



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Integrative Research Center Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit

Genomverändernde Strategien für die maßgeschneiderte Produktion der Exopolysaccharide Alginat und Welan

Nadine Maria Sperl

Vollständiger Abdruck der von der promotionsführenden Einrichtung TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Bastian Blombach

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Volker Sieber
2. Prof. Dr. Cordt Zollfrank

Die Dissertation wurde am 16.07.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und von der promotionsführenden Einrichtung TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit am 07.11.2019 angenommen.



für Lea

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation ohne Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt wurde. Alle verwendeten Passagen wurden kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe der Technischen Universität München, Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit, bei Prof. Volker Sieber durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Volker Sieber herzlich für seine Unterstützung und sein Vertrauen danken.

Prof. Cordt Zollfrank danke ich für die Begleitung dieser Arbeit als Mentor, sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Prof. Jochen Schmid möchte ich mich für die fachliche Betreuung bedanken.

Im Rahmen des ersten Projekts bedanke ich mich bei Frau Dr. Johanna de Reese und Frau Dr. Oksana Storcheva für die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Reinhard Sterner und Klaus-Jürgen Tiefenbach für die Möglichkeit der Benutzung des CD-Spektrometers bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin der Deutschen Forschungsgesellschaft für die Finanzierung meiner Promotion.

Ein großes Dankeschön für die immer nette und hilfsbereite Zusammenarbeit gilt allen Mitgliedern des Lehrstuhls Chemie Biogener Rohstoffe.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Broder Rühmann, Claudia Nowak, Irmgard Urban, Dr. Josef Sperl, Magdalena Haslbeck, Manuel Döring, Marius Rütering, Michael Loscar, Moritz Gansbiller und Petra Lommes für die Unterstützungen im Labor, sowie bei Elisabeth Aichner für die Unterstützung in administrativen Belangen.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und dafür, dass sie mir das alles ermöglicht haben.

Ganz besonders danke ich Sepp und Lea für ihre Unterstützung und Geduld.

Publikationsliste

Schmid, J., **Sperl N.**, Sieber V. (2014). "A comparison of genes involved in sphingan biosynthesis brought up to date." *Appl Microbiol Biotechnol* 98(18): 7719-7733.

de Reese, J.*, **Sperl N.***, Schmid J., Sieber V., Plank J. (2015). "Effect of biotechnologically modified alginates on LDH structures" *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials* 4(3): 13.

*geteilte Erstautorenschaft

Schmid, J., Heider D., Wendel N.J., **Sperl N.**, Sieber V. (2016). "Bacterial Glycosyltransferases: Challenges and Opportunities of a Highly Diverse Enzyme Class Toward Tailoring Natural Products." *Front Microbiol* 7: 182.

Zusammenfassung

Mikrobiell produzierte Exopolysaccharide (EPS) erlangen nicht zuletzt auch durch die Umorientierung der chemischen Industrie hin zu nachwachsenden Rohstoffen immer mehr Bedeutung. Diese ungiftigen Polymere können nachhaltig produziert werden, sind zudem biologisch abbaubar und finden technische Anwendung in der Verdickung, Emulgation und Stabilisierung wässriger Lösungen. Gerichtete Veränderungen ihrer molekularen Struktur ermöglichen neue physikochemische Eigenschaften und eröffnen dadurch auch bis heute unbekannte Anwendungsfelder. Ein potentiell neues Anwendungsfeld von Alginaten, einer bestimmten Gruppe von Exopolysacchariden, findet sich in der Bauchemie. Durch die Interkalation von Alginaten in *layered double hydroxide* (LDH) Schichten entstehen Nanostrukturen, die z.B. als Zusatzstoff zur Reduktion der Brüchigkeit und Erhöhung der Zugfestigkeit von Beton benutzt werden können. Da der Einfluss unterschiedlicher Alginatstrukturen (Verhältnis von Mannuron (M)- zu Guluronsäure (G)) auf die Bildung und Gestalt dieser Nanostrukturen in vorangegangenen Studien nicht ausreichend untersucht wurde, wurden in dieser Arbeit gezielt verschiedene bakterielle Alginate mit definierten Monomerverhältnissen bereitgestellt und charakterisiert. Alle Alginatproben interkalierten in die Zn_2Al Wirtsstruktur. Ein gesteigerter G-Gehalt in der Struktur führte auf Grund des größeren sterischen Volumens von G zu einer Vergrößerung des Zwischenschichtabstandes. Alginate, die verschiedene Mengen an G besitzen, können demnach benutzt werden, die Zwischenschichten der LDH Gemische gezielt zu verändern. Auch die partielle Acetylierung von Alginat-Hydroxylgruppen vergrößerte die Entfernung der LDH-Schichten, während unterschiedliche Molekulargewichte der Polymere keine Auswirkungen zeigten.

Auch EPS, die vom Genus *Sphingomonas* produziert werden, spielen eine Hauptrolle in der Entwicklung einer biobasierten Zukunft. In dieser Arbeit wurde daher detailliert das kürzlich sequenzierte Genom des Welan-produzierenden Stammes *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 untersucht und das komplette Welancluster sowie weitere Gene, die in der EPS Produktion involviert sind, identifiziert. Anschließend wurden diese EPS-Synthesegene auf Nukleotid- und Aminosäuresequenzbasis mit den anderen EPS-Clustern der beschriebenen Gellan-, Diutan-, S-88- und S7-produzierenden Stämmen verglichen. Hierbei zeigte sich, dass das Auftreten der Gene in allen Biosyntheseclustern mit den Strukturen der unterschiedlich produzierten Sphingane verbunden ist. Darüber hinaus sind die Gencluster für die Biosynthese von Diutan, Welan, Gellan, S-88 und S7 in ihrer generellen Organisation sehr ähnlich, unterscheiden sich aber in der Lokalisierung und Anordnung einiger Gene. Aufbauend auf diese Erkenntnisse wurde die

Veränderung der bekannten Struktur des EPS Welan angestrebt. Welan besitzt ein konstant aufgebautes Rückgrat, das zusätzlich eine Seitenkette besitzt, die im Verhältnis 2:1 aus Rhamnose und Mannose besteht. Durch Deletion des Rhamnoseclusters sollte die Versorgung mit Rhamnosevorläufermolekülen verringert oder gar unterbunden werden, um somit eine Seitenkette zu erhalten, die nur noch aus Mannose besteht. Da Rhamnose auch ein Bestandteil der Hauptkette ist, wurden zusätzliche Effekte auf das Rückgrat des EPS erwartet. Zur Deletion des Rhamnoseclusters wurde eine für den Organismus *Pseudomonas putida* entwickelte *knockout* Methode anhand einiger Veränderungen erfolgreich im Stamm *Sphingomonas* sp. etabliert. Die Deletion war jedoch nicht vollständig, da in erfolgreichen Deletionsstämmen stets noch das zuvor integrierte pEMG-Plasmid nachweisbar war. Um dieses widersprüchliche Phänomen genauer zu untersuchen, wurden weitere Genomanalysen durchgeführt, die zeigten, dass das integrierte Plasmid auf Grund einer bestehenden lokalen Sekundärstruktur in der Deletionsregion nicht komplett entfernt werden konnte und dass der Stamm ATCC 31555 mehrere Genkopien besitzt. Weitere Deletionsversuche der Gene *welQ*, *welB*, *urf31* und *urf34* führten zu der Erkenntnis, dass eine Integration am 5'-Ende des Synthesecusters nicht möglich ist und dass erst 20 kBp unterhalb des 3'-Endes eine vollständige Deletion erfolgreich durchgeführt werden kann. Das EPS der nicht vollständig deletierten Mutante Welan Δ rmlAD wurde anschließend auf seine Monomierzusammensetzung mittels HPLC-MS untersucht. Der Anteil an Rhamnose war sehr stark verringert und konnte nur noch in Spuren nachgewiesen werden. Zudem konnte, unabhängig vom verwendeten Medium, eine große Menge des Monomers Galactose identifiziert werden. Galactose war bisher noch nicht als Bestandteil der Welanstruktur beschrieben, daher wurde das EPS-Produkt des nicht-modifizierten Stamms ATCC 31555 erneut charakterisiert. Auch hierbei konnte ein Anteil an Galactose nachgewiesen werden. Diese interessante Erkenntnis spricht in Kombination mit der beschriebenen Struktur von Welan dafür, dass *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 zwei verschiedene EPS produzieren kann, wobei das zweite EPS mit dem Monomer Galactose in geringerer Menge gebildet wird. Auf Grund der partiellen Deletion des Rhamnoseclusters ging die Fähigkeit zur Produktion von Welan weitestgehend verloren, weshalb nur noch das Galactose-enthaltende EPS auftrat. Ausgehend von der beabsichtigten Genomeditierung zur Produktion von modifizierten Varianten des EPS Welan konnten damit in dieser Arbeit deutliche Hinweise auf die Produktion eines weiteren EPS in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 gefunden werden.

Abstract

With the sustained reorientation of the chemical industry towards renewable resources, microbiologically synthesized exopolysaccharides (EPS) obtain more and more importance. These nontoxic polysaccharides can be produced sustainably and they are biodegradable. In addition and above all they can modify the properties of aqueous solutions by thickening or are used for emulsifying and stabilizing applications. Their chemical structures can precisely be modified by engineering the genomes of production strains. Consequently, targeted changes in the molecular structure of EPS lead to novel physicochemical features and open application areas, which are unknown today. Recently, bioinspired materials based on nano-structured composites have acquired significant attention. Alginates, a certain group of EPS intercalate in layered double hydroxide (LDH) structures to yield different types of nano structures. These structures can be used as admixture to decrease the brittleness and increase the tensile strength of hardened cement and thus have a prospective application in the construction industry. As the influence of the different structures of alginate (ratio of mannuronic acid (M) to guluronic acid (G)) on the formation and shape of these nano structures was not sufficiently examined, bacterial alginates with different M to G ratios were produced and characterized in this thesis. The alginates intercalated successfully into Zn_2Al host structures, with a higher content of G leading to larger interlayer distances due to the bigger steric volume of G. Hence alginates owing different contents of G can be used to alter the interlayer distance in LDH compounds. Partial acetylation of hydroxylic groups also increased the d-spacing of the LDH, whereas the molecular weight of the alginate polymers did not exhibit any effect.

EPS produced by the genus *Sphingomonas* also play a major role for the development of a biobased future. Because of this, the recently sequenced genome of the welan-producing strain *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 was examined in detail in this thesis and the complete welan cluster and further genes involved in EPS production were identified. The corresponding genes were then further compared on the nucleotide and amino acid sequence level to the EPS clusters of the described gellan-, diutan-, S-88- and S7-producing strains. The results showed that the appearance of genes in all biosynthesis clusters is related to the structure of the various produced sphingans. Homologous genes responsible for the assembly of identical repeating units demonstrate high sequence identity, whereas genes for putative side chain attachment (*urf31*, *urf31.4*, *urf34*) vary in significant areas. Furthermore, gene clusters for biosynthesis of diutan, welan,

gellan, S-88 and S7 are similar in general organization but differ in location and arrangement of several genes.

Based on these results, the alteration of the known Welan structure was pursued. Welan consists of the conserved sphingan backbone repeating unit of glucose/glucuronic acid/rhamnose in the ratio of about 2:1:1 with an additional rhamnosyl or mannosyl side chain. The ratio of appearance in the side chain between rhamnose and mannose is about 2:1. The supply with dTDP-rhamnose as activated nucleotide sugar precursor should be reduced or even stopped by deletion of the rhamnose cluster to obtain a side chain only consisting of mannose. Additionally, a change of the sugar backbone was also expected as rhamnose is also part of the main chain. To yield the deletion of the rhamnose cluster a knockout method previously applied in *Pseudomonas putida* (pEMG/pSW) was successfully transformed to the strain *Sphingomonas* through integration of specific modifications. However, the deletion was not complete as the integrated plasmid pEMG remained in the genome of deletion strains. To examine this contradictory phenomenon, further genetic analyses were examined. These analyses showed that the particular secondary structure at this gene locus led to the incomplete excision of the plasmid by the endonuclease and that the genomic DNA of strain ATCC 31555 consists of multiple copies. Further deletion trials of the genes *welQ*, *welB*, *urf31* and *urf34* showed that the plasmid integration was not possible at the 5' terminus of the synthesis cluster and that a complete DNA knockout could only be achieved 20 kbp downstream of the 3' terminus. Nevertheless, the EPS Welan Δ rmlACBD produced by the partial deletion strain *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD was characterized by HPLC-MS to yield information on its monomer composition. As expected, the amount of rhamnose was very largely reduced and it was only detectable in traces. Surprisingly, a high amount of the monomer galactose was identified in the monomer composition. Galactose was previously unknown as an element of welan. Because of this, welan produced by the wild type strain was again analyzed and galactose was again detected. This finding suggests, in combination with the described structure of welan that does not contain galactose, that the strain *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 is able to produce two different EPS of which the second one contains galactose. Due to its partial deletion of the rhamnose cluster, the strain *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD lost the ability to produce Welan largely, leading to an EPS with a relatively high content of galactose. As a conclusion, the detailed characterization of welan variants produced by genome edited strains showed clear indications for the synthesis of a second EPS in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bakterielle Polysaccharide	1
1.2	Bakterielle Exopolysaccharide (EPS)	2
1.3	Alginat	3
1.3.1	Struktur von Alginat	3
1.3.2	Die Alginatproduktion in <i>Azotobacter vinelandii</i>	5
1.3.3	Anwendung und Modifikation von bakteriell produzierten Alginaten .	9
1.4	Sphingane	11
1.4.1	Struktur verschiedener Sphingane	11
1.4.2	Biosynthese der Sphingane	16
1.4.3	Konzepte der Genmanipulation für die Verbesserung der Sphingan- produktion	24
1.5	Ziele dieser Arbeit	25
2	Material	26
2.1	Chemikalien	26
2.2	Enzyme	27
2.3	Kits	28
2.4	Geräte	28
2.5	Verwendete Software und Datenbanken	30
2.5.1	Lokale Anwendungen	30
2.5.2	Servergestützte Anwendungen	30
2.6	Nährmedien und Antibiotika	31
2.6.1	Nährmedien	31
2.6.2	Antibiotika	33
2.7	Verwendete Bakterienstämme	33
2.8	Verwendete Plasmide	34
2.9	Verwendete Oligodesoxyribonukleotide	36

2.10	DNA- und Protein-Längenstandards	40
3	Methoden	41
3.1	Mikrobiologische Methoden	41
3.1.1	Vorbereitung von Geräten und Lösungen.....	41
3.1.2	Bestimmung der optischen Dichte von <i>E. coli</i> Zellsuspensionen	41
3.1.3	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> , <i>A. vinelandii</i> und <i>Sphingomonas</i> Stämmen.....	41
3.1.4	Anzucht von <i>A. vinelandii</i> und <i>Sphingomonas</i> sp. Stämmen im Schüttelkolben für EPS-Produktion	42
3.1.5	Anzucht von <i>A. vinelandii</i> und <i>Sphingomonas</i> sp. Stämmen durch Fermentationen für EPS-Produktion	42
3.1.6	Herstellung kompetenter Zellen, Transformation und Konjugation .	43
3.1.7	Expression von rekombinanten Gensequenzen	47
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	49
3.2.1	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	49
3.2.2	Isolierung und Reinigung von genomischer DNA aus <i>A. vinelandii</i> und <i>Sphingomonas</i> sp.....	49
3.2.3	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	50
3.2.4	Agarosegelelektrophorese.....	50
3.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten	51
3.2.6	Restriktion und Ligation der DNA	51
3.2.7	Amplifikation von DNA mittels PCR.....	51
3.2.8	Gibson- <i>Assembly</i>	56
3.2.9	Anlagerung von Oligonukleotiden.....	56
3.2.10	Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	57
3.3	Proteinchemische Methoden.....	57
3.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration über UV.....	57
3.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
3.3.3	Proteinreinigung	59
3.3.4	Einkonzentrieren von Proteinlösungen	62

3.3.5	Lagerung von Proteinen	62
3.4	Prozessierung von Exopolysacchariden.....	62
3.4.1	Fällung von Polysacchariden.....	62
3.4.2	Deacetylierung von Alginat.....	63
3.4.3	Trocknung und Mahlen von Polysacchariden	63
3.4.4	Dialyse von Polysacchariden.....	63
3.5	Analytische Methoden.....	64
3.5.1	Gelpermeationschromatographie	64
3.5.2	Circular Dichroismus-Spektroskopie.....	65
3.5.3	High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	66
3.5.4	Fluoreszenzspektroskopie	69
3.5.5	Glucose-Assay	69
3.5.6	Phenol-Schwefelsäure-Assay.....	69
3.5.7	Bildung von Alginat-Gelen	69
3.5.8	<i>In vitro</i> Epimerisierung von Alginat	70
4	Ergebnisse	71
4.1	Interkalation des EPS Alginat in <i>Layered Double Hydroxides</i>	71
4.1.1	Quantifizierung der Monomierzusammensetzung mittels CD-Spektroskopie	72
4.1.2	Epimerisierung des EPS Alginat mit der Epimerase AlgE4.....	74
4.1.3	Charakterisierung und Anwendung verschiedener Alginate	86
4.2	Identifikation und Zuordnung der Gene des Welansyntheseclusters in <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555.....	91
4.3	Gen- und Proteinsequenzvergleich der Sphinganbiosynthesegene	95
4.3.1	Nukleotidvorstufen.....	95
4.3.2	Bildung der Tetrasaccharidwiederholungseinheiten	97
4.3.3	Hauptkettenmodifikation	98
4.3.4	Polymerisierung und Export.....	99
4.3.5	Regulation der Sphinganbiosynthese	101

4.4	Veränderung der Monomierzusammensetzung des EPS Welan mittels <i>genetic engineering</i>	102
4.4.1	<i>Knockout</i> des kompletten <i>rmlACBD</i> -Clusters	102
4.4.2	<i>Knockout</i> von <i>crtB</i>	115
4.4.3	<i>Knockouts</i> quer durch das Welansynthesecluster	117
4.4.4	Plasmidbasierte Überexpression von Proteinen und Integration von Genen in das Welansynthesecluster	123
4.5	Analyse gebildeter Welanvarianten	132
4.5.1	<i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555	132
4.5.2	<i>Knockout</i> Mutanten des Stammes <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555	139
4.5.3	Plasmidbasierte Überexpression von <i>rmlACBD</i> in <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555+pSRK-rmlACBD	147
5	Diskussion	148
5.1	Effekte von biotechnologisch modifizierten Alginaten auf LDH Strukturen .	148
5.1.1	Die Wahl des Polymers Alginat zur Interkalation in LDH Strukturen	148
5.1.2	Expression von Alginat mit AlgE4	149
5.1.3	Quantifizierung von Monomierzusammensetzung mittels CD	149
5.1.4	EPS-Ausbeute der <i>in vivo</i> Epimerisierung mittels Fermentation...	150
5.1.5	Anwendung verschiedener Alginatvarianten.....	152
5.2	Zuordnung und Vergleich von Sphinganbiosyntheseogenen	152
5.3	Genetische Modifikationen des Welansyntheseclusters.....	154
5.3.1	Deletion des <i>rmlACBD</i> -Clusters in <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555	154
5.3.2	<i>Knockout</i> von <i>crtB</i>	157
5.3.3	<i>Knockout</i> weiterer Gene des Welansyntheseclusters mit der pEMG/pSWII Methode.....	157
5.3.4	Modifizierung des Leervektors pJB861 und plasmidbasierte Überexpression	158

5.4	Analyse der gebildeten Welanvarianten	160
5.4.1	<i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555 produziert zwei verschiedene EPS	160
5.4.2	Auswirkung auf die Welanstruktur durch Deletion des Clusters <i>rmlACBD</i> via Methode pEMG/pSWII	163
5.4.3	Auswirkung auf die Welanstruktur durch Deletion des Gens <i>urf31</i> , <i>urf34</i> bzw. <i>welB</i> via Methode pEMG/pSWII	164
6	Ausblick	166
6.1	Alginataufbau beeinflusst Interkalation in LDH Strukturen.....	166
6.2	<i>Genetic engineering</i> in <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555	166
6.3	Aufklärung des Aufbaus der verschiedenen Welanvarianten	166
7	Referenzen	168
8	Anhang	176

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gemeinsame Struktur von K1 Polymer (produziert von <i>E. coli</i>) und KPS Gruppe B (produziert von <i>Neisseria meningitidis</i>).....	2
Abbildung 2: Struktur des Polysaccharids Alginat.....	4
Abbildung 3: Detaillierte Beschreibung der Alginatsynthese in <i>A. vinelandii</i>	6
Abbildung 4: Synthesecuster von Polysaccharid Alginat aus <i>A. vinelandii</i>	9
Abbildung 5: Strukturen der verschiedenen Sphingane.	12
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Welanbiosynthese.	17
Abbildung 7: Vergleich der Anordnung der Sphingangencluster (Gellan , Welan , Diutan , S-88 und S-7 produzierende Stämme).	18
Abbildung 8: <i>2-Log Ladder</i> dargestellt auf 1 % Agarosegel.	40
Abbildung 9: <i>PageRuler™ Unstained Protein Ladder</i> dargestellt auf SDS-Gel (12,5 %).	40
Abbildung 10: CD-Spektren der Alginatvarianten MC ₁ und MC ₂	73
Abbildung 11: Gele von MC ₁ und MC ₂	74
Abbildung 12: Plasmidbasierte <i>in vivo</i> Expression im analytischen Maßstab des Proteins AlgE4 durch pJB861-algE4. Ohne Induktion oder Induktion mit 1 mM Toluat.	76
Abbildung 13: CD-Spektren der Alginatvarianten MA973 und MA955.	77
Abbildung 14: Expression im analytischen Maßstab der Proteine AlgE4 und AlgE4-His ₆ durch pET22b(+)-Vektoren mit der Negativkontrolle des Leervektors pET22b(+). Induktion mit 0, 0,5 oder 1 mM IPTG.	80
Abbildung 15: SDS-PAGE der gereinigten Proteine AlgE4-His ₆ und AlgE4.	81
Abbildung 16: CD Spektren der Epimerisierungsreaktion mit AlgE4 der Probe PolyM in verschiedenen Konzentrationen.	82
Abbildung 17: CD Spektren der Epimerisierungsreaktion mit AlgE4 (58 + 79 kDa) und AlgE4-His ₆ (80 kDa) der Probe OligoM.	83
Abbildung 18: CD Spektren der <i>online</i> Epimerisierungsreaktion von OligoM mit AlgE4.	84

Abbildung 19: CD Spektren der <i>online</i> Epimerisierungsreaktion mit AlgE4 der Probe PolyM.....	85
Abbildung 20: CD-Spektren der Alginatevariante MEP82.....	86
Abbildung 21: GPC Chromatogramme der verschiedenen Alginatevarianten zur Bestimmung des Molekulargewichtes, sowie Kalibriergerade mit Pullulan.....	88
Abbildung 22: Schematische Darstellung der molekularen Anordnung der in Zn ₂ Al-LDH-Systeme interkalierten Alginateproben.	90
Abbildung 23: Synthesecuster des Welan-produzierenden Stamms <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555.	92
Abbildung 24: Schematische Darstellung der <i>knockout</i> -Methode pEMG/pSWII.	104
Abbildung 25: Agarosegele für den Nachweis der Plasmidintegration bzw. des <i>knockouts</i> , sowie schematisch dargestellte Plasmidintegration ins Genom von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555.	106
Abbildung 26: Kalibrierungsgerade des Logarithmus der Kopienanzahl von <i>rmlA</i> -Fragment mit der Anzahl der Quantifizierungszyklen und Amplifikationsgraphen von <i>rmlA</i>	111
Abbildung 27: Agarosegel für den Nachweis der Plasmidintegration, sowie schematisch dargestellte Plasmidintegration ins Genom von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555.....	116
Abbildung 28: Agarosegel für den Nachweis des <i>knockouts</i> des Gens <i>crtB</i> im Genom von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555, sowie Abbildung des Phänotyps der Mutante <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC31555Δ <i>crtB</i> und des Wildtyps.	117
Abbildung 29: Agarosegele für den Nachweis der Plasmidintegration, sowie des <i>knockouts</i> von <i>welB</i> im Stamm <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555.	119
Abbildung 30: Agarosegele für den Nachweis der Plasmidintegration, sowie des <i>knockouts</i> von <i>urf31</i> im Stamm <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555.	120
Abbildung 31: Agarosegele für den Nachweis der Plasmidintegration, sowie des <i>knockouts</i> von <i>urf34</i> im Stamm <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555.	121
Abbildung 32: LB _{Kana/Strep} Agar-Selektionsplatten nach der triparentalen Konjugation zur Integration der pEMG Plasmide.	123

Abbildung 33: Vergleich der Plasmidkonzentrationen von pJB861-L, pJB861-L-251M, pJB861-L-271C, pJB861-L-46M, pJB861-L-46M-251M, pJB861-L-46M-271C und pJB861-L-46M-251M-271C.....	126
Abbildung 34: Fluoreszenzemission von NEB Turbo Zellen mit den Plasmiden pJB861-L-eGFP, pJB861-L-251M-eGFP, pJB861-L-271C-eGFP, pJB861-L-46M-eGFP, pJB861-L-46M-251M-eGFP, pJB861-L-46M-271C-eGFP und pJB861-L-46M-251M-271C-eGFP und Vergleich der Plasmidkonzentration und RFU mittels 2D-Plot.....	128
Abbildung 35: Wachstumskurven und Glucoseverbrauch von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555.....	133
Abbildung 36: Überlagerung des UV- und MS-Chromatogrammes von der Monomeranalyse von Welan(Glucose).	134
Abbildung 37: Überlagerung des UV- und MS-Chromatogrammes von der Monomeranalyse von Welan(Saccharose).	136
Abbildung 38: Chromatogramme der GPC zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Welan(Glucose) und Welan(Saccharose) anhand einer Pullulan- Kalibriergerade.....	137
Abbildung 39: Verteilung von Glucose in den Fraktionen der Gelfiltration und Kalibriergerade des Phenol-Schwefelsäure Assays mit Glucose.	139
Abbildung 40: Wachstumskurven und Glucoseverbrauch von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD.....	140
Abbildung 41: Überlagerung des UV- und MS-Chromatogrammes von der Monomeranalyse von Welan Δ rmlACBD.	141
Abbildung 42: Überlagerung der MS-Chromatogramme von der Monomeranalyse von Welan(Glc) und Welan Δ rmlACBD.....	142
Abbildung 43: Chromatogramme der GPC zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Welan Δ rmlACBD, sowie Überlagerung der Chromatogramme Welan(Glucose), Welan(Saccharose) und Welan Δ rmlACBD.....	143
Abbildung 44: Chromatogramme der GPC zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Welan Δ welB, Welan Δ urf31, Welan Δ urf34, sowie Überlagerung der Chromatogramme Welan Δ urf34, Welan Δ urf31 und Welan Δ rmlACBD.	146

Abbildung 45: HPLC Chromatogramm zur Bestimmung der Acetatmenge von MA973.	176
Abbildung 46: Kalibrierungsgerade des Logarithmus der Kopienanzahl von 16S-Regionen mit der Anzahl der Quantifizierungszyklen.	176
Abbildung 47: Kalibriergerade mit Pullulan für die Bestimmung der Molekulargewichte von Welan(Glc) und Welan(Sac).	177
Abbildung 48: Fragmentierungsmuster des Dimers β -D-GlcUA-(1 \rightarrow 4)-D-Glc (m/z = 687).	177
Abbildung 49: Wachstumskurven und Glucoseverbrauch von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555 Δ urf31 (A), <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555 Δ urf34 (B) und <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC31555 Δ welB (C).....	178
Abbildung 50: Überlagerung des UV- und MS-Chromatogrammes von der Monomeranalyse von Welan Δ urf31 (Isolierung nach Zentrifugation)...	179

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.	26
Tabelle 2:	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.	33
Tabelle 3:	Zusammenfassung der verwendeten Plasmide.	34
Tabelle 4:	Zusammenfassung der konstruierten Plasmide.	34
Tabelle 5:	Zusammenfassung der verwendeten Oligonukleotide.	36
Tabelle 6:	PCR-Protokoll für die Taq DNA-Polymerase (NEB) und GoTaq® G2 (Promega).	54
Tabelle 7:	Extinktionskoeffizient und Molekulargewicht der Proteine AlgE4 und AlgE4-His ₆	58
Tabelle 8:	Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele.	59
Tabelle 9:	Standards zur Quantifizierung der Molekulargewichte mittels GPC.	64
Tabelle 10:	Monomierzusammensetzung und Retentionszeiten der Standards A und B der Gravity C18 Säule (Macherey-Nagel).	68
Tabelle 11:	M/G-Verhältnisse von Alginaten vor und nach Zugabe von AlgE4 zu OligoM bis zur Reaktionszeit von 100 h.	84
Tabelle 12:	M/G-Verhältnisse der verschiedenen Alginatvarianten.	87
Tabelle 13:	Verschiedene Molekulargewichte der Alginatvarianten.	88
Tabelle 14:	Verschiedene Abstände der Zwischenschichten für Zn ₂ Al- Alginat-LDHs der Alginatvarianten.	89
Tabelle 15:	Genname, Nukleotidanzahl, Proteinname, Aminosäureanzahl und prognostizierte Funktion der im Genom von <i>Spingomonas</i> sp. ATCC31555 essentiellen Strukturen für die Welanbiosynthese.	93
Tabelle 16:	Sequenzvergleiche der Gene für die Rhamnosenukleotidzuckersynthese (<i>rmIABCD</i>), die in Sphingan-produzierenden Stämmen identifiziert wurden.	96
Tabelle 17:	Sequenzvergleiche der Glykosyltransferasegene (<i>spnBKLQ</i>), die in Sphingan-produzierenden Stämmen identifiziert wurden.	98
Tabelle 18:	a-c Sequenzvergleiche der <i>urf</i> Gene (<i>urf31</i> , <i>34.1</i> und <i>34</i>), die in Sphingan-produzierenden Stämmen identifiziert wurden. d	

	Sequenzvergleiche des <i>sphF</i> Gens, das eine unbekannte Funktion in der Sphingan-Familie besitzt.....	99
Tabelle 19:	Sequenzvergleiche der Polymerisations-und Exportgene (<i>spnCGES</i>), die in Sphingan-produzierenden Stämmen identifiziert wurden.	100
Tabelle 20:	a Sequenzvergleiche der Exportgene (<i>spnD</i>), die in Sphingan-produzierenden Stämmen identifiziert wurden. b-d zeigen den Sequenzvergleich der Gene, deren Funktion nicht bestätigt ist (<i>spnMNL</i>).	101
Tabelle 21:	Resultate der EPS Analyse mit HT-PMP Methode von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555 (Kultivierung in EPS-Medium).....	133
Tabelle 22:	Resultate der EPS Analyse mit HT-PMP Methode von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555 (Kultivierung im Medium nach Jia <i>et al.</i>) und von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555 (Kultivierung in EPS-Medium).	136
Tabelle 23:	Resultate der EPS Analyse mit HT-PMP Methode von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555Δ <i>rmlACBD</i> (Kultivierung in EPS Medium), <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555 (Kultivierung im Medium nach Jia <i>et al.</i>) und von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555 (Kultivierung in EPS-Medium).	141
Tabelle 24:	Resultate der EPS Analyse mit HT-PMP Methode von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555::pEMG-us/ds(<i>rmlACBD</i>) (Kultivierung in EPS Medium).....	144
Tabelle 25:	Resultate der EPS Analyse mit HT-PMP Methode von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555Δ <i>welB</i> , ATCC 31555Δ <i>urf31</i> und ATCC 31555Δ <i>urf34</i> (Kultivierung in EPS Medium).	145
Tabelle 26:	Resultate der EPS Analyse mit HT-PMP Methode von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC+pSRK- <i>rmlACBD</i> (Kultivierung in EPS Medium).....	147
Tabelle 27:	Zusammenstellung der Monomierzusammensetzungen und molare Vergleichsanalysen von Welan(Glucose), sowie Welan(Saccharose), WelanΔ <i>rmlACBD</i> , WelanΔ <i>welB</i> , WelanΔ <i>urf31</i> und WelanΔ <i>urf34</i>	165
Tabelle 28:	Resultate der EPS Analyse (Fällung mit 75 – 95 % Isopropanol bzw. 95 % Ethanol) mit HT-PMP Methode von <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555.....	178

Formelverzeichnis

Formel 1:	Berechnung der Transformationseffizienz.....	44
Formel 2:	Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon(280)$	57
Formel 3:	Berechnung der Proteinkonzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz.	57
Formel 4:	Berechnung der molaren Elliptizität.....	65
Formel 5:	Berechnung der Monomierzusammensetzung von Alginat.	66

Abkürzungen

µL	Microliter
<i>A. vinelandii</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Amp	Ampicillin
Bp	Basenpaare
CAZy	Carbohydrate-Active enZYmes Database
Chloramp	Chloramphenicol
CFGE	<i>cloning free genome editing</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	doppeldestilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat dTTP
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DO	<i>dissolved oxygen</i> (= gelöster Sauerstoff)
<i>dps</i>	Gene des Diutansyntheseclusters
dTDP	Desoxythymidindiphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>dw</i>	<i>deep well</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPS	Exopolysaccharide
<i>et al.</i>	et alii bzw. et aliae (= und andere)
F6P	Fructose-6-phosphat
G	Guluronsäure
GDL	Glucono-d-lacton
GDP	Guanosindiphosphat
<i>gel</i>	Gene des Gellansyntheseclusters
Genta	Gentamycin
Glc	Glucose
GlcUA	D-Gluconat
GT	Glykosyltransferase
h	Stunde(n)
HR	homologe Region
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (= Meerrettich-Peroxidase)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

Abkürzungen

Kana	Kanamycin
KP	Kalium-Phosphat-Puffer
LDH	Lactatdehydrogenase
LS	Lichtstreuung
M	Mannuronsäure
Man	Mannose
MCS	<i>Multiple cloning site</i> (= Polylinker)
MDa	Megadalton
min	Minute(n)
MTP	Mikrotiterplatte
M _p	<i>Peak molecular weight</i>
Na ₄ EDTA	Natriummethyldiamintetraessigsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
ng	Nanogramm
O-Ac	Acetyl
OD _x	Optische Dichte bei x nm
O-Gl	Glycerat
PCP	Polysaccharide Kopolymerase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (= Polymerasekettenreaktion)
PGM	Phosphoglucomutase
PHB	Polyhydroxybuterat
PMP	1-Phenyl-3-methyl-5-pyralozon
PPi	Diphosphat
Rha	Rhamnose
RI	<i>refractive index</i> (= Brechungsindex)
rpm	<i>rounds per minute</i> (= Umdrehungen pro Minute)
RT	Raum-Temperatur
s.	siehe
S.	<i>Sphingomonas</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (= Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde(n)
sL/h	Standardliter pro Stunde
SOC-Medium	<i>Super Optimal Broth with Catabolite Repression</i>
<i>Sphingomonas sp.</i>	<i>Sphingomonas species</i>
<i>spn</i>	Gene des Sphinganclusters
<i>sps</i>	Gene des S-88-Clusters
Strep	Streptomycin

Abkürzungen

TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UGP	Glucose-1-phosphaturidyltransferase
UGP	Glucose-1-phosphaturidyltransferase
ün	über Nacht
urf	<i>uncharacterized open readinge frame</i> (= nicht zugewiesener Leserahmen)
UTP	Uridintriphosphat
<i>wel</i>	Gene des Welansyntheseclusters
wt	Wildtyp
X.	<i>Xanthomonas</i>
YEME	<i>Yeast extract-malt extract</i>
YM	<i>Yeast Malt</i>

1 Einleitung

1.1 Bakterielle Polysaccharide

Polysaccharide zeichnen sich dadurch aus, dass sie trotz der großen Zahl an natürlich vorkommenden Varianten nur aus relativ wenigen Struktureinheiten aufgebaut sind. Ihre heute bekannte, große Variabilität basiert auf der Verknüpfung von Zuckerresiduen, die ein breites Spektrum an Pentosen, Hexosen und Uronsäuren darstellen. Verschiedene Kohlenstoffatome dieser Zuckermonomere werden glycosidisch verbunden, was schließlich zu der nahezu unzählbaren Anzahl von verschiedenen Polysacchariden führt. Polysaccharide sind eine weitverbreitete Stoffklasse mit zahlreichen Aufgaben. Tierische Zellen benötigen diese Polymere vorwiegend als Energielieferant, wobei Pflanzen und Mikroorganismen sie als Speicher- und Gerüststoff verwenden. Zudem werden bakterielle Polysaccharide in der Lebensmittel-, Arzneimittel- und Computerindustrie, sowie in der Erdölförderung verwendet oder in der medizinischen Forschung als wichtige Antigene pathogener Bakterien eingesetzt.

Bakteriell produzierte Polysaccharide können allgemein in drei Klassen unterteilt werden: Speicherpolysaccharide, kapsuläre Polysaccharide und Exopolysaccharide.

Speicherpolysaccharide dienen als Energiespeicher, die für die Energieproduktion und biosynthetische Aktivitäten bei Bedarf hydrolysiert werden. Glykogen, das auch tierische Stärke genannt wird, ist das einzige in Bakterien vorkommende Speicherpolysaccharid. Es stellt den tierischen und bakteriellen, sowie den Energiespeicher der Pilze dar und ist ein sehr großes, verzweigtes Polymer aus Glucoseeinheiten. Die Primärstruktur von Glykogen besteht aus einer α -(1,4)-glycosidisch verbundenen Glucankette mit zusätzlicher α -(1,6)-glycosidisch verbundener Verzweigung an jedem achten bis zwölften Glucosemonomer. Das Polymer wird in den Zellen für die kontrollierte Freisetzung der Glucose vom Enzym Phosphorylase, das die α -(1,4)-glycosidischen Verbindung trennt, zu Glucose-1-phosphat Molekülen abgebaut und diese können anschließend zum Beispiel im Citratzyklus verstoffwechselt werden (Berg, Tymoczko et al. 2002).

Kapsuläre Polysaccharide (KPS) werden nach der Synthese sekretiert und übernehmen in gram-negativen Pathogenen die Funktion der Virulenzfaktoren, weshalb diese Polysaccharide dauerhaft als Kapsel an die Zellwand gebunden sind. Zu den Aufgaben der bakteriellen Kapseln zählen außerdem der Schutz vor Austrocknung und die Vermittlung der Moleküldiffusion durch die Zellwand (Roberts 1996). Die Bindung der kapsulären Polysaccharide an die bakterielle Oberfläche tritt meist kovalent zu Phospholipiden oder Lipid-A Molekülen auf, wobei auch die Assoziation an der Zelle durch die Abwesenheit eines Membranankers beobachtet wurde (Whitfield und Valvano 1993). Innerhalb der

Gruppe der kapsulären Polysaccharide ist eine große strukturelle Vielfalt erkennbar. Diese Makromoleküle sind Homo- oder Heteropolymere, die aus glycosidisch verbundenen, wiederholenden Monosaccharideinheiten bestehen (Roberts 1996). Außerdem tragen die verschiedenen Möglichkeiten der Ausbildung der glycosidischen Bindungen zwischen einer Vielzahl von Hydroxylgruppen der Monomeren zur Verschiedenartigkeit der Strukturen bei. Trotz dieser großen Vielfalt bakterieller KPS, synthetisieren verschiedene Stämme chemisch identische Kapseln: Das KPS *Neisseria meningitidis* Gruppe B ist identisch zum K1 Polymer, das von *E. coli* produziert wird (s. Abbildung 1) und die Antigene K18, K22 und K100, ebenfalls produziert in *E. coli*, besitzen dieselbe Struktur wie die Serotyp b Kapseln von *Haemophilus influenza* (Reckseidler-Zenteno, DeVinney et al. 2005).

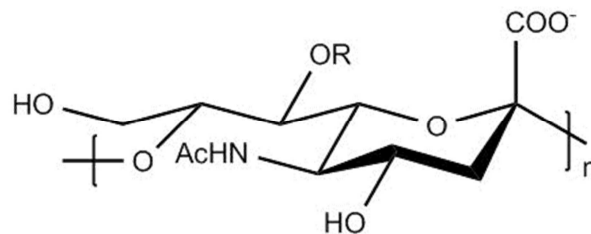


Abbildung 1: Gemeinsame Struktur von K1 Polymer (produziert von *E. coli*) und KPS Gruppe B (produziert von *Neisseria meningitidis*).

Beide Polysaccharide besitzen eine α -(2,8)-glycosidisch verbundene Sialinsäure. R zeigt eine potentielle Acetylierung.

1.2 Bakterielle Exopolysaccharide (EPS)

Exopolysaccharide (EPS) stellen die größte Untergruppe der bakteriellen Polysaccharide dar. Sie bilden den Hauptbestandteil des bakteriell produzierten Biofilms, der die Oberflächenhaftung der Zellen gewährleistet und vor Umweltbelastungen, wie z.B. Austrocknung schützt (Ciszek-Lenda 2011; Nwodo, Green et al. 2012). EPS werden von der Zelle nach ihrer Synthese in die unmittelbare Umgebung abgegeben, weshalb diese Kohlenhydrate effizient aus Zellkulturüberständen isoliert werden können. Die synthetisierten EPS können anhand ihrer chemischen Struktur in Homopolysaccharide und Heteropolysaccharide unterteilt werden (Ruas-Madiedo, Hugenholtz et al. 2002). Homopolysaccharide bestehen nur aus einer Monomerenart, wohingegen Heteropolysaccharide aus Wiederholungseinheiten mit zwei bis sieben Monomeren aufgebaut sind. Homopolymere können weiter in α - bzw. β -D-Glucane, Fructane und Polygalactane auf Grund ihrer Monomerenverbindung und -art unterteilt werden (Stewart-Tull 1980). Die Struktur der Heteropolysaccharide beinhaltet Wiederholungseinheiten, die z.B. aus D-Glucose, D-Galactose und L-Rhamnose, sowie N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin und Glucuronsäure aufgebaut sind. Zusätzlich befinden sich oft Substituenten wie Phosphat-,

Acetyl- und Glyceringruppen an den Wiederholungseinheiten (Ruas-Madiedo, Hugenholz et al. 2002). Die Verbindungen zwischen den Monomeren des Polymerrückgrats sind β -(1,4)- oder β -(1,3)-, sowie α -(1,2)- oder α -(1,6)- glycosidische Bindungen, wobei Ersteren eine hohe Steifheit und Letzteren eine größere Flexibilität zugeordnet wird. Die Unterschiede der Hetero- und Homopolysaccharide finden sich nicht nur in deren chemischen Strukturen, sondern auch in den verschiedenen Synthesenzymen und -orten. So werden z.B. die Wiederholungseinheiten der Heteropolysaccharide im Zellplasma gebildet und anschließend für die Polymerisation mit Kanallipiden aus der Zelle transportiert, wohingegen Homopolysaccharide nur ein spezifisches Substrat (z.B. Sucrose) benötigen. Die produzierte Menge an EPS variiert mit der produzierenden Bakterienspezies. Jedoch können auch physikochemische Faktoren (pH-Wert, Temperatur, Inkubationszeit und Medienzusammensetzung) erhebliche Einflüsse auf die Ausbeute haben (Nwodo, Green et al. 2012).

EPS können auch entsprechend ihrer Funktion unterschieden und in sieben Gruppen eingeteilt werden: strukturelle, sorptive, oberflächenaktive, aktive, informative, redoxaktive und nährnde EPS. Biomoleküle, die der Gruppe der strukturellen EPS zugeordnet werden, sind neutrale Polysaccharide. Diese erleichtern die Wasserrückhaltung und schützen die Zellen. Oberflächenaktive EPS, die Moleküle mit amphiphilem Verhalten darstellen, variieren in der chemischen Struktur und ihren Oberflächeneigenschaften. Sie sind an der Biofilmbildung beteiligt und besitzen teilweise antibakterielle oder fungizide Aktivität. Die Gruppe der sorptiven EPS besteht aus geladenen Polymeren, deren Funktion es ist, andere geladene Moleküle, die in die Zelloberflächeninteraktion involviert sind, zu greifen (Nwodo, Green et al. 2012).

Die bekanntesten Vertreter der Gruppe der EPS sind Alginat, Xanthan, Cellulose, Hyaluronsäure, Levan und Gellan. Diese Polysaccharide sind in der Lebensmittelindustrie als Stabilisatoren, Emulgatoren, Viskositätsverbesserer und Geliermittel von zentraler Bedeutung (van Kranenburg, Boels et al. 1999). Darüber hinaus weckt besonders das Potential von EPS fossil basierte Polymere, wie z.B. Polyacrylate, in naher Zukunft ersetzen zu können, das Interesse der chemischen Industrie (Rehm 2010).

1.3 Alginat

1.3.1 Struktur von Alginat

Das EPS Alginat, ein lineares Heteropolysaccharid, wird sowohl von Pflanzen als auch von Bakterien produziert und besteht nur aus zwei Monomeren: α -L-Guluronsäure (G)

und β -D-Mannuronsäure (M). Diese Uronsäuren sind (1,4)-glycosidisch im wechselnden Verhältnissen verknüpft (s. Abbildung 2) (Haug und Larsen 1969; Larsen und Haug 1971). Während pflanzliche Alginat 25-75 % Mannuronsäure beinhalten, sind mikrobielle Alginat immer reich an Mannuronsäure, wobei eine zusätzliche Acetylierung der M-Einheiten auftreten kann (Skjak-Braek, Grasdalen et al. 1986).

Die Anordnung der Monomere innerhalb des Polymers ist dabei nicht zufällig. Alginat bestehen aus gleichen oder strikt abwechselnden Residuen, sodass sich z.B. Monomerabfolgen wie MMMMMM, GGGGGG oder MGMGMG ergeben. Jede dieser verschiedenen Varianten bevorzugt eine andere räumliche Struktur, wobei sich die Monomere grundsätzlich innerhalb des Polysaccharidrückgrates in ihrer energetisch bevorzugten Konformation anordnen. Blöcke aus Mannuronsäuren bilden die 4C_1 Sesselform, während Blöcke, die nur aus Guluronsäure bestehen, die 1C_4 Sesselform einnehmen. Blöcke mit abwechselnden Residuen, weisen eine Zwischenstufe beider Sesselformen auf (Domb, Kumar et al. 2011).

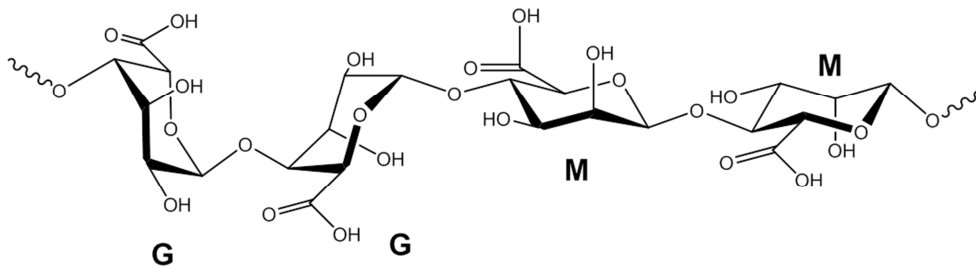


Abbildung 2: Struktur des Polysaccharids Alginat.

Im Polymer treten verschiedene Blöcke (MM, GG oder MG) und daraus resultierend unterschiedliche Sekundärstrukturen, auf.

Abkürzungen: G = α -L-Guluronsäure; M = β -D-Mannuronsäure

Aus de Reese, Sperl et al. 2015

Alginat mit vielen GG-Blöcken formen in Anwesenheit von bivalenten Kationen, wie Ca^{2+} , Mg^{2+} und Ba^{2+} , Hydrogele. Dabei lagern sich diese Ionen zwischen die GG-Polymerketten, wodurch ionische Quervernetzungen entstehen. Nach dem sogenannten „Eierschachtel-Modell“ werden diese Quervernetzungen jeweils von zwei zueinander gerichteten G-Strängen gebildet, wobei jedes Verbindungslion mit zwei benachbarten G-Monomeren, sowie mit zwei G-Residuen in der gegenüberliegenden Kette der Polymerketten interagiert (Grant, Morris et al. 1973; Smidsrød, Glover et al. 1973; Paredes Juárez, Spasojevic et al. 2014). Die Steifigkeit und Viskosität des Hydrogels, sowie sein Quellvermögen sind durch die Auswahl und den stöchiometrischen Anteil des gelierenden Ions steuerbar. Außerdem beeinflussen die Ausgangskonzentration, das M/G-Verhältnis der Struktur und das Molekulargewicht des Alginates die genannten physikochemischen Eigenschaften der Gele (Lee und Mooney 2012).

Der prozentuale Anteil von M zu G kann durch Circular dichroismus (Donati, Gamini et al. 2003) oder NMR-Spektroskopie (Ertesvag, Erlie et al. 1998) bestimmt werden.

1.3.2 Die Alginateproduktion in *Azotobacter vinelandii*

Kommerziell erhältliches Alginate wird hauptsächlich aus Braunalgen gewonnen. Dennoch ist auch die Herstellung von Alginate in Bakterien seit Jahren von großer Bedeutung. Im Jahr 1964 wurde zum ersten Mal der schleimbildende Stamm *Pseudomonas aeruginosa* von Linker und Jones als Produzent für mikrobielles Alginate identifiziert (Linker und Jones 1964). Zwei Jahre später wurde eine vergleichbare Entdeckung für das Bakterium *Azotobacter vinelandii* publiziert (Gorin und Spencer 1966) und im Jahre 1988 wurde ein weiteres Alginate, das von *Azotobacter chroococcum* produziert wird, entdeckt (Cote und Krull 1988). *A. vinelandii* ist ein gram negatives, bewegliches, obligat aerobes Bakterium, das die Fähigkeit besitzt molekularen Stickstoff zu fixieren (Noar und Bruno-Barcena 2018). Es produziert neben Alginate auch 5-Alkylresorcinole (Phenolische Lipide) und Poly- β -hydroxybuttersäure (PHB), das für die Herstellung von biologisch abbaubarem Plastik verwendet wird (Kozubek und Tyman 1999; Tokiwa und Calabia 2004). *A. vinelandii* produziert Alginate um eine Kapsel bilden zu können, die die Zelle vor Austrocknung schützen soll (Gacesa 1998; Hay, Wang et al. 2014). Darüber wird es als Schutzbarriere gegen die Toxizität von Schwermetallen benutzt (Segura, Cruz et al. 2003; Urtuvia, Maturana et al. 2017).

1.3.2.1 Die Synthese der Vorstufe GDP-Mannuronsäure

Die Gene, die in die Alginatebiosynthese und Regulation involviert sind, sind in den Stämmen *Pseudomonas sp.* und *A. vinelandii* trotz einiger Unterschiede sehr ähnlich (Hay, Wang et al. 2014). Zunächst wird nur ein polyM-Strang synthetisiert, wobei anschließend die G-Monomere nur durch die Konversion der Mannuronsäuren mit speziellen C5-Epimerasen gebildet werden (Haug und Larsen 1969; Haug und Larsen 1971; Ertesvag, Hoidal et al. 1995). Auf Grund der vorläufigen Synthese eines PolyM-Stranges ist die GDP-Mannuronsäure das einzige zu bildende Vorläufermolekül. GDP-M wird in vier Schritten im Cytosol der Zelle mittels drei Enzymen aus Fructose-6-phosphat (F6P) synthetisiert (s. Abbildung 3). Als ersten Schritt wird die Umsetzung von F6P zu Mannose-6-Phosphat (M6P) mit dem bifunktionellen Enzym AlgA, das den Gruppen der Phosphomannoseisomerasen und GDP-Mannosepyrophosphorylasen zugeordnet werden kann, katalysiert (May, Shinabarger et al. 1994). Im zweiten Schritt katalysiert die Phosphomannomutase AlgC M6P zu Mannose-1-phosphat (M1P), das anschließend durch die Pyrophosphorylaseaktivität von AlgA via Hydrolyse von GTP zu GDP-Mannose um-

gewandelt wird (Shinabarger, Berry et al. 1991). Als letzten und einzigen irreversiblen Schritt entsteht mit Hilfe der GDP-Mannosedehydrogenase AlgD aus GDP-Mannose das Vorläufermolekül GDP-Mannuronsäure, das als Substrat für die anschließende Polymerisation dient (Roychoudhury, May et al. 1989; Tatnell, Russell et al. 1994; Tavares, Leitao et al. 1999).

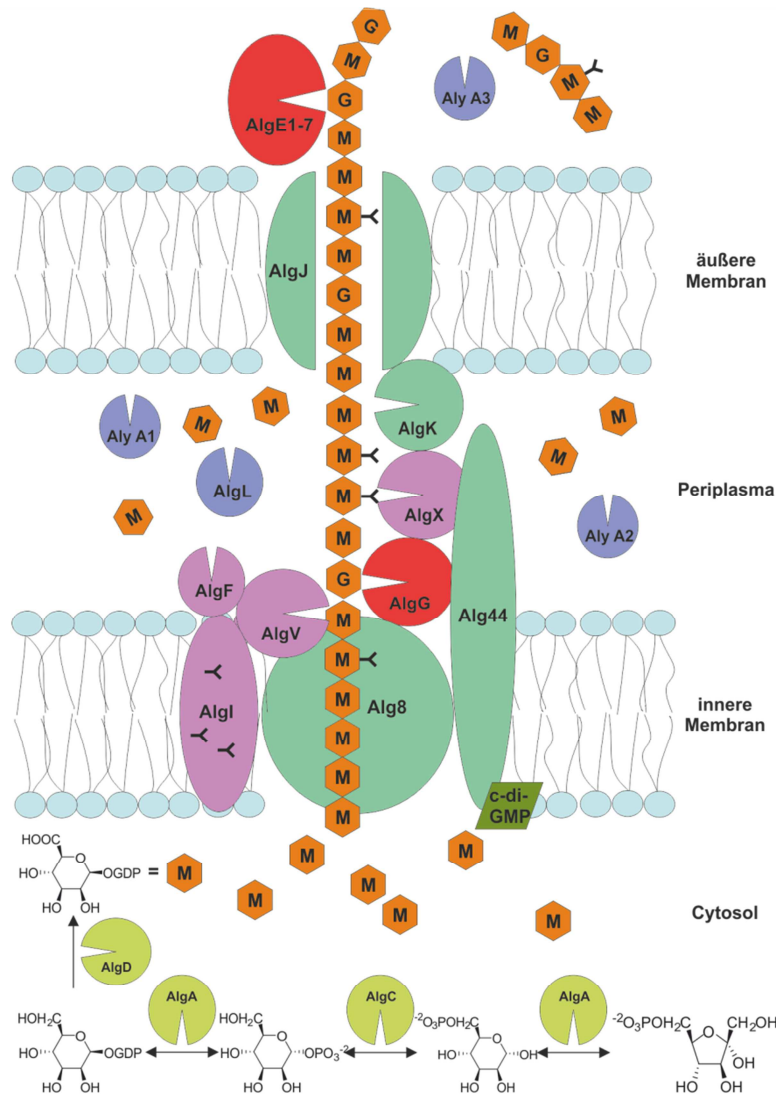


Abbildung 3: Detaillierte Beschreibung der Alginatsynthese in *A. vinelandii*.

Der aktivierte Mannuronsäurevorläuferzucker (GDP-Mannuronsäure; M) wird im Cytoplasma aus Fructose-6-phosphat (F6P), über Mannose-6-Phosphat (M6P), Mannose-1-phosphat (M1P) und GDP-Mannose im Cytoplasma synthetisiert (Enzyme: AlgA, AlgC, AlgD) und anschließend mittels Alg8 polymerisiert. Der Transport des Polymeren erfolgt über den Komplex Alg8/Alg44 und AlgX, AlgK, AlgG, AlgL und AlgE. AlgI, AlgJ, AlgF, sowie AlgX acetylieren die Mannuronsäureeinheiten. AlgI, AlgE7, AlyA1, AlyA2 und AlyA3 besitzen Lyaseaktivität. In der PolyM-Kette können nur mittels Epimerasen M-Residuen zu G-Residuen umgesetzt werden (innerzelluläre AlgG und extrazellulär AlgE1-7).

Modifiziert nach Urtuvia, Maturana et al. 2017

1.3.2.2 Polymerisation

Die Polymerisation der GDP-Mannuronsäure wird von zwei essentiellen Enzymen, die in der inneren Membran der Zelle lokalisiert sind, katalysiert: Alg8, eine Glykosyltransferase und Polymerase, und Alg44, eine Copolymerase. Alg8 und Alg44 gehören dem so-

nannten Polymerasekomplex an, der zunächst durch das zyklische bis-(3',5')-*di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP)* aktiviert wird (Hay, Ur Rehman et al. 2013; Ahumada-Manuel, Guzman et al. 2017). Bei dieser Aktivierung bindet als erstes der Cofaktor c-di-GMP an Alg44 und anschließend bindet das Lipoprotein AlgK, das den Komplex und zusätzlich das Porinprotein AlgJ in der äußeren Membran stabilisiert (Keiski, Yip et al. 2007; Franklin, Nivens et al. 2011).

1.3.2.3 Periplasmatische Translokation, Sekretion und Modifikation

Die durch die Polymerisation entstandene PolyM-Kette wird im nächsten Schritt mit Hilfe eines Multienzymkomplexes, bestehend aus AlgG, AlgX, AlgK durch das Periplasma der Zelle befördert (Jain und Ohman 1998; Jain, Franklin et al. 2003; Robles-Price, Wong et al. 2004). Während dieses Prozesses schützen AlgX und AlgK die Polymerkette vor der Lyaseaktivität (β -Elimination der glycosidischen Bindung) von AlgL, die ebenfalls im Periplasma lokalisiert ist und das Molekulargewicht der Alginatkette reguliert (Trujillo-Roldan, Moreno et al. 2004; Keiski, Yip et al. 2007). Die exakte Funktion von AlgX ist bis heute nicht komplett identifiziert. Seine wichtige Bedeutung für die Alginatproduktion wurde bereits oft postuliert, wie z.B. die bereits oben genannte Aufgabe der Erleichterung der Alginattranslokation und –sekretion (Robles-Price, Wong et al. 2004). Zusätzlich kann eine effiziente Polymerisierung auch nur in Anwesenheit von AlgX stattfinden (Gutsche, Remminghorst et al. 2006). Anhand der im Jahre 2013 veröffentlichten Struktur von AlgX konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym aus zwei Domänen besteht: einer Hydrolysedomäne, die in der Acetylierung von Alginat involviert ist, und einer Domäne für die Bindung von Kohlenhydraten mit deren Hilfe die Alginatkette durch die Zelle geführt wird (Riley, Weadge et al. 2013).

Während der Durchschleusung der PolyM-Kette wird diese mit Hilfe der Enzyme AlgX, AlgI, AlgJ und AlgF mit Acetylgruppen modifiziert. AlgI, AlgJ, AlgF fügen O-acetyl-Esterbindungen an die C2- oder C3- Position der Mannuronsäure (Franklin und Ohman 2002). Diese Enzyme sind jedoch im Gegensatz zu AlgX nicht essentiell für die Alginatsynthese.

Zusätzlich zu AlgL produziert *A. vinelandii* noch weitere Alginatlyasen: AlgE7 ist eine bifunktionelle Mannuronsäure-C-5-Epimerase und Alginatlyase, die G-MM- und G-GM-Bindungen spaltet. Die drei AlyA-Lyasen (AlyA1, AlyA2 und AlyA3) trennen die Bindungen zwischen G-M und M-G mit verschiedenen Katalysegeschwindigkeiten (Gimmestad, Ertesvag et al. 2009; Ertesvag 2015).

Im nächsten Schritt wird die Alginatkette durch AlgJ durch die äußere Membran und somit in den extrazellulären Raum sekretiert, in dem sich sieben extrazelluläre Man-

nuron-C-5-Epimerasen (AlgE1-7) befinden. Diese verschiedenen Epimerasen modifizieren zu Alginatprodukten mit unterschiedlichen Epimerisierungsmustern: AlgE2 und AlgE5 epimerisieren hauptsächlich M-Residuen, die zu G-Residuen benachbart sind und bilden somit G-Blöcke (Ertesvag, Hoidal et al. 1999). Die Epimerase AlgE4 dagegen produziert MG-Blöcke, in denen sich M- und G-Reste jeweils abwechseln (Hoidal, Ertesvag et al. 1999). Die Epimerasen AlgE1, AlgE3 und AlgE7 erzeugen neben MG-Blöcken auch GG-Blöcke (Ertesvag und Valla 1999) und AlgE6 schließlich führt längere G-Abschnitte ein (Hoidal, Glaerum Svanem et al. 2000). Alle diese sekretierten Epimerasen beinhalten jeweils ein bis zwei A- und ein bis sieben R-Module. Im Jahr 1999 konnte nachgewiesen werden, dass das A-Modul das katalytische Zentrum des Enzyms enthält und auch den Bindungsort für Calciumionen (Ertesvag und Valla 1999). Die R-Module dagegen weisen vier bis sieben Wiederholungen von langen Motiven mit neun Aminosäuren auf, die für viele Proteine, die durch ATP-Bindungskassetten-Transporter exportiert werden, charakteristisch sind (Delepelaire 2004).

Die Polymerkette kann jedoch nicht nur extrazellulär epimerisiert werden, sondern auch im Periplasma von dem bereits erwähnten bifunktionellen Enzym AlgG. Kinetische Analysen zeigten, dass AlgG eine höhere Affinität für größere Substrate, die bis zu 20 Residuen besitzen (d.h. 100 Å), aufweist. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Epimerase mehrere PolyM-Ketten gleichzeitig binden und umsetzen kann (Jerga, Stanley et al. 2006).

1.3.2.4 Regulation der Alginatbiosynthese

Alle Alginat-Synthesegene, die die Enzyme für die Synthese der Zuckervorstufen, sowie der Polymerisation, des Abbaus, der Acetylierung, der Epimerisierung und der Sekretion codieren, sind im Genom von *A. vinelandii* in einem Operon nebeneinander angeordnet (s. Abbildung 4).

Mindestens zwei Promotoren oberhalb des Gens *algD* sind auf dem Alginatsynthesecluster in *A. vinelandii* zu finden: ein AlgU- und ein RpoS (σ^S)-abhängiger Promotor (Castaneda, Sanchez et al. 2001). Zusätzlich weist das Genom einen syntheseclusterinternen Promotor des Typs σ^S auf, der sich oberhalb von *alg8* befindet, sowie zwei Promotoren je oberhalb von *algG* und *algA*. Den Promotoren vor *algG* und *algA* konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Funktionen zugeordnet werden, wobei vermutet wird, dass diese in der Mengenregulation oder Polymermodifikation ihre Aufgabe besitzen (Hay, Wang et al. 2014).

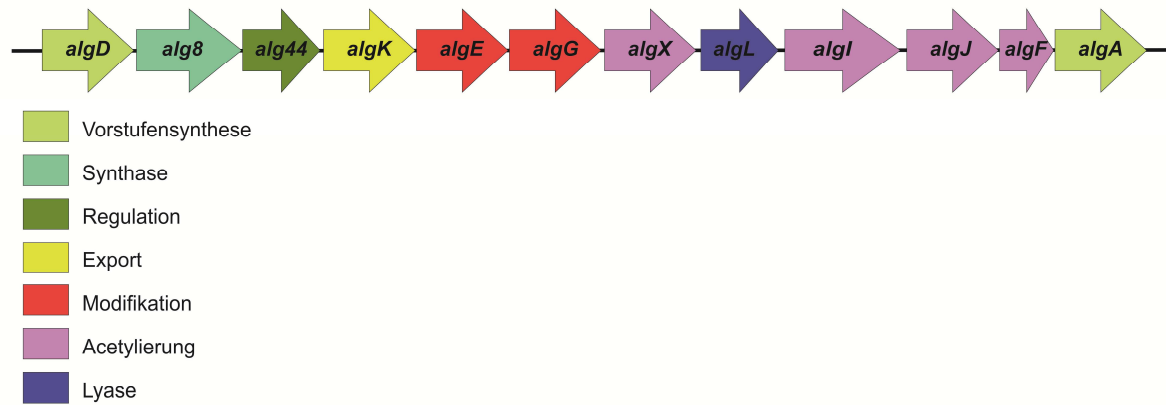


Abbildung 4: Synthesekluster von Polysaccharid Alginat aus *A. vinelandii*.

Im Genom von *A. vinelandii* sind zwölf Gene der Alginatsynthese nebeneinander angeordnet. Die verschiedenen Farben sind den verschiedenen Funktionen zugeordnet.

Modifiziert nach Galindo, Pena et al. 2007

Der übergeordnete Regulator der Alginatbiosynthese ist der Sigmafaktor AlgU. AlgU ist ein positiver Regulator und wird im Gencluster *algUmucABCD* codiert. Dieser Regulator befindet sich im Cytosol und ist durch das in der Membran verankerte MucA, ein Antisigmafaktor, an der inneren Membran stabilisiert (Mathee, McPherson et al. 1997; Nunez, Leon et al. 2000). Das periplasmatische Protein MucB, welches ein negativer Regulator ist, bindet an die periplasmatische Seite von MucA und schützt deshalb MucA vor dem Abbau. Die Freisetzung von AlgU und die damit verbundene Transkription wird durch eine regulierte, proteolytische Kaskade, die den Abbau von MucA durchführt, initiiert (Cezairliyan und Sauer 2009). MucD ist ebenfalls ein negativer Regulator, der in den Abbau von falschgefalteten Proteinen, die sonst AlgW oder MucP aktivieren würden, involviert ist (Damron und Yu 2011). AlgW und MucP sind Proteasen, die bei angeschaltetem System durch z. B. Stress MucA abbauen und somit die cytoplasmatische Domäne aus AlgU und MucA in das Cytosol entlassen. Im Cytosol baut ClpXP den Regulator MucA komplett ab, wodurch AlgU nicht weiter gebunden werden kann und folglich mit der RNA-Polymerase interagiert und die Expression der Alginatbiosynthesegene aktivieren kann (Hay, Wang et al. 2014). MucC konnte noch keine regulatorische Rolle zugeordnet werden.

1.3.3 Anwendung und Modifikation von bakteriell produzierten Alginaten

Der Einsatz von Alginat in verschiedenen Industriezweigen ist auf Grund von einzigartigen Materialeigenschaften, wie z.B. der Fähigkeit zur Bildung von Hydrogelen, weit verbreitet. Das Polysaccharid wird unter anderem als Stabilisierungs-, Verdickungs- und Geliermittel in der Lebensmittelindustrie oder als Biomaterial im biomedizinischen Bereich verwendet. Da Alginat hydrophil, nicht immunogen und biokompatibel sind, wer-

den sie z.B. in Form von Hydrogelen als Trägerstoff für Arzneimittel, sowie als Wundauflage, die die bakterielle Wundbesiedlung verringert, benutzt (Matthew, Browne et al. 1995; Shapiro und Cohen 1997; Liew, Chan et al. 2006; Lee und Mooney 2012; Schmid, Sieber et al. 2015). Als Voraussetzung für die Anwendung in der Biotechnologie und in der biomedizinischen Forschung müssen Alginat reproduzierbar und mit einer definierten Homogenität bzgl. ihrer Zusammensetzung herstellbar sein und damit gleichbleibende Materialeigenschaften aufweisen. Diese Qualitätsmerkmale können nur Alginat erfüllen, die bakteriell erzeugt wurden (Pena, Miranda et al. 2002; Galindo, Pena et al. 2007). Die bakterielle Produktion ermöglicht zudem die Einstellung von Materialeigenschaften, wie z.B. den Grad der Viskosität. Hochmolekulare Alginat sind viskoser im Vergleich zu niedermolekularen Alginaten und können durch Kontrolle der Konzentration an gelöstem Sauerstoff während der Fermentation oder durch Deletion der *algL*-Gene hergestellt werden (Pena, Trujillo-Roldan et al. 2000; Trujillo-Roldan, Moreno et al. 2003; Trujillo-Roldan, Moreno et al. 2004; Diaz-Barrera, Silva et al. 2010). Des Weiteren können die Materialeigenschaften von Alginaten auch durch den Einsatz von Epimerasen gesteuert werden. Alginat mit hohem M-Anteil z.B. sind auf Grund ihrer besonderen Materialeigenschaften und Biokompatibilität von besonderem Interesse für einige Arten von Zelltransplantation (Klock, Frank et al. 1994; Klock, Pfeffermann et al. 1997). Ein anderes mögliches Anwendungsfeld von modifizierten Alginaten ist die Synthese von Kompositmaterialien. Sogenannte Alginat-LDH-Doppelschichthydroxide (*layered double hydroxides*) werden in der Abwasserreinigung bereits erfolgreich zum Abfangen von Chromaten und Farbstoffen verwendet (Lee und Mooney 2012; Zhang, Yao et al. 2014). LDH-Konstrukte sind Schichtstrukturen, die als Grundgerüst für die Einlagerung von anionischen Molekülen dienen, ohne dabei ihre Struktur zu verändern. Die Art der eingebauten Anionen reicht von Ionen bis hin zu großen Biomolekülen, wie den Polysacchariden. Neben der Abwasserreinigung könnten solche Materialien auch in der Medizin eingesetzt werden, da sie eine zeitlich kontrollierbare Abgabe von interkalierten Biomolekülen aus der LDH-Wirtsstruktur ermöglichen (Darder, López-Blanco et al. 2005; Duan und Evans 2006; Raki und Beaudoin 2011; Zou und Plank 2012).

Neben dem M/G-Verhältnis spielt auch der Grad der Acetylierung eine entscheidende Rolle für die Eigenschaften von bakteriellen Alginaten. Ein höherer Grad an Acetylierung führt z.B. zu signifikanten Steigerungen der Viskosität und der pseudoplastischen Rheologie (Skjåk-Bræk, Zanetti et al. 1989; Rehm 2009). Das Level der Acetylierung kann gut durch die Benutzung geeigneter Mutanten, Veränderungen im Wachstumsmedium oder durch Kontrollparameter bei der Fermentation, wie pH, Temperatur und Begasung kontrolliert werden (Pena, Hernandez et al. 2006; Gaytan, Pena et al. 2012).

1.4 Sphingane

Sphingane stellen eine weitere wichtige Untergruppe der Exopolysaccharide dar und werden vom Genus *Sphingomonas* produziert (Pollock 1993). Sphingomonaden sind gram-negative, aerob lebende und stäbchenförmige Bakterien. Diese Bakterien können aus einer Vielzahl von natürlichen Habitaten, wie Wasser- und Bodenproben, sowie Pflanzengewebe, isoliert werden (White, Sutton et al. 1996). *Sphingomonas elodea*, der das Sphingan Gellan sekretiert, stellt dabei in der Forschung den am besten untersuchten Stamm dar. Neben *S. elodea* werden die Stämme *Sphingomonas* ATCC 53159 (Polysaccharid: Diutan), *Sphingomonas* ATCC 31555 (Welan), *Sphingomonas* ATCC 31554 (S-88) und *Sphingomonas sp.* ATCC 21423 (S-7) ebenfalls den EPS-synthetisierenden Stämmen zugeordnet. Diese Stämme synthetisieren Sphingane, die sehr ähnliche, jedoch nicht identische Strukturen besitzen.

Sphingane zeigen in Lösung über einen weiten pH (2-12)- und Temperaturbereich (100-150 °C) eine gleichbleibende Viskosität, die von ihrer jeweiligen Struktur abhängt. Die EPS Gellan, Welan, Rhamsan und Diutan sind sehr gut hinsichtlich ihrer Produktion und ihrem rheologischen Verhalten erforscht und werden für einige Industrieanwendungen, wie z.B. in der Lebensmittel- und Baubranche, bei der Ölgewinnung und in Körperpflegeprodukten, kommerziell produziert (Schmid, Sperl et al. 2014). Die Gruppe der Sphingane ist daher Gegenstand aktueller Forschung, mit dem Ziel neue Anwendungen der Polysaccharide zu entwickeln oder Produktionsprozesse zu optimieren (Pollock 2005; Fialho, Moreira et al. 2008; Kaur, Bera et al. 2014; Schmid, Sperl et al. 2014).

1.4.1 Struktur verschiedener Sphingane

Das Polysaccharidrückgrat von Sphinganen besteht typischerweise aus $[\rightarrow 4) \alpha\text{-L-Rha}$ oder $\alpha\text{-L-Man (1}\rightarrow 3) \beta\text{-D-Glc (1}\rightarrow 4) \beta\text{-D-GlcUA (1}\rightarrow 4) \beta\text{-D-Glc (1}\rightarrow]$. Grundsätzlich sind die Sphingane in ihrem Aufbau sehr ähnlich, jedoch nicht komplett identisch (Pollock 2005). In einigen Sphinganen wurden Veränderungen in der Zuckermonomierzusammensetzung der Hauptkette, sowie allgemein in den Seitenketten beobachtet (s. Abbildung 5).

1.4.1.1 Gellan (S-60)

Gellan, ein lineares Molekül, wird von *S. elodea* ATCC 31461 produziert. Die Wiederholungseinheit besteht aus den Monomeren D-Glucose/D-Glucuronsäure/L-Rhamnose im Verhältnis 2:1:1, wobei das Polysaccharid keine zusätzliche Seitenkette besitzt. Die zweite Glucoseeinheit der Hauptkette ist mit L-Glycerat und/oder Acetat an C-2 bezie-

ungsweise C-6 verestert (s. Abbildung 5A) (O'Neill, Selvendran et al. 1983; Jansson und Widmalm 1994).

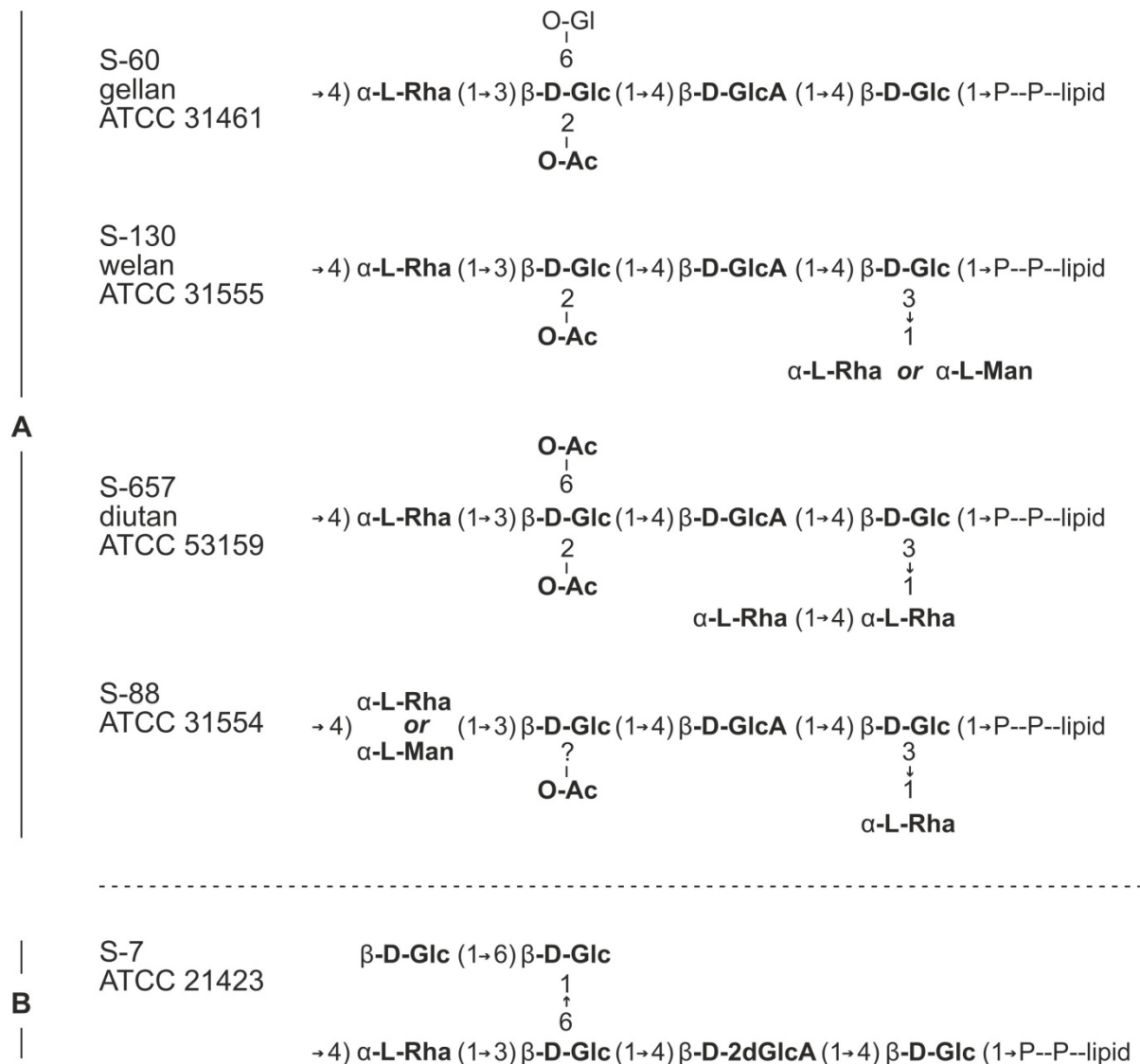


Abbildung 5: Strukturen der verschiedenen Sphingane.

Die Wiederholungseinheiten werden zunächst mit Phosphodiesterbindungen am reduzierenden Ende an den Lipidträger (lipid) angehängt. Das Gerüst der Hauptkette und der Seitenketten besitzt Glucose (Glc), Glucuronsäure (GlcA), Mannose (Man), Rhamnose (Rha), Acetyl (O-Ac) und Glycerat (O-Gl). Die Verbindung des Acetylsubstituenten ist in S-88 bis heute nicht bekannt. **A:** Sphingane, deren Daten der Nukleotidsequenzen, die die Biosynthese betreffen, in öffentlichen Datenbanken verfügbar sind. **B:** Struktur von S-7, von der keine Nukleotiddaten verfügbar sind.

Adaptiert/Übersetzt mit Erlaubnis von Springer Nature Applied Microbiology and Biotechnology, A comparison of genes involved in sphingan biosynthesis brought up to date, Jochen Schmid, Nadine Sperl, Volker Sieber, 2014.

Gellan ist somit auf Grund der genannten Charakteristika das am einfachsten aufgebaute Polysaccharid innerhalb der Gruppe der Sphingane.

Die Fähigkeit zur Bildung von Gelen hängt allgemein von der Verfügbarkeit der Kationen in der Umgebung, sowie der Substituenten am Zuckerrückgrat, ab. Im Falle von Gellan führt das Verhältnis von Acetyl- zu L-Glycerylsubstituenten (1:0,5 pro Einheit) (Kuo, Chen et al. 1986) zu einer hohen Gelbildungstendenz, wenn divalente Kationen in der Lösung

vorhanden sind. Die Gelstärke ist dabei abhängig von der Art und der Konzentration der vorhandenen Kationen, wobei die stabilsten Gele mit Calciumionen gebildet werden (Nickerson, Paulson et al. 2003). Mittels Röntgenstrahlbeugung wurde gezeigt, dass native sowie deacetylierte Gellane als linksdrehende und halbgestaffelte Doppelhelix auftreten (Chandrasekaran, Radha et al. 1992). Der Einfluss des Grades an Acetylierung auf die Struktur wurde via Rasterkraftmikroskopie bestimmt (Funami, Noda et al. 2008; Ikeda, Gohtani et al. 2013) und ergab, dass native Gellangele weniger stabil sind als Gele aus deacetyliertem Gellan. Darüber hinaus können mit divalenten Kationen (Calcium- und Magnesiumionen) verglichen zu monovalenten Kationen (Natrium- und Kaliumionen) stärkere und elastischere Gele gebildet werden (Nickerson, Paulson et al. 2003). Im Jahr 2004 wurden die Sequenzdaten des Biosyntheseclusters von Gellan publiziert und mit den *GenBank accession* Nummern AY217008.1 und AY220099 benannt (Harding, Patel et al. 2004). Harding *et al.* identifizierten im selben Jahr das Gen *gelA*, das nicht auf dem *Synthesecluster* liegt, als Regulator der Gellansynthese. Neun Jahre später wurde die erste Genomsequenz des Stamms ATCC 31461 (*GenBank accession number* AGFU01000000) veröffentlicht (Gai, Wang et al. 2011).

1.4.1.1 Welan (S-130)

Welan wird vom Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 produziert. Das Polysaccharidrückgrat ist dem von Gellan identisch, die Welanstruktur besitzt aber eine zusätzliche L-Rhamnosyl- oder L-Mannosylseitenkette an jeder ersten Glucoseeinheit der Wiederholungseinheit (s. Abbildung 5A). Die Mannose- und Rhamnosemonomere wechseln sich in der Seitenkette im Verhältnis 1:2 ab, d.h. jede dritte Wiederholungseinheit besitzt eine Mannoseseitenkette (Jansson und Widmalm 1994). Auch in Welan ist wie im Gellan die Glucoseeinheit der Hauptkette acetyliert, jedoch findet sich hier nur eine Acetatgruppe am C2 der zweiten Glucoseeinheit wieder (Stankowski und Zeller 1992). Auf Grund dieser Strukturmerkmale bildet Welan viskose Lösungen, besitzt aber nicht die Fähigkeit Gele zu bilden. Die viskosen Lösungen zeigen gegenüber niedrigen Scherraten hohe Viskositäten und besitzen eine gute thermische Stabilität über einen Temperaturbereich bis zu 150 °C (Xu, Xu et al. 2013). Diese hohe Temperaturstabilität wässriger Welanlösungen resultiert aus doppelt-helikalen Strukturen, die durch Interaktionen der Hauptkette mit der Seitenkette stabilisiert werden (Hember, Richardson et al. 1994). Darüber hinaus sind diese Strukturen über einen großen pH-Bereich von 2-12 stabil. Eine Konformationsänderung dieser stabilen doppelt-helikalen Anordnung zu ungeordneten Windungen wurde jedoch in Anwesenheit von Dimethylsulfoxid beobachtet (Hember, Richardson et al. 1994). Da das rheologische Verhalten seiner Lösungen aber unabhängig von ver-

schiedenen Salzkonzentrationen (v.a. Calciumionen), Temperaturen und pH-Werten ist, ist Welan interessant für die Anwendung in der Bauindustrie (Plank und Steinbüchel 2005).

Das komplette Genom des Welan-produzierenden Stammes ATCC 31555 wurde 2012 veröffentlicht (*GenBank accession number* ALBQ01000000) (Wang, Tao et al. 2012) und drei Jahre später wurde das Welansynthesecluster näher untersucht (Schmid, Sperl et al. 2014).

1.4.1.2 Diutan (S-657)

Diutan wird hauptsächlich von *Sphingomonas* sp. ATCC 53159 produziert und wurde 1992 aus einer Algenprobe isoliert (Peik, Steenberger et al. 1992). Dieses EPS besteht ebenfalls aus der konservierten Hauptkettenwiederholungseinheit sowie einer zusätzlichen zweifachen L-Rhamnoseseitenkette, die an die erste Glucose des Zuckerrückgrates gebunden ist (Chowdhury, Lindberg et al. 1987). Darüber hinaus befinden sich zwei O-Acetylgruppen an dem C2 und C6 des zweiten Glucosemonomers (Diltz und Zeller 2001). Diutan besitzt unter allen beschriebenen Sphinganen die höchste Stabilität gegenüber hohen Temperaturen und die höchste Viskosität in niedrig konzentrierten, wässrigen EPS-Lösungen (Peik, Steenberger et al. 1992). Im Jahr 2008 wurde eine detaillierte Untersuchung des Stammes *Sphingomonas* sp. ATCC 53159 durchgeführt, was zu einigen nun bekannten Gensequenzen führte. Es wurde fast das komplette Diutansynthesecluster, d.h. wichtige Gene für die Hauptkettensynthese, sowie Gene für die Aktivierung der Rhamnosemonomere, der Polymerisation und Sekretion identifiziert und charakterisiert. Diese sind unter der GenBank EU026118.1 zugänglich (Coleman, Patel et al. 2008).

1.4.1.3 Sphingan S-88

Das EPS S-88, das vom Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31554 hergestellt wird, besitzt wiederum die vier bekannten Hauptkettenzuckermonomere, wobei das vierte Monomer statt L-Rhamnose auch L-Mannose sein kann. Ungefähr 50 % der Wiederholungseinheiten besitzen eine verzweigte L-Rhamnopyranosylseitengruppe an der ersten Glucose (Jansson, Kumar et al. 1986). Etwa 5 % der zweiten Glucoseinheit der Wiederholungseinheit liegen acetyliert vor (Tako und Tamaki 2005). Die rheologischen Eigenschaften sind vergleichbar zu Welan, da beide ihre Viskosität bei Temperaturen bis zu 150 °C beibehalten (Pollock 2005). Auch für das EPS S-88 wurden die Gene des Syntheseclusters detailliert charakterisiert und analysiert und die resultierenden Nukleotidsequenzen sind verfügbar (U51197) (Yamazaki, Thorne et al. 1996).

1.4.1.4 Sphingan S-7

Der Stamm *Sphingomonas* ATCC® PTA-2175 produziert das Sphingan S-7, das eine unterschiedliche Struktur verglichen mit den anderen Sphinganan aufzeigt. S-7 besitzt in der Hauptkette anstatt der sonst vorhandenen Glucuronsäure eine 2-Deoxyglucuronsäure (Thorne, Mikolajczak et al. 2000). Zusätzlich befindet sich eine Seitenkette aus zwei D-Glucoseeinheiten an der zweiten Glucose der Wiederholungseinheit (s. Abbildung 5B). Weitere Substituenten, wie Acetat oder Glycerol sind bisher nicht bekannt.

Die Viskosität dieses Polysaccharids in wässrigen Lösungen weist ebenfalls eine große pH- und Temperaturstabilität auf und ist von Salzkonzentrationen unabhängig (Pollock 2005).

Thorne *et al.* identifizierten im Jahr 2000 das Cluster für die S-7-Synthese und beschrieben es schematisch mit Hilfe von DNA-Hybridisierungsversuchen, wobei bis heute kaum Sequenzen in der öffentlichen Datenbank zu finden sind. Die wenigen Nukleotidsequenzen, die unter der *accession* Nummer AF214113 verfügbar sind, weisen das *pgm* Gen auf, das in der Nukleotidzuckerproduktion involviert ist. (Thorne, Mikolajczak et al. 2000).

1.4.1.5 Sanxan

Sphingomonas sanxanigenens, eine neu entdeckte Spezies des Stammes *Sphingomonas*, synthetisiert das EPS Sanxan (Huang, Wang et al. 2009; Huang, Wu et al. 2016). Die Monomeranalysen dieses Polysaccharids ergaben eine Zuckerzusammensetzung von Glucose, Mannose, Rhamnose und Glucuronsäure. Somit entspricht die Zusammensetzung von Sanxan den Sphinganan S-88 und Welan, jedoch unterscheidet sich der Aufbau der Tetrasaccharidwiederholungseinheit entscheidend. Sanxan besitzt ein Polysaccharidgrundgerüst, das aus $[\rightarrow 4) \beta\text{-D-Man (1}\rightarrow 4) \beta\text{-D-GlcUA (1}\rightarrow 3) \alpha\text{-L-Rha (1}\rightarrow 3) \beta\text{-D-Glc (1}\rightarrow]$ besteht, wobei das Glucosemonomer acetyliert ist (Huang, Wu et al. 2016).

Sanxan kann elastische thermoreversible Gele bilden, indem heiße Polysaccharidlösung abgekühlt wird. Die Stärke des Gels erhöht sich mit der Konzentration der zugegebenen Kationen (besonders Ca^{2+}), wobei das Maximum mit 25 mM Calcium bei einem 1 % Sanxangel erreicht wird (Huang, Wu et al. 2016; Wu, Shi et al. 2017).

Phylogenetische Analysen, die auf der 16S ribosomalen RNA Gensequenz der sphinganproduzierenden Stämme sowie von *S. sanxanigenens* basierten, zeigten, dass der Stamm *S. sanxanigenens*, trotz seiner Fähigkeit EPS zu produzieren, von den eng genetisch verbundenen Sphingomonasstämmen getrennt ist. Die EPS Synthesegene sind

verstreut auf dem Genom (6.205.897 bp) lokalisiert, was ebenfalls einen Unterschied zu den sphinganproduzierenden Stämmen darstellt (Wu, Huang et al. 2017).

1.4.2 Biosynthese der Sphingane

1.4.2.1 Überblick der Biosynthese und Genomvergleich der Synthesecluster

Die Biosynthese der Sphingane folgt dem generellen Schema des Wzx/Wzy-abhängigen Stoffwechselweges, der bereits für einige kapsuläre Polysaccharide des Genus *Enterobacteria* beschrieben wurde (Rehm 2010). Bei der Synthese werden aktivierte Nukleotidzucker durch Glykosyltransferasen zu konservierten Tetrasaccharidwiederholungseinheiten als Grundgerüst zusammengefügt, das regelmäßig mit je nach Sphingan verschiedenen weiteren Zuckerresten besetzt ist. Die Tetrasaccharide sind dabei an einen Undecaprenylphosphatträger gebunden, der in der inneren Membran Richtung Cytoplasma verankert ist (Rehm 2010; Whitney und Howell 2013). Im Anschluss an die Assemblierung wird die Wiederholungseinheit durch Flippaseproteine (Wzx-ähnlich) durch die innere Membran transportiert. Die nächsten Schritte sind dann die Polymerisation der Wiederholungseinheiten und die Einstellung der Kettenlänge durch ein Polymeraseprotein (Wzy-ähnlich) bzw. durch eine Copolymerase (Wzx-ähnlich). Die abschließende Sekretion durch die Zellwand und äußere Membran erfolgt durch einen Translokationsweg, der Proteine benutzt, die den Polysaccharid-Copolymerasen (PCP) und den Polysaccharidexportproteinen der äußeren Membran Familien zugeordnet sind. Im Falle der Sphingane werden die Gene, die an den jeweiligen Polysaccharidsynthesen beteiligt sind, entsprechend ihres finalen Produkts benannt (*gel*-Gene für Gellan; *wel*-Gene für Welan; usw.). In der Abbildung 6 ist der komplette Weg der Welanbiosynthese als Beispiel für die restlichen Sphingane schematisch dargestellt.

Die Gene, die für die Biosynthese der verschiedenen Sphingane verantwortlich sind, sind alle in einem Genomabschnitt zusammengefügt. Diese Anordnung ist sehr typisch für viele EPS (Reeves, Hobbs et al. 1996). Die Gene für die Assemblierung der Wiederholungseinheiten, sowie für die Polymerisation und Sekretion, sind dabei sehr dicht lokalisiert. Im Gegensatz dazu, sind die Gene, die für die Nukleotidzuckervorstufen verantwortlich sind, disperser im Genom verteilt und nur im Falle von dTDP-Rhamnose sind diese im *Synthesecluster* bei den Glykosyltransferasen zu finden. Interessanterweise treten einige wenige Veränderungen dieses allgemeinen Schemas innerhalb der verschiedenen Sphingane auf. Da die meisten Gene der verschiedenen Sphingancluster hohe Sequenzidentitäten und Homologien aufweisen, werden sie allgemein als

spn-Gene bezeichnet. Diese Bezeichnung wird generell verwendet, wenn die Spingambiosynthese allgemein diskutiert wird (Schmid, Sperl et al. 2014).

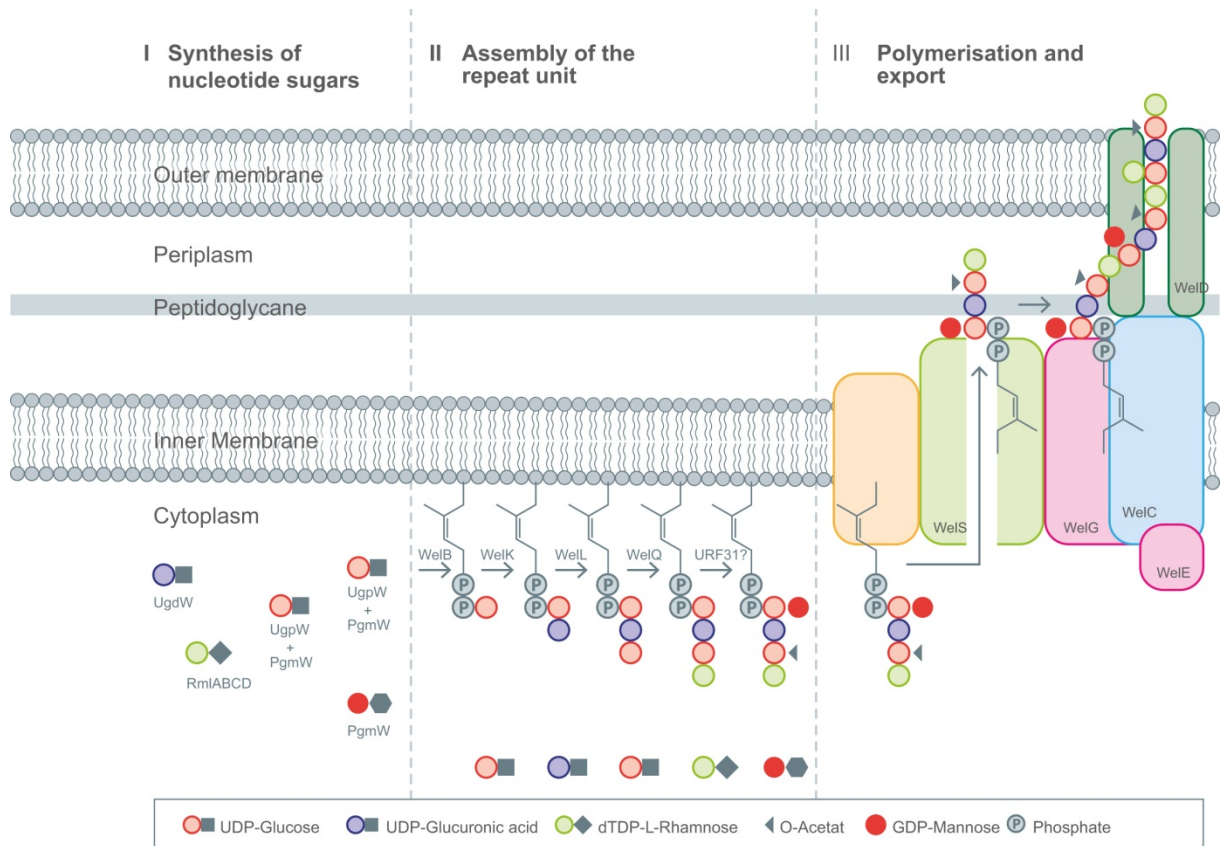


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Welanbiosynthese.

- I) Die Vorstufen der Nucleotidzucker werden mittels der Gene *pgm*, *udp* und *ugp* synthetisiert.
- II) Die Assemblierung der aktivierten Zuckernucleotide findet am Lipidanker, der in der inneren Membran fixiert ist, statt und wird durch die Glykosyltransferasen WelB, WelK, WelL und WelQ katalysiert. Der abschließende Schritt der Bildung der Wiederholungseinheit, d.h. die Anheftung der Seitenkette und die Veresterung, ist noch ungeklärt.
- III) Der Export des finalen Produkts wird durch die Flippase WelS, die die Wiederholungseinheit zum periplasmatischen Raum transferiert, katalysiert. WelG, WelC und WelE beeinflussen die Polymerisation und die Regulation der Kettenlänge und WelD realisiert vermutlich den abschließenden Transport durch die äußere Membran und Zellwand.

Adaptiert/Übersetzt mit Erlaubnis von Springer Nature: Springer Nature Applied Microbiology and Biotechnology, A comparison of genes involved in spingambiosynthesis brought up to date, Jochen Schmid, Nadine Sperl, Volker Sieber, 2014.

Die *spnGSR*-Gene, die für die Sekretion und Polymerisation verantwortlich sind, befinden sich am 5'-Terminus des Synthesecusters (s. Abbildung 7). Im Falle von Gellan, sind diese Gene im Vergleich zu den anderen Stämmen weiter oberhalb des Hauptclusters lokalisiert. Auffällig ist die unterschiedliche Anordnung von *spnG* und *spnS* in den unterschiedlichen Spingambiosynthetisierern: Der Diutan-produzierende Stamm z.B. zeigt eine gedrehte Anordnung von *dspS* und *dspG*. Ebenfalls ist eine Änderung der Orientierung von *dspS* zu vermerken. Die Funktion der Acetylierung von Gellan wird einer Acetyltransferase, die sich ungefähr 20000 Bp oberhalb von *gelGSR* befindet, zugeordnet (Harding, McQuown et al. 2003). Die Gene *spnQIKLJFDCEMN*, die *spnR* und *gelA* folgen, zeigen in allen Spingambiosynthetisierern dieselbe Anordnung und Orientierung.

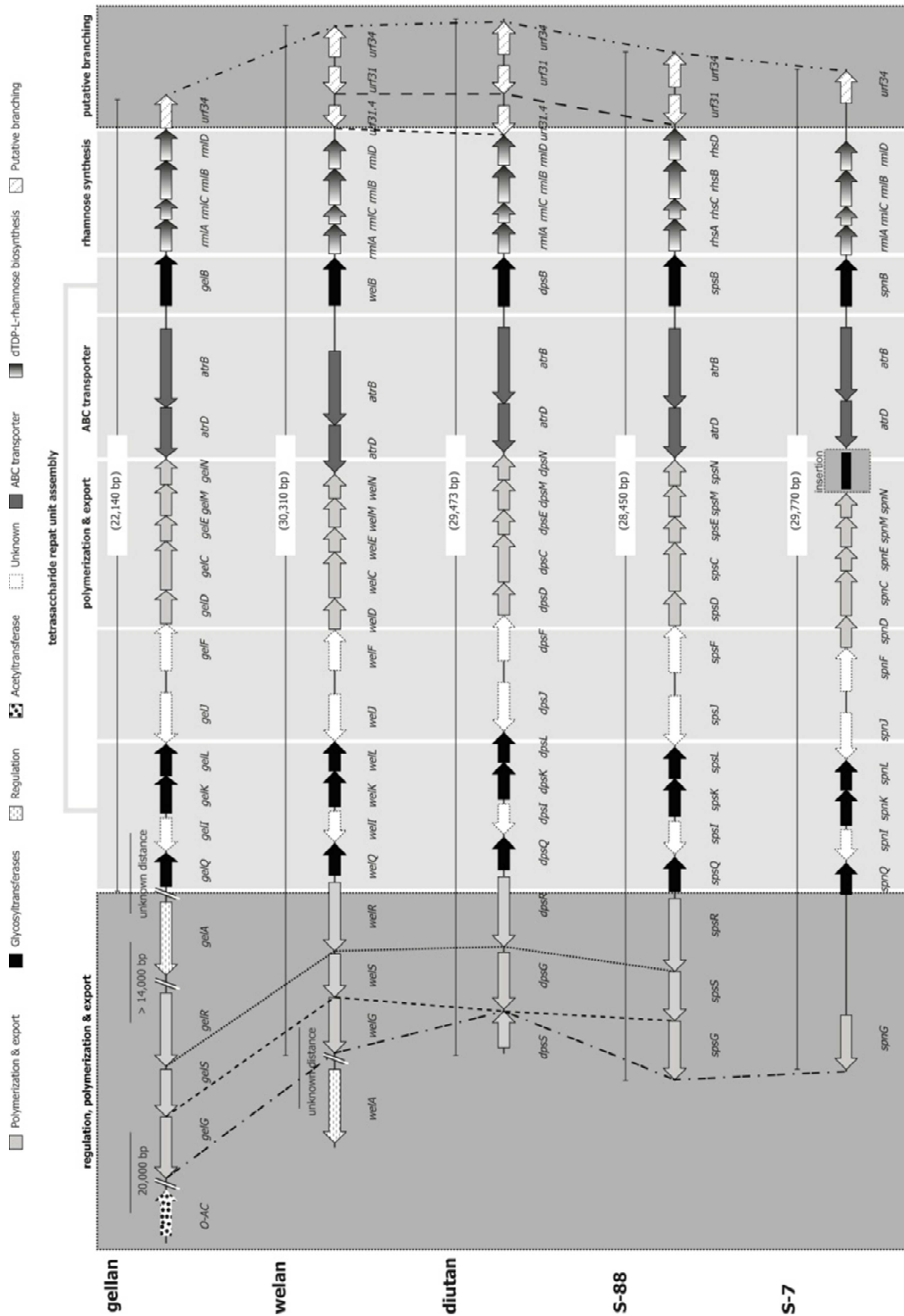


Abbildung 7: Vergleich der Anordnung der Spingangencluster (Gellan , Welan , Diutan , S-88 und S-7 produzierende Stämme).

Die Funktionen der verschiedenen Gene sind der Legende zu entnehmen. Die linke, dunkelgraue Region stellt die Regulation, Polymerisation und den Export dar. Die hellgraue Region in der Mitte stellt die konservierten Gencluster für die Synthese der Vorläuferringnucleotidzucker, die Assemblierung der Tetrasaccharideinheiten, die Polymerisation und die Gene für den Export dar. In der rechten, dunkelgrau gefärbten Region sind die Gene mit den unbekannt, jedoch vermuteten Funktionen in der Verzweigung der Seitenketten, dargestellt. Die Insertion, die nur im S-7 Cluster auftritt, ist mittels eines schwarzen Kastens, anstatt eines Pfeiles für Gene, sichtbar.

Adaptiert/Übersetzt mit Erlaubnis von Springer Nature: Springer Nature Applied Microbiology and Biotechnology, A comparison of genes involved in spingangen biosynthesis brought up to date, Jochen Schmid, Nadine Sperl, Volker Sieber, 2014.

Dasselbe Ergebnis ergibt sich auch für *artD* und *artB*, die ABC-Transporter codieren, obwohl die Relevanz dieser Transporter bis heute unklar ist (Yamazaki, Thorne et al. 1996). Das anschließende Gen *spnB*, dem die Funktion einer putativen Glykosyltransferase zugeordnet ist, befindet sich ebenfalls immer an derselben Stelle innerhalb der verschiedenen Cluster. Diese Tatsache gilt auch für Gene der Biosynthese der Rhamnosenukleotidzuckervorläufer, welche als *rmlACBD* benannt wurden. Am 3'-Ende jedes Clusters befinden sich die Gene *urf31*, *urf31.4* und *urf34*, deren Funktion noch unbekannt ist und in unterschiedlicher Anzahl abhängig vom Produzenten auftreten.

1.4.2.2 Nukleotidvorläufer

Der erste Schritt der Biosynthese aller Sphingane ist die Herstellung der Vorläufernukleotidzucker, die für die Assemblierung der Wiederholungseinheiten und Seitenketten, benutzt werden (Martins und Sa-Correia 1991). Drei Gene sind in der Synthese von Uridindiphosphat(UDP)-Glucose und UDP-Glucuronsäure involviert: *pgmG* (G für Gellan) codiert eine Phosphoglucomutase (PGM; EC 5.4.2.2) und *ugpG* codiert eine Glucose-1-phosphaturidyltransferase (UGP; EC 2.7.7.9). Das Enzym PGM wird für die Interkonversion von Glucose-6-phosphat zu Glucose-1-phosphat benötigt, wobei das Enzym UGP anschließend die reversible Umwandlung von Glucose-1-phosphat mit UTP zu UDP-Glucose katalysiert (Videira, Cortes et al. 2000; Marques, Ferreira et al. 2003). Im nächsten Schritt wird die UDP-Glucose durch das Enzym UGD (UDP-Glucosedehydrogenase; EC 1.1.1.22), das vom Gen *ugdG* codiert wird, umgesetzt (Granja, Popescu et al. 2007). Hierbei ist zu erwähnen, dass das Gen *pgm* der Sphingomonaden ein bifunktionelles Protein mit einer PGM und Phosphomannomutaseaktivität exprimiert und deshalb in der UDP-Glucose-, sowie in der GDP-Mannoseproduktion involviert ist (Videira, Cortes et al. 2000; Huang, Li et al. 2013). Das *rmlACBD*-Cluster besteht aus vier Genen, die für die Bildung von dTDP-Rhamnose benötigt werden. Das erste Gen in diesem Cluster ist *rmlA*, das eine Glucose-1-phosphatthymidyltransferase (EC 2.7.7.24) codiert. Dieses Enzym konvertiert Glucose-1-phosphat und Desoxythymidintriphosphat (dTTP) zu dTDP-D-Glucose (Silva, Marques et al. 2005). Dieses Produkt wird anschließend durch das Enzym dTDP-D-Glucose-4,6-dehydratase (EC 4.2.1.46), das von *rmlB* codiert wird, in dTDP-4-keto-6-deoxy-D-Glucose umgesetzt. Im nächsten Schritt wird das Molekül dTDP-4-keto-6-deoxy-D-Glucose zu dTDP-4-keto-L-Rhamnose vom Enzym dTDP-4-Dehydrorhamnose-3,5-epimerase (*rmlC*; EC 5.1.3.13) umgewandelt und abschließend zu dTDP-L-Rhamnose mittels dTDP-4-Dehydrorhamnosereduktase (*rmlD*; EC 1.1.1.133) reduziert (Sa-Correia, Fialho et al. 2002). Diese vier Gene, die für die Syn-

these von dTDP-L-Rhamnose verantwortlich sind, sind in den Syntheseclustern für Welan, Diutan, Gellan und S-88 identisch angeordnet (Schmid, Sperl et al. 2014).

1.4.2.3 Bildung des Tetrasaccharidgrundgerüsts

Die Wiederholungseinheiten der verschiedenen Sphingane werden durch die Katalyse der spezifischen Glycosyltransferasen (EC 2.4.x.y) an aktivierten Lipidträgern, die in der inneren Membran verankert sind, assembliert. Diese Glycosyltransferasen katalysieren dabei den Transfer von aktivierten Zuckermonomeren an spezifische Akzeptormoleküle und umfassen laut der CAZy (*Carbohydrate-Active enZymes Database*)-Klassifikation aktuell 106 Familien (Schmid, Heider et al. 2016). Die Gene *spnBKLQ* (s. Abbildung 7), die die vier Glycosyltransferasen für die Hauptkettenassemblierung codieren, sind in derselben Reihenfolge in jedem annotiertem Synthesecluster zu finden. *SpnK* ist unterhalb von *spnQ* und oberhalb von *spnL* im *spn*-Cluster lokalisiert, wobei sich *spnB* nahe am 3'-Ende des Clusters oberhalb der *rml*-Gene befindet (s. Abbildung 7) (Schmid, Sperl et al. 2014).

Die initiierende Glycosyltransferase (Glucosyl-isoprenyl-phosphat-transferase) wird vom Gen *spnB* codiert. Hierbei wird Glucose-1-phosphat vom Vorläufernukleotidzucker UDP-Glucose auf den C55-Isoprenylphosphatträger dirigiert (Yamazaki, Thorne et al. 1996; Pollock, van Workum et al. 1998). Diese Funktion wurde durch Komplementationversuche einer Mutante des Stammes *Xanthomonas campestris*, die keine Transferase I aber ein Plasmid mit *gelB* enthielt, überprüft und bestätigt (Coleman, Patel et al. 2008). Die C-terminale Aminosäuresequenz von GelB weist hohe Homologie zu Glykosyl- und Galactosyltransferasen auf, wobei die N-terminale Region bereits innerhalb der *spnB*-Gruppe sehr stark variiert und aus verschiedenen hydrophoben Regionen besteht. Diese Regionen am N-Terminus sollen eigene Domänen sein, die für die Membrandurchspannung und damit für die Fixierung in der zellulären Membran essentiell sind (Yamazaki, Thorne et al. 1996). Darüber hinaus konnte anhand der *gumD*-Glycosyltransferase von *X. campestris* bewiesen werden, dass die enzymatische Aktivität im C-terminalen Teil des Proteins lokalisiert ist. GelB und GumD katalysieren die identische Reaktion, d.h. die Bildung von Glucoseisoprenylpyrophosphate und stellen somit jeweils die startende Glycosyltransferase in der EPS-Biosynthese dar (Katzen, Ferreira et al. 1998; Harding, Patel et al. 2004). Jedoch konnte durch Sequenzalignments mit anderen Glycosyltransferasen aufgrund der niedrigen Homologie keine Spezifität für einen speziellen Zucker postuliert werden.

Die zweite Glycosyltransferase ist für den Transfer von Glucuronsäure-1-phosphat aus UDP-Glucuronsäure auf das reduzierende Ende der Glucose verantwortlich, die am Lip-

idanker fixiert ist. Diese Glucosyl- α -pyrophosphorylpolyprenol (PPL)-1,4-glucuronosyltransferase wird vom Gen *spnK* codiert und zeigt strikte Stereospezifitäten, sowie eine präzise Stereochemie gegenüber den Substraten. Dies bedeutet, dass z.B. der Austausch von UDP-Glucose oder UDP-Galactose anstatt UDP-Glucuronsäure zu einer fehlenden Assemblierung führte (Videira, Fialho et al. 2001). Das Protein GelK z.B. besitzt ein sogenanntes „DXD“-Motiv. Auf Grund dieses Motivs bindet GelK divalente Kationen, aber benötigt keine Mangan oder Magnesiumionen für seine Aktivität (Campbell, Davies et al. 1997; Charnock und Davies 1999; Videira, Fialho et al. 2001). Die Substratbindung dieser Glykosyltransferase findet am C-terminalen Ende statt und die Bindungsstelle für den Akzeptor (PPi) ist am N-Terminus lokalisiert, der eine spezifische G-Schleife besitzt (Ha, Walker et al. 2000).

Der dritte und vierte Zucker werden an die bereits vorbereitete Kette angehängt (Pollock, van Workum et al. 1998), wobei dieser Transfer bis heute in den sphinganproduzierenden Stämmen nicht experimentell bewiesen werden konnte. Dem Gen *spnL* (Gen für die putative Glucosyl-glucuronosyl-transferase) wird die Aufgabe der Übertragung der zweiten D-Glucose und dem Gen *spnQ* die Addition der Rhamnose, d.h. des vierten Zuckers zugeordnet (Videira, Fialho et al. 2001). Die Wichtigkeit des Proteins SpnQ für die Biosynthese von S-88 wurde bereits im Jahr 1996 bewiesen, da *spsL*-defiziente Mutanten nicht fähig waren dieses EPS zu bilden (Yamazaki, Thorne et al. 1996). Im Jahr 2017 konnte im Genom des Stamms *S. sanxanigenens* das homologe Gen *ssQ* identifiziert werden. Anhand von Deletionsexperimenten wurde zudem gezeigt, dass dessen Genprodukt ebenfalls die Addition von Rhamnose an Glucose katalysiert (Wu, Huang et al. 2017). Obwohl die Struktur des EPS dieses Stamms sich von den Sphinganen unterscheidet, bestätigen diese Experimente dennoch die vermutete Funktion von SpnQ.

Ein weiterer wichtiger Teil der Synthese der Wiederholungseinheit ist die abschließende Addition von Acetyl- und Glycerylsubstituenten an der zweiten Glucoseeinheit. Die Gene und Enzyme, die für diese Schritte essentiell sind, sind bis dato für alle Sphingane unaufgeklärt. Eine Ausnahme hierbei stellt der Acetylierungsprozess des EPS Gellan dar: Harding *et al.* identifizierten eine Mutante des Stamms *S. elodea*, die ein nicht-acetyliertes Gellan produziert (Harding, McQuown et al. 2003).

1.4.2.4 Zuckerrückgratmodifikation

Der Mechanismus für die Anheftung der Zuckerseitenketten ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Anfügung tritt entweder auf, nachdem die Wiederholungseinheit der Hauptkette vollendet ist oder bereits vor der Vervollständigung der Hauptketteneinheiten (Pollock 2005). Im Jahr 2008 konnten *open reading frames* (*urf*, *urf31*, *urf31.4* und *urf34*)

identifiziert werden, die teilweise Glycosyltransferasen für den Transfer der Seitenketten sein sollen (Coleman, Patel et al. 2008).

Urf31 befindet sich am 3'-Ende des Synthesecusters *sps*, *dps* und *wel*. Es wird vermutet, dass dieses Gen ein Protein codiert, das für die Anheftung der Rhamnoylseitenkette verantwortlich ist (Coleman, Patel et al. 2008; Schmid, Sperl et al. 2014). Diese hypothetisch zugeordnete Funktion wird durch die Abwesenheit von *urf31* im Synthesecuster von S-7 gestützt, da das EPS S-7 als Seitenkette D-Glucose statt L-Rhamnose an der zweiten D-Glucose der Hauptkette enthält (Thorne, Mikolajczak et al. 2000). Darüber hinaus fehlt auf dem Gellancluster das Gen *urf31*. Auf Grund der fehlenden Seitenkette von Gellan wird die vermutete Rolle von Urf31 als Rhamnosyltransferase für Verzweigungen gestützt. Urf31 besitzt einige charakteristische Eigenschaften der Glycosyltransferaseklasse GT2, wie z.B. die DXD Konsensussequenz (AS 111-113) und entsprechende Aspartatreste, die für die Aktivität von β -Glycosyltransferasen essentiell sind (Wiggins und Munro 1998; Garinot-Schneider, Lellouch et al. 2000; Coleman, Patel et al. 2008). Darüber hinaus zeigt Urf31 einige multiple hydrophobe Bereiche, die auf Domänen hinweisen, die die Membran durchspannen. Ein experimentelles Indiz zur Aktivität von Urf31 als Transferase wurde durch die Deletion von *urf31* in ATCC 53159 erbracht. Das resultierende Diutan der Mutante weist verminderte Mengen bis hin zum kompletten Fehlen der Rhamnoseseitenketten auf (Coleman, Patel et al. 2008).

Das Gen *urf34* tritt im *dps*-, *sps*-, *gel*-, *wel*-, sowie im S-7-Cluster auf, wobei aber bis heute noch keine Funktion beschrieben werden konnte (Thorne, Mikolajczak et al. 2000; Sa-Correia, Fialho et al. 2002; Harding, Patel et al. 2004; Coleman, Patel et al. 2008). Auf Grundlage der Strukturen von Welan, Gellan, S-88, Diutan und S-7 scheint eine Funktion bzgl. der Seitenkettenanheftung ausgeschlossen. Eine allgemeine Aufgabe dieses Transmembranproteins könnte in der Assemblierung oder Sekretion liegen. Eine Deletionsmutante von *urf34* im Stamm ATCC 31462 zeigte eine unveränderte Gellanproduktion, sowie –ausbeute verglichen mit dem Wildtyp. Aus diesen Gründen wird davon ausgegangen, dass Urf34 nicht an der Sphingansynthese beteiligt ist (Coleman, Patel et al. 2008). Ähnlich wie bei Urf34 konnte auch dem Gen *urf31.4* noch keine Funktion zugeordnet werden. *Urf34.1* ist nur auf den *wel*- und *dps*-Clustern zu finden, weshalb die Ähnlichkeiten dieser EPS-Strukturen eine Aufgabe von Urf31.4 in der Einführung der Seitenketten oder in der Unterstützung der Assemblierung der verzweigten Wiederholungseinheiten, vermuten lassen. Urf34.1 besitzt keine Transmembranregion (Schmid, Sperl et al. 2014).

1.4.2.5 Polymerisation und Export

Die Wiederholungseinheiten, die an den Lipidanker gebunden sind, werden durch die innere Membran mittels einer Wzx-ähnlichen Translokase, die von *spsS* codiert wird, transportiert und mittels einer Wzy-ähnlichen Polymerase (Gen *spnG*) polymerisiert. Die Kettenlänge des finalen Sphingans wird im Periplasma durch Enzyme der PCP-Familie (PCP= *polysaccharide co-polymerase* ; SpnC und SpnE) reguliert (Moreira, Hoffmann et al. 2004). Für die folgenden Gene *gelM* und *gelN* konnten nur hypothetische Funktionen auf der Grundlage von Deletionsmutanten aufgestellt werden. Die EPS-Ausbeute der Mutanten, sowie die Viskosität des erhaltenen EPS waren drastisch reduziert, was an einem geringeren Molekulargewicht des EPS liegen kann (Harding, Patel et al. 2004). Das Protein Gell soll nicht direkt an der Assemblierung des Gellans beteiligt sein, es könnte jedoch trotz seiner etwas entfernteren Lage im Cluster wichtig für die Proteinfaltung oder den Export sein. Die Deletion von *gell* verursachte eine Reduktion der Polysaccharidausbeute, wobei jedoch weder die Monomierzusammensetzung, noch der Acetylierungsgrad im Endprodukt verändert wurde (Harding, Patel et al. 2004). Auf Grund der geringsten Sequenzidentitäten der *spnF*-Gene innerhalb aller *spn*-Gene, könnte dieses Protein eine Rolle im spezifischen Mechanismus der Sphinganbiosynthese spielen, wobei diese Rolle sehr abhängig von dem unterschiedlichen Aufbau der EPS-Strukturen ist (Schmid, Sperl et al. 2014). Mutanten, denen nur *gelF* deletiert wurde, waren letal, wobei die *gelF*-Deletion in glykosyltransferase-I-defizienten Mutanten (Δ *gelB*) zum Wachstum einiger Klone führte. Durch diese Versuche gelangte man zu der Erkenntnis, dass der letale Effekt der *gelF*-Deletion nur dann auftritt, wenn die Gellansynthese mit der Bindung der Zuckermonomere an den Lipidanker initiiert wird. Dies bedeutet, dass die Akkumulierung der Wiederholungseinheiten der Zellwandsynthese schadet, wenn die nachfolgende Polymerisierung blockiert ist (Harding, Patel et al. 2004).

1.4.2.6 Regulation der Sphinganbiosynthese

Das Gen *gelA* ist bis dato das einzige identifizierte Gen, für das eine Funktion in der Regulation der Sphinganbiosynthese zugeschrieben werden kann. Außerdem konnte auch auf dem *wel*-Cluster eine homologe Version von *gelA* identifiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass dieses Regulationsprotein, das zusätzlich homologe Regionen verglichen mit Sensorinasen und Regulationsproteinen aufweist, eine essentielle Rolle in der Sphinganproduktion inne hat (Harding, Patel et al. 2004; Fialho, Moreira et al. 2008).

1.4.3 Konzepte der Genmanipulation für die Verbesserung der Sphinganproduktion

Heutzutage werden viele Anstrengungen, darunter auch klassische Mutationsansätze, unternommen, um die Sphinganproduktion zu steigern oder neue, bessere Produzenten zu identifizieren (West 2005). Es existieren einige Patente über die Genmanipulation von verschiedenen Sphingan-produzierenden Stämmen, die vor allem von der *Kelco Company* oder der *Shin-Etsu Bio, Inc.* verfasst wurden. Neben der Enträtselung der Biosynthese wurden auf Genlevel Ansätze zur Überproduktion von natürlichen und deacetylierten Sphinganvarianten durchgeführt.

Es existiert eine Vielzahl an Berichten, die die Überexpression von Genen, die in der Herstellung der Sphinganvorstufen beteiligt sind, beschreiben. Videira *et al.* konnten z.B. keine Steigerung der Gellanproduktion durch Überexpression von *pgmG* und *ugpG* erreichen (Videira, Cortes *et al.* 2000). Die Überexpression des kompletten *sps*-Clusters oder eines Teiles des Clusters (*spsB* bis *rhsABCD*) resultierte in einer Erhöhung der Ausbeute des finalen Produkts von nur 10 %, wobei sich allerdings zusätzlich eine drastische Steigerung der Viskosität (circa 40 %) ergab. Außerdem veränderte sich die Monomierzusammensetzung des EPS. Das veränderte Polysaccharid besaß ein höheres Rhamnose-/Glucoseverhältnis als das native S-88 (Thorne, Mikolajczak *et al.* 2000). Vergleicht man die oben genannte Überexpression von *pgm* mit diesen Überexpressionen, wiesen Letztere verringerte Zelldichten als der Wildtyp auf, wobei dieses Problem durch eine zusätzliche *pgm*-Überexpression kompensiert werden konnte. Im Jahr 2013 gelang es Huang *et al.* die Sphinganproduktion in einem neu identifizierten *Sphingomonas* Stamm (*S. sanxanigenens*) durch die Überexpression des Gens *pgm* zu steigern. Die Sphinganausbeute wurde um 17 % im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Huang, Li *et al.* 2013). Diese Versuchsergebnisse geben einen Hinweis für einen veränderbaren Mechanismus der Regulation der Sphinganvorstufenproduktion innerhalb der *Sphingomonas*-Familie.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Das Polysaccharid Alginat wird als Interkalat in Zn_2Al -Schichtstrukturen z.B. in der Abwasserreinigung eingesetzt. Eine gezielte Verwendung von modifizierten Alginatvarianten könnte daher durch die Bildung neuartiger Strukturen die Effektivität dieser Anwendung verbessern oder weitere Anwendungsgebiete (Bauchemie oder Pharmaindustrie) erschließen. Da der Einfluss von Alginatvarianten unterschiedlicher Zusammensetzung auf die Schichtdicken und Morphologien der LDH-Strukturen jedoch bislang noch nicht aufgeklärt worden ist, sollten im ersten Teil dieser Arbeit anhand der Interkalation gezielt hergestellter Alginatvarianten entsprechende Alginat-Struktur-Beziehungen ermittelt werden. Um die Monomierzusammensetzung und folglich die räumliche Struktur der Alginate verändern zu können, waren die Alginate *in vivo* und *in vitro* durch die C5-Alginat-Epimerase AlgE4 zu epimerisieren. Nach einer Optimierung der EPS-Ausbeuten sollten die Polymere in anorganischen Zn_2Al -Schichtstrukturen interkaliert werden und anschließend der Einfluss der EPS auf Morphologie und Formfaktoren der gebildeten Kopräzipitate untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten effektive Strategien für die genetische Modifikation des Stammes *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 etabliert werden mit dem Ziel, veränderte Varianten des EPS Welan zu erhalten. Um dies zu erreichen, war zunächst das Synthesecluster dieses Stammes anhand von Genvergleichen mit anderen Spezies derselben Stammgruppe zu analysieren, um so einzelne Synthesegene identifizieren zu können. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse war anschließend die Verfügbarkeit der Zuckervorläuferstufen gezielt zu variieren, da diese einen vielversprechenden Angriffspunkt für die Änderung der Monomierzusammensetzung der Seitenkette darstellt. Dazu sollte zunächst eine Genknockout Methode im Welan-produzierenden Stamm etabliert werden, die später für weitere knockouts von Syntheseclustergenen, wie *welB*, *welQ*, *urf31* und *urf34*, zu verwenden war. Ergänzend sollte durch Integrationen bzw. plasmidbasiert anhand von Überexpressionen bestimmter Synthesegene eine Veränderung der Monomierzusammensetzung von Sphinganen erreicht werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen den höchstmöglichen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen (s. Tabelle 1):

Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Firma	Katalognummer
10x Glucono-d-lacton (GDL)-Lösung	Sigma-Aldrich	G4750
1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon	Sigma-Aldrich	M70800
3-Morpholinopropansulfonsäure	Carl-Roth	6979
ABTS	Sigma-Aldrich	A1888
Acetonitril LM-MS grade	VWR	83.040.320
Alginat MC ₁	Sigma-Aldrich	A0683 Batch: 106K01132
Alginat MC ₂	Sigma-Aldrich	71238 Lot: 0001434156
Ammoniak	Carl-Roth	P093.1
Ammoniumacetat	Carl-Roth	7869.2
Ammoniumchlorid	Carl-Roth	K298.1
Ammoniumnitrat	VWR	21.280.260
Ammoniumpersulfat	VWR	1.012.010.500
Ampicillin-Natriumsalz	Carl-Roth	K029.2
Antischaum B silikonbasiert	VWR	BAKR8390.0500
Borsäure	Sigma-Aldrich	B7901
Bromphenolblau	VWR	449
Calciumcarbonat	Carl-Roth	6230.1
Calciumchloriddihydrat	Carl-Roth	5239.1
Calciumsulfat	Sigma-Aldrich	C3771
Cobalt(II)sulfatheptahydrat	Alfa Aesar	A16346
Coomassie Brilliant Blue G250	VWR	443283M
D(+)-Glucosemonohydrat	VWR	108.342
D(+)-Saccharose	Carl-Roth	4621.2
DA-64 (N-(Carboxymethylaminocarbonyl)-4,4'-bis(dimethylamino)-diphenylamin Natriumsalz	FUJIFILM Wako Chemicals	043-22351
Dikaliumphosphat	Carl-Roth	6875
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl-Roth	P030.1
Di-Natriumtartrat-Dihydrat	Carl-Roth	0254.1
DNA Stain Clear G	Serva Electrophoresis	39804.02
D-Sorbitol	Carl-Roth	6213.2
EDTA	VWR	443885J
Eisen(II)sulfatheptahydrat	Sigma-Aldrich	31236
Essigsäure	Carl-Roth	6755.1
Ethanol absolut	VWR	20.821.321
Gentamycin-Sulfat	Carl-Roth	0233.2
Glycerin p. a.	Carl-Roth	3783.2

Material

Hefeextrakt	Carl-Roth	2363.4
Imidazol	Carl-Roth	3899.4
Isopropanol	VWR	20.922.466
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl-Roth	P749.3
Kanamycin-Sulfat	Carl-Roth	T832.3
Kupfer(II)sulfatheptahydrat	Sigma-Aldrich	61245
Lithiumnitrat	VWR	13405.30
Magnesiumsulfathexahydrat	Merck	1.058.861.000
Malzextrakt	VWR	1053919025
Mangan(II)chloridtetrahydrat	Sigma-Aldrich	63535-50G-F
Methanol LC-MS grade	VWR	83.638.320
m-Toluat	VWR	SAFAT36609
Natriumacetat	Carl-Roth	X891.1
Natriumchlorid	VWR	1.064.041.000
Natriumhydroxid	Carl-Roth	6771.2
Natriummolybdatdihydrat	Carl-Roth	M1651
oligoM	CarboSynth	OP03136 batch OP031361201
ortho-Phosphorsäure	Carl-Roth	9079.3
Phenol	VWR	20.599.231
Phenolrot	Alfa Aesar	B21710
Pullulan	PSS Polymer Stan- dards	PSS-dpul
Salzsäure	Carl-Roth	4625.1
Schwefelsäure	Carl-Roth	4623.4
SDS	Serva Electrophore- sis	20760.02
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M3701
Streptomycin Sulfat	VWR	0382-EU
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich	T6508
TRIS	Carl-Roth	AE15.2
Trypton	Carl-Roth	8952.5
Vitaminlösung (RPMI 1640 100x)	Sigma-Aldrich	R7256
Xylencyanol	VWR	819

2.2 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von folgenden Herstellern bezogen:

OptiTherm DNA-Polymerase	Rapidozym GmbH, Berlin
Taq DNA Polymerase mit ThermoPol® Buffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
<i>Phusion High-Fidelity</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
GoTaq® G2	PROMEGA, Madison, USA
Pfu Polymerase	PROMEGA, Madison, USA
Quick T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
T4-DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Restriktionsendonukleasen TypII	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
CIP alkalische Phosphatase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main

T4 Polynucleotid-Kinase
Meerrettichperoxidase

New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.3 Kits

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit

Thermo Fischer Scientific, Fermentas,
St.Leon-Rot

DNeasy® Blood & Tissue Kit (50)

Qiagen, Hilden

NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix

New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

CloneJET PCR Cloning Kit

Thermo Fischer Scientific, Fermentas,
St.Leon-Rot

Quick Blunting™ Kit

New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main

2.4 Geräte

Auflistung in alphabetischer Reihenfolge:

Autoklav: Varioklav 135S

Thermo Fischer Scientific, USA

Chromatographieanlagen:

ÄKTA™ *purifier* inklusive

GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

UltiMate 3000 RS LC System inklusive

Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein

GPC SECurity GPC System

Polymer Standard Services GmbH, Mainz

CD-Spektrometer JASCO J-815

JASCO Corporation, Großbritannien

Cross Flow Filtrationskassette Vivaflow200

Sartorius AG, Göttingen

Fermentationssysteme:

DASGIP 8x Parallelreaktorsystem

DASGIP GmbH, Jülich

Biostat Bplus 2L

Sartorius AG, Göttingen

Fluoreszenzspektrometer infinit M200

Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz

Gelelektrophorese:

Agarose-Elektrophorese-Apparatur

Mini-Sub Cell GT System

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Dark Reader® transillumina

Clare Chemical Research, Guanajuato

SDS-Elektrophoresekammer

Mini-PROTEAN®-Tetra Cell

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Mini-Protean®3Multi-Casting Chamber

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Gefrierschrank -20 °C

Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen

Gefrierschrank -80 °C Forma 906 -86°C ULT

Thermo Fischer Scientific, USA

Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LD plus

Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen

GmbH

mit Vakuumpumpe RC 6

VACUUBRAND GmbH + Co. KG

Geldokumentation *Gel iX Imager*

Intas Science Imaging Instruments GmbH,

Göttingen

Hamilton Mikroliterspritze, 25 µL

Hamilton AG, Bonaduz, Schweiz

Heizblock-Thermostat Tmix

Analytik Jena Aktiengesellschaft, Jena

Heizschrank Function Line T12

Thermo Fischer Scientific, Haeraeus

Hochdruckhomogenisator

Cell Disruption System Basic Z

Constant Systems, Daventry, Großbritan-
nien

Inkubationsschränke:

Klimaschrank KBF 240 E5.1/C

BINDER GmbH, Tuttlingen

Brutschrank Function Line B12

Thermo Fischer Scientific, Haeraeus

Inkubationsschüttler:

HAT Minitron

Infors AG, Bottmingen/Basel, Schweiz

MaxQ 2000
TiMix 5 control
Konzentrator Savant SpeedVac Plus
SC210A
mit Savant *Refrigerated Vapor Trap*
RVT100

Magnetrührer und Homogenisieren:

Ultra Turrax T18 basic
MR 3001 K

VMS-C7
Variomag Telesystem
Massenspektrometer ESI-Ion Trap MS

Microliterpipetten:

Transferpette[®] S Pipettensatz über
0,1-10.000 µL

Mikroliterpipetten, elektrisch:

Transferpette[®] S -8 electronic 10-200 µL
Research pro 8x 1200 µL
Research pro 12x 300 µL
Mikrowelle MH 25 ED

pH-Messgeräte und Elektroden:

FiveGo[™]
FiveEasy[™]
InLab[®] Expert Pro pH 0-14 ; 0-100 °C
InLab[®] Micro Pro pH 0-14 ; 0-100 °C

PCR-Geräte:

MJ Mini[™] Personal Thermo Cycler
MyCycler[™] Thermal Cycler
CFX96[™] Real-Time System
Rheometer Physica MCR 300
Reinstwasseranlage PURELAB Classic
Schingmühle MM400
Sicherheits-Vakuumtrockenschrank VD 53
Sterilbank MSC-Advantage
Ultraschallbad Ultrasonic Cleaner
Ultraschall-Prozessor UIS250v

UV-Vis Spektralphotometer:

Multiskan Spectrum
Varioskan
Infinite 200 pro
Nanophotometer P-class
Handphotometer Ultrospec 10

Vakuumpumpe PC 2004 VARIO

Vertikalschüttler Rocking Platform
Vortex Genie 2

Waagen:

Feinwaage Pioneer[™]
TE6101
TE1502S
Wasserbad ED-33

Thermo Fischer Scientific
Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Savant Instruments, Indien

Thermo Fischer Scientific, USA

IKA-Werke GmbH & C. KG, Staufen
Heidolph Instruments GmbH & Co.KG,
Schwabach
VWR International GmbH
Thermo Fischer Scientific, USA
Bruker Daltonics GmbH, Bremen

BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim

BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf AG, Hamburg
ECG, Prag, Tschechien

Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Mettler-Toledo GmbH, Gießen

Bio-Rad Laboratories GmbH
Bio-Rad Laboratories GmbH
Bio-Rad Laboratories GmbH
Anton Paar GmbH, Österreich
ELGA LabWater, Celle
Retsch GmbH, Haan
BINDER, Tuttlingen
Thermo Fischer Scientific, USA
VWR International GmbH
Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow

Thermo Fischer Scientific, USA
Thermo Fischer Scientific, USA
Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Implen, Westlake Village, USA
Amersham Biosciences, Großbritannien

VACUUBRAND GmbH & Co. KG, Wert-
heim
VWR International GmbH, Darmstadt
Scientific Industries Inc, Bohemia, USA

Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Sartorius AG, Göttingen
Sartorius AG, Göttingen
JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach

Zentrifugen:

Sorvall RC 6+	Thermo Fischer Scientific, USA
Fresco 21 Centrifuge	Heraeus, Hanau
Pico 17	Heraeus, Hanau
Rotanta 460R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Galaxy MiniStar	VWR International

2.5 Verwendete Software und Datenbanken

2.5.1 Lokale Anwendungen

ÄKTA Unicorn Version 5.01	GE HEALTHCARE, Großbritannien
Bioedit Sequence Alignment Editor V.7.0.9	IBIS BIOSCIENCES, Tom Hall
Bruker DataAnalysis	Brucker Daltonics GmbH, Bremen
Bruker QuantAnalysis	Brucker Daltonics GmbH, Bremen
CFX Maestro™ Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ChemDraw Ultra 12.0	Perkin Elmer Informatics, USA
Chromeleon 6.80	Thermo Fisher Scientific Dionex, Idstein
Clone Manager 6	Scientific & Educational Software, USA
Corel Draw Version 14	COREL Corporation, Kanada
DASware control	DASGIP GmbH, Jülich
Module Operator Service Program 3.0	Sartorius AG, Göttingen
MS Office 2010	2010 MICROSOFT Corporation, USA
PSS WinGPC Unichrom 8.1	Polymer Standard Services GmbH, Mainz
Rheoplus/32 V3.61	Anton Paar GmbH, Österreich
SigmaPlot 12.0	Systat Software GmbH, Erkrath
Spectra Manager Version 2.06	JASCO Corporation, Großbritannien
Skantl 2.4.3	Thermo Fischer Scientific, USA

2.5.2 Servergestützte Anwendungen

BLAST	National Center for Biotechnology Information, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch
Braunschweig Enzyme Database (BRENDA)	Technische Universität Braunschweig, Institut für Biochemie und Biotechnologie, http://www.brenda-enzymes.info/
Clustal Omega	EMBL-EBI https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
<i>Calculator for determining the number of copies of a template</i>	URI Genomics & Sequencing Center http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html
Double Digest Finder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder
Entrez	National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery
IDT	Integrated DNA Technologies https://eu.idtdna.com/pages

ProtParam tool

ETH Zürich, *Swiss Institute of Bioinformatics*
<http://web.expasy.org/protparam/>
PATRIC, University of Chicago

*Rapid Annotation using Subsystem
Technology*

(RAST) Version 2.0

SciFinder

<http://rast.nmpdr.org/>
Chemical Abstract Service (CAS);
<https://scifinder.cas.org/scifinder>

2.6 Nährmedien und Antibiotika

Hitzestabile Medien, Puffer und Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Alle hitzelabilen Lösungen wurden über einen sterilen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter (VWR International GmbH) steril filtriert. Für ein Medium, das aus verschiedenen Lösungen besteht, wurden alle Bestandteile einzeln autoklaviert bzw. steril filtriert. Zur Herstellung von Festmedien wurde den Flüssigmedien vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt. Die verwendeten Medien sind unter 2.6.1 aufgelistet. Selektivmedien wurde nach Bedarf das entsprechende steril filtrierte Antibiotikum nach Abkühlen zugegeben.

Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur, sofern nicht anders angegeben. Es wurde Wasser aus der Reinstwasseranlage PURELAB Classic (ddH₂O) zum Ansetzen aller Medien, Puffer und Lösungen verwendet.

2.6.1 Nährmedien

LB-Medium (Bertani 1951)

5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton

TB-Medium (mit Sorbitol und Betain)

12 g/L Pepton, 24 g/L Hefeextrakt, 12,5 g/L K₂PO₄, 2,5 g/L KH₂PO₄, 182 g/L Sorbitol

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium eine Endkonzentration von 5 mM Betain (steril filtriert) zugegeben.

EPS-Medium:

5 g/L Trypton, 1,67 g/L KH₂PO₄, pH 6,8, 1,33 g/L MgSO₄ x 7 H₂O, 0,05 g/L CaCl₂ x 2 H₂O, 30 g/L Glucose Monohydrat

Die verschiedenen Bestandteile des Mediums wurden getrennt autoklaviert.

Anschließende Zugabe von 0,2 % (v/v) Spurenelementlösung und 0,1 % (v/v) Vitaminlösung (RPMI 1640 100x).

Material

Spurenelementlösung:

1,8 g/L $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 g/L $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,258 g/L Borsäure, 0,031 g/L $\text{CuSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,021 g/L ZnCl_2 , 0,075 g/L $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,023 g/L Na_2MoO_4 , 2,1 g/L Natriumtartrat $\times 2 \text{H}_2\text{O}$

AG(*Azotobacter Growth*)-Medium (Page und von Tigerstrom 1979; Glick, Brooks et al. 1985):

2 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L CaSO_4 , 0,5 g/L Hefeextrakt, 0,8 g/L K_2HPO_4 , 0,2 g/L KH_2PO_4 , 20 g/L Saccharose, pH=7,2

Die verschiedenen Bestandteile des Mediums wurden getrennt autoklaviert.

Anschließend Zugabe von 0,1 % (v/v) Spurenelementen.

RA1-Medium (Gimmestad, Steigedal et al. 2006)

2 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/L NH_4NO_3 , 0,29 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2 g/L Pepton, 0,5 g/L K_2HPO_4 , 10,5 g/L MOPS, 20 g/L Fructose, pH=7,0

Die verschiedenen Bestandteile des Mediums wurden getrennt autoklaviert.

Anschließend Zugabe von 0,1 % (v/v) Spurenelementen.

Burk's-Medium (Peña, Campos et al. 1997)

0,029 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,027 g/L $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L NaCl, 0,05 g/L CaSO_4 , 3 g/L Hefeextrakt, 0,66 g/L K_2HPO_4 , 0,16 g/L KH_2PO_4 , 1,42 g/L MOPS, 20 g/L Saccharose

Die verschiedenen Bestandteile des Mediums wurden getrennt autoklaviert.

YEME(*Yeast Extract-Malt Extract*)-Medium (Harding, Patel et al. 2004)

2,5 g/L Hefeextrakt, 0,25 g/L Malzextrakt

YM(*Yeast Malt*)-Medium (Pollock, Thorne et al. 1996)

3 g/L Hefeextrakt, 3 g/L Malzextrakt, 5 g/L Pepton, 10 g/L D-Glucose

Die Glucoselösung wurde separat autoklaviert und nach dem Abkühlen dem Medium zugegeben.

M9-Medium:

Zu 750 mL sterilem H_2O wurden zugegeben:

200 mL 5 x M9 Salze, 2 mL MgSO_4 (1M), 20 mL Glucose (20%), 0,1 mL CaCl_2 (1M)

5x M9—Salze:

64 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 15 g KH₂PO₄, 2,5 g NaCl, 5,0 g NH₄Cl in Wasser gelöst, auf 1 L aufgefüllt, autoklaviert und bei RT gelagert.

2.6.2 Antibiotika

Die Lagerung der gelösten Antibiotika erfolgte nach Sterilfiltration durch einen sterilen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter (VWR International GmbH) bei -20 °C.

Ampicillin-Stammlösung (1000x):

100 mg/mL Ampicillin-Natriumsalz

Kanamycin-Stammlösung (1000x):

30 mg/mL Kanamycin-Sulfat oder 100 mg/mL Kanamycin-Sulfat

Gentamycin-Stammlösung (1000x):

15 mg/mL Gentamycin-Sulfat

Streptomycin-Stammlösung (1000x):

100 mg/mL Streptomycin-Sulfat

2.7 Verwendete Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 aufgeführt:

Tabelle 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> NEB Turbo	F' <i>proA+B+ lacIq Δ (lacZ) M15/fhuA2 Δ (lac-proAB) glnV gal R(zgb-210::Tn10)TetS endA1 thi-1 Δ (hsdS-mcrB)5</i>	NEB (Frankfurt am Main)
<i>E. coli</i> DH5α	F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), λ-</i>	Life Technologies (Darmstadt)
<i>E. coli</i> DH5αλpir	<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17λpir</i>	Martinez-Garcia und de Lorenzo
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F' <i>ompT gal dcm hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3)</i>	Novagen (Merck, Darmstadt)
<i>E. coli</i> HB101	<i>Strep^H, hsdR-M^r, pro, leu, thi, recA</i>	Sambrook et al. 1989
<i>E. coli</i> (ATCC®47055™)-S17.1	<i>recA pro hsdR RP42Tc::MuKm::Tn7</i>	ATCC (USA)
<i>Azotobacter vinelandii</i> Lipman 1903 (DSMZ 576)	Wildtyp	DSMZ (Braunschweig)
<i>Sphingomonas</i> sp. (ATCC® 31555™)	Wildtyp <i>Strep^R</i>	ATCC (USA)
<i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555Δ <i>crtB</i>	<i>Strep^H, crtB⁻</i>	diese Arbeit
<i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555Δ <i>rmlACBD</i>	<i>Strep^H, Kana^H, rmlACBD⁻+pEMG-us/ds(rmlAD)</i>	diese Arbeit
<i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555Δ <i>welB</i>	<i>Strep^R, Kana^R, welB⁻+pEMG-us/ds(welB)</i>	diese Arbeit
<i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555Δ <i>urf31</i>	<i>Strep^R, Kana^R, urf31⁻+pEMG-us/ds(urf31)</i>	diese Arbeit
<i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555Δ <i>welQ</i>	<i>Strep^H, Kana^H, welQ⁻+pEMG-us/ds(welQ)</i>	diese Arbeit
<i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555Δ <i>urf34</i>	<i>Strep^H, Kana^H, urf34⁻+pEMG-us/ds(urf34)</i>	diese Arbeit

2.8 Verwendete Plasmide

In Tabelle 3 sind die verwendeten Plasmide aufgeführt. In Tabelle 4 befinden sich die im Rahmen dieser Arbeit neu konstruierten Plasmide.

Tabelle 3: Zusammenfassung der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Größe (Bp)	Beschreibung	Referenz
pJET1.2	2974	<i>Amp^R</i> ; <i>rep</i> (pMB1); <i>eco471R</i> ; <i>P_{lacUV5}</i> ; T7 Promotor Klonierungsvektor mit <i>blunt ends</i> , der bei Religation letales Gen enthält.	Thermo Fischer Scientific, (St.Leon- Rot)
pET22b(+)	5493	<i>Amp^R</i> <i>ColE1 Plac lacZ' lacI</i> , Proteinexpressionsvektor mit T7-Expressionssystem unter der Kontrolle eines lac- Operators zur Proteinexpression	Novagen (Merck, Darmstadt)
pJB861	7243	<i>Kana^R</i> , <i>broad-host</i> Expressionsvektor unter der Kontrol- le eines Pm-Promotors; <i>xylS</i> ; <i>trfA</i>	NIG, Japan Blatny, Brautaset et al. 1997
pEMG	3168	<i>Kana^R</i> , oriR6K, <i>lacZα</i> mit zwei flankierenden I-SceI Er- kennungssequenzen; Für Genomintegrationen	Martinez-Gracia und de Lorenzo
pSWII	8235	<i>Gm^R</i> ; oriRK2, Expressionsvektor unter der Kontrolle eines Pm-Promotors; <i>xylS</i>	Martinez-Gracia und de Lorenzo
pRK2013	4800	<i>Kana^R</i> ; oriColE1, RK2; <i>mob⁺</i> , <i>tra⁺</i>	(Figurski und Helinski 1979)
pCM184	6760	<i>Kana^R</i> ; <i>Tet^R</i> Allelaustauschvektor mit loxP	Marx und Lidstrom 2002
pBBR122	5307	<i>Chloramp^R</i> ; <i>Kana^R</i> ; Klonierungsvektor; <i>mob</i>	MoBiTec GmbH; Göttingen
pSRKKm	5739	<i>Kana^R</i> ; <i>broad-host-range</i> Expressionvektor unter Kontrol- le von lac-Operators	Khan, Gaines et al. 2008
pAK405	3937	<i>Kana^R</i> ; Intergrationsvektor; oriV, RP4 oriT, pUC18 <i>multi- ple cloning site</i> in <i>lacZ</i> , <i>rpsL1</i>	Kaczmarczyk, Vor- holt et al 2012
pK19mobsacB	5722	<i>Kana^R</i> ; Intergrationsvektor; oriV, Ec oriT, <i>sacB</i>	Schäfer, Tauch et al. 1994
pUO-pp-324-3- GFP-Linker	2382	<i>Kana^R</i> ; Templat für Amplifikation von <i>eGFP</i>	Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe

Tabelle 4: Zusammenfassung der konstruierten Plasmide.

Plasmid	Größe (Bp)	Beschreibung	Referenz
pET22b(+)-algE4	7029	<i>Amp^R</i> , pET22b(+) enthält <i>algE4</i> Gen; kloniert über Schnitt- stellen NdeI und XhoI	diese Arbeit
pET22b(+)-algE4- His ₆	7026	<i>Amp^R</i> , pET22b(+) enthält <i>algE4</i> Gen mit C-terminalem His ₆ -tag; kloniert über Schnittstellen NdeI und XhoI	diese Arbeit
pJB861-algE4	8815	<i>Kana^R</i> , pJB861 enthält <i>algE4</i> Gen; kloniert über AflIII und EcoRI	diese Arbeit
pEMG-us/ds(crtB)	5149	<i>Kana^R</i> , oriR6K, pEMG enthält je Region oberhalb und unterhalb von <i>crtB</i> Gen (je 1000 Bp); kloniert über EcoRI und XbaI	diese Arbeit
pEMG-us/ds(rmlAD)	5147	<i>Kana^R</i> , oriR6K, pEMG enthält Region oberhalb und unter- halb von <i>rmlACBD</i> Cluster (je 1000 Bp); kloniert über E- coRI und XbaI	diese Arbeit
pSWII-lacP	7989	<i>Gm^R</i> ; oriRK2, <i>xylS</i> ; Expressionsvektor unter der Kontrolle eines lac-Promotors; kloniert über AflIII und NdeI	diese Arbeit
pSWII-welB	8329	<i>Gm^R</i> ; oriRK2, <i>xylS</i> ; Expressionsvektor unter der Kontrolle eines welB-Promotors; kloniert über AgeI und NdeI	diese Arbeit
pEMG-us/ds(rmlAD) -loxP	5217	<i>Kana^R</i> , oriR6K, pEMG enthält Region oberhalb und unter- halb von <i>rmlACBD</i> Cluster (je 1000 Bp); besitzt zwei loxP Erkennungssequenzen; kloniert über EcoRI	diese Arbeit
pSRK-rmlACBD	5808	<i>Kana^R</i> ; <i>Chloramp^R</i> <i>broad-host-range</i> Expressionvektor pSRKKm enthält <i>rmlA</i> , <i>B</i> , <i>C</i> , <i>D</i>	diese Arbeit
pJET-16S	4492	<i>Amp^R</i> , <i>blunt</i> -Ligation mit 16S-Fragment aus <i>Sphingo- monas</i> sp. ATCC 31555	diese Arbeit
pJET-rmlAD	6518	<i>Amp^R</i> , <i>blunt</i> -Ligation mit Genbereich von <i>rmlACBD</i> und 172 Bp oberhalb <i>rmlA</i> aus <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555	diese Arbeit

Material

pAK405-HR1/2	5416	<i>Kana^R</i> ; oriV, oriT; pAK405 enthält Region oberhalb und unterhalb von <i>rmIACBD</i> Cluster Gen (je 740 Bp); kloniert über EcoRI und XbaI	diese Arbeit
pK19mobsacB-us/ds(rmlA)	7706	<i>Kana^R</i> ; pK19mobsacB enthält Region oberhalb und unterhalb von <i>rmlA</i> (je 1000 Bp); kloniert über HindIII und XbaI	diese Arbeit
pCM184-us/ds(welB)	8728	<i>Kana^R</i> ; <i>Tet^R</i> ; pCM184 enthält Region oberhalb und unterhalb von <i>welB</i> (je 1000 Bp); kloniert über EcoRI, NdeI, SacII und AgeI	diese Arbeit
pEMG-us/ds(welB)	5146	<i>Kana^R</i> , oriR6K, pEMG enthält Region oberhalb und unterhalb von <i>welB</i> Gen (je 1000 Bp); kloniert über EcoRI und XbaI	diese Arbeit
pEMG-us/ds(urf31)	5146	<i>Kana^R</i> , oriR6K, pEMG enthält Region oberhalb und unterhalb von <i>urf31</i> Gen (je 1000 Bp); kloniert über EcoRI und XbaI	diese Arbeit
pEMG-us/ds(urf34)	5147	<i>Kana^R</i> , oriR6K, pEMG enthält Region oberhalb und unterhalb von <i>urf34</i> Gen (je 1000 Bp); kloniert über EcoRI und XbaI	diese Arbeit
pEMG-us/ds(welQ)	5151	<i>Kana^R</i> , oriR6K, pEMG enthält Region oberhalb und unterhalb von <i>urf34</i> Gen (je 1002 Bp); kloniert über EcoRI und XbaI	diese Arbeit
pEMG-us/ds(ur)	4606	<i>Kana^R</i> , oriR6K, pEMG enthält Region oberhalb und unterhalb von <i>ur</i> (je 730 Bp); kloniert über EcoRI und XbaI	diese Arbeit
pJB861-L	7064	<i>Kana^R</i> , pJB861 mit veränderter <i>multiple cloning site</i> mit den Restriktionsstellen KpnI und SacI	diese Arbeit
pJB861-L-46M	7064	<i>Kana^R</i> , Punktmutation an Basenposition 138 von <i>trfA</i> (Adenin zu Thymin)	diese Arbeit
pJB861-L-251M	7064	<i>Kana^R</i> , Punktmutation an Basenposition 751 von <i>trfA</i> (Cytosin zu Thymin)	diese Arbeit
pJB861-L-271C	7064	<i>Kana^R</i> , Punktmutation an Basenposition 810 von <i>trfA</i> (Cytosin zu Thymin)	diese Arbeit
pJB861-L-251M-271C	7064	<i>Kana^R</i> , Punktmutation an Basenposition 751 und 810 (Cytosin zu Thymin) von <i>trfA</i>	diese Arbeit
pJB861-L46M-251M	7064	<i>Kana^R</i> , Punktmutation an Basenposition 138 (Adenin zu Thymin) und 751 (Cytosin zu Thymin) von <i>trfA</i>	diese Arbeit
pJB861-L46M-271C	7064	<i>Kana^R</i> , Punktmutation an Basenposition 138 (Adenin zu Thymin) und 810 (Cytosin zu Thymin) von <i>trfA</i>	diese Arbeit
pJB861-251M-271C	7064	<i>Kana^R</i> , Punktmutation an Basenposition 138 (Adenin zu Thymin) und 751 (Cytosin zu Thymin) von <i>trfA</i>	diese Arbeit
pJB861-L46M-251M-271C	7064	<i>Kana^R</i> , Punktmutation an Basenposition 138 (Adenin zu Thymin), 751 und 810 (Cytosin zu Thymin) von <i>trfA</i>	diese Arbeit
pJB861-L-eGFP	7736	<i>Kana^R</i> , pJB861-L enthält Gen <i>eGFP</i> ; kloniert über AflIII und EcoRI	diese Arbeit
pJB861-L-251M-eGFP	7736	<i>Kana^R</i> , pJB861-L-251M enthält Gen <i>eGFP</i> ; kloniert über AflIII und EcoRI	diese Arbeit
pJB861-L-271C-eGFP	7736	<i>Kana^R</i> , pJB861-L-271C enthält Gen <i>eGFP</i> ; kloniert über AflIII und EcoRI	diese Arbeit
pJB861-L-46M-eGFP	7736	<i>Kana^R</i> , pJB861-L-46M enthält Gen <i>eGFP</i> ; kloniert über AflIII und EcoRI	diese Arbeit
pJB861-L-46M-251M-eGFP	7736	<i>Kana^R</i> , pJB861-L-46M-251M enthält Gen <i>eGFP</i> ; kloniert über AflIII und EcoRI	diese Arbeit
pJB861-L-46M-271C-eGFP	7736	<i>Kana^R</i> , pJB861-L-46M-271C enthält Gen <i>eGFP</i> ; kloniert über AflIII und EcoRI	diese Arbeit
pJB861-L-251M-271C-eGFP	7736	<i>Kana^R</i> , pJB861-L-251M-271C enthält Gen <i>eGFP</i> ; kloniert über AflIII und EcoRI	diese Arbeit
pJB861-L-46M-251M-271C-eGFP	7736	<i>Kana^R</i> , pJB861-L-46M-251M-271C enthält Gen <i>eGFP</i> ; kloniert über AflIII und EcoRI	diese Arbeit
pSRK-crtB	6505	<i>Kana^R</i> , pSRKKm enthält Gen <i>crtB</i> ; kloniert über NdeI und KpnI	diese Arbeit
pEMG-eGFP-us/ds	6873	<i>Kana^R</i> , pEMG enthält Gen <i>eGFP</i> und us/ds-Region für Integration; Kloniert über NheI, AflIII und XbaI	diese Arbeit

2.9 Verwendete Oligodesoxyribonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonukleotide (Oligonukleotide), die für PCR und Sequenzierung verwendet wurden, sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Oligonukleotide wurden bei biomers.net GmbH synthetisiert. Die Basen, die unterstrichen sind, bilden jeweils eine Restriktionsschnittstelle und die Basen, die in fett hervorgehoben werden, stellen die neu eingeführte Mutation dar.

Tabelle 5: Zusammenfassung der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Länge [-mer]	Verwendungszweck	Sequenz in 5'-3'-Richtung
T7 Promotor	20	Vorwärts-Primer für Kolonie-PCR	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Terminator	19	Revers-Primer für Kolonie-PCR	CTAGTTATTGCTCAG CGGT
pJET1.2-fwd	23	Vorwärts-Primer für Kolonie-PCR	CGACTCACTATAGGGAGAGC GGC
pJET1.2-rev	24	Revers-Primer für Kolonie-PCR	AAGAACATCGATTTTCCATGG CAG
pJB861-fwd	19	Vorwärts-Primer für Kolonie-PCR	TGGCTATCTCTAGAAAGGCC
pJB861-rev	21	Revers-Primer für Kolonie-PCR	CGAAGTAATCGCAACATCCG C
pEMG-fwd	23	Vorwärts-Primer für Kolonie-PCR	CCATTCAGGCTGCGCAACTG TTG
pEMG-rev	22	Revers-Primer für Kolonie-PCR	CTTTACACTTTATGCTTCCGG C
pSRK-fwd	20	Vorwärts-Primer für Kolonie-PCR	TGCTTCCGGCTCGTATGTTG
pSRK-rev	20	Revers-Primer für Kolonie-PCR	TTAACGACCCTGCCCTGAAC
5'algE4+Ser_AflIII	40	Erstellung von <i>algE4</i> für pJB861- <i>algE4</i> ; Besitzt Erkennungssequenz für AflIII	GAAGCGACATGTCTGATTAC AACGTC AAGGATTTCCGGTGC
3'algE4_EcoRI	38	Erstellung von <i>algE4</i> für pJB861- <i>algE4</i> ; Besitzt Erkennungssequenz für EcoRI	GAGCGGGAATTCCTAGACGA TCGTCCC GGCTGCGTGCC
5'algE4_NdeI	34	Erstellung von <i>algE4</i> für pET22b(+)- <i>algE4</i> -His ₆ und pET22b(+)- <i>algE4</i> ; Besitzt Erkennungssequenz für NdeI	AGCGGACATATGGATTACAA CGTCAAGGATTTCCG
3'algE4_Stopp_XhoI	33	Erstellung von <i>algE4</i> für pET22b(+)- <i>algE4</i> ; Besitzt Erkennungssequenz für XhoI	GAGCGGCTCGAGCTAGACGA TCGTCCC GGCTG
3'algE4_XhoI	32	Erstellung von <i>algE4</i> für pET22b(+)- <i>algE4</i> -His ₆ ; Besitzt Erkennungssequenz für XhoI	CGGGACCTCGAGGACGATCG TCCC GGCTGCG
5'us_crtB_EcoRI	33	Erstellung von <i>us(crtB)</i> -Fragment für <i>us/ds(crtB)</i> ; Besitzt Erkennungssequenz für EcoRI	TATATAGAATTCGATCGAATC GTCACCAAGTTC
3'us_crtB	21	Erstellung von <i>us(crtB)</i> -Fragment für <i>us/ds(crtB)</i>	TACAGCTGGTCGCGCCGCAA C
3'ds_crtB_XbaI	32	Erstellung von <i>ds(crtB)</i> -Fragment für <i>us/ds(crtB)</i> ; Besitzt Erkennungssequenz für XbaI	TATATATCTAGACTGGCGGC GCAGTTTCCGGC
5'ds_crtB(OE)	42	Erstellung von <i>ds(crtB)</i> Fragment für <i>us/ds(crtB)</i> ; Besitzt komplementäre 20 Bp von <i>us(crtB)</i> für OE PCR	GTTGCGGCGCGACCAGCTGT ACTTTGGTTATTGGGCGTTCA G
5'1116Bp_us_crtB	20	Überprüfung von Genomintegration von pEMG- <i>us/ds(crtB)</i>	GCTCGCGCCGGTGCCGCATC
3'1123Bp_ds_crtB	20	Überprüfung von Genomintegration von pEMG- <i>us/ds(crtB)</i>	GATGCGGTGGTGGTATTGAC
5'us_rmlA_EcoRI	31	Erstellung von <i>us(rmlA)</i> -Fragment für <i>us/ds(rmlAD)</i> ; Besitzt Erkennungssequenz für EcoRI	GACGGCGAATTCCTGGACGT AACCGACGGTGC
3'us_rmlA(OE)	32	Erstellung von <i>us(rmlA)</i> -Fragment für <i>us/ds(rmlAD)</i> ; Besitzt komplementäre 25 Bp von <i>ds(rmlD)</i> für OE-PCR	GAGGCGCTTTGCTTGCTAC AAATCCCCCTTG
5'ds_rmlD(OE)	32	Erstellung von <i>ds(rmlD)</i> -Fragment für <i>us/ds(rmlAD)</i> ; Besitzt komplementäre 15 Bp von <i>us(rmlD)</i> für OE-PCR	CAAGGGGGATTTGTAGACAA GCAAAGCGCCTC

Material

3'ds-rmID_XbaI	33	Erstellung von <i>ds(crtB)</i> -Fragment für <i>us/ds(crtB)</i> ; Besitzt Erkennungssequenz für XbaI	CAGCGGTCTAGAGTCACGAC CTCCGACGAAGAG
5'1035Bp_us_rmlA	18	Überprüfung von Genomintegration von pEMG-us/ds(rmlAD)	GCTGGACGAGTTGGTAATTG
3'1067Bp_ds_rmlD	19	Überprüfung von Genomintegration von pEMG-us/ds(rmlAD)	CGATATCAACTGGCGACTGG
5'lac_AgeI (anneal)	63	<i>Oligoannealing</i> für Lactose-Promotor	CCGGTATTACGCCAAGCTTG CATGCCTGCAGGTCGACTCT AGACTGCAGGCTACCGATTG ACCA
3'lac_NdeI (anneal)	63	<i>Oligoannealing</i> für Lactose-Promotor	ATATGGTCAATCGGTAGCCT GCAGTCTAGAGTCGACCTGC AGGCATGCAAGCTTGGCGTA ATA
5'welBP_AgeI	32	Erstellung von <i>welBP</i> -Fragment für pSWII-welB; Besitzt Erkennungssequenz für AgeI	TATATAACCGGTAGAAAATGC TGCCTGCAGC
3'welBPr_NdeI	32	Erstellung von <i>welBP</i> -Fragment für pSWII-welB; Besitzt Erkennungssequenz für NdeI	TATATACATATGAGCCTCGCC GGGCTCCCTCAC
5'psWII(vorPro)_Seq	20	Überprüfung von Inserierung von lac-Promotor in pSWII	GTTTCTACACATATATTGCG
3'pSW(Anfang trfA)_seq	20	Überprüfung von Inserierung von neuen Promotor in pSWII	ATGAATCGGACGTTTGACCG
5'loxP_EcoRI (anneal)	38	<i>Oligoannealing</i> für loxP	AATTATAACTTCGTATAGCAT ACATTATACGAAGTTAT
3'loxP_EcoRI (anneal)	38	<i>Oligoannealing</i> für loxP	TTAAATAACTTCGTATAATGT ATGCTATACGAAGTTAT
5'rmlA_NdeI+pSRK	41	<i>Gibbson Assembly</i> für die Herstellung von pSRK-rmlAD	CAATTTACACAGGAAACAG CATATGATGAAGGGTATCATT CTTGC
3'rmID+5'CAT	45	<i>Gibbson Assembly</i> für die Herstellung von pSRK-rmlAD	CCTCTTACGTGCCGATCACT CGATCAGCGGGCGAGACGG TCCATCAC
5'CATChlor amp	21	<i>Gibbson Assembly</i> für die Herstellung von pSRK-rmlAD	TCGAGTGATCGGCACGTAAG
3'CATChlor amp_KpnI+pSRK	44	<i>Gibbson Assembly</i> für die Herstellung von pSRK-rmlAD	CGACTCACTATAGGGCGAAT TGGGTACCTTACGCCCGCC CTGCCAC
27_fn	20	Erstellung von 16S-Region Nach (Weisburg, Barns et al. 1991)	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1525r	17	Erstellung von 16S-Region Nach (Weisburg, Barns et al. 1991)	AAGGAGGTGWTCCARCC
16SqPCR_fw	26	Erstellung von Teilregion von 16S-Region aus <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555 für qPCR	CACCTCAGCGTCAATACCAG TCCAGTG
16SqPCR_rev	27	Erstellung von Teilregion von 16S-Region aus <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555 für qPCR	TCCAGAAGTGCCTTTGAGACT GCATCG
5'rmlA-qPCR	20	Erstellung von Teilregion von <i>rmlA</i> aus <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555 für qPCR	AAGGGTATCATTCTTGCGGG
3'rmlA-qPCR	19	Erstellung von Teilregion von <i>rmlA</i> aus <i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555 für qPCR	ATCAGGATGTCACGGATGC
5'welB(Ende)	22	Erstellung von <i>cluster rmlACBD</i> und 172 Bp oberhalb <i>rmlA</i> für pJET-rmlACBD	CGCGATATCACCATCCTGTTC
3'rmID(Ende)	22	Erstellung von <i>cluster rmlACBD</i> und 172 Bp oberhalb <i>rmlA</i> für pJET-rmlACBD	TCAGCGGGCGAGACGGTCCA TC
5'Anfang Kana	20	Inverse PCR	GCGTGCAATCCATCTTGTTT
3'Ende Kana	18	Inverse PCR	GCCTTCTTGACGAGTTCTTC
5'us-mIA_EcoRI	32	Erstellung von HR1/2-Fragment für pAK405-HR1/2; Besitzt Erkennungssequenz für EcoRI	GACGGCGAATTCCTGGACGT AACCGACGGTGC
3'us-rmlA(OE)	32	Erstellung von HR1-Fragment für HR1/2; Besitzt komplementäre 15 Bp von HR2 für OE-PCR	GAGGCGCTTTGCTTGTCTAC AAATCCCCCTTG
5'ds-rmID(OE)	32	Erstellung von HR2-Fragment für HR1/2; Besitzt komplementäre 15 Bp von HR1 für OE-PCR	CAAGGGGGATTGTAGACAA GCAAAGCGCCTC

Material

3'ds-rmlD_XbaI	33	Erstellung von HR1/2-Fragment für pAK405-HR1/2; Besitzt Erkennungssequenz für XbaI	CAGCGGTCTAGAGTCACGAC CTCCGACGAAGAG
5'rmlA	20	Erstellung von Genabschnitt von <i>rmlA</i> für CFGE	ATGAAGGGTATCATTCTTGC
3'rmlA-504Bp	21	Erstellung von Genabschnitt von <i>rmlA</i> für CFGE	CTTAGGCGTAGCCGGCTTTT C
5'Kana	23	Erstellung von Kanamycinkassette für CFGE	ATGAGCCATATTCAACGGGA AAC
3'Kana	22	Erstellung von Kanamycinkassette für CFGE	TTAGAAAACTCATCGAGCAT C
5'us-welB_EcoRI	32	Erstellung von <i>us</i> -Fragment für pCM184- <i>us</i> (<i>welB</i>); Besitzt Erkennungssequenz für EcoRI	TATATAGAATTCTTGGTTTC GCTGGTTCGGC
3'us-welB_NdeI	32	Erstellung von <i>us</i> -Fragment für pCM184- <i>us</i> (<i>welB</i>); Besitzt Erkennungssequenz für NdeI	TATATACATATGAGCCTCGCC GGGCTCCCTCA
5'ds-welB_SacII	32	Erstellung von <i>ds</i> -Fragment für pCM184- <i>us</i> (<i>welB</i>); Besitzt Erkennungssequenz für SacII	TATATACCGCGGTCGGCGGC GCCACCATTGTTG
3'ds-welB_AgeI	32	Erstellung von <i>ds</i> -Fragment für pCM184- <i>us</i> (<i>welB</i>); Besitzt Erkennungssequenz für AgeI	TATATAACCGGTATGGACTTG GGTCATGCTGC
5'us_welB_EcoRI	37	Erstellung von <i>us</i> (<i>welB</i>)-Fragment für <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>welB</i>); Besitzt Erkennungssequenz für EcoRI	TATATAGAATTCTTGGTTTC GCTGGTTCGGCGAAC
3'us_welB	21	Erstellung von <i>us</i> (<i>welB</i>)-Fragment für <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>welB</i>)	AGCCTCGCCGGCTCCCTCA C
5'ds_welB(OE)	42	Erstellung von <i>ds</i> (<i>welB</i>)-Fragment für <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>welB</i>); Besitzt komplementäre 22 Bp von <i>us</i> (<i>welB</i>) für OE-PCR	GTGAGGGAGCCCGGCGAGG CTTCGGCGGCGCCACCATTG TTG
3'ds_welB_XbaI	32	Erstellung von <i>ds</i> (<i>welB</i>)-Fragment für <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>welB</i>); Besitzt Erkennungssequenz für XbaI	TATATATCTAGAGATGGACTT GGGTCATGCTG
5'1082Bp_us_welB	20	Überprüfung von Genomintegration von pEMG- <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>welB</i>)	CTGCACTTTTCCATTTTCGG
3'1060Bp_ds_welB	20	Überprüfung von Genomintegration von pEMG- <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>welB</i>)	CACGATGGTCGCCGTGCTTG
5'us_urf31-EcoRI	32	Erstellung von <i>us</i> (<i>urf31</i>)-Fragment für <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>urf31</i>); Besitzt Erkennungssequenz für EcoRI	GTATAGGGATAACAGGGTAA TCTGAATTCCGG
3'us_urf31	19	Erstellung von <i>us</i> (<i>urf31</i>)-Fragment für <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>urf31</i>)	CGGATCATCAGCCCTTGTC
5'ds_urf31(OE)	45	Erstellung von <i>ds</i> (<i>urf31</i>)-Fragment für <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>urf31</i>); Besitzt komplementäre 25 Bp von <i>us</i> (<i>urf31</i>) für OE-PCR	CTCCGCTGACAAGGGCTGAT GATCCGAAATGGGACATCAC AATCG
3'ds_urf31_XbaI	33	Erstellung von <i>ds</i> (<i>urf31</i>)-Fragment für <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>urf31</i>); Besitzt Erkennungssequenz für XbaI	GTCGACTCTAGACTCCGGCG GAGCGGCAAAGAG
5'1100Bp_us_urf31	20	Überprüfung von Genomintegration von pEMG- <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>urf31</i>)	CTGGCGATGATCACCGGTGC
3'1050Bp_ds_urf31	20	Überprüfung von Genomintegration von pEMG- <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>urf31</i>)	CATAACCGGATCTCCATGTC
5'us_urf34_EcoRI	25	Erstellung von <i>us</i> (<i>urf34</i>)-Fragment für <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>urf34</i>); Besitzt Erkennungssequenz für EcoRI	TATATAGAATTCCAAAAAACG CCGGCGGGACTTAC
3'us_urf34(OE)	46	Erstellung von <i>us</i> (<i>urf34</i>)-Fragment für <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>urf34</i>); Besitzt komplementäre 26 Bp von <i>ds</i> (<i>urf34</i>) für OE-PCR	CGGGTGGAGATGCCCCGCAA CAATCGCCGGCTGGTTAGGG CGCAG
5'ds_urf34	20	Erstellung von <i>ds</i> (<i>urf34</i>)-Fragment für <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>urf34</i>);	GATTGTTGGCGGGCATCTCC
3'ds_urf34_XbaI	35	Erstellung von <i>ds</i> (<i>urf34</i>)-Fragment für <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>urf34</i>); Besitzt Erkennungssequenz für XbaI	TATATATCTAGATCGCGCATG CCGCGGGCAGATC
5'1100Bp_us_urf34	21	Überprüfung von Genomintegration von pEMG- <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>urf34</i>)	GATGTCCATTTTCACCGGTC
3'1100Bp_ds_urf34	20	Überprüfung von Genomintegration von pEMG- <i>us</i> / <i>ds</i> (<i>urf34</i>)	GGTCGACCGAAGTGTCGGCG

Material

5'us_welQ_ EcoRI	34	Erstellung von <i>us(welQ)</i> -Fragment für <i>us/ds(welQ)</i> ; Besitzt Erkennungssequenz für EcoRI	TATATAGAATTTCGTTACGGCC GTTACGACATTG
3'us_welQ(OE)	46	Erstellung von <i>us(welQ)</i> -Fragment für <i>us/ds(welQ)</i> ; Besitzt komplementäre 26 Bp von <i>ds(welQ)</i> für OE-PCR	GCGCAGACCCGCGGGTCTG CGGCCAACGATGGTCATAG CTTTGCC
5'ds_welB	20	Erstellung von <i>ds(welQ)</i> -Fragment für <i>us/ds(welQ)</i> ;	GGGCCGACACCCGCGGGT C
3'ds_welB_XbaI	36	Erstellung von <i>ds(welQ)</i> -Fragment für <i>us/ds(welQ)</i> ; Besitzt Erkennungssequenz für XbaI	TATATATCTAGAGAATAGGTT CAAGTAGAAGTTTG
5'1100Bp_us_welQ	20	Überprüfung von Genomintegration von pEMG- <i>us/ds(welQ)</i>	GTGAGGATGATTGCGTCTG
5'1100Bp_us_welQ	20	Überprüfung von Genomintegration von pEMG- <i>us/ds(welQ)</i>	CATCTTCAGCCGCTGCCGC
5'us_ur_ EcoRI	32	Erstellung von <i>us(ur)</i> -Fragment für <i>us/ds(ur)</i> ; Besitzt Erkennungssequenz für EcoRI	TATATAGAATTTCGAACGCCTG GCGGTGCTGTC
3'us_ur	41	Erstellung von <i>us(ur)</i> -Fragment für <i>us/ds(ur)</i> ; Besitzt komplementäre 21 Bp von <i>ds(ur)</i> für OE-PCR	GCCTGTCTCCCTGCGCGAC GCGATCGGCGACAAGATCAA G
5'ds_ur(OE)	21	Erstellung von <i>ds(ur)</i> -Fragment für <i>us/ds(ur)</i> ;	GCGATCGGCGACAAGATCAA G
3'ds_ur_XbaI	34	Erstellung von <i>ds(ur)</i> -Fragment für <i>us/ds(ur)</i> ; Besitzt Erkennungssequenz für XbaI	TATATATCTAGAGATGCCGGC GCGCAACAGCTTC
5'1193Bp_us_ur	20	Überprüfung von Genomintegration von pEMG- <i>us/ds(ur)</i>	CCTCAGCGACATCCATGCC
3'2482Bp_ds_ur	20	Überprüfung von Genomintegration von pEMG- <i>us/ds(ur)</i>	CGCCGTGCTGGAGCGGCG C
5'trfA46M	31	Einführung der Punktmutation an Basenposition 138 von <i>trfA</i>	CGTAGCTTGCTGGACCATCG AGCCGACGGAC
3'trfA46M	31	Einführung der Punktmutation an Basenposition 138 von <i>trfA</i>	GTCCGTGGCTCGATGGTCC AGCAAGCTACG
5'trfA251M	31	Einführung der Punktmutation an Basenposition 751 von <i>trfA</i>	CGCGCTACAGGCGATGGC GATGGGCTTCAC
3'trfA251M	31	Einführung der Punktmutation an Basenposition 751 von <i>trfA</i>	GTGAAGCCCATCGCCATCGC CTGTAGGCGCG
5'trfA271C	31	Einführung der Punktmutation an Basenposition 810 von <i>trfA</i>	GTGTGCTGCTGCACTGCTT CCGCGTCTGG
3'trfA271C	31	Einführung der Punktmutation an Basenposition 810 von <i>trfA</i>	CCAGGACGCGGAAGCAGTG CAGCAGCGACAC
5'trfA_seq	20	Überprüfung von Mutation an Basenposition 138, 751 und 810 von <i>trfA</i>	ATGAATCGGACGTTTGACCG
3'trfA_seq	19	Überprüfung von Mutation an Basenposition 138, 751 und 810 von <i>trfA</i>	CTAGCGTTTGCAATGCACC
5'eGFP_AflIII	35	Erstellung von <i>eGFP</i> für Insertion in pJB861-L Varianten; Besitzt Erkennungssequenz für AflIII	TCATGAACATGCTGTGAGCA AGGGCGAGGAGCTG
3'eGFP_ EcoRI	34	Erstellung von <i>eGFP</i> für Insertion in pJB861-L Varianten; Besitzt Erkennungssequenz für EcoRI	TATATAGAATTTCCTCACTTGTA CAGCTCGTCCATG
5'crtB_ NdeI	32	Erstellung von <i>crtB</i> für Insertion in pSRKKM Varianten; Besitzt Erkennungssequenz für NdeI	TATATACATATGCGCTTTCCC GGCCGCGATG
3'crtB_ KpnI	33	Erstellung von <i>crtB</i> für Insertion in pSRKKM Varianten; Besitzt Erkennungssequenz für KpnI	TATATAGGTACCTTATCGCGG CCGCGTCCACAG
5'us_Int_AflIII	32	Erstellung von <i>us</i> -Fragment für <i>us/ds</i> für Integration; Besitzt Erkennungssequenz für AflIII	TATATACTTAAGCTGGGACGT CGCCTCCGCTG
3'ds_Int	18	Erstellung von <i>us</i> -Fragment für <i>us/ds</i> für Integration	ACCCGTTGGGATCAGGC
5'ds_Int(OE)	42	Erstellung von <i>ds</i> -Fragment für <i>us/ds</i> für Integration; Besitzt komplementäre 22 Bp von <i>us</i> für OE-PCR	GCCACTGCCTGATCCCAACC GGGTAGAAAATGCTGCACTG CAGC
3'ds_Int_ NheI	29	Erstellung von <i>ds</i> -Fragment für <i>us/ds</i> für Integration; Besitzt Erkennungssequenz für NheI	TGCGCGGCTAGCGGCCAC CGCACCGTCCG

2.10 DNA- und Protein-Längenstandards

DNA-Längenstandard

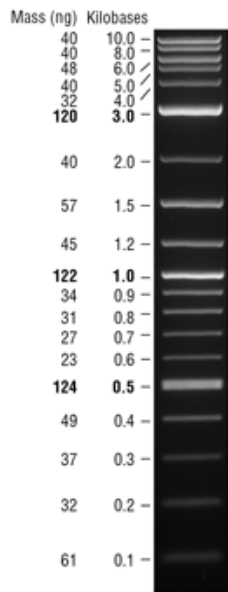


Abbildung 8: 2-Log Ladder dargestellt auf 1 % Agarosegel.

Für jede Bande ist die Masse in ng/Bande bei 5 µg Auftrag und die Polynukleotidgröße in kBp dargestellt.

Protein-Längenstandard

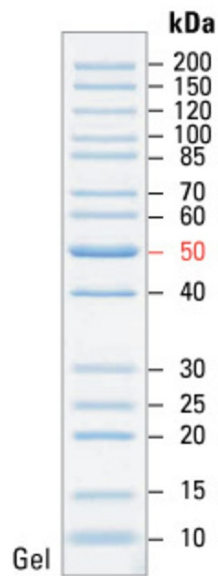


Abbildung 9: PageRuler™ Unstained Protein Ladder dargestellt auf SDS-Gel (12,5 %).

Für jede Bande ist die Größe in kDa angegeben.

3 Methoden

Die hier aufgeführten Methoden wurden teilweise aus der Standardmethodensammlung des Lehrstuhls für Chemie Biogener Rohstoffe übernommen.

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Glaswaren wurden zur Sterilisation vier Stunden bei 200 °C ausgebacken. Medien und hitzestabile Lösungen wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert, während hitzelabile Lösungen mit Hilfe eines Spritzenfilters (0,22 µm Porengröße) steril filtriert wurden.

3.1.2 Bestimmung der optischen Dichte von *E. coli* Zellsuspensionen

Die optische Dichte (OD_{600}) von *E. coli* Kulturen wurde bei 600 nm in Küvetten (VWR cuvettes PS semi-micro) bestimmt (Handphotometer Ultrospec 10; Amersham Biosciences). Vermessen wurden jeweils 1000 µL Zellsuspension. Einer OD_{600} von 1,0 entsprechen etwa $3,2 \times 10^8$ Zellen/mL.

3.1.3 Anzucht und Lagerung von *E. coli*, *A. vinelandii* und *Sphingomonas* Stämmen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle verwendeten *E. coli* Stämme bei 37 °C und *A. vinelandii* und *Sphingomonas* Stämme bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler (170 rpm; Thermo Fischer Scientific, MaxQ 2000) angezogen. Die Anzucht erfolgte in den unter 2.6.1 angegebenen Medien, wobei zu plasmidtragenden oder plasmidintegrierten Stämmen das entsprechende Antibiotikum aus einer tausendfach konzentrierten Lösung zugegeben wurde.

Die Herstellung von kompetenten Zellen zur Plasmidvervielfältigung und Genexpressionen basieren auf der Inokulation der jeweiligen Vorkultur mit Einzelkolonien. Um diese Kolonien zu erhalten wurde die entsprechende Zellsuspension auf LB-Agarplatten (*E. coli* und *Sphingomonas*) bzw. AG-Agarplatten (*A. vinelandii*) mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und üN bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 2 Tage bei 30 °C (*A. vinelandii* und *Sphingomonas*) inkubiert. Zur kurzzeitigen Lagerung der verschiedenen Stämme wurden die Platten oder Suspensionen mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Für die Herstellung der Glycerinkulturen wurden 500 µL steriles 86 % (w/v) p.a. Glycerin mit 500 µL Bakterienkultur vermischt und anschließend bei -80 °C tiefgefroren.

3.1.4 Anzucht von *A. vinelandii* und *Sphingomonas* sp. Stämmen im Schüttelkolben für EPS-Produktion

Zur Anreicherung von Exopolysacchariden im Medium wurde die Kultivierung in Volumina von 200-1000 mL Selektivmedium in 2000-5000 mL Schüttelkolben durchgeführt.

Als Vorkultur wurde stets eine Bakterienkultur, die 24 h in RA1 (*Azotobacter vinelandii*)- bzw. EPS-Medium (*Sphingomonas* sp.) (versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum) gewachsen war, verwendet.

Die Hauptkultur wurde entweder auf eine OD_{600} von 0,1 oder im Verhältnis 1:100 mit der Vorkultur angeimpft und bei 30 °C und 100-140 rpm auf dem Rotationsschüttler (Thermo Fischer Scientific, MaxQ 2000) inkubiert. Nach 12 h wurde die Hauptkultur mit m-Toluat in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und anschließend weitere 2 bis 3 Tage inkubiert und die Zellen anschließend abzentrifugiert (RC 6+ Centrifuge mit Rotor F10-6x500y oder F9-4x1000y Rotor, 4.000 g, 20 min, 20 °C).

Das Medium wurde sofort weiterverarbeitet (s. 3.4.1).

3.1.5 Anzucht von *A. vinelandii* und *Sphingomonas* sp. Stämmen durch Fermentationen für EPS-Produktion

3.1.5.1 Fermentation im DASGIP-System

Das DASGIP-Bioreaktorsystem bestand aus acht parallel verwendbaren Reaktoren mit einem Maximalvolumen von jeweils einem Liter. Die Reaktoren besaßen jeweils Sonden für die Bestimmung des pH-Wertes, des Sauerstoffgehaltes (DO(*dissolved oxygen*)-Wert) und der Temperatur. Außerdem verfügten sie über je drei Zugabeventile, die für die Zugabe von Säure, Base (Regelung des pH-Wertes) und Antischaum (10 % (v/v) Antischaum B silikonbasiert; Verhinderung von übermäßiger Schaumbildung) verwendet wurden. Zudem waren die Reaktoren mit einem Überkopfantrieb für den Rührer, einem Begasungsrohr, einem Abluftkühler mit angeschlossener Abgasanalytik, sowie mit einem Probenentnahmeventil ausgestattet. Um eine Schaumbildung bereits ohne das Antischaummittel eindämmen zu können, wurden kurze Kabelbinderstücke zusätzlich an die Rührerwelle angebracht. Die Regulation und Dokumentation der Fermentation erfolgte über die DASware-Steuerungssoftware und die Regelung des DO-Wertes wurde über eine Kaskade gesteuert, d.h. zunächst wurde die Drehzahl des Rührers und erst bei Bedarf die Begasungsrate erhöht. Der Bereich für die Rührerdrehzahl lag bei 300-800 Umdrehungen/Minute und der Begasungsbereich bei 6-10 sL/h. Der pH-Wert wurde mittels Zugabe von 7 % Phosphorsäure oder 2 M Natronlauge auf einen Wert von 7,2 (*A. vinelandii*) geregelt. Für jede Fermentation betrug die Temperatur 30 °C und das Mediumvolumen 450 mL.

Das Animpfen erfolgte mit 45 mL einer Vorkultur, die 2 Tage bei 30 °C unter Schütteln angezogen wurde. Die Fermentationsdauer betrug 48 bzw. 72 Stunden. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen, die für *online*-Analysen, wie Bestimmungen von OD₆₀₀-Werten, von Glucosekonzentrationen oder Viskositäten, notwendig waren.

3.1.5.2 Fermentation im Satorius-2L-System

Um ausreichend EPS-Masse zu erhalten, wurde die Kultivierung der *A. vinelandii* und *Sphingomonas* sp. Stämme in einem SatoriusBplus-2 L-Fermenter (Sartorius, Göttingen) durchgeführt. Der Reaktor besaß jeweils Sonden für die Bestimmung des pH-Wertes, des Sauerstoffgehaltes (DO(*dissolved oxygen*)-Wert) und der Temperatur. Außerdem verfügte er über ein Zugabeventil für Säuren, Basen (Regelung des pH-Wertes) und Antischaum (10 % (v/v) Antischaum B silikonbasiert; Verhinderung von übermäßiger Schaumbildung), ein Begasungsrohr, einen Abluftkühler, ein Probenentnahmerohr, sowie einen Scheibenblattrührer. Um eine Schaumbildung bereits ohne das Antischaummittel eindämmen zu können, wurden kurze Kabelbinderstücke zusätzlich an die Rührerwelle angebracht. Das Arbeitsvolumen lag bei 1,2 L RA1-bzw. Bruck's Medium (*A. vinelandii*), sowie EPS-Medium (*Sphingomonas* sp.) und die Temperatur bei 30 °C. Der DO-Wert wurde durch eine Kaskadenregelung bei einem konstanten Wert (5-30 %) gehalten. Hierbei wurde die Drehzahl des Rührers (300-600 rpm) und erst bei Bedarf die Begasungsrate (0,3-1,5 L/min) erhöht. Die Regelung des pH-Wertes auf 6,8 (*Sphingomonas* sp.) bzw. 7,2 (*A. vinelandii*) erfolgte mittels Zugabe von 7 % Phosphorsäure oder 2 M Natronlauge.

Die Inokulation des Reaktors erfolgte mit 100 mL einer Vorkultur, die 2 Tage bei 30 °C unter Schütteln angezogen wurde. Um das Zellwachstum mittels OD₆₀₀, den Glucoseverbrauch und die EPS-Produktion im kleinen Maßstab durch die Fällung mit Isopropanol überprüfen zu können, wurden in regelmäßigen Abständen Proben der Fermentationsbrühe gezogen. Die Fermentationsdauer betrug abhängig vom Bakterienstamm 2 bis 6 Tage.

3.1.6 Herstellung kompetenter Zellen, Transformation und Konjugation

3.1.6.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen und chemische Transformation

Ausgehend von einer Glycerinkultur wurde eine Einzelkolonie des gewünschten Zellstamms verwendet, um eine 5 mL Vorkultur zu beimpfen. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. 4 mL von dieser Vorkultur wurden anschließend in 200 mL LB Medium transferiert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C und 180 rpm

geschüttelt. Die Kultur wurde dann für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 3500 g, 4 °C; Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor). Das Pellet wurde in 10 mL eiskalter 100 mM MgCl₂-Lösung (steril) resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor). Das erhaltene Pellet wurde in 10 mL eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung (steril) resuspendiert und dann für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der abschließenden Zentrifugation (10 min, 3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor) wurde das Pellet in 2 mL eiskalter 10 % (v/v) Glycerin-Lösung resuspendiert, in 100 µL aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

Für die chemische Transformation wurden zunächst die bei -80°C gelagerten kompetenten *E. coli*-Zellen 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend mit 50-200 ng DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis, in der die DNA an die Zellen adsorbiert, wurden die Ansätze für 45 sec auf 42°C erhitzt (Hitzeschock) und anschließend 2 min auf Eis gestellt. Der Reaktionsansatz konnte dann wahlweise sofort auf geeignete Selektionsplatten ausgestrichen oder vorher mit LB-Medium eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert werden, um eine Expression des Antibiotika-Resistenzgens, das sich auf dem eingebrachten Plasmid befindet, zu ermöglichen. Anschließend wurden die Selektionsplatten ü. N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz (T_E) wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen wie soeben beschrieben mit 1 ng Plasmid-DNA transformiert. Nach der Regenerationsphase von 60 min bei 37 °C wurden je 100 µL einer Verdünnungsreihe auf Selektivagar ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert. Die Transformationseffizienz wurde folgendermaßen berechnet:

$$T_E = \frac{n_{\text{Kolonien}} \times f}{m_{\text{DNA}}}$$

Formel 1: Berechnung der Transformationseffizienz.

T_E : Transformationseffizient (Kolonien pro µg DNA)
 n_{Kolonien} : Anzahl der Kolonien auf eine Platte
 f : Verdünnungsfaktor auf 1 mL
 m_{DNA} : eingesetzte DNA-Menge in µg

3.1.6.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation

Zur Präparation von elektrokompetenten *E.coli*-Zellen nach Dower, Miller et al. 1988) wurden 50 mL LB-Medium aus einer üN Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde 30 min auf Eis abgekühlt und die Zellen abzentrifugiert (10 min, 3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 50 mL eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifu-

gation (10 min, 3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor) wurde das Zellpellet in 20 mL eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Nach einem weiteren Inkubations- (10 min) und Zentrifugationsschritt (10 min, 3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor) wurden die Zellen in 10 mL eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Es wurde ein letztes Mal auf Eis inkubiert (10 min) und zentrifugiert (10 min, 3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor) und das Pellet dann in mindestens 1 mL 10 % (w/v) Glycerin aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 100 µL aliquotiert und anschließend transformiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

Zur Transformation wurden Aliquots zu je 100 µL entnommen und mit maximal 20 µL salzfreier DNA-Lösung versetzt. Dazu wurde die DNA mindestens 60 min gegen Wasser dialysiert indem 10-20 µL DNA-Lösung auf die glänzende Seite eines Nitrocellulosefilters (MILLIPORE) aufgebracht wurden, welcher in einer Petrischale auf ddH₂O aufgelegt worden war. Nach Zugabe der DNA zu den Zellen wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 1 mm) überführt. Nach dem elektrischen Puls (1800 V, 25 µF, 200 Ohm) im Elektroporator wurden die Zellen sofort in 0,9 mL LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Danach wurden Aliquots auf Selektivagar ausplattiert und üN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.1.6.3 Herstellung elektrokompetenter *A. vinelandii*-Zellen und Transformation

Zur Herstellung elektrokompetenter *A. vinelandii*-Zellen wurde die Methode nach (Koranyi, Burg et al. 1998) mit Modifizierungen durchgeführt. Hierzu wurden 80 mL AG-Medium aus einer üN Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 angezogen. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (10 min, 3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor) geerntet und das Zellpellet in 80 mL eiskaltem 10 % (w/v) Glycerin gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in 40 mL eiskaltem 10 % (w/v) Glycerin resuspendiert und zentrifugiert (10 min, 3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor). Anschließend folgte der letzte Waschschrift mit 30 mL eiskaltem 10 % (w/v) Glycerin, wobei das Zellpellet nach abschließender Zentrifugation (10 min, 3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor) in 2 mL 10 % (w/v) Glycerin aufgenommen, in 100 µL aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

Zur Transformation wurden Aliquots zu je 100 µL entnommen und mit maximal 0,3–1 µg salzfreier DNA-Lösung versetzt. Dazu wurde die DNA mindestens 60 min gegen Wasser dialysiert indem 10-20 µL DNA-Lösung auf die glänzende Seite eines Nitrocellulosefilters

(MILLIPORE) aufgebracht wurden, welcher in einer Petrischale auf ddH₂O aufgelegt worden war. Nach Zugabe der DNA zu den Zellen wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm) überführt. Nach dem elektrischen Puls (2500 V, 25 µF, 200 Ohm) im Elektroporator wurden die Zellen sofort in 0,9 mL AG-Medium aufgenommen und für 2 h bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Danach wurden Aliquots auf AG-Selektivagar ausplattiert und 2 bis 3 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

3.1.6.4 Transformation von *A. vinelandii* mittels biparentaler Konjugation

Die Konjugation von *A. vinelandii* wurde nach Goodwin *et al.* durchgeführt (Goodwin 1999). Hierzu wurde zunächst der Donorstamm *E. coli* S17-1 mit dem zu übertragenden Plasmid chemisch transformiert und üN bei 37 °C inkubiert (s. 3.1.3). Am darauffolgenden Tag wurden mit Hilfe einer Impföse ca. 4 µL *E. coli* S17-1-Zellen von der Agarplatte abgeschabt und in sterilem 200 µL 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit jeweils 200 µL sterilem Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und abschließend in 100 µL sterilem Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen. 5 µL dieser Zellsuspension wurden in die Mitte einer FM-Agarplatte (Burk's Medium und LB Medium im Verhältnis 1:1) pipettiert und sofort ca. 4 µL an *A. vinelandii* Zellen (Wachstum der Zellen zuvor zwei Tage bei 30 °C auf AG-Agarplatte) in die Zellsuspension gemischt. Diese FM-Agarplatte wurde üN bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen von der Agarplatte mittels einer Impföse abgeschabt, auf AG-Selektivagar ausgestrichen und 2 bis 3 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

3.1.6.5 Herstellung elektrokompetenter *Sphingomonas* sp. ATCC 31555-Zellen und Transformation

Zur Präparation von elektrokompetenten *Sphingomonas* sp.-Zellen wurden 20 mL YEME-Medium aus einer üN Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und 12 Stunden bei 30 °C angezogen. Die Kultur wurde 30 min auf Eis abgekühlt und die Zellen abzentrifugiert (10 min, 3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 25 mL eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (5 min, 3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor) und in 20 mL eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Nach einem weiteren Inkubations- (15 min, Eis) und Zentrifugationsschritt (5 min, 3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor) wurden die Zellen in 15 mL eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Es wurde ein letztes Mal auf Eis inkubiert (10 min) und zentrifugiert (5 min, 3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit

SH-3000 Rotor) und das Pellet dann in mindestens 1 mL sterilem 10 % (w/v) Glycerin aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 100 µL aliquotiert und sofort transformiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

Zur Transformation wurden Aliquots zu je 100 µL entnommen und mit maximal 800 ng salzfreier DNA-Lösung versetzt. Dazu wurde die DNA vor der Transformation mindestens 60 min gegen Wasser dialysiert indem 5-15 µL DNA-Lösung auf die glänzende Seite eines Nitrocellulosefilters (MILLIPORE) aufgebracht wurden, welcher in einer Petrischale auf ddH₂O aufgelegt worden war. Nach Zugabe der DNA zu den Zellen wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm) überführt. Nach dem elektrischen Puls (2500 V, 25 µF, 200 Ohm) im Elektroporator wurden die Zellen sofort in 0,9 mL LB-Medium aufgenommen und für 2 h bei 30 °C ruhend inkubiert. Danach wurden Aliquots auf LB-Selektivagar ausplattiert und 2 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

3.1.6.6 Transformation von *Sphingomonas* sp. mittels triparentaler Konjugation

Plasmid-DNA wurde von *E. coli* DH5αpir mittels eines triparentalen Konjugationssystems auf *Sphingomonas* sp. übertragen. Das Protokoll wurde mit Modifikationen von Pollock *et al.* und Martinez-Gracia *et al.* übernommen (Pollock, Yamazaki *et al.* 2001; Martinez-Garcia und de Lorenzo 2011). Zur Konjugation wurden die Donorzellen *E. coli* DH5αpir (enthalten Plasmid mit Mob+Tr-), sowie die Helferzellen DH5α (enthalten Mob+Tra+Plasmid pRK2013) auf LB-Selektionsplatten üN bei 37 °C und der Wildtyp *Sphingomonas* sp. für 24 h auf YM-Platten ohne Glucose bei 30 °C kultiviert. Ein Gemisch dieser Stämme wurde mit Hilfe einer Impföse in der Reihenfolge *E. coli* DH5αpir, DH5α-pRK2013 und *Sphingomonas* sp. im optischen Zellmengenverhältnis von 5:2:10 in die Mitte einer nichtselektiven YM-Platte ohne Glucose aufgebracht und für 12 h bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde durch einen Ausstrich der Zellen auf LB-Selektivplatten (Antibiotikum immer in Kombination mit Streptomycin) auf *Sphingomonas*-Zellen mit dem transferierten Plasmid selektiert. Die Selektionsplatten wurden für drei Tage bei 30 °C inkubiert.

3.1.7 Expression von rekombinanten Gensequenzen

Für die heterologe Expression wurden *E. coli* BL21(DE3) bzw. *A. vinelandii*- und *Sphingomonas* sp. Stämme mit den in Tabelle 4 aufgeführten Vektoren chemisch transformiert. Die Herstellung der verwendeten Medien und Agarplatten ist in 2.6.1 zusammengefasst.

3.1.7.1 Genexpression im analytischen Maßstab in *E. coli*-Zellen

Um die Expression der klonierten Gene zu überprüfen, wurden Expressionstests im 20 mL Maßstab im 100 mL Schüttelkolben (Probeexpression) durchgeführt. Hierfür wurde ein Schüttelkolben mit dem entsprechenden Selektivmedium mit einer frischen Vorkultur einer Einzelkolonie für 3 h bei 37 °C und 150 rpm auf dem Rotationsschüttler (Thermo Fischer Scientific, MaxQ 2000) inkubiert. Danach wurde die Kultur mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und bei 37 °C für 4 h weiter geschüttelt. Anschließend wurden 2-4 mL der Zellsuspension zentrifugiert (14.000 g, 5 min, 4 °C, Fresco 21 Centrifuge), das Zellpellet in 1 mL des gewünschten Puffers aufgenommen und über Ultraschall (Sonotrode VialTweeter, 100 % Amplitude, 0,6 msec, 3x 45 sec Puls/45 sec auf Eis) aufgeschlossen. Zellreste wurden vom löslichen Anteil über Zentrifugation (14.000 g, 30 min, 4 °C, Fresco 21 Centrifuge) getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet wieder in 1 mL Puffer resuspendiert. Von beiden Proben wurden 16 µL mit 4 µL 5x SDS-Probenpuffer versehen, bei 95 °C für 5 Minuten aufgekocht und 10 µL davon mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert (s. 3.3.1).

3.1.7.2 Genexpression im analytischen Maßstab in *A. vinelandii*-Zellen

Um zu prüfen, ob *algE4* in *A. vinelandii*-Zellen exprimiert und zusätzlich ins Medium sekretiert wird, wurden Expressionstests im 20 mL Maßstab im 100 mL Schüttelkolben mit Schikanen (Probeexpression) durchgeführt. Hierfür wurden ein Schüttelkolben mit Burk's-Medium und entsprechendem Antibiotikum mit einer frischen Vorkultur einer Einzelkolonie für 10 h bei 30 °C und 150 rpm auf dem Rotationsschüttler (Thermo Fischer Scientific, MaxQ 2000) inkubiert. Danach wurde die Kultur mit 1 mM m-Toluat Endkonzentration induziert und bei 30 °C für 24 h weiter geschüttelt. Anschließend wurden 4 mL der Zellsuspension zentrifugiert (14.000 g, 5 min, 4 °C, Fresco 21 Centrifuge), das Zellpellet in 1 mL Burk's-Medium resuspendiert und der Überstand um das 35fache einkonzentriert (Zentrifugaleinheiten mit Nylonmembran (0,2 µm Porengröße), VWR). Von beiden Proben wurden 16 µL mit 4 µL 5x SDS-Probenpuffer versehen, bei 95 °C für 5 Minuten aufgekocht und 10 µL davon mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert (s. 3.3.1).

3.1.7.3 Genexpression im präparativen Maßstab

Zur Anreicherung von Proteinen wurde die Genexpression in Volumina von 200-1000 mL Selektivmedium in 1000-5000 mL Schüttelkolben durchgeführt.

Als Vorkultur wurde stets eine Bakterienkultur, die ün in LB-Medium (versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum) gewachsen war, verwendet.

Die Hauptkultur wurde entweder auf eine OD von 0,1 oder im Verhältnis 1:100 mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 100-120 rpm auf dem Rotationsschüttler (Thermo Fischer Scientific, MaxQ 2000) inkubiert. Bei einer OD_{600} nm von 0,5-0,6, wurde die Hauptkultur mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und anschließend 4 h weiter inkubiert und die Zellen anschließend abzentrifugiert (Sorvall, RC 6+ Centrifuge mit Rotor F10-6x500y oder F9-4x1000y, 4.000 g, 15 min, 20 °C). Die Zellen wurden sofort weiterverarbeitet (s. 3.3.3) oder bei -20 °C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Klonierungsstämmen (s. Tabelle 2) wurde das *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fischer Scientific, Fermentas) verwendet. Die Isolierung erfolgte jeweils nach Herstellerangaben, wobei 5-8 mL einer frischen üN Kultur verwendet wurden. Die DNA wurde mit 40-50 µL ddH₂O oder Elutionspuffer eluiert. Anschließend wurde die Plasmidpräparation bei -20 °C gelagert.

Für den Vergleich der Plasmidkopienanzahl wurden Übernachtskulturen in 6 mL LB_{Kana}-Flüssigmedium angezogen. Vor der Abtrennung des Zellpellets mittels Zentrifugation wurden die Zellmengen auf $OD_{600}=1,7$ in 5 mL festgelegt. Die Plasmidisolierung wurde mit dem *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt und die DNA mit 45 µL ddH₂O eluiert. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

3.2.2 Isolierung und Reinigung von genomischer DNA aus *A. vinelandii* und *Sphingomonas* sp.

Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte entweder mit dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben oder anhand eines modifizierten Protokolls nach Chen und Kuo (Chen und Kuo 1993). Hierzu wurden 2 mL Zellsuspension aus einer üN-Kultur abzentrifugiert (10000 g, 5 min, RT, Fresco 21 Centrifuge) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in 200 µL sterilen Lysepuffer (40 mM Tris-Acetat pH 7,8, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS) resuspendiert und 66 µl sterile 5 M NaCl-Lösung zugegeben, um Proteine und Zellrückstände zu entfernen. Nach einer weiteren Zentrifugation (10000 g, 10 min, 4 °C, Fresco 21 Centrifuge) wurde der Überstand mit 1 Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und mehrmals bis zur Bildung einer milchigen Lösung sanft invertiert. Nach erneuter Zentrifugation (10000 g, 3 min, 4 °C, Fresco 21 Centrifuge) wurde der Überstand zum Fällern der DNA mit 300 µL eiskaltem Ethanol versetzt und für 30 min bei -20 °C inkubiert. Die

präzipitierte DNA wurde mittels Zentrifugation (10000 g, 30 min, 4 °C, Fresco 21 Centrifuge) pelletiert, anschließend zweimal mit 300 µL eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und das DNA-Pellet bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die gDNA wurde in 50 µL ddH₂O resuspendiert und anschließend die DNA-Präparation bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Thermo Fischer Scientific, Multiskan oder Implen, Nanophotometer P-class). Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz entspricht eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm und einer Schichtdicke von $d = 1$ cm einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/mL, einer ssDNA-Konzentration von 33 µg/mL und einer ssRNA-Konzentration von 35 µg/mL. Eine DNA-Lösung gilt als rein, wenn sie keine Extinktion oberhalb von 300 nm und einen Quotienten aus A_{260}/A_{280} von mindestens 1,8 aufweist (Mülhardt 2013).

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Folgende Lösungen wurden verwendet:

- 50x TAE-Puffer:

2 M TRIS; 0,05 M EDTA wurden zusammen mit 57,1 mL reiner Essigsäure in einem Gesamtvolumen von 1000 mL in ddH₂O aufgelöst.

- *SERVA DNA Stain Clear G* (20000x)

- 6x Probenauftragspuffer (*loading dye*):

10 mM TRIS pH 7,6; 60 mM EDTA; 60 % Glycerin (w/v); 0,03 % (w/v) Bromphenolblau; 0,03 % (w/v) Xylencyanol

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend deren Länge erfolgte in 1 % (w/v) Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit *SERVA DNA Stain Clear G* (1x) versetzt und in Gelkammern mit für das Probenvolumen passenden Taschenkämmen gegossen. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden in Probenpuffer auf eine 1x-Probenpuffer-Endkonzentration eingestellt. Danach wurden sie in die Geltaschen gegeben und anschließend die Gelelektrophorese bei einer Spannung von 110 Volt für 30 min durchgeführt.

Der Farbstoff interkalierte dabei in die DNA. Die Detektion der mit Farbstoff-markierten DNA konnte durch Fluoreszenz im UV-Licht sichtbar gemacht (Sharp, Sugden et al. 1973) und mit Hilfe der Geldokumentationsanlage (INTAS, Gel iX Imager) dokumentiert werden. Als Größenstandards diente der Größenstandards der Firma New England Biolabs GmbH (*2-Log DNA Ladder*, s. Abbildung 9).

3.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die gewünschten, unter Blaulicht der Wellenlänge 490 nm (Dark Reader® transilluminator, Clare Chemical Research) sichtbar gemachten DNA-Fragmente, wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und die Gelstücke in 2 mL Reaktionsgefäße überführt. Anschließend erfolgte die Extraktion der DNA mit Hilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits* (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde in 15-50 µL ddH₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.2.6 Restriktion und Ligation der DNA

Die spezifische Spaltung von dsDNA-Molekülen erfolgte mit Typ IIP-Restriktionsendonukleasen (Sambrook 1989; Wilson und Murray 1991). Diese Restriktionsenzyme besitzen eine palindromische Erkennungssequenz und erzeugen durch die Restriktion in dieser Erkennungssequenz einzelsträngige Überhänge, sogenannte *sticky-ends*, oder glatte Schnittstellen ohne Überhänge, sogenannte *blunt-ends*.

Zur Restriktion wurde jeweils ein Gesamtansatz von 40 µL angesetzt. Zu dem Plasmid (ca. 2 µg) wurde der nach Herstellerangaben empfohlene 10 x NEB Puffer und jeweils 20 U der Restriktionsenzyme zugegeben und auf das Gesamtvolumen mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend folgte wie vom Hersteller empfohlen eine Inkubation von 1,5 Stunden bei 37 °C.

Zur Ligation zweier gereinigter DNA-Fragmente wurde der Vektor zum Insert in einem molaren Verhältnis zwischen 1:1 und 1:4 in einen entsprechenden Ansatz eingesetzt. Der Ansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µL mit 1 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) für 1 h bei RT in Ligase-Puffer inkubiert. Danach wurden kompetente *E. coli* (DH5α, NEB Turbo oder DH5αλpir) mit 10 µL des Ligationsansatzes chemisch transformiert (s. 3.1.6.1).

Blunt end-Ligationen in pJET2.1 erfolgten mit dem *CloneJET PCR Cloning Kit* nach Herstellerangaben.

3.2.7 Amplifikation von DNA mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die enzymatische Vervielfältigung von DNA Fragmenten *in vitro* (Mullis und Faloona 1987; Saiki, Gelfand et al. 1988).

Die *Annealing*-Temperatur (T_A) entsprach der Schmelztemperatur des Primers mit dem niedrigeren Wert minus 3 °C.

3.2.7.1 Standard PCR

Für Klonierungen, sowie die Amplifikation von Genen und Fragmenten aus genomischer DNA wurde die *Phusion® High Fidelity* DNA-Polymerase (NEB) verwendet. Die Reaktion

erfolgte in einem sterilen 0,2 mL PCR-Softtube (Sarstedt). Zu 50-100 ng Templat-DNA wurden 2 µL dNTPs (10 mM), je 5 µL eines *forward* und *reverse* Oligonukleotids (10 µM), 20 µL 5x Phusion GC-Puffer, 3 µL DMSO und 1 µL *Phusion*[®] *High Fidelity* DNA-Polymerase gegeben und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µL gebracht. Die anschließende PCR fand in einem Thermocycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, MJ MiniTM Personal Thermo Cycler und MyCyclerTM Thermal Cycler) nach folgendem Programm statt:

Zunächst wurde die DNA bei 98 °C für 30 sec zum Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges denaturiert. Danach folgten 25-35 Amplifikationszyklen, die sich jeweils aus drei Phasen zusammensetzten. In der Denaturierungsphase wurde der Ansatz bei 98 °C für 10 sec denaturiert, um gebundene Oligonukleotide von der DNA zu lösen und Doppelstränge aufzuschmelzen. In der *Annealing*-Phase (15 sec), die bei 50-65 °C stattfand, konnten die Oligonukleotide spezifisch an DNA-Einzelstränge binden. In der Elongationsphase bei 72 °C entstanden dann durch enzymatische Polymerisierung jeweils komplementäre Stränge. Für die Elongationszeit wurden pro Kilobasenpaar der erwarteten Fragmentgröße 30 sec veranschlagt. Abschließend erfolgte noch eine zehnminütige Phase für Kettenverlängerung bei 72 °C. Die amplifizierte DNA wurde bei 12 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Bei großen Unterschieden in der *Annealing*-Temperatur zwischen zwei Primern wurde eine Gradienten-PCR in einem Gradienten-Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH) durchgeführt, um die ideale *Annealing*-Temperatur zu bestimmen.

3.2.7.2 *Overlap Extension (OE)-PCR*

Mittels der OE-PCR können zwei DNA-Fragmente, die z.B. voneinander im Genom entfernt sind, zu einem zusammenhängenden Fragment synthetisiert werden (Ho, Hunt et al. 1989). Hierzu werden für jedes Fragment die Primer, die sich am Ende der zu verbindenden Sequenz befinden, so definiert, dass diese einen 5'-Überhang (15-25 bp) besitzen, der zum Ende des anderen Moleküls komplementär ist. In der ersten PCR wurden zunächst in zwei getrennten 100 µL PCR-Ansätzen mit je einem OE-primer (10 µM), einem konstruktsspezifischen Primer, der sich jeweils an der nicht überlappenden Region befindet und evtl. eine Restriktionsschnittstelle beinhaltet (10 µM), und ca. 50 – 100 ng Templat-DNA zwei Megaprimer synthetisiert. Diese Megaprimer wiesen entgegengesetzte Orientierungen auf und überlappten im Bereich der zu verschmelzenden Stelle.

Nach Aufreinigung der Megaprimer mittels *NucleoSpin Extract II* – Kit (Macherey & Nagel) wurden die PCR-Ansätze mit einem konstruktsspezifischen *forward* und *reverse* Primer und je 10 µL der beiden Megaprimer als Templat durchgeführt. Das entstandene

Vollängen-Produkt wurde nach der Gelextraktion mit Restriktionsenzymen geschnitten und in den gewünschten Vektor kloniert (s. 3.2.6).

Die drei PCR-Ansätze fanden in einem Thermocycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, MJ Mini™ Personal Thermo Cycler und MyCycler™ Thermal Cycler) statt, wobei 35 Amplifikationszyklen durchgeführt wurden (Temperaturprogramm s. 3.2.7.1, *Annealing*-Phase (15 s) bei 58 °).

3.2.7.3 QuikChange-PCR™

Diese Methode erlaubt die effiziente, positionsspezifische Mutagenese einzelner Nukleotide eines Gens oder einer Vektorposition in doppelsträngigen Plasmiden. Die von Stratagene (La Jolla, CA) entwickelte Mutagenisierungsmethode wurde nach einem veränderten Protokoll durchgeführt (Wang und Malcolm 1999). Zunächst wurden zwei separate PCR-Ansätze mit je 50 µL angesetzt. Der erste Ansatz enthielt dabei nur den 5'-Primer, der zweite Ansatz nur den 3'-Primer, wobei die zu mutagenisierende Position sich in der Mitte der beiden komplementären Primer befand. Nach vier Zyklen wurden je 25 µL aus jedem Ansatz entnommen, vereinigt und für weitere 18 Zyklen amplifiziert. Das Produkt der PCR stellt einen Vektor, der die veränderte Sequenz enthält, dar, es besitzt jedoch noch zwei Einzelstrangbrüche an den 3'-Enden der ursprünglichen Primer. *E.coli*-eigene Enzyme können diese Einzelstrangbrüche nach einer Transformation reparieren. Für die QuikChange-PCR wurde die Pfu DNA-Polymerase, die eine 3'→5'-*Proofreading*-Aktivität besitzt, verwendet. Die Reaktionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 50 µL mit je 50 ng der als Ganzes zu amplifizierenden DNA-Matrize, 3 U Pfu DNA-Polymerase, 5 µL 10x Pfu-Puffer, 1 µL dNTPs (je 10 mM) und jeweils 8 µL der beiden Primer (10 mM). Ein QuikChange™-PCR Programm begann mit einer initiierenden Denaturierung (95 °C, 3 min). Die Schritte 2, 3 und 4 stellten den Wiederholungszyklus aus Denaturierung (95 °C 45 sec), *Annealing* (55 °C, 1 min) und Extension (72 °C 1 min/kb) dar. In den ersten beiden PCRs wurden diese Schritte 4-mal wiederholt. Nach der Vereinigung der beiden Ansätze wurden weitere 3 U Pfu-Polymerase zugegeben und das Programm nochmals gestartet und die Schritte 2 bis 4 wurden 18-mal wiederholt. Der 5. und zugleich abschließende Schritt des PCR-Programms bestand in der Lagerung bei 12 °C bis zur Weiterverarbeitung.

Anschließend wurde das Ursprungsplasmid durch Zugabe von 20 U DpnI, das nur methylierte DNA spaltet, für 1,5 h bei 37 °C im PCR-Ansatz verdaut. Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 10 µL des neu amplifizierten Vektors eingesetzt (s. 3.1.6.1).

3.2.7.4 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung des Erfolges einer Klonierung wurde ein Insert-*screening* mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Zusätzlich wurden Kolonie-PCRs auch für die Überprüfung von korrekten Integrationen und *knockouts* in *A. vinelandii* und *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 verwendet. Für Kolonie-PCR-Reaktionen mit *E. coli* wurde die Taq DNA Polymerase (NEB) benutzt, während für Stämme von *A. vinelandii* und *Sphingomonas* sp. die GoTaq® G2-Polymerase (PROMEGA) verwendet wurde. In der Tabelle 6 sind die jeweiligen PCR-Protokolle vergleichend dargestellt.

Tabelle 6: PCR-Protokoll für die Taq DNA-Polymerase (NEB) und GoTaq® G2 (Promega).

Zyklusabschnitt	Taq (NEB)			GoTaq® G2 (Promega)		
	Temperatur	Zeit	Durchläufe	Temperatur	Zeit	Durchläufe
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1x	95 °C	10 min	1x
Denaturierung	95 °C	30 s		95 °C	45 s	
Annealing	45-68 °C	30 s	30x	50-65 °C	45 s	25-30x
Extension	68 °C	1 min/kB		72 °C	1 min/kB	
Finale Extension	68 °C	10 min	1x	72 °C	10 min	1x
Lagerung	16 °C	∞		16 °C	∞	

Zunächst wurden auf Selektiv-Agar gewachsene Kolonien mit einer Pipettenspitze in 30 µL LB-Medium resuspendiert.

Das Volumen der Ansätze betrug jeweils 20 µL. Im Ansatz befanden sich neben 1 µL Zellsuspension, 0,5 mM beider Primer, 0,2 mM jedes dNTPs, NEB ThermoPol- bzw. GoTaq-Puffer, 3 % DMSO und 1 U Taq-Polymerase (NEB bzw. PROMEGA).

Die Länge des PCR-Produktes wurde mittels Agarosegelelektrophorese (s. 3.2.4) überprüft.

3.2.7.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR beruht auf dem System der Standard PCR (s. 3.2.7.1) und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der synthetisierten DNA, die mittels einer Fluoreszenzmessung in Echtzeit bestimmt wird. Hierzu wurden die Amplikons für die Standardkurve so definiert, dass sie eine Länge von 100-200 bp (entspricht einem Ausschnitt des zu untersuchenden Genes) und einen GC-Gehalt zwischen 50-60 % besitzen. Diese Amplikons wurden in den PCR-Ansätzen als lineares Fragment oder in einen pJET-Vektor, in den das Fragment *blunt* kloniert worden war, eingesetzt. Das zu quantifizierende Gen befand sich auf der genomischen DNA von *Sphingomonas* sp., weshalb diese gDNA nach der Reinigung (s. 3.2.2) ebenfalls eingesetzt wurde. Vor jeder Analyse mussten die optimalen Konzentrationen der beiden Amplifizierungsprimer bestimmt werden, wobei hierbei die Primerkonzentrationen bei 250- 500 nM pro 10 µL Ansatz lag. In den Ansatz wurden außerdem 2,5-5 ng Templat (Kalibrierungsfragment oder gDNA) und

5 μL SYBR® Green Master Mix (Biorad; enthält dNTPs, MgCl_2 und DNA Polymerase) gegeben und mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 10 μL gebracht.

Die anschließende PCR fand in einem Thermocycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, CFX96TM Real-Time System) nach folgendem Programm mit der Einstellung SYBR®/FAM statt:

Zunächst wurde die DNA bei 98 °C für 3 min zum Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges denaturiert und die Polymerase aktiviert. Danach folgten 40 Amplifikationszyklen, die sich jeweils aus zwei Phasen zusammensetzten. In der Denaturierungsphase wurde der Ansatz bei 98 °C für 15 sec denaturiert, um gebundene Oligonukleotide von der DNA zu lösen und Doppelstränge aufzuschmelzen. In der *Annealing*- und Elongationsphase (60 °C; 30 sec) konnten die Oligonukleotide spezifisch an den DNA-Einzelstrang binden und in der Elongationsphase der komplementäre Strang durch enzymatische Polymerisierung entstehen. Dabei bindet bei jeder Amplifizierungsrunde der Farbstoff SYBR® Green an die DNA, was zu einer Steigerung des Fluoreszenzlevels am Ende jedes Extensionsschrittes führt.

Abschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse der Produkte, bei der die Temperatur in Schritten von 0,5 °C von 65 bis 95 °C (5 sec pro Schritt) erhöht wurde.

Die genomische DNA wurde teilweise zusätzlich vor der Reaktion mit Hilfe des Restriktionsenzym HindIII (NEB) verdaut, um die gDNA in kleinere Stücke einsetzen zu können und somit die Bedingungen der DNA-Faltung des Templates der Kalibrierung (linear oder pJET) etwas nachahmen zu können.

3.2.7.6 Inverse PCR

Die inverse PCR wird zur Amplifizierung von unbekanntem DNA-Regionen benutzt, die ein Ende eines bekannten Bereiches flankieren. Für diese Region sind keine Primer vorhanden. Es wurde die Methode nach Sambrook *et al.* mit Modifikationen angewendet (Sambrook und Russell 2006). Zunächst wurde die genomische DNA der Sphingomonaden isoliert (s. 3.2.2) und anschließend mittels des Restriktionsenzym AluI (4 *cutter*; 5 min; 37 °C) oder KpnI (6 *cutter*; 90 min; 37 °C) verdaut. Nach der Auftrennung der Fragmente via Agarosegelelektrophorese und Gelelution der Banden von 1-6 kbp wurden die Fragmente durch intramolekulare Ligation in zirkuläre Moleküle überführt. Durch eine anschließende Aufreinigung des Ligationsansatzes mittels *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* nach Herstellerangaben konnte die zirkuläre DNA mittels AflIII oder PstI (6 *cutter*; 90 min; 37 °C), an einer Restriktionsschnittstelle in der bekannten Gensequenz geschnitten werden. Die Restriktionsenzyme wurden durch einen folgenden Hitzeschritt (20 min; 80 °C; Heizblock-Thermostat Tmix) inaktiviert und somit konnten die

linearen Fragmente als Templat für eine PCR benutzt werden. Die unbekannte Sequenz wurde anhand von zwei Primern amplifiziert, die spezifisch in unterschiedlichen Amplifikationsrichtungen an die bekannte DNA-Region binden. Die PCR-Produkte wurden anschließend *blunt* in einen pJET-Vektor kloniert und NEB-Turbo Zellen transformiert. Zur Überprüfung positiver Klone wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt und Klone, deren Plasmid ein Fragment >1000 bp enthielten, wurden in 5 mL LB_{Amp}-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht unter Schütteln kultiviert. Am nächsten Tag konnten Plasmide isoliert (s. 3.2.1) und sequenziert (s. 3.2.10) werden.

3.2.8 Gibson-Assembly

Das Gibson-Assembly stellt eine robuste, Exonukleasen-basierende Methode dar, um DNA-Fragmente nahtlos und in einer richtigen Reihenfolge zusammenzufügen (Gibson, Young et al. 2009). Mehrfache DNA-Fragmente können unabhängig von ihrer Länge und Kompatibilität vereint werden.

Für jedes zu assemblierende Fragment wurden jeweils zwei Primer designt, die eine überlappende Sequenz zum Nachbarfragment (15- 25 bp) und eine genspezifische Sequenz (20 bp) besaßen. Der zweite Abschnitt war für die Bindung an das Templat während der PCR notwendig. Für diese Reaktion wurde der NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB), bestehend aus einer Exonuklease, DNA Polymerase und DNA Ligase verwendet und nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurde ein Ansatz von 20 µL bestehend aus 10 µL *Mastermix*, dem verdautem Vektor und den beiden Fragmenten, die zusammen in den Vektor assembliert werden sollten, für 15 min bei 50 °C inkubiert. Bei der Vereinigung von 3 Fragmenten sollten 0,03-0,2 pmol der Fragmente, wobei das vorgeschlagene Verhältnis von Vektor zu Insert 1 zu 2 betragen sollte, eingesetzt werden. Während dieser Inkubation bildete eine Exonuklease einzelsträngige 3'-Überhänge, die die Assemblierung der überlappenden Regionen erleichtern. Anschließend füllt eine DNA Polymerase die Lücken, die sich zwischen den zusammengefügt Fragmenten gebildet haben und eine DNA Ligase verschließt abschließend die noch vorhandenen Brüche. Als Resultat erhält man ein komplett verschlossenes, doppelsträngiges DNA-Molekül, das als Templat für eine PCR (s. 3.2.7) dient oder direkt zur chemischen Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen (s. 3.1.6.1) benutzt werden kann.

3.2.9 Anlagerung von Oligonukleotiden

Zur Einführung von kurzen Bereichen doppelsträngiger DNA in einen Vektor (z.B. für die Einfügung von neuen Restriktionsschnittstellen), wurden zwei Oligonukleotide so ange-

lagert, dass an den Enden des Doppelstrangs kompatible Überhänge entstanden. Diese Überhänge wurden anschließend mit den Überhängen eines durch Restriktionsenzyme geschnittenen Vektors ligiert.

Hierzu wurden je 10 µL der Primerlösung (10 µM) gemischt, im Wasserbad auf 95 °C erhitzt und üN auf RT abgekühlt. Von dieser Lösung wurden dann 2 µL als Insert in einer Ligationsreaktion eingesetzt.

3.2.10 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) nach dem Sanger-Verfahren (Sanger, Nicklen et al. 1977) durchgeführt. Die Proben wurden sequenzierfertig aufbereitet (Gesamtvolumen 12 µL: 500 ng Plasmid-DNA, davon 2 µL Sequenzierungsoligonukleotid (10 µM)) und nach der Sequenzierung mit der Software Bioedit oder Clone Manager ausgewertet.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration über UV

Die Proteinkonzentration reiner Proteinpräparationen wurde über UV-Spektroskopie bestimmt. Zur Berechnung der Molekulargewichte sowie der Extinktionskoeffizienten aller Proteine wurde das ProtParam *tool* des ExPASy-Servers verwendet. Die Berechnung beruht auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie auf der Absorption von Cystinen (Disulfidbrücken) im Bereich von 250-300 nm. Aus der Aminosäuresequenz wurde so der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280}) mit Hilfe folgender Formel berechnet (Pace, Vajdos et al. 1995):

$$\epsilon(280) = \sum \text{Trp} * 5500 + \sum \text{Tyr} * 1490 + \sum \text{Cys} * 125$$

Formel 2: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon(280)$.

Unter Verwendung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes kann daraus die Proteinkonzentration berechnet werden:

$$c = \frac{A(280)}{d * \epsilon(280)} * MW$$

Formel 3: Berechnung der Proteinkonzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

c: Konzentration [mg mL⁻¹]
A₍₂₈₀₎: Absorption bei 280 nm
d: Schichtdicke [cm]
 $\epsilon_{(280)}$: Extinktionskoeffizient [M⁻¹ cm⁻¹]
MW: Molekulargewicht [g mol⁻¹]

In der Tabelle 7 sind die für die Konzentrationsbestimmung der Proteine AlgE4 und AgE4-His₆ benötigten Extinktionskoeffizienten, sowie die Molekulargewichte aufgelistet:

Tabelle 7: Extinktionskoeffizient und Molekulargewicht der Proteine AlgE4 und AlgE4-His₆.

Protein	Extinktionskoeffizient [$M^{-1} cm^{-1}$]	Molekulargewicht [$kg mol^{-1}$]
AlgE4	38280	58
AlgE4-His ₆	38280	59

Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Absorptionsspektrum der Proteinlösung von 200-400 nm aufgenommen (Multiskan, Thermo Fisher Scientific oder Nanophotometer, Implen).

Es sollte dabei keine Absorption oberhalb von 300 nm auftreten, da diese auf durch Aggregatbildung hervorgerufene Lichtstreuung hindeutet.

3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

- Ammoniumpersulfat (APS)-Stammlösung 10 %:

100 g/L APS wurden in ddH₂O gelöst und bei 4 °C gelagert

- Coomassie-Färbelösung:

2 g/L Coomassie Brilliant Blue G250 und R250, 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) reine Essigsäure. Nachdem die Lösung für mindestens drei Stunden gerührt wurde, wurde sie filtriert und bei RT lichtgeschützt gelagert.

- 4x SDS-PAGE Trenngelpuffer

8 g/L SDS, 1,5 M Tris/HCl pH 8,8. Der pH-Wert wurde mit 37 % (v/v) HCl eingestellt.

- 4x SDS-PAGE Sammelgelpuffer

8 g/L SDS, 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8. Der pH-Wert wurde mit 37 % (v/v) HCl eingestellt.

- 10x SDS-PAGE Laufpuffer (resultierender pH-Wert: 8,5)

10 g/L SDS, 0,25 M Tris, 1,92 M Glycin. Der pH-Wert darf nicht verändert werden.

- 5x SDS-Probenauftragspuffer

50 % (v/v) Glycerin; 12,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 75 g/L SDS; 0,25 M Tris, 0,25 g/L Bromphenolblau, pH 6,8. Der pH-Wert wurde mit 37 % (v/v) HCl eingestellt.

In Tabelle 8 ist die Zusammensetzung der verwendeten Gele, die mit Hilfe der Mini-Protean®3 Multi-Casting Chamber (Bio-Rad Laboratories GmbH) hergestellt wurden, zusammengefasst.

Tabelle 8: Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele.

Die Mengenangaben gelten für 14 Gele.

	80 mL Trenngel (12 %)		40 mL Sammelgel (5 %)	
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung (40 % (w/v); 37,5:1)	24	mL	5,2	mL
Trenn-/Sammelgelpuffer (4x)	20	mL	10	mL
ddH₂O	34,32	mL	23,96	mL
SDS (10 % (w/v))	800	µL	400	µL
Start der Polymerisation durch Zugabe von				
TEMED	80	µL	40	µL
APS (10 % (w/v))	800	µL	400	µL

Die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE erfolgte elektrophoretisch entsprechend ihrem Molekulargewicht (Laemmli 1970). Das negativ-geladene Detergens SDS lagert sich in konstanten Massenverhältnissen an die Proteine (1,4 g SDS/g Protein) an. Somit werden die Eigenladungen der Proteine kompensiert, was zu negativen Nettoladungen führt. Aus diesem Grund wandern bei der Elektrophorese die Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung und nur entsprechend ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das SDS-Polyacrylamidgel zur Anode. Pro Ansatz wurden jeweils bestimmte Proteinmengen mit SDS-Probenauftragspuffer versetzt und 10 min bei 95 °C erhitzt. Zur Beladung des SDS-Gels wurden mit Hilfe einer Hamiltonspritze jeweils 5-10 µL Probe in die Geltaschen gefüllt und anschließend die Elektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro SDS-Gel für ca. 50 Minuten (*Bio-Rad Laboratories GmbH, Mini-PROTEAN Tetra Cell*) durchgeführt. Zum Anfärben der Proteine wurde das Gel nach der Gelelektrophorese einer Coomassie-Färbung unterzogen (Stahl 1969; Sambrook 1989). Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 färbt Proteine bis zu einer Nachweisgrenze von 0,2-0,5 µg/mm². Dazu wurde das Gel für 20 Minuten in einer Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Entfärbt wurde das Gel, indem es zweimal für 5 min H₂O_{dest} in der Mikrowelle erhitzt wurde und über Nacht in H₂O_{dest} schüttelte. Als Standard wurde der PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet (s. 2.10).

3.3.3 Proteinreinigung

3.3.3.1 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Zellen aus Expressionskulturen wurden in einem Verhältnis von 1:40 (w/v) in Bindepuffer (50 mM 3-Morpholinopropansulfonsäure(MOPS) Puffer pH 6,9; 5 mM Calciumchlorid; Spuren an Magnesiumsulfat und DNaseI) resuspendiert und im Eisbad mittels Ultraschall (Ultraschall-Prozessor UIS250v mit Sonotrode LS24d10, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow) bei 80 % Amplitude, 0,5 ms Puls/ 0,5 ms Pause drei mal zwei Minuten aufge-

schlossen. Nach dem Zellaufschluss wurden Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (Sorvall RC 6+ Centrifuge, SS34 Rotor, 14.000 g, 45 min, 4 °C) abgetrennt.

Aus dem Überstand wurden im Anschluss die Proteine, die mit einem His₆-Tag versehen waren, über Metallchelate-Affinitätschromatographie und die Proteine ohne Tag über Ionenaustauschchromatographie gereinigt.

3.3.3.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Folgende frisch filtrierte (0,2 µM Cellulose Filter, Sartorius stedim biotech) Lösungen wurden verwendet:

• Bindungspuffer:

50 mM 3-Morpholinopropansulfonsäure(MOPS) Puffer pH 6,9, 1 mM Calciumchlorid, 300 mM Natriumchlorid, 10 mM Imidazol

• Elutionsspuffer:

50 mM 3-Morpholinopropansulfonsäure(MOPS)-Puffer pH 6,9, 1 mM Calciumchlorid, 300 mM Natriumchlorid, 1 M Imidazol

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie wurde mit HisTrap™ FF Säulen (GE Healthcare, CV: 5 mL) durchgeführt. Diese Säulen sind mit Sepharose 6 Fast Flow befüllt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt durch die Anlegung eines Imidazolgradienten, wodurch die strukturell ähnlichen Imidazolmoleküle mit den Histidinseitenketten des Proteins um die Bindestellen an der Säule konkurrieren und diese somit vom Säulenmaterial verdrängen.

Die Reinigung wurde an der Chromatographie-Anlage ÄKTA™ purifier (GE Healthcare) nach folgender Methode durchgeführt:

Flussrate: 5 mL/min

Äquilibrierung: 4 CV 99 % Bindepuffer, 1 % Elutionsspuffer

Beladen: löslicher Anteil des Zellysats, zuvor über eine 0,2 µM Membran (VWR; Spritzenfilter) filtriert

Waschen: 12 CV 98 % Bindepuffer, 2 % Elutionsspuffer

Elution: 12 CV Gradient 2-50 % Elutionsspuffer

Es wurden 1 mL Fraktionen gesammelt.

Reinigung der Säule: 5 CV 100 % Elutionsspuffer

Spülen und Lagerung der Säule: 5 CV ddH₂O; 3 CV 20 % Ethanol

Die Elution der Proteine wurde durch eine *online*-Messung der Extinktion bei 280 nm überwacht. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE

(s. 3.3.2). Fraktionen, die das Zielprotein enthielten wurden vereinigt und über eine *HiPrep 26/10 Desalting*-Säule umgepuffert (s. 3.3.3.4).

3.3.3.3 Ionenaustauschchromatographie

Folgende frisch filtrierte (0,2 µM Cellulose Filter, Sartorius stedim biotech) Lösungen wurden verwendet:

• Bindungspuffer:

50 mM 3-Morpholinopropansulfonsäure(MOPS)-Puffer pH 6,9, 1 mM Calciumchlorid

• Elutionsspuffer:

50 mM 3-Morpholinopropansulfonsäure(MOPS)-Puffer pH 6,9, 1 mM Calciumchlorid, 1 M Natriumchlorid

Die Ionenaustauschchromatographie wurde mit HisTrap™ Q XL Säulen (GE Healthcare, CV: 1 mL) durchgeführt. Diese Säulen sind mit *Q Sepharose XL* Medium befüllt. Die Gelmatrix bindet bei pH 6,9 die positiv geladenen Proteine. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt durch das Anlegen eines Natriumchloridgradienten. Die positiv geladenen Natriumionen konkurrieren mit dem Protein um die Bindungsstellen der Matrix. Somit werden bei steigender Konzentration die Proteine in der Reihenfolge ihrer positiven Ladungsstärke von dem Ionenaustauscher verdrängt.

Die Reinigung wurde an der Chromatographie-Anlage ÄKTA™ *purifier* (GE Healthcare) nach folgender Methode durchgeführt:

Flussrate: 0,8 mL/min

Äquilibration: 4 CV 100 % Bindepuffer

Beladen: löslicher Anteil des Zellysats, zuvor über eine 0,22 µM Membran (Millipore) filtriert

Waschen: 15 CV 100 % Bindepuffer

Elution: 15 CV Gradient 0-50 % Elutionspuffer

Es wurden 1 mL Fraktionen gesammelt.

Reinigung der Säule: 5 CV 100 % Elutionspuffer

Spülen und Lagerung der Säule: 5 CV ddH₂O, 3 CV 20 % Ethanol

Die Elution der Proteine wurde durch eine *online*-Messung der Extinktion bei 280 nm überwacht. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (s. 3.3.2). Fraktionen, die das Zielprotein enthielten wurden vereinigt und über eine *HiPrep 26/10 Desalting*-Säule umgepuffert (s. 3.3.3.4).

3.3.3.4 Größenausschlusschromatographie von Proteinlösungen

Zum schnellen Austausch von Puffersubstanzen und Salzen wurde die Größenausschlussssäule *HiPrep 26/10 Desalting* (GE Healthcare) verwendet. In der Regel wurde nach folgender Methode entsalzt bzw. der Puffer ausgetauscht:

Flussrate: 5-10 mL/min

Äquilibration: 2 CV Austauschpuffer

Beladen: 15 mL Proteinlösung

Elution: 2 CV Austauschpuffer; mit manueller Fraktionierung anhand des Chromatogramms

Reinigung der Säule: 2 CV Austauschpuffer

Spülen und Lagerung der Säule: 2 CV ddH₂O, 2 CV 20 % Ethanol

Zur Durchführung der manuellen Fraktionierung wurden die Extinktion bei 280 nm gemessen.

3.3.4 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Bei Bedarf wurden die Proteinlösungen mit Hilfe von AMICON Ultra Konzentratoren (Millipore, MWCO=10 kDa) durch Ultrafiltration (3500 g, 4 °C, Sorvall RC 6+ Zentrifuge mit SH-3000 Rotor) einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation hing von der Ausgangskonzentration und dem Ausgangsvolumen, sowie von der gewünschten Endkonzentration der Proteinlösung ab.

3.3.5 Lagerung von Proteinen

Die gereinigten Proteinlösungen wurden in kleinen Volumina (20-50 µL) in flüssigen Stickstoff eingetroppt und als feste Kügelchen bei -80 °C gelagert.

3.4 Prozessierung von Exopolysacchariden

3.4.1 Fällung von Polysacchariden

Zur Fällung der Exopolysaccharide wurden zunächst die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt (Sorvall, RC 6+ Centrifuge mit Rotor F10-6x500y oder F9-4x1000y, RT, 4000 g, 20 min) und das Zellpellet autoklaviert und entsorgt. Bei der Polysaccharidfällung aus *A. vinelandii*-Kulturen wurden vor der Zentrifugation (s. 3.1.4 und 3.1.5) zusätzlich 10 mL/L 100 mM NaCl und 10 mL/L 10 mM Natriummethylen-diamintetraessigsäure (Na₄EDTA) für das Aufbrechen des Alginate-Calcium-Komplexes zur Zellbrühe gegeben und die Kultur anschließend für weitere 30 min geschüttelt (Beale und Foster 1996).

Nach der Zentrifugation wurden die sekretierten Polysaccharide mit Hilfe von Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt. Hierzu wurde zu zwei vorgelegten Volumenteilen Isopropanol 1 Volumenteil Überstand unter ständigem Rühren zugegeben. Das EPS war sofort als Fäden in der Flüssigkeit erkennbar und konnte deshalb mittels eines Glasstabs oder im Falle von kürzeren Fäden durch ein Abgießen über ein Sieb (20 μM) entfernt werden. Das restliche Isopropanol wurde anschließend durch das Ausdrücken der Polysaccharidfäden entfernt und bis zur Weiterverarbeitung (s. 3.4.3) im Abzug gelagert.

3.4.2 Deacetylierung von Alginat

Da die enzymatische Epimerisierung des Alginats bei deacetylierten Varianten am erfolgreichsten ist, wurde das EPS Alginat, das von dem Stamm *A. vinelandii* in das Medium sekretiert wurde, mit Natronlauge behandelt. Hierbei wurden pro Liter 5 mL NaOH (10 M) unter Rühren zugegeben, wobei der pH-Wert dadurch in den Bereich größer 11 angehoben wurde. Das Medium wurde für 1 h bei RT gerührt und abschließend mit Salzsäure (37 %) bis zur Neutralisation titriert (Gimmestad, Steigedal et al. 2006). Im Anschluss wurde das deacetylierte EPS aus dem Medium gefällt (s. 3.4.1).

3.4.3 Trocknung und Mahlen von Polysacchariden

Nach der Fällung wurden die Polysaccharidfäden im Vakuumtrockenschrank bei 45 °C getrocknet (Sicherheits-Vakuumtrockenschrank VD 53, BINDER, Tuttlingen) und dadurch komplett von Lösungsmittel befreit. Anschließend wurde die Ausbeute an EPS durch Auswiegen [g/L Medium] bestimmt.

Für weitere Analysen des Polysaccharides wurde die harte Substanz mittels einer Schwingmühle (MM400, Retsch, Haan) in einem 25 mL Aluminiumbecher mittels einer Aluminiumkugel zu feinem Pulver gemahlen.

3.4.4 Dialyse von Polysacchariden

Falls bei einer EPS-Lösung (2-10 g/L) Salze oder kleinere Monomere/Dimere entfernt werden sollten (z.B. für GPC-Messungen, s. 3.5.1), wurde gegen einen mindestens 100-fachen Volumenüberschuss Elga-Wasser bei 4 °C 10 h im Kühlraum dialysiert. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch aus einer Cellulosemembran (Roth, Karlsruhe) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 10 kDa verwendet, der das Polysaccharid zurückhält, während niedermolekulare Substanzen frei diffundieren können. Das ddH₂O wurde hierbei mindestens dreimal gewechselt. Nach der Dialyse wurde das EPS erneut durch Fällung (s. 3.4.1) isoliert.

Eine andere Dialysemethode stellte die Querstrom-Filtration mit einer 0,45 µm Ausschlussmembran (Hydrostat, Sartorius, Göttingen) dar. Hierbei wurde das Medium direkt nach der Zellentfernung nach Herstellerangaben bis zu einer Leitfähigkeit von circa 300 µSv filtriert und dabei auch aufkonzentriert. Auch hier wurde das EPS durch eine anschließende Fällung isoliert (s. 3.4.1).

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Gelpermeationschromatographie

Die Verteilung der Molekulargewichte (M_w) der verschiedenen Polysaccharide wurde mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) (SECurity GPC System, PSS Polymer Standards Service, Mainz) bestimmt. Um eine größtmögliche und saubere Auftrennung der Polymere zu gewährleisten, besitzt das System eine Suprema 100 Å (Auftrennung von 100-100000 Da)- und zwei Suprema 10000 Å (Auftrennung von 1-1000 kDa)-Säulen. Für die Analysen wurden ein RI (*refractive index*)- und ein LS(Lichtstreuungs)-Detektor verwendet. Die Probenvorbereitung umfasste zunächst eine Dialyse, um Salze, die während der Fällung aus dem Medium mitisoliert wurden, zu entfernen. Nach Fällung und Trocknung wurde eine 0,1 % (w/v) EPS-Lösung in 0,1 M LiNO₃ hergestellt. Darüber hinaus wurde die erhaltene EPS-Lösung direkt vor der Injektion zur Partikelentfernung zentrifugiert (30 min, 12000 g, RT, Fresco 21 Centrifuge). Pro GPC-Lauf wurden 100 µL Probelösung injiziert. Die Chromatographie erfolgte bei einer Temperatur von 50 °C und einem Druck von circa 45 bar. Die Elution wurde mit 0,1 M LiNO₃ als Laufmittel und einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt, wobei ein Lauf 50 min dauerte. Mit Hilfe des RI-Detektors und einer Pullulanstandardgerade konnte das Molekulargewicht (M_p) bestimmt werden (Pullulan: PSS Polymer Standards Service, Mainz; Molekulargewichtsverteilung des Standards s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Standards zur Quantifizierung der Molekulargewichte mittels GPC.

Standardbezeichnung	M_p [Da]	Konzentration [g/L]
p-0.3	342	0,247
p-1-2	1080	0,262
p-5-3	6100	0,255
p-10-2	9600	0,260
p-20-2	21100	0,250
p-50-2	47100	0,266
p-100-2	107000	0,253
p-200-2	200000	0,259
p-400-3	344000	0,242
p-800-2	708000	0,143
p-1300di	1220000	0,134
p-2500di	2350000	0,127
p-100-2 (Kalibrierung)	107000	2,004

3.5.2 Circular Dichroismus-Spektroskopie

Die Circular Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) ist eine spezielle Form der UV/VIS-Spektroskopie, die auf Wechselwirkungen von zirkular polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen, wie Proteinen und Polysaccharide, beruht. Hierbei tritt eine Phasenverschiebung ϕ auf, die durch unterschiedliche Brechungsindizes für rechts- und links-polarisiertes Licht der optisch aktiven Substanzen initiiert wird. Außerdem unterscheiden sich auch die Extinktionskoeffizienten für rechts- und links-polarisiertes Licht bei optisch aktiven Substanzen, was beim Durchgang der Lösung zu elliptisch polarisiertem Licht führt. Als Signal wird bei CD-Messungen die Elliptizität (θ_{rec}) verwendet und die molare Elliptizität $[\theta]$ wurde anhand der Formel 4 berechnet.

$$[\theta] = \frac{\theta_{\text{rec}}}{10 * c * l}$$

Formel 4: Berechnung der molaren Elliptizität.

$[\theta]$: molare Elliptizität [$\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$]
 θ_{rec} : Elliptizität [deg]
c: Konzentration [mol/L]
l: Lichtweg [cm]

3.5.2.1 Bestimmung der Monomierzusammensetzung von Alginat mittels CD-Spektroskopie

Wechselnde Monomierzusammensetzungen von Alginat führen auf Grund der unterschiedlichen Nachbarresiduen zu unterschiedlichen chiroptischen Eigenschaften und als Folge zu verschiedenen CD-Spektren. Die CD-Spektroskopie eignet sich daher als sensitive Methode zur Bestimmung der Dimerblöcke der Alginatstruktur und somit zur Bestimmung des Verhältnisses von Mannuronsäure zu Guluronsäure (Donati, Gamini et al. 2003).

Für die Messungen wurden zuvor dialysierte Alginat in ddH₂O oder Puffer gelöst (3 mmol/L) und der pH-Wert der Lösung auf 7,0 eingestellt. Die Schichtdicke der verwendeten Quarzküvetten (Rundküvette) betrug 1 cm. Die CD-Spektren wurden bei RT mit Messpunktabständen von 0,5 nm aufgenommen (Scan-Geschwindigkeit 20 nm/min, Wellenlängenbereich von 195-240 nm, Akkumulation von 3 Einzelspektren) und um das Wasser- bzw. Puffersignal bereinigt. Jedes Spektrum entstand aus der Mittelung von drei Messungen, wobei die angelegte Spannung sich stets unter 700 Volt befand, was eine Validierung der Daten möglich machte. Die Berechnung der Monomierzusammensetzung wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$[\theta]_{\text{rec}}(\lambda)^f = P_1 * [\theta]_{\text{GG}}(\lambda)^f + P_2 * [\theta]_{\text{MM}}(\lambda)^f + P_3 * [\theta]_{\text{MG+GM}}(\lambda)^f$$

Formel 5: Berechnung der Monomerzusammensetzung von Alginat.

Wobei $P_1 + P_2 + P_3 = 1$ und $[\theta]_{\text{rec}}(\lambda)^f$ die aufgenommene Elliptizität der Alginat bei der angegebenen Wellenlänge darstellt.

Die Werte für $[\theta]_{\text{MM}}(\lambda)^f$, $[\theta]_{\text{MG+GM}}(\lambda)^f$ und $[\theta]_{\text{GG}}(\lambda)^f$ bei 198 nm und 207 nm sind:

$$[\theta]_{\text{MM}}(198)^f = 1214.6 \frac{\text{deg cm}^2}{\text{dmol}}; [\theta]_{\text{MM}}(207)^f = 38.16 \frac{\text{deg cm}^2}{\text{dmol}}; [\theta]_{\text{MG+GM}}(198)^f = -879.8 \frac{\text{deg cm}^2}{\text{dmol}};$$

$$[\theta]_{\text{MG+GM}}(207)^f = -837.7 \frac{\text{deg cm}^2}{\text{dmol}}; [\theta]_{\text{GG}}(198)^f = -1713.9 \frac{\text{deg cm}^2}{\text{dmol}}; [\theta]_{\text{GG}}(207)^f = -1867.2 \frac{\text{deg cm}^2}{\text{dmol}};$$

3.5.2.2 Funktionelle Charakterisierung von AlgE4 mittels CD-Spektroskopie

Die Aktivität des gereinigten Proteins AlgE4 wurde via CD-Spektroskopie bei Raumtemperatur bestimmt. Die Epimerisierung wurde durch die Erniedrigung der Elliptizität im Wellenlängenbereich von 195-200 nm beobachtet und wie im Abschnitt 3.5.2.1 beschrieben, analysiert. Für den Alginat-Assay wurde das EPS zunächst deacetyliert (s. 3.4.2) und dann mit 0,5 μM AlgE4, das heterolog in *E. coli* exprimiert wurde, 10 mM MOPS pH 6,8, 3 mM CaCl_2 und 2 g/L Substrat in einem Gesamtvolumen von 1,5 mL epimerisiert. Die Reaktion wurde für 100 Stunden verfolgt. Bei zu hoher auftretender Viskosität wurden 0,1 M NaCl zum Reaktionsansatz zugegeben.

3.5.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC ist ein Flüssigchromatographie-Verfahren bei dem verschiedene Komponenten eines Reaktionsansatzes oder eines Substanzgemisches getrennt, identifiziert und quantifiziert werden können. Durch unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial resultieren für die einzelnen Komponenten unterschiedliche Retentionszeiten. Die Identifikation erfolgt dabei durch den Vergleich der erhaltenen Retentionszeiten mit denen von Standardsubstanzen. Je nach Art der Analyten und des Trennproblems werden verschiedene Typen von Säulen und mobilen Phasen eingesetzt. In dieser Arbeit wurde ein UltiMate-3000 HPLC-System (Thermo Fischer Scientific) mit angeschlossenen Autosampler und RI (refractive detector) Detektor (RI-101, Shodex) bzw. Dioden-Array Detektor zur Messung des UV-Extinktionssignals, der zu untersuchenden Substanzen, verwendet.

3.5.3.1 Bestimmung des Acetylierungsgrades des EPS Alginat

Der Acetylierungsgrad wurde nach der Methode von Castillo *et al.* (Castillo, Galindo *et al.* 2013) analysiert. Hierzu wurden 10 mg lyophilisiertes Alginatpulver in 500 μL ddH₂O üN gelöst. Anschließend wurden 500 μL Natronlauge (1 M) zugegeben und bei 80 °C für 2 h inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf 4 °C wurden 625 μL Phosphorsäure (1,5 M) zugegeben und zentrifugiert (12000 g, 15 min, RT, Fresco 21 Centrifuge). Alle

Proben wurden vor dem Auftrag filtriert (PVDF), um unlösliche Stoffe abzutrennen. Zur Analyse der Konzentration an Acetat in der Probe wurde eine Rezex-Säule (Rezex ROA-Organic Acid H+ (8 %), 300x 7,80 mm; Phenomenex) verwendet und die Probe isokratisch mit einer Flussrate von 0,5 mL/min bei 70 °C mit Schwefelsäure (2,5 mM) eluiert. Die Elution wurde durch die Veränderung des Brechungsindex der Lösung mittels RI Detektor (RI-101, Shodex) verfolgt. Durch den Vergleich mit dem Elutionsprofil der reinen Essigsäure konnte Acetat dem Peak bei 18,7 min zugeordnet werden und mittels einer Standardgerade konnten die Acetatsmengen der Proben quantifiziert werden.

3.5.3.2 High throughput Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon Analyse (HT-PMP)

Die Monomierzusammensetzung der Polysaccharide wurde nach einer etablierten Methode nach Rühmann *et al.* (Rühmann, Schmid *et al.* 2014; Rühmann, Schmid *et al.* 2015) analysiert. Hierbei wurde die Trennung mittels HPLC, mit UV- und Massenspektroskopieeinheit (ESI-Ionen-Falle; HCT, Bruker) zur Detektion gekoppelt (HPLC-MS). Zur Probenvorbereitung wurde das EPS-Pulver ün in ddH₂O zu einer Endkonzentration von 1 g/L gelöst und am nächsten Tag wurden je 20 µL dieser Lösungen mit 20 µL TFA (4 M) versetzt. Alle Schritte wurden in 96-well PCR-Mikrotiter-Platten (Brand 781350, Wertheim) durchgeführt. Die vollständige Hydrolyse erfolgte bei 121 °C für 90 min im Sandbad. Nach dem Abkühlen der Proben wurden die Proben mit 40-80 µL 3,2 % Ammoniak neutralisiert, wobei die verwendete Menge Ammoniak bei jedem Durchlauf zuvor in 40 µL TFA (2 M) mittels dem Indikator Phenolrot ermittelt worden war. Anschließend wurden die Proben durch die Zugabe von 25 µL Derivatisierungsreagenz (125 mg 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon (PMP), 7 mL Methanol, 437,5 µL 3,2 % Ammoniaklösung, 3,06 mL ddH₂O) und durch Inkubation im PCR-Cycler (100 min, 70 °C; Biorad Mycycler, USA) mit PMP derivatisiert. Zur Analyse der Monomierzusammensetzung wurden je 20 µL des Derivats in 130 µL Essigsäure (19,26 mM) aufgenommen, anschließend in eine 96-well Filterplatte (0,2 µm Supor, Pall Corporation) transferiert und zentrifugiert (2500 g, 5 min, 20 °C, Sorvall, RC 6+ Centrifuge mit SH-3000 Rotor). Abschließend wurde die 96-well-Platte mit einer Silikonmatte (Whatmann 7704-0105, USA) verschlossen und zur Messung in den Autosampler (WPS 3000TRS) gestellt.

Die Standardlösungen A und B (Zusammensetzung s. Tabelle 9) wurden nicht hydrolysiert, jedoch um vergleichende Bedingungen mit den Proben herzustellen, mit der Matrixlösung (4 M Trifluoressigsäure, 3,2 % Ammoniak) versetzt. Die Standards wurden in den Konzentrationen 200 mg/L, 50 mg/L, 40 mg/L, 30 mg/L, 20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 4 mg/L und 2 mg/L vorbereitet.

Tabelle 10: Monomerzusammensetzung und Retentionszeiten der Standards A und B der Gravity C18 Säule (Macherey-Nagel).

Die Retentionszeiten sind von den verschiedenen Chargen der mobilen Phase abhängig und mussten daher von Lauf zu Lauf angepasst werden.

Standard A			Standard B		
Monomer	m/z	Retentionszeit [min]	Monomer	m/z	Retentionszeit [min]
D-(+)-Mannose	511	~ 3,4	D-(+)-Glucuronsäure	525	~ 4,0
D-(+)-Glucosamin	510	~ 4,0	D-(+)-Galacturonsäure	525	~ 4,2
D-(-)-Ribose	481	~ 4,3	D-(+)-Gentobiose	673	~ 4,4
L-(+)-Rhamnose	495	~ 4,3	D-(+)-Lactose	673	~ 5,7
D-(+)-Galactosamin	510	~ 5,1	N-Acetyl-D-(+)-Galactosamin	552	~ 6,3
N-Acetyl-D-(+)-Glucosamin	552	~ 5,6	L-(+)-Arabinose	481	~ 7,1
D-(+)-Cellobiose	673	~ 5,9	L-(-)-Fucose	495	~ 8,3
L-(+)-Glucose	511	~ 6,2			
D-(+)-Galactose	511	~ 6,6			
D-(+)-Xylose	481	~ 7,2			
D-(+)-2-desoxy-Glucose		~ 8,5			
D-(-)-2-desoxy-Ribose		~ 8,7			

Für die Messung wurde eine Gravity C18 Säule (100 mm Länge, 2 mm Innendurchmesser, 1,8 µm Partikelgröße; Macherey-Nagel) auf 50 °C temperiert. Die mobile Phase bestand aus Puffer A (99 % Puffer A (5 mM Ammoniumacetat pH 5,6, 15 % Acetonitril)+ 1 % Puffer B (Acetonitril)) und die Flussrate betrug 0,6 mL/min. Der Gradient zur Elution wurde wie folgt angelegt: Zunächst startete die mobile Phase mit 1 % Puffer B (Acetonitril) und wurde innerhalb von 5 min auf 5 % erhöht. Diese 5 % an Puffer B wurden für 2 min gehalten und dann innerhalb von 1 min auf 18 % erhöht. Der Gradient wurde anschließend innerhalb von 0,3 min auf 40 % erhöht und für 2 min gehalten. Abschließend kehrte die Pufferzusammensetzung in 0,2 min zu den Anfangsbedingungen zurück. Bevor die Probe in die ESI-MS überführt wurde, wurde die Menge 1/20 aufgeteilt (Accurate-Post-Column-Splitter, Dionex). Die Temperatur des Autosamplers wurde auf 20 °C gestellt und das Injektionsvolumen betrug 100 µL. Die Ionenfalle wurde in einem Ultra-Scan-Modus (26000 m/z/s) von 50 bis 1000 m/z durchgeführt. Die automatische Regulierung der Ionenfallen-Füllung (ICC) wurde mit 200.000 Skalenteilen und einer maximalen Akkumulationszeit von 50 ms eingestellt. Die Parameter der Ionenquelle wurden wie folgt festgelegt: Kapillarenstromstärke 4 kV, Trocknungstemperatur 325 °C, Verneblerdruck: 40 psi und Fluss des Trocknungsgases 6 L/min. Es wurde ein Auto-MS-Modus mit einer Zielmasse von 600 m/z und einer MS/MS-Fragmentierungsamplitude von 0,5 V benutzt.

Die Daten wurden mit den Programmen Bruker Hystar, QuantAnalysis und Dionex Chromeleon ausgewertet.

3.5.4 Fluoreszenzspektroskopie

Absorbiert ein Molekül Licht einer bestimmten Wellenlänge wird es von einem energetischen Grundzustand in einen angeregten Zustand transferiert. Durch die Emission eines Photons geschieht die Rückkehr in den Grundzustand. Dieser Vorgang ist als Fluoreszenz messbar.

Die Messungen wurden an einem Fluoreszenzspektrometer infinite M200 (Tecan, Schweiz) in 96 well Fluoreszenzplatten (Nunc, Thermo Fisher) mit 100 µl Zellsuspension in M9-Medium durchgeführt. Die Anregungswellenlänge lag bei 488 nm und die Emission wurde bei 515 nm gemessen. Die Spaltbreite betrug bei Anregung 9 nm und bei Emission 20 nm. Der Verstärkungswert lag bei 50. Es wurden jeweils 3 Messpunkte akkumuliert und gemittelt.

3.5.5 Glucose-Assay

Für die Bestimmung der monomeren Glucose wurden Proben einer Fermentationsbrühe für die Zellabtrennung zentrifugiert (2 min; 10000 rpm; Fresco 21 Centrifuge) und der Überstand auf 1:500 mit ddH₂O verdünnt. Zum Start der Reaktion wurden zu 50 µL dieser Probe 50 µL des vorher hergestellten *Mastermixes* (40 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, 1,5 mM ABTS, 0,4 U Glucoseoxidase und 0,02 U Meerrettichperoxidase) pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 30 °C wurde die resultierende Extinktion bei 418 nm vermessen. Zusätzlich wurde die Absorption des Hintergrundes bei 480 nm abgezogen. Die Standardgerade für die Quantifizierung der Glucosemenge wurde mit einer Achtpunktkalibrierung im Bereich von 2,5 bis 500 µM (Dreifachbestimmung) erstellt.

3.5.6 Phenol-Schwefelsäure-Assay

Je 20 µL der Elutionsfraktion der Gelfiltration zur Auftrennung von EPS wurden in eine 96-well Platte pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 180 µL des *Assay Mastermixes* (30 µL 5 % (w/v) Phenol und 150 µL konzentrierte Schwefelsäure; frisch auf Eis hergestellt) gestartet. Nach einer kurzen Mischung auf einem Schüttler (2 min; 800 rpm; RT) wurde die Platte für 35 min bei 80 °C inkubiert. Abschließend wurde die Extinktion bei 480 nm ermittelt. Zur Quantifizierung der Polysaccharidmenge wurde eine Standardgerade mit acht verschiedenen Konzentrationen des Monomers Glucose (0,05-5 g/L) angefertigt. Diese Punkte wurden in Triplikaten vermessen.

3.5.7 Bildung von Alginate-Gelen

Die Bildung der Alginate-Gele wurde nach der Methode von Draget *et al.* durchgeführt (Draget, Østgaard et al. 1989; Draget, Østgaard et al. 1990), die auf einer internen Diffu-

sion mit ionischen Querverbindungen basiert und somit relativ unabhängig von der Moleküllänge ist. Zur Durchführung mussten 11 mL einer Calciumcarbonatsuspension (15 mM), die als interne Calciumquelle fungiert, in eine Petrischale vorgelegt werden und anschließend unter Schütteln mit 0,11 g Alginatepulver versetzt werden (100 rpm; Thermo Fischer Scientific, MaxQ 2000). Im nächsten Schritt erfolgte durch die Zugabe von 1,1 mL einer 10x Glucono-d-lacton (GDL)-Lösung (320 mM) eine Erniedrigung des pH-Wertes und somit eine Freisetzung von Calciumionen. Die Lösungen wurden zur Gelbildung weitere 30 min leicht geschüttelt (100 rpm; Thermo Fischer Scientific, MaxQ 2000) und abschließend wurde die Gelstärke analysiert.

3.5.8 *In vitro* Epimerisierung von Alginat

Alginat (produziert in *A. vinelandii*) wurde zunächst deacetyliert (s. 3.4.2). Anschließend wurden 4 g/L deacetyliertes Substrat mit 0,5 μ M AlgE4, das in *E. coli* heterolog exprimiert wurde, 10 mM MOPS pH 6,8 und 3 mM CaCl₂ in einem Gesamtvolumen von 250 mL versetzt. Die Reaktionszeit betrug 20 Stunden bei 30 °C. Anschließend folgte die Prozessierung des EPS (s. 3.4).

4 Ergebnisse

4.1 Interkalation des EPS Alginat in *Layered Double Hydroxides*

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits einige Polysaccharide mit dem Ziel der Integration in *Layered Double Hydroxides* (LDH) untersucht (Leroux, Gachon et al. 2004; Darder, López-Blanco et al. 2005). Es zeigte sich bei diesen Experimenten, dass die Interkalation durch elektrostatische Interaktionen zwischen den negativ geladenen Gruppen der Biopolymere und den positiv geladenen LDH-Schichten angetrieben wurde (Leroux, Gachon et al. 2004). Darüber hinaus spielte die Lokalisation der Ladung beim interkalierenden Molekül eine entscheidende Rolle. Eine erfolgreiche Inkorporierung war nur möglich, wenn das Biopolymer anionische Ladungen besaß, die ausreichten die signifikante Menge der positiven Ladungen des LDH-Rahmens zu kompensieren. Zusätzlich war die Interkalation begünstigt, wenn sich die anionische Ladung in der Hauptkette, anstatt in der Seitenkette des Polysaccharides befand (Plank, Ng et al. 2012). Aufgrund dieser Ergebnisse sollten die negativ-geladenen EPS grundsätzlich als stabiles Interkalierungsreagenz fungieren können. Da bis zum Beginn dieser Arbeit jedoch noch keine Kenntnisse über die Bedeutung von Konformation, Molekulargewicht und Monomerzusammensetzung von EPS für die Interkalation vorhanden waren, sollten als erstes Ziel dieser Arbeit weitere Einflüsse für eine stabile Interkalation von EPS in LDHs identifiziert werden.

Da die erfolgreiche Integration des EPS Alginat bereits gezeigt werden konnte (Darder, López-Blanco et al. 2005), die Integrationseffizienz jedoch bis zum Beginn dieser Arbeit nicht mit der Strukturvielfalt von Alginaten in Zusammenhang gebracht werden konnte, wurde zunächst das Ziel verfolgt die Beziehung zwischen Struktur und Integration herauszufinden. Durch Variation der M/G-Monomerzusammensetzung kann bei Alginaten eine hohe Strukturvielfalt erhalten werden. Auf Grund der unterschiedlichen Verteilungen von homopolymeren Blöcken (MM oder GG) und wechselnden M- und G-Residuen (MG), entstehen verschiedene sterische Anordnungen: MM-Blöcke sind linear, während GG-Blöcke helikal angeordnet sind. Alginate mit vielen GG-Blöcken formen in Anwesenheit von bivalenten Kationen Hydrogele, was auf die Ionenbindungsfähigkeit der G-Residuen zurückzuführen ist. Hierbei treten sogenannte Eierschachtel-Modelle auf, d.h. die Verbindungszonen werden von zwei zueinander gerichteten G-Strängen gebildet und jedes Verbindungszion interagiert dabei mit zwei benachbarten G-Monomeren, sowie mit zwei G-Residuen in der gegenüberliegenden Kette (Grant, Morris et al. 1973; Smidsrød, Glover et al. 1973). Neben der Monomerzusammensetzung stellt auch die Variation der Kettenlänge einen Angriffspunkt für die Veränderung der Alginatstruktur

dar. Darüber hinaus können im bakteriell synthetisierten Alginat Acetylierungen der Mannuronsäurereste auftreten, die ebenfalls die Strukturvielfalt erhöhen.

Somit stellen Alginat auf Grund ihrer hohen Anzahl an möglichen Strukturen ein ideales EPS dar, um die strukturbasierte Interkalation in LDHs zu analysieren.

4.1.1 Quantifizierung der Monomierzusammensetzung mittels CD-Spektroskopie

Donati *et al.* veröffentlichten im Jahr 2003 eine Methode, mit der sie erfolgreich die Zusammensetzung von PolyM, PolyG und PolyMG anhand von CD-Messungen bestimmen konnten. In dieser Publikation konnte gezeigt werden, dass die drei möglichen Blöcke (MM, MG oder GG) der Alginatstruktur unterschiedliche CD-Spektren besitzen. Dies ließ sich auf die lokale Ringgeometrie um den Carboxylchromophor, sowie auf einen Effekt der Nachbargruppen zurückführen. Während die MG- und GG-Blöcke eine negative Elliptizität im Bereich von 195-250 nm zeigten, befanden sich die Spektren der MM-Diaden unterhalb 210 nm im Bereich positiver Elliptizität (Donati, Gamini *et al.* 2003). Dies bedeutet, dass die für ein spezifisches Alginat gemessenen Elliptizitäten im Wellenlängenbereich von 210 bis 195 nm umso niedriger sind, je höher der G-Anteil in der Zusammensetzung ist. Dieser Effekt sollte anhand des Kurvenverlaufs des CD-Spektrums einer Alginatprobe bereits eine erste qualitative Bestimmung der Zusammensetzung ermöglichen. Zur quantitativen Bestimmung des Verhältnisses von M/G-Monomeren sollten dann die von Donati *et al.* entwickelten Formeln (s. 3.5.2) unter Berücksichtigung der aus der Literatur bekannten $[\theta]$ -Werte für die MM-/GG- und MG-Diaden bei den beiden Wellenlängen 198 und 207 nm verwendet werden können.

In dieser Arbeit wurde zunächst die veröffentlichte Methode nachgestellt. Aufgrund des Fehlens von Alginatstandards bekannter Zusammensetzung (mit Ausnahme von PolyM) wurden dazu zwei kommerziell erhältliche Alginat unbekannter Zusammensetzung (genannt MC₁ und MC₂) verwendet. Diese Alginat wurden von Braunalgen (*Macrocystis pyrifera*; Sigma Aldrich) produziert und als Feststoff erhalten. Zunächst wurden die beiden Proben \bar{u} N in ddH₂O gelöst. Um ein relativ rauscharmes aber dennoch deutliches Signal zu erhalten, konnte bei Verwendung einer 1 cm Rund-Quarzküvette eine Konzentration von 2 g/L als ideal identifiziert werden. Anschließend wurden jeweils Triplikate eines Spektrums von 190 bis 250 nm aufgenommen, wobei die Elliptizitätswerte bei 198 und 207 nm möglichst exakt bestimmt wurden. Nach Abzug der entsprechenden *blank*-Werte und Berechnung der molaren Elliptizitäten (s.3.5.2) konnten für die Proben MC₁ und MC₂ folgende Kurven erhalten werden (s. Abbildung 10).

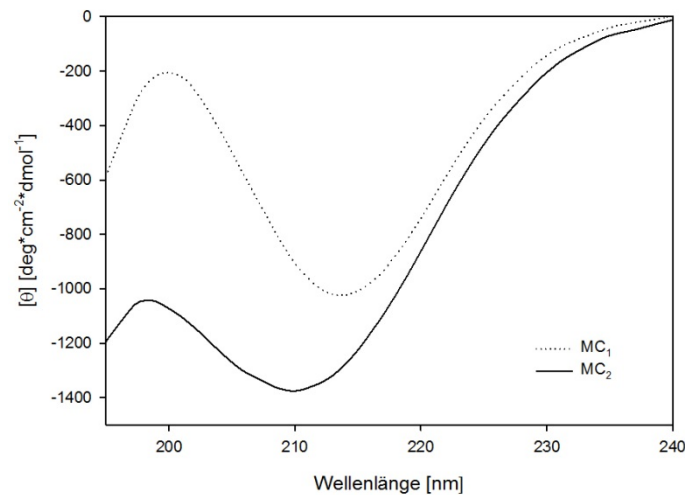


Abbildung 10: CD-Spektren der Alginatvarianten MC₁ und MC₂.

Spektren wurden durch die Anwendung des Loess Algorithmus (*Sampling proportion* 0,1) mit Sigma Plot 12.0 geglättet.

Für MC₁ konnte bei 198 nm eine $[\theta]$ von $-343 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ und für 207 nm eine $[\theta]$ von $-744 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ermittelt werden. Folglich ergab sich ein bestimmter Monomergehalt von 43 % Guluronsäure und 57 % Mannuronsäure. Die Kurve des Alginat MC₂ verlief im kompletten Wellenlängenbereich und besonders im Bereich von 195 bis 210 nm unterhalb von MC₁, was bereits einen höheren Guluronsäureanteil andeutete. Die Berechnungen zeigten, dass die Probe MC₂ aus 73 % G und 27 % M besteht (197 nm = $-1079,6 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$, 207 nm = $-1334,7 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$).

Da die exakte Zusammensetzung beider Alginatvarianten unbekannt war, sollten die durch CD-Spektroskopie erhaltenen Daten anhand der Analyse der Gelbildung qualitativ bestätigt werden (s. 3.5.7). Hierzu wurden je 1 % (w/v) Alginatpulver zu 15 mM CaCO₃ gegeben und die Gelbildung durch die Zugabe von 32 mM Glucono-d-lacton Lösung (GDL) gestartet. Die gebildeten Gele wurden anschließend auf ihre Reißfestigkeit untersucht. Für beide Alginatproben MC₁ und MC₂ konnten (im Gegensatz zur mitgeführten Probe PolyM) Gele gebildet werden (s. Abbildung 11), wobei das Gel der Probe MC₂ eine hohe Stabilität aufwies und als ganzes Stück aus der Petrischale entfernt werden konnte. Bei dem Alginat MC₁ konnte ebenfalls eine Gelbildung beobachtet werden, das Gel zerbrach jedoch beim Entfernen aus der Petrischale.

Da mit PolyM keine Gele gebildet werden können und die Gelstärke mit steigendem G-Gehalt zunimmt (Draget, Østgaard et al. 1990), konnten die Ergebnisse der CD Spektroskopie somit qualitativ bestätigt werden (M/G-Verhältnis des Alginates MC₂ (73 % G laut CD) ist höher als das von MC₁(43 %)). Insgesamt konnte die quantitative Bestimmung der Monomierzusammensetzung von Alginaten erfolgreich etabliert werden.

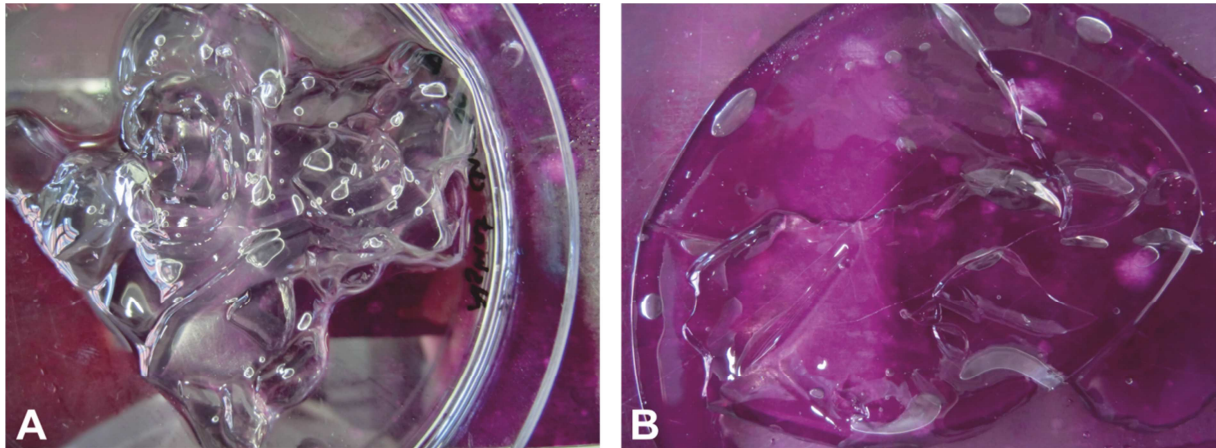


Abbildung 11: Gele von MC₁ und MC₂.

Zu sehen sind die mit der Calciumcarbonatmethode gebildeten Gele.

A) Gel des Alginates MC₁ (43 % G, 57 % M)

B) Gel des Alginates MC₂ (73 % G, 27 % M)

4.1.2 Epimerisierung des EPS Alginat mit der Epimerase AlgE4

Um das Interkalationsverhalten verschiedener definierter Alginat unterschiedlicher Strukturen untersuchen zu können, sollten diese zunächst unter Einsatz einer geeigneten Methode hergestellt werden. Da Struktur und Ausbeute von Alginaten bei Produktion in *A. vinelandii* besser kontrollierbar ist, wurde die bakterielle Synthese der meist verbreiteten Alginateherstellung durch Algen vorgezogen. Das Alginat des Wildtyps zeigte, wie oben beschrieben, keine Gelbildung und bestand somit hauptsächlich aus M-Residuen, die mittels Epimerisierung zu G-Residuen verändert werden können. Folglich wurde in dieser Arbeit für das Ziel der Herstellung unterschiedlich aufgebauter Alginat die enzymatische Epimerisierung dieses Alginats ausgewählt. Der Stamm *A. vinelandii* besitzt natürlicherweise Alginat-C5-Epimerasen, die das M/G-Verhältnis verringern und dadurch strukturelle Veränderungen im Polysaccharid bewirken. Aus diesem natürlichen *Pool* wurde das Enzym AlgE4, das zu der Gruppe der extrazellulären Epimerasen AlgE1-E7 zählt, ausgewählt, da es M-Monomere in MG-Blöcke umwandelt ohne dabei das Polysaccharidrückgrat aufzubrechen.

4.1.2.1 *In vivo* Epimerisierung

Zunächst sollte die Epimerisierung von mikrobiellem Alginat *in vivo* in *A. vinelandii* anhand der plasmidbasierten Überexpression der Epimerase AlgE4 erfolgen.

Klonierung des Expressionsplasmides pJB861-*algE4*

Für die Herstellung des Plasmides pJB861-*algE4* wurde eine PCR mit der gereinigten genomischen DNA von *A. vinelandii* (s. 3.2.2) als Templat und den Primern 5'*algE4*+Ser_AflIII und 3'*algE4*_EcoRI durchgeführt. Auf Grund der sehr GC-reichen Se-

quenz konnte das Gen *algE4* (1670 bp) nur nach umfangreicher Optimierung unter Verwendung der Kombination von 3 % DMSO, G/C-Phusion-Puffer und einer *Annealing*-temperatur von 60,5 °C amplifiziert werden. Dieses PCR-Produkt, das am 5'-Ende zur Vermeidung eines *frameshifts* zusätzlich die codierende Sequenz für Serin enthält, wurde über die Restriktionsschnittstellen AflIII und EcoRI in den Vektor pJB861 inseriert. Nach der Transformation von *NEB Turbo*-Zellen und Ausplattierung auf LB_{Kana}-Agar-Platten wurden positive Klone durch Kolonie-PCR mit vektorspezifischen Primern (5'pJB861_seq und 3'pJB861_seq) ermittelt.

Transformation und Konjugation von *A. vinelandii* mit pJB861-*algE4*

Um das Plasmid in den Stamm *A. vinelandii* zu transferieren, wurden zunächst elektrokompetente Zellen nach der Methode von Koranyi *et al.* hergestellt (s. 3.1.6.3). Für die E-Transformation wurde eine E-Küvette mit einer Spaltbreite von von 1 mm (Puls: 1,8 kV; ca. 5 ms) verwendet. Pro Transformation wurden 100 µl Zellen und 300 ng DNA eingesetzt. Nach der Ausplattierung auf AG_{Kana}-Agar-Platten konnte nach zwei Tagen (30 °C) eine Transformationseffizienz von $6,3 \times 10^3$ cfu/µg DNA(pJB861) und 3×10^3 cfu/µg DNA(pJB861-*algE4*) ermittelt werden. Die erhaltenen Klone wurden für weitere Arbeiten in Flüssigmedium angezogen und als Glycerinkulturen bei -80 °C gelagert.

Eine andere Methode, um das Plasmid in den Stamm *A. vinelandii* zu transferieren, stellte die Konjugation dar. Hierbei wurde eine biparentale Paarung mit dem Donorstamm S17-1 und einer Selektion auf AG_{Kana}-Agar-Platten durchgeführt (s. 3.1.6.4). Nach der Inkubation der Platten für zwei Tage bei 30 °C wuchsen sehr viele, schleimige Kolonien, die auf erfolgreiche Transformation mittels Kolonie-PCR mit den vektorspezifischen Primern überprüft wurden.

Plasmidbasierte *in vivo* Expression von *AlgE4* in *A. vinelandii*+pJB861-*algE4*

Im nächsten Schritt wurde die Expression des Proteins *AlgE4* überprüft. Für eine Testexpression wurde eine Glycerinkultur von *A. vinelandii*+pJB861-*algE4* auf AG_{Kana}-Platten ausgestrichen und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert, um eine 5 mL Vorkultur animpfen zu können. Am darauffolgenden Tag wurden 15 mL AG_{Kana}-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und die Expression nach 5 h mit 1 mM m-Toluat induziert. Die Kultur schüttelte weitere zwei Tage bei 30 °C. Da bekannt war, dass *AlgE4* normalerweise in das Medium sekretiert wird, wurden abschließend die Zellen vom Medienüberstand getrennt und Fraktionen anhand einer SDS-PAGE vergleichend analysiert (s. 3.3.2; s. Abbildung 12). Das Mediumvolumen wurde vor der Gelauftragung mit Hilfe von Ultra Konzentratoren um den Faktor 35 einkonzentriert.

Die SDS-PAGE zeigte, dass im Medium der Expressionskultur bereits ohne Induktion eine starke Bande bei ca. 57 kDa vorhanden ist, die durch Induktion noch verstärkt werden kann. Dies zeigt bereits ohne Induktion eine eindeutige Überproduktion des Proteins AlgE4. Auch innerhalb der Zelle konnte eine große Menge an AlgE4 durch die starke Gelbande nachgewiesen werden.

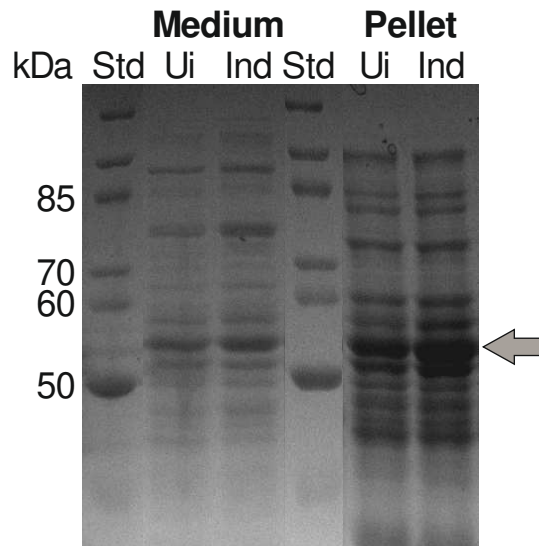


Abbildung 12: Plasmidbasierte *in vivo* Expression im analytischen Maßstab des Proteins AlgE4 durch pJB861-algE4. Ohne Induktion oder Induktion mit 1 mM Toluat.

Die Kultur wurde auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und die Induktion erfolgte nach 5 h mit 1 mM IPTG. Nach weiteren 48 h Inkubation wurden die Zellen vom Überstand getrennt, die Zellen erneut in Wasser resuspendiert und Zelldichten bestimmt, auf $OD_{600} = 1$ verdünnt und jeweils 500 μ L zentrifugiert. Die Pellets wurden in 20 μ L 5x SDS-Probenauftragspuffer resuspendiert und davon je 10 μ L aufgetragen (Pellet *A. vinelandii*+pJB861-algE4 uninduziert=Ui; Pellet *A. vinelandii*+pJB861-algE4 induziert=Ind). Das Medium des Stammes *A. vinelandii*+pJB861-algE4 wurde um den Faktor 35 einkonzentriert (Endvolumen 20 μ L), in 5x SDS-Probenauftragspuffer resuspendiert und davon ebenfalls je 10 μ L aufgetragen (Medium uninduziert=Ui; Medium induziert=Ind). Größe von AlgE4 mit Pfeil dargestellt.

Herstellung von Alginaten und Monomeranalyse mittels CD-Spektroskopie

Das Wachstum des Epimerisierungstamms *A. vinelandii*+pJB861-algE4 auf AG-Platten, sowie im AG-Flüssigmedium war vergleichbar zum Wachstum des Wildtyps. Dennoch konnte aus im Schüttelkolben gezogenen Kulturen des Epimerisierungstamms kein EPS gewonnen werden. Aus diesem Grund wurde *A. vinelandii*+pJB861-algE4, sowie der Wildtyp *A. vinelandii* in einem 2 L-Biostat Fermenter bei 30 °C angezogen. Der DO-Wert wurde während den Fermentationen auf 5 % mit variierender Sauerstoffzufuhr und Rührergeschwindigkeit reguliert, da bei höherer Sauerstoffzufuhr die Aktivität von intrinsischen Alginatlyasen zunimmt (Pena, Trujillo-Roldan et al. 2000; Galindo, Pena et al. 2007). Der pH-Wert wurde konstant auf 7,2 gehalten und 1,2 L AG_{Kana} bzw. AG-Flüssigmedium wurden mit 5 % (v/v) frischer Vorkultur angeimpft. Das Zellwachstum wurde durch Messungen der OD_{600} verfolgt und die Alginatproduktion wurde nach Separierung der Zellen mittels Zentrifugation und anschließender Probefällung mittels Isopro-

panol überprüft. Die Ausbeute an EPS des Stamms *A. vinelandii*+pJB861-*algE4* betrug nach 6 Tagen Kultivierung und einer anschließenden Aufkonzentrierung des Mediums mit Crossflow (s.3.4.4) 2,9 g/L Feststoff. Die finale EPS Ausbeute des Wildtyps, das identisch zum EPS des Epimerisierungstamms isoliert wurde, betrug nach einer Fermentationsdauer von 3 Tagen 4,9 g/L. Die pulverisierten EPS wurden anschließend in Wasser gelöst und durch Dialyse gereinigt (s. 3.4.4). Nach einer erneuten Fällung mit Isopropanol und Mahlen der Polysaccharide (s. 3.4.1, 3.4.3) wurde die Monomierzusammensetzung durch CD-Spektroskopie bestimmt (s. 3.5.2; s. Abbildung 13).

Der Kurvenverlauf beider Spektren ähnelte dem des veröffentlichten PolyM-Spektrums (Donati, Gamini et al. 2003), was darauf hindeutete, dass sich in den Polymeren nur wenige G-Monomere befanden. Mittels Berechnung konnte ein M-Anteil des Polymers des Wildtyps von 97 mol % bestimmt werden. Da dieses EPS auf Grund der bakteriellen Produktion acetyliert war (Sutherland 1990) und das M/G-Verhältnis 97:3 betrug, wird dieses EPS in den folgenden Abschnitten MA973 (A= acetyliert) bezeichnet. Der Kurvenverlauf der EPS-Probe von *A. vinelandii*+pJB861-*algE4* war, wie eingangs erwähnt, dem EPS des Wildtyps sehr ähnlich, seine Kurve verlief jedoch unterhalb von MA973. Das M/G-Verhältnis des Polymers des Epimerisierungstamms konnte dementsprechend auf 95/5 quantifiziert werden, weshalb dieses EPS MA955 (A= acetyliert) bezeichnet wurde.

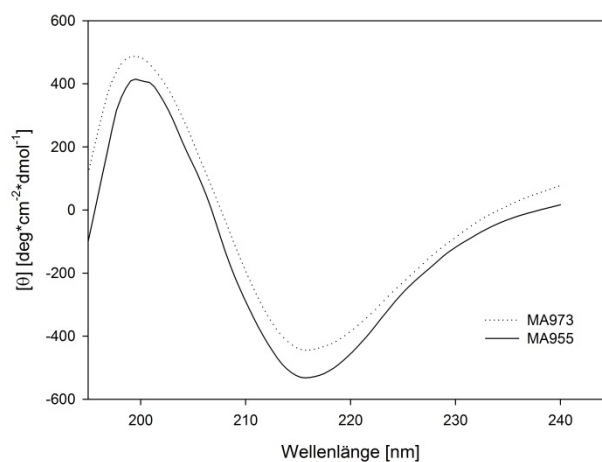


Abbildung 13: CD-Spektren der Alginatvarianten MA973 und MA955.

Spektren wurden durch die Anwendung des Loess Algorithmus (*Sampling proportion* 0,1) mit Sigma Plot 12.0 geglättet.

Neben den durchgeführten Fermentationen bei Standardbedingungen, wurden zur Steigerung des Epimerisierungsgrades und der finalen Ausbeute weitere Fermentationen unter Variation unterschiedlicher Parameter durchgeführt. In der Literatur war bekannt, dass ein DO-Wert von 3 % zwar zu Alginaten mit einem hohen Molekulargewicht führt, höhere Ausbeuten jedoch bei DO-Werten von 5 % möglich sind (Galindo, Pena et al.

2007). Aus diesem Grund wurde die Sauerstoffsättigung bei den Fermentationen in 2 L-Biostat Fermentern zunächst auf einen DO-Wert von 5 % geregelt. Da aber hierbei die Epimerisierung nicht zufriedenstellend war, wurden anschließend verschiedene Variationen des DO-Wertes zur Steigerung des G-Gehaltes der produzierten EPS-Varianten im Rahmen von Parallelfertmentation im DASGIP System (s. 3.1.5.1) untersucht. Da die Epimerase AlgE4 für ihre Aktivität eine hohe Sauerstoffkonzentration benötigt (Sabra, Zeng et al. 2000) wurde der DO-Wert auf 10 % bzw. 20 % erhöht. Zusätzlich war bekannt, dass die Epimeraseaktivität vom Cofaktor Calcium abhängig ist (Larsen und Haug 1971), weshalb einem zusätzlichen Ansatz, bei dem der DO-Wert auf 10 % geregelt wurde, 3 mM CaCl₂ zum Start der Fermentation zugesetzt wurden. Alle Ansätze wurden parallel zum Epimerisierungsstamm ebenfalls mit dem Wildtyp *A. vinelandii* durchgeführt. Nach einer Fermentationsdauer von 3 (Wildtyp) bzw. 6 Tagen (Epimerisierungsstamm) erfolgten Fällungsversuche und abschließende Analysen. In den Fermentern mit einem DO-Wert von 20 % zeigte der Wildtyp kein Wachstum und von der Brühe des dünn gewachsenen Epimerisierungsstamms konnte kein EPS gefällt werden. Reduzierung des DO-Wertes auf 10 % ermöglichte die Isolierung einer geringen Menge EPS (Ausbeute 1 g/L) aus der Fermentationsbrühe des Wildtyps mit einem M/G-Verhältnis von 96/4, was bedeutete, dass die Steigerung der Sauerstoffzugabe zu 1 mol % mehr G-Residuen im EPS führte. Das EPS des Epimerisierungsstamms fiel bei der Isopropanolfällung sehr flockig, was auf Polymer mit kurzer Kettenlänge hindeutete. Die finale Ausbeute war bei diesem Polymer sehr gering (580 mg/L). Durch die darüber hinaus geringe Reinheit, die durch eine Verunreinigung mit einer hohen Proteinmenge verursacht wurde, konnte die Monomierzusammensetzung nicht mittels CD-Messungen quantitativ bestimmt werden. Die Zugabe von 3 mM CaCl₂ zeigte keine Veränderungen sowohl in der Ausbeute, sowie in der Monomierzusammensetzung bzw. der Auswertbarkeit der CD-Spektren. Somit konnte durch die Veränderung der Fermentationsbedingungen kein höherer Epimerisierungsgrad, d.h. G-Gehalt erreicht werden.

4.1.2.2 *In vitro* Epimerisierung

Da *A. vinelandii*+pJB861-*algE4* geringere EPS-Ausbeuten verglichen mit dem Wildtyp zeigte und darüber hinaus nur eine Steigerung von 2 mol % an G mittels der *in vivo* Epimerisierung erreicht werden konnte, sollte die Verringerung des M/G-Verhältnisses über *in vitro* Epimerisierung mit rekombinant exprimiertem AlgE4 erreicht werden. Da durch das Anfügen eines His-*Tags* eine Proteinreinigung über Metallchelate-Affinitätschromatographie möglich ist, sollte zusätzlich AlgE4-His₆ hergestellt werden, um nach erfolgter *in vitro* Epimerisierung eine Entfernung des Proteins mit Hilfe des His₆-*Tags* aus

dem Reaktionsansatz zu ermöglichen, wodurch eine zusätzliche Verunreinigung durch das eingesetzte Enzyme vermieden werden könnte.

Klonierung der Plasmide pET22b(+)-algE4 und pET22b(+)-algE4-His₆

Für die Herstellung der Proteine AlgE4 und AlgE4-His₆ (Konstrukt mit C-terminalem His₆-tag) wurde zunächst eine PCR mit der gDNA von *A. vinelandii* als Templat und mit den Primern 5'algE4_NdeI und 3'algE4_Stopp_XhoI bzw. 3'algE4_XhoI durchgeführt. Variation verschiedener Additive und *Annealing*temperaturen ergaben spezifische PCR-Produkte bei Zugabe von 3 % DMSO und einer *Annealing*temperatur von 60 °C. Die PCR-Produkte wurden nach Reinigung über die Restriktionsschnittstellen NdeI und EcoRI in den Vektor pET22b(+) inseriert. Nach der chemischen Transformation von *DH5α*-Zellen und Ausplattierung auf LB_{Amp}-Agar-Platten wurden positive Klone für die jeweiligen Konstrukte durch Kolonie-PCR mit vektorspezifischen Primern (T7-Promotor; T7-Terminator) ermittelt und zur Überprüfung sequenziert.

Expression im analytischen Maßstab von AlgE4 und AlgE4-His₆

Um die heterologe Expression der Proteine durch die erstellten Konstrukte zu überprüfen und das Expressionslevel zu vergleichen, wurden zunächst Expressionen im analytischen Maßstab durchgeführt. Hierzu wurden die Vektoren pET22b(+)-algE4 und pET22b(+)-algE4-His₆ Einzelanalysen unterzogen.

Für die Testexpressionen wurden chemisch kompetente *BL21(DE3)*-Zellen mit den Konstrukten pET22b(+)-algE4 und pET22b(+)-algE4-His₆ transformiert, um im Anschluss eine 5 mL LB-Vorkultur mit 5 µL dieses Transformationsansatzes inokulieren zu können. Am nächsten Tag wurden 15 mL LB_{Amp}-Flüssigmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Expression wurde mit 0,5 mM bzw. 1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,6 induziert, wobei Proben vor der Induktion (t₀) und drei Stunden nach der Induktion entnommen wurden. Anschließend wurde die Menge der exprimierten Proteine AlgE4 und AlgE4-His₆ anhand von SDS-PAGE analysiert. Als Negativkontrolle wurden ebenfalls chemisch kompetente *BL21(DE3)*-Zellen mit dem Leervektor pET22b(+) transformiert und entsprechend behandelt (s. Abbildung 14).

Laut den Berechnungen des ProtParam *tools* besaßen die Proteine AlgE4 und AlgE4-His₆ eine Masse von 58 bzw. 59 kDa. Durch die SDS-PAGE war zu erkennen, dass eine deutliche Überexpression von AlgE4 und AlgE4-His₆ stattgefunden hatte, jedoch die Proteingrößen nicht den berechneten Werten entsprachen. Die überexprimierten Proteine zeigten eine Größe von ca. 80 kDa, was allerdings den publizierten Daten von Hoidal *et al.* entspricht (Hoidal, Ertesvag *et al.* 1999). Hoidal *et al.* fanden, dass in

E. coli bei plasmidbasierter Überexpression von *algE4* vier Banden in der SDS-PAGE auftraten (bei 79, 74, 68 und 58 kDa), wobei das aktive Enzyme eine Bande der Masse von 79 kDa zeigte. Beide Konstrukte führten somit zu einer eindeutigen Überexpression der aktiven Enzyme. Die Proteinmengen waren unabhängig von der eingesetzten Konzentration des Induktionsmittels (0,5 oder 1 mM), weshalb die folgenden Expressionen mit 0,5 mM IPTG durchgeführt wurden.

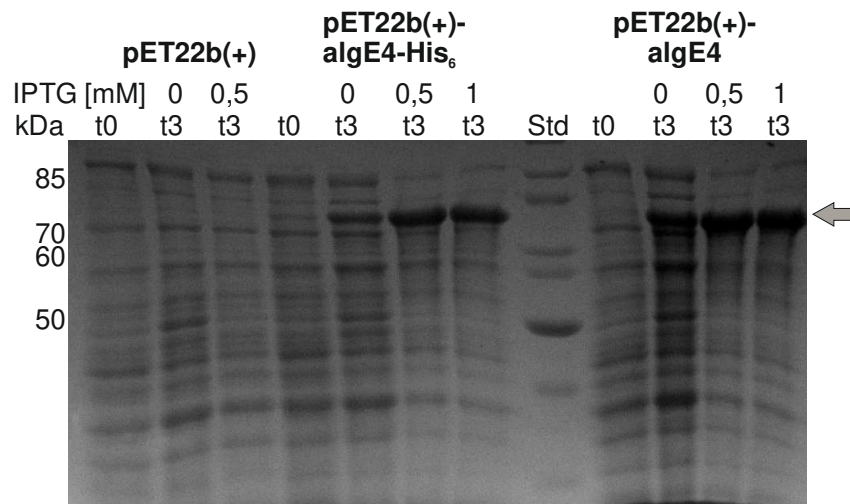


Abbildung 14: Expression im analytischen Maßstab der Proteine AlgE4 und AlgE4-His₆ durch pET22b(+)-Vektoren mit der Negativkontrolle des Leervektors pET22b(+). Induktion mit 0, 0,5 oder 1 mM IPTG.

Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C geschüttelt. Die Induktion erfolgte mit 0,5 mM oder 1 mM IPTG. Es wurden jeweils Proben vor der Induktion (t0), sowie drei Stunden nach Induktion entnommen (t3). Zusätzlich wurden Zellen, die nicht induziert wurden (0t3), zeitgleich mit t3 geerntet. Die Zelldichten der entnommenen Proben wurden bestimmt, auf OD₆₀₀ = 1 verdünnt und jeweils 500 µL zentrifugiert. Die Pellets wurden in 20 µL 5x SDS-Probenauftragspuffer resuspendiert und davon je 10 µL aufgetragen. Größe von aktivem AlgE4 mit Pfeil dargestellt.

Expression und Reinigung im präparativen Maßstab der rekombinanten Proteine AlgE4 und AlgE4-His₆ im pET22b(+)-System

Um eine ausreichende Menge der Proteine AlgE4 und AlgE4-His₆ für spätere Analysen zu erhalten, wurden transformierte *BL21(DE3)*-Zellen in 1 L LB_{Amp}-Flüssigmedium kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 0,5 mM IPTG induziert.

Nach dem Ernten der Zellen wurden diese in 25 mL 50 mM MOPS, pH 6,9 mit 1 mM CaCl₂ und einer Spatelspitze DNaseI und MgSO₄ resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen (s. 3.3.3.1). Anschließend folgte die Reinigung des Proteins AlgE4-His₆ mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (s. 3.3.3.2) und des Proteins AlgE4 mittels Ionenaustauschchromatographie nach der Methode von Hoidal *et al.* (s. 3.3.3.3) (Hoidal, Ertesvag *et al.* 1999). Nach Vereinigung weitgehend sauberer Fraktionen erfolgte ein Pufferaustausch mittels Gelfiltration (s. 3.3.3.4). Der Laufpuffer setzte sich hierbei aus 10 mM MOPS, pH 6,9 und 5 mM CaCl₂ zusammen. Abschließend wur-

den die Proteinlösungen AlgE4-His₆ auf 3 mL (AlgE4-His₆) bzw. 12 mL (AlgE4) durch Zentrifugation (s.3.3.4) konzentriert.

Insgesamt konnten so 4,8 mg AlgE4-His₆ und 10 mg AlgE4 isoliert werden. Trotz identischer Expressionsstärke war die Proteinausbeute mit C-terminalem His₆-tags um mehr als die Hälfte reduziert. Es konnte jedoch sauberes Protein mit nur einer Bande in der SDS-PAGE erhalten werden, während die mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigte Probe Proteine mit Banden bei 79 und 58 kDa, sowie weitere Verunreinigungen enthielt (s. Abbildung 15).

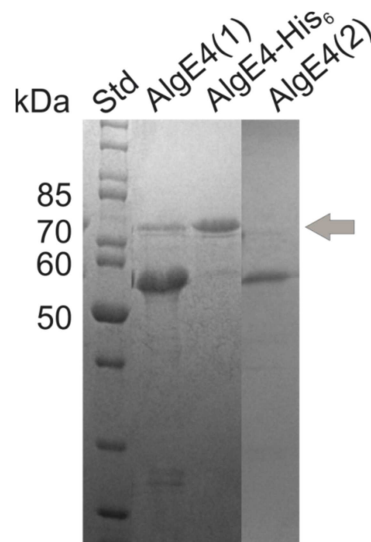


Abbildung 15: SDS-PAGE der gereinigten Proteine AlgE4-His₆ und AlgE4.

Aufgetragen sind vereinte Fraktionen von AlgE4 nach der Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (AlgE4(1) enthält Protein mit 79, 58 kDa und Verunreinigungen; AlgE4(2) enthält Protein mit 58 kDa), sowie von AlgE4-His₆ nach Aufreinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (AlgE4-His₆ enthält Protein mit 80 kDa); Größe von aktivem AlgE4 mit Pfeil dargestellt.

Funktionelle Charakterisierung von AlgE4 und AlgE4-His₆ via CD-Spektroskopie

Zur funktionellen Charakterisierung der gereinigten Proteine wurde eine *online*-Bestimmung der Epimerisierung von Alginaten anhand des mittels CD-Spektroskopie bestimmten M/G-Verhältnisses angestrebt. Hierzu mussten wie in 4.1.1 die Elliptizitäten bei 198 und 207 nm möglichst exakt bestimmt werden, wozu das Rauschen des Signals bei diesen Wellenlängen minimiert werden sollte.

Høidal *et al.* verfolgten Epimerisierungen mittels ¹³C NMR-Spektroskopie in einem Gesamtvolumen von 6 mL mit 1,5 mM Ca²⁺, 10 mM MOPS pH 6,8, 1,15 μM AlgE4 und 6,7 g/L Substrat, was als Grundansatz für die Bestimmung der Epimerisierung von Alginaten via CD-Spektroskopie benutzt wurde. Da dieser Reaktionsansatz keine exakte Analyse mittels der Elliptizität auf Grund des hohen Rauschsignals <210 nm zuließ, musste die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes optimiert werden. Für die Bereitstellung des Cofaktors Ca²⁺ wurde die Konzentration von CaCl₂ auf 3 mM erhöht, da die-

se Lösung im Bereich <200 nm kaum absorbierte und folglich das Rauschsignal nicht beeinflusst wurde. Da MOPS Puffer eine hohe Absorption aufwies, wurde versucht diesen Puffer durch den besser für CD-Spektroskopie geeigneten Puffer KP zu ersetzen (Greenfield 2007). Da jedoch Calciumphosphat durch die Verwendung des KP-Puffers präzipitierte, wurde weiterhin MOPS-Puffer für die Bestimmung des Epimerisierungsgrades von Alginat mittels CD-Spektroskopie verwendet. AlgE4 zeigte eine hohe Absorption bei 198 und 207 nm und verursachte damit ein starkes Rauschen. Aus diesem Grund wurde die Konzentration von AlgE4 auf $0,5 \mu\text{M}$ reduziert, da bei dieser eingesetzten Enzymmenge der Reaktionsumsatz nur mäßig verringert wurde. Die letzte Optimierung des Reaktionsansatzes bezog sich auf die Substratmenge, die das Signal-/Rauschverhältnis bestimmt. Hierzu wurden in einen $1,5$ mL Reaktionsansatz 1 bis 24 mg PolyM (entsprach $0,66$ - 16 g/L; Probe wurde von I. Donati zur Verfügung gestellt) eingesetzt und für 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Elliptizitäten bestimmt und die molaren Elliptizitäten (s.3.5.2) berechnet (s. Abbildung 16).

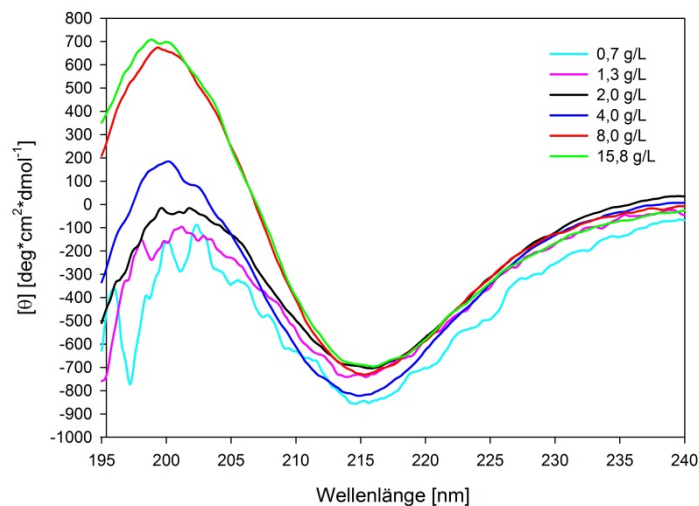


Abbildung 16: CD Spektren der Epimerisierungsreaktion mit AlgE4 der Probe PolyM in verschiedenen Konzentrationen.

Es wurden jeweils 10 mM MOPS, pH $6,9$ mit 3 mM CaCl_2 , $0,5 \mu\text{M}$ AlgE4 und Substratkonzentrationen (PolyM) von $0,7$ bis $15,8$ g/L. Die Reaktionsdauer betrug 24 h. Glättung (*sm25*) erfolgte mit der Software Spectra Manager Version 2.06 (JASCO Corporation).

Hierbei war den Spektren zu entnehmen, dass $0,7$ g/L ein sehr verrauschtes und nicht auswertbares CD-Signal auf Grund einer zu geringen Menge an Substrat zur Folge hatte. 2 g/L PolyM bewirkten ein verringertes Rauschsignal, wobei die Epimerisierung im Vergleich zu den anderen Substratmengen am weitesten fortgeschritten war. Ab 8 g/L Substrat im Ansatz trat keine Reaktion auf.

Folglich wurden anschließend standardmäßig 3 mM CaCl_2 , 10 mM MOPS pH $6,9$, $0,5 \mu\text{M}$ AlgE4 und 2 g/L Substrat verwendet, wobei zunächst drei Proteinlösungen ($1\times$ AlgE4-His₆ und $2\times$ AlgE4; s. Abbildung 15) anhand des etablierten Assays auf ihre

Aktivität mit dem Substrat OligoM untersucht wurden. Die Proben wurden bei Reaktionsstart (t_0) und nach 3 Tagen Inkubation (t_{3d}) bei 37 °C mit CD-Spektroskopie vermessen und die molaren Elliptizitäten berechnet (s. Abbildung 17).

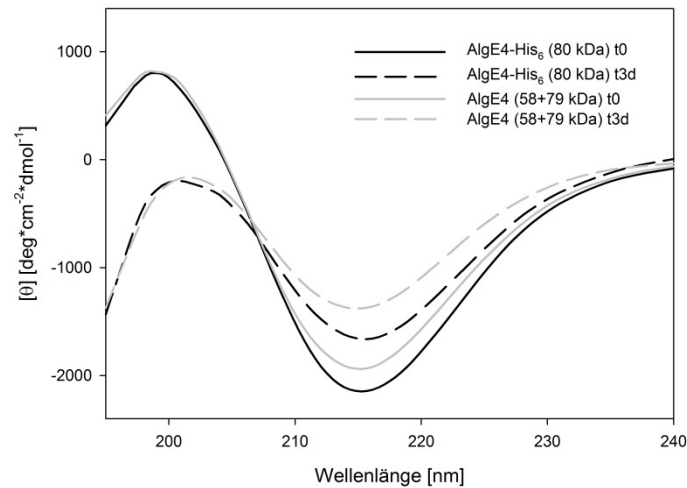


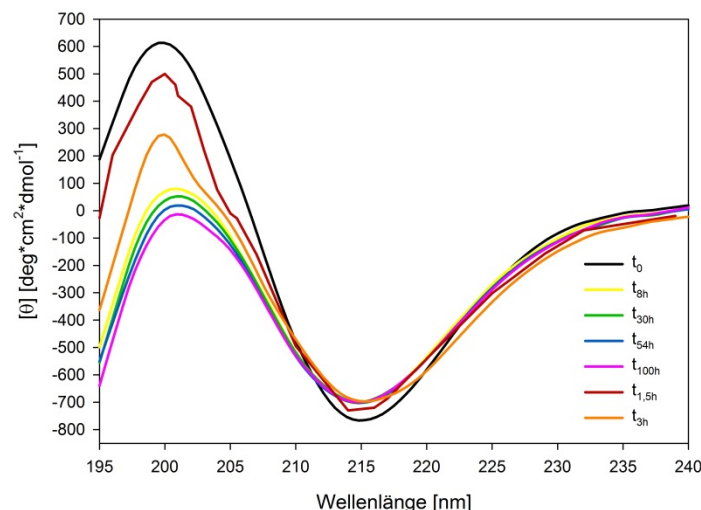
Abbildung 17: CD Spektren der Epimerisierungsreaktion mit AlgE4 (58 + 79 kDa) und AlgE4-His₆ (80 kDa) der Probe OligoM.

Es wurden jeweils 10 mM MOPS, pH 6,9 mit 3 mM CaCl₂ verwendet und Proben vor der Enzymzugabe (0,5 μM AlgE4-His₆ oder AlgE4, t_0) und nach einer Reaktionsdauer von 3 Tagen (t_{3d}) vermessen. Als Substrat wurden 2 g/L OligoM eingesetzt. Spektren wurden durch die Anwendung des Loess Algorithmus (Sampling proportion 0,1) mit Sigma Plot 12.0 geglättet.

Laut der CD-Spektren war die Enzymaktivität von AlgE4 (58 und 79 kDa) ähnlich der Aktivität von AlgE4-His₆, da die Elliptizität von beiden t_{3d} Proben im Bereich von 190-210 nm identisch abnahm. Die Epimerisierung erreichte mit diesen Enzymproben jeweils den gleichen Endpunkt. In der Kurve von AlgE4, das nur aus dem Protein mit 58 kDa bestand, konnte keine Epimerisierung nachgewiesen werden, da das Spektrum vom Zeitpunkt t_3 dem Spektrum vom Startpunkt t_0 entsprach (Daten nicht gezeigt). Auf Grund dieses Versuches konnte bestätigt werden, dass nur das Protein mit 79 kDa der aktiven Variante entsprach und zudem, dass das Anfügen des His-*tags* die Aktivität nicht verminderte, weshalb anschließend die Entfernung des Proteins AlgE4-His₆ aus dem Epimerisierungsreaktionsansatz angestrebt wurde. Anhand von UV-Messungen bei 280 nm musste leider festgestellt werden, dass auf Grund des durch die Epimerisierung steigenden Anteils an G und der daraus resultierenden Zähflüssigkeit der Reaktionsansätze die Entfernung des Enzyms mittels Nickel *Magnetic beads* (28 mg/mL; Millipore) nicht erfolgreich war. Somit konnte zwar gezeigt werden, dass AlgE4-His₆ sauber gereinigt werden kann und der zusätzliche His-*tag* keine Aktivitätsverluste bewirkt, da jedoch keine Entfernung des Proteins nach Abschluss der Epimerisierung möglich war, wurden weitere Schritte dieser Arbeit mit dem unmodifizierten AlgE4 durchgeführt.

Zunächst wurde die enzymatische Umwandlung von M zu G des Substrats OligoM (Polymerisierungsgrad von 5-20) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Zugabe von AlgE4 durch die Veränderung des CD-Spektrums *online* verfolgt (s. Abbildung 18, s. Tabelle 11).

Tabelle 11: M/G-Verhältnisse von Alginaten vor und nach Zugabe von AlgE4 zu OligoM bis zur Reaktionszeit von 100 h.



Probe	M [mol %]	G [mol %]
t0h	100	0
t1,5h	89	11
t3h	87	13
t8h	82	18
t30h	79	21
t54h	78	22
t100h	78	22

Abbildung 18: CD Spektren der *online* Epimerisierungsreaktion von OligoM mit AlgE4.

Es wurden jeweils 10 mM MOPS, pH 6,9 mit 3 mM CaCl₂ verwendet und Proben vor der Enzymzugabe (0,5 µM AlgE4; t₀) und nach bestimmten Zeitintervallen (1,5 h = t_{1,5h}; 2 h = t_{2h}; usw.) vermessen. Als Substrat wurden 2 g/L OligoM eingesetzt. Spektren wurden durch die Anwendung des Loess Algorithmus (Sampling proportion 0,1) mit Sigma Plot 12.0 geglättet.

Die Epimerisierungsrate M zu G war in den ersten 1,5 Stunden am höchsten und nahm dann mit der Zeit ab. Ab einer Reaktionszeit von 8 h trat nur noch eine geringe weitere Epimerisierung auf und nach 54 h stagnierte das M/G-Verhältnis. Die maximale Umwandlung von OligoM führte zu einer M/G-Zusammensetzung von 78/22. Da die AlgE4 Epimerase nur an mindestens hexameren OligoM Substraten angreifen kann (Holtan, Bruheim et al. 2006), war aufgrund der Kettenlängenverteilung des verwendeten Substrates ein maximaler Epimerisierungsgrad von 22 % nicht zu übertreffen. Aufgrund der relativ kurzen Alginatketten des Substrats trat während der Reaktion keine Zunahme der Viskosität auf und der Reaktionsverlauf wurde nicht durch eine mögliche Verhinderung der Diffusion limitiert. Zusätzlich konnte durch die Inkubation von OligoM unter entsprechenden Reaktionsbedingungen ohne Zugabe von AlgE4, ausgeschlossen werden, dass es innerhalb der untersuchten Zeit (100 h) spontan zu einer Epimerisierung kommt (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes wurde das EPS PolyM (Probe wurde von I. Donati zur Verfügung gestellt) epimerisiert, um den Einfluss der Kettenlänge und eine mögliche Erhöhung der Viskosität untersuchen zu können. Hierzu wurde ein Reaktionsansatz wie oben beschrieben für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend einer CD-Messung unterzogen (s. Abbildung

19). Parallel dazu wurde derselbe Reaktionsansatz, jedoch mit Zugabe von 0,1 M NaCl, angesetzt. NaCl vermindert das Gelieren der Probe, das auf Grund der Komplexbildung mit Calciumionen bei zunehmenden G-Anteil auftritt (Hoidal, Ertesvag et al. 1999). Da dieses Salz leider auch das Rauschen der CD-Spektroskopie beeinflusste, konnte es nur in geringen Konzentrationen der Proben zugesetzt werden.

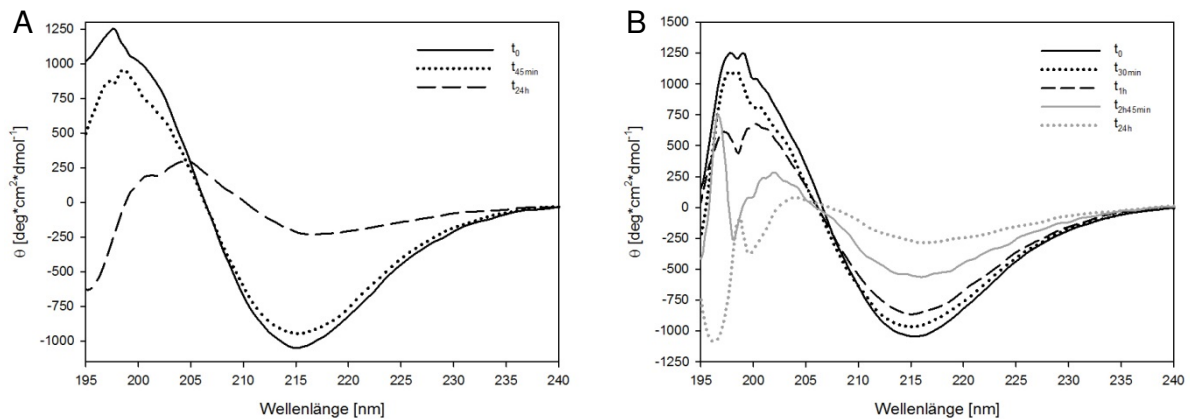


Abbildung 19: CD Spektren der *online* Epimerisierungsreaktion mit AlgE4 der Probe PolyM.

Es wurden jeweils 10 mM MOPS, pH 6,9 mit 3 mM CaCl_2 verwendet und Proben vor der Enzymzugabe ($0,5 \mu\text{M}$ AlgE4; t_0) und nach bestimmten Zeitintervallen (45 min = $t_{45\text{min}}$; 24 h = $t_{24\text{h}}$; usw.) vermessen. Als Substrat wurden 2 g/L PolyM eingesetzt. Spektren wurden mittels der Software Spectra Manager Version 2.06 (JASCO Corporation) geglättet (smooth 25). **A)** Reaktionsansatz ohne NaCl; **B)** Reaktionsansatz mit 0,1 M NaCl

Ohne Zugabe von NaCl gelierte die Probe bereits nach 15 min, weshalb die Diffusion der Reaktionskomponenten nur eingeschränkt möglich war. Dies führte dazu, dass die quantitative Auswertung der Spektren nur mittels Glättung möglich war (*smooth 25*). Der M-Anteil lag nach 45 min noch bei 94 mol %. Bei der Probe, die während der Reaktion bereits NaCl enthielt, bildete sich ebenfalls ein Gel, aber mit geringerer Viskosität und die Lösung konnte noch gut pipettiert werden. Auf Grund des hohen Salzanteiles konnte nur eine qualitative, jedoch keine quantitative Auswertung der Monomierzusammensetzung des Alginates durchgeführt werden. Beim Vergleich beider Spektren ist erkennbar, dass die Epimerisierung des PolyMs mit NaCl weiter fortgeschritten war, da die Elliptizitäten der Kurve $t_{24\text{h}}$ vollständig im negativen Bereich lagen. Hierbei wurden circa 35 mol % zu G umgewandelt, was durch den Kurvenverlauf abgeschätzt werden konnte. Somit stellte die Gelbildung einen limitierenden Faktor der Epimerisierungsreaktion dar, da unter Bedingungen, die eine Gelbildung reduzierten, circa 30 mol % mehr G in der Struktur nachgewiesen werden konnten. Zusätzlich konnte, wie erwartet, durch die Erhöhung des Polymerisationsgrades die Epimerisierung um circa 13 mol % gesteigert werden. Das theoretische Maximum von 50 mol % G konnte jedoch nicht erreicht werden.

Herstellung von MEP82

Für spätere Charakterisierungen und Anwendungen der Produkte der Epimerisierung, musste der Reaktionsansatz vergrößert werden, um mindestens 3 g sauberes, epimerisiertes Alginatpulver zu erhalten. Da das EPS zur Abtrennung aus dem Reaktionsansatz gefällt werden sollte, war es nötig, das Reaktionsvolumen trotz *Up-scaling* gering zu halten, um so sowohl den Verbrauch an Isopropanol minimieren zu können, als auch die Ausbeute des Polysaccharides zu erhöhen. Da die zur Verfügung stehende Substratmenge an PolyM zu gering für weitere Epimerisierungen war, wurde MA973 (s. 3.1.5.2) verwendet. Für die Epimerisierung wurden 4 g/L vorher deacetyliertes MA973 (s. 3.4.2) mit 0,5 μM AlgE4 (heterolog in *E. coli* exprimiert) in 10 mM MOPS, pH 6,8 und 3 mM CaCl_2 in einem Gesamtvolumen von 250 mL eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 20 Stunden und das EPS wurde anschließend isoliert und aufgereinigt (Entsalzung durch Dialyse, Fällung und Mahlen). Dieses epimerisierte Alginat besaß laut CD-Spektrum 82 mol % M und 18 mol % G (s. Abbildung 20) und wurde deshalb im Folgenden MEP82 genannt.

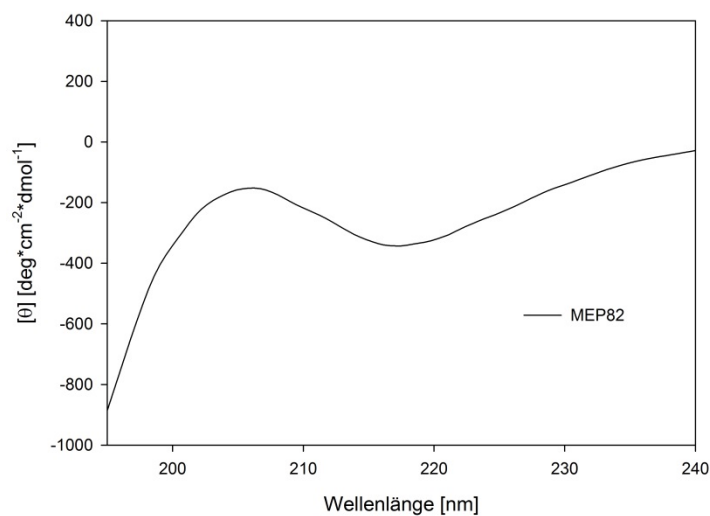


Abbildung 20: CD-Spektren der Alginatvariante MEP82

Spektrum wurde durch die Anwendung des Loess Algorithmus (Sampling proportion 0,1) mit Sigma Plot 12.0 geglättet.

4.1.3 Charakterisierung und Anwendung verschiedener Alginat

Um die Interkalationseigenschaften von verschiedenen Alginatvarianten zu testen, wurden das kommerziell erhältliche OligoM (OM100) und ein kommerzielles Alginat, das in Algen produziert wurde und 43 mol % M in seiner Struktur besaß ($\text{MC}_1=\text{MC}_{43}$), benutzt. Außerdem wurden die Varianten MA973 und MD955 für Interkalationsversuche verwendet. Anhand von MD955, das durch Deacetylierung (s. 3.4.2) von MA955 hergestellt wurde, konnte der Einfluss der Acetylierung bzgl. der Interkalation bestimmt werden. Die fünfte auserwählte Variante MEP82 befand sich auf Grund deren Monomierzusammen-

setzung zwischen den Varianten MD955 und MC43 und wodurch eine geeignete Probe für den Vergleich der LDH-Interkalation, die abhängig von der räumlichen Anordnung des Interkalates war, dar. Die M/G-Verhältnisse, die, wie oben beschrieben, durch CD-Spektroskopie bestimmt wurden, sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: M/G-Verhältnisse der verschiedenen Alginatvarianten.

Variante	M [mol %]	G [mol %]
oligo Mannuronsäure, kommerziell; OM100	100	0
acetyliertes Alginat, synthetisiert; MA973	97	3
deacetyliertes Alginat, synthetisiert; MD955	95	5
epimerisiertes, deacetyliertes Alginat, synthetisiert; MEP82	82	18
algenproduziertes Alginat, kommerziell; MC43	43	57

4.1.3.1 Bestimmung des Acetylierungsgrades von Alginat

Für die Bestimmung des Acetylierungsgrades wurden die Proben MA973 und MD955 zunächst für 2 h bei 80 °C chemisch hydrolysiert und anschließend für die Analyse mittels HPLC neutralisiert (s. 3.5.3.1). Der Acetatpeak besaß typischerweise eine Retentionszeit von 18,7 min (siehe Anhang) und konnte anhand einer Kalibrierung mit Essigsäure als Standard quantifiziert werden.

Für die Probe MA973 konnte ein Acetylierungsgrad von 4,9 % (w/w) (entspricht 19,2 mol %) bestimmt werden, während das Chromatogramm der Probe MD955 nur Spuren an Acetat zeigte, die nicht quantifiziert werden konnten. Anhand der Bestimmung des Acetatgehalts konnte somit gezeigt werden, dass die chemische Deacetylierung erfolgreich war. Die Probe MA973 weist mit einem Acetylierungsgrad von 4,9 % (w/w) einen relativ niedrigen Wert im Vergleich zu anderen bakteriell produzierten Alginaten auf (Literaturwert von 1,4-19,4 % (w/w) bzw. 5,5-75,9 mol %) (Skjak-Braek, Grasdalen et al. 1986; Sutherland 1990; Sutherland 1996).

4.1.3.2 Größenbestimmung der Alginate mittels GPC Messungen

Abschließend wurden Molekulargewichte verschiedener Alginate durch GPC-Analysen bestimmt (s. 3.5.1), wobei das Polysaccharid Pullulan als interner Standard ($M_p(\text{Peak molecular weight}) = 342 \text{ Da} - 2350 \text{ kDa}$) benutzt wurde. In Abbildung 21 sind die GPC-Chromatogramme und in der Tabelle 13 die berechneten Molekulargewichte der verschiedenen Varianten dargestellt. Die Alginate besaßen Molekulargewichte von 5-600 kDa. Die Variante MEP82 hatte dasselbe M_w verglichen mit MA973, woraus ersichtlich ist, dass die beiden *in vitro* Modifikationen Deacetylierung und Epimerisierung, keine Änderungen der Moleküllänge der Hauptfraktion verursachten. MD955 zeigte neben der Hauptfraktion allerdings einen geringen Anteil an niedermolekularen Spezies.

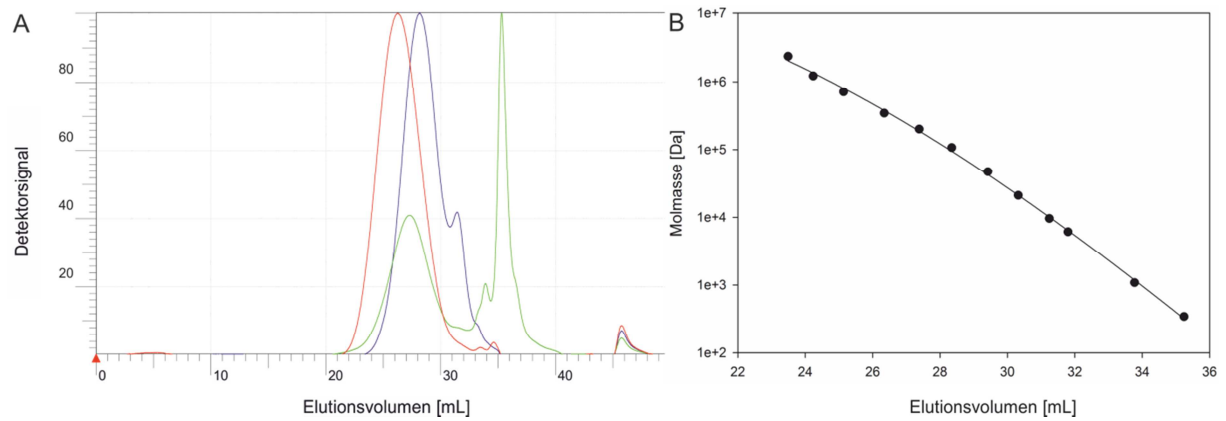


Abbildung 21: GPC Chromatogramme der verschiedenen Alginatevarianten zur Bestimmung des Molekulargewichtes, sowie Kalibriergerade mit Pullulan.

A) Elutionsprofile der Varianten MC43 (rot), MA973 (blau) und MD955 (grün), aufgenommen mittels RI-Detektor.

B) Kalibriergerade mit Pullulan für die Bestimmung der Molekulargewichte verschiedener Alginatvarianten. Fit-Typ: Polynominal 5; R:0,9995

Tabelle 13: Verschiedene Molekulargewichte der Alginatevarianten.

Variante	M _w [Da]
OM100	<5000
MA973	169910
MD955	328935
MEP82	~170000
MC43	626907

4.1.3.3 Interkalationen verschiedener Alginat in Zn₂Al-LDHs

Um den Einfluss verschiedener M/G-Verhältnisse auf die Interkalationseigenschaften verschiedener Alginat in Zn₂Al-Schichten zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Bauchemie von Prof. Johann Plank, TU München, Experimente durchgeführt.

Layered double hydroxides (LDHs) können als Wirtsmatrix für die Interkalation von organischen Polymeren dienen, um dadurch organisch-nicht-organische Nanocomposite zu synthetisieren. Lamellenförmige LDH Strukturen werden dabei generell als über Ecken verbundene, achtförmige Platten angesehen, in denen bivalente Kationen durch trivalente Kationen ersetzt werden (Brindley und S. 1979).

Für die LDH Wirtsstruktur der Polysaccharidintegration wurde das Zn-Al-LDH System benutzt. Die Fähigkeit der Interkalation dieser Polymerproben mit hohen Molekulargewichten in die Zn₂Al-LDH Strukturen wurde durch eine Kopräzipitation-Synthesemethode untersucht, die am Lehrstuhl für Bauchemie durchgeführt wurde (Plank, Ng et al. 2012; de Reese, Sperl et al. 2015). Da in der Publikation Plank *et. al* beschrieben werden konnte (Plank, Ng et al. 2012), dass die anionische Ladung der Polysaccharide die wichtigste treibende Kraft für die Interkalation darstellt, wurden zunächst die anionischen La-

ladungsdichten der verschiedenen Alginatvarianten bestimmt (durchgeführt am Lehrstuhl für Bauchemie). Die gemessenen Werte der Ladungsmengen der Alginatproben betragen 2866 – 5575 $\mu\text{eq/g}$, was relativ hohen anionischen Ladungsdichten entsprach. Diese resultieren aus den zugänglichen Carboxylgruppen der Mannuron- und Guluronsäuren. Anschließend wurden die anionischen Polysaccharide in die LDH Strukturen inkorporiert und mittels Weitwinkelröntgenstreuung (WAXS) charakterisiert (durchgeführt am Lehrstuhl für Bauchemie). Für alle Alginate konnte eine erfolgreiche Integration auf Grund der vergrößerten Abstände der Zwischenschichten bewiesen werden. Da die Dicke der inorganischen Phasen 0,48 nm betrug, konnten durch Subtraktion dieses Wertes von den gemessenen Werten mittels WAXS die Zwischenschichtenabstände der Zn_2Al -Alginat-LDHs berechnet werden (s. Tabelle 14).

Tabelle 14: Verschiedene Abstände der Zwischenschichten für Zn_2Al -Alginat-LDHs der Alginatvarianten.

Variante	Abstände der Zwischenschichten [nm]
OM100	0,80
MA973	1,24
MD955	1,00
MEP82	1,16
MC43	1,37

Die Abstände der Zwischenschichten betrugen zwischen 0,8 und 1,37 nm und zeigten, dass der Anteil an Guluronsäure in der Monomierzusammensetzung einen entscheidenden Einfluss hatte: Je höher der G-Anteil war, desto weiter waren die Schichten voneinander entfernt. Darüber hinaus konnten basierend auf den maximalen Expansionen der Monomere von 0,47 nm für die Mannuronsäure und 0,62 nm für die Guluronsäure, die Konformationen der Alginate innerhalb der Wirtstrukturen festgelegt werden (s. Abbildung 22).

Für OM100 konnte fast die doppelte Distanz der Mannuronsäure (0,8 nm) beobachtet werden. Deshalb konnte das Auftreten einer Doppelschicht von OM100, die über Wasserstoffbrücken fixiert ist, vermutet werden. Die Interkorporation der Probe MD955 wies einen Abstand der Schichten von 1 nm auf, was auf die Anordnung von gestaffelten Doppelschichten schließen lässt. Bei den Varianten MEP82 und MC43 verursachten die beiden Stufen der G-Ketten, die in diesen Molekülen auftraten, eine Schichtdistanz, die um das doppelte verglichen mit der Höhe der Guluronsäure stieg.

Einen großen Einfluss besaßen die Acetatgruppen der Probe MA973: Diese Alginatvariante interkalierte in einer hoch gedehnten Konformation, weil die acetylierten Hydroxylgruppen ein Strecken der Polymerketten verursachten. Somit benötigte dieses Polymer in seiner Anordnung ein größeres Volumen, was wiederum eine weitere Distanz der Schichtlagen bedeutete.

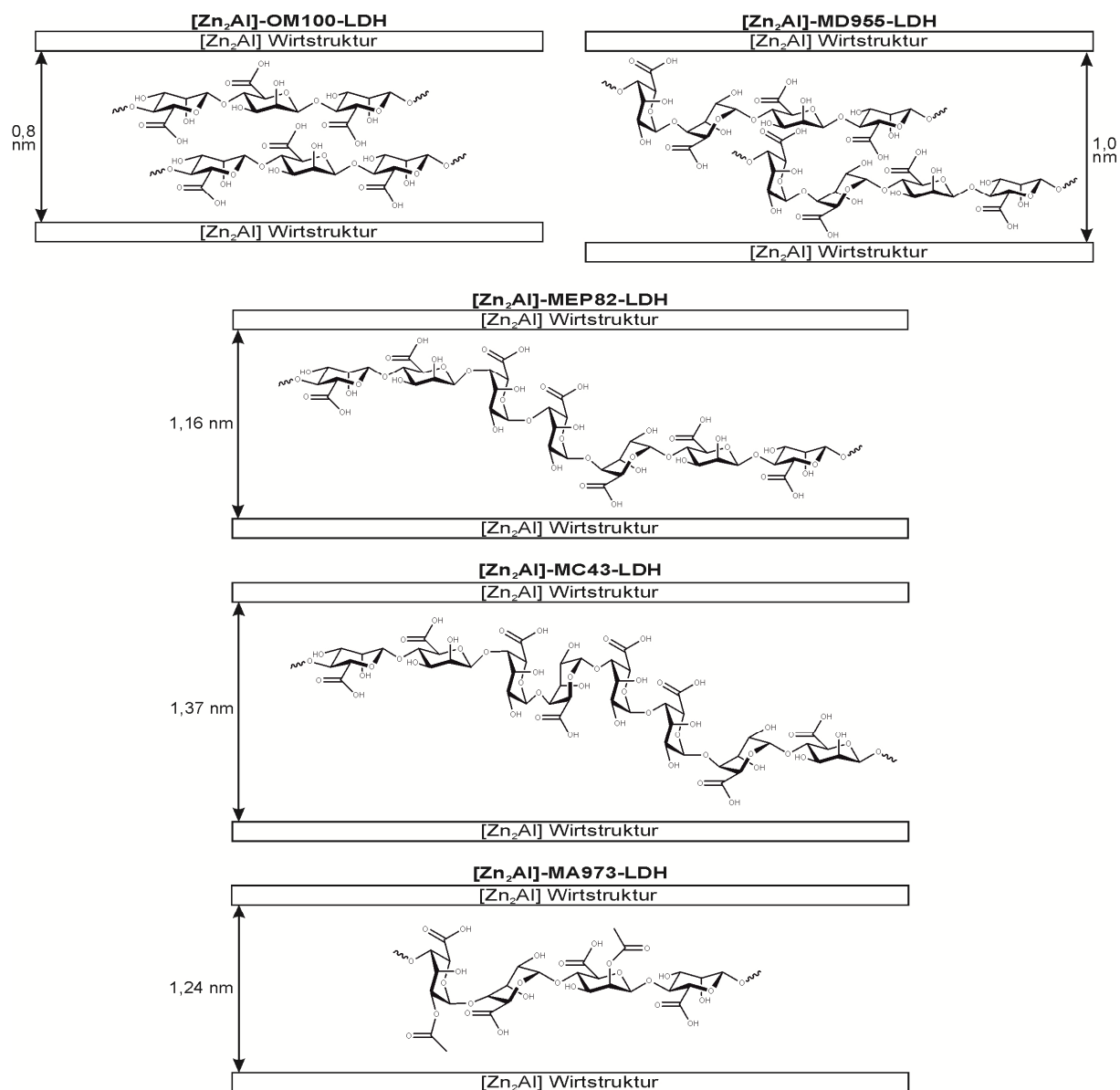


Abbildung 22: Schematische Darstellung der molekularen Anordnung der in Zn_2Al -LDH-Systeme interkalierten Alginatproben.

Modifiziert nach de Reese, Sperl *et al.* 2015.

Somit konnte bewiesen werden, dass die selbst produzierten, epimerisierten, sowie kommerziell erworbenen Alginat in LDH-Strukturen interkalieren konnten. Darüber hinaus stellte die Monomierzusammensetzung einen großen Einfluss für die resultierenden Distanzen der Zwischenschichten dar. Im Gegensatz dazu, scheinen die unterschiedlichen langen Kettenlängen keine Auswirkungen auf die Abstände der Zwischenlagen mit sich zu bringen.

4.2 Identifikation und Zuordnung der Gene des Welansyntheseclusters in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555

Sphingane stellen innerhalb der mikrobiellen Polysaccharide eine Gruppe sekretierter EPS dar, die von Mitgliedern des Genus *Sphingomonas* produziert werden. *Sphingomonas elodea* ist hierbei der meist erforschte Stamm. Er stellt das EPS Gellan her. Zusätzlich zu *S. elodea* produzieren auch die Stämme *Sphingomonas* ATCC 53159 (EPS: Diutan), *Sphingomonas* ATCC 31555 (Welan), *Sphingomonas* ATCC 31544 (S-88) und *Sphingomonas* ATCC 21423 (S-7) Sphingane.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die strukturelle Veränderung des EPS Welan durch den Einsatz gentechnischer Methoden angestrebt, um ein besseres Verständnis über die Biosynthese der Sphingane und der zugrunde liegenden genetischen Eigenschaften zu erhalten.

Das Interesse der Industrie an der Verwendung von Sphinganen zeigt sich durch eine Vielzahl an Patenten, die zumeist durch die Kelco Company oder Shin-Etsu Bio, Inc. erstellt wurden. Diese Patente betreffen in der Regel die gentechnische Manipulation verschiedener sphingan-produzierender Stämme. Besonders die Erstellung von *knockout* Varianten der Stämme *S. elodea* und *S. ATCC 53159*, die schwach an Zellen gebundene Sphingane produzieren und somit die Isolierung und Aufreinigung der EPS im Vergleich zum Wildtyp erheblich erleichtern, stellten einen Fortschritt in der Verwendung von Sphinganen in der Industrie dar (Harding, Yamini et al. 2014). Zusätzlich konnten durch die Einführung von DNA Segmenten die EPS-Produktivitäten gesteigert, sowie auch Erkenntnisse der Biosynthese der mikrobiellen EPS erheblich vorangetrieben werden (Pollock, Thorne et al. 1996; Harding, Patel et al. 2011). Für weitere gentechnische Untersuchungen und eine gezielte Veränderung der gebildeten Polysaccharide, ist es wichtig den genauen Aufbau der Synthesecluster der Sphingan-produzierenden Stämme zu analysieren und die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu erkennen. In dieser Arbeit wurde dies durch Alignments der Gen- und Proteinsequenzen mittels der Software Clustal Omega (Sievers, Wilm et al. 2011) angestrebt. Darauf aufbauend sollten dann durch *genetic engineering*, d.h. Deletion und Integration von Genen in das Genom von *Sphingomonas* ATCC 31555, modifizierte Varianten des EPS Welan erhalten werden. Daher wurde das im Jahr 2012 veröffentlichte Genom des Stammes *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 zunächst mit Fokus auf die Polysaccharid Synthesegene untersucht.

Bei Veröffentlichung des ersten Genoms eines Welan-produzierenden Stammes (ATCC 31555) im Jahr 2012 bemerkten die Autoren der Publikation bereits hohe Sequenzähnlichkeiten bei den für die Welansynthese essentiellen Genen (Wang, Tao et al.

2012). In diesem Teil der Arbeit wurde das sequenzierte Genom im Detail untersucht, wobei das Hauptziel die Identifizierung des kompletten Synthesecusters von Welan war. Zudem sollten weitere Gene, die in die EPS-Produktion involviert sind, identifiziert werden. Für die Annotierung und Zusammenstellung des Welanclusters wurden die Synthesegene durch Sequenzvergleiche mit den anderen Sphingan-produzierenden Stämmen bestimmt (Software: *Clustal Omega*, *EMBL-EBI*) (Sievers, Wilm et al. 2011) und die Nomenklatur „*wel*“ für die Welangene eingeführt. Das finale Cluster ist in Abbildung 23 dargestellt.

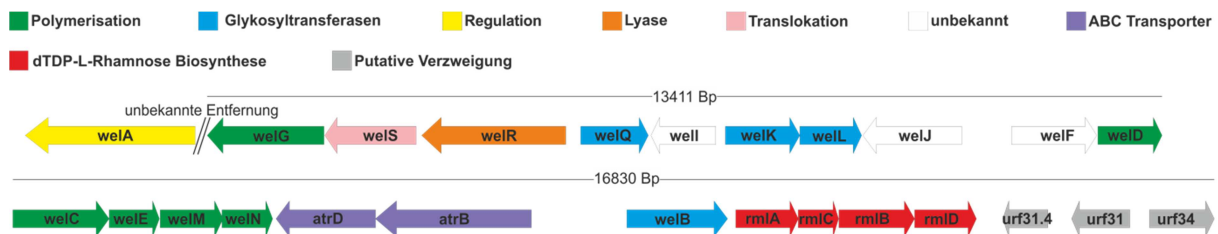


Abbildung 23: Synthesecuster des Welan-produzierenden Stamms *Spingomonas* sp. ATCC 31555. Das Welancluster umfasst 30 Kilobasenpaare. Innerhalb des Clusters sind die verschiedenen Gengruppen für die Assemblierung der Tetrasaccharidwiederholungseinheit, der Polymerisation, des Exports, der ABC Transporter, der Rhamnosese Synthese und der Sphinganzweigungen orange hinterlegt. Die einzelnen Gene sind anhand ihrer Aufgaben zusammengefasst und entsprechend gemustert.

Das gesamte Welancluster umfasst circa 30 kBp und beinhaltet 24 Gene. Am 5'-Ende des Genabschnittes ist das Gen *welG*, das eine Polymerase codiert, lokalisiert. Da sich das Gen *welA*, das eine Rolle in der Regulation spielt und durch Sequenzübereinstimmungen mit *gela* (für die Gellanproduktion) identifiziert werden konnte, außerhalb des Synthesecusters befindet, stellt *welG* den Beginn des Synthesecusters dar. *Downstream* von *welG* befindet sich das Gen *welS*, dessen Protein für den Export der Tetrasaccharideinheiten verantwortlich ist. Anschließend folgen in 3'-Richtung *welR* (codiert eine Lyase), *welQ* (Glykosyltransferase) und *well*, dessen Funktion noch unbekannt ist. Das Genom besitzt neben *welQ* drei weitere Gene, die Glykosyltransferasen codieren: *welK*, *welL* und *welB*, wobei sich Letzteres zwischen *artB* und *rmlA* befindet. Die Gene *welJ* und *welF*, denen noch keine Funktion zugeordnet wurde, sind ungefähr in der Mitte des Clusters angeordnet. Der folgende Genabschnitt (*welD*, *C* und *E*) besteht aus *welD* und *E*, die Proteine für die Kettenlängenregulation codieren, und *welD*, dessen Protein für den Export des Polysaccharids verantwortlich ist. Daran anschließend befinden sich die Gene *welM* und *N*, deren Funktion ebenfalls im Export vermutet wird. *Upstream* von *welB* befinden sich *artD* und *artB*, die in allen Sphinganen auftreten und ABC Transporter codieren. Gegen Ende des Clusters befinden sich die vier Gene *rmlA*, *rmlC*, *rmlD* und *rmlB*, die für die Synthese des Vorläuferzuckers dTDP-Rhamnose essentiell sind. Am 3'-Ende des Synthesecusters konnten noch die Gene *urf31.4*, *urf31* und *urf34* identi-

fiziert werden. Die postulierte Funktion dieser Gene liegt in der Modifikation der Hauptketten, indem sie als Seitenketten-Glykosyltransferasen fungieren oder im Assemblierungsprozess beteiligt sind (Coleman, Patel et al. 2008).

Die Gene *pgmG*, *ugpG* und *ugdG*, die für die Synthese von UDP-Glucose, UDP-Glucuronsäure, sowie GDP-Mannose verantwortlich sind, konnten ebenfalls im Genom von *Spingomonas* sp. ATCC51333 identifiziert werden. Diese Gene sind wie in allen anderen sphingan-produzierenden Stämmen dispers im Genom verteilt und deshalb nicht in Abbildung 23 aufgeführt.

In Tabelle 15 sind alle im Welangenom identifizierten Gene, die für die Welansynthese essentiell sind, sowie deren Nukleotidanzahl, Proteinname und Aminosäureanzahl und die zugeordnete Funktion, aufgelistet.

Tabelle 15: Genname, Nukleotidanzahl, Proteinname, Aminosäureanzahl und prognostizierte Funktion der im Genom von *Spingomonas* sp. ATCC31555 essentiellen Strukturen für die Welanbiosynthese.

Genname	Nukleotidanzahl [bp]	Proteinname	Aminosäureanzahl	Prognostizierte Funktion
<i>welA</i>	2382	WelA	794	Regulatorprotein
<i>welG</i>	1638	WelG	545	Membranprotein/Export
<i>welS</i>	1281	WelS	426	Polysaccharidexportprotein
<i>welR</i>	2019	WelR	672	Zelloberflächeprotein/Lyase
<i>welQ</i>	948	WelQ	315	Rhamnosyl-glykosyl-Transferase
<i>welI</i>	907	WelI	301	unbekannt
<i>welK</i>	1044	WelK	288	Glykosyl- α -1,4,-Glucuronosyl-Transferase
<i>welL</i>	867	WelL	288	Glykosyl-Glucuronosyl-Transferase
<i>welJ</i>	1383	WelJ	461	unbekannt
<i>welF</i>	1194	WelF	397	unbekannt
<i>welD</i>	900	WelD	299	Polysaccharidexportprotein
<i>welC</i>	1350	WelC	449	Kettenlängenregulation
<i>welE</i>	705	WelE	234	Kettenlängenregulation
<i>welM</i>	882	WelM	293	Polysaccharidexport
<i>welN</i>	711	WelN	236	Polysaccharidexport
<i>atrDwel</i>	1396	AtrD-wel	464	ABC Transporter
<i>atrB-wel</i>	2187	AtrB-wel	728	ABC Transporter
<i>welB</i>	1413	WelB	470	Glucosyl-Isoprenylphosphat-Transferase
<i>rmlA-wel</i>	878	RmlA-wel	292	Glucose-1-phosphat-Thymidyltransferase
<i>rmlC-wel</i>	567	RmlC-wel	188	dTDP-6-Deoxy-D-Glucose-3,5-Epimerase
<i>rmlB-wel</i>	1062	RmlB-wel	353	dTDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase

Ergebnisse

<i>rmID-wel</i>	867	RmID-wel	288	dTDP-6-Deoxy-L-Mannose-Dehydrogenase
<i>urf31.4-wel</i>	632	Urf31.4-wel	209	nicht bekannt
<i>urf31-wel</i>	816	Urf31-wel	272	Rhamnosyltransferase
<i>urf34-wel</i>	909	Urf34-wel	302	nicht bekannt
<i>pgm-wel</i>	1386	PGM-wel	462	Phosphoglucomutase/Phosphomanno-mutase
<i>ugpG-wel</i>	870	UGP-wel	289	Glucose-1-Phosphate-Uridyltransferase
<i>ugdG-wel</i>	1314	UGD-wel	428	UDP-Glucose-Dehydrogenase

4.3 Gen- und Proteinsequenzvergleich der Sphinganbiosynthesegene

Nach erfolgreicher Annotierung und Zusammenstellung des Synthesecusters für Welan, wurden alle Synthesecuster der oben erwähnten sphingan-produzierenden Stämme paarweise verglichen. Neben den Genen im Synthesecuster, wurden zusätzlich auch Gene, die sich oberhalb des Hauptclusters der Welan- und Gellansynthese befanden in die Analyse integriert. Zusätzlich wurde auch *Sphingomonas* ATCC 21423, der S-7 produziert, basierend auf Hybridisierungsexperimenten in die Analysen miteinbezogen, da von diesem Stamm keine Nukleotidsequenzen vorhanden waren. Die Alignments wurden erneut mit der servergestützten Software *Clustal Omega* durchgeführt (Sievers, Wilm et al. 2011). Um die Sequenzen besser vergleichen zu können, wurde als neue Nomenklatur die Bezeichnung „*spn*“ für die verschiedenen Gene der Sphingane eingeführt, da die meisten dieser Gene hohe Homologien oder zumindest starke Ähnlichkeiten zueinander aufweisen (Schmid, Sperl et al. 2014). Die Nomenklatur für die Gene, die für die Biosynthese von Welan (*wel*), Gellan (*gel*), Diutan (*dps*) und S-88 (*sps*) verantwortlich sind, wurde dennoch beibehalten. Die Bezeichnung *spn* wird in den nachfolgenden Abschnitten immer dann benutzt, wenn es sich um Gene handelt, die die Sphinganbiosynthese generell betreffen.

4.3.1 Nukleotidvorstufen

Der erste Schritt der Biosynthese aller Sphingane besteht in der Herstellung der aktivierten Nukleotid-Zuckervorstufen, die die Grundbausteine für die spätere Assemblierung der Wiederholungseinheiten und Seitenketten darstellen (Martins und Sa-Correia 1991). Die Gene, die in der Synthese von UDP-Glucose- und UDP-Glucuronsäure benötigt werden, sind *pgmG* (G für Gellan) und *ugpG*. Darüber hinaus besitzen Sphingomonaden ein bifunktionelles Protein, das von *pgm* codiert wird und in die Produktion von UDP-Glucose und GDP-Mannose involviert ist.

Die Gene *pgmG*, *ugpG* und *ugdG* sind dispers in den Genomen von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 (Wang, Tao et al. 2012) und *S. elodea* ATCC31461 (Harding, Patel et al. 2004) verteilt. In dieser Arbeit konnten das Gen *pgmW* (W für Welan) in *contig* 21 (ALBQ01000021.1) und die Gene *ugdW* und *ugpW* in *contig* 11 (ALBQ01000011.1) der Genomsequenz von ATCC 31555 identifiziert werden. Der N-Terminus von *ugdW* befindet sich 15362 Bp *upstream* vom N-Terminus von *ugpW*.

Alle Sphingomonaden zeigten große Identitäten auf Nukleotid- und Aminosäureebene bezüglich der Gene, die für die Synthese der Nukleotidvorstufen verantwortlich sind. Das

Gen *pgmW* (1386 bp) besaß eine Nukleotidsequenzidentität zu *pgmG* (1386 bp) von 91 % und circa 80 % Identität zu dem im Jahre 2013 identifizierten Gen *pgm* in *S. sanxanigenes* (Huang, Li et al. 2013). Des Weiteren besaß das *ugpW* (870 bp) eine Identität zu *ugpG* (870 bp) von 89 % und das Gen *ugdW* (1314 bp) eine Identität von 91 % zu *ugdG* (1314 bp). Das *pgm* Gen des Stammes *Sphingomonas* S-7 stellte eines der wenigen verfügbaren Nukleotidsequenzen dieses Stammes dar (AF214113) und zeigte hohe Identitäten zu *pgmG* (Thorne, Mikolajczak et al. 2000). Bis heute sind noch keine Sequenzdaten für *pgm*, *upd* und *ugp* der Diutan- und S-88-produzierenden Stämme verfügbar, weshalb keine Vorhersagen über deren Lokalisierung in den Genomen getroffen werden konnten.

Eine weitere Nukleotidvorstufe ist dTDP-Rhamnose. Für die Herstellung der dTDP-Rhamnose sind vier Gene (*rmlA*, *rmlB*, *rmlC*, *rmlD*) notwendig, die sich im *rml*-Cluster befinden. Der Vergleich der verfügbaren Sequenzdaten zeigte, dass sich diese vier Gene immer an derselben Stelle innerhalb des *spn*-Clusters befanden. Die Nukleotidsequenzidentitäten betragen 83-95 % und die Identitäten auf der Basis von Aminosäuren 85-99 % (s. Tabelle 16).

Tabelle 16: Sequenzvergleiche der Gene für die Rhamnosenukleotidzuckersynthese (*rmlABCD*), die in Sphingan-produzierenden Stämmen identifiziert wurden.

Dargestellt sind jeweils im oberen Teil der Tabellen (hellgrau) die Identitäten in Prozent, die auf den Aminosäurevergleich basieren, und im unteren Teil der Tabellen (dunkelgrau) die Identitäten in Prozent, die auf den Nukleotidvergleich basieren.

Adaptiert/Übersetzt mit Erlaubnis von Springer Nature: Springer Nature Applied Microbiology and Biotechnology, A comparison of genes involved in sphingan biosynthesis brought up to date, Jochen Schmid, Nadine Sperl, Volker Sieber, 2014.

		a) Aminosäure							b) Aminosäure				
		<i>rmlA</i>	Wel	Dps	Sps	Gel			<i>rmlC</i>	Wel	Dps	Sps	Gel
Nukleotid	<i>wel</i>			97.26	98.95	95.21	Nukleotid	<i>wel</i>		94.68	96.28	92.55	
	<i>dps</i>	89.87			97.60	94.86		<i>dps</i>	89.42			96.28	94.68
	<i>sps</i>	90.44	92.83			95.89		<i>sps</i>	89.42	91.89			94.15
	<i>gel</i>	86.92	88.62	89.31				<i>gel</i>	87.48	91.89	91.36		
		c) Aminosäure							d) Aminosäure				
		<i>rmlB</i>	Wel	Dps	Sps	Gel			<i>rmlD</i>	Wel	Dps	Sps	Gel
Nukleotid	<i>wel</i>			99.15	99.15	96.88	Nukleotid	<i>wel</i>		86.81	84.72	87.85	
	<i>dps</i>	95.10			98.58	97.17		<i>dps</i>	80.97			88.54	89.24
	<i>sps</i>	94.54	94.82			96.88		<i>sps</i>	80.85	85.01			90.97
	<i>gel</i>	93.79	95.01	93.41				<i>gel</i>	82.81	87.31	88.47		

In allen vier annotierten Sphinganclustern lag die geringste Aminosäureidentität bei paarweisem Vergleich der *rml*-Gene bei 88 %. Diese Genbereiche wiesen somit eine sehr hohe Konservierung auf.

4.3.2 Bildung der Tetrasaccharidwiederholungseinheiten

Die Wiederholungseinheiten der verschiedenen Sphingane werden durch die Aktivitäten verschiedener spezifischer Glykosyltransferasen (*spnBKLQ*) assembliert. Die primäre Transferase wird durch das Gen *spnB* kodiert. Bei genaueren Analysen zeigte sich, dass der C-terminale Teil der Aminosäuresequenz von GelB zwar hohe Homologien zu anderen Glykosyl- und Galaktosyl-Transferasen aufwies, die N-terminale Proteinregion jedoch aus einigen hydrophoben Abschnitten bestand, die sich sehr stark innerhalb der *spnB*-Gruppe unterschieden. In den durchgeführten Proteinalignments konnten Identitäten von 83-85 % innerhalb der Aminosäuresequenzen von GelB, WelB, SpsB und DpsB verzeichnet werden. Die Identitäten der Nukleotidsequenzen befanden sich im Bereich von 79-86 % (s. Tabelle 17 a).

Die Studien, die auf den Nukleotidsequenzen von *gelK*, *welK*, *spsK* und *dpsK* basierten, zeigten ähnliche Identitäten von 79-87 % (s. Tabelle 17 b). Die Nukleotidsequenzen der dritten Glykosyltransferasen *spnL* besaßen bereits weniger konservierte Bereiche: *gell* und *spsL* z.B. zeigten nur noch eine Identität von 76 % (s. Tabelle 17 c). Innerhalb der Gruppe der vierten Glykosyltransferasen *spnQ* sanken die Identitäten weiter (s. Tabelle 17 d). Da GelQ, im Gegensatz zu SpsQ, nur L-Rhamnose und nicht auch L-Mannose transferieren kann (Harding, Patel et al. 2004), war die niedrige Nukleotidsequenzidentität von 71 % nicht überraschend.

Die Assemblierung des Rückgrates der Hauptkette ist erst durch das Anfügen von Acetyl- und Glycerylsubstituenten an der zweiten Glucoseeinheit vollendet. Die verantwortlichen Gene und Proteine für diese Additionen bleiben bis heute, mit Ausnahme der Gelanacetylierung, unentdeckt. Harding *et al.* identifizierten eine Acetyltransferase in *S. elodea*, dessen Sequenz deshalb nun zugänglich ist. Das Gen der Acetyltransferase O-AT (Harding, McQuown et al. 2003) konnte auf dem *contig* 34 des veröffentlichten ATCC 31461 Genoms (AGFU01000034.1) identifiziert werden. Auf diesem *contig* befanden sich in reverser Orientierung die gebündelten Gene *gelR*, *gelS* und *gelG*, wobei die Distanz von *gelG* zu dem Gen der Acetyltransferase 20000 Bp betrug. Da noch einige Lücken im veröffentlichten Genom von ATCC 31461 vorhanden waren, konnte die Entfernung der Gene *gelRSG* zum Gellansynthesecluster nicht eindeutig (mehr als 14 kB zu *gelQ*) bestimmt werden.

Tabelle 17: Sequenzvergleiche der Glykosyltransferasegene (*spnBKLQ*), die in Spingan-produzierenden Stämmen identifiziert wurden.

Dargestellt sind jeweils im oberen Teil der Tabellen (hellgrau) die Identitäten in Prozent, die auf den Aminosäurevergleich basieren, und im unteren Teil der Tabellen (dunkelgrau) die Identitäten in Prozent, die auf den Nukleotidvergleich basieren.

Adaptiert/Übersetzt mit Erlaubnis von Springer Nature: Springer Nature Applied Microbiology and Biotechnology, A comparison of genes involved in spingan biosynthesis brought up to date, Jochen Schmid, Nadine Sperl, Volker Sieber, 2014.

		a) Aminosäure						b) Aminosäure					
		spnB	Wel	Dps	Sps	gGel			spnK	Wel	Dps	Sps	Gel
Nukleotid	<i>wel</i>			83.19	84.68	84.04	Nukleotid	<i>wel</i>		87.07	87.93	85.92	
	<i>dps</i>	79.90			87.66	87.02		<i>dps</i>	79.56			94.25	88.51
	<i>sps</i>	79.33	85.85			85.96		<i>sps</i>	79.47	87.11			87.93
	<i>gel</i>	79.83	84.50	85.21				<i>gel</i>	78.54	84.24	83.19		
		c) Aminosäure						d) Aminosäure					
		spnL	Wel	Dps	Sps	Gel			spnQ	Wel	Dps	Sps	Gel
Nukleotid	<i>wel</i>			74.65	75.35	70.83	Nukleotid	<i>wel</i>		64.42	73.33	64.86	
	<i>dps</i>	69.90			86.11	76.39		<i>dps</i>	66.88			64.42	61.22
	<i>sps</i>	72.32	78.43			77.43		<i>sps</i>	72.47	67.52			67.09
	<i>gel</i>	68.86	75.78	76.12				<i>gel</i>	66.56	64.96	70.59		

4.3.3 Hauptkettenmodifikation

Die Funktion der Seitenkettenassemblierung oder die Beteiligung am Assemblierungsprozess wird den *uncharacterized open reading frames urf* (*urf31*, *urf31.4* und *urf34*) zugeordnet (Coleman, Patel et al. 2008). Das Gen *urf31* befindet sich am 3'-Ende der Synthesecluster von Welan, Diutan und S-88 und ist vermutlich bei der Addition der Rhamnosylseitenketten beteiligt (Coleman, Patel et al. 2008). Aus den Sequenzvergleichen der verschiedenen *urf31* Gene ergab sich ein Identitätsbereich von 77 (*sps*- und *wel*-Cluster) bis 79 % (*sps*- und *dps*-Cluster) (s. Tabelle 18 a).

Das Gen *urf34* konnte im *dps*, *sps*, *gel*, *wel*, sowie im S-7-Cluster identifiziert werden (Thorne, Mikolajczak et al. 2000; Sa-Correia, Fialho et al. 2002; Harding, Patel et al. 2004; Coleman, Patel et al. 2008), wobei jedoch keine Funktion dieses Genproduktes beschrieben werden konnte. Die Nukleotididentitäten der verfügbaren Sequenzdaten reichten von 85 bis 90 % (s. Tabelle 18 b). Auffällig hierbei war, dass die *urf34* Gene, genauso wie *spnJ* und *spnC*, das Startcodon GTG anstatt ATG besaßen. Auf Grund der Strukturähnlichkeiten der EPS Welan, Gellan, S-88, Diutan und S-7 scheint eine mögliche Funktion von *urf34* in der Seitenkettenassemblierung ausgeschlossen. Das Protein Urf34 besitzt wohl eher eine untergeordnete Aufgabe in der Assemblierung oder Sekretion, da auch Deletionsmutanten $\Delta urf34$ des gellan-produzierenden Stamms keine Veränderungen in der Polysaccharidproduktion und -ausbeute aufwiesen (Coleman, Patel et al. 2008). Auch dem Gen *urf31.4*, das nur im *wel*- und *dps*-Cluster vorhanden ist, konnte

wie dem Gen *urf34* noch keine Funktion zugeordnet werden. Die Nukleotidsequenzidentität lag bei 86 % (s. Tabelle 18 c). Die Funktion von *urf34.1* könnte auf Grund der strukturellen Ähnlichkeiten von Welan und Diutan in der Einführung der Seitenkette oder in der Unterstützung der Assemblierung der verzweigten Wiederholungseinheiten zu finden sein. Des Weiteren besitzt Urf34.1 keine durchspannenden Transmembranregionen.

Tabelle 18: a-c Sequenzvergleiche der *urf* Gene (*urf31*, *34.1* und *34*), die in Sphingan-produzierenden Stämmen identifiziert wurden. d Sequenzvergleiche des *sphF* Gens, das eine unbekannte Funktion in der Sphingan-Familie besitzt.

Dargestellt sind jeweils im oberen Teil der Tabellen (hellgrau) die Identitäten in Prozent, die auf den Aminosäurevergleich basieren, und im unteren Teil der Tabellen (dunkelgrau) die Identitäten in Prozent, die auf den Nukleotidvergleich basieren.

Adaptiert/Übersetzt mit Erlaubnis von Springer Nature: Springer Nature Applied Microbiology and Biotechnology, A comparison of genes involved in sphingane biosynthesis brought up to date, Jochen Schmid, Nadine Sperl, Volker Sieber, 2014.

a)		Aminosäure				
		urf31	Wel	Dps	Sps	Gel
Nukleotid	<i>wel</i>			82.29	80.37	
	<i>dps</i>	77.94			77.04	
	<i>sps</i>	77.00	79.09			
	<i>gel</i>					

b)		Aminosäure				
		urf34.1	Wel	Dps	Sps	Gel
Nukleotid	<i>wel</i>			74.64		
	<i>dps</i>	85.15				
	<i>sps</i>					
	<i>gel</i>					

c)		Aminosäure				
		urf34	Wel	Dps	Sps	Gel
Nukleotid	<i>wel</i>			88.41	88.41	89.17
	<i>dps</i>	85.15			90.97	95.67
	<i>sps</i>	85.48	87.25			94.95
	<i>gel</i>	86.33	89.69	90.41		

d)		Aminosäure				
		spnF	Wel	Dps	Sps	Gel
Nukleotid	<i>wel</i>			54.80	58.08	56.93
	<i>dps</i>	58.77			74.31	57.64
	<i>sps</i>	59.70	73.21			60.88
	<i>gel</i>	61.31	64.97	67.90		

4.3.4 Polymerisierung und Export

Wiederholungseinheiten, die durch Lipide an der Membran verankert sind, werden zunächst durch das Protein SpnS durch die innere Membran transportiert und anschließend durch das Protein SpnG polymerisiert. Die Identität der Translokase-Gensequenz des diutan-produzierenden Stamms (*dpsS*; nur eine unvollständige Sequenz verfügbar) zu den anderen *spnS* Genen lag maximal bei nur 48 %, wobei das Proteinalignment nur eine Identität von 22 % aufwies (s. Tabelle 19 b). *GelS* und *spsS* besaßen innerhalb der *spnS* Gene die höchste Identität von circa 74 %.

Die Gensequenzen der Polymerasen *spnG* zeigten eine niedrige Übereinstimmung von 50 % (s. Tabelle 19 a), was auf eine notwendige Strukturvielfalt der Enzyme auf Grund der strukturell unterschiedlichen Wiederholungseinheiten (Seitenketten, usw.) hindeutete.

Für die Polymerisation und den Export des EPS sind die Enzyme SpnC und SpnE, die die finale Kettenlänge des Polymers im periplasmatischen Raum regulieren, von großer

Bedeutung. Die Nukleotididentität der Co-Polymerasengene war innerhalb der Spingangfamilie relativ hoch: Es erreichten z.B. *spsE* und *dpsE* eine Identität von 88 % (Nukleotidlevel) und 89 % (Aminosäurelevel) (s. Tabelle 19 d). Des Weiteren wurden auch die Gene der Exportproteine *spnD* verglichen und sehr schwankende Identitäten von 69 bis 80 % herausgefunden (s. Tabelle 20 a).

Tabelle 19: Sequenzvergleiche der Polymerisations- und Exportgene (*spnCGES*), die in Spingangproduzierenden Stämmen identifiziert wurden.

Dargestellt sind jeweils im oberen Teil der Tabellen (hellgrau) die Identitäten in Prozent, die auf den Aminosäurevergleich basieren, und im unteren Teil der Tabellen (dunkelgrau) die Identitäten in Prozent, die auf den Nukleotidvergleich basieren.

Adaptiert/Übersetzt mit Erlaubnis von Springer Nature: Springer Nature Applied Microbiology and Biotechnology, A comparison of genes involved in sphingang biosynthesis brought up to date, Jochen Schmid, Nadine Sperl, Volker Sieber, 2014.

		a) Aminosäure							b) Aminosäure				
		spnG	Wel	Dps	Sps	Gel			spnS	Wel	Dps	Sps	Gel
Nukleotid	<i>wel</i>			47.77	55.68	43.54	Nukleotid	<i>wel</i>		22.15	75.59	60.56	
	<i>dps</i>	55.20			53.35	43.76		<i>dps</i>	47.81			22.36	25.10
	<i>sps</i>	59.23	58.44			43.28		<i>sps</i>	73.73	46.47			58.92
	<i>gel</i>	51.41	51.64	53.25				<i>gel</i>	63.00	46.67	74.40		
		c) Aminosäure							d) Aminosäure				
		spnC	Wel	Dps	Sps	Gel			spnE	Wel	Dps	Sps	Gel
Nukleotid	<i>wel</i>			77.68	80.31	79.24	Nukleotid	<i>wel</i>		77.78	75.64	75.21	
	<i>dps</i>	74.39			87.25	82.59		<i>dps</i>	77.16			89.36	88.94
	<i>sps</i>	76.56	85.71			87.47		<i>sps</i>	76.03	87.99			87.66
	<i>gel</i>	75.43	80.70	83.33				<i>gel</i>	73.76	85.31	86.02		

Als nächstes wurden die Gene *spnI* analysiert. Es wird vermutet, dass Gell eine Funktion in der Proteinfaltung oder dem Export besitzt, wobei die Gell-Aktivität die monomere Zusammensetzung, sowie den Acetylierungsgrad des finalen Produktes nicht beeinflusst (Harding, Patel et al. 2004). Die Vergleiche der *spnI* Gene in dieser Arbeit zeigten Identitäten von 74-84 % (s. Tabelle 20 b).

Die Genprodukte GelM und GelN scheinen eine Funktion in der Festlegung des Polymerisierungsgrads und im Export des Polysaccharides zu haben. Diese Vermutungen konnten jedoch bis heute nicht eindeutig bewiesen werden (Harding, Patel et al. 2004). Beide Gene besaßen Sequenzähnlichkeiten auf Nukleotidebene von 75 bis 88 % (s. Tabelle 20 c und d).

Die letzten Gene, die in dieser Gruppe behandelt wurden, waren *spnF*. Die Funktion dieser Gene ist noch unbekannt und die Identitäten der verfügbaren Sequenzen auf Nukleotidebene lagen bei 58-73 % (s. Tabelle 20 b). Diese Identitäten sind im Vergleich zu den ermittelten Identitäten der anderen *spn* Gene sehr gering.

Tabelle 20: a Sequenzvergleiche der Exportgene (*spnD*), die in Spingangan-produzierenden Stämmen identifiziert wurden. b-d zeigen den Sequenzvergleich der Gene, deren Funktion nicht bestätigt ist (*spnMNL*).

Dargestellt sind jeweils im oberen Teil der Tabellen (hellgrau) die Identitäten in Prozent, die auf den Aminosäurevergleich basieren, und im unteren Teil der Tabellen (dunkelgrau) die Identitäten in Prozent, die auf den Nukleotidvergleich basieren.

Adaptiert/Übersetzt mit Erlaubnis von Springer Nature: Springer Nature Applied Microbiology and Biotechnology, A comparison of genes involved in sphingane biosynthesis brought up to date, Jochen Schmid, Nadine Sperl, Volker Sieber, 2014.

a)		Aminosäure					b)		Aminosäure				
		spnD	Wel	Dps	Sps	Gel			spnI	Wel	Dps	Sps	Gel
Nukleotid													
	<i>wel</i>			71.57	72.58	67.89			<i>wel</i>		72.41	73.33	76.25
	<i>dps</i>	70.89			81.73	75.67			<i>dps</i>	74.34		81.38	80.00
	<i>sps</i>	71.78	80.68			79.67			<i>sps</i>	73.20	83.73		85.67
	<i>gel</i>	69.44	77.30	79.73					<i>gel</i>	74.67	82.47	84.39	

c)		Aminosäure					d)		Aminosäure				
		spnM	Wel	Dps	Sps	Gel			spnN	Wel	Dps	Sps	Gel
Nukleotid													
	<i>wel</i>			77.47	79.86	77.82			<i>wel</i>		71.55	71.98	72.41
	<i>dps</i>	77.44			84.98	84.30			<i>dps</i>	75.39		90.03	87.07
	<i>sps</i>	78.12	82.54			86.69			<i>sps</i>	73.96	87.98		88.79
	<i>gel</i>	77.10	82.09	82.20					<i>gel</i>	77.10	86.12	86.84	

4.3.5 Regulation der Spingambiosynthese

In dieser Arbeit konnte das Gen *gelA*, das für die Regulation der Gellansynthese verantwortlich ist, auf dem *contig* 61 des Genomes von ATCC 31461 (AGFU01000061.1) gefunden werden. Der Ort von *gelA* innerhalb des Genoms konnte auf Grund der Lücken, die im Genom des gellan-produzierenden Stammes noch existierten, nicht exakt bestimmt werden. Des Weiteren war es möglich, das Gen *welA*, das die homologe Version von *gelA* darstellt (Identität auf Proteinebene= 85 %; Identität auf Nukleotidebene= 78 %), durch die Analyse des Genoms von ATCC 31555 auf dem *contig* 23 (ALBQ01000023.1) zu identifizieren. Diese Entdeckung zeigte, dass dieses Regulatorprotein, das homologe Regionen zu Sensorinasen und Regulatorproteinen besitzt (Harding, Patel et al. 2004; Fialho, Moreira et al. 2008), in allen Spingomonaden existieren könnte und deshalb eine essentielle Rolle in der Spinganganproduktion einnimmt. Darüber hinaus zeigten Analysen von *welA* mit der servergestützten Software BLAST (*nucleotide blast*) eine Übereinstimmung von 73 % mit multisensorischen Hybrid-Histidin-Kinasen, die im kompletten Genom von *Sphingomonas* sp. MM-1 auftreten. Zusätzlich besitzt eine kurze Sequenz von *welA* eine hohe Identität mit einem Sensorprotein, das im Genom von *Rhizobium* sp. NT-26 gefunden wurde. Dies weist darauf hin, dass eine Beteiligung des Regulatorproteins auch in der EPS Produktion im Stamm *Rhizobium* möglich ist.

4.4 Veränderung der Monomierzusammensetzung des EPS Welan mittels *genetic engineering*

Das Polysaccharid Welan ist aus einer linearen Hauptkette, die aus Tetrasaccharid-Wiederholungseinheiten (2x D-Glucose, L-Rhamnose, D-Glucuronsäure) besteht, aufgebaut. Zusätzlich besitzt Welan eine Monosaccharidseitenkette am O-3 der ersten Glucose der Hauptkette, wobei 2/3 der Seitenketten L-Rhamnose und 1/3 L-Mannose ist. Darüber hinaus sind die Wiederholungseinheiten zu 80-90 % an der zweiten Glucose acetyliert (Campana Filho, Regiani et al. 1997).

Im folgenden Abschnitt der Arbeit wurde eine *knockout*-Methode in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 etabliert, um durch Deletionen von Genen bzw. Genabschnitten veränderte Monomierzusammensetzungen zu erhalten. Zusätzlich wurde auch durch plasmidbasierte Überexpressionen von Synthesegenen eine strukturelle Variation des Polysaccharides angestrebt.

4.4.1 *Knockout* des kompletten *rmlACBD*-Clusters

Das Ziel des ersten Abschnitts lag in der Herstellung von Welanvarianten im Vergleich zur nativen Variante abweichender Monomierzusammensetzungen. Hierzu sollte zunächst durch die Deletion des kompletten *rmlACBD*-Clusters, eine Verminderung des Rhamnoseanteiles im sekretierten Produkt erreicht werden. Weitere Varianten sollten durch *knockouts* verschiedener Glykosyltransferasen, sowie unterschiedlicher noch nicht charakterisierter Gene erhalten werden.

Zunächst musste im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 eine geeignete Methode zur Durchführung von *knockouts* etabliert werden. Solche genetische Manipulationen basieren typischerweise auf homologen Rekombinationen zwischen Inserts, die sich auf einen Plasmid befinden, und Zielsequenzen auf der genomischen DNA. Da die Genomeditierung durch homologe Rekombination in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 keine Standardmethode darstellte, wurde eine die im Jahr 2011 für *P. putida* veröffentlichte Deletionsmethode, die ein sogenanntes pEMG/pSW-System benutzte, als vielversprechender Ansatz ausgewählt (Martinez-Garcia und de Lorenzo 2011). Die von Martínez-Gracia et al. etablierte Methode basierte ihrerseits auf dem Grundgerüst des mehrfachen, markerlosen Genaustauschs durch Doppelstrangbrüche in den Chromosomen in *E. coli* (Posfai, Plunkett et al. 2006). Der wichtigste Schritt in diesem pEMG/pSW-System ist die Generierung von Doppelstrangbrüchen im Zielgenom durch die plasmidbasierte Expression der I-SceI Endonuklease. Die Erkennungssequenz dieses Enzyms besteht aus 18 bp (5'-TAGGGGATAACAGGGTAAT-3') und trat in mehr als 1700 mikro-

biellen Organismen nicht auf. Daher sollte diese Methode grundsätzlich in vielen Organismen eingesetzt werden können. Außerdem stellt das pEMG/pSW-System eine effektive und zuverlässige Plattform für direkte Genomveränderungen in Gram-negativen Bakterien dar, da die Doppelstrangbrüche, die durch die I-SceI Endonuklease verursacht wurden, keine erkennbare metagenetische Antwort mit sich brachten.

Im ersten Schritt wurden zwei I-SceI Erkennungssequenzen, die den zu deletierenden Genomabschnitt auf dem Plasmid pEMG flankierten, durch Ko-Integration des Suizidvektors pEMG in das bakterielle Chromosom eingebracht (s. Abbildung 24). Hierbei waren zwei verschiedene Integrationsrichtungen des Vektors möglich. Zellen mit erfolgreich integriertem Plasmid konnten anschließend anhand der miteingebrachten Resistenz selektiert werden. Um das Plasmid, wieder aus dem Genom zu entfernen, wurde die Mutante mit dem Plasmid pSWII, das die Endonuklease I-SceI codierte, transformiert. Durch Endonukleaseaktivität wurden an den Erkennungssequenzen Doppelstrangbrüche erzeugt, die durch die abschließende Rekombination repariert wurden. Dabei entstand entweder wieder der Wildtyp oder eben die erwünschte Mutante, mit einem erfolgreichen, narbenfreien *knockout* (s. Abbildung 24).

Als erstes Ziel für einen *knockout* eines Genbereichs in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555, der in die Synthese des Polysaccharides involviert ist, wurde das Rhamnosecluster gewählt. Dieses Cluster ist für die Synthese des Vorläufermoleküls dTDP-L-Rhamnose verantwortlich. Besonders die Steuerung der Verfügbarkeit von Zuckervorläuferstufen stellte einen vielversprechenden Angriffspunkt für die Veränderung der Monomerzusammensetzung dar. Durch eine Deletion des Rhamnoseclusters (Clusterlänge: 3372 Bp), das aus den Genen *rmlA*, *rmlB*, *rmlC* und *rmlD* besteht, sollte die Versorgung an Rhamnoseverläufermolekülen direkt verringert oder gar unterbunden werden und die Seitenkette des Polymers folglich nur noch oder zumindest weitgehend aus dem Monomer Mannose bestehen. Zusätzlich wurde ebenfalls eine Veränderung des EPS Rückgrats erwartet, da Rhamnose auch ein Bestandteil der Hauptkette ist.

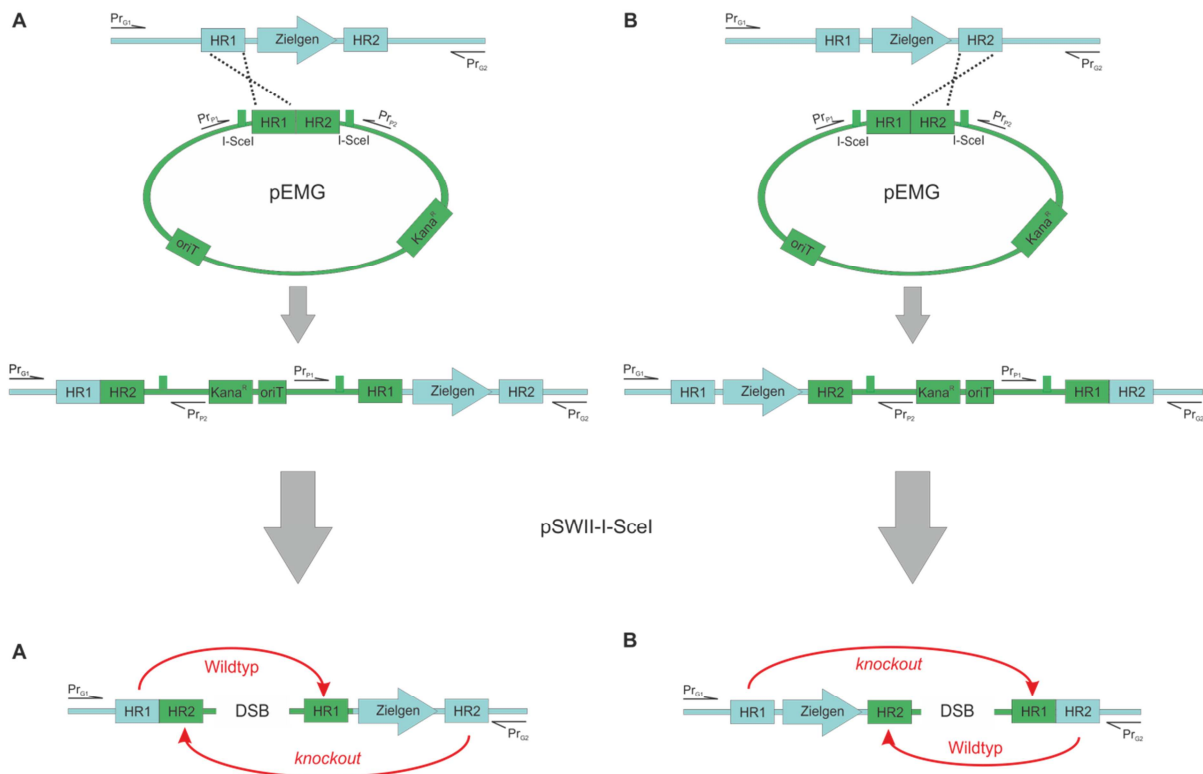


Abbildung 24: Schematische Darstellung der *knockout*-Methode pEMG/pSWII.

Die flankierenden homologen Regionen des zu deletierenden Genes (HR1, HR2) werden in das Plasmid pEMG kloniert. Homologe Rekombination führt zur Integration des kompletten Plasmides pEMG (grün) in das Genom (blau). Selektion durch die eingeführte Kanamycinresistenz. Es können zwei verschiedene Integrationsrichtungen des Plasmides auftreten (A+B), die durch Kolonie-PCR mit den verschiedenen Primerkombinationen von mit zwei Oligonukleotidkombinationen ($Pr_{G1}+Pr_{P2}$, $Pr_{G2}+Pr_{P1}$) identifiziert werden. Durch die Einführung des I-SceI Expressionsplasmides pSWII kann das Plasmid pEMG aus dem Genom entfernt werden, wobei in 50 % erneut der Wildtyp und 50 % die erwünschte Mutante gebildet wird. Abkürzungen: Pr_G =Oligonukleotid bindet an Genom; Pr_P =Oligonukleotid bindet an Plasmid; DSB=Doppelstrangbruch

4.4.1.1 Methode pEMG/pSWII

Da bisher kein *knockout* in Sphingomonaden mit der pEMG/pSW-Methode beschrieben war, wurde zunächst versucht, dieses System im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 zu etablieren. Zunächst wurden die flankierenden Regionen vor und nach *rmlACBD* in den Suizidvektor kloniert. Für die Herstellung des Plasmides pEMG-us/ds(*rmlAD*) wurden dazu zwei getrennte PCR-Ansätze mit der gDNA von ATCC 31555 als Templat und den Primern 5'us_*rmlA*_EcoR1 und 3'us_*rmlA*(OE) bzw. 5'ds_*rmlD*(OE) und 3'ds_*rmlS*_XbaI durchgeführt. Die Primer 3'us_*rmlA*(OE) und 5'ds_*rmlD*(OE) besaß jeweils am 5'-Terminus 15 Bp, die zu der Region unterhalb von *rmlD* bzw. oberhalb von *rmlA* komplementär waren. Die erhaltenen PCR-Produkte, die jeweils 1000 Bp groß waren, wurden als Templat für eine OE-PCR verwendet (s. 3.2.7.2). Das resultierende PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XbaI in den Vektor pEMG inseriert. Nach der Transformation von DH5 α pir und Ausplattierung auf LB_{Kana}-Agar-Platten wurden positive Klone für das Konstrukt pEMG-us/ds(*rmlAD*) mit vektorspezifischen Primern (pEMG-fwd; pEMG-rev) ermittelt. Anschließend wurde das

Plasmid pEMG-us/ds(rmlAD) via triparentaler Konjugation (s. 3.1.6.6) übertragen. Hierbei war die Anzahl der Mutanten, bei denen das Plasmid erfolgreich integrierte, am höchsten, wenn die Zellmengen des Donorstamms (DH5 α pir mit dem Plasmid pEMG-us/ds(rmlAD)), des Helferstamms (DH5 α pir mit pRK2013) und des Empfängerstamms (*Sphingomonas* sp.) im Verhältnis von 5:2:10 auf YM-Platten in dieser Reihenfolge aufgetragen wurden. Am nächsten Tag wurde eine Spatelspitze Zellen, die auf der Konjugationsplatte wuchsen, auf eine LB_{Kana/Strep}-Agar-Platte mittels Verdünnungsstrichen ausgestrichen und bei 30 °C für mindestens 3 Tage inkubiert. Die Trennung der *Sphingomonas* sp. Zellen von *E. coli* Zellen konnte durch das zusätzliche Pipettieren von ca. 50 μ l Strep₁₀₀ in den Petrischalendeckel der Selektionsplatte erreicht werden. Um positive Klone zu identifizieren wurden verschiedene Kolonie-PCR-Ansätze mit zwei plasmidspezifischen (pEMG-fwd; pEMG-rev) und zwei genom-spezifischen Primern (5'1035Bp_us_rmlA 3'1067Bp_ds_rmlD), die sich ca. 50 Bp entfernt von den jeweils 1000 Bp großen *rmlAD*-flankierenden Regionen befanden, in der Kombination pEMG-rev und 5'1035Bp_us_rmlA bzw. pEMG-fwd und 3'1067Bp_ds_rmlD durchgeführt (s. Abbildung 25 A).

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass 5 von den 16 getesteten Einzelkolonien (K1, K6, K7, K15, K16) das Plasmid erfolgreich in der gewünschten Position integrierten. Die Einzelkolonie 2, dessen Fragment der PCR mit den Primern 5'1035Bp_us_rmlA und pEMG-rev sequenziert wurde und diese Ergebnisse die Integration erneut bestätigten, wurde in LB_{Kana}-Flüssigmedium angeimpft und für die Transformation mit dem Plasmid pSWII chemisch kompetent gemacht (s. 3.1.6.1), da mit dieser Mutante eine elektrische Transformation nicht erfolgreich war. Nach einer chemischen Transformation von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 mit pSWII wurde für 3 Tage auf LB_{Genta}-Agar-Platten nach erfolgreich transformierten Kolonien selektiert. Diese Klone konnten auf Grund der sofortigen Überexpression der I-SceI Endonuklease via PCR mit den Primern 5'1035Bp_us_rmlA und 3'1067Bp_ds_rmlD auf eine Deletion des Clusters überprüft werden (s. Abbildung 25 C).

Dem Agarosegel war zu entnehmen, dass der PCR-Ansatz des Wildtyps mit den Primern 5'1035Bp_us_rmlA und 3'1067Bp_ds_rmlD ein Produkt mit der Fragmentgröße von 5454 Bp enthielt. Ein Klon des Stammes *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ rmlACBD musste demnach eine Bande aufweisen, deren Größe um 3372 Bp geringer war. Bei allen mit PCR getesteten Mutanten wurde ein Fragment der Größe von 2082 Bp synthetisiert und anschließend dieses Fragment zur Überprüfung sequenziert, was den gewünschten, narbenfreien *knockout* bestätigte.

Ergebnisse

Bei Kontrollausstrichen der Mutanten *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ rmlACBD auf LB_{Kana}-Agar-Platten wurde jedoch festgestellt, dass diese eine Kanamycinresistenz zeigte, die auf die Integration des Plasmides pEMG-us/ds(rmlAD) schließen lässt. Das noch integrierte Plasmid konnte auch mittels PCR nachgewiesen werden (s. Abbildung 25 C).

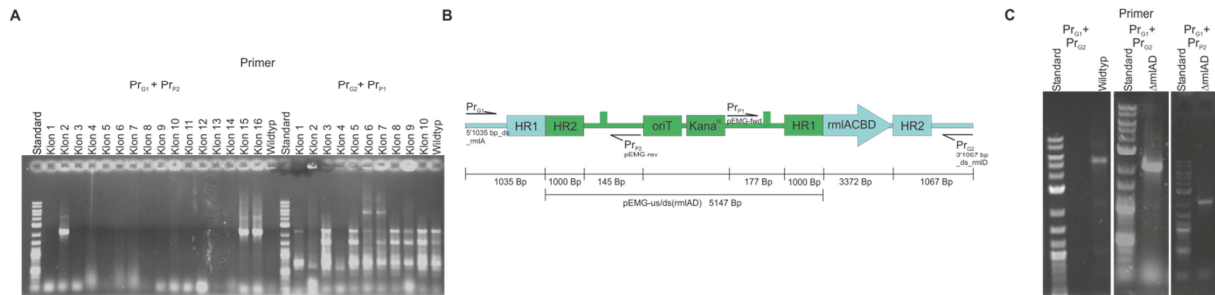


Abbildung 25: Agarosegele für den Nachweis der Plasmidintegration bzw. des knockouts, sowie schematisch dargestellte Plasmidintegration ins Genom von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555.

A) Agarosegel, das die Kolonie-PCR zur Überprüfung der Integration des Plasmides pEMG-us/ds(rmlAD) darstellt. Die Einzelklone 1-16, sowie der Wildtyp als Kontrolle, wurden mit den Primern pEMG-rev und 5'1035bp_us_rmlA amplifiziert. Bei den Klonen 2, 15 und 16 tritt eine Bande bei ca. 2180 Bp auf. Die Einzelklone 1 bis 10 und der Wildtyp wurden mit den Primern pEMG-fwd und 3'1067bp_ds_rmlD überprüft, wobei in den Ansätzen der Klone 6 und 7 eine Bande bei ca. 5616 Bp amplifiziert wurde.

B) Schematische Darstellung beider Integrationsvarianten in das Genom. In die Klone 2, 5, 6, 7, 15 und 16 wurde das Plasmid wie dargestellt vor *rmlACBD* eingefügt.

C) Agarosegele, die verschiedene Kolonie-PCR Ansätze zur Überprüfung des knockouts des Clusters, sowie die Integration des Plasmides darstellen. In dem linken Gelbild konnte die erwartete Bande von 5454 Bp im Wildtyp mit den Primern 5'1035bp_us_rmlA und 3'1067bp_ds_rmlD bestätigt werden. Die Gelbilder in der Mitte und auf der rechten Seite zeigen eine Kolonie-PCR der Mutante *Sphingomonas* sp.

ATCC31555 Δ rmlACBD mit den Primern 5'1035bp_us_rmlA und 3'1067bp_ds_rmlD, bzw. pEMG-rev und 5'1035bp_us_rmlA, wobei in der Mitte die erwartete Bande bei ca. 2180 Bp sichtbar ist. Auf dem Gel, das sich auf der rechten Seite befindet, konnte ein Fragment von ca. 2100 Bp gezeigt werden, was die pEMG-Integration in der Mutante bestätigt.

Entsprechende Mutanten *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ rmlACBD, die nur den *knockout* aufweisen und bei denen das Plasmid pEMG-us/ds(rmlAD) erfolgreich herausgeschnitten wurde, sollten durch längere Kultivierung in Flüssigmedium und die somit erzwungene Vervielfältigung der gDNA, erhalten werden. Ein Einzelklon wurde daher in LB_{Genta}-Flüssigmedium angeimpft, drei Tage bei 30 °C geschüttelt und anschließend auf LB_{Genta}-Agar-Platten ausplattiert. Von diesen Agar-Platten wurden 600 Klone in 500 μ l LB₀-Flüssigmedium überführt und mittels eines Impfigels gleichzeitig auf LB₀- und LB_{Kana}-Agar-Platten transferiert. Hierbei konnte jedoch nach drei Tagen Inkubation bei 30 °C kein Klon gefunden werden, der auf Agar ohne Antibiotikumzugabe wuchs und gleichzeitig nicht auf Agar mit Kanamycin wachsen konnte, was bedeutete, dass alle Klone das Cluster bestehend aus *rmlACDB* erfolgreich deletierten hatten, aber das vorher integrierte Plasmid nicht vollständig aus dem Genom durch die Endonuklease entfernt werden konnte. Auch eine mehrtägige Induktion durch m-Toluat bedingte ebenfalls nicht das komplette Herausschneiden von pEMG-us/ds(rmlAD). Die entsprechende Prozedur wurde auch mit einem Klon, bei dem pEMG vor dem Gen integriert wurde, durchgeführt und

auch hierbei trat das Phänomen auf, dass sich bei erfolgreichem *knockout* das Plasmid weiterhin stabil im Genom befand.

a) Modifikationen der etablierten pEMG/pSW-Methode

Da bei der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ rmlACBD trotz des Nachweises des erfolgreichen *knockouts* des Clusters *rmlACBD* das Plasmid pEMG-us/ds(rmlAD) noch im Genom integriert war, wurden verschiedene modifizierte Ansätze verfolgt. Zunächst wurde versucht, das Gen für die Endonuklease unter die Kontrolle eines anderen Promotors zu setzen. PSWII enthielt einen induzierbaren Pm-Promotor. Statt diesem Pm-Promotor wurden ein Lactose(lac)-Promotor, der durch IPTG induziert werden konnte, bzw. der *welB*-Promotor des Synthesecusters von ATCC 31555 in das Plasmid inseriert. Letzterer stellt vermutlich einen konstitutiven Promotor dar, da dieser die Expression der initiierenden Glykosyltransferase kontrolliert, die für die Synthese von Welan essentiell ist. Für die Herstellung des Plasmids pSWII_lacP wurde das pSWII mit den Restriktionsendonukleasen AgeI und NdeI verdaut. Parallel dazu wurden die Oligonukleotide 5'lac_AgeI(anneal) und 3'lac_Nde(anneal) gemischt und durch Aufheizen im Wasserbad auf 95 °C und dann langsames Abkühlen auf Raumtemperatur angelagert (siehe 3.2.9). Die so erhaltene Oligonukleotidlinker konnte direkt in den verdauten pSWII eingefügt und so pSWII_lacP erhalten werden. Für die Herstellung von pSWII_welBP wurde die gDNA von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 als Templat für die Amplifikation des Promotors von *welB* mit den Primern 5'welBP_AgeI und 3'welBP_NdeI verwendet. Das resultierende PCR-Produkt wurde dann über AgeI und NdeI in pSWII kloniert um pSWII-welBP zu erhalten. Nach der Transformation von NEB Turbo Zellen und Ausplattierung auf LB_{Genta}-Agar-Platten wurden positive Klone mit vektorspezifischen Primern (5'psWII(vorPro)-_Seq bzw. 5'lac_AgeI(anneal) und 3'pSW(Anfang trfA)_seq) ermittelt. Anschließend folgte die elektrische Transformation von *Sphingomonas* sp. ATCC31555-pEMG-us/ds(rmlAD) (Plasmid pEMG ist integriert) mit pSWII-lacP oder pSWII-welB und die erhaltenen Klone wurden erneut mittels PCR auf den *knockout* des Clusters *rmlACBD* und die Integration von pEMG analysiert. Weder die Expression der Endonuklease durch pSWII-welB, noch die Induktion des Lactosepromotors konnte bei erfolgreichem *knockout* das komplette Entfernen des integrierten Plasmides bewirken.

Einen weiteren Ansatz stellte die Kombination der pEMG/pSWII-Methode mit dem sogenannten Cre-lox-System dar (Marx und Lidstrom 2002). Marx *et al.* etablierten dieses System im Jahre 2002, bei dem zunächst die flankierenden Regionen, die sich oberhalb und unterhalb des zu entfernenden Gens befanden, mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pCM184 kloniert werden. Nach Transformation entstand eine Mutante, die anstatt

des Zielgens eine Kanamcyinkassette mit flankierenden 34 Bp großen Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase (loxP) enthielt. Diese Resistenz wurde anschließend durch die Einführung des Cre Expressionsplasmides pCM157 entfernt, was letztendlich zu einem *Genknockout* mit einer zurückgebliebenen loxP-Sequenz führte. Angewendet auf die pEMG-Methode, wurde die Erkennungssequenz für die I-SceI Endonuklease auf dem Plasmid pEMG durch die palindromischen Erkennungssequenzen für die Cre Rekombinase ersetzt, wodurch im zweiten Schritt das Entfernen des integrierten Plasmides durch die Rekombinase möglich wird. Hierzu wurden die Oligonukleotide 5'loxP_EcoRI(anneal) und 3'loxP_EcoRI(anneal) gemischt und durch Aufheizen im Wasserbad auf 95 °C und dann langsames Abkühlen auf Raumtemperatur angelagert (s. 3.2.9). Die Oligonukleotide wurden über EcoRI in den verdauten und dephosphorylierten Vektor pEMG-us/ds(rmlAD) kloniert und so pEMG-us/ds(rmlAD)-loxP erhalten. Nach der Transformation von DH5 α pir und Ausplattierung auf LBKana-Agar-Platten wurden die drei erhaltenen Klone mit vektorspezifischen Primern (pEMG-fwd und pEMG-rev) sequenziert. Anschließend folgte die triparentale Konjugation (s. 3.1.6.6) mit dem Empfängerstamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 und dem Donorstamm DH5 α pir mit dem pEMG-us/ds(rmlAD)-loxP. Leider trat auch nach mehrmaliger Wiederholung kein Klon mit dem integrierten Plasmid auf. Da sich das Plasmid pEMG-us/ds(rmlAD)-loxP zu pEMG-us/ds(rmlAD) nur durch den Austausch der I-SceI Erkennungssequenzen gegen die loxP-Sequenzen unterschied, stellten diese 34 Bp langen, palindromischen Basenpaare wohl ein sterisches Problem für die Genomintegration an dieser Stelle dar, weshalb auch dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

b) Plasmidbasierte Einbringung des zu entfernenden Clusters und anschließende Entfernung des *Clusters* aus dem Genom

Da verschiedene Ansätze zur Entfernung des integrierten Plasmides bei der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD nicht erfolgreich waren, lag die Vermutung nahe, dass eine komplette Entfernung des *rmlACBD*-Clusters für den Stamm letal ist. Um dies zu überprüfen, sollte das *rmlACBD*-Cluster in ein Expressionsplasmid kloniert werden und nach der Integration des pEMG-Plasmides in den Stamm transferiert werden. Somit sollte die komplette Deletion und das Herausschneiden von pEMG ermöglicht werden, da eine weitere plasmidbasierte *rmlACBD*-Kopie in den Zellen diesen *knockout* komplementieren würde.

In das Plasmid pSRK wurden durch Gibson Assembly (siehe 3.2.8) die Gene *rmlA*, *C*, *B* und *D*, sowie eine Kassette für eine Chloramphenicolresistenz mitsamt Promotor, kloniert. Als Templat für das *rmlACBD*-Cluster diente die gDNA von ATCC 31555 und für

das Resistenzgen das Plasmid pBBR112. Die verwendeten Primer waren: 5'*rmlA*_NdeI+pSRK, 3'*rmlD*+5'*CAT*, 5'*CAT*Chloramp und 3'*CAT*Chloramp_KpnI+pSRK. Der in den Gibson Assembly Ansatz eingesetzte Vektor wurde zuvor mit NdeI und KpnI verdaut, um pSRK-*rmlACBD* zu erhalten. Nach der Transformation von NEB Turbo Zellen wurden diese auf LB_{Chloramp}-Agar-Platten ausgestrichen und am nächsten Tag die positiven Klone mittels Kolonie-PCR (Primer: pSRK-fwd, pSRK-rev) ermittelt. Anschließend wurde der Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC31555-pEMG-us/ds(*rmlAD*) mit pSRK-*rmlAD* elektrisch transformiert und ein erhaltener Einzelklon angezogen und im Anschluss elektrokompent gemacht. Nach einer erneuten elektrischen Transformation mit pSWII konnte nur Zellwachstum auf LB_{Genta}-Agar-Platten, jedoch nicht auf LB_{Genta/Chloramp}-Agar-Platten beobachtet werden. Somit enthielten die Zellen nur das Plasmid pSWII, nicht jedoch das Plasmid pSRK-*rmlACBD*. Da laut Literaturrecherchen (Novick 1987) eine Plasmidinkompatibilität auf Grund der Replikationsursprünge ausgeschlossen wurde, wurde dieses Phänomen anhand weiterer Experimente untersucht. Dazu wurde der Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555, sowie der Stamm *E. coli* NEB Turbo jeweils mit dem Plasmid pSRK-*rmlAD* transformiert, daraus kompetente Zellen hergestellt und das Plasmid pSWII transferiert. Auch hierbei konnte jeweils nur ein Wachstum der Zellen auf der Selektionsplatte mit Gentamycin festgestellt werden. Auf den LB_{Genta/Chloramp}-Agar-Platten konnten auf Grund des Verlustes des Plasmides pSRK-*rmlACBD* (auch durch PCR bestätigt) keine Kolonien wachsen. Zusätzlich wurden die Stämme *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 und *E. coli* NEB Turbo zunächst mit pSWII transformiert und diesmal erst nach der Herstellung kompetenter Zellen mit dem Plasmid pSRK-*rmlAD* transformiert. Auch hierbei konnten beide Plasmide nicht gleichzeitig in einer Zelle enthalten sein, da wiederum nur Wachstum auf LB_{Genta}-Agar-Platten beobachtet werden konnte.

c) Ansätze für die Aufklärung des Phänomens eines kompletten *knockouts* im Genom von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 bei gleichzeitigem Verbleib des Plasmides pEMG

Da durch verschiedene Variationen der pEMG/pSW-Methode, das zuvor integrierte Plasmid pEMG bei gleichzeitigem, erfolgreichen *knockout* des Clusters *rmlACBD* nicht entfernt werden konnte, sollte die Ursache für dieses Phänomen analysiert werden. Die homologe Rekombination zu einem *knockout* kann bei einem Bakterium mit nur einer Genomkopie nicht gleichzeitig mit einer Integration am gleichen Genomabschnitt stattfinden. Da auch durch wiederholtes Vereinzeln der Kolonien ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei den Mutanten um Mischklone handelte, die sich in verschiedenen

Stadien der Replikation befanden, sollte untersucht werden, ob der Stamm *Sphingomonas* sp. mehrere Genomkopien besitzt. Hierzu wurde die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR gewählt (siehe 3.2.7.5). Zunächst wurde zur Anpassung der Methode die Kopienanzahl der 16S-Region in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 bestimmt. In der Literatur schwanken die Werte der Kopienzahl im Genus *Sphingomonas* sp. von 1 bis 15 (Leys, Ryngaert et al. 2004; Zeng, Koblizek et al. 2013; Bodenhausen, Bortfeld-Miller et al. 2014).

Als interner Standard wurde ein pJET-Vektor benutzt, in den eine 1518 Bp langes, mit den Primern 27_fn und 1525r amplifiziertes Fragment (16S-Region des Welan-produzierenden Stammes) kloniert wurde, was zum Plasmid pJET-16S führte. Ein qPCR-Ansatz bestand aus je 400 nM Primern (16S_qPCR_fw und 16SqPCR_rev), 5 ng gDNA bzw. unterschiedlichen Plasmidkonzentrationen und 5 µL des kommerziellen *Mastermix* und wurde mit ddH₂O auf 10 µL aufgefüllt. Es wurde ein Fragment mit einer Länge von 140 Bp synthetisiert. Für die Standardgerade wurden 5,28 pg bis zu 792 ng in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. Aus der Auftragung der logarithmischen Anzahl der Kopien (errechnet über cels.uri.edu) gegen die Cq(*quantification cycle*)-Werte konnte eine Standardgeradengleichung von $y(Cq) = -3,2945x(\log(\text{Kopien})) + 38,518$ ermittelt werden (Kalibriergerade siehe Anhang). Hierbei wurde der Cq-Wert festgelegt als der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz der Probe den Schwellenwert erreicht. Der Schwellenwert wurde durch die CFX Maestro™ Software (Bio-Rad Laboratories GmbH) bestimmt. Der E(*efficiency*)-Wert der Standardgerade lag bei 101,2 %. Dieser Wert, der von der Steigung der Geraden abhängig ist ($E = 10^{(-1/\text{Geradensteigung}) - 1}$), sollte idealerweise bei 100 % liegen, was bedeutete, dass bei jedem Amplifizierungszyklus sich die DNA-Menge des Produktes verdoppelte. Eine gute Reaktion sollte eine Effizienz von 90 bis 110 % (entspricht einer Steigung von -3,58 bis -3,10) aufweisen, weshalb die oben erwähnte Standardgerade für die Quantifizierung der 16 S-Region verwendet werden konnte. Bei dem Einsatz von 5 ng gDNA (entsprach $1,14 \cdot 10^6$ Kopien bei einer Genomgröße von 4046117 Bp) wurde durch eine Dreifachbestimmung ein Mittelwert von Cq=15,0 bestimmt. Somit lag die Kopienanzahl des Ansatzes bei $13,8 \cdot 10^6$. Alle synthetisierten Fragmente besaßen einen Schmelzpunkt von 84 °C, weshalb die Amplifikation unerwünschter Fragmente ausgeschlossen werden konnte. Dies bedeutete, dass laut der qPCR-Analyse 12 Kopien der 16S-Region pro genomischer DNA bestimmt wurden, was eine realistische Anzahl darstellt.

Folglich konnte nun die Anzahl der Regionen des Clusters *rmIACBD* im Genom von ATCC 31555 ebenfalls mit qPCR bestimmt werden. Das Primerdesign wurde mit dem *RealTimePCR tool* der servergestützten Software der Integrated DNA Technologies

durchgeführt. Dieses Programm ermittelte mittels der ausgewählten Amplikongröße von 110-150 Bp und den hinterlegten, favorisierten Merkmalen eines optimalen qPCR Fragments ein 149 Bp langes Amplikon, das sich in dem 3372 Bp langen Cluster befand. Dieses Amplikon, das sich nahe des 5'-Terminus des *rmlA* Gens befand, wurde durch PCR mit den Primern 5'*rmlA*-qPCR und 3'*rmlA*-qPCR hergestellt. Als Templat für die Standardgerade wurde das Plasmid pJET-*rmlACBD*, das durch eine *blunt* Insertion des mit PCR amplifizierten Fragmentes *rmlACBD* (Primer: 5'*welB*(Ende), 3'*rmlD*(Ende)) synthetisiert wurde, gewählt. Die Standardgerade mit dem Plasmid pJET-*rmlACBD* in den Konzentrationen von 0,165 pg/μL bis 6,15 ng/μL (entspricht einer gDNA-Anzahl von $1,8 \cdot 10^9$ - $1,8 \cdot 10^5$) besaß die Geradengleichung $y(Cq) = -3,34x(\log(\text{Kopien})) + 37,766$, was einem E-Wert von 99,3 % entsprach (s. Abbildung 26).

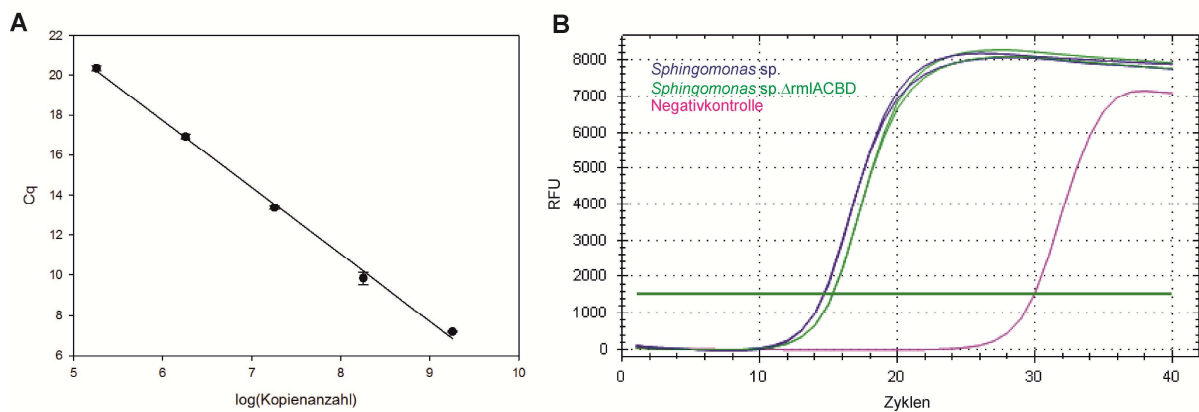


Abbildung 26: Kalibrierungsgerade des Logarithmus der Kopienanzahl von *rmlA*-Fragment mit der Anzahl der Quantifizierungszyklen und Amplifikationsgraphen von *rmlA*.

A) Kalibrierungsgerade von Kopienanzahl von *rmlA*-Fragment (172 Bp) durch Amplifizierung mit Plasmid pJET-*rmlACBD* als Templat. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen an. Fit-Typ: linear; $R=0,9987$

B) Graphen der Amplifikation des Fragmentes von *rmlA* (172 Bp) mit dem Templat *Sphingomonas* sp und *Sphingomonas* sp.Δ*rmlACBD*. Negativkontrolle ohne DNA-Templat.

Abkürzungen: RFU= relative fluorescence units; Cq = quantification cycle

Für die Quantifizierung der Genbereiche des Clusters *rmlACBD* wurden 6,4 ng/ μl gDNA des Wildtyps bzw. 7 ng/μl der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC31555Δ*rmlACBD* pro Ansatz eingesetzt. Somit konnte berechnet werden, dass der Wildtyp *Sphingomonas* sp. ATCC31555 6,3 Kopien des Gens *rmlA*/gDNA und die Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC31555Δ*rmlACBD* noch 3,13 Kopien des Gens *rmlA*/gDNA besaß. Die Schmelzkurven der synthetisierten Produkte zeigten, dass alle Fragmente einen Schmelzpunkt bei 87 °C besaßen, während die Negativkontrolle, deren Produktmenge den Schwellenwert im 30. Zyklus erreichte, einen Schmelzpunkt von 79 °C aufwies (Daten nicht gezeigt). Somit konnte eine Kontamination der Proben ausgeschlossen werden. Folglich befanden sich insgesamt 6 Kopien des Clusters *rmlACBD* im Genom des Wildtyps und nur die Hälfte dieser konnte durch den *knockout* mittels der pEMG/pSWII-Methode entfernt wer-

den. Folglich konnte die Erkenntnis gestützt werden, dass in der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ rmlACBD der *knockout* des Clusters, jedoch bei gleichzeitiger unvollständiger Deletion, erfolgreich war.

Da nun gezeigt werden konnte, dass im *knockout* Stamm noch 50 % des zu deletierenden Genabschnitts vorhanden waren, musste nun im nächsten Schritt geklärt werden in welcher Anzahl und an welcher Stelle das noch integrierte Plasmid pEMG-us/ds(rmlAD) auf dem Genom lokalisiert war. Hierzu wurde zunächst die Methode der inversen PCR gewählt (s. 3.2.7.6). Mit dem Ziel große, für Sequenzierungen verwendbare Amplikons (>3000 Bp) zu erhalten wurden verschiedene Restriktionsenzyme für den Verdau der gDNA (AluI, KpnI) und der Ligationsprodukte (AflIII, PstI, NcoI), die durch Ligation der gDNA-Stücke mit der T4 Ligase (NEB) hergestellt wurden, verwendet. Mit der Kombination von KpnI (gDNA-Verdau) und NcoI (Verdau zyklischer Ligationsprodukte) und Sequenzierprimern, die an die Kanamycinkassette im Plasmid pEMG-us/ds(rmlAD) in entgegengesetzten Richtungen banden (5'Anfang Kana und 3'Ende Kana) konnte bewiesen werden, dass das Plasmid pEMG-us/ds(rmlAD) in der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ rmlACBD noch mit seiner kompletten Größe im Genom integriert war. Es konnten jedoch keine Produkte derart hergestellt werden, um Aussagen über die Lokalisierung dieses Plasmides im Genom treffen zu können, was eine Genomsequenzierung der kompletten gDNA mittels der Illumina MiSeq Sequenzierungsmethode als nächsten Schritt zur Folge hatte. Für die Sequenzierung wurde die genomische DNA der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ rmlACBD frisch mittels *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Qiagen) nach Herstellerangabe isoliert. Die Sequenzierung der gDNA wurde am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie in Freising (TU München) durchgeführt und die Sequenzdaten mittels dem Server RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology Version 2.0) ausgewertet und annotiert (Aziz, Bartels et al. 2008; Overbeek, Olson et al. 2014; Brettin, Davis et al. 2015). Das zusammengestellte Genom besaß eine Größe von 4137811 Bp, das in 39 *contigs* aufgeteilt wurde. Die Größen der verschiedenen *contigs* variierten von 809953 bis zu 1000 Bp. Durch manuelle Sequenzanalysen konnten 5 *contigs*, die für den Bereich des *knockouts* und der Integration des Plasmides relevant waren, identifiziert werden. Die Sequenzdaten zeigten, dass sich das Plasmid pEMG-us/ds(rmlAD) nur einmal an der bekannten Stelle des Genoms der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ rmlACBD befand und darüber hinaus jedoch das komplette Synthesecluster für das EPS Welan nicht alignen konnte. Alle Sequenzen brachen in der *upstream*-Region von *rmlA*, d.h. im Gen *welB*, ab, was somit bedeutete, dass wohl auf Grund von räumlichen Anordnungen des DNA-Stranges von *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ rmlACBD keine durchgehende Sequenz des Syntheseclusters in-

klusive des Plasmides möglich war. Dies könnte auch der Grund sein, weshalb die I-SceI Endonuklease nicht an allen Stellen des Genoms binden konnte und das Plasmid deshalb nicht komplett herausgeschnitten wurde.

4.4.1.2 Verwendung anderer *knockout*-Methoden

Da es nur möglich war das Cluster *rmlACBD* in 50 % der Genomstellen zu deletieren, wurden weitere literaturbekannte *knockout* Methoden angewendet und auf den Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 übertragen.

Es wurde die auf dem Gen *rpsL* basierende, markerfreie Deletionsmethode (Kaczmarczyk, Vorholt et al. 2012), das sogenannte *cloning-free genome editing* (kurz: CFGE)-System mit dem Versuch die Funktion eines Synthesegens auszuschalten (Döhlemann, Brennecke et al. 2016) und die Integration des kompletten Plasmides pK19mobsacB-us/ds(*rmlAD*), was vergleichbar zum pEMG/pSWII-System ist (Schäfer, Tauch et al. 1994) durchgeführt. Für die Anwendung der Deletionsmethode für den *knockout* von *rmlACBD* nach Kaczmarczyk et al. wurde das Plasmid pAK405-HR1/2 (HR1/2: 740 Bp lange, homologe Bereiche des *rmlACBD*-Clusters) hergestellt (PCR-Produkte mit Templat gDNA Wildtyp und Primern 5'*us-rmlA_EcoR1* und 3'*us-rmlA(OE)*, sowie 5'*ds-rmlD(OE)* und 3'*ds-rmlD_XbaI*; anschließend OE-PCR mit Primern 5'*us-rmlA_EcoR1* und 3'*ds-rmlD_XbaI*), anschließend ATCC 31555 Zellen elektrisch mit diesem Plasmid transformiert und auf LB_{Kana}-Agar-Platten selektiert. Bei dem CFGE-System bestand das zu transferierende DNA-Konstrukt nur aus einer homologen Region (HR), die den ersten 506 Bp des Gens *rmlA* entsprach und einer Kanamycinresistenzkassette. Das DNA-Produkt HR und die Kanamycinkassette wurden durch PCR mit den Primern 5'*rmlA* und 3'*rmlA-504Bp*, bzw. 5'*Kana* und 3'*Kana* amplifiziert. Als Templat diente die genomische DNA von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 bzw. das Plasmid pJB861. Anschließend wurden die Amplikons mit der T4 Polynucleotid-Kinase phosphoryliert (30 min, 37 °C) und dann die Kinase hitzeinaktiviert (20 min, 65 °C). Da eine definierte Orientierung und folglich gerichtete Integration nicht nötig war, wurden die DNA Fragmente mittels einer normalen *blunt* Ligation zirkularisiert und der Ansatz mit dem *NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kit* nach Herstellerangaben gereinigt. Abschließend wurden die elektrokompenten *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Zellen mit der aufgereinigten DNA transformiert und ebenfalls auf LB_{Kana}-Agar-Platten selektiert. Des Weiteren wurde für den Deletionsversuch von *rmlA* das Plasmid pK19mobsacB-us/ds(*rmlA*) kloniert (*us/ds*: 1000 Bp lange, homologe Bereich vor bzw. nach *rmlA*). Hierzu wurden die *us/ds*-Regionen mit den Primern 5'*us_rmlA_HindIII* und 3'*us_rmlA*, bzw. 5'*ds_rmlA(OE)* und 3'*ds_rmlA_XbaI* und der gDNA von *Sphingomo-*

nas sp. ATCC 31555 als Templat amplifiziert und durch OE-PCR (s. 3.2.7.2) zu einem Amplikon vereinigt. Anschließend wurde das Plasmid, das in DH5 α Zellen enthalten war, via triparentaler Konjugation mit Hilfe des Helferstamms DH5 α pir-pRK2013 in den Empfängerstamm ATCC 31555 überführt, wobei es durch homologe Rekombination ins Chromosom integrieren sollte. Die Selektion erfolgte ebenfalls auf LB_{Kana}-Agar-Platten. Alle Methoden zeigten dasselbe Ergebnis: Bei den gewachsenen Klonen trat nun eine Kanamycinresistenz auf (auch durch PCR bestätigt), wobei die verantwortliche Resistenzkassette nicht am jeweils gewünschten Ort nachgewiesen werden konnte. Alle getesteten Klone entsprachen im Bereich des Syntheseclusters dem Wildtyp.

Der letzte Ansatz, der benutzt wurde, um einen *knockout* im Synthesecluster des EPS Welan zu erhalten, war das Cre-lox-System (Marx und Lidstrom 2002). Diese Methode wurde bereits im Unterpunkt 4.4.1 genauer erklärt, da hierbei die loxP-Erkennungssequenzen in das Plasmid pEMG-us/ds(rmlAD) inseriert wurden. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die 34 Bp langen, palindromischen DNA-Sequenzen für die Erkennung der Cre-Rekombinase die Integration im unmittelbaren Bereich vor und nach dem *rmlACBD*-Cluster störten. Da nun die komplett, beschriebene Methode in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 durchgeführt werden sollte, bedeutete dies, dass ein anderes Gen für den Versuch des *knockouts* ausgewählt werden musste. Da auch die initierende Glykosyltransferase WelB ein interessantes Ziel für spätere EPS-Analysen darstellte, wurde nun versucht das Gen *welB* zu deletieren. Zunächst mussten die flankierenden Regionen vor und nach *welB* (1413 Bp) in den Vektor pCM184 kloniert werden. Für die Herstellung des Plasmids pCM184-us/ds(*welB*) wurden zwei getrennte PCR-Ansätze mit der gDNA von ATCC 31555 als Templat und den Primern 5'us-*welB*_EcoRI und 3'us-*welB*_NdeI bzw. 5'ds-*welB*_SacII und 3'ds-*welB*_AgeI durchgeführt. Diese PCR-Produkte, die jeweils 1000 Bp groß waren, wurden mit EcoRI und NdeI bzw. SacII und AgeI verdaut und zunächst das letztere Fragment (*ds*) in den Vektor inseriert, was zum Plasmid pCM184-ds(*welB*) führte. In dieses Plasmid wurde anschließend das Fragment, dass mit EcoRI und NdeI verdaut wurde (*us*), kloniert. Nach erfolgreicher Transformation von NEB Turbo Zellen und anschließender Identifikation positiver Klone durch Kolonie-PCR wurde versucht einen Allelaustausch im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 durch triparentale Konjugation zu erreichen. Die erhaltenen Klone besaßen bei gleichzeitiger Tetrazyklinsensitivität eine Kanamycinresistenz. Dies ließ darauf schließen, dass der Allelaustausch erfolgreich war und das Plasmid auf Grund der fehlenden Tetrazyklinresistenz in den Zellen nicht als eigenständiges Plasmid vorlag. Jedoch konnte dieses Ergebnisse nur durch Selektionsversuche mit LB_{Kana}-/bzw. LB_{Tet}-Agar-Platten aufgezeigt werden. Laut PCR konnte keine zusätzlich eingeführte Ka-

namycinkassette anstatt des Gens *weIB* bestätigt werden. Auch das Gen *weIB* konnte durch einen PCR Ansatz noch im Genom identifiziert werden.

Somit zeigte sich, dass keine der weiteren ausgewählten *knockout* Methoden für eine Deletion des *rmlACBD*-Clusters bzw. dessen Umgebung genutzt werden konnte. Bei allen Methoden konnte die neu eingebrachte Resistenz durch Selektion auf LB-Agar-Platten bestätigt werden, jedoch wurde jeweils die Genkassette an einen anderen, nicht definierbaren Locus eingeführt. Folglich stellte das pEMG/pSWII-System die beste Methode für einen angestrebten *knockout* im Welan Synthesecenter dar, da hierbei die Plasmidintegration spezifisch durchgeführt und anschließend eine Gendeletion erreicht werden konnte. Da die Endonuklease vermutlich durch die DNA-Sekundärstruktur gehindert wurde, alle integrierten Plasmide aus dem Genom zu entfernen, musste noch der Einfluss des Genbereiches getestet werden, da eine Veränderung der Methode nicht zum Ziel führte.

4.4.2 Knockout von *crtB*

Da mittels Deletionsmethode pEMG/pSWII das Cluster *rmlACBD* nicht komplett entfernt werden konnte, wurde nun das Gen *crtB* als weiterer Angriffspunkt gewählt. Dieses Gen (Gengröße=924 Bp) codiert die Phytoensynthase (EC 2.5.1.32), das für die Carotinoidsynthese in Sphingomonaden essentiell ist und bewirkt eine Orangefärbung beim Wildtyp. Deshalb kann eine erfolgreiche Deletion von *crtB* leicht durch den Verlust der Orangefärbung der Klone nachgewiesen werden. Das Gen wurde im Jahr 2016 in dem Welan-produzierenden Stamm *Alcaligenes* sp. ATCC31555 durch ein pLO3/*sacB*-System, das sich einer Integration des Suizidvektors mit *sacB* bediente, deletiert (Zhang, Chen et al. 2016). Da in dieser Arbeit bereits herausgefunden wurde, dass das System mit pK19mobsacB-us/ds(*rmlAD*), das ebenfalls auf der Entfernung des Plasmids auf Grund von *sacB* beruhte, nicht für den *knockout* von *rmlACBD* verwendet werden konnte, wurde das pEMG/pSWII-System auch für den *knockout* von *crtB* gewählt. Zunächst wurde das Plasmid pEMG-us/ds(*crtB*) wie im Abschnitt 4.4.1.1 mit den Oligonukleotiden 5'us_*crtB*_EcoRI und 3'us_*crtB*, bzw. 5'ds_*crtB*(OE) und 3'ds_*crtB*_XbaI kloniert. Anschließend wurde das Plasmid pEMG-us/ds(*crtB*) via triparentaler Konjugation (s. 3.1.6.6 und 4.4.1.1) in *Sphingomonas* sp. übertragen. Um positive Klone zu identifizieren wurden verschiedene Kolonie-PCR-Ansätze mit zwei plasmidspezifischen (pEMG-fwd; pEMG-rev) und zwei genom-spezifischen Primern (5'1116Bp_us_*crtB*; 3'1123Bp_ds_*crtB*), die sich ca. 100 Bp entfernt von der 1000 Bp

großen *crtB*-flankierenden Regionen befanden, in verschiedenen Kombination durchgeführt (s. Abbildung 27).

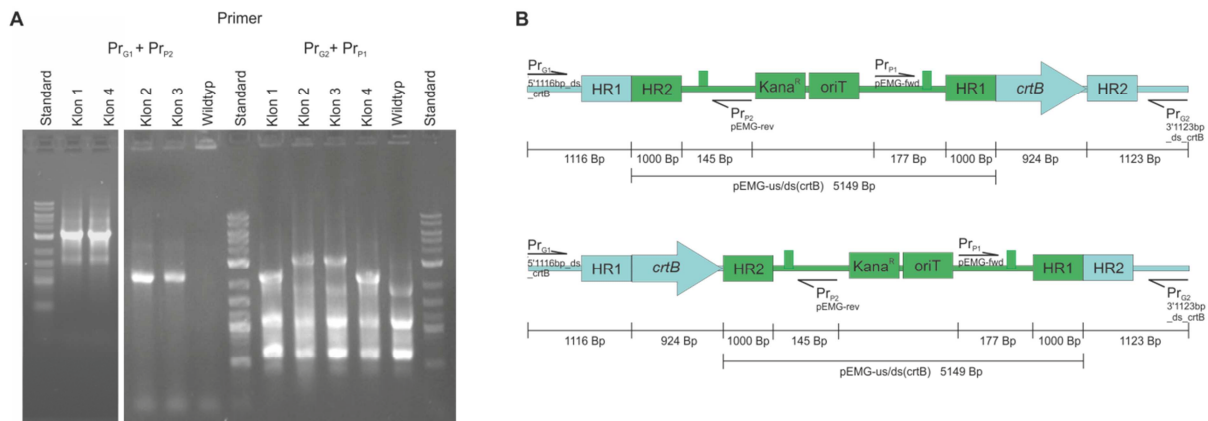


Abbildung 27: Agarosegel für den Nachweis der Plasmidintegration, sowie schematisch dargestellte Plasmidintegration ins Genom von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555.

A) Agarosegel, das die Kolonie-PCR zur Überprüfung der Integration des Plasmides pEMG-us/ds(*crtB*) darstellt. Die Einzelklone 1-4, sowie der Wildtyp als Kontrolle, wurden mit den Primern 5'1116Bp_us_*crtB* und pEMG_rev, sowie pEMG_fwd und 3'1123Bp_ds_*crtB* amplifiziert.

B) Schematische Darstellung beider Integrationsvarianten in das Genom. In die Klone 2 und 3 wurde das Plasmid wie oben dargestellt integriert, in Klon 1 und 4 wie unten dargestellt.

Von den vier getesteten Einzelkolonien hatten alle das Plasmid erfolgreich integriert. Bei den Klonen 1 und 4 wurde mit den Primern 5'1116Bp_us_*crtB* und pEMG_rev ein Fragment mit der Größe von 3185 Bp und mit der Kombination von pEMG_fwd und 3'1123Bp_ds_*crtB* ein Fragment mit 2300 Bp amplifiziert, was eine Plasmidintegration nach dem Gen *crtB* bestätigte (s. Abbildung 27B unten). Auch bei den Klonen 2 und 3 konnte durch die am Gel sichtbaren Bande bei ebenfalls 2261 Bp mit den Primern 5'1116Bp_us_*crtB* und pEMG_rev und bei 3224 kBp mit pEMG_fwd und 3'1123Bp_ds_*crtB* die Integration, jedoch vor dem *crtB* Gen, nachgewiesen werden (s. Abbildung 27B oben).

Im nächsten Schritt wurden elektrokompente *Sphingomonas* Zellen (s. 3.1.6.5) des Klons 2 mit dem Plasmid pSWII elektrisch transformiert (s. 3.1.6.5) und auf LB_{Genta}-Agar-Platten bei 30 °C inkubiert. Nach drei Tagen wuchsen insgesamt 22 Kolonien, wobei 14 Kolonien weiß gefärbt waren. Somit konnte bereits eine Selektion über die Farbe durchgeführt werden. Zusätzlich wurde eine Kolonie-PCR mit dem Primern 5'1116Bp_us_*crtB* und 3'1123Bp_ds_*crtB* durchgeführt, wobei ein PCR-Ansatz zur Kontrolle mit dem Wildtyp angesetzt wurde. Die Ansätze wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (s. Abbildung 28). Mit den oben genannten Primern wurde mit dem Templat des Wildtyps eine Fragmentgröße von 3200 Bp erwartet, was auch bestätigt werden konnte. Durch einen *knockout* von *crtB* verringerte sich diese Größe um 924 Bp. Auf dem Gelbild war zu erkennen, dass der PCR-Ansatz des weißen

Klons eine Bande von ca. 2250 Bp aufwies. Außerdem wurde letztere Bande mittels Sequenzierung überprüft, was den erfolgreichen *knockout* erneut bestätigte. Bei erfolgreichen *knockouts* konnte zusätzlich das integrierte Plasmid pEMG-us/ds(*crtB*) aus dem Genom wieder komplett entfernt werden. Zellen ohne das Plasmid pSWII konnten dann durch Verdünnungsaustrich ohne Selektion erhalten werden. Hierzu wurde die *knockout* Mutante zunächst für zwei Tage in LB₀-Flüssigmedium bei 30 °C geschüttelt und anschließend in einer Verdünnung von 10⁻⁵ auf LB₀-Agar-Platten ausplattiert. Einzelkolonien wurden dann je auf LB₀, LB_{Kana} und LB_{Genta}-Agar-Platten ausgestrichen und gewachsene Kolonien erneut mittels Kolonie-PCR mit den Primern pEMG-fwd und 3'1123Bp_ds_*crtB* auf eine Integration des Plasmides pEMG überprüft (s. Abbildung 28). Sowohl das Agarosegel der Kolonie-PCR sowie die Selektionsausstriche auf verschiedenen Medien zeigten, dass die Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555Δ*crtB* erfolgreich hergestellt werden konnte, wobei keine Rückstände der *knockout*-Methode in der Mutante zu finden waren. Somit konnte die pEMG/pSW-Methode mit bestimmten Modifikationen auch im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 für die Erstellung eines *knockouts* verwendet werden.

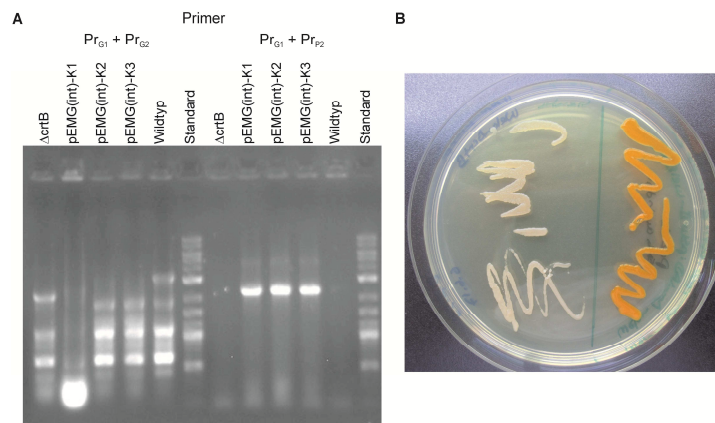


Abbildung 28: Agarosegel für den Nachweis des *knockouts* des Gens *crtB* im Genom von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555, sowie Abbildung des Phänotyps der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC31555Δ*crtB* und des Wildtyps.

A) Agarosegel, das zwei Klonie-PCR Ansätze zur Überprüfung des *knockouts* des Gens *crtB* sowie die Integration des Plasmides darstellt. Für die Überprüfung der Deletion des Gens *crtB* wurden die Primer 5'1116Bp_us_*crtB* (Pr_{G1}) und 3'1123Bp_ds_*crtB* (Pr_{G2}) verwendet. Für die Integration des pEMG-us/ds(*crtB*) wurde die Kombination 5'1116Bp_us_*crtB* (Pr_{G1}) und pEMG-rev (Pr_{P2}) verwendet. Es wurde jeweils eine Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC31555Δ*crtB* (Δ*crtB*), drei Klone von *Sphingomonas* sp. ATCC31555-pEMG(us/ds)*crtB* (pEMG(int)) und ein Wildtyp als Kontrolle analysiert.

B) Auf der linken Seite der LB_{Strep}-Agar-Platte ist die Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC31555Δ*crtB* sichtbar, rechts der Wildtyp.

4.4.3 *Knockouts* quer durch das Welansynthesecluster

Im vorangegangenen Abschnitt wurde das Ziel verfolgt, das *mlACBD*-Cluster im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 zu deletieren. Als geeigneteste Methode konnte das pEMG/pSWII-System identifiziert werden, da hierbei der *knockout* des kompletten Clus-

ters erfolgreich durchgeführt werden konnte. Jedoch war es der Endonuklease nicht möglich alle integrierten Plasmide, die für die Integration benötigt wurden, aus dem Genom zu entfernen. Der Grund hierfür musste in der Sekundärstruktur und folglich der unzureichenden Zugänglichkeit der Erkennungssequenzen für die I-SceI Endonuklease liegen, weshalb nun der *knockout* von Genen quer durch das Synthesecoluster weitere Erkenntnisse bzgl. der sterischen Anordnung der DNA in diesem Bereich bringen sollte.

4.4.3.1 Knockout von *welB*

Zunächst wurde der *knockout* des Gens *welB* (Gengröße=1413 Bp) gewählt, da sich dieses Gen unmittelbar in der Region oberhalb von *rmlA* befand (Distanz Stoppcodon *welB* zu Startcodon *rmlA*: 113 Bp). Somit konnte herausgefunden werden, ob ein *knockout* mit dem pEMG/pSWII-System in diesem Genomabschnitt möglich war.

Für die Herstellung des Plasmides pEMG-us/ds(*welB*) wurden identisch zur Klonierung von pEMG-us/ds(*rmlAD*) (s. 4.4.1.1) mit den Oligonukleotiden 5'*us_welB_EcoRI* und 3'*us_welB* bzw. 5'*ds_welB(OE)* und 3'*ds_welB_XbaI* durchgeführt und ebenfalls mittels via triparentaler Konjugation (s. 3.1.6.6; s. 4.4.1.1) in den Empfängerstamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 übertragen. Zur Identifizierung positiver Klone wurden Kolonie-PCR-Ansätze mit einem plasmidspezifischen (pEMG_rev) und einem genom-spezifischen (5'*1082Bp_us_welB*) Primer durchgeführt. In 80 % der getesteten Kolonien war die homologe Rekombination und folglich die Integration vor oder nach *welB* nachzuweisen (s. Abbildung 29 A). Im nächsten Schritt wurden elektrokompetente *Sphingomonas* Zellen (s. 3.1.6.5) des Klons 1 mit dem Plasmid pSWII elektrisch transformiert (s. 3.1.6.5) und auf LB_{Genta}-Agar-Platten bei 30 °C inkubiert. Nach drei Tagen konnten durch Kolonie-PCR mit dem Primern 5'*1082Bp_us_welB* und 3'*1060Bp_ds_welB* Mutanten mit einem *knockout* des Gens *welB* identifiziert werden. Die erwartete Bande mit der oben genannten Primerkombination lag beim Wildtypstamm bei 3400 Bp und bei der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC31555Δ*welB* bei 2100 Bp (s. Abbildung 29 B). Jedoch konnte auch hier eine vollständige Entfernung des integrierten Plasmides pEMG-us/ds(*welB*) ausgeschlossen werden, da mittels PCR mit den Oligonukleotiden 5'*1082Bp_us_welB* und pEMG-rev dieses im Genom der Mutante identifiziert werden konnte.

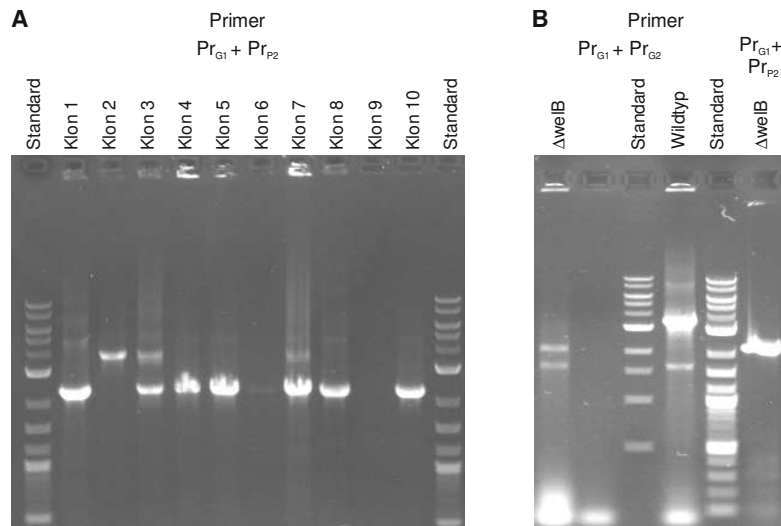


Abbildung 29: Agarosegele für den Nachweis der Plasmidintegration, sowie des *knockouts* von *welB* im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555.

A) Agarosegel, das die Kolonie-PCR zur Überprüfung der Integration des Plasmides pEMG-us/ds(*welB*) darstellt. Die Einzelklone 1-10 wurden mit den Primern pEMG-rev und 5'1082bp_us_welB amplifiziert. Bei den Klonen 1, 3, 4, 5, 7, 8 und 10 tritt eine Bande bei ca. 2200 Bp auf. Der Einzelklone 3 zeigt eine Bande bei ca. 3650 Bp.

B) Agarosegel, das Kolonie-PCR Ansätze mit einem Einzelklon des Stammes *Sphingomonas* sp. ATCC31555Δ*welB* zur Überprüfung des *knockouts* von *welB*, sowie die Integration des Plasmides darstellt. In der ersten Spur konnte die erwartete Bande von circa 2100 Bp mit den Primern 5'1082bp_us_welB und 3'1060bp_ds_welB bestätigt werden, wobei im PCR-Ansatz mit dem Wildtyp als Templat mit derselben Primerkombination die erwartete Bande von circa 3400 Bp nachgewiesen wurde. Die rechte Spur bestätigte die Plasmidintegration von pEMG-us/ds(*welB*) in *Sphingomonas* sp. ATCC31555Δ*welB* (Primer 5'1082bp_us_welB und pEMG-rev).

Abkürzung: Δ*welB*= *Sphingomonas* sp. ATCC31555Δ*welB*

4.4.3.2 *Knockout* von *urf31*

Das Gen *urf31* (816 Bp) ist 1333 Bp *downstream* von *rmlD* lokalisiert und sollte als nächstes Ziel für den *knockout* mit der pEMG/pSWII Methode dienen. Auch für diesen Ansatz musste zunächst das Integrationsplasmid pEMG-us/ds(*urf31*) Primern 5'us_urf31-EcoRI und 3'us_urf31 bzw. 5'ds_urf31(OE) und 3'ds_urf31_XbaI hergestellt und in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 wie bereits für das Plasmid pEMG-us/ds(*rmlAD*) beschrieben, übertragen werden (s. 4.4.1.1). Um Integrationsklone zu identifizieren, wurden Kolonie-PCR-Ansätze mit den plasmidspezifischen (pEMG-fwd; pEMG-rev) und genom-spezifischen (5'1100Bp_us_urf31; 3'1050Bp_ds_urf31) Primern durchgeführt. In 90 % der getesteten Kolonien war die homologe Rekombination und folglich die Integration vor (*K5* und *K10*) oder nach *urf31* (*K1-4* und *K6-8*) nachzuweisen (s. Abbildung 30 A). Anschließend wurden die Zellen des Klons 5 elektrisch mit pSWII transformiert und auf LB_{Genta}-Agar-Platten ausplattiert. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30 °C wurden 20 der 29 gewachsenen Klone durch Kolonie-PCR mit den Primern 5'1100Bp_us_urf31; 3'1050Bp_ds_urf31 bzgl. des *knockouts* des Gens *urf31* getestet. Bei zwei Klonen wurde im Ansatz eine Bande von 3000 Bp amplifiziert, die dem Wildtyp entsprach. Bei den restlichen Klonen konnte ein *knockout* von *urf31* durch die Amplikongröße von 2200 Bp be-

stätigt werden. In Abbildung 30 B ist das Agarosegel für jeweils einen Klon des Wildtyps und ATCC 31555 Δ urf31 dargestellt. Außerdem konnte auch im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ urf31 das Plasmid pEMG-us/ds(urf31) nicht komplett entfernt werden, was bedeutete, dass das Gen *urf31* noch auf der genomischen DNA lokalisiert war. Dies wurde durch PCR-Ansätze mit den Primern 5'1100Bp_us_urf31 und pEMG-rev, bzw. 5'urf31 und 3'urf31 und denn daraus hergestellten Fragmenten mit der Größe von 2245 Bp bzw. 816 Bp herausgefunden (s. Abbildung 30 C).

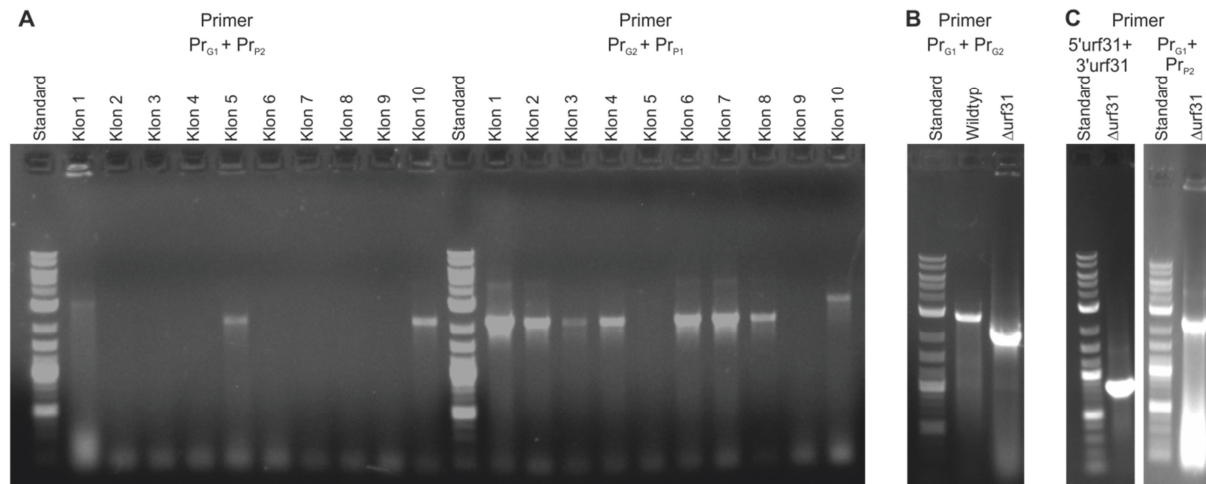


Abbildung 30: Agarosegele für den Nachweis der Plasmidintegration, sowie des knockouts von *urf31* im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555.

A) Agarosegel, das die Kolonie-PCR zur Überprüfung der Integration des Plasmides pEMG-us/ds(urf31) darstellt. Die Einzelklone 1-10 wurden mit den Primern pEMG-rev und 5'1100bp_us_urf31, bzw. pEMG-fwd und 3'1050bp_ds_urf31 amplifiziert. Bei den Klonen 5 und 10 tritt eine Bande bei 2245 Bp und bei Klon 1 bei 3100 Bp auf (Primer pEMG-rev und 5'1100bp_us_urf31), wobei bei den Klonen 1-4 und 6-8 und 10 tritt eine Bande bei ca. 2200 Bp auf und der Einzelklone 10 zeigt eine Bande bei ca. 3050 Bp (Primer pEMG-fwd und 3'1050bp_ds_urf31).

B) Agarosegel, das Kolonie-PCR Ansätze mit einem Einzelklon des Stammes *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ urf31 zur Überprüfung des knockouts von *urf31*. In der Spur des Wildtyps konnte die erwartete Bande von circa 3050 Bp mit den Primern 5'1100bp_us_urf31 und 3'1050bp_ds_urf31 bestätigt werden, wobei im PCR-Ansatz mit dem Deletionsstamm *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ urf31 als Templat mit derselben Primerkombination die erwartete Bande von circa 2200 Bp nachgewiesen wurde.

C) Das erste Gel beweist die Anwesenheit des Gens *urf31* in *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ urf31 (Primern 5'urf31 und 3'urf31). Die rechte Spur bestätigt die Plasmidintegration von pEMG-us/ds(urf31) in *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ urf31 (Primer pEMG-rev und 5'1100bp_us_urf31).

Abkürzung: Δ urf31= *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ urf31

4.4.3.3 Knockout von *urf34*

Am 3'-Terminus des Welan-Syntheseclusters befand sich das Gen *urf34* (909 Bp), was somit eine interessante Stelle für die Anwendung der pEMG/pSWII-Methode darstellte. Im ersten Schritt wurde das Plasmid pEMG-us/ds(urf34) mit den Primern 5'us_urf34_EcoRI und 3'us_urf34(OE) bzw. 5'ds_urf34 und 3'ds_urf34_XbaI kloniert und in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 transformiert (s. 4.4.1.1). In 6 von 7 getesteten Konjugationsklonen (Primer pEMG-fwd und 3'1100Bp_ds_urf34, bzw. 5'1100Bp_us_urf34 und pEMG-rev) konnte die Integration nach (K1, 3, 5, 7) bzw. hinter (K2 und 6) *urf34* bestätigt werden (s. Abbildung 31 A). Nach elektrischer Transformation von Zellen des

Klons 1 mit pSWII und anschließender Selektion konnten Kolonien mittels PCR identifiziert werden, bei denen *urf34* erfolgreich deletiert werden konnte. Diese Kolonie-PCR-Ansätze beinhalteten die Primer 5'1100Bp_us_urf34 und 3'1100Bp_ds_urf34, wobei im Ansatz des Wildtyps die erwartete Bande von 3131 Bp und in *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ urf34 eine Bande von 2222 Bp amplifiziert wurde (s. Abbildung 31 B). Jedoch konnte auch in dieser Mutante das Plasmid pEMG-us/ds(urf34) mit einer Kolonie-PCR (Primern 5'1100Bp_us_urf34 und pEMG-rev) nachgewiesen werden (s. Abbildung 31 B).

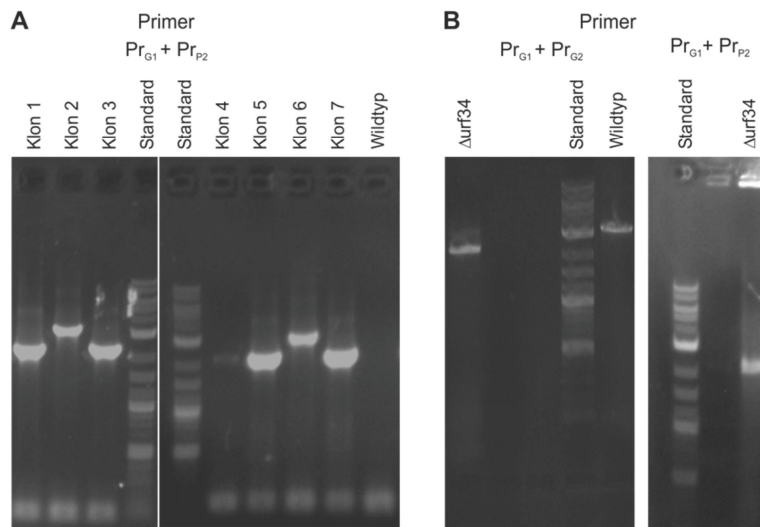


Abbildung 31: Agarosegele für den Nachweis der Plasmidintegration, sowie des knockouts von *urf34* im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555.

A) Agarosegel, das die Kolonie-PCR zur Überprüfung der Integration des Plasmides pEMG-us/ds(urf34) darstellt. Die Einzelklone 1-7 wurden mit den Primern pEMG-rev und 5'1100 bp_us_urf34 amplifiziert. Bei den Klonen 1, 3, 5, und 7 tritt eine Bande bei ca. 3150 Bp, bzw. bei Klon 2 und 6 zeigt eine Bande bei ca. 2200 Bp.

B) Agarosegele, die Kolonie-PCR Ansätze mit einem Einzelklon des Stammes *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ urf34 zur Überprüfung des knockouts von *urf34*, sowie die Integration des Plasmides darstellen. In der ersten Spur konnte die erwartete Bande von 2222 Bp mit den Primern 5'1100 bp_us_urf34 und 3'1100bp_us_urf34 bestätigt werden, wobei im PCR-Ansatz mit dem Wildtyp als Templat mit derselben Primerkombination die erwartete Bande von 3131 Bp nachgewiesen wurde. Die rechte Spur bestätigt die Plasmidintegration von pEMG-us/ds(urf34) in *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ urf34 (Primer 5'1100 bp_us_urf34 und pEMG-rev).

Abkürzung: Δ urf34= *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ urf34

4.4.3.4 Knockout von *welQ*

Es wurde bereits bewiesen, dass am 3'-Ende des Synthesecusters die Faltung der DNA eine Anlagerung der Endonuklease verhinderte. Aus diesem Grund wurde nun das Gen *welQ* für einen neuen *knockout* Ansatz gewählt, da *welQ* das zweite Gen am 5'-Terminus war. Das Integrationsplasmid pEMG-us/ds(*welQ*) (Herstellung mit Oligonukleotiden 5'us_welQ_EcoRI und 3'us_welQ(OE), bzw. 5'ds_welB und 3'ds_welB_XbaI) sollte in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 durch Konjugation integriert werden (s. 4.4.1.1). Auch durch mehrmalige Integrationsversuche konnte das Plasmid durch Kolonie-PCR (Primer: 5'1100Bp_us_welQ, 3'1100Bp_ds_welQ, pEMG-fwd, pEMG-rev) in den erhalte-

nen Klonen nicht nachgewiesen werden. Dies bedeutete, dass in diesem Bereich des Syntheseclusters die Integration des Plasmides nicht möglich war.

4.4.3.5 Zusammenfassung

Kein Gen des Welansyntheseclusters konnte komplett deletiert werden. Die Gene *welB*, *urf31*, *urf34*, sowie das Cluster *rmlACBD* konnten zwar aus dem Genom entfernt werden, jedoch blieben weitere Genkopien erhalten. Dieser nicht erfolgreiche *knockout* aller Genkopien folgte aus der unvollständigen Entfernung der integrierten pEMG-Plasmide, was an der Unzugänglichkeit der Erkennungssequenzen liegen könnte. Keines der *knockout* Versuche quer durch das Synthesecluster erbrachte eine Besserung. Auffällig war, dass bereits die Integration des Plasmides pEMG in Richtung des 3'-Terminus des Syntheseclusters eine geringe Effizienz bis hin zu einer kompletten Unfähigkeit der Integration am Genort *welQ* aufwies. Dies konnte quantitativ durch die Zahl der Einzelklone auf den Selektionsagarplatten aufgezeigt werden (s. Abbildung 32). Nach der Konjugation bzw. die damit verbundene Integration war es wichtig, dass Einzelklone für weitere Analysen isoliert werden konnten. In der Abbildung 32 waren die LB_{Kana/Strep}-Agar-Platten nach der Anzahl der Einzelklone geordnet, was gleichzeitig auch den Integrationsorten in 5'- zu 3'-Richtung des Syntheseclusters entsprach. Auf der Selektionsplatte für die Integration von pEMG-us/ds(*urf34*) traten circa 270 isolierte Einzelklone auf. Folglich war an dieser Stelle innerhalb des Syntheseclusters die Integration am erfolgreichsten. Ungefähr 180 Klone konnten auf der Agar-Platte für die Integration des Plasmides pEMG-us/ds(*urf31*) bestimmt werden, was zeigte, dass an diesem Lokus die Integration etwas schwieriger war als bei *urf34*, jedoch möglich. Des Weiteren konnten circa 90 Klone für die Integration des Plasmides pEMG-us/ds(*rmlAD*) im Bereich von *rmlACBD* identifiziert werden, wobei auf dieser Selektionsplatte bereits kleine Zellhaufen entstanden, was bedeutete, dass falsch-positive Klone ebenfalls selektiert wurden. Diese Zellhaufen traten zusammen mit circa 80 Einzelklonen auch auf der Platte für die Integration des Plasmides pEMG-us/ds(*welB*) auf. Wie bereits im Unterpunkt 4.4.3.4 beschrieben, konnte am Genort von *welQ* kein Plasmid erfolgreich integriert werden. Dies war auch nach der Konjugation auf der Selektionsplatte sichtbar, da sich zwar wenige, gelbe Kolonien auf der Platte befanden, diese aber nur als Zellhaufen wuchsen. Da nur wenige Einzelklone auftraten, bei denen nachgewiesen werden konnte, dass kein Integrationsereignis stattfand, und viele bereits durch den Phänotyp erkennbare falsch-positive Klone darstellten, konnte durch den Selektionsausstrich bereits bestätigt werden, dass am 5'-Terminus des Syntheseclusters keine Integration des Plasmides möglich war.

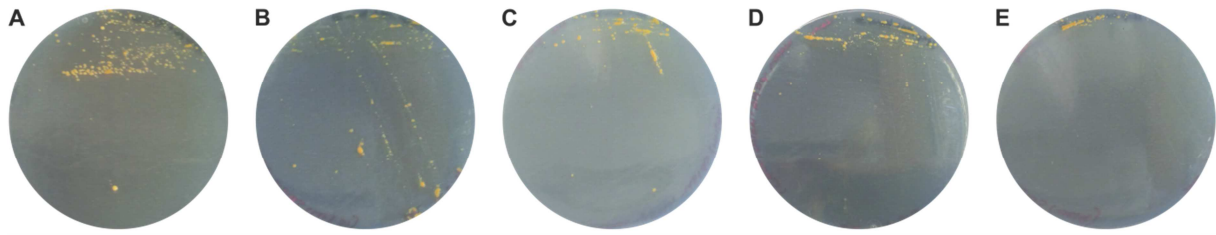


Abbildung 32: LB_{Kana/Strep} Agar-Selektionsplatten nach der triparentalen Konjugation zur Integration der pEMG Plasmide.

Sichtbar ist der Konjugations- bzw. Integrationserfolg verschiedener pEMG Plasmide anhand der abzuschätzenden Menge der Kolonien. Integration von A) pEMG-us/ds(*urf34*), B) pEMG-us/ds(*urf31*), C) pEMG us/ds(*rmlABCD*), D) pEMG-us/ds(*welB*) und E) pEMG-us/ds(*welQ*).

Da somit das Integrationsereignis am 3'-Ende des Syntheseclusters erfolgreich war, stellte sich nun die Frage, ob *downstream* dieses Clusters das vollständige Entfernen des pEMG Plasmides möglich war. Es zeigte sich, dass sich eine Region ohne zugeordnete Funktion (470 Bp), die sich 8,5 kBp unterhalb des Stoppcodons von *urf34* befand, nur mit dem gleichem Ergebnis des *knockouts* von *welB*, *rmlACBD*, *urf31* und *urf34* deletieren ließ. Ein weiterer zufällig ausgewählter Genbereich (benannt *ur: unknown region*; 450 Bp), der sich ca. 20 kBp unterhalb des Syntheseclusters befand und diesem ebenfalls noch keine Funktion zugeordnet werden konnte, wurde versucht mittels pEMG/pSWII Methode zu deletieren. Die Methode wurde identisch, wie mehrfach oben beschrieben (s. 4.4.1.1; PCR-Amplifikation mit Primern 5'*us_ur_EcoRI* und 3'*us_ur* bzw. 5'*ds_ur(OE)* und 3'*ds_ur_XbaI* zur Herstellung von pEMG-us/ds(*ur*)) durchgeführt und *ur* konnte in 25 % erfolgreich und vollständig aus dem Genom deletiert werden (Kolonie-PCR mit 5'*1193Bp_us_ur* und 3'*2482Bp_ds_ur*; Bandengrößen: Wildtyp 3250 Bp; *knockout* 2800 Bp). Ein zusätzlicher Ausstrich der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ *ur* auf LB_{Kana}-Agar-Platten bestätigte die Kanamycinsensitivität.

4.4.4 Plasmidbasierte Überexpression von Proteinen und Integration von Genen in das Welansynthesecluster

In einem weiteren Abschnitt dieser Arbeit wurde versucht, spezifische Gene plasmidbasiert im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 zu überexprimieren oder weitere Gene in dessen Genom zu integrieren, um durch diese zusätzlichen Enzymaktivitäten die Monomerstrukturen des EPS Welan verändern zu können.

4.4.4.1 Überexpression mit dem Plasmid pJB861

Um eine Verringerung des Rhamnoseanteils im Polysaccharid Welan zu bewirken, wurde zunächst versucht, die Enzyme PMM (Phosphomannomutase), PMI (Mannose-6-phosphatisomerase) und GMP (Mannosepyrophosphorylase), die für die GDP-Mannosesynthese verantwortlich waren, im Stamm *Sphingomonas* sp.

ATCC 31555 zu überproduzieren. Als Plasmid wurde das *broad-host-range* Plasmid pJB861, das für Genexpressionen und Klonierungsexperimente in vielen gram-negativen Bakterien verwendet wurde, gewählt (Blatny, Brautaset et al. 1997).

a) Analyse und Steigerung der Plasmidkopienzahl, sowie des Proteinexpressionslevels mittels Einführung von Punktmutationen

Das Plasmid pJB861 besitzt einen durch m-Toluat induzierbaren Pm-Promotor und dessen Regulatorgen *xyIS*. Außerdem weist es einen *oriV* (*origin of vegetative replication*) und das Gen *trfA*, das das essentielle Initiatorprotein der Replikation kodiert, auf. TrfA bindet an Intronsequenzen von *oriV*.

Der Leervektor pJB861 wurde vom National Institute of Genetics (NIG; Japan) bezogen, wobei dessen Sequenz nicht mit der bekannten Plasmidkarte übereinstimmte. Dies wurde bemerkt, da nach einer Isolierung der DNA mittels dem *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (s. 3.2.1) trotz reduziertem Elutionsvolumen nur eine DNA-Konzentration von 20-40 ng/μL erreicht werden konnte. Da diese Plasmidmenge auch bereits einen limitierenden Faktor für Standardklonierungen darstellte, musste versucht werden, die Kopienzahl zu erhöhen. Laut Blatny *et al.* konnte die Kopienzahl des Vektors leicht durch Punktmutationen im *trfA* modifiziert werden. Aus diesem Grund wurde eine Sequenzierung des Plasmides durchgeführt. Hierbei konnte eine Punktmutation an der Base 138 (Adenin anstatt Guanin) im *trfA* Gen bemerkt werden. Da sich diese Mutation an der dritten Stelle des Codons für die Aminosäure Methionin befand, wurde anstatt dieser Aminosäure Isoleucin in das Protein eingebaut. Da der Austausch von einzelnen Aminosäuren in diesem Gen Auswirkungen auf die Plasmidmenge zeigte, sollte nun untersucht werden, ob die Mutation an der Basenposition 138 einen Einfluss hatte. Da zusätzlich das Ziel einer gesteigerten Kopienzahl des Plasmides pJB861 für die Vereinfachung der Klonierung und für spätere, höhere plasmidbasierte Expressionen in *Sphingomonas sp.* verfolgt wurde, wurden die Mutationen 251M und 271C ebenfalls separat eingeführt. Die Mutation 251C, die einen Austausch von Threonin zu Methionen darstellte, und die Mutation 271C (Austausch Arginin zu Cystein) sollten laut Literatur eine 16- bzw. 8-fache Steigerung der Plasmidanzahl in einer Zelle mit sich bringen (Blatny, Brautaset et al. 1997). Für die Analyse der Einflüsse der Mutationen 46M, 251M und 271C auf die Plasmidkopienzahl wurde zunächst der Leervektor pJB861-L, der einen zusätzlichen *Linker* mit den Restriktionsschnittstellen für KpnI und Scal mit einer dazwischenliegenden Ribosomenbindestelle enthält, durch QuikChange-PCR™ (s. 3.2.7.3) verändert. Hierzu wurde, wie in den Methoden beschrieben, zunächst ein Amplifikationsschritt mit 4 Zyklen und den Primern 5'trfA46M und 3'trfA46M, bzw. 5'trfA251M und 3'trfA251M, sowie

5'trfA271C und 3'trfA271C durchgeführt. Nach der Vereinigung der jeweiligen PCR-Ansätze und einer weiteren Fragmentsynthese durch PCR wurde der Vektor pJB861-L mit DpnI verdaut und jeweils 10 µL des jeweiligen Ansatzes in NEB Turbo Zellen transferiert. Anschließend wurden die Plasmide pJB861-L-46M, pJB861-L-251M und pJB861-L-271C aus den Zellen isoliert und zur Überprüfung der eingeführten Punktmutation mit den Primern 5'trfA_seq und 3'trfA_seq sequenziert. Darüberhinaus wurden ebenfalls die Konstrukte pJB861-L-46M-251M und pJB861-L-46M-271C durch eine erneute Durchführung einer QuikChange-PCR™ mit den Primern 5'trfA251M und 3'trfA251M, bzw. 5'trfA271C und 3'trfA271C und dem Templat pJB861-L-46M erstellt und zur Identifizierung der positiven Klone die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Die letzte klonierte Plasmidvariante stellte das Konstrukt pJB861-L-46M-251M-271C, das drei Punktmutationen im Vergleich zu pJB861-L besitzt, dar. Hierbei diente pJB861-L-46M-251M als Templat für eine erneute QuikChange-PCR™ mit den Oligonukleotiden 5'trfA271C und 3'trfA271C. Positive Konstrukte wurden wie oben beschrieben identifiziert.

Für einen Vergleich der Plasmidkopienzahl wurden je NEB Turbo, sowie DH5α Zellen mit den Konstrukten pJB861-L, pJB861-L-251M, pJB861-L-271C, pJB861-L-46M, pJB861-L-46M-251M, pJB861-L-46M-271C und pJB861-L-46M-251M-271C transformiert, auf LB_{Kana}-Agar-Platten selektiert. Die Plasmidisolierung wurde wie in 3.2.1 beschrieben, durchgeführt. Die erhaltenen DNA-Mengen wurden vermessen und miteinander verglichen (s. Abbildung 33). Alle Ansätze wurden sowohl in NEB Turbo als auch in DH5α Zellen in Triplikaten durchgeführt. Der Abbildung 33 war zu entnehmen, dass die DNA-Konzentrationen des Plasmides pJB861-L in beiden Zellstämmen mit 42 bzw. 41 ng/µl am geringsten waren. Durch die Einführung von 251M und 271C konnten die Konzentrationen 30 bzw. 24 %, sowie 16 bzw. 10 % gesteigert werden. Die Entfernung der unerwünschten Sequenz, die das Codon für die Aminosäure Isoleucin darstellte, führte nur zu einer kleinen Steigerung der Plasmidmenge von 3-4 %, wobei allerdings diese Mutation einen entscheidenden Einfluss auf die Kopienanzahl der Plasmide pJB861-L-46M-251M und pJB861-L-46M-271C hatte. Die Mutation 271C konnte nur in der Kombination mit 46M die Plasmidmenge um das 1,7- bzw. 1,8-fache im Vergleich zu dem Plasmid pJB861-L erhöhen. Jedoch konnte die 8-fache Steigerung der Konzentration, die im Jahre 1997 publiziert wurde (Blatny, Brautaset et al. 1997), nicht erreicht werden. Des Weiteren konnte mit der Kombination der Mutationen 46M und 251M eine Verdopplung bzw. 2,3 fache Erhöhung der DNA-Menge erreicht werden, jedoch auch hierbei konnte die publizierte 16 fache Steigerung nicht nachgewiesen werden. Ein guter Erfolg zeigte sich bei der Doppelmutation 251M und 271C: Hier konnten DNA-Konzentration von 193 bzw. 200 ng/µL erhalten werden. Eine weitere Zunahme der Konzentration auf

260 ng/μL konnte mit dem Konstrukt pJB861-L-46M-251M-271C verzeichnet werden. Somit konnte die Plasmidkonzentration durch die Einführungen der Punktmutationen 46M, 251M und 271C stark erhöht werden, wobei durch die Dreifachmutation in *trfA* eine Steigerung um mehr als 600 % verglichen mit der Menge des Plasmides pJB861-L folgte.

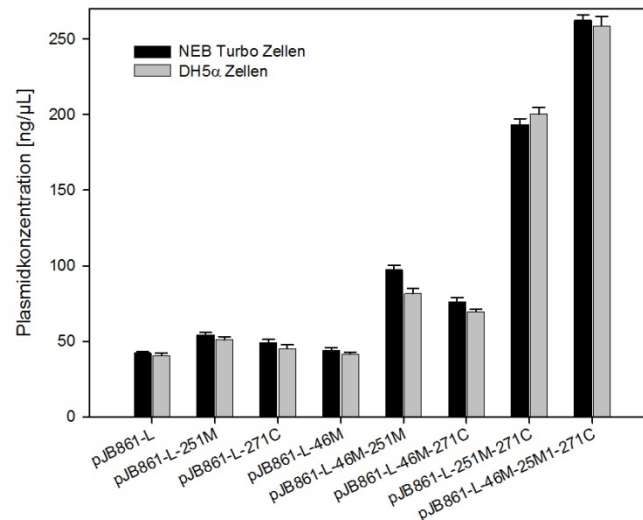


Abbildung 33: Vergleich der Plasmidkonzentrationen von pJB861-L, pJB861-L-251M, pJB861-L-271C, pJB861-L-46M, pJB861-L-46M-251M, pJB861-L-46M-271C und pJB861-L-46M-251M-271C.

Von Übernachtskulturen wurden die Zelldichten bestimmt, die Kulturen auf $OD_{600}=1$ verdünnt und jeweils 5 mL zentrifugiert. Die Plasmide wurden mittels GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit isoliert und die Konzentration in [ng/μL] bestimmt. Die Konzentration der Plasmide, die von NEB Turbo Zellen isoliert wurden, sind in schwarz dargestellt und die Konzentrationen der Plasmide, die von DH5α Zellen isoliert wurden in grau. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen an.

Da eine Plasmidkopienzahl im Zusammenhang mit einem Expressionslevel eines entsprechenden plasmidcodierten Gens steht, wurden Konstrukte mit dem Gen *eGFP* für spätere Fluoreszenzmessungen erstellt. Hierzu wurde das Gen *eGFP* zunächst durch PCR mit den Primern 5'eGFP_AfIII und 3'eGFP_EcoRI und dem Templat pUO-pp-324-3-GFP-linker amplifiziert und mit AfIII und EcoRI in die oben genannten Plasmide inseriert. Nach der Transformation von NEB Turbo Zellen wurden am nächsten Tag positive Klone durch Kolonie-PCR mit den plasmidbasierten Oligonukleotiden pJB861-fwd und pJB861-rev identifiziert. Somit standen die Plasmide pJB861-L-eGFP, pJB861-L-251M-eGFP, pJB861-L-271C-eGFP, pJB861-L-46M-eGFP, pJB861-L-46M-251M-eGFP, pJB861-L-46M-271C-eGFP, pJB861-L-251M-271C-eGFP und pJB861-L-46M-251M-271C für Expressionsanalysen durch den Vergleich der Fluoreszenzsignale zur Verfügung. Für die Synthese von eGFP wurden je 3 mL LB_{Kana} -Flüssigmedium mit einer frischen Übernachtskultur auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft und nach 4 Stunden mit 2 mM Toluat geschüttelt, da ohne Induktion nur eine sehr geringe Expression beobachtet wer-

den konnte (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die Zellen für weitere 26 h bei 30 °C geschüttelt. Für die Probenvorbereitung wurden die Zellen dreimal in M9-Medium gewaschen und anschließend auf eine OD₆₀₀ von 0,75 normiert. Davon wurden jeweils 100 µL für die Aufnahme einer Fluoreszenzmessung benutzt (s. 3.5.4) und die Signalstärken analysiert und verglichen (s. Abbildung 34A). Dem Graphen ist zu entnehmen, dass das Fluoreszenzsignal und folglich die Proteinexpression mit der Plasmidkopienzahl korrelierten, da die Emission von den Zellen mit dem Plasmid pJB861-L-eGFP (35 AU), über pJB861-L-271C-eGFP (109 AU) bis hin zu pJB861-L-251M-eGFP (159 AU) stieg. Das Fluoreszenzsignal von pJB861-L-46M-eGFP nahm im Vergleich zu pJB861-L-eGFP nur um 10 % zu. Besonders auffällig war das hohe Emissionssignal der Zellen mit den Plasmiden pJB861-L-251M-271C-eGFP (674 AU) und pJB861-L-46M-251M-271C-eGFP (813 AU), was durch ein sehr hohes Proteinexpressionslevel bedingt wurde. Sehr stimmig waren auch die Vergleiche der Plasmidkonzentration zu den Fluoreszenzemissionssignalen: Die Plasmidkonzentration von pJB861-L-46M-251M verglichen mit pJB861-L-251M erhöhte sich um das 1,8-fache, das Emissionssignal um das 2-fache. Darüber hinaus konnte ein starker Einfluss durch die gleichzeitige Mutation von 251M und 271C erreicht werden, da die Plasmidmenge verglichen mit pJB861-L-46M-251M verdoppelt und die Proteinmenge um das 2,1-fache gesteigert wurde. Das höchste Signal und die größte DNA-Menge wurde durch das Plasmid pJB861-L-46M-251M-271C-eGFP erreicht, da auch hierbei im Vergleich zu pJB861-L-46M-251M die 2,7 fache Menge an Plasmid und die 2,6 fache Signalstärke erhalten wurde. Die Auftragung der Fluoreszenz gegen die Plasmidkonzentration zeigte eindeutig eine lineare Korrelation beider Größen (s. Abbildung 34B).

Somit konnte gezeigt werden, dass durch die Einführung der Punktmutationen 251M und 271C sowohl die Plasmidkopienzahl und folglich auch die Proteinmenge erhöht werden konnte. Im Zusammenspiel mit der Mutation 46M konnte das jeweilige Ergebnis ungefähr um das Doppelte gesteigert werden. Die beste Plasmidvariante beinhaltete das Gen *trfA* mit allen drei Mutationen.

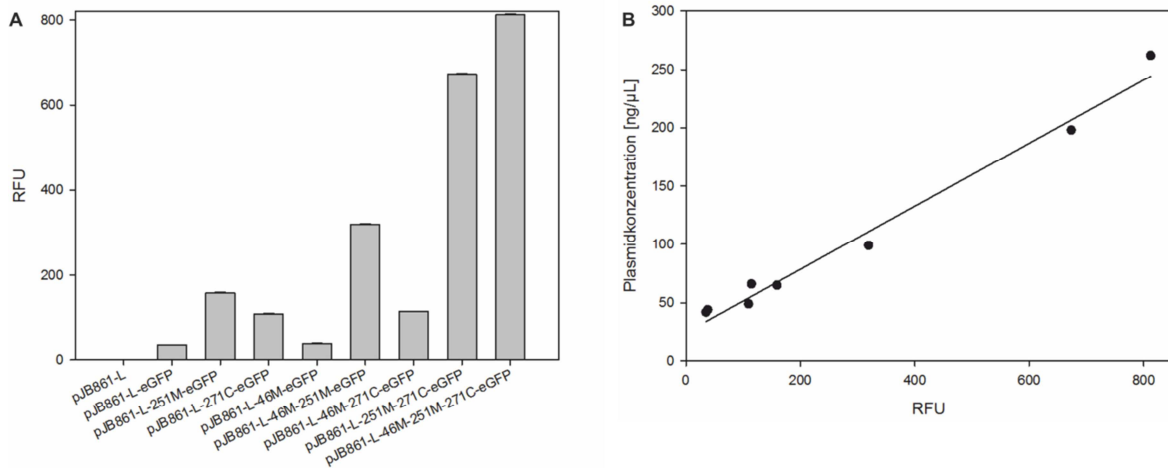


Abbildung 34: Fluoreszenzemission von NEB Turbo Zellen mit den Plasmiden pJB861-L-eGFP, pJB861-L-251M-eGFP, pJB861-L-271C-eGFP, pJB861-L-46M-eGFP, pJB861-L-46M-251M-eGFP, pJB861-L-46M-271C-eGFP und pJB861-L-46M-251M-271C-eGFP und Vergleich der Plasmidkonzentration und RFU mittels 2D-Plot

A) NEB Turbo Zellen mit verschiedenen Plasmidvarianten pJB861-eGFP wurden nach dreimaligen Waschen mit M9-Medium auf eine OD von 0,75 normiert und von 100 μL Zellsuspension wurde die Änderung der Fluoreszenzemission bei 488 nm nach Anregung bei 515 nm analysiert. Zellen mit dem Plasmid pJB861-L dienten als Negativkontrolle. Zu sehen ist eine Auftragung der transformierten Plasmide gegen die detektierte Fluoreszenz (RFU).

B) 2D-Plot: Zu sehen ist eine Auftragung der Plasmidkonzentration gegen die RFU der genannten Plasmide. Fit-Typ: Linear; R=0,9879; Gleichung: $y=0,27x+24,6$

b) Überexpression der Vorläufergene der GDP-Mannose mit pJB861

Da vermutet wurde, dass aus einer Überexpression der Gene, die die Vorläuferenzyme der GDP-Mannose codieren, eine Veränderung bzgl. des Mannose- bzw. Rhamnoseanteiles in der Monomerstruktur von Welan resultieren könnte, wurden die Gene für die Enzyme PMI (EC 5.3.1.8 auf ALBQ01000020.1), PMM (EC 5.4.2.8 auf ALBQ01000021.1) und GMP (EC 2.7.7.22 auf ALBQ01000017.1) in verschiedenen Kombinationen in den Vektor pJB861-L kloniert. Nach der erfolgreichen Herstellung der Konstrukte wurde der Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 mit je einem dieser Plasmide transformiert und auf LB_{Kana}-Agar-Platten selektiert. Da alle Plasmide erfolgreich via PCR in den Zellen nachgewiesen wurden und eine Überexpression der Enzyme jedoch via SDS-PAGE nicht sichtbar gemacht werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden die Zellen zur EPS-Produktion in EPS_{Kana}-Flüssigmedium kultiviert (s. 3.1.4). Nach Isolierung des Polymers wurde seine Monomerzusammensetzung mittels HT-PMP (s. 3.5.3.2) überprüft. Laut den Chromatogrammen und Quantifizierungen zeigte sich, dass keinerlei Veränderungen der Monomerverteilung im Vergleich zu Welan, das vom Wildtyp produziert wurde, erkennbar waren.

4.4.4.2 Überexpression Plasmid pSRK

a) Überexpression von *crtB*

Mit dem Vektor pSRK konnte eine erfolgreiche Expression des β -Glucuronidase-Gens *uidA* aus *E. coli* MG1655 im Stamm *Pseudomonas fluorescens*, der dem Stamm *Sphingomonas* sp. relativ nahe verwandt ist, nachgewiesen werden (Khan, Gaines et al. 2008), was auf ein erfolgreich anwendbares System in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 hindeutete. Der Vektor pSRK besitzt einen lac-Promotor, der eine stringente Regulation klonierter Gene bietet. Um eine relativ schnelle Beurteilung der Verwendung des Plasmids pSRK als Expressionssystem zu erhalten, wurde versucht das Gen *crtB* in der weiß gefärbten Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ *crtB* plasmidbasiert zu exprimieren, was zum gelben Phänotyp des Wildtyps *Sphingomonas* sp. ATCC31555 führen sollte. Hierzu wurde das Gen *crtB* durch PCR mit der gDNA von *Sphingomonas* sp. ATCC31555 und den Primern 5'*crtB*_NdeI und 3'*crtB*_KpnI amplifiziert und nach Verdau mit NdeI und KpnI in das Plasmid pSRK inseriert. Anschließend wurden NEB Turbo Zellen transformiert und auf LB_{Kana}-Agar-Platten ausplattiert. Positive Klone wurden durch Kolonie-PCR mit plasmidbasierenden Primern (pSRK-fwd, pSRK-rev) identifiziert und sequenziert, was zu pSRK-*crtB* führte. Elektrochemisch kompetente *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Zellen wurden mit dem Plasmid pSRK-*crtB* elektrochemisch transformiert und bei 30 °C auf LB_{Kana}-Agar-Platten inkubiert. Nach 2 Tagen befanden sich vielen weiße Einzelklone auf der Platte, in denen das Plasmid stabil vorhanden war (gezeigt durch Kolonie-PCR; Daten nicht gezeigt). Nach Lagerung der Platte von einem Tag bei RT war bereits eine leichte Gelbfärbung der Kolonien zu beobachten, wobei nach weiterer, eintägiger Aufbewahrung alle Klone komplett gelb gefärbt waren. Somit konnten die Mutanten *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ *crtB*+pSRK-*crtB* phänotypisch nicht vom Wildtyp unterschieden werden, was eine erfolgreiche Expression von *crtB* bestätigte. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass die Induktion durch 1 mM IPTG keine Beschleunigung der Gelbfärbung verursachte, jedoch wurde überraschenderweise das Wachstum der Klone beschleunigt. Nach EPS-Produktion der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC31555 Δ *crtB*+pSRK-*crtB* in EPS_{Kana}-Flüssigmedium (s. 3.1.4) wurde das Polymer isoliert (s. 3.4.1 und 3.4.3) und die Monomerzusammensetzung mit HT-PMP (s. 3.5.3.2) untersucht. Es zeigten sich keine Unterschiede im Aufbau zum Polymer, das vom Wildtyp produziert wurde (Daten nicht gezeigt), weshalb davon auszugehen ist, dass das Expressionssystem pSRK keine Auswirkung auf die EPS-Produktion besaß.

b) Überexpression von *rmlACBD*

Das Cluster *rmlACBD*, das die Enzyme für Synthese von der Rhamnosevorstufe codieren, wurde plasmidbasiert im Wildtyp *Sphingomonas* sp. ATCC31555 überexprimiert. Hierzu wurde das Plasmid pSRK-rmlACBD wie im oberen Abschnitt 4.4.1.1 hergestellt und elektrischkompetente *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Zellen transformiert. Positive Klone auf LB_{Chloramp}-Agar-Platten wurden durch Kolonie-PCR mit den plasmidspezifischen Primern (pSRK-fwd, pSRK-rev) identifiziert und anschließend zur EPS-Produktion kultiviert (s. 3.1.4).

Darüberhinaus wurden elektrisch kompetente Zellen der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlABCD mit dem Plasmid pSRK-rmlACBD transformiert und anschließend positive Klone wie oben beschrieben identifiziert. Eine Kultivierung dieses Stammes war jedoch nur in LB_{Chloramp}-Flüssigmedium mit einer reduzierten Antibiotikakonzentration von 24 μ g/mL (anstatt 34 μ g/mL) möglich. Aber auch unter diesen mildereren Bedingungen produzierte die Mutante ATCC 31555 Δ rmlABCD mit dem Plasmid pSRK-rmlACBD kein EPS.

4.4.4.3 Integration mittels pEMG-Vektor

Da wie oben beschrieben, die spezifische Integration durch homologe Rekombination nur mit dem Plasmid pEMG möglich war, wurde nun das Konstrukt pEMG-eGFP-us/ds für eine angestrebte eGFP-Überexpression im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 kloniert. Die homologen Regionen für die Integration (*us/ds*) wurden im Genbereich zwischen *atrB* und *welB* gewählt. Dieser Bereich zwischen den beiden Genen betrug 1387 Bp und stellte somit den größten Abschnitt ohne codierende Sequenz im Synthesecuster da. Zwischen den Regionen *us* und *ds* befanden sich 140 Bp, die nach der Integration weiterhin im Genom enthalten blieben. Für die Herstellung des Plasmides wurden zunächst die homologen Bereiche in zwei getrennten PCR Ansätzen (Oligonukleotiden 5'*us*_Int_AfIII und 3'*us*_Int bzw. 5'*ds*_Int(OE) und 3'*ds*_Int_NheI) mit der gDNA von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 als Templat amplifiziert und dann als Templat für die OE-PCR (s. 3.2.7.2) benutzt, was zu dem Produkt *us/ds* führte. Nach dem Verdau mit AfIII und NheI wurde das Fragment in den Vektor pEMG inseriert und eine Transformation von DH5 α pir Zellen durchgeführt. Nach erfolgreicher Identifikation positiver Klone wurde das Plasmid mit NheI und XbaI verdaut und dephosphoryliert (30 min, 37 °C), da die entstanden Überhänge kompatibel waren. Ligierte wurde dieses verdaute Plasmid mit einem Fragment, das aus den Vektor pJB861-L-eGFP mit NheI und XbaI herausgeschnitten wurde und das Gen *eGFP*, sowie eine Ribosomenbindestelle enthielt. Das durch Sequenzierung überprüfte Plasmid pEMG-eGFP-*us/ds* wurde mittels triparentaler

Konjugation (s. 3.1.6.6) in den Empfängerstamm ATCC 31555 übertragen und erfolgreich integriert (durch PCR bestätigt; Daten nicht gezeigt). Für die Analyse der eGFP Expression wurden 5 mL LB_{Kana}-Flüssigmedium mit einer frischen üN-Kultur auf eine OD von 0,5 angeimpft und für 35 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle der Wildtypstamm identisch behandelt. Zur Probenvorbereitung wurden die Zellen mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen und in dieser Lösung auf eine OD₆₀₀ von 0,75 eingestellt. Anschließend wurde diese Zellsuspension einer Fluoreszenzmessung unterzogen (s. 3.5.4). In dem Ansatz der Negativkontrolle konnte kein Fluoreszenzsignal festgestellt werden. Der Stamm ATCC 31555 mit dem integrierten Plasmid pEMG-eGFP-us/ds besaß trotz Verstärkung des Signals um den Wert 50 ein sehr geringes Emissionssignal. Durch Analyse der eGFP-Fluoreszenz des Stammes DH5α_{pir}+pEMG-eGFP-us/ds zeigte sich, dass das Plasmid pEMG kein geeignetes System für eine Expression darstellte, da vermutlich ein zusätzlicher Promotor auf dem Plasmid nötig gewesen wäre. Auch die konstitutiven Promotoren, die sich auf dem Welangenom befanden, waren für die plasmidbasierte Expression von eGFP nicht ausreichend.

4.5 Analyse gebildeter Welanvarianten

Polysaccharide können auf ihre Monomierzusammensetzung mit einer am Lehrstuhl etablierten HT-PMP Methode untersucht werden (s. 3.5.3.2). Die Identifikation und Quantifizierung der Monomere bzw. Dimere wurde mit den Anwendungsprogrammen Dionex Chromeleon für HPLC Daten und Bruker Hystar, sowie Quant Analysis für MS Daten ermöglicht. Eine weitere Methode zur Charakterisierung der EPS-Varianten stellte die Bestimmung des Molekulargewichtes durch GPC-Messungen dar (s. 3.5.1), die mit der Software PSS WinGPC Unichrom 8.1 ausgewertet wurde.

4.5.1 *Sphingomonas* sp. ATCC 31555

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Herstellung modifizierter Welanvarianten, die aus gentechnischen Manipulationen folgten. Um die Monomierzusammensetzung, sowie das Molekulargewicht dieser Polymere mit dem EPS Welan, das vom Wildtyp produziert wurde, vergleichen zu können, wurde zunächst das unveränderte Welan analysiert.

Für die Produktion des Welans wurde eine 1 L EPS_{Strep}-Flüssigmedium-Kultur (s. 3.1.4) für 50 h inkubiert und zu verschiedenen Zeiten Proben für die Analyse der OD₆₀₀ und der Glucosekonzentration im Medium entnommen (s. Abbildung 35). Dem Graphen der OD₆₀₀-Werte ist zu entnehmen, dass eine kurze lag-Phase von ca. 2 h auftrat. Anschließend stieg die Zellmenge in den nächsten 18 h konstant an, wobei das Maximum bei OD₆₀₀=8,2 lag. Auch die Glucosemenge im Medium veränderte sich in diesem Zeitabschnitt: Beim Kultivierungsstart waren 27,9 g/L Glucose enthalten und diese Menge veränderte sich in den ersten 5 Stunden nicht. Innerhalb der nächsten 2 Stunden reduzierte sich die Glucosemenge auf 26,4 g/L, was bedeutete, dass Glucose für die Produktion des EPS benötigt wurde. Zum Zeitpunkt des maximalsten OD₆₀₀-Wertes konnten 23,5 g/L Glucose im Medium wiedergefunden werden und diese Menge sank bis zum Kultivierungsabbruch (Kultivierungsdauer 50 h) auf 20,2 g/L. Nach der Zentrifugation der Brühe zur Abtrennung der Zellen befand sich im Überstand trotz mehrerer Verdünnungsschritte mit ddH₂O und einer Inkubation der Brühe bei 70 °C für 1 h eine gelbe, viskose „Wolke“, die nicht sedimentierte. Diese beinhaltete auf Grund der auftretenden Viskosität eine große Menge an EPS, das an Zellen haftete. Die „EPS-Zell-Wolke“ konnte nicht gefällt werden, was zu einer geringen EPS-Ausbeute von 365 mg/L führte. Außerdem befand sich zum Zeitpunkt der EPS-Isolierung noch ein hoher Anteil der Ausgangsmenge der Glucose im Medium, von dem ein Teil ebenfalls mit Isopropanol mitgefällt wurde und das Ausbeuteergebnis verfälschte. Die Kultivierungszeit zur Reduktion der Glucosekonzentration im Kultivierungsmedium konnte jedoch nicht verlängert werden, da sich die

Zellmenge ab einer Inkubation von 25 h verringerte, sowie die Viskosität der Lösung sehr hoch war und diese die Abtrennung der Zellen vom Medium erschwerte. Diese Kultivierung wurde weitere zweimal identisch durchgeführt, was zu den gleichen Ergebnissen führte.

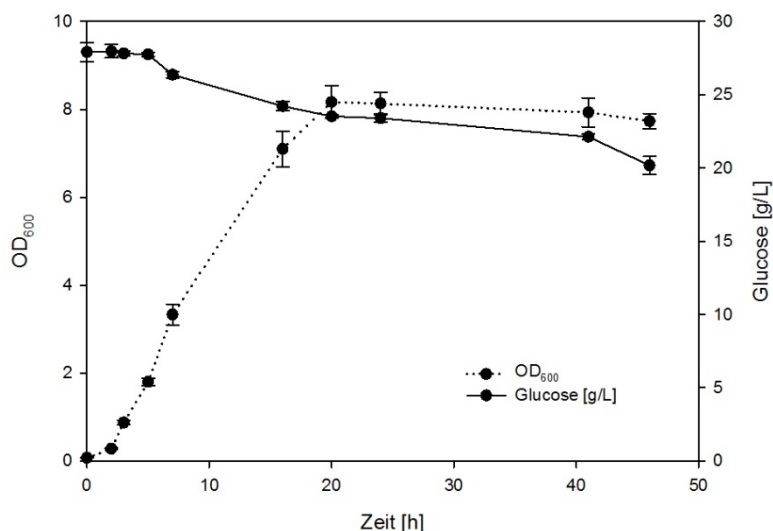


Abbildung 35: Wachstumskurven und Glucoseverbrauch von *Spingomonas* sp. ATCC 31555.

Die Zellen wurden via einer frischen Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 30°C und 100 rpm für 50 h geschüttelt. Das Zellwachstum und der Glucoseverbrauch wurden verfolgt. Zu sehen ist eine Auftragung der Zeit in [h] gegen die OD₆₀₀ (Wachstumskurven; gepunktet dargestellt) und gegen die Glucosemenge im Medium in [g/L] (als durchgehender Strich dargestellt). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der in biologischen Triplikaten durchgeführten Messungen an.

Das EPS-Pulver wurde anschließend über Nacht in ddH₂O gelöst (Konzentration der EPS-Lösung 1 g/L). Nach der anschließenden chemischen Hydrolyse wurde die Probe der HT-PMP-Methode unterzogen (s. 3.5.3.2). Die in den Chromatogrammen aufgetretenen Peaks wurden mittels den Standardlösungen A + B (s. 3.5.3.2) zugeordnet und quantifiziert. Die Monormengen konnten mit der Software Dionex Chromeleon bzw. bei Überlagerungen mit Quant Analysis ausgewertet werden. Tabelle 21 kann die Quantifizierung der Monomere entnommen werden und in Abbildung 36 ist die Überlagerung des MS- und UV-Chromatogrammes des EPS Welan(Glucose) sichtbar und der Tabelle 21 kann die Quantifizierung der Monomere entnommen werden.

Tabelle 21: Resultate der EPS Analyse mit HT-PMP Methode von *Spingomonas* sp. ATCC 31555 (Kultivierung in EPS-Medium).

Abkürzungen: Glc = Glucose; Gal = Galactose; Man = Mannose; Rha = Rhamnose; GlcUA = Glucuronsäure; + = positiv

Kohlenhydratgehalt [mg/L] (PMP)					Identifizierung Dimer via MS	
Glc	Gal	Man	Rha	GlcUA	Wiederfindung [%]	Glucuronsäure-Glucose
170±4	37±2	59±1	245±5	25±3	54	+

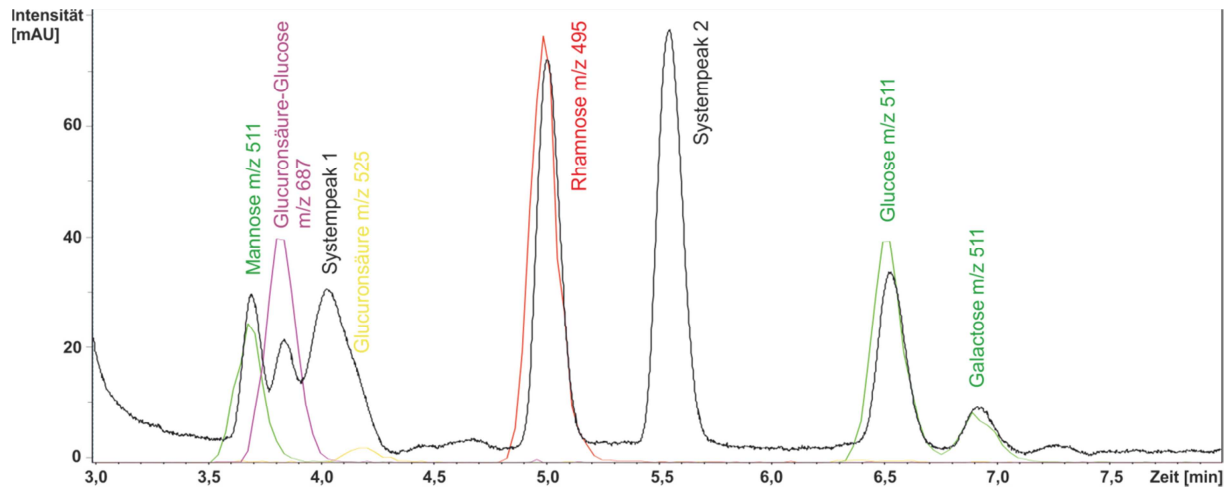


Abbildung 36: Überlagerung des UV- und MS-Chromatogrammes von der Monomeranalyse von Welan(Glucose).

UV: 245 nm (schwarz); Ionenchromatogramme: Hexosen (m/z 511, grün), Uronsäure (m/z 525, gelb), Deoxyhexose (m/z 495, rot), Dimer Uronsäure-Hexose (m/z 687, lila).

Sowohl dem Chromatogramm der HPLC, sowie der MS konnte entnommen werden, dass sich das analysierte EPS aus Glucose, Galactose, Mannose, Rhamnose und Glucuronsäure im molarem Verhältnis 2,0 : 0,4 : 0,7 : 3,2 : 0,3 zusammensetzte. Ein zusätzlicher Peak mit dem Maximum bei 3,8 min stellte das Dimer β -D-GlcUA-(1 \rightarrow 4)-D-Glc (m/z (*mass-to-charge ratio*) 687) dar, was aus dem Fragmentierungsmuster der MS-Daten entnommen werden konnte (siehe Anhang). Dieses Dimer, genannt Cellobiuronsäure (Arrecubieta, Lopez et al. 1996), entstand durch eine unvollständige Hydrolyse. Da Dimere aus Uronsäuren und Hexosen starke glycosidische Bindungen ausbilden können und diese durch Standardhydrolysebedingungen nicht leicht zu trennen sind, war im Falle des Polymers Welan keine komplette Hydrolyse möglich. Auch eine Verlängerung der Hydrolysezeit oder eine Verschärfung der Hydrolysebedingungen würde kein verbessertes Resultat erzielen, da dies zu einer erhöhten Degradation der Uronsäuren führten würde (Tait, Sutherland et al. 1990; Rühmann, Schmid et al. 2015). Die Menge an Cellobiuronsäure konnte durch den fehlenden Standard nicht quantifiziert werden. Folglich fehlte diese Dimermenge bei der Berechnung der Wiederfindung. In der Literatur ist eine Verteilung der Monomere von Glucose, Mannose, Rhamnose und Glucuronsäure von 2,0 : 0,3 : 1,6 : 1,0 bekannt (Sutherland 2005) und Rühmann *et al.* veröffentlichten eine Monomerzusammensetzung des kommerziellen Welans (Colltec, Welan gum Collstab W200), die mittels PMP-Derivatisierung ermittelt wurde, von 2,0 : 0,9 : 1,6 : 0,3. Besonders auffällig war hierbei der verringerte Anteil der GlcUA verglichen mit den bekannten Werten, da durch die chemische Hydrolyse mit TFA eine hohe Degradationsrate der Uronsäuren als Monomer auftrat. Der Abbildung 36 konnte entnommen werden, dass durch einen Abbau die Glucuronsäure nur in Teilmengen nachgewiesen werden konnte,

wodurch ein weiterer Fehler in der Wiederfindung auftrat. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die Konzentration der Rhamnose in der vermessenen Probe mit 245 mg/L circa 46 % (w/w) der analysierten Wiederfindung darstellte. Diese Rhamnosemenge ist für das vom Wildtyp produzierte Welan (Literaturwert Rhamnoseanteil ca. 27 %) zu hoch, da Rhamnose nur einmal in der Hauptkette und eventuell in der Seitenkette des Welans auftreten konnte.

Auffällig in der hier vermessenen Welanprobe war, dass das Monomer Galactose einen Anteil von ca. 7 % (w/w) der gesamten nachgewiesenen Monomere darstellte. Dies war sehr erstaunlich, da Galactose bisher noch nicht als Bestandteil der nativen Welanstruktur beschrieben wurde. In dieser Arbeit konnte durch die Analyse des Überstandes einer erneuten Fällung der aufgereinigten Probe bewiesen werden, dass die Galactose nicht als Monomer oder in Lactose als Dimer im Kultivierungsmedium enthalten war und somit bei der EPS-Fällung als Nebenprodukt mitisoliert wurde (Daten nicht gezeigt). In der Probe des Überstandes konnte nur Glucose quantifiziert werden, deren Konzentration (48 ± 5 mg/L) zur Berichtigung von den berechneten Konzentrationen der HT-PMP Proben abgezogen wurde. Für die Erklärung der auftretenden Galactosemonomere in der HT-PMP-Analyse des vom Wildtyp produzierten EPS, konnte durch Literaturrecherche das EPS WL-26 gefunden werden. Jia *et al.* publizierten im Jahr 2012 das Polysaccharid WL-26, das neben Welan, ebenfalls vom Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 produziert wurde (Jia, Zhang et al. 2012). WL-26, das aus Glucose, Galactose, Mannose, Rhamnose und Glucuronsäure im Verhältnis 2,0 : 1,2 : 1,2 : 3,5 : 0,8 bestand, besaß somit das Monomer Galactose, das kein Bestandteil von Welan ist. Außerdem besaß es einen β -D-GlcUA-(1 \rightarrow 4)-D-Glc Abschnitt, der ebenfalls im Welan zu finden ist. Für die Herstellung dieses Polysaccharides wurde ein Medium benutzt, dessen Kohlenstoffquelle Saccharose anstatt Glucose darstellte. Somit wurde der Stamm ATCC 31555 erneut unter denselben Bedingungen in 1 L des von Jia *et al.* veröffentlichten Medium kultiviert. Das Medium bestand aus 20 g/L Saccharose, 0,8 g/L NaNO₃, 3,2 g/L Hefextrakt, 2g/L KH₂PO₄, 0,1 g/L MgSO₄ und 0,0005 g/L FeSO₄, sowie 500 μ L Strep(100). Nach einer Inkubation von 3 Tagen wurden die Zellen durch Zentrifugation entfernt und das EPS wie gewöhnt isoliert und prozessiert. Auf Grund des Auftretens der oben erwähnten „EPS-Zell-Wolke“ lag die EPS-Ausbeute nur bei 320 mg/L. Dieses Polymer (benannt „Welan(Sac)“) wurde ebenfalls durch chemische Hydrolyse und Derivatisierung mit PMP auf seine Monomere untersucht (s. Tabelle 22). Die Überlagerung des MS- und UV-Chromatogrammes und Welan(Sac) ist in Abbildung 37 sichtbar.

Tabelle 22: Resultate der EPS Analyse mit HT-PMP Methode von *Shingomonas* sp. ATCC 31555 (Kultivierung im Medium nach Jia *et al.*) und von *Shingomonas* sp. ATCC 31555 (Kultivierung in EPS-Medium).

Abkürzungen: Glc = Glucose; Gal = Galactose; Man = Mannose; Rha = Rhamnose; GlcUA = Glucuronsäure; Rib = Ribose; + = positiv

EPS	Kohlenhydratgehalt [mg/L] (PMP)						Wiederfindung [%]	Identifizierung Dimer via MS Glucuronsäure-Glucose
	Glc	Gal	Man	Rha	GlcUA	Rib		
Welan (Sac)	120 ±6	0	33 ±1	109 ±5	Spuren	9 ±1	27	+
Welan (Glc)	170 ±4	37 ±2	59 ±1	245 ±5	25±3	0	54	+

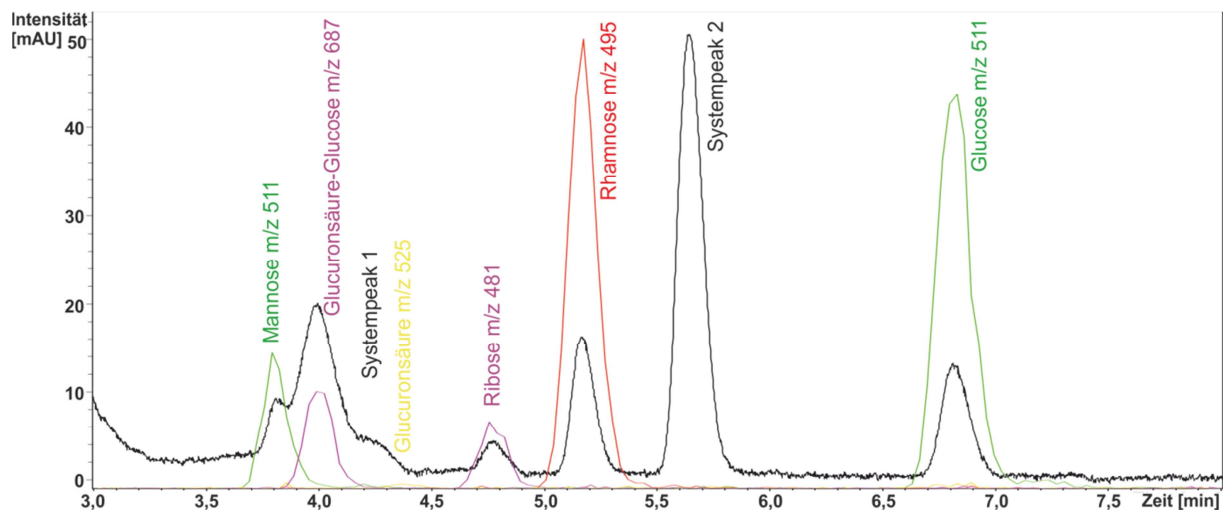


Abbildung 37: Überlagerung des UV- und MS-Chromatogrammes von der Monomeranalyse von Welan(Saccharose).

UV: 245 nm (schwarz); Ionenchromatogramme: Hexosen (m/z 511, grün), Uronsäure (m/z 525, gelb), Deoxyhexose (m/z 495, rot), Pentosen (m/z 481 lila), Dimer Uronsäure-Hexose (m/z 687, lila).

Das EPS, das durch die Kultivierung im Medium nach Jia *et al.* produziert wurde, zeigte einen Aufbau von Glucose, Mannose und Rhamnose im Verhältnis von 2,0 : 0,6 : 2,0. Des Weiteren wurde das Uronsäuredimer (m/z 687) aus GlcUA und Glc im Diagramm detektiert, während das Monomer GlcUA alleine nur in Spuren auftrat. Darüber hinaus konnte keine Galactose als Monomer bestimmt werden. Folglich konnte hierbei das Verhältnis, das von Rühmann *et al.* für Welan ermittelt wurde, annähernd erhalten werden, was somit bedeutete, dass in einem Medium mit Saccharose als Kohlenstoffquelle reines Welan isoliert werden konnte. Dies widersprach komplett der Hypothese für die Produktion von WL-26, die im Jahr 2012 von Jia *et al.* publiziert wurde. Die Wiederfindung war zusätzlich reduziert, da aus dem Medium 52 ± 1 mg/L Glucose mit Welan(Sac) mitgefällt und zur Ermittlung der Wiederfindung entsprechend subtrahiert wurden. Das Monomer Ribose, das ebenfalls detektiert wurde, stellte eine Verunreinigung der EPS-Probe dar. Im Anschluss wurden die Molekulargewichte der beiden EPS via GPC bestimmt (s. 3.5.1). Die GPC-Chromatogramme der Proben Welan(Glucose) und

Welan(Saccharose), sowie eine Überlagerung beider Proben sind in Abbildung 38 dargestellt.

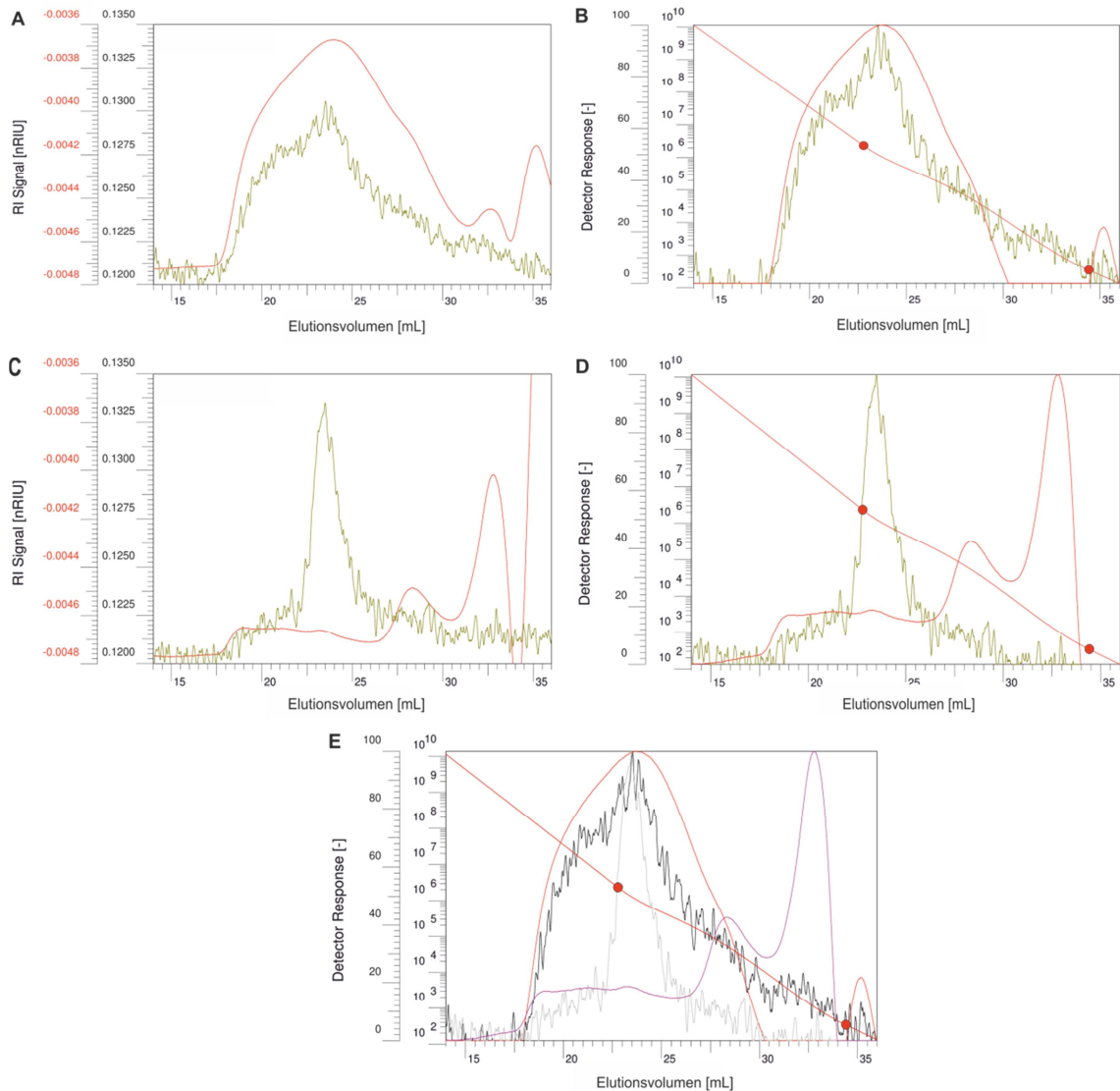


Abbildung 38: Chromatogramme der GPC zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Welan(Glucose) und Welan(Saccharose) anhand einer Pullulan- Kalibriergerade.

- A) Chromatogramm der Probe Welan(Glucose). Dargestellt ist das RI-Signal (rot) und das Lichtstreusignal (grün).
- B) Elutionschromatogramm der Probe Welan(Glucose). Dargestellt ist das normierte RI-Signal (rot), das normierte Lichtstreusignal (grün) und die Kalibriergerade mit Pullulan (Markierungen jeweils bei 342 und 2350000 Dalton)
- C) Chromatogramm der Probe Welan(Saccharose). Dargestellt ist das RI-Signal (rot) und das Lichtstreusignal (grün).
- D) Elutionschromatogramm der Probe Welan(Saccharose). Dargestellt ist das normierte RI-Signal (rot), das normierte Lichtstreusignal (grün) und die Kalibriergerade mit Pullulan (Markierungen jeweils bei 342 und 2350000 Dalton)
- E) Überlagerung der Chromatogramme der Probe Welan(Glucose) und Welan(Saccharose). Dargestellt ist das normierte Lichtstreusignal von Welan(Glucose) (schwarz), Welan(Saccharose) (hellgrau) sowie das normierte RI-Signal von Welan(Glucose) (rot) und Welan(Saccharose) (lila). Die Kalibriergerade mit Pullulan (Markierungen jeweils bei 342 und 2350000 Dalton) ist in rot dargestellt.

Die zur Quantifizierung verwendete Pullulanstandardgerade ist im Anhang dargestellt. Das GPC-Chromatogramm von Welan(Glc) zeigte für das RI (*refractive index* = Bre-

chungsindex)- sowie LS(Lichtstreu)-Signal einen sehr breiten Peak, der auf eine Mischung mehrere Polymere verschiedener Größen schließen ließ. Dem Maximum des Peaks konnte mit Hilfe der Pullulanstandardgerade eine Masse von $1 \cdot 10^6$ Da zugeordnet werden. Zusätzlich besaß der Peak eine kleine Schulter, was bedeutete, dass auch ein geringer Anteil eines Polymers, das kleiner als die ermittelte Masse war, in der Probe auftrat. Außerdem konnte eine weitere, sehr markante Schulter im Bereich $>2,35$ MDa identifiziert werden, weshalb vermutet wurde, dass Welan(Glucose) eine Mischung aus mindestens zwei Polymeren war. Eine genaue Bestimmung der hochmolekularen Schulter konnte nicht durchgeführt werden, da diese im Ausschlussvolumen der Säule zu finden war. Durch den direkten Vergleich der Chromatogramme von Welan(Glucose) und Welan(Saccharose) ließ sich vermuten, dass die Schulter $>2,35$ MDa ein zusätzliches EPS darstellte. Die Probe Welan(Saccharose) zeigte eine Molmassenverteilung, die ihr Maximum bei $1 \cdot 10^6$ Dalton hatte und keine polymeren Nebenprodukte. Diese Auswertung war nur mittels LS-Signal möglich. Da in diesem EPS keine Galactose als Monomer nachgewiesen werden konnte, konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass der Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 im EPS-Medium zwei verschiedene EPS bildete. Der Hauptanteil des isolierten Polysaccharides stellte das bekannte Welan dar. Als Nebenprodukt wurde ein Polysaccharid (benannt Welan-Gal) synthetisiert, das in seiner Struktur Galactose beinhaltet.

Um die Hypothese, dass der Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 fähig war gleichzeitig zwei EPS herzustellen, zu bestätigen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Es war bekannt, dass die für die Präzipitation der Polysaccharide verwendete Menge an Alkoholen den Präzipitationseffekt entscheidend beeinflusste (Smidsrød und Haug 1967; Swennen, Courtin et al. 2005) und folglich wurde versucht, die beiden EPS, die in der Probe Welan(Glucose) enthalten sind, durch die Verwendung unterschiedlicher Ethanol- und Isopropanolmengen zu trennen. Hierzu wurden 10 mg/mL EPS-Pulver in ddH₂O üN gelöst und am nächsten Tag 1 mL der Lösung mit Isopropanol bzw. Ethanol zu Endkonzentrationen von 10 - 95 % (v/v) gefällt. Ab 75 % (v/v) Isopropanol konnte EPS in steigenden Mengen (6,4 – 7,8 mg) isoliert werden. Bei den Fällungsversuchen mit Ethanol präzipitierte Welan nur mit 95 % (v/v) Ethanol. Nach der Trocknung der Polysaccharide wurden deren Monomierzusammensetzungen durch die HT-PMP Methode bestimmt, wobei in jeder Probe das Polysaccharid Galactose detektiert werden konnte (siehe Anhang). Somit konnte durch eine Fällung mit verschiedenen Alkoholkonzentrationen und –arten keine Trennung der beiden Polysaccharide der Probe Welan(Glucose) erreicht werden.

Ein weiterer Versuch beide EPS der Probe Welan(Glucose) präperativ trennen zu können und anschließend die Monomierzusammensetzung zu analysieren, stellte die Gelfiltration dar (s. 3.3.3.4). Es musste eine Säule gewählt werden, die eine Trennung im hochmolekularen Bereich ermöglichte. Hierzu wurde die Säule Sephacryl™ High Resolution column (320 mL; GE Healthcare) verwendet. Diese Säule wurde mit 10 mL 1 % (w/v) Welan(Glucose)-Lösung, die zuvor im Exsikkator entgast wurde, beladen und die Polysaccharide in den Elutionsfraktionen (4x96 Fraktionen à 0,85 mL; Fluss 0,2 mL/min) durch den Phenol-Schwefelsäure-Assay (s. 3.5.6) identifiziert (s. Abbildung 39). Es konnte festgestellt werden, dass die Wiederfindung der Polysaccharide (Summierung aller Fraktionen) nur 8,1 % (w/v) betrug (aufgetragene Glucoseäquivalente: 77,8 mg; Wiederfindung: 6,29 mg). Nur in Fraktionen der zweiten 96 *well*-Platte, sowie in vier Fraktionen der dritten Platte konnte Polysaccharid nachgewiesen werden. Des Weiteren befanden sich Polysaccharide in diffuser Reihenfolge und Mengen in den Elutionsfraktionen, weshalb keine Trennung zweier EPS erkennbar war. Auch die anschließende Einkonzrierung der Proben und Monomerbestimmung via HT-PMP bestätigte, dass eine Gelfiltration für die Auftrennung der Probe Welan(Glucose) im präperativen Maßstab unmöglich war, da die Viskosität der Probe für diese Methode einen entscheidenden Nachteil darstellte.

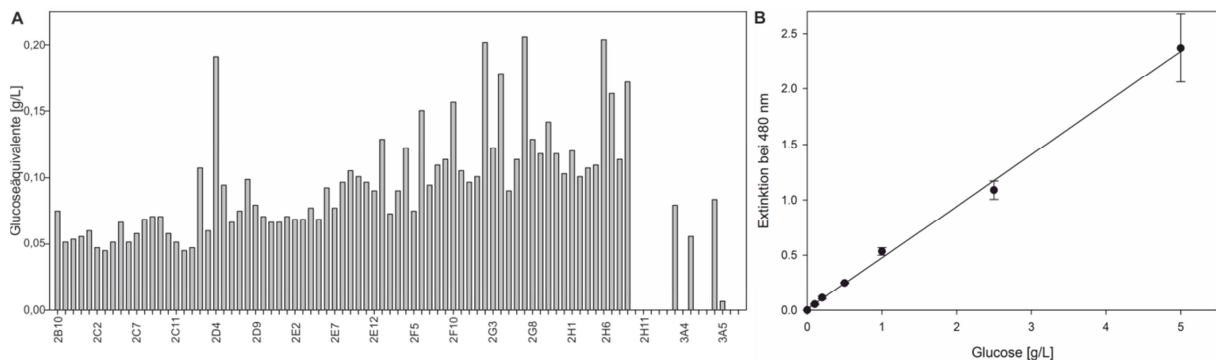


Abbildung 39: Verteilung von Glucose in den Fraktionen der Gelfiltration und Kalibriergerade des Phenol-Schwefelsäure Assays mit Glucose.

A) Glucoseäquivalente [g/L] der einzelnen Fraktionen

B) Kalibriergerade mit Glucose für die Quantifizierung der Glucose in den jeweiligen Fraktionen

($y = 0,47x + 0,01$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen an. Fit Typ: linear; $R=0,9990$

4.5.2 *Knockout* Mutanten des Stammes *Spingomonas* sp. ATCC 31555

Im nachfolgenden Abschnitt dieser Arbeit werden die EPS der Mutanten, die durch die *knockout* Methode pEMG/pSWII erzeugt wurden, auf deren Monomierzusammensetzung und Molekulargewicht analysiert.

4.5.2.1 EPS Welan Δ rmlACBD

Nach einer komplexen Analyse der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD stellte sich heraus, dass nur 50 % der Kopien des Clusters *rmlACBD* deletiert werden konnten, da das Plasmid pEMG-us/ds(rmlAD) nach Abschluss der Methode weiterhin im Genom integriert war. Diese Mutante wurde im Fermenter (s. 3.1.5.2) und im Schüttelkolben (s. 3.1.4) mit dem Flüssigmedium EPS_{Strep} zur Herstellung des EPS Welan Δ rmlACBD kultiviert, wobei mehrere Proben zur Analyse des OD₆₀₀-Wertes und der Glucosemenge im Medium entnommen wurden (s. Abbildung 40). Der Wachstumskurve der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD war zu entnehmen, dass die lag-Phase ca. 3 Stunden betrug, was bedeutete, dass diese Phase im Vergleich zum identisch kultivierten Wildtyp etwas länger war. Nach ca. 30 h Kultivierung wurde die stationäre Phase mit einer OD₆₀₀ von 8,4 erreicht. Die EPS-Produktion, die am Glucoseverbrauch erkennbar war, setzte im ersten Drittel der Inkubation ein. Ein Unterschied zur EPS-Produktion des Wildtyps war, dass die Mutante auch in der stationären- und Absterbephase noch Glucose verstoffwechselte.

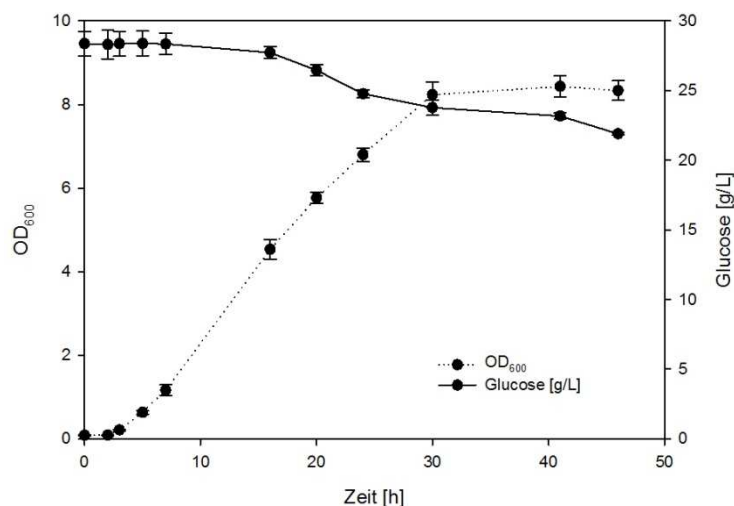


Abbildung 40: Wachstumskurven und Glucoseverbrauch von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD.

Die Zellen wurden via Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 30°C und 100 rpm für 50 h geschüttelt. Das Zellwachstum und der Glucoseverbrauch wurden verfolgt. Zu sehen ist eine Auftragung der Zeit in [h] gegen die OD₆₀₀ (Wachstumskurven; gepunktet dargestellt) und gegen die Glucosemenge im Medium in [g/L] (als durchgehender Strich dargestellt). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der in biologischen Triplikaten durchgeführten Messungen an.

Nach der Kultivierung wurde das EPS Welan Δ rmlACBD isoliert und wie gewohnt aufgearbeitet (s. 3.4.1. und 3.4.3). Die Ausbeute im Fermenter betrug 757 mg/L bzw. 90 mg/L im Schüttelkolben, da auch hierbei nach der Zentrifugation zur Zellabtrennung eine „EPS-Zell-Wolke“ diese Ausbeuten reduzierte. Somit konnte durch die Inkubation im Schüttelkolben (1 L EPS_{Strep}-Flüssigmedium, 5 L Schikanekolben) nur ¼ der EPS-Menge im Vergleich zum Wildtyp, der unter identischen Bedingungen heranwuchs, isoliert wer-

Ergebnisse

den. Das erhaltene EPS-Pulver wurde auf seine Monomierzusammensetzung mit der HT-PMP Methode (s. 3.5.3.2) analysiert (s. Tabelle 23, Abbildung 41 und Abbildung 42).

Tabelle 23: Resultate der EPS Analyse mit HT-PMP Methode von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD (Kultivierung in EPS Medium), *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 (Kultivierung im Medium nach Jia *et al.*) und von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 (Kultivierung in EPS-Medium).
Abkürzungen: Glc = Glucose; Gal = Galactose; Man = Mannose; Rha = Rhamnose; GlcUA = Glucuronsäure; Rib = Ribose; - = negativ

EPS	Kohlenhydratgehalt [mg/L] (PMP)					Identifizierung Dimer via MS		
	Glc	Gal	Man	Rha	Rib	Glc UA	Wiederfindung [%]	Glucuronsäure-Glucose
Welan	30	110	73	9	1	-	22	-
ΔrmlACBD	± 2	± 5	± 1	± 1	± 0			
Welan (Glc)	170	37	59	245	0	25 \pm 3	54	+
Welan (Sac)	± 4	± 2	± 1	± 5				
	120	0	33	109	9	Spuren	27	+
	± 6		± 1	± 5	± 1			

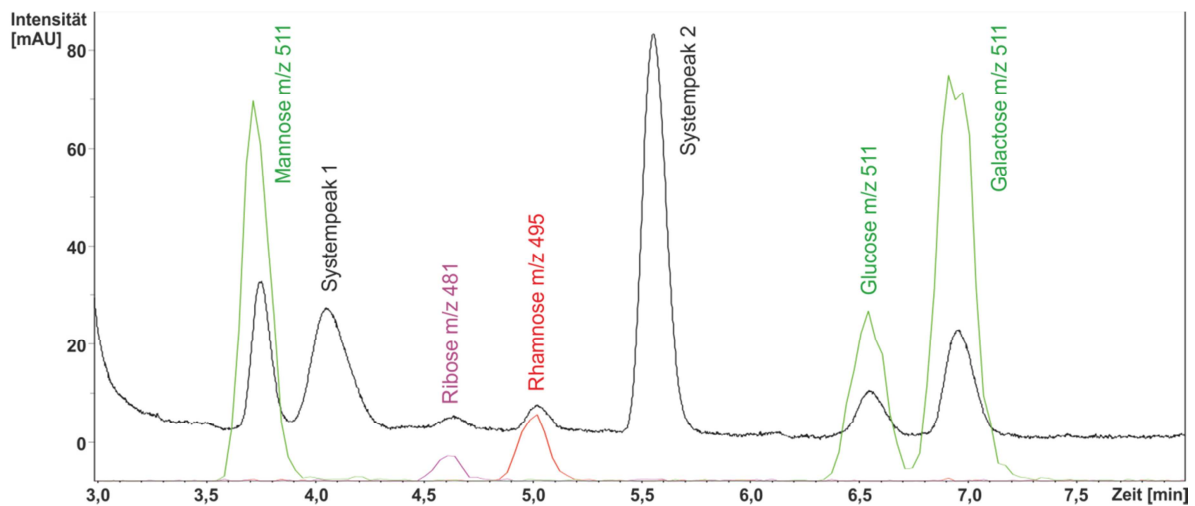


Abbildung 41: Überlagerung des UV- und MS-Chromatogrammes von der Monomeranalyse von Welan Δ rmlACBD.

UV: 245 nm (schwarz); Ionenchromatogramme: Hexosen (m/z 511, grün), Deoxyhexose (m/z 495, rot), Pentose (m/z 481, lila).

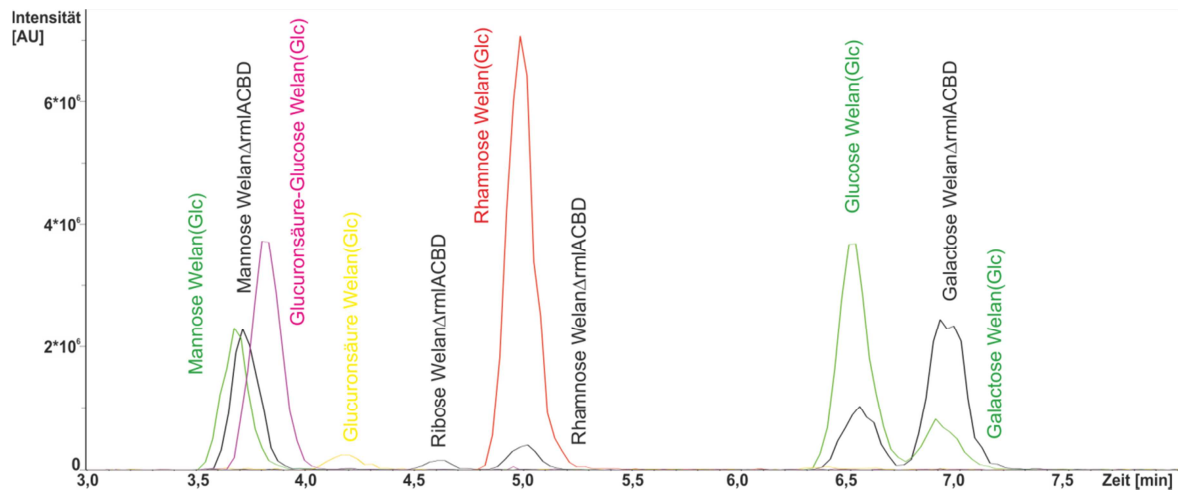


Abbildung 42: Überlagerung der MS-Chromatogramme von der Monomeranalyse von Welan(Glc) und Welan Δ rmlACBD.

Hexosen (m/z grün (für Welan(Glc) bzw. schwarz (für Welan Δ rmlACBD), Uronsäure (m/z 525, gelb), Deoxyhexose (m/z 495, rot bzw schwarz), Pentosen (m/z 481 schwarz), Dimer Uronsäure-Hexose (m/z 687, pink).

Das EPS Welan Δ rmlACBD zeigte einen Aufbau aus Glucose, Galactose, Mannose und Rhamnose, wobei Glucose und Galactose im Verhältnis 1,0 : 3,7 auftraten. Folglich war hier eine sehr hohe Menge an Galactose im EPS zu finden. Des Weiteren konnten keine GlcUA-Glc Dimere, sowie keine GlcUA Spuren im Chromatogramm detektiert werden, was bedeutete, dass diese Probe kein Welan enthielt. Die Wiederfindungsrate lag bei 22 %, wobei durch eine zweite Fällung des EPS eindeutig gezeigt werden konnte, dass sich in der Probe ein Polysaccharid befand. Auffällig war, dass der Rhamnoseanteil sehr reduziert wurde, was entweder durch die Deletion des *rmlACBD*-Clusters oder durch die alleinige Produktion des zweiten, vermuteten EPS (Welan-Gal), das dann einen geringen Rhamnoseanteil besitzen musste, bedingt wurde. Vermutlich konnte durch die Deletion das Polymer Welan nicht mehr synthetisiert werden. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die Polymerlösung auf seine Größenverteilung via GPC untersucht (s. 3.5.1 und Abbildung 43A). Das LS-Signal zeigte zwei Fraktionen, die gut getrennt waren. Der höhere Peak (Elutionsvolumen 23 mL) entsprach einer Masse von $1 \cdot 10^6$ Da, was auf das Auftreten des EPS Welan hindeutete. Dem Peak mit dem Elutionsvolumen von 19 mL befand sich im Ausschlussvolumen, da hierbei das Trennvermögen der Säulen nicht ausreichte. Da in der Überlagerung des GPC-Chromatogramms der Probe Welan(Glucose) mit der Probe Welan Δ rmlACBD (s. Abbildung 43B) eindeutig erkennbar war, dass der Peak mit dem Elutionsvolumen von 19 mL in beiden Proben identifiziert werden konnte, handelte es sich um Welan-Gal. Zusätzlich konnte in beiden Chromatogrammen der dem Welan zugewiesenen Peak identifiziert werden (Elutionsvolumen: 23 mL). Bei der Betrachtung der RI-Signale war zu erkennen, dass der Peak für Welan-Gal deutlich erkennbar war, was bedeutete, dass sich eine große Menge dieses

Polymers in der analysierten Probe befand. Des Weiteren befand sich laut RI-Signal nur ein kleiner Anteil Welan in der Probe, was das Ergebnis der HT-PMP Studie bestätigte. Auffällig war, dass das LS-Signal bei 19 mL niedriger als das LS-Signal bei 23 mL war, was trotz der früheren Elution für eine geringere Molekülmasse des bei 19 mL eluierten Polymers spricht. Folglich hätte Welan-Gal eine niedrigere Molekülmasse als Welan, obwohl es im Ausschlussvolumen der Säule detektiert wird.

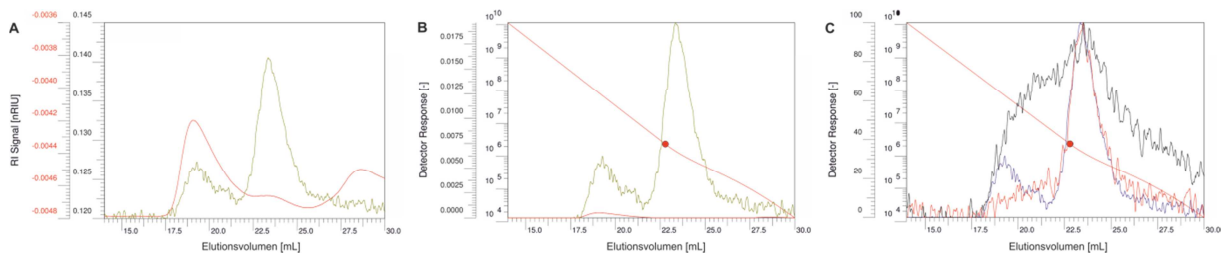


Abbildung 43: Chromatogramme der GPC zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Welan Δ rmlACBD, sowie Überlagerung der Chromatogramme Welan(Glucose), Welan(Saccharose) und Welan Δ rmlACBD.

- Chromatogramm der Probe Welan Δ rmlACBD. Dargestellt ist das RI-Signal (rot) und das Lichtstreuungssignal (grün).
- Elutionschromatogramm der Probe Welan Δ rmlACBD. Dargestellt ist das RI-Signal (rot), das Lichtstreuungssignal (grün) und die Kalibriergerade mit Pullulan (Markierung bei 2350000 Dalton).
- Überlagerung der Chromatogramme der Probe Welan(Glucose), Welan(Saccharose) und Welan Δ rmlACBD. Dargestellt ist das normierte Lichtstreuungssignal von Welan(Glucose) (schwarz), Welan(Saccharose) (rot) und Welan Δ rmlACBD (blau). Die Kalibriergerade mit Pullulan (Markierung 2350000 Dalton) ist in rot dargestellt.

Folglich konnte gezeigt werden, dass die Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD ein EPS bildete, das im Wildtyp wohl ca. $\frac{1}{4}$ der gebildeten Polymermenge entsprach. Die Mutante war auf Grund der Anwendung der Deletionsmethode pEMG/pSWII fähig nur Spuren an Welan herzustellen, wobei die Produktion von Welan-Gal nicht eingestellt wurde.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit versucht, das EPS Welan Δ rmlACBD im Medium nach (Jia, Zhang et al. 2012) herzustellen. Dieses Medium enthielt anstatt Glucose Saccharose als Kohlenstoffquelle und der Wildtyp *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 produzierte unter diesen Bedingungen nur Welan und kein zusätzliches Polysaccharid. Die Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD konnte in diesem Medium wachsen, jedoch war es nicht möglich EPS zu isolieren. Diese Mutante produzierte also nur das EPS, das Galactose enthielt, und dieses konnte mit Saccharose nicht hergestellt werden.

Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob die Eigenschaften von Welan Δ rmlACBD auf die Deletion des Clusters *rmlACBD* oder auf die Integration des Plasmides pEMG-us/ds(*rmlACBD*) zurückzuführen waren. Aus diesem Grund wurde die Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555::pEMG-us/ds(*rmlACBD*) erstellt und zur Herstellung von EPS kultiviert (s. 3.1.4). Nach der Isolierung und Aufreinigung des EPS (s. 3.4.1 und

3.4.3) wurden die Proben ebenfalls mit den Methoden der HT-PMP (s. 3.5.3.2) analysiert (s. Tabelle 24). Durch die Monomerbestimmung konnte gezeigt werden, dass diese Ergebnisse denen des EPS Welan Δ rmlACBD entsprachen. Folglich veränderte der zweite Schritt, d.h. die Transformation der Integrationsmutante mit dem Plasmid pSWII und die daraus folgende Entfernung des Plasmides pEMG aus dem Genom nicht die Fähigkeit der EPS Produktion. Das EPS der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555::pEMG-us/ds(rmlACBD) entsprach Welan Δ rmlACBD.

Tabelle 24: Resultate der EPS Analyse mit HT-PMP Methode von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555::pEMG-us/ds(rmlACBD) (Kultivierung in EPS Medium).

Abkürzungen: Glc = Glucose; Gal = Galactose; Man = Mannose; Rha = Rhamnose; GlcUA = Glucuronsäure; - = negativ

EPS	Kohlenhydratgehalt [mg/L] (PMP)						Wiederfindung [%]	Identifizierung Dimer via MS Glucuronsäure-Glucose
	Glc	Gal	Man	Rha	Rib	Glc UA		
WelanΔrmlACBD -pEMG -us/ds(rmlAD)	75 ± 4	192 ± 3	128 ± 1	12 ± 1	-	-	41	-
WelanΔrmlACBD	30 ± 2	110 ± 5	73 ± 1	9 ± 1	1 ± 0	-	22	-

4.5.2.2 EPS Welan Δ welB, Welan Δ urf31 und Welan Δ urf34

Die drei Mutanten ATCC 31555 Δ welB, ATCC 31555 Δ urf31 und ATCC 31555 Δ urf34 wurden zur Herstellung der EPS Welan Δ welB, Welan Δ urf31 und Welan Δ urf34 angezogen (s. 3.1.4). Das Zellwachstum und der Glucoseverbrauch während der Kultivierung, sowie die Ausbeuten waren vergleichbar zur Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD (s. Abbildung 40; s. Anhang). Nach der Isolierung und Aufarbeitung der EPS (s. 3.4.1 und 3.4.3) wurden jeweils der Aufbau auf Monomerenbasis und das Molekulargewicht bestimmt (s. 3.5.3.2 und 3.5.1; s. Tabelle 25). Alle Chromatogramme besaßen die selben Monomere wie Welan Δ rmlACBD (Ribose stelle eine Verunreinigung in der Probe Welan Δ urf31 dar), was bedeutete, dass auch hierbei keine Glucuronsäuren und folglich keine GlcUA-Glc Dimere detektiert wurden. Folglich beinhaltet keines dieser EPS Welan, was zeigte, dass jeder dieser erstellten *knockouts* die Fähigkeit der Stämme für die Produktion von Welan zerstörte. Auffällig war, dass Welan Δ urf34 einen sehr geringen Anteil an Rhamnose besaß. Dieses Phänomen konnte bereits in Welan Δ rmlACBD beobachtet werden, weshalb die Deletion von *urf34* wohl auch Auswirkungen auf den Einbau der Rhamnose hatte. Die Ausbeuten nach der Isolierung der EPS, sowie die Wiederfindungen waren relativ gering (~100 mg/L bzw. <20 (w/w) %). Letztere sind erneut (vgl. 4.5.1) auf hohe Glucosekonzentrationen (79-137 mg/L), die aus den Medien mitgefällt wurden zurückzuführen.

**Tabelle 25: Resultate der EPS Analyse mit HT-PMP Methode von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ welB, ATCC 31555 Δ urf31 und ATCC 31555 Δ urf34 (Kultivierung in EPS Medium).
Abkürzungen: Glc = Glucose; Gal = Galactose; Man = Mannose; Rha = Rhamnose; GlcUA = Glucuronsäure; Rib = Ribose; - = negativ**

EPS	Kohlenhydratgehalt [mg/L] (PMP)						Wiederfindung [%]	Identifizierung Dimer via MS Glucuron-säure-Glucose
	Glc	Gal	Man	Rha	Glc UA	Rib		
ATCC 31555ΔwelB	30 \pm 1	64 \pm 2	47 \pm 1	46 \pm 1	-	-	19	-
ATCC 31555Δurf31	19 \pm 1	41 \pm 2	31 \pm 1	42 \pm 1	-	7 \pm 1	14	-
ATCC 31555Δurf34	24 \pm 1	64 \pm 2	40 \pm 1	6 \pm 0	-	-	13	-
Welan(Glc)	170 \pm 4	37 \pm 2	59 \pm 1	245 \pm 5	25 \pm 3	-	54	+

Die GPC-Proben der EPS Welan Δ welB, Welan Δ urf31 und Welan Δ urf34 besaßen vergleichbare Chromatogramme (s. Abbildung 44A+B+C+D+E+F): Der höchste Peak des RI-Signals und somit der größte Mengenanteil der Probe, der Welan-Gal entsprach, konnte im Ausschluss detektiert werden. Zusätzlich war nur eine kleine Erhöhung im Bereich des Molekulargewichts von Welan erkennbar (entsprach $1 \cdot 10^6$ Da). Die Kurve, die durch die Detektion mit dem LS-Detektor aufgezeichnet wurde, zeigte zwei Peaks im hochmolekularen Bereich, wobei der Peak bei 19 mL Elutionsvolumen eine geringere Fläche besaß, was folglich einer kleineren Molekülmasse entsprechen musste. Durch eine Überlagerung der RI- und LS-Kurven der EPS Welan Δ rmlACBD, Welan Δ urf31, Welan Δ urf34 und Welan Δ welB konnte die weitgehende Übereinstimmung in der Peakverteilung und –fläche festgestellt werden (s. Abbildung 44G).

Zusätzlich war zu erwähnen, dass Welan Δ urf31 erneut mittels der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ urf31 hergestellt wurde (3 d; 30 °C). Die Fällung dieses Polymers wurde ebenfalls mit Isopropanol durchgeführt, wobei anschließend die Fäden nicht durch Entfernung mit einem Glasstab isoliert wurden, sondern durch Sedimentation mittels Zentrifugation (4 °C; 10 min; 2000 rpm). Dieser Schritt bedeutete, dass kein gebildetes EPS verloren ging, jedoch sich auch viele Salze und Verunreinigungen in der EPS Probe befanden. Bei der Analyse dieser Probe mit HT-PMP (s. 3.5.3.2) konnte ein kleiner Peak für das Dimer der Glucuronsäure und Glucose detektiert werden, was bedeutete, dass durch die Zentrifugation auch Welan isoliert werden konnte (s. Anhang). Somit konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm fähig war eine kleine Menge Welan zu produzieren. Dies wurde bereits bei Auswertungen von GPC-Chromatogramme der EPS, die von den Mutanten produziert wurden, postuliert, da der sehr sensitive LS-Detektor stets ein Molekül mit dem M_w von $1 \cdot 10^6$ Da detektierte.

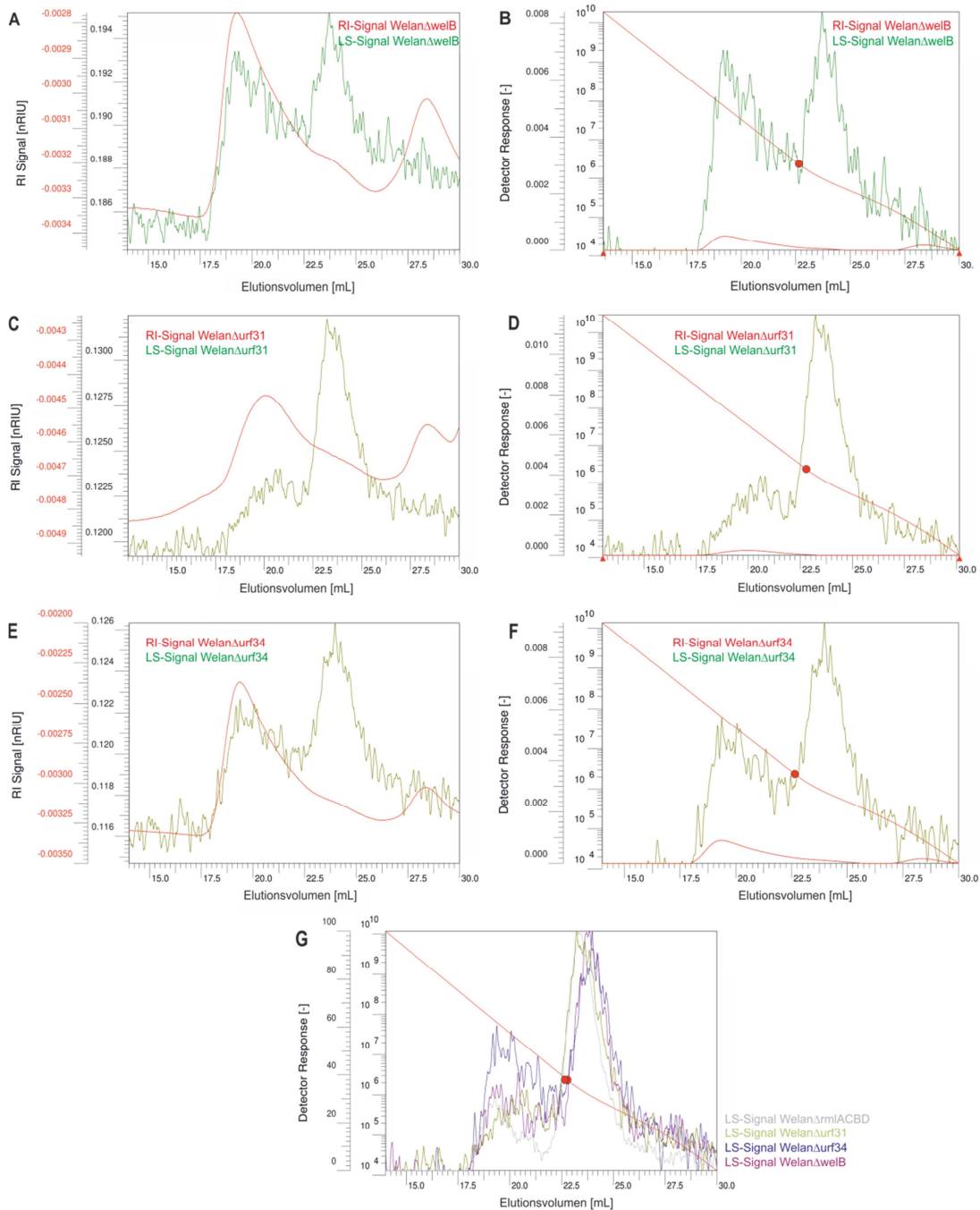


Abbildung 44: Chromatogramme der GPC zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Welan Δ welB, Welan Δ urf31, Welan Δ urf34, sowie Überlagerung der Chromatogramme Welan Δ urf34, Welan Δ urf31 und Welan Δ rmiACBD.

- A) Chromatogramm der Probe Welan Δ welB. Dargestellt ist das RI-Signal (rot) und das LS-Signal (grün).
- B) Elutionschromatogramm der Probe Welan Δ welB. Dargestellt ist das RI-Signal (rot) und das normierte LS-Signal (grün) und die Kalibriergerade mit Pullulan (Markierung bei 2350000 Dalton).
- C) Chromatogramm der Probe Welan Δ urf31. Dargestellt ist das RI-Signal (rot) und das LS-Signal (grün).
- D) Elutionschromatogramm der Probe Welan Δ urf31. Dargestellt ist das RI-Signal (rot) und das normierte LS-Signal (grün) und die Kalibriergerade mit Pullulan (Markierung bei 2350000 Dalton).
- E) Chromatogramm der Probe Welan Δ urf34. Dargestellt ist das RI-Signal (rot) und das LS-Signal (grün).
- F) Elutionschromatogramm der Probe Welan Δ urf34. Dargestellt ist das RI-Signal (rot) und das normierte LS-Signal (grün) und die Kalibriergerade mit Pullulan (Markierung bei 2350000 Dalton).
- G) Überlagerung der Chromatogramme der Proben Welan Δ rmiACBD, Welan Δ urf31, Welan Δ urf34 und Welan Δ welB. Dargestellt ist das normierte LS-Signal von Welan Δ rmiACBD (grau), Welan Δ urf31 (grün), Welan Δ urf34 (blau) und Welan Δ welB (violett). Zu sehen sind zwei die Kalibriergeraden für Welan Δ rmiACBD, Welan Δ welB bzw. Welan Δ urf31 mit Pullulan (Markierung bei 2350000 Dalton).

4.5.3 Plasmidbasierte Überexpression von *rmlACBD* in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555+pSRK-rmlACBD

Nach der Kultivierung des Stammes *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 + pSRK-rmlACBD (s. 3.1.4) und Isolierung, sowie Aufreinigung des produzierten EPS Welan+rmlACBD (s. 3.4.1 und 3.4.3) wurden Untersuchungen des Polymers via HT-PMP (s. 3.5.3.2) durchgeführt. Die Ergebnisse der HT-PMP sind in Tabelle 26 dargestellt. Die Quantifizierung der Monomere des EPS Welan+rmlACBD ergaben ein molares Verhältnis von Glc:Gal:Man:Rha:GlcUA von 2,0 : 0,1 : 1,7 : 2,2 : 0,1, was bedeutete, dass im Vergleich zum Wildtyp, der das EPS Welan(Glucose) produzierte (Glc:Gal:Man:Rha:GlcUA = 2,0 : 0,4 : 0,7 : 3,2 : 0,3), der Rhamnoseanteil nicht gesteigert werden konnte. Im EPS Welan+rmlACBD wurde durch die gesteigerte Verfügbarkeit der Rhamnosevorstufen die Seitenkette nur bestehend aus Rhamnose anstatt Mannose erwartet und deshalb sollte der Mannoseanteil gesenkt werden. Dies konnte nicht nachgewiesen werden, da nicht nur die Rhamnosekonzentration nicht gesteigert wurde, sondern auch die Konzentration an Mannose erhöht war (98 mg/L). Durch das Auftreten des Dimerpeaks, sowie der Detektion der GlcUA im MS Chromatogramm zeigte sich, dass Welan trotz transferiertem Plasmid pSRK-rmlACBD weiterhin produziert wurde. Darüber hinaus konnte zusätzlich festgestellt werden, dass nur eine geringe Konzentration an Galactose (4 mg/L) bei der Monomeranalyse wiedergefunden werden konnte. Folglich besaß dieses EPS nun mehr Mannose anstatt Galactose, was durch das Plasmid pSRK-rmlACBD ausgelöst wurde.

Tabelle 26: Resultate der EPS Analyse mit HT-PMP Methode von *Sphingomonas* sp. ATCC+pSRK-rmlACBD (Kultivierung in EPS Medium).

Abkürzungen: Glc = Glucose; Gal = Galactose; Man = Mannose; Rha = Rhamnose; GlcUA = Glucuronsäure; Rib = Ribose; + = positiv

EPS	Kohlenhydratgehalt [mg/L] (PMP)						Identifizierung Dimer via MS	
	Glc	Gal	Man	Rha	Glc UA	Rib	Wiederfindung [%]	Glucuronsäure-Glucose
Welan+rmlACBD	116±3	4±0	98±2	119±1	4±0	5±0	35	+
Welan (Glc)	170±4	37±2	59±1	245±5	25±3	-	54	+

5 Diskussion

5.1 Effekte von biotechnologisch modifizierten Alginaten auf LDH Strukturen

5.1.1 Die Wahl des Polymers Alginat zur Interkalation in LDH Strukturen

Anorganische Doppelhydroxidschichtstrukturen (*Layered double hydroxides*, LDH) mit Interkalaten werden heutzutage in der Bauchemie, der Abwasserreinigung bis hin zur Pharmaindustrie eingesetzt (Duan und Evans 2006; Raki und Beaudoin 2011) und werden auf Grund des großen Interesses stetig verbessert und weiter erforscht. Da viele verschiedene Arten von Anionen, wie z.B. unterschiedliche anorganische Ionen, aber auch große Biomoleküle, wie DNA, Proteine oder Polysaccharide interkaliert werden können (Darder, López-Blanco et al. 2005; Duan und Evans 2006; Zou und Plank 2012), ergeben sich sehr vielfältige Anwendungsbereiche für die resultierenden Interkalate. Die interkalierten Teilchen oder Moleküle können dabei auch zeitkontrolliert wieder an die Umgebung abgegeben werden, wodurch z.B. die Wirkung von Medikamenten oder von Additiven in Zement erst zu einem gewünschten Zeitpunkt eintritt oder langanhaltender ist.

Der erste Teil dieser Arbeit konzentrierte sich daher auf die Untersuchung der Interkalation von Alginaten in LDH. Ein positiver Aspekt für die Untersuchung von Alginaten lag in der einfachen Herstellung durch den Organismus *A. vinelandii*. Außerdem wird das synthetisierte EPS in das Medium sekretiert, was eine einfache Isolierung möglich macht. *A. vinelandii* wird zudem den R1 Organismen zugeordnet, von denen es unwahrscheinlich ist, dass sie beim Menschen eine Krankheit hervorrufen. Dadurch konnten Alginatvarianten relativ schnell und gefahrlos produziert, sowie aufgereinigt werden. Darüber hinaus besitzt *A. vinelandii* ein zirkuläres Genom, dessen Sequenz komplett veröffentlicht wurde (Setubal, dos Santos et al. 2009). Auf Grund dieser Verfügbarkeit des kompletten Genoms wurde in dieser Arbeit dieser Organismus für Alginatuntersuchungen verwendet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das EPS Alginat durch seine relativ einfache Produktion über den Modellorganismus *A. vinelandii*, die vorhandenen strukturellen Unterschiede, sowie durch die negativen Ladungen der Uronsäuren in der Hauptkette, die die elektrostatische Interaktion mit den positiv geladenen LDH-Strukturen und folglich die Interkalation begünstigen (Leroux, Gachon et al. 2004; Plank, Ng et al. 2012), ein gutes Ziel für die beabsichtigten Analysen darstellte.

5.1.2 Expression von Alginat mit AlgE4

Die mechanischen und chemischen Eigenschaften eines interkalierten Alginates bestimmen die finalen Produkteigenschaften und damit den Einsatz von Alginat-LDH-Strukturen. Aus diesem Grund ist es wünschenswert, die Alginatstruktur kontrolliert chemisch oder enzymatisch verändern zu können. In dieser Arbeit wurde die gezielte Veränderung der Monomierzusammensetzung mittels Epimerase ausgewählt, da bereits umfangreiche Informationen bezüglich der Eigenschaften und Funktionen bekannt waren (Ertesvag, Hoidal et al. 1995; Svanem, Skjak-Braek et al. 1999).

Es gibt keinen universellen Expressionsvektor für die Produktion von Proteinen in diesem Stamm, weshalb in dieser Arbeit der *broad host* Vektor pJB861 aufgrund seines starken Promotors P_m, der in vielen Wirten aktiv ist, ausgewählt wurde (Blatny, Brautaset et al. 1997). Außerdem konnte dieses Plasmidsystem bereits im Syntheseweg des EPS Xanthan erfolgreich eingesetzt werden (Winther-Larsen, Josefsen et al. 2000). Mit dem Ziel der *in vivo* Expression von AlgE4 in *A. vinelandii* wurde der Stamm mit dem Plasmid pJB861-algE4 via einer elektrischen Transformation oder biparentalen Konjugation transformiert. Beide Methoden waren erfolgreich, wobei durch die Konjugation eine größere Anzahl an Klonen auf der Selektionsplatte erhalten wurde. Das rekombinante Protein AlgE4 wurde nach einem etablierten Protokoll exprimiert und gereinigt (Hoidal, Ertesvag et al. 1999). Die Ursachen für das Auftreten mehrerer Proteine in der gereinigten Probe und das veränderte Laufverhalten, das ebenfalls von Hoidal *et al.* beschrieben wurde, wurden jedoch nicht aufgeklärt. Das rekombinante Protein AlgE4-His₆ konnte ohne zusätzliche Proteinbanden gereinigt werden. Das Anfügen eines C-terminalen His-tag ermöglichte offenbar die Abreinigung der weiteren inaktiven AlgE4-Varianten, bei denen es sich daher um Abbauprodukte handeln könnte. Das unnatürliche Laufverhalten von AlgE4-Proteinen bei der SDS-PAGE kann auf ihre gestreckte Struktur zurückgeführt werden, wodurch sich Abweichungen vom Laufverhalten der globulären Standardproteine ergeben.

5.1.3 Quantifizierung von Monomierzusammensetzung mittels CD

Um die Funktionalität von AlgE4 untersuchen zu können, mussten die Monomierzusammensetzungen der Alginatedukte bzw. -produkte bestimmt werden. Eine geeignete Methode zur Bestimmung der Monomierzusammensetzung von Alginaten und folglich der Aktivität der Epimerase AlgE4 stellte die CD-Spektroskopie dar. Im Jahr 2003 gelang es Donati *et al.* die M- und G-Anteile des Alginataufbaus zu analysieren (Donati, Gamini et al. 2003). Da jedoch bis zum Beginn dieser Arbeit keine unbekanntes Alginat analysiert wurden bzw. Epimeraseaktivität mit CD-Spektroskopie verfolgt wurde, wurde zunächst

eine Anpassung der ursprünglichen Methode mit kommerziellen Alginatvarianten etabliert. Die erhaltenen Ergebnisse konnten anhand der Alginatgelbildung nach Draget *et al.* bestätigt werden (Draget, Østgaard *et al.* 1989; Draget, Østgaard *et al.* 1990), da die Anzahl der G-Blöcke im Polymer Alginat mit dem Potential der Entstehung von Hydrogelen korreliert (Grant, Morris *et al.* 1973; Smidsrød, Glover *et al.* 1973).

Bei der Epimerisierung verschiedener Alginatsubstrate mit unterschiedlichen Längen (OligoM: Polymerisierungsgrad von 5-20; PolyM: > 500) konnte mit OligoM nur ein Endprodukt mit einem M/G-Verhältnis von 78/22 erhalten werden, während PolyM zu einem Produkt mit M/G-Verhältnis von 65/35 führte. Diese relativ geringe Epimerisierungsfähigkeit bei OligoM lag daran, dass AlgE4 Epimerasen Edukte umsetzen, die einen Polymerisierungsgrad von mindestens sechs Einheiten aufweisen (Svanem, Strand *et al.* 2001; Holtan, Bruheim *et al.* 2006). Auch bei PolyM konnte die erwartete Umsetzung von M zu G auf ein Endprodukt von 50/50 nicht erreicht werden, da der Reaktionsansatz bereits bei 6 mol % gelierte und Epimerisierungsreaktionen von Substraten, die modifiziert sind oder sich im Gelzustand befinden, behindert werden (Stanisci, Aarstad *et al.* 2018). Diese Behinderung der Einführung weiterer G-Blöcke wird durch die Anwesenheit von Verbindungszonen sowie die Porengröße der Gelmatrix verursacht. Durch die Zugabe von 0,1 M NaCl konnte das Gelieren eingeschränkt werden (Hoidal, Ertesvag *et al.* 1999), jedoch absorbiert das Salz signifikant unterhalb 200 nm (Kelly, Jess *et al.* 2005). Um eine komplette Gelbildung zu verhindern, wäre eine höhere Konzentration des Salzes im Ansatz nötig gewesen, was CD-Messungen jedoch unmöglich gemacht hätte.

5.1.4 EPS-Ausbeute der *in vivo* Epimerisierung mittels Fermentation

Bei der Gewinnung von Alginat durch Fermentation des Stammes *A. vinelandii* ist die Menge des gelösten Sauerstoffs, der sich im Kultivierungsmedium befindet, von entscheidender Bedeutung. Vor allem die Ausbeute und das Molekulargewicht werden durch die Sauerstoffzufuhr und die Rührergeschwindigkeit stark beeinflusst. Da beschrieben wurde, dass die Einstellung des entsprechenden Regelparameters (DO-Wert) auf 5 % eine Alginatausbeute von bis zu 4,5 g/L ermöglichte (Galindo, Pena *et al.* 2007), wurden in dieser Arbeit die Fermentationen zunächst ebenfalls mit diesem Wert durchgeführt. Dabei konnte für *A. vinelandii* die Variante MA973 isoliert werden, die acetyliert war und 3 mol % G in ihrer Struktur enthielt. Für die Produktion einer Alginatvariante mit dem Stamm *A. vinelandii*+pJB861-*algE4* wurde eine 6-tägige Fermentation unter Induktion mit *m*-Toluat durchgeführt. Die Verlängerung der Fermentationsdauer verglichen mit der Kultivierung von *A. vinelandii* folgte aus einem entsprechend langsameren Zellwachstum, das auf die Zugabe eines Antibiotikum aus Gründen der Plasmidstabilität zurückge-

führt wurde (Wegrzyn und Wegrzyn 2002). Die erhaltene Ausbeute dieses EPS (MD955), war trotz der verlängerten Fermentationszeit um 2 g/L reduziert. Solche negativen Effekte auf das Zellwachstum und die EPS-Ausbeute waren allerdings bekannt, wenn Plasmide eingebracht werden, die die Alginateproduktion betreffen (Galindo, Pena et al. 2007). Erstaunlich war jedoch, dass MA955 ein höheres Molekulargewicht im Vergleich zu dem kürzer fermentierten MA973 aufwies, da normalerweise eine Verlängerung der Fermentationsdauer zu Kettenverkürzungen durch die Depolymerisierungsaktivität von Lyasen führte (Pena, Trujillo-Roldan et al. 2000). Andererseits könnten kleinere Alginatemoleküle aber auch komplett abgebaut worden sein und dadurch die geringe Ausbeute von MD955 erklären. Der größte Nachteil war jedoch, dass durch die *in vivo* Epimerisierung nur 2 mol % mehr M-Residuen epimerisiert wurden. Für Epimerasen, wie auch für Lyasen, war bekannt, dass eine hohe Sauerstoffkonzentration essentiell für die entsprechenden Reaktionen ist (Sabra, Zeng et al. 2000). Daher sollte durch einen höheren DO-Wert während der Fermentation der Mutante die AlgE4 Aktivität gesteigert werden und sich anschließend ein höherer Epimerisierungsgrad im Produkt finden lassen. Bei der Fermentation mit 20 % DO-Wert konnte *A. vinelandii* nicht wachsen. Durch die Reduzierung des DO-Wertes auf 10 % konnte *A. vinelandii* ein EPS mit einem M/G-Verhältnis von 96/4 bilden, was bedeutete, dass die erhöhte Sauerstoffzufuhr nur eine minimale Veränderung von 1 mol % G mit sich brachte. Sabra *et al.* publizierten im Jahr 2000, dass durch die Fermentation von *A. vinelandii* bei einem DO-Wert von 10 % ein maximaler G-Anteil von 50 mol % bei einer Molekularmasse von 800 kDa erreicht werden konnte. Jedoch wurde dies mit einer kontinuierlichen Kultur unter Phosphatlimitierung erreicht, was der Grund für die Abweichungen zum Ergebnis dieser Arbeit sein könnte (Sabra, Zeng et al. 2000). Das Produkt von Stamm *A. vinelandii*+pJB861-*algE4* (DO-Wert 10 %), das erneut erst nach einer Fermentationsdauer von 6 Tagen gefällt wurde, war im Unterschied zu normalen Fällungen sehr flockig, was auf ein sehr kurzes Polymer hindeutete (Rühmann, Schmid et al. 2014). Leider konnten trotz vorheriger Probenaufarbeitung durch Dialyse die erhaltenen CD-Spektren nicht ausgewertet werden. Die Probe enthielt auf Grund der Überexpression von *algE4* eine zu hohe Proteinmenge, was durch einen Bradfordtest bestätigt werden konnte. Durch die erfolgreiche Bildung eines Alginatgels, dessen Gelstärke zu Proben mit 10 mol % G vergleichbar war, konnte dennoch zumindest qualitativ gezeigt werden, dass das produzierte Alginate einen höheren Epimerisierungsgrad aufwies. Weitere Fermentationsansätze, denen zusätzlich Calciumionen zugesetzt wurden, um die Cofaktorkonzentration und folglich wie beschrieben die AlgE4 Aktivität zu erhöhen (Ertesvag und Valla 1999), führten aber ebenfalls nicht zu

dem gewünschten Produkt. Folglich war es mittels *in vivo* Epimerisierung nicht möglich Alginatvarianten mit ausreichend gesteigertem Guluronsäuregehalt zu erhalten.

5.1.5 Anwendung verschiedener Alginatvarianten

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war die Analyse der Interkalation verschiedener Alginatvarianten in LDH Strukturen. Die Motivation solche Alginat-LDH Gemische zu untersuchen, wurde durch die mögliche Anwendung als Zusatzmittel in Beton zur Verbesserung der Brüchigkeit und Dehnfestigkeit hervorgerufen. Für diesen Einsatzbereich werden aktuell noch Fasern aus Carbon, Polypropylen oder Stahl benutzt. Das Langzeitziel stellt daher die Ersetzung dieser Fasern durch Nanofolien aus Alginat-LDH Strukturen dar, die vermutlich das Potential besitzen die Zähigkeit von zementgebundenen Materialien zu modifizieren. In den Studien, die in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Bauchemie der TU München durchgeführt wurden, wurden fünf verschiedene Alginatvarianten (G-Anteil von 3-57 mol %) benutzt. Bei den zugeordneten Molekulargewichten konnte festgestellt werden, dass der Prozess der chemischen Deacetylierung keinen Einfluss auf die Kettenlänge mit sich brachte, obwohl durch die harsche Behandlung eine Verkürzung vermutet wurde. Außerdem war bekannt, dass eine hohe Ladungsdichte Interkalationen in LDH Strukturen begünstigte (Plank, Ng et al. 2012). Alle untersuchten Alginatvarianten weisen eine relativ hohe anionische Ladungsdichte auf. Jede Variante konnte erfolgreich interkaliert werden, wobei herausgefunden wurde, dass mit Steigerung des Anteils an G zu einer größeren Schichtdicke wegen des größeren sterischen Volumens von G führte. Einen entscheidenden Einfluss für die Vergrößerung des Polysaccharidvolumens stellte die Acetylierung der Probe MA973 dar. Diese Variante interkalierte in hoch gedehnter Konformation, weil die acetylierten Hydroxygruppen eine Streckung der Kette verursachten (de Reese, Sperl et al. 2015). Zusammenfassend können Alginatvarianten, die unterschiedliche Mengen an G besitzen, benutzt werden um die Distanzen der Schichten in LDH Komponenten zu verändern. Im Gegensatz dazu, besaß das Molekulargewicht der Alginatproben keine Wirkung auf die Distanz der Schichten.

5.2 Zuordnung und Vergleich von Sphingambiosynthesegenen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde detailliert das Welansynthesecenter des Stamms *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 untersucht (Schmid, Sperl et al. 2014). Die Genidentifizierung wurde mittels Sequenzvergleichen mit den Stämmen *Sphingomonas* sp. ATCC 31461, *Sphingomonas* sp. ATCC 53159, *Sphingomonas* sp. ATCC 31554 und *Sphingomonas* sp. S7 durchgeführt. Dies war das erste analysierte Welancluster, das auf dem sequenzierten Genom von ATCC 31555 basierte (Wang, Tao et al. 2012).

Durch die Analyse konnten 24 verschiedene *wel* Gene im 30 kBp großem Genbereich annotiert werden, sowie zusätzlich *welA*, dessen Distanz vom Genort zum Welancluster nicht bestimmt werden konnte. Einigen Genen konnten die Aufgaben der Polysaccharidvorstufensynthese, der Polymerisation und des Exports und der Regulation zugeordnet werden. Des Weiteren befanden sich vier Glykosyltransferasen, zwei ABC Transporter und eine Lyase im Cluster. *WeIS* codierte zudem eine Translokase während die Funktionen der Gene *welI*, *welJ* und *welF* auf Grund von Sequenzvergleichen nicht bestimmt werden konnten. Am Ende des Syntheseclusters konnten noch die Gene *urf31.4*, *urf31* und *urf34*, deren Funktionen noch unbekannt waren, gefunden werden (s. Abbildung 7). Durch Sequenzanalysen stellte sich heraus, dass das Auftreten von Genen in allen Biosyntheseclustern mit der Struktur der verschiedenen, produzierten Sphingane verbunden war. Hohe Sequenzähnlichkeiten zeigten z.B. die Gene, die für die Assemblierung der identischen Wiederholungseinheiten verantwortlich waren. Die Glykosyltransferasen SpnB und SpnK besaßen eine hohe Ähnlichkeit, was bedeutete, dass alle diese Enzyme die beschriebene Funktion des Transfers und die Anheftung der ersten Glucose bzw. der folgenden GlcUA katalysierten (Yamazaki, Thorne et al. 1996; Pollock, van Workum et al. 1998). Für die Anfügung des 3. und 4. Zuckers sind vermutlich die Glykosyltransferasen SpnL und SpnQ verantwortlich (Pollock, van Workum et al. 1998; Videira, Fialho et al. 2001; Harding, Patel et al. 2004). Diese Vermutungen konnten durch die Sequenzanalysen ebenfalls gestützt werden. SpnL könnte somit bei allen Sphinganen für die Assemblierung der zweiten Glucose verantwortlich sein. Die Identitäten der Aminosäure- und Nukleotidsequenzen von SpnQ waren allerdings geringer. Dies konnte jedoch mit der hypothetischen Funktion dieser 4. Glykosyltransferase in Einklang gebracht werden, da z.B. das EPS S-88 Rhamnose oder Mannose als 4. Zucker in der Hauptkette besitzt und folglich das Substratspektrum des entsprechenden Enzyms im Vergleich zur Synthese von Sphinganen, die nur Rhamnose in der Hauptkette besitzen, verändert sein muss. Folglich zeigen nur die *spn* Gene, die die Assemblierungsreaktion mit dem gleichen Vorstufenzucker katalysieren, hohe Sequenzidentitäten. Relativ geringe Sequenzübereinstimmungen konnten bei den Genen *urf31*, *urf31.4* und *urf34*, die vermutlich für die Seitenkettenanheftung nötig sind, aufgezeigt werden. Das Gen *urf31*, das sich am 3'-Ende der Synthesecluster von *sps* und *dps* befindet, konnte ebenfalls innerhalb des *wel*-Clusters identifiziert werden. Als Funktion wird *urf31* die Assemblierung der Rhamnose als Seitenkette zugeschrieben (Coleman, Patel et al. 2008). Da keine identischen Sequenzen in den Genomen der S-7- und Gellan-produzierenden Stämmen identifiziert werden konnten und S-7 sowie Gellan Glucosemonomere als Seitenkette bzw. keine Seitenkette aufwies, konnte die Aufgabe der Rhamnosyltransferase durch Se-

quenzanalysen bestätigt werden. Des Weiteren befindet sich das Gen *urf34* am 3'-Terminus der Cluster *dps*, *sps*, *gel*, *wel*, sowie S-7 (Thorne, Mikolajczak et al. 2000; Sa-Correia, Fialho et al. 2002; Harding, Patel et al. 2004; Coleman, Patel et al. 2008; Schmid, Sperl et al. 2014). Da die Übereinstimmungen der Nukleotidsequenzen sehr hoch und die Ähnlichkeiten der Sphinganstrukturen bekannt waren, schien eine mögliche Funktion in der Seitenkettenassemblierung unmöglich. Es lag die Vermutung nahe, dass das Transmembranprotein Urf34 eine generelle Funktion, die die Assemblierung oder die Sekretion betrifft, besitzt. In identischer Weise wie für *urf34* wurde dem Gen *urf34.1*, das nur in den *wel*- und *dps*- Clustern mit einer hohen Nukleotididentität von 86 % lokalisiert war, noch keine Funktion zugeordnet. Auf Grund der Strukturähnlichkeiten von Welan und Diutan konnte eine Aufgabe von *urf31.4* in der Einführung der Seitenkette oder als Hilfsprotein für die Assemblierung von verzweigten Wiederholungseinheiten vermutet werden.

5.3 Genetische Modifikationen des Welansyntheseclusters

5.3.1 Deletion des *rmlACBD*-Clusters in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555

In dieser Arbeit wurde zunächst eine Deletionsmethode für den Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 gewählt, die im Jahr 2011 erfolgreich im Stamm *Pseudomonas putida* etabliert und veröffentlicht wurde (Martinez-Garcia und de Lorenzo 2011). Die Zielgene sollten im Welansynthesecluster festgelegt werden, da Strukturveränderungen des EPS Welan angestrebt wurden. Um diese Methode im Stamm ATCC 31555 etablieren zu können, wurde zunächst versucht, die Deletion des *rmlACBD*-Clusters durchzuführen. Für die Integration des Plasmides pEMG-us/ds(*rmlAD*) in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 stellte sich heraus, dass eine Überhanglänge (*us* und *ds*) von je 1000 Bp optimal war. Für die Übermittlung des Plasmides vom Donorstamm *E. coli* Dh5 α pir auf den Empfängerstamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 wurde eine triparentale Konjugation mit dem Helferstamm *E. coli* DH5 α pir mit dem Vektor pRK2013 durchgeführt. Die höchste Integrationseffizienz mit erfolgreicher Integration konnte bei einem Mengenverhältnis der verschiedenen Zellen von Donorstamm:Helferstamm:Empfängerstamm von 5:2:10 erreicht werden, wobei die Auftragung auf die YM-Agarplatte in dieser Reihenfolge erfolgte. Die Inkubation durfte nicht länger als 16 h bei 30 °C erfolgen. Anschließend wurde eine geringe Zellmenge mittels Impföse auf eine LB_{Kana}-Agar-Platte verteilt. Zur Inkubation der Selektionsplatte musste jeweils Strep₁₀₀ in den Petrischalendeckel pipetiert werden, da ansonsten die *Sphingomonas* Mutanten mit *E. coli* Zellen verunreinigt waren, was sich auch durch mehrmaliges Ausstreichen und Kultivieren in Flüssigmedium

unter erhöhtem Selektionsdruck nicht bereinigen ließ. Durch die Zugabe der Streptomycinlösung im Deckel und den Verschluss mit Parafilm wurde vermutlich die Oberfläche der wachsenden, streptomycinresistenten *Sphingomonas* Klone zusätzlich mit verdampfter Flüssigkeit bedeckt, weshalb sich *E. coli* Zellen nicht mehr in der von Sphingomonaden gebildeten Schleimschicht, die aus EPS bestand, vor dem Antibiotikum schützen konnten, da die EPS-Produktion wohl reduziert wurde. Da der Dampfdruck des Aminoglykosids Streptomycin (Krause, Serio et al. 2016) gering ist, hätte vermutlich die Reduktion der EPS-Schicht auch nur mit der Zugabe von ddH₂O erreicht werden können. Somit wuchs eine hohe Anzahl an Integrationsklonen auf der Selektionsplatte, deren Integrationserfolg bei 32 % lag. Die Erfolgsquote des anschließenden *knockout* rmlACBD lag bei 100 %. Jedoch wurde durch PCR und auch durch Selektionsausstriche auf LB_{Kana}-Agar-Platten der verschiedenen Mutanten festgestellt, dass das Plasmid pEMG-us/ds(rmlAD) bei gleichzeitig erfolgreichem *knockout* noch im Genom integriert war. Somit musste auch das komplette Cluster noch im Genom enthalten sein. Da sich jedoch direkt benachbart das Plasmid pEMG befand, war es möglich, dass zumindest die Regulationsmechanismen für die Rhamnosevorläufergene gestört wurden.

Das integrierte Plasmid konnte nach der vollständigen Durchführung der *knockout* Methode auch durch die Vervielfältigung des Organismus via mehrtägiger Kultivierung in Flüssigmedium, sowie durch anschließende Analyse von 600 Einzelklonen nicht vollständig entfernt werden. Hierbei spielte es auch keine Rolle in welcher Richtung das Plasmid im 1. Schritt in den Wildtyp integrierte, da beide Varianten hinsichtlich des Problems des unvollständigen *knockouts* untersucht wurden. Eine Erklärung, weshalb das Plasmid pEMG gleichzeitig mit einem erfolgreichen *knockout* auftrat, konnte sein, dass die vollständige Deletion der *rml*-Gene auf dem Genom letal wäre und deshalb der Organismus als Art Schutzmechanismus einer kompletten pEMG Entfernung entgegen wirkt. Um dies beweisen zu können wurde die Integrationsmutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555-pEMG-us/ds(rmlAD) anstatt mit dem Plasmid pSWII mit dem Plasmid pSRK-rmlACBD transformiert. Dieses Expressionsplasmid, dessen Funktion durch die Überexpression von CrtB in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555ΔcrtB in dieser Arbeit bewiesen werden konnte, enthielt das komplette *rmlACBD*-Cluster. Jedoch wurde bei gleichzeitiger Transformation mit dem Plasmid pSWII eine Plasmidinkompatibilität festgestellt, da trotz unterschiedlicher Vorgehensweise keine doppelt transformierten Klone erhalten werden konnten. Das Problem der Unverträglichkeit von Plasmiden wurde bereits im Jahr 1987 publiziert und durch den Besitz gemeinsamer Elemente der Plasmidreplikation begründet (Novick 1987). Jedoch konnten in der Literatur keine Hinweise für eine fehlende Vereinbarkeit der Promotoren oder Replikationsursprünge der Plasmidi-

de pSWII (Promotor: RK2) und pSRK (pBBR) gefunden werden. Eine Sequenzanalyse stellte zudem sicher, dass das Plasmid pSRK-rmlACBD keine I-SceI-Erkennungssequenz aufwies und deshalb nicht von der Endonuklease abgebaut werden sollte. Folglich konnte die Letalität der kompletten Entfernung des *rmlACBD-Clusters* nicht nachgewiesen werden.

Da es experimentell nicht möglich war, das integrierte Plasmid pEMG bei gleichzeitigem erfolgreichen *knockout* zu entfernen, wurde vermutet, dass *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 zur Gruppe der polyploiden Organismen zählt. Hierzu konnten in der Literatur Hinweise zum mehrmaligen Auftretens der 16S Region in einer Zelle (Kopienanzahl 1-15) gefunden werden (Leys, Ryngaert et al. 2004; Zeng, Koblizek et al. 2013; Bodenhausen, Bortfeld-Miller et al. 2014). Um die Kopienzahl von Genen des Welansyntheseclusters zu bestimmen wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass der Wildtyp 6 Kopien und die Mutante noch 3 Kopien des Gens *rmlA* auf deren Genomen besaßen. Somit konnte gezeigt werden, dass der Genort, der den Rhamnosylvorstufenzucker codierte, mehrmals im Genom vorhanden war und durch die Deletionsmethode pEMG/pSWII nur 50 % der Kopien entfernt werden konnten. Im nächsten Schritt war nun eine Analyse der Anzahl und der Lokalisierung des integrierten Plasmides nötig. Hierzu wurde zunächst eine inverse PCR durchgeführt, wobei trotz mehrmaliger Variation keine Produkte erhalten werden konnten, die Hinweise auf die Fragestellungen bzgl. des pEMG Plasmides erbrachten. Vermutlich war die interzirkuläre Ligation zu unspezifisch und fehlerhaft. Folglich wurde als nächstes eine Genomsequenzierung der gDNA der Mutante mittels der Illumina MiSeq Methode durchgeführt. Durch die Annotation und Auswertung der Sequenzdaten via dem Server RAST (Aziz, Bartels et al. 2008; Overbeek, Olson et al. 2014; Brettin, Davis et al. 2015) konnte festgestellt werden, dass die *contigs*, die Teile des Welansyntheseclusters aufwiesen, immer im Gen *welB* endeten. Dieser Abbruch trat bei zwei *contigs* sogar an derselben Base auf, was auf eine spezielle Faltung der DNA-Sekundärstruktur und somit auf ein Hindernis für die Sequenzierung hindeutete. Zusätzlich konnte nun gezeigt werden, dass das integrierte Plasmid nur an der bekannten Stelle lokalisiert war, da die *upstream* und *downstream* Regionen in diesem Zusammenhang entsprechend zu finden waren.

Da in dieser Arbeit weiterhin das Ziel einer Deletion aller *rmlACBD*-Cluster auf dem Genom von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 verfolgt wurde, sollte geklärt werden, ob eine andere Methodenauswahl zu einem vollständigen *knockout* geführt hätte. Die Methoden, die anschließend auf Grund von Literaturrecherchen gewählt wurden, waren noch nicht im Stamm ATCC 31555 durchgeführt worden, schienen aber ein vielversprechendes Konzept für Spezies innerhalb dieses Genus aufzuweisen. Die markerfreie Deletionsme-

thode nach Kaczmarczyk *et al.* im Stamm *Sphingomonas* sp. Fr1 basierte auf dem Gen *rpsL*, das die natürlich vorhandene Streptomycinresistenz vieler Sphingomonaden codierte (Kaczmarczyk, Vorholt *et al.* 2012). Obwohl dieses Gen im *contig* 20 des veröffentlichten Genoms des Welan-produzierenden Stammes identifiziert wurde, konnte mit dieser Methode kein *knockout* erfolgreich durchgeführt werden. Weitere Methoden wie das CFGE-System, die Deletion mittels Suizidvektor pK19mobsacB-us/ds(rmlAD), sowie das Cre-lox-System führten jeweils zu identischen Ergebnissen (Schäfer, Tauch *et al.* 1994; Marx und Lidstrom 2002; Döhlemann, Brennecke *et al.* 2016).

Folglich stellte die Verwendung des pEMG/pSWII-System die zielführendste Methode für den *knockout* des Clusters *rmlACBD* dar, da hierbei zumindest 50 % dieser Genorte aus dem Genom entfernt werden konnten. Veränderungen der Methode oder Anwendungen komplett neuer Strategien waren nicht erfolgreich.

5.3.2 *Knockout von crtB*

Das Gen *crtB* wurde im Welan-produzierenden Stamm *Alcaligenes* sp. ATCC 31555 durch ein pOL37/sacB-System erfolgreich entfernt (Zhang, Chen *et al.* 2016). Dieser Genort stellte folglich einen geeigneten Angriffspunkt für die Überprüfung der pEMG/pSWII Methode in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 dar. Hierbei lag der Integrationserfolg von pEMG-us/ds(*crtB*) bei 64 %, was eine deutliche Verbesserung verglichen mit dem *knockout rmlACBD* darstellte. Nach der kompletten Entfernung des integrierten Plasmides pEMG durch die Endonuklease konnte bei jedem via PCR getesteten Klon der *knockout crtB* bestätigt werden. Somit war die pEMG/pSWII-Methode im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 an diesem Genort erfolgreich.

5.3.3 *Knockout weiterer Gene des Welansyntheseclusters mit der pEMG/pSWII Methode*

Die pEMG/pSWII Methode im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 konnte grundsätzlich erfolgreich angewendet werden. Spezielle DNA-Faltungen behinderten wohl jedoch Integrationen und auch Genomsequenzierungen. Auch die Endonukleaseerkennungssequenzen waren nicht komplett zugänglich, weshalb nur 50 % der integrierten pEMG Plasmide entfernt werden konnten. Der Erfolg dieser Deletionsmethode hing dabei nicht von der Größe des Zielgens ab, da sich ein Basenstück von 450 Bp, das sich 8 kbp von *urf34* entfernt befand, nicht komplett entfernen ließ, wobei 12 kbp weiter unterhalb ein Fragment der gleichen Größe komplett deletiert werden konnte.

5.3.4 Modifizierung des Leervektors pJB861 und plasmidbasierte Überexpression

Das *broad-host-range* Plasmid pJB861 wurde bereits in vielen gram-negativen Bakterien für Genexpressionen und Klonierungsexperimente verwendet (Blatny, Brautaset et al. 1997). In dieser Arbeit wurde das Plasmid für die Überexpression von *algE4* in *A. vinelandii* eingesetzt, wobei das synthetisierte Protein bei nachgewiesener Überproduktion nur eine geringe Aktivität *in vivo* aufwies. Das Plasmid wurde dann für die plasmidbasierte Überexpression der Gene, die die Enzyme für die Katalyse der Mannosevorläuferzucker codierten, in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 verwendet und daher hinsichtlich Plasmidkopienzahl und Proteinexpressionslevel genauer untersucht. Blatny et al. publizierten im Jahr 1997, dass spezielle Punktmutationen im Gen *trfA*, das das essentielle Initiatorprotein der Replikation codierte und an die Intronsequenz des *oriVs* band, die Plasmidanzahl in der Zelle verändern konnten (Blatny, Brautaset et al. 1997). Bei der Auswahl der zu testenden Punktmutationen in *trfA* konnte durch Sequenzierungen gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit verwendete Plasmid eine Punktmutation an der Basenposition 138 (Mutation 46M) aufwies. Daraus folgte, dass anstatt Methionin die Aminosäure Isoleucin translatiert wurde und deshalb die geringen Plasmidausbeuten von pJB861 erklärt werden konnten. Da auf Grund von Klonierungsexperimenten und dem späteren Einsatz als Expressionsplasmid die Steigerung der Kopienanzahl des Plasmides wünschenswert war, wurden die Mutationen 251M und 271C in unterschiedlichen Kombinationen in *trfA* eingeführt. Diese Mutationen konnten laut Literatur zu einer Erhöhung der Plasmidmenge um den Faktor 16 bzw. 8 führen. Durch die Analysen der Kopienanzahl verschiedener pJB861 Plasmide in NEB Turbo und DH5 α Zellen zeigte sich, dass die Entfernung der Mutation 138 alleine nur zu einer 4 %-igen Steigerung der Plasmidausbeute führte. Ein großer Einfluss dieser Mutation folgte erst in Kombination mit 251M bzw. 271C, da hier Steigerungen um den Faktor 2,3 bzw. 1,8 auftraten, die jedoch weit von den in der Literatur postulierten Werten entfernt waren. Erstaunlich war, dass die Mutationen 251M bzw. 271C ohne die Mutation 46M nur einen minimalen Einfluss auf die DNA-Mengen hatten. Dies bedeutete, dass die Mutation 46M den Auswirkungen von 251M und 271M entgegenwirkte. Des Weiteren konnte mit einer Doppelmutation in *trfA* (Plasmid pJB861-L-251M-271C) die Plasmidanzahl in der Zelle im Vergleich zum Ausgangskonstrukt (Plasmid pJB861-L) verfünffacht bzw. mit der Tripelmulation (Plasmid pJB861-L-46M-251M-271C) versechsfacht werden. Somit führte die Kombination von 46M, 251M und 271C zu einer drastischen Erhöhung der Replikation des Plasmides. Diese Ergebnisse spiegelten sich auch in der Analyse des Expressionslevels von *eGFP* wider, die sich mit den Tendenzen der Steigerungen durch den Einfluss der ver-

schiedenen Mutationskombinationen deckten. Durch die Tripelmutation konnte die synthetisierte Proteinmenge im Vergleich zu pJB861-L-eGFP um das 23-fache erhöht werden, was einer enormen Steigung entsprach.

In den analysierten pJB861-L Vektor wurden die Gene, die für die Enzyme PMI, PMM und GMP codieren, kloniert und nach der Transformation von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 sollten die Stämme zur EPS-Herstellung kultiviert werden. Es zeigte sich jedoch, dass durch den Plasmidstress das Wachstum verlangsamt war. Außerdem zeigten die Analysen der Monomierzusammensetzungen der isolierten EPS keine Unterschiede zum Welan, das vom Wildtyp produziert wurde. Dies bedeutete, dass entweder die Überexpression der Gene mit dem Plasmid pJB861-L nicht erfolgreich war, oder dass die Enzymaktivitäten keine Auswirkungen auf die Struktur von Welan hatten. Es war bekannt, dass die Proteine PMI, PMM und GMP zweiwertige Metalle, wie Cobalt oder Magnesium für die Katalyse benötigen (Tran, Le et al. 2009). Da diese nicht zusätzlich zugegeben wurden, könnte dies ein Grund für die fehlende Aktivität der Enzyme sein. Darüber hinaus ist PMM ein bifunktionales Enzym, das zusätzlich Phosphoglucosyltransferase-Aktivität (PGM) besitzt (Lee, Mick et al. 2012). Die PGM-Aktivität katalysiert den ersten Umsetzungsschritt von Glucose-6-Phosphat zu Glucose-1-Phosphat, was für die Synthese von UDP-D-Glucose, UDP-D-Glucuronsäure und dTDP-L-Rhamnose essentiell ist (Huang, Li et al. 2013). Hierbei könnte somit durch die PGM-Aktivität ebenfalls die Herstellung von anderen Vorstufen gefördert werden, wodurch die Monomierzusammensetzung des Welans schließlich nicht verändert war.

Um eine unzureichende Überexpression via pJB861 in *Sphingomonas* sp. als Ursache auszuschließen, wurde der Vektor pSRK als neues Expressionssystem in ATCC 31555 gewählt, da Khan *et al.* bereits eine erfolgreiche Expression im Stamm *Pseudomonas fluorescens*, der zum Stamm *Sphingomonas* sp. relativ nahe verwandt ist, durchführen konnten (Khan, Gaines et al. 2008). Der Erfolg dieses Vektors konnte in dieser Arbeit im Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ crtB durch die plasmidbasierte Expression von crtB bestätigt werden, da diese Zellen auch bereits ohne Induktion mit IPTG wieder den gelben Phänotyp, der dem Wildtyp entsprach, aufwiesen. Auch die Isolierung von EPS war trotz Verweilen des Plasmides in der Zelle möglich. Im Gegensatz dazu konnte nach der Transformation der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD mit pSRK-rmlACBD keine EPS-Produktion nachgewiesen werden. Somit zeigte sich, dass die Mutante, die das pEMG Plasmid im Genom noch integriert hatte, durch die zusätzliche Anwesenheit eines Plasmides und den daraus resultierenden Plasmidstress die Fähigkeit verlor EPS herzustellen. Durch die Transformation des Wildtyps mit pSRK-rmlACBD veränderten sich das Wachstum und die Polymerproduktion nicht. Das

isolierte EPS konnte auf Grund der Monomeranalyse als Welan identifiziert werden, wobei der Rhamnoseanteil aber nicht erhöht war. Da jedoch die Mannosemenge bei gleichzeitiger Reduktion des Galactoseanteils vergrößerte war, hatte die Anwesenheit von pSRK-rmlACBD einen Effekt auf die Zusammensetzung des Nebenpolymers Welan-Gal.

5.4 Analyse der gebildeten Welanvarianten

5.4.1 *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 produziert zwei verschiedene EPS

Das EPS, das vom Wildtyp *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 während einer Fermentation mit Glucose als Kohlenstoffquelle produziert wurde, wurde zunächst mittels HT-PMP auf seine Monomerzusammensetzung untersucht. Das auffälligste Merkmal war, dass sich Galactose in der Zusammensetzung des Polymers befand. Anhand einer zweiten Fällung konnte eindeutig gezeigt werden, dass Galactoseresiduen nicht durch ihre Anwesenheit in der Fermentationsbrühe ebenfalls isoliert wurden, sondern dass diese echter Bestandteil des EPS waren. Im Jahr 2012 wurde das Auftreten von Galactoseeinheiten im EPS von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 auch beobachtet (Jia, Zhang et al. 2012). Jia *et al.* isolierten das Polysaccharid WL-26, das eine andere chemische Struktur als Welan aufwies. Bis zur Fertigstellung dieser Arbeit war allerdings nicht bekannt, warum derselbe Organismus fähig war beide Polymere zu bilden. Durch Ultraschallbehandlung von WL-26 konnte eine Zerteilung in die Oligosaccharide F21 erreicht werden und Analysen bzgl. dessen Struktur und Verknüpfung wurden durchgeführt (Jia, Zhang et al. 2012). Die Untersuchungen der Monosaccharide von F21 ergaben die Anwesenheit von D-Glucose, D-Galactose, D-Mannose, L-Rhamnose und D-Glucuronsäure im molaren Verhältnis von 2,0 : 1,2 : 1,2 : 3,5 : 0,8. Diese Ergebnisse von Jia *et al.* wurden überraschenderweise keinen weiteren Untersuchungen unterzogen, obwohl die Produktion eines zweiten EPS durch *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 entscheidend für wichtige Forschungen in diesem Bereich gewesen wäre. Diese Tatsache verunsicherte in der Bewertung der veröffentlichten Daten. Das EPS, das in dieser Arbeit mittels ATCC 31555 produziert wurde, besaß ein molares Verhältnis von Glucose, Galactose, Mannose, Rhamnose, und Glucuronsäure von 2,0 : 0,4 : 0,7 : 3,2 : 0,3, sowie einen Dimerpeak ($m/z=687$) im Chromatogramm, der der Cellobiuronsäure entsprach. Die Cellobiuronsäure bestand aus β -D-GlcUA-(1 \rightarrow 4)-D-Glc (Arrecubieta, Lopez et al. 1996) und entstand durch eine unvollständige Hydrolyse des EPS Welan. Diese Dimermenge konnte auf Grund eines fehlenden Standards nicht quantifiziert werden, weshalb dieser Anteil an GlcUA und Glc in der Wiederfindung fehlte. Rühmann *et al.* veröffentlichten im Jahr 2015

eine Monomerzusammensetzung eines kommerziellen Welans (Colltec, Welan gum Col-lstab W200) mit einem molaren Verhältnis von Glucose, Mannose, Rhamnose und Glucuronsäure von 2,0 : 0,3 : 1,6 : 1,0 (Rühmann, Schmid et al. 2015). Die Monomermengen wurden ebenfalls mittels HT-PMP analysiert, weshalb es möglich war, dieses publizierte Verhältnis nach Rühmann *et al.* von dem des Welan(Glucose)-Monomerverhältnisses zu subtrahieren (Normierung beider molaren Verhältnisse auf Glucose = 2). Da wie bereits erwähnt die Glucose- und Glucuronsäuremengen nicht auswertbar waren, erhielt man nach Abzug eine molare Mengenverteilung von Mannose:Rhamnose:Galactose von 0,4 : 1,6 : 0,4. Dies erinnerte an den Aufbau von F21 (molare Verhältnis Mannose:Rhamnose:Galactose = 1,2 : 3,5 : 1,2), was folglich dem gebildeten EPS neben Welan entsprechen konnte. Allgemein ist zu sagen, dass die komplette Probe Welan(Glucose) im Gegensatz zu den bekannten, analysierten Welanproben zu viel Rhamnose und zusätzlich den Zuckerbaustein Galactose aufwies. Diese beiden Residuen wurden als Bestandteil von Welan-Gal vermutet. Deshalb wurde im folgenden Schritt durch die Kultivierung des Wildtyps ATCC 31555 im von Jia *et al.* veröffentlichten Medium, das als Kohlenstoffquelle Saccharose besaß, versucht nur eines der beiden Polysacchariden zu erhalten. Jia *et al.* postulierten, dass der verwendete Stamm mit Saccharose nur das Polymer WL-26 synthetisiert. Bei der Analyse der Monomere des isolierten Welan(Saccharose) wurden Glucose, Mannose und Rhamnose in einem molaren Verhältnis von 2,0 : 0,6 : 2,0 detektiert, was sehr ähnlich zu dem publizierten Verhältnis des kommerziellen Welans von Rühmann *et al.* war. Außerdem konnte keine Galactose in der Probe nachgewiesen werden. Somit produzierte der *Sphingomonas*-stamm im Medium nach Jia *et al.* nicht wie veröffentlicht das EPS WL-26, sondern die reine Form von Welan, dessen Struktur aufgeklärt ist.

Da der Verdacht der Bildung zweier EPS durch *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 im Medium mit Glucose weiter bestätigt werden sollte, wurden die Proben Welan(Glucose) und Welan(Saccharose) via GPC auf ihre Molekulargewichtsverteilungen untersucht. Welan(Glucose) zeigte eine breite Massenverteilung, was auf mindestens zwei Polymere mit verschiedenen Größen hindeutete. Durch das Chromatogramm der Probe Welan(Saccharose), das nur einen gut getrennten, scharfen Peak bei $1 \cdot 10^6$ Da aufwies, konnte bewiesen werden, dass Welan(Glucose) neben dem Saccharid Welan mit einer Masse von 1 MDa noch Welan-Gal besaß. Ob Welan-Gal WL-26 entsprach konnte durch GPC nicht bestätigt werden, da WL-26 eine Größe von 1,7 kDa besaß, was jedoch anhand eines Dextranstandards im Vergleich zum in dieser Arbeit verwendeten Pullulanstandard quantifiziert wurde (Jia, Zhang et al. 2012). Pullulan besteht aus linearen Maltotrioseeinheiten, während Dextran ein stark verzweigtes Polysaccharid darstellt. Aus

diesen strukturellen Unterschieden resultieren unterschiedlich hydrodynamische Radii, sodass die ermittelten Größen der Publikation mit denen dieser Arbeit nicht miteinander verglichen werden können.

Insgesamt konnte durch die Fermentation des Stamms *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 im EPS-Medium zum ersten Mal die Aufreinigung von zwei EPS beobachtet werden, wobei durch einen Medienwechsel und die resultierende Veränderung der Kohlenstoffquelle die Produktion von reinem Welan möglich wurde. Dies ist ungewöhnlich, da die Strukturen von Polysacchariden, die von mikrobiellen Spezies produziert werden, normalerweise unabhängig vom im Medium benutzten Kohlenstoffsubstrat sind (Sutherland 1990). Bei einigen Pflanzenpathogenen, wie z.B. *P. syringae* var. *glycinae*, wird die Polysaccharidsynthese jedoch durchaus vom verwendeten Zucker im Medium beeinflusst. Falls es sich dabei um Saccharose handelt, produziert dieser Stamm Levan, während mit Glucose Alginat gebildet wird (Sutherland 1990). Das Phänomen eines Wechsels des gebildeten Polymertyps ist dennoch sehr selten und nur möglich, wenn die mikrobiellen Zellen mehr als eine Art von Exopolysaccharid bilden können. Desweiteren ist bekannt, dass das thermophile Bakterium *Aeribacillus pallidus* 418 die Fähigkeit besitzt, unabhängig von der Kohlenstoffquelle, zwei verschiedene EPS zu produzieren (Radchenkova, Vassilev et al. 2013).

Um die Hypothese der Bildung zweier EPS durch ATCC 31555 zu unterstützen, wurde bei der Fällung des EPS aus der Zellbrühe eine Trennung von Welan von Welan-Gal durch den Einsatz verschiedener Alkohole und Fällungsmittelvolumina versucht. Allgemein können Polymere durch die Zugabe von organischen Lösungsmitteln, die komplett mit Wasser vermischbar sind, präzipitiert werden. Die Chemikalien, die hierzu am meisten benutzt werden, sind niedermolekulare Alkohole wie Methanol, Ethanol und Isopropanol (Sutherland 1990). Bei dem Trennungsversuch der Probe Welan(Glucose) mit Ethanol und Isopropanol konnten jeweils bei erfolgreicher Fällung nur beide Polymere gleichzeitig isoliert werden. Aus diesem Grund sollte für das Ziel der Separierung beider EPS der Probe Welan(Glucose) die Methode der präparativen Gelfiltration angewendet werden. Diese eignete sich jedoch nicht für die Auftragung der viskosen EPS-Lösung, weshalb bereits nach kurzer Laufzeit das Säulenmaterial wohl auf Grund der Viskosität der Polysaccharidlösung komprimiert wurde. Die Wiederfindungsrate lag bei nur 8 % und eine eindeutige Trennung konnte nicht erreicht werden.

5.4.2 Auswirkung auf die Welanstruktur durch Deletion des Clusters *rmlACBD* via Methode pEMG/pSWII

Für die Produktion des EPS Welan Δ rmlACBD wurde die Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD identisch zum Wildtypstamm fermentiert. Auffällig war, dass die lag-Phase des Zellwachstums der Mutanten länger andauerte und dass die EPS-Ausbeute nur $\frac{1}{4}$ der Masse der Ausbeute des Wildtyps EPS Welan(Glucose) entsprach. Für die Monomierzusammensetzung ergab sich ein molares Verhältnis von Glucose:Galactose von 1,0 : 3,7, was bedeutete, dass der Anteil der Galactoseresiduen und somit von Welan-Gal hoch war. Außerdem konnte im Chromatogramm weder ein Dimer noch GlcUA detektiert werden, weshalb nach Abzug der Glucosemenge der wässrigen Isopropanollösung des Mediums der zweiten Fällung die Menge der Glucose im Polysaccharid quantitativ bestimmt werden konnte und zudem ausgeschlossen werden konnte, dass Welan-Gal F21 (enthält Glc-GlcUA Dimer) entsprach. Die Wiederfindungsrate der HT-PMP Methode für Welan Δ rmlACBD lag bei nur 22 %. Durch eine zweite Fällung der Probe konnte jedoch anhand der sofortigen fädigen Präzipitation eindeutig bewiesen werden, dass es sich beim Isolat um ein Polysaccharid handelte. Die Monomeranalyse zeigte dennoch nur einen geringen Gehalt an Rhamnose, weshalb es sich bei dem gefällten Polysaccharid um eine veränderte Variante zu Welan(Glucose) handeln musste. Dieser reduzierte Gehalt an Rhamnosebausteinen im EPS konnte eine Folge der Deletion des Clusters *rmlACBD* sein. Da jedoch kein Glc-GlcUA Dimer im Chromatogramm detektiert werden konnte, wurde vermutet, dass die Mutante ATCC 31555 Δ rmlACBD die Fähigkeit verloren hatte, das Polymer Welan zu bilden und somit nur noch Welan-Gal synthetisierte. Diese Vermutung würde auch den sehr hohen Anteil an Galactose und die verminderte EPS-Ausbeute nach der Isolierung erklären. Da der Rhamnoseanteil aber selbst für Welan-Gal zu niedrig war, stand wohl durch die Deletion sogar eine zu geringe Menge an Rhamnosevorläufermolekülen zur Verfügung, weshalb sich die Monomierzusammensetzung veränderte. Eine weitere Bestätigung, dass es sich bei Welan Δ rmlACBD nur um Welan-Gal handelte, konnte durch die fehlende EPS-Produktion der Mutante im Kultivierungsmedium nach Jia *et al.* erbracht werden. Somit war es dem Stamm ATCC 31555 Δ rmlACBD nicht möglich Welan herzustellen.

Im Anschluss wurde analysiert, ob das produzierte Welan Δ rmlACBD auf die Deletion des Clusters *rmlACBD* oder auf die Integration des Plasmides pEMG-us/ds(*rmlAD*) zurückzuführen war. Auf Grund der Integration des kompletten Plasmides vor bzw. nach dem Cluster *rmlACBD* wurden bereits Regulationsmechanismen für die Synthese der Rhamnosevorstufen unterbunden (z.B. zu weite Entfernung der Promotoren von den Genen),

weshalb Effekte zu verzeichnen waren, die für eine Deletion der Gene *rmlA*, *rmlB*, *rmlC* und *rmlD* erwartet wurden.

5.4.3 Auswirkung auf die Welanstruktur durch Deletion des Gens *urf31*, *urf34* bzw. *welB* via Methode pEMG/pSWII

Mit der Mutante *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ urf31 wurde das EPS Welan Δ urf31 produziert und analysiert (Coleman, Patel et al. 2008). Falls die vermutete Funktion von Urf31 als Rhamnosyltransferase bestätigt werden konnte, sollte das theoretische molare Rhamnose/Mannoseverhältnis durch die Deletion von *urf31* von 5,3 (in Welan molares Verhältnis Rha:Man = 1,6 : 0,3) auf 1 reduziert werden. Im Polymer Welan Δ urf31 konnte ein Wert von 1,5 ermittelt werden, was einer Reduktion des experimentell bestimmten Verhältnisses von Welan(Saccharose) bedeutete (s. Tabelle 27). Da jedoch erneut kein Dimer im MS-Chromatogramm detektiert werden konnte und das Galactose- zu Glucoseverhältnis sehr hoch war (jedoch etwas geringer als bei Welan Δ rmlACBD) wurde wohl vergleichbar zu Welan Δ rmlACBD nur Welan-Gal gebildet. Dies konnte auch durch die Bestimmung der Molmassen mittels GPC bestätigt werden, da ein großer Anteil eines Polymers im Ausschlussvolumen eluierte, sowie eine kleinere Menge eines Polymers mit 1 MDa nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu deutete das Lichtstreuungssignal von Welan-Gal auf eine, verglichen mit Welan, kleinere Molmasse hin, was einen Widerspruch zum Prinzip der GPC darstellte. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass Welan-Gal strukturelle Eigenschaften besitzt, die eine Abstoßung vom Säulenmaterial (modifiziertes Acrylatcopolymer Netzwerk) der GPC bewirken und so die Elution im Ausschlussvolumen der Säule verursachen. Diese Wechselwirkungen könnten durch die Veränderung der Ionenstärke der mobilen Phase vermindert werden (Budd 1989). Neben abstoßenden Wechselwirkungen könnte auch die Konformation des Welan-Gal Moleküls verfälschte Molekulargewichte liefern, da GPC-Analysen auf dem hydrodynamischen Volumen eines Moleküles im Vergleich zur zugänglichen Porengröße basieren und nicht auf dem eigentlichen Molekulargewicht (Harding, Varum et al. 1991). Falls Welan-Gal eine sehr gestreckte Form aufweist, kann es in weniger Matrixporen eindringen und besitzt deshalb die sehr geringe Retentionszeit.

Für das Polysaccharid, dem das EPS Welan zugeordnet wurde, wurde mittels GPC eine Masse von 1 MDa ermittelt und trat laut RI-Signal in sehr geringen Mengen in allen von den Mutanten produzierten EPS auf. Diese Menge lag unterhalb der Nachweisgrenze der HT-PMP Methode. Durch die Isolierung des EPS Welan Δ urf31 nach der Präzipitation durch Zentrifugation wurde neben Zelltrümmern, Salzen und weiteren Verunreinigungen auch eine größere Menge Welan, was durch den kleinen Dimerpeak im

MS-Chromatogramm bestätigt wurde, erhalten. Somit wurde bewiesen, dass die Mutanten fähig waren geringe Mengen Welan zu produzieren, Welan aber hier als Nebenprodukt zu betrachten war.

Durch die Monomeranalyse und die Auswertung der MS-Chromatogramme von Welan Δ welB, Welan Δ urf31 und Welan Δ urf34 zeigte sich, dass alle Mutanten als Hauptpolysaccharid Welan-Gal bildeten und nur geringe Spuren an Welan. Welan Δ urf34 besaß ein molares Verhältnis Rha/Man von 0,2, was dem Wert von Welan Δ rmlACBD sehr ähnlich war (s. Tabelle 27). Dies bedeutete, dass eine Reduktion der Rhamnose des EPS-Aufbaus auch durch den *knockout* von *urf34* verursacht wurde. Folglich war es möglich war, dass dieses Gen ein Enzym mit der Aufgabe einer Rhamnosyltransferase für das zweite EPS codierte oder einen identischen Effekt wie der *knockout* *rmlACBD* bewirkte. Zusätzlich war der Gal/Rha-Quotient von Welan Δ rmlACBD und Welan Δ urf34 mit 10,4 bzw 10,6, sowie der Gal/Glc-Quotient mit 3,7 für Welan Δ rmlACBD, gefolgt von Welan Δ urf34 mit 2,7 sehr hoch. Dies konnte bedeuten, dass diese EPS statt Rhamnose das Monosaccharid Galactose in ihre Polysaccharidstruktur besaßen, was den gesteigerten Anteil an Galactose erklärt.

Tabelle 27: Zusammenstellung der Monomerzusammensetzungen und molare Vergleichsanalysen von Welan(Glucose), sowie Welan(Saccharose), Welan Δ rmlACBD, Welan Δ welB, Welan Δ urf31 und Welan Δ urf34.

Abkürzungen: Glc = Glucose; Gal = Galactose; Man = Mannose; Rha = Rhamnose; + = positiv, - = negativ

EPS	Gal [mg/L]	Glc [mg/L]	Gal/Glc	Rha [mg/L]	Man [mg/L]	Rha/Man	Theorie Rha/Man	Dimer
Welan (Glucose)	37	170	0,2	245	59	4,6	5,3	+
Welan (Saccharose)	0	120	-	109	33	3,6	5,3	+
Welan ΔrmlACBD	110	30	3,7	9	73	0,1	\leq 1,0	-
WelanΔwelB	64	30	2,1	46	47	1,1	5,3	-
WelanΔurf31	41	19	2,2	42	31	1,5	1	-
WelanΔurf34	64	24	2,7	6	40	0,2	5,3	-

Für die Proben Welan Δ welB und Welan Δ urf31 konnten vergleichbare Gal/Glc- und Rha/Man-Verhältnisse errechnet werden, was bedeutete, dass es sich hierbei wohl um dasselbe EPS handelte. Auf Grund von Vorkenntnissen konnten diese Deletionsmutanten nur Welan-Gal bilden.

6 Ausblick

6.1 Alginataufbau beeinflusst Interkalation in LDH Strukturen

Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene Alginatvarianten für Interkalationen in LDH-Strukturen hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass durch gezielte Modifikationen des EPS Alginat die Struktur der gebildeten LDHs verändert wurde. Die Anwendung dieser Zn₂Al-LDHs als Zusatzmittel in Beton könnte dessen mechanischen Eigenschaften beeinflussen, was gezielt untersucht werden sollte.

6.2 Genetic engineering in *Sphingomonas* sp. ATCC 31555

In dieser Arbeit wurde die pEMG/pSW Methode als das geeignetste Verfahren für den *knockout* von Welansynthesegenen identifiziert. Jedoch konnte in diesem Genbereich kein kompletter *knockout* erreicht werden. Aus diesem Grund muss die Anwendung des neu etablierten, molekularbiologischen CRISPR/Cas Verfahren in Betracht gezogen werden (Jinek, Chylinski et al. 2012). Damit ist es möglich einzelne DNA-Bausteine in das Genom einzufügen, auszuschalten und zu entfernen. Diese Methode funktioniert grundsätzlich in allen Organismen, weshalb auch eine Durchführung in Sphingomonaden erfolgreich sein sollte, wobei jedoch das vermutete Problem der DNA-Struktur zunächst gelöst werden muss. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit nur eine plasmidbasierte Überexpression von *crtB* erfolgreich durchgeführt und bewiesen werden. Die plasmidbasiert eingefügten Synthesegene des EPS Welan zeigten keine Auswirkung auf die Welanstruktur, weshalb durch Southern und Western Blot Analysen bestimmt werden sollte, ob die angestrebte Überexpression nachweisbar ist. Bei einer eventuellen Bestätigung des Expressionserfolgs sollte die fehlende Auswirkung auf die Struktur durch Analysen der Enzymaktivitäten, z.B. die Abhängigkeit von der zusätzlichen Zugabe an Cofaktoren (bivalente Metalle), untersucht werden.

6.3 Aufklärung des Aufbaus der verschiedenen Welanvarianten

Das in dieser Arbeit isolierte Welan(Glucose), das von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 hergestellt wurde, stellte sich als Mischung zweier Polysaccharide heraus. Das EPS, das neben Welan produziert wurde, sollte eingehender charakterisiert werden inklusive einer Bestimmung seines kompletten Aufbaus. Hierzu sollte zunächst eine Methode gefunden werden, die es ermöglicht die beiden Polysaccharide in präparativem Maßstab zu trennen. Anschließend könnte durch die Anwendung der Lithiumdegradation (Lau, McNeil et al. 1987) die Lage der Galactoseresiduen genauer bestimmt werden. Für eine endgültige Strukturaufklärung ist eine Untersuchung via NMR-Spektroskopie unumgänglich. Falls

eine definierte Trennung von Welan und dem galactosehaltigen EPS auf Grund von Wechselwirkungen nicht möglich sein sollte, könnten Welanvarianten, die durch die Deletionsmutanten dieser Arbeit produziert werden können und einen hohen Galactoseanteil aufweisen, mittels NMR-Spektroskopie vermessen werden. Anhand dieser Untersuchungen sollte anhand der Zusammensetzungen der beiden EPS auch geklärt werden, warum das EPS Welan+rmlACBD, das mittels dem Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555+pSRK-rmlACBD produziert wurde, einen sehr hohen Mannose-, sowie einen geringen Galactoseanteil besaß, sowie warum der Stamm *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 Δ rmlACBD mit dem Plasmid pSRK-rmlACBD die Fähigkeit verliert EPS zu bilden.

Die Klärung dieser Sachen könnte mit der Charakterisierung des zweiten EPS ein möglicherweise industriell relevantes EPS entdecken, sowie die maßgeschneiderte Produktion von jeweils reinen, modifizierten EPS mit dem Stamm ermöglichen.

7 Referenzen

- Ahumada-Manuel, C. L., et al. (2017). "The signaling protein MucG negatively affects the production and the molecular mass of alginate in *Azotobacter vinelandii*." *Appl Microbiol Biotechnol* **101**(4): 1521-1534 DOI: 10.1007/s00253-016-7931-8
- Arrecubieta, C., et al. (1996). "Type 3-specific synthase of *Streptococcus pneumoniae* (Cap3B) directs type 3 polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli* and in pneumococcal strains of different serotypes." *J Exp Med* **184**(2): 449-455 DOI: 10.1084/jem.184.2.449
- Aziz, R. K., et al. (2008). "The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology." *BMC Genomics* **9**: 75 DOI: 10.1186/1471-2164-9-75
- Beale, J. M., Jr. und J. L. Foster (1996). "Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR investigations of the triose pools." *Biochemistry* **35**(14): 4492-4501 DOI: 10.1021/bi951922v
- Berg, J. M., et al. (2002). "Biochemistry." New York, W.H. Freeman.
- Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **62**(3): 293-300
- Blatny, J. M., et al. (1997). "Improved broad-host-range RK2 vectors useful for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria." *Plasmid* **38**(1): 35-51 DOI: 10.1006/plas.1997.1294
- Bodenhausen, N., et al. (2014). "A synthetic community approach reveals plant genotypes affecting the phyllosphere microbiota." *PLoS Genet* **10**(4): e1004283 DOI: 10.1371/journal.pgen.1004283
- Brettin, T., et al. (2015). "RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes." *Sci Rep* **5**: 8365 DOI: 10.1038/srep08365
- Brindley, G. W. und K. S. (1979). "A crystal-chemical study of Mg,Al and Ni,Al hydroxy-perchlorates and hydroxy-carbonates." *American Mineralogist* **64**(8): 5 DOI: 10.1346/CCMN.1982.0300303
- Budd, P. M. (1989). "Polymer Characterization." ScienceDirect.
- Campana Filho, S. P., et al. (1997). "On the stiffness of the welan chain." *Polymer Bulletin* **38**(1): 81-85 DOI: 10.1007/s002890050022
- Campbell, J. A., et al. (1997). "A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities." *Biochem J* **326** (Pt 3): 929-939 DOI: 10.1042/bj3260929u
- Castaneda, M., et al. (2001). "The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*." *J Bacteriol* **183**(23): 6787-6793 DOI: 10.1128/JB.183.23.6787-6793.2001
- Castillo, T., et al. (2013). "The acetylation degree of alginates in *Azotobacter vinelandii* ATCC9046 is determined by dissolved oxygen and specific growth rate: studies in glucose-limited chemostat cultivations." *J Ind Microbiol Biotechnol* **40**(7): 715-723 DOI: 10.1007/s10295-013-1274-6
- Cezairliyan, B. O. und R. T. Sauer (2009). "Control of *Pseudomonas aeruginosa* AlgW protease cleavage of MucA by peptide signals and MucB." *Mol Microbiol* **72**(2): 368-379 DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06654.x
- Chandrasekaran, R., et al. (1992). "Roles of potassium ions, acetyl and L-glycerol groups in native gellan double helix: an X-ray study." *Carbohydr Res* **224**: 1-17 DOI: 10.1016/0008-6215(92)84088-A
- Charnock, S. J. und G. J. Davies (1999). "Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms." *Biochemistry* **38**(20): 6380-6385 DOI: 10.1021/bi990270y
- Chen, W. P. und T. T. Kuo (1993). "A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA." *Nucleic Acids Res* **21**(9): 2260 DOI: 10.1093/nar/21.9.2260
- Chowdhury, T. A., et al. (1987). "Structural Studies of an extracellular polysaccharide, S-657, elaborated by *Xanthomonas* ATCC 53159." *Carbohydrate Research* **164**: 117-122 DOI: 10.1016/0008-6215(87)80124-6
- Ciszek-Lenda, M. (2011). "Biological functions of exopolysaccharides from probiotic bacteria. Central European Journal of Immunology." *Central European Journal of Immunology* **36**(1): 51-55
- Coleman, R. J., et al. (2008). "Identification and organization of genes for diutan polysaccharide synthesis from *Sphingomonas* sp. ATCC 53159." *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**(4): 263-274 DOI: 10.1007/s10295-008-0303-3
- Cote, G. L. und L. H. Krull (1988). "Characterization of the exocellular polysaccharides from *Azotobacter chroococcum*." *Carbohydrate Research* **181**: 143-152 DOI: 10.1016/0008-6215(88)84030-8
- Damron, F. H. und H. D. Yu (2011). "*Pseudomonas aeruginosa* MucD regulates the alginate pathway through activation of MucA degradation via MucP proteolytic activity." *J Bacteriol* **193**(1): 286-291 DOI: 10.1128/JB.01132-10
- Darder, M., et al. (2005). "Bio-Nanocomposites Based on Layered Double Hydroxides." *Chemistry of Materials* **17**(8): 1969-1977 DOI: 10.1021/cm0483240
- de Reese, J., et al. (2015). "Effect of biotechnologically modified alginates on LDH structures " *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials* **4**(3): 13 DOI: 10.1680/jbibr.14.00032
- Delepelaire, P. (2004). "Type I secretion in gram-negative bacteria." *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3): 149-161 DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.05.001

- Diaz-Barrera, A., et al. (2010). "Manipulating the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures." Bioresour Technol **101**(23): 9405-9408 DOI: 10.1016/j.biortech.2010.07.038
- Diltz, S. und S. G. Zeller (2001). "Location of O-acetyl groups in S-657 using the reductive-cleavage method." Carbohydr Res **331**(3): 265-270 DOI: 10.1016/S0008-6215(01)00045-3
- Döhlemann, J., et al. (2016). "Cloning-free genome engineering in *Sinorhizobium meliloti* advances applications of Cre/loxP site-specific recombination." J Biotechnol **233**: 160-170 DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.06.033
- Domb, A. J., et al. (2011). "Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development.". A. J. Domb, N. Kumar und A. Ezra. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc. : Clinical Uses of Alginate Pages: 137-184
- Donati, I., et al. (2003). "Determination of the diadic composition of alginate by means of circular dichroism: a fast and accurate improved method." Carbohydr Res **338**(10): 1139-1142 DOI: 10.1016/S0008-6215(03)00094-6
- Dower, W. J., et al. (1988). "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation." Nucleic Acids Res **16**(13): 6127-6145 DOI: 10.1093/nar/16.13.6127
- Draget, K. I., et al. (1989). "Alginate-based solid media for plant tissue culture." Applied Microbiology and Biotechnology **31**(1) DOI: 10.1007/bf00252532
- Draget, K. I., et al. (1990). "Homogeneous alginate gels: A technical approach." Carbohydrate Polymers **14**(2): 159-178 DOI: 10.1016/0144-8617(90)90028-q
- Duan, X. und D. G. Evans (2006). "Layered Double Hydroxides." Heidelberg, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ertesvag, H. (2015). "Alginate-modifying enzymes: biological roles and biotechnological uses." Front Microbiol **6**: 523 DOI: 10.3389/fmicb.2015.00523
- Ertesvag, H., et al. (1998). "Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase." J Bacteriol **180**(15): 3779-3784 DOI: 10.1007/s00253-003-1345-0
- Ertesvag, H., et al. (1995). "A family of modular type mannuronan C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*." Mol Microbiol **16**(4): 719-731 DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02433.x
- Ertesvag, H., et al. (1999). "Mannuronan C-5-epimerases and their application for in vitro and in vivo design of new alginates useful in biotechnology." Metab Eng **1**(3): 262-269 DOI: 10.1006/mben.1999.0130
- Ertesvag, H. und S. Valla (1999). "The A modules of the *Azotobacter vinelandii* mannuronan-C-5-epimerase AlgE1 are sufficient for both epimerization and binding of Ca²⁺." J Bacteriol **181**(10): 3033-3038 DOI: 10.11.599.7293
- Fialho, A. M., et al. (2008). "Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives." Appl Microbiol Biotechnol **79**(6): 889-900 DOI: 10.1007/s00253-008-1496-0
- Figurski, D. H. und D. R. Helinski (1979). "Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(4): 1648-1652 DOI: 10.1073/pnas.76.4.1648
- Franklin, M. J., et al. (2011). "Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl." Front Microbiol **2**: 167 DOI: 10.3389/fmicb.2011.00167
- Franklin, M. J. und D. E. Ohman (2002). "Mutant analysis and cellular localization of the AlgI, AlgJ, and AlgF proteins required for O acetylation of alginate in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **184**(11): 3000-3007 DOI: 10.1128/JB.184.11.3000-3007.2002
- Funami, T., et al. (2008). "Molecular structures of gellan gum imaged with atomic force microscopy in relation to the rheological behavior in aqueous systems in the presence or absence of various cations." J Agric Food Chem **56**(18): 8609-8618 DOI: 10.1021/jf8007713
- Gacesa, P. (1998). "Bacterial alginate biosynthesis--recent progress and future prospects." Microbiology **144** (Pt 5): 1133-1143 DOI: 10.1099/00221287-144-5-1133
- Gai, Z., et al. (2011). "Genome sequence of *Sphingomonas elodea* ATCC 31461, a highly productive industrial strain of gellan gum." J Bacteriol **193**(24): 7015-7016 DOI: 10.1128/JB.06307-11
- Galindo, E., et al. (2007). "Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*." Microb Cell Fact **6**: 7 DOI: 10.1186/1475-2859-6-7
- Garinot-Schneider, C., et al. (2000). "Identification of essential amino acid residues in the *Sinorhizobium meliloti* glucosyltransferase ExoM." J Biol Chem **275**(40): 31407-31413 DOI: 10.1074/jbc.M004524200
- Gaytan, I., et al. (2012). "*Azotobacter vinelandii* lacking the Na(+)-NQR activity: a potential source for producing alginates with improved properties and at high yield." World J Microbiol Biotechnol **28**(8): 2731-2740 DOI: 10.1007/s11274-012-1084-4
- Gibson, D. G., et al. (2009). "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases." Nat Methods **6**(5): 343-345 DOI: 10.1038/nmeth.1318
- Gimmetstad, M., et al. (2009). "Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination." J Bacteriol **191**(15): 4845-4853 DOI: 10.1128/JB.00455-09
- Gimmetstad, M., et al. (2006). "Identification and characterization of an *Azotobacter vinelandii* type I secretion system responsible for export of the AlgE-type mannuronan C-5-epimerases." J Bacteriol **188**(15): 5551-5560 DOI: 10.1128/JB.00236-06
- Glick, B. R., et al. (1985). "Transformation of *Azotobacter vinelandii* with plasmid DNA." J Bacteriol **162**(1): 276-279 DOI: 10.1016/0147-619X(88)90042-X

- Goodwin, P. J. (1999). Biosynthesis of the nitrogenase FeMo-cofactor from *Azotobacter vinelandii*: involvement of the NifNE complex, NifX and the Fe protein. *Virginia Polytechnic Institute*: 210.
- Gorin, P. A. J. und J. F. T. Spencer (1966). "Exocellular Alginate from *Azotobacter Vinelandii*." *Canadian Journal of Chemistry* **44**(9): 993-998 DOI: 10.1139/v66-147
- Granja, A. T., et al. (2007). "Biochemical characterization and phylogenetic analysis of UDP-glucose dehydrogenase from the gellan gum producer *Sphingomonas elodea* ATCC 31461." *Appl Microbiol Biotechnol* **76**(6): 1319-1327 DOI: 10.1007/s00253-007-1112-8
- Grant, G. T., et al. (1973). "Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model." *FEBS Letters* **32**(1): 195-198 DOI: 10.1016/0014-5793(73)80770-7
- Greenfield, N. J. (2007). "Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure." *Nature Protocols* **1**(6): 2876-2890 DOI: 10.1038/nprot.2006.202
- Gutsche, J., et al. (2006). "Biochemical analysis of alginate biosynthesis protein AlgX from *Pseudomonas aeruginosa*: purification of an AlgX-MucD (AlgY) protein complex." *Biochimie* **88**(3-4): 245-251 DOI: 10.1016/j.biochi.2005.06.003
- Ha, S., et al. (2000). "The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis." *Protein Sci* **9**(6): 1045-1052 DOI: 10.1110/ps.9.6.1045
- Harding, N. E., et al. (2003). "Mutant strain of *Sphingomonas elodea* which produces non-acetylated gellan gum." I. CP Kelco U.S., Delaware.
- Harding, N. E., et al. (2004). "Organization of genes required for gellan polysaccharide biosynthesis in *Sphingomonas elodea* ATCC 31461." *J Ind Microbiol Biotechnol* **31**(2): 70-82 DOI: 10.1007/s10295-004-0118-9
- Harding, N. E., et al. (2011). "High viscosity diutan gums." I. CP Kelco U.S.
- Harding, N. E., et al. (1991). "Molecular weight determination of polysaccharides." *Advances in Carbohydrate Analysis* **1**: 63-144 DOI: 10.5740/jaoacint.18-0121
- Harding, N. E., et al. (2014). "Targeted gene deletion for polysaccharide slime formers." I. CP Kelco U.S.
- Haug, A. und B. Larsen (1969). "Biosynthesis of alginate. Epimerisation of D-mannuronic to L-guluronic acid residues in the polymer chain." *Biochim Biophys Acta* **192**(3): 557-559 DOI: 10.1016/0304-4165(69)90414-0
- Haug, A. und B. Larsen (1971). "Biosynthesis of alginate. II. Polymannuronic acid C-5-epimerase from *Azotobacter vinelandii* (Lipman)." *Carbohydr Res* **17**(2): 297-308 DOI: 10.1016/S0008-6215(00)82537-9
- Hay, I. D., et al. (2013). "Microbial alginate production, modification and its applications." *Microb Biotechnol* **6**(6): 637-650 DOI: 10.1111/1751-7915.12076
- Hay, I. D., et al. (2014). "Genetics and regulation of bacterial alginate production." *Environ Microbiol* **16**(10): 2997-3011 DOI: 10.1111/1462-2920.12389
- Hember, M. W., et al. (1994). "Native ordered structure of welan polysaccharide: conformational transitions and gel formation in aqueous dimethyl sulphoxide." *Carbohydr Res* **252**: 209-221 DOI: 10.1016/0008-6215(94)84133-0
- Ho, S. N., et al. (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." *Gene* **77**(1): 51-59 DOI: 10.1016/0378-1119(89)90358-2
- Hoidal, H. K., et al. (1999). "The recombinant *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase AlgE4 epimerizes alginate by a nonrandom attack mechanism." *J Biol Chem* **274**(18): 12316-12322 DOI: 10.1074/jbc.274.18.12316
- Hoidal, H. K., et al. (2000). "Mannuronan C-5 epimerases and cellular differentiation of *Azotobacter vinelandii*." *Environ Microbiol* **2**(1): 27-38 DOI: 10.1046/j.1462-2920.2000.00074
- Holtan, S., et al. (2006). "Mode of action and subsite studies of the guluronan block-forming mannuronan C-5 epimerases AlgE1 and AlgE6." *Biochem J* **395**(2): 319-329 DOI: 10.1042/BJ20051804
- Huang, H., et al. (2013). "Cloning, expression and characterization of a phosphoglucomutase/phosphomannomutase from sphingon-producing *Sphingomonas sanxanigenens*." *Biotechnol Lett* **35**(8): 1265-1270 DOI: 10.1007/s10529-013-1193-7
- Huang, H., et al. (2016). "Structural and physical properties of sanxan polysaccharide from *Sphingomonas sanxanigenens*." *Carbohydr Polym* **144**: 410-418 DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.02.079
- Huang, H. D., et al. (2009). "*Sphingomonas sanxanigenens* sp. nov., isolated from soil." *Int J Syst Evol Microbiol* **59**(Pt 4): 719-723 DOI: 10.1099/ijs.0.000257-0
- Ikeda, S., et al. (2013). "High Acyl Gellan Networks Probed by Rheology and Atomic Force Microscopy." *Food Science and Technology Research* **19**(2): 201-210 DOI: 10.3136/fstr.19.201
- Jain, S., et al. (2003). "The dual roles of AlgG in C-5-epimerization and secretion of alginate polymers in *Pseudomonas aeruginosa*." *Mol Microbiol* **47**(4): 1123-1133 DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03361
- Jain, S. und D. E. Ohman (1998). "Deletion of algK in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* blocks alginate polymer formation and results in uronic acid secretion." *J Bacteriol* **180**(3): 634-641
- Jansson, P. E., et al. (1986). "Structural studies of a polysaccharide (S-88) elaborated by *Pseudomonas* ATCC 31554." *Carbohydr Res* **156**: 165-172 DOI: 10.1016/S0008-6215(00)90108-3
- Jansson, P. E. und G. Widmalm (1994). "Welan gum (S-130) contains repeating units with randomly distributed L-mannosyl and L-rhamnosyl terminal groups, as determined by FABMS." *Carbohydr Res* **256**(2): 327-330 DOI: 10.1016/0008-6215(94)84217-5
- Jerga, A., et al. (2006). "Chemical mechanism and specificity of the C5-mannuronan epimerase reaction." *Biochemistry* **45**(30): 9138-9144 DOI: 10.1021/bi060748f

- Jia, W., et al. (2012). "Structure of oligosaccharide F21 derived from exopolysaccharide WL-26 produced by *Sphingomonas* sp. ATCC 31555." *Carbohydrate Polymers* **90**(1): 60-66 DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.04.061
- Jia, W., et al. (2012). "Ultrasound-assisted degradation of a new bacterial exopolysaccharide WL-26 from *Sphingomonas* sp." *African Journal of Biotechnology* **11**(79) DOI: 10.5897/ajb11.4290
- Jinek, M., et al. (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." *Science* **337**(6096): 816-821 DOI: 10.1126/science.1225829
- Kaczmarczyk, A., et al. (2012). "Markerless gene deletion system for sphingomonads." *Appl Environ Microbiol* **78**(10): 3774-3777 DOI: 10.1128/AEM.07347-11
- Katzen, F., et al. (1998). "*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence." *J Bacteriol* **180**(7): 1607-1617
- Kaur, V., et al. (2014). "Welan gum: microbial production, characterization, and applications." *Int J Biol Macromol* **65**: 454-461 DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.061
- Keiski, C. L., et al. (2007). "Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of *Pseudomonas fluorescens* AlgK." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **63**(Pt 5): 415-418 DOI: 10.1107/S1744309107016880
- Kelly, S. M., et al. (2005). "How to study proteins by circular dichroism." *Biochim Biophys Acta* **1751**(2): 119-139 DOI: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005
- Khan, S. R., et al. (2008). "Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing." *Appl Environ Microbiol* **74**(16): 5053-5062 DOI: 10.1128/AEM.01098-08
- Klock, G., et al. (1994). "Production of purified alginates suitable for use in immunisolated transplantation." *Appl Microbiol Biotechnol* **40**(5): 638-643 DOI: 10.1007/BF00173321
- Klock, G., et al. (1997). "Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates." *Biomaterials* **18**(10): 707-713 DOI: 10.1016/S0142-9612(96)00204-9
- Koranyi, P., et al. (1998). "Stable electrotransformation of symbiont candidate diazotrophic bacterium with plasmids carrying selectable and screenable marker genes." *Res Microbiol* **149**(5): 361-372 DOI: 10.1016/S0923-2508(98)80441-5
- Kozubek, A. und J. H. Tyman (1999). "Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity." *Chem Rev* **99**(1): 1-26 DOI: 10.1021/cr970464o
- Krause, K. M., et al. (2016). "Aminoglycosides: An Overview." *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**(6) DOI: 10.1101/cshperspect.a027029
- Kuo, C. C., et al. (1986). "Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR." *J Clin Microbiol* **24**(6): 1034-1037
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685 DOI: 10.1038/227680a0
- Larsen, B. und A. Haug (1971). "Biosynthesis of alginate." *Carbohydrate Research* **17**(2): 287-296 DOI: 10.1016/s0008-6215(00)82536-7
- Lau, J. M., et al. (1987). "Selective degradation of the glycosyluroic acid residues of complex carbohydrates by lithium dissolved in ethylenediamine." *Carbohydrate Research* **168**(2): 219-243 DOI: 10.1016/0008-6215(87)80028-9
- Lee, K. Y. und D. J. Mooney (2012). "Alginate: properties and biomedical applications." *Prog Polym Sci* **37**(1): 106-126 DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
- Lee, Y., et al. (2012). "A coevolutionary residue network at the site of a functionally important conformational change in a phosphohexomutase enzyme family." *PLoS One* **7**(6): e38114 DOI: 10.1371/journal.pone.0038114
- Leroux, F., et al. (2004). "Biopolymer immobilization during the crystalline growth of layered double hydroxide." *Journal of Solid State Chemistry* **177**(1): 245-250 DOI: 10.1016/j.jssc.2003.08.013
- Leys, N. M., et al. (2004). "Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons." *Appl Environ Microbiol* **70**(4): 1944-1955 DOI: 10.1128/AEM.70.4.1944-1955.2004
- Liew, C. V., et al. (2006). "Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets." *Int J Pharm* **309**(1-2): 25-37 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.040
- Linker, A. und R. S. Jones (1964). "A Polysaccharide Resembling Alginic Acid from a *Pseudomonas* Micro-Organism." *Nature* **204**: 187-188 DOI: 10.1038/204187a0
- Marques, A. R., et al. (2003). "Characterization of the *ugpG* gene encoding a UDP-glucose pyrophosphorylase from the gellan gum producer *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461." *Mol Genet Genomics* **268**(6): 816-824 DOI: 10.1007/s00438-003-0805-7
- Martinez-Garcia, E. und V. de Lorenzo (2011). "Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440." *Environ Microbiol* **13**(10): 2702-2716 DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x
- Martins, L. O. und I. Sa-Correia (1991). "Gellan gum biosynthetic enzymes in producing and nonproducing variants of *Pseudomonas elodea*." *Biotechnol Appl Biochem* **14**(3): 357-364 DOI: 10.1111/j.1470-8744.1991.tb00188.x
- Marx, C. J. und M. E. Lidstrom (2002). "Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria." *Biotechniques* **33**(5): 1062-1067 DOI: 10.2144/02335rr01

- Mathee, K., et al. (1997). "Posttranslational control of the algT (algU)-encoded sigma22 for expression of the alginate regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (AlgN)." *J Bacteriol* **179**(11): 3711-3720 DOI: 10.1128/jb.179.11.3711-3720.1997
- Matthew, I. R., et al. (1995). "Subperiosteal behaviour of alginate and cellulose wound dressing materials." *Biomaterials* **16**(4): 275-278 DOI: 10.1016/0142-9612(95)93254-B
- May, T. B., et al. (1994). "Identification of amino acid residues involved in the activity of phosphomannose isomerase-guanosine 5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase. A bifunctional enzyme in the alginate biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Biol Chem* **269**(7): 4872-4877 DOI: 10.1016/j.febslet.2008.09.013
- Moreira, L. M., et al. (2004). "The Gellan Gum Biosynthetic Genes *gelC* and *gelE* Encode Two Separate Polypeptides Homologous to the Activator and the Kinase Domains of Tyrosine Autokinases." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **8**(1): 43-57 DOI: 10.1159/000082080
- Mülhardt, C. (2013). "Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics." Akademischer Verlag Spektrum.
- Mullis, K. B. und F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-350 DOI: 10.1016/0076-6879(87)55023-6
- Nickerson, M. T., et al. (2003). "Rheological properties of gellan solutions: effect of calcium ions and temperature on pre-gel formation." *Food Hydrocolloids* **17**(5): 577-583 DOI: 10.1016/s0268-005x(02)00075-9
- Noar, J. D. und J. M. Bruno-Barcena (2018). "Azotobacter vinelandii: the source of 100 years of discoveries and many more to come." *Microbiology* **164**(4): 421-436 DOI: 10.1099/mic.0.000643
- Novick, R. P. (1987). "Plasmid incompatibility." *Microbiol Rev* **51**(4): 381-395 DOI: 10.1093/protein/gzm005
- Nunez, C., et al. (2000). "Role of Azotobacter vinelandii mucA and mucC gene products in alginate production." *J Bacteriol* **182**(23): 6550-6556 DOI: 10.1128/JB.182.23.6550-6556.2000
- Nwodo, U. U., et al. (2012). "Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects." *Int J Mol Sci* **13**(11): 14002-14015 DOI: 10.3390/ijms131114002
- O'Neill, M. A., et al. (1983). "Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*." *Carbohydrate Research* **124**(1): 123-133 DOI: 10.1016/0008-6215(83)88360-8
- Overbeek, R., et al. (2014). "The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST)." *Nucleic Acids Res* **42**(Database issue): D206-214 DOI: 10.1093/nar/gkt1226
- Pace, C. N., et al. (1995). "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein." *Protein Science* **4**(11): 2411-2423 DOI: 10.1002/pro.5560041120
- Page, W. J. und M. von Tigerstrom (1979). "Optimal conditions for transformation of Azotobacter vinelandii." *J Bacteriol* **139**(3): 1058-1061
- Paredes Juárez, G. A., et al. (2014). "Immunological and Technical Considerations in Application of Alginate-Based Microencapsulation Systems." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2** DOI: 10.3389/fbioe.2014.00026
- Peik, J., et al. (1992). "Heteropolysaccharide S-657." I. Merk & Co. US5175278 A.
- Peña, C., et al. (1997). "Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of Azotobacter vinelandii cultured in shake flasks." *Applied Microbiology and Biotechnology* **48**(4): 510-515 DOI: 10.1007/s002530051088
- Pena, C., et al. (2006). "Manipulation of the acetylation degree of Azotobacter vinelandii alginate by supplementing the culture medium with 3-(N-morpholino)-propane-sulfonic acid." *Lett Appl Microbiol* **43**(2): 200-204 DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01925.x
- Pena, C., et al. (2002). "Alginate production by Azotobacter vinelandii mutants altered in poly-beta-hydroxybutyrate and alginate biosynthesis." *J Ind Microbiol Biotechnol* **29**(5): 209-213 DOI: 10.1038/sj.jim.7000310
- Pena, C., et al. (2000). "Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of Azotobacter vinelandii*." *Enzyme Microb Technol* **27**(6): 390-398 DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00221-0
- Plank, J., et al. (2012). "Intercalation of the Microbial Biopolymers Welan Gum and EPS I into Layered Double Hydroxides." *Zeitschrift für Naturforschung B* **67**(5) DOI: 10.5560/znb.2012-0081
- Plank, J. und A. Steinbüchel (2005). "Applications of Biopolymers in Construction Engineering." DOI: 10.1002/3527600035.bpola002
- Pollock, T. J. (1993). "Gellan-related polysaccharides and the genus Sphingomonas." *Journal of General Microbiology* **139**(8): 1939-1945 DOI: 10.1099/00221287-139-8-1939
- Pollock, T. J. (2005). "Sphingan Group of Exopolysaccharides (EPS)." Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Pollock, T. J., et al. (1996). "DNS-Segmente und Verfahren zur Erhöhung von Polysaccharid-Produktion.". I. Shin-Etsu Bio. DE69637385.
- Pollock, T. J., et al. (1998). "Assignment of biochemical functions to glycosyl transferase genes which are essential for biosynthesis of exopolysaccharides in Sphingomonas strain S88 and Rhizobium leguminosarum." *J Bacteriol* **180**(3): 586-593
- Pollock, T. J., et al. (2001). "DNA segments and methods for increasing polysaccharide production." US 6284516 B1.
- Posfai, G., et al. (2006). "Emergent properties of reduced-genome Escherichia coli." *Science* **312**(5776): 1044-1046 DOI: 10.1126/science.1126439

- Radchenkova, N., et al. (2013). "Production and Properties of Two Novel Exopolysaccharides Synthesized by a Thermophilic Bacterium *Aeribacillus pallidus* 418." Applied Biochemistry and Biotechnology **171**(1): 31-43 DOI: 10.1007/s12010-013-0348-2
- Raki, L. und J. J. Beaudoin (2011). "Controlled release of chemical admixtures ". N. R. C. o. Canada. Canada.
- Reckseidler-Zenteno, S. L., et al. (2005). "The capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* contributes to survival in serum by reducing complement factor C3b deposition." Infect Immun **73**(2): 1106-1115 DOI: 10.1128/IAI.73.2.1106-1115.2005
- Reeves, P. R., et al. (1996). "Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature." Trends in Microbiology **4**(12): 495-503 DOI: 10.1016/s0966-842x(97)82912-5
- Rehm, B. H. (2010). "Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications." Nat Rev Microbiol **8**(8): 578-592 DOI: 10.1038/nrmicro2354
- Rehm, B. H. A. (2009). "Alginates: Biology and Applications." Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- Riley, L. M., et al. (2013). "Structural and functional characterization of *Pseudomonas aeruginosa* AlgX: role of AlgX in alginate acetylation." J Biol Chem **288**(31): 22299-22314 DOI: 10.1074/jbc.M113.484931
- Roberts, I. S. (1996). "The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria." Annu Rev Microbiol **50**: 285-315 DOI: 10.1146/annurev.micro.50.1.285
- Robles-Price, A., et al. (2004). "AlgX is a periplasmic protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **186**(21): 7369-7377 DOI: 10.1128/JB.186.21.7369-7377.2004
- Roychoudhury, S., et al. (1989). "Purification and characterization of guanosine diphospho-D-mannose dehydrogenase. A key enzyme in the biosynthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*." J Biol Chem **264**(16): 9380-9385
- Ruas-Madiedo, P., et al. (2002). "An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria." International Dairy Journal **12**(2-3): 163-171 DOI: 10.1016/s0958-6946(01)00160-1
- Rühmann, B., et al. (2014). "Fast carbohydrate analysis via liquid chromatography coupled with ultra violet and electrospray ionization ion trap detection in 96-well format." J Chromatogr A **1350**: 44-50 DOI: 10.1016/j.chroma.2014.05.014
- Rühmann, B., et al. (2015). "High throughput exopolysaccharide screening platform: from strain cultivation to monosaccharide composition and carbohydrate fingerprinting in one day." Carbohydr Polym **122**: 212-220 DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.12.021
- Sa-Correia, I., et al. (2002). "Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering." J Ind Microbiol Biotechnol **29**(4): 170-176 DOI: 10.1038/sj.jim.7000266
- Sabra, W., et al. (2000). "Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase." Appl Environ Microbiol **66**(9): 4037-4044 DOI: 10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000
- Saiki, R. K., et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491 DOI: 10.1126/science.239.4839.487
- Sambrook, J. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual.", Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sambrook, J. und D. W. Russell (2006). "Inverse PCR." CSH Protoc **2006**(1) DOI: 10.1101/pdb.prot3487
- Sanger, F., et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467 DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463
- Schäfer, A., et al. (1994). "Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*." Gene **145**(1): 69-73 DOI: 10.1016/0378-1119(94)90324-7
- Schmid, J., et al. (2016). "Bacterial Glycosyltransferases: Challenges and Opportunities of a Highly Diverse Enzyme Class Toward Tailoring Natural Products." Front Microbiol **7**: 182 DOI: 10.3389/fmicb.2016.00182
- Schmid, J., et al. (2015). "Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies." Front Microbiol **6**: 496 DOI: 10.3389/fmicb.2015.00496
- Schmid, J., et al. (2014). "A comparison of genes involved in sphingan biosynthesis brought up to date." Appl Microbiol Biotechnol **98**(18): 7719-7733 DOI: 10.1007/s00253-014-5940-z
- Segura, D., et al. (2003). "Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis." Arch Microbiol **179**(6): 437-443 DOI: 10.1007/s00203-003-0553-4
- Setubal, J. C., et al. (2009). "Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes." J Bacteriol **191**(14): 4534-4545 DOI: 10.1128/JB.00504-09
- Shapiro, L. und S. Cohen (1997). "Novel alginate sponges for cell culture and transplantation." Biomaterials **18**(8): 583-590 DOI: 10.1016/S0142-9612(96)00181-0
- Sharp, P. A., et al. (1973). "Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose--ethidium bromide electrophoresis." Biochemistry **12**(16): 3055-3063 DOI: 10.1021/bi00740a018
- Shinabarger, D., et al. (1991). "Purification and characterization of phosphomannose isomerase-guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase. A bifunctional enzyme in the alginate biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*." J Biol Chem **266**(4): 2080-2088 DOI: 10.1007/s00203-009-0534-3
- Sievers, F., et al. (2011). "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega." Mol Syst Biol **7**: 539 DOI: 10.1038/msb.2011.75

- Silva, E., et al. (2005). "Proteins encoded by *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 rmlA and ugpG genes, involved in gellan gum biosynthesis, exhibit both dTDP- and UDP-glucose pyrophosphorylase activities." *Appl Environ Microbiol* **71**(8): 4703-4712 DOI: 10.1128/AEM.71.8.4703-4712.2005
- Skjåk-Bræk, G., et al. (1986). "Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates." *Carbohydr Res* **154**: 239-250 DOI: 10.1016/S0008-6215(00)90036-3
- Skjåk-Bræk, G., et al. (1989). "Effect of acetylation on some solution and gelling properties of alginates." *Carbohydrate Research* **185**(1): 131-138 DOI: 10.1016/0008-6215(89)84028-5
- Smidsrød, O., et al. (1973). "The relative extension of alginates having different chemical composition." *Carbohydrate Research* **27**(1): 107-118 DOI: 10.1016/S0008-6215(00)82430-1
- Smidsrød, O. und A. Haug (1967). "Precipitation of acidic polysaccharides by salts in ethanol-water mixtures." *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia* **16**(3): 1587-1598 DOI: 10.1002/polc.5070160335
- Stahl, E. (1969). "Thin-layer chromatography. A laboratory handbook."
- Stanisci, A., et al. (2018). "Overall size of mannuronan C5-Epimerases influences their ability to epimerize modified alginates and alginate gels." *Carbohydrate Polymers* **180**: 256-263 DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.09.094
- Stankowski, J. D. und S. G. Zeller (1992). "Location of the O-acetyl group in welan by the reductive-cleavage method." *Carbohydr Res* **224**: 337-341 DOI: 10.1016/0008-6215(92)84122-9
- Stewart-Tull, D. E. (1980). "The immunological activities of bacterial peptidoglycans." *Annu Rev Microbiol* **34**: 311-340 DOI: 10.1146/annurev.mi.34.100180.001523
- Sutherland, I. W. (1990). "Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides." Cambridge University Press.
- Sutherland, I. W. (1996). "Extracellular Polysaccharides." *Biotechnology* **7**: 613-657.
- Sutherland, I. W. (2005). "Microbial exopolysaccharides." *Polysaccharides Structural Diversity and Functional Versatility*. S. Dumitriu und M. Dekker. NY.
- Svanem, B. I., et al. (1999). "Cloning and expression of three new *Azotobacter vinelandii* genes closely related to a previously described gene family encoding mannuronan C-5-epimerases." *J Bacteriol* **181**(1): 68-77 DOI: 10.1128/AEM.02945-09
- Svanem, B. I. G., et al. (2001). "The Catalytic Activities of the Bifunctional *Azotobacter vinelandii* Mannuronan C-5-Epimerase and Alginate Lyase AlgE7 Probably Originate from the Same Active Site in the Enzyme." *Journal of Biological Chemistry* **276**(34): 31542-31550 DOI: 10.1074/jbc.M102562200
- Swennen, K., et al. (2005). "Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxyloligosaccharides with different structures." *Carbohydrate Polymers* **62**(3): 283-292 DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.08.001
- Tait, M., et al. (1990). "Acid hydrolysis and high-performance liquid chromatography of xanthan." *Carbohydrate Polymers* **13**(2): 133-148 DOI: 10.1016/0144-8617(90)90080-c
- Tako, M. und H. Tamaki (2005). "Molecular Origin for the Thermal Stability of S-88 Gum Produced by *Pseudomonas* ATCC 31554." *Polymer Journal* **37**(7): 498-505 DOI: 10.1295/polymj.37.498
- Tatnell, P. J., et al. (1994). "GDP-mannose dehydrogenase is the key regulatory enzyme in alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence from metabolite studies." *Microbiology* **140** (Pt 7): 1745-1754 DOI: 10.1099/13500872-140-7-1745
- Tavares, I. M., et al. (1999). "Pattern of changes in the activity of enzymes of GDP-D-mannuronic acid synthesis and in the level of transcription of algA, algC and algD genes accompanying the loss and emergence of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*." *Res Microbiol* **150**(2): 105-116 DOI: 10.1016/S0923-2508(99)80028-X
- Thorne, L., et al. (2000). "Increasing the yield and viscosity of exopolysaccharides secreted by *Sphingomonas* by augmentation of chromosomal genes with multiple copies of cloned biosynthetic genes." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **25**(1): 49-57 DOI: 10.1038/sj.jim.7000019
- Tokiwa, Y. und B. P. Calabia (2004). "Degradation of microbial polyesters." *Biotechnol Lett* **26**(15): 1181-1189 DOI: 10.1023/B:BILE.0000036599.15302.e5
- Tran, S. T., et al. (2009). "Cloning and characterization of phosphomannose isomerase from *Sphingomonas chungbukensis* DJ77." *BMB Rep* **42**(8): 523-528 DOI: 10.5483/BMBRep.2009.42.3.172
- Trujillo-Roldan, M. A., et al. (2004). "The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*." *Appl Microbiol Biotechnol* **63**(6): 742-747 DOI: 10.1007/s00253-003-1419-z
- Trujillo-Roldan, M. A., et al. (2003). "Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase." *Appl Microbiol Biotechnol* **60**(6): 733-737 DOI: 10.1007/s00253-002-1173-7
- Urtuvia, V., et al. (2017). "Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production." *World J Microbiol Biotechnol* **33**(11): 198 DOI: 10.1007/s11274-017-2363-x
- van Kranenburg, R., et al. (1999). "Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides." *Curr Opin Biotechnol* **10**(5): 498-504 DOI: 10.1016/S0958-1669(99)00017-8
- Videira, P., et al. (2001). "Biochemical characterization of the beta-1,4-glucuronosyltransferase GelK in the gellan gum-producing strain *Sphingomonas paucimobilis* A.T.C.C. 31461." *Biochem J* **358**(Pt 2): 457-464 DOI: 10.1042/0264-6021:3580457
- Videira, P. A., et al. (2000). "Identification of the pgmG gene, encoding a bifunctional protein with phosphoglucomutase and phosphomannomutase activities, in the gellan gum-producing strain

- Sphingomonas paucimobilis ATCC 31461." *Appl Environ Microbiol* **66**(5): 2252-2258 DOI: 10.1128/AEM.66.5.2252-2258.2000
- Wang, W. und B. A. Malcolm (1999). "Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis." *Biotechniques* **26**(4): 680-682 DOI: 10.2144/99264st03
 - Wang, X., et al. (2012). "Genome Sequence of the Welan Gum-Producing Strain Sphingomonas sp. ATCC 31555." *Journal of Bacteriology* **194**(21): 5989-5990 DOI: 10.1128/jb.01486-12
 - Wegrzyn, G. und A. Wegrzyn (2002). "Stress responses and replication of plasmids in bacterial cells." *Microb Cell Fact* **1**(1): 2 DOI: 10.1186/1475-2859-1-2
 - Weisburg, W. G., et al. (1991). "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study." *J Bacteriol* **173**(2): 697-703 DOI: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
 - West, T. P. (2005). "Improved Polysaccharide Production Using Strain Improvement." 301-311 DOI: 10.1385/1-59259-847-1:301
 - White, D. C., et al. (1996). "The genus Sphingomonas: physiology and ecology." *Curr Opin Biotechnol* **7**(3): 301-306 DOI: 10.1016/S0958-1669(96)80034-6
 - Whitfield, C. und M. A. Valvano (1993). "Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria." *Adv Microb Physiol* **35**: 135-246 DOI: 10.1016/S0065-2911(08)60099-5
 - Whitney, J. C. und P. L. Howell (2013). "Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria." *Trends in Microbiology* **21**(2): 63-72 DOI: 10.1016/j.tim.2012.10.001
 - Wiggins, C. A. und S. Munro (1998). "Activity of the yeast MNN1 alpha-1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 7945-7950 DOI: 10.1073/pnas.95.14.7945
 - Wilson, G. G. und N. E. Murray (1991). "Restriction and modification systems." *Annu Rev Genet* **25**: 585-627 DOI: 10.1146/annurev.ge.25.120191.003101
 - Winther-Larsen, H. C., et al. (2000). "Parameters affecting gene expression from the Pm promoter in gram-negative bacteria." *Metab Eng* **2**(2): 79-91 DOI: 10.1006/mben.1999.0142
 - Wu, M., et al. (2017). "The evolutionary life cycle of the polysaccharide biosynthetic gene cluster based on the Sphingomonadaceae." *Scientific Reports* **7**(1) DOI: 10.1038/srep46484
 - Wu, M., et al. (2017). "Network structure and functional properties of transparent hydrogel sanxan produced by Sphingomonas sanxanigenens NX02." *Carbohydrate Polymers* **176**: 65-74 DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.08.057
 - Xu, L., et al. (2013). "The comparison of rheological properties of aqueous welan gum and xanthan gum solutions." *Carbohydr Polym* **92**(1): 516-522 DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.09.082
 - Yamazaki, M., et al. (1996). "Linkage of genes essential for synthesis of a polysaccharide capsule in Sphingomonas strain S88." *J Bacteriol* **178**(9): 2676-2687 DOI: 10.1128/jb.178.9.2676-2687.1996
 - Zeng, Y. H., et al. (2013). "Long PCR-RFLP of 16S-ITS-23S rRNA genes: a high-resolution molecular tool for bacterial genotyping." *J Appl Microbiol* **114**(2): 433-447 DOI: 10.1111/jam.12057
 - Zhang, M., et al. (2014). "Layered Double Hydroxide–Carbon Dot Composite: High-Performance Adsorbent for Removal of Anionic Organic Dye." *ACS Applied Materials & Interfaces* **6**(22): 20225-20233 DOI: 10.1021/am505765e
 - Zhang, W., et al. (2016). "Improved production of carotenoid-free welan gum in a genetic-engineered *Alcaligenes* sp. ATCC31555." *Biotechnol Lett* **38**(6): 991-997 DOI: 10.1007/s10529-016-2068-5
 - Zou, N. und J. Plank (2012). "Intercalation of papain enzyme into hydrotalcite type layered double hydroxide." *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **73**(9): 1127-1130 DOI: 10.1016/j.jpcs.2012.04.016

8 Anhang

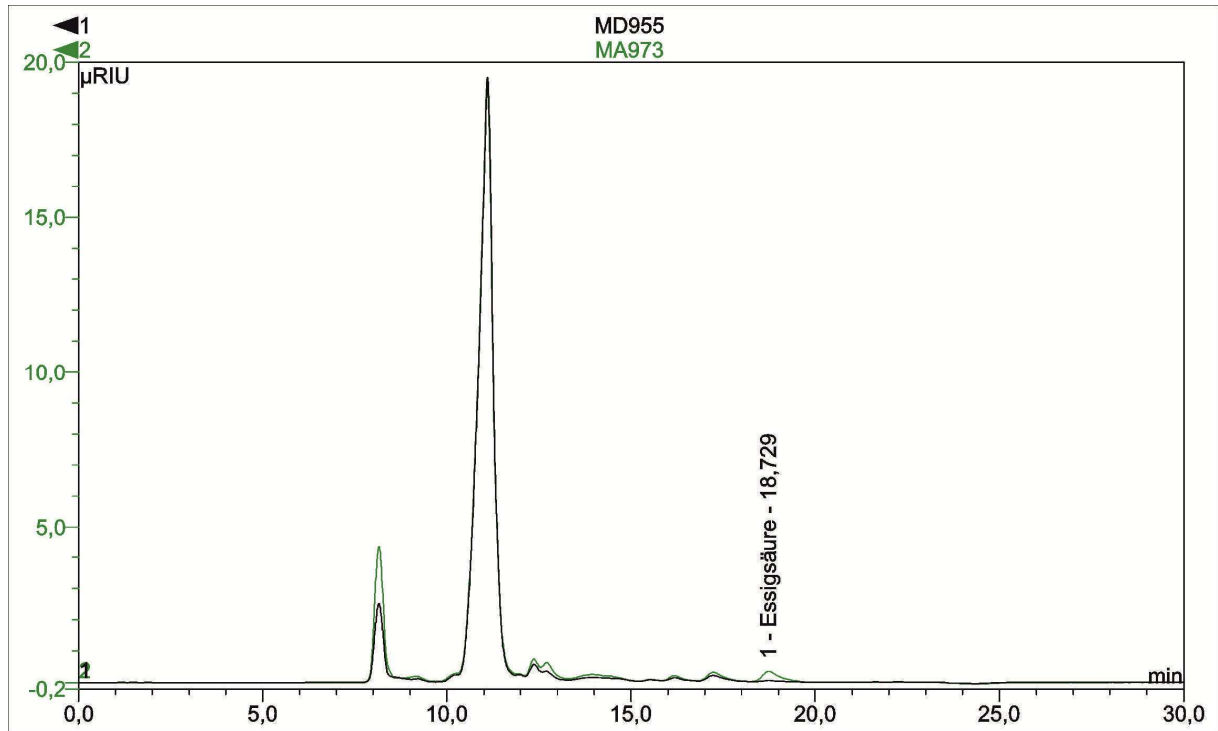


Abbildung 45: HPLC Chromatogramm zur Bestimmung der Acetatmenge von MA973.

Elutionsprofile der Varianten MA973 (grün) und MD955 (schwarz), aufgenommen mittels RI-Detektor (RI-101, Shodex). Beladung der Säule Rezex.

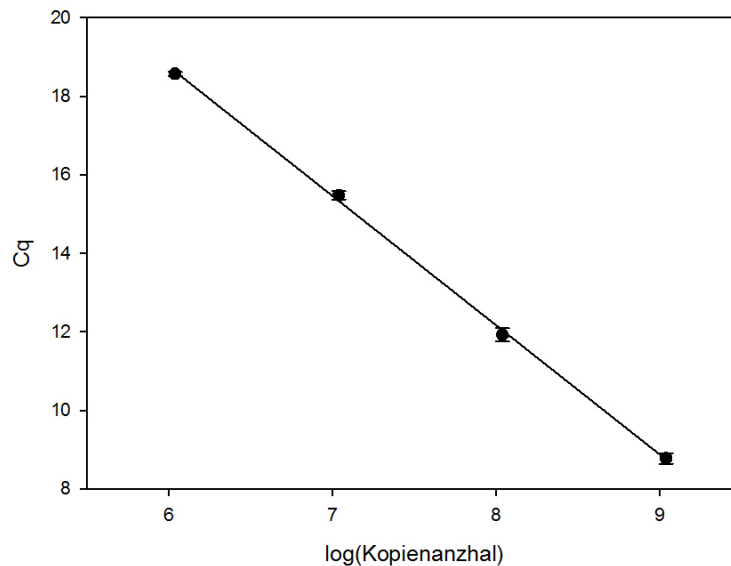


Abbildung 46: Kalibrierungsgerade des Logarithmus der Kopienanzahl von 16S-Regionen mit der Anzahl der Quantifizierungszyklen.

Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen an.
Fit-Typ: linear; R=0,9996

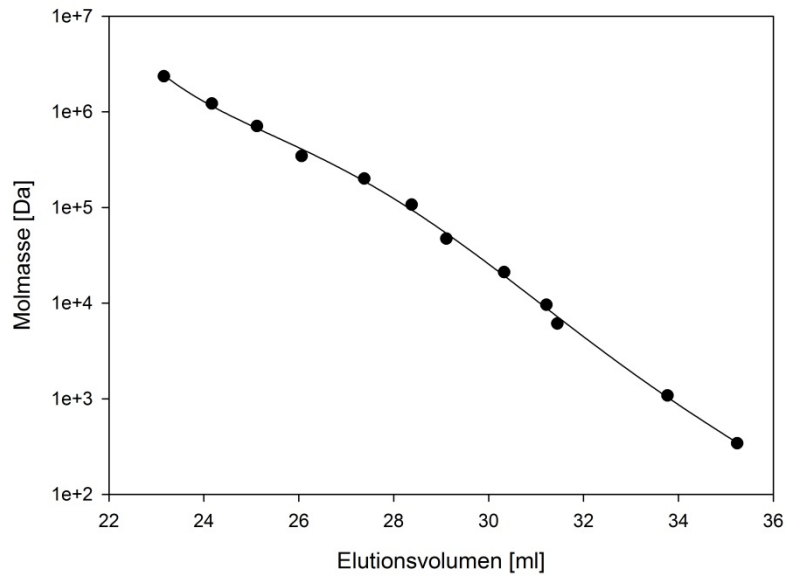


Abbildung 47: Kalibriergerade mit Pullulan für die Bestimmung der Molekulargewichte von Welan(Glc) und Welan(Sac).
Fit-Typ: Polynominal 5; R:0,9993

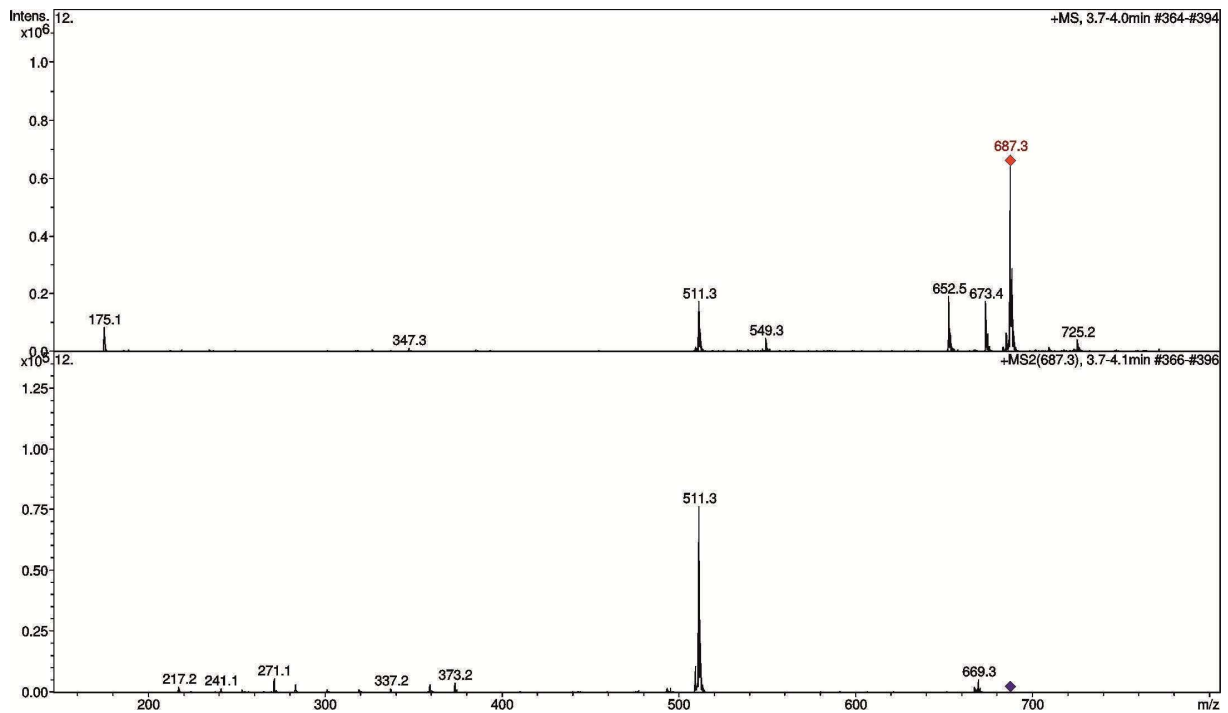


Abbildung 48: Fragmentierungsmuster des Dimers β -D-GlcUA-(1 \rightarrow 4)-D-Glc ($m/z = 687$).

Tabelle 28: Resultate der EPS Analyse (Fällung mit 75 – 95 % Isopropanol bzw. 95 % Ethanol) mit HT-PMP Methode von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555.

Abkürzungen: Glc = Glucose; Gal = Galactose; Man = Mannose; Rha = Rhamnose; GlcUA = Glucuronsäure; Rib = Ribose; + = positiv

Keine Berechnung der Wiederfindung möglich, da die maximal gefällte Menge an EPS eingesetzt wurde.

Probe	Kohlenhydratgehalt [mg/L] (PMP)						Identifizierung Dimer
	Glc	Gal	Man	Rha	GlcUA	Rib	via MS
75 % Isopropanol	610	67	595	614	Spuren	2	Glucuronsäure-Glucose +
80 % Isopropanol	503	66	562	477	Spuren	-	+
85 % Isopropanol	552	70	614	556	Spuren	-	+
95 % Isopropanol	584	63	509	537	Spuren	-	+
95 % Ethanol	560	67	574	505	Spuren	-	+

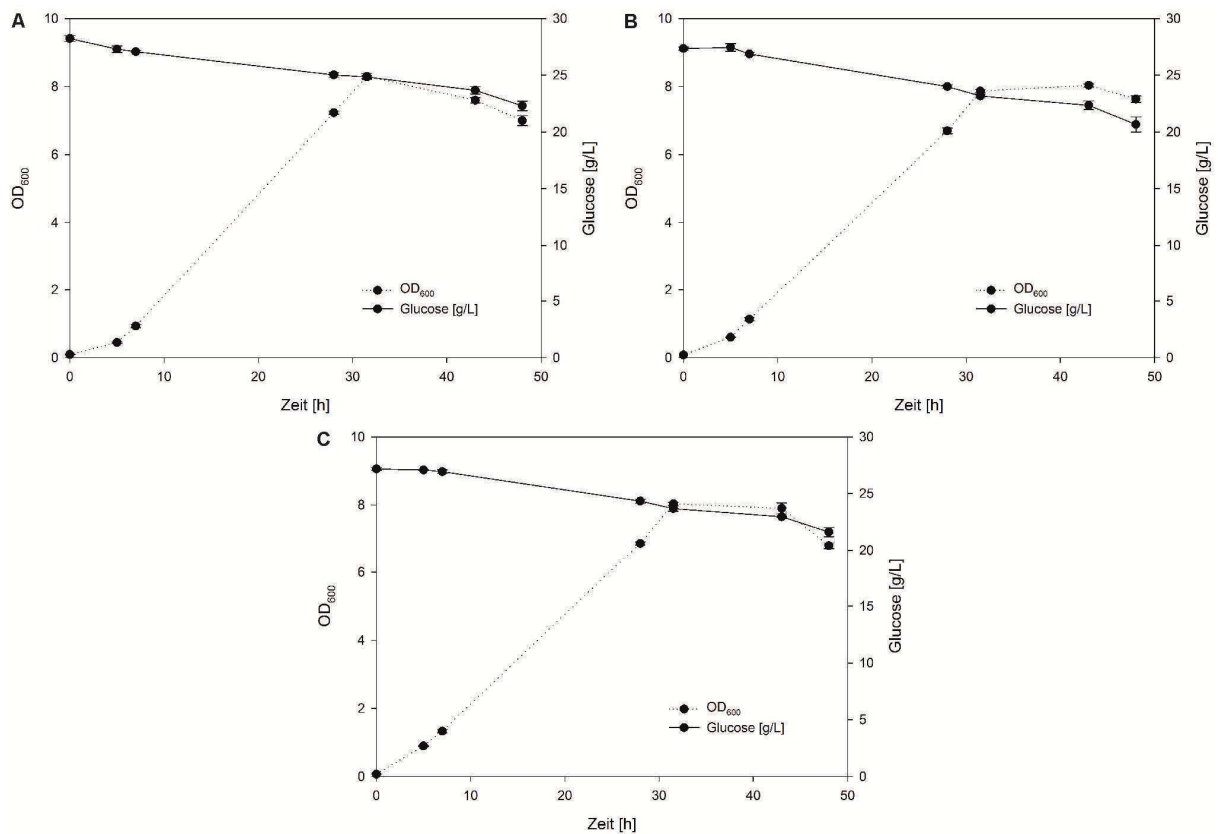


Abbildung 49: Wachstumskurven und Glucoseverbrauch von *Sphingomonas* sp. ATCC 31555Δurf31 (A), *Sphingomonas* sp. ATCC 31555Δurf34 (B) und *Sphingomonas* sp. ATCC31555ΔwelB (C).

Die Zellen wurden via einer frischen Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 30°C und 100 rpm für 48 h geschüttelt. Das Zellwachstum und der Glucoseverbrauch wurden verfolgt. Zu sehen ist eine Auftragung der Zeit in [h] gegen die OD₆₀₀ (Wachstumskurven; gepunktet dargestellt) und gegen die Glucosemenge im Medium in [g/L] (als durchgehender Strich dargestellt). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen an.

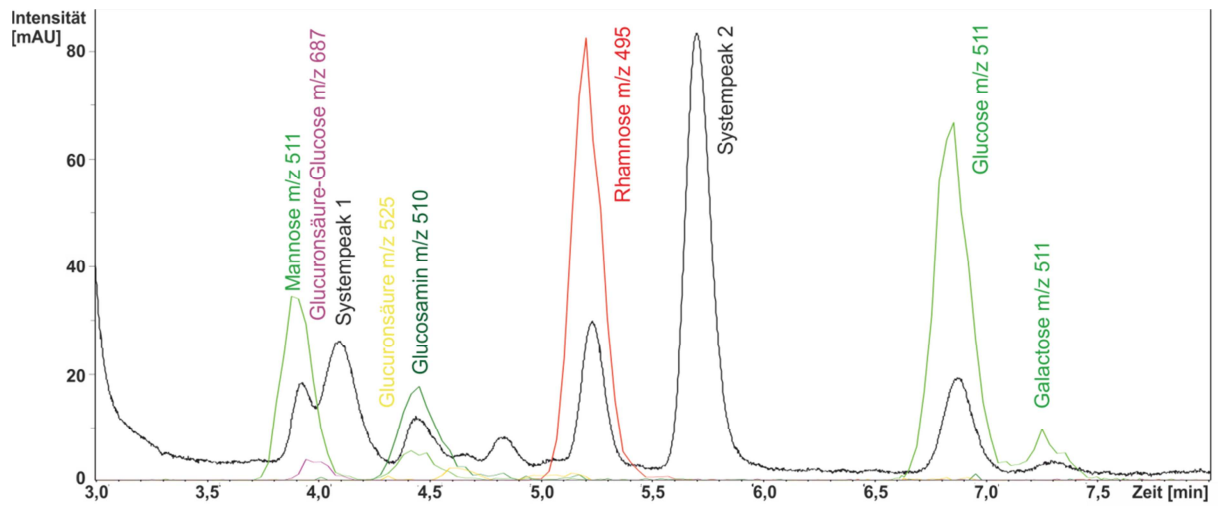


Abbildung 50: Überlagerung des UV- und MS-Chromatogrammes von der Monomeranalyse von Welan Δ urf31 (Isolierung nach Zentrifugation).

UV: 245 nm (schwarz); Ionenchromatogramme: Hexosen (m/z 511, grün), Uronsäure (m/z 525, gelb), Glucosamin (m/z 510, dunkelgrün), Deoxyhexose (m/z 495, rot), Pentosen (m/z 481 lila), Dimer Uronsäure-Hexose (m/z 687, lila).