

Fraunhofer Gesellschaft,
Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik,
Abteilung Gentechnologie in Hannover

**Rekombinante Expression,
Aufreinigung und Charakterisierung
einer marinen Chitindeacetylase**

Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover,
zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften

DOCTOR RERUM NATURALIUM

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von Dipl.-Biochem. Christian Schmalz
geb. 02.08.1975 in Kassel

2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2000 bis Juni 2003 in der Fraunhofer Gesellschaft am Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, IGB in der Abteilung Gentechnologie in Hannover, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Otto angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Bernd Otto

Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion: 09.07.2003

Datum der Veröffentlichung: Juli 2003

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Christian Schmalz, geboren am 02.08.1975 in Kassel, an Eides statt, dass ich die im Fachbereich Chemie an der Universität Hannover eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**Rekombinante Expression,
Aufreinigung und Charakterisierung
einer marinen Chitindeacetylase**

am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, IGB, in der Abteilung Gentechnologie in Hannover unter der Anleitung von Prof. Dr. B. Otto ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung der Promotion eingereicht, noch wurden diese oder andere Arbeiten als Dissertation vorgelegt.

Hannover, den 04.06.2003

Teile dieser Arbeit wurden bereits an folgender Stelle veröffentlicht:

Schmalz, C., Zakaria, H., Otto, B. "Molecularbiological screening for new chitindeactylases in marine microorganisms." Poster bei der *Arbeitstagung Meeresbiotechnologie* vom 12.-13. September 2000 in Oldenburg.

Schmalz, C. „A new chitindeactylase from a marine microorganism.“ Vortrag bei der *5th international conference of the european chitin society* vom 26.-28. Juni 2002 in Trondheim, Norwegen.

Schmalz, C. „Wirkstoff aus Krabbenschalen: Chitosan – glänzende Perspektiven durch ein neues Herstellungsverfahren.“ Vortrag im Rahmen der *Veranstaltungsreihe Biotechnologie der TUHH-Technologie GmbH* am 05.12.2002 in Hamburg.

Schmalz, C. and Otto, B. „Identification, cloning, expression and characterization of a chitin deacetylase from a marine microorganism.“ Eingereicht beim *Journal of Biological Chemistry*.

Die in dieser Arbeit beschriebene Chitindeacetylase ist beim Deutschen Patentamt zur Patentanmeldung eingereicht (Anmeldenummer: EP 200202585).

Marge: We have someone here who can help you.

Homer Is it Batman?

Marge: No, he`s a scientist.

Homer: Batman`s a scientist.

The Simpsons

Zusammenfassung

Die chemischen und biologischen Eigenschaften des Chitosans, der deacetylierten Form des Chitins, ermöglichen vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. Die heutige Produktion aus chitinhaltigen Krabbenabfällen der Fischereiindustrie erfolgt durch einen ineffizienten und umweltbelastenden thermochemischen Prozess. Durch ungewollte Degradation der Zuckerketten ist das daraus gewonnene Chitosan für medizinische Applikationen nur bedingt geeignet und deshalb in Deutschland nicht zugelassen. Die enzymatische Herstellung von Chitosan durch eine Chitindeacetylase (CDA, [EC 3.5.1.41]) kann dabei neue Wege eröffnen. Bislang scheiterte dieses Vorhaben am Mangel geeigneter katabolischer Enzyme.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die DNA-Sequenz eines *open reading frame*, welcher für eine potenzielle Chitindeacetylase kodiert und durch molekularbiologisches *Screening* in einem marinen Mikroorganismus gefunden wurde. Der *open reading frame* besitzt fünf mögliche bakterielle Startcodons. Die Expression der fünf potenziellen Gene zeigte nur bei dem Protein, welches mit Startcodon fünf beginnt, signifikante Chitindeacetylaseaktivität, so dass im weiteren Verlauf der Fokus der Untersuchungen auf diesem Enzym lag.

Das native Enzym liegt als Homooligomer (12-14-Mer) vor und wird in seiner Struktur durch die Präsenz von Phosphationen stabilisiert. Das Molekulargewicht einer Untereinheit beträgt ~ 27.1 kDa. Das pH-Optimum der Chitindeacetylase liegt bei 7.0. Die Umsatzkinetik zeigt dabei, dass es sich um ein hysteretisches Enzym handelt, welches eine ausgeprägte *lag*-Phase aufweist und durch Zugabe von bereits deacetyliertem Produkt aktiviert wird. Eine Kooperativität bezüglich der Substratbindung konnte nicht gezeigt werden.

Das Enzym weist ein breit gefächertes Substratspektrum auf. Sowohl lösliche N-Acetyl-D-Glucosaminoligomere mit einer Kettenlänge von mindestens zwei Zuckereinheiten werden deacetyliert, als auch diverse feste Chitinsubstrate wie Shrimps-, Tintenfisch- und Krabbenchitin.

Trotz hoher Sequenzhomologie mit bereits bekannten Chitindeacetylasen, unterscheidet sich das untersuchte Enzym in einigen entscheidenden Punkten. So liegen die Temperaturoptima bekannter Enzyme zwischen 50°C und 60°C, während die untersuchte CDA ihre höchste Umsatzrate bei 25°C hat. Auch kann das untersuchte Enzym kein Glycolchitin deacetylieren.

Stichworte:

Chitindeacetylase, marines Enzym, Homooligomer

Abstract

Chitosan, the deacetylated form of chitin, has a broad range of applications, due to its chemical and biological properties. Currently, chitosan is produced by thermochemical deacetylation of chitin. Unwanted side reactions such as degradation of the sugar chain may occur as a result of this process. An alternative method and better approach should be the usage of a chitin deacetylase (CDA, [EC 3.5.1.41]), especially when a non-degraded and well-defined product is required, as it is for medical applications. Recent approaches failed due to the lack of suitable catabolic enzymes.

This thesis is based on a sequence of an open reading frame coding for a putative CDA, which had been found by molecular biological screening in a marine microorganism. The open reading frame consists of five sequences which are distinguished by their possible start codon. They were cloned and expressed in *E. coli*. The shortest protein starting with start codon five most efficiently deacetylates chitin. Longer proteins showed significantly lower rates of enzyme activity. Consequently, this protein corresponding to start codon five was used for further characterization.

Purified enzyme was determined to be a homopolymer with 12-14 subunits stabilized by phosphate ions. Its molecular weight was determined to be ~ 27.1 kDa per subunit. Optimal enzyme velocity was achieved at pH 7.0. Kinetic experiments showed a hysteretic progress of enzyme activity, indicated by an intense lag-phase, which could be shortened by adding the deacetylated product. However substrate binding cooperativity could not be detected.

The new CDA has wide substrate specificity, it deacetylates soluble N-acetyl-D-glucosamine homopolymers with at least two N-acetyl-D-glucosamine residues and solid chitinous substrates from different sources, e.g. from shrimps, crab or squid as well.

Despite high sequence homology the chitin deacetylase distinguishes itself from known enzymes in some essential facts. Optimum temperature for enzymatic activity was determined to be 25°C, while known chitin deacetylases prefer temperatures of 50 - 60°C. The enzyme does not deacetylate glycol chitin either.

Keywords:

chitin deacetylase, marine enzyme, homooligomer

1.	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	1
1.1	CHITIN UND CHITOSAN.....	1
1.1.1	Einleitung.....	1
1.1.2	Historischer Hintergrund.....	1
1.1.3	Struktur von Chitin und Chitosan	2
1.1.4	Vorkommen in der Natur	5
1.1.5	Physiologische Funktion.....	5
1.1.6	Metabolismus.....	6
1.1.7	Chemische Eigenschaften von Chitin und Chitosan	10
1.1.8	Kommerzialisierbare Eigenschaften von Chitinderivaten.....	11
1.1.9	Gewinnung und biotechnologischer Ansatz.....	14
1.1.10	Chitinacetylase	16
1.2	VORAUSGEGANGENE ARBEITEN.....	20
1.3	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	21
2.	EXPERIMENTELLER TEIL	22
2.1	MATERIAL	22
2.1.1	Geräte.....	22
2.1.2	Chemikalien.....	23
2.1.3	Verwendete Kits.....	23
2.1.4	Proteine, Oligonucleotide und Chitinsubstrate	23
2.1.5	Standard-Pufferlösungen.....	24
2.1.6	Chromatographiematerial.....	25
2.1.8	Mikroorganismen.....	25
2.1.9	Nährmedien für <i>E.coli</i> -Zellen.....	25
2.1.10	Verwendete Primer	26
2.1.11	Expressionsvektoren.....	27
2.1.12	Verwendete Antikörper.....	27
2.1.13	Datenverarbeitung.....	27
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	28
2.2.1	PCR zur gerichteten Insertion und Deletion von DNA-Sequenzen.....	28
2.2.2	Kolonie-PCR.....	30
2.2.3	Isolierung genomischer DNA aus Bakterien.....	30
2.2.4	Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i>	30
2.2.5	Spaltung mit Restriktionsenzymen.....	31
2.2.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	31
2.2.7	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	31
2.2.8	Dephosphorylierung von DNA Fragmenten	31
2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	32
2.2.10	Erzeugung transformationskompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	32
2.2.11	Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen.....	32
2.2.12	DNA-Sequenzierung.....	33
2.2.13	Konstruktion der Expressionsplasmide.....	34
2.3	EXPRESSION DER CDA IN <i>E. COLI</i>	35
2.3.1	Fermentation	35
2.3.2	Aufschluss der <i>E.coli</i> durch Ultraschallbehandlung	35
2.4	PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	35
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	35
2.4.2	Aufkonzentration und Umpufferung von Proteinlösungen	36
2.4.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.4.4	Westernblot und Immunfärbung.....	37

2.4.5	Herstellung von kolloidalem Chitin	37
2.4.6	Aufreinigung der CDA als MBP-Fusionsprotein	38
2.4.7	Aufreinigung der CDA als <i>Strep-TagII</i> -Fusionsprotein	39
2.4.8	Analytische Gelfiltration	39
2.4.9	<i>Reversed-Phase</i> HPLC	40
2.5	BIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER CDA	40
2.5.1	Acetat-Freisetzungs-Assay	40
2.6	BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG DER CDA	40
2.6.1	MALDI-TOF-Analyse der CDA	40
2.6.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der CDA	41
2.6.3	Infrarotspektroskopische Bestimmung des Substratdeacetylierungsgrades	42
2.6.4	1-D- ¹ H-NMR-spektroskopische Analyse der Substratdeacetylierung	42
3.	ERGEBNISSE	43
3.1	KONSTRUKTION VERSCHIEDENER EXPRESSIONSPLASMIDE	43
3.1.1	Expressionsoptimierung	47
3.2	AUFREINIGUNG DER VERSCHIEDENEN PROTEIN-KONSTRUKTE	48
3.2.1	<i>Strep-TagII</i> -Konstrukte	48
3.2.2	MBP-Konstrukt	49
3.3	BIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER CDA	53
3.3.1	Aktivitätsvergleich der fünf exprimierten Proteine des <i>open reading frame</i>	53
3.3.2	Enzymkinetik	54
3.3.3	Substratspezifität	55
3.3.4	Einfluss von Puffern und anderen Agenzien auf die Umsatzgeschwindigkeit	56
3.3.5	Temperatur- und pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit	57
3.3.6	Michaelis-Menten-Konstante und maximale Reaktionsgeschwindigkeit	58
3.3.7	Einfluss unterschiedlicher Fusionsproteine auf die Enzymaktivität	60
3.3.8	Stabilität des Enzyms	61
3.4	BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG DER CDA	63
3.4.1	Analytische Gelfiltration	63
3.4.2	<i>Reversed-Phase</i> HPLC	64
3.4.3	MALDI-TOF -Massenspektrometrie	65
3.4.4	Denaturierungsexperimente	66
3.4.5	1-D- ¹ H-NMR-Spektroskopie	69
3.4.6	Infrarotspektroskopie	70
4.	DISKUSSION	73
4.1	KLONIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER AKTIVEN FORM DER CDA	73
4.2	EXPRESSIONSOPTIMIERUNG DER REKOMBINANTEN CDA	74
4.3	BIOLOGISCHE UND BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG DER CDA	76
4.4	AUSBLICK	80
5.	LITERATURVERZEICHNIS	82
6.	ANHANG	93
6.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	93
6.2	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	95
6.3	SEQUENZ DES <i>OPEN READING FRAME</i> UND HOMOLOGIEVERGLEICH	97
6.4	DANKSAGUNG	99
6.5	LEBENS LAUF	100

1. Theoretische Grundlagen

1.1 Chitin und Chitosan

1.1.1 Einleitung

Chitin und Chitosan sind Biopolymere, die aus N-Acetylglucosamin- (GlcNAc) und Glucosaminuntereinheiten (GlcN) bestehen. Ihre weite Verbreitung in der Natur, sowie der Umstand, dass es sich bei diesen Polysacchariden um erneuerbare Ressourcen und um vielseitig einsetzbare Stoffe handelt, ließen sie in den letzten Jahren immer stärker ins Blickfeld der Forschung rücken. Sowohl Grundlagen- als auch angewante Forschung zeigen ein starkes Interesse, welches sich in einer Vielzahl von Publikationen und neuer, kommerzieller Anwendungen widerspiegelt.

Um das Potenzial, das von Chitin und Chitosan ausgeht, ausschöpfen zu können, ist es erforderlich, neue Verfahren bezüglich der Gewinnung und Weiterverarbeitung zu entwickeln. Dabei kann biotechnologischen Methoden, wie der Einsatz von Enzymen bei der Herstellung oder Modifikationen von Biopolymeren, eine Schlüsselposition zukommen.

1.1.2 Historischer Hintergrund

Chitin wurde erstmals 1811 von *Henri Braconnot* beschrieben. Er isolierte Chitin aus Pilzen und charakterisierte es als eigenständige Substanz neben, den bis dato in Pflanzen identifizierten Komponenten.

Zwölf Jahre später isolierte *Oder* Chitin aus den Exoskeletten von Insekten und bezeichnete es mit dem griechischem Ausdruck $\chi\iota\tau\omega\nu$ (*Altgriechisch: chiton = Umschlag*). 1859 wurde Chitosan durch *Rouget* entdeckt, als er bemerkte, dass in konzentrierter Natronlauge gekochtes Chitin durch Deacetylierung in organischen Säuren löslich wurde. Weitere chemische Charakterisierungen und Strukturaufklärungen wurden in den folgenden Jahren beschrieben. So fand *Ledderhose* 1878, dass Chitin ein Polysaccharid aus mehrheitlich acetylierten Glucosaminen ist, und *Tiemann* zeigte 1886, dass die Phenylosazone von Glucosamin identisch sind mit denen, die *Fischer* zwei Jahre zuvor synthetisiert hatte. Erst 1939 entschlüsselte *Haworth* die absolute Konformation der Zuckereinheiten als D-Glucosamine. Neben dem Vorkommen in Insekten und Pilzen, konnte Chitin bereits 1894 von *Hoppe-Seyler* in Krabben, Skorpionen und Spinnen nachgewiesen werden.

In den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts wuchs das Interesse an neuen chitinbasierten Anwendungen, was sich damals in mehr als 50 eingereichten Patenten widerspiegelte.

Unzureichende Technologien und der Siegeszug des Synthetik-Kautschuks verhinderten jedoch die Entwicklung kommerzieller Produkte.

Erst in den 70er Jahren wurde nach Möglichkeiten gesucht, anfallende Krabben-Abfälle als natürliche Rohstoffquelle zu nutzen, um die Abhängigkeit vom Rohöl zu reduzieren. Im Zuge dieser Entwicklung wurden die Eigenschaften und das Potenzial von Chitin und seinen Derivaten als natürliche Polymere untersucht.

Heute finden Chitinderivate Anwendung in den unterschiedlichsten Bereichen, wie z.B. der Nahrungsmittelherstellung, in der Landwirtschaft und in der pharmazeutischen Industrie.

In Zukunft sind weitere Untersuchungen notwendig, um effizientere Methoden der Chitingewinnung sowie weitere Anwendungen für Chitin und seine Derivate zu finden. Biotechnologische Verfahren eröffnen, besonders im Hinblick auf hochreine Produkte für medizinische Anwendungen, neue Möglichkeiten zur Nutzung von Chitinprodukten.

1.1.3 Struktur von Chitin und Chitosan

Chitin besteht aus linear β -1,4-verknüpfter 2-Acetamido-2-desoxyglucose (N-Acetylglucosamin) und besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit Cellulose. Chitosan ist das deacetylierte Derivat des Chitins (2-Amino-2-desoxy-D-Glucose). Beide Stoffe sind keine Homopolymere. Der jeweilige Grad und die Abfolge der Acetylierung (DA) bzw. Deacetylierung (DD) kann stark variieren. Ab einem Deacetylierungsgrad von $> 50\%$ spricht man von Chitosan.

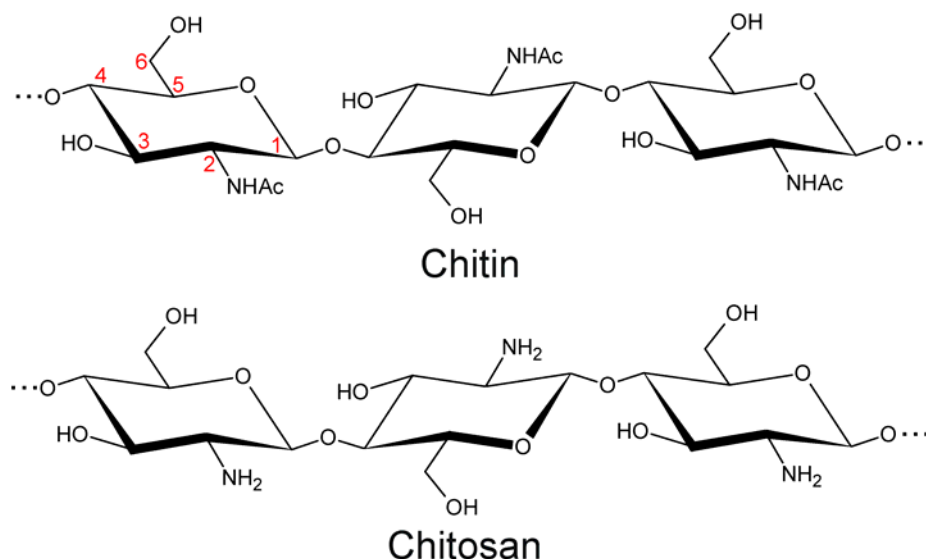


Abbildung 1-1: Ausschnitt aus der Kettenstruktur von Chitin und Chitosan. Die glycosidischen Kohlenstoffatome sind teilweise nummeriert.

Chitin aus tierischem Material unterscheidet sich bezüglich des Polymerisationsgrades deutlich von dem aus Pilzen. So beträgt das durchschnittliche Molekulargewicht des Chitins bei Insekten etwa 2×10^6 Da, was einer Kettenlänge von 5-10.000 GlcNAc-Monomeren

entspricht (Hackman, 1987), während es bei Pilzen zwischen 100 und 8.000 Untereinheiten sein können.

Chitosan aus der Zellwand von Pilzen hat ein Molekulargewicht von 4×10^5 bis $1,2 \times 10^6$ Da (2.500-8.000 GlcN-Monomere) bei einem Acetylierungsgrad von 10-20 %. Chemisch hergestelltes Chitosan aus Crustaceenschalen hingegen hat keine definierte Kettenlänge. Sie ist von dem in der Herstellung verwendeten Rohchitin und dem Deacetylierungsverfahren abhängig.

In biologischem Material liegt Chitin in fibrillären, mikrokristallinen Strukturen vor (Peter, 1992). Analog zur Cellulose existieren drei verschiedene Modifikationen des Chitins (α , β und γ -Chitin), die sich in der Ausrichtung ihrer Polysaccharidketten unterscheiden (Muzzarelli, 1977).

α -Chitin ist die kompakteste Form, in der die Ketten antiparallel angeordnet sind. Die Struktur wird durch Wasserstoffbrücken stabilisiert (Abbildung 1-2), die sowohl innerhalb einer Kette als auch zwischen den Ketten auftreten. Intramolekular treten diese zwischen C3-Hydroxylgruppe und C5-Pyranose-Sauerstoff, sowie zwischen C6-Hydroxylgruppe und Carbonyl-Sauerstoff auf. Intermolekulare H-Brücken existieren zwischen Amid-Wasserstoff und Carbonyl-Sauerstoff eines benachbarten Amids. C6-Hydroxylgruppen können darüber hinaus sowohl intra- als auch intermolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden. In der vorliegenden Arbeit ist stets α -Chitin gemeint, wenn es nicht anders vermerkt ist.

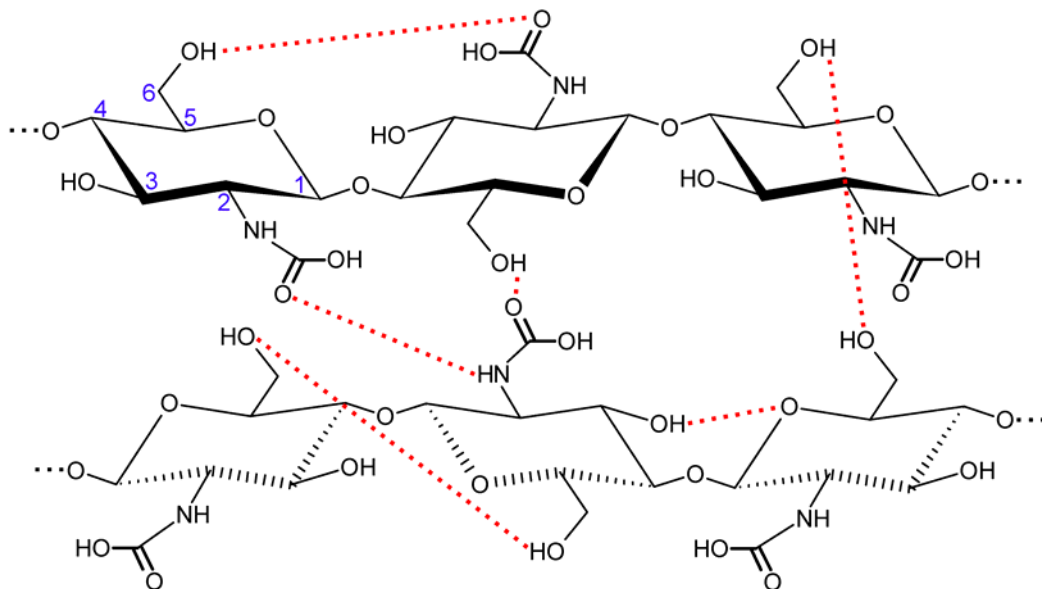


Abbildung 1-2: Wasserstoffbrücken im α -Chitin. Dargestellt ist ein Ausschnitt der antiparallelen Ketten, mit rot markierten H-Brücken.

β -Chitin besteht aus parallelen Strängen und γ -Chitin aus zwei parallelen Ketten, statistisch alternierend zu einer antiparallelen (Roberts, 1992; Ebert, 1993; Chanzy, 1997). Allen drei Formen kommen in der Natur unterschiedliche Funktionen zu.

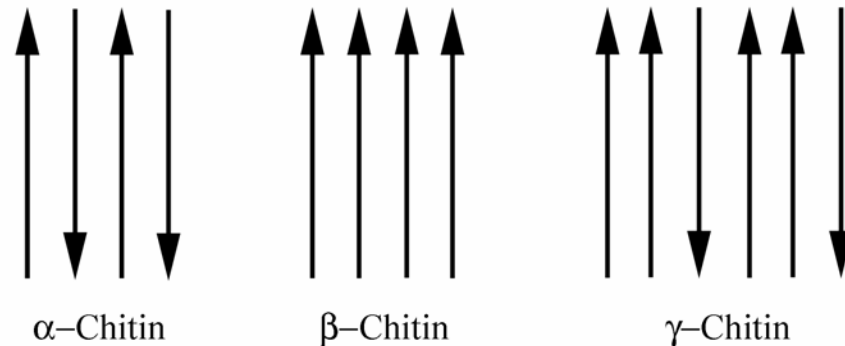


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Polysaccharidketten-Anordnung in α -, β - und γ -Chitin. Die Pfeile geben die Orientierung der Chitinketten wieder.

Chitin mit einer Kettenlänge von 40-50 GlcNAc-Untereinheiten liegt in niederviskosen Lösungen als frei rotierende Kette vor, bei der die Monomere frei um die Achse der glycosidischen Bindung rotieren können, während der Bindungswinkel unverändert bleibt. In höheren Konzentrationen geht Chitin in einen dispersen Zustand über (Terbojevich, 1986).

Kristallines Chitosan existiert in mehreren polymorphen Formen, denen eine helicale Anordnung der einzelnen Ketten gemein ist. Sie bilden intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen C3-Hydroxylgruppe und C5-Pyranose-Sauerstoff aus. Es gehört zu den wenigen, natürlich vorkommenden kationischen Polyelektrolyten (Hirano, 1986).

Für Chitosan gibt es mehrere Modelle für die Konformation in Lösung. U.a. wird eine wurmförmige Kette vorgeschlagen (Beri 1993; Berth, 1998; Terbojevich, 1988), die unabhängig vom Deacetylierungsgrad ist und die die Bewegung der GlcN-Segmente zueinander stark eingeschränkt.

Wegen seiner polykationischen Natur ist die Konformation jedoch abhängig von der Molmasse, Polydispersität, Ionenstärke, Polymerkonzentration und dem Vorhandensein von wasserstoffbrückenaufbrechenden Reagenzien, wie z.B. Harnstoff. Aufgrund dessen werden als Modell sowohl frei rotierende Ketten, deren Steifheit sich mit steigendem Deacetylierungsgrad erhöht, aber auch ein statistisches Knäuel diskutiert (Errington, 1993; Varum 1994; Tsaih und Chen, 1997; Chen und Tsaih 1998; Signini 2000).

1.1.4 Vorkommen in der Natur

Chitin stellt nach Cellulose das in der Natur am zweithäufigsten vorkommende Biopolymer dar. Während der Hauptanteil des organischen Kohlenstoffs (40 %) in Form von Cellulose hauptsächlich in Pflanzen gebunden vorkommt (ca. $1,1 \times 10^{11}$ Tonnen) (Ebert, 1993), ist der Anteil des Chitins wesentlich kleiner. Jedoch übersteigt der jährliche Chitinumsatz den der Cellulose bei weitem. Während lediglich $1,3 \times 10^9$ Tonnen Cellulose synthetisiert werden, sind es schätzungsweise $2,3 \times 10^9$ bis 10^{11} Tonnen Chitin pro Jahr.

Chitin kommt in zahlreichen Organismen, insbesondere in Insekten, Crustaceen und Pilzen, vor. So beträgt der Chitinanteil in organischen Verbindungen bei Pilzen und Arthropoden bis zu 45 %. Bei Insekten bewegt sich der Chitingehalt zwischen 20 und 60 %, während er in Crustaceen bis zu 80 % ausmachen kann.

Chitin kommt hauptsächlich in seiner thermodynamisch stabilen α -Konformation vor. Man findet es in der Kutikula von Arthropoden und verschiedenen Pilzen immer dann, wenn hohe Stabilität erforderlich ist (Muzzarelli, 1977). β - und γ -Chitin scheinen mit kollagenartigen Proteinen assoziiert zu sein und Widerstandsfähigkeit, Flexibilität und Beweglichkeit zu vermitteln. Sie erfüllen physiologische Funktionen, wie z.B. die Kontrolle des Elektrolytenflusses.

Neben hoch polymerisiertem Chitin werden kurzkettige Chitooligosaccharide in zahlreichen Spezies hergestellt. So findet man sie in Bakterien der Familien der *Rhizobiacea* (Denarie, 1996), *Filaria Nematoda* (Jeuniaux, 1996) und sogar im Menschen (Bakkers, 1999). Hier ist Di-N-Acetylchitobiose ein Baustein der N-Glycane bei Glycoproteinen.

1.1.5 Physiologische Funktion

Während Cellulose als extrazelluläre Gerüstsubstanz in Pflanzen die herausragende Rolle spielt, ist Chitin, neben dem Vorkommen in einigen Pilzarten, vor allem in Tieren weit verbreitet. Chitin ist ebenfalls ein extrazelluläres Polysaccharid, dessen vorrangige Aufgabe bei Insekten und Crustaceen die Bildung von Exoskeletten ist, deren mechanische Widerstandskraft durch Mineralisierung weiter erhöht werden kann. Der fundamentale funktionale Unterschied zwischen den Biopolymeren ist die Fähigkeit der Chitin fibrillen als Ansatzpunkt und Aufhängung der Muskeln zu dienen und so die Grundlage der Mobilität zu bilden.

Chitin liegt immer mit Proteinen assoziiert vor. Die Verknüpfung erfolgt dabei häufig kovalent. Die mechanischen Eigenschaften sind das Resultat des fibrillären Chitinaufbaus. In der Insektenkutikula liegt das Chitin in Form von Mikro fibrillen mit einem Durchmesser von 2,5 bis 25 nm und einer Länge von etwa $0,36 \mu\text{m}$ vor (Vincent, 1990). Die Steifheit der Chitinfasern liegt zwischen 70 und 90 GPa, die der verknüpften Proteine bei 120 MPa. Diese

hohe isotrope Steifheit wird dadurch erhalten, dass jede Faserschicht quer zu ihren benachbarten Schichten liegt. Anisotrope Fasern, wie sie in den Sehnen von Insekten vorkommen, zeigen eine parallele fibrilläre Struktur, die in Längsrichtung eine Steifheit von 11 GPa erreicht, während sie in Querrichtung lediglich 0,15 GPa beträgt.

Neben der Orientierung der Fibrillen, bestimmen die assoziierten Proteine die funktionellen Eigenschaften des Chitins. So sind beispielsweise die Chitinfasern der Aufhängungen von Heuschreckenflügeln mit dem gummiartigen Protein Resilin verknüpft (*Frazier, 1995; Haas, 2000; Zill, 2000*). Bei Insekten kommen in der Chitin-Proteinmatrix noch weitere stabilisierende Substanzen, wie etwa phenolische Verbindungen, insbesondere Catecholaminderivate, vor. Diese werden enzymatisch oxydiert und in der Kutikula eingelagert.

In Pilzen variieren die Eigenschaften des Chitins durch die Verknüpfung mit anderen Polysacchariden. Polyphenolische Pigmente haben hierbei eine wichtige Funktion. Sie ermöglichen die Verknüpfung der Polysaccharidketten untereinander und zwischen Zuckern und Proteinen. Vorstufen dieser Pigmente sind u.a. L-Tyrosin, dessen Derivat 3,4-Dihydroxy-Phenylalanin (DOPA), 1,8-Dihydroxynaphthalin und Catecholamine (*Prota, 1992*).

In Crustaceen erhöht sich die Härte des Exoskeletts durch die Einlagerung von Mineralien, besonders durch die von Calciumcarbonat.

In Verbindung mit Proteinen und weiteren nieder- als auch hochmolekularen Komponenten findet Chitin als Faserelement in vielen weiteren biologischen Strukturen Verwendung. Zu erwähnen sind z.B. die Darmwand der Insekten (*Tellam und Eisemann 2000*), die Schalen von Nematodeneiern oder der Eierlegeapparat vieler Insektenspezies.

1.1.6 Metabolismus

1. Chitinbiosynthese

Organismen, die Chitin oder Chito oligosaccharide verwenden, verfügen über Enzyme zur Biosynthese des Polysaccharids. Homologe Gene der Chitinsynthase kommen in Bakterien, Pilzen und Vertebraten, einschließlich des Menschen, vor. Ein Überblick über die Chitinbiosynthese gibt Tabelle 1-1.

Die Chitinbiosynthese erfolgt in einem membrangebundenen Multiproteinkomplex (*Kramer und Koga 1986; Spindler und Spindler-Barth, 1996; Londershausen, 1997*), der in der periplasmatischen Membran und in cytoplasmatischen Chitosomen lokalisiert ist (*Ruiz-Herrera und Martinez-Espinoza, 1999; Leal-Morales, 1994*). Dabei wird N-Acetylglucosamin als UDP-GlcNAc an das reduzierende Ende der wachsenden Chitinkette gehängt. Über den Mechanismus des *de novo* Kettenstarts ist wenig bekannt. Lediglich in der Crustaceenspezies *Artemia salina* (*Horst, 1986; Horst und Walker, 1993*) konnte

nachgewiesen werden, dass die Polymerisation im Golgiapparat durch Verknüpfung von Chitooligomeren mit Proteinen initiiert wird.

Transformation	Enzym
Trehalose	
↓	
Glucose	Trehalase
↓	
Glucose-6-Phosphat	Hexokinase
↓	
Fructose-6-Phosphat	Glucosephosphat-Isomerase
↓	
Glucosamin-6-Phosphat	Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Aminotransferase
↓	
N-Acetylglucosamin-6-Phosphat	Glucosamin 6-Phosphat-N-Acyl-Transferase
↓	
N-Acetylglucosamin-1-Phosphat	Phosphoacetyl-Glucosamin-Mutase
↓	
UDP-N-Acetylglucosamin	Uridin-Diphosphat-N-Acetylglucosamin Pyrophosphorylase
↓	
Chitin	Chitinsynthase

Tabelle 1-1: Biochemischer Pfad der Chitinbiosynthese. In vielen niederen Organismen wie Pilzen, Algen oder Arthropoden wird Glucose in Form von Trehalose gespeichert. Davon ausgehend wird durch Hydrolyse Glucose generiert, welche die eigentliche Basis der Chitinbiosynthese darstellt.

Die Translokation des Chitinpolymers aus Chitosomen geschieht durch Exocytose und wird durch GTP-bindende Proteine vermittelt (*Londershausen, 1997*). Bei Lokalisation des Chitinsynthasekomplexes in der Periplasmamembran erfolgt die Ausschleusung der Chitinketten durch Extrusion. Der genaue Kristallisationsmechanismus einzelner Polysaccharid-Ketten zu den jeweiligen fibrillären Strukturen ist bislang nicht geklärt.

In Vertebraten und Rhizobien sind Chitooligosaccharide mit einer Kettenlänge von vier bis sechs Untereinheiten Produkte der Chitinsynthase. In Bakterien werden diese Oligomere modifiziert, um Lipo-Chitooligosaccharide (Nod-Faktoren) zu erhalten (*Denarie, 1996; Bakkers, 1999*) (Abbildung 1-4), denen bei der Aufnahme von Knöllchenbakterien in Pflanzen eine tragende Rolle zukommt. So gehen Leguminosen und rhizobielle Bakterien zwecks besserer Stickstoffgewinnung eine enge, genetisch fixierte, Symbiose ein. Hierbei werden von den Leguminosen Signalsubstanzen, z.B. Flavonoide, an die Rhizosphäre abgegeben, die Rhizobien anlocken. Diese produzieren daraufhin Nod-Faktoren, die ihrerseits

von den Leguminosen im Wurzelhaarbereich erkannt werden und schließlich zur Bildung von Knöllchen (Nodulation) im Wurzelkortex führen.

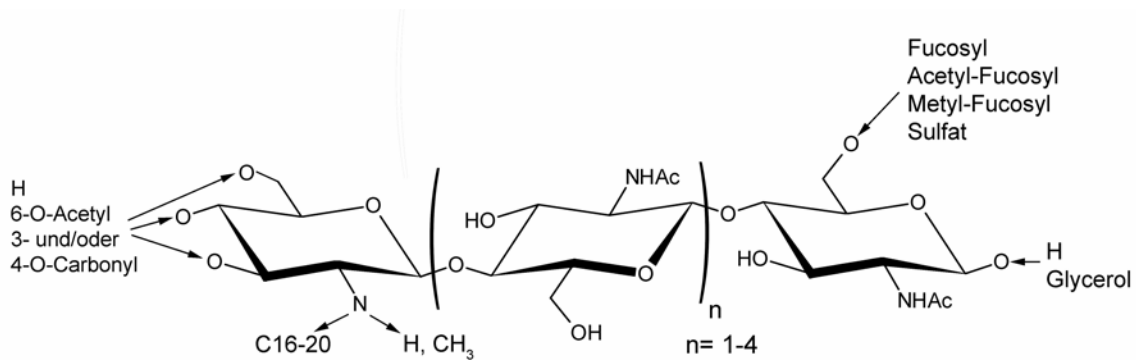


Abbildung 1-4: Aufbau der rhizobiellen Nod-Faktoren.

Bei Vertebraten konnten sowohl im Frosch, der Maus und dem Zebrafisch Gene identifiziert werden (Semino, 1996), die eine wichtige Rolle bei der Embryogenese zwischen den Stadien der späten Midblastula und der Neurulation spielen. Diese exprimierten Gene synthetisieren Chitooligosaccharide (Semino, Robbins, 1995), die als *Primer* für die Hyaluronbiosynthese dienen (Meyer und Kreil, 1996).

Die Regulation der Chitinsynthese findet auf mehreren Ebenen statt. Auf Proteinebene konnte in Arthropoden eine proteolytische Aktivierung nachgewiesen werden (Kramer und Koga, 1986; Ludwig 1991), die eine effiziente *in vitro* Verknüpfung der Zuckervorstufen zu Polysacchariden ermöglicht. Die Synthese kann auch, wie bei einigen Pilzen, allosterisch z.B. durch GlcNAc aktiviert werden (Merz, 1999). In der Insektenzelllinie *Chirininus tentans*, wird die Chitinsynthese durch Mg^{2+} -Ionen stimuliert, während sie durch UDP, UMP und UTP inhibiert wird. Des Weiteren konnten translationale (Ibrahim, 2000) und transkriptionelle Kontrollen der Chitinsynthese nachgewiesen werden (Marks und Ward, 1987; Palli und Retnakaran, 1999).

2. Chitindegredation

Die enormen Mengen Chitin aus der Biosynthese (s.a. 1.1.4) werden durch Mikroorganismen degradiert, die das Polysaccharid als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen. Darüber hinaus spielt die Chitindegredation während der Entwicklung von Arthropoden (Metamorphose) und Vertebraten, sowie bei Abwehr von Pilzinfektionen, eine wichtige Rolle.

Es werden zwei Wege des biologischen Chitinabbaus postuliert. An dieser Stelle soll zunächst der experimentell belegte Chitinaseabbauweg besprochen werden, der sowohl bei terrestrischen Bodenbakterien, als auch bei marinen Mikroorganismen, wie *Vibrio furnissii*, nachgewiesen werden konnte. Unter 1.1.10 wird dann der Chitinab- und -umbau mittels Chitindeacetylasen beleuchtet.

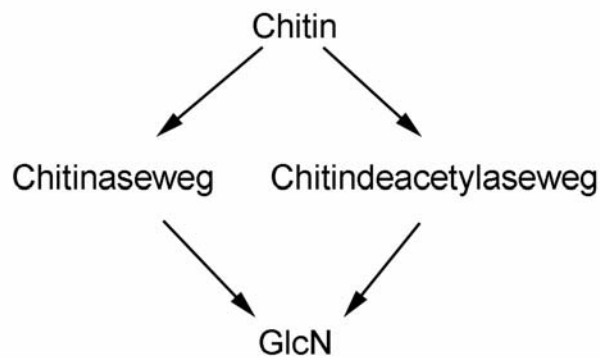


Abbildung 1-5: Postulierte Abbauwege des Chitins in der Natur nach *Gooday, 1996*.

Der erste Degradationsschritt findet aufgrund der Größe der Chitinfasern außerhalb der Zelle statt. Hier wird das Zuckerrückgrat des makromolekularen Chitins durch extrazellulär sezernierte Chitinasen zerkleinert. Sie hydrolysieren glycosidische Bindungen von N-Acetylchitopoly- und oligomeren mit einer Mindestkettenlänge von drei GlcNAc-Untereinheiten. Als Produkte entstehen zumeist N-Acetylglucosamin und Di-N-Acetylchitobiose, aber auch länger-kettige Oligomere.

Zum weiteren Abbau werden die N-Acetylchitooligomere ins Periplasma transportiert. Bei gramnegativen Bakterien geschieht dies über Porine. Chitodextrinase und β -N-Acetylgalactosaminidase hydrolysieren dort länger-kettige Oligomere zu N-Acetylglucosamin und Di-N-Acetylchitobiose (*Keyhani und Roseman, 1999*). Letztere kann außerdem noch durch Di-N-Acetylchitobiase zu N-Acetylglucosamin gespalten werden.

Substrat	Enzym
Chitin	Chitinase
Chitooligomere	Chitodextrinase; β -N-Acetylglucosaminidase
(GlcNAc) ₂	Di-N-Acetylchitobiase
GlcNAc, GlcNAc-6-P, GlcNAc-1-P	Deacetylasen

Tabelle 1-2: Übersicht der chitinolytischen Enzyme bei der Degradation über den Chitinaseweg.

Der weitere Transport ins Cytosol erfolgt bei N-Acetylglucosamin, nach Phosphorylierung zu GlcNAc-6-P, durch das Phosphoenolpyruvate:Glycose Phosphotransferase-System (PTS). Di-N-Acetylchitobiose hingegen gelangt teils unverändert mittels einer Permease ins Cytosol, kann aber ebenfalls zu (GlcNAc)₂-P phosphoryliert werden (*Park, 2000*).

Im Cytosol erfolgt schließlich die Deacetylierung der verschiedenen Substrate (GlcNAc, GlcNAc-6-P, (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₂-P) und deren weitere Metabolisierung (*Yamano, 1996*).

Neben der Metabolisierung von Chitin, kommen Chitinasen weitere Aufgaben zu. So spielen sie eine tragende Rolle bei der Abwehr von Pilzinfektionen in Säugetieren und in Pflanzen (*Overdijk, 1996; Overdijk 1999*). Hier hemmen Chitinasen das Wachstum pathogener Pilze, indem sie die Zellwände chitinhaltiger Pilze hydrolysieren. Bei Fischen dienen die Enzyme

primär zum Verdau von Chitin, das mit der Nahrung aufgenommen wurde (*Matsumiya und Mochiz, 1996*). In Insekten haben sie wachstumsregulierende Funktionen, da sie essenziell für den teilweisen Verdau des Exoskeletts während der Häutung der Kutikula sind.

Durch Sequenzhomologie lassen sich Chitinasen als Glucosidasen der Familien 18 und 19 klassifizieren (*Coutinho und Henrissat, 1999*). Weitere Subfamilien ergeben sich aus ihrer Struktur sowie der zellulären Lokalisation. Während Familie 18-Chitinasen in Säugetieren, Arthropoden, Pflanzen, Pilzen, Bakterien und Viren nachgewiesen wurden, kommen Vertreter der Familie 19 in Pflanzen und Bakterien vor (*Watanabe, 1999, Tsujibo, 2000*).

Die Regulation der Chitindegradation erfolgt bei Pflanzen durch Bindung von N-Acetylchitooligomeren in subnanomolaren Konzentrationen an ein hoch affines Plasmamembranprotein. Die Signalkaskade induziert neben weiteren Phytoalexinen die Synthese von Chitinasen (*Deikman, 1997; Ohme-Takagi, 2000*).

In Insekten werden die Chitinsynthese und ihre Degradation gleichermaßen durch den Titer an 20-Hydroxyecdysen gesteuert (*Fukamizo und Kramer, 1987*). Während der Häutung steigt dieser an und induziert die Genexpression der chitinverdauenden Enzyme.

In Bakterien wird die Chitinasensynthese durch Chitin induziert und durch Glucose inhibiert (*Keyhani und Roseman, 1999*). Die Promotorregion der meisten *Streptomyces* enthält eine 12 bp lange Sequenz, die für die Regulation verantwortlich ist.

In Pilzen werden Chitinasen i.a. durch die Gegenwart von chitinhaltigem Substrat induziert und durch Glucose oder N-Acetylglucosamin inhibiert.

1.1.7 Chemische Eigenschaften von Chitin und Chitosan

Gereinigtes α -Chitin ist makroskopisch ein amorpher, farbloser Feststoff, der 5-10 % Wasser enthält und nicht toxisch ist. Chitin ist in Wasser, verdünnten Säuren, Laugen und Alkoholen nicht löslich. Erst bei der Verwendung von 5 % LiCl in Dimethylacetamid, Hexafluoroaceton, Hexafluoro-2-Propanol oder in 12 M HCl als Solvenz ist Chitin in Lösung zu bringen (*Roberts, 1992*). Seine beschränkte Löslichkeit limitiert die Zahl der chemischen Modifikationen. Lediglich die Deacetylierung zu Chitosan hat größere Relevanz. Die Reaktivität von β -Chitin ist verglichen mit der von α -Chitin erheblich höher.

Chitosan ist ebenfalls ein amorpher Feststoff mit ca. 5 % Wasseranteil. In wässrigen organischen Säuren ist Chitosan löslich, in Wasser nicht. Die Toxizität ist bei oraler Applikation mit $LD_{50} >16$ g/kg in Mäusen als gering einzustufen. Allergische Reaktionen beruhen meist auf dem Vorhandensein geringer Proteinverunreinigungen, die bei der Herstellung von Chitosan aus Krustentieren zurückbleiben.

Chitosan besitzt einzigartige chemische Eigenschaften, da es zum einen primäre und sekundäre Hydroxylgruppen und zum anderen primäre Aminogruppen hat, die für zahlreiche Modifikationen (Tabelle 1-3) geeignet sind und somit das Einsatzspektrum erweitern können.

Derivat	R ¹ ; R ²	R ³	R ⁴
Triphenylsilyl-Chitin	H, Ac	Ph ₃ Si	Ph ₃ Si
N-Acylchitosan	H, Acyl	H	H
N-Alkylchitosan	H, Alkyl	H	H
quartäre Chitosansalze	(R ₃) ⁺	H	H
N-Alkylidenchitosan	=CH-Alkyl	H	H
N-Arylidenchitosan	=CH-Aryl	H	H
N- oder O-Carboxychitosan	CH ₂ COO ⁻	H, CH ₂ COO ⁻	H, CH ₂ COO ⁻
N,N-Dicarboxymethylchitosan	CH ₂ COO ⁻	H	H
N- oder O-Sulfonylchitosan	H, SO ₃ ⁻	H	H
N- oder O-Hydroxylchitosan	Alkyl-OH	H	H oder Alkyl-OH

Tabelle 1-3: Chemische Modifikationen von Chitin und Chitosan.

1.1.8 Kommerzialisierbare Eigenschaften von Chitinderivaten

Das große Potenzial für Applikationen aus Chitin und vor allem Chitosan spiegelt sich in über 3500 Patenten und in einer noch weit größeren Zahl wissenschaftlicher Artikel wider. Die am häufigsten betrachteten Aspekte sind die physikochemischen und biologischen Eigenschaften des Chitosans, z.B. seine antimikrobielle Wirkung und die Fähigkeit zur Biodegradation.

Die Kommerzialisierung der Forschungsergebnisse hat bereits zu einer Vielzahl von Anwendungen vor allem für Chitosan und seinen Derivaten geführt. Sie werden u.a. im Bereich der Abwasseraufbereitung, der Nahrungsmittelindustrie, in Produkten für die Landwirtschaft sowie in der Kosmetik und in der Medizin verwendet. Die unterschiedlichen Anwendungen sind hierbei abhängig vom Reinheitsgrad der Präparate.

Chemische Eigenschaften	Biologische Eigenschaften
<ul style="list-style-type: none"> ● Kationisches Polyamin hohe Ladungsdichte bindet an negativ geladenen Oberflächen bildet Gele mit Polyanionen ● hohes Molekulargewicht ● variable Viskosität ● gute Komplexierungseigenschaften ● geringe Gaspermeabilität ● leichte chemische Modifikation ● reaktive Amino-/Hydroxylgruppen 	<ul style="list-style-type: none"> ● Biokompatibel natürliches Polymer biologisch abbaubar geringe Toxizität kaum allergen ● Haemostatisch ● Bakteriostatisch ● Fungistatisch ● Anticancerogen ● Lipidsenkend ● beschleunigt Wundheilung

Abbildung 1-6: Chemische und biologische Eigenschaften von Chitosan.

Chitosan gehört zu den wenigen, natürlich vorkommenden Polykationen (*Hirano, 1986*) und besitzt dadurch gute Komplexierungseigenschaften. Es formt mit Polyanionen, wie Dextransulfat, Chondroitinsulfat (*Sakiyama, 1999*) oder Hyaluronsäure (*Denuziere, 1996*) polyelektrolytische Komplexe. Dadurch können zur Verkapselung von Flüssig- oder Feststoffen Mikrokapseln aus Chitosan und 6-Oxychitin (*Muzzarelli, 2000a*) oder Chitosansulfat (*Holme und Perlin, 1997*) hergestellt werden, deren mechanische Festigkeit durch Quervernetzung mit bifunktionalen Reagenzien erhöht werden kann.

Seine hervorragenden Komplexierungseigenschaften werden u.a. zur Reinigung von proteinhaltigen Abwässern aus der Frucht-, Milch- oder Bierindustrie genutzt (*Guerrero, 1998; Savant und Torres, 2000*). Die ausgeflockten Chitosan-Proteinkomplexe können als Tierfutter verwendet werden.

Des Weiteren sind die Ionenkomplexierungseigenschaften gut untersucht (*Guibal, 1997; Domard und Piron, 2000*). Die Verwendung von Chitosan als Fällungsmittel für Schwermetallionen, z.B. in Kläranlagen, ist somit nahe liegend.

In Lösung gebrachtes Chitosan bildet bei Entzug des Lösungsmittels eine Filmschicht, die eine Reißfestigkeit von 38 bis 66 MPa hat, was der doppelten von Polyethylen entspricht (*Remunan-Lopez und Bodmeier, 1996; Park, 1999*). Diese Filme eignen sich u.a. zur Oberflächenbeschichtung und können bei Bedarf mit Essigsäureanhydrid in Chitin umwandelt werden. Chitosanmembranen sind weniger permeabel gegenüber Sauerstoff, Stickstoff oder Kohlendioxid als solche aus Celluloseacetat (Cellophan). Diese Eigenschaften machen sie in vielen Bereichen, z.B. als Verpackungsmaterial für Lebensmittel, attraktiv.

Bei der Papierherstellung zeigt mit Chitosan beschichtetes Papier eine deutlich höhere Reiß- und Zugfestigkeit gegenüber unbehandeltem Material (*Wieczorek und Mucha, 1997*), sowie eine verringerte Knitterneigung. Neben der nachträglichen Papierbeschichtung sind auch

Verfahren in der Entwicklung, bei denen Chitosan dem Cellulosebrei schon während der Herstellung beigemischt wird.

In der Textilherstellung finden mit Phosphat- oder Phthalsäure modifizierte Chitosanfasern Verwendung (*Knaul, 1999*). Aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften werden vor allem Unterwäsche und Sanitärprodukte damit behandelt.

In der Kosmetikbranche werden Chitosan und seine Derivate als Zusatz in Hautsalben und Haarkosmetika verwendet (*Lang, 1995*). Hier nutzt man ebenfalls die Fähigkeit des Chitosans Filme zu bilden bzw. durch Wasseraufnahme Hydrogele zu formieren.

Im Agrarsektor ist Chitosan als Futterzusatzmittel in den USA zugelassen. Es wird vor allem zur Verfütterung der Molke beigemischt, die dadurch besser verträglich wird (*Peter, 1992*). Darüber hinaus ist ein in Studien stärkeres Wachstum der Tiere belegt worden. Außerdem finden Chitosan-Produkte ihren Einsatz in der Konservierung von Saatgut und Früchten sowie als Düngemittel. Dabei zeigt sich, neben der direkten antimikrobiellen Wirkung des Chitosans, dass das Wachstum von chitinaseproduzierenden Bakterien stimuliert wird, wodurch Pilz- und Nematodenbefall signifikant verringert werden (*Goody, 1999; Herrera-Estrella und Chet, 1999*).

Zu den weiteren Eigenschaften des Chitosans zählt seine Fähigkeit verschiedene Lipide, wie Fettsäuren, Di- und Triglyceride sowie Steroide zu binden. Zwar ist der Bindungsmechanismus nicht komplett entschlüsselt, jedoch sind zahlreiche Interaktionen mit Carboxylaten sowie die Emulgationseigenschaften von Chitosan dokumentiert. Immobilisiertes Chitosan kann bis zum Doppelten seines Eigengewichts an Olivenöl binden (*Muzarelli, 2000b*).

Auf die Eigenschaft Lipide zu binden zielt auch die Vermarktung von Chitosan als Nahrungsergänzungsmittel ab, das zur Gewichtsreduktion führen soll. Mit der Nahrung aufgenommene Lipide sollen im Gastrointestinaltrakt an Chitosan binden und unverdaut wieder ausgeschieden werden. Die Wirksamkeit ist allerdings umstritten. Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass Gallensäuren, Cholesterin und Fettsäuren, die an Chitosan adsorbiert sind, nicht vom Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden (*Muzarelli 1998; Ormrod, 1998; Han 1999*). Auch konnte eine höhere Fett- und Gallensäureausscheidung bei Ratten beobachtet werden, denen Chitosan als Nahrungsergänzung verabreicht wurde. Jedoch haben Untersuchungen ergeben, dass die positiven Ergebnisse bei Mäusen und Ratten nicht auf den Menschen übertragbar sind (*Gades, 2002*).

Es gibt allerdings zahlreiche klinische Studien, die belegen dass Chitosan bzw. Chitooligosaccharide einen positiven Effekt auf den Gehalt an *low-density-lipoproteinen* (LDL) im Blut haben (*Maezaki, 1993; Colombo und Sciuotto, 1996; Girola, 1996; Macchi, 1996*) und den Blutdruck senken können (*Kawasaki, 1998*). Dies macht Chitosan auch für die Medizin interessant. So wird der Einsatz von Chitosan als Lipidsenker bei erhöhtem Cholesterinspiegel untersucht.

Chitosan ist in der Medizin gegenwärtig nicht als Wirkstoff zugelassen. Es dient aber zur Synthese von Glucosamin, das als Schmerzmittel bei der Behandlung von rheumatischen Krankheiten wie Arthrose, Arthritis oder Osteoporose verwendet wird.

Da reines Chitosan kaum allergen und durch körpereigene Enzyme, wie z.B. Lysozym, langsam abgebaut wird, eignet es sich u.a. als Grundlage für Wundabdeckungen, Fasern zur Wundvernähung, für nicht permanent verbleibende Organteile und Prothesen oder für Formulierungen von Wirkstoffen.

Als Wundabdeckung konnten erstaunliche Ergebnisse mit Chitosan erzielt werden (*Muzarelli, 1997*). Als Membran wirkt Chitosan der Dehydrierung der Wunde entgegen und verhindert Kontaminationen von außen. Der Blutgerinnungsprozess wird aktiv durch Chitosan gefördert, indem es die Ausschüttung von β -Thromboglobulin und *Platelet Faktor 4* induziert. Darüber hinaus beschleunigt es den Heilungsprozess, indem es die Regeneration von Epithel- und Nervenzellen erleichtert (*Stone, 2000*). Diesen Effekt beobachtet man auch bei der Oberflächenbeschichtung von Gelenk- und Knochenprothesen aus Keramik und Titan mit Chitosan. Die dadurch begünstigte Anlagerung von Fibroblasten und Osteoblasten resultiert in einer verbesserten Heilung und Integration der Implantate.

Da Chitosan stark mukoadhesiv ist, bietet es sich u.a. als *Carrier* für Wirkstoffe an, die über Schleimhäute aufgenommen werden. So konnte ein verstärkter Transport von polaren Substanzen durch nasales Epithelzellgewebe bei Ratten ohne toxische Begleiterscheinungen für das Gewebe beobachtet werden (*Dornish, 1997*).

Eine Vielzahl weiterer medizinischer Applikationen, wie der Einsatz von N-octanyl- und N-hexanyl-Derivaten des Chitosans als Dialyse-Membranen oder künstliche Blutgefäße wird gegenwärtig diskutiert. Sulfonierte Chitin- und Chitosanderivate hemmen die Blutgerinnung und stellen so eine Alternative zu Heparin dar. Auch werden Chitooligomeren aufgrund ihrer immunstimulierenden Wirkung eine Anti-Tumor-Wirkung zugeschrieben.

1.1.9 Gewinnung und biotechnologischer Ansatz

Der größte Anteil des nutzbar zu machenden α -Chitins fällt als Abfall der Fischereiindustrie, bei der Verarbeitung von Schalentieren wie Krabben, Shrimps oder Hummer, an. Davon sind jährlich etwa $1,5 \times 10^5$ t industriell nutzbar (*Roberts, 1992; Shahidi und Synowiecki, 1992*).

Zur Chitin- und Chitosanproduktion werden im Nordatlantik vor allem Shrimps der Gattung *Pandalus borealis* genutzt (*Stenberg und Watcher, 1996*), während in Japan Krabbenchitin aus *Chinieetes japonicas* die Hauptquelle darstellt (*Hirano, 1989*). Japan ist der größte Hersteller von Chitosan, das dort im großtechnischen Maßstab produziert wird.

Darüber hinaus ist die Chitingewinnung aus biotechnologisch genutzten Pilzen nicht zu vernachlässigen. So fallen jährlich aus Pilzen, wie beispielsweise *Aspergillus niger*, der zur Zitronensäureherstellung verwendet wird, 6×10^6 t Abfälle an, die bislang nur wenig genutzt werden (*Kobarg und Hesse, 1997*). *McGahren et al. (1984)* beschreibt die Gewinnung von

Chitosan aus der Fermentation von *Absidia coerulea*. Dieser Pilz produziert Chitosan in großen Mengen. Durch Optimierung des Fermentationsprozesses wird zurzeit an einer industriellen Nutzung gearbeitet.

Der bisher genutzte Weg zur Darstellung von Chitin und Chitosan ist die Säure/Base-Behandlung auf der Rohstoffbasis der Crangonfischerei (siehe Abbildung 1-7). Hierbei wird das Chitin aus gemahlene Crustaceenschalen gewonnen und die Proteine mit verdünnter Natronlauge extrahiert. Die Mineralien werden mit verdünnter Mineralsäure entfernt. Chitosan entsteht danach durch Deacetylierung in konzentrierter Natronlauge. Der Deacetylierungsgrad des Produktes wird durch die Konzentration der Alkalilauge (40–60 %), die Temperatur (60-150°C) und die Reaktionszeit (1–144 h) beeinflusst. Eine komplette Deacetylierung wird jedoch nicht erreicht, da die hierfür erforderlichen Bedingungen zu einer unerwünscht starken Degradation der Zuckerketten führen. Typisch ist ein Deacetylierungsgrad von ca. 57-78 %.

Eine Übersicht der verschiedenen Reinigungsschemata gibt *Roberts (1992)*. Die Produktionskosten hängen im Wesentlichen vom erstrebten Reinheitsgrad ab, wobei auch die Herkunft des Materials eine Rolle spielt.

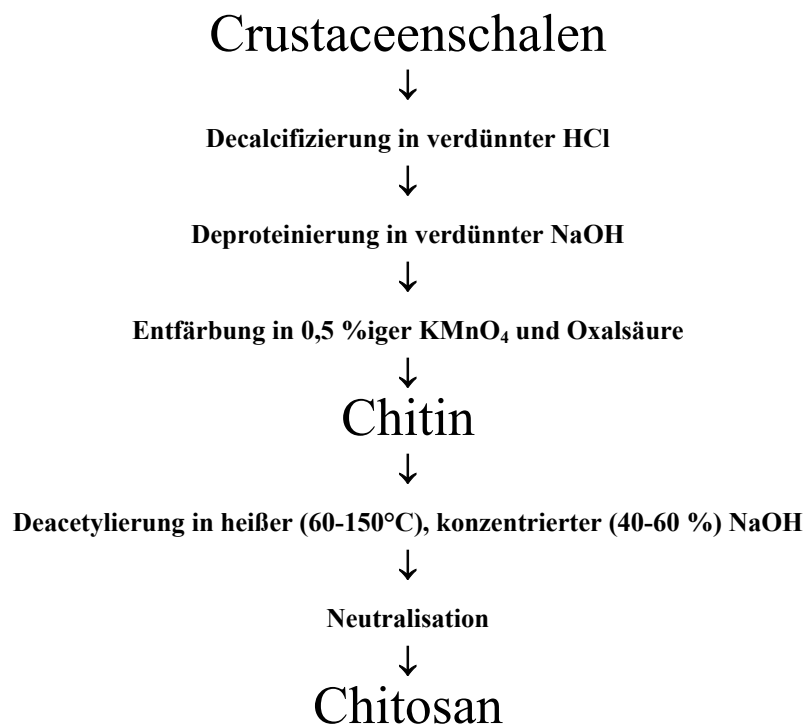


Abbildung 1-7: Thermochemischer Prozess der Chitosanherstellung aus Fischereiabfällen.

Die thermochemische Produktion, vor allem von hochreinem Chitosan für medizinische Anwendungen, bereitet jedoch Probleme. So erhält man trotz identischer Versuchsbedingungen nur eingeschränkt reproduzierbare Produkte. Vor allem die Degradation von Chitosan lässt sich bei konventioneller Gewinnung schlecht kontrollieren, so dass immer Produktgemische unterschiedlicher Qualität entstehen. Diese Qualitäts-

fluktuationen erschweren den Einsatz von Chitosanprodukten in vielen Bereichen der Medizin. Der Zugang zu hochreinem Chitosan mit konstanter Zusammensetzung würde weitere therapeutische Anwendungen erschließen.

Chitin aus Insekten lässt sich aufgrund seines geringeren Kristallisationsgrades zwar unter wesentlich milderen Bedingungen deacetylieren (*Struszczyk, 2000; Zhang, 2000*), jedoch ist die mangelnde Verfügbarkeit ein entscheidender Faktor, der gegen die Verwendung von Insektenchitin spricht.

Aufgrund dessen und aufgrund der Tatsache, dass die chemische Chitosanproduktion mit hohen Umweltbelastungen verbunden ist, wird nach alternativen Wegen gesucht. Biotechnologische Verfahren eröffnen dabei neue Möglichkeiten. So stellt die enzymatische Umsetzung von Chitin zu Chitosan durch geeignete Enzyme eine Alternative dar. Chitindeacetylasen katalysieren in der Natur die Deacetylierung von Chitin. Die Nutzbarmachung dieses Potenzials könnte unter geeigneten Bedingungen sowohl Pilzabfälle aus Fermentern als auch Krabbenschalen als Rohstoffquelle für hochreines Chitosan mit gleich bleibender Qualität zugänglich machen. Ein gentechnisch hergestelltes Enzym könnte neue Möglichkeiten eröffnen (*Jaspar-Versali und Clerisse, 1997*).

Neben dem Ansatz der Chitindeacetylierung werden zurzeit weitere biotechnologische Verfahren zur Deproteinierung und Demineralisierung von chitinhaltigen Abfällen erforscht. Auch die Weiterverarbeitung von Chitosan, z.B. zu Folien, kann auf enzymatischen Wege erfolgen (*Kumar, 1999; Chen 2000*).

1.1.10 Chitindeacetylase

Die Fähigkeit der enzymatischen Chitindeacetylierung ist bislang nur in Pilzen und Bakterien beschrieben worden (*Kolodziejaska, 1995; Tsigos, 2000*). Die Enzymklasse der Chitindeacetylasen (CDA, [EC 3.5.1.41]) katalysiert dabei die Deacetylierung von polymeren N-Acetylglucosaminen zu Chitosan und Acetat (Abbildung 1-8).

Erste Berichte über eine Chitindeacetylase des Zygomyceten *Mucor rouxii* stammen aus dem Jahr 1975 von *Araki und Ito*. 1993 gelang es *Kafetzopoulos et al.* das Enzym bis zur Homogenität aufzureinigen und zu charakterisieren. Eine weitere Chitindeacetylase eines Zygomyceten konnte in *Absidia coerulea* (*Gao, 1995*) identifiziert werden. Beide Enzyme sind im Periplasma lokalisiert (*Bartnicki-Garcia, 1989*) und dienen der Synthese von Chitosan, welches in die Zellwand inkorporiert wird. Da die CDA eine zentrale Bedeutung für die Zellwandbiogenese hat, ein Prozess, der während der gesamten Entwicklung des Organismus aufrechterhalten werden muss, ist die Expression der *cda*-Gene konstitutiv.

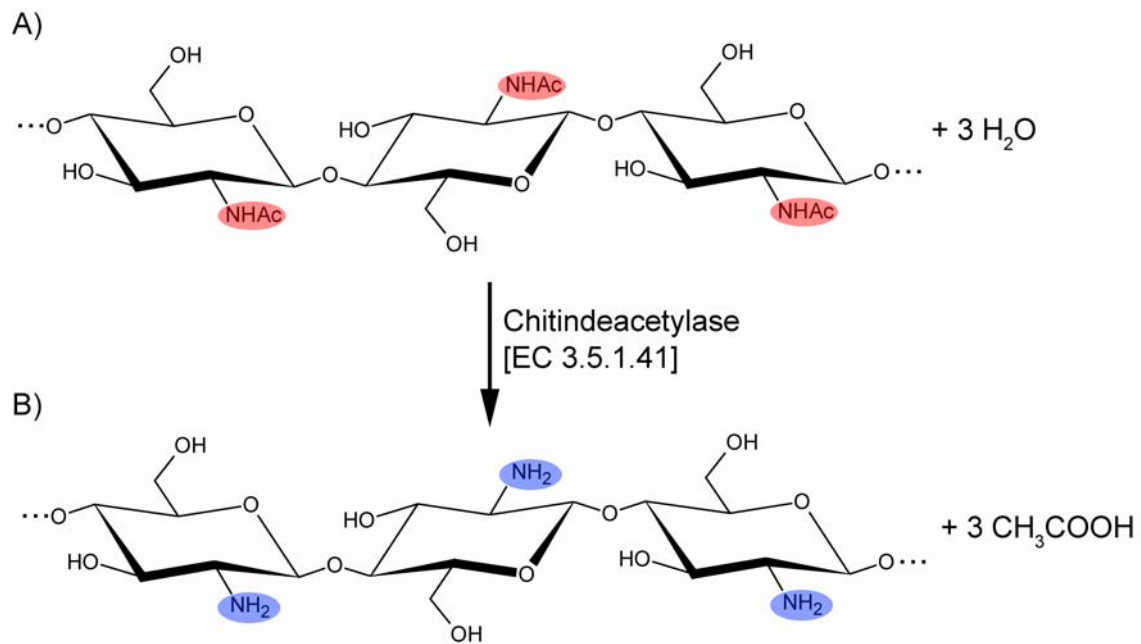


Abbildung 1-8: Enzymatische Deacetylierung von A) Chitin zu B) Chitosan. Bei der Hydrolyse entsteht außerdem Acetat.

Chitin deacetylases spielen eine wichtige Rolle bei der Infektion von Pflanzen durch Pilze, indem sie zur Umgehung von pflanzlichen Abwehrmechanismen beitragen.

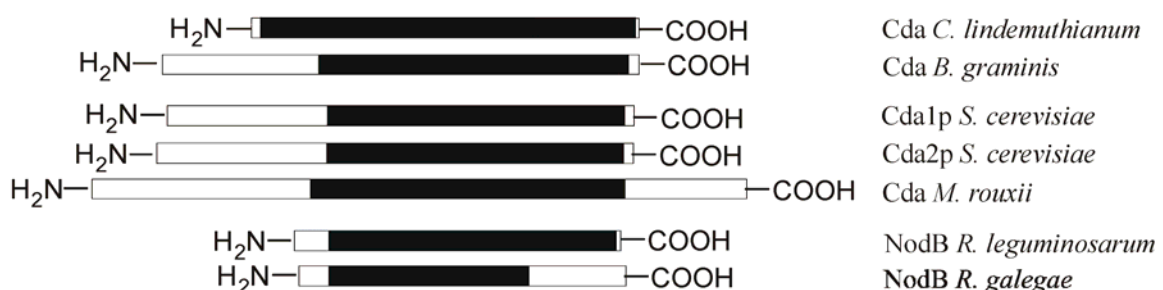
Pflanzen verfügen neben konstitutiven Abwehrmechanismen, wie z.B. der Bildung von Barrieren aus Lignin oder Suberin (Kolattukdy, 1980; Kolattukdy 1985; Mellersh und Heath, 2001), sowie antimikrobielle Substanzen, zu denen Saponine, cyanogene Glycoside und Glucosinolate (Bennett und Wallsgrove, 1994), über zahlreiche induzierte Abwehrmechanismen. Bei Pilzinfektionen von Pflanzen werden Fragmente der pilzlichen Strukturpolysaccharide β -1,3-Glucan und Chitin als Elicitoren erkannt. Diese induzieren u.a. die Expression von hydrolytischen Enzymen, wie β -1,3-Glucanasen und Chitinasen, die in der Lage sind die Strukturpolymere der Pilze zu lysieren (Mauch, 1988).

Pflanzenpathogene Pilze, wie *Colletotrichum lagenarium* (Siegrist und Kaus, 1990) oder *Colletotrichum lindemuthianum* (Tsigos, 1995) können auf diese Abwehr reagieren, indem sie die Beschaffenheit ihrer Zellwand modifizieren. Eine Möglichkeit besteht in der Maskierung der durch Hydrolasen angreifbaren Komponenten, z.B. durch eine äußere Proteinschicht (Schoffmeier, 1999). Eine andere ist die Modifikation der Zellwandbestandteile selbst. Da die Kristallisation der einzelnen Chitinketten zu Fibrillen nach deren Biosynthese in Pilzen mit einem gewissen zeitlichen Abstand erfolgt (Merz, 1999), bietet sich die Möglichkeit durch eine Chitin deacetylase die Ketten in Chitosan umzuwandeln, bevor diese in einer starren Struktur vorliegen (Davis und Bartnicki-Grazia, 1984). Das bietet dem pathogenen Pilz direkten Schutz vor den Chitinasen der Pflanze und die Freisetzung von elicitorischen Chitin-Fragmenten wird eingeschränkt. Untersuchungen an Weizen-Chitinasen haben gezeigt, dass diese nur sehr geringe Aktivität gegenüber Chitosan aber hohe Aktivität gegenüber dem acetylierten Substrat besitzen (Ride und Barber, 1990).

Aufgrund seines nicht klar definierten Polymerisations- und Deacetylierungsgrads ist nicht klar, in wie weit das durch Chitindeacetylasen in der Zellwand entstehende Chitosan selbst als Elicitor wirkt. Dennoch scheint die Deacetylierung eine geeignete Strategie darzustellen, die pflanzlichen Abwehrmechanismen bis zu einer erfolgreichen Etablierung des Pathogens im Wirt auszuhebeln. Da den Chitindeacetylasen pflanzenpathogener Pilze nur innerhalb einzelner Entwicklungsstadien eine Funktion zukommt, findet eine stadienspezifische Regulation ihrer Expression statt.

Die Chitindeacetylase spielt auch eine wichtige Rolle bei der Sporulation von *S. Cerevisia*. Zwei Isoformen konnten identifiziert werden, die eine hohe Sequenzhomologie mit den Enzymen aus Pilzen aufweisen (*Christodoulidou, 1996*). Der Gehalt an Chitosan in der Zellwand der Sporen nimmt, verglichen mit normalen Zellen, um das Fünffache zu (*Briza, 1988*). Da die Zellwand der Sporen einen besseren Schutz gegenüber Stressbedingungen bietet (*Miller, 1989*), als die der vegetativen Zellen, tritt eine Sporulation bei Stickstoff- und Kohlenstoffmangel auf. Eine Lage der vierschichtigen Zellwand besteht aus Chitosan. Ähnlich dem Zusammenspiel bei Pilzen, deacetylieren auch hier Chitindeacetylasen die durch Chitinsynthetasen entstehenden Chitinketten zu Chitosan.

Sequenzanalysen zeigen eine strukturelle Ähnlichkeit der Chitindeacetylasen mit NodB Proteinen verschiedener *Rhizobien* (*John, 1993; Kafetzopoulos, 1993*). Diese Übereinstimmungen spiegeln sich auch funktionell wider. Die NodB Proteine sind N-Acetylchitooligosacchariddeacetylasen, die essenziell für die Biosynthese von Nod-Faktoren sind (*Denarie, 1996*). Die zur Symbiose erforderlichen Proteine haben, wie unter 1.1.6 bereits ausgeführt, die Grundstruktur eines N-Acetylglucosamin-Oligomers. Diese Oligomere werden durch eine Chitinsynthase (NodC) erzeugt und anschließend weiter modifiziert. So entfernen NodB Proteine am nichtreduzierenden Ende die N-Acetylgruppe, wodurch eine freie Aminogruppe entsteht, die später für die Acylierung durch NodA benötigt wird (*John, 1993*).



50 aa

Abbildung 1-9: Sequenzhomologie auf Proteinebene verschiedener CDAs und ähnlicher Enzyme. Die schwarzen Abschnitte kennzeichnen die Bereiche der Polysaccharid-Deacetylase-Domäne.

Allen Enzymen ist eine hohe Sequenzhomologie gemein, wobei auffällig ist, dass diese Ähnlichkeit nur wenige Aminosäuren umfasst. Längere zusammenhängende homologe Sequenzbereiche, wie sie u.a. bei den Chitinsynthetasen über Bereiche bis zu 15 Aminosäuren zu finden sind, treten bei den Chitindeacetylasen nicht auf. Die Bereiche der Gene, in denen durch Sequenzvergleiche Ähnlichkeiten festgestellt wurden, dehnen sich meist über 100-150 Aminosäuren aus, in denen es *Cluster* mit stärkeren homologen Aminosäuresegmenten gibt. Dieser Bereich wird vom *European Bioinformatics Institute* (EBI) als Polysaccharid-Deacetylase-Domäne (InterPro Zugangsnummer: IPR002509) klassifiziert.

Neben den diversen anabolischen Funktionen, die Chitindeacetylasen in den beschriebenen Organismen aufweisen, kommen ihnen auch katabolische zu. So wird neben dem Abbau des Chitins über Chitinasen ein weiterer Weg postuliert, in dem die CDA eine wichtige Rolle einnimmt. Hierbei wird das Chitin zunächst deacetyliert. Das dabei entstehende Chitosan wird dann durch Chitosanasen, in Chitooligomere, zumeist Chitobiose gespalten. Durch Glucosamidasen werden diese letztlich wiederum zu Glucosamin hydrolysiert.

Substrat	Enzym
Chitin	
↓	
Chitosan	Chitindeacetylase
↓	
(GlcN) ₂	Chitosanase
↓	
GlcN	Glucosamidase

Tabelle 1-4: Postulierte Chitindegradation über den Chitindeacetylaseweg.

Im Gegensatz zum gut untersuchten mikrobiellen Abbauweg von Chitin im Erdboden, ist über den Abbau in Meer- und Süßwasser wenig bekannt. Untersuchungen des Chitinabbaus im Meer deuten jedoch daraufhin, dass im Meerwasser neben dem Chitin-Abbau über Chitinasen auch der Abbau über Chitosan mit Chitindeacetylasen beschrritten wird. So spielen Chitindeacetylasen vor allem bei Bakterien aus marinen Sedimenten eine wichtige Rolle. Untersuchungen zeigten, dass sedimentiertes Chitin bei nachweisbarer Chitindeacetylaseaktivität innerhalb kürzester Zeit zu Chitosan deacetyliert werden kann (Gooday und Ferguson, 1996).

Während Chitinaseaktivität im gesamten Sediment nachgewiesen werden konnte, war die Aktivität von Chitindeacetylasen auf eine Tiefe von 4 cm beschränkt (Gooday, 1997). Wahrscheinlich handelt es sich um aerobe Organismen, da die Schnittstelle zwischen aeroben und anaeroben Organismen hier bei etwa 5 cm Tiefe liegt.

1.2 Vorausgegangene Arbeiten

Chitosan stellt ein vielseitiges Biopolymer dar, welches durch Deacetylierung aus Chitin gewonnen werden kann. Problematisch gestaltet sich zurzeit noch der Einsatz in weiten Bereichen der Medizin, da mit chemischen Synthesemethoden nur unzureichend reine Chitosanpräparate erhältlich sind. Viel versprechend ist dagegen die Gewinnung von Chitosan aus chitinhaltigen „Abfällen“ durch eine Chitindeacetylase.

Im Rahmen des Forschungsprojektes „Marine Biotechnologie“ des Landes Niedersachsen, an dessen Teilbereich „Chitosan“ insgesamt fünf Arbeitsgruppen beteiligt waren, sollte die Verbreitung und das Vorkommen von Chitindeacetylasen in marinen Mikroorganismen untersucht werden. Darüber hinaus sollte die technische Nutzbarmachung des Enzyms zur Chitosanproduktion ermöglicht werden. Dies sollte unter Zuhilfenahme von mikrobiologischen, biochemischen und molekularbiologischen Methoden erfolgen.

In der Abteilung Gentechnologie des Fraunhofer IGB in Hannover wurde in der Diplomarbeit von C. Schmalz (2000) ein molekularbiologischer Ansatz verfolgt, mit dessen Hilfe neue Chitindeacetylasegene in marinen Mikroorganismen gefunden werden sollten. Diese aus dem Meeressediment isolierten Bakterien haben in verschiedenen Assays Chitindeacetylaseaktivität gezeigt.

Grundlage des molekularbiologischen *Screenings* war das Design von PCR-Primern, die an konservierte Gen-Regionen bekannter Chitindeacetylasen und homologer Gene binden.

So wurden unbekannte DNA-Segmente amplifiziert, sofern sie in der *Primer*-Bindungsregion eine starke CDA-Homologie aufwiesen. Die erhaltenen Fragmente wurden sequenziert und mit Hilfe von Datenbanken identifiziert.

Dadurch wurde die Teilsequenz einer Polysaccharid-Deacetylase-Domäne identifiziert. Mittels direkter Sequenzierung des bakteriellen Genoms, konnte so ein *open reading frame* (ORF) einer potenziellen Chitindeacetylase entschlüsselt werden. Bei diesem *open reading frame* handelt es sich um eine 1086 bp lange Sequenz, die *upstream* der Polysaccharid-Deacetylase-Domäne fünf mögliche bakterielle Startcodons aufwies. Diese fünf potenziellen *cda*-Gene haben eine Länge von 747-1068 bp.

Der Wirtsorganismus mit dem Arbeitsnamen 99/6 konnte anhand seiner 16S rRNA als grampositives Bakterium identifiziert werden. Es gehört zur Gattung *Promicromonospora*, welche dem Stamm der *Actinobacterien* untergeordnet sind. Die Sequenz des *open reading frame*, sowie ein Vergleich mit sequenzhomologen Enzymen sind im Anhang (7.3) aufgeführt.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von Chitosan, sowie der Ausblick auf neue medizinische Anwendungen, die durch höherwertiges Material ermöglicht werden, machen neue Herstellungsverfahren notwendig. Dabei kann die Erforschung von Chitindeacetylasen, die als mögliche biotechnologische Werkzeuge zur schonenden Chitosanherstellung betrachtet werden, einen wichtigen Beitrag leisten.

Basierend auf oben genannten Vorarbeiten, sollen die potenziellen *cda*-Gene des *open reading frame*, welche sich durch fünf mögliche Startcodons unterscheiden, rekombinant exprimiert, aufgereinigt und charakterisiert werden.

Die rekombinante Produktion der neuen Chitindeacetylase soll Zugang zu größeren Proteinmengen gewährleisten. Die prokaryotische Expression in *E.coli* wurde gewählt, da sie eine effiziente Produktion mit hohen Ausbeuten ermöglicht. Ebenso berücksichtigt wurde dabei die Tatsache, dass der *open reading frame* aus einem marinen Bakterium stammt und somit keine Glycosylierung erfordert. Die Detektion und Aufreinigung sollen durch ein *Affinitätstag* bzw. Fusionsprotein erfolgen.

Bei der Charakterisierung sollen Unterschiede der Enzymaktivität der fünf potenziellen Gene mit unterschiedlichen N-termini untersucht werden. Bei der biologischen Charakterisierung bezüglich verschiedener Reaktionsparameter sollen auch Unterschiede zu bekannten Chitindeacetylasen aus Pilzen bzw. Chitooligosaccharid-Deacetylasen diskutiert werden.

Daneben sollen Untersuchungen der biophysikalischen Eigenschaften des Enzyms genauer charakterisieren.

2. Experimenteller Teil

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarose-Gelkammer	Wide/Mini Sub Cell (Agarose-Gel), Biometra
Autoklav	Modell GLA 40, Gössner
Blotapparatur	Semidry Blotter, Biometra
Brutschrank	Modell 5060, Heraeus-Christ
Chromatographiesysteme	Econo System, BioRad; Perfusion Chromatography Workstation 60 BioCAD, PerSeptive Biosystems
HPLC-Anlage	VP10-System, Shimadzu
Exsikkator	Schleicher und Schuell
Fluorimeter	Shimadzu Spektralfluorimeter RF 1501
Geldokumentation	BioDocII, Biometra
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf
IR-Spektrometer	1430 Ratio Recording, Perkin Elmer
Magnetrührer	RET basic, IKA Labortechnik
Mikrowelle	R-6200, Sharp
Netzteile	Electrophoresis Power Supply, ECPS 3000/150, Pharmacia; Power Supply Model 100, Besthesda Research
MALDI-TOF Massenspektrometer	Kratos Kompact Maldi-II, Shimadzu
NMR-Spektrometer	DRX 600, Bruker
PAGE-Gelkammer	Mini Twin, Biometra
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick
Photometer	Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech
Rotoren	JA-14, JA-25.50, JS-13.1, Beckmann
Schüttelinkubator	Modell G25, New Brunswick Scientific Co
Sequenzer	ABI Prism 310 GeneticAnalyzer, Applied Biosystems
Spektralphotometer	Ultraspec 3.000, Pharmacia Biotech
Thermocycler	Peltier Thermocycler PTC-200, MJ Research
Ultraschallprozessor	UP 200 H, Dr. Hilscher
Umluftinkubator	Modell ULE 500, Mettler Toledo
UV Transilluminator	TI 3, Biometra
Vortex	Minishaker MS 1, IKA Labortechnik

Wasseraufbereitung	MilliQ Plus, Millipore
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5417 R, Eppendorf Avanti J-25, Beckmann Minifuge RF Haeraeus

2.1.2 Chemikalien

Die eingesetzten Biochemikalien und Chemikalien wurden, falls nicht anders erwähnt von folgenden Firmen bezogen:

AppliChem, Darmstadt
 BioRad, München
 Fluka, Neu-Ulm
 Merck, Darmstadt
 Applied Biosystems, Weiterstadt
 Roth, Karlsruhe
 Serva, Heidelberg
 Stratagene, Heidelberg
 Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
 Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.3 Verwendete Kits

DNA-Gelextraktion	Qiagen
Genomische-DNA-Isolierungskit	Qiagen
DNA-Mini- und Midipräparationskit	Qiagen
Sequenzierkit	Applied Biosystems
Acetat-Freisetzungssassay	R-Biopharm, Roche

2.1.4 Proteine, Oligonucleotide und Chitinsubstrate

Oligonucleotide	TIB Molbiol
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Enterokinasen	New England Biolabs
DNA-Standards	New England Biolabs
Ligase	New England Biolabs
Shrimps Alkalische Phosphatase	Roche
Protein-Molekulargewichtsstandards	BioRad
<i>Pwo</i> -Polymerase	Peqlab
N-Acetylchitooligomere	Saikagagu

2.1.5 Standard-Pufferlösungen

SDS-Elektrodenpuffer

Anode

25 mM Tris pH 8,0

Kathode

25 mM Tris pH 8,0

250 mM Glycin

SDS-Trenngel (7,5 % - 15 %)

12 % Acrylamid/Bisacrylamid

0,1 % SDS

375 mM Tris/HCl pH 8,8

0,1 % APS

0,05 % TEMED

SDS-Sammelgel (5 %)

5 % Acrylamid/Bisacrylamid

0,1 % SDS

125 mM Tris/HCl pH 6,8

0,19 % APS

0,05 % TEMED

Coomassie-Entfärbelösung

40 % Methanol

10 % Essigsäure

50 % Aqua bidest

5x Laemmli-Puffer

250 mM Tris pH 6,8

10 % (w/v) SDS

10 % (v/v) β -Mercaptoethanol

0,2 % (w/v) Bromphenolblau

50 % (w/v) Glycerin

DNA-Probenpuffer

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol FF

30 % Glycerin

in Aqua bidest bei 4° C gelagert

Coomassie-Färbelösung

0,5 % (w/v) *Coomassie Brilliant Blue*

in Entfärbelösung aufnehmen

Transferpuffer

25 mM Tris pH 8,3

192 mM Glycin

20 % Methanol

TAE-Puffer pH 7,4

40 mM Tris

1,0 mM EDTA

0,11 % (v/v) Essigsäure

TBST-Lösung

25 mM Tris-HCl pH 7,4

125 mM Natriumchlorid

5,0 mM Magnesiumchlorid

0,05 % Tween20

AP-Puffer

100 mM Tris pH 9,5

100 mM Natriumchlorid

5,0 mM Magnesiumchlorid

DNA-Agarosepuffer

10 % Glycerin

0,025 % (w/v) Bromphenolblau

0,025 % (w/v) Xylencyanol

2.1.6 Chromatographiematerial

1. Affinitätschromatographie:

- Amylose-Säulenmaterial (Fa. New England Biolabs) in Pharmacia XK 16/20-Säule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech)
- Hydroxylapatit (Fa. Sigma) in XK 16/20 -Säule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech)
- *Strep-Tactin*-Sepharose-Säule (Fa. IBA)

2. Gelfiltrationschromatographie

- Superdex 75 in K 9/60-Säule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech)
- Superdex 200 in K 9/60-Säule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech)
- BioSil SEC 125 5 (Fa. BioRad)

Reversed-Phase-HPLC

- Nucleosil C4 (Fa. Macherey & Nagel)

2.1.7 Mikroorganismen

Folgende *E. coli* Bakterienstämme wurden für die Klonierungsexperimente und die Proteinexpression verwendet:

JM 105 $F' traD36 lacI^q \Delta(lacZ) M15 proA^+B^+/thi rpsL (Str^r) endA sbcB15$
 $hsdR4 (r_K^- m_K^+) \Delta(lac-proAB)$

TB1 $F^- ara \Delta(lac-proAB)[\Phi80dlac \Delta(lacZ)M15] rpsL(Str^R) thi hsdR.$

SoloPack® Gold $Tet^R \Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1$
 $recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZ\Delta M15 Tn10 (Tet^R) Amy$
 $Cam^R \int'$

BL21(D3) $F^- dcm ompT hsdS(r_B^- m_B) gal \lambda(DE3)$

2.1.8 Nährmedien für *E.coli*-Zellen

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte in 2x YT-Medium der Firma DIFCO. Für die selektive Aufzucht wurden 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Bei der Herstellung von Agarplatten wurden in 2x YT-Medium 16 g/l Agar zugesetzt.

2.1.9 Verwendete *Primer*

1. *Primer* zur gerichteten PCR-Mutagenese

<i>Primer</i>	Sequenz
EcoRI-FW	5'– ATC CCG GAA TTC CTG GTT CCT CGA CGG GCG GCC GGT GG -3'
EcoRI-rv	5'– GAT CCG GAA TTC TCA TCG GCG CAC CAT CCG TTC GCG CGC -3'
ORF2-FW	5'– Ph-CTG GTC GTT CCA TGT CCT GGG CGT CAC CC -3'
ORF3-FW	5'– Ph-GTG ACA CCT CTC GTC GTC CGT CGA CGA GAC -3'
ORF4-FW	5'– Ph-ATC GAG CAG GAC GTG CCG CCC GCC GGG GCG-3'
ORF5-FW	5'– Ph-GTG CCG CCC GCC GGG GCG TTC CGC GGC GTC-3'
Uni-IBA7-rv	5'– Ph-GAA TTC GGG ACC GCG GTC TCG GCG CCC TTC-3'
CDA-pkk-FW	5'– AAA CAT GTG GAG CCA CCC GCA GTT CGA AAA AAT C -3'
CDA-pkk-rv	5'– GAG CTA AGC TTC ATC ATC GGC GCA CCA TCC GTT C -3'
N-term(-)-rv	5'– Ph-CAT GGT CTG TTT CCT GTG TGA AAT TGT TAT CC -3'
C-FW	5'– Ph-GTT CGA AA ATG AAA GCT TGG CTG TTT TGG CGG -3'
C-rv	5'– Ph-TGC GGG TGG CTC CAT CGG CGC ACC ATC CGT TC -3'

Tabelle 2-1: Übersicht der verwendeten *PCR-Primer* zur Insertion und Deletion von DNA-Abschnitten.

2. Sequenzier- und Kolonie-PCR-*Primer*

<i>Primer</i>	Sequenz
r36	5'– CGA ATG TCA GGG CGA AGA CC -3'
R43	5'– CGG ACG ACG AGA GGT GTC AC -3'
F36	5'– CCA TGT CCT GGG CGT CAC CC-3'
R44	5'– ATG GTG GAA CGA CCA GTC G -3'
F29	5'–CCG GCG ACG CCT TTG ACT GGG-3'
R41	5'–TCA TCG GCG CAC CAT CCG TTC-3'
F24	5'–ACG ACA AGG TCT TCG CCC TGA C-3'
R48	5'–GTG GTC CCG CCC GTG CAG CGC G-3'
r49	5'–CTG GCC GCG TCG TCG ACC CAG-3'
Term bw	5'–TTC TGC GTT CTG ATT TAA TCT GTA TCA GGC-3'
Pkk233FW-2	5'–CAA TTA ATC ATC CGG CTC GTA TAA TGT GT GG-3'
M13	5'– TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT -3'

Tabelle 2-2: Übersicht der verwendeten *PCR- und cycle sequencing-Primer*.

2.1.10 Expressionsvektoren

Folgende Expressionsvektoren wurden zur Klonierung und Überexpression der Chitindeacetylase verwendet:

pASK-IBA7 N-terminale *Strep-tag II*-Fusion an das Zielprotein; konstitutive Expression unter der Kontrolle eines *tetA*-Promotors; Reinigung des Fusionsproteins durch Affinitätschromatographie an *Strep-Tactin* möglich

pMAL-c2G N-terminale Fusion des Maltosebindepoteins (MBP, *malE* codiert) an das Zielprotein; konstitutive Expression unter Kontrolle eines *trc*-Promotors; Reinigung des Fusionsproteins durch Affinitätschromatographie an Amylose möglich

pKK233-2 konstitutive Expression unter Kontrolle eines *trc*-Promotors

Alle verwendeten Plasmide enthielten zur Selektion in *E. coli* ein β -Lactamasegen, das eine Ampicillinresistenz vermittelt.

2.1.11 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper

Anti-MBP Polykoniales Anti-Serum, *New England Biolabs*, USA

Anti-*Strep-Tactin* HRP-conjugate, *IBA*, Göttingen

Sekundäre Antikörper

Anti-rabbit IgG (Fc) AP-conjugate, *Promega*, Madison, USA

2.1.12 Datenverarbeitung

Die Planung und Dokumentation der Klonierungsexperimente wurde mit dem Programm *Vector NTI 6.0* (Fa. Informax) durchgeführt.

Die Dokumentation von SDS-PAGE-Gelen and Westernblots wurde mit einem Flachbettscanner des Typs Scanjet 7450 der Firma Hewlett Packard (Software: Precision Scan LTX 3.0) vorgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels des Programmes *Adobe Photoshop 7.0*. Proteinmengen wurden mit dem Programm *Scion Image 4.02* der Firma Scion quantifiziert.

Die Analyse der Elektrospherogramme einer DNA-Sequenzierung wurde mit Hilfe der Software *ABI Prism Sequencing 2.1.1* (Fa. Perkin Elmer) und *Contig Express* (Fa. Informax) durchgeführt.

Die Enzymkinetiken wurden mit den Programmen *Prism 3.03* (Fa. Graphpad) und *Ekl 3* (Verlag Wiley-VCH) dargestellt.

Standardsoftware bei der Erstellung von Graphiken und Tabellen sowie der Textverarbeitung waren *MS-Excel-XP* und *MS-Word-XP* (Fa. Microsoft, Redmond, WA, USA).

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 PCR zur gerichteten Insertion und Deletion von DNA-Sequenzen

Die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode diente der Einführung von Schnittstellen für Restriktionsenzyme oder Fusions-*Tags* und der gerichteten Deletion bestimmter DNA-Sequenzen. Zur Minimierung des Einbaus von Fehlbasen wurde die Amplifikation mit Hilfe der *Pwo*-(*Pyrococcus woesei*)-DNA-Polymerase unter Verwendung der folgenden Protokolle durchgeführt:

1. Modifizierung von Plasmiden, bei der das Produkt eine ähnliche Größe wie das Ausgangsplasmid hat:

PCR- Ansatz:

Plasmid-DNA	≈ 5 µg
<i>Primer</i>	je 100 pmol
Nucleotidmix	200 µM je dNTP
MgSO ₄	2-6 mM (je nach Ansatz)
<i>Pwo</i> -Polymerase	2 U
10x <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase-Puffer	5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

PCR-Programm:

- 1) 240 s 95°C
Zugabe der *Pwo*-DNA-Polymerase
- 2) 45 s 95°C
- 3) 60 s 40-65°C (je nach *Primer*-Paar)
- 4) 600 s 68°C
- 5) 11x GOTO 2)
- 6) 600 s 68°C
- 7) unbegrenzt 4°C

Nach Beendigung der Reaktion enthielt die Lösung neben dem linearen Amplifikat noch Ausgangsplasmid-DNA von ähnlicher Größe. Da diese methyliert vorlag, konnte sie durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* verdaut werden. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 40 U *DpnI* versetzt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte eine gelelektrophoretische Reinigung über ein 1,5 %iges Agarosegel.

2. Modifizierung von DNA-Fragmenten, bei denen das Produkt eine deutlich abweichende Größe vom *Template* hat:

PCR- Ansatz:

DNA	20 ng Plasmid-DNA; 500 ng genomische DNA
<i>Primer</i>	je 100 pmol
Nucleotidmix	200 µM je dNTP
MgSO ₄	2-6 mM (je nach Ansatz)
<i>Pwo</i> -Pol	2 U
10x <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase-Puffer	5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

PCR-Programm:

1) 90 s	94°C
Zugabe der <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	
2) 90 s	94°C
3) 30 s	20°C
4) 300 s	72°C
5) 6x GOTO 2)	
6) 90 s	94°C
7) 120 s	45-55°C (je nach <i>Primer</i>)
8) 300 s	72°C
9) 30x GOTO 6)	
10) unbegrenzt	4°C

Aufgrund der unterschiedlichen Größen von PCR-Produkt und *Template* konnte direkt eine elektrophoretische Auftrennung durchgeführt werden.

In beiden Ansätzen wurde nachfolgend das PCR-Produkt aus dem Agarosegel ausgeschnitten, die DNA extrahiert, mit T4-DNA-Ligase ligiert, schließlich in *E. coli* transformiert und auf einer YT-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert.

2.2.2 Kolonie-PCR

Um die Orientierung bei der Insertion des PCR-Fragments in den Vektor zu ermitteln, wurde eine PCR direkt mit den erhaltenen Klonen durchgeführt, indem diese mit einer Pipettenspitze gepickt, kurz in ein RG für die PCR getaucht und dann in einem Kapsenbergkappenröhrchen mit dem entsprechenden Selektivmedium für eine Mini-Präparation und die Herstellung einer Glycerin-Dauerkultur kultiviert wurden.

Für die PCR wurde der vorwärts gerichtete *Primer* so gewählt, dass er auf dem Vektor kurz vor dem Insert ansetzte und der rückwärts gerichtete *Primer* so, dass er am Ende des Inserts ansetzte. Ein PCR-Produkt der dem Insert entsprechenden Größe kam somit nur zu Stande, wenn die gewünschte Orientierung des Inserts vorlag. Erfolgte die Insertion mit der entgegengesetzten Orientierung, so entstand das PCR-Produkt nicht.

2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien

Für die Isolierung genomischer DNA aus dem marinen Mikroorganismus (Arbeitsname 99/6) wurde das *Genomic-Tip-System* von Qiagen gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die isolierte DNA wurde in 1 ml H₂O aufgenommen und bei 4°C gelagert.

2.2.4 Plasmidpräparation aus *E.coli*

1. Minipräparation

Für die Gewinnung kleinerer Mengen DNA wurde eine Übernachtskultur von *E.coli* bei 37°C in 3 ml 2x YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angezogen. Die Präparation erfolgte mit dem MiniPrep Plasmid Kit von Qiagen gemäß den Herstellerangaben. Die isolierte DNA wurde in 20 µl H₂O aufgenommen und bei 4°C gelagert.

2. Midipräparation

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde eine Übernachtskultur von *E.coli* bei 37°C in 150 ml 2x YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angezogen. Die Plasmid DNA wurde mit dem MidiPrep Plasmid Kit von Qiagen nach Herstellerangaben präpariert. Die isolierte DNA wurde in 100 µl H₂O aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Die DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der jeweiligen Präparationen erfolgte durch Extinktionsmessung bei 260 nm und 280 nm.

2.2.5 Spaltung mit Restriktionsenzymen

Die Klonierung von Plasmidfragmenten und PCR-Produkten in Vektoren, sowie die Verifizierung der resultierenden Produkte erfolgte mit Hilfe von Restriktionsenzymen.

Ein typischer Restriktionsansatz enthielt 200-1.000 ng DNA und 10 bis 20 U des entsprechenden Restriktionsenzym in 20 µl gepufferter Lösung. Puffer- und Inkubationsbedingungen wurden nach Herstellerangaben gewählt.

2.2.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Auftrennung der Proben in einer Flachbett-Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurde 1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach dem Gießen und Abkühlen des Gels wurden die Proben mit 1/10 Volumen 10x DNA-Auftragspuffer gemischt und aufgetragen. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente dienten folgende Nucleinsäurestandards: λ -DNA-*BstEII*-Digest und ϕ X174 DNA-*HaeIII*-Digest. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei RT und einer konstanten Spannung von 100 V. Für alle analytischen und präparativen Gele wurden die Nucleinsäurebanden zur Sichtbarmachung mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt. Dazu wurden die Gele für mindestens 15 min unter leichtem Schütteln in 0,1 % (w/v) Ethidiumbromid in TAE gefärbt.

2.2.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von elektrophoretisch aufgetrennter DNA in Agarosegelen wurde das *QiaQuick Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Angabe des Herstellers verwendet.

2.2.8 Dephosphorylierung von DNA Fragmenten

Die zur Klonierung eingesetzten Vektorfragmente wurden mit alkalischer Phosphatase aus Krabben (SAP, Fa. Roche) dephosphoryliert, um eine Selbstligation zu unterbinden.

Reaktionsansatz:

- 1 µg geschnittener Vektor-DNA
- 1x SAP-Puffer
- 1 U SAP

Die Dephosphorylierung erfolgte 1 h bei 37°C. Vor der anschließenden Ligation wurde die SAP 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die intra- bzw. intermolekulare Verknüpfung von DNA-Molekülen, die am 3'-Ende eine Hydroxyl- und am 5'-Ende eine Phosphatgruppe tragen, wurde durch T4 DNA Ligase katalysiert.

Bei der Insertion eines DNA-Fragments in einen Vektor, wurde ein molares Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) eingesetzt. T4-Ligase wurde mit einer Aktivität von 400 U/ μ l für *sticky-end*-Ligationen bzw. 2.000 U/ μ l für *blunt-end*-Ligationen verwendet.

Ligationsansatz:

Vektor DNA	1 μ g
DNA Insertfragment	3x molare Menge
10 x T4-DNA Ligasepuffer (NEB)	2 μ l
T4-DNA Ligase (NEB)	1 μ l
H ₂ O	ad 20 μ l

Im Vorfeld der Ligation wurden die DNA Fragmente 10 min bei 45°C inkubiert, um eine eventuelle lockere Anlagerung der jeweiligen Enden aufzuheben. Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert, durch 10 min Erhitzen auf 65°C von Ligaseaktivität befreit und zur Transformation eingesetzt.

2.2.10 Erzeugung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen

Für die Transformationsvorbereitung wurden Bakterien der *E. coli*-Stämme JM105, TB1 und B121(D3) nach der CaCl₂-Methode behandelt. Für die Vermehrung wurden 10 ml YT-Medium mit einer ÜNK angeimpft und anschließend bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von etwa 0,7 inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3.000 rpm, 15 min, 4°C, Heraeus Minifuge RF) und der Überstand verworfen.

Das Pellet wurde in 5 ml eisgekühlter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, das Pellet in 500 μ l eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die so behandelten Zellen waren transformationskompetent, wurden bei 4°C gelagert und innerhalb von 24 h für die Transformation verwendet.

Die von der Firma Stratagene vertriebenen *SoloPack*[®] *Gold* wurden bereits durch den Hersteller kompetent ausgeliefert und bedurften somit keinerlei Vorbehandlung.

2.2.11 Transformation von *E.coli*-Zellen

Zur Transformation von Plasmid-DNA in die *E. coli*-Stämme JM105, TB1 und B121(D3) wurden je 2 μ l des Ligationsansatzes zu 30 μ l der transformationskompetenten Zellen hinzugegeben. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, 90 s auf 42°C erwärmt und für

2 min auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurde mit 300 µl 2x YT-Medium verdünnt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde auf Selektivagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Transformation von Plasmid-DNA in *SoloPack[®] Gold* der Firma Stratagene erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem von der Firma Perkin Elmer vertriebenen Sequenzierkit „ABI PRISM[™] Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“, das nach einer modifizierten Kettenabbruchmethode nach *Sanger (1977)* die DNA-Fragmente in einer Sequenzier-PCR erzeugt.

Die Analyse der entstandenen fluoreszierenden DNA-Fragmente erfolgte in einem ABI Prism 310 *Genetic Analyzer* der Firma Perkin Elmer. Die Rohdaten wurden anschließend mit Hilfe der Programme *ABI Prism Sequencing 2.1.1* (Fa. Perkin Elmer) und *Contig Express* (Fa. Informax) ausgewertet.

Sequenzieransatz:

Terminator <i>Premix</i>	3 µl
DNA- <i>Template</i>	250 ng
Sequenzier- <i>Primer</i>	5 pmol
H ₂ O	ad 20 µl

Reaktionszyklus:

- 1) 10 s 96°C
- 2) 5 s 50°C
- 3) 240 s 60°C
- 4) 25x GOTO 1)
- 5) unbegrenzt 4°C

Alle Temperaturänderungen erfolgten mit einer Rate von 2°C/s.

Die DNA wurde anschließend mit 250 µl Ethanol und 10 µl NaAc (3M; pH 5,2) präzipitiert, 30 min bei 14.000x g zentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut 20 min bei 14.000x g zentrifugiert und das Sediment im Exsikkator getrocknet. Dem DNA-Pellet wurden nachfolgend 20 µl *template suppression reagent* zugesetzt, die Lösung 3 min auf 90°C erwärmt, auf Eis abgekühlt und anschließend in spezielle 0,5 ml-Gefäße mit Septen überführt.

2.2.13 Konstruktion der Expressionsplasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden die fünf potenziellen *cda*-Gene des *open reading frame*, welche sich durch fünf mögliche Startcodons unterscheiden in *E.coli* als Fusionsproteine des Maltose-Bindungs-Proteins (MBP) (Kapust und Waugh, 1999) bzw. *Strep-TagII* (Schmidt, 1996; Skerra, 1999, Skerra, 2000) exprimiert.

Die Klonierungsstrategie für die Insertion in den Vektor pASK-IBA7 sah die Einführung von *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen *up-* und *downstream* des größten *cda*-Gens vor. Der so erhaltene Vektor pASK-IBA7-*cda* besaß ein unter der Kontrolle eines *tet*-Promotors stehendes *cda*-Gen mit N-terminalem *Strep-TagII* Fusionsprotein. Die vier kürzeren Startcodon-Varianten des *cda*-Gens wurden mittels gerichteter Deletions-PCR erzeugt.

Das *cda*-Gen mit Startcodon 5 (s.a. 3.3.1) wurde in den Vektor pKK233-2 (Fa. Invitrogen) durch Insertion von *NcoI* und *HindIII*-Restriktionsschnittstellen, welche das Gen flankieren, kloniert. Die Expression unterliegt der Kontrolle eines *trc*-Promotors. Da der Vektor pKK233-2 keine *Strep-TagII*-Sequenz besitzt, wurde das Plasmid mittels gerichteter Insertions-PCR N- bzw. C-terminal des Chitindeacetylasegens mit solchen Sequenzen versehen.

Die Klonierung des *cda*-Gen mit Startcodon 5 in den Vektor pMAL-c2G (Fa. New England Biolabs) erfolgte ebenfalls über *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen. Die CDA wurde so mit einem N-terminalen MBP-Fusionsanteil unter Kontrolle eines *trc*-Promotors exprimiert.

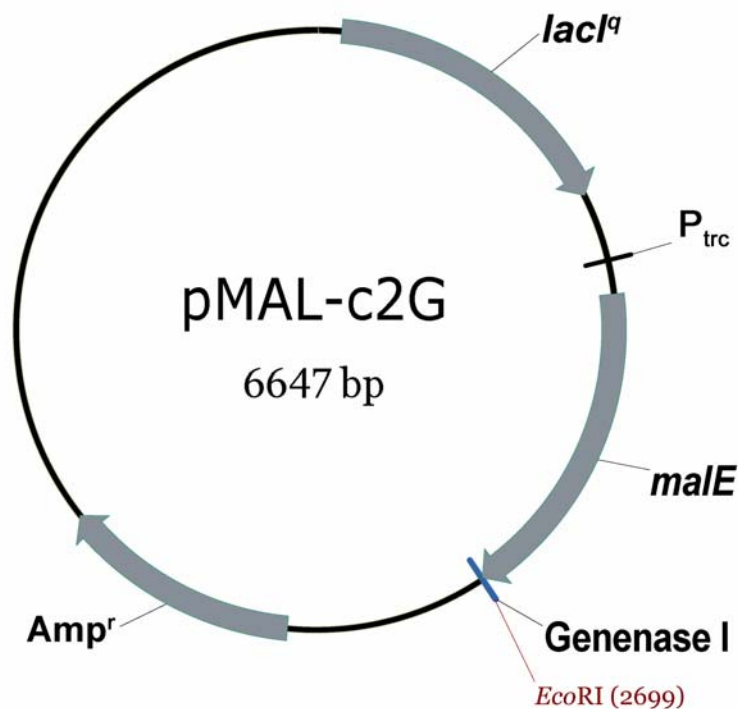


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Expressionsplasmides pMAL-c2G.

2.3 Expression der CDA in *E.coli*

2.3.1 Fermentation

Vorkulturen wurden bei 37°C unter ständigem Schütteln (300 rpm) in ampicillinhaltigem (100 µg Ampicillin/ml) 2x YT-Medium im Schüttelinkubator angezogen. Jeweils 500 ml 2x YT Medium (100 µg Ampicillin/ml) wurden in 2 l Kolben mit der Vorkultur im Verhältnis 1:50 angeimpft. Bei der Expression des MBP-CDA Fusionsproteins wurde dem Medium 2 g/l Glucose zugesetzt. Bei einer optischen Dichte OD_{600nm} von 0,5 - 0,6 wurde die Expression induziert. Die Induktion erfolgte abhängig vom verwendeten Expressionsvektor.

Expressionsvektor	Promotor	Induktor	Verwendeter <i>E.coli</i> -Stamm
pASK-IBA7	<i>tet</i>	200 µg/l AHT	BL21(D3)
pKK233-2	<i>trc</i>	50 µM IPTG	BL21(D3)
pMAL-c2G	<i>trc</i>	300 µM IPTG	TB1

Tabelle 2-3: Übersicht und Eigenschaften der verwendeten Expressionsplasmide.

Die Fermentation wurde nach ca. 4 h oder Erreichen einer konstanten OD_{600nm} beendet. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (JA14; 6.000 rpm) geerntet. Bis zur Aufarbeitung wurden die vereinigten Bakterienpellets bei -20°C gelagert.

2.3.2 Aufschluss der *E.coli* durch Ultraschallbehandlung

Bei der Produktion von rekombinanten Proteinen in prokaryotischen Systemen kann das erzeugte Protein entweder löslich oder aber auf Grund der hohen Proteinexpressionsraten in Form von unlöslichen, nicht kristallinen Aggregaten im Cytoplasma vorliegen. Zur Gewinnung von löslich exprimierten Proteinen, wurde das Bakterienpellet in 10 ml Puffer (100 mM NaPP; pH 7,0) pro g Zellennassgewicht resuspendiert. Es schloss sich eine Ultraschallbehandlung (6x 15 s, permanenter Puls, max. Amplitude) auf Eis an. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (10.000x g für 30 min bei 4°C) pelletiert.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

1. Mikroassay nach *Bradford*

Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden durch Bindung des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue R 250* (Fa. Merck) nach der Methode von *Bradford (1976)* bestimmt. Die Quantifizierung des gebildeten farbigen Komplexes erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm. Proteinkonzentrationen im Bereich von 1 µg - 20 µg Protein/ml

weisen eine direkte Proportionalität zwischen Konzentration und Extinktion auf. Der Mikroassay (1 ml Volumen) wurde als Fertiglösung von der Firma BioRad bezogen.

2. Bestimmung nach *Christian* und *Warburg*

Diese Methode basiert auf der Absorption von Tryptophan- und Tyrosin-Resten bei 280nm. Bei der Proteinbestimmung nach *Christian* und *Warburg* wird die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm und 260 nm gemessen. Aus den gemessenen Absorptionen wird dann die Proteinkonzentration nach folgender Formel bestimmt:

$$1,56 \cdot OD_{280} - 0,76 \cdot OD_{260} = \frac{mg \text{ Protein}}{ml}$$

2.4.2 Aufkonzentration und Umpufferung von Proteinlösungen

Zur Aufkonzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen bis zu einem Volumen von 500 µl wurden Microcon YM-3-Zentrifugationssäulen und für größere Volumina Ultrafree-CL-Zentrifugationssäulen der Firma Amicon nach Maßgabe des Herstellers verwendet.

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zusammensetzung	Sammelgel 5 %ig	Trenngel 15 %ig
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (29,22 %/ 0,78 %)	0,5 ml	4 ml
Wasser	1,65 ml	2 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	0,7 ml	-
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	-	2 ml
10 % APS	50 µl	100 µl
TEMED	2 µl	5 µl

Tabelle 2-4: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel bei der SDS-PAGE.

Die Elektrophorese erfolgte in Elektrodenpuffer bei Stromstärken von 15 mA im Sammelgel und 25 mA im Trenngel. Zur Größenbestimmung der Proteine wurden Molekulargewichtsmarker der Firma BioRad verwendet.

Anschließend wurden die Gele entweder zur Westernblotanalyse verwendet oder angefärbt. Dazu wurden die Gele 20 min in *Coomassie*-Färbelösung in der Mikrowelle auf kleinster Stufe erwärmt und anschließend in *Coomassie*-Entfärbelösung bei RT entfärbt.

2.4.4 Westernblot und Immunfärbung

Nach einer von *Burnette (1981)* entwickelten Methode konnten Proteine nach SDS-PAGE elektrophoretisch auf Nitrocellulose transferiert werden. Dies erlaubt den spezifischen Nachweis mittels mono- oder polyklonalen Antikörpern. In dem hier verwendeten *Semi-Dry-Blot* Verfahren wird Whatman-Filterpapier, das Gel und die Membran in Transferpuffer äquilibriert und anschließend als "Sandwich" in die Blotapparatur (Fa. BioRad) luftblasenfrei eingelegt.



Abbildung 2-2: Aufbau des *Semi-Dry-Blotssandwichs*.

Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei einer Stromdichte von 2 mA/cm^2 für 60 min. Zur Kontrolle des Transfererfolges wurden die an Nitrocellulose gebundenen Proteine reversibel mit *Ponceau S*-Färbelösung (Fa. Sigma) sichtbar gemacht.

Zum immunchemischen Nachweis wurden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch 2 % (w/v) BSA in TBST 60 min abgesättigt. Der Blot wurde dreimal mit TBST gewaschen. Wurde als Antikörper *Anti-Strep-Tactin AP-conjugate* verwendet, so wurde der Blot vor Antikörperzugabe 10 min in 10 ml TBST mit $2 \mu\text{g/ml}$ Avidin inkubiert, um unspezifische Bindung durch *Biotin Carboxyl Carrier Protein* (BCCP) zu unterbinden. Der Primärantikörper (s. 2.1.10) wurde in TBST verdünnt (1:1.000) und der Blot unter Schwenken 60 min mit dem Antikörper inkubiert. Danach wurde dreimal 5 min mit 20 ml TBST gewaschen. Bei Verwendung von *Anti-Strep-Tactin AP-conjugate* schloss sich unmittelbar die Färbereaktion an. Andernfalls wurde der Blot mit einem mit alkalischer Phosphatase konjugiertem sekundären Antikörper 60 min unter Schütteln inkubiert. Es schloss sich eine dreimalige Waschung des Blots mit 20 ml TBST an. Zur pH-Äquilibrierung des Blots wurde dieser einmal mit 20 ml AP-Puffer gewaschen. Die Färbereaktion wurde mit NBT/BCIP-Färbelösung (Fa. Roche) in AP-Puffer durchgeführt. Durch mehrmaliges Waschen mit Wasser wurde die Färbereaktion beendet. Die Blots wurden zur Dokumentation fotografiert und danach getrocknet.

2.4.5 Herstellung von kolloidalem Chitin

Um die einzelnen Chitinketten dem Enzym besser zugänglich zu machen, kann die kristalline Struktur der Chitinfibrillen durch Säurebehandlung aufgebrochen werden. Die dabei vergrößerte Oberfläche soll zu einer höheren Deacetylierungseffizienz führen.

Zur Präparation wurden 10 g kristallines Chitin bei RT in 80 ml konz. HCl mehrere Stunden gerührt. Dann wurde die Lösung über eine Glasfritte filtriert und das Filtrat in *aqua dest.* (400 ml) eingetropft. Das Chitin fiel dabei aus und wurde durch Waschen mit Wasser neutralisiert. Das nun kolloidale Chitin wurde zentrifugiert und getrocknet.

2.4.6 **Aufreinigung der CDA als MBP-Fusionsprotein**

Alle zur Affinitätschromatographie eingesetzten Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm PVDF-Filter der Fa. Millipore). Die Aufreinigung der rekombinant hergestellten CDA erfolgte aus der löslichen Cytosolfraction (s. 2.3.2). Die Chromatographieläufe wurden an einem „Econo System“ (Fa. BioRad) durchgeführt und bei 280 nm verfolgt. Die Lagerung der CDA-Präparationen erfolgte bei 4°C.

Die Aufreinigung des MBP-Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe einer Amylose-Säule (Fa. New England Biolabs, Säulenvolumen (V_0) = 20 ml) bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min bei 4°C. Der cytosolische Überstand aus dem Zellaufschluss (s. 2.3.2) wurde vor der Chromatographie sterilfiltriert, um ein Verstopfen der Säule zu verhindern. Die Amylose-Säule wurde mit 8 V_0 Puffer (100 mM NaPP, 0,1 % n-Octyl-β-D-Glucopyranosid; pH 7,0) äquilibriert. Der cytosolische Überstand wurde 1:5 mit Puffer verdünnt und auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 12 V_0 Puffer gewaschen. Das gereinigte Fusionsprotein wurde mit 10 mM Maltose in Puffer eluiert. Die Regeneration der Säule wurde mit 3 V_0 Wasser, 1 V_0 0,1 % SDS, 1 V_0 Wasser und 3 V_0 Puffer durchgeführt.

Proteinfractionen wurden gepoolt und auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Der MBP-Fusionsanteil des Proteins wurde mit *Genenase I* (Fa. New England Biolabs) von der CDA abgeschnitten (*Carter und Wells, 1987; Carter, 1989*). Hierzu wurde *Genenase I* mit einer finalen Konzentration von 10 µg/ml für 16 h bei RT mit dem Fusionsprotein inkubiert.

Die Separierung der CDA vom MBP erfolgte in zwei Schritten. Zum Entfernen der Maltose wurden 3 g Hydroxylapatit (Fa. Sigma) in 20 mM NaPP, 200 mM NaCl, pH 7,2 resuspendiert und in eine XK 16/20 Säule (Fa. Pharmacia, Säulenvolumen (V_0) = 5ml) gegeben und mit 15 V_0 Puffer (20 mM NaPP, 200 mM NaCl, pH 7,2) äquilibriert. Die Chromatographie fand bei RT und einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min statt. Das geschnittene Fusionsprotein wurde auf die Säule gegeben und mit 80 ml Puffer gewaschen. Eluiert wurden die Proteine mit 0,5 M NaPP, pH 7,2.

Die geschnittene Chitindeacetylase wurde durch wiederholte Chromatographie über eine Amylosesäule wie zuvor beschrieben vom Fusionsprotein MBP separiert. Die geschnittene CDA floss durch die Säule, während das MBP an der Amylose gebunden wurde.

2.4.7 Aufreinigung der CDA als *Strep-TagII*-Fusionsprotein

Alle zur Affinitätschromatographie eingesetzten Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm PVDF-Filter der Fa. Millipore). Die Präparation der löslichen cytosolischen Fraktion erfolgte wie unter 2.3.2 beschrieben. Die Chromatographieläufe erfolgten mit einer *Strep-Tactin*-Sephacrose-Säule (Fa. IBA, Säulenvolumen (V_0) = 1ml) bei 4°C unter Schwerkraftfluss. Die CDA-Präparationen wurden bei 4°C gelagert.

Die Säule wurde mit 2 ml Puffer W (100 mM NaPP, 0,1 % n-Octyl-β-D-Glucopyranosid, pH 7,0) äquilibriert. Der cytosolische Überstand aus dem Zellaufschluss (s. 2.3.2) wurde vor der Chromatographie sterilfiltriert, um ein Verstopfen der Säule zu verhindern. Außerdem wurde der Überstand mit einer finalen Konzentration von 10 µg/ml Avidin 30 min auf Eis inkubiert, um eine unspezifische Bindung an die *Strep-Tactin* Sepharose zu vermeiden.

Nach dem Auftragen des Überstands wurde die Säule mit 5 ml Puffer W gewaschen. Die Elution erfolgte durch 6x 0,5 ml Puffer E (100 mM NaPP, 0,1 % n-Octyl-β-D-Glucopyranosid, 2,5 mM Desthiobiotin pH 7,0) Die Regeneration der Säule erfolgte mit 3 V_0 Puffer R (100 mM NaPP, 0,1 % n-Octyl-β-D-Glucopyranosid, 1 mM HABA, pH 7,0) und 2 V_0 Puffer W.

2.4.8 Analytische Gelfiltration

Nach Aufreinigung des MBP-CDA-Fusionsproteins bzw. nach *GenenaseI*-Verdau schloss sich eine analytische Gelfiltration mit dem Ziel an, das Molekulargewicht des nativen Proteins zu bestimmen. Aufgrund unterschiedlicher Retentionszeiten ließ sich klären, ob das Enzym in monomerer oder oligomerer Form vorlag.

Die Gelfiltration erfolgte mittels Superdex 75 bzw. Superdex 200 in K 9/60-Säulen (V_0 = 54 ml; Fa. Amersham Pharmacia Biotech) oder einer BioSil SEC 125 5-Säule (V_0 = 26,5 ml; Fa. BioRad).

Die Säulenmaterialien wurden mit 10 V_0 1 % (w/v) SDS in Wasser, 10 V_0 0,1 M NaOH und 10 V_0 Wasser gereinigt.

Das Injektionsvolumen betrug 100 µl - 500 µl des Eluats der ersten Amylose-Säule bzw. des *GenenaseI*-Verdaus. Als Laufpuffer diente 100 mM NaPP (pH 7,0 mit 0,1 % n-Octyl-β-D-Glucopyranosid). Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Eichung der Säulen erfolgte mittels des Gelfiltrationsstandards der Firma BioRad.

2.4.9 *Reversed-Phase HPLC*

Die RP-HPLC diente der Präparation der nativen CDA-Proben, um sie im MALDI-TOF massenspektrometrisch analysieren zu können.

Verwendet wurde eine Nucleosil C4-Säule der Firma Macherey und Nagel mit $V_0 = 250/4$ mm, einer Porengrösse von 300 Å und einer Partikelgrösse von 10 µm.

Die CDA-Proben wurden mit einem Fluss von 1 ml/min in 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) aufgetragen. Die Elution erfolgte bei 25°C mit einem linearen Gradienten von 0 auf 100 % Acetonitril in 0,1 % TFA über 50 min und mit 1 ml/min. Die Proteinpeaks wurden bei 220 nm detektiert.

Die Läufe wurden mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Reproduktionsmedizin (Prof. Töpfer-Petersen, Tierärztliche Hochschule, Hannover) an einem VP10-System, (Fa. Shimadzu) durchgeführt.

2.5 **Biologische Charakterisierung der CDA**

2.5.1 **Acetat-Freisetzungs-Assay**

Bei der Deacetylierung von N-Acetyl-Glucosaminen wird Acetat in äquimolaren Mengen zu den vorhandenen Acetylgruppen freigesetzt. Durch Bestimmung der Acetat-Menge kann indirekt der durch das Enzym katalysierte Deacetylierungsgrad der Probe bestimmt werden. Der quantitative Nachweis von Acetat erfolgte über ein Enzymtest der Firma Roche nach Vorschrift des Herstellers.

2.6 **Biophysikalische Charakterisierung der CDA**

2.6.1 **MALDI-TOF-Analyse der CDA**

Das Molekulargewicht der aufgereinigten Chitindeacetylase wurde mittels eines MALDI-TOF Massenspektrometers (Kratos kompact Maldi-II, Shimadzu, Kyoto, Japan) im linearen *High-Mass*-Modus bestimmt. Die Spektren wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV und einer Ionisationspannung von 180 mV erhalten. Die Proben wurden nach der Sandwichmethode präpariert (*Kussman, 1997*). Hierzu wurde α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure in 99 % Aceton und 1 % Wasser als Basisschicht verwendet. Von dieser Lösung wurden 0,5 µl auf dem Probenträger eingedunstet. Anschließend wurde 1 µl Proteinlösung der HPLC-Fraktionen mit 0,5 µl α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (Acetonitril und 0,1 % TFA im Verhältnis 1:1) aufgetragen. Nach Verdunsten des Lösungsmittels konnte mit der Messung begonnen werden.

Die Messungen wurden mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Reproduktionsmedizin (Prof. Töpfer-Petersen, Tierärztliche Hochschule, Hannover) durchgeführt.

2.6.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der CDA

Die Experimente wurden mit einem Shimadzu RF 1501 Spektralfluorimeter durchgeführt, das mit einem Magnetrührer ausgestattet war und über einen Flüssigkeitskreislauf beheizt werden konnte. Die Spaltbreite betrug bei Excitations- und Emissionsspektren jeweils 10 nm, mit einer Bestrahlungsdauer von 0,1 s. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. Die Emission wurde in einem Winkel von 90° bei einer Wellenlänge von 334 nm detektiert.

Zur Messung wurde das Enzym mit Startcodon 5 verwendet (s.a. 3.3.1). Hierzu wurde die CDA als CDA-MBP-Fusionsprotein nach Aufreinigung und Separation vom Fusionsanteil eingesetzt. In dieser Form enthält das Enzym drei Tryptophan-Aminosäuren, welche maßgeblich für die intrinsische Fluoreszenz der Probe verantwortlich sind. Die CDA lag in den in Tabelle 2-5 aufgeführten Puffern vor. Aus den gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten wird der Umwandlungsgrad α bestimmt.

1. Cosolvens induzierte Auffaltung

Unter isothermen Bedingungen (20°C) wurde die Auffaltung des Proteins durch Zugabe von 6 M Guanidiniumhydrochlorid (Gdn HCl) in den entsprechenden Puffern (Tabelle 2-5) bis zu einer finalen Konzentration zwischen 0 und 1,5 M gemessen. Das Entfaltungsgleichgewicht stellte sich innerhalb von 5 min ein. Die Messzeit betrug 0,1 s und wurde zehnmal wiederholt und das Ergebnis gemittelt. Die Konzentration der Proben betrug 10 µg/ml.

Puffer	pH	NaCl-Konz. [mM]	sonstige Zusammensetzung
100 mM Tris-HCl	7,0	100	0,1 % (w/v) n-Octyl-β-D-Glucopyranosid
100 mM NaPP	7,0	0	0,1 % (w/v) n-Octyl-β-D-Glucopyranosid
100 mM NaPP	7,0	100	0,1 % (w/v) n-Octyl-β-D-Glucopyranosid
100 mM NaPP	7,0	500	0,1 % (w/v) n-Octyl-β-D-Glucopyranosid

Tabelle 2-5: Zusammensetzung der Puffer, in denen die CDA während der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen vorlag.

2. Thermisch induzierte Auffaltung

Die Auffaltung der Chitindeacetylase wurde durch sukzessive Erhöhung der Temperatur in einem Bereich zwischen 25°C und 60°C erzielt. Dazu wurde die Probenküvette beheizt und die Temperatur mittels eines Digitalthermometers (GTH 1200, Fa. Greising electronics) an

der Küvette ermittelt. Nach Erreichen der jeweiligen Temperatur stellte sich das Entfaltungsgleichgewicht innerhalb von 1 min ein. Die Messzeit betrug 0,1 s, wurde zehnmal wiederholt und das Ergebnis gemittelt. Die Konzentration der Proben betrug 10 µg/ml.

Die verwendeten Puffer sind analog zu denen, die in der Cosolvens induzierten Auffaltung benutzt worden und sind der Tabelle 2-5 zu entnehmen.

2.6.3 Infrarotspektroskopische Bestimmung des Substratdeacetylierungsgrades

Kristallines bzw. kolloidales Chitin aus natürlichen Quellen wie Krabben oder Shrimps weist keine vollständige Acetylierung der Zuckerketten auf. Deshalb ist es notwendig, den Deacetylierungsgrad der Substrate vor der Reaktion zu bestimmen. Darüber hinaus konnte der maximale Grad der Deacetylierung nach enzymatischer Verdau für die einzelnen Substrate bestimmt werden.

Zur Probenpräparation wurden 2 mg Substrat mit 100 mg Kaliumbromid im Mörser vermengt und mit einer *Quick Press*-Apparatur der Firma Perkin Elmer zu einem Pressling verarbeitet. Der Pressling wurde 16 h bei 80°C getrocknet, um Wasser zu entfernen, welches die Messung stört. Die IR-spektroskopische Analyse wurde in einem 1430-Ratio-Recording-IR-Spektrometer der Firma Perkin Elmer in einem Spektralbereich zwischen 200 und 4.000 nm durchgeführt (Sabnis, 1997; Khan, 2002). Die Messungen wurden freundlicherweise von Dipl. Chemiker Bernd Schmiertenknop vom Institut für Umwelttechnik (Prof. Siefert, Fachhochschule Oldenburg-Ostfriesland-Wilhelmshaven) durchgeführt.

2.6.4 1-D-¹H-NMR-spektroskopische Analyse der Substratdeacetylierung

Eindimensionale ¹H-NMR-Spektren der enzymatischen Deacetylierung von Di-N-Acetylchitobiose und Tri-N-Acetylchitotriose wurden bei einer Konzentration von 10 mg/ml Substrat in 0,1 % (w/v) n-Octyl-β-D-Glucopyranosid, 100 mM NaPP, pH 7,0 und einer Temperatur von 27°C in einem Bruker DRX 600 NMR-Spektrometer vermessen. Dazu wurden 100 µl der Probelösung mit 10 µl DMSO-D6 versetzt und in 2 mm NMR-Kapillaren eingeschmolzen. Die Aufnahmen erfolgten bei 600 MHz mit einer Messdauer von 9 µs pro Puls und einer Leistung von 5 dB über eine Aufnahmenweite von 10 ppm. Es wurde eine Wasserunterdrückung durch 2 s Vorsättigung des Signals durchgeführt.

Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung Bio- und Umweltanalytik (Prof. Preiß, Fraunhofer ITEM, Hannover) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Konstruktion verschiedener Expressionsplasmide

Die potenziellen *cda*-Gene des *open reading frame*, welche sich durch fünf mögliche Startcodons unterscheiden, wurden in den Vektor pASK-IBA7 kloniert (Abbildung 3-1). Hierzu wurden *upstream* des ersten Startcodons und *downstream* des Stopcodons des *open reading frame*, mittels Insertions-PCR *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen eingefügt. Als *Template* wurde genomische DNA aus dem marinen Bakterium 99/6 verwendet. Das PCR-Produkt wurde mit *EcoRI* geschnitten und mit dem mit *EcoRI* linearisierten Vektor pASK-IBA7 ligiert. Nach Transformation in *SoloPack*[®] *Gold* wurden die Plasmide der erhaltenen Klone mittels *XhoI*-Restriktionsverdau überprüft.

Durch Deletions-PCR wurden die vier 5'-terminal verkürzten Varianten des Chitindeacetylase-ORF in den Vektor pASK-IBA7 generiert. Die PCR-Produkte wurden ligiert und ebenfalls in *SoloPack*[®] *Gold* transformiert. Die nach Klonierung und Transformation erhaltenen Plasmide wurden mittels *EcoRI*-Restriktionsverdau überprüft.

Eine optimierte Expression und Aufreinigung der Chitindeacetylase sollte durch Klonierung in den Vektor pKK233-2 erreicht werden. Hierzu wurde das Gen der Chitindeacetylase, welches mit Startcodon fünf beginnt, verwendet (Abbildung 3-2). Diese Sequenz wurde gewählt, weil das exprimierte Gen wie unter 3.3.1 beschrieben, die höchste enzymatische Aktivität aufwies.

Mittels Insertions-PCR wurde am 5'-Terminus eine *AflIII*-Restriktionsschnittstelle, welche zur *NcoI*-Schnittstelle des Zielvektors kompatibel ist, sowie am 3'-Terminus eine *HindIII*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Als *Template* diente das Plasmid pASK-IBA7 mit dem *cda*-Gen von Startcodon fünf. Die PCR-*Primer* wurden so gewählt, dass das im Vektor pASK-IBA7 enthaltene *Strep-TagII* *upstream* des *cda*-Gens erhalten blieb. Das PCR-Produkt wurde mit *AflIII* und *HindIII* geschnitten und mit dem mit *NcoI/HindIII* linearisierten Vektor pKK233-2 ligiert und in *SoloPack*[®] *Gold* transformiert. Die nach Klonierung und Transformation erhaltenen Plasmide wurden mittels Kolonie-PCR überprüft.

Die Verwendung eines Fusionsanteils am Protein an Stelle des unmodifizierten, nativen Proteins kann neben Vorteilen, die bei der Aufreinigung und Identifizierung eine Rolle spielen, auch die Faltung bzw. die Expressionsrate des Proteins negativ beeinflussen. Durch eine Deletions-PCR wurde zwischen dem *cda*-Gen und dem *Strep-TagII*-Fusionsanteil ein Bereich entfernt, welcher für eine Faktor-XA-Enterokinasschnittstelle sowie ein Teil der *Multiple Cloning Site* (MCS) kodiert. Insgesamt wurden 33 Basen deletiert, wodurch der Fusionsanteil so klein wie möglich gehalten wurde, aber dennoch eine Aufreinigung des Proteins mit dem *Strep-TagII*-System möglich blieb. Die nach Klonierung und Transformation erhaltenen Plasmide wurden mittels *NcoI/HindIII*-Restriktionsverdau überprüft.

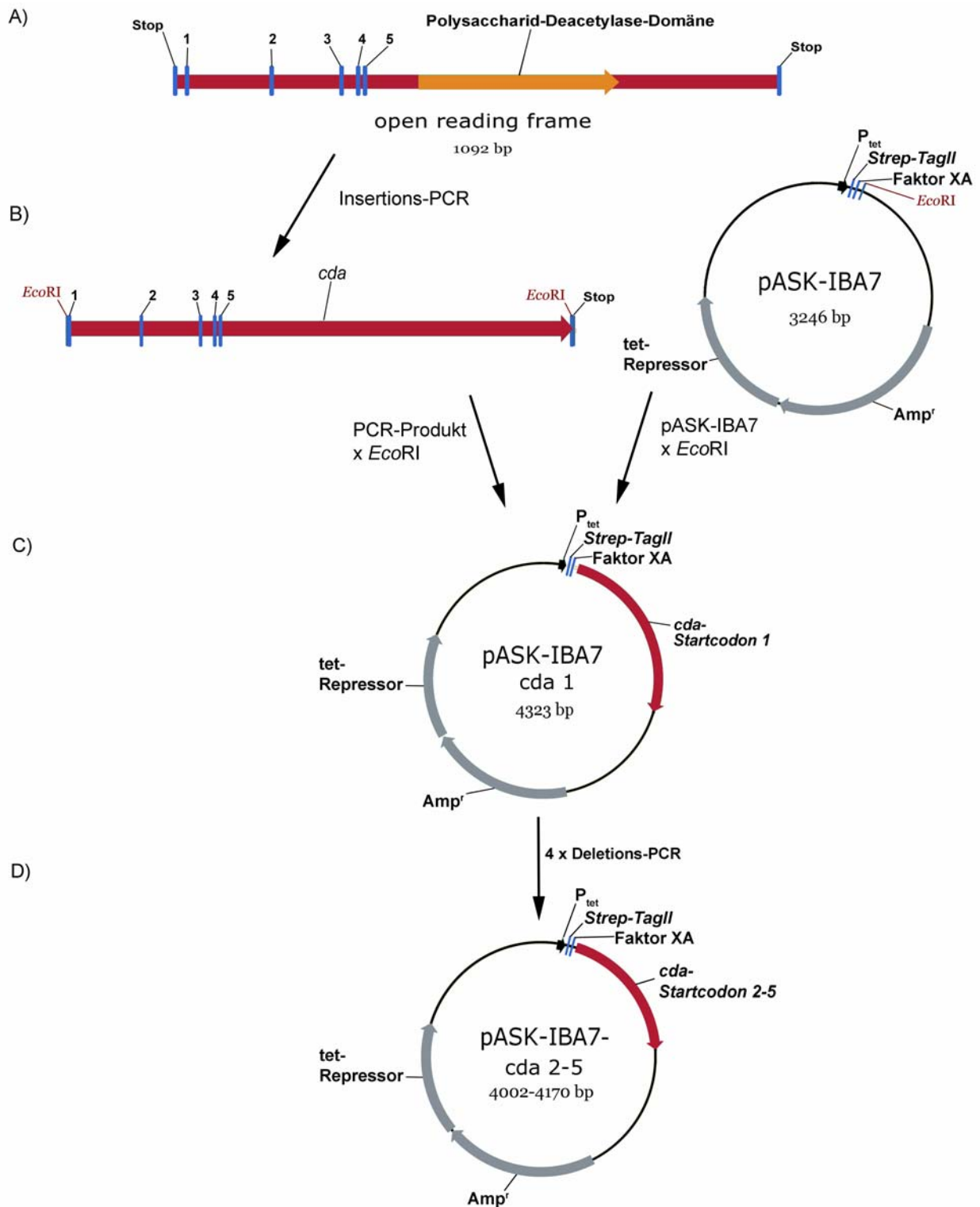


Abbildung 3-1: Klonierungsschema der potenziellen *cda*-Gene in den Vektor pASK-IBA7.

A) *Open reading frame* des *cda*-Gens mit den fünf möglichen Startcodons (1-5). Der konservierte Bereich der Polysaccharid-Deacetylase-Domäne ist markiert.

B) Startcodon 1 mit *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen nach Insertions-PCR und Klonierungsvektor pASK-IBA7.

C) Vektor pASK-IBA7 nach Insertion der *cda* mit Startcodon 1 über *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen.

D) Generierung der vier 5'-terminal verkürzten Varianten der CDA durch Deletions-PCR.

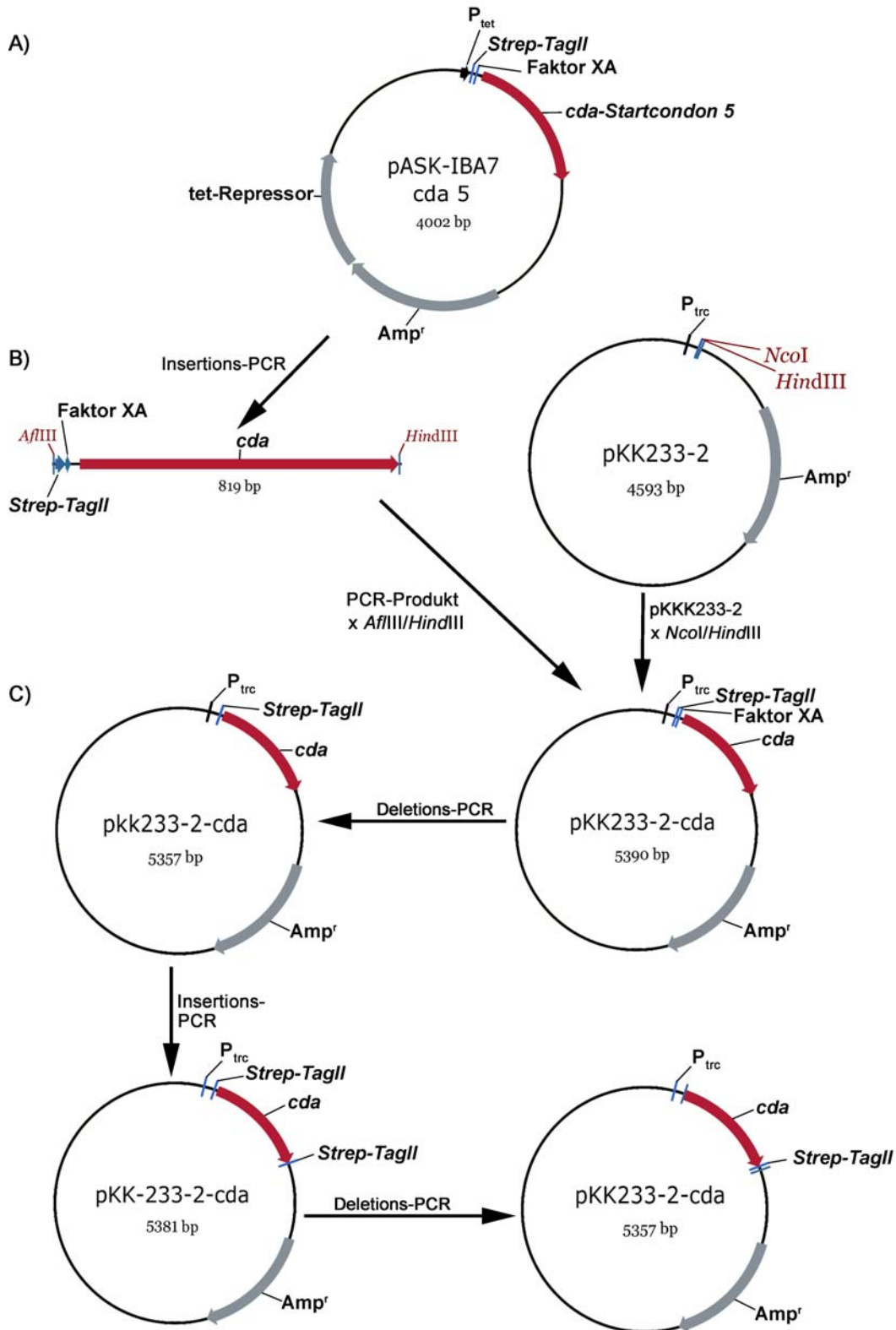


Abbildung 3-2: Klonierungsschema des *cda*-Gens mit Startcodon 5 in den Vektor pKK233-2.

A) Als *Template* für Insertions-PCR dient das Konstrukt pASK-IBA7 mit *cda*, welches ein 5'-terminales *Strep-TagII* aufweist.

B) CDA nach Insertion von *AfIII*- und *HindIII*-Restriktionsschnittstellen und Klonierungsvektor pKK233-2.

C) Herstellung der verschiedenen *Strep-TagII*-Varianten durch Insertions- bzw. Deletions-PCR.

Zur weiteren Expressions- und Aufreinigungsoptimierung wurden mittels Deletions- bzw. Insertions-PCR Varianten des pKK233-2-*cda* mit kombiniertem 5'- und 3'-terminalem bzw. nur 3'-terminalem *Strep-TagII* generiert (Abbildung 3-3). Als PCR-Template diente der zuvor beschriebene Vektor pASK-IBA7-*cda* 5 mit 5'-terminalen *Strep-TagII*. Die nach Klonierung und Transformation erhaltenen Plasmide wurden bei der Doppel-*Strep-TagII*-Variante mittels *Bgl*SI- bzw. bei der 3'-terminalen Variante mit *Nco*I/*Hind*III- Restriktionsverdau überprüft.

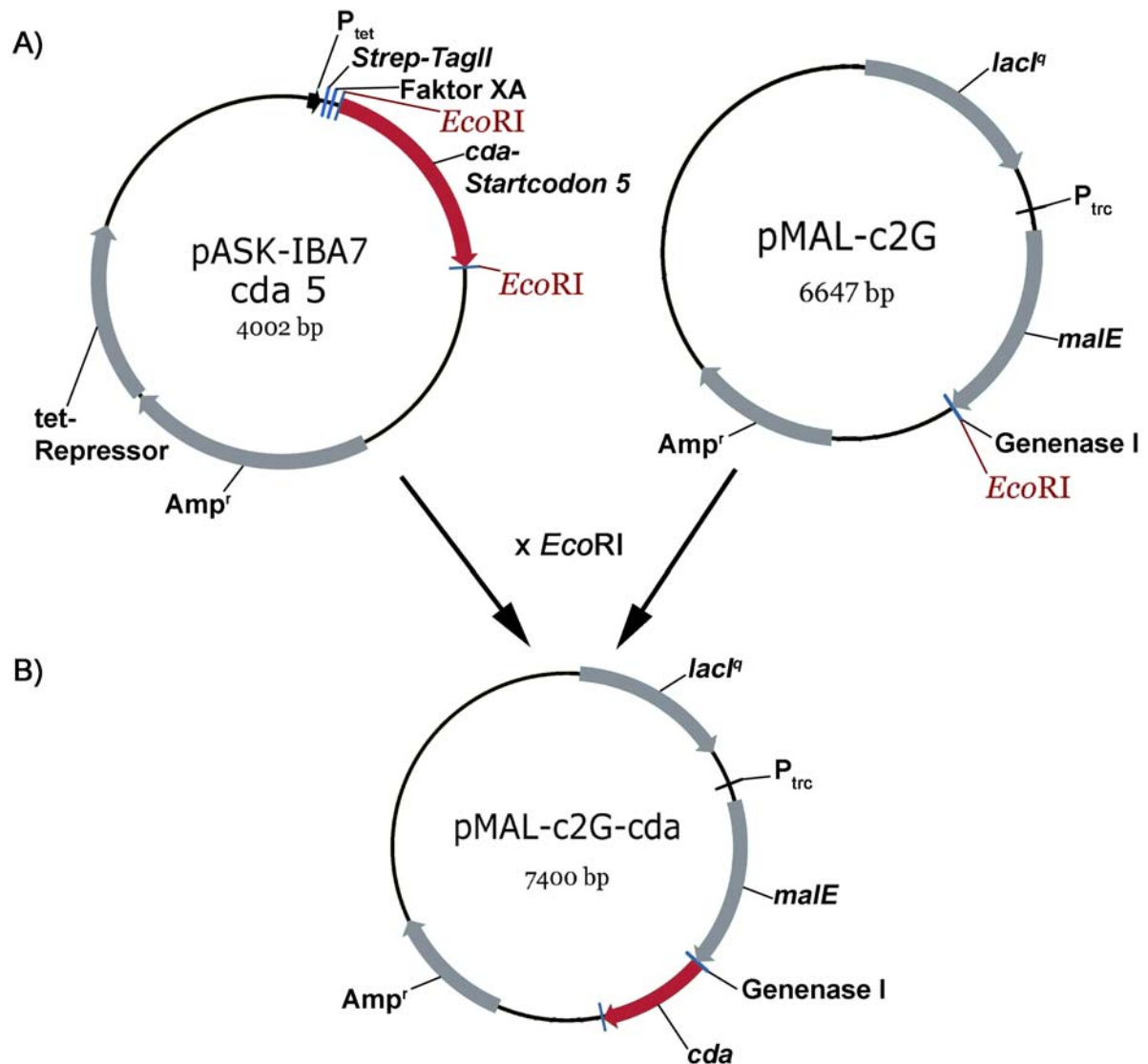


Abbildung 3-3: Klonierungsschema des *cda*-Gens mit Startcodon 5 in den Vektor pMAL-c2G.

- A) Das Gen wird durch *Eco*RI-Verdauung aus dem Konstrukt pASK-IBA7 generiert und in den Zielvektor inseriert.
 B) Vektor pMAL-c2G mit inseriertem *cda*-Gen.

Neben den Plasmidkonstrukten, die das *Strep-TagII*-System verwendeten, wurde das *cda*-Gen, welches mit Startcodon fünf beginnt (s.a. 3.3.1), in den Vektor pMAL-c2G kloniert (Abbildung 3-3). Mit diesem Vektor wurde das klonierte Gen als Fusionsprotein des

N-terminalen Maltose-Bindungs-Proteins (MBP) exprimiert. Die Verwendung dieses Systems ermöglichte die Expression von rekombinanten Proteinen mit erhöhter Löslichkeit (*Kapust und Waugh, 1999*). Die Klonierung erfolgte durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* aus pASK-IBA7-*cda* in den mit *EcoRI* linearisierten Vektor pMAL-c2G. Die nach Klonierung und Transformation erhaltenen Plasmide wurden mittels *BsiWI*-Restriktionsverdau überprüft.

Alle beschriebenen Konstrukte wurden in *SoloPack[®] Gold* transformiert und ihre exakte Sequenz durch Sequenzierung verifiziert.

3.1.1 Expressionsoptimierung

Die verschiedenen Chitinacetylase-*Strep-TagII*-Konstrukte (N-terminal in pASK-IBA7; N- und/oder C-terminal in pKK233-2) wurden in *E.coli* BL21(D3) bzw. JM105 und das N-terminale MBP-CDA-Fusionsprotein (in pMAL-c2G) in *E.coli* TB1 exprimiert. Die Proteinexpression wurde durch SDS-PAGE/*Coomassie*-Färbung und Western Blot Analyse kontrolliert. Zur Kontrolle der Gesamtmenge an rekombinantem Protein wurde nach Induktion alle 60 min ein Aliquot mit einer optischen Dichte von 2,5 OD Einheiten abgenommen. Die Bakterien wurden pelletiert, mit 250 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min aufgekocht. Je 10 µl wurden auf die Gele aufgetragen. Der Einsatz dieser Menge erwies sich für eine Analyse des Gels nach *Coomassie*-Färbung als optimal. Die Gesamt-Proteinmenge setzt sich aus im Cytosol löslichen Protein und unlöslichen Aggregaten, sog. *inclusion bodies* zusammen, welche eine denaturierende Aufarbeitung unumgänglich machen.

Der lösliche Proteinanteil lässt sich i.a. durch Verringerung der Expressionstemperatur und der Induktorkonzentration erhöhen. Eine Kontrolle der so hergestellten Fusionsproteine wurde ebenfalls durch SDS-PAGE und anschließendem Western Blot vorgenommen. Zur Analyse des löslichen Anteils wurden die geernteten Zellen auf Eis mit Ultraschall behandelt und der Überstand nach Zentrifugation mit TCA-Lösung gefällt, in 200 µl PBS aufgenommen und mit 50 µl Probenpuffer versetzt.

Zur Steigerung des löslichen Proteinanteils wurde die Expression bei 25°C durchgeführt. Die maximale Induktion des *tet*-Promotors der pASK-IBA7-Konstrukte erfolgte mit 200 µg/l AHT. Der *trc*-Promotor des pMAL-c2G-Konstrukts wurde maximal mit 300 µM IPTG induziert. Die Verringerung der Induktorkonzentration zeigte bei den pASK-IBA7- und den pMAL-c2G-Konstrukten keine Erhöhung der Löslichkeit. Bereits durch halbmaximale Induktorkonzentrationen wurde in beiden Fällen die Expression völlig unterbunden. Bei Verwendung des Plasmids pKK233-2 war es möglich die Induktorkonzentration von maximal 1mM auf 50 µM IPTG zu vermindern, um den Anteil an löslichem Protein zu erhöhen. Die Ergebnisse dieser Optimierungen sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

Produktion	Minuten nach Induktion						Plasmid-Konstrukt
	0	60	120	180	240	300	
37°C 200 µg/L AHT							pASK-IBA7 <i>Strep-TagII</i> (N-terminal)
25°C 200 µg/L AHT							pASK-IBA7 <i>Strep-TagII</i> (N-terminal)
37°C 1 mM IPTG							pKK233-2 <i>Strep-TagII</i> (N-terminal)
37°C 50 µM IPTG							pKK233-2 <i>Strep-TagII</i> (N-terminal)
25°C 300 µM IPTG							pMAL-C2g <i>MBP</i> (N-terminal)

Tabelle 3-1: Expressionsoptimierung von verschiedenen CDA-Fusionsproteinen. Die Kontrolle erfolgte durch Western Blot Analyse. Gezeigt wird der Einfluss von Induktorkonzentration und Inkubationstemperatur auf die Menge an löslichem Protein.

Da mit der Aufarbeitung von löslichem Enzym die Renaturierung umgangen werden konnte, wurden alle folgenden Proteinpräparationen mit diesem Material durchgeführt.

3.2 Aufreinigung der verschiedenen Protein-Konstrukte

3.2.1 *Strep-TagII*-Konstrukte

Die Aufreinigung aller *Strep-TagII*-Konstrukte erfolgte wie unter 2.4.5 beschrieben. Die Ausbeute an aufgereinigtem Protein aus diesen Konstrukten war relativ gering. Maximal 200 µg Protein pro g Zellnassgewicht wurden erhalten. Die Konzentration des Eluats betrug etwa 30 µg CDA pro ml. Mit der verwendeten *Strep-Tactin*-Säule konnte des Weiteren nur eine Reinheit von etwa 30 % erreicht werden (Abbildung 3-4). Zur Reduktion der Kontamination mit *E.coli*-Proteinen wurden diverse Maßnahmen getroffen, die weitgehend wirkungslos blieben. So wurde u.a. die Ionenstärke durch höhere NaCl-Konzentrationen angehoben, um unspezifische Bindungen an die Säule bzw. an das Protein durch ionische Wechselwirkungen zu verhindern. Die Zugabe von Glutathion zur Reduktion von Disulfidbrücken, die nach dem Zellaufschluss zwischen der CDA und anderen *E.coli*-Proteinen ausgebildet werden können, zeigte ebensowenig einen Effekt wie die Verwendung geringer Mengen SDS.

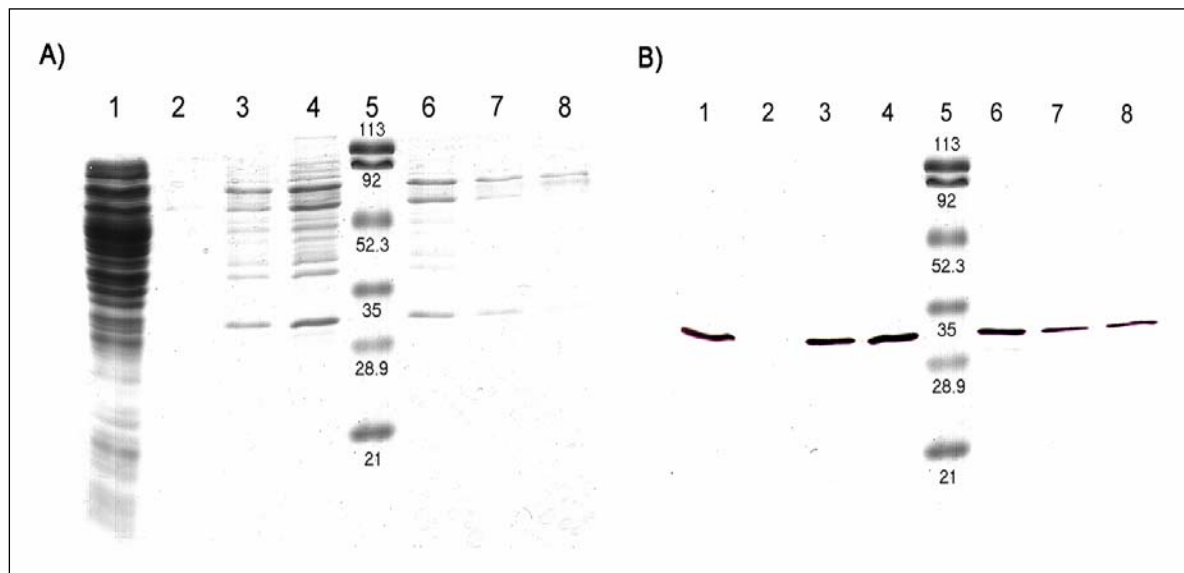


Abbildung 3-4: Aufreinigung der CDA mit Startcodon 5 als N-terminales *Strep-TagII*-Fusionsprotein. Analyse durch A) *Coomassie* gefärbte SDS-PAGE und B) Western-Blot; Aufgetragene Proben in den Spuren: **1:** lösliches, cytosolisches Protein; **2-4** und **6-8:** Elutionsfraktionen der gereinigten CDA (29,5 kDa), eluiert mit 2,5 mM Desthiobiotin, je 10 μ l aufgetragen; **5:** *prestained* LMW-Marker.

Die Verwendung anderer Puffer und die Variierung des pH-Wertes brachten keine merklichen Verbesserungen. Auch die zur Expressions- und Aufreinigungsoptimierung verwendeten *Strep-TagII*-Konstrukte des Vektors pKK233-2 zeigten ähnlich niedrige Ausbeuten, sowie unzureichende Reinheit des Proteins.

Auf eine präparative Gelfiltration wurde verzichtet, da das Protein für den Chromatographieschritt stark aufkonzentriert werden muss. Aufgrund seiner Aggregationsneigung (s. 3.3.8) hätte dies zur weiteren Verringerung der Ausbeute geführt. Außerdem führt die Chromatographie selbst zu einer Ausbeutereduktion.

3.2.2 MBP-Konstrukt

Die Aufreinigung des MBP-CDA-Fusionsproteins erfolgte wie unter 2.4.4 beschrieben. Die Proteinausbeute war deutlich höher, als bei den *Strep-TagII*-Varianten. Bis zu 10 mg aufgereinigtes Fusionsprotein konnte nach der ersten Amylose-Säule aus 1 g Zellnassgewicht gewonnen werden. Die Reinheit nach dem ersten Chromatographieschritt betrug ca. 90 %. Abbildung 3-5 zeigt die SDS-PAGE-Analyse der ersten Amylose-Chromatographie. Das aufgereinigte Protein konnte nun zur biologischen bzw. biophysikalischen Charakterisierung eingesetzt werden.

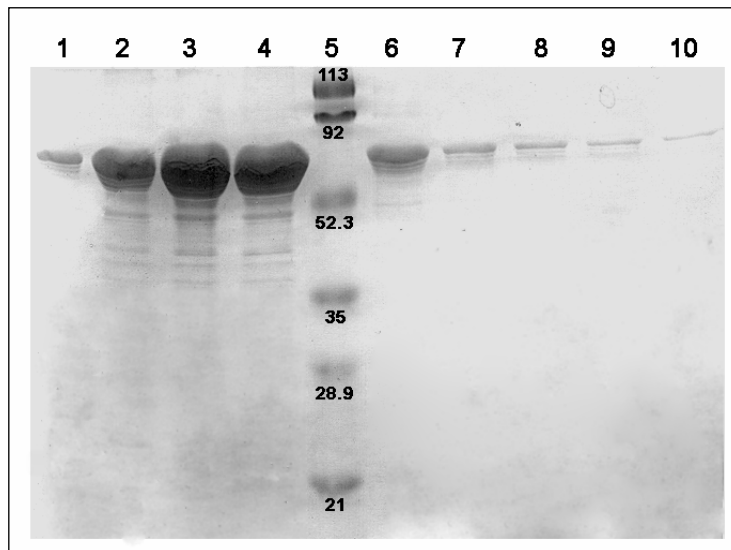


Abbildung 3-5: Aufreinigung der CDA als MBP-CDA-Fusionsprotein. Analyse durch *Coomassie* gefärbte SDS-PAGE; *peak*-Fraktionen (Spuren 1-4 und 6-10) der Elution mit 10 mM Maltose (s. Abb. 3-6), je 10 μ l aufgetragen; 5: *prestained* LMW-Marker.

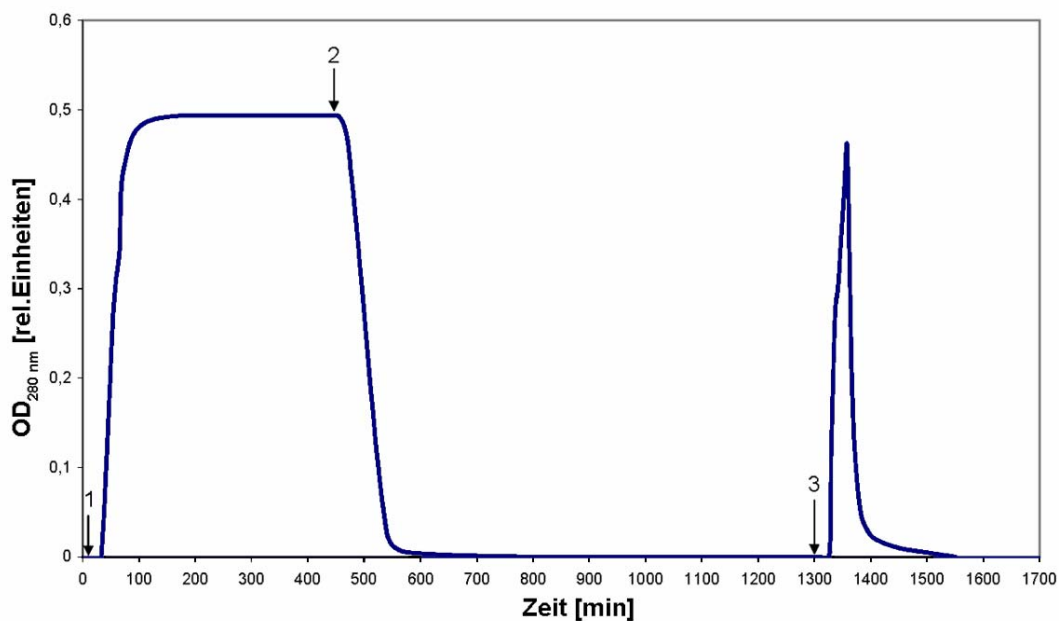


Abbildung 3-6: Chromatogram der Aufreinigung des MBP-CDA-Fusionsproteins. Säulenchromatogram der ersten Amylose Säule; 1: Auftragsbeginn der löslichen cytosolischen Fraktion; 2: Waschen der Säule; 3: Elution mit 10 mM Maltose.

Zur Abspaltung des MBP-Fusionsanteils wurde das Eluat auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml gebracht und mit *Genenase I* mit einer finalen Konzentration von 10 μ g/ml für 16 h bei RT inkubiert. Etwa 80 % des eingesetzten Proteins konnten unter diesen Bedingungen abgespalten werden.

Im nächsten Schritt wurde die Maltose durch Verwendung einer Hydroxy-Apatit-Säule entfernt (Abbildung 3-7). In den *gepoolten peak*-Fraktionen konnten ca. 80 % des eingesetzten Proteins wieder gefunden werden.

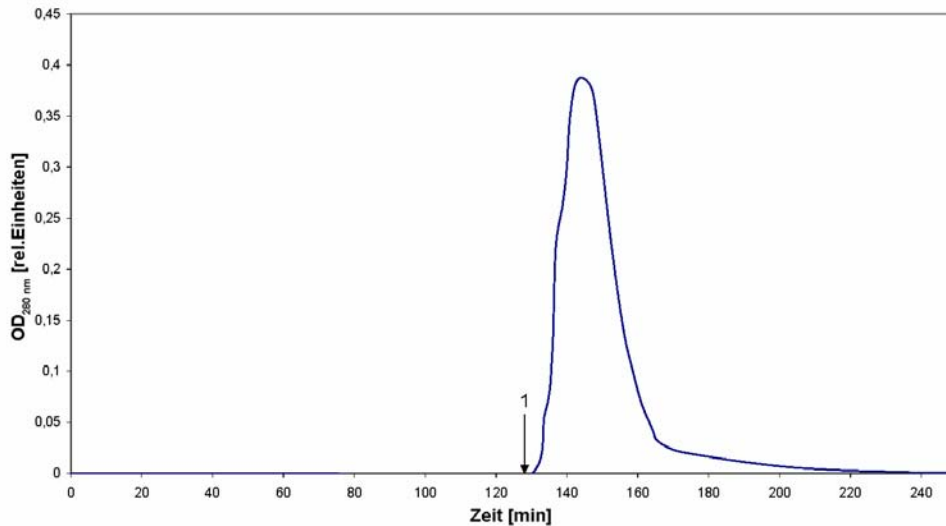


Abbildung 3-7: Elutionsprofil der CDA und des MBP auf der Hydroxyapatit-Säule. 1: Elutionsbeginn mit 500 mM NaPP, pH 7,2.

Ein zweiter Chromatographieschritt mit einer Amylosesäule erfolgte, um das abgeschnittene MBP von der CDA zu separieren. Die Proteinlösung wurde zuvor auf eine Konzentration von 1-1,5 mg/ml aufkonzentriert, um eine zu große Verdünnung durch die Chromatographie zu vermeiden, die zu verringerter Ausbeute führt. Abbildung 3-8 zeigt das Elutionsprofil der zweiten Amylose-Chromatographie.

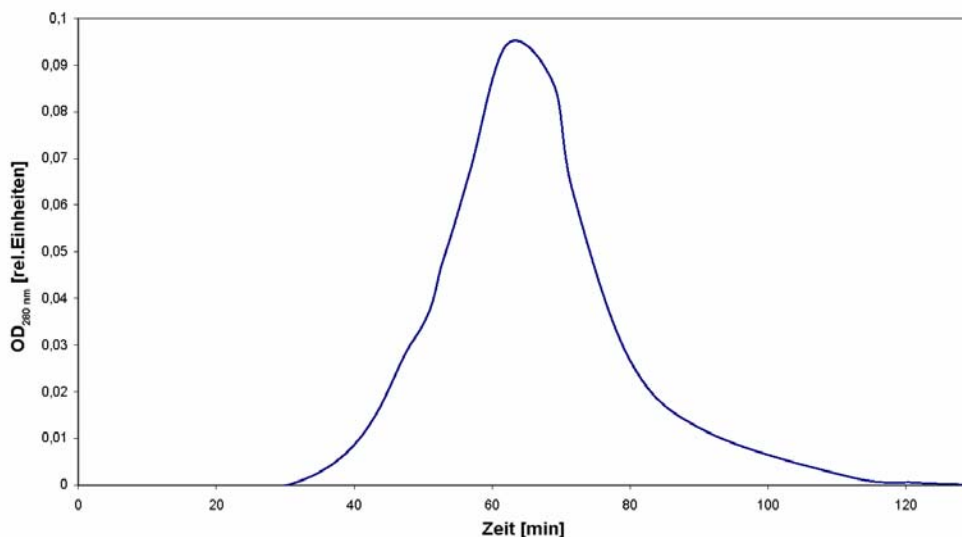


Abbildung 3-8: Chromatogramm der zweiten Amylose-Säule. Die geschnittene CDA befindet sich im Durchfluss, während MBP an die Säule gebunden bleibt.

Die dabei erhaltene CDA hatte einen Reinheitsgrad von etwa 90 % und lag in Form des nativen Proteins vor. Die Konzentration betrug etwa 50-200 µg/ml. Abbildung 3-9 zeigt die

SDS-PAGE-Analyse der MBP-Abtrennung. Aufgrund der erzielten Reinheit, wurde auf eine präparative Gelfiltration verzichtet.

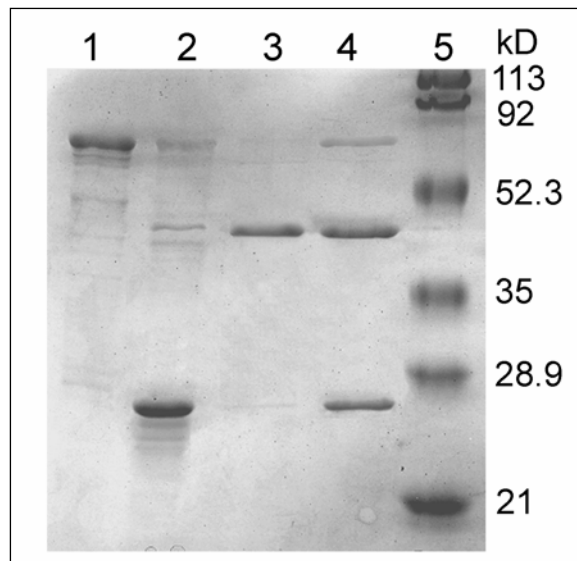


Abbildung 3-9: SDS-PAGE der CDA-Abtrennung vom MBP-Fusionsprotein. 1: MBP-CDA-Fusionsprotein (69,9 kDa); 2: gereinigte, native CDA (27,3 kDa); 3: abgeschnittenes und separiertes MBP (42,6 kDa); 4: CDA (27,3 kDa) und MBP (42,6 kDa) nach *GeneseeI*-Verdau; 5: *prestained* LMW-Marker.

Die Reinheit des Proteins wurde jeweils mittels SDS-PAGE/*Coomassie*-Färbung und anschließender Analyse mit dem Programm *Scion-Image 4.02* (Fa. Scion) bestimmt. Die Bilanzierung in Tabelle 3-2 bezieht sich auf jeweils 1 g Zellnassgewicht.

Aufarbeitungs-Stufe	Protein-Konz. [mg/ml]	Menge [mg]	Ausbeute (gesamt) CDA [%]
1. Amylose-Säule	0,3-2,5	10	100
<i>GeneseeI</i>-Verdau	1,0	10	80 (80)
Hydroxy-Apatit-Säule	0,5-1,5	8,0	80 (64)
2. Amylose-Säule	0,05-0,2	2,3	90 (58)

Tabelle 3-2: Bilanzierung der Aufreinigung der CDA als MBP-Fusionsprotein.

3.3 Biologische Charakterisierung der CDA

Unter Verwendung des Acetat-Freisetzungssassays der Firma Roche konnte das bei der Substratdeacetylierung entstehende Acetat quantifiziert werden. Als Substrat wurden u.a. lösliche N-Acetylchitooligomere mit einer Kettenlänge von 1-6 GlcNAc-Untereinheiten benutzt. Des Weiteren wurden kristallines bzw. kolloidales Chitin aus Krabben, Tintenfisch, und Shrimps verwendet.

Als Modellsubstrat wurde Di-N-Acetylchitobiose verwendet. Vorteilhaft gegenüber länger-kettigen Substraten und festem Chitin war vor allem die hohe Löslichkeit in wässrigen Puffersystemen. Außerdem wurde mit Di-N-Acetylchitobiose die höchste enzymatische Aktivität aller eingesetzten Substrate erreicht. Die Untersuchungen wurden, wenn es nicht anders angegeben ist, bei 25°C in 100 mM NaPP, pH 7,0 mit 0,1 % n-Octyl- β -D-Glucopyranosid als Stabilisator und 23,6 mM Di-N-Acetylchitobiose als Substrat durchgeführt, was 47,2 mM Acetyläquivalenten entspricht. Gemessen wurde die relative maximale Umsatzgeschwindigkeit (s.a. 3.3.6), bei der die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes einen konstanten Wert hatte. Die eingesetzte Enzymmenge betrug, bezogen auf abspaltbare Acetylgruppen, 12,6 pkat (s. auch Tabelle 3-3). Wie unter 3.3.2 beschrieben, haben weder *Strep-TagII*- noch das MBP-Fusionsprotein signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität. Bis auf das Material für den Aktivitätsvergleich der fünf Proteine mit unterschiedlichen Startcodons des *open reading frame* (s.a. 3.3.1), wurden für alle weiteren biologischen Untersuchungen sowohl Enzym mit *Strep-TagII*, MBP als auch natives Enzym ohne Fusionanteil verwendet.

3.3.1 Aktivitätsvergleich der fünf exprimierten Proteine des *open reading frame*

Die Präparationen der fünf Konstrukte erfolgten ausschließlich als *Strep-TagII*-Fusionsproteine aus dem Vektor pASK-IBA7. Abbildung 3-10 zeigt deutlich, dass allein das Enzym, welches mit Startcodon fünf beginnt, signifikante Chitindeacetylaseaktivität aufweist.

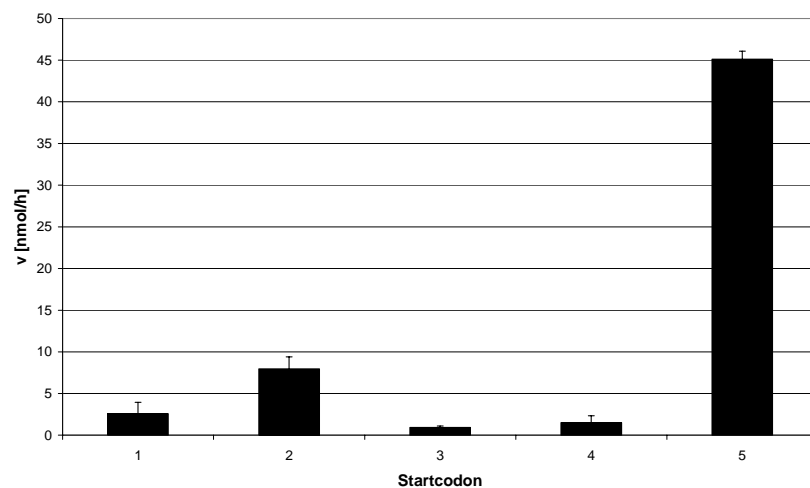


Abbildung 3-10: Vergleich der enzymatischen Aktivität der fünf exprimierten Proteine des ORF. Verwendet wurde Protein mit N-terminalem *Strep-TagII* aus dem Expressionsvektor pASK-IBA-7.

Veränderungen des pH-Wertes bzw. die Verwendung anderer Puffer oder Substrate zeigten das gleiche Ergebnis. Aufgrund dieser Resultate wurde im weiteren Verlauf der Charakterisierung nur das Enzym, welches mit Startcodon 5 beginnt, verwendet und als CDA bezeichnet.

3.3.2 Enzymkinetik

Zur Ermittlung der Enzymkinetik wurden 23,6 mM Di-N-Acetylchitobiose als Substrat in 100 mM NaPP, pH 7,0 mit 0,1 % n-Octyl- β -D-Glucopyranosid als Stabilisator verwendet (Abbildung 3-11, Kurve \blacklozenge). Hier ist zu erkennen, dass die höchste Enzymgeschwindigkeit von 45 nmol abgespaltener Acetylgruppen pro Stunde erst nach 48 h erreicht wird. Der Kurvenverlauf zeigt zu Beginn eine ausgeprägte Verzögerungsphase (*lag*-Phase) mit nur geringem Umsatz (*pre steady state* Phase). Daran schließt sich eine Fließgleichgewichtsphase (*steady state* Phase) an, in der die höchste Geschwindigkeit erreicht wird und die Steigung der Kurve am größten ist. Nach etwa 96 h verflacht der Kurvenverlauf aufgrund Substraterschöpfung.

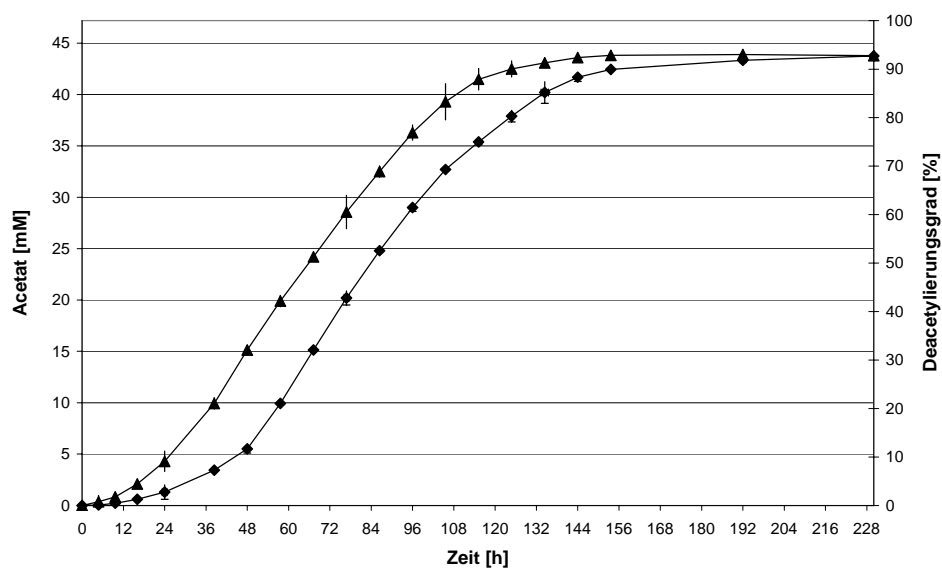


Abbildung 3-11: Reaktionskinetik der CDA bei der Deacetylierung von Di-N-Acetylchitobiose.

Wurde dem Ansatz 2,3 mM Chitobiose zugesetzt, war eine signifikant kürzere Verzögerungsphase zu beobachten (Abbildung 3-11, Kurve \blacktriangle). Die maximale Umsatzgeschwindigkeit wurde hier schon nach etwa 16 h mit ebenfalls 45 nmol/h umgesetzter Acetylgruppen erreicht. Die Menge an zugesetztem Produkt entspricht dabei der Menge, die am Beginn der *steady state* Phase vorliegt. Der weitere Kinetikverlauf war analog zu dem Ansatz ohne Chitobiosezugabe. Durch höhere Chitobiose-Konzentrationen wurde keine weitere Verkürzung der *lag*-Phase erzielt. Weder die Zugabe verschiedener Acetat-Konzentrationen noch die Erhöhung der Enzymkonzentration, zeigten einen Effekt.

Hierdurch ergibt sich bei Verwendung von 23,6 mM N-Acetylchitobiose als Substrat die relative spezifische Aktivität des nativen Enzyms von 2,16 nkat/mg, bezogen auf ein

monomeres CDA-Molekül (s. auch 3.4.1). Dabei werden statistisch 3,48 Acetylgruppen von einem CDA-Monomer pro Minute deacetyliert.

Der Verlauf der enzymatischen Reaktion bei allen Substraten verlief ähnlich zu der in Abbildung 3-11 (Kurve \blacklozenge) dargestellten. Die jeweiligen spezifischen Aktivitäten sind unter 3.3.3 aufgeführt. Auf eine Untersuchung des Einflusses von völlig oder teilweise deacetyliertem längerem Substrat auf die Verkürzung der *lag*-Phase wurde verzichtet. Kristallines oder kolloidales Chitin aus Krabben, Shrimps oder Tintenfisch, welches bereits teilweise deacetyliert vorliegt (s.a. 3.4.5.), wies keine kürzere Verzögerungsphase auf.

3.3.3 Substratspezifität

Das Enzym hat ein breites Substratspektrum. Die Deacetylierung von verschiedenen Chitinsubstraten, wie löslichen N-Acetylchitooligomeren mit einer Kettenlänge von 2-6 GlcNAc-Untereinheiten, sowie mehreren kristallinen bzw. kolloidalen Substraten, läuft mit unterschiedlich großer Geschwindigkeit ab. Die höchste Geschwindigkeit, und somit die größte spezifische Aktivität, wird mit Di-N-Acetylchitobiose erzielt und sinkt bei längeren Ketten. Wie bereits erwähnt, ist dies ein Grund weshalb Di-N-Acetylchitobiose als Modells substrat für die Charakterisierung verwendet wurde.

Substrat	Substrat-Konz. [g/l]	Spezifische Aktivität pro CDA-Monomer [nkat/mg]	Deacetylierungs-Differenz [%]	max. Deacetylierungsgrad [%]
GlcNAc	10,43	0	0	0
(GlcNAc)₂	10,01	2,16	92	92
(GlcNAc)₃	9,85	1,16	89	89
(GlcNAc)₄	9,80	1,05	91	91
(GlcNAc)₅	9,75	0,96	87	87
(GlcNAc)₆	9,72	1,00	84	84
Glycolchitin	10,25	0	0	0
Krabbenchitin (kristallin)	16,08	1,53	14,1	45,5
Krabbenchitin (kolloidal)	15,55	1,49	16,9	45,0
Tintenfischchitin (kolloidal)	14,71	1,14	10,4	41,6
Shrimpschitin (kristallin)	14,08	0,75	3,2	31,2

Tabelle 3-3: Vergleich der Deacetylierung von verschiedenen Chitin-Substraten. Die CDA wurde in einer Konzentration von 2,4 mM (bezogen auf die monomere Form) bei RT in 100 mM NaPP, 0,1 % n-Octyl- β -D-Glucopyranosid, pH 7,0, inkubiert.

Wenn lösliche N-Acetylchitooligomere als Substrat verwendet wurden, betrug die Differenz abgespaltener Acetylgruppen nach enzymatischer Deacetylierung maximal 92 % gegenüber dem Edukt. Das entspricht dem Deacetylierungsgrad, da das Edukt vollständig acetyliert vorliegt.

Bei kristallinem Chitin beträgt der Deacetylierungsgrad des eingesetzten Edukts jedoch bereits zwischen 25 und 40 %. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurde die Menge Chitin eingesetzt, die 47,2 mM deacetylierbaren Acetylgruppen entspricht. Der Deacetylierungsgrad des Edukts wurde wie unter 3.4.6 beschrieben mittels Infrarotspektroskopie bestimmt. Die Deacetylierungsdifferenz vor und nach der Reaktion betrug maximal 16,9 % bei kolloidalem Krabbenchitin, was einer Erhöhung des Deacetylierungsgrades von 35,7 % auf 45,0 % entsprach.

3.3.4 Einfluss von Puffern und anderen Agenzien auf die Umsatzgeschwindigkeit

Die Aktivität der Chitindeacetylase ist stark vom verwendeten Puffer abhängig. Neben dem pH-Wert ist vor allem die Pufferzusammensetzung von entscheidender Bedeutung für die optimale Substratumsetzung. Verschiedene Puffer im pH-Bereich zwischen 3,0 bis 9,0 wurden bei Konzentrationen von 50, 100 und 200 mM bei 25°C untersucht. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms wird nur in Gegenwart von Phosphationen erreicht. Abbildung 3-12 zeigt die Pufferabhängigkeit bei Verwendung von jeweils 100 mM Pufferlösungen bei pH 7,0. Deutlich zu erkennen ist die Aktivitätssteigerung bei Anwesenheit von Phosphationen. Eine höhere Konzentration führte zu keiner weiteren Aktivitätssteigerung, so dass 100 mM NaPP standardmäßig verwendet wurde.

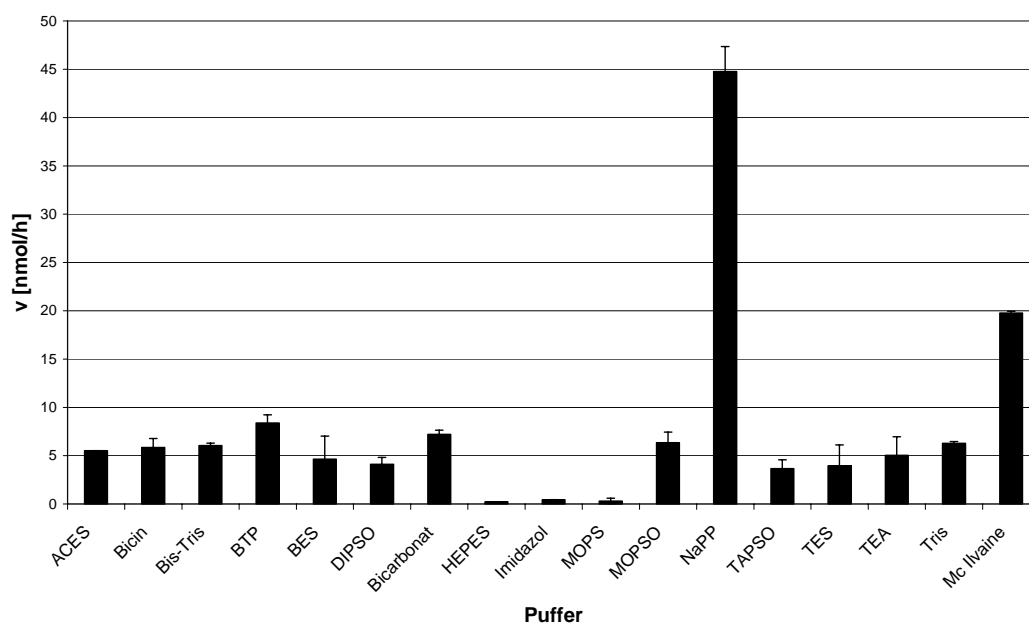


Abbildung 3-12: Enzymatische Aktivität bei Verwendung unterschiedlicher Puffer. Die Konzentration beträgt jeweils 100 mM (McIlvaine: 100 mM Citrat, 200 mM Na₂HPO₄) bei pH 7,0 mit 0,1 % n-Octyl-β-D-Glucopyranosid als Stabilisator.

Durch Zugabe verschiedener Metall-Kationen, Anionen wie Acetat oder Komplexbildner wie EDTA in Konzentrationen von 1 mM, 10 mM und 35 mM konnte gezeigt werden (Abbildung 3-13), dass i.a. die enzymatische Aktivität mit steigender Ionenstärke sinkt. Dabei wurden jeweils die Chlorid-Salze der Metalle verwendet. Bei Co^{2+} , Ni^{2+} und EDTA ist bereits bei einer Konzentration von 1 mM eine nahezu vollständige Inhibierung erfolgt. Weitere Versuche mit EDTA zeigten, dass stöchiometrisch äquivalente Mengen ausreichen, um die Aktivität der Chitindeacetylase zu inhibieren. NaCl konnte in Konzentrationen oberhalb von 500 mM die Enzymaktivität um den Faktor vier reduzieren.

Acetat zeigt in den dargestellten Konzentrationen keinen hemmenden Effekt auf die enzymatische Aktivität. Erst bei Konzentrationen, die die Pufferkapazität überschreiten und somit zu einer Absenkung des pH-Wertes führten, zeigte sich ein negativer Effekt, welcher sich aber durch einen höher konzentrierten Puffer vermeiden ließ.

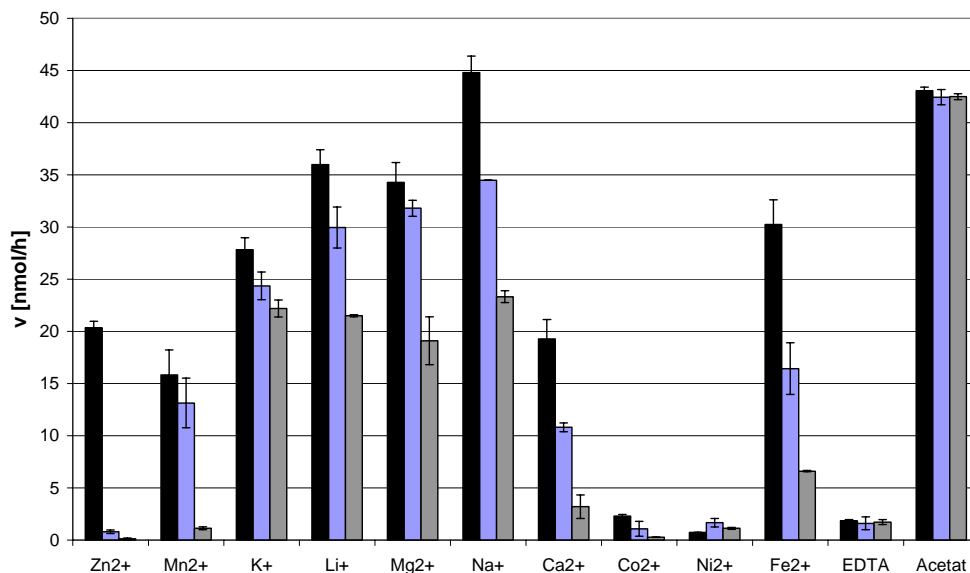


Abbildung 3-13: Enzymatische Aktivität der CDA bei Anwesenheit verschiedener Agenzien in steigender Konzentration. ■: 1 mM, ■: 10 mM, ■: 35 mM

Aufgrund der Tatsache, dass Phosphationen besonders mit bivalenten Kationen wechselwirken, wurde der Versuch mit 100 mM Tris, pH 7,0 wiederholt. Dieser Versuchsaufbau lieferte analoge Resultate.

3.3.5 Temperatur- und pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

Neben dem Einfluss verschiedener Ionen auf die Enzymaktivität, ist der pH-Wert des verwendeten Puffers von Bedeutung für die Umsatzgeschwindigkeit. In Abbildung 3-14 wird der Vergleich des pH-Wertes zwischen 2,0-8,6 mit 100 mM Mc Ilvains-Puffer (100 mM Citrat, 200 mM Na_2HPO_4) und 0,1 % n-Octyl- β -D-Glucopyranosid als Stabilisator

verdeutlicht. Der optimale pH liegt hier um 7,0. Dieser Wert konnte bei Verwendung anderer Puffer bestätigt werden.

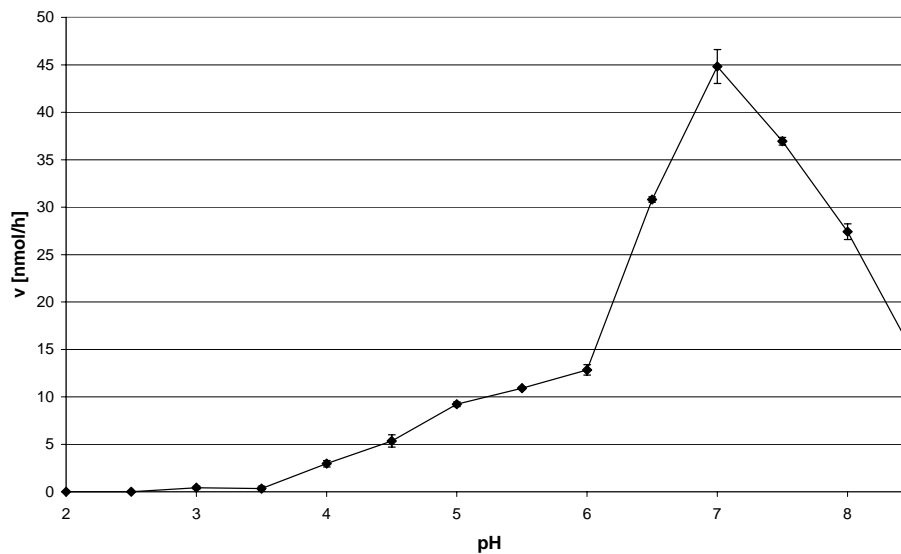


Abbildung 3-14: Einfluss des pH auf die Enzymaktivität.

Neben ihrer pH-Abhängigkeit, zeigt die Chitindeacetylase auch eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit (Abbildung 3-15). Sie zeigt ein Optimum bei 25°C. Bei Temperaturen unterhalb von 15°C bzw. überhalb von 37°C ist die Aktivität stark reduziert.

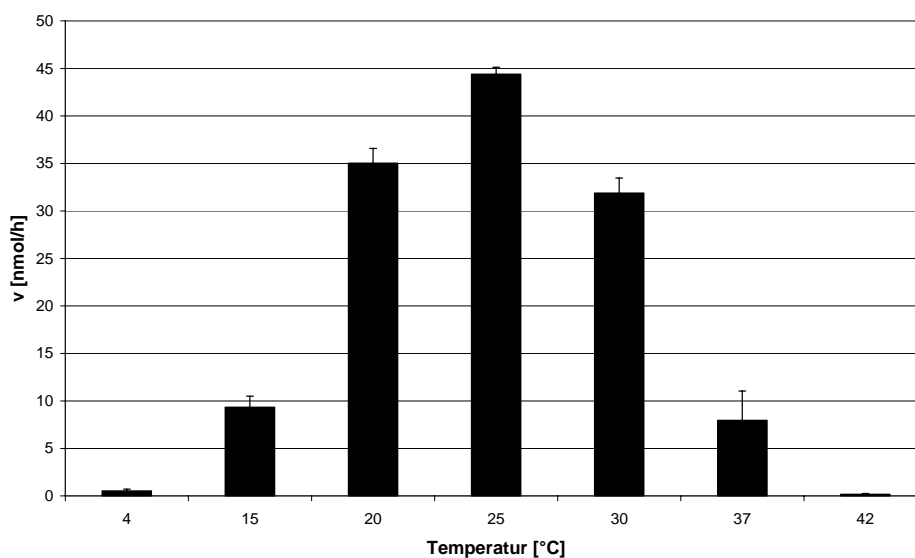


Abbildung 3-15: Einfluss der Temperatur auf die CDA-Aktivität.

3.3.6 Michaelis-Menten-Konstante und maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Bei Verwendung von 23,6 mM Di-N-Acetylchitobiose beträgt die maximale Enzymgeschwindigkeit, wie unter 3.4.6 dargestellt, 45 nmol/h abgespalterter Acetylgruppen. Für andere Konzentrationen wurden ebenfalls Reaktionskinetiken aufgestellt, um deren

maximale Enzymgeschwindigkeit zu ermitteln. Im Bereich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit liegt ein Fließgleichgewicht vor. Als Folge der Konstanz des Enzym-Substrat-Komplexes wird eine lineare Produktbildung beobachtet (Bisswanger, Enzymkinetik, S. 53 ff.) Die Reaktionsgeschwindigkeit ist hier gemäß einer Reaktion nullter Ordnung von der Substratkonzentration unabhängig.

Daraus lässt sich graphisch nach Michaelis-Menten (Abbildung 3-16) und Lineweaver-Burk (Abbildung 3-17) die Michaelis-Menten Konstante, sowie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bestimmen. Dadurch berechnet sich die maximale Umsatzgeschwindigkeit v_{\max} zu 48,10 nmol abgespaltener Acetylgruppen pro Stunde und die Michaelis-Menten-Konstante zu $K_M = 3,26$ mM Di-N-Acetylchitobiose. So ergibt sich eine maximale spezifische Aktivität von 2,29 nkat/mg, bezogen auf ein monomeres CDA-Molekül (s. auch 3.4.1). Bei Verwendung längererkettiger Substrate wurden entsprechende Ergebnisse erzielt.

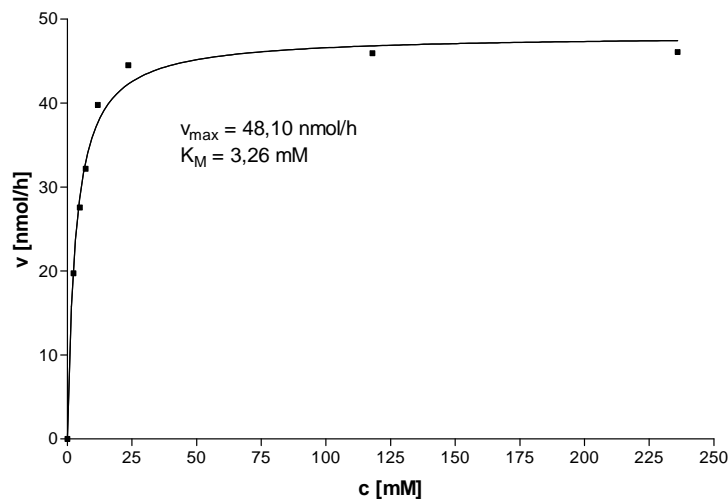


Abbildung 3-16: Graphische Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bei der Deacetylierung von Di-N-Acetylchitobiose.

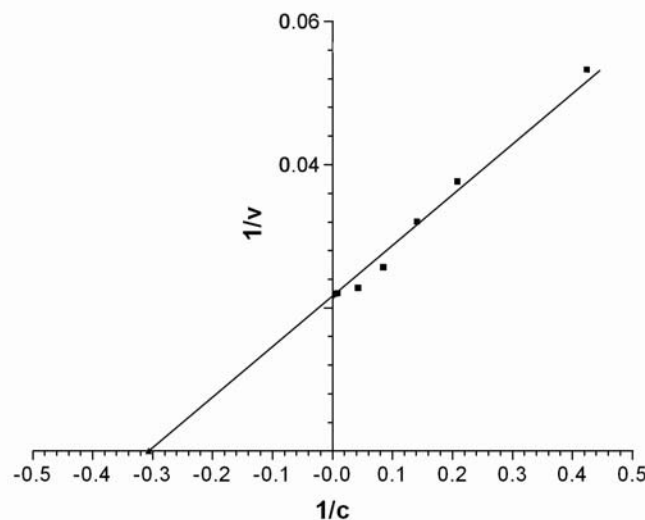


Abbildung 3-17: Lineweaver-Burk-Plot zur graphischen Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante bei Verwendung von Di-N-Acetylchitobiose.

Sind an einem Enzym bzw. einem Enzymkomplex mehrere Substratbindungsstellen vorhanden, so kann die Bindung eines Substratmoleküls die Bindung weiterer Moleküle beeinflussen. Dieses, als Kooperativität bezeichnete Phänomen, lässt sich durch die Hill-Gleichung beschreiben:

$$\lg \frac{v}{v_{\max} - v} = h \cdot \lg[S] - \lg K_M$$

K_M ist die Michaelis-Menten-Konstante, $[S]$ die Substratkonzentration und v die Umsatzgeschwindigkeit. Der Hill-Koeffizient h gibt die Abweichung vom Lineweaver-Burk-Plot an. Er lässt sich als Steigung aus dem Hill-Plot (Abbildung 3-18) graphisch ermitteln. Bei Werten < 1 spricht man von negativer und bei Werten > 1 von positiver Kooperativität.

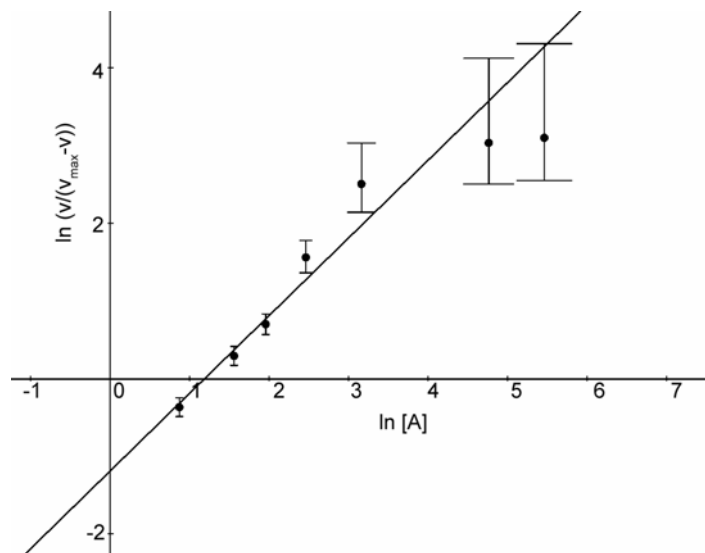


Abbildung 3-18: Hill-Plot zur Darstellung von Substratkooperativität.

Erwartungsgemäß weist die Auftragung des Hill-Plots eine Gerade mit der Steigung 1 auf. Bereits die graphischen Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (Abbildung 3-16) zeigte einen hyperbolen Verlauf. Solche Kurven ergeben, unabhängig von der Zahl der Bindungsstellen des Makromoleküls, im Hill-Plot immer Geraden mit einer Steigung von 1. Daraus lässt sich ableiten, dass die CDA keine Kooperativität bezüglich der Substratkonzentration zeigt.

3.3.7 Einfluss unterschiedlicher Fusionsproteine auf die Enzymaktivität

Die verschiedenen Fusionsproteine zeigten alle innerhalb der Messtoleranzen ähnliche Enzymaktivitäten. Selbst mit dem sterisch anspruchsvollen MBP war keine signifikante Verringerung der CDA-Aktivität zu verzeichnen.

Fusions-Konstrukt	Molmasse des monomeren Fusionskonstrukts [Da]	Spezifische Aktivität pro monomeren Fusionskonstrukt [nkat/mg]	Spezifische molare Aktivität pro monomeren Fusionskonstrukt [nkat/ μ mol]
<i>Strep-TagII</i> , N-terminal	29.495	2,04	60,1
<i>Strep-TagII</i> , N-terminal, verkürzt	28.293	2,09	59,2
<i>Strep-TagII</i> , C-terminal	28.293	2,08	58,8
<i>Strep-TagII</i> , C- und N-terminal	29.333	1,94	59,0
MBP, N-terminal	69.889	0,81	56,4
ohne Fusionsanteil	27.286	2,16	58,9

Tabelle 3-4: Enzymatische Aktivität der verschiedenen Fusionsproteine. Dargestellt ist die Enzymaktivität bei Verwendung von 23,6 mM Di-N-Acetylchitobiose.

3.3.8 Stabilität des Enzyms

Die Chitinacetylase neigte stark zur Bildung von unlöslichen Aggregaten. Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei den *Strep-TagII*- als auch bei den MBP-Präparationen. Bei letzterer Aufreinigungsmethode wurde die Aggregatbildung durch Entfernen des MBP-Proteins begünstigt. Um dies zu Unterbinden wurde das gereinigte Enzym sowohl als MBP-CDA-Fusionsprotein in Konzentrationen zwischen 100 μ g/ml und 1,5 mg/ml als auch ohne Fusionsanteil in Konzentrationen von 500 μ g/ml bis 800 μ g/ml gelagert. Weitere Konditionen der Lagerung waren verschiedene Temperaturen (RT, 4°C und -20°), sowie die Aufbewahrung mit und ohne Stabilisatoren (0,1 % n-Octyl- β -D-Glucopyranosid bzw. 0,15 % Polyethylenglycol (PEG), 20.000) in NaPP (100 mM, pH 7,0).

Die enzymatische Aktivität wurde anschließend bei 25°C in 100 mM NaPP, pH 7,0 mit Di-N-Acetylchitobiose als Substrat bestimmt. Es zeigte sich, dass die Aggregationsbildung beim MBP-CDA-Fusionsprotein bei einer Konzentration von maximal 1 mg/ml und ohne Fusionsanteil von 300 μ g/ml am geringsten war. Generell wies das Enzym sowohl mit als auch ohne Fusionsanteil bei 4°C und der Zugabe von 0,15 % (w/v) PEG-20.000 die längste Haltbarkeit auf (Abbildung 3-19). Der Einsatz von Stabilisatoren verringerte in den getesteten Konzentrationen die Aktivität des Enzyms nicht. Wurde das Enzym bei -20°C gelagert,

bildeten sich bei allen Präparationen während des Auftauens unlösliche Aggregate, welche mit einem Aktivitätsverlust von bis zu 90 % einhergingen.

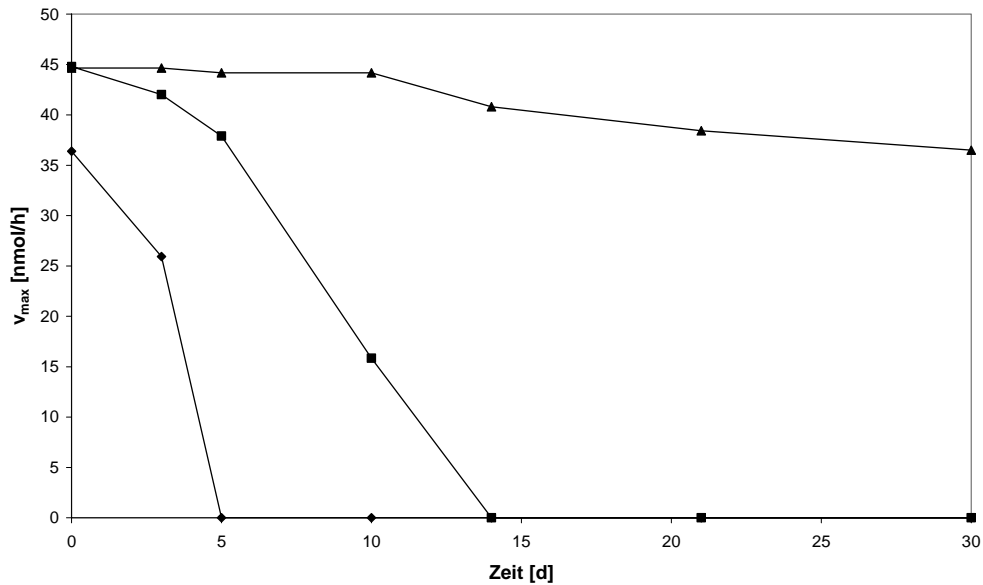


Abbildung 3-19: Einfluss verschiedener Stabilisatoren auf die Stabilität des Enzyms. Dargestellt ist die Enzymaktivität nach Lagerung bei 4°C. Verwendet wurde die CDA nach Abspaltung und Entfernen des MBP-Fusionsproteins; die Proteinkonzentration beträgt 200 µg/ml ▲: 0,15 % PEG 20.000; ■: 0,1 % n-Octyl-β-D-Glucopyranosid; ◆: ohne Zusatz

Wie Abbildung 3-20 zeigt, weist das Enzym nur geringe thermische Stabilität auf. Die Lagerung bei 37°C führt innerhalb von 10 Tagen zum völligen Verlust der Aktivität, während sie bei 50°C bereits nach 15 Minuten auf die Hälfte abfällt (Daten nicht gezeigt).

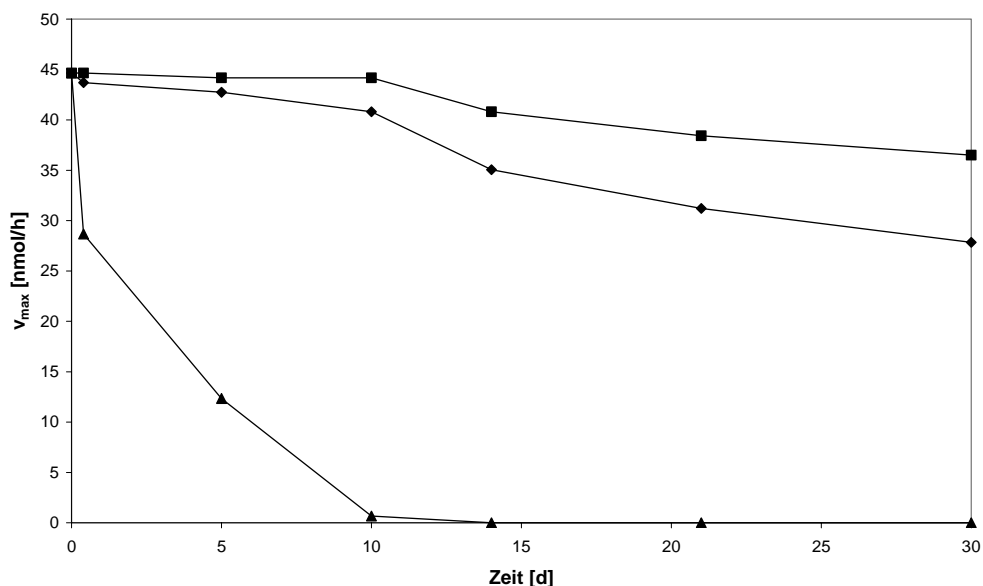


Abbildung 3-20: Thermische Stabilität der CDA bei Verwendung von 0,15 % PEG-20.000 als Stabilisator. Dargestellt ist die Enzymaktivität nach Inkubation bei: ■: 4°C; ◆: RT; ▲: 37°C. Verwendet wurde die CDA nach Abspaltung und Entfernen des MBP-Fusionsproteins; die Proteinkonzentration beträgt 200 µg/ml

3.4 Biophysikalische Charakterisierung der CDA

3.4.1 Analytische Gelfiltration

Der sigmoide Kurvenverlauf der Enzymkinetik, sowie die Verkürzung der *lag*-Phase durch Produktzugabe legten nahe, dass es sich bei dem Enzym um ein allosterisch kontrolliertes Homooligomer handelt.

Zur Ermittlung des nativen Molekulargewichts wurden 500 μ l Enzym sowohl als MBP-CDA-Fusionsprotein, als auch in geschnittener Form wie unter 2.4.7 beschrieben auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Größenbestimmung fand anhand des Gelfiltrationsstandards der Firma BioRad und der damit erstellten Eichgerade (Abbildung 3-22) statt.

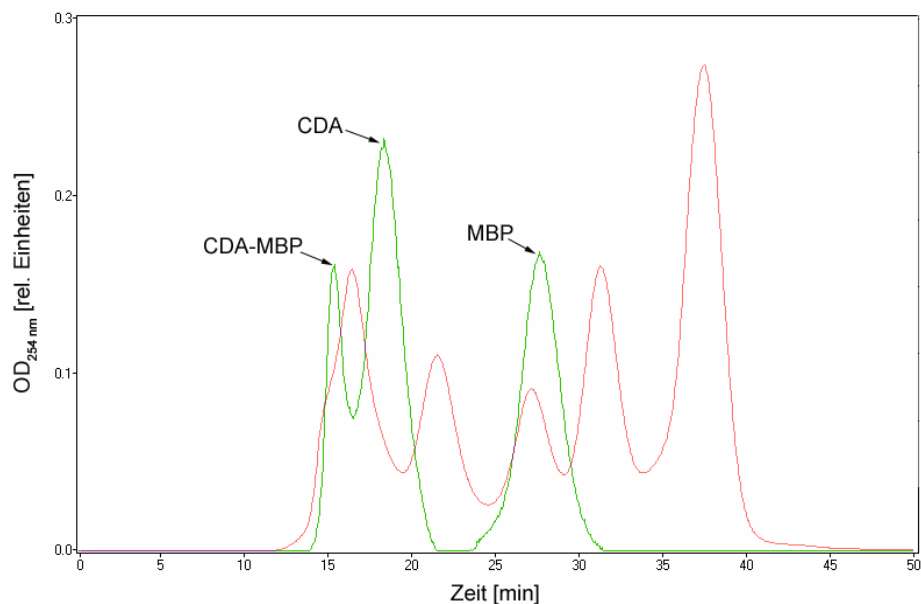
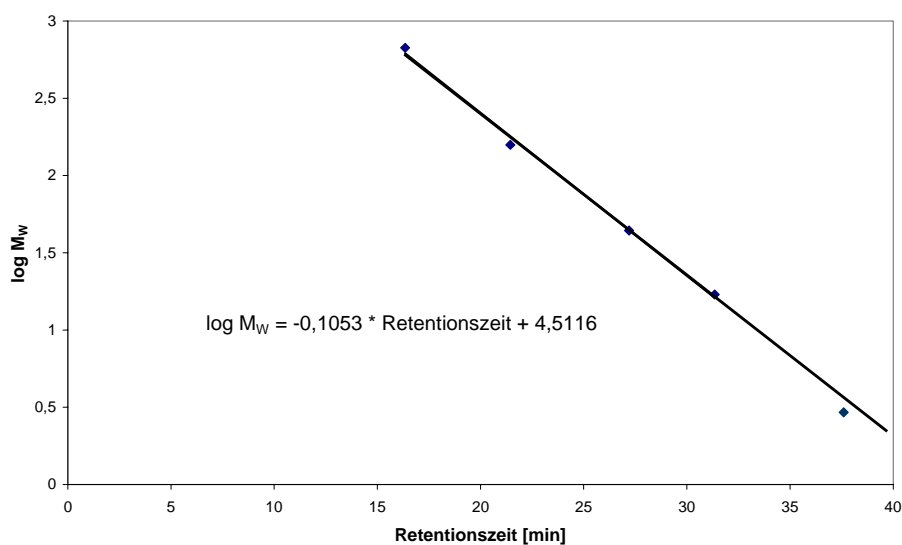


Abbildung 3-21: Gelfiltrationschromatogramm des verdauten CDA-MBP-Fusionsproteins. Benutzt wurde eine K 9/60-Säule mit Superdex 200 (Fa Amersham Pharmacia Biotech). —: Gelfiltrationsstandard der Fa. BioRad; —: teilweise verdautes CDA-MBP-Fusionsprotein, das abgespaltene MBP dient hier als interner Standard; die CDA zeigt ein deutlich zu höheren Molmassen hin verschobenes Elutionsprofil

Basierend auf der theoretischen Masse des CDA-MBP-Fusionsproteins (69.889 Da) und der im MALDI-TOF (Vergl. 3.4.3) bestimmten Massen des isolierten, monomeren Enzyms (27.296 Da) und des MBP (42.606 Da) konnte anhand der Retentionszeiten (Abbildung 3-21) in der Gelfiltration die Molmasse des oligomeren Proteins bestimmt werden. Sie betrug beim MBP-CDA-Fusionsprotein 838 kDa, was einem Dodecamer entspräche. Beim *GenenaseI*-verdautem nativen Enzym betrug sie 387 kDa, was einem Tetradecamer entspräche. Die Bestimmungen wurden mit verschiedenen Gelfiltrationsmaterial (Superdex 75, Superdex 200 und BioSil SEC 125) wiederholt und lieferten analoge Ergebnisse.

A)



B)

Substanz	M_W [kDa]
Thyroglobulin	670
IgG	158
Ovalbumin	44
Myoglobin	17
Cyanocobalamin	1,35

Abbildung 3-22: A) Halblogarithmische Auftragung der Molmasse gegen die Retentionszeit der einzelnen Proteine des Gelfiltrationsstandards. Aus der linearen Regressionsgeraden lässt sich der Bezug zur rechnerischen Molmassenbestimmung der oligomeren CDA ableiten. **B) Zusammensetzung des Gelfiltrationsstandards.**

3.4.2 *Reversed-Phase* HPLC

Eine direkte Molmassenbestimmung der oligomeren CDA im MALDI-TOF war aufgrund mangelnder Ionisierbarkeit der Probe bzw. unzureichender Genauigkeit des Instruments bei Molmassen über 300 kDa nicht möglich. Aufgrund dessen wurde die native CDA durch *Reversed-Phase* HPLC in ihre monomere und oligomere Form getrennt.

500 μ l CDA-Probe wurden mit einem Fluss von 1 ml/min in 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) aufgetragen. Die Elution erfolgte bei 25°C mit einem linearen Gradienten von 0 auf 100 % Acetonitril in 0,1 % TFA über 50 min und mit 1 ml/min. Die *Proteinpeaks* wurden bei 220 nm detektiert.

Das Monomer eluiert bei 53 % Acetonitril, während die oligomeren Formen erst zwischen 60 und 66 % Acetonitril eluieren. Dieses Ergebnis zeigt deutlich die im Vergleich zum Oligomer schwächeren hydrophoben Wechselwirkungen des Monomers mit der Säulenmatrix.

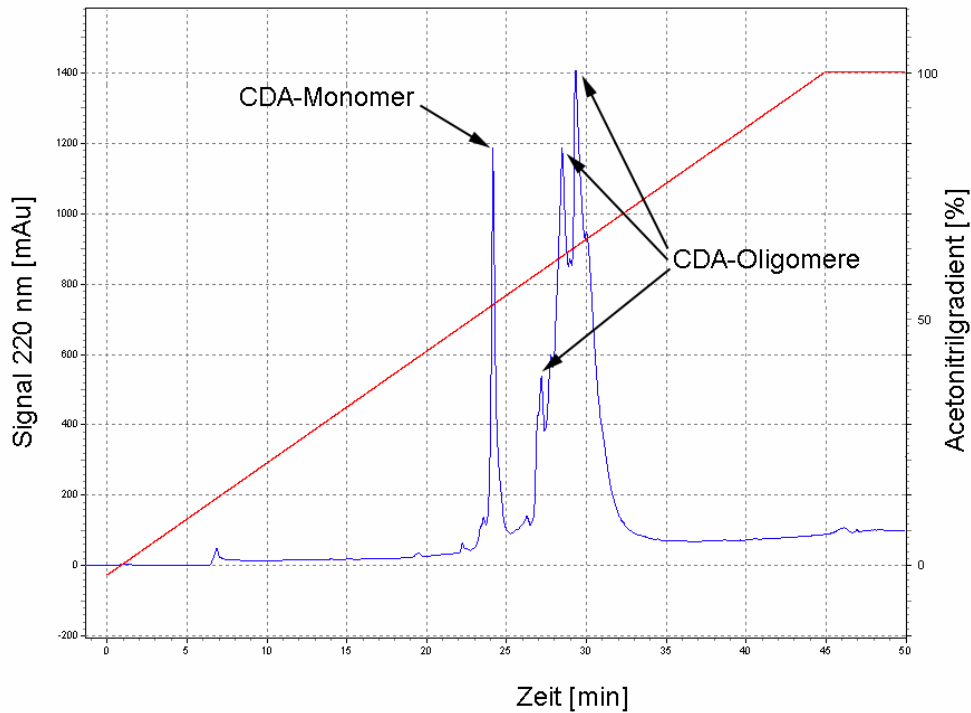


Abbildung 3-23: *Reversed-Phase* HPLC Chromatogram der CDA. —: Elutionsprofil der CDA, —: Acetonitrilgradient.

3.4.3 MALDI-TOF -Massenspektrometrie

Das Molekulargewicht der CDA in monomerer Form wurde nach Entfernen des MBP-Fusionsanteils und anschließender *Reversed-Phase* HPLC auf einem MALDI-TOF-Massenspektrometer bestimmt (Abbildung 3-24).

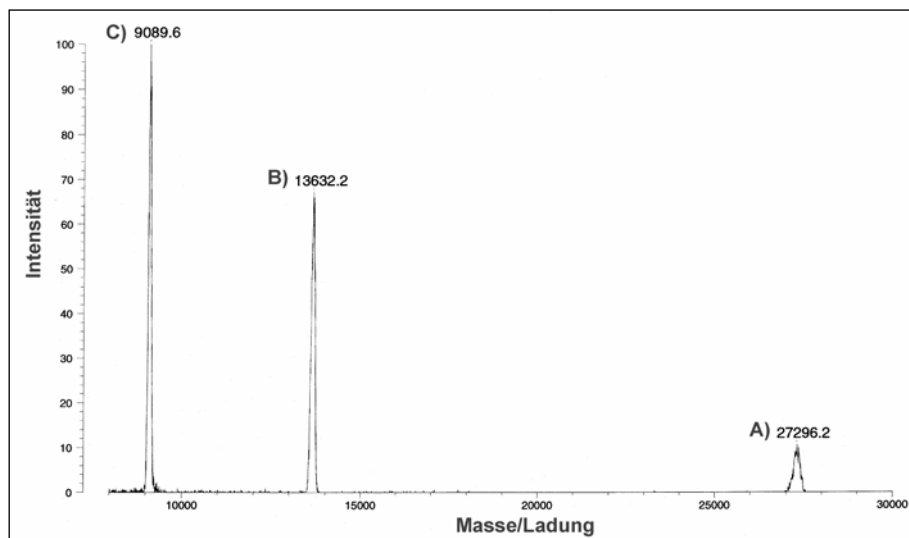


Abbildung 3-24: Massenspektrum der nativen CDA nach Entfernen des MBP-Fusionsproteins. Die *peaks* repräsentieren einzelne Ladungszustände des Proteins. Für die CDA wurde die Masse auf 27.296 Da \pm 10 Da bestimmt.

Die erwartete Masse der CDA liegt bei 27.287 Da, gemessen wurden 27.296 Da (C). Diese Abweichung liegt im Bereich der Messungenauigkeit von +/- 10 Da. Bei den weiteren *peaks* (A und B) handelt es sich um mehrfach geladene Moleküle der CDA.

Die Masse des abgespaltenen MBP wurde auf 42.606 Da +/- 3 Da bestimmt (Daten nicht gezeigt), was mit dem theoretischen Wert von 42.602 Da übereinstimmt.

3.4.4 Denaturierungsexperimente

Die Denaturierungskurven der CDA sollten Aufschluss über die Stabilität des oligomeren Enzyms, bzw. des Monomers unter verschiedenen Pufferbedingungen, geben.

Dabei wurde das native Enzym ohne *Strep-TagII* oder MBP eingesetzt, um diesbezügliche Epiphänomene auszuschließen. Das Maximum der Fluoreszenzemission der CDA lag im nativen Zustand bei 334 nm. Das dazugehörige Exzitationsmaximum lag bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Um den Einfluss des Photobleichens (*bleaching*) der Messwerte erfassen zu können, wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm kontinuierlich Licht in eine CDA Probe eingestrahlt. Nach einer Anregungsdauer von 20 min war die Fluoreszenzintensität auf etwa 90 % des Ausgangswertes gesunken. Für die Aufzeichnung der Denaturierungskurven wurden zwischen 250 und 370 Messwerte aufgenommen. Die Bestrahlungsdauer je Messwert betrug 0,1 s. Das bedeutet, dass bei der Erfassung der Messwerte eine Reduktion zwischen 0,21 % und 0,31 % am Ende der Messung durch *bleaching* verursacht wurde. Diese Werte wurden vernachlässigt.

Die Cosolvens induzierte Denaturierung der CDA wurde durch langsame Zugabe einer 6 M Gdn HCl-Lösung im entsprechenden Puffer erreicht. Bis zur Einstellung eines konstanten Messwertes wurde 5 min gewartet. Dieses Verfahren hat den experimentellen Vorteil, dass weniger Protein für eine Messung erforderlich ist als bei dem alternativen Verfahren, bei dem jede Probe vor Beginn der Messung mit einer definierten Konzentration an Cosolvens inkubiert wird. Nachteilig ist die etwas größere Ungenauigkeit der Messung durch die mehrfachen Pipettierschritte. Für dieses Verfahren ist eine Linearität der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration des Fluorophors Bedingung. Abbildung 3-25 zeigt die Linearität der Fluoreszenz im Bereich zwischen 1 µg/ml und 10 µg/ml CDA.

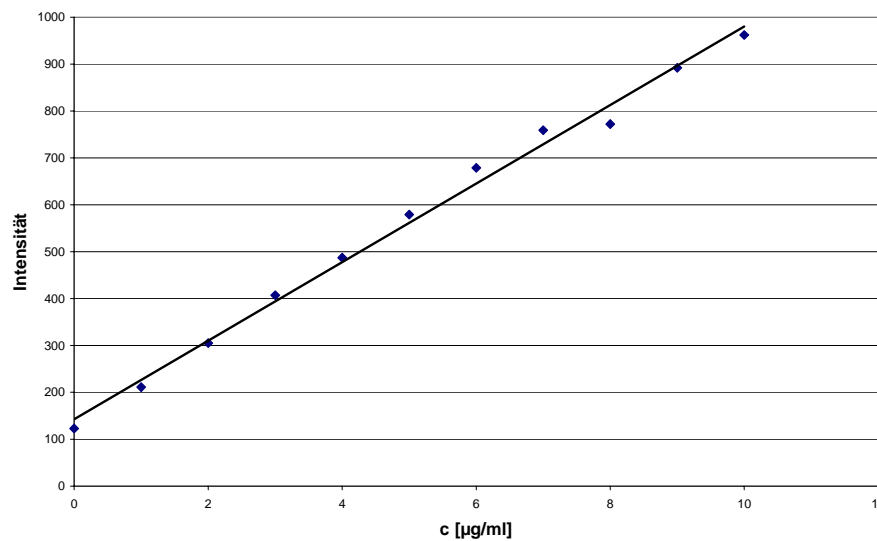


Abbildung 3-25: Die Fluoreszenz der CDA ist bei 349 nm linear abhängig von der Konzentration.

Die durch die Versuchsdurchführung bedingte Zunahme des Probenvolumens machte eine Korrektur des Fluoreszenzsignals notwendig:

$$I_{\text{korrigiert}} = I \cdot \frac{V}{V_0}$$

V_0 ist das Ausgangsvolumen, V das Endvolumen und I ist die Intensität der Probe des Endvolumens. Die Daten wurden zur grafischen Auftragung auf Anfangs- und Endwert normiert.

Der sich daraus ergebende Umwandlungsgrad α lässt sich wie folgt ausdrücken:

$$\alpha = \frac{I - I_u}{I_f - I_u}$$

I ist die gemessene Signalintensität, I_f ist die Intensität des nativen Proteins und I_u die Intensität des völlig denaturierten Proteins.

Die Cosolvens induzierte Entfaltung erfolgte in zwei Stufen (Abbildung 3-26). Zunächst fand eine exponentielle Abnahme des Fluoreszenzsignals statt. Daran schließt sich ein Plateaubereich an, der in eine zweite, sigmoide Entfaltungskurve übergeht.

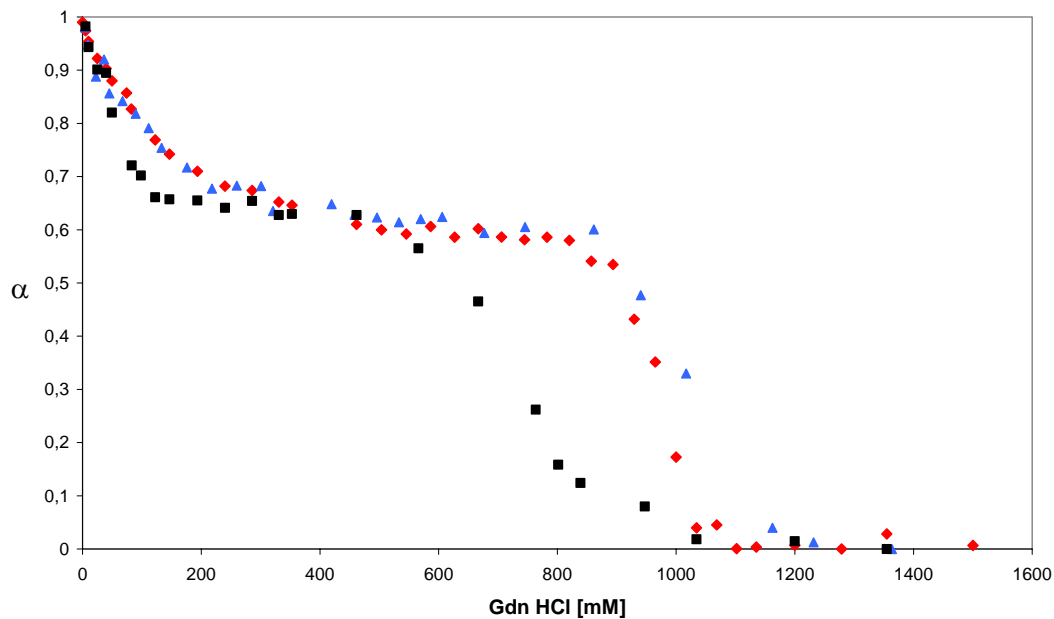


Abbildung 3-26: Umwandlungskurve der CDA durch sukzessive Zugabe von 6 M Gdn HCl-Lösung.

■: 100 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 7,0; ♦: 100 mM NaPP, pH 7,0; ▲: 100 mM NaPP, 500 mM NaCl, pH 7,0; Die Puffer enthielten zusätzlich je 0,1 % (w/v) n-Octyl-β-D-Glucopyranosid. Dargestellt ist der Anteil an nativem Protein, bestimmt aus den relativen Fluoreszenzintensitäten bei 334 nm als Funktion der Gdn HCl Konzentration.

Die Wendepunkte dieser Kurve liegen im Falle von Tris-HCl-Puffer bei etwa 750 mM und NaPP bei etwa 975 mM Gdn HCl. Die NaCl-Konzentration zeigte keinen Einfluss auf das Schmelzverhalten. So waren die Kurven sowohl bei 0 mM als auch bei 500 mM NaCl nahezu identisch (Daten nicht gezeigt).

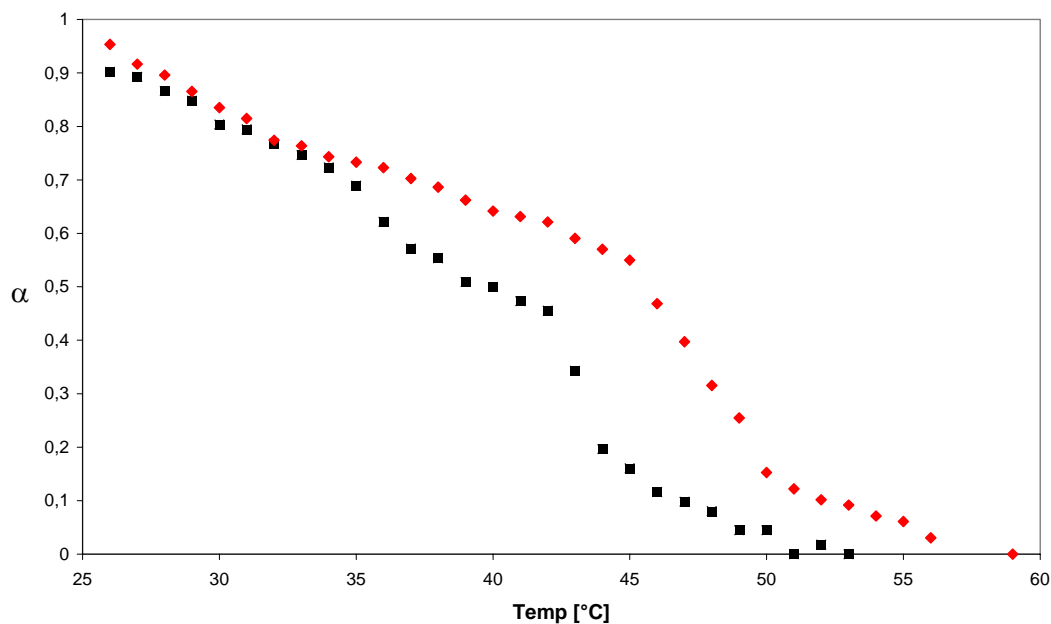


Abbildung 3-27: Thermische Denaturierung der CDA.

■: 100 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 7,0; ♦: 100 mM NaPP, pH 7,0; die Schmelzpunkte liegen für Tris-HCl-Puffer bei 43°C und für NaPP bei 47°C.

Die thermisch induzierte Denaturierung (Abbildung 3-27) verifizierte die vorherigen Ergebnisse und zeigte eine analoge Denaturierung der CDA. Auch hier war die Aufschmelzkurve bei Verwendung von NaPP zu höheren Temperaturen verschoben. Die Schmelzpunkte lagen bei Verwendung von Tris-HCl-Puffer bei ca. 43°C und bei Verwendung von NaPP bei 47°C. Aufgrund der Tatsache, dass die Fluoreszenzintensität temperaturabhängig ist, zeigt sich bei keiner Temperatur ein paralleler Kurvenverlauf zur Abszisse.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass es sich bei der Entfaltung der CDA um einen mehrstufigen Prozess handelt, bei dem der oligomere Komplex zerfällt und das Monomer aufschmilzt. Aufgrund des Kurvenverlaufes kann jedoch der genaue Ablauf dieser Reaktion nicht bestimmt werden. Die Gegenwart von Phosphat-Ionen stabilisiert offenbar das Enzym, da höhere Konzentrationen Gdn HCl, respektive höhere Temperaturen nötig sind, um es aufzuschmelzen.

3.4.5 1-D-¹H-NMR-Spektroskopie

Mittels eindimensionaler ¹H-NMR-Spektroskopie wurde die Deacetylierung von Di-N-Acetylchitobiose und Tri-N-Acetylchitotriose sowohl qualitativ als auch quantitativ untersucht. Hierzu wurde die Feldverschiebung der Protonen der Acetylgruppe, der Protonen am C-1-Atom, welche am Ring ohne 1-4-Bindung in anomerer α - und β -Konformation vorliegen, sowie die dispersen Protonen des Zuckeringes untersucht (Abbildung 3-28).

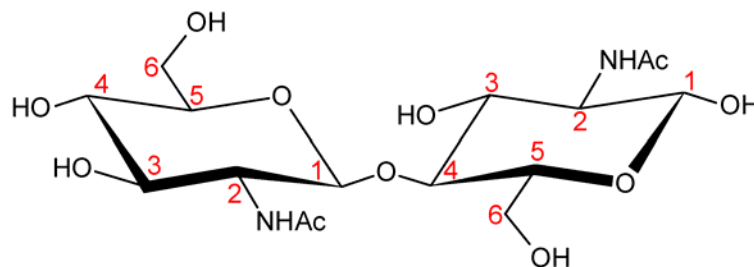


Abbildung 3-28: Strukturmodell der Di-N-Acetylchitobiose. Die Zuckereinheiten sind β -1-4-verknüpft; die Protonen am freien C1-Atom liegen als anomere α - und β -Konformation vor.

Durch Integration der Signale über den Protonen am C-1-Atom, sowie über den Protonen der Acetylgruppe bzw. des freien Acetats konnte die Reaktion quantifiziert werden.

Die Protonen am C-1-Atom zeigen bei beiden Substraten aufgrund skalarer Kopplung mit den C-2-Protonen ein Duplett bei 4,55 ppm, wenn eine β -1-4-glycosidische Bindung vorliegt und ein Duplett bei 5,16 ppm (α -Konformation) und 4,66 ppm (β -Konformation), wenn es sich um den Terminus ohne β -1-4-glycosidische Bindung handelt.

Die Acetylgruppen zeigten bei der Di-N-Acetylchitobiose zwei Singuletts bei 2,05 und 2,02 ppm und bei Tri-N-Acetylchitotriose 2,01, 2,03 und 2,04 ppm. Das freigewordene Acetat zeigte eine Hochfeldverschiebung nach 1,88 ppm.

Aus den Spektren des Verdaus von Di-N-Acetylchitobiose (Abbildung 3-29) ist zu ersehen, dass bei der Reaktion keine der Acetylgruppen bevorzugt abgebaut wurde. Die Deacetylierung erfolgte gleich schnell an allen Positionen. Analog verlief die enzymatische Deacetylierung von Tri-N-Acetylchitotriose.

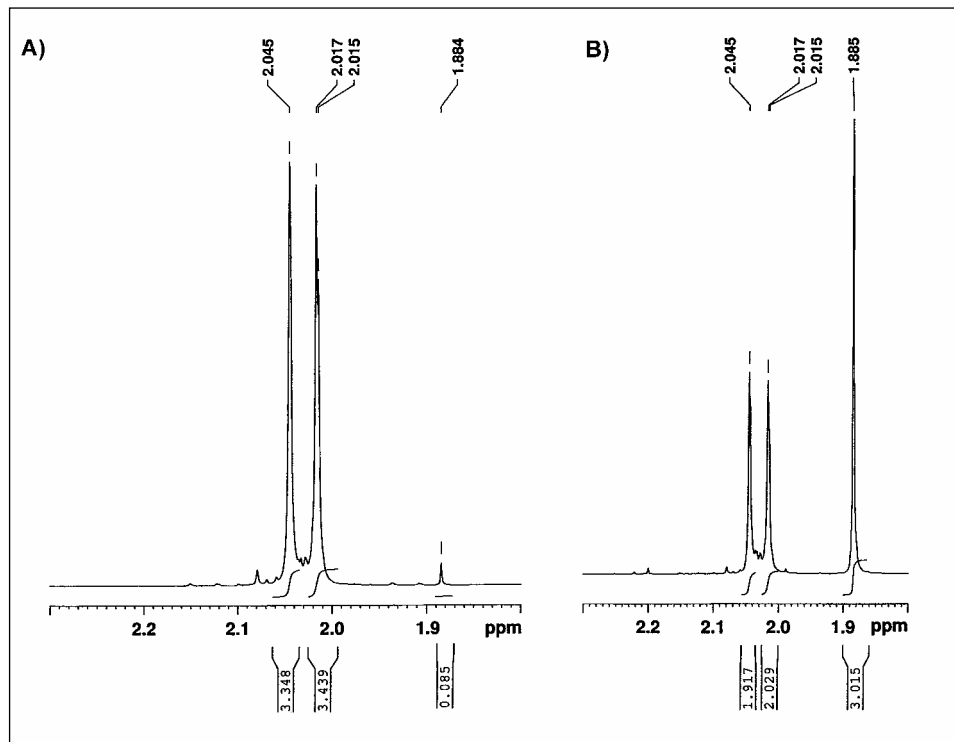


Abbildung 3-29: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum während der enzymatischen Deacetylierung von Di-N-Acetylchitobiose. A) zeigt den 0 h-Wert und B) den 72 h-Wert; bei 2,05 ppm und 2,02 ppm sind die beiden Singulets der Acetylgruppen und bei 1,88 ppm ist das gebildete Acetat zu sehen.

3.4.6 Infrarotspektroskopie

Chitin aus natürlichen Quellen (Krabben, Shrimps, Tintenfisch) weist einen stark schwankenden nativen Acetylierungsgrad auf. Da der Acetat-Freisetzungssassay nur eine differentielle Bestimmung der Acetylierung zulässt, war es notwendig, den absoluten Acetylierungsgrad des Substrats zu messen. Dies geschah vor bzw. nach enzymatischer Substratumsetzung mittels Infrarotspektroskopie (Sabnis, 1997; Khan, 2002).

Die Proben wurden wie unter 2.6.3 beschrieben als KBr-Presslinge untersucht. Detektiert wurde ein Absorptionsbereich zwischen 200 und 4.000 nm. Zur Quantifizierung der Acetylierung wurde die Absorption der Amid-I (C=O)-Valenzschwingung bei 1655 nm gemessen.

Die Valenzschwingung zwischen Sauerstoff- und Wasserstoffatomen der beiden Hydroxylgruppen am C-3 bzw. C-6-Atom wurden bei 3450 nm detektiert und dienten als interner Standard.

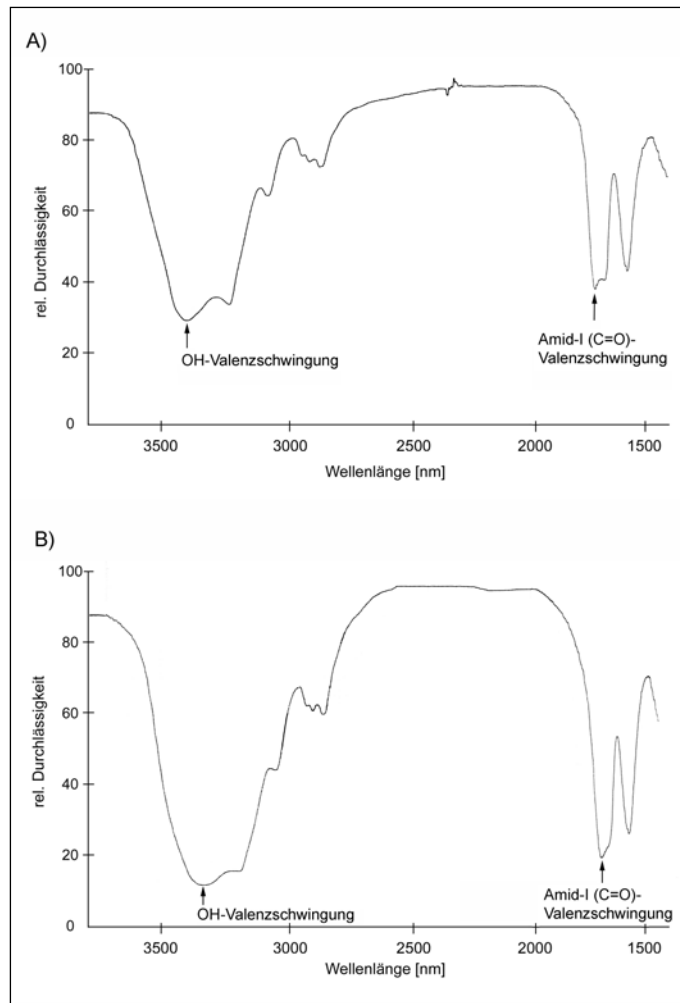


Abbildung 3-30: IR-Spektrum von kolloidalem Chitin. A) vor Verdau; B) nach enzymatischen Verdau des Substrats.

Mit dieser Bestimmungsmethode konnte der maximale Deacetylierungsgrad nach Abschluss der enzymatischen Reaktion bestimmt und die Ergebnisse aus dem Acetat-Freisetzungssassay für kristallines und kolloidales Chitin verifiziert werden. Die Berechnung des prozentualen Deacetylierungsgrades erfolgte nach *Domszy und Roberts (1985)* gemäß folgender Formel:

$$DD = 100 - \left[\left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \cdot 100 / 1,33 \right]$$

DD ist der prozentuale Deacetylierungsgrad, A_{1655} und A_{3450} sind die relevanten Absorptionen. Der Faktor 1,33 gibt das Verhältnis A_{1655}/A_{3450} für komplett N-acetyliertes Chitosan an.

Basierend auf der Annahme, dass ein linearer Bezug zwischen N-Acetylgruppen und der Absorption der Amid-I-Bande besteht, ergibt sich bei vollständiger Deacetylierung der Wert gleich null.

Substrat	A₁₆₅₅	A₃₄₅₀	Deacetylierungsgrad [%]
Krabbe (kristallin) - vor Verdau	60,5	73,1	37,8
Krabbe (kristallin) - nach Verdau	36,1	49,8	45,5
Krabbe (kolloidal) - vor Verdau	50,3	58,8	35,7
Krabbe (kolloidal) - nach Verdau	61,8	77,5	45,0
Tintenfisch (kolloidal) - vor Verdau	67,2	78,4	35,5
Tintenfisch (kolloidal) - nach Verdau	53,4	68,8	41,6
Shrimps (kristallin) - vor Verdau	46,3	49,0	29,0
Shrimps (kristallin) - nach Verdau	45,7	49,9	31,2

Tabelle 3-5: Auswertung der IR-Spektren verschiedener Substrate vor und nach CDA-Verdau.

4. Diskussion

Gegenwärtig wird Chitosan aus Crustaceenschalenchitin durch einen thermochemischen Prozess gewonnen. Als Ergebnis dieser Behandlung treten neben der gewünschten Deacetylierung des Chitins, unterschiedliche Degradationsstufen der Zuckerketten auf. Diese Produktinhomogenität limitiert den Einsatz von Chitosan beispielsweise für medizinische Anwendungen. Alternativ scheint eine enzymatische Umwandlung von Chitin zu Chitosan kontrollierbarer und schonender für das Produkt zu sein. Darüber hinaus kann der Einsatz von umweltbelastenden Chemikalien, die bei der industriellen Produktion anfallen, reduziert werden.

Neben der enzymatischen Deacetylierung des Chitins gibt es Ansätze Rohchitin aus Crustaceenschalen zu gewinnen. Dieser Vorgang umfasst enzymatische Decalcifizierung und Deproteinierung.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit ist es gelungen eine neue Chitindeacetylase rekombinant in *E.coli* zu exprimieren, aufzureinigen und zu charakterisieren. Als Basis diente ein zuvor identifizierter *open reading frame* aus einem isolierten marinen Mikroorganismus (*Schmalz, 2000*), der Sequenzhomologien mit bekannten Chitindeacetylasen aus Pilzen (*Mucor rouxii*, *Colletotrichum lindemuthianum*), Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) und Chitooligomer-Deacetylasen (z.B. *Rhizobium galegae*) aufweist.

4.1 Klonierung und Identifizierung der aktiven Form der CDA

Der *open reading frame* hat fünf mögliche bakterielle Startcodons für potenzielle *cda*-Gene, welche *upstream* einer konservierten Polysaccharid-Deacetylase-Domäne (InterPro Zugangsnummer: IPR002509) liegen. Dieser konservierte Bereich wird als essenziell für die Funktion des Enzyms angesehen. Daher wurden weitere potenzielle Startcodons innerhalb bzw. *downstream* dieser Domäne nicht berücksichtigt.

Die Klonierung und Expression aller fünf potenziellen *cda*-Gene in den Standardvektor pASK-IBA7 ließ einen Vergleich der Expression, Aufreinigung und Charakterisierung zu. Das *Strep-TagII*-System wurde gewählt, um eine einfache säulenchromatographische Aufreinigung, sowie die Detektion des Proteins im Westernblot mittels Antikörpern zu ermöglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass das mit Startcodon fünf beginnende Protein mit der kürzesten Sequenz, Chitin am effektivsten deacetylieren kann. Die längeren Varianten zeigten nur zwischen 2 und 20 % dieser Enzymaktivität. Der längere N-terminus verhindert wahrscheinlich eine effektive Umsetzung der verwendeten Substrate. Die Aminosäuresequenz ist bei der Herabsetzung der Aktivität vermutlich von entscheidender Bedeutung, da weder das N-terminale *Strep-TagII* noch das Maltose-Bindungs-Fusionsprotein mit einer Molmasse

von 42 kDa zu einer signifikanten Minderung der Aktivität gegenüber dem nativen Enzym führten.

Dieses Ergebnis bedeutet nicht, dass es sich bei der rekombinanten Expression des Gens, das mit Startcodon fünf beginnt, um die im marinen Wirtsorganismus exprimierte und verwendete Form handeln muss. Es ist möglich, dass eine oder mehrere der längeren Sequenzen dort exprimiert werden. Bei diesen N-termini kann es sich um Domänen handeln, die das Protein z.B. in der Membran verankern, während sie beim rekombinanten Protein negativ mit enzymatisch aktiven Bereichen in Wechselwirkung treten, die Oligomerisierung des Enzyms beeinträchtigen oder die Untereinheiten destabilisieren. Es kann sich bei den längeren Varianten aber auch um N-terminale präpro-Sequenzen handeln, die nach der Proteinsynthese abgeschnitten werden, wie dies bei der CDA aus *C. lindemuthianum* der Fall ist.

Aufgrund der Tatsache, dass die CDA, die mit Startcodon 5 beginnt, die größte Aktivität aufwies, wurden alle Optimierungen und Charakterisierungen mit diesem Gen durchgeführt.

4.2 Expressionsoptimierung der rekombinanten CDA

Die Chitinacetylase wurde in verschiedenen Expressionssystemen (*Strep-TagII* und pMAL) in *E.coli* rekombinant hergestellt. In *Coomassie* gefärbten SDS-PAGE-Gelen und im Western Blot konnten die Fusionsproteine bzw. das native Protein in ihren monomeren Formen eindeutig identifiziert werden.

Ein Schwerpunkt bei der rekombinanten Expression war die Ausbeutemaximierung des löslichen Proteins. In prokaryotischen Systemen überexprimierte Proteine neigen oft zur Bildung unlöslicher Aggregate (*inclusion bodies*), die bei der Präparation eine denaturierende Aufarbeitung mit anschließender Renaturierung erforderlich machen. Um dies zu umgehen wurde versucht, durch Optimierung der Induktorkonzentration und der Inkubationstemperatur, die Ausbeute des löslichen Proteins im Cytosol zu erhöhen.

Die optimale Wachstumstemperatur für *E.coli* beträgt meistens 37°C. Die Expressionszeit kann dadurch so kurz wie möglich gehalten werden. Die Erfahrung zeigt jedoch, dass rekombinant hergestellte Proteine dabei oft zur Bildung von unlöslichen, nicht funktionellen Aggregaten neigen. Auch eine zu starke Induktion der Proteinexpression kann zu erhöhter Aggregatbildung führen, da der bakterielle Faltungsapparat überlastet ist.

Die Verwendung unterschiedlicher Plasmide bei der *Strep-TagII*-Expression wurde erforderlich, da der Vektor pASK-IBA7 bei Verringerung der Induktorkonzentration die Proteinexpression einstellt. Diese strikte Kontrolle der Expression ist vom Hersteller beabsichtigt, um die basale Expression zu unterdrücken. Dies ist vor allem bei der Produktion von für den Wirt toxischen Proteinen vorteilhaft. Für die Expressionsoptimierung ist dieser Mechanismus allerdings kontraproduktiv, da der Promotor zwangsläufig maximal induziert werden muss. In diesem Fall kann die Ausbeute des löslichen Proteins lediglich über die

Verringerung der Inkubationstemperatur, hier 25°C, reguliert werden. Dadurch konnte allerdings bei den pASK-Konstrukten keine Erhöhung der löslichen Ausbeute erzielt werden.

Aus diesem Grund wurde das *cda*-Gen in den Vektor pKK233-2 kloniert. Dessen Proteinexpression wird über einen *trc*-Promotor reguliert, der keinen Mechanismus zur Unterdrückung basaler Expression besitzt. So konnte die Induktorkonzentration auf 1/20 der maximalen Induktorkonzentration herabgesetzt und die Konzentration an löslichem Protein erheblich gesteigert werden.

Die Ausbeute des gereinigten Proteins nach Chromatographie auf einer *Strep-Tactin* Säule belief sich auf etwa 200 µg Protein pro Gramm Zellnassgewicht. Der Hauptteil des löslichen Proteins floss allerdings durch die Säule, ohne an die *Strep-Tactin*-Matrix zu binden. Wahrscheinlich ist das *Strep-TagII* durch die oligomere Form der CDA teilweise maskiert, so dass keine Bindung des Proteins an die Säule stattfinden konnte. Die Reinheit der CDA betrug bei dieser Präparationsmethode 30 %. Durch Veränderung des pH, der Erhöhung der Ionenstärke durch Zusatz von NaCl oder dem Zusatz von Glutathion oder SDS konnten Kontaminationen nicht verringert werden. Die Position des *Strep-TagII* hatte dabei keinen Einfluss auf die Ausbeute bzw. Reinheit des Proteins.

Die für biophysikalische Charakterisierungen teilweise nicht ausreichende Reinheit des Enzyms, sowie der Umstand, dass für die Experimente relativ große Mengen Protein benötigt wurden, machten die Verwendung eines anderen Expressionssystems erforderlich.

Beim eingesetzten pMAL-System (Vektor pMAL-c2G) wurde die CDA ebenfalls als Fusionsprotein exprimiert. Das im Vergleich zum *Strep-TagII* deutlich größere Maltose-Bindungs-Protein (MBP) ermöglicht neben der einfachen affinitätschromatographischen Aufreinigung eine verbesserte Löslichkeit des rekombinanten Proteins (*Kapust und Waugh, 1999*). Der Fusionsanteil des Proteins lässt sich darüber hinaus mit *GenenaseI* abspalten, so dass natives Protein erhalten wird. Durch Senken der Inkubationstemperatur auf 25°C konnte ein Großteil des Proteins löslich produziert werden. Eine Verringerung der Induktorkonzentration hatte einen kompletten Verlust der Expression zu Folge. Dies liegt, wie zuvor diskutiert, an der strikten Expressionskontrolle des Vektors durch ein *lacI^q*. Der lösliche Proteinanteil war dennoch so hoch, dass es nicht notwendig erschien, einen anderen Vektor zu benutzen bzw. den Vektor selbst zu modifizieren. Nach dem ersten Chromatographieschritt lag die Ausbeute an MBP-CDA-Fusionsprotein bei ca. 10 mg pro Gramm Zellnassgewicht. Die Reinheit lag bei ca. 90 %. Nach Abschneiden des MBP mit *GenenaseI*, sowie der Abtrennung von der CDA lag die Ausbeute an nativer CDA bei ca. 2,3 mg pro Gramm Zellnassgewicht. Bezogen auf die ursprüngliche Enzymmenge nach der ersten Amylosesäulenchromatographie entspricht dies einer Ausbeute von 58 %.

4.3 Biologische und biophysikalische Charakterisierung der CDA

Durch analytische Gelfiltration und MALDI-TOF-Analyse der monomeren Form des Enzyms konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Chitinacetylase um ein Homooligomer mit 12 bis 14 Untereinheiten handelt. Solche Enzymkomplexe zeichnen sich oft durch allosterische Kontrolle aus. Homooligomere Enzyme mit mehr als zehn Untereinheiten sind weit verbreitet. Beispielsweise besteht der Pyruvatdecarboxylaseteil des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes aus 24 Untereinheiten. Auch die Dihydrolipoyl-Acyltransferase-Untereinheit des in Pflanzen vorkommenden α -Keto-Säure-Dehydrogenasekomplex ist ein 24-Mer (Moonay, 2000), während die aktive Form der Selenocystein-Synthase aus *Eubacterium acidamiophilum* ein Decamer (Engelhardt, 1992) ist. Die Bildung von homooligomeren Strukturen ist bei den bekannten Chitinacetylase- bzw. homologen Enzymen, wie den NodB-Proteinen, bislang nicht beschrieben worden.

Der Kurvenverlauf einer enzymatischen Reaktion ist gewöhnlich durch drei Phasen gekennzeichnet. In der ersten, meist sehr kurzen Phase (*pre steady state* Phase) bildet sich der Enzym-Substrat-Komplex bei gleichzeitiger Abnahme des freien Enzyms. Zu dieser Zeit ist die Umsatzgeschwindigkeit noch gering. Ihr schließt sich die mittlere Phase (*steady state* Phase) an, in der die Konzentration des Enzym-Substratkomplexes nahezu konstant ist und die Umsatzgeschwindigkeit ihren maximalen Wert hat. In der letzten Phase nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit, bedingt durch Substraterschöpfung, wieder ab.

Die beobachtete Enzymkinetik der CDA weist einen ausgeprägten sigmoiden Kurvenverlauf auf, d.h. die Enzymreaktion startet nicht mit einer linearen Anfangsgeschwindigkeit nullter Ordnung, sondern nach Substratzugabe schließt sich eine lange Verzögerungsphase (*lag* Phase) an. Erst nach 42 h wird die maximale Enzymgeschwindigkeit erreicht. Dieses Verhalten ist charakteristisch für hysteretische Enzyme.

Frieden (1970) entlehnte diesen Begriff der im Magnetismus auftretenden Retardierung und postulierte, dass solche regulatorischen Mechanismen wichtig für einen Metabolismus sind, in dem verschiedene Enzyme um ein Substrat konkurrieren. Die Hysterese hat zudem eine dämpfende Wirkung, d.h. das System reagiert nicht sofort auf metabolische Änderungen. Dadurch werden kurzzeitige, nicht anhaltende Impulse ignoriert und Schwankungen ausgeglichen. Die Ursache dieses Phänomens kann durch das Modell von Ricard (1974) beschrieben werden. Hier kann das Enzym in zwei Konformationen vorliegen, welche das Substrat mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten umsetzen. Erst durch die Konformationsänderung erfolgt die Substratumsetzung mit voller Geschwindigkeit.

Diese Umwandlung kann auf drei Wegen erfolgen: 1. das Gleichgewicht zwischen assoziierter (aktiver) und dissoziierter (inaktiver) Form der monomeren Untereinheiten des Enzyms wird durch die versuchsbedingte Verdünnung des Enzyms gestört, so dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erst durch erneute Einstellung des Gleichgewichts

erfolgt. 2. das Substrat selber induziert eine solche Konformationsänderung, 3. das Produkt induziert die Konformationsänderung.

Für den ersten Fall ergäbe eine höhere Enzymkonzentration nach *Dixon (1965)* eine Verkürzung der Verzögerungsphase. Dieser Effekt konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Im zweiten Fall wäre der Verlauf der Umsatzgeschwindigkeit bezüglich der eingesetzten Substratmenge (Michaelis-Menten-Plot) sigmoid, d.h. er würde Kooperativität aufweisen. Dies ist so vorstellbar, dass das Enzym nach Bindung des Substrats in den aktiveren Zustand übergeht. Bei geringer Substratkonzentration kann das Enzym nach jedem Substratumsatz wieder in die inaktive Form zurückkehren, bevor das nächste Substratmolekül bindet. Bei höherer Substratmolekülnzahl reicht die Zeit bis zur nächsten Bindung für die Rückkehr in die inaktive Form nicht aus. Das Enzym verbleibt im aktiven Zustand und arbeitet mit maximaler Effizienz. Kooperativität bezüglich der Substratkonzentration konnte jedoch im Michaelis-Menten- bzw. Hill-Plot ausgeschlossen werden, so dass mit diesem Modell die Enzymcharakteristik nicht beschrieben werden kann.

Im letzten Fall könnte durch Zugabe eines oder beider Produkte, also Acetat bzw. Chitobiose, eine Verkürzung der *lag*-Phase beobachtet werden. Für die Zugabe verschiedener Mengen Acetat trat der postulierte Effekt nicht auf. Wurde dem Reaktionsansatz jedoch Chitobiose zugegeben war eine deutlich kürzere Verzögerungsphase zu verzeichnen.

Dieser Effekt verstärkte sich proportional, bis zur Chitobiose-Konzentration von etwa 0,1 % (w/v). Dies entspricht der Menge zu Beginn der *steady state* Phase im Ansatz ohne Chitobiosezugabe. Eine weitere Erhöhung der Konzentration zeigte keinen Effekt. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit veränderte sich nicht. Aus diesen Ergebnissen, leitet sich eine Produktaktivierung des Enzyms durch das entstandene Produkt ab.

Während Chitobiose durch die Aktivierung des Enzyms die Verzögerungsphase verkürzt, wird erst durch Zugabe von Phosphationen die maximale Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms erreicht. Ohne Phosphat ist die Aktivität etwa um den Faktor fünf erniedrigt. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der Enzymstabilität bezüglich Denaturierung durch Temperatur oder Guanidiniumhydrochlorid zeigten eine Stabilisierung der CDA in NaPP. Eine solche Stabilisierung durch Phosphationen konnte u.a. von *Griesler (1999)* für die tetramere Glucan-Phosphorylase gezeigt werden.

Die enzymatische Aktivität der CDA sinkt mit höherer Kationenkonzentration. Mittels Fluoreszenzspektroskopie konnte jedoch keine Destabilisierung des oligomeren Komplexes bzw. des monomeren Enzyms bei der Zugabe von 500 mM NaCl, das die Umsetzungsgeschwindigkeit um den Faktor vier herabsetzt, beobachtet werden. Somit scheint eine Wechselwirkung der Ionen mit dem reaktiven Zentrum plausibel, die sich negativ auf den katalytischen Umsatz auswirkt. Dies wird auch von Co^{2+} oder Ni^{2+} -Ionen angenommen, die schon bei einer Konzentration von 1 mM eine nahezu vollständige Inhibition des Enzyms bewirken.

Aus dem Elutionsprofil der *Reversed-Phase* HPLC lässt sich die Verknüpfung der Monomere durch hydrophile Wechselwirkungen schlussfolgern. Die Elution des Monomers vor dem Oligomer zeigt dessen hydrophileren Charakter. Wahrscheinlich sind diese hydrophilen Bereiche im oligomeren Zustand nicht zugänglich, so dass eine stärkere Wechselwirkung mit der hydrophoben Säulenmatrix stattfinden kann. Auch die starke Aggregationsneigung des Enzyms und die Tatsache, dass durch Stabilisatoren wie 0,1 % (w/v) n-Octyl- β -D-Glucopyranosid und 0,15 % (w/v) Polyethylenglycol 20.000 die Hydrophobie von Proteinen verringert werden, sind Hinweise auf außenliegende hydrophobe Bereiche im Enzym. Möglicherweise treten diese mit dem hydrophoben, länger-kettigen Chitin-Substrat in Wechselwirkung.

Die Chitindeacetylase zeigt ein breites Substratspektrum. Neben löslichen Substraten wie N-Acetylchitooligomere, wird festes Chitin, in kristalliner und in kolloidaler Form deacetyliert. Wie bei vielen bekannten Chitindeacetylase findet keine Deacetylierung von N-Acetylglucosamin statt. Bei dem untersuchten Enzym sind mindestens zwei N-Acetylglucosaminreste für eine Umsetzung erforderlich. Im Gegensatz zu Chitindeacetylase aus *M. rouxii*, *C. lindemuthianum* oder *A. nidulans* setzt die untersuchte CDA Glycolchitin nicht um. Bei diesem Substrat handelt es sich um ein chemisch modifiziertes Chitin, mit teilweise ethylierten Hydroxylgruppen, die die Löslichkeit erhöhen. Wahrscheinlich inhibieren diese Gruppen die Enzymaktivität. Die Deacetylierungseffizienz ist bei kristallinem bzw. kolloidalem Chitin erwartungsgemäß deutlich geringer (3-17 %) als bei den löslichen N-Acetylchitooligomeren. Wahrscheinlich limitiert die mangelnde Zugänglichkeit der Acetylgruppen (*Tsigos, 1995*) im Inneren der Chitinpartikel eine effektive Deacetylierung des Substrates.

Die Aktivität der Chitindeacetylase ist stark vom pH des Mediums abhängig in dem die Reaktion stattfindet. So zeigt die Umsatzgeschwindigkeit in Bezug auf den pH-Wert eine Glockenkurve mit einem Maximum bei pH 7,0. Bekannte Enzyme aus Pilzen haben unterschiedliche pH-Optima. Diese liegen bei den Enzymen aus *Mucor rouxii* (pH 4,5), *Adsidia coerulea* (pH 5,0) und *Uredinale viciae-fabae* (pH 5,5-6,0) im sauren Bereich. Die CDA aus *Aspergillus nidulans* hat bei pH 7,0 die höchste Umsatzrate, während die pH-Optima bei den Chitindeacetylase aus *C. lindemuthianum* (pH 11,5) und *S. cerevisiae* Cda2p (pH 8,0) im Alkalischen liegen.

Für die Zugänglichkeit der Acetylgruppen ist die Reaktion bei pH 7,0 ungünstig. Im sauren Milieu ist die Löslichkeit des Chitins geringfügig erhöht, während im Basischen Chitin aufquillt und ebenfalls für Enzyme leichter zugänglich ist.

Neben dem pH-Wert spielt die Reaktionstemperatur eine wichtige Rolle. Bei 25°C wird das Optimum erzielt. Auch hier unterscheidet sich das untersuchte Enzym von den meisten bekannten Chitindeacetylase, die Temperaturen zwischen 50°C und 60°C bevorzugen und in diesem Bereich thermostabil sind. Lediglich die Isoenzyme aus *Uredinale viciae-fabae* zeigen ebenfalls keine Thermostabilität. Untersuchungen zur thermischen Stabilität haben gezeigt,

dass die Inkubation der CDA bei 50°C innerhalb weniger Minuten zum irreversiblen Aktivitätsverlust führt. Hohe Temperaturen führen offenbar zur Zerstörung von Strukturen, die für die Enzymaktivität eine entscheidende Rolle spielen. Diese Vermutung konnte durch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen manifestiert werden, bei denen sich zeigte, dass das Enzym bei 50°C völlig denaturiert vorliegt.

Das vergleichsweise niedrige Temperaturoptimum kann auch die relativ geringe spezifische Aktivität des Enzyms von 2,16 nkat/mg erklären. Eine Anhebung der Reaktionstemperatur ist i.a. ein probates Mittel, um die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion zu erhöhen. Die Stabilität des Enzyms jedoch erlaubt diese Option unter den getesteten Bedingungen nicht. Andererseits bedeutet das niedrige Temperaturoptimum auch eine schonende Umsetzung des Substrats.

Quelle	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cda2p	<i>Mucor rouxii</i>	<i>Absidia coerulea</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Colletotricium lindemuthianum</i> (ATCC 56676)	CDA aus 99/6
Lokalisation	Rekombinant	Periplasma	Periplasma	Kulturmedium	Kulturmedium	Rekombinant
M_w (kDa)	43	75	75	27	31,5	27,2 (Monomer)
opt. pH	8,0	4,5	5,0	7,0	11,5	7,0
opt. Temp. (°C)	50	50	50	50	60	25
Acetat-Inhibition	ja	ja	ja	nein	nein	nein
mindest Substratkettlänge	2	3	3	2	2	2
Umsetzung von Glycolchitin	ja	ja	ja	ja	ja	nein

Abbildung 4-1: Vergleich der biologischen und biophysikalischen Eigenschaften verschiedener CDAs.

Obwohl es sich bei der Chitindeacetylase offensichtlich um ein allosterisches Homooligomer handelt, zeigt sie bezüglich der Substratkonzentration keine Kooperativität, d.h. die Bindung eines Substratmoleküls hat keinen Einfluss auf die Bindung weiterer Substratmoleküle. Des Weiteren geben die Ergebnisse aus der 1-D-¹H-NMR einen Hinweis darauf, dass die Acetylgruppen bei der Di-N-Acetylchitobiose und bei der Tri-N-Acetylchitotriose an allen Positionen gleich schnell hydrolysiert werden. Das Enzym macht also keinen Unterschied zwischen den einzelnen Acetylgruppen, während beispielsweise die CDA aus *Mucor rouxii* am nicht reduzierenden Ende der Zuckerkette beginnend sukzessive die Acetoamidgruppen hydrolysiert (Tsigos, 1999). Weitere Untersuchungen mit länger-kettigen Substraten müssen diesen Befund verifizieren.

4.4 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit behandelte Chitindeacetylase wurde bezüglich verschiedener Parameter untersucht. Dennoch ist es für das Verständnis des Chitinabbaus wichtig, die genaue Tertiär- als auch Quartärstruktur des Enzyms zu untersuchen. Eine kristallographische Untersuchung wäre hierfür die optimale Lösung. Jedoch sind dafür Konzentrationen des Enzyms notwendig, die bislang zur Präzipitation führten. Für die Molmassenbestimmung des oligomeren Proteins und somit für die präzise Bestimmung der Merigkeit mittels Ultrazentrifugation sind ebenfalls hohe Proteinkonzentrationen erforderlich. Aggregation des Proteins führt hier zur Verfälschung der Ergebnisse. Deshalb sind Pufferbedingungen zu untersuchen, die eine hohe Enzymkonzentration zulassen, ohne dabei die native Struktur zu beeinflussen. Alternativ können Vernetzungsexperimente, bei denen die Untereinheiten kovalent miteinander verknüpft werden, zur Klärung des Oligomerisierungsgrades beitragen.

Die Aktivierung des Enzyms durch das gebildete Produkt bedarf ebenfalls genauerer Betrachtung. So müssen weitere Untersuchungen mit länger-kettigen Substraten erfolgen. Es ist zu klären, ob das Acetylierungsmuster bei länger-kettigen Substraten für die Enzymaktivierung eine Rolle spielt und ob Kreuzreaktivität besteht, d.h. ob kurz-kettige Substrate die Aktivierung des Enzyms bei der Deacetylierung länger-kettiger Chitinsubstrate erhöhen und umgekehrt.

Eine Reihe weiterführender Untersuchungen sind für einen industriellen Einsatz notwendig. Die Tatsache, dass die Aufreinigung des Enzyms mit patentgeschützten Systemen (*Strep-TagII* und pMAL) erfolgte, macht den kommerziellen Einsatz unwirtschaftlicher, so dass über alternative Aufreinigungsmethoden nachgedacht werden muss.

Optimal wäre eine Herstellung des Enzyms in hohen Ausbeuten ohne Fusionsprotein. Die Expression des Enzyms könnte in löslicher Form mittels eines frei verfügbaren prokaryotischen Vektors erfolgen. Die Aufreinigung des Enzyms müsste daher durch Austauschchromatographie (Anionen- oder Kationenaustauscher) erfolgen. Offen bleibt, wie groß die Ausbeute des löslichen Proteins vor bzw. nach erfolgter Chromatographie ist. Des Weiteren ist fraglich, ob weitere Chromatographieschritte nötig werden, um eine ausreichende Reinheit zu gewährleisten, die zwangsläufig Kosten der Aufreinigung und dadurch die Konkurrenzfähigkeit des Verfahrens gegenüber konventioneller Produktion beeinflussen. Eine weitere Möglichkeit der Proteingewinnung stellt die Aufreinigung aus *inclusion bodies* dar. Diese Einschlusskörperchen fallen bei der prokaryotischen Überexpression eines Gens an und bestehen weitgehend aus falsch gefalteten Proteinaggregaten. Zu den Vorteilen der Präparation aus *inclusion bodies* gehört, neben der hohen Ausbeute an Rohprotein, die einfache Separierung der *inclusion bodies* von den restlichen Zellbestandteilen. Dadurch liegt das Protein meist in hochreiner Form vor. Außerdem bieten *inclusion bodies* weitgehenden Schutz vor cytosolischen Proteasen. Nachteilig ist die Notwendigkeit einer denaturierenden

Behandlung des Proteins mit anschließender Renaturierung, um nativ gefaltetes und somit aktives Material zu erhalten. Diese Vorgehensweise kann Probleme bereiten, wenn sich das Protein nur teilweise oder falsch rückfaltet. Das Resultat ist oft eine Verminderung der Aktivität bis hin zu ihrem totalen Verlust, sowie erhöhte Aggregationsneigung. Nicht zu vernachlässigen ist die Tatsache, dass es sich bei dem Enzym um einen homooligomeren Komplex handelt, der bei Proteingewinnung aus *inclusion bodies* eine korrekte Konformation ausweisen muss.

Bei industrieller Anwendung sind neben proteinpräparativen Optimierungen weitere Untersuchungen zur Verbesserung der Enzymaktivität bei der Deacetylierung von kristallinen und kolloidalen Chitin, dem eigentlichen Substrat des Enzyms, erforderlich. Da wahrscheinlich der enzymatische Abbau durch die Unzugänglichkeit der Acetylgruppen im Inneren der Substratpartikel limitiert wird, muss vor allem die Vorbehandlung des Substrats genauer untersucht werden. Im Hinblick auf medizinische Applikationen müssen Möglichkeiten gefunden werden, das Enzym nach dem Deacetylierungsprozess vom entstandenen Chitosan zu trennen, um antigene Reaktionen durch Proteinreste auszuschließen. Neben der angestrebten Substitution des chemischen durch einen enzymatischen Prozess der Deacetylierung ist auch eine gegenseitige Ergänzung beider Prozesse vorstellbar. Ziel weiterer Untersuchungen wird nun in Zusammenarbeit mit einem industriellen Partner das *upscaling* der Enzympräparation und des Deacetylierungsprozesses sein.

Trotz der Ausrichtung dieser Arbeit auf die Charakterisierung eines rekombinant hergestellten Enzyms, bietet der Ursprungsorganismus, aus dem das Gen gewonnen wurde, ein attraktives System, um den Metabolismus mariner Organismen zu studieren. Diese unterscheiden sich im Hinblick auf den bekannten Chitinabbauweg über Chitinasen, N-Acetylglucosamidasen sowie der Deacetylierung von N-Acetylglucosamin anderer Organismen (*Bassler, 1991; Tsujibo, 2002*)

5. Literaturverzeichnis

Arakane, Y., Hoshika, H., Kawashima, N., Fujiya-Tsujimoto, C., Sasaki, Y. & Koga, D. (2000). Comparison of chitinase isozymes from yam tuber-enzymatic factor controlling the lytic activity of chitinases. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 723-730.

Araki, Y. & Ito, E. (1975). A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. Enzymatic deacetylation of chitin. *Eur J Biochem* **55**, 71-78.

Bakkers, J., Kijne, J. W. & Spaink, H. P. (1999). Function of chitin oligosaccharides in plant and animal development. *Exs* **87**, 71-83.

Bartkowiak, A. & Hunkeler, D.(2000). Alginate-Oligochitosan Microcapsules II. Control of Mechanical Resistance. *Chem Mater* **12**, 206-212.

Bartnicki-Garcia, S. (1999). Glucans, walls, and morphogenesis: On the contributions of J. G. H. Wessels to the golden decades of fungal physiology and beyond. *Fungal Genet Biol* **27**, 119-127.

Bassler, B. L., Gibbons, P. J., Yu, C. & Roseman, S. (1991). Chitin utilization by marine bacteria. Chemotaxis to chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *J Biol Chem* **266**, 24268-24275.

Beintema, J. J. (1994). Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett* **350**, 159-163.

Beri, R. G., Walker J., Reese, E. T. & Rollings, J. E. (1993). Characterization of chitosans via coupled size-exclusion chromatography and multiple-angle laser light-scattering technique. *Carbohydr Res* **238**, 11-26

Bergmeyer, H. U. & Moellering, H. (1966). Enzymatic determination of acetate. *Biochem Z* **344**, 167-189.

Berth, G., Voigt, A., Dautzenberg, H. & Peter, M. G. (1998). Physicochemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation. *Carbohydr Polym* **36**, 205-216.

Berth, G., Voigt, A., Dautzenberg, H., Donath, E. & Mohwald, H. (2002). Polyelectrolyte complexes and layer-by-layer capsules from chitosan/chitosan sulfate. *Biomacromolecules* **3**, 579-590.

Bisswanger, H. (2000). *Enzymkinetik, Theorie und Methoden*, 3. Aufl., Weinheim: Wiley-VCH.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Briza, P., Ellinger, A., Winkler, G. & Breitenbach, M. (1988). Chemical composition of the yeast ascospore wall. The second outer layer consists of chitosan. *J Biol Chem* **263**, 11569-11574.

- Burnette, W. N. (1981).** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203.
- Carter, P., Nilsson, B., Burnier, J. P., Burdick, D. & Wells, J. A. (1989).** Engineering subtilisin BPN' for site-specific proteolysis. *Proteins* **6**, 240-248.
- Carter, P. & Wells, J. A. (1987).** Engineering enzyme specificity by "substrate-assisted catalysis". *Science* **237**, 394-399.
- Chanzy, H. (1997).** Chitin crystals. *Adv chitin sci* **2**, 11-21.
- Chen, R. H. & Tsaih, M. L. (1998).** Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution. *Int J Biol Macromol* **23**, 135-141.
- Chen, T., Kumar, G., Harris, M. T., Smith, P. J. & Payne, G. F. (2000).** Enzymatic grafting of hexyloxyphenol onto chitosan to alter surface and rheological properties. *Biotechnol Bioeng* **70**, 564-573.
- Christodoulidou, A., Bouriotis, V. & Thireos, G. (1996).** Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**, 31420-31425.
- Colombo, P. & Sciutto, A. M. (1996).** Nutritional aspects of chitosan employment in hypochaloric diet. *Acta Toxicol Ther* **17**, 287-302.
- Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (1999).** Life with no sugars? *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 307-308.
- Davis, L. L. & Bartnicki-Garcia, S. (1984).** The coordination of chitosan and chitin synthesis in *Mucor rouxii*. *J Gen Microbiol* **130 (Pt 8)**, 2095-2102.
- Debelle, F., Plazanet, C., Roche, P., Pujol, C., Savagnac, A., Rosenberg, C., Prome, J. C. & Denarie, J. (1996).** The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol Microbiol* **22**, 303-314.
- Deikman, J. (1997).** Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiol Plantarum* **100**, 561-566.
- Denarie, J., Debelle, F. & Prome, J. C. (1996).** *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* **65**, 503-535.
- Denuziere, A., Ferrier, D. & Domard, A. (1996).** Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan hyaluronate polyelectrolyte complexes. *Carbohydr Polym* **29**, 317-323.
- Dixon, M. & Kleppe, K. (1965).** *Biochim Biophys Acta* **146**, 54
- Dixon, M., Webb, E.C., Throne, C. J. R. & Tipton, K, F. (1979).** *Enzymes, 3rd ed.*, Suffolk: The Chaucer Press.

- Domszy, J.G. & Roberts, G. A. F. (1985).** Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan. *Makromol Chem* **186**, 1671-1677.
- Dornish, M., Skaugrud, O., Illum, L. & Davis, S. S. (1997).** Nasal Drug delivery with Protosan. *Adv Chitin Sci* **2**, 694-697.
- Ebert, G. (1993).** *Biopolymere*, Stuttgart: Teubner.
- Engelhardt, H., Forchhammer, K., Muller, S., Goldie, K. N. & Bock, A. (1992).** Structure of selenocysteine synthase from *Escherichia coli* and location of tRNA in the seryl-tRNA(sec)-enzyme complex. *Mol Microbiol* **6**, 3461-3467.
- Errington, N., Harding, S. E., Varum, K. M. & Illum, L. (1993).** Hydrodynamic characterization of chitosans varying in degree of acetylation. *Int J Biol Macromol* **15**, 113-117.
- Frazier, S. F., Larsen, G. S., Neff, D., Quimby, L., Carney, M., DiCaprio, R. A. & Zill, S. N. (1999).** Elasticity and movements of the cockroach tarsus in walking. *J Comp Physiol A* **185**, 157-172.
- Frieden, C. (1970).** Kinetic aspects of regulation of metabolic processes. The hysteretic enzyme concept. *J Biol Chem* **245**, 5788-5799.
- Gades, M. D. & Stern, J. S. (2002).** Chitosan supplementation does not affect fat absorption in healthy males fed a high-fat diet, a pilot study. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**, 119-122.
- Gao, X. D., Katsumoto, T. & Onodera, K. (1995).** Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *J Biochem (Tokyo)* **117**, 257-263.
- Girola, M., De Bernadi, M., Contos, S., Tripodi, S., Ventura, P., Guarino, C. & Marletta, M. (1996).** Dose effect in lipid-lowering activity of a new dietary integrator. *Acta Toxicol Ther* **17**, 25-40.
- Gooday, G. W. & Ferguson, M. J. L. (1996).** Environmental recycling of chitin. *Chitin Enzymology, Vol. 2* (R. A. A. Muzzarelli, Ed.), Grottammare: Atec.
- Gooday, G.W. (1997).** Enzymatic biodegradation pathways of chitin and chitosan. *International Symposium Chitin/Chitosan*, Lübeck.
- Gooday, G. W. (1999).** Aggressive and defensive roles for chitinases. *Exs* **87**, 157-169.
- Griesler, R. (1999).** Structure and function and structure and stability relationships in starch-phosphorylase from *Corynebacterium callunae*. *Dissertation*, Wien: Universität für Bodenkultur, Institut für Lebensmitteltechnologie.
- Guerrero, L., Omil, F., Mendez, R. & Lema, J. M. (1998).** Protein recovery during the overall treatment of wastewaters from fish-meal factories. *Bioresour Technol* **63**, 221-229.
- Guibal, E., Milot, C. & Roussy, J. (1997).** Chitosan gel beads for metal ion recovery. *Chitin Handbook* (Muzzarelli, R. A. A., Peter, M. G., Eds.), Grottammare: Atec, 423-429.

- Haas, F., Gorb, S. & Blickhan, R. (2000).** The function of resilin in beetle wings. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **267**, 1375-1381.
- Hackman, R. H. (1987).** Chitin and the fine structure of insect cuticles. *Chitin and Benzoylphenyl Ureas* (Wright, J. E., Retnakaran, A. Eds.), Dordrecht: W. Junk.
- Han, L. K., Kimura, Y. & Okuda, H. (1999).** Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* **23**, 174-179.
- Herrera-Estrella, A. & Chet, I. (1999).** Chitinases in biological control. *Exs* **87**, 171-184.
- Hesse, M., Meier, H. & Zeeh, B. (1991).** *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Hirano, S. (1986).** Chitin and Chitosan. *Ulman's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Campell, E. T., Pfefferkorn, R., Rounsaville, J. F., Eds.), Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 231-232.
- Hirano, S. (1989).** Production and application of chitin and chitosan in Japan. *Chitin and Chitosan* (Skjak-Braek, G., Anthonsen, T., Sandford, P., Eds.), London: Elsevier Applied Science, 37-73.
- Holme, K. R. & Perlin, A. S. (1997).** Chitosan N-sulfate. A water-soluble polyelectrolyte. *Carbohydr Res* **302**, 7-12.
- Horst, M. N. (1986).** Lipid-linked intermediates in crustacean chitin synthesis. *Chitin in Nature and Technology* (Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C., Gooday, G. W., Eds.), New York: Plenum Press, 45-52.
- Horst, M. N. & Walker, A. N. (1993).** Crustacean chitin synthesis and the role of the Golgi apparatus. *Chitin Enzymology* (Muzzarelli, R. A. A., Ed.), Lyon: European Chitin Society, 109-118.
- Ibrahim, G. H., Smartt, C. T., Kiley, L. M. & Christensen, B. M. (2000).** Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **30**, 1213-1222.
- Jaspar-Versali, M. F. & Clerisse, F. (1997).** Expression and characterization of recombinant chitin deacetylase. *Adv Chitin Sci* **2**, 273-278.
- Jeuniaux, C., Compere, P., Toussaint, C., Decloux, N. & Voss-Foucart, M. F. (1996).** Confirmation of the presence of chitin in fin cuticles of some Blennidae [Telestei] by enzymatic and cytochemical methods. *Adv Chitin Sci* **1**, 18-25.
- John, M., Rohrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U. & Schell, J. (1993).** Rhizobium NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 625-629.
- Kafetzopoulos, D., Martinou, A. & Bouriotis, V. (1993).** Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2564-2568.

- Kafetzopoulos, D., Thireos, G., Vournakis, J. N. & Bouriotis, V. (1993).** The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8005-8008.
- Khan, T. A., Peh, K. K. & Ch`ng, H. S. (2002).** Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J Pharm Pharmaceut Sci* **5**, 205-212.
- Kamst, E., Bakkers, J., Quaedvlieg, N. E., Pilling, J., Kijne, J. W., Lugtenberg, B. J. & Spaink, H. P. (1999).** Chitin oligosaccharide synthesis by rhizobia and zebrafish embryos starts by glycosyl transfer to O4 of the reducing-terminal residue. *Biochemistry* **38**, 4045-4052.
- Kapust, R. B. & Waugh, D. S. (1999).** Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* **8**, 1668-1674.
- Kawasaki, T., Kawasaki, M., Notomi, A., Itoh, K. & Ikeyama, N. (1998).** Effects of chito-oligosaccharides on blood pressure, lipid and glucose metabolism in clinically healthy subjects – a randomized single-blind placebo-controlled crossover trial. *Kichin, Kitosan Kenyu* **4**, 316-324.
- Keyhani, N. O. & Roseman, S. (1999).** Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1473**, 108-122.
- Knaul, J. Z., Hudson, S. M. & Creber, K. A. M. (1999).** Improved mechanical properties of chitosan fibers. *J Appl Polym Sci* **72**, 1721-1732.
- Kobarg, S. & Hess, K. J. (1997).** Abfall oder wertvolle nachwachsende Rohstoffe? *Internationales Symposium Chitin/Chitosan: Isolierung, Charakterisierung, Anwendung*, Lübeck.
- Koga, D., Mitsutomi, M., Kono, M. & Matsumiya, M. (1999).** Biochemistry of chitinases. *Exs* **87**, 111-123.
- Koga, D., Sasaki, Y., Uchiumi, Y., Hirai, N., Arakane, Y. & Nagamatsu, Y. (1997).** Purification and characterization of Bombyx mori chitinases. *Insect Biochem Mol Biol* **27**, 757-767.
- Kolattukdy, P. E. (1980).** Biopolyester membranes of olants: cutin and suberin. *Science* **208**, 990-1000.
- Kolattukdy, P. E. (1985).** Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Ann Rev Phytopath* **23**, 223-250.
- Kumar, G., Smith, P. J. & Payne, G. F. (1999).** Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnol Bioeng* **63**, 154-165.
- Kumar, M. N. V. R. (2000).** A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* **46**, 1-27.

- Kurita, K. (1997).** Chitin and chitosan derivatives. *Desk Reference of Functional Polymers, Synthesis and Applications* (Arshady, R., Ed.), Washington, DC: American Chemical Society, 239-259.
- Kussman, M., Nordhoff, E., Rahbeck-Nielsen, H., Haebel, S., Rossel-Larsen, M., Jacobsen, L. & Gobom, L. (1997).** Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed favorius peptide and protein analytes. *J Mass Spectrom* **32**, 593-601.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lang, G. (1995).** Chitosan derivatives – preparation and potential uses. *Chitin Chitosan* (Zakaria, M. B., Wan-Muda, W. M., Pauzi, A. Eds.), Bangi: Penerbit University Kebangsaan Malaysia, 109-118.
- Larsen, G. S., Frazier, S. F., Fish, S. E. & Zill, S. N. (1995).** Effects of load inversion in cockroach walking. *J Comp Physiol [A]* **176**, 229-238.
- Leal-Morales, C. A., Bracker, C. E. & Bartnicki-Garcia, S. (1994).** Subcellular localization, abundance and stability of chitin synthetases 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **140 (Pt 9)**, 2207-2216.
- Londershausen, M., Turberg, A., Ludwig, M., Hirsch, B. & Spindler-Barth (1996).** Characterization and inhibitor studies of chitinases from a parasitic blowfly (*Lucilia cuprina*), a tick (*Boophilus microplus*), an intestinal nematode (*Haemonchus contortus*) and a bean (*Phaseolus vulgaris*). *Pest Sci* **48**, 305-314.
- Ludwig, M., Spindler-Barth, M. & Spindler, K. D. (1991).** Properties of chitin synthase in homogenates from *Chironomus* cells. *Arch Biochem Physiol* **18**, 251-263.
- Macchi, G. (1996).** A new approach to the treatment of obesity: chitosan`s effects on body weight reduction and plasma cholesterol`s levels. *Acta Toxicol Ther* **17**, 303-320.
- Maezaki, Y., Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawai, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., Takekawa, T., Terada, W., Hara, A. & Mitsuoka, T. (1993).** Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**, 1439-1444.
- Marks, E. P. & Ward, G. B. (1987).** Regulation of chitin synthesis: mechanisms and methods. *Chitin and Benzoylphenyl Ureas* (Wright, J. E., Retnakaran, A., Eds.), Dordrecht: W.Junk, 33-42.
- Martinez, J. P., Gimenez, G., Bracker, C. E. & Bartnicki-Garcia, S. (1989).** Sedimentation properties of chitosomal chitin synthetase from the wild-type strain and the 'slime' variant of *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta* **990**, 45-52.
- Matsumiya, M. & Mochizuki, A. (1996).** Distribution of chitinase and β -N-actylhexoamidase in the organs of several fishes. *Fish Sci* **62**, 150-151.

- Mauch, F., Mauch-Mani, B & Boller, T. (1988).** Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Phys* **88**, 936-942.
- Mellersh, D. G. & Heath, M. C. (2001).** Plasma membrane-cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration. *Plant Cell* **13**, 413-424.
- Merz, R. A., Horsch, M., Nyhlen, L. E. & Rast, D. M. (1999).** Biochemistry of chitin synthase. *Exs* **87**, 9-37.
- Meyer, M. F. & Kreil, G. (1996).** Cells expressing the DG42 gene from early *Xenopus* embryos synthesize hyaluronan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4543-4547.
- Mooney, B. P., Henzl, M. T., Miernyk, J. A. & Randall, D. D. (2000).** The dihydrolipoyl acyltransferase (BCE2) subunit of the plant branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex forms a 24-mer core with octagonal symmetry. *Protein Sci* **9**, 1334-1339.
- Muzarelli, R. A. A. (1973).** *Natural Chelating Polymers*, London: Pergamon Press.
- Muzarelli, R. A. A. (1997).** Human enzymic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Mol Life Sci* **53**, 131-140.
- Muzarelli, R. A. A. (1998).** Management of hypercholesterolemia and overweight by oral administration of chitosans. *Biomed Health Res* **16**, 135-142.
- Muzarelli, R. A. A. (2000a).** Chemical and preclinical studies on 6-oxychitin. *Adv Chitin Sci* 171-175.
- Muzarelli, R. A. A. (Ed.) (2000b).** *Chitosan per os from dietary supplement to drug carrier*, Grottamare: Atec.
- Ohme-Takagi, M., Suzuki, K. & Shinshi, H. (2000).** Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant Cell Physiol* **41**, 1187-1192.
- Ormrod, D. J., Holmes, C. C. & Miller, T. E. (1998).** Dietary chitosan inhibits hypercholesterolaemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **138**, 329-334.
- Overdijk, B. & Van Steijn, G. J. (1994).** Human serum contains a chitinase: identification of an enzyme, formerly described as 4-methylumbelliferyl-tetra-N-acetylchitotetraoside hydrolase (MU-TACT hydrolase). *Glycobiology* **4**, 797-803.
- Overdijk, B., Van Steijn, G. J. & Odds, F. C. (1996).** Chitinase levels in guinea pig blood are increased after systemic infection with *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology* **6**, 627-634.
- Overdijk, B., Van Steijn, G. J. & Odds, F. C. (1999).** Distribution of chitinase in guinea pig tissues and increases in levels of this enzyme after systemic infection with *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **145 (Pt 1)**, 259-269.
- Palli, S. R. & Retnakaran, A. (1999).** Molecular and biochemical aspects of chitin synthesis inhibition. *Exs* **87**, 85-98.

- Park, H. J., Jung, S. T., Song, J. J., Kang, S. G., Vergano, P. J. & Testin, R. F. (1999).** Mechanical and barrier properties of chitosan-based biopolymer film. *Kichin, Kitosan, Kenkyu* **5**, 19-26.
- Park, J. K., Keyhani, N. O. & Roseman, S. (2000).** Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Identification, molecular cloning, and characterization of A N, N'-diacetylchitobiose phosphorylase. *J Biol Chem* **275**, 33077-33083.
- Patil, R. S., Ghormade, V. V. & Deshpande, M. V. (2000).** Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol* **26**, 473-483.
- Peter, M. G. (1992).** Chitin, Chitosan und seine Derivate. *Studie im Auftrag des Ministers für Natur, Umwelt und Landesentwicklung des Landes Schleswig-Holstein*.
- Peter, M., G. (2002).** *Biopolymers, Polysaccharides II* (De Baets, S., Vandamme, E. J., Steinbüchel, A., Eds.), Weinheim: Wiley-VCH.
- Prota, G. (1992).** The role of peroxidase in melanogenesis revisited. *Pigment Cell Res Suppl* **2**, 25-31.
- Quong, D., Groboillot, A., Darling, G. D., Poncele, D. & Neufeld, R. J. (1997).** Microencapsulation with cross-linked chitosan membranes. *Chitin Handbook* (Muzzarelli, R. A. A., Peter, M. G., Eds.), Grottammare: Atec, 405-410.
- Rehm, H. (2002).** *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Remunan-Lopez, C. & Bodmeier, R. (1996).** Mechanical and water vapor transmission properties of polysaccharide films. *Drug Dev Ind Pharm* **22**, 1201-1209.
- Remunan-Lopez, C., Lorenzo-Lamosa, M. L., Vila-Jato, J. L. & Alonso, M. J. (1998).** Development of new chitosan-cellulose multicore microparticles for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* **45**, 49-56.
- Remunan-Lopez, C., Portero, A., Vila-Jato, J. L. & Alonso, M. J. (1998).** Design and evaluation of chitosan/ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery. *J Control Release* **55**, 143-152.
- Ricard, J., Meunier, J. C. & Buc, J. (1974).** Regulatory behavior of monomeric enzymes. 1. The mnemonical enzyme concept. *Eur J Biochem* **49**, 195-208.
- Ride, J. P. & Barber, M. S. (1990).** Purification and characterization of multiple forms of endochitinase from wheat leaves. *Plant Physiol* **71**, 185-197.
- Roberts, G. A. F. (1992).** *Chitin Chemistry*, Houndmills: Macmillan.
- Roberts, G. A. F. (1997).** Chitosan production routes and their role in determination the structure and properties of the product. *Adv Chitin Sci* **2**, 22-31.

- Roche, P., Maillet, F., Plazanet, C., Debelle, F., Ferro, M., Truchet, G., Prome, J. C. & Denarie, J. (1996).** The common nodABC genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15305-15310.
- Ruiz-Herrera, J. & Martinez-Espinoza, A. D. (1999).** Chitin biosynthesis and structural organization in vivo. *Exs* **87**, 39-53.
- Sabnis, S. & Block, L. H. (1997).** Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-acetylation of chitosan. *Polym Bull* **39**, 67-71.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.*, New York: Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Savant, V. D. & Torres, J. A. (2000).** Chitosan-based coagulating agents for treatment of cheddar cheese whey. *Biotechnol Prog* **16**, 1091-1097.
- Sakiyama, T., Takata, H., Kikuchi, M. & Nakanishi, K. (1999).** Polyelectrolyte complex gel with high pH-sensitivity prepared from dextran sulfate and chitosan. *J Appl Polym Sci* **73**, 2227-2233.
- Schmalz, C. (2000).** Molekularbiologisches *Screening* nach neuen Chitindeacetylasen in marinen Mikroorganismen. *Diplomarbeit*, Universität Hannover.
- Schmidt, T. G., Koepke, J., Frank, R. & Skerra, A. (1996).** Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol* **255**, 753-766.
- Schofelmeer, E. A. M., Klis, F. M., Sietsma, J. H. & Cornelissen, B. J. C. (1999).** The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fung Gen Biol* **27**, 275-282.
- Semino, C. E. & Robbins, P. W. (1995).** Synthesis of "Nod"-like chitin oligosaccharides by the *Xenopus* developmental protein DG42. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3498-3501.
- Semino, C. E., Specht, C. A., Raimondi, A. & Robbins, P. W. (1996).** Homologs of the *Xenopus* developmental gene DG42 are present in zebrafish and mouse and are involved in the synthesis of Nod-like chitin oligosaccharides during early embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4548-4553.
- Shahidi, F. & Synowiecki, J. (1992).** Quality and compositional characteristics of Newfoundland shellfish processing discards. *Advances in Chitin and Chitosan* (Brine, C. J., Sandford, P. A., Zikakis, J. P., Eds), London: Elsevier Applied Science, 617-626.
- Shimahara, K., Takiguchi, Y., Kobayashi, T., Uda, K. & Sannan, T. (1989).** Screening of Mucoraceae strains suitable for chitosan production. *Chitin and Chitosan* (Skjak-Braek, G., Anthonsen, T., Sandford, P., Eds.), London: Elsevier Applied Science, 171-178.
- Siegrist, J. & Kaust, H. (1990).** Chitin deacetylase in cucumber leaves infected by *Colletrichium lagenarium*. *Physiol Mol Plant Path* **36**, 267-275.

- Skerra, A. & Schmidt, T. G. (1999).** Applications of a peptide ligand for streptavidin: the Strep-tag. *Biomol Eng* **16**, 79-86.
- Skerra, A. & Schmidt, T. G. (2000).** Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol* **326**, 271-304.
- Spindler, K. D. & Spindler-Barth, M. (1999).** Chitin degradation and synthesis in arthropods. *Chitin in Life Sciences* (Giraud-Guille, M. M., Ed), Lyon: Andre, 41-52.
- Stendberg, E. & Wachter, R. (1996).** Potential of the northern shrimp (*Pandalus borealis*) as a source of chitosan in Norway. *Adv Chitin Sci* **1**, 166-172.
- Stone, C. A., Wright, H., Clarke, T., Powell, R. & Devaraj, V. S. (2000).** Healing at skin graft donor sites dressed with chitosan. *Br J Plast Surg* **53**, 601-606.
- Struszczyk, H. (1987).** Microcrystalline chitosan. I. Preparation and properties of microcrystalline chitosan. *J Appl Polym Sci* **33**, 177-189.
- Struszczyk, M. H., Hahlweg, R. & Peter, M. G. (2000).** Comparative analysis of chitosans from insects and Crustacea. *Adv Chitin Sci* **4**, 40-49.
- Tellam, R. L. & Eisemann, C. (2000).** Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* **30**, 1189-1201.
- Tellam, R. L., Eisemann, C., Casu, R. & Pearson, R. (2000).** The intrinsic peritrophic matrix protein peritrophin-95 from larvae of *Lucilia cuprina* is synthesised in the cardia and regurgitated or excreted as a highly immunogenic protein. *Insect Biochem Mol Biol* **30**, 9-17.
- Terbojevich, M., Cosani, A., Palumbo, M. & Pregnolato, F. (1986).** Structural properties of hyaluronic acid in moderately concentrated solutions. *Carbohydr Res* **149**, 363-377.
- Tsaih, M. L. & Chen, R. H. (1997).** Effect of molecular weight and urea on the conformation of chitosan molecules in dilute solutions. *Int J Biol Macromol* **20**, 233-240.
- Tsigos, I. & Bouriotis, V. (1995).** Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J Biol Chem* **270**, 26286-26291.
- Tsigos, I., Zydowicz, N., Martinou, A., Domard, A. & Bouriotis, V. (1999).** Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides. *Eur J Biochem* **261**, 698-705.
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D. & Bouriotis, V. (2000).** Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol* **18**, 305-312.
- Tsujibo, H., Okamoto, T., Hatano, N., Miyamoto, K., Watanabe, T., Mitsutomi, M. & Inamori, Y. (2000).** Family 19 chitinases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520: molecular cloning and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 2445-2453.

- Tsujibo, H., Orikoshi, H., Baba, N., Miyahara, M., Miyamoto, K., Yasuda, M. & Inamori, Y. (2002).** Identification and characterization of the gene cluster involved in chitin degradation in a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. *Appl Environ Microbiol* **68**, 263-270.
- Watanabe, A., Nong, V. H., Zhang, D., Arahira, M., Yeboah, N. A., Udaka, K. & Fukazawa, C. (1999).** Molecular cloning and ethylene-inducible expression of Chib1 chitinase from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 251-256.
- Watanabe, T., Kimura, K., Sumiya, T., Nikaidou, N., Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Ferrer, S. & Regue, M. (1997).** Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. *J Bacteriol* **179**, 7111-7117.
- Watanabe, T. & Kono, M. (1997).** Isolation of a cDNA encoding a chitinase family protein from cuticular tissues of the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Zoolog Sci* **14**, 65-68.
- Watanabe, T., Kono, M., Aida, K. & Nagasawa, H. (1996).** Isolation of cDNA encoding a putative chitinase precursor in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Mol Mar Biol Biotechnol* **5**, 299-303.
- Watanabe, T., Kono, M., Aida, K. & Nagasawa, H. (1998).** Purification and molecular cloning of a chitinase expressed in the hepatopancreas of the penaeid prawn *Penaeus japonicus*. *Biochim Biophys Acta* **1382**, 181-185.
- Yamano, N., Matsushita, Y., Kamada, Y., Fujishima, S. & Arita, M. (1996).** Purification and characterization of N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase with activity against N-acetylglucosamine from *Vibrio cholerae* non-O1. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**, 1320-1323.
- Zhang, M., Haga, A., Sekiguchi, H. & Hirano, S. (2000).** Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. *Int J Biol Macromol* **27**, 99-105.
- Zielinski, B. A. & Aebischer, P. (1994).** Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation. *Biomaterials* **15**, 1049-1056.
- Zill, S., Frazier, S. F., Neff, D., Quimby, L., Carney, M., DiCaprio, R., Thuma, J. & Norton, M. (2000).** Three-dimensional graphic reconstruction of the insect exoskeleton through confocal imaging of endogenous fluorescence. *Microsc Res Tech* **48**, 367-384.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
aa	<i>amino acid(s)</i>	<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
Abb.	Abbildung	Fa.	Firma
ACES	N-2-Acetamido-2-aminoethansulfonsäure	g	Erdbeschleunigung
AHT	Anhydro-Tetracyclin	g	Gramm
Amp	Ampicillin	Gdn HCl	Guanidiniumhydrochlorid
AP	alkalische Phosphatase	GlcN	Glucosamin
APS	Ammoniumperoxydisulfat	GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
as	Aminosäure(n)	GPa	Gigapascal
bp	Basenpaar(e)	GTP	Guanidiniumtriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-indolylphosphat	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-2-piperazinethansulfonsäure
BES	N,N-Bis(2-hydroxy-ethyl)-2-aminoethansulfonsäure	HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
<i>BLAST</i>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
BSA	Bovines Serum Albumin	i.a.	im allgemeinen
BTB	Bis-Tris-Propan	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
bzw.	beziehungsweise	k	kilo
CDA	Chitindeacetylase	kat	Katal – SI-Einheit der katalytischen Aktivität eines Enzyms: 1 kat = mol _{Substrat} s ⁻¹ ; 1 kat = 16.667 U
Da	Dalton	kb	Kilobasen
DA	Acetylierung	K _M	Michaelis-Menten-Konstante
DD	Deacetylierung	l	Liter
DIPSO	3-[N,N-Bis(hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropan-sulfonsäure	LD ₅₀	letale Dosis bei 50 % der Versuchstiere
DMSO	Dimethylsulfoxid	LDL	<i>low density lipoprotein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	m	milli
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat	μ	micro
DOPA	Dihydroxy-Phenylalanin	M	Molar
<i>EBI</i>	<i>European Bioinformatics Institute</i>	MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption</i>
<i>EC</i>	<i>Enzyme Commision</i>	MCS	<i>multiple cloning site</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>

Mhz	Megahertz	s.a.	siehe auch
min	Minute(n)	SAP	Shrimps Alkalische-Phosphatase
MPB	Maltosebindungsprotein	SDS	Natriumdodecylsulfat
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-propansulfonsäure	t	Tonne(n)
MOPSO	3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonylsulfonsäure	TCA	Trichloressigsäure
Mpa	Megapascal	TFA	Trifluoressigsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>	Tab.	Tabelle
M _w	Molekulargewicht	TAPSO	3-[N-tris(hydroxymethyl)amino]-2-hydroxypropansulfonsäure
n	nano	TAE	Tris-Acetat-Puffer
NaAc	Natriumacetat	TEA	Tris-Ethylamin-Puffer
NaPP	Natriumphosphat-Puffer	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
NBT	Nitroblautetrazolinumchlorid	TES	Tris-EDTA-Saccharose-Puffer
Nod	Nodulation	TOF	<i>Time of flight</i>
OD	Optische Dichte	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ORF	<i>open reading frame</i>	U	unit (Enzymeinheit): alte, nicht SI-Einheit der katalytischen Aktivität eines Enzyms: 1 U = 1 μmol _{Substrat} min ⁻¹ ; 1 U = 1/60 μkat
p	piko	u.a.	unter anderem
PAGE	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese	UDP	Uridin-Diphosphat
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>	ÜNK	Übernachtkultur
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	UV	ultraviolett
PEG	Polyethylenglycol	v	Geschwindigkeit einer Enzymreaktion
pH	potentia Hydrogenii	v.a.	vor allem
Ph	phosphorylierter 5'-Terminus bei PCR-Primern	V ₀	Säulenvolumen
ppm	<i>parts per million</i>	v/v	Volumen pro Volumen
PTS	Phosphotransferase-System	V	Volumen
PVDF	Polyvinylidenfluorid	VIS	visuell(er) Bereich des Lichtspektrums
Pwo	<i>Pyrococcus woesi</i>	w/v	Gewicht pro Volumen
RG	Reaktionsgefäß	YT	<i>Yeast Trypton</i>
RNA	Ribonukleinsäure	z.B.	zum Beispiel
rpm	Umdrehungen pro Minute		
rRNA	<i>ribosom ribonucleic acid</i>		
RT	Raumtemperatur		
s	Sekunde		
S	Svedberg		

6.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Ausschnitt aus der Kettenstruktur von Chitin und Chitosan.....	2
Abbildung 1-2: Wasserstoffbrücken im α -Chitin.....	3
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Polysaccharidketten-Anordnung in α -, β - und γ -Chitin.....	4
Abbildung 1-4: Aufbau der rhizobiellen Nod-Faktoren.....	8
Abbildung 1-5: Postulierte Abbauwege des Chitins in der Natur nach <i>Gooday, 1996</i>	9
Abbildung 1-6: Chemische und biologische Eigenschaften von Chitosan.....	12
Abbildung 1-7: Thermochemischer Prozess der Chitosanherstellung aus Fischereiabfällen.....	15
Abbildung 1-8: Enzymatische Deacetylierung von Chitin zu Chitosan.....	17
Abbildung 1-9: Sequenzhomologie auf Proteinebene verschiedener CDAs und ähnlicher Enzyme.....	18
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Expressionsplasmides pMAL-c2G.....	34
Abbildung 2-2: Aufbau des <i>Semi-Dry-Blotssandwichs</i>	37
Abbildung 3-1: Klonierungsschema der potenziellen <i>cda</i> -Gene in den Vektor pASK-IBA7.....	44
Abbildung 3-2: Klonierungsschema des <i>cda</i> -Gens mit Startcodon 5 in den Vektor pKK233-2.....	45
Abbildung 3-3: Klonierungsschema des <i>cda</i> -Gens mit Startcodon 5 in den Vektor pMAL-c2G.....	46
Abbildung 3-4: Aufreinigung der CDA mit Startcodon 5 als N-terminales <i>Strep-TagII</i> -Fusionsprotein.....	49
Abbildung 3-5: Aufreinigung der CDA als MBP-CDA-Fusionsprotein.....	50
Abbildung 3-6: Chromatogram der Aufreinigung des MBP-CDA-Fusionsproteins.....	50
Abbildung 3-7: Elutionsprofil der CDA und des MBP auf der Hydroxyapatit-Säule.....	51
Abbildung 3-8: Chromatogram der zweiten Amylose-Säule.....	51
Abbildung 3-9: SDS-PAGE der CDA-Abtrennung vom MBP-Fusionprotein.....	52
Abbildung 3-10: Vergleich der enzymatischen Aktivität der fünf exprimierten Proteine des ORF.....	53
Abbildung 3-11: Reaktionskinetik der CDA bei der Deacetylierung von Di-N-Acetylchitobiose.....	54
Abbildung 3-12: Enzymatische Aktivität bei Verwendung unterschiedlicher Puffer.....	56
Abbildung 3-13: Enzymatische Aktivität der CDA bei Anwesenheit verschiedener Agenzien.....	57
Abbildung 3-14: Einfluss des pH auf die Enzymaktivität.....	58
Abbildung 3-15: Einfluss der Temperatur auf die CDA-Aktivität.....	58
Abbildung 3-16: Graphische Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bei der Deacetylierung von Di-N-Acetylchitobiose.....	59
Abbildung 3-17: Lineweaver-Burk-Plot zur graphischen Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante bei Verwendung von Di-N-Acetylchitobiose.....	59
Abbildung 3-18: Hill-Plot zur Darstellung von Substratkooperativität.....	60
Abbildung 3-19: Einfluss verschiedener Stabilisatoren auf die Stabilität des Enzyms.....	62
Abbildung 3-20: Thermische Stabilität der CDA bei Verwendung von 0,15 % PEG-20.000 als Stabilisator.....	62
Abbildung 3-21: Gelfiltrationschromatogram des verdauten CDA-MBP-Fusionsproteins.....	63
Abbildung 3-22: Halblogarithmische Auftragung der Molmasse gegen die Retentionszeit der einzelnen Proteine des Gelfiltrationsstandards.....	64
Abbildung 3-23: <i>Reversed Phase</i> HPLC Chromatogram der CDA.....	65

Abbildung 3-24: Massenspektrum der nativen CDA nach Entfernen des MBP-Fusionsproteins.....	65
Abbildung 3-25: Die Fluoreszenz der CDA ist bei 349 nm linear abhängig von der Konzentration.....	67
Abbildung 3-26: Umwandlungskurve der CDA durch sukzessive Zugabe von 6 M Gdn HCl-Lösung.....	68
Abbildung 3-27: Thermische Denaturierung der CDA.....	68
Abbildung 3-28: Strukturmodell der Di-N-Acetylchitobiose.....	69
Abbildung 3-29: Ausschnitt aus dem ¹ H-NMR-Spektrum während der enzymatischen Deacetylierung von Di-N-Acetylchitobiose.....	70
Abbildung 3-30: IR-Spektrum von kolloidalem Chitin.....	71
Abbildung 4-1: Vergleich der biologischen und biophysikalischen Eigenschaften verschiedener CDAs.....	79
Abbildung 7-1: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des <i>open reading frame</i>	97
Abbildung 7-2: Multiples Sequenzalignment auf Proteinebene des <i>open reading frame</i> mit CDAs, sowie homologen Enzymen (NodB-Proteinen).....	98

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Biochemischer Pfad der Chitinbiosynthese.....	7
Tabelle 1-2: Übersicht der chitinolytischen Enzyme bei der Degradation über den Chitinaseweg.....	9
Tabelle 1-3: Chemische Modifikationen von Chitin und Chitosan.....	11
Tabelle 1-4: Postulierte Chitindegredation über den Chitindeacetylaseweg.....	19
Tabelle 2-1: Übersicht der verwendeten PCR- <i>Primer</i> zur Insertion und Deletion von DNA-Abschnitten.....	26
Tabelle 2-2: Übersicht der verwendeten PCR- und <i>cycle sequencing-Primer</i>	26
Tabelle 2-3: Übersicht und Eigenschaften der verwendeten Expressionsplasmide.....	35
Tabelle 2-4: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel bei der SDS-PAGE.....	36
Tabelle 2-5: Zusammensetzung der Puffer, in denen die CDA während der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen vorlag.....	41
Tabelle 3-1: Expressionsoptimierung von verschiedenen CDA-Fusionsproteinen.....	48
Tabelle 3-2: Bilanzierung der Aufreinigung der CDA als MBP-Fusionsprotein.....	52
Tabelle 3-3: Vergleich der Deacetylierung von verschiedenen Chitin-Substraten.....	55
Tabelle 3-4: Enzymatische Aktivität der verschiedenen Fusionsproteine.....	61
Tabelle 3-5: Auswertung der IR-Spektren verschiedener Substrate vor und nach CDA-Verdau.....	72

	(1) 1	10	20	30	40	55
1	(1)	MQIKTFALSAAIAQVATLALADTSANYWQSF	TSQINPKNISIPSIEQTSSIDPTQ			
2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
3	(1)	-----	-----	MRIQLNTIDLQCIIALSCLGQFVHAEANRE		
4	(1)	-----	-----	MKIFNTIQSVLFAAFFLKQGNCLASN--		
5	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
6	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
7	(1)	-----	LVPRAAGGHGLRDVRRPDRHPVRLGGHRRRPPGAARPA			
	(56) 56	70	80	90	100	110
1	(56)	ECAYYTPDASLFTFNASEWPSIWEVATTNGMNESAEFLSVYNSIDWTKAPNISVSR				
2	(1)	-----	-----	MHFSTLLGAAATAALAGS		
3	(31)	DLKQIDFQFPVLERAAKTFFPDWLSAFTGLKEWPGLDPPYIPLDFIDFSQIPDY				
4	(27)	-----	GSTALMGEVDMQTPFPEWLTEFTNLTQWPGIDPPYIPLDYINLTEVPEL			
5	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
6	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
7	(43)	RPGLRPGRRLVVPPCPGRHPRRCRAAAAPRPGCVLLGCGPPQARRAGRTPDVTPL				
	(111) 111	120	130	140	150	165
1	(111)	TLDANGNLDTTGYNTATDPDCWWTATTCTSPKISDINDDTSKCPPEPETWGLTYDD				
2	(19)	TNASPLARRQVPVG---TP-----	ILQCTQFGLWALTYDD			
3	(86)	KEYDQNHCDSPRDCSFCFCHHCT-----	EHDDVYTCSKLSQTFDD			
4	(76)	DRYYPGQCPKISREQCSFDCYNCI-----	DVDDVTSFCFKLSQTFDD			
5	(1)	MKNLNIIDSVD-----	V DAGADDPVYLTFFDD			
6	(1)	MKHLDIHEVPS-----N-----	CDYGTEDRSIYLTFFDD			
7	(98)	VVRRRDIEQDVPPAGAFRGVAYARGRVPAAALTRALG--TFCVDTDKVFALTYDD				
	(166) 166	180	190	200	210	220
1	(166)	GPN-CSHNAFYDYLQEQK LKASMEFYIGSNVV-----	DWPY GAMRGVVDGHHIASH			
2	(51)	GP-FTFTAQILDILKQNDVKATFFVNGNWNANIEAGSNPDTIRRRRADGHLVGS				
3	(127)	GP-----SASTKLLDRLKHNSTFFNLGVNIV-----	QHPDIYQRMQKEGHLIGSH			
4	(117)	GP-----APATEALLKKLRQRTTFFVLGINTV-----	NYPDIYEHILERGHLLIGTH			
5	(28)	GNPFCTPHILDVLAQHAVSATFFVIGANAE-----	VHPGLVQRIVSEGHGVANH			
6	(30)	GNPNHCTPEILDVLAQHAVPATFFVIGTYAK-----	SOPELIRRIVAEGHEVANH			
7	(151)	GPDRSSTPAVLDTLARHGARATFVLSAAVR-----	SHPLLRIRIVDEGHEIALH			
	(221) 221	230	240	250	260	275
1	(215)	TWSHPQMTTKT-NQEVLAEFYYTQKAIKLATGLTPRYWRPPYGDIDDRVRWIASQ				
2	(105)	TYAHPDLNLTLS-SADRI SQMRQLEEBATRRIDGFAPKYMRAPYLSCDAGCQDGLGG				
3	(173)	TWSHVYLPNVS-NEKIIAQIEWSIWAMNATGNHTPKWFRPPYGGIDNRVRAITRQ				
4	(163)	TWSHEFLPSLS-NEEIVAQIEWSIWAMNATGKHFPKYFRPPYGAIDNRVRAIVKQ				
5	(78)	TMTHPDLATCSR PQVEREIDEANRAIISACPGASIRHIRAPYGKWTEEALVKSAS				
6	(80)	TMTHPDLSTCGPHEVEREIVEASEAIIAACPOAAVRHIRAPYGVWSEEALTRSAS				
7	(201)	GRDHRSLLTLS-DRDAVSMIRDARAEVEDVAGRAVRSYRPPYGEHTWGQARGVRG				
	(276) 276	290	300	310	320	330
1	(269)	LGLTAVIWNLDTDW SAGVTTTVEAVEQSYSDYI AMGTNGTFANS GNIVLTHEIN				
2	(159)	LG YHI IDTNI LDTKDYENNKPETTHLSAEKFDNELSGDVG-----ANSYIVLSDVH				
3	(227)	FGLQAVLWDHDTFDW SLLLNSVITEQEILQNVINWNKS-----GTGLILEHDST				
4	(217)	FGLTVVLDLDTFDWKLITNDDFRTEEEIILMDINTWKKGK-----RKGLILEHDGA				
5	(133)	LGLAVVHWSVDRDWS CPG-----VDAIVDRVLAAAK-----PGSIVLLHEDG				
6	(135)	AGLTATHWSADPRDWSRPG-----ANAIVDAVLDLSDV-----PGAIVLLHDGC				
7	(255)	LGLLELVVWSGDAFDWVDDA-----ASAVADRALAAVF-----PGAILLLHDTR				
	(331) 331	340	350	360	370	385
1	(324)	TTMSLAVENLPKIIISAYKQVIDVATCYNISHPYFEDYEWTVNLNGTKSSATASGS				
2	(210)	EQTVVSLTQRLIDTLKSKGYRAVTVGECLGDA PENWYKA-----				
3	(277)	EKTVDLAIKINKLIGDDQSTVSHCVGGIDYIKEFLS-----				
4	(267)	RRTVEVAIKINELIGSDQLTIAECTGTDYIERD-----				
5	(176)	PPGAADPTKLPTLRDQTLAAISAITKSLRSRGLTIRSLP-----				
6	(178)	PP--DESGALTLRDQTLMA LSRIVPALHERGFAIRPLPPH-----				
7	(298)	ADPETLGPGERLPADRGEVLDRIILTATRADGYTGTNTNALT SRHRVVKSVARER				
	(386) 386	400	410	428		
1	(379)	ATSASASGGATTAAAHIQASTSGAMSVLPNLALISAFIATLLF				
2	(249)	-----	-----	-----	-----	-----
3	(313)	-----	-----	-----	-----	-----
4	(302)	-----	-----	-----	-----	-----
5	(215)	-----	-----	-----	-----	-----
6	(218)	-----	-----	-----	-----	-----
7	(353)	MVRR-----	-----	-----	-----	-----

Abbildung 6-2: Multiples Sequenzalignment auf Proteinebene des *open reading frame* mit CDAs, sowie homologen Enzymen (NodB-Proteinen). (1) *Mucor rouxii*, (2) *Colletotrichum lindemuthianum*, (3) *Saccharomyces cerevisiae I*, (4) *Saccharomyces cerevisiae II*, (5) *Rhizobium galegae* (NodB), (6) *Sinorhizobium meliloti* (NodB), (7) *open reading frame* aus 99/6.

6.4 Danksagung

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Bernd Otto für die Überlassung des Themas, der fortwährenden Unterstützung und die positive Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Walter Müller für das freundlicherweise übernommene Korreferat der Dissertation.

Dr. Hayssam Zakaria für zahlreiche thematische Anregungen, der Unterstützung bei diversen Computerproblemen, sowie seiner Diskussionsbereitschaft.

Dr. Marco Kresin für seinen reichen Fundus an proteinchemischen Erfahrungen, sowie seine freundliche und hilfsbereite Art und Weise.

Andreas Busche und Florian Battermann für das freundliche Arbeitsklima, der fachlichen Diskussion und zahlreicher methodischer Unterstützung, vor allem beim Finden von diversen Laborgegenständen.

Frau Reinhild Bähr danke ich für die technische Unterstützung im Labor sowie für ihre Hilfe bei der Herstellung von verschiedenen Plasmidkonstrukten.

Allen Mitarbeitern in der des IGB und ITEM für das angenehme Arbeitsklima und die allzeit freundliche Unterstützung beim lösen kleiner Probleme.

Dr. M. Ekhlesi-Hundrieser und Christine Hettel des Instituts für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule für ihre tatkräftige Unterstützung bei *Reversed-Phase*-HPLC und Massenspektrometrie.

Herr Bernd Schmietenknop von der Fachhochschule Oldenburg-Ostfriesland-Wilhelmshaven für die Durchführung der infrarotspektroskopischen Messungen und dem Austausch von Ideen.

Dr. Jochen Meens und Christine Schreiber vom Institut für Mikrobiologie der Universität Hannover für ihre Hilfe bei verschiedenen Fragestellungen.

Herrn Elend von der Abteilung für Bio- und Umweltanalytik des Fraunhofer ITEM in Hannover für die Zusammenarbeit und Erläuterungen bei der NMR-Spektroskopie.

Den diversen Künstlern aller Richtungen, deren Werke nicht nur Inspiration, sondern auch Seelenbalsam sind.

Meiner Freundin Judit Oldekamp danke ich für mehr als Worte sagen können.

Meinen außerordentlichen Dank haben meine Eltern verdient. Ihnen möchte ich einfach für all die Geduld, das Vertrauen und ihre Hingabe danken.

6.5 Lebenslauf

Name Christian Schmalz
Geburtsdaten 02.08.1975 in Kassel
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

08/1982 - 06/1986 Grundschule in Kassel
08/1986 – 07/1988 Orientierungsstufe in Kassel
09/1988 - 06/1995 Wilhelm-Schule, Gymnasium in Kassel, Abitur, Note: sehr gut (1,3)

Studium und Promotion

09/1995 - 04/2000 Biochemiestudium an der Universität Hannover. Schwerpunkte: Biochemie, Organische Chemie und Pharmakologie. Note: sehr gut
05/2000 - 11/2000 Diplomarbeit am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik bei Prof. Dr. Otto in Hannover. Thema: *Molekularbiologisches Screening nach neuen Chitindeactylasen in marinen Mikroorganismen*. Note: sehr gut
12/2000 - 07/2003 Dissertation am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik bei Prof. Dr. Otto in Hannover. Thema: *Expression, Aufreinigung und Charakterisierung einer marinen Chitindeacetylase*. Note: ausgezeichnet
10/2002 – 6/2003 Projektarbeit Stabilisierung von Interferon-Gamma durch Pegylierung

Auszeichnungen

10/2002 Erhalt des vom bayerischen Staatsministerium für Wirtschaft, Verkehr und Technologie gestifteten Hugo-Geiger-Preises der Fraunhofer-Gesellschaft für die beste Diplomarbeit.