). Tatsächlich sank der NAD(H)-Pool in keiner Biotransformation auf eine Konzentration, welche die Produktivität begrenzen würde. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass nur einige Zellen der Gesamtpopulation NAD(H) verloren, während bei anderen Zellen der Pool stabil geblieben sein muss. Das heterogene Verhalten von Zellen in Zellpopulationen, z.B. bezüglich der Genexpression, wurde vor einiger Zeit publiziert (Mc Adams und Arkin, 1997; Elowitz et al. 58

2002). Der folgende Teil beschäftigt sich mit der Fragestellung, wie der NAD(H)-Verlust erfolgt und welche Parameter dafür verantwortlich sind.

### 3.1 Nachweis von extrazellulärem NAD(H) bei der Ganzzellbiotransformation

Die hohe Stabilität des NAD(H)-Pools in ruhenden Zellen von *E. coli* in Kalium-Phosphat-Puffer (Abb. 3.5) im Vergleich zum raschen Verlust von NAD(H) in der Biotransformation ließen darauf schließen, dass der NAD(H)-Abbau nicht durch Enzyme katalysiert wurde. Eine partielle Membranpermeabilisierung wurde bereits in der Vergangenheit diskutiert und als verantwortlich für den Kofaktorverlust ruhender Zellen von *E. coli* vermutet (Walton und Stewart, 2004; Kaup, 2004). Die Membranpermeabilisierung sollte durch die hohe Konzentration von Formiat in der Biotransformation hervorgerufen werden (Kaup, 2004). Wenn es zu einer Membranpermeabilisierung kommt, müsste NAD(H) im Überstand nachzuweisen sein. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde eine Standardbiotransformation mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD*::*pncB* pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* durchgeführt, wobei eine Zelldichte von 14,5 g Zelltrochgewicht l<sup>-1</sup> gewählt wurde, um extrazelluläres NAD(H) mittels HPLC nachweisen zu können. Über einen Zeitraum von 90 min wurde regelmäßig die intrazelluläre und die extrazelluläre NAD(H)-Konzentration bestimmt (Abb. 3.22).



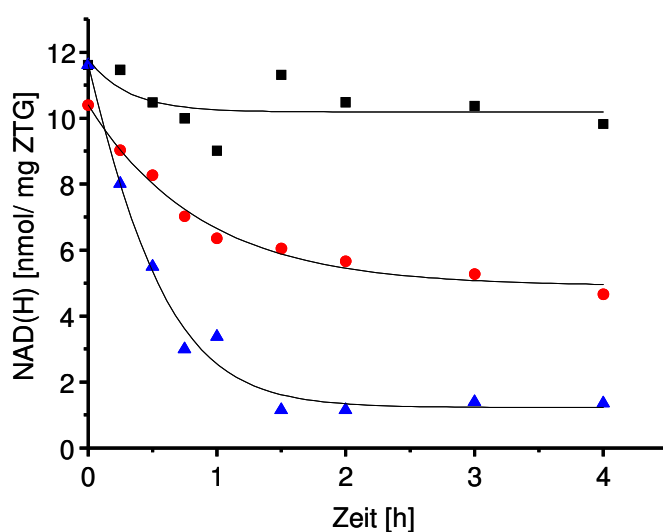
**Abb. 3.22:** Intrazelluläre (▲) [nmol mg<sup>-1</sup> ZTG] und extrazelluläre (■) [µM] NAD(H)-Konzentration während der Biotransformation mit *E. coli* BL21(DE3)  $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD*::*pncB* pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf*.



Bereits wenige Minuten nach Beginn der Biotransformation konnte NAD(H) im Medium nachgewiesen werden. Der Anstieg der extrazellulären NAD(H)-Konzentration und der Abfall der intrazellulären NAD(H)-Konzentration verhielten sich umgekehrt proportional zueinander. Demnach war das Ausströmen von NAD(H) durch permeabilisierte Zellmembranen, welche normalerweise kein NAD(H) passieren lassen, der Hauptgrund für den Verlust von intrazellulärem NAD(H). Ziel nachfolgender Untersuchungen war die Identifizierung der Parameter, welche die Zellpermeabilisierung verursachten. Dass es im Zuge der Biotransformation zu einer Schädigung der Membran kommt, konnte durch Experimente des Kooperationspartners (InnoSweet, Braunschweig) bestätigt werden.

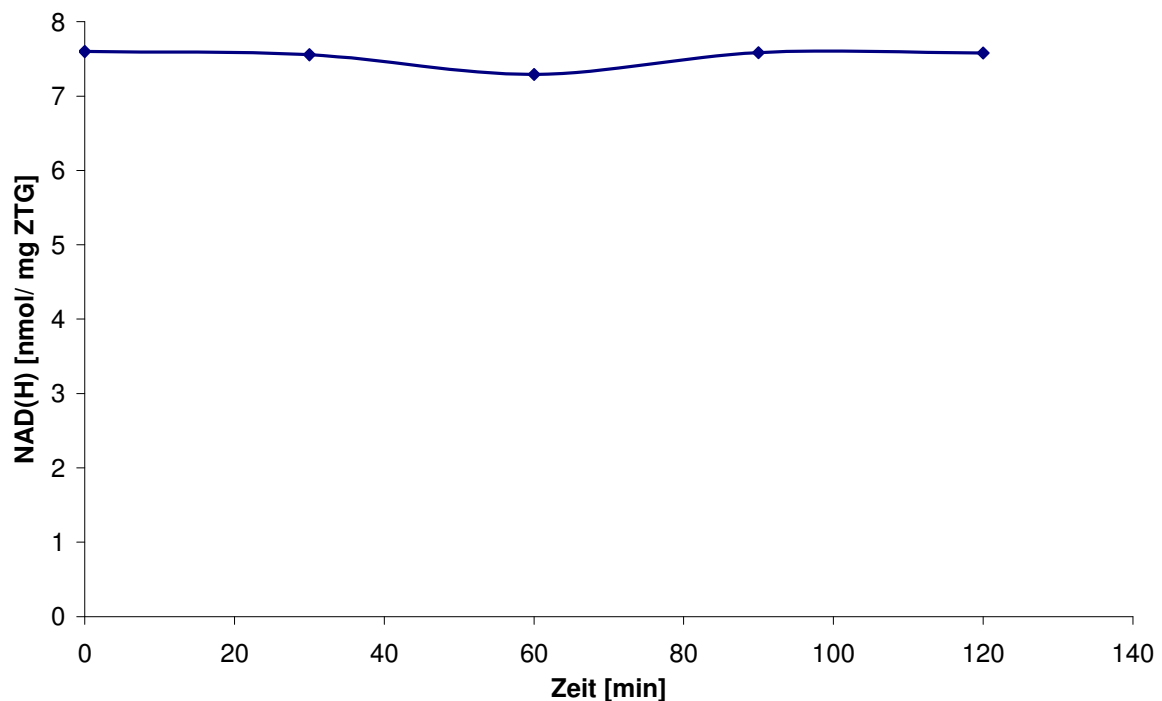
### 3.2 Einfluss des Formiats auf die Stabilität des NAD(H)-Pools

Formiat ist als cytotoxische Substanz bekannt, welche das Wachstum von *E. coli* inhibieren kann. Als Ursachen wurden Störungen des Stofftransports und der Synthese von Makromolekülen sowie Veränderungen des cytoplasmatischen pH-Wertes festgestellt (Cherrington et al., 1991). Im Folgenden wurde der Einfluss unterschiedlicher Formiatkonzentrationen auf die Stabilität des NAD(H)-Pools ausgewirkt. Hierzu wurden Biotransformationen mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* durchgeführt, wobei die Formiatkonzentration zwischen 0 mM, 50 mM und 250 mM variiert wurde. Die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration wurde in allen drei Ansätzen über einen Zeitraum von vier Stunden ermittelt (Abb. 3.23).



**Abb. 3.23:** NAD(H)-Pool von *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* bei der Biotransformation mit verschiedenen Formiatkonz., 0 mM (■), 50 mM (●) und 250 mM (▲).

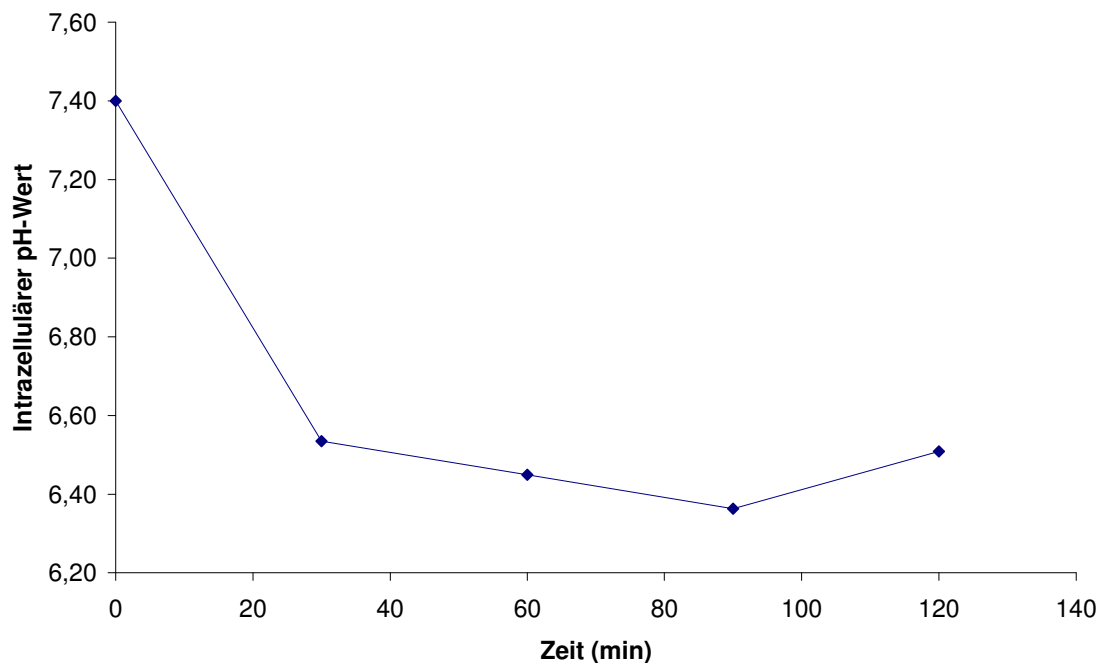
Das Absinken der intrazellulären NAD(H)-Konzentration steht im Zusammenhang mit der vorgelegten Menge an Formiat. Je höher die gewählte Konzentration an Formiat war, desto schneller sank der intrazelluläre Pool an NAD(H) ab. Dieses Experiment zeigte, dass die Stabilität des NAD(H)-Pools von der Formiatkonzentration abhing. Allerdings konnte durch dieses Experiment nicht gezeigt werden, ob Formiat durch seine chemischen Eigenschaften alleine eine Membranpermeabilisierung verursachte oder ob andere Parameter wie z.B. die Bildung von CO<sub>2</sub> bzw. D-Mannitol im Zusammenhang mit der Formiatkonzentration hierfür verantwortlich waren. Um den Einfluss von Formiat auf die Integrität der Zellmembran zu untersuchen, wurde *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* angezogen, ohne dass die Gene induziert wurden. Die Zellen wurden in Kalium-Phosphat-Puffer in Gegenwart von 250 mM Na-Formiat inkubiert (Abb. 3.24)



**Abb. 3.24:** Inkubation nicht-induzierter Zellen von *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* mit 250 mM Na-Formiat in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,5.

In Gegenwart von 250 mM Na-Formiat blieb der NAD(H)-Pool von *E. coli* unter diesen Bedingungen über wenigstens zwei Stunden stabil. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass Formiat alleine zu einem Abfall des intrazellulären NAD(H)-Pools führte. Wie auch durch eine andere Arbeit bestätigt wurde (Cherrington et al., 1991), blieb in Gegenwart von Formiat die Integrität der Zellmembran von *E. coli* gewahrt, so dass eine Diffusion von NAD(H) aus der Zelle ausgeschlossen werden konnte.

Es stellte sich nun die Frage, warum die Formiat-Konzentration von Bedeutung für die Stabilität des NAD(H)-Pools war, wenn Formiat selbst offensichtlich nicht zu einer Permeabilisierung der Zellen führte. Hierbei ist anzumerken, dass die D-Mannitol-Produktivität von *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* erst ab einer Formiatkonzentration von 250 mM maximal war. Da der  $K_M$ -Wert der Fdh von *M. vaccae* N10 für Formiat 6 mM beträgt (Galkin et al., 1995), ist die außen vorhandene Menge an Formiat offensichtlich nicht intrazellulär verfügbar. Da die Produktivität jedoch mit zunehmender Konzentration an Formiat zunahm, musste die intrazelluläre Konzentration von der extrazellulären Konzentration abhängen. Hierzu ist bekannt, dass Formiat als schwache Säure als Entkoppler des Protonengradienten wirkt (Cherrington et al., 1991). Nur die protonierte Form ist membrangängig und akkumuliert sich im Cytoplasma, sofern der pH-Wert des Mediums niedriger ist als der intrazelluläre pH-Wert. Mit der Zeit säuert das Cytoplasma an, weil pro importierten Moleküls Formiat ein Proton in die Zelle transportiert wird. Dies geschieht solange, bis der pH-Wert im Zellinneren den pH-Wert des Außenmediums angenommen hat. Über die Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Wertes während der Biotransformation wurde untersucht, ob dieses Phänomen auch bei *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* zu erkennen war. Der intrazelluläre pH-Wert sank innerhalb von 30 Minuten von pH 7,4 auf pH 6,5. Der intrazelluläre pH-Wert war somit identisch mit dem des Außenmediums (Abb. 3.25).

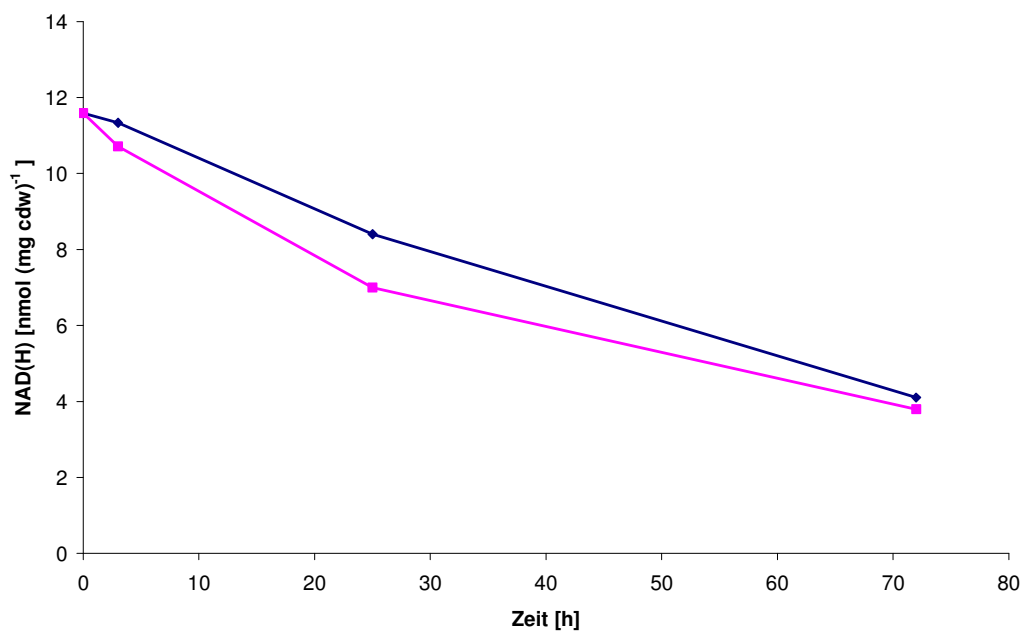


**Abb. 3.25:** Intrazellulärer pH-Wert von *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* während der Mannitolbiotransformation.

Die Ansäuerung des Cytoplasmas führt zu einem Verlust des transmembranen Protonengradienten (Eklund, 1983). Die Zelle kann somit kein ATP über die Atmungskette regenerieren und ist Energie limitiert. Dies könnte zum Zelltod führen und langfristig zur Lyse der Zellmembran. Offensichtlich ist dieses jedoch nicht der Grund für die rasche Zellpermeabilisierung während der Biotransformation, weil in Gegenwart von 250 mM Na-Formiat kein Verlust von intrazellulärem NAD(H) festgestellt wurde (Abb. 3.24).

### 3.3 Beteiligung der Formiat-Dehydrogenase an der Zellpermeabilisierung

Der zeitliche Zusammenfall von NAD(H)-Freisetzung ins Medium und dem Maximum der CO<sub>2</sub>-Entwicklung legten einen Zusammenhang beider Phänomene nahe. Es wurde vermutet, dass *E. coli* solch hohen CO<sub>2</sub>-Partialdrücke, wie sie bei der Biotransformation entwickelt wurden, nicht tolerieren würde. Wenn CO<sub>2</sub> für die Zellpermeabilisierung verantwortlich wäre, müsste der NAD(H)-Pool auch stabil bleiben, wenn nur die Gene *mdh* und *glf* exprimiert würden. Dies wurde untersucht, indem nur die Gene *mdh* und *glf* in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert wurden und über einen Zeitraum von drei Tagen die NAD(H)-Poolgröße bestimmt wurde. Die Zellen wurden dabei in Medium inkubiert, das zum einen D-Fruktose und Kaliumphosphat, zum anderen zusätzlich Formiat enthielt. So sollte in diesem Zusammenhang der Einfluss von Formiat auf die Zellintegrität untersucht werden (Abb. 3.26).

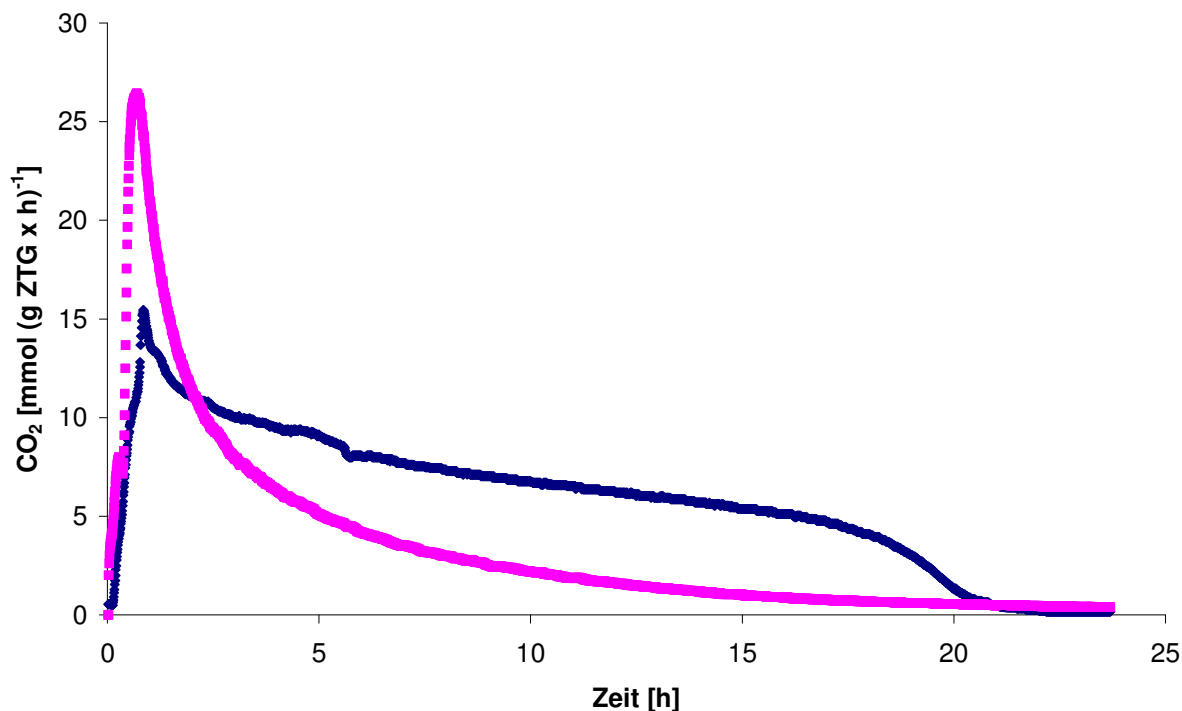


**Abb. 3.26:** NAD(H)-Pool von *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*mdh*; pZY507-*glf*.

(■) Medium: 250 mM Na-Formiat, 500 mM D-Fruktose, 100 mM KPi pH 6,5.

(♦) Medium: 500 mM D-Fruktose, 100 mM KPi, pH 6,5.

Die Inkubation des Stammes *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*mdh*; pZY507-*glf* in Biotransformationsmedium führte in den ersten Stunden nur zu einem geringfügigen Absinken der intrazellulären NAD(H)-Konzentration. Dabei gab es keinen Unterschied, ob Formiat in dem Medium vorhanden war oder nicht. Durch dieses Experiment konnte weiterhin verifiziert werden, dass Formiat hauptsächlich nicht für die Zellpermeabilisierung verantwortlich war. Über einen Zeitraum von drei Tagen nahm jedoch in beiden Ansätzen die anfängliche NAD(H)-Konzentration um 60 % ab. Dies deutete daraufhin, dass die Integrität der Zellmembran durch die Expression von *glf* geschwächt wurde. Da in den ersten Stunden der NAD(H)-Pool jedoch kaum merklich absank, war es naheliegend, einen Zusammenhang zwischen der Expression der *fdh* und der Zellpermeabilisierung herzustellen. Dies führte zu der Hypothese, dass das bei der Biotransformation entwickelte CO<sub>2</sub> die Zellen permeabilisieren könnte. Durch eine Beschränkung der Aktivität der Formiat-Dehydrogenase wäre es vielleicht möglich, stabile Produktivitäten zu erzielen, ohne dass die Zellen permeabilisierten. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde der Stamm *E. coli* Tuner(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* verwendet, welcher durch Deletion des *lacY*-Gens durch Gabe variabler IPTG-Konzentrationen zu unterschiedlichen Enzymaktivitäten induziert werden konnte. Der Stamm wurde mit 50 µM IPTG induziert, woraufhin die Mannitol-Dehydrogenase eine Aktivität von 0,58 U mg<sup>-1</sup> Protein und die Formiat-Dehydrogenase eine Aktivität von 0,34 U mg<sup>-1</sup> Protein hatte. Der Vergleichsstamm *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* hatte in diesem Experiment eine Mdh-Aktivität von 8,00 U mg<sup>-1</sup> Protein und eine Fdh-Aktivität von 1,02 U mg<sup>-1</sup> Protein. Da die Menge an gebildetem D-Mannitol äquivalent war zu der Menge an produziertem CO<sub>2</sub>, konnte über die CO<sub>2</sub>-Entwicklung auf die Produktivität der Stämme geschlossen werden (Abb. 3.27).

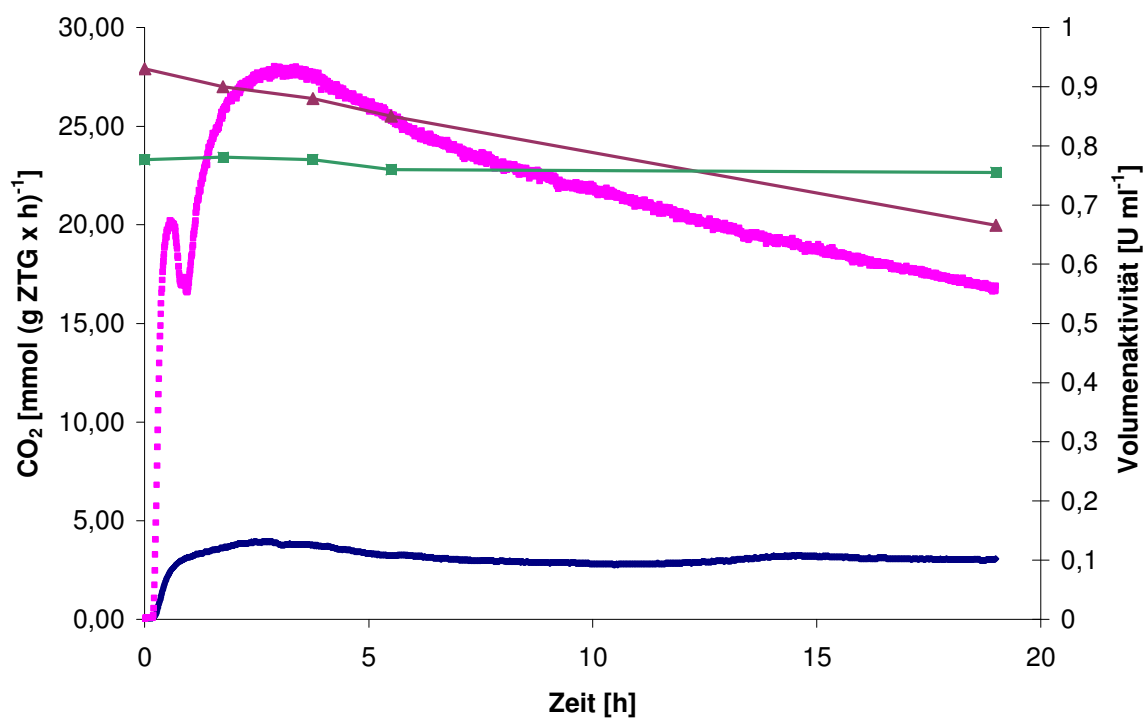


**Abb. 3.27:** CO<sub>2</sub>-Bildung bei *E. coli* Tuner(DE3) (◆) bzw. *E. coli* BL21(DE3) (■) mit Plasmiden pET24a(+)-*fdh-mdh* und pZY507-*glf*, die sich durch höhere Enzymaktivitäten der Formiat-Dehydrogenase und der Mannitol-Dehydrogenase im Stamm *E. coli* BL21(DE3) unterscheiden.

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* erreichte nach ca. 1 h mit 25 mmol CO<sub>2</sub> (g Zelltrockengewicht x h)<sup>-1</sup> die maximale CO<sub>2</sub>-Produktivität. Etwa zeitgleich erreichte der Stamm *E. coli* Tuner (DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* mit 15 mmol CO<sub>2</sub> (g Zelltrockengewicht x h)<sup>-1</sup> eine um 40 % niedrigere CO<sub>2</sub>-Produktivität. Nach ca. 2 h waren die CO<sub>2</sub>-Produktivitäten beider Stämme identisch, woraufhin die Produktivität des Stammes *E. coli* Tuner(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* langsamer absank. Nach ca. 24 h zeigten beide Stämme nur noch geringe Restaktivität. Es wurde vermutet, dass der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* schneller an Produktivität verlor, weil der Großteil der Zellpopulation die hohe CO<sub>2</sub>-Entwicklungsrate zu Beginn der Biotransformation nicht tolerieren konnte. Trotz der geringen CO<sub>2</sub>-Raten des Stammes *E. coli* Tuner(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* konnte keine stabile Produktivität erzielt werden. Dieses ließ Zweifel darüber aufkommen, ob wirklich das CO<sub>2</sub> für die Zellpermeabilisierung verantwortlich sein könnte. Deshalb sollte die CO<sub>2</sub>-Produktivität im folgenden Teil unabhängig von der Mannitolbildung untersucht werden.

### 3.4 Einfluss der CO<sub>2</sub>-Entwicklung auf die Zellstabilität und die Rolle des Glukose-Facilitators

Zur Untersuchung des Einflusses der CO<sub>2</sub>-Entwicklung auf die Zellen von *E. coli* BL21(DE3) wurde nur das *fdh*-Gen im Vektor pCDF-Duet1 überexprimiert, um den Einfluss der CO<sub>2</sub>-Bildung unabhängig von der D-Mannitolbildung untersuchen zu können. Das bei der Reaktion der Fdh gebildete NADH wurde über die Atmungskette oxidiert. Dazu wurden die Zellen mit Luft begast. Um den Einfluss des Glukose-Facilitators auf die Stabilität der Zellen zu untersuchen, wurde das *fdh*-Gen zusätzlich im Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh*; pZY507-*glf* überexprimiert (Abb. 3.28).



**Abb. 3.28:** CO<sub>2</sub>-Produktivitäten von *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh* (◆) bzw. *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh*; pZY507-*glf* (■) in 250 mM Na-Formiat und 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer; pH 6,5. Zur Bestimmung der Integrität der Zellmembranen wurde die Volumenaktivität der Fdh von *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh* (■) bzw. *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh*; pZY507-*glf* (▲) bestimmt.

Die spezifische Aktivität der Formiat-Dehydrogenase war über den gesamten Zeitraum der Messung konstant, so dass die Volumenaktivität des Enzyms als Indikator für eine Permeabilisierung der Zellen genommen werden konnte. Die Zellen von *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh* zeigten über einen Zeitraum von 18 h eine stabile CO<sub>2</sub>-Produktionsrate von 3-4 mmol CO<sub>2</sub> (g Zelltrockengewicht h)<sup>-1</sup>. Die Volumenaktivität der Zellen war konstant, so dass

davon ausgegangen werden konnte, dass die Zellen nicht permeabilisierten. In Gegenwart von 250 mM Formiat kam es offenbar nicht zu einer Permeabilisierung der Zellen im Zeitraum von 18 h, was die bisherigen Befunde unterstützte, dass Formiat nicht der Faktor ist, welcher die schnelle Permeabilisierung der Zellen in der Biotransformation bewirkte. Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh*; pZY507-*glf* erreichte nach ca. 3 h mit 28 mmol CO<sub>2</sub> (g Zelltrockengewicht x h)<sup>-1</sup> eine um den Faktor 7 höhere CO<sub>2</sub>-Entwicklungsrate als der Stamm ohne *glf*. Dies bedeutete, dass der Zugang von Formiat zum Cytoplasma durch die Expression von *glf* erleichtert wurde. Die Expression von *glf* war offensichtlich für eine Destabilisierung der Zellmembran verantwortlich, so dass Formiat durch erleichterte Diffusion in die Zelle gelangte. Eine Destabilisierung der Zellmembranen durch Expression von *glf* konnte vorab schon gezeigt werden, als die NAD(H)-Pool-Stabilität *glf*-exprimierender Zellen untersucht wurde (Abb. 3.24). Weshalb die Diffusion von Formiat über die Zellmembran nach Expression von *glf* erleichtert war, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Nach Erreichen der Spitzenaktivität fiel die CO<sub>2</sub>-Produktivität bis auf 16 mmol CO<sub>2</sub> (g Zelltrockengewicht x h)<sup>-1</sup> nach 18 h. Der Verlust der Produktivität war auf eine Permeabilisierung der Zellen zurückzuführen, da die Volumenaktivität der Fdh sank.

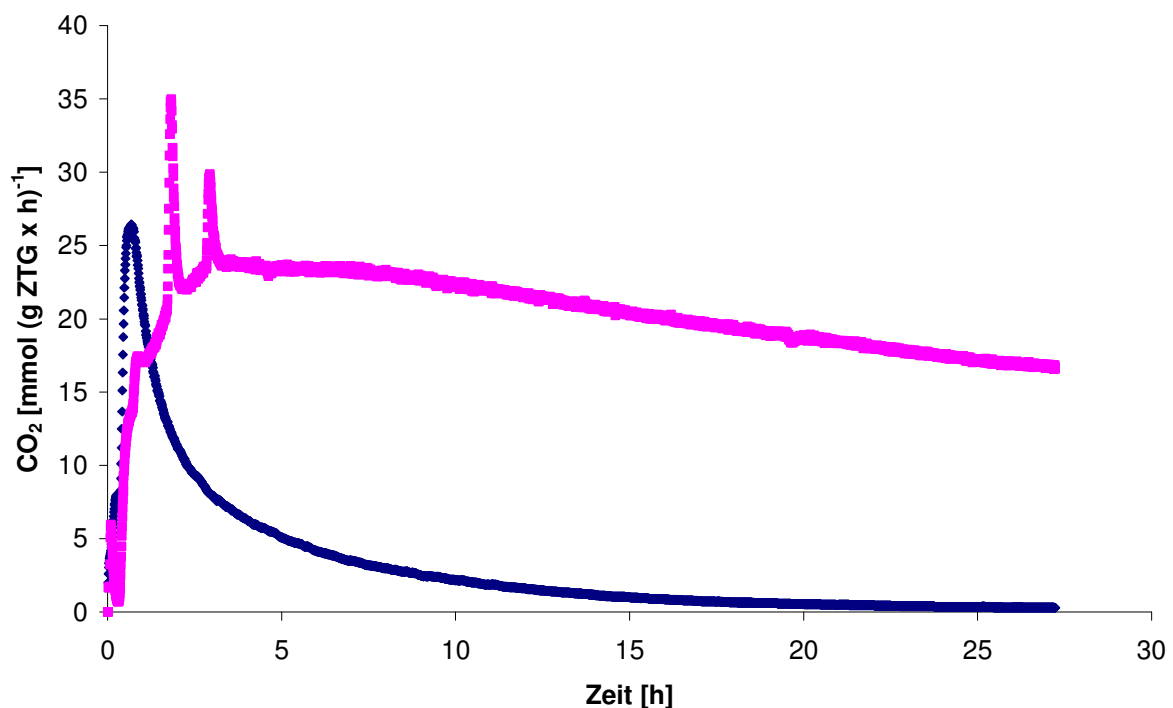
Es stellte sich nun die Frage, ob die Zellen *per se* durch Expression von *glf*, als Folge des Einströmens größerer Mengen an Formiat oder durch die Entwicklung großer CO<sub>2</sub>-Mengen permeabilisierten. Der Einfluss von Formiat auf *glf* exprimierende Zellen wurde bereits untersucht (Abb. 3.24). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Zellerpermeabilisierung und der Anwesenheit von Formiat hergestellt werden. Ein Vergleich zwischen den Graphiken 3.26 und 3.28 zeigt, dass *glf* exprimierende Zellen unabhängig von der hohen CO<sub>2</sub>-Entwicklung permeabilisierten, was durch den Verlust an NAD(H) verdeutlicht wurde. Demnach schien der Glukosefacilitator hauptverantwortlich für die Destabilisierung der Zellmembran zu sein.

### 3.5 Einfluss der Mannitol-Dehydrogenase auf die Zellpermeabilisierung

Der Mannitol bildende Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* hatte nach 1 h Biotransformation 50 % des intrazellulären NAD(H) verloren (Abb. 3.16). Wenn nur die Gene *fdh* und *glf* exprimiert waren, wurde zwar auch eine Zellpermeabilisierung festgestellt, die jedoch deutlich langsamer erfolgte. Hierfür wurde die Expression des Glukosefacilitatorgens verantwortlich gemacht. In folgendem Diagramm (Abb. 3.28) wurden



die CO<sub>2</sub>-Produktivitäten zweier Stämme gegenübergestellt, die sich nur durch das Vorhandensein des *mdh*-Gens im Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* unterschieden. Der Stamm ohne *mdh*-Gen, *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh*; pZY507-*glf*, wurde zur Regeneration von NAD<sup>+</sup> über die Atmungskette mit 30 % Sauerstoff/ 70% Stickstoff begast. Der Stamm mit *mdh*-Gen konnte NAD<sup>+</sup> über die Mannitol-Dehydrogenase regenerieren und wurde mit 100 % Stickstoff begast. Die Zellen wurden im gleichen Biotransformationsmedium mit 500 mM D-Fruktose, 250 mM Na-Formiat und 100 mM KPi, pH 6,5 inkubiert. Der Vergleich beider Ansätze sollte den Zusammenhang zwischen *mdh*-Expression und Zellpermeabilisierung verdeutlichen.



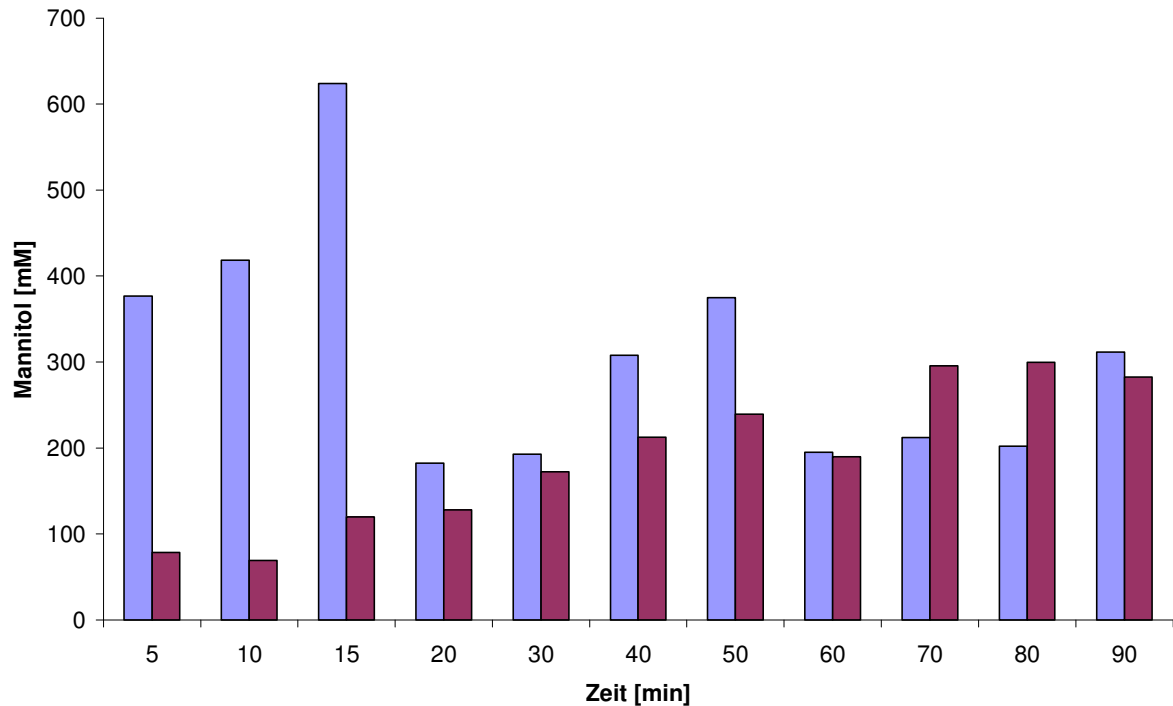
**Abb. 3.28:** CO<sub>2</sub>-Produktivitäten der Stämme *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh*; pZY507-*glf* und *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh*; pZY507-*glf*. Die Biotransformation wurde in 250 mM Na-Formiat, 500 mM D-Fruktose und 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,5 durchgeführt.

Beide Stämme zeigten zu Beginn ähnlich hohe CO<sub>2</sub>-Produktivitäten. Während der Stamm mit *mdh* jedoch rasch an Produktivität verlor, fiel beim Stamm ohne *mdh* die Produktivität nur langsam ab. Dies bewies, dass nicht CO<sub>2</sub> für die Permeabilisierung der Zellen verantwortlich war. Beide Ansätze unterschieden sich darin, dass der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* Mannitol bildete und durch die Begasung mit Stickstoff anaerob gehalten wurde, während der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh*; pZY507-*glf* kein Mannitol bildete und durch die Begasung mit Sauerstoff in der Lage war, NAD<sup>+</sup> über die Atmungskette zu

regenerieren. Die Möglichkeit zur Atmung erlaubte dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh*; pZY507-*glf* den Aufbau eines Protonengradienten und damit verbunden die Aufrechterhaltung einer hohen Energieladung der Zelle. Der Stamm, der mit Stickstoff begast wurde, wird hingegen nicht in der Lage gewesen sein, ATP über die Atmungskette zu regenerieren. Allerdings kommt es bei der Biotransformation mit ruhenden Zellen auch unter anaeroben Bedingungen nicht zu einer Membranpermeabilisierung innerhalb der ersten Stunden (Canovas et al., 2007). Die rasche Zellpermeabilisierung, die schon wenige Minuten nach Beginn der Biotransformation eintrat und sich durch den Verlust von intrazellulärem NAD(H) äußerte (Abb. 3.22) lässt darauf schließen, dass es zu einem Platzen der Zellen kam durch die Akkumulation von Mannitol und dem damit verbundenen Einströmen von Wasser in die Zelle.

### 3.6 Bestimmung der intrazellulären D-Mannitolkonzentration

Da durch die Expression der *mdh* eine schnelle Permeabilisierung der Zellen von *E. coli* BL21(DE3) pCDF-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* erfolgte, lag die Vermutung nahe, dass die Bildung von D-Mannitol zu der Permeabilisierung führte. Es wurde vermutet, dass D-Mannitol nicht problemlos aus der Zelle diffundieren konnte und sich im Cytoplasma akkumulierte. Hierzu könnte es zu einer starken Erhöhung des Turgors durch Einströmen von Wasser kommen, so dass die Zellen permeabilisierten. Dieser Permeabilisierungseffekt könnte allerdings erst dann eintreten, wenn die Osmolarität des Außenmediums überschritten wurde, welche durch 500 mM D-Fruktose, 250 mM Formiat und 100 mM Kalium-Phosphat schon sehr hoch war. Falls diese Vermutung richtig ist, müssten deutlich erhöhte D-Mannitolkonzentrationen im Cytoplasma messbar sein. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden über einen Zeitraum von 90 min während der Biotransformation Zellpellets durch Silikonölzentrifugation vom Überstand getrennt und die intrazelluläre D-Mannitolkonzentration mittels Gaschromatographie bestimmt (Abb. 3.29).



**Abb. 3.29:** Intrazelluläre D-Mannitolkonzentration [mM] der Stämme *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh* (rot) bzw. *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* (blau) während der Biotransformation in 250 mM Na-Formiat, 500 mM D-Fruktose und 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,5.

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* akkumulierte innerhalb der ersten 15 Minuten bis zu 623 mM D-Mannitol. Nach 20 min betrug die intrazelluläre Konzentration nur noch 182 mM und stieg dann wieder kontinuierlich auf 375 mM nach 50 min an. Anschließend erfolgte wieder ein Abfall auf 195 mM, woraufhin die Konzentration wieder auf über 300 mM nach 90 min anstieg. Die intrazelluläre D-Mannitolkonzentration war folglich gekennzeichnet durch einen stetigen Anstieg, auf den wieder ein rasches Absinken folgte. Der starke Abfall der intrazellulären Mannitolkonzentration beruht vermutlich darauf, dass hier die Osmolarität des Cytoplasmas die Osmolarität des Mediums überschritt, Wasser in die Zellen einströmte und es zum Platzen der Zellen kam. Ganz anders entwickelte sich die intrazelluläre D-Mannitolkonzentration beim Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*, dem der Glukosefacilitator fehlte. Hier akkumulierten die Zellen kontinuierlich D-Mannitol bis zu einer Konzentration von 300 mM. Die langsame Bildung von D-Mannitol ist nicht verwunderlich, weil *E. coli* Fruktose überwiegend über das PTS-System aufnimmt und phosphorylierte Fruktose kein Substrat der Mannitol-Dehydrogenase ist (Kornberg und Prior, 1989). Die Akkumulation von D-Mannitol im *E. coli* Stamm ohne

Glf zeigte, dass D-Mannitol nicht ohne weiteres über die Zellmembran diffundieren kann, denn dieser Stamm bildete fast kein D-Mannitol und folglich bestand ein großer Konzentrationsgradient zwischen Medium und Cytoplasma. Es ist bekannt, dass kompatible Solute, wozu auch D-Mannitol gezählt wird (Kets el al., 1996), nicht in der Lage sind, die Zellmembran schnell zu passieren ohne die entsprechenden Transportsysteme (Csonka, 1989). Im Falle des *glf* exprimierenden Stammes diffundiert D-Fruktose abhängig vom Konzentrationsgradienten in die Zelle. Durch den stetigen Verbrauch der D-Fruktose in der Zelle durch die Mannitol-Dehydrogenase ist stets ein Konzentrationsgefälle vorhanden, so dass D-Fruktose kontinuierlich nachströmt. Vermutlich existiert in *E. coli* kein Mannitolexportsystem, da *E. coli* kein D-Mannitol aus D-Fruktose bildet. Es ist zwar ein PTS-abhängiges Mannitolaufnahmesystem bekannt (Veldhuis et al., 2005), welches jedoch vermutlich nicht den Export von D-Mannitol katalysiert. Folglich kommt es in den Zellen von *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* zur Akkumulation von D-Mannitol in hoher Konzentration, was dazu führen könnte, dass Wasser in die Zellen eindringt und die Zellen durch den hohen osmotischen Druck permeabilisieren.

### 3.7 Klonierung einer putativen Mannitolpermease aus *L. pseudomesenteroides*

Das Gen, das für die Mannitol-Dehydrogenase kodiert, wurde aus *L. pseudomesenteroides* isoliert. *L. pseudomesenteroides* reduziert D-Fruktose zu D-Mannitol unter anaeroben Bedingungen zur Kofaktorregenerierung. Die Reduktion von D-Fruktose zu D-Mannitol ist energetisch für *L. pseudomesenteroides* günstig, weil dann weniger Acetyl-Phosphat zu Ethanol reduziert wird und die Dephosphorylierung von Acetyl-Phosphat zu Acetat ein Molekül ATP liefert (Axelsson, 1998). Durch Reinigung der Mannitol-Dehydrogenase und N-terminale Ansequenzierung des Proteins konnte eine DNA-Sonde hergestellt werden, mit der das Mannitol-Dehydrogenase-Gen im Southern Blot aus genomischer DNA von *L. pseudomesenteroides* isoliert werden konnte (Hahn et al., 2003). Der DNA-Abschnitt, der daraufhin isoliert wurde, kodierte neben der *mdh* für vier weitere ORF's. ORF 2 hatte eine Größe von 734 Basenpaaren und wurde kolinear zum Gen *mdh* transkribiert. Das Gen wies 81 % Homologie zu einem Gen aus *L. mesenteroides* auf, das für ein putatives Membranprotein kodierte (Aarnikunnas et al., 2002). Ferner wurden 64 % Homologie zu einem Gen aus *Lactobacillus reuteri* festgestellt, das für einen putativen Zucker-spezifischen Membrantransporter kodierte (Copeland et al., 2006) (Abb. 3.30).

```

1 - ATGGCACAAAACGCGCAACATCATAATCCGCGAAGCATTTC AATGAGCAAATCACTTATG - 60
1 - M A Q N A Q H H N P R S I S M S K S L M - 20

61 - TTTTTTGCCATCTCATTGATTTTTAAATGCGATGGGAAATGTTTTGACGCTCGTCACAGCT - 120
21 - F F A I S L I L N A M G N V L T L V T A - 40

121 - TCACATATAAAAACCCGCTTTTTTGGGATCAGCTTATTGGACTGCTGCAGAGGCTAATCTA - 180
41 - S H I K P A F L G S A Y W T A A E A N L - 60

181 - GGTCAAGCTTTATTAGGAAATAATTCACCTTGCTTTGTTTTGGGCATTTTTAGTTCCTGGC - 240
61 - G Q A L L G N N S L V L F W A F L V L G - 80

241 - ATGCTTATTTTCATTCCTGAATGCGTTATTAATGAAAAAGTTAGATTGGCATCGTATCATT - 300
81 - M L I S F L N A L L M K K L D W H R I I - 100

301 - GGTAATTTCTTGTTTATGTTACCATTTTCAATTTTTATTCAATGGTTTTCAAATATTTTC - 360
101 - G N F L F M L P F S I F I Q W F S N I F - 120

361 - AATCAAATTATGCCAAATGCTAATTCAGTGGCAGCAACTGTGTTATATACAGTAATTAAT - 420
121 - N Q I M P N A N S V A A T V L Y T V I N - 140

421 - TTTATTGGTGTGGCTTGATCGCCGTTGCTATTTTCGATTTATCAACGTGTGAATTTAGTG - 480
141 - F I G V G L I A V A I S I Y Q R V N L V - 160

481 - TTACACCCTGCCGATGATTTGATGCAAATTTTACGTTTCAAATATTTTACGGGTCTGGCT - 540
161 - L H P A D D L M Q I L R F K Y F H G S A - 180

541 - TTCAAGGCTATGTGGGCGTCTATATTCCGCCAACGATTTTTGCAATTATTGCCTTTGTG - 600
181 - F K A M W A S Y I P P T I F A I I A F V - 200

601 - ATCACTTTCCCTAATTTGTATAATTTCCGGTTAGGAATTATTTTTGCATTCTTATTCCAG - 660
201 - I T F P N L Y N F G L G I I F A F L F Q - 220

661 - GGTGGCATCACAGGAATCGCGGACAAGTACGTCTTTAAGAATTTAAAGCATCAGGCAATA - 720
221 - G G I T G I A D K Y V F K N L K H Q A I - 240

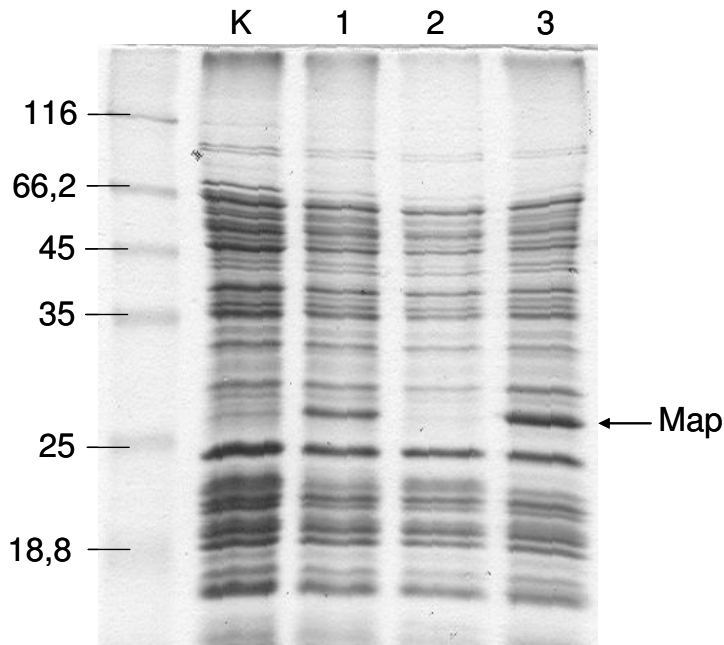
721 - GATGTTGGTAATTAA
241 - D V G N *

```

**Abb. 3.30:** DNA- und Aminosäuresequenz von ORF 2, der zusammen mit dem Gen für die Mannitol-Dehydrogenase aus dem Genom von *L. pseudomesenteroides* isoliert wurde (Hahn et al., 2003). Das Gen wies 64 % Homologie zu einem Gen aus *L. reuteri* aus, welches ein putativer Zucker-spezifischer Membrantransporter ist.

Da ORF 2 kollinear mit dem Gen *mdh* transkribiert wurde und hohe Homologien zu einem putativen Zucker-spezifischen Membrantransporter aufwies, könnte es sich hierbei um eine Mannitolpermease handeln. Da die bisherigen Ergebnisse darauf hindeuteten, dass die intrazelluläre Akkumulation von D-Mannitol hauptverantwortlich für die Zellpermeabilisierung bei der Biotransformation ist, könnte die Expression eines Mannitolexportergens im *E. coli* Mannitolproduzenten die Zellpermeabilisierung verhindern und die Produktivität des Stammes verlängern. ORF 2, der im folgenden als *map*

(Mannitolpermease) bezeichnet wird, wurde in den Vektor pBBR1-*MCS2* kloniert. Nach Expression des Gens in *E. coli* XL1Blue wurden die Proteine der Membranfraktion isoliert und in einem SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.31).



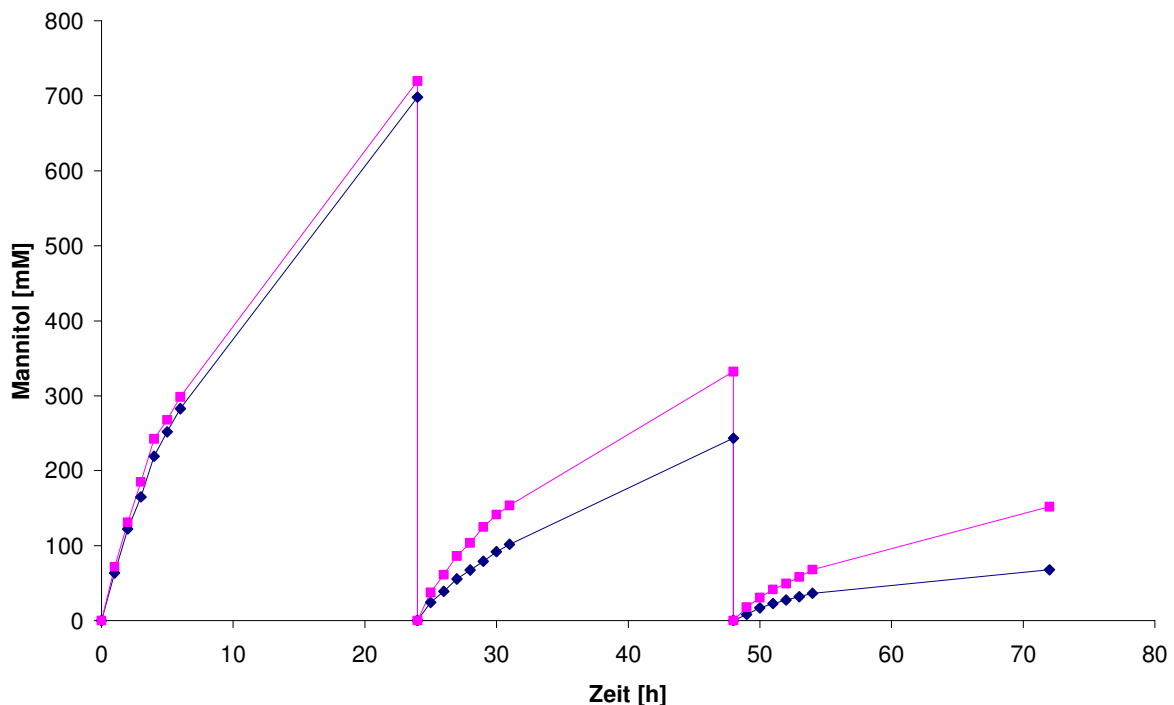
**Abb. 3.31:** SDS-PAGE-Gel von Membranfraktionen aus *E. coli* XL1Blue pBBR1-*MCS2* (Kontrolle K) und *E. coli* XL1 Blue pBBR1-*MCS2-map* (Klone 1-3). Bei den Klonen 1 und 3 konnte eine überzählige Proteinbande mit einer Größe von 27 kD identifiziert werden, die mit dem theoretischen Molekulargewicht der putativen Mannitolpermease übereinstimmte.

Nach Expression von *map* konnte im SDS-Gel eine zusätzliche Proteinbande mit einer Größe von ca. 27 kD identifiziert werden. Die Größe dieses Proteins stimmte mit der theoretischen Größe von Map überein, welche 27,2 kD beträgt. Demzufolge konnte *map* in *E. coli* transkribiert und translatiert werden.

### 3.8 Biotransformation unter Expression eines putativen Mannitolexporter-Gens

Nachdem Formiat und CO<sub>2</sub> als Parameter für die Zellpermeabilisierung bei der D-Fruktose-D-Mannitol-Biotransformation ausgeschlossen werden konnten, konnte die intrazelluläre Akkumulation von D-Mannitol hierfür verantwortlich gemacht werden. Es ist bekannt, dass kompatible Solute, wozu auch D-Mannitol gehört, die Zelle ohne Hilfe von Transportsystemen nur langsam verlassen können (Csonka, 1989). Folglich wäre die Expression eines Mannitolexportergens eine potenzielle Lösung für einen effektiven Export

von D-Mannitol bei der Biotransformation. In einer Biotransformation wurde untersucht, ob sich die Expression des putativen Mannitolexportergens aus *L. pseudomesenteroides* stabilisierend auf die Produktivität auswirkte. Hierzu wurden die Plasmide pBBR1-MCS2 bzw. pBBR1-MCS2-map, pCDF-fdh-mdh und pZY507-glf in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Es wurde eine Biotransformation in 300 mM D-Fruktose, 150 mM Na-Formiat und 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,5 durchgeführt, wobei mit 3 M Ameisensäure und 3 M D-Fruktose titriert wurde, um verbrauchtes Substrat zu ersetzen und den pH-Wert konstant zu halten. Die Zellen wurden nach 24 h und 48 h geerntet, in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,5 gewaschen und erneut in der Biotransformation eingesetzt. Die Produktivität an D-Mannitol wurde über einen Zeitraum von drei Tagen bestimmt (Abb. 3.32)



**Abb. 3.32:** D-Mannitolbildung der Stämme *E. coli* BL21(DE3) pCDF-fdh-mdh; pZY507-glf; pBBR1-MCS2-map (■) bzw. *E. coli* BL21(DE3) pCDF-fdh-mdh; pZY507-glf; pBBR1-MCS2 (◆) in drei aufeinanderfolgenden Biotransformationen. Die Zellen wurden jeweils nach 24 h und 48 h geerntet, gewaschen und erneut der Biotransformation zugeführt.

Mit Expression des putativen Mannitolexportergens konnten nach drei Tagen insgesamt 1,2 M D-Mannitol produziert werden. Dies bedeutete eine Steigerung von 20 % gegenüber der Kontrolle, die im gleichen Zeitraum nur 1 M D-Mannitol produzierte. Durch die Expression von *map* konnte jedoch nicht verhindert werden, dass die Zellen NAD(H) verloren und der Kofaktor zur limitierenden Größe der Produktivität wurde. Der Zusatz von 1 mM NAD<sup>+</sup> nach

72 h führte zu einem Anstieg der Produktivität, so dass nach 103 h noch einmal 465 mM bzw. 320 mM D-Mannitol (Kontrolle) gebildet wurden. In vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich D-Mannitol bei der Biotransformation in der Zelle akkumulierte (Abb. 3.29). Zellen, denen das *mdh*-Gen fehlte und die kein D-Mannitol produzierten, erzielten relativ konstante CO<sub>2</sub>-Produktivitäten über einen Zeitraum von 28 h. Dieses konnte als deutlicher Hinweis darauf gewertet werden, dass D-Mannitol zu einem osmotischen Anschwellen der Zellen führte, welches eine Permeabilisierung und einen Verlust von NAD(H) einleitete. Die Expression von *map* verbesserte die Langzeitstabilität um 20 %. Daraus konnte geschlossen werden, dass *map*-exprimierende Zellen D-Mannitol besser aus der Zelle exportieren konnten. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei *map* um ein Gen für eine Mannitolpermease handelt. Hierzu sind jedoch noch detaillierte Studien durchzuführen. Die Tatsache, dass *map* exprimierende Zellen trotzdem, wenn auch langsamer, permeabilisierten, deutete daraufhin, dass immer noch ein Ungleichgewicht zwischen Import von D-Fruktose und Export von D-Mannitol bestand. Dieses Problem könnte gelöst werden, indem die Expressionslevel von *glf* und *map* aufeinander abgestimmt werden, so dass nicht mehr D-Fruktose in die Zelle gelangt als D-Mannitol wieder exportiert werden kann.



## IV. Diskussion

Bei der Biotransformation von D-Fruktose zu D-Mannitol mit einem rekombinanten Stamm von *E. coli* wurde innerhalb von zwei Stunden 50 % des NAD(H)-Pools abgebaut, was zu einem starken Rückgang der Produktivität führte (Kaup, 2004). Es wurde vermutet, dass der Abbau von NAD(H) auf die Aktivität NAD(H) abbauender Enzyme zurückzuführen wäre. Ziel dieser Arbeit war es, den NAD(H)-Pool der Zellen zu stabilisieren, um eine höhere Langzeitproduktivität des rekombinanten *E. coli* zu erzielen.

### 1. NAD(H) Turnover in nicht-wachsenden Zellen von *Escherichia coli*

In der Literatur sind ausschließlich Turnoverraten für wachsende Zellen bestimmt worden, wobei sich die Ergebnisse stark unterscheiden. Iizuka und Minzuno (1967) konnten kein NAD(H)-Turnover in *E. coli* feststellen, während hohe Turnoverraten in *Staphylococcus aureus* und *Lactobacillus fructosus* gemessen wurden. Eine andere Arbeit berichtet von einer hohen NAD(H)-Turnoverrate in *E. coli*, wobei etwa 140 Molekül NAD(H) pro Sekunde und Zelle umgesetzt werden (Hillyard et al., 1981). Der überwiegende Anteil von NAD(H) werde dabei über NAD(H)-Pyrophosphatasen abgebaut. Neben dem Abbau von NAD(H) über Enzyme ist auch ein abiotischer Abbau möglich. So vermuten Wong und Whitesides (1981), dass 50 % vom intrazellulären NAD(H) in *E. coli* nach 50 h durch die hohe intrazelluläre Phosphatkonzentration abgebaut werden könnte.

In *E. coli* sind zwei Gene annotiert, *yrfE* und *yjaD* (ERGO-Datenbank), die für NADH-Pyrophosphatasen kodieren. Durch Deletion beider Gene sollte der NAD(H)-Turnover bei der D-Fruktose D-Mannitol Biotransformation begrenzt werden. Der Ansatz schien vielversprechend, weil beide Enzyme eine Präferenz für NADH gegenüber  $\text{NAD}^+$  haben und der Pyridinnukleotidpool während der Biotransformation in einem hochreduzierten Zustand vorliegt (Kaup, 2004). Das Genprodukt von *yjaD* hat eine hundertfach höhere Aktivität in Bezug auf NADH als auf  $\text{NAD}^+$ . Bei *YrfE* ist die Präferenz für NADH neunmal höher (O'Handley et al., 1998; Frick und Bessman, 1995). Die Funktion dieser Enzyme könnte in der selektiven Entfernung von NADH unter anaeroben Bedingungen liegen (Frick und Bessman, 1995). In *E. coli* wurde eine NADH-Pyrophosphataseaktivität von  $4,6 \text{ mU mg}^{-1}$

Protein gemessen. Durch die Deletion beider NADH-Pyrophosphatasegene konnte die spezifische Aktivität um 70 % reduziert werden. Die Messung signifikanter NADH-Pyrophosphataseaktivität im Rohextrakt von *E. coli* bestätigen die Ergebnisse von Hillyard et al. (1981), welche einen Abbau von NAD(H) in *E. coli* vorwiegend über Nikotinamidmononukleotid feststellten. Aufgrund der Reduktion der spezifischen NADH-Pyrophosphataseaktivität durch die Deletion der Gene *yrfE* und *yjaD* kann jedoch nicht darauf geschlossen werden, ob die Produkte dieser Gene eine signifikante Rolle beim intrazellulären NAD(H)-Turnover spielen. Die Deletion des NAD(H)-Pyrophosphatasegens *pnuE* in *S. typhimurium* führte zwar zum vollständigen Verlust der NADH-Pyrophosphataseaktivität im Zellrohextrakt, doch hatte diese Mutation keinen Einfluss auf den NAD(H)-Turnover (Park et al., 1988). Ob die Deletion des NADH-Pyrophosphatasegens einen Einfluss auf die intrazelluläre NAD(H)-Poolkonzentration hatte, wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt. Durch die Deletion der Gene *yrfE* und *yjaD* kam es in *E. coli* zu keiner Veränderung der intrazellulären NAD(H)-Konzentration.

Das Wachstum der Deletionsmutante *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* war sowohl in Komplex- als auch in Minimalmedium gegenüber dem Wildtyp unverändert. Demzufolge hatte die Deletion der Gene *yrfE* und *yjaD* keinen Einfluss auf das Wachstum unter aeroben Bedingungen. Unter anaeroben Bedingungen könnten die Genprodukte von *yrfE* und *yjaD* eine Rolle spielen, indem sie überschüssiges NADH abbauen (Frick und Bessman, 1995). Eine anaerobe Anzucht von *E. coli* ist aber für die Ganzzellbiotransformation nicht relevant und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Eine weitere Hypothese über die Funktion von NADH-Pyrophosphatasen ist, dass sie biologisch inaktive  $\alpha$ -Pyridinnukleotide abbauen. Es wird angenommen, dass die Isomerisierung von  $\beta$ -NAD zu  $\alpha$ -NAD vorwiegend in der reduzierten Form stattfindet (Park et al., 1989). Dies würde erklären, warum YrfE und YjaD eine Präferenz für NADH haben.

Ruhende Zellen von *E. coli*, die in Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6,5) unter leichtem Rühren bei 30°C inkubiert wurden, verloren nur ca. 15 % der NADH-Anfangskonzentration nach drei Tagen. Dieses Ergebnis widerspricht der Vermutung, dass in ruhenden Zellen ein starker NAD(H)-Abbau stattfindet, der zum Verlust von 50 % intrazellulärem NAD(H) nach 50 h führen könne (Wong und Whitesides, 1981). Die Deletionsmutante *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD* hatte ebenfalls einen Verlust von 15 % NAD(H) nach drei Tagen.

Demzufolge haben die Genprodukte von *yrfE* und *yjaD* keinen Einfluss auf die Poolstabilität ruhender Zellen.

## 2. Überexpression von Genen der NAD(H)-Synthese

Die Nikotinsäurephosphoribosyl-Transferase, kodiert durch *pncB*, katalysiert den ersten Schritt im NAD-Recyclingweg, welcher das Nikotinatgrundgerüst aus dem NAD-Abbau der Neusynthese zuführt. Die Nikotinsäurephosphoribosyl-Transferase wurde als schrittmachendes Enzym des NAD(H)-Recyclingweges identifiziert (Imsande und Pardee, 1962). Die Expression des *pncB*-Gens wird durch den NadR-Repressor in Abhängigkeit von der intrazellulären NAD(H)-Konzentration reguliert (Penfound und Foster, 1999). Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Überexpression des *pncB*-Gens zu einer Erhöhung der intrazellulären NAD(H)-Konzentration führt (Wubbolts et al., 1990; San et al., 2002), wurde diese Strategie auch in dieser Arbeit angewandt, um den NAD(H)-Pool in *E. coli* zu vergrößern. Die Überexpression von *pncB* in *E. coli* BL21(DE3) im Plasmid pET24a(+) unter Kontrolle eines T7-Promotors führte zu einem Anstieg der NAD(H)-Konzentration auf 20 nmol mg<sup>-1</sup> Zellrockengewicht. Damit war die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration etwa zwei- bis dreimal so hoch wie im Wildtyp, wo im Durchschnitt eine NAD(H)-Konzentration von 6 bis 7 nmol mg<sup>-1</sup> Zellrockengewicht gemessen wurde. Die Überexpression des *pncB*-Gens mit nativem Promoter auf einem Plasmid in hoher Kopienzahl führte zur Erhöhung des NAD(H)-Pools auf 30 nmol mg<sup>-1</sup> Zellrockengewicht (Wubbolts et al., 1990). Diese Konzentration war fünfmal höher als im Wildtyp von *E. coli*, wo NAD(H)-Konzentrationen zwischen 3 und 7 nmol mg<sup>-1</sup> Zellrockengewicht gemessen wurden (Wubbolts et al., 1990). Die in der eigenen Arbeit und durch Wubbolts et al. bestimmten NAD(H)-Konzentrationen im Wildtyp von *E. coli* stimmen mit Messungen anderer Arbeiten überein (Hughes et al., 1983; Lilius et al., 1979; Wimpenny und Firth, 1972).

San et al. (2002) berichteten über einen Anstieg der intrazellulären NAD(H)-Konzentration von lediglich 42%, wenn das *pncB*-Gen in ein Plasmid mit *lac*-Promotor kloniert wurde. Die Klonierung des *pncB*-Gens in ein Plasmid hoher Kopienzahl mit nativem Promotor führte zur Erhöhung der NAD(H)-Konzentration um 36 %. San et al. schlossen daraus, dass die Kopienzahl der Plasmide in der Zelle die Anzahl der Repressormoleküle von NadR übertraf. Demzufolge wird zur Erhöhung des NAD(H)-Pools kein sehr hohes Expressionslevel von *pncB* benötigt. Demnach war eine so hohe Kopienzahl von *pncB*, wie sie durch die

Klonierung in den Vektor pET24a(+) erreicht wurde, nicht nötig, um den Effekt der NAD(H)-Poolerhöhung zu erzielen. Diese Hypothese konnte durch die genomische Integration von *pncB* bestätigt werden. Nach der Integration war die Enzymaktivität stark vermindert und im SDS-Gel konnte keine Überexpression von *pncB* festgestellt werden. Trotzdem war die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration mit  $20 \text{ nmol mg}^{-1}$  Zelltrockengewicht noch genauso hoch wie in *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*pncB*.

Der Effekt der Überexpression von *nadD* und *nadE* auf die NAD(H)-Poolgröße wurde in dieser Arbeit erstmals untersucht. NadE kodiert für eine NAD-Synthase, welche die ammoniumabhängige Aminierung von Nikotinsäureadeninindinukleotid zu  $\text{NAD}^+$  katalysiert (Willison und Tissot, 1994). Die Klonierung von *nadE* in den Vektor pCDF unter Kontrolle des T7-Promoters führte in *E. coli* BL21(DE3) zur Steigerung der Enzymaktivität von  $0,01 \text{ U mg}^{-1}$  Protein auf  $1,5 \text{ U mg}^{-1}$  Protein. Willison und Tissot klonierten das *nadE* Gen von *E. coli* unter Kontrolle des *tac* Promoters. Nach Überexpression des Gens hatte die NAD-Synthase eine Aktivität von  $8,33 \text{ U mg}^{-1}$  Protein. Im Wildtyp von *E. coli* wurde eine Enzymaktivität von  $0,02 \text{ U mg}$  Protein gemessen (Willison und Tissot, 1994). Die Überexpression von *nadE* in dieser Arbeit führte zu einer Erhöhung der intrazellulären NAD(H)-Konzentration auf  $16 \text{ nmol mg}^{-1}$  Zelltrockengewicht, was eine Verdopplung gegenüber dem Wildtyp bedeutet. Somit konnte gezeigt werden, dass nicht nur das natürliche Expressionslevel von *pncB*, sondern auch das von *nadE* die NAD(H)-Synthese limitieren.

NadD kodiert für die Nikotinsäuremononukleotid-Adenylyltransferase, welche die ATP abhängige Adenylierung von Nikotinsäuremononukleotid katalysiert. Die Expression des Gens unter Kontrolle des T7-Promoters im Plasmid pRSF führte zu einer Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität von  $0,01 \text{ U mg}^{-1}$  Protein auf  $5,8 \text{ U mg}^{-1}$  Protein. Die Überexpression von *nadD* führte zu einem Sinken der intrazellulären NAD(H)-Konzentration um den Faktor zehn im Vergleich zum Wildtyp. Der Einfluss der Überexpression von *nadD* auf die Größe des NAD(H)-Pools wurde bislang nicht untersucht. Stancek et al. (2003) konstruierten eine Rasterschubmutante des Gens *nadD* in *E. coli*, was zu verringerter Aktivität des Enzyms führte. Diese Mutation führte zu einem Sinken der intrazellulären NAD(H)-Konzentration.

Mehl et al. (2000) überexprimierten *nadD* homolog in *E. coli*. Es wurde festgestellt, dass NadD nicht nur die Adenylierung von Nikotinsäuremononukleotid, sondern auch von

Nikotinamidmononukleotid katalysiert, aber mit einer zwanzigfach niedrigeren Rate. Im Enzymtest katalysierte NadD die vollständige Umsetzung von 0,25 mM Nikotinsäuremononukleotid zu Nikotinsäureadenindinukleotid. Wurden jedoch 1,5 mM Nikotinsäuremononukleotid eingesetzt, stoppte die Reaktion, wenn eine Konzentration von 1 mM Produkt erreicht war. Mehl et al. folgerten daraus, dass die Nikotinsäuremononukleotid-Adenylyltransferase einer Produktinhibierung unterliege. Die Enzymreaktion von NadD ist reversibel, das heißt NadD kann auch die Reaktion von Nikotinsäureadenindinukleotid zu Nikotinsäuremononukleotid bzw.  $\text{NAD}^+$  zu Nikotinamidmononukleotid katalysieren (Mehl et al., 2000). Da beide Reaktionen reversibel sind, könnte es sein, dass eine Überexpression von *nadD* NAD(H)-metabolisierende Reaktionen begünstigt, wodurch es zu einem Sinken der intrazellulären NAD(H)-Konzentration käme.

Die Genprodukte von *nadB* und *nadA* katalysieren die beiden ersten Schritte der NAD(H) *de novo* Synthese. Die Operatorregionen beider Gene besitzen jeweils zwei Bindestellen für das Regulatorprotein NadR, welches die NAD(H) *de novo* Synthese ab einer bestimmten NAD(H)-Konzentration unterbindet (Penfound und Foster, 1999). Die Überexpression beider Gene führte zu keinem Anstieg der intrazellulären NAD(H)-Konzentration. Da die Expression beider Gene am Anfang der NAD(H) *de novo* Synthese strikt kontrolliert wird, wäre ein Anstieg der intrazellulären NAD(H)-Konzentration zu erwarten gewesen. Flachmann et al. (1988) stellten einen starken Anstieg der extrazellulären Quinolinat-Konzentration einer *nadC* defizienten Mutante fest, wenn die Gene *nadB* und *nadA* überexprimiert worden waren. Dies zeigte, dass die Überexpression beider Gene zu einer Erhöhung der Syntheseleistung führte. Die Überexpression beider Gene führte jedoch nicht zu einer Erhöhung des NAD(H)-Pools. Der Grund hierfür könnte in einer Enzyminhibierung in der darauffolgenden Reaktion liegen: NadC wird durch das Produkt Nikotinsäuremononukleotid kompetitiv inhibiert (Bhatia und Calvo, 1996).

### 3. Einfluss eines erhöhten NAD(P)(H)-Pools auf die reduktive Biotransformation

Bei der Biotransformation von D-Fruktose zu D-Mannitol mit dem rekombinaten *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* kam es bereits in der ersten Stunde zu einem intrazellulären Verlust von NAD(H) von etwa 50 %. Es wurde vermutet, dass NAD(H) abbauende Enzyme für diesen Verlust verantwortlich waren. Hohe NAD(H)-Turnoverraten,

welche in *S. typhimurium* bestimmt worden waren, unterstützen diese Vermutung (Manlapaz-Fernandez und Olivera, 1973; Park et al., 1989). In ruhenden Zellen von *E. coli* BL21(DE3) wurde eine Abnahme von 15 % der intrazellulären NAD(H)-Konzentration nach drei Tagen gemessen. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass in ruhenden Zellen von *E. coli* kein signifikanter NAD(H)-Turnover stattfindet. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Messungen von Iizuka und Minzuno (1967), welche keinen NAD(H)-Turnover in *E. coli* feststellen konnten. Die Detektion von NAD(H) im Überstand der Biotransformation zeigte, dass die Zellen NAD(H) über eine permeabilisierte Zellmembran verloren. Die extrazelluläre NAD(H)-Konzentration nahm in dem Maße zu, wie die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration abnahm. Dies zeigte, dass der NAD(H)-Verlust über permeabilisierte Membranen hauptverantwortlich für den Produktivitätsverlust der Biotransformation war. Ein Produktivitätsrückgang durch den Verlust von Kofaktoren über permeabilisierte Membranen wurde bereits in anderen Arbeiten angenommen (Walton und Stewart, 2004; Bucholz und Gröger, 2006) und wurde auch als Ursache für den Produktivitätsverlust bei der Biotransformation von D-Fruktose zu D-Mannitol diskutiert (Kaup, 2004).

Neben der Stabilisierung des NAD(H)-Pools durch Deletion von Genen, welche für NAD(H) abbauende Enzyme kodieren, war die Erhöhung der intrazellulären NAD(H)-Konzentration ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Es sollte untersucht werden, ob sich durch Erhöhung der Kofaktorkonzentration eine Steigerung der Produktivität erzielen ließe. Bei der heterologen Überexpression einer Luciferase aus *Vibrio fischeri* in *E. coli* kam es zu einer Limitierung durch den Kofaktor FAD (Belas et al., 1982). Wubbolts et al. (1990) schlossen daraus, dass bei es bei starker Expression eines Dehydrogenasegens in *E. coli* auch zur Limitierung des Kofaktors NAD(H) kommen könnte, weshalb sie den NAD(H)-Pool in *E. coli* durch Überexpression des *pncB*-Gens vergrößerten. Bei der Biotransformation von D-Fruktose zu D-Mannitol bewahrheitete sich diese Theorie nicht. Die Verdopplung der intrazellulären NAD(H)-Konzentration führte zu keiner Steigerung der Produktivität. Der Grund hierfür liegt vermutlich in den niedrigen  $K_M$ -Werten der Formiat-Dehydrogenase und der Mannitol-Dehydrogenase. Die Mannitol-Dehydrogenase besitzt einen  $K_M$ -Wert von 0,093 mM (Kaup et al., 2004) für NADH, welcher um den Faktor 10 unter der intrazellulären NAD(H)-Konzentration von *E. coli* von 1 mM liegt (Penfound und Foster, 1996). Die Formiat-Dehydrogenase besitzt einen  $K_M$ -Wert von 0,035 mM (Galkin et al., 1995), welcher sogar um den Faktor 30 unter der intrazellulären NAD(H)-Konzentration liegt. Folglich ist die intrazelluläre NAD(H)-Konzentration in diesem Biotransformationssystem nicht limitierend.

Dieser Befund deckt sich mit der Vermutung von Walton und Stewart (2004), dass die Erhöhung der intrazellulären NAD(H)-Konzentration keine Steigerung der Produktivität bewirke, weil die meisten Dehydrogenasen  $K_M$ -Werte weit unterhalb der Kofaktorkonzentration haben.

Die Glukose-Dehydrogenase, welche zur Kofaktorregenerierung bei der Biotransformation von Methylacetoacetat zu (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat eingesetzt wurde besitzt in Bezug auf den Kofaktor NADP<sup>+</sup> einen hohen  $K_M$ -Wert von 0,26 mM (Fujita et al., 1977), welcher in der Größenordnung der intrazellulären NADP(H)-Konzentration von 0,2 mM liegt (Penfound und Foster, 1996). Folglich sollte eine Erhöhung der intrazellulären NADP(H)-Konzentration zu einer Steigerung der Produktivität von (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat führen. Sowohl die Glukose-Dehydrogenase als auch die Alkoholdehydrogenase akzeptieren NAD(H) und NADP(H) als Kofaktoren. Wegen des hohen  $K_M$ -Wertes der Alkoholdehydrogenase von 1,6 mM in Bezug auf NADH und des niedrigen  $K_M$ -Wertes von 0,0093 mM in Bezug auf NADPH wird der Redoxzyklus dieses Biotransformationssystems NADP(H) als Kofaktor bevorzugt (Tan, 2006).

Durch die Überexpression von *pncB* in *E. coli* kam es nicht nur zu einer Verdopplung der intrazellulären NAD(H)-Konzentration, sondern auch zu einer Erhöhung der NADP(H)-Konzentration von 0,2 mM auf 0,45 mM. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Befunden von (Lundquist und Olivera, 1971). Da die intrazelluläre NADP(H)-Konzentration im Stamm *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yrfE* $\Delta$ *yjaD::pncB* höher war als der  $K_M$ -Wert der Glukose-Dehydrogenase, sollte der Einsatz dieses Stammes zur Biotransformation von Methylacetoacetat zu (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat eine Erhöhung der Produktivität bewirken.

Der Vergleich zwischen dem Stamm mit erhöhtem NADP(H)-Pool und dem unveränderten *E. coli* BL21(DE3) *pBTac-Lbadh-gdh*; *pZY507-glf* in der Biotransformation führte zu dem Ergebnis, dass es zu keiner Erhöhung der Produktivität kam. Abweichungen in der Produktivität waren auf Unterschiede in der Enzymaktivität der Alkohol-Dehydrogenase und der Glukose-Dehydrogenase zurückzuführen. Demzufolge war nicht die intrazelluläre NADP(H)-Konzentration, sondern ein anderer Faktor hauptlimitierend. Es wurde vermutet, dass die intrazelluläre Konzentration von D-Glukose die Produktivität limitierte bedingt durch eine niedrige Transportrate des Glukosefacilitators aus *Z. mobilis*. Für die Glukose-

Dehydrogenase wurde eine *in vitro* Enzymaktivität von 8-10  $\mu\text{mol D-Glukose mg}^{-1}$  Zelltrochengewicht bestimmt. Der heterolog in *E. coli* exprimierte Glukosefacilitator transportierte 93 nmol D-Glukose  $\text{mg}^{-1}$  Zelltrochengewicht (Weisser et al. 1995). Folglich war die Transportrate um den Faktor 1000 niedriger als die theoretisch zu erzielende Umsatzrate durch die Glukose-Dehydrogenase. Zudem ist der  $K_M$ -Wert der Glukose-Dehydrogenase für D-Glukose mit 42,9 mM (Fujita et al. 1977) sehr hoch, so dass in der Zelle vermutlich keine enzymsättigende Konzentration erreicht wurde. Bei der Biotransformation von D-Fruktose zu D-Mannitol mit *E. coli* BL21(DE3) pET24a(+)-*fdh-mdh*; pZY507-*glf* wurde die Produktivität ebenfalls durch die Transportrate des Glukosefacilitators limitiert. Dies zeigte sich daran, dass der Pyridinnukleotidpool zu 90 % im reduzierten Zustand vorlag (Kaup, 2004).

Eine andere Arbeit beschäftigte sich ebenfalls mit dem Einfluss eines erhöhten Kofaktorpools auf die Produktivität der Ganzzellbiotransformation (Weckbecker et al., 2007). Auch hier wurde eine Steigerung des NAD(P)(H)-Pools durch Überexpression der Gene *pncB*, *nadE* und zusätzlich des Gens *nadK*, welches für die NAD-Kinase kodiert, erzielt. Der Einfluss des gesteigerten NAD(P)(H)-Pools auf die Produktivität wurde in einem rekombinanten *E. coli* untersucht, welcher mittels einer Alkohol-Dehydrogenase Acetophenon zu (*R*)-1-phenylethanol umsetzte. Die Kofaktorregenerierung erfolgte ebenfalls mittels Glukose-Dehydrogenase aus *B. subtilis*. Durch die Erhöhung des NAD(P)(H)-Pools konnte eine Produktivitätssteigerung von 40 % erzielt werden. Da in dieser Arbeit vorab eingefrorene Zellen benutzt wurden, ist davon auszugehen, dass die Zellmembran hierbei geschädigt wurde und deshalb D-Glukose relativ ungehindert in die Zelle diffundieren konnte und somit nicht limitierender Faktor war. Somit konnte gezeigt werden, dass in diesem Biotransformationssystem eine Erhöhung des NAD(P)(H)-Pools die Produktivität steigern kann.

#### 4. Ursachen für die Zellpermeabilisierung in der D-Fruktose-D-Mannitol-Biotransformation

Als Ursache für die rasche Zellpermeabilisierung bei der D-Fruktose-D-Mannitol-Biotransformation wurde zunächst die Präsenz von Formiat/Ameisensäure im Biotransformationsansatz verantwortlich gemacht (Kaup, 2004). Als Grund hierfür wurde angeführt, dass die Säure in undissoziierter Form die Membran passiert (Walter und



Gutknecht, 1984) und intrazellulär, abhängig vom dortigen pH-Wert dissoziiert. Dabei entstehen toxische Säureanionen und die frei werdenden Protonen führen zur Ansäuerung des Cytoplasmas (Russell, 1992; Young und Foegeding, 1993) sowie zum Verlust des transmembranen Protonenpotentials (Eklund, 1983). Der Verlust des transmembranen Protonenpotentials kann zwar durch Energieverarmung die zellulären Funktionen beeinträchtigen, doch ist damit nicht automatisch der Zelltod verbunden (Canovas et al. 2007). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zellen in Gegenwart von 250 mM Na-Formiat über einen Zeitraum von mindestens 20 h keine Anzeichen von Membranpermeabilisierung zeigten. Daher konnte ausgeschlossen werden, dass Formiat für den schnellen Kofaktorverlust in der Biotransformation verantwortlich war. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch eine Arbeit von Cherrington et al. (1991), der bei *E. coli* Zellen in Gegenwart von Ameisensäure bei einem pH von 5,0 keine Membranpermeabilisierung feststellen konnte.

Die Biotransformationsbedingungen (Anaerobiose, Stickstoffmangel) können als Ursachen für die schnelle Zellpermeabilisierung während der Biotransformation ausgeschlossen werden. Bei einer unter ähnlichen Bedingungen durchgeführten Biotransformation mit ruhenden Zellen von *E. coli* zur Produktion von L-Carnitin behielten die Zellen innerhalb der ersten Stunden ihre volle Lebensfähigkeit. Erst nach 24 h war bei 20 % der Zellen eine Membranpermeabilisierung eingetreten (Canovas et al., 2007).

Die Expression des Glukosefacilitators aus *Z. mobilis* in *E. coli* führte zu einer partiellen Membranpermeabilisierung, was sich durch einen verstärkten Einstrom von Formiat in die Zelle während der Biotransformation und durch den verstärkten Verlust von NAD(H) ruhender Zellen äußerte. Für *E. coli* BL21(DE3) konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Membranproteinen zum Zelltod führen kann, vermutlich aufgrund von Membranpermeabilisierung (Miroux und Walker 1996). Die Verwendung von Mutanten von *E. coli* BL21(DE3) mit niedrigerem Expressionslevel erhöhte die Anzahl lebensfähiger Zellen, weil diese Mutanten die Membranproteine in geringerer Konzentration produzierten (Miroux und Walker, 1996; Dumon-Seignovert, 2004). In Arbeiten, in denen das *glf* Gen in *E. coli* exprimiert wurde, wurde nicht von einer Membranpermeabilisierung berichtet (Weisser et al., 1995; Parker et al., 1995). Die Verwendung des Plasmids pZY507 mit niedriger Kopienzahl lässt aber darauf schließen, dass hohe Expressionslevel von *glf* für *E. coli* toxisch sein könnten. Die Überexpression einer Xylen-Monooxygenase in *E. coli*, welche für ein

integrales Membranprotein kodiert, führte zu einer Beeinträchtigung der Membranintegrität, ohne dass es zu einer Membranpermeabilisierung kam (Looser et al. 2005). Als Folge der Insertion des heterologen Proteins in die Membran von *E. coli* kam es zu Störungen in der Membranfunktion. Eine Inaktivierung von membranständigen Effluxpumpen wurde diskutiert (Looser et al. 2005). Folglich kann die Insertion eines Proteins in die Membran von *E. coli* zu mannigfaltigen Störungen der Membranfunktionen führen. Im Extremfall kann eine Membranpermeabilisierung erfolgen.

Ein ineffektiver Export von D-Mannitol aus der Zelle wurde als Ursache für die Membranpermeabilisierung ausgemacht. Durch die Akkumulation von D-Mannitol in der Zelle könnte es zu einem verstärkten Einströmen von Wasser in die Zelle kommen, was schließlich zum Platzen der Zellen führt. *E. coli* nimmt Mannitol über eine Mannitol-Phosphotransferase auf (Veldhuis et al., 2005). Ein Mannitol spezifischer Exporter ist jedoch nicht bekannt. Ein Export über den Glukosefacilitator kann ausgeschlossen werden, weil dieses Protein kein D-Mannitol transportiert (Parker et al. 1995). Für den Export von D-Mannitol in *E. coli* sind vermutlich unspezifische Transporter verantwortlich. Möglicherweise wird der Export durch mechanosensitive Kanäle katalysiert, die sich bei erhöhtem Zellturgor durch die Akkumulation von D-Mannitol öffnen. Mechanosensitive Kanäle wurden als verantwortlich für das Ausschleusen von kompatiblen Soluten bei Erhöhung des Zellturgors diskutiert (Berrier et al., 1996). Mechanosensitive Kanäle besitzen eine hohe Exportkapazität. Für den Export von Glycin-Betain wurde in *E. coli* eine Exportrate von  $300.000 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  Zelltrockengewicht bestimmt (Ajouz et al. 1998). Folglich sollte über diese Kanäle D-Mannitol effektiv exportiert werden, ohne dass es zu einer Membranpermeabilisierung kommt. Durch die Überexpression des Glukosefacilitators könnten Transportfunktionen der Membran geschädigt worden sein, was bei Überexpression von Membranproteinen der Fall sein kann (Looser et al. 2005). Folglich könnte die Expression von *glf* einen effektiven Export von D-Mannitol verhindern, was zur Akkumulation von D-Mannitol in der Zelle führen könnte und diese durch den Anstieg des Zellturgors schließlich zum Platzen bringen könnte. Die Tatsache dass durch die Überexpression eines putativen Mannitoltransporters aus *L. pseudomesenteroides* die Stabilität der Zellen um 20 % erhöht werden konnte, unterstützt die Vermutung, dass ein ineffektiver Mannitolexport zur Membranpermeabilisierung führt.

## V. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den intrazellulären NAD-Turnover zu begrenzen und die intrazelluläre NAD-Konzentration in *Escherichia coli* zu erhöhen, um einen Stamm zu konstruieren, der sich durch eine höhere Produktivität und eine bessere Langzeitstabilität in der reduktiven Ganzzellbiotransformation auszeichnete. Hierzu wurden zunächst die Gene *yrfE* und *yjaD* deletiert, die für NADH-Pyrophosphatasen kodieren, welche vermutlich eine Rolle im intrazellulären NAD-Abbau spielen. Nach Deletion dieser Gene war die spezifische Aktivität der NADH-Pyrophosphatase im Rohextrakt um 70 % reduziert. Durch die Überexpression der Gene *pncB* und *nadE* aus der NAD-Biosynthese konnte eine Verdopplung der intrazellulären NAD-Konzentration erreicht werden. Die gemeinsame Überexpression beider Gene erhöhte den NAD-Pool um den Faktor sieben.

Ein rekombinanter Stamm von *E. coli* zur Gewinnung von D-Mannitol aus D-Fruktose war Bezugssystem zur Untersuchung, ob die Mutationen im NAD-Metabolismus einen Einfluss auf die Langzeitstabilität von Ganzzellbiotransformationen haben. D-Fruktose wurde hier mittels einer Mannitol-Dehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* zu D-Mannitol reduziert. Der Kofaktor NADH wurde mittels einer Formiat-Dehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* N10 regeneriert. Die Aufnahme von D-Fruktose wurde durch einen Glukosefacilitator aus *Zymomonas mobilis* ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Zellen während der Biotransformation NAD(H) über eine permeabilisierte Zellmembran verloren. Als Ursache für die Zellpermeabilisierung wurde eine Akkumulation von D-Mannitol in der Zelle ermittelt, was zum Platzen der Zellen durch den erhöhten osmotischen Druck führte. Durch die Klonierung eines putativen Mannitoltransportergens aus *L. pseudomesenteroides* konnte die Langzeitstabilität des rekombinanten *E. coli* erhöht werden, so dass die Mannitolausbeute nach drei Tagen Biotransformation um 20 % gesteigert werden konnte.

---

## VI. Literatur

**Aarnikunnas J, Ronnholm K, Palva A (2002).** The mannitol dehydrogenase gene (*mdh*) from *Leuconostoc mesenteroides* is distinct from other known bacterial *mdh* genes. *Appl Microbiol Biotechnol* **59** (6): 665-671.

**Ajouz B, Berrier C, Garrigues A, Besnard M, Ghazi A (1998).** Release of Thioredoxin via the Mechanosensitive Channel MscL during Osmotic Downshock of *Escherichia coli* Cells. *J Biol Chem* **273** (41): 26670-26674.

**Alemohammad MM, Knowles CJ (1974).** Osmotically induced volume and turbidity changes of *Escherichia coli* due to salts, sucrose and glycerol, with particular reference to the rapid permeation of glycerol in the the cell. *J Gen Microbiol* **82** (1): 125-142.

**Andreoli AJ, Grover T, Gholson RK, Matney TS (1969).** Evidence for a functional pyridine nucleotide cycle in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **192**:539-541.

**Axelsson L (1998).** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A (eds). Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects, 2nd edn. Dekker, New York 1-72.

**Baecker PA, Yung SG, Rodriguez M, Austin E, Andreoli AJ (1978).** Periplasmic localization of Nikotinate phosphoribosyltransferase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **133** (3): 1108-1112.

**Beckwith J (1987).** The lactose operon. In: Neidhardt FC (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Washington, D. C.: American Society of Microbiology 1444-1452.

**Belas R, Mileham A, Cohn D, Hilmen M, Simon M, Silverman M (1982).** Bacterial Bioluminescence: Isolation and Expression of the Luciferase Genes from *Vibrio harveyi*. *Science* **218**: 791-793.

- Bernofsky C, Swan M (1973).** An improved cycling assay for Nikotinamide adenine dinucleotide. *Anal Biochem* **53** (2): 452-458.
- Berrier C, Besnard M, Ajouz B, Coulombe A, Ghazi A (1996).** Multiple mechano-sensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *J Membr Biol* **151** (2): 175-187.
- Bhatia R, Calvo KC (1996).** The sequencing expression, purification, and steady-state kinetic analysis of quinolinate phosphoribosyl transferase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **325** (2): 270-278.
- Bommarius AS, Drauz K, W. H, Kula MR, Wandrey C (1994).** Some new developments in reductive amination with cofactor regeneration. *Biocatalysis* **10**: 37-47.
- Bommarius AS, Schwarm M, Drauz K (1998).** Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals. *Biocatalysis* **5**: 1-11.
- Bradford MM (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Buchholz S und Gröger H (2006).** Ganzzellbiokatalyse. In: Angewandte Mikrobiologie. Antranikian G (ed.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 161-172.
- Bullock WO, Fernandez JM, Stuart JM (1987).** XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-379.
- Canovas M, Garcia V, Bernal V, Torroglosa T, Iborra JL (2007).** Analysis of *Escherichia coli* cell state by flow cytometry during whole cell catalyzed biotransformation for L-carnitine production. *Process Biochemistry* **42** (1): 25-33.

**Cayley DS, Guttman HJ, Record MT, Jr. (2000).** Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. *Biophys J* **78** (4): 1748-1764.

**Cherrington CA, Hinton M, Pearson GR, Chopra I (1991).** Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. *J Appl Bacteriol* **70** (2): 161-165.

**Copeland A, Lucas S., Lapidus A., Barry K., Detter JC, Glavina del Rio T, Hammon N, Israni S, Dalin E, Tice H, Bruce D, Pitluck S, Richardson P (2006).** Sequencing of the draft genome and assembly of *Lactobacillus reuteri* 100-123. Unveröffentlichte Daten.

**Costas AM, White AK, Metcalf WW (2001).** Purification and characterization of a novel phosphorus-oxidizing enzyme from *Pseudomonas stutzeri* WM88. *J Biol Chem* **276** (20): 17429-36.

**Csonka LN (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* **53** (1): 121-147.

**Datsenko KA, Wanner BL (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** (12): 6640-6645.

**Donovan RS, Robinson CW, Glick BR (1996).** Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J Ind Microbiol* **16** (3): 145-154.

**Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16** (13): 6127-6145.

**Ebbighausen H, Weil B, Krämer R (1989).** Transport of branched-chain amino-acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* **151**:238-244.

**Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L (2004).** The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif* **37** (1): 203-206.

**Eklund T (1983).** The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *J Appl Bacteriol* **54** (3): 383-9.

**Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS (2002).** Stochastic gene expression in a single cell. *Science* **297**: 1183-1186.

**Faber K (2000).** Biotransformations in Organic Chemistry - a textbook. edn. 4 Berlin: Springer-Verlag.

**Falconer DF, Spector MP, Foster JW (1984).** Membrane Association of NAD Pyrophosphatase in *Salmonella typhimurium*. *Current Microbiology* **10**: 237-242.

**Ferro AM, Olivera BM (1987).** Intracellular pyridine nucleotide degradation and turnover. In Dolphin D, Poulson R and Avramovic O (ed.), Coenzymes and Cofactors, vol. II. Pyridine Nucleotide Coenzymes, part A. John Wiley & Sons, Inc., New York. 25-77.

**Flachmann R, Kunz N, Seifert J, Gutlich M, Wientjes FJ, Laufer A, Gassen HG (1988).** Molecular biology of pyridine nucleotide biosynthesis in *Escherichia coli*. Cloning and characterization of quinolinate synthesis genes *nadA* and *nadB*. *Eur J Biochem* **175** (2): 221-228.

**Foster JW, Baskowsky-Foster AM (1980).** Pyridine nucleotide cycle of *Salmonella typhimurium*: *in vivo* recycling of Nikotinamide adenine dinucleotide. *J Bacteriol* **142** (3): 1032-1035.

**Foster JW, Kinney DM, Moat AG (1979a).** Pyridine nucleotide cycle of *Salmonella typhimurium*: isolation and characterization of *pncA*, *pncB*, and *pncC* mutants and

utilization of exogenous Nikotinamide adenine dinucleotide. *J Bacteriol* **137** (3): 1165-1175.

**Foster JW, Kinney DM, Moat AG (1979b)**. Pyridine nucleotide cycle of *Salmonella typhimurium*: regulation of Nikotinic acid phosphoribosyltransferase and Nikotinamide deamidase. *J Bacteriol* **138** (3): 957-961.

**Foster JW, Moat AG (1980)**. Nikotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. *Microbiol Rev* **44** (1): 83-105.

**Fountoulakis M, Langen H (1997)**. Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal Biochem* **250** (2): 153-156.

**Frick DN, Bessman MJ (1995)**. Cloning, purification, and properties of a novel NADH pyrophosphatase. Evidence for a nucleotide pyrophosphatase catalytic domain in MutT-like enzymes. *J Biol Chem* **270** (4): 1529-1534.

**Fujita Y, Ramaley R, Freese E (1977)**. Location and properties of glucose dehydrogenase in sporulating cells and spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **132** (1): 282-93.

**Galkin A, Kulakova L, Tishkov V, Esaki N, Soda K (1995)**. Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium *Mycobacterium vaccae* N10. *Appl Microbiol Biotechnol* **44** (3-4): 479-483.

**Gallagher SR, Desjardins PR (2007)**. Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. *Current Protocols in Human Genetics*. Appendix 3D.

**Gay P, Le Coq D, Steinmetz M, Berkelmann T, Kado CI (1985)**. Positive Selection Procedure of Insertion Sequence Elements in Gram-Negative Bacteria. *J Bacteriol* **164** (2): 918-921.



**Gellert M, Little JW, Oshinsky CK, Zimmerman SB (1968).** Joining of DNA strands by DNA ligase of *E. coli*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **33** 21-6.

**Gholson RK (1969).** The pyridine nucleotide cycle. *Nature* (London) **212**: 933-935.

**Grose JH, Bergthorsson U, Roth JR (2005).** Regulation of NAD synthesis by the trifunctional NadR protein of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **187** (8): 2774-2782.

**Gutmann M (1992).** Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und physiologische Bedeutung des Carrier vermittelten Exports. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J (1995).** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J Bacteriol* **177** (14): 4121-4130.

**Hahn G, Kaup B, Bringer-Meyer S, Sahm H (2003).** A zinc-containing mannitol-2-dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: purification of the enzyme and cloning of the gene. *Arch Microbiol* **179** (2): 101-107.

**Hanahan D (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166** (4): 557-580.

**Hansen LH, Knudsen S, Sorensen SJ (1998).** The effect of the *lacY* gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Curr Microbiol* **36** (6): 341-347.

**Heinonen JK, Lahti RJ (1981).** A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal Biochem* **113** (2): 313-317.

**Herring CD, Glasner JD, Blattner FR (2003).** Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*. *Gene* **311** 153-163.

**Hillyard D, Rechsteiner M, Manlapaz-Ramos P, Imperial JS, Cruz LJ, Olivera BM (1981).** The pyridine nucleotide cycle. Studies in *Escherichia coli* and the human cell line D98/AH2. *J Biol Chem* **256** (16): 8491-8497.

**Hughes KT, Ladika D, Roth JR, Olivera BM (1983).** An indispensable gene for NAD biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **155** (1): 213-221.

**Iizuka M, Mizuno D (1967).** Turnover of NAD in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **148** (2): 320-327.

**Imсандe J, Pardee AB (1962).** Regulation of pyridine nucleotide synthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **237**: 1305-1308.

**Josse J (1966).** Constitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. 1. Purification and catalytic properties. *J Biol Chem* **241** (9): 1938-1947.

**Kaplan NO, Colowick SP, Barnes CC (1951).** Effect of alkali on diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* **191** (2): 461-472.

**Kashket ER (1985).** Effects of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> on the proton motive force of respiring *Escherichia coli* at alkaline pH. *J Bacteriol* **163** (2): 423-429.

**Kaup B (2004).** Gewinnung von D-Mannitol mit rekombinanten *Escherichia coli* Stämmen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Kaup B, Bringer-Meyer S, Sahn H (2004).** Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol* **64** (3): 333-339.

**Kelle R, Laufer B, Brunzema C, Weuster-Botz D, Krämer R, Wandrey C (1996).** Reaction Engineering Analysis of L-Lysine Transport by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and Bioengineering* **51**: 40-50.

**Kets EP, Galinski EA, de Wit M, de Bont JA, Heipieper HJ (1996).** Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J Bacteriol* **178** (23): 6665-6670.

**Kihumbu D, Stillger T, Hummel W, Liese A (2002).** Enzymatic synthesis of all stereoisomers of 1-phenylpropane-1,2-diol. *Tetrahedron Asymm* **13**: 1069-1072.

**Klingenberg M, Pfaff E (1977).** Means of terminating reactions. *Methods in Enzymology* **10**: 680-684.

**Koeller KM, Wong CH (2001).** Enzymes for chemical synthesis. *Nature* **409** (6817): 232-240.

**Kornberg HL, Lambourne LT, Sproul AA (2000).** Facilitated diffusion of fructose via the phosphoenolpyruvate/glucose phosphotransferase system of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (4): 1808-1812.

**Kornberg HL, Prior TI (1989).** Fructose uptake by *Escherichia coli*-'the odd man out' of the phosphotransferase system. *FEMS Microbiol Rev* **5** (1-2): 193-200.

**Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd, Peterson KM (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1-MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166** (1): 175-176.

**Kurnasov O, Goral V, Colabroy K, Gerdes S, Anantha S, Osterman A, Begley TP (2003).** NAD Biosynthesis. Identification of the Tryptophan to Quinolinate Pathway in Bacteria. *Chem Biol* **10** (12): 1195-1204.

**Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259): 680-685.

**Li Z, van Beilen JB, Duetz WA, Schmid A, de Raadt A, Griengl H, Witholt B (2002).** Oxidative biotransformations using oxygenases. *Curr Opin Chem Biol* **6** (2): 136-144.

**Lilius EM, Multanen VM, Toivonen V (1979).** Quantitative extraction and estimation of intracellular Nikotinamide nucleotides of *Escherichia coli*. *Anal Biochem* **99** (1): 22-27.

**Link AJ, Phillips D, Church GM (1997).** Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* **179** (20): 6228-6237.

**Looser V, Hammes F, Keller M, Berney M, Kovar K, Egli T (2005).** Flow-Cytometric Detection of Changes in the Physiological State of *E. coli* Expressing a Heterologous Membrane Protein during Carbon-Limited Fedbatch Cultivation. *Biotechnol Bioeng* **92** (1): 69-78.

**Lowry OH, Passonneau JV, Rock MK (1961).** The stability of pyridine nucleotides. *J Biol Chem* **236**: 2756-2759.

**Lundin A, Thore A (1975).** Comparison of Methods for Extraction of Bacterial Adenine Nucleotides Determined by Firefly Assay. *Applied Microbiology* **30** (5): 713-721.

**Lundquist R, Olivera BM (1971).** Pyridine nucleotide metabolism in *Escherichia coli*. I. Exponential growth. *J Biol Chem* **246** (4): 1107-1116.

**Maggio-Hall LA, Escalante-Semerena JC (2003).** Alpha-5,6-dimethyl-benzimidazole adenine dinucleotide (alpha-DAD), a putative new intermediate of coenzyme B<sub>12</sub> biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* **149** (Pt 4): 983-990.

**Manlapaz-Fernandez P, Olivera BM (1973).** Pyridine nucleotide metabolism in *Escherichia coli*. IV. Turnover. *J Biol Chem* **248** (14): 5150-5155.

**Marin K, Stirnberg M, Eisenhut M, Krämer R, Hagemann M (2006).** Osmotic stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803: low tolerance towards nonionic osmotic stress results from lacking activation of glucosylglycerol accumulation. *Microbiology* **152** (Pt 7): 2023-2030.

**McAdams HH, Arkin A (1997).** Stochastic mechanisms in gene expression. *Biochemistry* **94**: 814-819.

**Mehl RA, Kinsland C, Begley TP (2000).** Identification of the *Escherichia coli* Nikotinic acid mononucleotide adenylyltransferase gene. *J Bacteriol* **182** (15): 4372-4374.

**Miller J (1972).** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 352-355.

**Miroux B, Walker JE (1996).** Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260** (3): 289-298.

**Moritz BM (2000).** Untersuchungen zur Regulation des Pentosephosphatweges in *Corynebacterium glutamicum*. Doktorarbeit an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

**Moss J, Garrison S, Oppenheimer NJ, Richardson SH (1979).** NAD-dependent ADP-ribosylation of arginine and proteins by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J Biol Chem* **254** (14): 6270-6272.

**Mülhardt C (2000).** Der Experimentator: Molekularbiologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin. 2. Auflage. 108-116.

**Murphy KC (1998).** Use of bacteriophage  $\lambda$  recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 2063-2071.

- Neidhardt FC, Bloch PL, Smith DF (1974).** Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol* **119** (3): 736-747.
- Nessi C, Albertini AM, Speranza ML, Galizzi A (1995).** The *outB* gene of *Bacillus subtilis* codes for NAD synthetase. *J Biol Chem* **270** (11): 6181-6185.
- Nouwens AS, Cordwell SJ, Larsen MR, Molloy MP, Gillings M, Willcox MD, Walsh BJ (2000).** Complementing genomics with proteomics: the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Electrophoresis* **21** (17): 3797-3809.
- O'Handley SF, Frick DN, Dunn CA, Bessman MJ (1998).** Orf186 represents a new member of the Nudix hydrolases, active on adenosine(5')triphospho(5')adenosine, ADP-ribose, and NADH. *J Biol Chem* **273** (6): 3192-3197.
- Olivera BM, Hall ZW, Anraku Y, Chien JR, Lehman IR (1968).** On the mechanism of the polynucleotide joining reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **33** 27-34.
- Pantazaki AA, Pritsa AA, Kyriakidis DA (2002).** Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**: 1-12.
- Park UE, Olivera BM, Hughes KT, Roth JR, Hillyard DR (1989).** DNA ligase and the pyridine nucleotide cycle in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **171** (4): 2173-2180.
- Park UE, Roth JR, Olivera BM (1988).** *Salmonella typhimurium* mutants lacking NAD pyrophosphatase. *J Bacteriol* **170** (8): 3725-3730.
- Parker C, Barnell WO, Snoep JL, Ingram LO, Conway T (1995).** Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (*glf*) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport. *Molecular Microbiology* **15** (5): 795-802.

**Penfound T, Foster JW (1996).** Biosynthesis and Recycling of NAD. In: *Escherichia coli* und *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt FC. American Society for Microbiology **2**: 721-730.

**Penfound T, Foster JW (1999).** NAD-dependent DNA-binding activity of the bifunctional NadR regulator of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181** (2): 648-655.

**Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR (1993).** Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57** (3): 543-594.

**Rongvaux A, Andris F, Van Gool F, Leo O (2003).** Reconstructing eukaryotic NAD metabolism. *BioEssays* **25**: 683-690.

**Russell JB (1992).** Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Bacteriology* **73**: 363-370.

**Sambrook J, Russel, DW (2000).** Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

**San KY, Bennett GN, Berrios-Rivera SJ, Vadali RV, Yang YT, Horton E, Rudolph FB, Sariyar B, Blackwood K (2002).** Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab Eng* **4** (2): 182-192.

**Sanger F, Coulson AR, Hong GF, Hill DF, Petersen GB (1982).** Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J Mol Biol* **162** (4): 729-773.

**Schaffer S, Weil B, Nguyen VD, Dongmann G, Gunther K, Nickolaus M, Hermann T, Bott M (2001).** A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22** (20): 4404-4422.

**Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B (2001).** Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409** (6817): 258-268.

**Schneider KH, Giffhorn F (1989).** Purification and properties of a polyol dehydrogenase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur J Biochem* **184** (1): 15-19.

**Schroer K, Mackfeld U, Tan IAW, Wandrey C, Heuser F, Bringer-Meyer S, Weckbecker A, Hummel W, Daubmann T, Pfaller R, Liese A, Lütz S (2007).** Continuous Asymmetric Ketone Reduction with Recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*.

**Schubert T, Hummel W, Muller M (2002).** Highly enantioselective preparation of multifunctionalized propargylic building blocks. *Angew Chem Int Ed Engl* **41**: 634-637.

**Schütte H, Flossdorf J, Sahm H, Kula MR (1976).** Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur J Biochem* **62** (1): 151-160.

**Schütz HJ (1984).** Unveröffentlichte Daten.

**Stancek M, Isaksson LA, Ryden-Aulin M (2003).** *fusB* is an allele of *nadD*, encoding nicotinate mononucleotide adenylyltransferase in *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**: 2427-2433.

**Starai VJ, Celic I, Cole RN, Boeke JD, Escalante-Semerena JC (2002).** Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. *Science* **298** (5602): 2390-2392.

**Stewart JD (2001).** Dehydrogenases and transaminases in asymmetric synthesis. *Curr Opin Chem Biol* **5** (2): 120-129.



**Studier FW, Moffatt BA (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189** (1): 113-130.

**Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990).** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89.

**Tabor S, Richardson CC (1990).** DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *J Biol Chem* **265**: 8322-8328.

**Takei S, Totsu J, Nakanishi K (1966).** Studies on metabolic pathway of NAD in yeast cells. Part V. Properties of nucleotide pyrophosphatase and its relation to 5-nucleotidase. *Agric Biol Chem* **33** 1251-1256.

**Tan AWY (2006).** Applications of Whole Cell Biotransformation for the Production of Chiral Alcohols. Dissertation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

**Theobald U, Mailinger W, Reuss M, Rizzi M (1993).** *In vivo* analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. *Anal Biochem* **214** (1): 31-37.

**Thompson JL, Hinton M (1996).** Effect of short-chain fatty acids on the size of enteric bacteria. *Lett Appl Microbiol* **22** (6): 408-412.

**van der Donk WA, Zhao H (2003).** Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Curr Opin Biotechnol* **14** (4): 421-426.

**Veldhuis G, Broos J, Poolman B, Scheek RM (2005).** Stoichiometry and substrate affinity of the mannitol transporter, EnzymeII<sub>mtl</sub>, from *Escherichia coli*. *Biophys J* **89** (1): 201-210.

**Vinitsky A, Grubmeyer C (1993).** A new paradigm for biochemical energy coupling. *Salmonella typhimurium* Nikotinate phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem* **268** (34): 26004-26010.

**Vorm O, Mann M (1994).** Improved mass accuracy in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**: 955-958.

**Vrtis JM, White AK, Metcalf WW, van der Donk WA (2001).** Phosphite dehydrogenase: an unusual phosphoryl transfer reaction. *J Am Chem Soc* **123** (11): 2672-2673.

**Walter A, Gutknecht J (1984).** Monocarboxylic acid permeation through lipid bilayer membranes. *J Membr Biol* **77** (3): 255-264.

**Walton AZ, Stewart JD (2004).** Understanding and improving NADPH-dependent reactions by nongrowing *Escherichia coli* cells. *Biotechnol Prog* **20** (2): 403-411.

**Webb MR (1992).** A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (11): 4884-4887.

**Weckbecker A, Mahmoud O, Hummel W (2007).** Increasing the catalytic performance of a whole cell biocatalyst by engineering the NAD(P)<sup>+</sup> biosynthesis. Unveröffentlicht.

**Weisser P, Kramer R, Sahn H, Sprenger GA (1995).** Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *J Bacteriol* **177** (11): 3351-3354.

**Willison JC, Tissot G (1994).** The *Escherichia coli* *efg* gene and the *Rhodobacter capsulatus* *adgA* gene code for NH<sub>3</sub>-dependent NAD synthetase. *J Bacteriol* **176** (11): 3400-3402.

**Wimpenny JW, Firth A (1972).** Levels of Nikotinamide adenine dinucleotide and reduced Nikotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *J Bacteriol* **111** (1): 24-32.

**Wong CH, Whitesides GM (1981).** Enzyme-Catalyzed Organic Synthesis: NAD(P)H Cofactor Regeneration Using Glucose-6-Phosphate and the Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Am Chem Soc* **53** 4890-4899.

**Wubbolts MG, Terpstra P, van Beilen JB, Kingma J, Meesters HA, Witholt B (1990).** Variation of cofactor levels in *Escherichia coli*. Sequence analysis and expression of the *pncB* gene encoding Nikotinic acid phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem* **265** (29): 17665-17672.

**You KS (1985).** Stereospecificity for Nikotinamide nucleotides in enzymatic and chemical hydride transfer reactions. *CRC Crit Rev Biochem* **17** (4): 313-451.

**Young KM, Foegeding PM (1993).** Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH. *J Appl Bacteriol* **74** (5): 515-520.

**Zhang H, Zhou T, Kurnasov O, Cheek S, Grishin NV, Osterman A (2002).** Crystal structures of *Escherichia coli* Nikotinate mononucleotide adenylyltransferase and its complex with deamido-NAD. *Structure* **10** (1): 69-79.

**Zhang J, Witholt B, Li Z (2006).** Coupling of permeabilized microorganisms for efficient enantioselective reduction of ketone with cofactor recycling. *Chem. Comm.* 398-400.

**Zhao H, Chockalingam K, Chen Z (2002).** Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol* **13** (2): 104-110.

**Zilberstein D, Agmon V, Schuldiner S, Padan E (1982).** The Sodium/Proton Antiporter Is Part of the pH Homeostasis Mechanism in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **257** (7): 3687-3691.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. H. Sahn danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung der Arbeit. Seine konstruktive Kritik in wissenschaftlichen Diskussionen hat diese Arbeit bereichert und Anstöße für die Weiterentwicklung geliefert.

Herrn Prof. Dr. K.-E. Jäger danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Frau Dr. S. Bringer-Meyer danke ich für die vielen aufschlussreichen Gespräche, Ratschläge und Anregungen, die ich während meiner Promotion erhalten habe.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie gilt mein Dank für ihre kollegiale Zusammenarbeit, besonders Frau M. Chmielus.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden, die mich in der Zeit der Doktorarbeit stets unterstützt haben.

Jül-4259  
Januar 2008  
ISSN 0944-2952