



Eva Kranen (Autor)  
**Autodisplay komplexer Enzyme für biokatalytische  
Anwendungen**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/406>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany  
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Biokatalyse .....</b>	<b>12</b>
3.1.1	Oxidoreduktasen in der Biokatalyse .....	13
3.1.1.1	Möglichkeiten zur Regenerierung von Pyridinnukleotid-Cofaktoren.....	14
3.1.2	NADH-Oxidasen.....	15
3.1.2.1	Die NADH-Oxidase NO <sub>x</sub> aus <i>Lactobacillus brevis</i> .....	18
3.1.3	Transferasen in der Biokatalyse .....	18
3.1.4	Prenyltransferasen.....	19
3.1.4.1	Die Prenyltransferase FgaPT2 aus <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	20
3.1.5	Ganzzellbiokatalysatoren.....	21
3.1.5.1	Autodisplay von Enzymen zur Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren.....	22
3.1.6	Ziele der Arbeit .....	24
<b>4</b>	<b>MATERIALIEN.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>26</b>
4.1.1	Geräte .....	26
4.1.2	Chemikalien und Materialien .....	27
4.1.3	Reagenziensätze („kits“).....	28
4.1.4	Antikörper.....	29
4.1.5	Enzyme .....	29
4.1.6	Oligonukleotide .....	29
4.1.7	Bakterienstämme .....	29
4.1.8	Plasmide.....	30
<b>4.2</b>	<b>Nährmedien, Puffer und Lösungen.....</b>	<b>30</b>
4.2.1	Nährmedien.....	30
4.2.2	Puffer und Lösungen .....	31
<b>5</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	<b>Arbeiten mit Bakterien .....</b>	<b>35</b>
5.1.1	Kultivierung .....	35
5.1.2	Stammhaltung .....	35
5.1.3	Bestimmung der optischen Dichte.....	36
5.1.4	Induktion der Proteinexpression .....	36
5.1.5	Herstellung elektrokompetenter Stämme.....	36
5.1.6	Transformation durch Elektroporation.....	37
5.1.7	Lyophilisieren von Zellproben.....	37
<b>5.2</b>	<b>Arbeiten mit Nukleinsäuren .....</b>	<b>38</b>
5.2.1	Plasmidisolierung.....	38
5.2.2	Polymerasekettenreaktion .....	38
5.2.3	Ligation.....	39

5.2.4	Entsalzen von DNA-Lösungen mittels Dialyse.....	39
5.2.5	Enzymatische Spaltung von DNA-Fragmenten .....	40
5.2.6	Agarosegelelektrophorese.....	40
5.2.7	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel .....	40
5.2.8	DNA-Sequenzanalyse .....	41
<b>5.3</b>	<b>Arbeiten mit Proteinen.....</b>	<b>41</b>
5.3.1	Isolierung von Proteinen der äußeren Bakterienmembran .....	41
5.3.2	Proteasezugänglichkeit oberflächenexprimierter Proteine .....	42
5.3.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	42
5.3.4	Western Blotting .....	43
5.3.5	Immunfärbung .....	44
<b>5.4</b>	<b>Arbeiten mit Ganzzellbiokatalysatoren .....</b>	<b>44</b>
5.4.1	Vorbereitung von Zellen für NADH-Oxidase-Aktivitätsbestimmungen .....	44
5.4.2	Photometrische NADH-Oxidase-Aktivitätsbestimmung .....	44
5.4.3	Photometrischer NADH-Oxidase-Aktivitätstest im Mikrotiterplattenmaßstab .....	45
5.4.4	Berechnung der Aktivität nach dem Lambert-Beerschen Gesetz .....	45
5.4.5	Lagerungsfähigkeit von NO <sub>x</sub> -Ganzzellbiokatalysatoren .....	46
5.4.6	Wiederverwendbarkeit von NO <sub>x</sub> -Ganzzellbiokatalysatoren .....	47
5.4.7	Einsatz von NO <sub>x</sub> -Ganzzellbiokatalysatoren zur Cofaktorregenerierung.....	47
5.4.8	Vorbereitung von Zellen für FgaPT2-Aktivitätsbestimmungen.....	48
5.4.9	HPLC-gestützter FgaPT2-Aktivitätstest.....	49
5.4.10	Untersuchung von Reaktionsprodukten mittels LC-MS.....	49
5.4.11	Lagerungsfähigkeit von FgaPT2-Ganzzellbiokatalysatoren.....	49
5.4.12	Wiederverwendbarkeit von FgaPT2-Ganzzellbiokatalysatoren.....	50
<b>6</b>	<b>EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE.....</b>	<b>51</b>
<b>6.1</b>	<b>Autodisplay der NADH-Oxidase aus <i>Lactobacillus brevis</i> .....</b>	<b>51</b>
6.1.1	Genkonstruktion .....	51
6.1.2	Expression und Oberflächenständigkeit der NO <sub>x</sub> .....	52
6.1.3	Aktivitätsbestimmung des NO <sub>x</sub> -Ganzzellbiokatalysators .....	54
6.1.3.1	Optischer Test nach Otto Warburg .....	54
6.1.3.2	NADH-Oxidase-Aktivität NO <sub>x</sub> -präsentierender, lyophilisierter Zellen .....	56
6.1.3.3	NADH-Oxidase-Aktivität NO <sub>x</sub> -präsentierender „resting cells“ .....	59
6.1.3.4	NADH-Oxidase-Aktivität von NO <sub>x</sub> -präsentierenden <i>E. coli</i> UT5600(DE3) .....	60
6.1.4	Optimierung der Aktivitätsbestimmung .....	61
6.1.4.1	Aktivitätsbestimmung durch Messung von Zellüberständen im Mikrotiterplattenformat .....	61
6.1.4.2	Aktivitätsbestimmung durch Messung von Zellsuspensionen im Mikrotiterplattenformat .....	64
6.1.5	Optimierung der Umsetzungsparameter .....	65
6.1.5.1	Optimierung des Kulturmediums.....	65
6.1.5.2	Untersuchungen zu Stabilität und Lagerungsfähigkeit des NO <sub>x</sub> -Ganzzellbiokatalysators.....	71
6.1.5.3	Untersuchungen zur Wiederverwendbarkeit des NO <sub>x</sub> -Ganzzellbiokatalysators .....	77
6.1.6	Einsatz des NO <sub>x</sub> -Ganzzellbiokatalysators als regenerierendes System.....	79
6.1.7	Die Rolle des FAD-Cofaktors bei Expression und Aktivität der NO <sub>x</sub> .....	84
<b>6.2</b>	<b>Autodisplay der Prenyltransferase aus <i>Aspergillus fumigatus</i> .....</b>	<b>91</b>
6.2.1	Genkonstruktion .....	91
6.2.2	Expression und Oberflächenständigkeit der Prenyltransferase FgaPT2.....	92
6.2.3	Aktivitätsbestimmung des FgaPT2-Ganzzellbiokatalysators .....	94
6.2.3.1	Umsetzung von Indol-3-propionsäure und L-β-Homotryptophan .....	94
6.2.3.2	Regioselektivität der Reaktion des FgaPT2-Ganzzellbiokatalysators.....	97
6.2.3.3	Optimierung der Umsetzung .....	99
6.2.3.4	Untersuchung zu Wiederverwendbarkeitsmöglichkeiten .....	100

6.2.3.5	Untersuchungen zu Stabilität und Lagerungsfähigkeit.....	101
6.2.3.6	Effizienz des FgaPT2-Ganzzellbiokatalysators.....	102
<b>7</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>104</b>
7.1	Autodisplay der NOx .....	104
7.2	Inkorporierung des FAD-Cofaktors.....	108
7.3	Autodisplay der FgaPT2 .....	113
7.4	Fazit und Ausblick .....	116
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>117</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>129</b>
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	129
9.2	Sequenzen.....	132
9.3	Plasmidkarten.....	134
9.4	Veröffentlichungen.....	135