



**Autodisplay von Cellulasen auf *Pseudomonas putida*, *Zymobacter palmae* und
Zymomonas mobilis - ein Ganzzell-Ansatz zur vereinfachten Hydrolyse von
Cellulose**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

in der NRW Graduate School of Chemistry

im Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Iasson Elias Philippos Tozakidis

aus Lippstadt

- 2016 -

| | |
|-----------------------------|----------------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. Andreas Heuer |
| Erster Gutachter: | Prof. Dr. Joachim Jose |
| Zweiter Gutachter: | Prof. Dr. Henning D. Mootz |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 20.07.2016 |
| Tag der Promotion: | 20.07.2016 |

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel sind in der Dissertation angegeben.

Diese Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Münster, den 31.05.2016

Iasson Elias Philippos Tozakidis

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| I Zusammenfassung | 1 |
| II Einleitung..... | 3 |
| 1 Biotreibstoffe als Alternative zu Rohöl-basierten Treibstoffen..... | 3 |
| 2 Cellulose als Rohstoff für Biokraftstoffe der zweiten Generation | 4 |
| 2.1 Chemische Struktur | 5 |
| 2.2 Assoziation mit anderen Polymeren | 6 |
| 2.3 Enzymatischer Abbau..... | 7 |
| 3 Konzepte zur Transformation von Cellulose | 12 |
| 3.1 Grundlegender Ablauf | 12 |
| 3.2 Prozessführung | 14 |
| 4 Ethanogene Bakterien..... | 18 |
| 4.1 <i>Zymomonas mobilis</i> | 18 |
| 4.2 <i>Zymobacter palmae</i> | 20 |
| 5 Oberflächenpräsentation mit Autodisplay..... | 21 |
| 5.1 Mechanistische Aspekte..... | 22 |
| 5.2 Biotechnologische Anwendungen | 23 |
| 5.3 AIDA-I und MATE | 24 |
| III Ziele der Arbeit | 26 |
| IV Material und Methoden..... | 27 |
| 1 Materialien | 27 |
| 1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial | 27 |
| 1.2 Chemikalien..... | 29 |
| 1.3 Bakterienstämme | 31 |
| 1.4 Oligonukleotide..... | 32 |
| 1.5 Plasmide..... | 33 |
| 1.6 Enzyme | 34 |
| 1.7 Nährmedien..... | 34 |

| | |
|--|----|
| 1.8 Puffer und Lösungen | 35 |
| 1.9 Reagenziensätze..... | 37 |
| 1.10 Software | 37 |
| 2 Methoden | 38 |
| 2.1 Grundlegende mikrobiologische Arbeiten..... | 38 |
| 2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren | 40 |
| 2.3 Arbeiten mit Proteinen | 43 |
| 2.4 Analytik der Esteraseaktivität | 45 |
| 2.5 Analytik der Cellulaseaktivität..... | 46 |
| 2.6 Prüfung der Oberflächenpräsentation | 47 |
| V Experimente und Ergebnisse | 50 |
| 1 Autodisplay der Esterase EstA zur Konzeptprüfung | 50 |
| 1.1 Konstruktion eines geeigneten Plasmids zur Proteinexpression | 50 |
| 1.2 Expression des MATE-EstA Fusionsproteins | 52 |
| 1.3 Prüfung der Oberflächenpräsentation | 54 |
| 1.4 Untersuchung der Esteraseaktivität ganzer Zellen | 58 |
| 2 Autodisplay der bakteriellen β -Glucosidase BglA..... | 61 |
| 2.1 Konstruktion und Expression von MATE-BglA | 61 |
| 2.2 Prüfung der Oberflächenpräsentation | 63 |
| 2.3 Untersuchungen zur hydrolytischen Aktivität von BglA..... | 65 |
| 3 Autodisplay der bakteriellen Endocellulase Cel5A | 69 |
| 3.1 Konstruktion und Expression von MATE-Cel5A | 69 |
| 3.2 Prüfung der Oberflächenständigkeit | 71 |
| 3.3 Untersuchungen zur hydrolytischen Aktivität von Cel5A | 73 |
| 4 Autodisplay der bakteriellen Exocellulase CelK | 77 |
| 4.1 Konstruktion und Expression von MATE-CelK | 78 |
| 4.2 Prüfung der Oberflächenständigkeit | 79 |
| 4.3 Untersuchungen zur hydrolytischen Aktivität von CelK | 81 |
| 5 Kombinierte Anwendung der Ganzzellkatalysatoren auf Filterpapier | 84 |

| | |
|--|-----|
| 6 Temperaturabhängigkeit der Glukose-Aufnahme von <i>P. putida</i> | 90 |
| 7 Wiederverwendbarkeit und Temperaturstabilität der Ganzzellkatalysatoren..... | 91 |
| VI Diskussion..... | 93 |
| 1 Autodisplay der Esterase EstA zur Konzeptprüfung | 93 |
| 2 Autodisplay der bakteriellen Cellulasen BglA, CelK und Cel5A | 98 |
| 2.1 Temperaturprofile der Ganzzellkatalysatoren..... | 99 |
| 2.2 Abbau von Filterpapier | 101 |
| 2.3 Kompatibilität anderer β -Glucosidasen mit MATE | 105 |
| VII Fazit und Ausblick | 108 |
| Literaturverzeichnis | 111 |
| Anhang | 127 |
| 1 Abkürzungsverzeichnis | 127 |
| 2 DNA- und Aminosäure-Sequenzen..... | 128 |
| 3 Plasmidkarten | 135 |
| 4 Veröffentlichungen | 136 |
| 5 Lebenslauf | 138 |

I Zusammenfassung

Die enzymatische Zersetzung von Cellulose und anschließende Fermentation der entstandenen Glukose zu Ethanol ist momentan gegenüber Herstellungsverfahren, die auf Erdöl oder stärkehaltiger Biomasse basieren, nicht wettbewerbsfähig. Das liegt hauptsächlich an den hohen Kosten, die mit der Produktion und Applikation der dafür benötigten Enzyme β -Glucosidase, Endo- und Exocellulase einhergehen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob diese Enzyme in Form von rekombinanten Autotransporter-Fusionsproteinen auf der Zelloberfläche von *Zymomonas mobilis*, *Zymobacter palmae* und *Pseudomonas putida* präsentiert werden können. Das würde den direkten Einsatz der Bakterien auf cellulosehaltiger Biomasse und damit die Einsparung kostenintensiver Aufreinigungsschritte ermöglichen. Der natürliche Metabolismus von *Z. mobilis* und *Z. palmae* würde weiterhin die Option bieten, die entstehende Glukose direkt zu Ethanol zu fermentieren und den Transformationsprozess damit auf technischer Ebene weiter zu vereinfachen.

Dazu wurde im ersten Teil der Arbeit auf Grundlage des *maximized autotransporter mediated expression* (MATE) Systems ein Plasmid konstruiert, das die Expression rekombinanter Autotransporter-Fusionsproteine - bestehend aus Signalpeptid, Passagierdomäne und Transporteinheit - in den beiden Organismen ermöglichte. Dabei wurde zuerst die Esterase EstA aus *B. gladioli* als Modell-Passagier genutzt, um die generelle Fähigkeit von *Z. mobilis* und *Z. palmae*, den Autotransporter-Sekretionspfad zu nutzen, zu prüfen. Durch SDS-PAGE von Außenmembranproteinisolaten konnte gezeigt werden, dass das entsprechende Fusionsprotein von beiden Organismen exprimiert und zur äußeren Membran transportiert wurde. Durchflusszytometrische Analysen und enzymgekoppelter, immunologischer Nachweis (ELISA) gaben weiterhin Hinweise auf die Lokalisation der Esterase auf der Oberfläche der Zellen. Ein kolorimetrischer Aktivitätstest mit ganzen Zellen ergab, dass das Enzym in seiner funktionellen Konformation vorlag. Dabei übertraf *Z. palmae* als Wirtsorganismus in seiner esterolytischen Aktivität von 294 mU/mL/OD₅₇₈1 nicht nur *Z. mobilis* (88 mU/mL/OD₅₇₈1), sondern überraschenderweise auch den optimierten *E. coli* Stamm BL21 (113 mU/mL/OD₅₇₈1). Eine geringe Enzymaktivität konnte allerdings auch im

Zellüberstand von *Z. palmae* detektiert werden, vermutlich aufgrund einer proteolytischen Freisetzung des Enzyms.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im zweiten Teil der Arbeit *Z. palmae* und *P. putida* für die Oberflächenpräsentation der Endocellulase Cel5A aus *Bacillus subtilis* sowie der β -Glucosidase BglA und der Exocellulase CelK, beide aus *Clostridium thermocellum*, genutzt. Die rekombinanten Stämme zeigten jeweils hydrolytische Aktivität gegenüber den wasserlöslichen Substraten 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid (BglA), 4-Nitrophenyl- β -D-cellobiosid (CelK) und Carboxymethylcellulose (Cel5A). Mischungen aus CelK- und Cel5A-präsentierenden Zellen konnten Filterpapier zu einem höheren Grad hydrolysieren als die einzelnen Stämme in Summe. Damit konnte ein erster Hinweis darauf gewonnen werden, dass das synergistische Potential von Cellulasen auch bei ihrer getrennten Oberflächenpräsentation nutzbar ist. Die Zugabe von BglA-präsentierenden Zellen zu dieser Mischung hatte dagegen einen kaum auszumachenden Effekt auf die Hydrolyse des Filterpapiers, vermutlich aufgrund einer zu geringen Aktivität der β -Glucosidase gegenüber Cellobiose. Die Aktivität dieser Kombination konnte jedoch durch Austausch von Cel5A mit der Endocellulase CelA aus *C. thermocellum* deutlich gesteigert werden. Mit *P. putida* als Wirtsorganismus wurde so eine hydrolytische Aktivität von 0.016 mU_{GE}/mL/OD₅₇₈1 gegenüber Filterpapier erzielt.

II Einleitung

1 Biotreibstoffe als Alternative zu Rohöl-basierten Treibstoffen

Erdöl ist der wichtigste Rohstoff unserer heutigen Gesellschaft. Erst die Erschließung dieses fossilen Energieträgers ermöglichte die Entwicklung einer globalisierten, hochindustrialisierten Wirtschaft, die auch heute noch maßgeblich durch Erdöl angetrieben wird. Dieser Zustand ist allerdings labil und zeitlich begrenzt: Angesichts einer fortschreitenden Verknappung der weltweiten Vorkommen sowie weitreichender Umweltprobleme, die durch die intensive Förderung des Rohöls und der Verbrennung der daraus hergestellten Produkte verursacht werden, sind in allen Bereichen, in denen Erdöl genutzt wird, Alternativen gefragt, welche die Abhängigkeit von diesem Rohstoff senken können (Ragauskas *et al.*, 2006; Curtis, 2009; Sorrell *et al.*, 2010). Da der größte Anteil des geförderten Öls in Form von Treibstoffen im Transportsektor verbraucht wird, verspricht die Verwendung alternativer Treibstoffe auf Basis nachwachsender Rohstoffe, sog. Biokraftstoffe, eine signifikante Reduzierung des Erdölverbrauchs. Durch die Substitution des Erdöls mit Biomasse kann außerdem das bei der Verbrennung der Treibstoffe freigesetzte Treibhausgas CO₂ von den für die Produktion angebauten Pflanzen wieder assimiliert werden, so dass sich bei einem hohen Substitutionsgrad und der Verwendung geeigneter Biomasse ein Gleichgewicht zwischen freigesetztem und wieder zu Biomasse umgesetztem CO₂ einstellen kann (Fargione *et al.*, 2008; Naik *et al.*, 2010).

Ein Biokraftstoff muss zwei wesentliche Rahmenbedingungen hinsichtlich seiner Herstellung erfüllen, um langfristig und in ausreichendem Umfang als Ersatz für fossile Treibstoffe dienen zu können: Zum einen muss der Produktionsprozess eine positive Energie- und Kostenbilanz aufweisen; zum anderen müssen Ausgangsmaterialien verwendet werden, die auch bei intensiver Nutzung in Zukunft schnell und in großem Umfang regenerierbar sind. Diese Ausgangsmaterialien dürfen allerdings nicht in Konkurrenz mit der Nahrungsmittelproduktion stehen. Biokraftstoffe der sog. ersten Generation, die aus Zuckerrüben, Zuckerrohr oder Getreide hergestellt werden, können zwar wirtschaftlich und in großem Maßstab produziert werden, entsprechen aber nicht der Forderung nach einem Ausschluss nahrungsmittelproduzierender Pflanzen. Selbst bei einem gegenwärtig

vergleichsweise niedrigen Produktionsvolumen von Biokraftstoffen der ersten Generation sind Auswirkungen auf die Nahrungsmittelpreise bereits feststellbar (Mitchell, 2008). Eine Steigerung der Produktion solcher Biokraftstoffe würde insbesondere in Entwicklungsländern bereits bestehende Probleme in der Nahrungsmittelversorgung weiter verschärfen und ist daher gesamtgesellschaftlich nicht vertretbar. Der Schwerpunkt von Forschung und Entwicklung hat sich daher auf die Herstellung von sog. Biokraftstoffen der zweiten Generation verlagert. Das sind Kraftstoffe, die aus für den Nahrungsmittelmarkt nicht verwertbaren Rohstoffen hergestellt werden (Naik *et al.*, 2010).

Als Biokraftstoffe können prinzipiell sowohl feste, flüssige, als auch gasförmige Verbindungen eingesetzt werden. Der aktuelle technische Entwicklungsstand im Transportsektor legt die Verwendung von flüssigen Treibstoffen nahe, da diese einfach transportiert und gelagert werden können, eine hohe Energiedichte besitzen und leicht in die bestehende Infrastruktur der Verbrennungsmotoren eingeführt werden können (Zhang, 2011). Ethanol aus Zuckerrohr und Getreide wird in Brasilien und den USA bereits in großem Umfang als Treibstoff genutzt, und es wird erwartet, dass dieser Alkohol in den nächsten Jahrzehnten den Biokraftstoff-Markt dominieren wird (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006). Grundsätzlich kommen aber auch beispielsweise Methanol, Butanol, verschiedene Ether sowie Fettsäuremethylester (Biodiesel) als flüssige Biokraftstoffe in Frage.

2 Cellulose als Rohstoff für Biokraftstoffe der zweiten Generation

Cellulose stellt den vielversprechendsten Rohstoff für zukünftige Biokraftstoffe der zweiten Generation dar. Sie ist die auf der Erde am häufigsten vorkommende Form von Biomasse und wird als Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand in nahezu unbegrenzter Menge gebildet. Die Nutzung dieser Ressource bietet in ökonomischer als auch ökologischer Hinsicht bedeutende Vorteile: In der Land- und Forstwirtschaft, der Nahrungsmittelindustrie und in städtischer Umgebung fallen große Mengen an cellulosehaltigen Abfällen an. Diese Abfälle werden bislang keinem wertsteigerndem Transformationsprozess zugeführt, die benötigte Biomasse ist zu einem gewissen Anteil also schon vorhanden und muss nicht erzeugt werden (Bayer *et al.*, 2007). Weiterhin ist die Kultivierung von Pflanzen zur Cellulose-Generierung wenig

anspruchsvoll, so dass Landflächen genutzt werden können, die für den Anbau von Nahrungsmittelpflanzen nicht geeignet sind (Wyman, 1999). Die Ressourcengewinnung findet somit ohne direkte Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion statt und Gebiete mit niedriger Bodenqualität können am Rohstoff-Markt partizipieren.

Bislang gibt es kein industriell etabliertes Verfahren zur effizienten Umwandlung cellulosehaltiger Biomasse zu Biokraftstoffen. Dieser Problematik liegen mehrere Teilaspekte zugrunde, die zusammen genommen die wirtschaftliche Gestaltung eines solchen Transformationsprozesses erschweren (Carriquiry *et al.*, 2011), und im Folgenden genauer beleuchtet werden.

2.1 Chemische Struktur

Cellulose ist ein unverzweigtes Polysaccharid, das aus Ketten β -1,4-verknüpfter D-Anhydro-Glukose-Moleküle besteht. Jede Cellulose-Kette besitzt ein reduzierendes und ein nicht reduzierendes Ende. Am reduzierenden Ende steht die Glukose-Einheit im Gleichgewicht zwischen Hemiacetal- und geöffneter Ringform, während beim nicht reduzierenden Ende das anomere Kohlenstoffatom durch die glykosidische Bindung an einer Ringöffnung gehindert wird (Klemm *et al.*, 2005). Durch die β -Konfiguration der glykosidischen Bindungen ist jedes Monomer gegenüber der vorangehenden und nachfolgenden Einheit um 180° verdreht (Abbildung 1). Das führt zu einer hoch symmetrischen, linearen Gestalt des Polymers und macht eine enge Zusammenlagerung von bis zu 30 Celluloseketten zu Elementarfibrillen möglich. Diese Zusammenlagerung wird durch eine hohe Anzahl an inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waal's - Wechselwirkungen stabilisiert. In gleicher Weise bilden mehrere Elementarfibrillen zusammen Mikrofibrillen aus, die wiederum in Makrofibrillen organisiert sind. Die hohe Symmetrie, die dieser Struktur innewohnt, bedingt die für ein Polysaccharid ungewöhnliche Eigenschaft von Cellulose, teilweise in kristalliner Form vorzuliegen (Mansfield *et al.*, 1999). Die sehr dichte Packung der einzelnen Ketten erschwert das Eindringen von Enzymen und sogar kleinen Molekülen wie Wasser und macht Cellulose dadurch sehr widerstandsfähig gegenüber chemischer und enzymatischer Zersetzung (Lynd *et al.*, 2002).

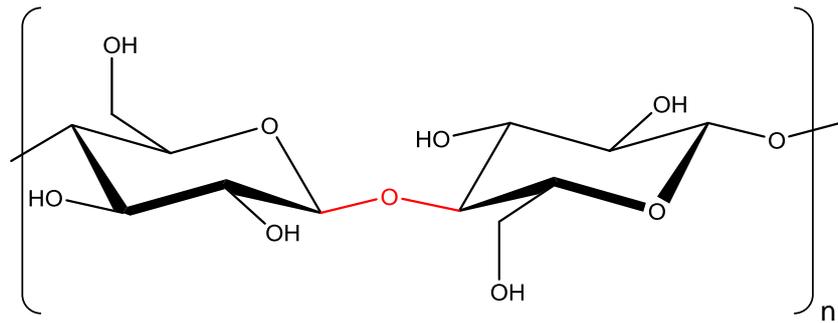


Abbildung 1: Chemische Struktur von Cellulose. Die β -1,4-glykosidische Bindung (rot) bedingt eine 180° -Verdrehung benachbarter Glukose-Einheiten zueinander, so dass das Polymer eine lineare Gestalt annimmt.

2.2 Assoziation mit anderen Polymeren

Cellulose liegt in den meisten für die Produktion von Biokraftstoffen relevanten Arten von Biomasse nicht in Reinform, sondern als Lignocellulose vor, in der sie in einer Matrix aus den Polymeren Lignin und Hemicellulose eingebettet ist. Im Mittel enthält Lignocellulose 35-50% Cellulose, 20-35% Hemicellulose und 5-30% Lignin (Lynd *et al.*, 2002). Lignin und Hemicellulose variieren in ihrer Zusammensetzung, sind stark verzweigt und bilden keine höheren Strukturen aus. Hemicellulose besteht hauptsächlich aus den Pentosen D-Xylose und L-Arabinose, den Hexosen D-Galactose, D-Glukose und D-Mannose sowie Glucuronsäure. Das amorphe Polysaccharid bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit den Mikrofibrillen der Cellulose aus und umgibt sie dadurch (Shallom und Shoham, 2003). Lignin ist ein aromatisches Polymer, das hauptsächlich aus Cumaryl-, Coniferyl- und Synapil-Alkoholen besteht. Es ist kovalent an Hemicellulose gebunden und verbindet damit die einzelnen Strukturelemente miteinander. Das Zusammenwirken dieser drei Polymere verleiht Lignocellulose neben ihrer chemischen Widerstandsfähigkeit auch eine hohe mechanische Stabilität, so dass eine Vorbehandlung der rohen Biomasse notwendig ist, um Cellulose aus ihrer Umgebung herauszulösen und für den enzymatischen Abbau zugänglich zu machen. Dazu zählen physikalische Verfahren wie Zermahlen, Erhitzung und Kompression, chemische Vorbehandlungen durch Säure, Lauge oder Oxidationsmittel und Kombinationen daraus (Hendriks und Zeeman, 2009; Agbor *et al.*, 2011).

2.3 Enzymatischer Abbau

Die weite Verbreitung von Cellulose in Habitaten, die sich hinsichtlich ihrer Wasser- und Sauerstoffverfügbarkeit, Redoxpotential und Nährstoffgehalt stark voneinander unterscheiden, haben zur evolutiven Entwicklung einer Vielzahl von Lebewesen geführt, die das Polymer abbauen und als primäre Nährstoffquelle nutzen können. In der Domäne der Bakterien finden sich solche unter den überwiegend aeroben *Actinomycetales* und den anaeroben *Clostridiales*. Bei Eukaryoten ist die Nährstoffgewinnung aus Cellulose insbesondere unter Pilzen weit verbreitet – diese reichen von primitiven Formen wie den *Chytridiomycetes* bis zu hoch entwickelten Spezies wie den Ständerpilzen (*Basidiomycota*). Die Fähigkeit zur Verwertung von Cellulose wurde aber auch bei einigen Tieren, darunter Termiten und Flusskrebse, festgestellt. Aus der dritten Domäne der Lebewesen, den Archaeen, wurden dagegen bislang keine cellulolytischen Organismen identifiziert (Lynd *et al.*, 2002).

2.3.1 Hydrolytischer Abbau durch Cellulasen

Neben ihrer taxonomischen Diversität unterscheiden sich auch die von den Spezies entwickelten Strategien für die Verwertung von Cellulose. Ein gemeinsames Merkmal besteht dabei in der Produktion von Cellulasen, einer Klasse von Enzymen, welche die Hydrolyse der glykosidischen Bindungen von Cellulose und den damit einhergehenden Abbau des Polymers katalysieren.

Systematik

Die systematische Klassifizierung von Cellulasen kann sowohl auf Grundlage von Sequenz- bzw. Struktur-Eigenschaften als auch auf funktioneller Basis erfolgen. Nach ersterer, von Henrissat (1991) vorgeschlagenen Methode werden Cellulasen entsprechend ihrer Aminosäuresequenzen in Familien der Glykosidhydrolasen (GH) eingeteilt, die durch Gemeinsamkeiten in ihren Tertiärstrukturen wiederum in Clans zusammengefasst sind. 22 von zurzeit 133 aufgeführten GH-Familien enthalten Cellulasen (Juturu und Wu, 2014). Während diese Systematik das Auffinden evolutionärer Verwandtschaften ermöglicht, erlaubt sie keine generellen Aussagen über die Substratspezifität der Cellulasen. So befinden sich Enzyme mit verschiedenen Spezifitäten teilweise innerhalb der gleichen GH-Familie, und andersherum sind Enzyme mit gleicher Spezifität häufig verschiedenen GH-Familien

zugeordnet (Davies und Henrissat, 1995). Neben dieser Systematik werden Cellulasen daher auch nach der Nomenklatur der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) in Endocellulasen, Exocellulasen und β -Glucosidasen unterteilt. Endocellulasen (EC 3.2.1.4) hydrolysieren glykosidische Bindungen innerhalb der Celluloseketten und erzeugen dadurch langkettige Oligomere. Exocellulasen prozessieren Cellulose dagegen an den reduzierenden (EC 3.2.1.91) oder nicht reduzierenden Enden (EC 3.2.1.176) der Ketten und trennen dimere Einheiten, die auch als Cellobiose bezeichnet werden, von dem Polymer ab. Dementsprechend werden diese Enzyme auch als Cellobiohydrolasen bezeichnet. β -Glucosidasen (EC 3.2.1.21) spalten Cellobiose und liefern damit Glukose als Produkt der vollständigen Hydrolyse von Cellulose (Abbildung 2).

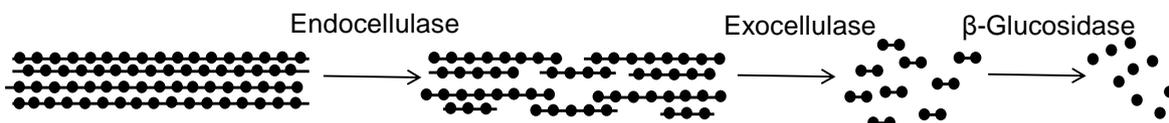


Abbildung 2: Enzymatischer Abbau von Cellulose durch die kombinierte Aktivität von drei Enzymklassen der Cellulasen. Endocellulasen hydrolysieren glykosidische Bindungen innerhalb der Celluloseketten, so dass neue Angriffspunkte für Exocellulasen entstehen. Die von diesem Enzym produzierten Disaccharide werden von β -Glucosidasen zu Glukose abgebaut.

Mechanismus

Aus mechanistischer Sicht unterscheidet man zwischen Cellulasen, die bei der Hydrolyse die Konfiguration des anomeren Zentrums invertieren (Inversionsmechanismus), und Cellulasen, die insgesamt keine Veränderung der Stereochemie verursachen (Retentionsmechanismus). In beiden Fällen sind jeweils zwei Carboxylreste der Aminosäuren Aspartat oder Glutamat im aktiven Zentrum des Enzyms an der Hydrolyse beteiligt. Beim Inversionsmechanismus fungiert einer davon als Base und deprotoniert ein Wassermolekül, welches das anomere Zentrum nucleophil angreift. Das abgehende Sauerstoffatom wird durch den zweiten Carboxylrest, der als Säure fungiert, protoniert. Die Hydrolyse findet in diesem Fall in einem einzigen Schritt statt. Dagegen wirkt beim Retentionsmechanismus einer der Carboxylreste zuerst selbst als Nucleophil und bildet eine intermediäre Esterverbindung mit dem anomeren Zentrum aus. In einer zweiten Substitutionsreaktion wird die Carboxylgruppe dann durch ein Hydroxidion

abgespalten. Der zweite Carboxylrest wirkt bei diesem Mechanismus sowohl als Säure (Protonierung des glykosidischen Sauerstoffatoms) als auch als Base (Deprotonierung eines Wassermoleküls) (McCarter und Withers, 1994). Der Mechanismus eines Enzyms wird maßgeblich durch den Abstand der beiden Carboxylreste voneinander bestimmt (Abbildung 3).

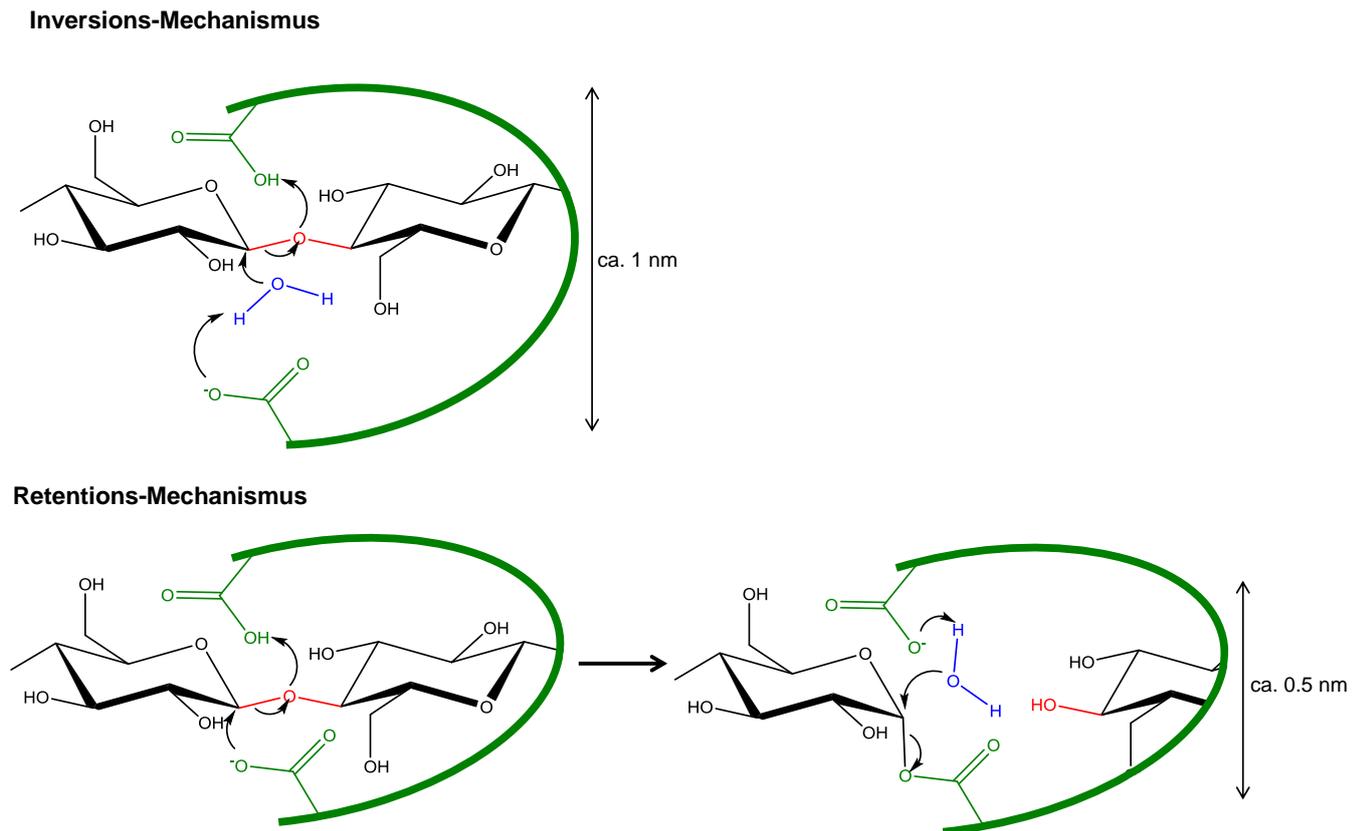


Abbildung 3: Mechanismus der Hydrolyse von glykosidischen Bindungen (**rot**) im katalytischen Zentrum von Cellulasen (**grün**). Beim Inversionsmechanismus (**oben**) wirkt ein Wassermolekül (**blau**) direkt als Nucleophil, beim Retentionsmechanismus (**unten**) folgt die Substitution durch Wasser erst nach einem Angriff durch einen Glutamat- oder Aspartat-Rest des Enzyms. Die Art des Mechanismus hängt vom Abstand der beiden katalytisch aktiven Aminosäuren voneinander ab. Nach Davies und Henrissat, 1995.

Carbohydrate binding modules

Die meisten Endo- und Exocellulasen beinhalten C- oder N-terminal von der katalytischen Domäne eine oder mehrere sog. *carbohydrate binding modules* (CBMs). Diese Domänen sind nicht an der Hydrolyse selbst beteiligt, sondern ermöglichen die gezielte Adhäsion des Enzyms an einen Bereich der Cellulose, der entsprechend der Substratspezifität des Enzyms angegriffen werden kann (Kim *et al.*, 2014). Diese Adhäsion basiert einerseits auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen

den Hydroxylgruppen der Cellulose und polaren Aminosäuren der CBM, andererseits auf hydrophoben *stacking* Wechselwirkungen zwischen dem Zuckergerüst der Cellulose und aromatischen Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin, und selten Phenylalanin) der CBM (Boraston *et al.*, 2004). Katalytische Domäne und CBMs sind durch Verbindungsregionen variabler Länge voneinander getrennt, die als flexible „Scharniere“ fungieren und die richtige Orientierung zwischen Cellulase und Cellulosesubstrat herstellen (Abbildung 4). Die wichtige Funktion dieser Domänen wird durch Studien belegt, die zeigen, dass ihre Entfernung zu einer starken Reduktion der Enzymaktivität gegenüber unlöslicher Cellulose führt (Tomme *et al.*, 1988; Bolam *et al.*, 1998; Boraston *et al.*, 2003).

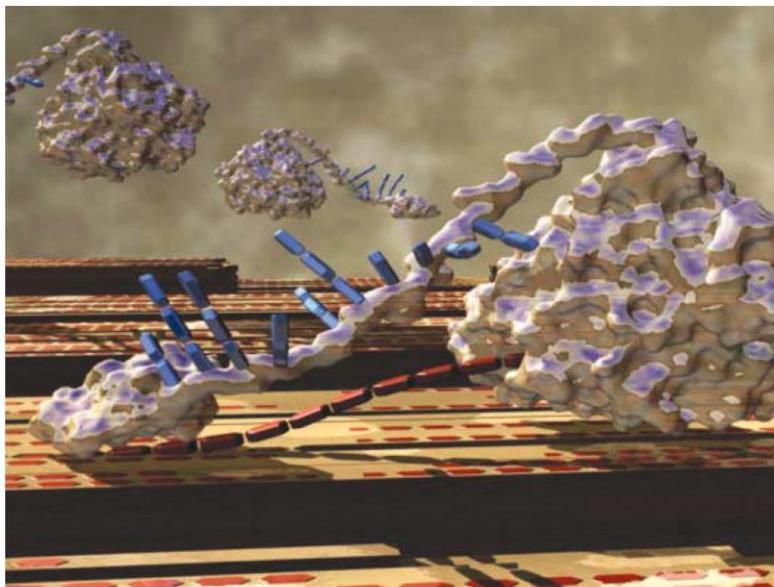


Abbildung 4: Zusammenspiel der funktionellen Einheiten von Endo- und Exocellulasen. Ein oder mehrere CBMs (**links**) erleichtern die Adhäsion der Enzyme an Cellulose. Die Verbindungsregion (**Mitte**) vermittelt die richtige Orientierung zwischen CBM und katalytischer Domäne (**rechts**). Aus Himmel *et al.*, (2007).

Synergie

Cellulasen besitzen ein hohes synergistisches Potential, d.h. ihre kombinierte hydrolytische Aktivität kann einen höheren Grad erreichen als die Summe der Aktivitäten der einzelnen Enzyme. Solche kooperativen Effekte treten sowohl zwischen Exo- und Endocellulasen (Wood und McCrae, 1979; Henrissat *et al.*, 1985), Exocellulasen untereinander (Fagerstam und Pettersson, 1980), sowie Endo- bzw. Exocellulasen und β -Glucosidasen (Lamed *et al.*, 1991) auf. Dabei kann es sich auf der einen Seite um eine sequentielle Form der Synergie handeln, d.h. die hydrolytische Aktivität des einen Enzyms erhöht auf verschiedenen Wegen indirekt (ohne Notwendigkeit von räumlicher Nähe) die Aktivität des anderen. Beispielsweise

produzieren Endocellulasen durch die Hydrolyse von Bindungen innerhalb der Cellulosestränge neue Kettenenden, die als Angriffspunkt für Exocellulasen dienen (Wood und McCrae, 1979) - diese machen durch ihre Aktivität wiederum neue Cellulosebereiche für Endocellulasen zugänglich (Nidetzky *et al.*, 1994; Kostylev und Wilson, 2012). Auf der anderen Seite kann auch eine simultane, d.h. durch direkte Wechselwirkung bestimmte Synergie zwischen Cellulasen vorliegen. Im Falle der Exocellulasen CBH I und CBH II aus dem Schimmelpilz *Trichoderma reesei* wird beispielsweise vermutet, dass ein Enzym-Enzym-Komplex entsteht, der die Adsorption der Enzyme an Cellulose erleichtert und dadurch deren katalytische Effizienz steigert (Tomme *et al.*, 1990). Eine quantitative Beschreibung solcher synergistischer Effekte fällt zum einen wegen dem Vorhandensein verschiedener Formen der Kooperativität schwer, zum anderen, weil diese von einer großen Anzahl von Parametern abhängen. Dazu gehören u.a. die experimentell nur unzureichend bestimmbare Kristallinität und der Polymerisationsgrad des eingesetzten Cellulosesubstrates, aber auch die Mengenverhältnisse und Substratspezifitäten der eingesetzten Enzyme (Woodward, 1991; Kostylev und Wilson, 2012).

Cellulosome

Im Gegensatz zu aeroben Organismen produzieren anaerobe Pilze und Bakterien ihre Cellulasen nicht in freier Form, sondern als Teil von als Cellulosomen bezeichneten Enzymkomplexen. Diese sind an die Zelloberfläche gebunden und bestehen aus einem Gerüst (*scaffoldin*), das mehrere *cohesin*-Domänen sowie eine oder mehrere CBMs beinhaltet. Cellulasen, die zu einem Cellulosom gehören, besitzen eine *dockerin* Domäne, mit der sie an die *cohesin*-Domäne des Gerüsts binden können (Bayer *et al.*, 2004). Die so erzeugte räumliche Nähe der Enzyme untereinander begünstigt die Entstehung von Synergieeffekten und ermöglicht ein optimales Mengenverhältnis der verschiedenen Cellulasetypen. Für biotechnologische Zwecke wird an der Herstellung sog. *designer*-Cellulosome gearbeitet, die aus Komponenten verschiedener Organismen zusammengesetzt sind und so in ihrer katalytischen Effizienz optimiert werden können (Stern *et al.*, 2015).

2.3.2 Oxidativer Abbau durch Oxygenasen

Reese *et al.* vermuteten bereits sehr früh, dass celluloseverwertende Mikroben neben den beschriebenen Cellulasen zusätzliche, nicht hydrolytische Enzyme zum Aufbrechen der dichten Packung des Polymers aufweisen müssen (Reese *et al.*, 1950). Tatsächlich konnte kürzlich mit CelS2 aus *Streptomyces coelicolor* eine kupferabhängige Monooxygenase identifiziert werden, die Cellulose unter Beteiligung von molekularem Sauerstoff oxidativ aufspaltet und dabei ein nicht reduzierendes Kettenende sowie eine Aldonsäure, d.h. ein am C1 oxidiertes Kettenende, produziert (Forsberg *et al.*, 2011). Strukturell ähnliche Enzyme sind in Bakterien und Pilzen weit verbreitet und scheinen daher ein gängiges Motiv in celluloseabbauenden Organismen darzustellen. Es wird vermutet, dass sie durch ihre flache Substratbindetasche kristalline Oberflächen angreifen und diese durch die Einführung eines geladenen Kettenendes (Aldonsäure) auflockern können. Das macht sie für industrielle Zwecke zu einer vielversprechenden Enzymklasse, die ergänzend zu hydrolytischen Enzymen die Zersetzung von Cellulose beschleunigen könnte (Horn *et al.*, 2012).

3 Konzepte zur Transformation von Cellulose

3.1 Grundlegender Ablauf

Ein biotechnologischer Prozess zur Konversion von Biomasse zu Biotreibstoffen oder anderen Produkten kann in vier Schritte eingeteilt werden: 1) chemische/physikalische Vorbehandlung, 2) hydrolytischer Abbau durch Enzyme, 3) Fermentation, und 4) Abtrennung des Produktes (Abbildung 5, Jäger und Büchs, 2012). Keiner dieser vier Schritte kann ohne die Einbeziehung der jeweils anderen konzipiert werden. Beispielsweise bestimmt die Wahl des Ausgangsmaterials und der Vorbehandlungsmethode über die Entstehung von inhibierenden oder toxischen Verbindungen, die negativen Einfluss sowohl auf den hydrolytischen Abbau als auch auf die anschließende Fermentation nehmen können (Palmqvist und Hahn-Hagerdal, 2000). Dieser Einfluss hängt wiederum davon ab, ob ganze Mikroben oder freie Enzyme für die Hydrolyse genutzt werden, und welcher Organismus für die Fermentation eingesetzt wird. Letzterer muss dabei so gewählt bzw. modifiziert werden, dass er die Produkte der Hydrolyse als Nährstoff nutzen kann. Gleichzeitig

darf das Fermentationsprodukt auch in hohen Konzentrationen keine toxische Wirkung auf den Organismus ausüben (Merino und Cherry, 2007).

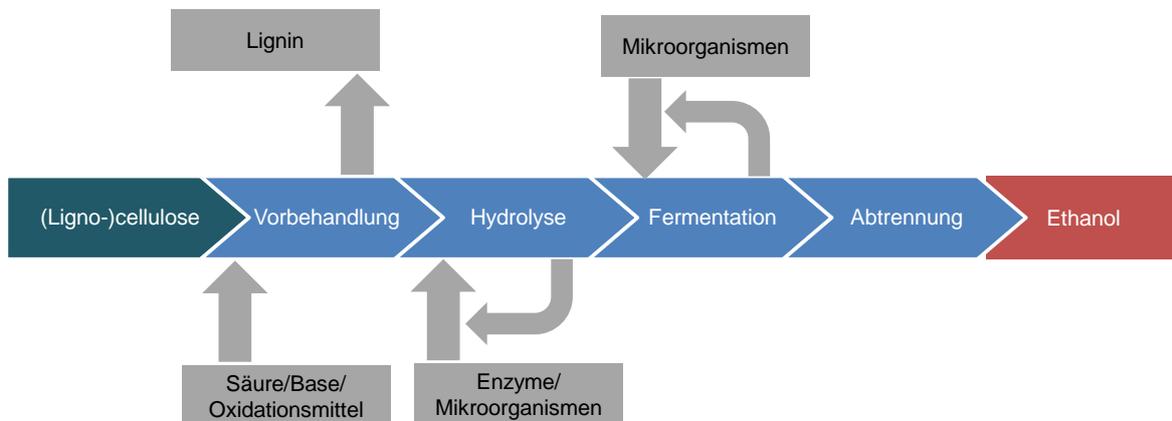


Abbildung 5: Vereinfachtes Schema eines Prozesses zur Transformation von Lignocellulose zu Ethanol. Modifiziert nach Jäger und Büchs (2012).

Es ist unmittelbar einsichtig, dass die Anzahl der einzubeziehenden Variablen maßgeblich durch die Komplexität des Ausgangsmaterials bestimmt wird. Wie vorher erläutert, liegt Cellulose in den meisten nutzbaren Formen von Biomasse nicht rein, sondern mit Lignin und Hemicellulose assoziiert vor. Der Abbau von Hemicellulose gilt aufgrund seiner amorphen Struktur als vergleichsweise unkompliziert – das daraus entstehende Gemisch aus Pentosen und Hexosen erfordert jedoch ein breites Substratspektrum des Fermentationsorganismus (Horn *et al.*, 2012). Für den enzymatischen Abbau von Lignin ist bislang noch kein kommerziell realisierbares Szenario abzusehen. Eine vollständig biokatalytische Verwertung von Lignocellulose stellt dementsprechend eine sehr umfangreiche Herausforderung dar. Die folgenden Ausführungen und die beschriebenen experimentellen Arbeiten beschränken sich daher auf die Nutzung von reiner Cellulose als Ausgangsmaterial. Das stellt keine bloße Vereinfachung des Sachverhaltes dar, sondern bietet durchaus anwendungsorientierte Perspektiven: Zum einen sind Verfahren denkbar, die Lignocellulose teilweise biokatalytisch und teilweise auf anderem Wege, beispielsweise durch thermische Energiegewinnung, verwerten (Demirbas, 2008). Zum anderen stehen prinzipiell auch Ausgangsmaterialien zur Verfügung, die einen sehr hohen Cellulosegehalt aufweisen, wie zum Beispiel Papierabfälle (Gomes *et al.*, 2015). Die Reduktion der Problemstellung auf reine Cellulose bietet die Vorteile, dass 1) nur drei Enzymklassen für die Hydrolyse gebraucht werden, 2) störende

Nebenprodukte der Hydrolyse nicht einbezogen werden müssen und 3) ausschließlich Glukose als Produkt der Hydrolyse auftritt.

3.2 Prozessführung

Das primäre Ziel bei der Konzeption eines Prozesses zur Transformation von Cellulose zu Ethanol liegt auf der Hand: Die Hydrolyse soll eine maximale Ausbeute an monomeren Zuckern, und die anschließende Fermentation daraus eine maximale Menge an Ethanol erzielen – dabei gilt es, die Investitions-, Betriebs- und Rohstoff-Kosten so niedrig wie möglich zu halten, um ein größtmögliches Verhältnis zwischen Ertrag und Aufwand zu erzeugen.

3.2.1 Produktion der Cellulasen

Aufgrund der Variabilität der zugrundgelegten Datenlage und Berechnungsmodelle sowie durch den starken Einfluss marktwirtschaftlicher Faktoren fällt eine genaue Bezifferung zwar schwer (Galbe *et al.*, 2007; Merino und Cherry, 2007; Gnansounou und Dauriat, 2010), jedoch ist allgemein akzeptiert, dass die Produktion der Cellulasen einen Großteil der Kosten bei der Transformation von Cellulose ausmacht (Mathew *et al.*, 2008). Klein-Marcuschamer *et al.* (2012) kalkulierten Enzymkosten zwischen 0,18 \$ und 0,39 \$ pro Liter produziertem Ethanol. Nach Angaben des *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) wird Bioethanol der zweiten Generation erst bei Produktionskosten von unter 0,35 \$/L wettbewerbsfähig gegenüber Bioethanol der ersten Generation (Phillips, 2007), so dass selbst im Optimalfall mehr als die Hälfte der angestrebten Produktionskosten auf die Herstellung der Enzyme zu veranschlagen wären. Dieser Schritt stellt daher den kritischen Kostenfaktor im Gesamtprozess dar und muss entsprechend als primäres Rationalisierungsziel angesehen werden.

Abgesehen von ihrer essentiellen Bedeutung für die Produktion von Biotreibstoffen der zweiten Generation sind Cellulasen auch wichtiger Bestandteil anderer industrieller Prozesse, u.a. im Bereich der Detergentien-, Nahrungsmittel-, Textil-, Zellstoff- und Papier-Industrie (Kuhad *et al.*, 2011). Mit 20% Anteil am globalen Enzym-Markt (Mathew *et al.*, 2008) besteht dementsprechend bereits eine große Produktionsbasis. Hierbei stellen Schimmelpilze der Spezies *Aspergillus* und *Trichoderma* den derzeitigen Industriestandard für die Expression von Cellulasen

dar. Darunter gilt *Trichoderma reesei* als der potenteste Cellulaseproduzent (Singhania *et al.*, 2010). Dieser von Reese *et al.* während des zweiten Weltkriegs aufgrund der Zersetzung von Baumwollmaterialien untersuchte Organismus (Reese, 1976) sekretiert eine Enzym-Mischung, die zu ca. 80% aus Exocellulasen, 15% aus Endocellulasen, 0,5% aus β -Glucosidasen sowie kleineren Anteilen anderer hydrolytischer Enzyme besteht. Die Sekretionsrate des ursprünglichen Stammes konnte mittlerweile durch ungerichtete Mutagenese um das 15- bis 20-fache gesteigert werden und liegt bei ca. 20 g Enzyme pro Liter (Peterson und Nevalainen, 2012). Diese Menge bzw. die hydrolytische Aktivität dieser Enzyme wird trotzdem als noch nicht ausreichend betrachtet, um Biomasse in den notwendigen Größenordnungen wirtschaftlich zu zersetzen (Chandel *et al.*, 2012; Garvey *et al.*, 2013). Neben einer zu niedrigen Sekretionsleistung liegt ein weiteres Problem in dem Mengenverhältnis der von *T. reesei* exprimierten Enzyme: Der Gehalt an β -Glucosidasen ist so niedrig, dass bei der Hydrolyse Cellobiose akkumuliert, die produktinhibierend auf die vorhandenen Exocellulasen wirkt. Um dieses Problem zu umgehen, werden die Enzym-Mischungen gegenwärtig - mit entsprechend verbundenem Mehraufwand - durch β -Glucosidasen aus dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* ergänzt. Aus diesem Grund wird intensiv an der rekombinanten Expression von Cellulasen gearbeitet, darauf abzielend, 1) höhere Enzymausbeuten zu generieren, 2) Kontrolle über das Verhältnis der produzierten Enzyme sowie 3) Zugriff auf Enzyme mit höherer katalytischer Effizienz zu erhalten. Neben Pilzen wie *T. reesei* und *A. niger* kommen dafür prinzipiell auch Bakterien, Hefen und Pflanzen in Frage:

Die Nutzung von Pflanzen für die rekombinante Produktion von Cellulasen bietet zum einen den Vorteil einer technisch anspruchslosen und industriell leicht realisierbaren Kultivierung, zum anderen eröffnet sich die Möglichkeit, die Pflanze zugleich als Quelle der zu zersetzenden Biomasse zu nutzen. Für diese sog. Autohydrolyse werden Cellulasen aus thermophilen Bakterien exprimiert, die erst bei erhöhten Temperaturen hydrolytisch aktiv werden. So kann die Pflanze bei normalen Temperaturen kultiviert und nach der Ernte bei erhöhten Temperaturen durch die bereits im Pflanzenmaterial enthaltenen Cellulasen zersetzt werden. Bei dieser konzeptionell sehr eleganten Strategie besteht die Herausforderung darin, die Pflanze eine ausreichende Menge an Cellulasen exprimieren zu lassen, um nach der Ernte ihre vollständige Zersetzung zu gewährleisten, gleichzeitig aber keine Störung

des Wachstums durch zu starke Überexpression der rekombinanten Proteine zu verursachen (Taylor *et al.*, 2008). Entsprechende Studien wurden bereits mit Tabak (Verma *et al.*, 2010; Petersen und Bock, 2011), Pappel (Jung *et al.*, 2013), Reis (Chou *et al.*, 2011) und Zuckerrohr (Harrison *et al.*, 2011) durchgeführt.

Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* und *Pichia pastoris* produzieren natürlicherweise keine Cellulasen, bieten sich für deren rekombinante Herstellung aber an, da sie mikrobiologisch sehr gut untersucht sind und bereits ein breiter Erfahrungsschatz hinsichtlich ihrer biotechnologischen Nutzung besteht. Dementsprechend stehen viele genetisch modifizierte Stämme mit vorteilhaften Eigenschaften zur Verfügung, z.B. Toleranz gegenüber Hitze, erhöhte Sekretion oder erhöhte Ethanolproduktion. Weiterhin sind Hefen befähigt, Proteine zu glykosylieren, so dass in ihnen auch Enzyme aus Pilzen, deren Funktionalität häufig von einer korrekten Glykosylierung abhängt, exprimiert werden können. Diese Fähigkeit kann allerdings auch negative Auswirkungen haben, wenn eine Hyperglykosylierung stattfindet (Jeoh *et al.*, 2008).

Das Darmbakterium *Escherichia coli* ist die mit Abstand am intensivsten genutzte Spezies für die Expression rekombinanter Cellulasen. Die einfache Handhabung, genetische Modifizierbarkeit sowie das schnelle Wachstum haben den Organismus zum beliebten Wirt sowohl für industrielle Proteinproduktionen als auch für Forschungszweck gemacht. Bei letzterer Anwendung wird *E. coli* insbesondere für die kinetische Charakterisierung bislang unbekannter Cellulasen, für mechanistische Studien sowie für die Untersuchung einzelner Cellulasedomänen genutzt. Während die Überexpression von Proteinen in *E. coli* in vielen Fällen gut möglich ist, besitzt das Bakterium nur begrenzte Sekretionskapazitäten. Eine intrazelluläre Expression erfordert einen anschließenden Zellaufschluss. Dieser ist im Labormaßstab ohne weiteres durchführbar, bedeutet in industriellen Anlagen allerdings einen signifikanten Mehraufwand, den es wenn möglich zu vermeiden gilt. Das Gram-positive Bodenbakterium *Bacillus subtilis* ist *E. coli* in dieser Hinsicht überlegen und wird daher ebenfalls als potentieller Wirtsorganismus untersucht. Wie bei Hefen kann auch bei Nutzung dieser beiden Organismen von einem breiten Erfahrungsschatz hinsichtlich genetischer Modifikation, Stammoptimierungen, industrieller Nutzung etc. profitiert werden (Garvey *et al.*, 2013). Als Alternative zur intrazellulären Expression

oder Sekretion bietet sich für Hefen und Bakterien auch die Oberflächenpräsentation der rekombinanten Cellulasen an (Abschnitt II.5).

3.2.2 Prozessintegration

Kapital- und operativer Aufwand von biotechnologischen Produktionsanlagen, insbesondere solcher für fermentative Verfahren, sind im Allgemeinen aufgrund hoher Anforderungen bzgl. der Prozesskontrolle, Sauerstoffzufuhr, Durchmischung, Sterilität etc. sehr hoch. Die Steigerung des Integrationsgrades, d.h. die Reduzierung der notwendigen Produktionsanlagen durch Vereinigung mehrerer Prozessschritte, birgt daher ein großes Einsparpotential (Kiss *et al.*, 2015). Bei der beschriebenen Transformation von Cellulose zu Ethanol kann eine solche Integration für die drei wesentlichen Schritte Enzymproduktion, Hydrolyse sowie Fermentation in Betracht gezogen werden. Die getrennte Durchführung dieser Schritte (*separated hydrolysis and fermentation*, SHF) bietet den Vorteil, dass die für die Cellulasen und den fermentativen Organismus jeweils optimalen Temperaturen unabhängig voneinander eingestellt werden können. Dadurch können auch Enzyme aus thermophilen Organismen genutzt werden, deren Einsatz Temperaturen erfordert, die den Fermentationsorganismus schädigen würden. Die bei der Hydrolyse akkumulierende Glukose bedingt jedoch eine Produktinhibition der Cellulasen, so dass die erreichbaren Glukosekonzentrationen im Reaktionsmedium beim SHF-Ansatz begrenzt sind. Bei der gleichzeitigen Durchführung von Hydrolyse und Fermentation (*simultaneous saccharification and fermentation*, SSF) wird dieses Problem umgangen, da die entstehende Glukose direkt vom Fermentationsbakterium verstoffwechselt wird und entsprechend keine inhibierenden Konzentrationen erreicht. Schätzungen zur Folge können mit der Reduktion der Produktionsanlagen durch SSF im Vergleich zu SHF Investitionskosten von mehr als 20% eingespart werden (Olofsson *et al.*, 2008). SSF erfordert allerdings die genaue Abstimmung der einzelnen Reaktionsschritte aufeinander, u.a. hinsichtlich Temperatur, pH-Wert und Reaktionszeit, und erzwingt in dieser Hinsicht ggf. das Eingehen von Kompromissen.

Die Prozessintegration kann noch weiter gesteigert werden, indem die Cellulasen nicht getrennt, sondern im Zuge des Hydrolyse- und Fermentationsschritts produziert werden (*consolidated bioprocessing*, CBP), d.h. der Cellulaseproduzent fungiert gleichzeitig als Fermentationsorganismus, so dass ein weiterer Prozess-Schritt

anlagentechnisch eingespart werden kann. Es ist allerdings keine Spezies bekannt, die beide Aufgaben natürlicherweise mit ausreichender Effizienz ausführen kann. Entweder muss also ein natürlich cellulolytischer Organismus zu einem guten Ethanolproduzenten gemacht werden (sog. *native*-Strategie) oder in einem natürlichen Ethanolproduzenten müssen Cellulasen exprimiert werden (sog. *recombinant*-Strategie). Bei der *native*-Strategie kann entweder nach Mutanten gesucht werden, deren Stoffwechsel höhere Ethanolausbeuten aufweisen, so beispielsweise mit *Aspergillus* und *Rhizopus* – Stämmen durchgeführt (Skory *et al.*, 1997), oder es können Pyruvatdecarboxylase und Alkoholdehydrogenase exprimiert werden, um dem Wirtsorganismus den klassischen Gärungsstoffwechsel zu ermöglichen – so z.B. mit *Chlostridium cellulolyticum* als Wirt gezeigt (Guedon *et al.*, 2002). Der größte Teil der bisherigen Forschung an CBP-Organismen beschränkt sich jedoch auf die *recombinant*-Strategie. Der dafür mit Abstand am häufigsten genutzte Wirt ist *S. cerevisiae* (Fujita *et al.*, 2004; Den Haan *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2011; Nakatani *et al.*, 2013), gefolgt von *E. coli* (Ryu und Karim, 2011). Es wurden aber auch bereits Arbeiten zur Etablierung der ethanologischen Bakterien *Zymomonas mobilis* und *Zymobacter palmae* als CBP-Organismen durchgeführt (Abschnitt II.4). Wie für SSF beschrieben, liegt die Schwierigkeit bei CBP umso mehr darin, Cellulaseproduktion, Hydrolyse und Fermentation aufeinander abzustimmen, und für jeden einzelnen Prozess eine ausreichende Effizienz zu erreichen.

4 Ethanogene Bakterien

4.1 *Zymomonas mobilis*

Anfang des 20. Jahrhunderts untersuchten Barker und Hillier (1912) den Ursprung der *cider sickness*, mit der sich Hersteller von Apfelschaumwein (engl. *cider*) konfrontiert sahen. Diese „Krankheit“ machte sich zuerst durch eine Reduzierung der Süße und einer Veränderung des Aromas des Weins, und im weiteren Verlauf durch starke Trübung und Gasentwicklung bis hin zum Platzen der verschlossenen Flaschen bemerkbar. Barker und Hillier konnten ein Bakterium isolieren und durch Reinfektion von sterilem Apfelschaumwein als Auslöser für die *cider sickness* ausmachen. Da die Autoren der Spezies allerdings keinen systematischen Namen gaben, wird ihre Entdeckung Paul Lindner zugeschrieben, der Anfang der 20er Jahre in Mexico die traditionelle Fermentation des Saftes der *Agave tequilana* zu dem

alkoholischen Getränk *Pulque* untersuchte, und ein Bakterium daraus isolierte, das Saccharose, Fruktose und Glukose zu Ethanol, CO₂ und wenig Milchsäure umsetzte (Kluyver und Hoppenbrouwers, 1931). Er nannte es *Thermobacterium mobile*. Die heute als *Zymomonas mobilis* bezeichnete Spezies wurde in der Folgezeit auch in Europa in verdorbenem Bier und in tropischen Ländern als Teil der Mikroflora von Palmwein identifiziert (Swings und De Ley, 1977).

Phylogenetisch wird *Z. mobilis* der Familie der *Sphingomonadaceae* aus der Klasse der *Alphaproteobacteria* zugeordnet. Die fakultativ anaeroben Stäbchenbakterien sind Gram-negativ, 4 bis 5 µm lang und 1 bis 2 µm breit, teilweise polar begeißelt, und wachsen bei Temperaturen von 25 bis 30 °C und pH-Werten von 3,5 bis 7,5. Bemerkenswert und für biotechnologische Anwendungen sehr interessant ist, dass der Stoffwechsel dieses Organismus als Endprodukt fast ausschließlich Ethanol in sehr hohen Ausbeuten liefert. Das geschieht über den Entner-Doudoroff-Weg, bei dem Glukose nach ihrer Phosphorylierung nicht wie bei der Glykolyse zu Fructose-6-phosphat isomerisiert wird, sondern zum Lacton oxidiert, zu 6-Phosphogluconat hydrolysiert und anschließend zu der für den Entner-Doudoroff-Weg charakteristischen Verbindung 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDPG) umgesetzt wird. KDPG wird zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat gespalten, wobei letztere Verbindung dem gleichen katabolischen Weg zugeführt wird wie bei der Glykolyse (Abbildung 6). Pyruvat wird dann zu Acetaldehyd decarboxyliert und zu Ethanol reduziert. Da dieser Stoffwechselweg im Vergleich zur Glykolyse weniger ATP erzeugt, ist er für ein anaerobes Bakterium äußerst ungewöhnlich und wird vorwiegend durch aerobe Organismen genutzt (Kerstens und De Ley, 1968; Swings und De Ley, 1977).

Z. mobilis hat eine höhere Zuckeraufnahmerate und produziert deutlich mehr Ethanol als Hefespezies, die momentan für industrielle Fermentationen genutzt werden. Dazu kommt, dass der Organismus als Prokaryot naturgemäß eine höhere Wachstumsrate besitzt und als Anaerobier ohne die Zugabe von Sauerstoff kultiviert werden kann, so dass er für die Ethanolproduktion als eine vielversprechende Alternative zu Hefen angesehen wird (Rogers *et al.*, 1979; Panesar *et al.*, 2006; He *et al.*, 2014). Das hat seit den frühen 80er Jahren intensive Bemühungen zur industriellen Nutzbarmachung dieses Bakteriums angeregt, die von der Entwicklung von Techniken zur genetischen Modifizierung (Skotnicki *et al.*, 1980; Dally *et al.*, 1982;

Drainas *et al.*, 1983) über die Ergänzung von Stoffwechselwegen zur Erweiterung der verwertbaren Zucker (Zhang *et al.*, 1995; Deanda *et al.*, 1996) bis zu Studien zur Fermentierung von hydrolysiertes Lignocellulose durch rekombinante Stämme (Lawford *et al.*, 2001; Lawford und Rousseau, 2003; Mohagheghi *et al.*, 2004) reichen. Die mittlerweile vollständig vorliegende Sequenz des Genoms von *Z. mobilis* (Seo *et al.*, 2005) eröffnet weitere Möglichkeiten zur gezielten Modifizierung des Organismus. Neben der Produktion von Ethanol wird auch in Betracht gezogen, den ungewöhnlichen Stoffwechsel von *Z. mobilis* rekombinant zu ergänzen und u.a. für die Herstellung der wichtigen Plattformchemikalie Sorbitol (Chun und Rogers, 1988) zu nutzen.

4.2 *Zymobacter palmae*

1993 isolierten Okamoto *et al.* (1993) aus Palmsaft in Japan ein Bakterium mit der Fähigkeit, Ethanol in hohen Mengen zu produzieren, das in Anlehnung an *Z. mobilis* *Zymobacter palmae* genannt wurde. Phylogenetisch gehört diese Spezies allerdings zu der Familie der *Halomonadaceae* in der Klasse der *Gammaproteobacteria* und ist damit, anders als der Name suggeriert, nur entfernt mit *Z. mobilis* verwandt. Das Bakterium bildet Gram-negative, stäbchenförmige, peritrich begeißelte Zellen mit einer Breite von 0,7 bis 0,9 μm und einer Länge von 1,3 bis 2,4 μm . Das Wachstum erfolgt, ähnlich wie bei *Z. mobilis*, fakultativ anaerob, bei Temperaturen zwischen 21 und 39 °C und pH-Werten zwischen 3 und 10. *Z. palmae* kann ein breites Spektrum an Hexosen, α -verknüpften Di- und Tri-Sacchariden und Zuckeralkoholen als Kohlenstoffquelle nutzen (Okamoto *et al.*, 1993) und ist *Z. mobilis* in dieser Hinsicht als Fermentationsbakterium überlegen. Dagegen scheint die Toleranz gegenüber Glukose- und Ethanol-Konzentrationen im Medium mit max. 15% bzw. 5% (Okamoto *et al.*, 1993) niedriger zu sein als bei *Z. mobilis* (40% bzw. 10%, Swings und DeLey, 1977). Die Ethanolproduktivität von *Z. palmae* ist mit ca. 2 mol pro mol Glukose mit der von *Z. mobilis* vergleichbar (Okamoto *et al.*, 1993).

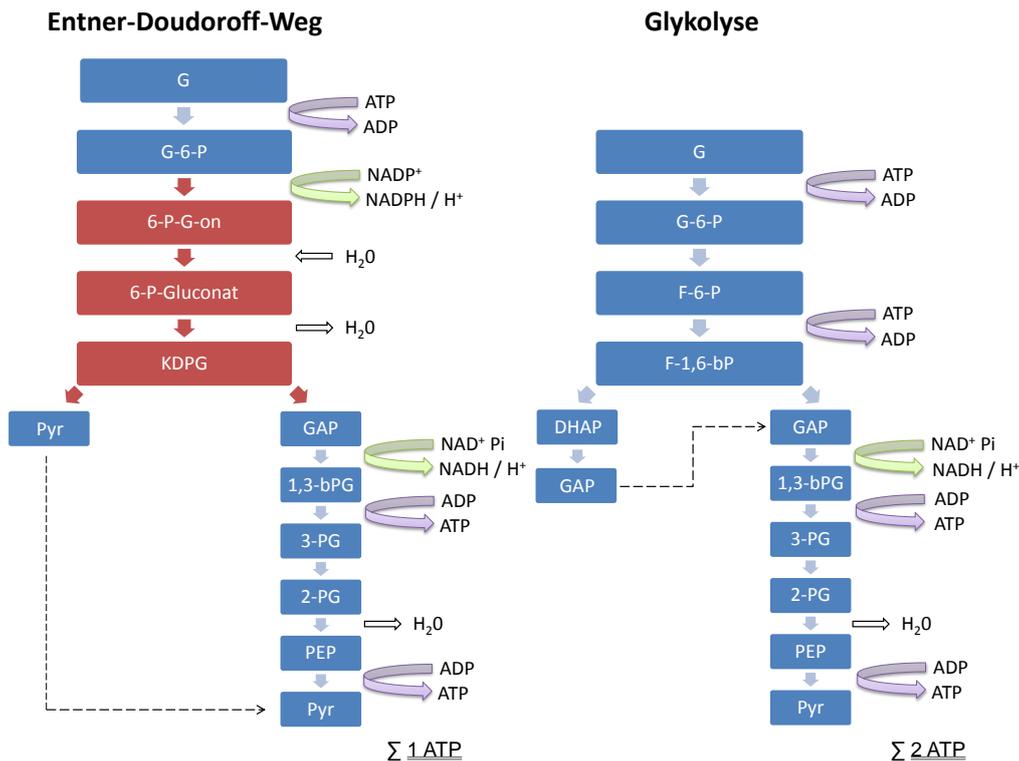


Abbildung 6: Vergleich des Entner-Doudoroff-Wegs mit der Glykolyse. Metabolite und enzymatische Umsetzungen, die sich von der Glykolyse unterscheiden, sind rot eingefärbt. **G** Glukose; **G-6-P** Glukose-6-Phosphat; **6-P-G-on** 6-Phospho-Glukose- δ -Lacton; **KDPG** 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat; **F-6-P** Fructose 6-Phosphat; **F-1,6-bP** 1,6-Biphosphofruktose; **Pyr** Pyruvat; **GAP** Glycerinaldehyd-3-phosphat; **DHAP** Dihydroxyacetonphosphat; **1,3-bPG** 1,3-Biphosphoglycerat; **3-PG** 3-Phosphoglycerat; **2-PG** 2-Phosphoglycerat; **PEP** Phosphoenolpyruvat. Modifiziert nach Sprenger (1996).

5 Oberflächenpräsentation mit Autodisplay

Oberflächenpräsentation, -expression oder *surface display* bezeichnet eine Expressionstechnik, bei der das Zielprotein mit einem geeigneten Transportprotein fusioniert wird, das die Übermittlung und Verankerung des Zielproteins an die Zelloberfläche des Wirtsorganismus vermittelt. Solche Transportproteine entstammen Membrankomponenten, deren natürliche Funktionen sehr vielfältig sein können, z.B. Zell-Zell-Kommunikation, Adhäsion, Porenbildung oder Virulenz, und sich dementsprechend stark in ihrer Struktur und ihrem Mechanismus der Oberflächenpräsentation unterscheiden. Eine Vielzahl solcher Transportproteine sind für *surface display* auf Sporen, Hefen, Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien bekannt. Für letztere wird sehr häufig der Typ Vc bzw. klassische Autotransporter (AT) - Sekretionsweg genutzt, eine Technik, die entsprechend als Autodisplay bezeichnet wird (Maurer *et al.*, 1997).

5.1 Mechanistische Aspekte

AT-Proteine bestehen aus vier Domänen: Einem N-terminalen Signalpeptid, das den Transport des Proteins durch die innere Zellmembran in das Periplasma der Zellen einleitet, dem sog. Passagier, d.h. dem Protein, das oberflächenpräsentiert werden soll, sowie einer C-terminalen Transport-Einheit, die aus Verbindungsregion und β -Fass-Domäne besteht. Letztere beide Domänen dienen der Fixierung des Proteins an der äußeren Membran und der Präsentation des Passagiers auf der Zelloberfläche. Dabei faltet sich die β -Fass-Domäne in einer porinähnlichen Form in die äußere Membran. Die Verbindungsregion „fädelt“ sich anschließend durch Ausbildung einer Haarnadelstruktur zusammen mit dem Passagier durch die entstandene Pore und sorgt für einen ausreichenden Abstand zwischen β -Fass und Passagier, so dass dieser seine aktive Konformation auf der Zelloberfläche einnehmen kann (Abbildung 7).

Das erste identifizierte und als solches bezeichnete AT-Protein, IgA-Protease, stammt aus *Neisseria gonorrhoeae*. Die in den 80er Jahren beschriebene Protease (Halter *et al.*, 1984; Meyer *et al.*, 1987; Pohlner *et al.*, 1987) diente als Grundlage für die Vermutung, dass es sich bei dem Transport und der Faltung dieses Proteins nicht um einen Spezialfall, sondern vielmehr um einen allgemeinen Mechanismus handelt, der sich signifikant von den bis dahin bekannten Sekretionstypen unterscheidet. Der Begriff *Autotransporter* wurde dabei im Rahmen der ursprünglichen Hypothese (Jose *et al.*, 1995) geprägt, nach der das Protein alle notwendigen Funktionalitäten enthält, um ohne Einfluss weiterer zellulärer Faktoren ein korrekt gefaltetes β -Fass in der äußeren Membran des Wirtes zu bilden und den Passagier zur Zelloberfläche zu transportieren. Diese Vorstellung gilt mittlerweile als überholt, da zahlreiche Studien auf eine Wechselwirkung des AT-Proteins mit periplasmatischen Chaperonen sowie mit einer Reihe von Außenmembranproteinen, die zusammen als *β -barrel assembly machinery* (BAM) bezeichnet werden, hinweisen. Dementsprechend wird neben dem beschriebenen, ursprünglichen „Haarnadelmodell“ auch das „BAM-Modell“ diskutiert (Knowles *et al.*, 2009), bei dem bislang allerdings unklar ist, in welcher Art und Weise der BAM-Komplex mit AT-Proteinen wechselwirkt. Es wurde vermutet, dass eine Komponente des Komplexes, BamA, eine Pore formt, durch die sich zuerst der Passagier hindurchfädelt und das β -Fass im Anschluss in die Außenmembran integriert wird. Da einzelne Aspekte aus beiden Modellen experimentell bestätigt

werden konnten, ist auch eine Kombination aus „Haarnadel-„ und „BAM-Modell“ denkbar, bei dem BamA das β -Fass in einer unvollständig gefalteten Form hält, durch die der Passagier sich mithilfe der haarnadelförmigen Verbindungsregion bewegt, und BamA sich im Anschluss vom AT-Protein löst (Leyton *et al.*, 2012). Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass eine Gruppe hochkonservierter Sequenzmotive innerhalb des β -Fasses dessen korrekt gefaltete Form stabilisieren, und dass diese Faltung auch in künstlichen Mizellen unter Ausschluss jeglicher zellulärer Faktoren stattfindet (Leyton *et al.*, 2014). Auch wenn die Sekretion *in vivo* durch die Zellmaschinerie unterstützt wird, scheint der Begriff des *Autotransporters* daher zumindest *in vitro* im Sinne eines selbstgenügsamen Systems weiterhin angemessen zu sein.

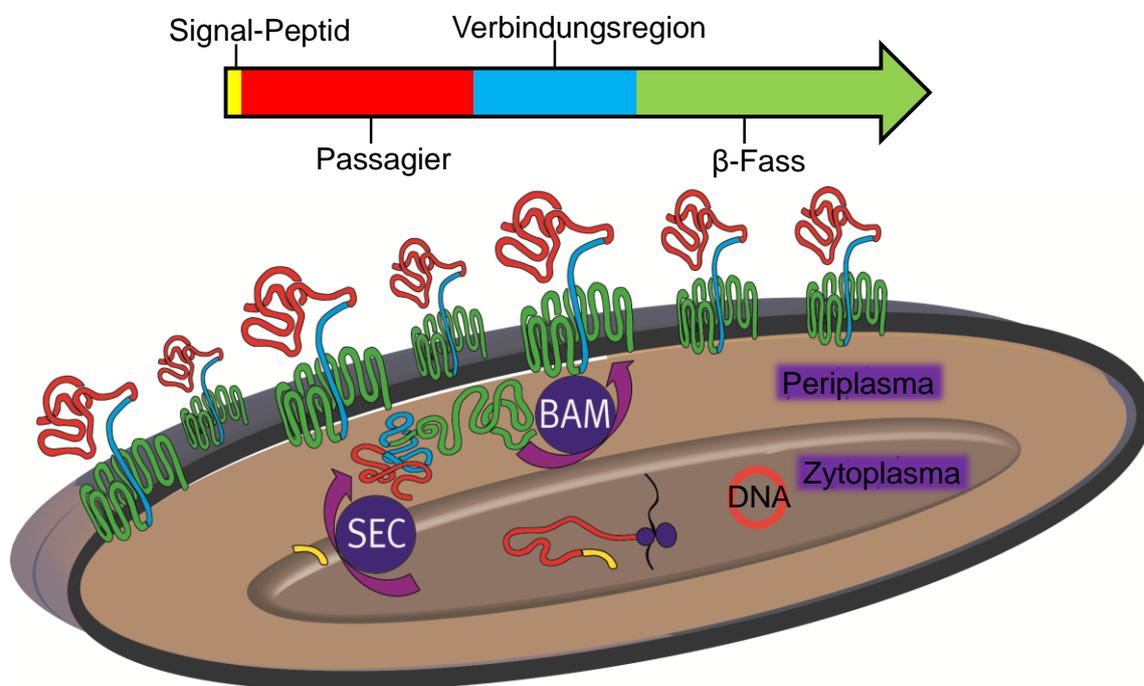


Abbildung 7: Der AT-Sekretionsmechanismus. Schematische Domänenstruktur eines AT-Proteins (**oben**) und vereinfachtes Modell der Sekretion (**unten**). Das im Cytoplasma der Bakterienzelle gebildete AT-Protein wird durch das Signalpeptid (**gelb**) von der Sec-Maschinerie (**SEC**) erkannt und in das Periplasma der Zelle transportiert. Von dort aus faltet sich die β -Fass-Domäne (**grün**) unter Beteiligung des Bam-Komplexes (**BAM**) in die äußere Membran und die Verbindungsregion (**blau**) durchtritt die entstandene Pore, um den Passagier (**rot**) auf der Zelloberfläche zu präsentieren.

5.2 Biotechnologische Anwendungen

Unabhängig von diesen mechanistischen Unklarheiten wurde Autodisplay bereits intensiv in verschiedenen biotechnologischen Bereichen genutzt, darunter Biokatalyse (Jose *et al.*, 2012), Hochdurchsatztestungen von Enzymlibliotheken

(Becker *et al.*, 2004), Antikörper- und *Affibody*-Entwicklung (Salema *et al.*, 2013; Fleetwood *et al.*, 2014; Jong *et al.*, 2014) und Bioadsorption (Valls *et al.*, 2000b). Dazu wird in den meisten Fällen die Passagierdomäne eines natürlichen AT-Proteins durch das rekombinante Protein ersetzt, das oberflächenpräsentiert werden soll. Eine Ausnahme bildet hierbei der EstA-AT, der inklusive seiner natürlichen Passagierdomäne als Transporteinheit genutzt wurde (Becker *et al.*, 2004; Becker *et al.*, 2005). Für biokatalytische Zwecke konnte Autodisplay bereits erfolgreich für die Oberflächenpräsentation industriell wichtiger Enzyme angewendet werden, darunter u.a. verschiedene Esterasen (Schultheiss *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2008), Lipasen (Yang *et al.*, 2010; Kranen *et al.*, 2014), Nitrilasen (Detzel *et al.*, 2011; Detzel *et al.*, 2013), Cytochrom P450-Enzyme (Schumacher *et al.*, 2012; Schumacher und Jose, 2012; Quehl *et al.*, 2016) und eine β -Glucosidase (Munoz-Gutierrez *et al.*, 2012). Dabei wurde fast ausschließlich das Darmbakterium *E. coli* als Wirt genutzt. Das sehr gut untersuchte und einfach zu handhabende Bakterium ist für Forschungszwecke und Laborroutinen sehr gut geeignet, besitzt aber hinsichtlich industrieller Anwendungen einige Schwächen: Für das Erreichen hoher Zelldichten muss beispielsweise ein sehr hoher Sauerstoffeintrag in die Kultur stattfinden, und als Enterobakterium reagiert *E. coli* auf pH- und Temperaturschwankungen naturgemäß empfindlich. Es stellt sich daher die Frage, ob Bakterien, die anderen Habitaten entstammen, besser an die Bedingungen industrieller Kultivierung adaptiert sind. Hier bietet sich Autodisplay als Technik zur Oberflächenpräsentation besonders an, da durch Sequenzvergleiche bereits über 1500 AT-Proteine in einer großen Bandbreite Gram-negativer Bakterien identifiziert werden konnten, was die Vermutung nahelegt, dass dieser Sekretionstyp ubiquitär vorhanden ist (Celik *et al.*, 2012). So konnten die Bodenbakterien *Pseudomonas putida* und *Ralstonia eutropha* bereits für Autodisplay von metallkomplexierenden Proteinen genutzt werden, um sie für die Adsorption von Schwermetallen einzusetzen (Valls *et al.*, 2000a; Biondo *et al.*, 2012).

5.3 AIDA-I und MATE

Für Autodisplay wurden bereits zahlreiche AT-Proteine aus verschiedenen Spezies erfolgreich angewendet. Das bislang mit Abstand am intensivsten untersuchte AT-Protein stellt dabei das 1989 identifizierte *adhesin involved in diffuse adherence* (AIDA-I) aus enteropathogenem *E. coli* dar (Benz und Schmidt, 1989). Arbeiten mit

AIDA-I führten zu wichtigen Erkenntnissen zur Funktion und Struktur dieses Proteintypus (Benz und Schmidt, 1990; Benz und Schmidt, 1992; Konieczny *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2005; Gawarzewski *et al.*, 2014). Maurer *et al.* (1997) verwendeten für die Verwendung der AIDA-I Transporteinheit zum ersten Mal den Begriff Autodisplay. Seither wurde die Transporteinheit dieses Proteins für die Oberflächenpräsentation einer großen Anzahl verschiedener Proteine und Enzyme genutzt (Jose und Meyer, 2007).

Für eine optimierte Expression und Oberflächenpräsentation wurden in der Arbeitsgruppe Jose kürzlich die *maximized autotransporter mediated expression* (MATE) - Plasmide entwickelt (Sichwart *et al.*, 2015). MATE-Plasmide kodieren für AT-Fusionsproteine, die auf dem EhaA AT-Protein aus enterohämorrhagischem *E. coli* basieren (Wells *et al.*, 2008). Während AIDA-I zu der Gruppe der *long type* AT-Proteine (Gruppe 13) gezählt wird, ist EhaA der Gruppe der IcsA/VirG AT-Proteine (Gruppe 12) zugeordnet. In einer großen Bandbreite Gram-negativer Bakterien konnten AT-Proteine ausgemacht werden, die starke Homologien zu EhaA aufweisen, so dass dieses AT-Protein möglicherweise eine hohe Kompatibilität zu alternativen Wirtsorganismen aufweist. Die für die rekombinanten AT-Proteine kodierenden Nukleotidsequenzen der MATE-Plasmide zeichnen sich durch eine modifizierte Kodonzusammensetzung aus, die eine optimierte Expression in *E. coli* ermöglicht. Der für das CtxB Signalpeptid aus *Vibrio cholerae* kodierende Sequenzabschnitt ist darüberhinaus zur Unterbindung von Sekundärstrukturen in seiner Kodonzusammensetzung modifiziert. Die Sequenz beinhaltet verschiedene Restriktionsschnittstellen für einen einfachen Austausch der für die Passagierdomäne kodierenden Sequenz. Weiterhin kodieren die Nukleotidsequenzen für verschiedene Epitope am N- und C-Terminus der Passagierdomäne zum Zwecke ihrer immunologischen Detektion sowie für verschiedene Proteaseschnittstellen am C-Terminus, die eine gezielte Abspaltung der Passagierdomäne von der Zelloberfläche ermöglichen (Sichwart *et al.*, 2015). Abbildung 8 zeigt die wichtigsten Elemente eines durch ein MATE-Plasmid kodierten AT-Fusionsproteins. MATE konnte bereits erfolgreich für die Oberflächenpräsentation von Proteinen in *E. coli*, *P. putida* und *R. eutropha* verwendet werden (Sichwart *et al.*, 2015; Sichwart und Jose, unveröffentlicht).

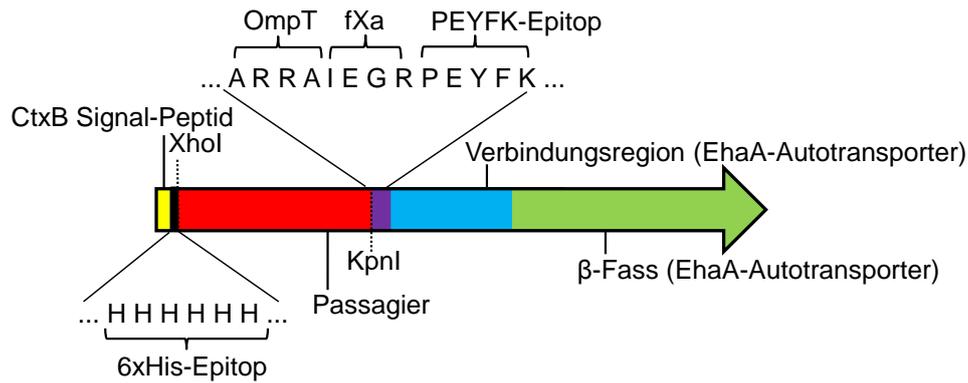


Abbildung 8: Wichtige Sequenzabschnitte der durch MATE-Plasmide kodierten AT-Fusionsproteine. Gelb: Signalpeptid. **Schwarz:** 6xHis-Epitop. **Rot:** Passagierdomäne. **Violett:** Erkennungssequenzen für die Proteasen OmpT und Faktor Xa sowie PEYFK-Epitop. **Blau:** Verbindungsregion. **Grün:** β -Fass-Domäne. Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme XhoI und KpnI in der Nukleotidsequenz sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet.

III Ziele der Arbeit

Die Produktion von Ethanol aus cellulosehaltiger Biomasse ist momentan so kostenaufwändig, dass eine Marktpositionierung gegenüber Biotreibstoffen aus stärkehaltiger Biomasse schwer fällt. Das Ziel dieser Arbeit war daher, zu evaluieren, ob die Immobilisation von Cellulasen auf der Oberfläche der Bakterien *Z. mobilis*, *Z. palmae* und *P. putida* mithilfe von Autodisplay möglich ist. Zum einen könnte somit die aufwändige Aufreinigung der Cellulasen obsolet und ein direkter Einsatz der Bakterien möglich gemacht werden. Zum anderen würde die Möglichkeit der direkten Fermentierung der bei der Hydrolyse entstehenden Glukose durch *Z. palmae* bzw. *Z. mobilis* eröffnet werden. Zu diesem Zweck sollte zuerst die generelle Fähigkeit dieser Organismen, ein rekombinantes AT-Fusionsprotein zur äußeren Membran zu transportieren und die enthaltene Passagierdomäne auf der Zelloberfläche zu präsentieren, getestet werden. Anschließend sollte die Oberflächenpräsentation von für die vollständige Hydrolyse von Cellulose notwendigen Enzymklassen β -Glucosidase, Endo- und Exocellulase erprobt und die Funktionalität der Enzyme geprüft werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine Mischung von Bakterien, die jeweils eine Cellulase auf ihrer Oberfläche tragen, die Hydrolyse von Filterpapier synergistisch katalysieren können.

IV Material und Methoden

1 Materialien

1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.

| Gerät / Material | Bezeichnung | Firma |
|--------------------------|---|---------------------------------|
| Autoklav | VX-95 | Systec, Wettengel |
| Brucheisbereiter | Scotsman AF 100 | Scotman, Milan, Italien |
| Brutschrank | Heratherm | Thermo Scientific, Schwerte |
| Durchflusszytometer | FACSAria III | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Elektroporationsküvette | 1mm Küvetten | PeqLab, Erlangen |
| Elektroporator | Gene Pulser Xcell | Bio-Rad Laboratories, München |
| ECL-Imager | ChemoCam HR16-3200 Imager | INTAS, Göttingen |
| Feinwaage | 2001 MP2 und TE64 | Sartorius, Göttingen |
| Gefrierschank -20 °C | Mediline Lgex3410-20 | Liebherr, Berlin |
| Gefriertruhe -80 °C | Forma 900 | Thermo Fischer, Dreieich |
| Geldokumentation | Gel iX Imager | INTAS, Göttingen |
| Gelkammer (Agarose) | Sub-Cell GT Cell | Bio-Rad Laboratories, München |
| Gelkammer (SDS-PAGE) | Mini Protean Cell | Bio-Rad Laboratories, München |
| Halbmikroküvette | 10-00132 | GML-Alfaplast, München |
| Heizblock | Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg |
| Heizrührer | Magnetic Stirrer | labworld-online, Staufen |
| Inkubationsschüttler | Minitron und Ecotron | Infors, Bottmingen, Schweiz |
| Kühlschrank 4 °C | Mediline LGUex 1500-20 | Liebherr, Berlin |
| Kühl-Gefrierkombination | Fris88f (+4/-20°C) | Thermo Fischer, Dreieich |
| Kühlzentrifugen | Universal 5810R, 200R und 320R | Hettich, Tuttlingen |
| Kühlzentrifuge | Sorvall Lynx 6000 Centrifuge mit T29x50-Rotor | Thermo Fischer, Dreieich |
| Membranfilter 0,025 µm | PSE, Celluloseacetat | Merck Millipore, Billerica, USA |
| Mikroreaktionsgefäße | 1,5 mL und 2 mL | Sarstedt, Nümbrecht |
| Mikrotiterplatten | REF 655161 | Greiner Bio One, Frickenhausen |
| Mikrotiterplatten-Reader | Infinite 200Pro und Sunrise | Tecan, Männedorf, Schweiz |
| Multikanalpipette | Finnpipette 30-300µl | Thermo Fischer, Dreieich |
| Mikrowelle | privileg 1026 | Whirlpool, Benton Harbor, USA |

| Gerät / Material | Bezeichnung | Firma |
|--------------------------------------|--|---------------------------------------|
| Nanophotometer | Pearl | Implen, München |
| pH-Meter | inoLab pH Level 1 | WTW, Weilheim |
| Photometer | Genesys 10s | Thermo Fischer, Dreieich |
| Pipettierhilfe | Easypet 3 | Eppendorf, Hamburg |
| Pipetten | Pipetman Neo P2N, P20N, P200N und P1000N | Gilson, Limburg-Offheim |
| Pipettenspitzen | 10 µl | Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf |
| Pipettenspitzen | 200 µl und 1000 µl | Sarstedt, Nümbrecht |
| Blotting-Membran | PVDF-Membran | Macherey-Nagel, Düren |
| Reinstwasseranlage | MilliQ Academic | Millipore, Eschborn |
| Sterilbank | Hera safe | Heraeus, Hanau |
| Tischzentrifuge | minispin | Eppendorf, Hamburg |
| Schüttelinkubator | Minitron | Infors, Einsbach |
| Spritzen | injekt | Braun, Melsungen |
| Spülmaschine | Compact-Desinfektor G7783CD | Miele, Gütersloh |
| Stromversorgung (Elektrophoresen) | PowerPac HC | Bio-Rad Laboratories, München |
| PCR-Cycler | ProFlex PCR System | life technologies, Carlsbad, USA |
| Trockenschrank | ED | Fresenberger, Wipperfürth |
| Transilluminator | LED-Illuminator 470nm | INTAS, Göttingen |
| Vakuumpumpe | Membranpumpe | Vacuubrand, Wertheim |
| Vortex Schüttler | Vortex Genie 2 | Thermo Fischer, Dreieich |
| Waage | 2337 | Sartorius, Göttingen |
| Weißlichtplatte | Weißlichtplatte | INTAS, Göttingen |
| Wippschüttler | Duomax 1030 | Heidolph, Schwabach |
| Zentrifugenröhrchen | PC Oak Ridge Tube 50 mL | Thermo Fischer, Dreieich |

1.2 Chemikalien

Tabelle 2: In dieser Arbeit eingesetzte Chemikalien.

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|---|
| 1,4-Dithiothreitol | AppliChem, Darmstadt |
| 10x FastDigest Green Buffer | Fermentas, St. Leon-Rot |
| 2-Mercaptoethanol | Fluka, Buchs, Schweiz |
| 2-Propanol | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| 3,3',5,5'-Teteramethylbenzidin (TMB) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| 4-Nitrophenol | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| 4-Nitrophenyl- β -D-cellobiosid (pNPG) | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA |
| 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid (pNPC) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| 5x HF-Puffer | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| 6x DNA Loading Dye | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Agar Agar | Roth, Karlsruhe |
| Agarose NEEO Ultra-Qualität | Roth, Karlsruhe |
| Agarose NEEO Ultra-Qualität | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumchlorid | Riedel de Haen, Seelze |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Merck, Darmstadt |
| Aprotinin | Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Carboxymethylcellulose, Natriumsalz | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Citronensäure-Monohydrat | Fisher Scientific, Schwerte |
| Coomassie Brilliant Blue R 250 | Serva, Heidelberg |
| D-Glucose | Merck, Darmstadt |
| D-Saccharose | Merck, Darmstadt |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Thermo Fischer Scientific, Schwerte |
| Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat | Merck, Darmstadt |
| Dikaliumhydrogenphosphat Dihydrat | Merck, Darmstadt |
| Dioxan | AppliChem, Darmstadt |
| DMSO | Fisher Scientific, Schwerte |
| DNA Größenmarker GeneRuler 1 kb | Fermentas, St. Leon-Rot |
| dNTP Mix, 10 mM | Fermentas, St. Leon-Rot |
| ECL Detektionslösung | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Eisessig | AppliChem, Darmstadt |
| Ethanol | VWR, Fontenay sous Bois, Frankreich |
| <i>Fetal bovine calf serum</i> (FCS) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|------------------------------|
| GelGreen Nucleic Acid Stain | Biotium, Hayward, USA |
| Glycerol | Roth, Karlsruhe |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| Hefeextrakt | Roth, Karlsruhe |
| Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) | AppliChem, Darmstadt |
| Kaliumchlorid | AppliChem, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Kanamycinsulfat | Life Technologies, Darmstadt |
| L-Arabinose | Roth, Karlsruhe |
| Magnesiumsulfat | Riedel de Haen, Seelze |
| Magnesiumchlorid | Riedel de Haen, Seelze |
| Methanol | VWR |
| Milchpulver | Roth, Karlsruhe |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumcarbonat | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Natriumchlorid p.a. | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid Plätzchen | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Pageruler Prestained Protein Ladder | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) | Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure | Merck, Darmstadt |
| Schwefelsäure | Fluka, Seelze |
| Schwefelsäure 96% | Fluka, Seelze |
| Trinatriumcitrat Dihydrat | Fluka, Seelze |
| Tris / Hydrochlorid | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Triton X-100 | Serva, Heidelberg |
| Trypton/Pepton aus Casein | Roth, Karlsruhe |
| Tween 20 | Roth, Karlsruhe |
| Western Blotting Luminol Reagent | Santa Cruz, Santa Cruz, USA |

1.3 Bakterienstämme

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

| Bezeichnung | Genomische Modifikationen | Referenz |
|--------------------------------|--|--|
| <i>E. coli</i> UT5600 (DE3) | F ⁻ , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>secA6</i> , <i>lacY1</i> , <i>proC14</i> , <i>tsx-67</i> , $\Delta(\textit{ompT-fepC})266$, <i>entA403</i> , <i>trpE38</i> , <i>rfdD1</i> , <i>rpsL109</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>thi-1</i> | Jose und Handel (2003) |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | B, F ⁻ , <i>dcm</i> , $\Delta\textit{ompT}$, <i>lon</i> , <i>hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻), <i>gal</i> , λ (DE3) | Studier und Moffatt (1986) |
| <i>E. coli</i> Stellar | F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>phoA</i> , $\Phi 80\textit{d lacZ}\Delta M15$, $\Delta(\textit{lacZYA} - \textit{argF}) U169$, $\Delta(\textit{mrr} - \textit{hsdRMS} - \textit{mcrBC})$, $\Delta\textit{mcrA}$, λ - | ClonTech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |
| <i>E. coli</i> DH5 α | F ⁻ , $\Phi 80\textit{lacZ}\Delta M15$, $\Delta(\textit{lacZYA-argF}) U169$, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ - <i>thi</i> - <i>1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> | Taylor <i>et al.</i> (1993) |
| <i>Z. mobilis</i> DSM-3580 | Keine Modifikationen | Kluyver und Hoppenbrouwers (1931) |
| <i>Z. palmae</i> DSM-10491 | Keine Modifikationen | Okamoto <i>et al.</i> (1993) |

1.4 Oligonukleotide

Tabelle 4: In dieser Arbeit eingesetzte Oligonukleotide.

| Bezeichnung | Sequenz | Anwendung |
|-------------|--|--|
| SI006 | CGAGGCGGCTACAGCCGATAGT CTGG | <i>reverse primer</i> zur Amplifikation von <i>Kan</i> -, <i>mob</i> - und <i>rep</i> -Gen aus pBBR1-MCS2 (Kovach <i>et al.</i> , 1995). |
| SI007 | TGCGCGCTTGGCGTAATCATGG TC | <i>forward primer</i> zur Amplifikation von <i>Kan</i> -, <i>mob</i> - und <i>rep</i> -Gen aus pBBR1-MCS2. |
| SI014 | GCTGTAGCCGCCTCGTTACCAAT TATGACAACCTTGACGGCTACAT | <i>reverse primer</i> zur Amplifikation des MATE-Fusionsgens mit <i>araBAD/araC</i> -Promotor Einheit aus pMATE-EstA _{Ara} . Generiert Überhang zum SI006/SI007-Amplifikat zur In-Fusion-Klonierung von pMATE _{mob} -EstA _{Ara} . |
| SI015 | TACGCCAAGCGCGCACCCAGTC TTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTA | <i>forward primer</i> zur Amplifikation des MATE-Fusionsgens mit <i>araBAD/araC</i> -Promotor Einheit aus pMATE-EstA _{Ara} . Generiert Überhang zum SI006/SI007-Amplifikat zur In-Fusion-Klonierung von pMATE _{mob} -EstA _{Ara} . |
| PT015 | GTTAGGAGAATAAACTACTAGTT TG | <i>forward primer</i> zur Amplifikation des pMATE _{mob} -Cel5A _{Ara} Rückgrats. Generiert Überhang mit P _{GAP} aus <i>Z. mobilis</i> gDNA zur In-Fusion-Klonierung von pMATE _{mob} -Cel5A _{GAP} . |
| PT016 | GGTTGTTGATCGAACCTTCTCTG | <i>reverse primer</i> zur Amplifikation des pMATE _{mob} -Cel5A _{Ara} Rückgrats. Generiert Überhang mit P _{GAP} aus <i>Z. mobilis</i> gDNA zur In-Fusion-Klonierung von pMATE _{mob} -Cel5A _{GAP} . |
| PT017 | GTTTCGATCAACAACCCGAATCCT ATCG | <i>forward primer</i> zur Amplifikation von P _{GAP} aus <i>Z. mobilis</i> gDNA. |
| PT018 | GTTTATTCTCCTAACTTATTAAGT AGC | <i>reverse primer</i> zur Amplifikation von P _{GAP} aus <i>Z. mobilis</i> gDNA. |

1.5 Plasmide

Die Plasmidkarten zu den in folgender Tabelle aufgelisteten Plasmiden befinden sich im Anhang.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

| Plasmid | Beschreibung | Quelle |
|--|--|------------------|
| pMATE-BglA _{Ara} | β-Glucosidase BglA als AT-Passagier, araBAD-Promotor. | Autodisplay GmbH |
| pMATE-Cel5A _{Ara} | Kodiert für Endocellulase Cel5A als AT-Passagier, araBAD-Promotor. | Autodisplay GmbH |
| pMATE-CelA _{Ara} | Kodiert für Endocellulase CelA als AT-Passagier, araBAD-Promotor. | Autodisplay GmbH |
| pMATE-CelK _{Ara} | Kodiert für Exocellulase CelK als AT-Passagier, araBAD-Promotor. | Autodisplay GmbH |
| pMATE-EstA _{Ara} | Kodiert für Esterase EstA als Autotransporter (AT) - Passagier, araBAD-Promotor. | Diese Arbeit |
| pMATE _{mob} -BglA _{Ara} | Kodiert für β-Glucosidase BglA als AT-Passagier, araBAD-Promotor, <i>mob</i> -Gen. | Diese Arbeit |
| pMATE _{mob} -Cel5A _{Ara} | Kodiert für Endocellulase Cel5A als AT-Passagier, araBAD-Promotor, <i>mob</i> -Gen. | Diese Arbeit |
| pMATE _{mob} -Cel5A _{GAP} | Kodiert für Endocellulase Cel5A als AT-Passagier, P _{GAP} -Promotor, <i>mob</i> -Gen. | Diese Arbeit |
| pMATE _{mob} -CelK _{Ara} | Kodiert für Exocellulase CelK als AT-Passagier, araBAD-Promotor, <i>mob</i> -Gen. | Diese Arbeit |
| pMATE _{mob} -EstA _{Ara} | Kodiert für Esterase EstA als AT-Passagier, araBAD-Promotor, <i>mob</i> -Gen. | Diese Arbeit |

1.6 Enzyme

Tabelle 6: In dieser Arbeit eingesetzte Enzyme.

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--|-------------------------|
| Alkalische Phosphatase | Fermentas, St. Leon-Rot |
| DNAse I | Roth, Karlsruhe |
| Lysozym aus Hühnereiweiß | Roth, Karlsruhe |
| Phusion DNA Polymerase | Thermo Fisher, Dreieich |
| Restriktionsenzyme (KpnI, XhoI, DpnI) | Fermentas, St. Leon-Rot |
| T4 DNA Ligase | Fermentas, St. Leon-Rot |

1.7 Nährmedien

Tabelle 7 führt die in dieser Arbeit genutzten Nährmedien auf. Diese wurden vor Nutzung für 20 min bei 2 bar, 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Glukose wurde getrennt autoklaviert und, wenn nötig, dem abgekühlten Nährmedium zugesetzt.

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Nährmedien.

| Nährmedium | Zusammensetzung |
|--------------|---|
| LB – Medium | 10 g/L Trypton/Pepton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 16 g/L Agar bei Festmedien. |
| PPM – Medium | 15 g/L Pepton, 5 g/L NaCl, 1 g/L Zulkowsky Stärke, 1 g/L KH ₂ PO ₄ , 0,8 g/L K ₂ HPO ₄ , 20 % (v/v) Glycerol. |
| SOC – Medium | 20 g/L Trypton/Pepton, 5 g/L Hefeextrakt, 0,5 g/L NaCl, 2,5 g/L KCl, 20 mM Glukose, 10 mM MgCl ₂ . |
| ZM – Medium | 10 g/L Trypton/Pepton, 10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Glukose, 16 g/L Agar bei Festmedien. |
| ZP – Medium | 10 g/L Hefextrakt, 2 g/L KH ₂ PO ₄ , 5 g/L NaCl, 16 g/L Agar bei Festmedien, mit NaOH auf pH 6.0 eingestellt. |

1.8 Puffer und Lösungen

Die folgenden Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser angesetzt.

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete allgemeine Lösungen.

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|----------------------|--|
| 10x DNA-Probenpuffer | 0,42 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerol, 10 mM EDTA, pH 8 |
| Agaroselösung | 8 g/L Agarose in 1x TAE-Puffer |
| DNA - Färbepad | 0,1% (v/v) GelGreen – Färbelösung. |
| DNS - Reagenz | 20 g Kalium-Natrium-Tartrat Tetrahydrat, 0,05g Na ₂ SO ₃ ; 0,2 g Phenol, 1 g 3,5-Dinitrosalicylsäure in 50 mL 2% (w/v) NaOH gelöst, bei 50°C für 1 h gerührt, auf 1 L mit Wasser aufgefüllt. |
| Natriumcitratpuffer | 26,02 g/L Na ₃ -Citrat Dihydrat, 2,42 g/L Citronensäure Monohydrat. |
| PBS 10x | 80 g/L NaCl, 2 g/L KCl, 14,2 g/L Na ₂ HPO ₄ , 2,7 g/L KH ₂ PO ₄ |
| TAE-Puffer | 2 M Tris, 0,1 M Essigsäure, 50 mM EDTA, pH 8 |
| TBS 10x | 80 g/L NaCl, 2 g/L KCl, 30 g/L Tris-Base, pH 7,4 |
| TMF-Puffer | 14,7 g/L CaCl ₂ Dihydrat, 6,05 g/L RbCl, 7,92 g/L MnCl ₂ Tetrahydrat. |

Tabelle 9: Lösungen für SDS-PAGE.

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|-----------------------------------|---|
| APS-Lösung | 10% APS (w/v). |
| Coomassie Brilliant Blue Färbepad | 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 450 mL Methanol, 450 mL Reinstwasser, 100 mL Eisessig. |
| Entfärbelösung | 10% Essigsäure. |
| Esteraseaktivitäts-Färbelösung | 1 mg/mL FastBlue RR, 0,5% (v/v) α-Naphtylacetat, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5. |
| Laufpuffer 10x | 0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1% SDS. |
| Polyacrylamidsammegel 4 % | 13,1 % (v/v) Rotiphorese Acrylamid Gel 30, 25 % (v/v) 4x Sammelpuffer, 0,1% (w/v) APS-Lösung. |

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---|---|
| Polyacrylamidtrenngel 10 bzw. 12.5 % | 33,3% bzw. 41,6% (v/v) Rotiphorese Acrylamid Gel 30, 25% (v/v) 4x Trenngelpuffer, 0,1 % APS-Lösung. |
| Proteinprobenpuffer 2x | 100 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0.2% (w/v) Bromphenolblau, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 200 mM Dithiothreitol. |
| Sammelgelpuffer 4x | 1,25 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS, 0,4% (w/v) TEMED. |
| Trenngelpuffer 4x | 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS, 0,4% (w/v) TEMED. |

Tabelle 10: Lösungen für Außenmembranproteinisolierungen.

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|-------------------|--|
| Aprotinin | 10 mg/mL |
| DNase I | 1 mg/mL |
| EDTA-Lösung | 10 mM Na ₂ EDTA |
| Extraktionspuffer | 2% (v/v) Triton X-100, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM MgCl ₂ |
| Lysozym | 10 mg/mL |
| PMSF | 100 mM in 2-Propanol |
| Proteinase K | 5 mg/mL |
| Saccharoselösung | 1,0 M D-Saccharose |
| Tris/HCl-Puffer | 0,2 M Tris-Lösung, mit HCl auf pH 8 eingestellt |

Tabelle 11: Lösungen für Western Blot.

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---------------------|--|
| Blockpuffer | 5 % (w/v) Milchpulver-TBS-Lösung. |
| TBS-T (Waschpuffer) | 0,1 % (v/v) Tween-20 in TBS. |
| Transferpuffer | 25 mM Tris, 1,92 M Glycin, 200 mL Methanol, auf 1 L mit Reinstwasser aufgefüllt. |

1.9 Reagenziensätze

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Reagenziensätze.

| Reagenziensatz | Bezugsquelle |
|---------------------------------|---------------------|
| In-Fusion HD EcoDry Cloning Kit | Clontech, USA |
| innuPREP DoublePure Kit | Analytik Jena, Jena |
| innuPREP Plasmid Mini Kit | Analytik Jena, Jena |

1.10 Software

Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Software.

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|------------------------------|--|
| CBS SignalP-Server4.0 | CBS, http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/ |
| DNASTAR (SeqBuilder, SeqMan) | NWZNET, Westfälische Wilhelms-Universität Münster |
| ExPASy compute pI/Mw | ExPASy, http://web.expasy.org/compute_pi/ |
| ExPASy translate tool | ExPASy, http://web.expasy.org/translate/ |
| Tm Calculator | Applied Biosystems, http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/ |

2 Methoden

2.1 Grundlegende mikrobiologische Arbeiten

2.1.1 Kultivierung und Proteinexpression

Die bei -80 °C in Kryoröhrchen gelagerten Bakterien wurden zur Inkulturnahme auf geeigneten Agarplatten oder in Flüssigmedium ausgebracht und mit den in Tabelle 14 angegebenen Parametern über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurde ein für die entsprechenden Experimente notwendiges Volumen an frischem Medium in einer Verdünnung von 1:100 mit der Übernachtskultur angeimpft. Zur Proteinexpression wurde bei einer optischen Dichte bei 578 nm (OD_{578}) von 0,5 L-Arabinose in einer Konzentration von 0,2% (w/v) zugegeben, und die Kultur für eine weitere Stunde (bei Expression des MATE-EstA-Fusionsproteins) bzw. für weitere 2 Stunden (Expression aller anderen Fusionsproteine) bei 30 °C kultiviert.

Tabelle 14: Kulturbedingungen für die in dieser Arbeit verwendeten Organismen.

| Organismus | Temperatur | Medium | Schüttler-Geschw. | Kanamycin-Konz. |
|--------------------------|------------|--------|-------------------|-----------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 37 °C | LB | 200 rpm | 50 µg/mL |
| <i>Zymomonas mobilis</i> | 30 °C | ZM | 60 rpm | 150 µg/mL |
| <i>Zymobacter palmae</i> | 30 °C | ZP | 60 rpm | 150 µg/mL |

2.1.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*, *Z. mobilis* oder *Z. palmae* - Zellen wurden entsprechende Bakterienkulturen mit einem Volumen von 200 mL wie beschrieben bis zu einer OD_{578} von 0,4 kultiviert und die Bakterien dann durch 10-minütige Zentrifugation bei 1.000 x g und 4 °C vom Nährmedium abgetrennt. Die Zellen wurden anschließend für 20 min auf Eis gekühlt, in 20 mL einer eiskalten, 10% Glycerinlösung suspendiert, und die Zellsuspension nochmals zentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Schrittes wurden die Bakterien in 500 µL einer 10% Glycerinlösung suspendiert, in 40 µL Aliquots aufgeteilt und in einem

Ethanol/Trockeneis-Gemisch schockgefroren. Die Aliquots wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.1.3 Transformation elektrokompetenter Zellen

Zur Transformation der elektrokompetenten Zellen wurde ein Aliquot der entsprechenden Zellen auf Eis bis auf 4 °C aufgewärmt, mit 50 ng (*E. coli* und *Z. palmae*) bzw. 500 ng (*Z. mobilis*) Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Schichtdicke gegeben, die mithilfe eines Elektroporators einem Stromimpuls (5 ms, 1800 V) ausgesetzt wurde. Direkt im Anschluss wurden die Zellen in 1 mL vorgewärmtes SOC- (*E. coli*), ZM- (*Z. mobilis*) bzw. ZP-Medium (*Z. palmae*) gegeben und im Thermoschüttler bei 1000 rpm, 37 °C (*E. coli*) bzw. bei 450 rpm, 30 °C (*Z. palmae*, *Z. mobilis*) inkubiert. Nach 1 h (*E. coli*), 3 h (*Z. palmae*) bzw. 6 h (*Z. mobilis*) wurden die Zellen dann auf geeigneten, kanamycinhaltigen Agarplatten ausplattiert und im Brutschrank gelagert, bis Kolonien sichtbar wurden.

2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* - Zellen wurde eine 40 mL Kultur wie beschrieben bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4 kultiviert, und die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 1.000 x g und 4 °C vom Nährmedium abgetrennt. Nach 10-minütiger Abkühlung auf Eis wurden die Zellen in 4 mL eiskaltem TMF-Puffer suspendiert, mit 1 mL Glycerin versetzt und in 250 µL Aliquots schockgefroren. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.1.5 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Zur chemischen Transformation von *E. coli* wurde ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen auf Eis bis auf 4 °C aufgewärmt und für ca. 30 min zusammen mit ca. 50 ng Plasmid-DNA oder 5 µL einer In-Fusion-Reaktion inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin für 90 Sek. im Thermoschüttler auf 42 °C erhitzt und für 1 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde 1 mL SOC-Medium zugegeben und für 1 h bei 37 °C und 1000 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Die Zellen wurden dann auf kanamycinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und im Brutschrank bei 37 °C bis zum Sichtbarwerden von Kolonien gelagert.

2.1.6 Kryokonservierung

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienstämmen wurden die entsprechenden Kulturen auf Agarplatten ausgestrichen, nach Bewachsung mit einem Wattestäbchen geerntet und in PPM-Medium suspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt, im Ethanol/Trockeneis-Bad schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurde der auf Silicasäulen basierende Reagentiensatz innuPREP Plasmid Mini Kit verwendet. Dazu wurden 8 mL einer Übernachtskultur zentrifugiert und die Zellen entsprechend den Herstellerangaben weiter verarbeitet. Die Konzentration und Reinheit der enthaltenen Plasmidlösung wurde anschließend photometrisch bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion und In-Fusion Klonierung

Die Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde mithilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt. Dazu wurde die Zielsequenz enthaltende DNA (*template*) zusammen mit flankierenden *primers*, dNTPs, Polymerase und geeignetem Puffer und Wasser in den in Tabelle 15 und Tabelle 16 angegebenen Zusammensetzungen gemischt und in einem PCR-Cycler mit den in Tabelle 17 und Tabelle 18 angegebenen Temperatur-Zeit-Profilen inkubiert. Die Temperaturen für die *primer*-Hybridisierung (*annealing*) wurden mithilfe von Tm Calculator berechnet. Für die exakte Amplifikation zu Klonierungszwecken wurde Fusion-Polymerase verwendet, für Kontrollzwecke Taq-Polymerase.

Zur restriktionsfreien Insertion eines DNA-Fragmentes in ein Plasmid mittels In-Fusion wurden die für die Amplifikation des DNA-Fragmentes eingesetzten *primers* mit 15 bp langen Überhängen am 3' bzw. 5'-Ende versehen, die komplementär zu den Abschnitten des Zielplasmids sind, an denen das Fragment eingefügt werden soll. Das Zielplasmid selbst wurde dabei mit *primers* ohne Überhänge amplifiziert. Dieses Vorgehen wurde alternativ auch umgekehrt durchgeführt, d.h. das Zielplasmid wurde mit, und das einzusetzende Fragment ohne Überhänge amplifiziert. In beiden

Fällen wurde der amplifizierte Zielplasmid anschließend für 1 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut, um *template*-DNA zu entfernen. 50 – 100 ng des Fragments und 50 – 200 ng des Zielplasmids wurden dann entsprechend den Herstellerangaben zum In-Fusion-Reagenz gegeben, für 15 min auf 50 °C erhitzt, und durch chemische Transformation in *E. coli* eingebracht.

Tabelle 15: Zusammensetzung der durchgeführten PCR-Reaktionen mit Taq-Polymerase.

| Komponente | Volumen |
|---------------------------------|-----------|
| 10x Taq Puffer | 5 µL |
| dNTP-Mix, je 2 mM | 5 µL |
| <i>primer</i> -Mix(10 mM) | je 0,5 µL |
| MgCl ₂ (25 mM) | 4 µL |
| <i>template</i> (ca. 100 ng/µL) | 1 µL |
| Polymerase | 0,25 µL |
| Reinstwasser | 33,75 µL |

Tabelle 16: Zusammensetzung der durchgeführten PCR-Reaktionen mit Fusion-Polymerase.

| Komponente | Volumen |
|----------------------------------|-----------|
| 10x Taq Puffer | 5 µL |
| dNTP-Mix, je 2 mM | 5 µL |
| <i>primer</i> -Mix (10 mM) | je 0,5 µL |
| DMSO | 1,5 µL |
| <i>template</i> (ca. 100 ng/ µL) | 1 µL |
| Polymerase | 0,5 µL |
| Reinstwasser | 36 µL |

Tabelle 17: Temperaturprofil der durchgeführten PCR-Reaktionen mit Taq-Polymerase.

| Reaktionsschritt | Temperatur | Dauer | Anzahl der Zyklen |
|---|------------|-------|-------------------|
| Initiale Denaturierung | 98 °C | 5 min | 1 |
| Denaturierung | 98 °C | 30 s | 32 |
| <i>primer</i> -Hybridisierung (<i>annealing</i>) | Variabel | 30 s | |
| Elongation | 68 °C | 1 min | |
| Finale Elongation | 68 °C | 5 min | 1 |

Tabelle 18: Temperaturprofil der durchgeführten PCR-Reaktionen mit Fusion-Polmerase.

| Reaktionsschritt | Temperatur | Dauer | Anzahl der Zyklen |
|---|------------|------------------|-------------------|
| Initiale Denaturierung | 98 °C | 5 min | 1 |
| Denaturierung | 98 °C | 30 s | 30 |
| <i>primer</i> -Hybridisierung (<i>annealing</i>) | Variabel | 30 s | |
| Elongation | 72 °C | 30 s pro 1000 bp | |
| Finale Elongation | 72 °C | 5 min | 1 |

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen oder präparativen Auftrennung von DNA wurde diese mit Ladebuffer versetzt, auf ein 1% (w/v) Agarosegel aufgetragen und in TAE-Puffer für ca. 1 h eine Spannung von 120 V angelegt. Als Größenreferenz wurde GeneRuler 1kb (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Zur visuellen Sichtbarmachung der DNA wurde das Gel für 20 min in GelGreen-Lösung gelagert und auf einem LED-Tisch bei 470 nm angeregt.

Zur weiteren Verwendung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden diese mit einem Skalpell ausgeschnitten und mithilfe des auf Silikasäulen basierenden innuPREP DoublePure Reagenziensatzes (Analytik Jena, Jena) entsprechend der Herstellerangaben extrahiert und aufgereinigt.

2.2.7 Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Insertion von DNA-Fragmenten in ein Plasmid mittels Restriktionsverdau und Ligation wurden 50 µL der jeweiligen DNA-Lösung für 2 Stunden bei 37 °C mit jeweils 1 µL der benötigten Restriktionsenzyme in dem vom Hersteller gelieferten Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme durch 10-minütige Erhitzung auf 65 °C deaktiviert, das zu insertierende DNA-Fragment und das Plasmid in einem molaren Verhältnis von 4:1 zusammengegeben und mit 1 µL T4-DNA-Ligase sowie Ligasepuffer versetzt. Dieser Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert, gegen Wasser dialysiert und zur Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation genutzt.

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Verifizierung von DNA-Sequenzen erfolgte durch Sanger-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977), durchgeführt von SeqLab GmbH (Göttingen).

2.3 Arbeiten mit Proteinen

2.3.1 Isolation von Außenmembranproteinen

Für die Isolation von Außenmembranproteinen wurde nach einem modifizierten Protokoll von Park *et al.* (2015) vorgegangen. Dazu wurden 40 mL (*E. coli*) bzw. 80 mL (*Z. palmae*, *Z. mobilis*) der entsprechenden Nährmedien mit einer Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes in einer Verdünnung von 1:100 angeimpft und bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 30 °C (*Z. palmae*, *Z. mobilis*) bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 kultiviert. Wenn notwendig, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert, und die Bakterien nach weiterer ein- oder zweistündiger Kultivierung (vom exprimierten Protein abhängig) durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen wurden dann zweimal mit 0,2 M Tris/HCl (pH 8,0) gewaschen und anschließend in 2 mL des gleichen Puffers suspendiert. Es wurden 150 µL Lysozym (10 mg/mL), 150 µL Saccharose (1 M) und 150 µL EDTA (10 mM) zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurden 15 µL Aprotinin (10 mg/mL), 15 µL PMSF-Lösung, 5 mL Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl, 2% Triton X-100, 10 mM MgCl₂) und 150 µL DNase (1 mg/mL) hinzugefügt und die Suspension kräftig geschüttelt. Nach 45-minütiger Inkubation auf Eis wurden noch intakte Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation (3.200 x g, 4 °C, 5 min) entfernt und der resultierende Überstand für 5 Minuten bei 18.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierten Proteine wurden mit 15 mL eiskaltem Wasser gewaschen und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Die Proteine wurden anschließend in 1 mL eiskaltem Wasser aufgenommen und für 10 Minuten bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und die Proteine bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Trennung und Analyse von Außenmembranproteinen wurde mithilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

modifiziert nach Laemmli (1970) durchgeführt. Dazu wurden die Proteinproben im 2,5-fachen Volumen 2x SDS-Probenpuffer mit 30 mg/mL DTT suspendiert und für 30 Minuten auf 98 °C erhitzt. Nach Abkühlung wurden dann zwischen 0,5 µL und 10 µL der Probe in die Taschen von Acrylamidgelen aufgetragen, die aus Sammelgel (4%) und Trenngel (12,5%) bestanden. Als Größenindikator wurde in eine Tasche 6 µL PageRuler *prestained protein ladder* gegeben. Die Gele wurden dann in eine Gelkammer eingesetzt und für eine Stunde eine Stromstärke von 25 mA pro Gel angelegt.

Coomassie-Färbung

Zur Sichtbarmachung der durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurden die Acrylamidgele für eine Stunde bei RT in ein Bad mit Coomassie Brilliant Blue eingelegt, und im Anschluss über Nacht bei RT in 10% Essigsäure aufbewahrt. Die fotografische Dokumentation wurde mittels Gel iX Imager durchgeführt.

Western Blot

Die spezifische Sichtbarmachung von Proteinen, die ein 6xHis-Epitop enthalten, erfolgte mittels Western Blot. Dazu wurde direkt im Anschluss an SDS-PAGE eine durch fünfminütige Inkubation in Methanol aktivierte PVDF-Membran auf das Acrylamidgel gelegt, und von beiden Seiten in Zellstoff und Fasermatten gehüllt. Der so hergestellte „Sandwich“ wurde in eine mit eiskaltem Transferpuffer gefüllte Western Blot Apparatur eingespannt, so dass die PVDF Membran zur Anode und das Acrylamidgel zur Kathode hin orientiert waren. Dann wurde unter Eiskühlung für eine Stunde eine Spannung von 100 V angelegt, um die Proteine vom Acrylamidgel zur PVDF-Membran zu transferieren. Zur Sättigung von freien Bindungsstellen der Membran wurde diese im Anschluss für 30 Minuten in TBS mit 5% Milchpulver eingelegt. Anschließend wurde eine Lösung mit Maus anti-6xHis Antikörper (1:2.500 [v/v] in TBS) auf die Membran gegeben und über Nacht unter Wippschütteln bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernung dieser Lösung und dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde eine Lösung mit HRP-gekoppeltem Ziege anti-Maus Antikörper auf die Membran gegeben und für eine Stunde bei RT unter Wippschütteln inkubiert. Die Antikörperlösung wurde dann entfernt und dreimal mit TBS-T gewaschen. Im Folgenden wurde die Membran mit einer 1:1 (v/v) Mischung aus den

Luminolreagenzien A und B benetzt und die entstehende Chemilumineszenz mithilfe eines ChemCam *imagers* fotografisch ausgewertet.

Esteraseaktivitätsfärbung

Zur selektiven Färbung von Proteinbanden, die esterolytische Aktivität aufweisen, wurde ein modifiziertes Protokoll nach Reiter *et al.* (2000) angewendet. Dazu wurde das Acrylamidgel nach erfolgter SDS-PAGE dreimal für je 30 Minuten mit einer 2,5% Triton X-100 Lösung (in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5) gewaschen, um das im Acrylamidgel enthaltene SDS zu entfernen. Die Sichtbarmachung der Banden erfolgte dann durch 5-minütige Inkubation in Färbepuffer (1 mg/mL FastBlueRR, 0,5% [v/v] α -Naphthylacetat, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5). Die fotografische Dokumentation erfolgte mittels Gel iX Imager.

2.4 Analytik der Esteraseaktivität

Zur Bestimmung der esterolytischen Aktivität von Bakterienzellen wurde nach einem modifizierten Protokoll von Schultheiss *et al.* (2002) vorgegangen. Dazu wurden die zu untersuchenden Bakterien wie beschrieben kultiviert, die Proteinexpression nach Erreichen einer OD_{578} von 0,5 durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert und nach weiterer Kultivierung für eine Stunde durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt. Die Bakterienzellen wurden dann bei 4 °C zweimal mit 0,1 M Tris/HCl (pH 7) gewaschen und anschließend im gleichen Puffer suspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine OD_{578} von 0,5 eingestellt, und 20 μ L dieser Suspension wurden mit 180 μ L einer 4 mM 4-Nitrophenolacetat-Lösung (in 0,1 M Tris/HCl pH 7) vermischt. Nach 20 Minuten Inkubation bei 30 °C wurde die Absorption bei 405 nm mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-*Readers* bestimmt. Zur Bestimmung der esterolytischen Aktivität des Zellüberstandes wurde die auf eine OD_{578} von 0,5 eingestellte Zellsuspension zentrifugiert und 20 μ L des Überstandes wie beschrieben für die Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

2.5 Analytik der Cellulaseaktivität

2.5.1 β -Glucosidase

Zur Bestimmung der β -Glucosidaseaktivität ganzer Zellen wurden diese wie beschrieben kultiviert, ggf. die Proteinexpression induziert und anschließend durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden dreimal mit Natriumcitratpuffer, pH 6 gewaschen und die Zellsuspension im selben Puffer auf eine OD_{578} von 50 eingestellt. Anschließend wurden 50 μ L der Zellsuspension für 5 Minuten auf die gewünschte Reaktionstemperatur vorgeheizt und mit 50 μ L einer ebenfalls auf diese Temperatur vorgeheizten 10 mM 4-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid-Lösung (in Natriumcitratpuffer, pH 6) versetzt. Nach Ablauf der gewünschten Reaktionszeiten wurden die Zellen mithilfe einer Tischzentrifuge von der Reaktionsmischung entfernt, 50 μ L des Überstandes mit dem gleichen Volumen einer 2 M Na_2CO_3 -Lösung gemischt, und die Absorption bei 405 nm mit einem Mikotiterplatten-*Reader* gemessen.

2.5.2 Exocellulase

Die Bestimmung der Aktivität von Zellen mit oberflächenpräsentierter Exocellulase wurde wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben durchgeführt, mit den Unterschieden, dass die OD_{578} der Zellsuspensionen auf 1 eingestellt wurde, und als Substrat 4-Nitrophenyl- β -D-Cellobiosid eingesetzt wurde.

2.5.3 Endocellulase

Zur Bestimmung der Endocellulaseaktivität von Bakterienzellen wurden diese wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben vorbereitet und 50 μ L der entsprechenden Zellsuspension nach einer 5-minütigen Vorheizphase bei der gewünschten Reaktionstemperatur mit dem gleichen Volumen einer ebenfalls vorgeheizten 2% (w/v) Carboxymethylcellulose (CMC)-Lösung versetzt. Nach Ablauf der gewünschten Reaktionszeit wurden die Zellen durch Zentrifugation von der Reaktionsmischung entfernt und der Überstand zum Nachweis reduzierender Zucker (Abschnitt 2.5.5) eingesetzt.

2.5.4 Abbau von Filterpapier

Zur Untersuchung des Abbaus von Filterpapier (FP) durch Bakterien mit oberflächenpräsentierter Endo- und Exocellulase, β -Glucosidase sowie Mischungen daraus wurden die entsprechenden Bakterienstämme wie in den Abschnitten 2.5.1 - 2.5.3 beschrieben vorbereitet und jeweils in Natriumcitratpuffer (100 mM, pH 6) suspendiert. Die OD_{578} der Suspensionen wurde auf 50 eingestellt. Anschließend wurden gemäß eines modifizierten Protokolls nach Xiao *et al.* (2004) jeweils 23,6 μ L der einzelnen Stämme sowie Zweier- und Dreier-Mischungen von diesen bei 55 °C für 24 Stunden mit einem kreisrunden Stück FP (Whatman Filter Paper No.1, Durchmesser 6 mm) unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Reaktionsvolumen wurde dabei bei allen Ansätzen auf 71 μ L eingestellt, und wurde entsprechend bei den einzelnen Stämmen und den Zweiermischungen mit Puffer aufgefüllt. Nach der Hydrolyse wurden die Zellen und FP-Reste durch Zentrifugation entfernt und reduzierende Zucker im Überstand mithilfe des DNS-Verfahrens (Abschnitt 2.4.5) quantifiziert.

2.5.5 Nachweis von reduzierenden Zuckern

Zum Nachweis von reduzierenden Zuckern, die durch die Hydrolyse von CMC oder FP entstehen, wurde das Dinitrosalicylsäure (DNS) -Verfahren modifiziert nach King *et al.* (2009) durchgeführt. Dazu wurden 50 μ L des Überstandes aus Endocellulase- oder FP-Test zu 100 μ L DNS-Lösung gegeben, für 5 Minuten auf 98 °C erhitzt und 100 μ L der Lösung nach Abkühlung in einem Mikrotiterplatten-Reader bei 450 nm vermessen.

2.6 Prüfung der Oberflächenpräsentation

2.6.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Für die Durchführung eines ELISA wurden Bakterienzellen wie beschrieben kultiviert und - falls notwendig - bei einer OD_{578} von 0,5 die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert. Nach weiterer Kultivierung für eine Stunde wurden die Kultur zentrifugiert, die sedimentierten Zellen in PBS suspendiert und die Zellsuspension auf eine OD_{578} von 0,2 eingestellt. Jeweils 100 μ L dieser Zellsuspensionen wurden in die Kavitäten einer 96-well Maxisorp-Platte gegeben und

über Nacht bei 4 °C inkubiert, um eine Anhaftung der Zellen an der Oberfläche der Kavitäten zu erreichen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Zellen anschließend für drei Stunden mit 150 µL einer 10% FCS-Lösung in PBS bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Entfernung dieser Lösung wurden die Zellen für eine Stunde mit Maus anti-6xHis Antikörper (THE HisTag, GenScript, USA) in einer Verdünnung von 1:5.000 in PBS bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 45 Minuten mit Ziege anti-Maus Meeretich-Peroxidase (HRP) -gekoppeltem Zweitantikörper (Thermo Scientific, USA) in einer Verdünnung von 1:10.000 in PBS bei RT behandelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden 100 µL 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in die Kavitäten gegeben und für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 100 µL 2M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption der Proben bei 450 nm gemessen.

2.6.2 Durchflusszytometrie

Zur Vermessung der Fluoreszenzintensitäten individueller Bakterienzellen mittels Durchflusszytometrie wurden die Bakterien wie beschrieben kultiviert und ggf. die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert. Nach weiterer Kultivierung für 1 Stunde (bei Expression des MATE-EstA-Fusionsproteins) bzw. 2 Stunden (bei Expression der MATE-BglA-, MATE-Cel5A-, MATE-Cel5- und MATE-CelK-Fusionsproteine) wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Kulturmedium entfernt, in sterilfiltriertem PBS suspendiert und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension mit PBS auf eine OD₅₇₈ von 0,4 eingestellt. 1 mL dieser Zellsuspension wurde dann für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µL einer Maus anti-6xHis Antikörper-Lösung (THE HisTag, GenScript, USA, 1:50-Verdünnung in PBS) suspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen dreimal mit je 500 µL PBS gewaschen und anschließend in 100 µL einer Zweitantikörperlösung (HRP-gekoppelter Ziege anti-Maus Antikörper, Thermo Scientific, USA, 1:50-Verdünnung in PBS) suspendiert. Es wurde für 45 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese in 500 µL PBS suspendiert und mittels eines FACSCalibur Durchflusszytometers (Experimente mit MATE-EstA-Fusionsprotein) bzw. FACSAria III Durchflusszytometers (Experimente mit MATE-BglA-, MATE-Cel5A-, MATE-CelA- und MATE-CelK-Fusionsproteinen)

vermessen. Es wurden jeweils 50.000 Zellen mit einer Exzitationswellenlänge von 633 nm angeregt und bei 660 nm vermessen.

V Experimente und Ergebnisse

1 Autodisplay der Esterase EstA zur Konzeptprüfung

Die in dieser Arbeit als Wirtsorganismen für die Oberflächenpräsentation der Cellulasen vorgesehenen Bakterien *Zymomonas mobilis* und *Zymobacter palmae* waren zuvor noch nicht für die rekombinante Expression von Autotransporter (AT) - Proteinen genutzt worden. Zuerst musste daher der Frage nachgegangen werden, ob der Typ V Sekretionsweg, dem die Oberflächenpräsentation mithilfe von AT-Proteinen zugrunde liegt, in diesen Organismen überhaupt nutzbar ist, und ob die in dieser Arbeitsgruppe bislang für Autodisplay in *E. coli* genutzten Konstrukte mit den neuen Wirtsorganismen kompatibel sind.

1.1 Konstruktion eines geeigneten Plasmids zur Proteinexpression

Das bereits für die Oberflächenexpression in *E. coli*, *P. putida* und *R. eutropha* erfolgreich genutzte Plasmid pMATE-EstA_{Ara} (Sichwart und Jose, unveröffentlicht) wurde als Grundlage für erste Expressionsexperimente genutzt. Das Rückgrat des Plasmids beinhaltet einen Replikationsursprung (ori) und ein *rep* Gen aus dem *broad host range* Plasmid pBBR1-MCS2 (Kovach *et al.*, 1995) sowie ein Kanamycinresistenzgen (*kan*), und kodiert für ein Fusionsprotein, das (von N- zu C-Terminus) aus dem CtxB Signalpeptid aus *Vibrio cholerae*, der Esterase EstA aus *Burkholderia gladioli* sowie der Transporteinheit des EhaA-AT-Proteins aus *E. coli* O157:H7 besteht. Zwischen Signalpeptid und Esterase befindet sich für immunologische Nachweisverfahren ein 6xHis-Epitop (Abbildung 9). Die Expression dieses Fusionsproteins unterliegt der Kontrolle des induzierbaren araBAD Promotors (Guzman *et al.*, 1995).

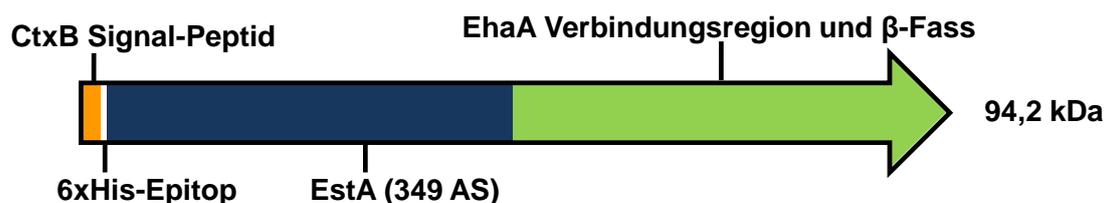


Abbildung 9: Domänenstruktur des durch pMATE-EstA und pMATE_{mob}-EstA_{Ara} kodierten MATE-Fusionsproteins bestehend aus CtxB Signalpeptid (orange), 6xHis-Epitop (weiß), Esterase EstA (blau) und EhaA Transporteinheit (grün). Die Länge der Passagierdomäne ist in Aminosäuren (AS) angegeben, das berechnete Molekulargewicht des gesamten Fusionsproteins ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

Das Einbringen von pMATE-EstA_{Ara} mittels Elektroporation in entsprechend vorbereitete Zellen war weder mit *Z. mobilis* noch mit *Z. palmae* erfolgreich. Es entstanden im Falle von *Z. mobilis* keine, im Falle von *Z. palmae* nur sehr wenige Kolonien auf den Selektionsplatten. Letztere zeigten in Flüssigkultur im Vergleich zu Zellen ohne Plasmid schwerwiegende Wachstumsdefekte und konnten für weitere Experimente nicht verwendet werden. Während die optische Dichte bei 578 nm (OD₅₇₈) von Kulturen von *Z. palmae* ohne Plasmid nach zehn Stunden Kultivierung 4 bis 5 betrug (Daten nicht gezeigt), erreichten Kulturen von *Z. palmae* mit pMATE-EstA_{Ara} im selben Zeitraum nur eine OD₅₇₈ von ca. 1 (Abbildung 10, rot). Aus diesem Grund wurde das Plasmid pMATE_{mob}-EstA_{Ara} konstruiert, das mit pMATE-EstA_{Ara} identisch ist, aber zusätzlich ein *mob* Gen enthält. Dazu wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ein Sequenzabschnitt aus dem Plasmid pBBR1-MCS2 (Kovach *et al.*, 1995) amplifiziert, das neben *ori*, *rep* und *kan* auch *mob* beinhaltet. Aus pMATE-EstA_{Ara} wurde ein Sequenzabschnitt amplifiziert, der für das araBAD/araC Operon sowie das beschriebene AT-Fusionsprotein mit EstA als Passagier kodiert. Dabei wurden die für die PCR eingesetzten Oligonukleotide mit Überhängen versehen, die komplementär zu dem Amplifikat aus pBBR1-MCS2 sind. Die beiden Sequenzabschnitte wurden mittels restriktionsfreier Klonierung (In-Fusion) zu pMATE_{mob}-EstA_{Ara} rekombiniert. Das *mob* Gen kodiert eine Relaxase (Szpirer *et al.*, 2001), die zusammen mit den durch die *tra* Gene kodierten Proteinen für den konjugativen Plasmidtransfer notwendig sind (Figurski und Helinski, 1979). Da die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide allerdings keine *tra* Gene enthalten, kann kein konjugativer Plasmidtransfer stattfinden. Das Plasmid pMATE_{mob}-EstA_{Ara} konnte durch Elektroporation in beide Spezies eingebracht werden, auf den Selektionsplatten entstanden im Falle von *Z. palmae* nun zahlreiche, im Falle von *Z. mobilis* wenige Kolonien. Das Wachstumsverhalten von *Z. palmae* pMATE_{mob}-EstA_{Ara} (Abbildung 10, blau) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu dem von *Z. palmae* ohne Plasmid (Daten nicht gezeigt). Kulturen von *Z. mobilis* pMATE_{mob}-EstA_{Ara} zeigten ebenfalls keine signifikante Veränderung der Wachstumskurve im Vergleich zu Kulturen mit *Z. mobilis* ohne Plasmid (Daten nicht gezeigt). Da keine Studien zu weiteren Funktionen des *mob* Gens vorhanden sind, ist unklar, aus welchem Grund dieses Gen für eine stabile Plasmidreplikation notwendig ist.

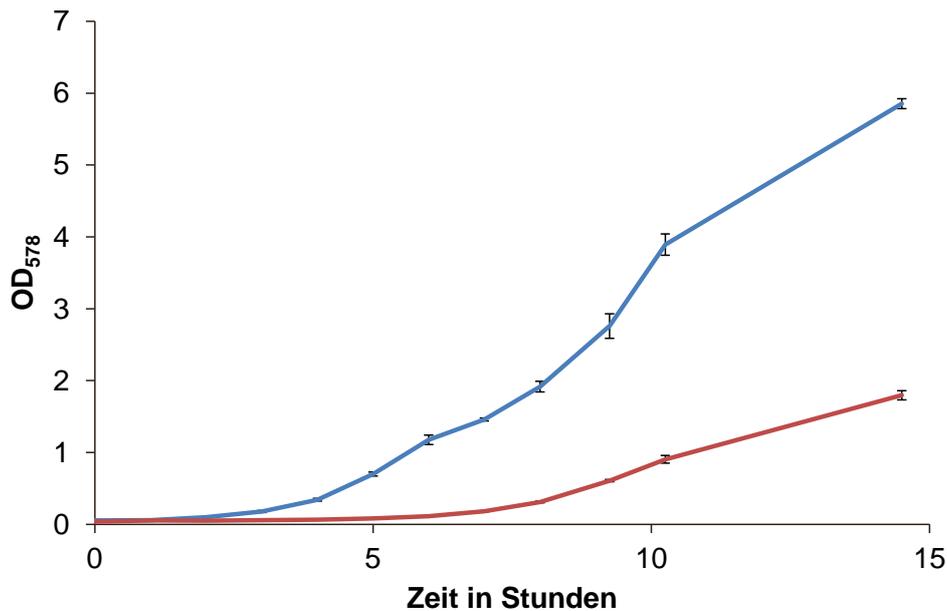


Abbildung 10: Effekt des *mob*-Gens auf das Wachstum von *Z. palmarum*. Wachstumskurven von *Z. palmarum* pMATE-EstA_{Ara}, das kein *mob*-Gen enthält (rot) sowie *Z. palmarum* pMATE_{mob}-EstA_{Ara}, das ein *mob*-Gen enthält (blau). Es wurden jeweils 20 mL ZP-Medium mit entsprechenden Vorkulturen auf eine OD₅₇₈ von 0,01 eingestellt und für 15 Stunden bei 30 °C, 60 rpm inkubiert.

1.2 Expression des MATE-EstA Fusionsproteins

Um die Funktionalität des in *Z. mobilis* und *Z. palmarum* bislang noch nicht verwendeten araBAD Promotors sowie die korrekte Expression des MATE-Fusionsproteins zu prüfen, wurden Flüssigkulturen von *Z. mobilis* pMATE_{mob}-EstA_{Ara} und *Z. palmarum* pMATE_{mob}-EstA_{Ara} angesetzt, und zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5 mit 0,2% L-Arabinose als Induktor des araBAD Promotors versetzt. Nach einer Stunde weiterer Kultivierung wurden die Bakterienkulturen zentrifugiert und die Außenmembranproteine der sedimentierten Zellen nach einem Protokoll von Park *et al.* (2015) isoliert. Als Kontrolle wurde diese Prozedur ohne Zugabe von L-Arabinose sowie mit den jeweiligen Stämmen ohne Plasmid durchgeführt. Die isolierten Außenmembranproteine wurden anschließend mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Nach Färbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue war in der Probe von *Z. palmarum* pMATE_{mob}-EstA_{Ara} Zellen, bei denen die Proteinexpression durch Zugabe von L-Arabinose induziert wurde, eine stark ausgeprägte Bande auf Höhe von ca. 100 kDa sichtbar (Abbildung 11A, Spur 3). Eine Bande auf selber Höhe war ebenfalls in Proben von *Z. mobilis* pMATE_{mob}-EstA_{Ara} Zellen, bei denen die Proteinexpression induziert wurde,

auszumachen, allerdings mit wesentlich geringerer Intensität (Abbildung 11C, Spur 3). Da diese Banden weder in Proben der jeweiligen Stämme ohne Plasmid, noch in Proben der Zellen, die ohne L-Arabinose kultiviert wurden, sichtbar waren, und ihre Laufhöhe in etwa dem berechneten Molekulargewicht des Fusionsproteins ohne Signalpeptid von 91,2 kDa entsprach, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Proteinbanden um das rekombinante MATE-EstA-Fusionsprotein handelte. Daraufhin wurden die elektrophoretisch getrennten Außenmembranproteine mit Renaturierungspuffer behandelt, und im Anschluss mit einer Kombination aus α -Naphthylacetat und dem Farbstoff FastBlueRR behandelt, um Proteinbanden mit esterolytischer Aktivität selektiv zu färben (Schultheiss *et al.*, 2002). Mit diesem Vorgehen konnten Proteinbanden derselben Laufhöhe wie die in der Coomassie-Färbung als rekombinante Fusionsproteine ausgemachten Banden detektiert werden (Abbildung 11B und 10D, Spur 3).

Insgesamt lassen diese Experimente den Schluss zu, dass 1) sowohl *Z. mobilis* als auch *Z. palmae* das durch pMATE_{mob}-EstA_{Ara} kodierte Fusionsprotein nach Induktion mit L-Arabinose exprimiert haben, 2) dieses Protein, vermutlich aufgrund der Erkennung des N-terminalen CtxB-Signalpeptides, in den periplasmatischen Raum transportiert und anschliessend in die äußere Membran beider Organismen inkorporiert wurde. und 3) die Außenmembran von *Z. palmae* eine deutlich höhere Menge des Fusionsproteins enthielt als die Außenmembran von *Z. mobilis*. Darüber hinaus konnte durch Sichtbarmachung der den Fusionsproteinen zugeordneten Proteinbanden mittels Esterase-Aktivitätsfärbung ein erster Hinweis auf die Funktionalität von EstA gewonnen werden.

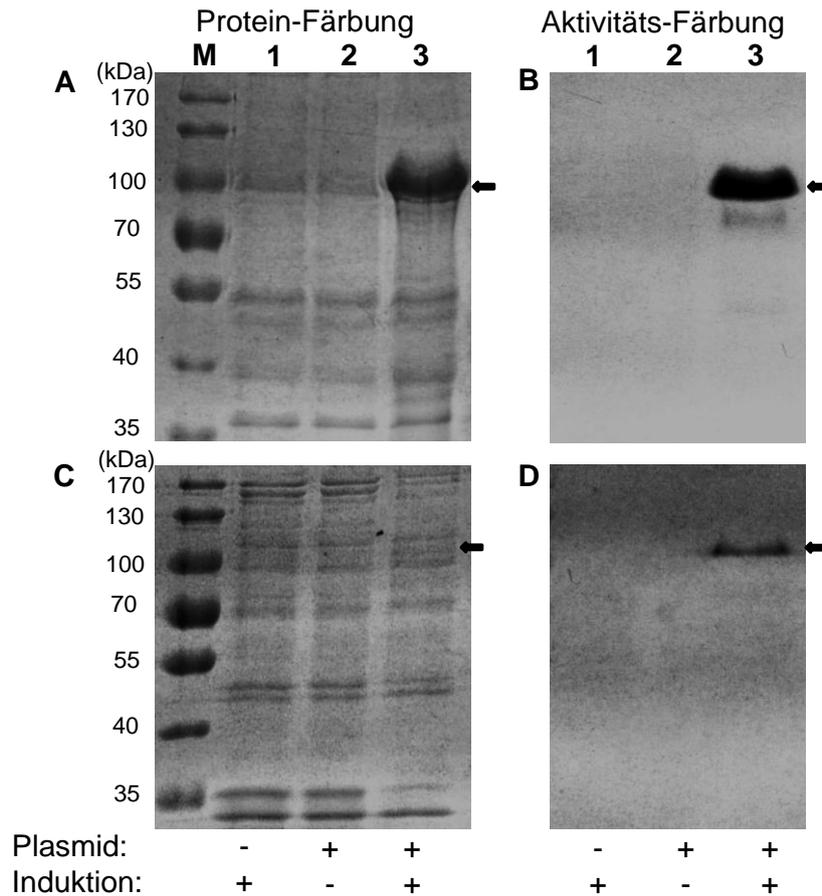


Abbildung 11: Expression und Lokalisation des MATE-EstA-Fusionsproteins in *Z. palmae* und *Z. mobilis*. SDS-PAGE von Außenmembranproteinen aus *Z. palmae* (A, B) und *Z. mobilis* (C, D), die mit Coomassie (A, C) bzw. Esteraseaktivitätsfärbung (B, D) angefärbt wurden. **M:** Größenmarker. **1:** Zellen ohne Plasmid. **2:** Zellen mit Plasmid pMATE_{mob}-EstA_{Ara}, die ohne Induktion der Proteinexpression kultiviert wurden. **3:** Zellen mit Plasmid pMATE_{mob}-EstA_{Ara}, bei denen die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert wurde. Die Außenmembranproteinisolierung wurde nach einem Protokoll von Park *et al.* (2015) durchgeführt. Das rekombinante Fusionsprotein ist jeweils mit einem Pfeil markiert.

1.3 Prüfung der Oberflächenpräsentation

1.3.1 Ganzzell-ELISA

Um zu prüfen, ob der AT-Sekretionsmechanismus in *Z. palmae* und *Z. mobilis* funktioniert und die Esterase als Passagierdomäne des MATE-Fusionsproteins tatsächlich an der Zelloberfläche der beiden Spezies präsentiert wurde, wurde ein enzymgekoppelter, immunologischer Nachweis (ELISA) mit ganzen Zellen nach Petermann *et al.* (2010) durchgeführt. Hierbei wird die Tatsache genutzt, dass Antikörper zu groß sind, um durch Zellmembranen zu diffundieren, so dass eine Bindung an ein Epitop nur stattfinden kann, wenn dieses außerhalb der Zelle zugänglich ist. Dazu wurden *Z. palmae*- und *Z. mobilis*- Zellen, die das Plasmid pMATE_{mob}-EstA_{Ara} trugen bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5 kultiviert, die

Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert und für eine weitere Stunde kultiviert. Nach Zentrifugation der Kulturen wurden die sedimentierten Zellen in PBS suspendiert und die Suspensionen auf eine OD₅₇₈ von 0,2 eingestellt. Jeweils 100 µL dieser Zellsuspensionen wurden in die Kavitäten einer 96-well Maxisorp®-Platte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert, um eine Anhaftung der Zellen an der Oberfläche der Kavitäten zu erreichen. Für die Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Kavitäten anschließend für drei Stunden mit 150 µL einer 10% FCS-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung dieser Lösung wurden die Zellen für eine Stunde mit einem Antikörper behandelt, der gegen das im Fusionsprotein enthaltene 6xHis-Epitop gerichtet ist. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5.000 in PBS eingesetzt. Nach Abwaschen von nicht gebundenem Antikörper mit PBS wurden die Zellen für 45 Minuten mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten, Meeretich-Peroxidase (HRP)-gekoppeltem Zweitantikörper behandelt. Dieser Antikörper wurde in einer 1:10.000-Verdünnung in PBS eingesetzt. Nach erneutem Abwaschen von ungebundenem Antikörper mit PBS konnte dann durch Zugabe von 100 µL 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) eine HRP-katalysierte Farbreaktion induziert werden, die nach 20 Minuten durch Zugabe von 100 µL 2M H₂SO₄ gestoppt und bei 450 nm photometrisch quantifiziert wurde. Als Kontrollen wurden Bakterien der jeweiligen Spezies ohne Plasmid, Bakterien mit Plasmid pBBR1-MCS2, sowie Bakterien mit Plasmid, die ohne Zugabe von L-Arabinose kultiviert wurden, verwendet. Wie in Abbildung 12 dargestellt, war die Farbreaktion bei Zellen, die das MATE-Fusionsprotein exprimierten um den Faktor 4 (*Z. palmae*) bzw. 3 (*Z. mobilis*) intensiver als bei den Kontrollen, was darauf schließen lässt, dass sich das 6xHis-Epitop - und damit auch EstA als Passagierdomäne - außerhalb der Bakterienzellen befand.

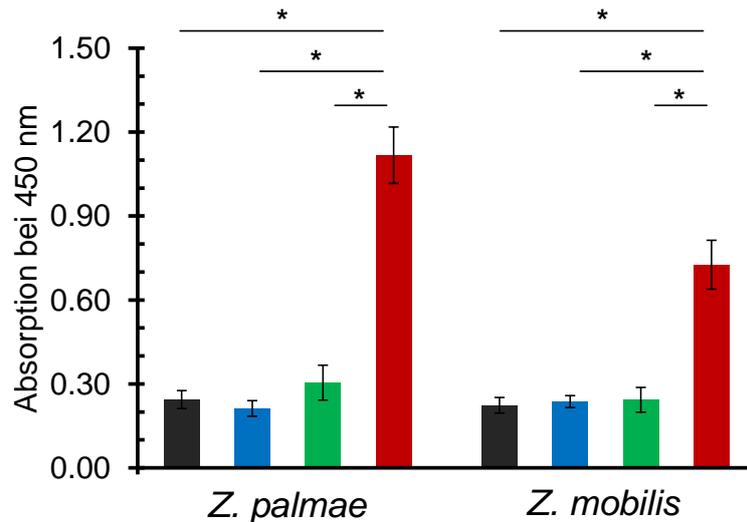


Abbildung 12: Prüfung der Oberflächenständigkeit von EstA bei *Z. palmae* (links) und *Z. mobilis* (rechts) mittels Ganzzell-ELISA. Schwarz: Zellen ohne Plasmid. **Blau:** Zellen mit Plasmid pBBR1-MCS2. **Grün:** Zellen mit Plasmid pMATE_{mob}-EstA_{Ara}, die ohne Induktion der Proteinexpression kultiviert wurden. **Rot:** Zellen mit Plasmid pMATE_{mob}-EstA_{Ara}, bei denen die Proteinexpression durch 0,2% L-Arabinose induziert wurde. Die Zellen wurden auf MaxiSorp-Platten immobilisiert und mit anti-6xHis Antikörper und HRP-gekoppeltem Zweitantikörper behandelt. Durch Inkubation mit TMB wurde eine Farbreaktion induziert, die nach Zugabe von H₂SO₄ bei 450 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader quantifiziert wurde. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch ungepaarte t-Tests analysiert, *p < 0.05, n = 3.

1.3.2 Durchflusszytometrie

Zur Verifizierung der im Abschnitt zuvor beschriebenen experimentellen Ergebnisse wurde die Oberflächenständigkeit der Esterase zusätzlich mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei besteht auch hier das Grundprinzip darin, dass eine Antikörperbindung mit einem an der Passagierdomäne befindlichen Epitop nur dann stattfinden kann, wenn die Passagierdomäne sich auf der Zelloberfläche befindet, d.h. wenn die Faltung des β -Fasses in die äußere Membran und die „Fädung“ von Verbindungsregion und Passagierdomäne durch das β -Fass korrekt verlaufen sind. Zu diesem Zweck wurden *Z. mobilis* pMATE_{mob}-EstA_{Ara} und *Z. palmae* pMATE_{mob}-EstA_{Ara} wie beschrieben kultiviert und die Proteinexpression für eine Stunde mit 0,2% L-Arabinose induziert. Nach Zentrifugation der Kulturen wurden die sedimentierten Zellen dann in PBS suspendiert und die Suspensionen auf eine OD₅₇₈ von 0,4 eingestellt. Jeweils 1 mL dieser Suspensionen wurden erneut zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in 100 μ L einer 1:50-verdünnten anti-6xHis Antikörper-Lösung suspendiert. Nach Abwaschen von nicht gebundenen Antikörpern mit PBS wurden die Zellen dann in 100 μ L einer 1:50-verdünnten Lösung eines DyLight-633-gekoppeltem Zweitantikörpers, der gegen den anti-6xHis Antikörper gerichtet ist, inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper erneut mit PBS

abgewaschen, die Zellen in 500 μ L PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer vermessen. Durch Bestrahlung mit einem Laser kann DyLight-633 zur Fluoreszenz angeregt werden, dessen Intensität im Durchflusszytometer für eine große Anzahl von Zellen individuell quantifiziert werden kann. Die Fluoreszenzintensität einer Zelle ist abhängig von der Anzahl der an ihr gebundenen Antikörper und damit von der Anzahl an Epitopen an der Zelloberfläche. Wie den Histogramm-Plots in Abbildung 13 zu entnehmen ist, wurde bei Zellen, die MATE-EstA exprimierten, eine signifikant höhere gemittelte Fluoreszenzintensität (mF, *Z. palmae*: 150,1; *Z. mobilis*: 291,0) gemessen als bei Zellen mit Plasmid pBBR1-MCS2 (*Z. palmae*: 4,7; *Z. mobilis*: 4,6) und Zellen ohne Plasmid (*Z. palmae*: 4,7; *Z. mobilis*: 5,1), was einen deutlichen Hinweis auf die Oberflächenpräsentation der Esterase darstellt. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass sich das 6xHis-Epitop am N-Terminus der Passagierdomäne befindet (Abbildung 9), und somit gemäß dem Modell der AT-Sekretion zuerst zur Oberfläche der Wirtszelle transloziert wird, gefolgt von der C-terminal des Epitops gelegenen Passagierdomäne (Abbildung 7). Es ist also prinzipiell denkbar, dass ausschließlich das 6xHis-Epitop oder nur ein Teil der Passagierdomäne tatsächlich auf der Zelloberfläche präsentiert wurde, weil die Sekretion nicht vollständig abgelaufen ist. Diese Möglichkeit könnte durch Verwendung eines C-terminal der Passagierdomäne befindlichen Epitops, das erst hinter der Passagierdomäne aus dem β -Fass austritt, ausgeschlossen werden. In diesem Falle würde eine Bindung des Antikörpers an das Epitop die vollständige Translokation der Passagierdomäne anzeigen.

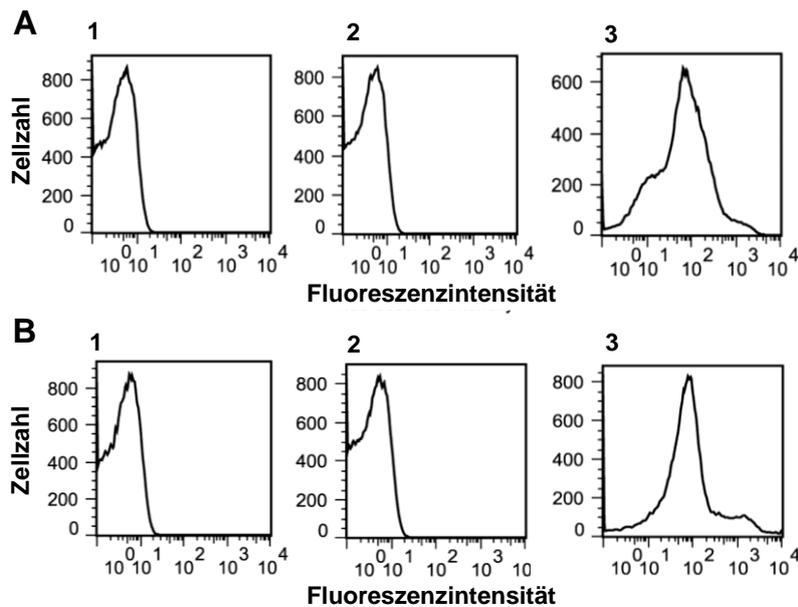


Abbildung 13: Untersuchung der Oberflächenständigkeit von EstA bei *Z. palmae* (A) und *Z. mobilis* (B) mittels Durchflusszytometrie. 1: Zellen ohne Plasmid. 2: Zellen mit Plasmid pBBR1-MCS2. 3: Zellen, die MATE-EstA exprimieren. Die Zellen wurden nach Kultivierung und Induktion der Proteinexpression in PBS suspendiert und die Suspensionen auf eine OD_{578} von 0,4 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen mit anti-6xHis Antikörper und DyLight-633-gekoppeltem Zweitantikörper behandelt. Es wurden 50.000 Zellen pro Probe vermessen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt und über einen 660/20 nm Bandpassfilter detektiert.

1.4 Untersuchung der Esteraseaktivität ganzer Zellen

Um festzustellen, ob EstA auf der Oberfläche von *Z. palmae* und *Z. mobilis* in ihrer funktionellen Konformation vorlag, wurden Zellen, die MATE-EstA exprimierten, einem Esteraseaktivitätstest unterzogen. Als Vergleichsspezies wurde *E. coli* eingesetzt, auf welcher EstA bereits in einer vorangegangenen Arbeit erfolgreich oberflächenpräsentiert werden konnte (Schultheiss *et al.*, 2002). Dazu wurden die jeweiligen Zellen wie beschrieben kultiviert, die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert, und die Kultur nach weiterer Kultivierung für eine Stunde zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden dann in Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) suspendiert und die Zellsuspensionen auf eine OD_{578} von 0,5 eingestellt. Anschließend wurden jeweils 20 μ L der Zellsuspensionen mit 180 μ L 4-Nitrophenylacetat-Lösung vermengt, für zwanzig Minuten bei 30 °C inkubiert und das gebildete 4-Nitrophenol photometrisch bei 405 nm quantifiziert (Abbildung 14). Es wurden Zellen ohne Plasmid, Zellen, die ein Protein ohne esterolytische Aktivität präsentierten, Zellen mit oberflächenpräsentierter Esterase sowie der Zellüberstand dieser Zellen vermessen. Alle drei Spezies mit oberflächenpräsentierter Esterase zeigten eine signifikant höhere enzymatische Aktivität gegenüber 4-Nitrophenylacetat

als die Kontrollen. Dabei fällt besonders auf, dass *Z. palmae* mit 294 mU/mL/OD₅₇₈1 eine mehr als doppelt so hohe Hydrolyserate aufwies als *E. coli* mit 113 mU/mL/OD₅₇₈1. Das ist umso bemerkenswerter, als dass der genutzte *E. coli*-Stamm BL21 im Gegensatz zu *Z. palmae* und *Z. mobilis* einer Reihe genetischer Modifikationen unterzogen ist, die u.a. auf eine verbesserte Proteinexpression abzielen. Weiterhin ist das durch pMATE_{mob}-EstA_{Ara} kodierte Fusionsprotein zu weiten Teilen der Kodon-Nutzung von *E. coli* angepasst, wodurch die Proteinexpression in diesem Organismus nicht durch sein tRNA-Repertoire limitiert und daher stärker ausgeprägt als in *Z. palmae* bzw. *Z. mobilis* sein sollte. Im Vergleich zu *E. coli* und *Z. palmae* übte *Z. mobilis* mit 88 mU/mL/OD₅₇₈1 eine niedrigere Esteraseaktivität aus. Das stimmt mit der Beobachtung überein, dass *Z. mobilis* offensichtlich eine wesentlich geringere Menge an MATE-EstA-Fusionsprotein in der Außenmembran enthielt als *Z. palmae* (Abbildung 11).

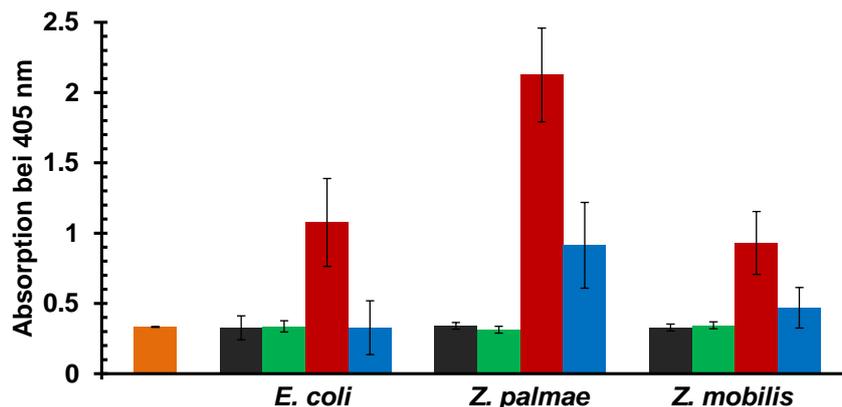


Abbildung 14: Aktivitätsbestimmung der oberflächenpräsentierten Esterase EstA mit 4-Nitrophenylacetat als Substrat. Als Wirtsorganismus wurde *E. coli* (links), *Z. palmae* (Mitte) und *Z. mobilis* (rechts) verwendet. **Orange:** Keine Zellen. **Schwarz:** Zellen ohne Plasmid. **Grün:** Zellen, die ein Protein ohne esterolytische Aktivität präsentieren. **Rot:** Zellen mit oberflächenpräsentierter Esterase. **Blau:** Zellüberstand dieser Zellen. Es wurden jeweils 20 µL einer Zellsuspension mit einer OD₅₇₈ von 0,5 mit 180 µL 4-Nitrophenylacetat vermischt und die Absorption bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader nach 20 Minuten gemessen.

Der Überstand von *Z. palmae* Zellen mit oberflächenpräsentierter Esterase wies eine relativ hohe Enzymaktivität auf, so dass davon ausgegangen werden muss, dass ein gewisser Anteil des Enzyms nicht an die Zelloberfläche gebunden, sondern in freier Form vorlag. Um festzustellen, ob die teilweise Freisetzung der Esterase auf eine mangelnde Zellintegrität aufgrund der Expression des MATE-EstA-Fusionsproteins zurückzuführen ist, wurde ein Zellysetest nach Sevastyanovich *et al.* (2012) durchgeführt. Dazu wurden *Z. palmae* Zellen, die das Fusionsprotein exprimierten, Zellen, bei denen die Proteinexpression nicht induziert wurde, sowie Zellen, bei

denen durch 5-minütige Behandlung mit Lysozym versucht wurde, die Außenmembranintegrität zu schädigen, für 25 Minuten mit 4-Nitrophenylphosphat inkubiert. Dieses Substrat kann nicht durch die oberflächenpräsentierte Esterase gespalten werden, wird aber durch im Periplasma der Zellen befindliche Phosphatasen zu 4-Nitrophenol umgesetzt. Die Entstehung dieses Produktes, das bei 405 nm photometrisch quantifiziert werden kann, gibt daher Aufschluss über die räumliche Verbindung zwischen Periplasma und Reaktionsraum und damit auf eine mögliche Beschädigung der Außenmembran. Wie in Abbildung 15 zu erkennen ist, entstand bei mit Lysozym behandelten Zellen eine deutlich höhere Menge 4-Nitrophenol als bei nicht mit Lysozym behandelten Zellen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Lysozymbehandlung die äußere Membran der Zellen tatsächlich geschädigt hat. Zwischen Zellen, die das MATE-EstA-Fusionsprotein exprimierten und Zellen, die kein rekombinantes Protein produzierten, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der kontinuierliche, leichte Anstieg der Absorption in beiden Proben ist durch die Diffusion des Substrates in den periplasmatischen Raum und/oder durch Autohydrolyse des Substrates zu erklären. Die Freisetzung von EstA von *Z. palmae* Zellen wurde also offensichtlich nicht durch Zelllyse verursacht. Eine Freisetzung des Enzyms durch oberflächenständige Proteasen ist naheliegend, da bei *Z. palmae* und *Z. mobilis*, im Gegensatz zu *E. coli* BL21, keine Deletion von Außenmembranproteasen bekannt ist. Damit einhergehend konnte im Überstand von *E. coli* BL21 keine Esteraseaktivität detektiert werden.

Insgesamt lassen diese Experimente den Rückschluss zu, dass die Expression des MATE-EstA-Fusionsproteins in beiden untersuchten Spezies zur Oberflächenpräsentation einer hydrolytisch aktiven Esterase geführt hat.

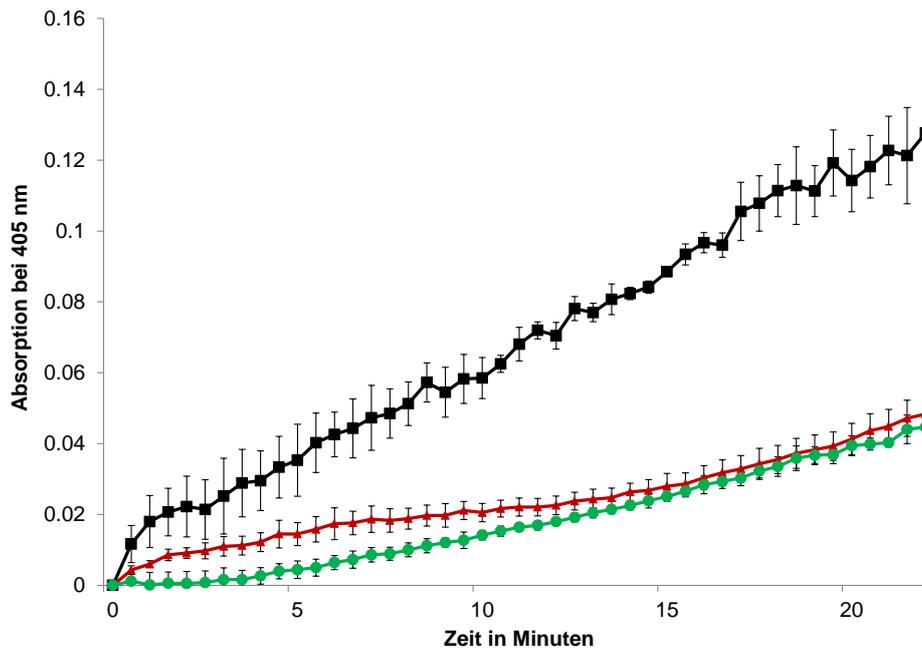


Abbildung 15: Zellysetest zur Prüfung der Integrität von *Z. palmae* Zellen bei Expression des MATE-EstA-Fusionsproteins. Schwarz: Zellen, die vor dem Testverfahren für 5 Minuten mit Lysozym behandelt wurden. **Rot:** Zellen, die ohne Induktion der Proteinexpression kultiviert wurden. **Grün:** Zellen, in denen die Expression des rekombinanten Fusionsproteins durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert wurde. Die Zellen wurden mit 4-Nitrophenylphosphat inkubiert, das durch periplasmatische Phosphatasen zu 4-Nitrophenol umgesetzt wird. Es wurden jeweils 20 μ L einer Zellsuspension mit einer OD_{578} von 0,5 mit 180 μ L 4-Nitrophenylacetat vermischt und die Veränderung der Absorption bei 405 nm verfolgt.

2 Autodisplay der bakteriellen β -Glucosidase BglA

Das Gram-positive Stäbchenbakterium *Clostridium thermocellum* exprimiert eine Reihe potenter cellulolytischer Enzyme, die es der Spezies erlauben, auf Cellulose als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen (Bayer *et al.*, 1983). Darunter wurde die β -Glucosidase BglA identifiziert, die Homologien zu vielen bakteriellen β -Glucosidasen aufweist (Grabnitz *et al.*, 1991). Um herauszufinden, ob die Oberflächenpräsentation von bakteriellen β -Glucosidasen mittels AT-Sekretionsweg auf *Z. palmae* möglich ist, wurde dieses Enzym zur Expression in Form eines MATE-Fusionsproteins ausgewählt.

2.1 Konstruktion und Expression von MATE-BglA

Das für BglA kodierende Gen *bglA* (GenBank: X60268) wurde von Start- und Stopp-Kodons befreit, am 5'-Ende mit einer XhoI- und am 3'-Ende mit einer KpnI-Restriktionsschnittstelle versehen und in dieser Form synthetisiert. Das Gen wurde nach Restriktionsverdau mit XhoI und KpnI mit den ebenso geschnittenen Plasmiden pMATE_{mob}-EstA_{Ara} und pMATE-EstA_{Ara} ligiert, so dass die resultierenden Plasmide

pMATE_{mob}-BglA_{Ara} bzw. pMATE-BglA_{Ara} ein Protein kodieren, das aus N-terminalem Signalpeptid, 6xHis-Epitop, BglA als Passagierdomäne und C-terminaler Transporteinheit des EhaA-AT besteht (Abbildung 16).

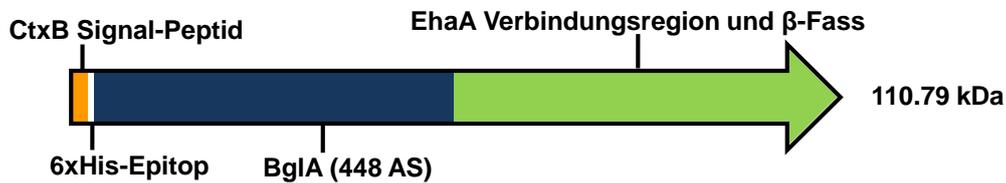


Abbildung 16: Domänenstruktur des durch pMATE_{mob}-BglA_{Ara} und pMATE-BglA_{Ara} kodierten Fusionsproteins bestehend aus CtxB Signalpeptid (**orange**), 6xHis-Epitop (**weiß**), β -Glucosidase BglA (**blau**) und EhaA Transporteinheit (**grün**). Die Länge der Passagierdomäne ist in Aminosäuren (**AS**) angegeben, das berechnete Molekulargewicht des gesamten Fusionsproteins ist in Kilodalton (**kDa**) angegeben.

Das Plasmid pMATE_{mob}-BglA_{Ara} wurde in *Z. palmae* und pMATE-BglA_{Ara} in *P. putida* eingebracht, die Zellen wie beschrieben kultiviert und die Proteinexpression induziert. Nach der Zellernte wurden die Außenmembranproteine der Zellen isoliert und mittels SDS-PAGE analysiert. In Proben von *Z. palmae* Zellen, die das Plasmid pMATE_{mob}-BglA_{Ara} enthielten und bei denen die Proteinexpression induziert wurde, war eine deutliche Proteinbande zu erkennen, deren Laufhöhe bei ca. 100 kDa mit dem berechneten Molekulargewicht des Fusionsproteins von 108,5 kDa (ohne Signalpeptid) korrespondiert (Abbildung 17, Spur 1). Im Außenmembranproteinisolat von *P. putida*-Zellen mit pMATE-BglA, bei denen die Proteinexpression induziert wurde, war ebenfalls eine Proteinbande auf gleicher Laufhöhe zu erkennen (Abbildung 18, Spur 2a). Diese Bande war bei Färbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue nur schwach erkennbar, so dass diese Probe zusätzlich mittels Western Blot unter Verwendung eines anti-6xHis Antikörpers analysiert wurde (Spur 2b). Damit konnte in einer Bande gleicher Laufhöhe ein Protein mit 6xHis-Epitop identifiziert werden. Beide Spezies exprimierten demnach das gewünschte MATE-BglA-Fusionsprotein.

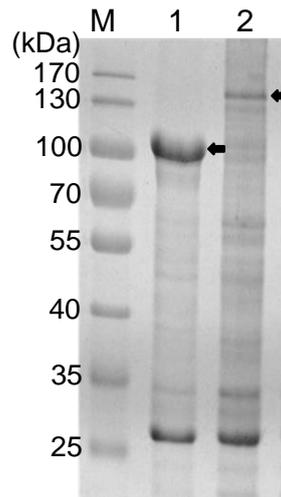


Abbildung 17: Expression und Lokalisierung von MATE-Fusionsproteinen in *Z. palmae*. Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE von *Z. palmae* Außenmembranproteinisolaten. **M:** Größenmarker. **1:** Zellen mit pMATE_{mob}-BglA_{Ara}. **2:** Zellen mit pMATE_{mob}-CelK_{Ara}. Die Zellen wurden wie beschrieben kultiviert, die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert und eine Außenmembranproteinisolierung nach Park *et al.* (2015) durchgeführt. Die rekombinanten Fusionsproteine sind mit Pfeilen markiert.

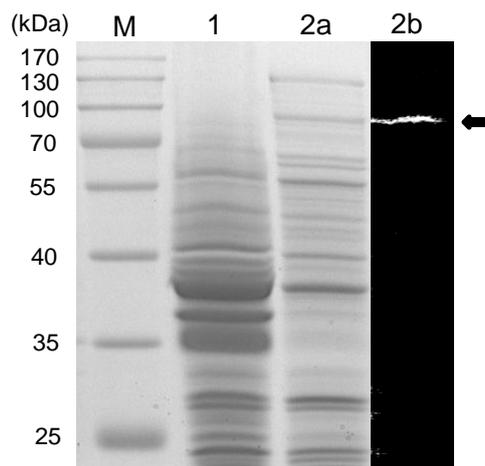


Abbildung 18: Expression und Lokalisierung von MATE-BglA in *P. putida*. Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE und Western Blot von *P. putida* Außenmembranproteinisolaten **M:** Größenmarker. **1:** Coomassie-gefärbte Proben von Zellen mit pMATE-BglA_{Ara}, die ohne Induktion der Proteinexpression kultiviert wurden. **2a:** Coomassie-gefärbte Proben von Zellen mit pMATE-BglA_{Ara}, bei denen die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert wurde. **2b:** Western Blot der Proben aus 2a mit anti-6xHis Antikörper. Die Außenmembranproteinisolierung wurde nach einem Protokoll von Park *et al.* (2015) durchgeführt. Das rekombinante Fusionsprotein ist mit einem Pfeil markiert.

2.2 Prüfung der Oberflächenpräsentation

Um festzustellen, ob die Expression von BglA als Teil eines MATE-Fusionsproteins zur Oberflächenpräsentation des Enzyms geführt hat, wurden durchflusszytometrische Analysen von *Z. palmae* und *P. putida*-Zellen, die MATE-BglA exprimierten, durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien wie beschrieben

kultiviert, die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose für zwei Stunden induziert, und die Bakterien durch Zentrifugation vom Kulturmedium entfernt. Die Zellen wurden anschließend in PBS suspendiert und die Zellsuspensionen auf eine OD_{578} von 0,5 eingestellt. Jeweils 1 mL dieser Zellsuspensionen wurde dann zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in 100 μ L einer anti-6xHis Antikörper-Lösung (1:50-Verdünnung) suspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen nach erneuter Zentrifugation in 100 μ L einer 1:50-verdünnten Lösung eines gegen den ersten Antikörper gerichteten, DyLight-633-gekoppelten Zweitantikörpers suspendiert. Als Kontrollen wurden die jeweiligen Spezies ohne Plasmid identisch behandelt und analysiert. Wie aus den Histogramm-Plots ersichtlich ist (Abbildung 19, Abbildung 20), wiesen sowohl *P. putida* als auch *Z. palmae* bei Expression von MATE-BglA eine erhöhte mF im Vergleich zu den Kontrollen auf (*P. putida*: 370 im Vergleich zu 82, *Z. palmae*: 425 im Vergleich zu 66). Dabei fällt auf, dass im Gegensatz zu den Kontrollen keine Normalverteilung der Fluoreszenzintensität der Zellen auftrat. Stattdessen war eine Population mit erhöhter mF und eine Population mit einer mF in der Größenordnung der Kontrollen erkennbar. Ob es sich bei letzterer Population um Zellen handelt, die kein AT-Fusionsprotein exprimiert haben, oder um Zellen, die das Protein zwar exprimiert haben, aber nicht mit Antikörpern markiert wurden, konnte nicht abschließend aufgeklärt werden. Da die beschriebenen Experimente in dieser Arbeit zum ersten Mal mit *P. putida* und *Z. palmae* als Wirtsorganismen durchgeführt wurden, liegen keine durchflusszytometrischen Analysen als Vergleich vor. In dieser Arbeit wurde daher jeweils die mF der Gesamtheit an analysierten Zellen bestimmt. Unabhängig davon deuten die erhobenen Daten darauf hin, dass die Expression von BglA in Form eines AT-Fusionsproteins in beiden untersuchten Wirtsorganismen zur Oberflächenpräsentation des Enzyms geführt hat.

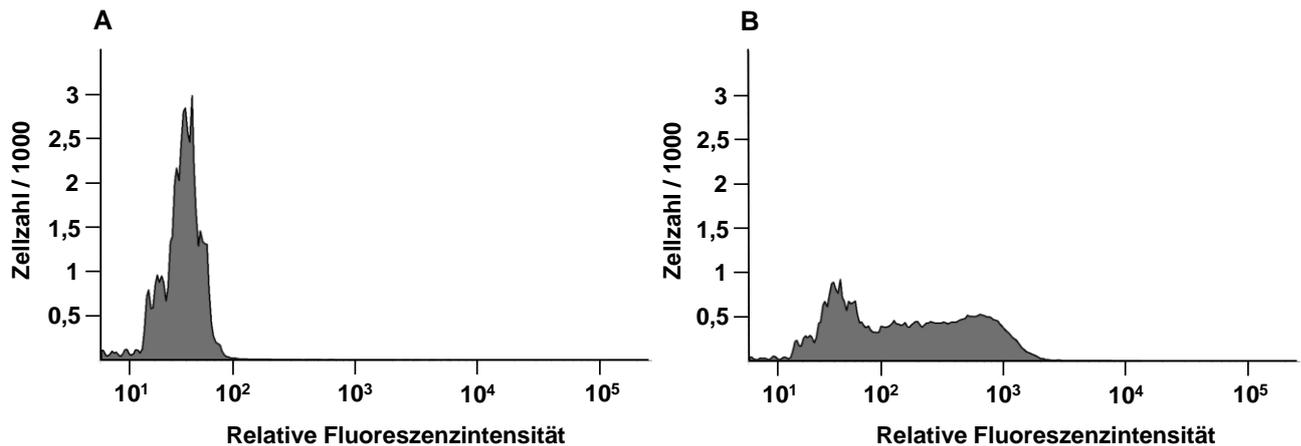


Abbildung 19: Untersuchung der Oberflächenpräsentation von BglA in *P. putida* mittels Durchflusszytometrie. Histogramm-Plots von *P. putida*-Zellen, die kein rekombinantes Protein exprimieren (A) sowie von Zellen, die MATE-BglA exprimieren (B). Die Zellen wurden nach Kultivierung und Induktion der Proteinexpression in PBS suspendiert und die Zellsuspensionen auf eine OD_{578} von 0,4 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen mit anti-6xHis Antikörper und DyLight-633-gekoppeltem Zweitantikörper behandelt. Es wurden 50.000 Zellen je Probe vermessen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt und über einen 660/20 nm Bandpassfilter detektiert.

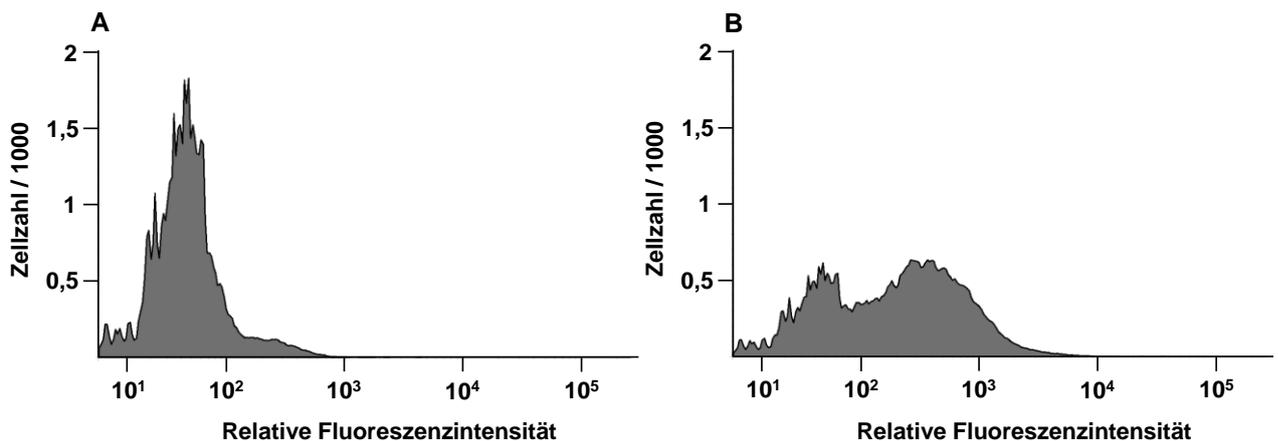


Abbildung 20: Untersuchung der Oberflächenpräsentation von BglA in *Z. palmae* mittels Durchflusszytometrie. Histogramm-Plots von *Z. palmae* Zellen, die kein rekombinantes Protein exprimieren (A) sowie von Zellen, die MATE-BglA exprimieren (B). Die Zellen wurden nach Kultivierung und Induktion der Proteinexpression in PBS suspendiert und die Zellsuspensionen auf eine OD_{578} von 0,4 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen mit anti-6xHis Antikörper und DyLight-633-gekoppeltem Zweitantikörper behandelt. Es wurden 50.000 Zellen je Probe vermessen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt und über einen 660/20 nm Bandpassfilter detektiert.

2.3 Untersuchungen zur hydrolytischen Aktivität von BglA

Zur Untersuchung der Funktionalität der auf *P. putida* und *Z. palmae* präsentierten β -Glucosidase BglA wurde ein kolorimetrischer Aktivitätstest mit 4-Nitrophenyl- β -D-Glukopyranosid (pNPG) als Substrat durchgeführt. Die hydrolytische Spaltung dieses Glykosids führt zur Freisetzung von 4-Nitrophenol, das einen hohen

Absorptionskoeffizienten bei 405 nm aufweist und dadurch eine Gelbfärbung der Lösung verursacht. Die Zersetzung des Substrates kann so photometrisch verfolgt werden und gibt Aufschluss über die hydrolytische Aktivität des Enzyms. Zu diesem Zweck wurden *P. putida*-Zellen, die pMATE-BglA_{Ara} trugen sowie *Z. palmae*-Zellen, die pMATE_{mob}-BglA_{Ara} trugen, wie beschrieben kultiviert und bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5 die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert. Nach weiterer Kultivierung für zwei Stunden wurden die Bakterienkulturen zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in 0,1 M Natriumcitratpuffer (pH 6) suspendiert. Die OD₅₇₈ der Zellsuspensionen wurde auf 25 (*Z. palmae*) bzw. 20 (*P. putida*) eingestellt. Diese unterschiedlichen Reaktionsbedingungen waren der in Vorexperimenten festgestellten, unterschiedlich hohen hydrolytischen Aktivitäten der beiden Organismen bei Oberflächenpräsentation von BglA geschuldet. Die Erhöhung der OD₅₇₈ bei *Z. palmae* diente der Steigerung der 4-Nitrophenol-Produktion für eine verbesserte Trennung des Absorptionssignals vom Grundrauschen. Jeweils 50 µL dieser Zellsuspensionen wurden dann mit 50 µL einer 10 mM pNPG-Lösung in 0,1 M Natriumcitratpuffer vermischt und bei 55 °C inkubiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die entsprechenden Reaktionsansätze zur Abtrennung der Zellen zentrifugiert und 50 µL des Überstandes mit 50 µL 2 M Na₂CO₃-Lösung vermischt. Anschließend wurde die Absorption der Lösung bei 405 nm photometrisch vermessen. Als Kontrolle wurden Zellen der jeweiligen Spezies eingesetzt, die kein rekombinantes Protein exprimierten. Sowohl Reaktionsansätze mit *Z. palmae* mit oberflächenpräsentierter BglA (Abbildung 21) als auch Reaktionsansätze mit *P. putida* mit oberflächenpräsentierter BglA (Abbildung 22) zeigten eine zeitabhängige Zunahme der Absorption bei 405 nm und damit einen Anstieg der 4-Nitrophenol-Konzentration in der Reaktionslösung. Da in den Kontrollen keine Erhöhung der Absorption festzustellen war, kann die Hydrolyse von pNPG auf die enzymatische Aktivität der oberflächenpräsentierten BglA zurückgeführt werden. Die C-terminale Fusion des Proteins mit der Transporteinheit des EhaA-AT-Proteins und die Oberflächenpräsentation des Enzyms verhinderten also offensichtlich nicht die Faltung des Enzyms in eine katalytisch aktive Konformation. Beim Vergleich der Reaktionen von *P. putida* und *Z. palmae* Zellen mit oberflächenpräsentierter BglA fällt auf, dass bei Verwendung von Ersterem als Wirtsorganismus eine deutlich stärkere Absorptionssteigerung zu beobachten war, woraus gefolgert werden kann, dass *P. putida*-Zellen entweder eine höhere Anzahl an Enzymen auf ihrer Oberfläche

trugen, oder dass die Enzyme auf der Oberfläche von *P. putida* eine höhere Aktivität aufwiesen als auf der Oberfläche von *Z. palmae*. Unter Zugrundelegung eines linearen Bereichs der Absorptionssteigerung von 0 bis 60 Minuten (*Z. palmae*) bzw. 5 bis 15 Minuten (*P. putida*) und Einrechnung der OD_{578} der eingesetzten Zellsuspensionen wurde mithilfe einer 4-Nitrophenol-Kalibrationsreihe (Daten nicht gezeigt) die Aktivität von *Z. palmae* mit oberflächenpräsentierter BglA zu $0,09 \text{ mU/mL/OD}_{578}1$ berechnet, während *P. putida* eine mehr als fünfmal so hohe Aktivität von $0,50 \text{ mU/mL/OD}_{578}1$ aufwies.

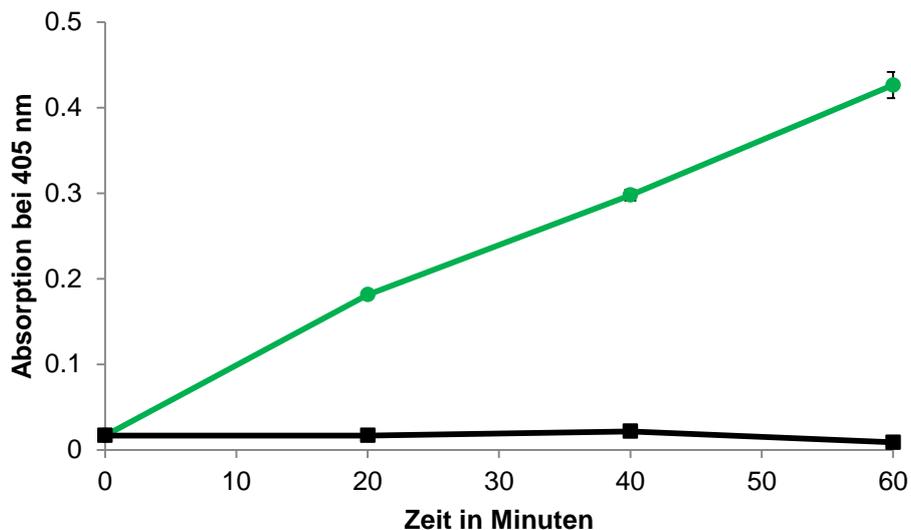


Abbildung 21: Hydrolyse von 4-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid durch *Z. palmae* mit oberflächenpräsentierter β -Glucosidase BglA. Grüne Kreise: Zellen mit oberflächenpräsentierter BglA. **Schwarze Rechtecke:** Zellen ohne Plasmid. Die Zellen wurden in Natriumcitratpuffer, pH 6,0 resuspendiert und die OD_{578} der Zellsuspension auf 25 eingestellt. Die Zellen wurden dann mit 5 mM pNPG bei 55 °C inkubiert. An den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen durch Zentrifugation entfernt, 50 μ L des Überstandes mit 50 μ L 2M Na_2CO_3 -Lösung versetzt und die Absorption bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen.

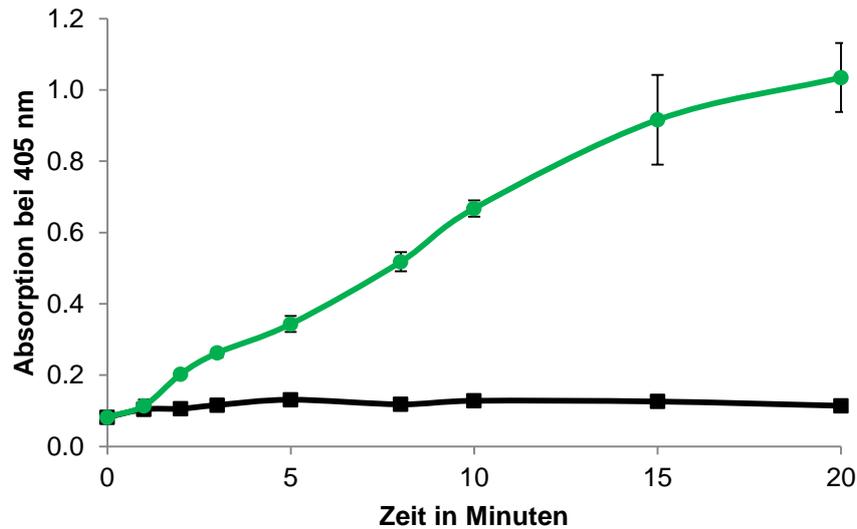


Abbildung 22: Hydrolyse von 4-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid durch *P. putida* mit oberflächenpräsentierter β -Glucosidase BglA. Grüne Kreise: Zellen mit oberflächenpräsentierter BglA. **Schwarze Rechtecke:** Zellen ohne Plasmid. Die Zellen wurden in Natriumcitratpuffer, pH 6,0 suspendiert und die OD_{578} der Zellsuspension auf 20 eingestellt. Die Zellen wurden dann mit 5 mM pNPG bei 55 °C inkubiert. An den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen durch Zentrifugation entfernt, 50 μ L des Überstandes mit 50 μ L 2M Na_2CO_3 -Lösung versetzt und die Absorption bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen.

Als wichtige Kenngröße des Ganzzellkatalysators wurde das Temperaturprofil der hydrolytischen Aktivität von *Z. palmae*-Zellen mit oberflächenpräsentierter BglA aufgenommen. Dazu wurde die beschriebene Quantifizierung der β -Glucosidaseaktivität bei Temperaturen von 30 °C bis 80 °C durchgeführt (Abbildung 23). Es ist erkennbar, dass der Ganzzellkatalysator bei ca. 60 °C die höchste Aktivität gegenüber pNPG ausübte. Sowohl bei Erhöhung als auch Erniedrigung der Temperatur um 10 °C fiel die Aktivität bereits stark auf ca. ein Drittel der Maximalaktivität von 0,3 mU/mL/ OD_{578} ab und ging bei weiterer Entfernung vom Temperaturoptimum rasch gegen null. Das oberflächenpräsentierte Enzym wies also ein sehr schmales Temperaturprofil auf.

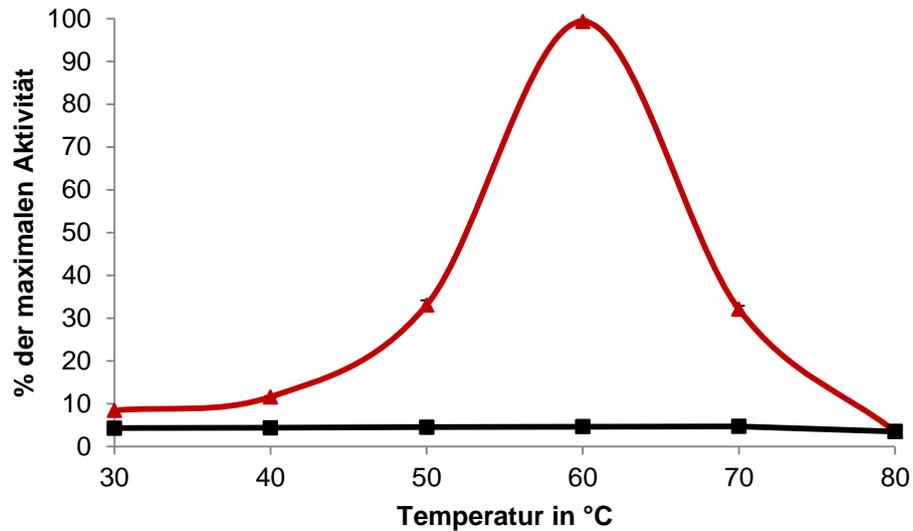


Abbildung 23: Temperaturprofil der hydrolytischen Aktivität von *Z. palmae* mit oberflächenpräsentierter β -Glucosidase BglA. Rote Dreiecke: Zellen mit oberflächenpräsentierter BglA. **Schwarze Rechtecke:** Zellen ohne Plasmid. Die Zellen wurden in Natriumcitratpuffer, pH 6,0 suspendiert und die OD_{578} der Zellsuspension auf 25 eingestellt. Die Zellen wurden dann mit 5 mM pNPG bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Nach 20 Minuten wurden die Zellen entfernt, 50 μ L des Überstandes mit 50 μ L 2M Na_2CO_3 -Lösung versetzt und die Absorption bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen.

3 Autodisplay der bakteriellen Endocellulase Cel5A

Das Gram-positive Stäbchenbakterium *Bacillus subtilis* exprimiert eine Reihe cellulolytischer Enzyme, darunter die Endocellulase Cel5A (Lin *et al.*, 2009) Dieses Enzym wurde ausgewählt, um zu untersuchen, ob eine bakterielle Endocellulase in Form eines MATE-Fusionsproteins oberflächenexprimiert werden kann.

3.1 Konstruktion und Expression von MATE-Cel5A

Das 1479 bp lange, für Cel5A kodierende Gen *EG15* (GenBank: FJ172348) wurde von den ersten 87 bp befreit, da diese ein N-terminales Signalpeptid zur Sekretion des Enzyms kodieren. Dieses Signalpeptid wird zur Oberflächenpräsentation des Enzyms nicht benötigt, da die Sekretion mithilfe des CtxB Signalpeptids erfolgen sollte. Das Stop-Kodon am Ende des Gens wurde ebenfalls entfernt, und flankierende XhoI- bzw. KpnI-Schnittstellen eingefügt. Das Gen wurde in dieser Form synthetisiert und durch Restriktionsverdau und Ligation in die Plasmide pMATE-EstA_{Ara} bzw. pMATE_{mob}-EstA_{Ara} eingefügt. Diese Plasmide kodieren somit für ein Fusionsprotein, das aus N-terminalem Signalpeptid, 6xHis-Epitop, Cel5A anstatt

EstA als Passagierdomäne sowie der Transporteinheit des EhaA-AT am C-Terminus besteht (Abbildung 24).

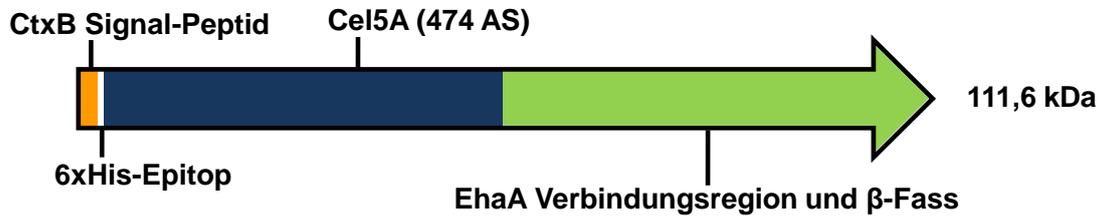


Abbildung 24: Domänenstruktur des durch $pMATE_{mob}\text{-}Cel5A_{Ara}$ und $pMATE\text{-}Cel5A_{Ara}$ kodierten Fusionsproteins bestehend aus CtxB Signalpeptid (**orange**), 6xHis-Epitop (**weiß**), Endocellulase Cel5A (**blau**) und EhaA Transporteinheit (**grün**). Die Länge der Passagierdomäne ist in Aminosäuren (**AS**) angegeben, das berechnete Molekulargewicht des gesamten Fusionsproteins ist in Kilodalton (**kDa**) angegeben.

Die so konstruierten Plasmide $pMATE\text{-}Cel5A_{Ara}$ und $pMATE_{mob}\text{-}Cel5A_{Ara}$ wurden durch Elektroporation in *P. putida* und *Z. palmae* eingebracht, die Zellen kultiviert und nach Erreichen einer OD_{578} von 0,5 für weitere zwei Stunden mit 0,2% L-Arabinose im Nährmedium kultiviert, um die Expression des MATE-Cel5A-Fusionsproteins zu induzieren. Anschließend wurden die Außenmembranproteine der Bakterien isoliert. Als Kontrollen wurden Zellen ohne Plasmid sowie Zellen, die ohne Induktion der Proteinexpression kultiviert wurden, verwendet. Die Proteine wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht (Abbildung 25, Abbildung 26). Daraus ist ersichtlich, dass sowohl *Z. palmae* $pMATE_{mob}\text{-}Cel5A_{Ara}$ als auch *P. putida* $pMATE\text{-}Cel5A_{Ara}$ Zellen, bei denen die Proteinexpression induziert wurde, jeweils eine Proteinbande im Bereich zwischen 100 und 130 kDa aufwiesen, die in den Kontrollen nicht vorhanden waren (Abbildung 25, Spur 3 und Abbildung 26, Spur 2). Dieser Bereich korrespondiert mit dem kalkulierten Molekulargewicht des rekombinanten Fusionsproteins ohne Signalpeptid von 109,4 kDa. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Expression von MATE-Cel5A in beiden Wirtsorganismen stattgefunden hat.

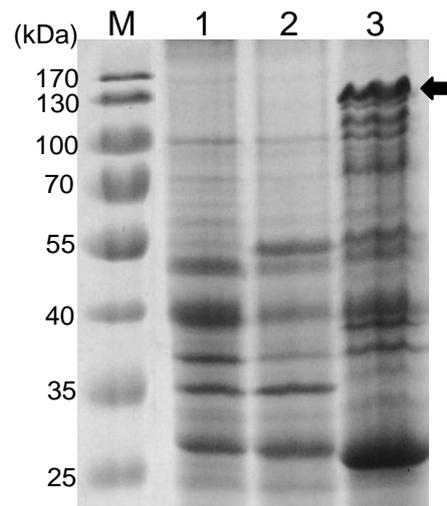


Abbildung 25: Expression und Lokalisation von MATE-Cel5A in *Z. palmae*. Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE von *Z. palmae* Außenmembranproteinisolaten. **M:** Größenmarker. **1:** Zellen ohne Plasmid. **2:** Zellen mit Plasmid pMATE_{mob}-Cel5A_{Ara}, die ohne Induktion der Proteinexpression kultiviert wurden. **3:** Zellen mit Plasmid pMATE_{mob}-Cel5A_{Ara}, bei denen die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert wurde. Die Außenmembranproteinisolierung wurde nach einem Protokoll von Park *et al.* (2015) durchgeführt. Das rekombinante Fusionsprotein ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

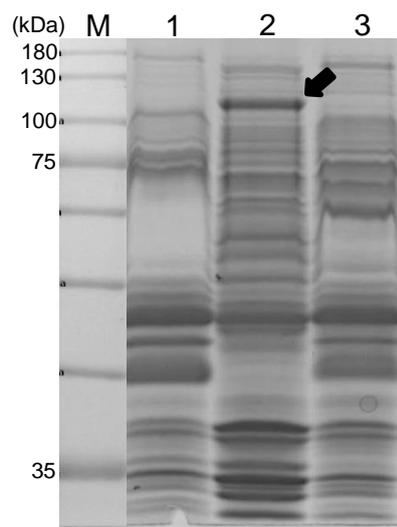


Abbildung 26: Expression und Lokalisation von MATE-Cel5A in *P. putida*. Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE von *P. putida* Außenmembranproteinisolaten. **M:** Größenmarker. **1:** Zellen mit pMATE-Cel5A_{Ara}, die ohne Induktion der Proteinexpression kultiviert wurden. **2:** Zellen mit pMATE-Cel5A_{Ara}, bei denen die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert wurde. **3:** Zellen ohne Plasmid. Die Außenmembranproteinisolierung wurde nach einem Protokoll von Park *et al.* (2015) durchgeführt. Das rekombinante Fusionsprotein ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

3.2 Prüfung der Oberflächenständigkeit

Um zu untersuchen, ob die Expression von MATE-Cel5A zur Oberflächenpräsentation des Enzyms geführt hat, wurden *Z. palmae* und *P. putida*-Zellen, die MATE-Cel5A exprimierten, wie bereits beschrieben zuerst mit einem anti-

6xHis Antikörper und anschließend mit einem DyLight-633-gekoppelten Zweitantikörper behandelt. Die Fluoreszenz der individuellen Zellen wurde dann mit Hilfe eines Durchflusszytometers quantifiziert. Als Kontrollen wurde die Fluoreszenz von Zellen der entsprechenden Spezies ohne Plasmid vermessen, die identisch behandelt waren. Aus den Histogramm-Plots (Abbildung 27, Abbildung 28) ist erkennbar, dass sowohl *Z. palmae* als auch *P. putida*-Zellen, die MATE-Cel5A exprimierten, eine höhere mF aufwiesen (*Z. palmae*: 646, *P. putida*: 1669) als Zellen, die kein rekombinantes Protein exprimierten (*Z. palmae*: 72, *P. putida*: 82). Diese erhöhte Fluoreszenz lässt auf eine Bindung der Antikörper an das N-terminal von Cel5A gelegene 6xHis-Epitop schließen, und gibt damit einen deutlichen Hinweis auf die Oberflächenpräsentation des Enzyms in beiden Spezies.

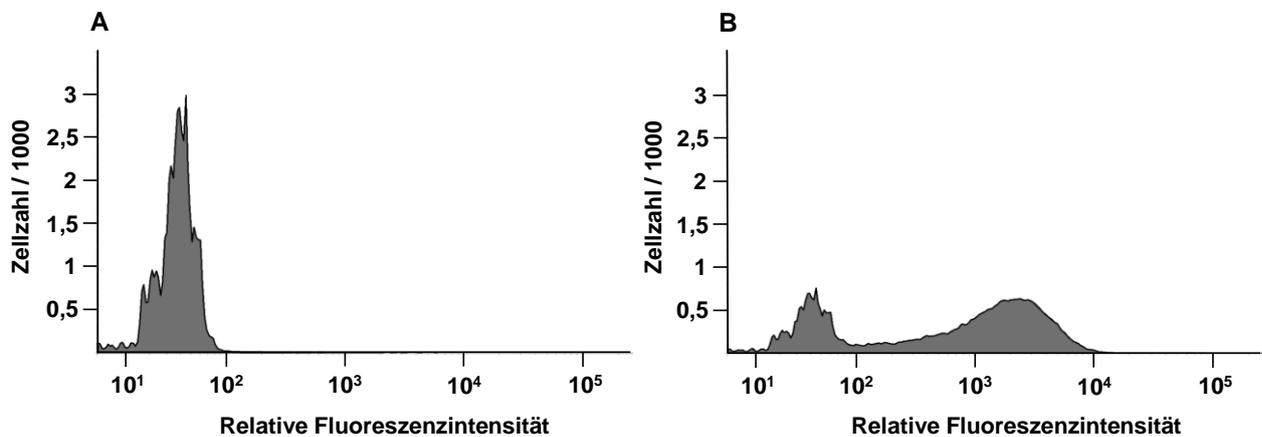


Abbildung 27: Untersuchung der Oberflächenpräsentation von Cel5A in *P. putida* mittels Durchflusszytometrie. Histogramm-Plots von *P. putida*-Zellen, die kein rekombinantes Protein exprimieren (A) sowie von Zellen, die MATE-Cel5A exprimieren (B). Die Zellen wurden nach Kultivierung und Induktion der Proteinexpression in PBS suspendiert, und die OD_{578} der Zellsuspensionen wurden auf 0,4 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen mit anti-6xHis Antikörper und DyLight-633-gekoppeltem Zweitantikörper behandelt. Es wurden 50.000 Zellen je Probe vermessen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt und über einen 660/20 nm Bandpassfilter detektiert.

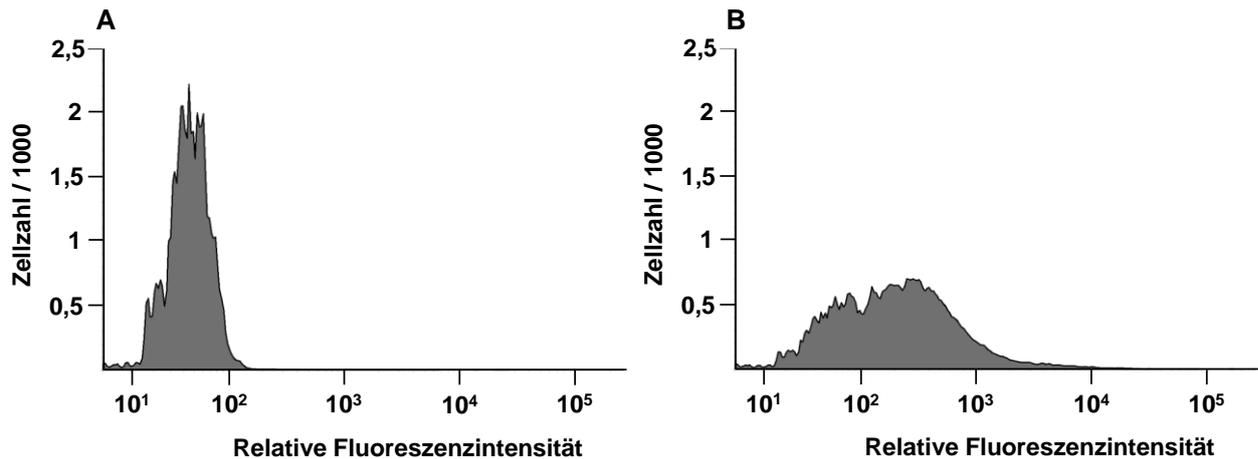


Abbildung 28: Untersuchung der Oberflächenpräsentation von Cel5A in *Z. palmae* mittels Durchflusszytometrie. Histogramm-Plots von *Z. palmae* Zellen, die kein rekombinantes Protein exprimieren (A) sowie von Zellen, die MATE-Cel5A exprimieren (B). Die Zellen wurden nach Kultivierung und Induktion der Proteinexpression in PBS suspendiert und die OD_{578} der Zellsuspensionen auf 0,4 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen mit anti-6xHis Antikörper und DyLight-633-gekoppeltem Zweitantikörper behandelt. Es wurden 50.000 Zellen je Probe vermessen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt und über einen 660/20 nm Bandpassfilter detektiert.

3.3 Untersuchungen zur hydrolytischen Aktivität von Cel5A

Für die Untersuchung der Funktionalität von Cel5A in oberflächenpräsentierter Form wurde eine Endocellulaseaktivitätsmessung mit Carboxymethylcellulose (CMC) als Substrat durchgeführt. Bei CMC handelt es sich um Cellulose, die durch Carboxylierung der Hydroxidreste wasserlöslich gemacht wurde. Endocellulasen können β -glykosidische Bindungen des CMC hydrolysieren und produzieren dabei reduzierende Zuckeren, die mithilfe einer Farbreaktion auf Basis einer Redoxreaktion mit 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS) quantitativ nachgewiesen werden können. Dazu wurden *Z. palmae* bzw. *P. putida*-Zellen, die pMATE_{mob}-Cel5A_{Ara} bzw. pMATE-Cel5A_{Ara} trugen kultiviert und bei einer OD_{578} von 0,5 die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert. Nach Kultivierung für weitere zwei Stunden wurde die Kultur zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in 0,1 M Natriumcitratpuffer (pH 6) suspendiert. Die OD_{578} der Zellsuspensionen wurde auf 50 (*Z. palmae*) bzw. 40 (*P. putida*) eingestellt. Jeweils 50 μ L dieser Suspensionen wurden dann mit 50 μ L einer 2% CMC-Lösung gemischt und bei 55°C inkubiert. Nach gegebenen Zeitpunkten wurden die Reaktionsansätze zur Abtrennung der Zellen zentrifugiert und 50 μ L des Überstandes mit 100 μ L DNS-Reagenz versetzt. Zur Reaktion der reduzierenden Zucker mit DNS wurde diese Lösung für 5 Minuten auf 98 °C erhitzt. DNS wechselt ihre Farbe bei Reduktion der Nitro-Substituenten am

Aromaten zu Rot. Diese Reaktion kann kolorimetrisch bei 540 nm quantifiziert werden. Das Ausmaß des Farbumschlags ist proportional zur Anzahl reduzierender Zuckereinheiten im Zellüberstand und damit zu der Aktivität der Endocellulase. Wie in Abbildung 29 und Abbildung 30 zu erkennen ist, zeigten Reaktionsansätze mit Zellen beider Spezies, die MATE-Cel5A exprimierten, eine signifikant höhere Absorption als die jeweiligen Kontrollen, woraus abgeleitet werden kann, dass Cel5A als Teil eines MATE-Fusionsproteins auf der Zelloberfläche von *Z. palmae* und *P. putida* in katalytisch aktiver Form vorlag. Analog zu den Beobachtungen bei der Oberflächenpräsentation von BglA (Abschnitt V.2.3) ist auch hier festzustellen, dass der Ganzzellkatalysator mit *P. putida* als Wirtsorganismus eine wesentlich höhere hydrolytische Aktivität aufwies als mit *Z. palmae* als Wirtsorganismus.

Da die Detektion von reduzierenden Zuckern keine Differenzierung bzgl. ihrer Kettenlänge erlaubt, ist kein eindeutiges Reaktionsprodukt definierbar. Die hydrolytische Aktivität wird daher in Glukoseäquivalenten ausgedrückt, bei der vereinfachend davon ausgegangen wird, dass jede durch die Endocellulase freigesetzte reduzierende Zuckereinheit ein Glukosemolekül darstellt. Dazu wurde mit dem beschriebenen DNS-Reagenz eine Kalibrationsreihe mit verschiedenen Glukosekonzentrationen vermessen (Daten nicht gezeigt) und daraus die Absorptionswerte der Aktivitätsbestimmungen in umgesetzte Glukoseäquivalente umgerechnet. Dabei wurden die unterschiedlichen OD_{578} der eingesetzten Zellsuspensionen berücksichtigt, und ein linearer Bereich der Absorptionssteigerung von 0 bis 8 Minuten (*Z. palmae*) bzw. 0 bis 10 Minuten (*P. putida*) zugrunde gelegt. Aus den so berechneten Werten wird ersichtlich, dass *P. putida* mit $12,6 \text{ mU}_{\text{GE}}/\text{mL}/OD_{578}$ eine mehr als doppelt so hohe Aktivität aufwies wie *Z. palmae* mit $4,7 \text{ mU}_{\text{GE}}/\text{mL}/OD_{578}$.

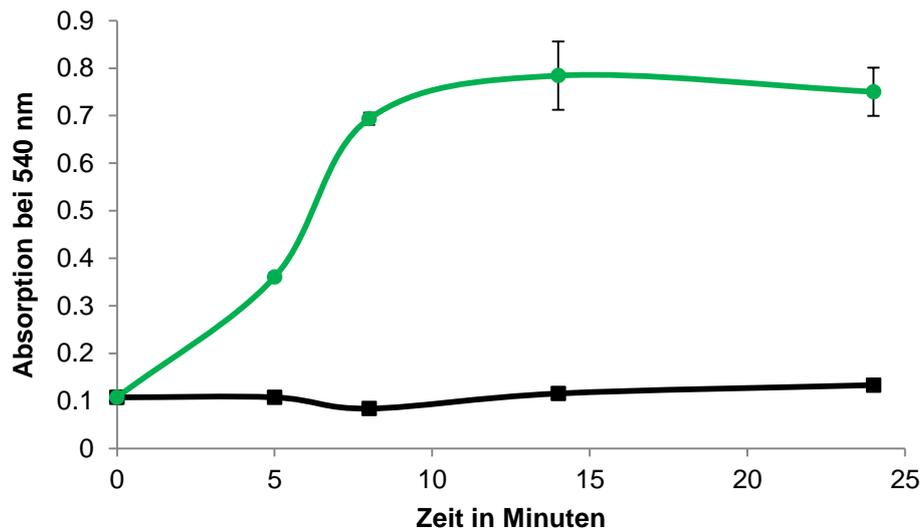


Abbildung 29: Hydrolyse von CMC durch *Z. palmae* mit oberflächenpräsentierter Endocellulase Cel5A. Grüne Kreise: Zellen mit oberflächenpräsentierter Cel5A. **Schwarze Rechtecke:** Zellen mit oberflächenpräsentierter Esterase. Die Zellen wurden in Natriumcitratpuffer, pH 6 suspendiert, und die OD_{578} der Zellsuspensionen auf 25 eingestellt. Die Zellen wurden dann bei 55 °C in 1% CMC-Lösung inkubiert. Nach gegebenen Zeitpunkten wurden 50 μ L des Zellüberstandes mit 100 μ L DNS-Reagenz versetzt, für 5 Minuten auf 98 °C erhitzt und die Absorption bei 540 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen.

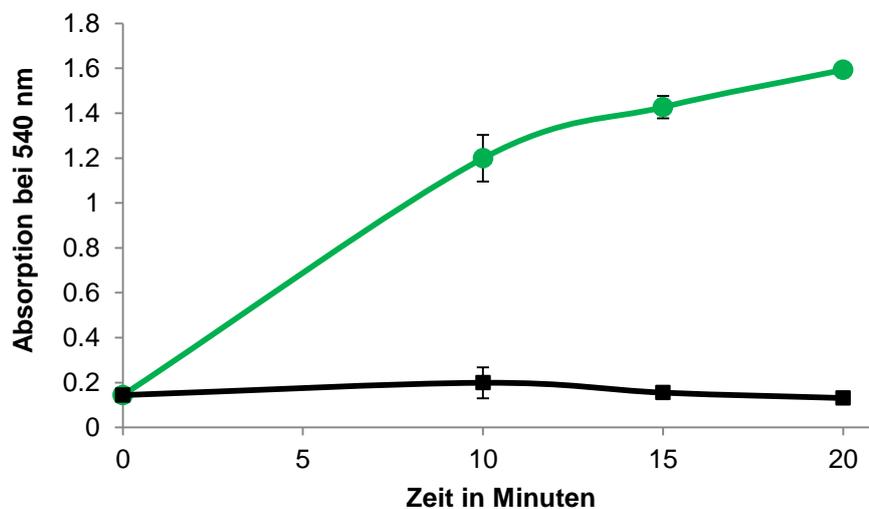


Abbildung 30: Quantifizierung der Hydrolyse von CMC durch *P. putida* mit oberflächenpräsentierter Endocellulase Cel5A. Grüne Kreise: Zellen mit oberflächenpräsentierter Cel5A. **Schwarze Rechtecke:** Zellen ohne Plasmid. Die Zellen wurden in Natriumcitratpuffer suspendiert und die OD_{578} der Zellsuspensionen auf 20 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen bei 55 °C in 1% CMC-Lösung inkubiert. Nach gegebenen Zeitpunkten wurden 50 μ L des Zellüberstandes mit 100 μ L DNS-Reagenz versetzt, für 5 Minuten auf 98 °C erhitzt und die Absorption bei 540 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen.

Daraufhin wurde untersucht, ob die hydrolytische Aktivität von *Z. palmae* Zellen gegenüber CMC erhöht werden kann, indem das MATE-Cel5A-Fusionsprotein statt unter Kontrolle des araBAD Promotors unter der Kontrolle eines konstitutiven

Promotors exprimiert wird. Dieser Überlegung liegt die Tatsache zugrunde, dass *Z. palmae* keine Pentosen als Nährstoff nutzen kann, und aus diesem Grund möglicherweise keine adäquaten Transporter besitzt, die den bei araBAD notwendigen Induktor L-Arabinose in das Zellinnere schleusen können, um dort die Proteinexpression zu induzieren. Als möglicherweise besser geeignete Alternative wurde der Promotor des zentralen Stoffwechsellenzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (P_{GAP}) aus *Zymomonas mobilis* ausgewählt. Der Promotor P_{GAP} wurde bereits als starker, konstitutiver Promotor für die Expression rekombinanter Proteine in *Z. palmae* beschrieben (Yanase *et al.*, 2007). Zu diesem Zweck wurde P_{GAP} aus genomischer DNA von *Z. mobilis* amplifiziert und mithilfe restriktionsfreier Klonierungstechnik (In-Fusion) in $pMATE_{mob}$ - $Cel5A_{Ara}$ als Substitut für den araBAD Promotor inseriert. Das so konstruierte Plasmid $pMATE_{mob}$ - $Cel5A_{GAP}$ wurde in *Z. palmae* eingeführt und der Stamm bis zum Erreichen einer OD_{578} von 1 kultiviert. Das entspricht der OD_{578} , die *Z. palmae*-Kulturen nach zweistündiger Induktion mit L-Arabinose aufweisen. Anschließend wurde der bereits beschriebene Aktivitätstest mit CMC als Substrat in Form einer Endpunkt-Bestimmung durchgeführt. Wie in Abbildung 31 dargestellt, konnte kein signifikanter Unterschied der Aktivitäten zwischen araBAD- und GAP-kontrollierter Expression von MATE-Cel5A festgestellt werden.

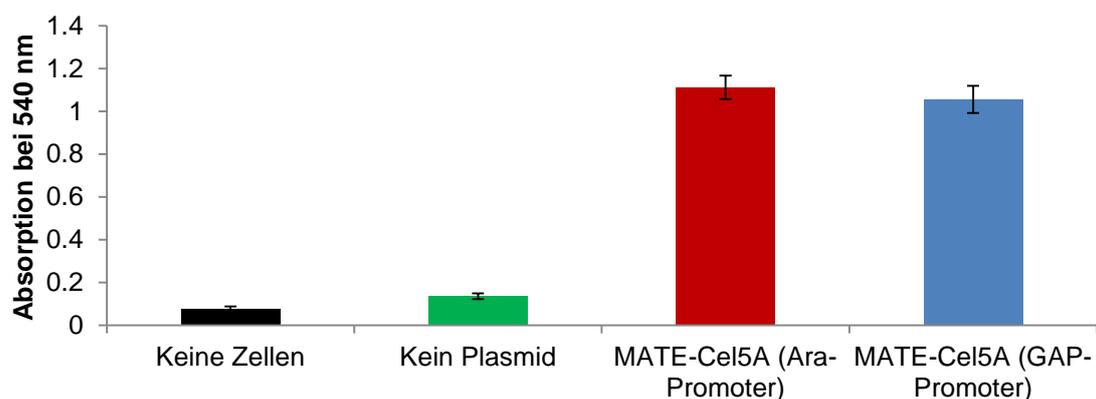


Abbildung 31: Vergleich der hydrolytischen Aktivitäten von *Z. palmae* Zellen gegenüber CMC bei Expression von MATE-Cel5A mit induzierbarem araBAD und konstitutivem P_{GAP} Promotor. Schwarz: Nur Substrat ohne Zellen. **Grün:** Zellen ohne Plasmid. **Rot:** Zellen, die MATE-Cel5A unter Kontrolle des araBAD-Promotors exprimieren. **Blau:** Zellen, die MATE-Cel5A unter Kontrolle des GAP-Promotors exprimieren. Die Stämme wurden wie beschrieben kultiviert, wenn nötig unter Zugabe von 0,2% L-Arabinose, und bei einer OD_{578} von 25 für 5 Minuten bei 55 °C in einer 1% CMC-Lösung inkubiert. Anschließend wurden 50 μ L des Zellüberstandes mit 100 μ L DNS-Reagenz versetzt, für 5 min auf 98 °C erhitzt und die Absorption bei 540 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen.

Als Nächstes wurde ein Temperaturprofil der an der Oberfläche von *Z. palmae* präsentierten Endocellulase aufgenommen. Zu diesem Zweck wurde die beschriebene Endocellulaseaktivitätsmessung bei Temperaturen von 30°C bis 80 °C durchgeführt (Abbildung 32). Eine maximale Enzymaktivität konnte bei 60 °C gemessen werden. Bemerkenswerterweise behielt Cel5A über einen sehr weiten Temperaturbereich eine relativ hohe Aktivität bei: Ein signifikanter Abfall der Enzymaktivität auf ca. 70% der Maximalaktivität war erst bei Senkung der Reaktionstemperatur auf 30 °C detektierbar. Auch bei 70 °C war nur ein leichter Aktivitätsabfall zu verzeichnen. Bei 80 °C war das Enzym inaktiv. Demnach ist Cel5A hinsichtlich ihres Temperaturprofils in oberflächenpräsentierter Form für *consolidated bioprocessing* (CBP) - Anwendungen sehr gut geeignet.

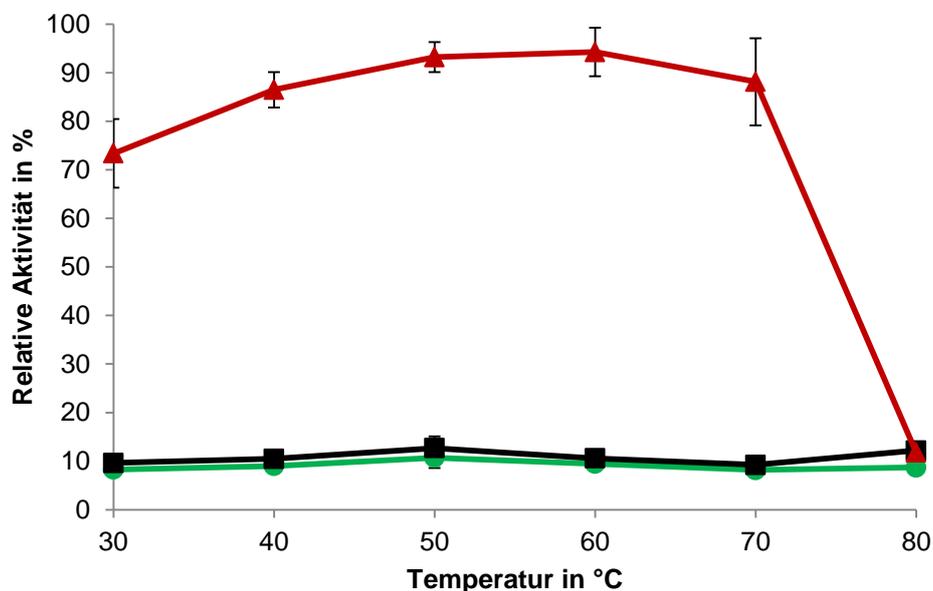


Abbildung 32: Temperaturprofil der hydrolytischen Aktivität von auf *Z. palmae* oberflächenpräsentierter Endocellulase Cel5A. Rote Dreiecke: Zellen mit oberflächenpräsentierter Cel5A. **Schwarze Rechtecke:** Zellen mit oberflächenpräsentierter Esterase. **Grüne Kreise:** Zellen ohne Plasmid. Die Zellen wurden in Natriumcitratpuffer, pH 6,0 suspendiert und die OD₅₇₈ der Zellsuspension auf 25 eingestellt. Die Zellen wurden dann mit 5 mM pNPG bei den jeweils angegebenen Temperaturen inkubiert. Nach 5 Minuten wurden die Zellen entfernt, 50 µL des Überstandes mit 100 µL DNS-Reagenz versetzt, 5 min auf 98 °C erhitzt und die Absorption bei 540 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen.

4 Autodisplay der bakteriellen Exocellulase CelK

Als Vertreter der dritten, für die vollständige Hydrolyse von Cellulose notwendigen Enzymklasse wurde CelK ausgewählt. Die Exocellulase wird wie BglA ebenfalls von *C. thermocellum* exprimiert und entstammt damit einem Organismus, der stark ausgeprägte cellulolytische Fähigkeiten besitzt.

4.1 Konstruktion und Expression von MATE-CelK

Für die Expression eines MATE-Fusionsproteins mit der Exocellulase CelK als Passagierdomäne wurde das für CelK kodierende Gen *celK* (GenBank: AF039030) von den ersten 81 bp am 5'-Ende befreit, da dieser Abschnitt für ein Signalpeptid kodiert, das die Sekretion des Enzyms in *C. thermocellum* einleitet. Dieses Signalpeptid wird zur Oberflächenpräsentation des Enzyms nicht benötigt, da die Sekretion mithilfe des CtxB Signalpeptids erfolgen sollte. Weiterhin wurden die letzten 234 bp am 3'-Ende des Gens entfernt. Dieser Abschnitt kodiert für eine *dockerin*-Domäne, welche die Bindung des Enzyms an die von *C. thermocellum* produzierten Cellulosome erlaubt. Für die katalytische Aktivität des Enzyms besitzt diese Domäne jedoch keine Relevanz. Am 5' wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym XhoI, und am 3'-Ende eine Schnittstelle für KpnI eingebracht, das Gen synthetisiert und mittels Restriktionsverdau und Ligation in pMATE_{mob}-EstA_{Ara} bzw. pMATE-EstA_{Ara} als neue Passagier-Domäne eingefügt. Die so neu konstruierten Plasmide pMATE_{mob}-CelK_{Ara} bzw. pMATE-CelK_{Ara} kodieren damit für ein Fusionsprotein, das aus CtxB Signalpeptid, 6xHis Epitop, verkürzter Exocellulase CelK und der Transporteinheit des EhaA-AT besteht (Abbildung 33).

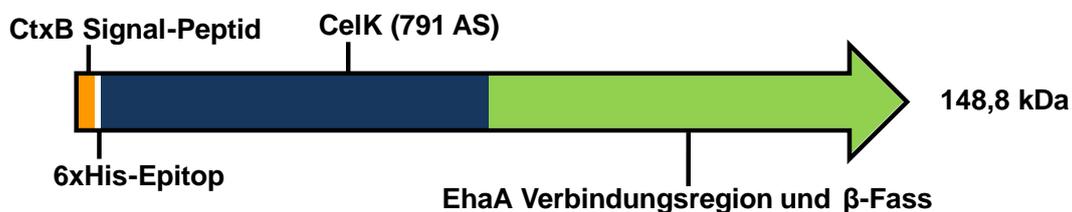


Abbildung 33: Domänenstruktur des durch pMATE_{mob}-CelK_{Ara} und pMATE-CelK_{Ara} kodierten Fusionsproteins bestehend aus CtxB Signalpeptid (orange), 6xHis-Epitop (weiß), Exocellulase CelK (blau) und EhaA Transporteinheit (grün). Die Länge der Passagierdomäne ist in Aminosäuren (AS) angegeben, das berechnete Molekulargewicht des gesamten Fusionsproteins ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

Diese Plasmide wurden in *P. putida* und *Z. palmae* eingebracht, die Bakterien bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5 kultiviert und die Proteinexpression für zwei Stunden mit 0,2% L-Arabinose induziert. Anschließend wurde eine Außenmembranproteinisolation vorgenommen. Die Analyse dieser Isolate mittels SDS-PAGE zeigte bei beiden Wirtsorganismen jeweils eine Proteinbande bei einer Laufhöhe von 130-170 kDa, die aufgrund ihrer Abwesenheit in Außenmembranproteinisolaten der Kontrollen dem rekombinanten MATE-CelK-Fusionsprotein zugeordnet werden konnten (Abbildung 34, Spur 2 und Abbildung 17,

Spur 2). Die Laufhöhe dieser Proteinbanden ist konsistent mit dem berechneten Molekulargewicht des rekombinanten Fusionsproteins von 147 kDa (ohne Signalpeptid). Es fällt auf, dass sich das Proteinbandenmuster der Außenmembranproteinisolate von *P. putida* bei Expression des rekombinanten Proteins signifikant verändert (Abbildung 34). Möglicherweise führt die Expression des AT-Fusionsproteins zu einer Veränderung der Expression der nativen Außenmembranproteine des Bakteriums.

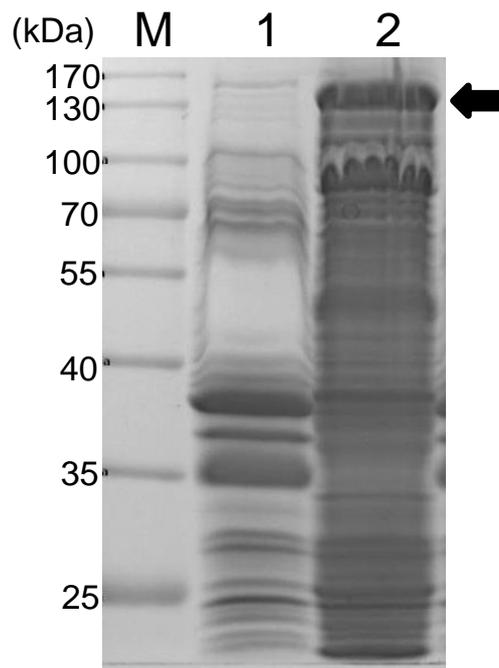


Abbildung 34: Expression und Lokalisation von MATE-CelK in *P. putida*. Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE der Außenmembranisolate von *P. putida* pMATE-CelK_{Ara}. **M:** Größenmarker. **1:** Zellen, bei denen die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose induziert wurde. **2:** Zellen, die ohne Zugabe von L-Arabinose kultiviert wurden. Die Außenmembranproteinisolierung wurde nach einem Protokoll von Park *et al.* (2015) durchgeführt. Das rekombinante Fusionsprotein ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

4.2 Prüfung der Oberflächenständigkeit

Um herauszufinden, ob die Expression von MATE-CelK in *P. putida* und *Z. palmarum* zur Präsentation des Enzyms an der Zelloberfläche geführt hat, wurden Zellen der jeweiligen Spezies, die MATE-CelK exprimierten, wie bereits beschrieben zuerst mit einem gegen das N-terminal von CelK befindliche 6xHis-Epitop gerichteten Erstantikörper und nachfolgend mit einem fluorophorgekoppeltem Zweitantikörper behandelt. Die Bindung der Antikörper an die Bakterienzellen wurde dann mithilfe eines Durchflusszytometers untersucht. Die aufgenommenen Histogramm-Plots sind in Abbildung 35 und Abbildung 36 dargestellt. MATE-CelK-exprimierende Zellen

zeigten bei beiden Spezies eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte mF (*Z. palmae*: 510 im Vergleich zu 60; *P. putida*: 275 im Vergleich zu 82). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Exocellulase auf der Oberfläche der Bakterien vorlag.

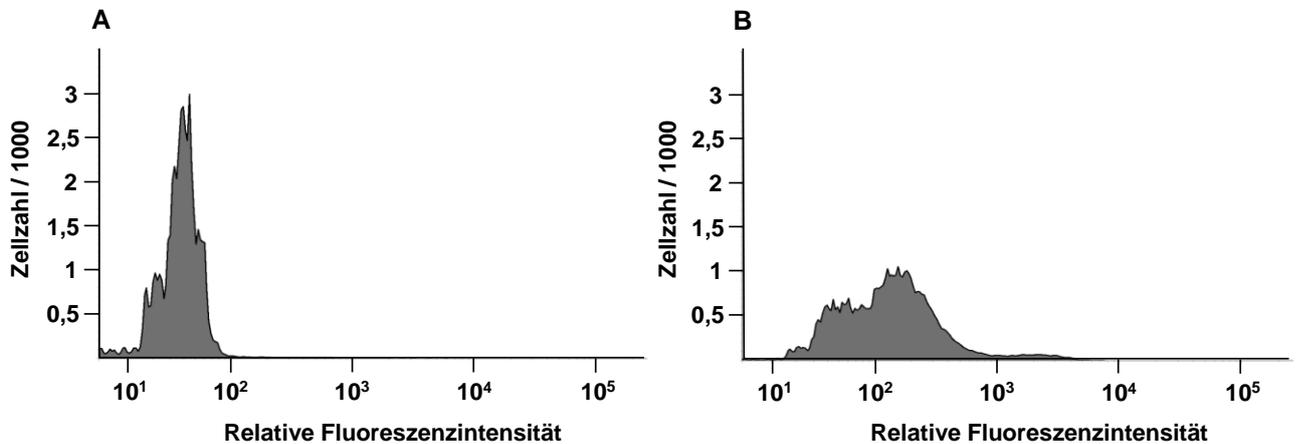


Abbildung 35: Untersuchung der Oberflächenpräsentation von CelK in *P. putida* mittels Durchflusszytometrie. Histogramm-Plots von *P. putida*-Zellen, die kein rekombinantes Protein exprimieren (A) sowie von Zellen, die MATE-CelK exprimieren (B). Die Zellen wurden nach Kultivierung und Induktion der Proteinexpression in PBS suspendiert und die OD_{578} der Zellsuspensionen auf 0,4 eingestellt. Die Zellen wurden anschließend mit anti-6xHis Antikörper und DyLight-633-gekoppeltem Zweitantikörper behandelt. Es wurden 50.000 Zellen je Probe vermessen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt und über einen 660/20 nm Bandpassfilter detektiert.

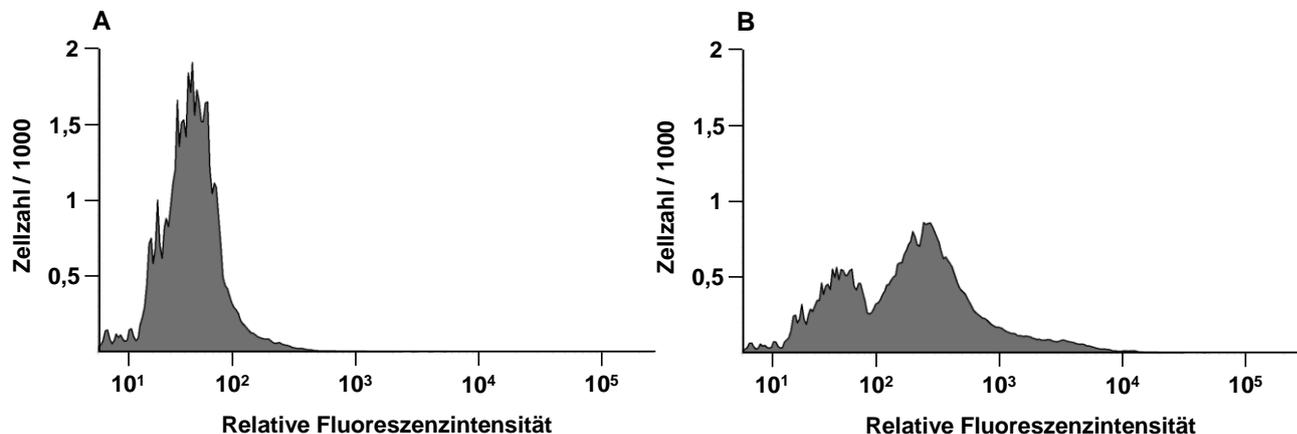


Abbildung 36: Untersuchung der Oberflächenpräsentation von CelK in *Z. palmae* mittels Durchflusszytometrie. Histogramm-Plots von *P. putida*-Zellen, die kein rekombinantes Protein exprimieren (A) sowie von Zellen, die MATE-CelK exprimieren (B). Die Zellen wurden nach Kultivierung und Induktion der Proteinexpression in PBS suspendiert und die OD_{578} der Zellsuspensionen auf 0,4 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen mit anti-6xHis Antikörper und DyLight-633-gekoppeltem Zweitantikörper behandelt. Es wurden 50.000 Zellen je Probe vermessen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt und über einen 660/20 nm Bandpassfilter detektiert.

4.3 Untersuchungen zur hydrolytischen Aktivität von CelK

Um festzustellen, ob die in Form eines MATE-Fusionsproteins in *Z. palmae* bzw. *P. putida* exprimierte CelK auf der Zelloberfläche der Bakterien ihre aktive Konformation einnehmen konnte, wurden photometrische Aktivitätsmessungen mit 4-Nitrophenyl- β -D-Cellobiosid (pNPC) als Substrat durchgeführt. Bei der Hydrolyse dieses Substrates entsteht 4-Nitrophenol, das photometrisch bei 405 nm quantifiziert werden kann und damit Aufschluss über die Exocellulaseaktivität der eingesetzten Zellen liefert. Zu diesem Zweck wurden *P. putida* pMATE-CelK_{Ara} und *Z. palmae* pMATE_{mob}-CelK_{Ara} kultiviert, nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5 die Proteinexpression mit 0,2% L-Arabinose induziert und die Zellen nach zwei Stunden durch Zentrifugation vom Nährmedium abgetrennt. Die Bakterien wurden dann in Natriumcitratpuffer (pH 6) suspendiert und die Zellsuspensionen auf eine OD₅₇₈ von 0,5 eingestellt. Jeweils 50 μ L der Zellsuspensionen wurden mit 50 μ L einer 10 mM pNPC – Lösung vermischt und bei 55 °C inkubiert. Nach gegebenen Zeitpunkten wurden die Bakterien dann durch Zentrifugation von der Reaktionsmischung abgetrennt, 50 μ L des Überstandes mit 50 μ L Na₂CO₃ vermengt und die Absorption dieser Lösung bei 405 nm gemessen. Als Kontrollen wurden Zellen der jeweiligen Spezies, die kein rekombinantes Protein exprimierten verwendet. Wie in Abbildung 37 und Abbildung 38 zu erkennen ist, erzeugten Zellen beider Spezies, die CelK auf ihrer Oberfläche trugen, aus pNPC 4-Nitrophenol. Im Gegensatz dazu konnte bei den Kontrollzellen die Entstehung dieser Verbindung nicht festgestellt werden. CelK lag demzufolge in einer aktiven Konformation auf den Zelloberflächen beider Spezies vor. Unter Zugrundlegung eines linearen Bereichs der Absorptionssteigerung zwischen 4 und 15 Minuten bei *P. putida* und 0 bis 40 Minuten bei *Z. palmae* wurden die erhaltenen Absorptionswerte mithilfe einer Kalibrationsreihe in *Units* umgerechnet. Wie auch bereits bei der Oberflächenpräsentation von BglA und Cel5A beobachtet wurde, fällt eine große Diskrepanz zwischen den Aktivitäten von CelK mit *Z. palmae* als Wirtsorganismus und mit *P. putida* als Wirtsorganismus auf: *P. putida* war mit 37,1 mU/mL/OD₅₇₈ fast viermal so aktiv wie *Z. palmae* mit 9,4 mU/mL/OD₅₇₈.

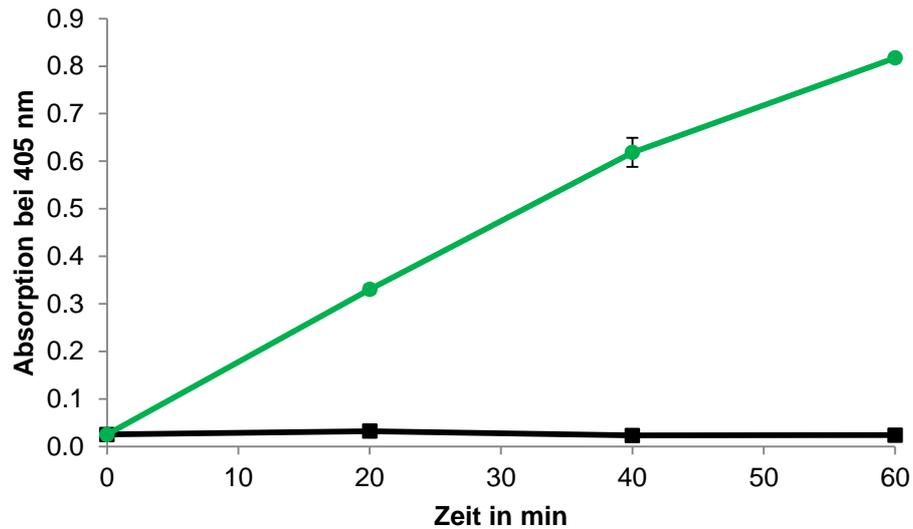


Abbildung 37: Hydrolyse von 4-Nitrophenyl- β -D-Cellobiosid (pNPC) durch *Z. palmae* mit oberflächenpräsentierter Exocellulase CelK. Grüne Kreise: Zellen mit oberflächenpräsentierter CelK. **Schwarze Rechtecke:** Zellen, die kein rekombinantes Protein exprimieren. Die Zellen wurden in Natriumcitratpuffer, pH 6 suspendiert und die OD_{578} der Zellsuspensionen auf 0,5 eingestellt. Die Zellen wurden bei 55 °C in 5 mM pNPC-Lösung inkubiert. Nach gegebenen Zeitpunkten wurden 50 μ L des Zellüberstands mit 50 μ L einer 2M Na_2CO_3 – Lösung versetzt und die Absorption bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen.

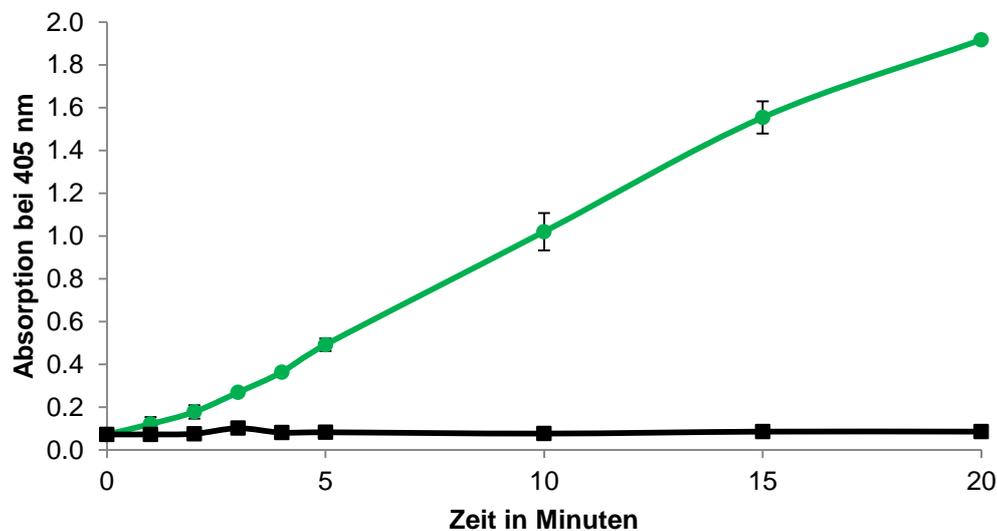


Abbildung 38: Hydrolyse von 4-Nitrophenyl- β -D-Cellobiosid (pNPC) durch *P. putida* mit oberflächenpräsentierter Exocellulase CelK. Grüne Kreise: Zellen mit oberflächenpräsentierter CelK. **Schwarze Rechtecke:** Zellen, die kein rekombinantes Protein exprimieren. Die Zellen wurden in Natriumcitratpuffer, pH 6 suspendiert und die OD_{578} der Zellsuspensionen auf 0,5 eingestellt. Die Zellen wurden dann bei 55 °C in 5 mM pNPC-Lösung inkubiert. Nach gegebenen Zeitpunkten wurden 50 μ L des Zellüberstands mit 50 μ L einer 2 M Na_2CO_3 – Lösung versetzt und die Absorption bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen.

Zur Beurteilung der Anwendungsmöglichkeiten des Ganzzellkatalysators bei verschiedenen Temperaturen wurde das beschriebene Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von CelK auf der Oberfläche von *Z. palmae* bei

Temperaturen von 30 °C bis 80 °C durchgeführt (Abbildung 39). Die Aktivität des Enzyms erreichte bei 60 °C ihr Maximum. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur fiel die Aktivität stark ab, bei 80 °C war das Enzym vollständig inaktiv. Die Reduzierung der Temperatur auf 50 °C bewirkte eine Reduktion der Hydrolyseeffizienz auf ca. 60% der maximalen Aktivität. Bei 30 °C besaß CelK noch eine Restaktivität von ca. 20%. Das Temperaturprofil von CelK ist damit nur bedingt geeignet für CBP-Anwendungen, bei denen eine hohe hydrolytische Aktivität im niedrigen Temperaturbereich benötigt wird.

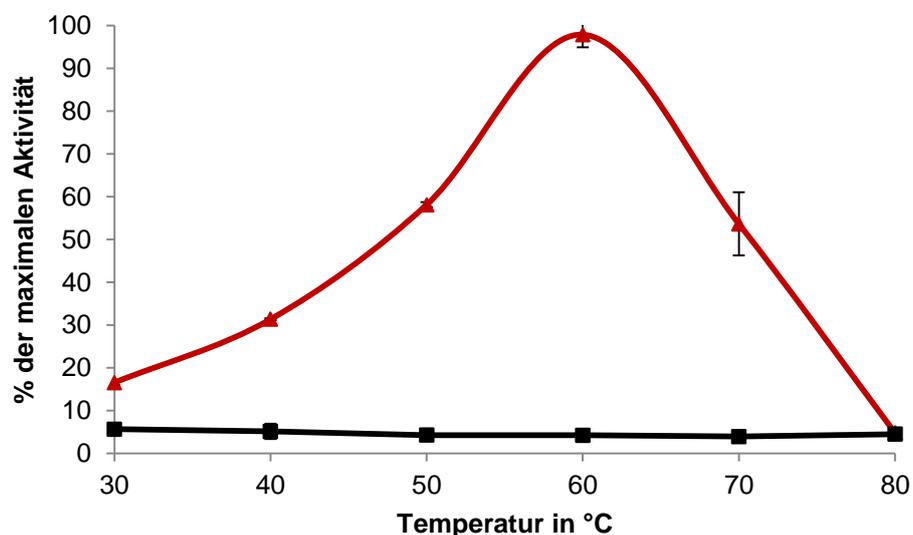


Abbildung 39: Temperaturprofil der hydrolytischen Aktivität von auf *Z. palmae* oberflächenpräsentierter Exocellulase CelK. Rote Dreiecke: Zellen mit oberflächenpräsentierter CelK. **Schwarze Rechtecke:** Zellen, die kein rekombinantes Protein exprimieren. Die Zellen wurden in Natriumcitratpuffer, pH 6,0 suspendiert und die Zellsuspensionen auf eine OD_{578} von 0,5 eingestellt. Die Zellen wurden dann mit 5 mM pNPG bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Nach 20 Minuten wurden 50 μ L des Zellüberstands mit 50 μ L einer 2 M Na_2CO_3 – Lösung versetzt und die Absorption bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen.

5 Kombinierte Anwendung der Ganzzellkatalysatoren auf Filterpapier

Für eine vollständige Hydrolyse von Cellulose zu Glukose ist eine kombinierte Anwendung der drei Cellulaseklassen β -Glucosidase, Endo- und Exocellulase notwendig. Cellulasen besitzen ein ausgeprägtes synergistisches Potential, d.h. ihre kombinierte Hydrolyseaktivität kann einen höheren Grad erreichen als die Summe der Aktivitäten der einzelnen Enzyme. Es wurde bislang jedoch nicht der Frage nachgegangen, ob diese Synergie auch erzeugt werden kann, wenn die Cellulasen getrennt voneinander auf der Zelloberfläche von Bakterien vorliegen. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, die konstruierten Ganzzellkatalysatoren miteinander zu kombinieren und die daraus resultierende hydrolytische Aktivität gegenüber Cellulose zu evaluieren. Dazu wurden *P. putida*-Zellen, die jeweils pMATE-BglA_{Ara}, pMATE-Cel5A_{Ara} und pMATE-CelK_{Ara} enthielten, sowie *Z. palmae* Zellen, die jeweils pMATE_{mob}-BglA_{Ara}, pMATE_{mob}-Cel5A_{Ara} und pMATE_{mob}-CelK_{Ara} enthielten, wie vorher beschrieben kultiviert und die Proteinexpression für zwei Stunden mit 0,2% L-Arabinose induziert. Nach Zentrifugation der Kulturen wurden die sedimentierten Zellen in 0,1 M Natriumcitratpuffer (pH 6) suspendiert und die OD₅₇₈ der Zellsuspensionen auf 50 eingestellt. Jeweils 23,6 μ L dieser Zellsuspensionen wurden dann zu einem kreisrunden Stück Whatman Filter Paper No.1 (FP) gegeben, und mit Natriumcitratpuffer auf ein Gesamtvolumen von 71 μ L aufgefüllt. Mit diesem Vorgehen wurden neben den einzeln eingesetzten Stämmen auch Zweier- und Dreier-Kombinationen mit jeweils 23,6 μ L der jeweiligen Zellsuspensionen hergestellt, wobei das Gesamtvolumen ebenfalls jeweils auf 71 μ L eingestellt wurde. Nach Inkubation bei 55 °C für 24 Stunden wurden das FP und die Bakterienzellen durch Zentrifugation entfernt und 50 μ L des Überstandes mit 100 μ L DNS-Reagenz vermischt. Durch 5-minütige Erhitzung auf 98 °C wurde eine Redoxreaktion zwischen den in der Lösung vorhandenen reduzierenden Zuckern und DNS bewirkt, deren Ausmaß durch Messung der Absorption bei 540 nm bestimmt werden konnte (Abschnitt V.3.3). Abbildung 40 und Abbildung 41 zeigen die aus diesem Vorgehen erhaltenen Resultate. Die erhaltenen Absorptionswerte der verschiedenen Kombinationen sind bei Einsatz von *P. putida* und *Z. palmae* als Wirt sehr ähnlich, qualitative und quantitative Aussagen können daher für beide Wirtsorganismen analog getroffen werden. Ein alleiniger Einsatz von Zellen mit

oberflächenpräsentierter BglA bewirkte keine Freisetzung von reduzierenden Zuckern aus FP. Das ist plausibel, da FP in unbehandelter Form keine Zweifachzucker (Cellobiose) enthält, die der β -Glucosidase als Substrat dienen könnten. Zellen mit oberflächenpräsentierter CelK oder Cel5A konnten dagegen die Freisetzung von reduzierenden Zuckern aus FP eigenständig katalysieren. Vermutlich handelt es sich bei den detektierten Zuckern um Cellobiose, die von CelK gemäß ihrer Funktion als Exocellulase vom Ende der Cellulosestränge aus abgetrennt wurde, bzw. um langkettige Zucker, die von der Endocellulase Cel5A durch Hydrolyse glykosidischer Bindungen innerhalb des Polymers aus dem FP gelöst wurden.

Durch kombinierten Einsatz von CelK- und Cel5A-präsentierenden Zellen konnten mehr reduzierende Zucker generiert werden als bei den Anwendungen der einzelnen Stämme in Summe, so dass von einer synergistischen Aktivität der beiden oberflächenpräsentierten Enzyme ausgegangen werden kann. Eine Kombination von Cel5A- mit BglA-präsentierenden Zellen hatte dagegen keinen messbaren Effekt auf die Hydrolyse von FP. Das ist konsistent mit der Annahme, dass Cel5A nur langkettige Zucker erzeugt, die BglA nicht weiter prozessieren kann. Die Zugabe von BglA- zu CelK-präsentierenden Zellen bewirkte im Mittel nur eine leichte Steigerung der FP-Hydrolyse, die aber nicht signifikant war. Da CelK Cellobiose, also das Substrat für BglA produziert, wäre ein deutlicherer Anstieg der freigesetzten Zucker zu erwarten. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte durch Ergänzung von BglA zu einer Kombination aus CelK und Cel5A ebenfalls keine signifikante Erhöhung der FP-Hydrolyse erzielt werden. Der Austausch von BglA durch eine kommerziell erhältliche, aufgereinigte β -Glucosidase führte hingegen zu einem signifikanten Anstieg der im Zellüberstand detektierbaren reduzierenden Zucker. Es muss also davon ausgegangen werden, dass BglA die entstandene Cellobiose nicht oder nur in sehr begrenztem Maße hydrolysieren konnte.

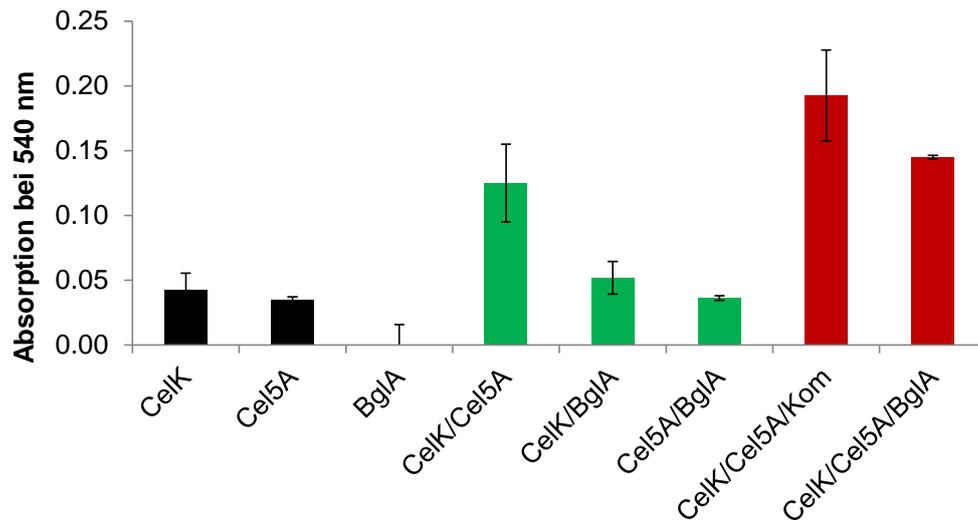


Abbildung 40: Hydrolyse von FP durch *Z. palmarum* mit oberflächenpräsentierten Cellulasen und Kombinationen daraus. Schwarz: CelK-, Cel5A oder BglA-präsentierende Stämme. **Grün:** Kombinationen aus zwei Stämmen. **Rot:** Kombinationen aus drei Stämmen bzw. Kombination aus CelK- und Cel5A-präsentierenden Zellen und einer aufgereinigten β -Glucosidase (**Kom**). Zellen, die pMATE_{mob}-Plasmide mit den angegebenen Passagierdomänen beinhalteten, wurden wie beschrieben unter Induktion der Proteinexpression kultiviert und in Natriumcitratpuffer, pH 6,0 suspendiert. Die Zellsuspensionen wurden auf eine OD₅₇₈ von 50 eingestellt. Jeweils 23,6 μ L der einzelnen Zellsuspensionen wurden miteinander vermischt. Bei einzelner Anwendung und Zweier-Kombinationen wurde mit Puffer auf ein Gesamtvolumen von 71 μ L aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 55 °C für 24 Stunden mit einem kreisrunden Stück FP inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze zentrifugiert, 50 μ L des Überstandes mit 100 μ L DNS-Reagenz versetzt, für 5 min auf 98 °C erhitzt und die Absorption bei 540 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen.

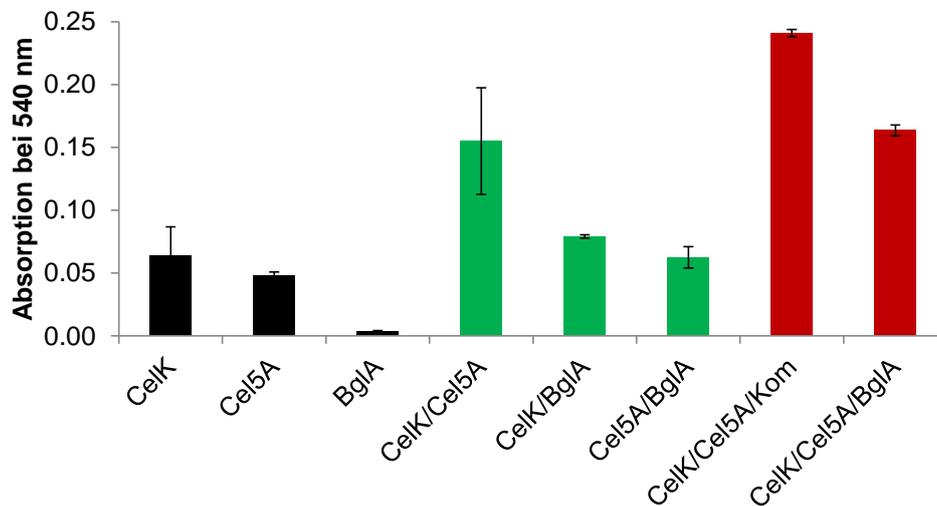


Abbildung 41: Hydrolyse von FP durch *P. putida* mit oberflächenpräsentierten Cellulasen und Kombinationen daraus. Schwarz: CelK-, Cel5A oder BglA-präsentierende Stämme. **Grün:** Kombinationen aus zwei Stämmen. **Rot:** Kombinationen aus drei dieser Stämme bzw. Kombination aus CelK- und Cel5A-präsentierenden Zellen und einer aufgereinigten β -Glucosidase (**Kom**). Zellen, die pMATE_{mob}-Plasmide mit den angegebenen Passagierdomänen beinhalteten, wurden wie beschrieben unter Induktion der Proteinexpression kultiviert und in Natriumcitratpuffer, pH 6,0 suspendiert. Die OD₅₇₈ der Zellsuspensionen wurde auf 50 eingestellt. Jeweils 23,6 μ L der einzelnen Zellsuspensionen wurden miteinander vermischt. Bei einzelner Anwendung und Zweier-Kombinationen wurde mit Puffer auf ein Gesamtvolumen von 71 μ L aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 55 °C für 24 Stunden mit einem kreisrunden Stück FP inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze zentrifugiert, 50 μ L des Überstandes mit 100 μ L DNS-Reagenz versetzt, für 5 min auf 98 °C erhitzt und die Absorption bei 540 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen.

Während BglA und CelK aus dem thermophilen *C. thermocellum* stammen, ist Cel5A dem mesophilen *B. subtilis* entnommen. Um bei gegebener Reaktionstemperatur von 55 °C der Möglichkeit einer Steigerung der FP-Hydrolyse durch die vollständige Nutzung von Enzymen thermophilen Ursprungs nachzugehen, wurde die Endocellulase CelA aus *C. thermocellum* auf *P. putida* oberflächenexprimiert. Dazu wurde das kodierende Gen *celA* (GenBank: K03088) in Analogie zu der Konstruktion der bereits beschriebenen Plasmide in ein pMATE-Plasmid eingefügt und das so hergestellte Plasmid pMATE-CelA_{Ara} in *P. putida* eingebracht. Nach Kultivierung des Stammes und Induktion der Proteinexpression mit 0,2% L-Arabinose für zwei Stunden wurden die Zellen wie vorher beschrieben mit einem gegen das 6xHis-Epitop im Fusionsprotein gerichteten Erstantikörper sowie mit einem fluorophorgekoppeltem Zweitantikörper behandelt. Abbildung 42 zeigt den Histogramm-Plot von *P. putida*-Zellen, die MATE-CelA exprimierten. Die erhöhte mF dieser Zellen (413) im Vergleich zur Kontrollprobe (60) legt nahe, dass CelA auf der Zelloberfläche der Bakterien lokalisiert war. Aktivitätsmessungen mit CMC als Substrat bestätigten weiterhin die Funktionalität des Enzyms mit einer Aktivität von 15.3 mU/mL/OD₅₇₈1 (Daten nicht gezeigt).

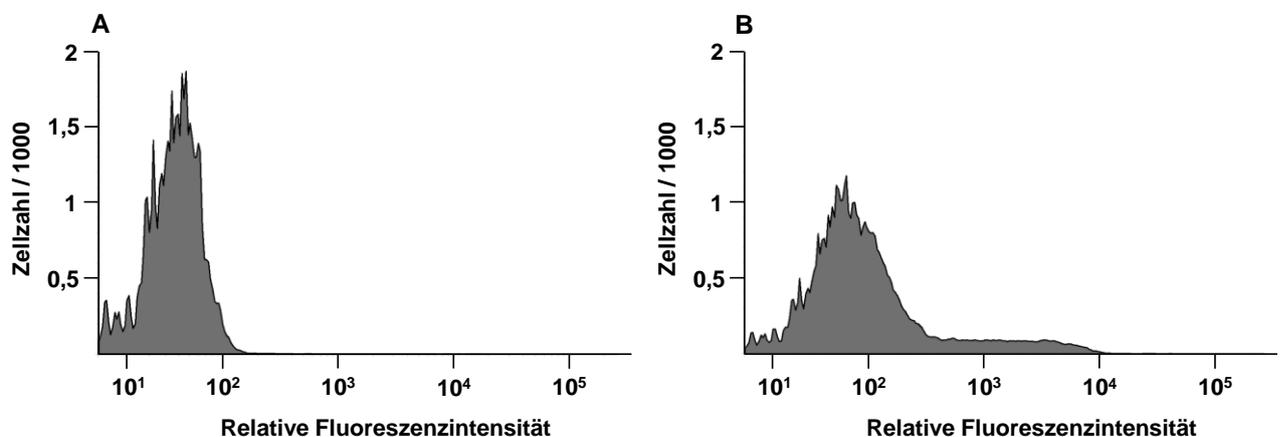


Abbildung 42: Untersuchung der Oberflächenpräsentation von CelA in *P. putida* mittels Durchflusszytometrie. Histogramm-Plot von *P. putida*-Zellen, die kein rekombinantes Protein exprimieren (A) sowie von Zellen, die MATE-CelA exprimieren (B). Die Zellen wurden nach Kultivierung und Induktion der Proteinexpression in PBS suspendiert und die OD₅₇₈ der Zellsuspensionen auf 0,4 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen mit anti-6xHis Antikörper und DyLight-633-gekoppeltem Zweitantikörper behandelt. Es wurden 50.000 Zellen je Probe vermessen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt und über einen 660/20 nm Bandpassfilter detektiert.

Darauf basierend wurden die beschriebenen Experimente zur Hydrolyse von FP mit CelA-präsentierenden Zellen als Ersatz für Cel5A-präsentierende Zellen durchgeführt (Abbildung 43). Dabei wurde *P. putida* als Wirtsorganismus verwendet. CelA-

präsentierende Zellen konnten eine höhere Menge reduzierender Zucker aus FP lösen als Cel5A-präsentierende Zellen. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wies eine Kombination aus CelA- und CelK-präsentierenden Zellen ebenfalls eine höhere Aktivität gegenüber FP auf als die entsprechende Kombination mit Cel5A. Auch in diesem Falle war die Menge der freigesetzten Zucker höher als bei den einzelnen Stämmen in Summe. Interessanterweise hatte die Zugabe einer aufgereinigten β -Glucosidase zu dieser Kombination mit einer Steigerung der Absorption um 17% einen wesentlich schwächer ausgeprägten Effekt auf die Hydrolyse als bei der Kombination mit Cel5A (55%). Wie in den vorherigen Experimenten konnte BglA in Kombination mit CelA allein keinen messbaren Beitrag zur FP-Hydrolyse leisten. Überraschenderweise erzielte jedoch die Kombination aus CelK, CelA und BglA eine vergleichbare hydrolytische Aktivität gegenüber FP wie die entsprechende Dreier-Kombination mit aufgereinigter β -Glucosidase, d.h. in dieser Kombination zeigte BglA offensichtlich deutliche hydrolytische Aktivität. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass das thermophile Enzym CelA eine höhere Stabilität bei 55 °C aufweist als Cel5A, das aus einem mesophilen Bakterium stammt, so dass CelA während der 24-stündigen Hydrolyse über einen längeren Zeitraum aktiv war und damit insgesamt eine höhere Anzahl an offenen Kettenenden produzieren konnte, wodurch die Exocellulase CelK wiederum eine größere Menge Cellobiose produzieren konnte, die für BglA als Substrat dienen konnte.

Wie bereits in Abschnitt V.3.3 erörtert, erlaubt die hier durchgeführte Detektion von reduzierenden Zuckern keine Aussage über die Kettenlängen der generierten Zucker. Für eine Vergleichbarkeit können die in den beschriebenen Experimenten aufgenommenen Absorptionswerte nur in die abstrakte Größe der Glukoseäquivalente umgerechnet werden. Diese setzt jeden freigesetzten reduzierenden Zucker vereinfachend einem Glukosemolekül gleich. Tabelle 19 stellt die in dieser Form für *Z. palmae* und *P. putida* dargestellten Aktivitäten gegenüber. Hieraus sind zwei wesentliche Schlussfolgerungen zu ziehen. Erstens spiegelt sich die bereits in den Aktivitätsmessungen mit pNPG, pNPC und CMC festgestellte höhere Aktivität bei Verwendung von *P. putida* als Wirtsorganismus auch bei der FP-Hydrolyse wieder, und zweitens führt der Austausch von Cel5A durch CelA beinahe zu einer Verdopplung der Hydrolyserate. Diese Aussagen können selbstverständlich nur vor dem Hintergrund der hier angewandten Kultivierungs-, Expressions- und Reaktionsbedingungen getroffen werden.

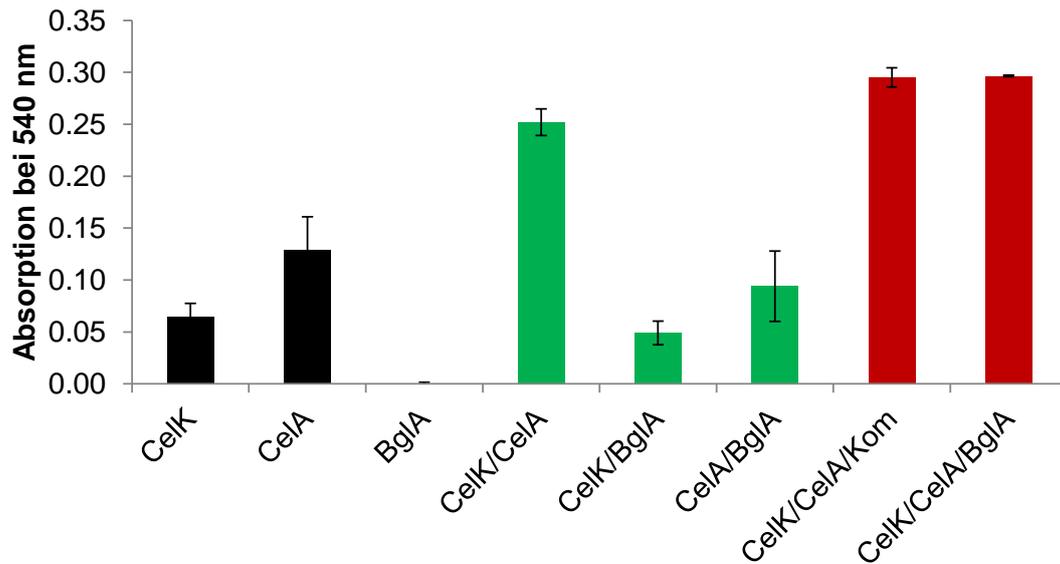


Abbildung 43: Untersuchung der Hydrolyse von FP durch *P. putida* mit oberflächenpräsentierten Cellulasen und Kombinationen daraus. Schwarz: CelK-, CelA oder BglA-präsentierende Stämme. **Grün:** Kombinationen aus zwei Stämmen. **Rot:** Kombinationen aus drei dieser Stämme bzw. Kombination aus CelK- und CelA-präsentierenden Zellen und einer aufgereinigten β -Glucosidase (**Kom**). Zellen, die pMATE_{mob}-Plasmide mit den angegebenen Passagierdomänen beinhalteten, wurden wie beschrieben unter Induktion der Proteinexpression kultiviert und in Natriumcitratpuffer, pH 6,0 suspendiert. Die OD₅₇₈ der Zellsuspensionen wurde auf 50 eingestellt. Jeweils 23,6 μ L der einzelnen Zellsuspensionen wurden miteinander vermischt. Bei einzelner Anwendung und Zweier-Kombinationen wurde mit Puffer auf ein Gesamtvolumen von 71 μ L aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 55 °C für 24 Stunden mit einem kreisrunden Stück FP inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze zentrifugiert, 50 μ L des Überstandes mit 100 μ L DNS-Reagenz versetzt, für 5 min auf 98 °C erhitzt und die Absorption bei 540 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen.

Tabelle 19: Vergleich der hydrolytischen Aktivitäten von Kombinationen aus cellulasepräsentierenden *Z. palmae* und *P. putida*-Zellen gegenüber FP. Eine Unit (U_{GE}) entspricht einem μ mol freigesetztem Glukoseäquivalent pro Minute. Die Aktivitäten beziehen sich auf eine Reaktionstemperatur von 55 °C.

| Wirtsorganismus | Aktivität in $mU_{GE}/mL/OD_{578}1$ | |
|------------------|-------------------------------------|-----------------|
| | BglA/CelK/Cel5A | BglA/CelK/CelA |
| <i>P. putida</i> | 0,009 | 0,016 |
| <i>Z. palmae</i> | 0,003 | nicht ermittelt |

6 Temperaturabhängigkeit der Glukose-Aufnahme von *P. putida*

Der im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Prozess einer kombinierten Anwendung von cellulasepräsentierenden *P. putida*-Stämmen zielt auf die Gewinnung von Glukose als Ausgangsverbindung für nachgeschaltete oder simultan stattfindende Fermentationsverfahren ab. Besonders im kommerziellen Kontext steht hierbei die Produktausbeute im Vordergrund. Da Glukose für nahezu alle Organismen einen Nährstoff darstellt, unterliegt der Einsatz von Ganzzellkatalysatoren einem möglichen (Teil-)Verlust der produzierten Glukose aufgrund der Aufnahme und Metabolisierung durch den eingesetzten Organismus. Um *P. putida* in dieser Hinsicht als Ganzzellkatalysator zu bewerten, wurden Glukoseaufnahme-Experimente bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Dazu wurde das Bakterium bis zu einer OD_{578} von 1 kultiviert, die Zellen durch Zentrifugation vom Kulturmedium getrennt und in 50 mM Natriumcitratpuffer, pH 6.0, suspendiert. Die OD_{578} der Zellsuspension wurde auf 25 eingestellt, mit 1 mg/mL Glukose versetzt und bei Temperaturen von 30 °C bis 70 °C für 20 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation entfernt und der Glukosegehalt im Zellüberstand mittels DNS-Verfahren quantifiziert. Wie in Abbildung 44A dargestellt, nahm *P. putida* bei 30 °C und 40 °C die zugegebene Glukose vollständig auf. Bei weiterer Steigerung der Temperatur sank die Glukoseaufnahme jedoch rapide ab: Bei 50 °C wurden nur noch ca. 20% der Glukose durch die Zellen aufgenommen, ab 60 °C waren es im Mittel unter 10%. Für den Einsatz von *P. putida* als Wirtsorganismus für die Hydrolyse von Cellulose (oder anderen Polymeren, die zu Glukose abgebaut werden) ergibt sich dadurch eine Minimaltemperatur von 50 °C für die tatsächliche Gewinnung eines Großteils der produzierten Glukose. Der in dieser Arbeit entwickelte Hydrolyseprozess bei 55 °C entspricht dieser Bedingung.

Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß diese für ein mesophiles Bakterium wie *P. putida* sehr hohe Temperatur die strukturelle Integrität und damit die Rückgewinnung der Zellen beeinträchtigt, wurde untersucht, welcher Anteil der Zellen durch Zentrifugation wieder abgetrennt werden kann. Dazu wurden Zellsuspensionen mit einer OD_{578} von 0,5 für 24 Stunden in 50 mM Natriumcitratpuffer, pH 6.0 bei 55 °C gelagert und anschließend durch einminütige Zentrifugation bei 3.500 x g sedimentiert. Die Anzahl der eingesetzten Zellen sowie

der sedimentierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometer quantifiziert. Als Kontrolle wurde die Anzahl von Zellen bestimmt, die bei 21 °C gelagert wurden. Wie in Abbildung 44B dargestellt, konnten im Mittel 70% der *P. putida*-Zellen bei 55 °C im Vergleich zu nahezu 100% bei 21 °C zurückgewonnen werden. Die Reaktionsführung bei 55 °C bedingt also eine gewisse Einbuße in der Anzahl wiederverwendbarer Zellen.

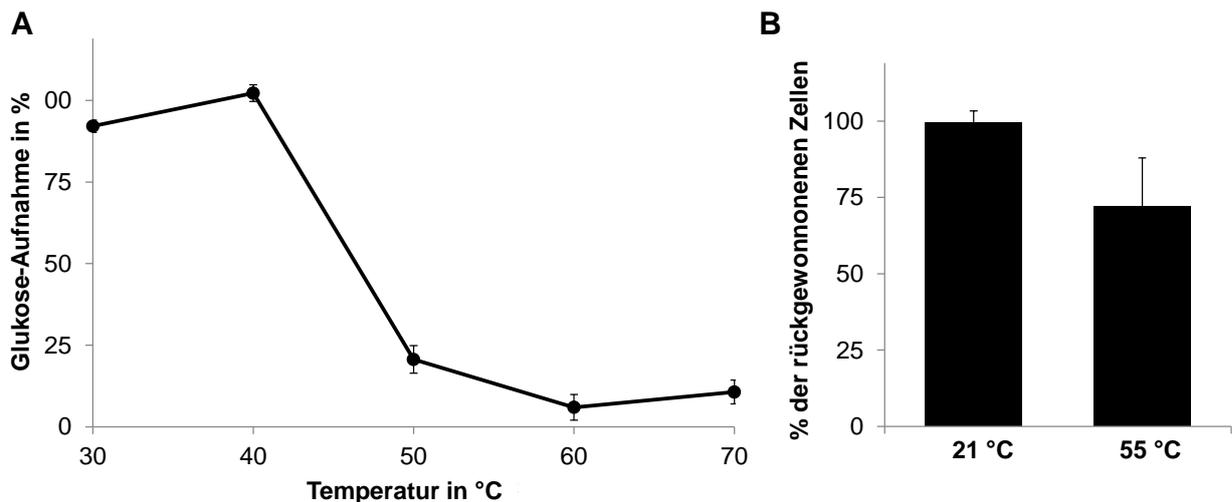


Abbildung 44: Glukoseaufnahme und Rückgewinnungsrate von *P. putida* bei verschiedenen Temperaturen. Zur Bestimmung der Glukoseaufnahme (A) wurden Zellsuspensionen mit einer OD_{578} von 25 mit 1 mg/mL Glukose in 50 mM Natriumcitratpuffer pH 6.0 versetzt und für 20 Stunden bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation entfernt und der verbliebene Glukosegehalt im Zellüberstand mittels DNS-Verfahren bestimmt. Zur Bestimmung der Rückgewinnungsrate (B) wurden Zellsuspensionen mit einer OD_{578} von 0,5 im gleichen Puffer für 24 Stunden inkubiert und anschließend durch einminütige Zentrifugation bei 3.500 x g sedimentiert. Die Anzahl der eingesetzten und durch Zentrifugation rückgewonnenen Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

7 Wiederverwendbarkeit und Temperaturstabilität der Ganzzellkatalysatoren

Da ein wesentlicher Vorteil der Ganzzellkatalyse in der einfachen Abtrennung und Wiederverwendbarkeit der eingesetzten Zellen liegt, wurde untersucht, ob die in dieser Arbeit konstruierten Ganzzellkatalysatoren in mehrfach aufeinander folgenden Reaktionszyklen eingesetzt werden können. Dazu wurden *P. putida* pMATE-BglA_{Ara}, pMATE-CelA_{Ara} und pMATE-CelK_{Ara} wie beschrieben kultiviert, die Expression der MATE-Fusionsproteine induziert und für die in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Verfahren zur Aktivitätsbestimmung mit den Substraten pNPG (für BglA), CMC (für CelA) und pNPC (für CelK) eingesetzt. Dabei wurden die Zellen mit ihrem jeweiligen Substrat für einen Zeitraum inkubiert, in dem die Steigung der

gemessenen Absorption linear verlief (7 min für BglA, 2 min für CelA, 10 min für CelK). Nach jedem Reaktionszyklus wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und in frischer Substratlösung suspendiert. Dieser Vorgang wurde neun- bis zehnfach wiederholt. Die bei jedem Reaktionszyklus bestimmten Aktivitäten wurden auf die Aktivitäten der Zellen beim ersten Reaktionszyklus normiert. Aus den in Abbildung 45A dargestellten Daten ist zu erkennen, dass BglA-präsentierende Zellen nach neun wiederholten Reaktionen noch ca. 70% der Ursprungsaktivität ausübten, CelK-präsentierende Zellen eine Restaktivität von ca. 80% und CelA-präsentierende Zellen eine Restaktivität von ca. 50% nach zehn Zyklen aufwiesen. Unter Berücksichtigung eines gewissen Verlustes an Zellen durch die Zentrifugationsschritte kann daraus geschlussfolgert werden, dass alle drei verwendeten Ganzzellkatalysatoren eine gute Wiederverwendbarkeit aufweisen.

Um zu untersuchen, ob die Ganzzellkatalysatoren auch über längere Zeit bei der genutzten Reaktionstemperatur von 55 °C angewendet werden können, wurde unter identischen Bedingungen die hydrolytische Aktivität der Zellen gemessen, nachdem diese für 24 Stunden bei 55 °C gelagert worden waren. Abbildung 45B zeigt die Aktivität von BglA-, CelA- und CelK-präsentierenden Zellen nach der Inkubationsphase. Während die Aktivität von CelK-präsentierenden Zellen im Mittel auf 75% der Ursprungsaktivität sank, hatte die Inkubation nahezu keinen Einfluss auf die Aktivität von BglA- und CelA-präsentierenden Zellen. Die konstruierten Ganzzellkatalysatoren können also insgesamt als sehr temperaturstabil bezeichnet werden.

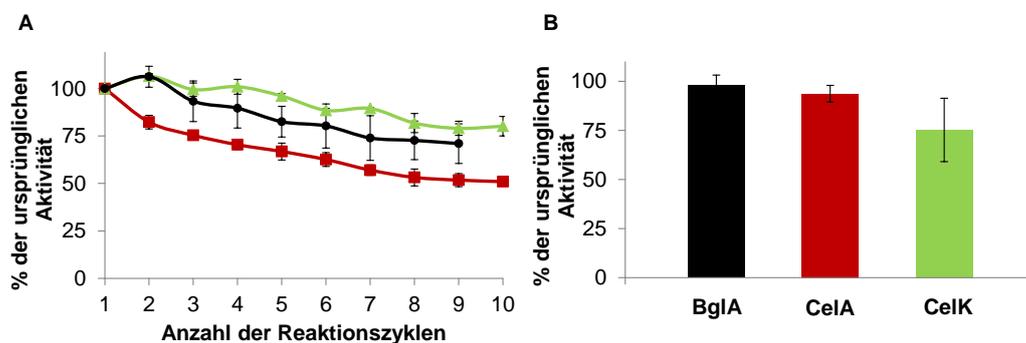


Abbildung 45: Wiederverwendbarkeit (A) und Temperaturstabilität (B) der Ganzzellkatalysatoren. *P. putida*-Zellen, die BglA (schwarz), CelA (rot) und CelK (grün) oberflächenpräsentieren, wurden wie beschrieben für die jeweilige Aktivitätsbestimmung mit den Substraten pNPG (BglA), CMC (CelA) und pNPC (CelK) eingesetzt, nach 7 min (BglA), 2 min (CelA) bzw. 10 min (CelK) durch Zentrifugation von der Reaktionsmischung getrennt und in frischer Substrat-Lösung suspendiert. Bei jedem Reaktionszyklus wurden die hydrolytischen Aktivitäten der Zellen bestimmt und auf die Aktivitäten des ersten Reaktionszyklus normiert (A). Für die Bestimmung der Temperaturstabilität wurden die Zellen für 24 Stunden bei 55 °C inkubiert, ihre hydrolytische Aktivität bestimmt und relativ zu ihrer Aktivität vor der Inkubation dargestellt (B).

VI Diskussion

1 Autodisplay der Esterase EstA zur Konzeptprüfung

Autodisplay ist eine Expressionstechnik, die es erlaubt, rekombinante Proteine ohne präparative Zwischenschritte im Zuge ihrer Expression an der Oberfläche des Wirts zu immobilisieren. Daraus ergeben sich eine Vielzahl von biotechnologischen Einsatzmöglichkeiten, die auf der einen Seite im Bereich der Laboranwendungen angesiedelt sind, z.B. der Durchsuchung von Wirkstoff-, Antikörper- oder Enzym-Bibliotheken, und auf der anderen Seite auf industrielle Prozesse abzielen, insbesondere auf biokatalytische Verfahren unter Verwendung ganzer Zellen (sog. Ganzzellkatalyse). Als Wirtsorganismus erfüllt *E. coli* die Anforderungen des erstgenannten Anwendungsbereiches sehr gut: Die Spezies lässt sich unkompliziert kultivieren, ist für zahlreiche Laborroutinen etabliert und kann genetisch leicht manipuliert werden. Autodisplay hat dementsprechend bis heute fast ausschließlich Anwendung in *E. coli* gefunden. Im Bereich der Ganzzellkatalyse ist die Expressionstechnik dagegen bislang nicht über Ansätze im Kleinstmaßstab hinaus zum Tragen gekommen. Ein Grund dafür könnte sein, dass *E. coli* als Darmbakterium nicht unweigerlich die beste Wahl für Prozesse in industriellen Größenordnungen darstellt. Bakterien, deren natürliches Habitat zur Ausprägung einer besonders resistenten Physiologie oder eines Metabolismus mit wertvollen Zwischen- oder Endprodukten geführt hat, könnten den Anforderungen mancher Produktionsverfahren möglicherweise besser gerecht werden. Der Transfer der Autodisplay-Expressionstechnik auf solche alternative Wirtsorganismen stellt daher ein lohnenswertes Ziel für die Entwicklung neuer Ganzzellkatalysatoren für den industriellen Einsatz dar. Dieser Ansatz wurde bereits mit *Pseudomonas putida* und *Ralstonia eutropha* verfolgt; beide Organismen können erhöhten Schwermetallkonzentrationen im Kulturmedium widerstehen und wurden aus diesem Grund mit Hilfe von Autodisplay zur Oberflächenpräsentation von metalladsorbierenden Proteinen für Bioremediationszwecke genutzt (Valls *et al.*, 2000a; Valls *et al.*, 2000b; Biondo *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurden bislang jedoch keine anderen Spezies mit industrieller Perspektive als Wirte für Autodisplay genutzt.

Die wesentliche Voraussetzung zur Nutzung von Autodisplay in einem alternativen Wirtsorganismus ist dessen Kompatibilität mit dem Autotransporter (AT) - Sekretionsmechanismus. Das erste Ziel dieser Arbeit war daher, die Erfüllung dieser Voraussetzung bei den ethanologischen Bakterien *Zymomonas mobilis* und *Zymobacter palmae* zu verifizieren. Dazu wurde die Esterase EstA als *maximized autotransporter mediated expression* (MATE)-Fusionsprotein (MATE-EstA), dem das EhaA AT-Protein zugrunde liegt, exprimiert. EstA wurde bereits in vorherigen Arbeiten mithilfe des AIDA-I AT-Proteins auf *E. coli* oberflächenpräsentiert (Schultheiss *et al.*, 2002). MATE-EstA konnte durch SDS-PAGE in den äußeren Membranen von *Z. mobilis* und *Z. palmae* nachgewiesen werden (Abbildung 11). Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der induzierbare araBAD Promotor für die Expression rekombinanter Proteine in beiden Spezies geeignet ist. Während bislang nur von der Verwendung des induzierbaren tac-Promotors in *Z. mobilis* berichtet wurde (Arfman *et al.*, 1992), ist für *Z. palmae* noch kein induzierbarer Promotor bekannt. Dieses Ergebnis stellt daher eine wertvolle Ergänzung zur biotechnologischen Nutzbarkeit beider Bakterien dar. Interessanterweise verwerten beide Spezies natürlicherweise keine Pentosen, woraus sich unweigerlich die Frage ergibt, auf welche Art und Weise die zugegebene Arabinose als Induktor von araBAD in das Zellinnere gelangen kann. Studien, in denen die Fähigkeit zur Pentoseverwertung durch rekombinante Expression der notwendigen metabolischen Enzyme ergänzt wurde, zeigen indirekt, dass die dem Medium zugegebenen Pentosen durch die Organismen aufgenommen wurden (Deanda *et al.*, 1996; Yanase *et al.*, 2007). Wie die Aufnahme stattfindet, wurde in diesen Studien jedoch nicht weiter untersucht. Während bislang noch keine Informationen über die Zuckeraufnahme in *Z. palmae* vorhanden sind, ist bekannt, dass *Z. mobilis* Glukose mithilfe des passiven Transporters glf (*glucose facilitator protein*) aufnimmt, der auch Xylose und Fruktose transportieren kann (Ren *et al.*, 2009). Es ist daher denkbar, dass Arabinose ebenfalls unspezifisch über diesen Transporter von den Zellen aufgenommen wird. Eine weitere Möglichkeit der Zuckeraufnahme liegt in der passiven Diffusion durch Porine.

Neben der erfolgreichen Expression können aus der Anwesenheit des MATE-EstA-Fusionsproteins in der Außenmembran von *Z. mobilis* und *Z. palmae* zwei weitere wichtige Schlussfolgerungen gezogen werden. Erstens wurde das heterologe CtxB Signalpeptid aus *Vibrio cholerae* von den Translokationsmaschinerien beider

Spezies erkannt und konnte den Transport des Proteins vom Zytosol in das Periplasma vermitteln. Zweitens wurde die β -Fass-Domäne des EhaA AT-Proteins in die äußere Zellmembran inkorporiert. Da EstA sowohl durch enzymgekoppelten, immunologischen Nachweis (ELISA) als auch durchflusszytometrisch auf den Zelloberflächen beider Spezies lokalisiert wurde, kann gemäß dem aktuellen AT-Sekretionsmodell davon ausgegangen werden, dass MATE-EstA von den β -barrel assembly machinery (BAM)-Komplexen der Bakterien (oder analogen Maschinerien) adäquat prozessiert wurde. AT-Proteine stellen also offensichtlich einen gangbaren Sekretionsweg für diese Spezies dar. Das unterstützt die Hypothese der Ubiquität von AT-Proteinen in Gram-negativen Bakterien (Jose und Meyer, 2007; Celik *et al.*, 2012). In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass EhaA aus *E. coli* stammt und damit für die genutzten Wirtsorganismen ein heterologes AT-Protein darstellt. Vorherige Studien ergaben, dass AT-Proteine nicht zwangsläufig heterolog nutzbar sind. Beispielsweise konnte das IgA AT-Protein aus *Neisseria gonorrhoeae* in *P. putida* (Valls *et al.*, 2000b) und *R. eutropha* (Valls *et al.*, 2000a) erfolgreich angewendet werden, wurde aber als ungeeignet für die Oberflächenpräsentation auf *E. coli* beurteilt (Jose und Meyer, 2007). Robert *et al.* (2006) identifizierten ein spezies-spezifisches Sequenzmotiv am C-Terminus des Transporteinheit, das von dem Membranprotein BamA erkannt wird und die Translokation des β -Fasses in die äußere Membran auslöst. Die beobachtete Inkompatibilität von IgA wurde mit einer fehlerhaften Erkennung dieses Sequenzmotivs durch *E. coli* begründet. Dagegen führte die heterologe Expression des AT-Proteins EstA aus *P. aeruginosa* in *E. coli* zur funktionalen Oberflächenpräsentation verschiedener lipolytischer Enzyme (Becker *et al.*, 2005). Bemerkenswerterweise berichteten Nicolay *et al.* (2012), dass bei Expression des originären, d.h. dem Wirtsorganismus selbst entstammenden AT-Proteins EstA in *Pseudomonas stutzeri* nur die natürliche sowie eine von sieben getesteten rekombinanten Passagierdomänen oberflächenpräsentiert werden konnte. Da in diesem Fall eine spezies-spezifische Inkompatibilität ausgeschlossen ist, kann über mögliche Ursachen einer fehlerhaften Translokation nur spekuliert werden. Es bleibt festzuhalten, dass der derzeitige Kenntnisstand zu Struktur und Mechanismus von AT-Proteinen eine Vorhersage von Kompatibilitäten nicht erlaubt und die experimentelle Erprobung jeder neuen Kombination aus AT-Einheit, Passagierdomäne und Wirtsorganismus erfordert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber, dass die EhaA AT-Einheit aus *E. coli* mit *Z. palmae* und *Z. mobilis* als

Wirtsorganismen kompatibel ist, und erweitern ihr Anwendungsspektrum auf diese Wirtsorganismen. Damit wird zusammen mit den bereits erfolgreich angewendeten Wirtsorganismen *E. coli* (Sichwart *et al.*, 2015), *P. putida*, wie im Verlauf dieser Arbeit gezeigt, und *R. eutropha* (Sichwart und Jose, unveröffentlicht) die bei der Konzeption intendierte breite Kompatibilität der MATE-Fusionsproteine (Sichwart *et al.*, 2015) untermauert.

Die Analyse der esterolytischen Fähigkeiten der untersuchten Wirtsorganismen mit oberflächenpräsentierter EstA zeigte, dass *Z. palmae* eine mehr als dreimal so hohe Aktivität aufweist wie *Z. mobilis*. Diese Beobachtung korrespondiert mit der SDS-PAGE-Analyse von Außenmembranproteinisolaten, nach der im Vergleich zu *Z. palmae* nur geringe Mengen des MATE-EstA-Fusionsproteins in der Außenmembran von *Z. mobilis* vorhanden waren. Die vorhandene Datenlage erlaubt allerdings keine Differenzierung zwischen exprimiertem und zur Außenmembran transportiertem Protein, d.h. es ist unklar, ob die beobachtete Diskrepanz der Aktivitäten eine unterschiedlich starke Proteinexpression oder eine unterschiedliche Sekretionseffizienz der Wirtsorganismen widerspiegelt. Hierbei ist zu beachten, dass mit der Transporteinheit des EhaA AT-Proteins ein substanzieller Anteil des MATE Fusionsproteins aus *E. coli* stammt. Marin *et al.* (2010) stellten in einer systematischen Studie eine negative Korrelation zwischen phylogenetischer Distanz eines AT-Proteins und seiner Effizienz der Oberflächenpräsentation fest. Da der Ursache für diese Beobachtung nicht nachgegangen wurde, kann nur vermutet werden, dass es sich dabei um einen kombinierten Einfluss von Expressions- und Sekretionseffizienz handelt. Während *Z. palmae*, genau wie *E. coli*, der Klasse der γ -Proteobakterien angehört, ist *Z. mobilis* als α -Proteobakterium phylogenetisch weiter entfernt von *E. coli*. Die beobachteten Unterschiede zwischen *Z. palmae* und *Z. mobilis* stehen demnach im Einklang mit den Ergebnissen von Marin *et al.* Folgerichtig müsste *E. coli* als Wirtsorganismus eine höhere oder zumindest ähnlich hohe esterolytische Aktivität aufweisen als *Z. palmae*; das Gegenteil war jedoch der Fall. Da EhaA als originäres AT-Protein für *E. coli* keine Limitationen hinsichtlich der Expression oder Sekretion darstellen kann, müssen andere Ursachen für die beobachtete höhere Aktivität von *Z. palmae* in Erwägung gezogen werden. So könnte die Passagierdomäne EstA möglicherweise Einfluss auf die Proteinexpression nehmen: Das kodierende Gen weist einen sehr hohen GC-Gehalt von 71.3% auf, den *Z. palmae* (55.8% genomischer GC-Gehalt) möglicherweise

besser translatieren kann als *E. coli* (50.0% genomischer GC-Gehalt). Es ist aber auch vorstellbar, dass die Translokationsmaschinerien von *Z. palmae* höhere Kapazitäten aufweisen als die von *E. coli*. Für eine Konkretisierung dieser Hypothese ist die experimentelle Quantifizierung des AT-Fusionsproteins in jedem Zellkompartiment des jeweiligen Wirts notwendig. Eine solche Fragestellung lag jedoch außerhalb der Ziele dieser Arbeit. Für zukünftige Studien, insbesondere mit *Z. mobilis* als Wirt, könnte eine Erhöhung der Anzahl oberflächenpräsentierter Enzyme durch Testung stärkerer Promotoren und besser geeigneter Signalpeptide sowie durch Nutzung einer originären AT-Einheit erreicht werden. Celik *et al.* (2012) identifizierten auf bioinformatischem Wege anhand von spezifischen Sequenzmotiven eine große Anzahl putativer AT-Proteine, unter denen sich auch ein Vertreter aus *Z. mobilis* befindet. Die Evaluation einer originären AT-Einheit ist in diesem Falle also prinzipiell realisierbar. Für *Z. palmae* besteht diese Möglichkeit aufgrund fehlender Sequenzierungsdaten bislang nicht.

Ungefähr ein Drittel der esterolytischen Aktivität wurde bei *Z. palmae* als Wirt im Zellüberstand, d.h. losgelöst von den Zellen, detektiert. Van Gerven *et al.* (2009) machten darauf aufmerksam, dass die Überexpression von AT-Proteinen eine Permeabilität der äußeren Zellmembran und die Freisetzung ihrer Komponenten zur Folge haben kann. Da ein Verfahren zur Detektion der periplasmatischen alkalischen Phosphatase mit MATE-EstA exprimierenden *Z. palmae* keinen Hinweis auf einen Defekt der Außenmembran lieferte, kann dieser als Ursache für die Enzymaktivität im Zellüberstand ausgeschlossen werden. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Esterase im Zuge ihrer Oberflächenpräsentation durch natürliche Außenmembranproteasen freigesetzt wurde. Dieser Umstand ist bei *E. coli* ausführlich beschrieben, und hat zur Verwendung der Stämme BL21 und UT5600 geführt, in denen die für die Außenmembranprotease *outer membrane protein T* (OmpT) kodierenden Gene entfernt wurden (Maurer *et al.*, 1997). Für zukünftige Anwendungen von *Z. palmae* und *Z. mobilis* empfiehlt sich daher, ggf. vorhandene Homologe bzw. Analoge von OmpT zu identifizieren und auszuschalten.

2 Autodisplay der bakteriellen Cellulasen BglA, CelK und Cel5A

Die Immobilisierung von Cellulasen auf einer mikrobiellen Zelloberfläche eröffnet die Möglichkeit, die Verwertung von Cellulose weniger aufwändig und damit kostengünstiger zu gestalten. Dementsprechend wurde bereits intensiv an verschiedenen Möglichkeiten zur Umsetzung dieses Konzepts gearbeitet. Bislang veröffentlichte Studien unterscheiden sich im Wesentlichen in der genutzten Expressionstechnik, Typ und Ursprung der Cellulasen sowie ihrer Oberflächenpräsentation als individuelles Enzym oder als Teil eines Cellulosoms. Als Wirtsorganismus stellen Hefen dabei die mit Abstand am häufigsten genutzten Spezies dar (Murai *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 2004; Lilly *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2009). Im Bereich der bakteriellen Ganzzellkatalyse bleiben bislang durchgeführte Arbeiten dagegen weitestgehend auf *Bacillus subtilis* und *E. coli* beschränkt. Während ersterer bevorzugt für die Oberflächenpräsentation von Cellulosomen Anwendung gefunden hat (Anderson *et al.*, 2011; You *et al.*, 2012), wurde *E. coli* ausschließlich für die Oberflächenpräsentation von individuellen Cellulasen verwendet (Francisco *et al.*, 1993; Jung *et al.*, 1998; Ryu und Karim, 2011; Tanaka *et al.*, 2011; Ko *et al.*, 2015); Munoz-Gutierrez *et al.* (2012) nutzten die Transporteinheit von AIDA-I für die Oberflächenpräsentation einer β -Glucosidase aus *Thermobifida fusca* auf *E. coli*. Als einzige Ausnahme zu diesen Arbeiten mit etablierten Wirtsorganismen setzten Kojima *et al.* (2012) das *ice nucleation protein* (INP) aus *Pseudomonas syringae* für die Oberflächenpräsentation einer Endocellulase auf *Z. palmae* ein. Es wurden allerdings nur ca. 20% der gesamten Enzymaktivität in der Zellmembran verortet, große Teile des rekombinanten Enzyms verblieben im Zytoplasma oder wurden in den Zellüberstand freigesetzt.

Basierend auf diesem Entwicklungsstand hatte der zweite Teil dieser Arbeit zum Ziel, das EhaA AT-Protein für die Oberflächenpräsentation von Vertretern der drei Enzymklassen β -Glucosidase, Endocellulase und Exocellulase anzuwenden. Das sollte in Bakterien erfolgen, die das bislang vorhandene Spektrum bakterieller Ganzzellkatalysatoren erweitern und insbesondere durch ihre Physiologie oder ihren Metabolismus bereichern. Da sich *Z. palmae* im ersten Teil der Arbeit als wesentlich leichter transformierbar, genetisch stabiler und schneller im Wachstum als *Z. mobilis* erwiesen hatte (Daten nicht gezeigt), und auch hinsichtlich der Expression von MATE-Fusionsproteinen als überlegener Wirt ausgemacht worden war, wurde die

Nutzung dieser Spezies der von *Z. mobilis* vorgezogen. Als weiterer Wirt wurde *P. putida* ausgewählt, da das Bakterium eine Reihe vorteilhafter Eigenschaften besitzt, die es zu einem vielversprechenden Kandidaten für die industrielle Biokatalyse machen, u.a. leichte Kultivierbarkeit, Resistenz gegenüber einer Vielzahl von toxischen Substanzen und Schwermetallen sowie einen flexiblen und leicht modifizierbaren Metabolismus (Poblete-Castro *et al.*, 2012). Das Bakterium wurde bislang aber noch nicht hinsichtlich seiner Eignung als rekombinanter Wirtsorganismus bei cellulolytischen Ganzzellkatalysatoren untersucht.

Die zur Oberflächenpräsentation ausgewählten Cellulasen BglA, CelK und Cel5A konnten bei Expression als MATE-Fusionsprotein in den Außenmembranfraktionen von sowohl *P. putida* als auch *Z. palmae* nachgewiesen werden, und durchflusszytometrische Messungen gaben einen deutlichen Hinweis auf ihre Oberflächenpräsentation. Die Ergebnisse des ersten Teils der Arbeit sind demnach auf andere Passagierdomänen übertragbar. Das gilt auch für die Funktionalität der Enzyme: Photometrische Aktivitätstests mit 4-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid (pNPG, für BglA), 4-Nitrophenyl- β -D-Cellobiosid (pNPC, für CelK) und Carboxymethylcellulose (CMC, für Cel5A) als Substrate ergaben, dass die Enzyme auf den Zelloberflächen beider Organismen ihre funktionelle Konformation einnahmen und befähigt waren, β -1,4-glykosidische Bindungen zu hydrolysieren. Dabei fiel auf, dass *P. putida* als Wirt eine drei- bis viermal höhere Aktivität aufwies als *Z. palmae*. Analog zur Diskussion der Ergebnisse aus dem ersten Teil der Arbeit kann auch an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden, ob die Expression, Sekretion oder ein Abbau der Proteine durch Proteasen dafür ursächlich ist.

2.1 Temperaturprofile der Ganzzellkatalysatoren

Die Oberflächenpräsentation eines Enzyms kann eine Veränderung seiner katalytischen Charakteristika zur Folge haben. So bedingte beispielsweise die Fusion einer Sorbitol-Dehydrogenase mit der AIDA-I AT-Einheit eine vom freien Enzym abweichende Substratspezifität (Jose und von Schwichow, 2004). Im Hinblick darauf und zur Beurteilung der Nutzbarkeit der konstruierten Ganzzellkatalysatoren wurde das Temperaturprofil der drei auf *Z. palmae* oberflächenpräsentierten Enzyme untersucht. Sowohl CelK als auch BglA erreichten bei ca. 60 °C ihre maximale Aktivität. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Studien von Ait *et al.* (1982)

und Kataeva *et al.* (2001) nach denen die Enzyme in gereinigter Form ein Temperaturoptimum von 65 °C aufweisen. Das Temperaturoptimum der oberflächenpräsentierten Cel5A wurde ebenfalls mit ca. 60 °C bestimmt. Lin *et al.* (2009) ermittelten mit gereinigtem Enzym den selben Wert. Im Rahmen der Messgenauigkeit kann also festgestellt werden, dass die Oberflächenpräsentation der drei Enzyme keine Veränderungen ihres Temperaturoptimums zur Folge hatte.

Cel5A wies in oberflächenpräsentierter Form ein sehr breites Temperaturspektrum auf, bei 30 °C betrug die Enzymaktivität noch 70% der Maximalaktivität (Abbildung 32). Das ist insbesondere im Hinblick auf die mögliche Anwendung von *Z. palmae* als *consolidated bioprocessing* (CBP) - Organismus ein wichtiger Befund, denn für die gleichzeitige Produktion von Ethanol aus der abgebauten Cellulose muss der Stoffwechsel des Organismus intakt bleiben; das erfordert Temperaturen, die im Bereich zwischen 21 °C und 39 °C liegen (Okamoto *et al.*, 1993). Cel5A ist in dieser Hinsicht also gut geeignet zur Verwendung in einem CBP-Ansatz. Dagegen verloren sowohl CelK als auch BglA bei einer Reduzierung der Reaktionstemperatur schnell an Aktivität, bei 30 °C war keine bzw. nur noch eine sehr niedrige Hydrolyserate feststellbar. Diese Enzyme genügen den Anforderung eines CBP-Ansatzes mit *Z. palmae* daher nicht oder nur bedingt (Abbildung 46).

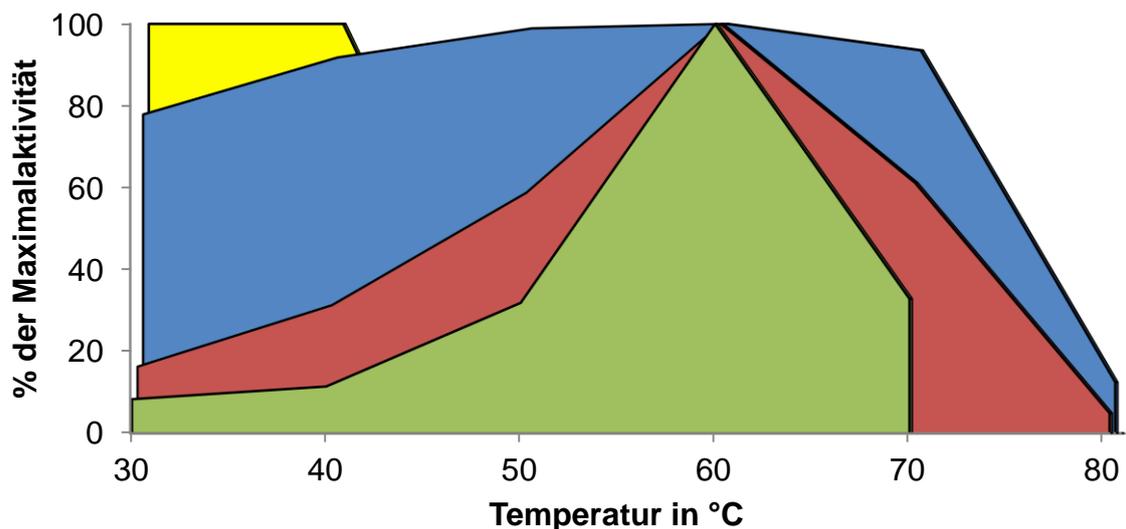


Abbildung 46: Temperaturprofil der auf *Z. palmae* oberflächenpräsentierten Cellulasen. Die zugrunde gelegten Daten sind aus den Abschnitten V.2 - V.4 zusammengetragen. Grün: BglA, Rot: CelK, Blau: Cel5A. Gelb: Temperaturbereich für CBP-Anwendungen mit *Z. palmae* nach Okamoto *et al.* (1993).

Für die Nutzung der hier vorgestellten Ganzzellkatalysatoren als Komponenten in einem *separated hydrolysis and fermentation* (SHF) - Prozess stellt sich der

Sachverhalt dagegen gänzlich anders dar: Durch die Trennung beider Prozesse kann die Reaktionstemperatur für die Hydrolyse der Cellulose unabhängig von der nachfolgenden Fermentation eingestellt werden. Erhöhte Temperaturoptima der Enzyme können dann sogar förderlich im Sinne des Gesamtprozesses sein, wenn z.B. vorgeschaltete Aufschlussverfahren *per se* hohe Temperaturen in der Reaktionsmischung bedingen, so dass auf eine Abkühlung für die Hydrolyse verzichtet werden kann, oder wenn das eingesetzte Substrat bei erhöhten Temperaturen besser zugänglich wird und dadurch schneller hydrolysiert werden kann. Dabei kann selbstverständlich nicht auf eine vorgeschaltete Anzucht der Bakterien bei ihrer optimalen Wachstumstemperatur verzichtet werden. Bei der in dieser Arbeit eingesetzten Reaktionstemperatur von 55 °C ist eine Nutzung des Metabolismus von *P. putida* nicht möglich. Das Bakterium fungiert in diesem Falle ausschließlich als schnell und einfach herzustellende Immobilisationsplattform für die Cellulasen. Es konnte aber gezeigt werden, dass selbst nach 24-stündiger Inkubation bei dieser Temperatur ein Großteil der Zellen abgetrennt und damit in einem weiteren Reaktionszyklus eingesetzt werden kann (Abbildung 44B). Die Vorteile der Ganzzellkatalyse bleiben also erhalten. Die Glukoseaufnahmeexperimente dieser Arbeit zeigten weiterhin, dass *P. putida* bei der hier angewendeten Reaktionstemperatur kaum noch Glukose aufnimmt, so dass diese aus der Reaktion abgeführt werden kann und nicht verloren geht (Abbildung 44A).

2.2 Abbau von Filterpapier

Mit einem Polymerisationsgrad von 4320 DP (*degree of polymerization*), das als ein Maß für die Widerstandsfähigkeit gegenüber enzymatischem oder chemischem Abbau angesehen werden kann, liegt Filterpapier (FP) zwischen mikrokristalliner Cellulose (470 DP) und Baumwollfasern (11790 DP, Jasiukaityte-Grojzdek *et al.*, 2012) und stellt damit ein vergleichsweise anspruchsvolles Substrat dar, das in seiner Struktur einem „realen“, für industrielle Prozesse relevanten Rohstoff recht nahe kommt.

Gemäß der ermittelten Temperaturprofile (Abbildung 46) wurde der Abbau dieses Substrats bei 55 °C untersucht. Bei dieser Temperatur konnten die auf *Z. palmae* bzw. *P. putida* oberflächenpräsentierten Exo- und Endocellulasen FP hydrolysieren. Das kombinierte Einwirken dieser Zellen hatte einen höheren Hydrolysegrad zur

Folge als ihr getrennter Einsatz: Eine Kombination aus CelK- und Cel5A-präsentierenden *P. putida*-Zellen wies eine im Vergleich zu den summierten Einzelanwendungen gesteigerte Hydrolyse von 38% auf, die gleiche Kombination mit *Z. palmae* als Wirt sogar eine relative Steigerung um 62%. In beiden Fällen kann also von einer synergistischen Hydrolyse des FP gesprochen werden.

Dagegen hatte die Zugabe der oberflächenpräsentierten β -Glucosidase BglA zur CelK/Cel5A-Kombination nicht den erwarteten verstärkenden Effekt auf die FP-Hydrolyse. Die tatsächliche Anwesenheit von Cellobiose wurde durch Zugabe einer aufgereinigten β -Glucosidase verifiziert, die zu einer deutlichen Erhöhung der reduzierenden Zucker führte (Abbildung 40 und Abbildung 41). Offensichtlich konnte BglA die produzierte Cellobiose nicht in ausreichendem Maße zu Glukose spalten. Diese Beobachtung korrespondiert mit der Notwendigkeit sehr hoher Zelldichten für die Aktivitätstestungen BglA-präsentierender Zellen gegenüber pNPG. Es können drei Ursachen für die niedrige Aktivität von BglA in Betracht gezogen werden: Erstens könnte die Fusion des Enzyms mit der EhaA AT-Einheit eine Reduktion seiner hydrolytischen Aktivität nach sich gezogen haben. Dieser Effekt wurde bereits mit anderen Enzymen beobachtet (Detzel *et al.*, 2011). Zweitens könnte die mangelnde Aktivität von BglA gegenüber Cellobiose eine inhärente Eigenschaft des Enzyms darstellen. Dieser Überlegung liegt die Tatsache zugrunde, dass BglA einem komplexen Cellulosom entnommen ist, in dem mehr als 40 Komponenten zusammenwirken (Gold und Martin, 2007). Es wäre also denkbar, dass das Enzym für sich allein nicht in der Lage ist, hohe Umsatzraten bei der Hydrolyse von Cellobiose zu bewirken. Da neben BglA nur BglB als weiteres Protein mit β -Glucosidasefunktionalität in *C. thermocellum* bekannt ist (Romaniec *et al.*, 1993), und die Überexpression von BglA zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität des Stammes gegenüber Cellulose führt (Maki *et al.*, 2013), scheint diese Möglichkeit aber eher unwahrscheinlich. Drittens könnte die Expression von MATE-BglA so schwach sein, dass nur eine geringe Anzahl an Enzymen auf den Zelloberflächen von *Z. palmae* bzw. *P. putida* vorhanden sind. In Einklang mit dieser Vermutung war das MATE-BglA-Fusionsprotein in Coomassie-gefärbten Außenmembranproteinisolaten von *P. putida* kaum auszumachen, sodass das Protein immunologisch nachgewiesen werden musste (Abbildung 18, Spur 2). In Außenmembranproteinisolaten von *Z. palmae* war MATE-BglA dagegen bereits in der Coomassie-Färbung gut sichtbar (Abbildung 17, Spur 1), obwohl diese Zellen in

den Aktivitätsbestimmungen mit pNPG deutlich weniger aktiv waren als die entsprechenden *P. putida*-Zellen (Abschnitt 2.3). Dieser Widerspruch wirft die Vermutung auf, dass die Anzahl rekombinanter Fusionsproteine in der Außenmembran nicht der Anzahl funktionaler Enzyme entspricht, oder anders formuliert, dass ein Teil des zur Außenmembran transportierten MATE-BglA in *Z. palmae* nicht in katalytisch aktiver Form vorlag. Da eine Quantifizierung der Proteine im SDS-PAGE bei *Z. palmae* und *P. putida* – Proben aufgrund fehlender Referenzbanden derzeit nicht möglich ist, muss diese Vermutung jedoch vorbehaltlich weiterer Experimente getroffen werden.

Durch die Ersetzung der Endocellulase Cel5A aus *B. subtilis* durch CelA aus *C. thermocellum* konnte die Hydrolyse von FP mit *P. putida* als Wirt in jeder Kombination deutlich gesteigert werden (Abbildung 41 und Abbildung 43). Der beobachtete Synergieeffekt war dagegen mit 30% ähnlich stark ausgeprägt wie in den Kombinationen mit Cel5A. Enzyme aus *C. thermocellum* sind naturgemäß sehr hitzestabil, z. B. wurde für CelK nach 200 Stunden Inkubation bei 60 °C noch 97% der Ursprungsaktivität gemessen (Kataeva *et al.*, 1999). Es ist daher denkbar, dass CelA über einen längeren Zeitraum katalytisch aktiv war als Cel5A und dadurch in dem betrachteten Zeitfenster von 24 Stunden eine höhere Menge reduzierender Zucker aus dem FP freisetzen konnte.

Überraschenderweise hatte, im Gegensatz zu den Experimenten mit Cel5A, die Zugabe von BglA-präsentierenden Zellen zur CelK/CelA-Kombination eine signifikante Steigerung des Hydrolysegrads zur Folge. Diese Beobachtung offenbart eine weitere mögliche Erklärung für die mangelnde Effizienz von BglA in den vorhergehenden Experimenten: Die Affinität des Enzyms zu Cellobiose ist so gering, dass hohe Konzentrationen des Substrates vorliegen müssen, um eine nennenswerte Hydrolysegeschwindigkeit zu erreichen. Die im Vergleich zur CelK/Cel5A-Kombination erhöhte Aktivität der CelK/CelA-Kombination könnte eine kritische Cellobiosekonzentration produziert haben, die zu einer messbaren Aktivität von BglA geführt hat.

In der Natur bauen Organismen Cellulose mithilfe von komplexen Mischungen aus Cellulasen, Hilfsproteinen (z.B. *carbohydrate binding modules*, CBMs), und anderen Enzymen (z.B. Oxygenasen) ab. Der hohen Effizienz solcher cellulolytischer Systeme liegt ein synergistisches Zusammenwirken ihrer einzelnen Komponenten

zugrunde. Um eine ähnliche oder sogar höhere Hydrolyseeffizienz in industriellen Prozessen zu erreichen, ist eine Nachbildung dieser synergistischen Effekte notwendig. Die beschriebenen Experimente zum Abbau von Filterpapier zeigen, dass beim *surface display* von Cellulasen die Expression der Enzyme nicht zwangsläufig auf einer gemeinsamen Zelloberfläche notwendig ist, um eine synergistische Hydrolyse zu erreichen. Vielmehr können Bakterien mit jeweils einer individuell oberflächenpräsentierten Cellulase getrennt kultiviert und nachträglich vermischt werden. Diese Art der Cellulaseproduktion bzw. Anwendung beinhaltet drei wesentliche Vorteile gegenüber der gemeinsamen Expression der Cellulasen. Erstens ist das Verfahren biotechnologisch unkompliziert, da nur ein einziges rekombinantes Protein exprimiert werden muss. Die Optimierung der Expression kann dementsprechend fokussiert stattfinden, und die mit der Ko-Expression von Proteinen einhergehenden Herausforderungen wie Plasmidkompatibilität, Abstimmung der Expressionsstärken, Überlastung der Translationsmaschinerien etc. müssen nicht berücksichtigt werden. Das gilt insbesondere für die Ko-Präsentation, bei der zusätzlich die begrenzten Kapazitäten der Außenmembran des Wirts einbezogen werden müssen. Zweitens ist die Ergänzung bzw. der Austausch von Enzymen möglich, ohne die bestehenden Ganzzellkatalysatoren modifizieren zu müssen. Drittens erlaubt das Verfahren eine präzise Steuerung der Mengenverhältnisse der Enzyme: Cellulasen sind im Allgemeinen einer starken Produktinhibition unterworfen (Teugjas und Valjamae, 2013), so dass unzureichende Mengen einer Enzymklasse zur Anhäufung von Zwischenprodukten führen, die durch Rückkoppelungseffekte den gesamten Hydrolyseprozess zum Erliegen bringen können. Viele Rohstoffe für die Celluloseverwertung sind in ihrer Zusammensetzung inhomogen und erfordern die Anpassung der Mengenverhältnisse der Cellulasen. Im Gegensatz zur Koexpression ist bei getrennter Expression der Cellulasen jede Enzymklasse als separater Ganzzellkatalysator verfügbar und kann in seinem Anteil an der Enzymmischung variiert werden. Zu jedem Zeitpunkt der Hydrolyse kann also eine ausgewogene Cellulasemischung eingestellt werden.

Wie bereits beschrieben, wird zwischen simultaner und sequentieller Synergie der Cellulasen unterschieden. Bei Cellulosomen wurde eine als *proximity effect* (Kontakteffekt) bezeichnete simultane Synergie beschrieben (Fierobe *et al.*, 2002; Morais *et al.*, 2010). Kürzlich konnte dieser Effekt auch bei der Ko-Präsentation von Cellulasen auf der Oberfläche von Hefen nachgewiesen werden: Die räumliche Nähe

der Enzyme auf der gemeinsamen Zelloberfläche bewirkte eine Verdoppelung ihrer hydrolytischen Aktivität im Vergleich zu einer Mischung von individuell oberflächenexprimierten Cellulasen (Bae *et al.*, 2015). Die hier durchgeführten Experimente lassen keinen Rückschluss auf die Art der beobachteten Synergie zu. Für weiterführende Arbeiten wäre daher von Interesse, ob der Kontakteffekt auch in dem hier vorgestellten System auftritt, bzw. ob die getrennte Oberflächenpräsentation der Cellulasen auf *Z. palmae* und *P. putida* eine Einbuße dieses Effektes zur Folge hat. Dazu müssen die drei Cellulasen ko-präsentiert und ihre hydrolytische Aktivität mit den individuell oberflächenpräsentierten Cellulasen verglichen werden.

2.3 Kompatibilität anderer β -Glucosidasen mit MATE

Wie bereits erläutert, müssen BglA und CelK für die Realisierung des angestrebten Prozesses der direkten Transformation von Cellulose zu Ethanol mit *Z. palmae* als Wirt durch Enzyme mit deutlich niedrigerem Temperaturoptimum ausgetauscht werden. Die Identifizierung geeigneter Enzyme fällt insbesondere unter dem Gesichtspunkt ihrer Expression in einem bakteriellen Organismus nicht leicht. Während eine Reihe eukaryotischer Cellulasen mit niedrigem Temperaturoptimum, insbesondere aus Schimmelpilzen, gut dokumentiert sind, ist die Auswahl bakterieller Cellulasen, die eine ausreichend hohe Aktivität bei niedrigen Temperaturen besitzen, bislang nicht sehr groß. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits erste Tests potentiell nutzbarer Kandidaten zur Expression als MATE-Fusionsprotein durchgeführt. So wurde die β -Glucosidase Bgl2 aus *Trichoderma reesei* (Temperaturoptimum: 40 °C, Takashima *et al.*, 1999) als Passagierdomäne in einem MATE-Fusionsprotein exprimiert, es konnte aber weder mit *E. coli* noch mit *Z. palmae* als Wirtsorganismus eine enzymatische Aktivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde die β -Glucosidase Cba3 aus *Cellulomonas biazotea* (Temperaturoptimum unbekannt) in Form eines MATE-Fusionsproteins in *P. putida* exprimiert. Das Enzym lag in funktioneller Form vor, wenn auch mit nur geringer hydrolytischer Aktivität gegenüber pNPG (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise gehören Bgl2 und Cba3, genau wie BglA, zur Familie 1 der Glykosidhydrolasen. Alle drei Enzyme nehmen demnach eine $(\alpha/\beta)_8$ TIM barrel fold Struktur ein, die sich aus acht α -Helices und acht parallelen β -Faltblättern zusammensetzt. Hieraus erwächst die Frage, warum die Fusion von Bgl2 mit MATE

zur Einbuße der Enzymaktivität führt, während die strukturell so ähnlichen Enzyme BglA und Cba3 auch als MATE-Fusionsprotein zumindest eine detektierbare Aktivität aufwiesen. Da Bgl2 bereits in *E. coli* funktionell exprimiert wurde (Saloheimo *et al.*, 2002), kann eine mangelnde Glykolysierung des Enzyms nicht die Ursache für die ausbleibende Aktivität darstellen. Abbildung 47 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei Enzyme. Die katalytisch aktiven Glutaminsäuren (N) liegen bei allen drei Enzymen zusammen mit den umgebenden, konservierten Motiven N-E-P und E-N-G an ähnlicher Stelle innerhalb der Aminosäuresequenzen; auf Basis der Primärstruktur kann im Vergleich zu Cba3 und BglA also ebenfalls keine Ursache für die mangelnde Funktionalität von Bgl2 ausgemacht werden. Es ist bekannt, dass die vorzeitige Knüpfung von Disulfidbrückenbindungen im Periplasma zu Problemen mit dem AT-Sekretionsmechanismus führen kann (Jose und Zangen, 2005). Eine bioinformatische Durchsuchung von Bgl2 auf das Vorhandensein solcher Bindungen mithilfe von DISULFIND (Ceroni *et al.*, 2006) erwies sich als negativ. Es bleibt nur zu vermuten, dass die Tertiärstrukturen der Enzyme sich in einer Art voneinander unterscheiden, die eine Fusion mit der AT-Einheit unter Beibehaltung der Funktionalität bei Cba3 und BglA zulässt, bei Bgl2 jedoch nicht.

| | | |
|------|--|-----|
| Bgl2 | -----MLPKDFQWGFATAAYQIEGAVDQDGRGPSIWDTFCAQPGKIADGSSGVTACDS | 53 |
| cba3 | MQTGPPSHGLPPGFLLFGASTASYQIEGATTEGDRGPSIWDTFEAEPGRVVDGSSGAVTCDH | 60 |
| BglA | ---MSKITFPKDFIWGSATAAYQIEGAYNEDGKGESIWDRFSTPGNIADGHTGDVACDH | 57 |
| | :* * :* :*:***** :*: * * * * * * * :* :* * * :* :* * * | |
| Bgl2 | YNRTAEDIALLKSLGAKSYRFSISWSRIIEGGRGDVAVNQAGIDHYVKFVDDLLDAGITP | 113 |
| cba3 | YHRWPEDVALLRRLGVDGYRFSIAWPRIQPTGS--GPAHQAGLDFYDRLVDALLEAGIAP | 118 |
| BglA | YHRYEEDIKIMKEIGIKSYRFSISWPRIFFPEGT--GKLNQKGLDFYKRLTNLLENGIMP | 115 |
| | *.* ** : : : * ..*****: * | |
| Bgl2 | FITLFHWDLPEGLHQRYGGLLNRIEFLDFENYARVMFRALP-KVRNWITFNEPLCSAIP | 172 |
| cba3 | MATLYHWDLPQALEDG--GGWLDRG-TASRFAEYAAIMGDLGDRVAHWCPVNEPNVVTLN | 176 |
| BglA | AITLYHWDLPQKLQDK--GGWKNRD-TTDFTEYSEVIFKNLGDIVPIWFTHNEPGVVSL | 173 |
| | ** :*****: * : * * : * | |
| Bgl2 | GYGSGTFAPGRQSTSEPWTVGHNILVAHGRAVKAYRDDFKPASGDGQIGIVLNGDFTYFW | 232 |
| cba3 | GYGEGSLAPGKALEFGALPVAHLLLGHLAVQALRA----AGA-RQVGTATNHAPVPL | 231 |
| BglA | GHFLGIHAPGIKDLRTSLEVSHNLLSHGKAVKLFRE----MNIDAQIGIALNLSYHYPA | 229 |
| | *: * | |
| Bgl2 | DAADPADKEAAERLEFFTAWFADPIYLGDPASMRKQLGDRLEPT--FTPEERALVHGSN | 290 |
| cba3 | SGS-EADVTAASLFDALWNRLFADPVLLGRYPDGIADAMPG-----PVAEDLLTIAQPL | 284 |
| BglA | SEK-AEDIEAAELSFSLAGRWYLDPVLKGRYPENALKLYKKKGIELSFPEDDLKLIQPI | 288 |
| | . * * * . : : * * : * * * . : : * * * * * * * * * * * * * * * * * | |
| Bgl2 | DFYGMNHYTSNYIRHRSSPASADDT-VGNVDVLFNKGQNCIGPETQSPWLRPCAAGFRD | 349 |
| cba3 | DFYGLNYYNPQGVRAAPEGSP-VPFDVAAVPG-----YPTTDFGWP-VAPSGLTD | 332 |
| BglA | DFIAFNYSSEFIKYDPSSSEGFSPANILEK-----FEKIDMGWI-IYPEGLYD | 337 |
| | ** . : * * . : : : . : : * | |
| Bgl2 | FLVWISKRYG-YPPYVTENGTSIKGESDLPKEKILEDDFRVKYNEYIRAMVTAVELDG | 408 |
| cba3 | LLVEMTERYPQIPPIILITENGCSYGMGPD--ADGVVDDQPRIDYLDLHSHLAVADAV-ARG | 389 |
| BglA | LLMLLDRDYG-KPNIVISENGAAFKDEIG--SNGKIEDTKRIQYLKDYLTQAHRAI-QDG | 393 |
| | :* : : . * * * : * * * : : : * | |
| Bgl2 | VNVKGYFAWSLMDNFEWADGYVTRFGVTYVDYENGQKRFPPKSAKSLKPLFDELIAAA-- | 466 |
| cba3 | VDVRGYCWSLLDNFEWADGFTQRFGLVHVDYDTLVRT-PKRSFD----WYADVIRAHRG | 444 |
| BglA | VNLKAYYLWSLLDNFEWAYGYNKRFIVHVNFDLTKERK-IKDSGY----WYKEVIKNNGF | 448 |
| | *: : : * : * * : * | |
| Bgl2 | --- | 466 |
| cba3 | TTA | 447 |
| BglA | --- | 448 |

Abbildung 47: Vergleich der Aminosäuresequenzen der β -Glucosidasen Bgl2, Cba3 und BglA. Übereinstimmungen sind in Abstufungen durch *, : und . angegeben. Die katalytisch aktiven Asparaginsäurereste sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

VII Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte Autodisplay von dem vorwiegend genutzten Wirtsorganismus *E. coli* auf die ethanologischen Bakterien *Z. palmae* und *Z. mobilis* übertragen werden. Es wurde außerdem gezeigt, dass die drei für den Abbau von Cellulose notwendigen Enzymklassen mit dieser Methodik funktional oberflächenpräsentiert werden können. Aus wissenschaftlicher Perspektive stellen diese Ergebnisse eine Ergänzung zu der theoretisch vorhergesagten, aber bislang kaum experimentell belegten Existenz des Autotransporter (AT) - Sekretionsweges in anderen Spezies als *E. coli* dar. Aus anwendungsorientierter Perspektive eröffnet sich damit eine neue Möglichkeit der heterologen Proteinexpression in *Z. palmae* und *Z. mobilis*. Diese bietet eine mögliche Grundlage für den Einsatz der Bakterien in *consolidated bioprocessing* (CBP) -Ansätzen zur Verwertung von Cellulose. Als elementarer Schritt in diese Richtung konnte die Eignung der konstruierten *Z. palmae* Stämme zur kombinierten Hydrolyse von Cellulose erfolgreich demonstriert werden. Aufgrund der stark voneinander abweichenden Temperaturanforderungen der oberflächenpräsentierten Enzyme und *Z. palmae* konnten Versuche zur direkten Fermentation der hydrolysierten Cellulose jedoch nicht durchgeführt werden. Mit *P. putida* als Wirtsorganismus wurde eine alternative Nutzungsmöglichkeit von MATE-exprimierten Cellulasen als mögliches Element in einem *seperated hydrolysis and fermentation* (SHF) - Prozess mit erhöhten Temperaturen aufgezeigt.

Die hier durchgeführten Experimente müssen als Konzeptprüfung verstanden werden und können naturgemäß kein vollendetes katalytisches System liefern. Dementsprechend muss einer realistischen Bewertung des vorgestellten Konzeptes hinsichtlich seiner industriellen Anwendbarkeit eine umfassende Optimierung vorangehen. Hier offenbart sich für anknüpfende Studien ein sehr weites Feld möglicher Ansatzpunkte. Der Auswahl der oberflächenpräsentierten Enzyme kommt dabei ein besonderer Stellenwert zu: Während die in dieser Arbeit gewählten Cellulasen aus *C. thermocellum* für einen SHF-Prozess bei erhöhter Temperatur gut geeignet scheinen, kann der angestrebte CBP-Prozess mit *Z. palmae* oder *Z. mobilis* als Wirt mit diesen Enzymen nicht realisiert werden. Dementsprechend müssen Cellulasen mit niedrigem Temperaturoptimum identifiziert und ihre Eignung als AT-Passagier geprüft werden. Der zurzeit lückenhafte Kenntnisstand über den AT-

Sekretionspfad und der Mangel an bioinformatischen Voraussagemöglichkeiten machen hierbei ein *trial & error* Vorgehen notwendig. Sind geeignete Enzyme gefunden, können diese mittels gerichteter Laborevolution in ihrer hydrolytischen Aktivität gesteigert werden. Das dazu verwendete Verfahren muss so konzipiert sein, dass Varianten selektiert werden, die in oberflächenpräsentierter Form - und nicht (nur) als freies Enzym - eine erhöhte Aktivität aufweisen. Dabei sollte der einzusetzende Wirt direkt mit einbezogen werden. Hier bieten sich durchflusszytometrische Selektionsverfahren besonders an.

Neben den Enzymen spielt der Wirtsorganismus selbst eine wesentliche Rolle im Gesamtsystem und muss entsprechend entwickelt werden. Die verwendeten *Z. mobilis*- und *Z. palmae*-Stämme repräsentieren Wildtypen ohne genetische Modifikationen. Durch Eingriffe in das Genom können wichtige Eigenschaften wie genetische Stabilität, Wachstumsgeschwindigkeit, Proteinexpression etc. verbessert werden. Insbesondere das zuvor erwähnte Ausschalten von Außenmembranproteasen verspricht eine erhöhte Stabilität der oberflächenpräsentierten Enzyme und sollte priorisiert werden. Weiterhin ist davon auszugehen, dass die Ganzzellkatalysatoren durch Optimierung der Kultivierungs-, Expressions- und Reaktionsbedingungen erheblich in ihrer Effizienz verbessert werden können. Hierbei stellen letztendlich nur die Kapazität der Zelloberfläche und damit einhergehend die Integrität der zellulären Strukturen des Wirts die limitierenden Faktoren dar. Zur heterologen Proteinexpression in *Z. mobilis* ist bereits eine große Anzahl von Studien als Grundlage für Optimierungsarbeiten vorhanden. Dagegen umfasst die vorhandene Literatur bislang nur sehr wenige Arbeiten zu *Z. palmae*. Die vielversprechenden Ergebnisse dieser Arbeit könnten Anstoß zu einer weiterführenden Entwicklung der Spezies geben. Der Optimierung der hydrolytischen Aktivität der Ganzzellkatalysatoren sollte sich im Falle von *Z. palmae* oder *Z. mobilis* dann die Evaluation ihrer Ethanolproduktivität anschließen.

Ein direkter Vergleich der Leistungsfähigkeit der Ganzzellbiokatalysatoren mit aktuell in der Industrie genutzten Enzymen bzw. Enzymmischungen ist aufgrund ihrer gänzlich unterschiedlichen Einsatzform nicht einfach, und erfordert zusätzlich zur Bewertung der reinen katalytischen Parameter die Einbeziehung betriebswirtschaftlicher Faktoren. Insbesondere die angestrebte Einsparung präparativer Zwischenschritte kann starken Einfluss auf die Gesamtbilanz des

Prozesses nehmen und damit möglicherweise die Schwelle zur Wirtschaftlichkeit übertreten.

Derzeit ist nicht absehbar, welche der zahlreichen Strategien und Technologien zur Verwertung von Cellulose sich auf dem Markt durchsetzen werden. Die enormen Fortschritte der letzten Jahre zeigen jedoch: Die Bioraffinerien der zweiten Generation werden bald Realität sein.

Literaturverzeichnis

- Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A und Levin DB (2011) Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol Adv* 29:675-685.
- Ait N, Creuzet N und Cattaneo J (1982) Properties of β -Glucosidase Purified from *Clostridium-Thermocellum*. *J Gen Microbiol* 128:569-577.
- Anderson TD, Robson SA, Jiang XW, Malmirchegini GR, Fierobe HP, Lazazzera BA und Clubb RT (2011) Assembly of minicellulosomes on the surface of *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 77:4849-4858.
- Arfman N, Worrell V und Ingram LO (1992) Use of the tac promoter and lacIq for the controlled expression of *Zymomonas mobilis* fermentative genes in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol* 174:7370-7378.
- Bae J, Kuroda K und Ueda M (2015) Proximity effect among cellulose-degrading enzymes displayed on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface. *Appl Environ Microbiol* 81:59-66.
- Barker BTP und Hillier VF (1912) Cider Sickness. *J Agr Sci* 5:67-85.
- Bayer EA, Belaich JP, Shoham Y und Lamed R (2004) The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol* 58:521-554.
- Bayer EA, Kenig R und Lamed R (1983) Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J Bacteriol* 156:818-827.
- Bayer EA, Lamed R und Himmel ME (2007) The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Curr Opin Biotechnol* 18:237-245.
- Becker S, Schmoldt HU, Adams TM, Wilhelm S und Kolmar H (2004) Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts. *Curr Opin Biotechnol* 15:323-329.
- Becker S, Theile S, Heppeler N, Michalczyk A, Wentzel A, Wilhelm S, Jaeger KE und Kolmar H (2005) A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS Lett* 579:1177-1182.
- Benz I und Schmidt MA (1989) Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 57:1506-1511.

- Benz I und Schmidt MA (1990) Diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Res Microbiol* 141:785-786.
- Benz I und Schmidt MA (1992) AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* 6:1539-1546.
- Biondo R, da Silva FA, Vicente EJ, Souza Sarkis JE und Schenberg AC (2012) Synthetic phytochelatin surface display in *Cupriavidus metallidurans* CH34 for enhanced metals bioremediation. *Environ Sci Technol* 46:8325-8332.
- Bolam DN, Ciruela A, McQueen-Mason S, Simpson P, Williamson MP, Rixon JE, Boraston A, Hazlewood GP und Gilbert HJ (1998) *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem J* 331 (Pt 3):775-781.
- Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ und Davies GJ (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* 382:769-781.
- Boraston AB, Kwan E, Chiu P, Warren RA und Kilburn DG (2003) Recognition and hydrolysis of noncrystalline cellulose. *J Biol Chem* 278:6120-6127.
- Carrquiry MA, Du XD und Timilsina GR (2011) Second generation biofuels: Economics and policies. *Energ Policy* 39:4222-4234.
- Celik N, Webb CT, Leyton DL, Holt KE, Heinz E, Gorrell R, Kwok T, Naderer T, Strugnell RA, Speed TP, Teasdale RD, Likic VA und Lithgow T (2012) A bioinformatic strategy for the detection, classification and analysis of bacterial autotransporters. *PloS one* 7:432-445.
- Ceroni A, Passerini A, Vullo A und Frasconi P (2006) DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res* 34:W177-181.
- Chandel AK, Chandrasekhar G, Silva MB und da Silva SS (2012) The realm of cellulases in biorefinery development. *Crit Rev Biotechnol* 32:187-202.
- Chou HL, Dai Z, Hsieh CW und Ku MS (2011) High level expression of *Acidothermus cellulolyticus* β -1,4-endoglucanase in transgenic rice enhances the hydrolysis of its straw by cultured cow gastric fluid. *Biotechnol Biofuels* 4:58.
- Chun UH und Rogers PL (1988) The Simultaneous Production of Sorbitol from Fructose and Gluconic Acid from Glucose Using an Oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 29:19-24.

- Curtis F (2009) Peak globalization: Climate change, oil depletion and global trade. *Ecol Econ* 69:427-434.
- Dally EL, Stokes HW und Eveleigh DE (1982) Use of Recombinant DNA for Enhancing Ethanol-Production in the Bacterium *Zymomonas mobilis*. *Abstr Pap Am Chem S* 184:64-Micr.
- Davies G und Henrissat B (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3:853-859.
- Deanda K, Zhang M, Eddy C und Picataggio S (1996) Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl Environ Microbiol* 62:4465-4470.
- Demirbas A (2008) Products from lignocellulosic materials via degradation processes. *Energy Source Part A* 30:27-37.
- Den Haan R, McBride JE, La Grange DC, Lynd LR und Van Zyl WH (2007) Functional expression of cellobiohydrolases in *Saccharomyces cerevisiae* towards one-step conversion of cellulose to ethanol. *Enzyme Microb Technol* 40:1291-1299.
- Detzel C, Maas R und Jose J (2011) Autodisplay of Nitrilase from *Alcaligenes faecalis* in *E. coli* Yields a Whole Cell Biocatalyst for the Synthesis of Enantiomerically Pure (R)-Mandelic Acid. *Chemcatchem* 3:719-725.
- Detzel C, Maas R, Tubeleviciute A und Jose J (2013) Autodisplay of nitrilase from *Klebsiella pneumoniae* and whole-cell degradation of oxynil herbicides and related compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4887-4896.
- Drainas C, Slater AA, Coggins L, Montague P, Costa RG, Ledingham WM und Kinghorn JR (1983) Electron-Microscopic Analysis of *Zymomonas mobilis*, Strain Atcc-10988 Plasmid DNA. *Biotechnol Lett* 5:405-408.
- Fagerstam LG und Pettersson LG (1980) The 1.4- β -Glucan Cellobiohydrolases of *Trichoderma reesei* Qm-9414 - a New Type of Cellulolytic Synergism. *FEBS Lett* 119:97-100.
- Fargione J, Hill J, Tilman D, Polasky S und Hawthorne P (2008) Land clearing and the biofuel carbon debt. *Science* 319:1235-1238.
- Fierobe HP, Bayer EA, Tardif C, Czjzek M, Mechaly A, Belaich A, Lamed R, Shoham Y und Belaich JP (2002) Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. Substrate targeting versus proximity of enzyme components. *J Biol Chem* 277:49621-49630.

- Figurski DH und Helinski DR (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* 76:1648-1652.
- Fleetwood F, Andersson KG, Stahl S und Lofblom J (2014) An engineered autotransporter-based surface expression vector enables efficient display of Affibody molecules on OmpT-negative *E. coli* as well as protease-mediated secretion in OmpT-positive strains. *Microb Cell Fact* 13:179.
- Forsberg Z, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Bunaes AC, Stenstrom Y, MacKenzie A, Sorlie M, Horn SJ und Eijsink VG (2011) Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. *Protein Sci* 20:1479-1483.
- Francisco JA, Stathopoulos C, Warren RA, Kilburn DG und Georgiou G (1993) Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains. *Biotechnology (N Y)* 11:491-495.
- Fujita Y, Ito J, Ueda M, Fukuda H und Kondo A (2004) Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl Environ Microbiol* 70:1207-1212.
- Galbe M, Sassner P, Wingren A und Zacchi G (2007) Process engineering economics of bioethanol production. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 108:303-327.
- Garvey M, Klose H, Fischer R, Lambertz C und Commandeur U (2013) Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms. *Trends Biotechnol* 31:581-593.
- Gawarzewski I, DiMaio F, Winterer E, Tschapek B, Smits SH, Jose J und Schmitt L (2014) Crystal structure of the transport unit of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence from *Escherichia coli*. *J Struct Biol* 187:20-29.
- Gnansounou E und Dauriat A (2010) Techno-economic analysis of lignocellulosic ethanol: A review. *Bioresour Technol* 101:4980-4991.
- Gold ND und Martin VJ (2007) Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis. *J Bacteriol* 189:6787-6795.
- Gomes D, Rodrigues AC, Domingues L und Gama M (2015) Cellulase recycling in biorefineries-is it possible? *Appl Microbiol Biotechnol* 99:4131-4143.

- Grabnitz F, Seiss M, Rucknagel KP und Staudenbauer WL (1991) Structure of the β -glucosidase gene *bglA* of *Clostridium thermocellum*. Sequence analysis reveals a superfamily of cellulases and β -glycosidases including human lactase/phlorizin hydrolase. *Eur J Biochem* 200:301-309.
- Guedon E, Desvaux M und Petitdemange H (2002) Improvement of cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol* 68:53-58.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ und Beckwith J (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177:4121-4130.
- Hahn-Hagerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Liden G und Zacchi G (2006) Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol* 24:549-556.
- Halter R, Pohlner J und Meyer TF (1984) IgA protease of *Neisseria gonorrhoeae*: isolation and characterization of the gene and its extracellular product. *The EMBO journal* 3:1595-1601.
- Harrison MD, Geijskes J, Coleman HD, Shand K, Kinkema M, Palupe A, Hassall R, Sainz M, Lloyd R, Miles S und Dale JL (2011) Accumulation of recombinant cellobiohydrolase and endoglucanase in the leaves of mature transgenic sugar cane. *Plant Biotechnol J* 9:884-896.
- He MX, Wu B, Qin H, Ruan ZY, Tan FR, Wang JL, Shui ZX, Dai LC, Zhu QL, Pan K, Tang XY, Wang WG und Hu QC (2014) *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. *Biotechnol Biofuels* 7:101.
- Hendriks AT und Zeeman G (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 100:10-18.
- Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280 (Pt 2):309-316.
- Henrissat B, Driguez H, Viet C und Schulein M (1985) Synergism of Cellulases from *Trichoderma reesei* in the Degradation of Cellulose. *Bio-Technol* 3:722-726.
- Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW und Foust TD (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315:804-807.
- Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B und Eijsink VG (2012) Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels* 5:45.

- Jäger G und Büchs J (2012) Biocatalytic conversion of lignocellulose to platform chemicals. *Biotechnology journal* 7:1122-1136.
- Jasiukaityte-Grojzdek E, Kunaver M und Poljansek I (2012) Influence of Cellulose Polymerization Degree and Crystallinity on Kinetics of Cellulose Degradation. *Bioresources* 7:3008-3027.
- Jeoh T, Michener W, Himmel ME, Decker SR und Adney WS (2008) Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion. *Biotechnol Biofuels* 1:10.
- Jong WS, Daleke-Schermerhorn MH, Vikstrom D, Ten Hagen-Jongman CM, de Punder K, van der Wel NN, van de Sandt CE, Rimmelzwaan GF, Follmann F, Agger EM, Andersen P, de Gier JW und Luirink J (2014) An autotransporter display platform for the development of multivalent recombinant bacterial vector vaccines. *Microb Cell Fact* 13:162.
- Jose J und Handel S (2003) Monitoring the cellular surface display of recombinant proteins by cysteine labeling and flow cytometry. *Chembiochem* 4:396-405.
- Jose J, Jahnig F und Meyer TF (1995) Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol* 18:378-380.
- Jose J, Maas RM und Teese MG (2012) Autodisplay of enzymes--molecular basis and perspectives. *J Biotechnol* 161:92-103.
- Jose J und Meyer TF (2007) The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:600-619.
- Jose J und von Schwichow S (2004) Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *Chembiochem* 5:491-499.
- Jose J und Zangen D (2005) Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 333:1218-1226.
- Jung HC, Park JH, Park SH, Lebeault JM und Pan JG (1998) Expression of carboxymethylcellulase on the surface of *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein. *Enzyme Microb Technol* 22:348-354.
- Jung YH, Cho HJ, Lee JS, Noh EW, Park OK und Kim KH (2013) Evaluation of a transgenic poplar as a potential biomass crop for biofuel production. *Bioresour Technol* 129:639-641.
- Juturu V und Wu JC (2014) Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renew Sust Energ Rev* 33:188-203.

- Kataeva I, Li XL, Chen H, Choi SK und Ljungdahl LG (1999) Cloning and sequence analysis of a new cellulase gene encoding CelK, a major cellulosome component of *Clostridium thermocellum*: evidence for gene duplication and recombination. *J Bacteriol* 181:5288-5295.
- Kataeva IA, Seidel RD, 3rd, Li XL und Ljungdahl LG (2001) Properties and mutation analysis of the CelK cellulose-binding domain from the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *J Bacteriol* 183:1552-1559.
- Kerstens K und De Ley J (1968) The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 34:393-408.
- Kim IJ, Lee HJ, Choi IG und Kim KH (2014) Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8469-8480.
- King BC, Donnelly MK, Bergstrom GC, Walker LP und Gibson DM (2009) An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnol Bioeng* 102:1033-1044.
- Kiss AA, Grievink J und Rito-Palomares M (2015) A systems engineering perspective on process integration in industrial biotechnology. *J Chem Technol Biotechnol* 90:349-355.
- Klein-Marcuschamer D, Oleskowicz-Popiel P, Simmons BA und Blanch HW (2012) The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnol Bioeng* 109:1083-1087.
- Klemm D, Heublein B, Fink HP und Bohn A (2005) Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew Chem Int Ed Engl* 44:3358-3393.
- Kluyver AJ und Hoppenbrouwers WJ (1931) Ein merkwürdiges Gärungsbakterium: Lindner's *Termobacterium mobile*. *Archiv Mikrobiol* 2:245-260.
- Knowles TJ, Scott-Tucker A, Overduin M und Henderson IR (2009) Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nat Rev Microbiol* 7:206-214.
- Ko KC, Lee B, Cheong DE, Han Y, Choi JH und Song JJ (2015) Bacterial cell surface display of a multifunctional cellulolytic enzyme screened from a bovine rumen metagenomic resource. *J Microbiol Biotechnol*

- Kojima M, Akahoshi T, Okamoto K und Yanase H (2012) Expression and surface display of *Cellulomonas* endoglucanase in the ethanologenic bacterium *Zymobacter palmae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:1093-1104.
- Konieczny MPJ, Benz I, Hollinderbaumer B, Beinke C, Niederweis M und Schmidt MA (2001) Modular organization of the AIDA autotransporter translocator: the N-terminal β 1-domain is surface-exposed and stabilizes the transmembrane β 2-domain. *Antonie Leeuwenhoek* 80:19-34.
- Kostylev M und Wilson D (2012) Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. *Adv Biochem Eng Biot* 3:61-70.
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd und Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175-176.
- Kranen E, Detzel C, Weber T und Jose J (2014) Autodisplay for the co-expression of lipase and foldase on the surface of *E. coli*: washing with designer bugs. *Microb Cell Fact* 13:19.
- Kuhad RC, Gupta R und Singh A (2011) Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research* 2011:280696.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lamed R, Kenig R, Morag E, Calzada JF, Demicheo F und Bayer EA (1991) Efficient Cellulose Solubilization by a Combined Cellulosome- β -Glucosidase System. *Appl Biochem Biotechnol* 27:173-183.
- Lawford HG und Rousseau JD (2003) Cellulosic fuel ethanol: alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. *Appl Biochem Biotechnol* 105 -108:457-469.
- Lawford HG, Rousseau JD und Tolan JS (2001) Comparative ethanol productivities of different *Zymomonas* recombinants fermenting oat hull hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol* 91-93:133-146.
- Leyton DL, Johnson MD, Thapa R, Huysmans GH, Dunstan RA, Celik N, Shen HH, Loo D, Belousoff MJ, Purcell AW, Henderson IR, Beddoe T, Rossjohn J, Martin LL, Strugnell RA und Lithgow T (2014) A mortise-tenon joint in the transmembrane domain modulates autotransporter assembly into bacterial outer membranes. *Nat Comm* 5:4239.

- Leyton DL, Rossiter AE und Henderson IR (2012) From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nat Rev Microbiol* 10:213-225.
- Lilly M, Fierobe HP, van Zyl WH und Volschenk H (2009) Heterologous expression of a Clostridium minicellulosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 9:1236-1249.
- Lin L, Meng X, Liu P, Hong Y, Wu G, Huang X, Li C, Dong J, Xiao L und Liu Z (2009) Improved catalytic efficiency of endo- β -1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* BME-15 by directed evolution. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:671-679.
- Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH und Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:506-577, table of contents.
- Maki ML, Armstrong L, Leung KT und Qin W (2013) Increased expression of β -glucosidase A in *Clostridium thermocellum* 27405 significantly increases cellulase activity. *Bioengineered* 4:15-20.
- Mansfield SD, Mooney C und Saddler JN (1999) Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnol Prog* 15:804-816.
- Marin E, Bodelon G und Fernandez LA (2010) Comparative analysis of the biochemical and functional properties of C-terminal domains of autotransporters. *J Bacteriol* 192:5588-5602.
- Mathew GM, Sukumaran RK, Singhania RR und Pandey A (2008) Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. *J Sci Ind Res India* 67:898-907.
- Maurer J, Jose J und Meyer TF (1997) Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:794-804.
- McCarter JD und Withers SG (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* 4:885-892.
- Merino ST und Cherry J (2007) Progress and challenges in enzyme development for Biomass utilization. *Adv Biochem Eng Biot* 108:95-120.
- Meyer TF, Halter R und Pohlner J (1987) Mechanism of extracellular secretion of an IgA protease by gram-negative host cells. *Adv Exp Med Biol* 216B:1271-1281.
- Mitchell D (2008) A Note on Rising Food Prices. *Policy Research Working Paper* 4682

- Mohagheghi A, Dowe N, Schell D, Chou YC, Eddy C und Zhang M (2004) Performance of a newly developed integrant of *Zymomonas mobilis* for ethanol production on corn stover hydrolysate. *Biotechnol Lett* 26:321-325.
- Morais S, Barak Y, Caspi J, Hadar Y, Lamed R, Shoham Y, Wilson DB und Bayer EA (2010) Cellulase-xylanase synergy in designer cellulosomes for enhanced degradation of a complex cellulosic substrate. *mBio* 1:5.
- Muller D, Benz I, Tapadar D, Buddenborg C, Greune L und Schmidt MA (2005) Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface. *Infect Immun* 73:3851-3859.
- Munoz-Gutierrez I, Oropeza R, Gosset G und Martinez A (2012) Cell surface display of a β -glucosidase employing the type V secretion system on ethanologenic *Escherichia coli* for the fermentation of cellobiose to ethanol. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:1141-1152.
- Murai T, Ueda M, Kawaguchi T, Arai M und Tanaka A (1998) Assimilation of celooligosaccharides by a cell surface-engineered yeast expressing β -glucosidase and carboxymethylcellulase from *Aspergillus aculeatus*. *Appl Environ Microbiol* 64:4857-4861.
- Naik SN, Goud VV, Rout PK und Dalai AK (2010) Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew Sust Energ Rev* 14:578-597.
- Nakatani Y, Yamada R, Ogino C und Kondo A (2013) Synergetic effect of yeast cell-surface expression of cellulase and expansin-like protein on direct ethanol production from cellulose. *Microb Cell Fact* 12
- Nicolay T, Lemoine L, Lievens E, Balzarini S, Vanderleyden J und Spaepen S (2012) Probing the applicability of autotransporter based surface display with the EstA autotransporter of *Pseudomonas stutzeri* A15. *Microb Cell Fact* 11:158.
- Nidetzky B, Steiner W, Hayn M und Claeysens M (1994) Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem J* 298 Pt 3:705-710.
- Okamoto T, Taguchi H, Nakamura K, Ikenaga H, Kuraishi H und Yamasato K (1993) *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. *Arch Microbiol* 160:333-337.

- Olofsson K, Bertilsson M und Liden G (2008) A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol Biofuels* 1
- Palmqvist E und Hahn-Hagerdal B (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour Technol* 74:17-24.
- Panesar PS, Marwaha SS und Kennedy JF (2006) *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *J Chem Technol Biotechnol* 81:623-635.
- Park M, Yoo G, Bong JH, Jose J, Kang MJ und Pyun JC (2015) Isolation and characterization of the outer membrane of *Escherichia coli* with autodisplayed Z-domains. *Biochim Biophys Acta* 1848:842-847.
- Petermann K, Vordenbaumen S, Pyun JC, Braukmann A, Bleck E, Schneider M und Jose J (2010) Autodisplay of 60-kDa Ro/SS-A antigen and development of a surface display enzyme-linked immunosorbent assay for systemic lupus erythematosus patient sera screening. *Anal Biochem* 407:72-78.
- Petersen K und Bock R (2011) High-level expression of a suite of thermostable cell wall-degrading enzymes from the chloroplast genome. *Plant Mol Biol* 76:311-321.
- Peterson R und Nevalainen H (2012) *Trichoderma reesei* RUT-C30--thirty years of strain improvement. *Microbiology* 158:58-68.
- Phillips SD (2007) Technoeconomic analysis of a lignocellulosic biomass indirect gasification process to make ethanol via mixed alcohols synthesis. *Ind Eng Chem Res* 46:8887-8897.
- Poblete-Castro I, Becker J, Dohnt K, dos Santos VM und Wittmann C (2012) Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:2279-2290.
- Pohlner J, Halter R, Beyreuther K und Meyer TF (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325:458-462.
- Quehl P, Hollender J, Schuurmann J, Brossette T, Maas R und Jose J (2016) Co-expression of active human cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 reductase on the cell surface of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 15:26.
- Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, Murphy R, Templer

- R und Tschaplinski T (2006) The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311:484-489.
- Reese ET (1976) History of the cellulase program at the U.S. army Natick Development Center. *Biotechnology and bioengineering symposium* 6:9-20.
- Reese ET, Siu RG und Levinson HS (1950) The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J Bacteriol* 59:485-497.
- Reiter B, Glieder A, Talker D und Schwab H (2000) Cloning and characterization of EstC from *Burkholderia gladioli*, a novel-type esterase related to plant enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:778-785.
- Ren C, Chen T, Zhang J, Liang L und Lin Z (2009) An evolved xylose transporter from *Zymomonas mobilis* enhances sugar transport in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 8:66.
- Robert V, Volokhina EB, Senf F, Bos MP, Van Gelder P und Tommassen J (2006) Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol* 4:e377.
- Rogers PL, Lee KJ und Tribe DE (1979) Kinetics of Alcohol Production by *Zymomonas mobilis* at High Sugar Concentrations. *Biotechnol Lett* 1:165-170.
- Romaniec MP, Huskisson N, Barker P und Demain AL (1993) Purification and properties of the *Clostridium thermocellum* bglB gene product expressed in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 15:393-400.
- Ryu S und Karim MN (2011) A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:529-542.
- Salema V, Marin E, Martinez-Arteaga R, Ruano-Gallego D, Fraile S, Margolles Y, Teira X, Gutierrez C, Bodelon G und Fernandez LA (2013) Selection of single domain antibodies from immune libraries displayed on the surface of *E. coli* cells with two β -domains of opposite topologies. *PloS one* 8:e75126.
- Saloheimo M, Kuja-Panula J, Ylosmaki E, Ward M und Penttila M (2002) Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -glucosidase BGLII (cel1A). *Appl Environ Microbiol* 68:4546-4553.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74:5463-5467.

- Schultheiss E, Paar C, Schwab H und Jose J (2002) Functional esterase surface display by the autotransporter pathway in *Escherichia coli*. *J Mol Catal B-Enzym* 18:89-97.
- Schultheiss E, Weiss S, Winterer E, Maas R, Heinzle E und Jose J (2008) Esterase autodisplay: enzyme engineering and whole-cell activity determination in microplates with pH sensors. *Appl Environ Microbiol* 74:4782-4791.
- Schumacher SD, Hannemann F, Teese MG, Bernhardt R und Jose J (2012) Autodisplay of functional CYP106A2 in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 161:104-112.
- Schumacher SD und Jose J (2012) Expression of active human P450 3A4 on the cell surface of *Escherichia coli* by Autodisplay. *J Biotechnol* 161:113-120.
- Seo JS, Chong H, Park HS, Yoon KO, Jung C, Kim JJ, Hong JH, Kim H, Kim JH, Kil JI, Park CJ, Oh HM, Lee JS, Jin SJ, Um HW, Lee HJ, Oh SJ, Kim JY, Kang HL, Lee SY, Lee KJ und Kang HS (2005) The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat Biotechnol* 23:63-68.
- Sevastyanovich YR, Leyton DL, Wells TJ, Wardius CA, Tveen-Jensen K, Morris FC, Knowles TJ, Cunningham AF, Cole JA und Henderson IR (2012) A generalised module for the selective extracellular accumulation of recombinant proteins. *Microb Cell Fact* 11:69.
- Shallom D und Shoham Y (2003) Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* 6:219-228.
- Sichwart S, Tozakidis IEP, Teese MG und Jose J (2015) Maximized autotransporter mediated expression (MATE) of surface display and secretion of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Food Technol Biotech* 53:251-260.
- Singhania RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C und Pandey A (2010) Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb Technol* 46:541-549.
- Skory CD, Freer SN und Bothast RJ (1997) Screening for ethanol-producing filamentous fungi. *Biotechnol Lett* 19:203-206.
- Skotnicki ML, Tribe DE und Rogers PL (1980) R-Plasmid Transfer in *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol* 40:7-12.
- Sorrell S, Speirs J, Bentley R, Brandt A und Miller R (2010) Global oil depletion: A review of the evidence. *Energ Policy* 38:5290-5295.

- Sprenger GA (1996) Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: A catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiol Lett* 145:301-307.
- Stern J, Kahn A, Vazana Y, Shamshoum M, Morais S, Lamed R und Bayer EA (2015) Significance of relative position of cellulases in designer cellulosomes for optimized cellulolysis. *PLoS one* 10:e0127326.
- Studier FW und Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-130.
- Swings J und De Ley J (1977) The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol Rev* 41:1-46.
- Szpirer CY, Faelen M und Couturier M (2001) Mobilization function of the pBHR1 plasmid, a derivative of the broad-host-range plasmid pBBR1. *J Bacteriol* 183:2101-2110.
- Takashima S, Nakamura A, Hidaka M, Masaki H und Uozumi T (1999) Molecular cloning and expression of the novel fungal β -glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J Biochem* 125:728-736.
- Tanaka T, Kawabata H, Ogino C und Kondo A (2011) Creation of a cellooligosaccharide-assimilating *Escherichia coli* strain by displaying active β -glucosidase on the cell surface via a novel anchor protein. *Appl Environ Microbiol* 77:6265-6270.
- Taylor LE, 2nd, Dai Z, Decker SR, Brunecky R, Adney WS, Ding SY und Himmel ME (2008) Heterologous expression of glycosyl hydrolases in planta: a new departure for biofuels. *Trends Biotechnol* 26:413-424.
- Taylor RG, Walker DC und McInnes RR (1993) *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res* 21:1677-1678.
- Teugjas H und Valjamae P (2013) Product inhibition of cellulases studied with ¹⁴C-labeled cellulose substrates. *Biotechnology for biofuels* 6:104.
- Tomme P, Heriban V und Claeysens M (1990) Adsorption of 2 Cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei* to Avicel - Evidence for Exo-Exo Synergism and Possible Loose Complex-Formation. *Biotechnol Lett* 12:525-530.
- Tomme P, Van Tilbeurgh H, Pettersson G, Van Damme J, Vandekerckhove J, Knowles J, Teeri T und Claeysens M (1988) Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. *Eur J Biochem* 170:575-581.

- Tsai SL, Oh J, Singh S, Chen R und Chen W (2009) Functional assembly of minicellulosomes on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface for cellulose hydrolysis and ethanol production. *Appl Environ Microbiol* 75:6087-6093.
- Valls M, Atrian S, de Lorenzo V und Fernandez LA (2000a) Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nat Biotechnol* 18:661-665.
- Valls M, de Lorenzo V, Gonzalez-Duarte R und Atrian S (2000b) Engineering outer-membrane proteins in *Pseudomonas putida* for enhanced heavy-metal bioadsorption. *J Inorg Biochem* 79:219-223.
- Van Gerven N, Sleutel M, Deboeck F, De Greve H und Hernalsteens JP (2009) Surface display of the receptor-binding domain of the F17a-G fimbrial adhesin through the autotransporter AIDA-I leads to permeability of bacterial cells. *Microbiology* 155:468-476.
- Verma D, Kanagaraj A, Jin SX, Singh ND, Kolattukudy PE und Daniell H (2010) Chloroplast-derived enzyme cocktails hydrolyse lignocellulosic biomass and release fermentable sugars. *Plant Biotechnol J* 8:332-350.
- Wells TJ, Sherlock O, Rivas L, Mahajan A, Beatson SA, Torpdahl M, Webb RI, Allsopp LP, Gobius KS, Gally DL und Schembri MA (2008) EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environ Microbiol* 10:589-604.
- Wood TM und McCrae SI (1979) Synergism Between Enzymes Involved in the Solubilization of Native Cellulose. *Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis*, Kap. 10, 181-209.
- Woodward J (1991) Synergism in Cellulase Systems. *Bioresour Technol* 36:67-75.
- Wyman BT (1999) Biomass Ethanol: Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges. *Annu Rev Energy Environ* 24:189-226.
- Xiao Z, Storms R und Tsang A (2004) Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. *Biotechnol Bioeng* 88:832-837.
- Yamada R, Taniguchi N, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H und Kondo A (2011) Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression. *Biotechnol Biofuels* 4

- Yanase H, Sato D, Yamamoto K, Matsuda S, Yamamoto S und Okamoto K (2007) Genetic engineering of *Zymobacter palmae* for production of ethanol from xylose. *Appl Environ Microbiol* 73:2592-2599.
- Yang TH, Kwon MA, Song JK, Pan JG und Rhee JS (2010) Functional display of *Pseudomonas* and *Burkholderia* lipases using a translocator domain of EstA autotransporter on the cell surface of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 146:126-129.
- You C, Zhang XZ, Sathitsuksanoh N, Lynd LR und Zhang YH (2012) Enhanced microbial utilization of recalcitrant cellulose by an *ex vivo* cellulosome-microbe complex. *Appl Environ Microbiol* 78:1437-1444.
- Zhang M, Eddy C, Deanda K, Finkelstein M und Picataggio S (1995) Metabolic Engineering of a Pentose Metabolism Pathway in Ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 267:240-243.
- Zhang Y-HP (2011) What is vital (and not vital) to advance economically-competitive biofuels production. *Process Biochem* 46:2091-2110.

Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| (v/v) | Volumenanteil |
| (w/v) | Massenanteil |
| AIDA | <i>Adhesin involved in diffuse adherence</i> |
| AS | Aminosäure |
| AT | Autotransporter |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAM | <i>β-barrel assembly machinery</i> |
| bp | Basenpaare |
| CBM | <i>Carbohydrate binding module</i> |
| CBP | <i>Consolidated bioprocessing</i> |
| CtxB | Cholera Toxin B |
| CMC | Carboxymethylcellulose |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Nukleosidtriphosphate |
| DTT | Dithiothreitol |
| DNS | 3,5-Dinitrosalicylsäure |
| DP | <i>Degree of polymerization</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| FCS | <i>Fetal bovine calf serum</i> |
| FP | Filterpapier |
| GH | Glykosidhydrolase |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| KDPG | 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat |
| M | mol/L |
| MATE | <i>maximized autotransporter mediated expression</i> |
| OD ₅₇₈ | Optische Dichte bei 578 nm |
| OmpT | <i>Outer membrane protein T</i> |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| pNPC | 4-Nitrophenyl-β-D-Cellobiosid |
| pNPG | 4-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| rpm | <i>revolutions per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SHF | <i>Separated hydrolysis and fermentation</i> |
| SSF | <i>Simultaneous saccharification and fermentation</i> |
| TMB | 3,3',5,5'-Teteramethylbenzidin |

2 DNA- und Aminosäure-Sequenzen

Die folgenden Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung bzw. von N- zu C-Terminus angegeben.

2.1 Sequenz der Passagier-Domäne von MATE-EstA

```

1 CTCGAGGGCGGGCGGTGACGACAACGCCGCG CCCGCCGCCCGCGGGCCGGCGTGCAGAAG CAGATCGTCTCGTTC
1 L E G G G D D N A A P A A P P A G V Q K Q I V S F
76 GGCACAGCCTGTCCGACGCTGGCACCTAT TCGCCGACAGATCCTGCTCGGCTTCGGCGGC GGGCGCTTCACCACC
26 G D S L S D A G T Y S P Q I L L G F G G G R F T T
151 AATCCGGGCGAGGTCTGGACCCAGAAGGTG GCCGAATACTTCGGCGACAGCTCAAGCCC GCCTACGAAGCGGC
51 N P G E V W T Q K V A E Y F G D T L K P A Y E G G
226 TTCGGGGTCCCCTGCAGGCCACCGCGCGC CTGGGCTACGCCAGGGCGGCTCGCGCGTG ACGCTGCAGCGGGC
76 F G V P L Q A T G G L G Y A Q G G S R V T L Q P G
301 CTCGGCCACGCCGACGCTCGGTGCCGAAC GCCGACTTCGCCAGGCCACCACCACGCCG ATCGCCACCCAGGTG
101 L G H A D A S V P N A D F A Q A T T T P I A T Q V
376 CAGCAGTACCTGACGGCGCACGGCAGCTTC AACGCCAACCAGATCGTGCTGATCAACGGC GGCGCCAACGCATC
126 Q Q Y L Q A H G S F N A N Q I V L I N G G A N D I
451 CTGTTCCAGGCGCAAGTCGCGGCCGCGGCC GGCAATACCCCGCGCCCAAGTCGCGGCC GCGCAGGCGGTTCGGC
151 L F Q A Q V A A A A G N T P A A Q V A A A Q A V G
526 CTGGCGGCCCAGCAGTTCGGCCAGATCATC GCGCAGATCGCCAACGCCGGCGCCAGCCAC GTGTTTCGTGCCAAC
176 L A A Q Q F G Q I I A Q I A N A G A S H V F V A N
601 ATGCCCGACATCGGCACCACGCCGCTGGCG GTGGCCGGCGGCCGCCACCAGGCCGCG CTGACCCAGCTCTCG
201 M P D I G T T P L A V A G G A A T Q A A L T Q L S
676 GGCCTGTTCAACCAGACGCTGAACGCCACG CTCGCCGCGCTGCAGGTCGACACCAGCAAG GTCAAGGTGATGGAC
226 G L F N Q T L N A T L A A L Q V D T S K V K V M D
751 GTGTACACCTGGCAGGACGGCATCGGCGCG AACCTCCAGGCCAACGGCTTCACGGTCGGC AATACCGGCACGGCC
251 V Y T W Q D G I G A N F Q A N G F T V G N T G T A
826 TGCAACCTGACCGCCATGGCGGCCGCGGCC GCGAAGCGGGGTGGCCAATCCGAGCGGC TTCGCCTCCTCGTG
276 C N L T A M A A A A A K A G V A N P S G F A S S L
901 TTCTGCTCGCCGACACCTACACGGTGGCC AACGCCGACCAGACCTACATGTTCCGCCGAC ACGGTGCACCCGACC
301 F C S P Q T Y T V A N A D Q T Y M F A D T V H P T
976 ACGCGCTGCATGCGCTGGTCGCGCAGTTC GTCGAGCAGCAGATCGCGGCCGGCGGCTC ACCAAGGGTACC
326 T R L H A L V A Q F V E Q Q I A A A G V T K G T

```

2.2 Sequenz der Passagier-Domäne von MATE-BglIA

```

1 AGCAAAATTACCTTCCCGAAAGATTTTATC TGGGGTAGCGCAACCGCAGCATATCAGATT GAAGGTGCATATAAT
1 S K I T F P K D F I W G S A T A A Y Q I E G A Y N
76 GAAGATGGCAAAGGCGAAAGCATTGGGAT CGTTTTAGCCATACACCGGGTAATATTGCA GATGGTCATACCGGT
26 E D G K G E S I W D R F S H T P G N I A D G H T G
151 GATGTTGCCTGTGATCATTATCATCGTTAT GAAGAGGATATCAAAATCATGAAAGAGATC GGCATCAAAGCTAT
51 D V A C D H Y H R Y E E D I K I M K E I G I K S Y
226 CGCTTTAGCATTAGCTGGCCTCGTATTTTT CCGGAAGGCACCGGTAAACTGAATCAGAAA GGCTGGAATTTCTAT
76 R F S I S W P R I F P E G T G K L N Q K G L D F Y
301 AAACGTCTGACCAATCTGCTGCTGAAAAAT GGTATTATGCCTGCAATTACCCTGTATCAT TGGGATCTGCCGCAG
101 K R L T N L L L E N G I M P A I T L Y H W D L P Q
376 AAACGTGAGGATAAAGGTGGTTGAAAAAT CGTGATACCACCGATTATTTACCGAATAT AGCGAGGTGATCTTT
126 K L Q D K G G W K N R D T T D Y F T E Y S E V I F
451 AAAAACTGGGTGATATTGTGCCGATCTGG TTTACCCATAATGAACCGGGTGTGTAGC CTGCTGGGTCAATTT
151 K N L G D I V P I W F T H N E P G V V S L L G H F
526 CTGGGTATTATGCACCGGGTATTAAGAT CTGCGTACCAGCCTGGAAGTTAGCCATAAC CTGCTGCTGAGCCAT
176 L G I H A P G I K D L R T S L E V S H N L L L S H
601 GGTAAGCAGTTAAACTGTTTCGCGAGATG AATATTGATGCCAGATTGGTATTGCACTG AACCTGAGCTATCAT
201 G K A V K L F R E M N I D A Q I G I A L N L S Y H
676 TATCCGGCAAGCGAAAAAGCAGAAGATATT GAAGCAGCAGAAGTGGCTTTAGCCTGGCA GGTCTGTTGATCTG
226 Y P A S E K A E D I E A A E L S F S L A G R W Y L
751 GATCCGGTCTGAAAGGTCGTTATCCGGAA AATGCACTGAAACTGTACAAAAAAAAGGC ATCGAACTGTCGTT
251 D P V L K G R Y P E N A L K L Y K K K G I E L S F
826 CCGGAAGATGATCTGAAACTGATTAGCCAG CCGATTGATTTTATCGCCTTTAACAATTAT AGCAGCGAGTTCATC
276 P E D D L K L I S Q P I D F I A F N N Y S S E F I
901 AAATATGATCCGAGCAGCGAAAGCGGTTTT AGTCCGGCAAATAGCATTCTGGAAAAATTC GAGAAAACCGATATG
301 K Y D P S S E S G F S P A N S I L E K F E K T D M
976 GGCTGGATTATCTATCCGGAAGGTCGTAT GATCTGCTGATGCTGCTGGATCGTGATTAT GGCAAACCGAATATT
326 G W I I Y P E G L Y D L L M L L D R D Y G K P N I
1051 GTGATTAGCGAAAAATGGTGCAGCCTTCAA GATGAAATTGGTAGCAATGGCAAAATCGAG GATACCAAACGTATC
351 V I S E N G A A F K D E I G S N G K I E D T K R I
1126 CAGTATCTGAAAGATTATCTGACCCAGGCA CATCGTGCAATTCAGGATGGTGTAACTCG AAAGCATATTATCTG
376 Q Y L K D Y L T Q A H R A I Q D G V N L K A Y Y L
1201 TGGTCCCTGCTGGATAATTTGAATGGGCA TATGGTTACAACAAACGCTTTGGTATTGTG CACGTGAATTTTGAT
401 W S L L D N F E W A Y G Y N K R F G I V H V N F D
1276 ACCCTGGAACGCAAAATCAAAGATAGCGGC TATTGGTATAAAGAGGTGATCAAAAAACAAC GGCTTT
426 T L E R K I K D S G Y W Y K E V I K N N G F

```

2.3 Sequenz der Passagier-Domäne von MATE-Cel5A

```

1 GCAGGCACCAAAACACCGGTTGCAAAAAAT GGTGAGCTGAGTATTAAGGCACCCAGCTG GTTAATCGTGATGGT
1 A G T K T P V A K N G Q L S I K G T Q L V N R D G
76 AAAGCAGTGCAGCTGAAAGGTATTAGCAGC CATGGTCTGCAGTGGTATGGTGAATTTGTT AATAAAGACAGCCTG
26 K A V Q L K G I S S H G L Q W Y G E F V N K D S L
151 AAATGGCTGCGTGATGATTGGGGTATTACC GTTTTTCGTGCAGCAATGTATACCGCAGAT GGTGGCTATATTGAT
51 K W L R D D W G I T V F R A A M Y T A D G G Y I D
226 AATCCGAGCGTTAAAAACAAAGTGAAAGAA GCAGTTGAAGCAGCCAAAGAAGTGGGCATT TATGTGATTATTGAT
76 N P S V K N K V K E A V E A A K E L G I Y V I I D
301 TGGCACATTCTGAACGATGGTAATCCGAAT CAGAACAAAGAAAAAGCGAAAGAATTTTTC AAAGAAATGAGCAGC
101 W H I L N D G N P N Q N K E K A K E F F K E M S S
376 CTGTATGGCAATACCCCGAATGTGATTAT GAAATTGCCAATGAACCGAATGGTGATGTG AATTGGAAACGCGAT
126 L Y G N T P N V I Y E I A N E P N G D V N W K R D
451 ATCAAACCGTATGCCGAAGAAGTGATTAGC GTTATTCGTAAAAATGACCCGGACAACATT ATTATCGTTGGCACC
151 I K P Y A E E V I S V I R K N D P D N I I I V G T
526 GGCACCTGGTCACAGGATGTTAATGATGCA GCAGATGATCAACTGAAAGATGCCAATGTT ATGTATGCCCTGCAT
176 G T W S Q D V N D A A D D Q L K D A N V M Y A L H
601 TTTTATGCAGGCACCCATGGTCAGTTTCTG CGTGATAAAGCAAATTATGCACTGAGCAAAA GGTGCACCGGTTTTT
201 F Y A G T H G Q F L R D K A N Y A L S K G A P V F
676 GTTACCGAATGGGGCACCAGTGATGCAAGC GGTAATGGTGGTGTTTTTCTGGATCAGAGC CGTGAATGGCTGAAT
226 V T E W G T S D A S G N G G V F L D Q S R E W L N
751 TATCTGGATAGCAAAACCATTAGCTGGGTG AACTGGAATCTGAGCGATAAACAAGAAAGC AGCAGCGCACTGAAA
251 Y L D S K T I S W V N W N L S D K Q E S S S A L K
826 CCGGTTGCAAGCAAAACAGGTGGTTGGCGT CTGAGTGATCTGAGCGCAAGCGGCACCTTT GTTCGTGAAAATATT
276 P G A S K T G G W R L S D L S A S G T F V R E N I
901 CTGGGTACAAAAGATAGCACCAAAGACATT CCGGAAACACCGGCAAAAAGATAAACCAGACC CAAGAAAATGGTATT
301 L G T K D S T K D I P E T P A K D K P T Q E N G I
976 AGCGTTCAGTATCGTGCCGGTGATGGTAGC ATGAATAGCAATCAGATTTCGTCCGCAGCTG CAGATCAAAAACAAT
326 S V Q Y R A G D G S M N S N Q I R P Q L Q I K N N
1051 GGTAATACCACCGTGGATCTGAAAGACGTT ACCGCACGTTATTGGTATAACGCCAAAAAC AAAGGCCAGAATGTG
351 G N T T V D L K D V T A R Y W Y N A K N K G Q N V
1126 GATTGTGATTATGCACAGCTGGGTTGTGGT AATATGACCCATAAATTTGTGACACTGCAC AAACCGAAACAGGGT
376 D C D Y A Q L G C G N M T H K F V T L H K P K Q G
1201 GCAGATACCTATCTGGAACCTGGGTTTCAAA AATGGCACCCCTGGCACCGGGTGCCTCAACC GGTAATATTAGCTG
401 A D T Y L E L G F K N G T L A P G A S T G N I Q L
1276 CGTCTGCATAACGATGATTGGAGCAATTAT GCCCAGAGCGGTGATTATAGCTTTTTTCAAA AGCAACACCTTTAAA
426 R L H N D D W S N Y A Q S G D Y S F F K S N T F K
1351 ACCACCAAAAAAATCACCCCTGTATGACCAG GGTAAACTGATTTGGGGCACCGAACCGAAC
451 T T K K I T L Y D Q G K L I W G T E P N

```

2.4 Sequenz der Passagier-Domäne von MATE-Ce1A

```

1 GCAGGCGTTCGTTTAATACCAAATATCCG TATGGTCCGACCAGCATTGCAGATAATCAG AGCGAAGTTACCGCA
1 A G V P F N T K Y P Y G P T S I A D N Q S E V T A
76 ATGCTGAAAGCAGAATGGGAAGATTGGAAA AGCAAACGCATTACCAGCAATGGTGCCGGT GGTATAAACGTGTT
26 M L K A E W E D W K S K R I T S N G A G G Y K R V
151 CAGCGTGATGCAAGCACCAATTATGATACC GTTAGCGAAGGTATGGGTATGGTCTGCTG CTGGCAGTTTGTITT
51 Q R D A S T N Y D T V S E G M G Y G L L L A V C F
226 AATGAACAGGCACTGTTTCGATGATCTGTAT CGTTATGTGAAAAGCCACTTTAATGGTAAC GGTCTGATGCATTGG
76 N E Q A L F D D L Y R Y V K S H F N G N G L M H W
301 CATATTGATGCCAATAATAACGTGACCAGC CATGATGGTGGTATGGTGCAGCAACCGAT GCAGATGAAGATATT
101 H I D A N N N V T S H D G G D G A A T D A D E D I
376 GCACTGGCACTGATTTTTGCCGATAAACTG TGGGGTAGCAGCGGTGCAATTAACCTATGGT CAAGAAGCACGTACC
126 A L A L I F A D K L W G S S G A I N Y G Q E A R T
451 CTGATCAATAACCTGTATAATCATTGCGTT GAACACGGTAGCTATGTTCTGAAACCGGGT GATCGTTGGGGTGGT
151 L I N N L Y N H C V E H G S Y V L K P G D R W G G
526 AGCAGTGTACCAATCCGAGCTATTTTGCA CCGGCATGGTATAAAGTTTATGCACAGTAT ACCGGTGATACCCGT
176 S S V T N P S Y F A P A W Y K V Y A Q Y T G D T R
601 TGGAATCAGGTTGCGGATAAATGTTATCAG ATTGTGGAAGAAGTAAAAAATACAACAAT GGCACCGGTCTGGTT
201 W N Q V A D K C Y Q I V E E V K K Y N N G T G L V
676 CCGGATTGGTGTACCGCAAGTGGTACACCG GCAAGCGGTGAGAGCTATGATTACAAATAT GATGCAACCCGTTAT
226 P D W C T A S G T P A S G Q S Y D Y K Y D A T R Y
751 GGTTGGCGTACCGCAGTTGATTATAGCTGG TTTGGTATCAGCGGTGCAAAAGCAAATTGT GATATGCTGACCAAAA
251 G W R T A V D Y S W F G D Q R A K A N C D M L T K
826 TTCTTTGCACGTGATGGCGCAAAAGGTATT GTTGATGGTTATACCATTGAGGGCAGCAAA ATTAGCAATAATCAT
276 F F A R D G A K G I V D G Y T I Q G S K I S N N H
901 AACGCCAGCTTTATTGGTCCGGTTGCAGCA GCAAGCATGACCGGTTATGATCTGAATTTT GCCAAAGAAGTGTAT
301 N A S F I G P V A A A S M T G Y D L N F A K E L Y
976 CGTGAACCGGTTGCAGTTAAAGATAGCGAG TATTATGGCTATTATGGTAATAGCCTGCGT CTGCTGACCCTGCTG
326 R E T V A V K D S E Y Y G Y Y G N S L R L L T L L
1051 TATATTACCGGCAATTTTCCGAATCCGCTG AGCGATCTGAGCGGTGAGCCGACCCCTCCG AGCAATCCGACCCCG
351 Y I T G N F P N P L S D L S G Q P T P P S N P T P
1126 AGTCTGCCTCCGAGGTTGTTTATGGTGAT GTGAATGGTATGGCAATGTTAATAGCACC GATCTGACCATGCTG
376 S L P P Q V V Y G D V N G D G N V N S T D L T M L
1201 AAACGTTATCTGCTGAAAAGCGTGACCAAT ATCAATCGTGAAGCAGCAGATGTTAATCGT GACGGTGCGATTAAT
401 K R Y L L K S V T N I N R E A A D V N R D G A I N
1276 AGCAGTGATATGACAATTCTGAAACGCTAC CTGATTAAGCATTCCGCATCTGCCGTAT
426 S S D M T I L K R Y L I K S I P H L P Y

```

2.5 Sequenz der Passagier-Domäne von MATE-Ce1K

```

1 CTGGAAGATAAAAAGCAGCAAACCTGCCGGAT TACAAAAACGATCTGCTGTATGAACGTACC TTTGATGAAGGTCTG
1 L E D K S S K L P D Y K N D L L Y E R T F D E G L
76 TGTTCCTCCGTGGCATAACCTGTGAAGATAGC GGTGGTAAATGTGATTTTGCCGTTGTGAT GTTCCGGGTGAACCG
26 C F P W H T C E D S G G K C D F A V V D V P G E P
151 GGTAATAAAGCATTTTCGTCTGACCGTTATT GATAAAGGCCAGAATAAATGGTCAGTGCAG ATGCGTCATCGTGGT
51 G N K A F R L T V I D K G Q N K W S V Q M R H R G
226 ATTACCTGGAACAGGGTCATACCTATACC GTTCGTTTTTACCATTTGGAGCGATAAAAAGC TGTCTGTGTATGCA
76 I T L E Q G H T Y T V R F T I W S D K S C R V Y A
301 AAAATTGGTCAGATGGGCGAACCCGTATACC GAATATTGGAATAAATAACTGGAACCCGTTT AATCTGACCCCTGGT
101 K I G Q M G E P Y T E Y W N N N W N P F N L T P G
376 CAGAAACTGACCGTTGAACAGAATTTTACC ATGAATATCCGACCGATGATACCTGCGAA TTCACCTTTCATCTG
126 Q K L T V E Q N F T M N Y P T D D T C E F T F H L
451 GGTGGTGAACGGCAGCAGGCACCCCGTAT TATGTTTATCTGGATGATGTTAGCCTGTAC GATCCGCGTTTTGTT
151 G G E L A A G T P Y Y V Y L D D V S L Y D P R F V
526 AAACCGGTTGAATATGTTCTGCCGACGCGG GATGTTCTGTTAATCAGGTTGGTTATCTG CCGTTTGCCAAAAA
176 K P V E Y V L P Q P D V R V N Q V G Y L P F A K K
601 TACGCAACCGTTGTTAGCAGCAGCACCAGT CCGCTGAAATGGCAGCTGCTGAATAGCGCA AATCAGGTTGTTCTG
201 Y A T V V S S S T S P L K W Q L L N S A N L T P G
676 GAAGGCAATACCATTCCGAAAAGGTTCTGGAT AAAGATAGCCAGGATTATGTGCATTGGATC GATTTTCAGCAACTTT
226 E G N T I P K G L D K D S Q D Y V H W I D F S N F
751 AAAACCGAAGCAAAGGCTACTACTTTAAA CTGCCGACCGTTAATAGCGATACCAATTAT AGCCATCCGTTTGAT
251 K T E G K G Y Y F K L P T V N S D T N Y S H P F D
826 ATTAGCGCAGATATCTATAGCAAAATGAAA TTTGATGCCCTGGCCTTCTTTTATCATAAA CGTAGCGGTATTCGG
276 I S A D I Y S K M K F D A L A F F Y H K R S G I A P
901 ATCGAAATGCCGTATGCAGCGGTTGAACAG TGGACCCGTCGCGCAGGTATATTGGTATT GAACCGAATAAAGGT
301 I E M P Y A G G E Q W T R P A G H I G I E P N K G
976 GATACCAATGTTCCGACCTGGCCTCAGGAT GATGAATATGCAGGTCGTCGCGAGAAATAT TACACCAAAGATGTT
326 D T N V P T W P Q D D E Y A G R P Q K Y Y T K D V
1051 ACCGGTGGTTGGTATGATGCCGGTGTATCAT GGCAAAATATGTTGTGAATGGTGGTATTGCA GTTTGGACCCCTGATG
351 T G G W Y D A G D H G K Y V V N G G I A V W T L M
1126 AACATGTATGAGCGTGCACAAAATTCGCGGT ATTGCCAATCAGGGTGCATATAAAGATGGT GGCATGAATATTCCG
376 N M Y E R A K I R G I A N Q G A Y K D G G M N I P

```

```

1201 GAACGCAATAATGGTTATCCGGACATTCTG GATGAAGCACGTTGGGAAATTGAATTTTTTC AAAAAATGCAGGTT
401 E R N N G Y P D I L D E A R W E I E F F K K M Q V
1276 ACCGAAAAAAGATCCGAGCATTGCAGGT ATGGTGCATCATAAAATTCATGATTTTCGT TGGACCGCACTGGGT
426 T E K E D P S I A G M V H H K I H D F R W T A L L G
1351 ATGCTGCCGATGAAGATCCGACGCTCGT TATCTGCGTCCGGTTAGCACCGCAGCAACC CTGAATTTTGCAGCC
451 M L P H E D P Q P R Y L R P V S T A A T L N F A A
1426 ACCCTGGCACAGAGCGCACGTCTGTGGAAA GATTATGATCCGACCTTTGCAGCAGATTGT CTGGAAAAAGCAGAA
476 T L A Q S A R L W K D Y D P T F A A D C L E K A E
1501 ATTGCATGGCAGGCAGCACTGAAACATCCG GATATTTATGCAGAATATACACCGGGTAGT GGTGGTCCGGGTGGC
501 I A W Q A A L K H P D I Y A E Y T P G S G G P G G
1576 GGTCCGTATAATGATGATTATGTTGGTGTAT GAGTTTTTATTGGGCAGCCTGTGAACTGTAT GTTACCACCGGCAAA
526 G P Y N D D Y V G D E F Y W A A C E L Y V T T G K
1651 GATGAGTATAAAAATATCTGATGAATCA CCGCACTACCTGGAATGCCTGCAAAAATG GGTGAAAATGGTGGT
551 D E Y K N Y L M N S P H Y L E M P A K M G E N G G
1726 GCAAAATGGTGAAGATAATGGTCTGTGGGGT TGTTCCTTACCTGGGGTACAACCCAGGGTCTG GGCACCATTACACTG
576 A N G E D N G L W G C F T W G T T Q G L G T I T L
1801 GCACTGGTGGAAAATGGTCTGCCTGCAACC GATATTCAGAAAGCAGTAATAACATTGCA AAAGCAGCCGATCGT
601 A L V E N G L P A T D I Q K A R N N I A K A A D R
1876 TGGCTGGAAAATATTGAAGAACAGGGTTAT CGTCTGCCGATTAACAGGCCGAAGATGAA CGTGGTGGCTATCCG
626 W L E N I E E Q G Y R L P I K Q A E D E R G G Y P
1951 TGGGGTAGCAATAGCTTTATCTGAATCAG ATGATCGTGTGGGCTATGCCTATGATTTT ACCGGCAATAGCAAA
651 W G S N S F I L N Q M I V M G Y A Y D F T G N S K K
2026 TATCTGGACGTTATGCAGGATGGTATGAGC TATCTGCTGGGTCGCAATGGTCTGGATCAG AGCTATGTGACCGT
676 Y L D G M Q D G M S Y L L G R N G L D Q S Y V T G

```

2.5 Sequenz der Passagier-Domäne von MATE-CelK (Fortsetzung)

```
2101 TATGGTGAACGTCCTCGCTGCAGAAATCCGCAT GATCGCTTTTGGACACCGCAGACCAGCAAA AAATTCCTGCACCG
701 Y G E R P L Q N P H D R F W T P Q T S K K F P A P
2176 CCTCCGGGTATTATTGCGGGTGGTCCGAAT AGCCGTTTTGAAGATCCTACCATTACCGCA GCAGTGAAAAAAGAT
726 P P G I I A G G P N S R F E D P T I T A A V K K D
2251 ACCCCTCCTCAGAAATGCTATATCGATCAT ACCGATAGCTGGTCCACCAATGAAATTACC GTTAATTGGAATGCA
751 T P P Q K C Y I D H T D S W S T N E I T V N W N A
2326 CCGTTTGCATGGGTTACCGCGTACCTGGAT GAAATTGATCTGATT
776 P F A W V T A Y L D E I D L I
```

2.6 Sequenz des modifizierten CtxB-Signalpeptids im MATE-System

```
1 ATGATCAAACCTGAAATTCGGCGTCTTCTTC ACCGTACTGCTGTCTCTGCTTACGCTCAC GGTACTCCGCAGAAC
1 M I K L K F G V F F T V L L S S A Y A H G T P Q N
76 ATCACC
26 I T
```

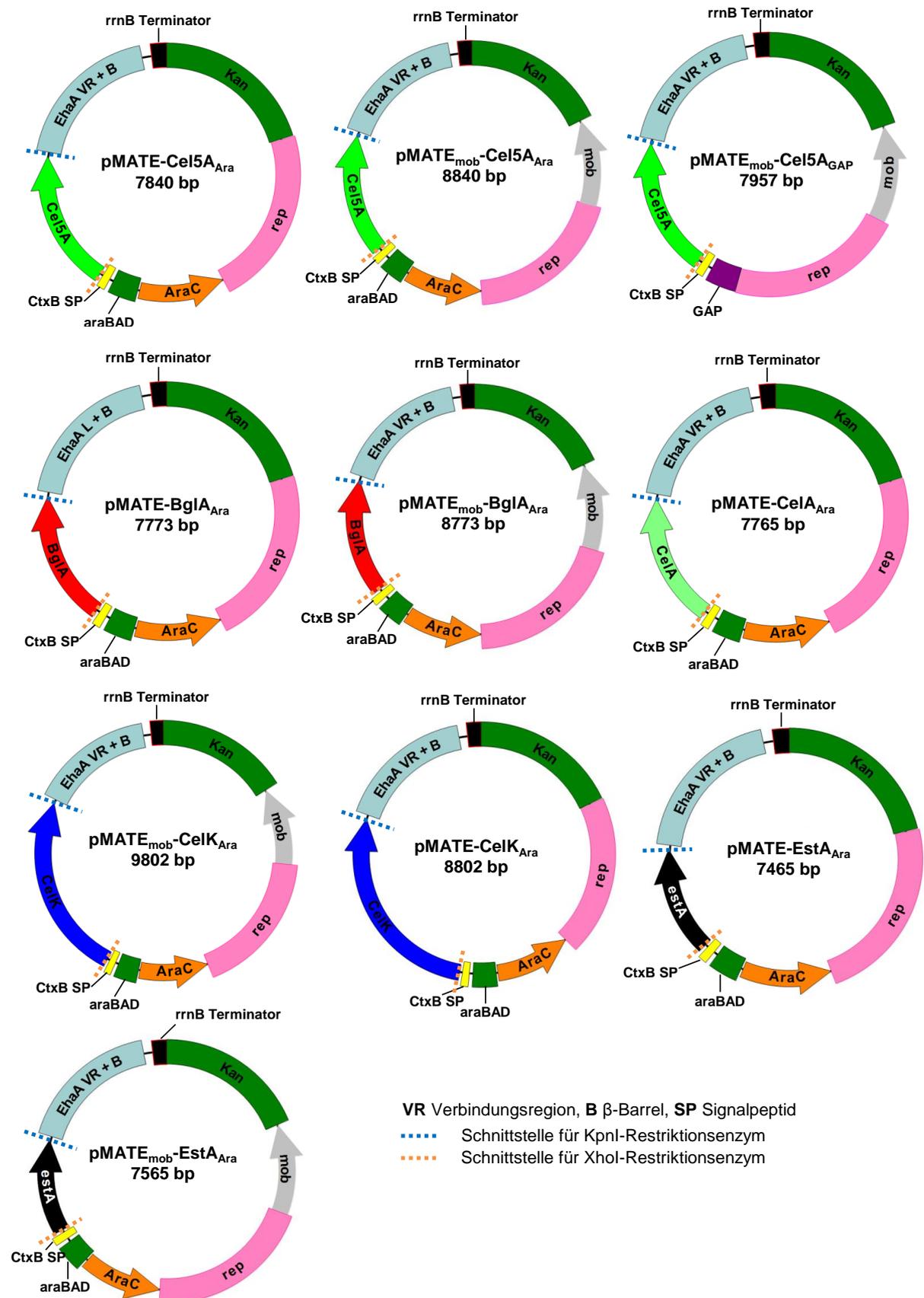
2.7 Sequenz von EhaA-Verbindungsregion und - β -Fass im MATE-System

```

1 CTGACCAACAATGGCAGCTGATGACGGGT ATGAGCGGTCAACAAGCGGGTAACGTTCTG GTTGTTAAGGGCAAT
1 L T N N G T L M T G M S G Q Q A G N V L V V K G N
76 TACCATGGCAATAACGGCCAGCTGGTCATG AACACGGTTCTGAACGGCGATGATAGCGTG ACCGACAAGCTGGTG
26 Y H G N N G Q L V M N T V L N G D D S V T D K L V
151 GTCGAGGGCGACACCTCTGGTACGACCGCA GTGACGGTGAATAATGCAGGCGGTACGGGT GCCAAAACCCTGAAC
51 V E G D T S G T T A V T V N N A G G T G A K T L N
226 GGTATTGAGTTGATCCACGTTGACGGTAAG AGCGAGGGCGAGTTTGTGCAGGCAGGCCGC ATTGTTGCTGGCGCT
76 G I E L I H V D G K S E G E F V Q A G R I V A G A
301 TATGACTATACGCTGGCCCCGTGGTCAGGGC GCGAATAGCGGTAACGGTATCTGACCAGC GGCTCCGACTCCCCG
101 Y D Y T L A R G Q G A N S G N W Y L T S G S D S P
376 GAACTGCAACCGGAGCCTGATCCGATGCCG AATCCGGAGCCAAACCCGAACCCGGAACCG AACCCAAATCCGACC
126 E L Q P E P D P M P N P E P N P N P E P N P N P T
451 CCGACTCCGGGTCCGGACTTGAACGTTGAT AACGACCTGCGTCCGGAGGCCGGTTCGTAC ATCGCGAACCTGGCA
151 P T P G P D L N V D N D L R P E A G S Y I A N L A
526 GCGGCCAATACGATGTTTACGACCCGCTCTG CACGAACGCGCTGGGTAATACCTACTATACC GATATGGTCACTGGT
176 A A N T M F T T R L H E R L G N T Y Y T D M V T G
601 GAACAGAAACAAACCACCATGTGGATGCGC CACGAGGGTGGTCACAATAAGTGGCGCGAC GGTAGCGGCCAGTTG
201 E Q K Q T T M W M R H E G G H N K W R D G S G Q L
676 AAAACCCAGAGCAATCGCTACGTTCTGCAA TTGGGCGGTGATGTGGCGCAATGGAGCCAA AACGGCAGCGACCGT
226 K T Q S N R Y V L Q L G G D V A Q W S Q N G S D R
751 TGGCATGTCCGGTGTGATGGCAGGTTACGGC AACAGCGACAGCAAGACCATCTCCAGCCGT ACCGGTTACCGTGCG
251 W H V G V M A G Y G N S D S K T I S S R T G Y R A
826 AAGGCAAGCGTCAACGGTTACAGCACCGGC CTGTATGCCACCTGGTATGCTGATGATGAG AGCCGCAACGGTGCT
276 K A S V N G G Y S T G L Y A T W Y A D D E S R N G A
901 TACTTGGACAGCTGGGCACAGTATCTTGG TTCGATAATACGGTGAAGGCGACGACCTG CAGAGCGAAAGCTAC
301 Y L D S W A Q Y S W F D N T V K G D D L Q S E S Y
976 AAATCGAAAGGTTTCACCGCGAGCCTGGAA GCCGGCTATAAGCACAAACTGGCGGAATTC AATGGCAGCCAGGGT
326 K S K G F T A S L E A G Y K H K L A E F N G S Q G
1051 ACTCGTAACGAATGGTACGTTCAACCGCAG GCGCAAGTCACTTGGATGGGCGTTAAGGCG GATAAACACCGTGAG
351 T R N E W Y V Q P Q A Q V T W M G V K A D K H R E
1126 AGCAACGGTACGTTGGTGCATAGCAACGGT GATGGTAATGTCCAAACCCGTCTGGGTGTG AAAACGTGGCTGAAG
376 S N G T L V H S N G D G N V Q T R L G V K T W L K
1201 TCCCATCACAAAATGGACGACGGTAAATCT CGTGAATTTACGCCGTTTCGTGGAAGTTAAC TGGCTGCATAATAGC
401 S H H K M D D G K S R E F Q P F V E V N W L H N S
1276 AAGGATTTACGACGACGATGGATGGTGTC TCCGTTACCCAGGACGGCGCACGTAACATT GCGGAGATCAAGACC
426 K D F S T S M D G V S V T Q D G A R N I A E I K T
1351 GCGTTCGAGGGTCAGCTGAATGCGAATCTG AATGTTTGGGGTAACGTGGGTGTTCAAGTA GCGGACCGTGGTTAC
451 G V E G Q L N A N L N V W G N V G V Q V A D R G Y
1426 AATGATAACGCGGATGGTGGGTATTAAG TGGCAGTTTTAA
476 N D T S A M V G I K W Q F *

```

3 Plasmidkarten



4 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Zeitschriftenbeiträge:

- Tozakidis IEP, Sichwart S, Jose J (2014) Autotransporter-mediated esterase display on *Zymomonas mobilis* and *Zymobacter palmae*. *Journal of Biotechnology*, 10,191:228-235.
- Sichwart S, Tozakidis IEP, Teese M, Jose J (2015) Maximized autotransporter mediated expression (MATE) for surface display and secretion of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Food Technology and Biotechnology*, 53:251-260.
- Tozakidis IEP, Sichwart S, Jose J (2015) Going beyond *E. coli*: Autotransporter mediated surface display in alternative host organisms. *New Biotechnology*, 32,6: 644-650.
- Tozakidis IEP, Quehl P, Schüürmann J, Jose J (2015) Lets do it outside: Neue Biokatalysatoren mittels Surface Display. *BioSpektrum*, 21,6: 668-671.
- Tozakidis IEP, Brossette T, Lenz F, Maas RM, Jose J (2016) Proof of concept for the simplified breakdown of cellulose by combining *Pseudomonas putida* strains with surface displayed thermophilic endocellulase, exocellulase and β -glucosidase. *Microbial Cell Factories* 15:103.

Konferenzbeiträge:

- Tozakidis IEP, Sichwart S, Jose J (2013) Surface display of an active esterase on *Zymomonas mobilis* cells using the Autodisplay technology. *Horizons in Molecular Biology*, Göttingen, 9.9.-12.9., P65.
- Tozakidis IEP, Meyers A, Brossette T, Jose J (2014) Surface display of enzymes on *Zymomonas mobilis* and *Zymobacter palmae* using the autotransporter secretion pathway. *16th European Congress on Biotechnology*, Edinburgh, 13.7.-16.7., PA-16.
- Tozakidis IEP, Meyers A, Jose J (2014) Establishing the ethanologenic bacteria *Zymomonas mobilis* and *Zymobacter palmae* as platforms for surface display applications. *BioCat*, Hamburg, 31.8.-3.9., P3-42.

Konferenzbeiträge (Fortsetzung):

- Tozakidis IEP, Brossette T, Lenz F, Jose J **(2015)** Towards the enzymatic release of glucose from cellulose - Spinning straw into gold. *Forschung der Chemischen Industrie Symposium*, Münster, 21.5., P40.
- Tozakidis IEP, Brossette T, Lenz F, Jose J **(2015)** Microbial teamwork: concerted hydrolysis of cellulose using surface displayed cellulases on *Pseudomonas putida*. *BioMicroWorld 2015*, Barcelona, 28.10-30.10., P545.

Vortrag:

- Tozakidis IEP, Jose J **(2015)** Stroh zu Gold – Biokatalytische Verwertung von Cellulose mithilfe der Autodisplay-Technologie. *RLS Stipendiatentreffen*, Berlin, 10.10.

Patentanmeldung:

- Jose J, Teese MG, Schwart S, Tozakidis IEP **(2014)** Improved surface display of functional proteins in a broad range of gram negative bacteria. Veröffentlichungsnummer WO2014139862 A1.

5 Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|----------------------------------|
| Name | Iasson Elias Philippos Tozakidis |
| Geburtsdatum | 30.04.1987 |
| Geburtsort | Lippstadt |
| Staatsangehörigkeit | Griechisch, Deutsch |

Akademischer Werdegang

| | |
|-------------------|---|
| 1997 – 2006 | Evangelisches Gymnasium, Lippstadt |
| 06/2006 | Allgemeine Hochschulreife |
| 2006 – 2012 | Chemiestudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) Münster |
| 03/2009 | Abschluss der Prüfungen zum Vordiplom |
| 03/2012 | Abschluss der mündlichen Prüfungen zum Diplom |
| 03/2012 – 09/2012 | Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-J. Galla, Institut für Biochemie, WWU Münster. |
| seit 10/2012 | Promotionsstudent bei Prof. Dr. Joachim Jose, Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie und NRW Graduate School of Chemistry, WWU Münster. |

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater **Prof. Dr. Joachim Jose** bedanken, der mir die Arbeit an einem spannenden Thema ermöglicht hat, mir für fachliche Diskussionen immer zur Seite stand und auch darüber hinaus eine offene, freundliche Atmosphäre geschaffen hat, in der ich mich sehr wohl gefühlt habe.

Ebenso möchte ich mich bei **Prof. Dr. Henning D. Mootz** und **Prof. Dr. Bernhard Wunsch** für ihre Bereitschaft bedanken, diese Arbeit zu begutachten.

Mein besonderer Dank gilt der **NRW Graduate School of Chemistry** und der **Reiner Lemoine Stiftung** für die finanzielle Unterstützung dieses Dissertationsvorhabens.

Dr. Tatjana Brossette (Autodisplay GmbH) danke ich für die vielen fachlichen Tipps und Hilfestellungen zur Cellulase-Thematik sowie für die Bereitstellung von u.a. Protokollen, Plasmiden und Aktivitätsmessungen. Ebenso danke ich allen Mitarbeitern der Autodisplay GmbH, insbesondere **Dr. Ruth Maas** und **Martin Bellof** für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des *Pathway*-Projektes.

Dr. Bertan Bopp, **Dr. Zoya Orlando** und **Shanna Sichwart** bin ich zu großem Dank für die freundschaftliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, der intensiven Einarbeitung, der Beantwortung jeglicher Fragen und der zahllosen schönen Stunden verpflichtet.

Ich danke **Florian Lenz** für seine fachliche Kompetenz, Motivation und Zuverlässigkeit während unserer Zusammenarbeit, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, und den vielen Spaß, den wir bislang zusammen hatten. Bei **Sebastian Borgert**, **Frauke Lankamp**, **Annika Meyers**, **Annika Möller-Kerrut**, **Patrick Nowak**, **Anika Retterath** und **Marten Schulte** bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung und schöne Zeit im Labor während der Forschungspraktika. Den weiteren Mitgliedern der Cellulase-Gruppe, **Christoph Furtmann**, **Alexander Mönninger**, **Svenja Siemer**, **Martina Umlauf** und **Paul Zurek** bin ich ebenfalls für die sehr produktive und angenehme Zusammenarbeit dankbar.

Paul Quehl, **Jan Schüürmann** und **Dr. Mark Teese** danke ich insbesondere für das Teilen ihrer biotechnologischen Expertise.

Sandra Kohaus danke ich für die zahllosen FACS-Messungen und für ihre große Hilfsbereitschaft und Verlässlichkeit. **Christian Nienberg** danke ich ebenfalls für seine Unterstützung bei den FACS-Messungen.

Dr. Dagmar Aichele danke ich für ihre sehr gute Organisation und Leitung der Praktika im 1. und 2. Semester. **Prof. Dr. Samer Haidar** bin ich für die gute Zusammenarbeit im Praktikum „Physikalische Chemie“ dankbar.

Darüber hinaus danke ich **Petra Nordlohne** für Ihre vielfältige organisatorische Unterstützung.

Mein Dank gilt auch **Alfred Gerber, Thomas Gottschlich, Uli Heczko** und **Michael Janning** für ihre Hilfsbereitschaft und Tatkraft in der Chemikalienausgabe und Haustechnik.

Neben den schon genannten Personen möchte ich mich herzlich bei **Dr. Alia Al-Sarraj, Oriana Agoglitta, Andre Bollacke, Carina Dilkaute, Indra Finger, Cristina Gisbert, Isabelle Lengers, Uta Meidt, Petra Nordlohne, Ilka Rauch, Thorsten Saenger, Katja Strätker, Tamara Tahan, Dr. Agne Tubeleviciute** und **Dr. Wilhelmine Weckenbrock** für die wunderbare Zeit bedanken. Meine guten Erinnerungen mit Euch würden den Umfang dieser Arbeit verdoppeln und müssen daher ungeschrieben bleiben.