

**Das Abbauverhalten des PHB-Granulumkomplexes
aus *Ralstonia eutropha*:
Charakterisierung mit Hilfe neu entwickelter
Methoden**

Birgit Gebauer

2009

**Das Abbauverhalten des PHB-Granulumkomplexes
aus *Ralstonia eutropha*:
Charakterisierung mit Hilfe neu entwickelter
Methoden**

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik (Fakultät 4)
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Birgit Gebauer
aus Karlsruhe

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter Jendrossek
Mitberichter: Prof. Dr. Karl-Heinrich Engesser

Tag der mündlichen Prüfung: 06. November 2009

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart
2009

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation, abgesehen von ausdrücklich gekennzeichneten Ratschlägen oder Mitarbeiten, von mir selbständig verfasst wurde.

Stuttgart, den 22. Juni 2009

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungen	7
Abstract	9
Zusammenfassung	11
1 Einleitung.....	13
1.1 Anwendung von PHA.....	13
1.2 Biosynthese	14
1.3 Extrazellulärer PHA-Abbau	15
1.4 Aufbau des PHA-Granulums	16
1.5 Intrazellulärer PHA-Abbau.....	16
1.6 Thiolyse.....	18
1.7 Themen der Doktorarbeit.....	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Organismen	20
2.2 Nährmedien und Puffer.....	21
2.2.1 Luria-Bertani-Medium (LB).....	21
2.2.2 Mineralmedium.....	21
2.2.3 Spurenelementlösung SL6.....	21
2.2.4 „Stinson & Merrick“-Medium	22
2.2.5 Tris-EDTA-Puffer (TE)	22
2.3 Zellkultivierung	22
2.3.1 Kultivierung nPHB-bildender Stämme.....	22
2.3.2 Lithoautotrophe Kultivierung und Selektion R. eutropha H16.....	26
2.4 Fluoreszenzmikroskopie	26
2.5 Zellaufschluss.....	26
2.6 DNA-Isolierung	27
2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
2.8 Agarose-Gelelektrophorese	28
2.9 Granulaisolierung und -waschen	29
2.10 Bestimmung des PHB-Gehaltes der isolierten Granulasuspension.....	30
2.11 Herstellung artifizierlicher PHB-Granula (aPHB)	30

2.12	Isolierung PhaZa1-his	30
2.12.1	Kultivierung E. coli JM 109	30
2.12.2	Aufreinigung PhaZa1	31
2.13	Proteinbestimmung (Bradford-Test)	31
2.13.1	Bradford-Reagenz	31
2.13.2	Standard-Proteinlösung	32
2.13.3	Testmethode.....	32
2.13.4	Kalibriergerade	32
2.14	SDS-Gelelektrophorese	33
2.14.1	SDS-PAGE.....	33
2.14.2	Coomassie-Färbung.....	34
2.14.3	Silberfärbung.....	35
2.15	Messung Enzymaktivitäten: Hydrolyse	35
2.15.1	pH-Stat Titration.....	35
2.15.2	3HB-Dehydrogenase-Test.....	36
2.15.3	HPLC-Analyse Hydrolyseprodukte	37
2.16	Messung Enzymaktivitäten: Thiolyse	37
2.16.1	Hydrolyse- und Thiolyseansatz	37
2.17	Derivatisierung mit Bromphenacylbromid (BPB)	38
2.17.1	Derivatisierung.....	38
2.17.2	Standards.....	39
2.18	HPLC-Analytik	40
2.18.1	Auftrennung Bromphenacyl-Derivate (3HB-Oligomere)	40
2.18.2	Auftrennung CoA-Ester (3HB-Oligomere)	40
2.19	ESI-MS (ESI plus)	41
2.20	Bestimmung Größenverteilung nPHB-Granula per PCS	42
3	Experimente und Ergebnisse.....	45
3.1	Etablierung pH-Stat-Methode: Nachweis Säurefreisetzung nPHA-Granula.....	49
3.1.1	Optimierung der Messparameter	50
3.1.2	Messung der Säurefreisetzung	53
3.2	Methodenentwicklung zum Nachweis von 3HB-Oligomeren	55
3.2.1	Derivatisierung der Hydrolyseproben	55
3.2.2	Analyse per HPLC.....	56

3.3	Bestimmung Größenverteilung nPHB-Granula	60
3.3.1	Notwendige Parameter	64
3.3.2	Bestimmung Größenverteilung nPHB-, nPHV und nPHO-Granula	64
3.4	Depolymeraseaktivität nativer PHB-Granula: Charakterisierung mit dem pH-Stat	73
3.4.1	Nachweis: Säurefreisetzung durch Enzyme	74
3.4.2	Titration nPHB aus <i>Alcaligenes latus</i>	77
3.4.3	Hemmung Eigenhydrolyse	79
3.4.4	Einfluss verschiedener Reagenzien	80
3.4.5	Vergleich Hydrolyseaktivität verschiedener Granula-Isolate	100
3.5	Hydrolyse und Thiolyse: der endogene Abbau nativer PHB-Granula	106
3.5.1	Einfluss von CoA und DTT auf den 3HB-DH-Test	106
3.5.2	Übersicht Analysemethoden	108
3.5.3	Standard-Chromatogramme	109
3.5.4	Charakterisierung der Thiolyse (nPHB <i>R. eutropha</i> Δ phaZa1)	115
3.5.5	Endogene Thiolyse und Hydrolyse von <i>R. eutropha</i> Wt / Δ phaP1 / Δ phaZa1 ..	125
3.5.6	Einfluss des Kulturmediums auf den Abbau der PHB-Granula	143
3.6	Isolierung Granula aus versch. Stämmen	152
3.6.1	Endogene Thiolyse verschiedener PHA-Bildner	154
3.6.2	Endogene Hydrolyse verschiedener PHA-Bildnern	165
3.7	Charakterisierung PhaZa1 (isoliertes Enzym)	172
3.7.1	Isolierung PhaZa1	172
3.7.2	Untersuchung Hydrolyse- und Thiolyseaktivität	174
3.7.3	pH-Optimum	177
3.7.4	Temperatur-Optimum	178
3.7.5	Test Aufbewahrung des Enzyms	180
3.7.6	Zeitabhängigkeit der Thiolyse durch PhaZa1	181
3.7.7	Optimales Verhältnis „PhaZa1 zu Substrat“	183
3.7.8	Spezifische Thiolyseaktivität PhaZa1	183
3.7.9	Hemmstoffe und Aktivatoren	184
3.7.10	Einfluss PhaZa1 auf nPHB anderer Stämme	189
3.7.11	aPHB: Wirkung von gereinigtem PhaZa1-his / Rohextrakt <i>E. coli</i> phaZa1 ...	191
3.8	Mikroskopische Beobachtung PHB-Speicherung und –Verwertung	196
3.8.1	Vergleich NB-Kultur versus MM-Kultur <i>R. eutropha</i> Wt	196

3.8.2	PHB-Speicherung bei <i>R. eutropha</i> Wt, Δ phaZa1, Δ phaP1, Δ phaP1-4 (NB).....	199
4	Diskussion	202
4.1	Methoden.....	202
4.1.1	pH-Stat-Methode	203
4.1.2	HPLC-Analytik	203
4.1.3	Photonenkorrelations-Spektroskopie (PCS)	203
4.2	Charakterisierung – Vergleich Wt, Δ phaP1 und Δ phaZa1.....	205
4.2.1	Nachweis Eigenhydrolyse.....	205
4.2.2	Einfluss Granula-fremde Proteine auf Produktspektrum	205
4.3	Vergleich nPHB <i>R.eutropha</i> Wt und Δ phaZa1	209
4.4	Vergleich nPHB <i>R.eutropha</i> Wt und Δ phaP1.....	212
4.4.1	Phasine als Schutz vor Depolymerasen?	212
4.4.2	Δ phaP-nPHB länger aktiv als Wt-nPHB	213
4.4.3	Ohne PhaP1: mehr 3HB-CoA als Acetyl-CoA.....	213
4.4.4	<i>R. eutropha</i> Δ phaP1: Empfindliche Granula.....	214
4.5	Charakterisierung – Einfluss Substanzen.....	216
4.5.1	Trypsin.....	216
4.5.2	ProteinaseK.....	217
4.5.3	SDS.....	218
4.5.4	Weitere Substanzen	220
4.6	Thiolyse.....	221
4.6.1	„Futile Cycle“ und die Idee der Thiolyse.....	221
4.6.2	Eigentholyse native PHB-Granula.....	222
4.6.3	Isoliertes PhaZa1	226
4.6.4	Thiolyse durch isoliertes PhaZa1	227
4.7	Hydrolyse / Thiolyse – Vergleich andere Organismen	229
4.7.1	Hydrolyse.....	229
4.7.2	Thiolyse	230
4.8	Thiolyse in vivo: ja oder nein?	233
4.9	Resumée und Ausblick.....	234
5	Literatur	236
	Danksagung.....	247

ABKÜRZUNGEN

Δ	Delta, Differenz
3-HB	3-Hydroxybutyrat
3-HB-DH	3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase
Abb.	Abbildung
aPHB	artifizielles amorphes PHB
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CoA	Coenzym A
d	Küvettschichtdicke
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dPHB	denaturiertes PHB
DZSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTNB	Dithiobisnitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie
et al.	et alii = und andere
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
kb	Kilobasen
KP	Kalium-Phosphat
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
M	Mol
mAU	Milliabsorptionseinheiten
MCL	medium-chain-length
min	Minute
MM	Mineralmedium
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidiert

NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat, reduziert
NB	Nutrient Broth
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nPHB	natives PHB
OD ₆₀₀	Optimische Dichte, gemessen bei $\lambda = 600$ nm
ORF	Open reading frame = offener Leserahmen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCS	Photone correlation spectroscopy
pH	Neg. dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PHA	Polyhydroxyalkanoat
PhaA	β -Ketothiolase
PhaB	Acetoacetyl-CoA-Reduktase
PhaC	PHA-Synthase
<i>phaCAB</i>	Codon der PHA-Biosynthese
PhaZ	PHA-Depolymerase
PHB	Polyhydroxybutyrat
PHO	Polyhydroxyoktanoat
PHV	Polyhydroxyvalerat
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SCL	short-chain-length
SDS	Natriumdodecylsulfat
SK	Stammkultur
SL	Spurenelementlösung
sp.	Spezies
t	Zeit
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units (Einheiten der Enzymaktivität)
Vol	Volumen
w/v	Weight per volume = Gewicht pro Volumen

ABSTRACT

In order to cope with unbalanced growth conditions, some microorganisms are able to store excess carbon intracellularly as an amorphous polyester such as poly(3-hydroxybutyrate), PHB. Upon return to favourable growth conditions, PHB-producing organisms possess intracellular depolymerases (PhaZ) to metabolise the PHB for further cell growth. In the model organism *Ralstonia eutropha* H16 at least seven intracellular depolymerases and two oligomer hydrolases have been proposed. Only two of the depolymerases have been identified on the surface of the granules; PhaZa1 and PhaZd. Together with the granule-bound phasin proteins (PhaP), PHB-synthase (PhaC) and others they build a complex system, which could be considered an organelle (Jendrossek 2009).

This thesis for the first time characterizes the depolymerase activity of the whole granule-complex by using a unique combination of known techniques and new methods. A pH-Stat system was used to detect the very low self- hydrolysis rate of isolated granules. The hydrolysis products were analysed by HPLC after derivatization with bromophenacyl bromide (BPB). By measuring the size of PHB granules via photon correlation spectroscopy (PCS) the total granule surface could be calculated. The specific depolymerisation activity could be determined referring to area instead of mass of PHB, thus taking into account the diverse particle size distributions.

These methods enabled the characterization of self-hydrolysis of native PHB granules (nPHB) by means of optimum pH, temperature and susceptibility to various agents (detergents, proteases, DTT, DTNB etc.). Furthermore the activities of nPHB isolated from *R. eutropha* wildtype, $\Delta phaZa1$, $\Delta phaZd$, and $\Delta phaP1$ mutants were determined, as well as from recombinant *E. coli* harbouring different combinations of genes involved in PHB metabolism. Native poly(3-hydroxyalkanoates) (nPHA) isolated from other organisms were also investigated, including PHV (polyhydroxyvalerate) and PHO (polyhydroxyoctanoate). Distinct variations in hydrolysis were observed ranging from granules with negligible activity, over nPHB of *R. eutropha* producing 3 nmol 3HB / min / mg PHB, up to 250 nmol 3HB / min / mg PHB by *A. latus*.

In 1990 Doi et al. reported that polymerization and depolymerization of PHB occur simultaneously, and the role of this putative futile cycle was discussed for many years. In 2007 Uchino et al. suggested an alternative strategy of PHA depolymerisation: that by addition of CoenzymeA the intracellular depolymerase PhaZa1 could also catalyse the thiolysis of PHB. Thereby 3HB-CoA was produced instead of 3HB, saving the energy of the polyester bond by forming a CoA-ester.

To better understand the importance of thiolysis we compared and characterized hydrolysis and thiolysis by testing native PHB granules alone and with addition of isolated PhaZa1. Native PHA granules isolated from other bacteria were also analysed and, if available, their amino acid sequences were checked via database for any protein similar to PhaZa1.

While test conditions showed hydrolysis to be widespread, thiolysis products could only be found for granules of *R. eutropha* and *Comamonas sp.*. Testing *A. latus* revealed that strong hydrolysis does not automatically imply the ability for strong, or indeed any, thiolysis activity. Searching for PhaZa1-related proteins revealed only few enzymes: mainly proteins from other *Ralstonia* or closely related species showed similarities. For *Comamonas sp.*, whose granules showed thiolysis activity similar to *R. eutropha*, no sequence was listed. However the closely related *Comamonas*

testosteroni showed a protein similar to PhaZa1, also containing cysteine as part of the catalytic center. This is well described for thiolases and therefore suggests that PhaZa1 is involved in thiolysis.

The characterization of the hydrolysis activity of the granule-organelle gave insight into the complex system of hydrolysis, the players involved and the general occurrence of this kind of depolymerisation within PHA producing organisms. Based on these findings the idea of thiolysis as an alternative system (Uchino et al. 2007) was tested intensely. Thiolysis is energetically favourable and PhaZa1, as well as native granules, were found to produce CoA-esters. However there are arguments against this: nPHB of PhaZa1-mutants showed thiolysis activity, and thiolysis does not seem to be established in all PHA-producing organisms. Furthermore it is not certain whether the thiolysis experiments really reflect the *in vivo* conditions. Therefore thiolysis via PhaZa1 might be one method of depolymerisation but it does not seem to be as important as hydrolysis. Further examinations on the mechanism of switching between hydrolysis and thiolysis, and whether there exists another pathway of thiolysis than via PhaZa1, are required.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Reihe von Mikroorganismen ist in der Lage, Kohlenstoff zu speichern, wenn aus Mangel an anderen essentiellen Substraten kein Wachstum möglich ist. Dies geschieht intrazellulär über amorphe Polyester wie Poly(3-hydroxybutyrat), PHB, die in Form von Granula eingelagert werden. Ist die Nährstoffversorgung für Wachstum und Vermehrung wieder im Gleichgewicht, kann der Kohlenstoffspeicher mit Hilfe von intrazellulären Depolymerasen (PhaZ) abgebaut und genutzt werden. Für den Modellorganismus *Ralstonia eutropha* H16 wurden bisher sieben intrazelluläre Depolymerasen und zwei Oligomerhydrolasen postuliert. Nur zwei der Depolymerasen konnten jedoch auf der Oberfläche der Granula nachgewiesen werden: PhaZa1 und PhaZd. Zusammen mit den Granula-gebundenen Phasin-Proteinen (PhaP), der PHB-Synthase (PhaC) und anderen Proteinen bilden sie ein komplexes System, das man durchaus als Organell bezeichnen kann (Jendrossek 2009).

Diese Arbeit charakterisiert erstmalig die Depolymerase-Aktivität des gesamten Granulumkomplexes, indem bekannte Techniken und neue Methoden kombiniert wurden. Mit Hilfe eines pH-Stat-Systems konnte die sehr niedrige Eigenhydrolyserate isolierter Granula detektiert werden. Nach Derivatisierung mit Bromphenacylbromid (BPB) wurden die Hydrolyseprodukte analysiert. Und über die Vermessung der Granula per Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) konnte die Gesamtoberfläche der Granula berechnet werden. Dadurch wurde es möglich, die spezifische Depolymeraseaktivität auf die Oberfläche zu beziehen statt wie bisher auf die Masse. Denn die Größenverteilung und somit die Gesamtoberfläche pro mg PHB variiert bei isolierten Granula je nach Charge, Organismus und Kultivierungsbedingungen.

Diese Methoden ermöglichten die Charakterisierung der Eigenhydrolyse nativer PHB-Granula (nPHB) anhand des optimalen pH-Wertes, der optimalen Temperatur sowie der Reaktion auf verschiedene Agentien (Detergentien, Proteasen, DTT, DTNB etc.). Darüber hinaus wurde die Depolymeraseaktivität von Granula aus folgenden Mutanten bestimmt: *R. eutropha* Δ phaZa1, Δ phaZ, Δ phaP1. Dazu kamen Granula aus rekombinanten *E. coli*-Stämmen mit verschiedenen Genen des PHB-Stoffwechsels sowie von anderen Organismen. Darunter waren neben PHB-Bildnern auch Bakterien, die Granula aus PHV (Poly(hydroxyvalerat)) und PHO (Poly(hydroxyoktanoat)) speichern. Die Hydrolyse reichte dabei von keiner messbaren Aktivität über die Raten von nPHB aus *R. eutropha* mit rund 3 nmol/min/mg PHB bis hin zu 250 nmol/min/mg PHB für Granula aus *Alcaligenes latus*.

1990 berichteten Doi et al., dass die Polymerisierung und die Depolymerisierung von PHB in der Zelle gleichzeitig ablaufen. Dieser scheinbar nutzlose Kreislauf wurde unter Fachleuten lange diskutiert. 2007 schlugen Uchino et al. erstmals eine alternative Strategie für den PHB-Abbau vor: sie hatten zeigen können, dass die intrazelluläre PHB-Depolymerase PhaZa1 durch Zugabe von freiem Coenzym A auch die Thiolyse von PHB katalysiert. Dabei entstand 3HB-CoA statt 3HB, so dass die Energie der Esterbindung in Form des CoA-Esters aufgefangen wurde. Das Nebeneinander von Polymeraufbau und -abbau wäre durch die Thiolyse kein allein energieverbrauchender, nutzloser Kreislauf, sondern würde zur Bildung einer CoA-aktivierten Verbindung beitragen.

Um die Bedeutung der Thiolyse besser einordnen zu können, wurden im Rahmen der Arbeit die Hydrolyse und Thiolyse nativer PHB-Granula charakterisiert und verglichen. Dabei kamen isolierte Granula alleine und unter Zugabe von isoliertem PhaZa1 zum Einsatz. Neben nPHB des Modellorganismus *R. eutropha* wurden auch Granula anderer Organismen auf ihre Thiolyseaktivität

untersucht. Soweit vorhanden wurden zudem die Aminosäure-Sequenzen dieser Stämme auf Proteine durchsucht, die eine signifikante Ähnlichkeit mit PhaZa1 aufweisen.

Während die Versuche zeigten, dass die Hydrolyse nativer PHB-Granula weit verbreitet ist, konnten Thiolyseprodukte nur im Ansatz mit Granula zweier Organismen gefunden werden: *R. eutropha* und *Comamonas sp.*. Die Versuche mit nPHB aus *A. latus* machten deutlich, dass man von einer hohen Hydrolyseaktivität nicht automatisch auf eine hohe Thiolyseaktivität bzw. auf Thiolyse allgemein schließen kann.

Nur in wenigen Organismen wurden per Datenbankrecherche Proteine gefunden mit signifikanter Ähnlichkeit zur intrazellulären Depolymerase PhaZa1. Dabei handelte es sich vor allem um *Ralstonia* oder nah verwandte Stämme. Für den untersuchten Stamm *Comamonas sp.* konnte hingegen keine entsprechende Sequenz identifiziert werden, obwohl seine Granula thiolytisch abgebaut werden können. Allerdings zeigte der Vergleich des nah verwandten Stammes *Comamonas testosteroni* ein Protein mit signifikanter Sequenzähnlichkeit zu PhaZ1 aus *R. eutropha*. Und genau wie die Depolymerase des Modellorganismus besitzt auch das Enzym aus *C. testosteroni* ein Cystein im katalytischen Zentrum. Letzteres ist vor allem für Thiolasen häufig beschrieben worden und unterstützt die Vermutung, dass PhaZa1 am thiolytischen PHB-Abbau beteiligt ist.

Die Charakterisierung der Hydrolyseaktivität nativer Granula hat gezeigt, wie komplex dieses System ist, welchen Einfluss einzelne Enzyme besitzen und welche Rolle der intrazelluläre Polymerabbau in verschiedenen PHA-Organismen spielt. Aufbauend auf den Erkenntnissen zur Hydrolyse wurde das alternative System des thiolytischen Abbaus (Uchino et al. 2007) eingehend untersucht. Energetisch gesehen wäre dies der günstigere Weg und für PhaZa1 konnte bereits Thiolyseaktivität nachgewiesen werden. Dagegen spricht jedoch beispielsweise, dass auch PhaZa1-Mutanten thiolytischen PHB-Abbau zeigen. Und dass dieser Abbauweg in nur zwei der acht getesteten Organismen detektiert werden konnte. Zudem muss näher untersucht werden, ob die Thiolyse-Versuche nah genug an die *in vivo*-Bedingungen heranreichen.

Die Thiolyse von PHA ist demnach vermutlich ein alternativer Abbauweg, der jedoch keinen größeren Stellenwert als die hydrolytische Spaltung zu besitzen scheint. Weitere Untersuchungen könnten zeigen, ob und wie sich die beiden Wege abwechseln oder ergänzen und inwiefern es möglicherweise weitere Abbauvarianten gibt.

1 EINLEITUNG

Schon 1926 entdeckte Maurice Lemoigne, Mitarbeiter am Institut Pasteur in Paris, lichtbrechende Strukturen in *Bacillus megaterium* (Lemoigne 1926). Er isolierte die Substanz und charakterisierte sie als den Polyester Poly-(3-hydroxybutyrat). Die Veröffentlichungen von Lemoigne erschienen in französischer Sprache, so dass es bis in die 60er Jahre dauerte, bis Chemiker und Biologen das Biopolymer wiederentdeckten (Law und Slepeck 1961, Wilde 1962, Merrick und Doudorff 1964, Hippe 1967, Griebel et al. 1968). Es wurde deutlich, dass es sich bei PHB oder allgemein PHA (Polyhydroxy-alkanoat) um einen unter Bakterien weit verbreiteten Speicherstoff handelt, ähnlich wie Polysaccharide, Fette oder Polyphosphate. PHA wird vor allem dann gebildet, wenn Kohlenstoff im Überschuss vorliegt bei gleichzeitigem Mangel eines essentiellen Elementes wie Stickstoff oder Phosphor. Die Zelle kann unter diesen Bedingungen nicht weiter wachsen oder sich teilen und lagert das Substrat stattdessen ein.

Nach *Bacillus megaterium* übernahm in den 60er Jahren das gram-negative β -Proteobakterium *Ralstonia eutropha* in der Forschung die zentrale Position. Die Namensgebung dieses PHB-Modellorganismus verlief dabei verwirrend. Isoliert wurde das Bakterium 1962 als *Hydrogenomonas eutrophus* (Wilde, 1962). Später wurde der Stamm zunächst als *Alcaligenes eutrophus* bezeichnet (Davis et al. 1969) und schließlich 1995 in *Ralstonia eutropha* umbenannt (Yabuuchi et al. 1995). 2004 hieß der Organismus für ein paar Monate *Wautersia eutropha* (Vanechoutte et al. 2004), bevor er die neueste Bezeichnung *Cupriavidus necator* erhielt (Vandamme und Coenye, 2004). Da in der Literatur dennoch der Name *Ralstonia eutropha* dominiert, wird der Organismus auch in der vorliegenden Arbeit so bezeichnet.

1.1 Anwendung von PHA

PHA besitzt je nach äußeren Bedingungen eine unterschiedliche Struktur. So liegt das Polymer im Zellinneren gewöhnlich im amorphen Zustand vor, nach Zellyse jedoch bildet es eine teilkristalline oder auch durchgehend kristalline Struktur aus (Kawaguchi und Doi 1990). In Bezug auf die einzelnen Bausteine des Polymers herrscht eine große Vielfalt. Die Monomere lassen sich zunächst je nach Anzahl an Kohlenstoffatomen (C) in short-chain-length (SCL) und medium-chain-length (MCL) unterteilen. Short meint dabei eine Länge von 3-5 C-Atomen, medium bedeutet mehr als 5 C-Atome pro Monomer. Häufige Verbindungen sind 3-Hydroxybutyrat (C₄) 3-Hydroxyvalerat (C₅) oder 3-Hydroxyoktanoat (C₈) (Madison und Huisman 1999).

Bereits PHB zeigt ähnliche Materialeigenschaften wie herkömmliche Kunststoffe (Polyethylen, Polypropylen). Polymere mit höherkettigen Bausteinen und natürlich vorkommende Copolymere wie P(3-HB-co-3-HV) bieten im Vergleich jedoch oft noch bessere Verarbeitungsmöglichkeiten durch geringere Kristallinität, höhere Elastizität und größere Thermostabilität. Durch die Zugabe bestimmter Substrate und einen gezielten Fermentationsprozess lässt sich zudem regelrechtes „Designer-Plastik“ herstellen, angepasst an den Einsatz des Polymers. In der Anwendung sind darüberhinaus sogenannte blends, Mischprodukte aus biologisch und synthetisch hergestellten Einheiten mit noch einmal neuen Materialeigenschaften.

Als erstes Produkt aus P(3-HB-co-3-HV) erschien in Deutschland 1990 eine Shampooflasche der Firma Wella. Der Preis des Shampoos lag jedoch nur aufgrund der neuen Verpackung eine D-Mark höher, so dass die Produktion wieder eingestellt wurde.

Der Vorteil von PHA gegenüber herkömmlichen Kunststoffen wie Polyethylen oder Polypropylen ist zum einen die Nutzung nachwachsender Rohstoffe. Zum anderen sind die Produkte – bis auf

viele Blends - biologisch abbaubar, was für einige Anwendungen von Vorteil ist und auch einen höheren Einkaufspreis erlaubt.

In der Landwirtschaft können dadurch Mulchfolien untergepflügt oder im Haushalt Biomüll in der abbaubaren Tüte auf dem Kompost gegeben werde. Ein mengenmäßig kleines aber wirtschaftlich interessantes Gebiet ist der Einsatz von PHA-Produkten in der Medizin. Biokompatible, langsam resorbierbare Matrices können hier die Regeneration von Gefäßen, Herzklappen oder auch Nervengewebe unterstützen. Eine aktuellen Überblick über die medizinische Verwendung des Polymers gibt der Artikel von Wu et al. 2009.

Neben der Gewinnung von PHA mit Hilfe des Modellorganismus *R. eutropha* und anderen Bakterien (u.a. rekombinant in *E. coli*) wurden die Synthesegene auch in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*, Poirier et al. 2001) und Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, Matsumoto et al. 2005) etabliert und PHA-Bildung nachgewiesen. Die amerikanische Firma Metabolix setzt auf die Produktion von PHA in Rutenhirse (*Panicum virgatum* L., Somleva et al. 2008). Bisher bildet die Pflanze jedoch maximal 3,7 % PHA (Zelltrockengewicht).

Parallel zu PHA wurden in den letzten Jahren andere Biokunststoffe entwickelt. Den derzeit höchsten Marktanteil besitzen Produkte auf Basis von Polymilchsäure (PLA). Dabei wird das Monomer biotechnologisch mit Hilfe von Milchsäurebakterien hergestellt und chemisch polymerisiert. Das Polymer besitzt ebenfalls ähnliche Verarbeitungseigenschaften wie herkömmliche Kunststoffe und ist ebenfalls biologisch abbaubar. Daneben spielen vor allem Produkte auf Grundlage von Stärke eine wichtige Rolle

1.2 Biosynthese

Das Schlüsselenzym der PHA-Bildung ist die PHA-Synthase (PhaC). Sie katalysiert den letzten Schritt vom Hydroxyalkyl-CoA zum Polymer und wurde auf den Granula lokalisiert (Gerngross et al. 1993). Abbildung 1 zeigt den PHB-Biosyntheseweg für *R. eutropha*. Er beginnt mit der Kondensation zweier Acetyl-CoA-Moleküle zu Acetoacetyl-CoA durch eine β -Ketothiolase (PhaA). Darauf folgt die Reduktion des Acetoacetyl-CoA zu Hydroxybutyryl-CoA durch eine Acetoacetyl-CoA-Reduktase (PhaB). Die Gene der drei beteiligten Enzyme bilden das PHA-Operon, nach ihrer Reihenfolge im Genom auch als *phaCAB* gezeichnet.

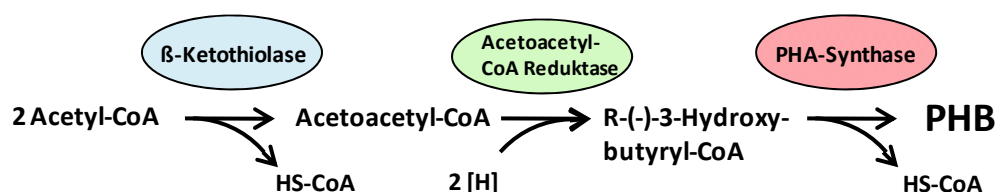


Abb. 1 Syntheseweg von PHB in *R. eutropha*

PHA-Synthasen sind bereits für zahlreiche Organismen identifiziert und untersucht worden. Je nach Proteinstruktur aus einer oder zwei Untereinheiten sowie nach Substratspezifität (v.a. HA_{SCL}

oder HA_{MCL}) werden sie in vier Klassen eingeteilt. So gehört die PHA-Synthase des Modellorganismus *R. eutropha* zu Klasse I. Das Enzym besteht aus einer Untereinheit und ist spezifisch für Thioester kurzkettiger 3HA-Monomere mit 3-5 C-Atomen. Einen guten Überblick über die verschiedenen PHA-Synthasen bietet der Artikel von Rehm und Steinbüchel 2002.

Die Polymerketten können ein Molekulargewicht von einige Millionen Dalton besitzen und die PHA-Granula mehr als 90% des Zelltrockengewichtes ausmachen (Anderson und Dawes 1990). Das Speichern von PHA ist unter Bakterien unterschiedlicher taxonomischer und physiologischer Gruppen verbreitet. Das Biopolymer findet sich sowohl bei aerob-heterotrophen Organismen wie *Pseudomonas* (Huismann et al. 1991), bei Chemolithotrophen (z.B. *Ralstonia eutropha*), bei den mycelartig wachsenden *Nocardia*-Stämmen (Anderson und Dawes 1990), bei phototrophen Arten (z.B. *Rhodospirillum*, Liebergesell et al. 1991), aber auch bei Vertretern der Archaeen und vielen gram-positiven *Bacillus*-Arten (Williamson und Wilkinson 1958). Eine Übersicht dazu liefern Steinbüchel und Hein (2001).

1.3 Extrazellulärer PHA-Abbau

Sind alle zum Wachstum notwendigen Stoffe wieder vorhanden und die Zelle benötigt Kohlenstoff, so wird der Speicherstoff intrazellulär zu Acetyl-CoA-Einheiten abgebaut (siehe Abb. 2) und darüber in den Stoffwechsel eingeschleust. Das Polymer verwerten können jedoch auch Bakterien, die es selber gar nicht bilden. PHA wird durch Zell-Lyse frei und kann dann, allerdings in denaturierter Form, von anderen Bakterien und auch Pilzen verstoffwechselt werden (Su-Qin et al. 2006). Für den Abbau des Polymers wurden entsprechend zwei Gruppen von Enzymen identifiziert: extrazelluläre und intrazelluläre Depolymerasen. Erstere sind spezifisch für denaturiertes, kristallines PHA (dPHA), letztere für natives, amorphes PHA (nPHA), wie es im Zellinneren vorliegt. Zudem können die Enzyme meist nur entweder Polymere aus kurzkettigen oder aus länger-kettigen Bausteinen abbauen.



Abb. 2 Kristallines PHB (dPHB): nach Isolierung aus *R. eutropha* und Behandlung mit Natriumhypochlorit (siehe 2.10)

Extrazelluläre Depolymerasen sind bereits gut untersucht. Für diese Enzyme ist typisch, dass sie meistens in einem breiten pH- und Temperatur-Bereich stabil sind und auch bei hoher Ionenstärke noch Aktivität zeigen. Ihr Optimum liegt im Alkalischen (pH 7,5 – pH 9,8) und sie bestehen aus nur einer Untereinheit. Und alle bisher identifizierten extrazellulären Depolymerasen besitzen die folgenden Strukturen: eine katalytische Domäne mit den drei konservierten Aminosäuren Serin, Aspartat und Histidin, eine Linking-Domäne und eine Substrat-bindende Domäne (Jendrossek und Handrick 2002).

1.4 Aufbau des PHA-Granulums

Intrazelluläre Depolymerasen katalysieren spezifisch den Abbau von amorphem PHA, wie es im Zellinneren vorliegt. Diese nativen PHA-Granula besitzen eine außergewöhnlich komplexe Struktur und Organisation, so dass sie nach Jendrossek (2009) als subzelluläre Organelle bezeichnet werden sollten. Die nativen Granula aus *R. eutropha* setzen sich zusammen aus 97,5 % PHA, 2 % Protein (w/w) und 0,5 % Lipiden (w/w) (Griebel et al. 1968). Dabei fanden sich vier Typen von Proteinen: die PHB-Synthase PhaC (Peoples und Sinskey 1989), die Gruppe der intrazellulären PHB-Depolymerasen PhaZa1, PhaZb, PhaZc und PhaZd (Saegusa et al. 2001, Kobayashi et al. 2003, Kobayashi et al. 2005, Abe et al. 2005), das Repressorprotein PhaR (Pötter et al. 2002) und schließlich die vier Phasin-Proteine PhaP1-PhaP4 (Wieczorek et al. 1995, Pötter et al. 2004).

Mengenmäßig dominiert Phasin 1 (PhaP1). Zum Zeitpunkt der maximalen PHB-Bildung sind zwischen 27 und 54 % der Granulaoberfläche davon bedeckt (Tian et al. 2005). Auch PhaP3 und PhaP4 konnten an Granula gebunden gefunden werden (Pötter et al. 2004). Ihre Konzentration ist jedoch deutlich geringer und PhaP2 konnte dort kaum nachgewiesen werden (Srinivasan et al. 2002). Neueste Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop zeigen, dass der Komplex von einer netzartigen Struktur umhüllt ist, die an das Cytoskelett roter Blutkörperchen erinnert (Dennis et al. 2008). Vermutlich sind daran vor allem die Phasinproteine beteiligt. Für PhaP1 konnte zudem nachgewiesen werden, dass das Protein die Bildung von PHA beeinflusst und die Größe der Granula mit reguliert. So bildeten PhaP1-Mutanten das Polymer mit einer niedrigeren Rate und statt mehrerer kleiner Granula entstand nur ein großes Granulum (Wieczorek et al. 1995, Pötter et al. 2002, Pötter et al. 2005, Kutscha et al. 2007).

Die Expression des zentralen Phasin-Proteins PhaP1 wiederum wird über das Repressorprotein PhaR gesteuert (Pötter et al. 2002). Der Repressor kann sowohl an die Granulaoberfläche binden als auch an die Promotorregion von *phaP1* und die seiner eigenen Genomsequenz (*phaR*). Pötter et al. bestätigten experimentell das Regulationsmodell, nach dem PhaR während der PHA-Bildung zunächst an die Granula bindet und dadurch PhaR selber und PhaP1 ungehindert exprimiert werden können. Erst wenn die Konzentration an Phasinproteinen so hoch ist, dass PhaR von der Granulaoberfläche verdrängt wird, bindet der Repressor an die Promotorregionen und stoppt die weitere Expression von PhaP1 und PhaR.

1.5 Intrazellulärer PHA-Abbau

Die vorliegende Arbeit richtet den Blick auf die intrazellulären Depolymerasen (PhaZ) aus *R. eutropha* und ihr Zusammenwirken mit dem ganzen Granulum. Nachdem bereits viel über Struktur und Funktion der extrazellulären Depolymerasen herausgefunden worden war, rückten die intrazellulären Enzyme in den Vordergrund. Sie stehen am Beginn des Polymerabbaus, der über das Endprodukt Acetyl-CoA mit dem gesamten zellulären Stoffwechsel in Verbindung steht. Für die einzelnen Schritte sei auf Abbildung 3 weiter unten verwiesen.

2001 charakterisierten Saegusa et al. die erste intrazelluläre Depolymerase aus *R. eutropha*: PhaZ1, später PhaZa1 genannt. Sie klonierten ihre Sequenz in *E. coli* und beschrieben die PHB-Hydrolyseaktivität des Enzyms durch Versuche mit dem zellfreien Überstand der rekombinanten Kultur. Fast im Jahresabstand folgte die Entdeckung weiterer i-PhaZ in *R. eutropha*: die Oligomerhydrolasen PhaZb (Kobayashi et al. 2003) und PhaZc (Kobayashi et al. 2005) sowie die PHA-Depolymerase PhaZd (Abe et al. 2005). Parallel postulierten York et al. (2003) und Schwartz

et al. (2003) anhand von Sequenzähnlichkeiten weitere intrazelluläre Depolymerasen, deren Enzymaktivität jedoch bisher nicht experimentell nachgewiesen wurde. Auch durch die vollständige Sequenzierung des *R. eutropha*-Genoms (Pohlmann et al. 2006) wurde eine weitere potentielle Depolymerase entdeckt.

Die experimentell untersuchten Enzyme (PhaZa1, PhaZb, PhaZc und PhaZd) wurden teilweise an die Granula gebunden oder im Cytoplasma gelöst lokalisiert oder aber auf beide Bereiche verteilt gefunden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die aktuell sieben untersuchten bzw. postulierten intrazellulären Depolymerasen und die zwei Oligomerhydrolasen aus *R. eutropha*.

Tab. 1 Übersicht bekannte und postulierte intrazelluläre Depolymerasen aus *R. eutropha* (nach Abe et al. 2005 und K. Uchino)

Bezeichnung nach:	PHA-Depolymerasen (Typ A)					Oligomerhydrolasen (Typ B und C)		PHA-Depolymerasen (Typ D)	
Saito	PhaZa1	PhaZa2	PhaZa3	PhaZa4	PhaZa5	PhaZb	PhaZc	PhaZd1	PhaZd2
Steinbüchel	PhaZ1	PhaZ2	PhaZ3	PhaZ4	PhaZ5	PhaZY1	PhaZY2	PhaZ6	PhaZ7
Sinsky	PhaZ1a	PhaZ1b	PhaZ1c	PhaZ2	PhaZ3				
York		PhaZ2	PhaZ3						
Molmasse:	47 kDa					78 kDa	32 kDa	39 kDa	
Lokalisation:	Granulum					Cytosol / Granulum	Cytosol / Spuren am Granulum	Cytosol / Granulum	
AS im katalyt. Zentrum:	Cystein					Serin			
Sequenz-ähnlichkeit zu:	PHA-Synthase (PhaC)					Extrazell. 3HB-Oligomerhydrolase	Intrazell. 3HB-Oligomerhydrolase	Extrazell. PHA-Depolymerase	
Zuerst beschrieben:	Saegusa et al. 2001	York et al. 2003	York et al. 2003	Schwartz et al. 2003	Pötter et al. 2003	Kobayshi et al. 2003	Kobayashi et al. 2005	Abe et al. 2005	Pohlmann et al. 2006
Charakterisiert durch:	Überexpression in <i>E. coli</i>	<i>R. eutropha</i> Mutante	<i>R. eutropha</i> Mutante	Sequenz-homologien	Sequenz-homologien	Überexpression in <i>E. coli</i>	Überexpression in <i>E. coli</i>	Überexpression in <i>E. coli</i>	Sequenz-homologien

Die bisher identifizierten intrazellulären Depolymerasen aus *R. eutropha* lassen sich in vier Typen (A-D) einteilen (Tabelle 1). Ausschlaggebend für die Klassifizierung sind dabei das Molekulargewicht und die Aminosäuresequenz. Dabei spielt vor allem der Aufbau des katalytischen Zentrums eine entscheidende Rolle, das für Typ A-Depolymerasen ein Cystein enthält, für die restlichen Typen ein Serin-Molekül. Zudem zeigt auch die übrige Aminosäure-Zusammensetzung der einzelnen Depolymerasetypen jeweils Ähnlichkeiten zu einer speziellen Proteingruppe, wie zum Beispiel die PhaZa-Enzyme zur PHA-Synthase (PhaC) (siehe jeweils Literaturangaben in Tabelle 1).

Durch die Vielzahl an identifizierten Enzymen und Arbeitsgruppen besitzen einige Depolymerasen je nach Autor variierende Bezeichnungen. Tabelle 1 listet alle veröffentlichten Namen auf. In der vorliegenden Arbeit wurden die farbig unterlegten Bezeichnungen der AG Saito verwendet, die am besten nachvollziehbar erschienen und auch für weitere Arbeiten empfohlen werden.

1.6 Thiolyse

Viele Jahrzehnte waren die Wissenschaftler davon ausgegangen, der Polyester PHA würde hydrolytisch gespalten, katalysiert von Depolymerasen. Diese Annahme liegt nahe, zumal das Reagenz H_2O in der Zelle im Überschuss vorliegt und die entsprechenden Hydrolyseprodukte detektiert wurden: Hydroxyalkanoate (siehe Abb. 3).

Mit der Entdeckung, dass sowohl die Enzyme der PHA-Biosynthese als auch des Abbaus in *R. eutropha* konstitutiv exprimiert werden, begann sich diese Vorstellung zu ändern: denn durch den gleichzeitigen Auf- und Abbau des Speicherpolymers scheint in der Zelle ein „futile cycle“ abzulaufen. Er verbraucht ohne bisher erkennbaren Grund Energie, indem zur PHB-Synthese 3HB wieder zu 3HB-CoA aktiviert werden muss (Doi et al. 1990, Taidi et al. 1995). In ihren Arbeiten von 2006 und 2007 postulierten Uchino et al. als erste ein alternatives intrazelluläres System, den thiolitischen Abbau von PHA. Hierbei katalysiert die Depolymerase PhaZa1 mit Hilfe von CoA die Spaltung des Polymers unter Bildung eines Hydroxyalkyl-CoA-Esters. Dadurch wird die Energie der Esterbindung in Form des CoA-aktivierten Monomers gespeichert. Abbildung 3 zeigt den Weg von PHB bis Acetyl-CoA, wie er mit großer Wahrscheinlichkeit über die Hydrolyse verläuft und parallel die vermutlichen Schritte der Thiolyse. Dass der Weg vom bereits aktivierten 3-Hydroxyalkyl-CoA – zumindest in der linksgängigen Form (L- β -Hydroxyalkyl-CoA) – zum Ketoacyl-CoA an anderer Stelle in der Zelle bereits fest etabliert ist, zeigt der Vergleich mit den zentralen Reaktionen der β -Oxidation von Fettsäuren (Abb. 3).

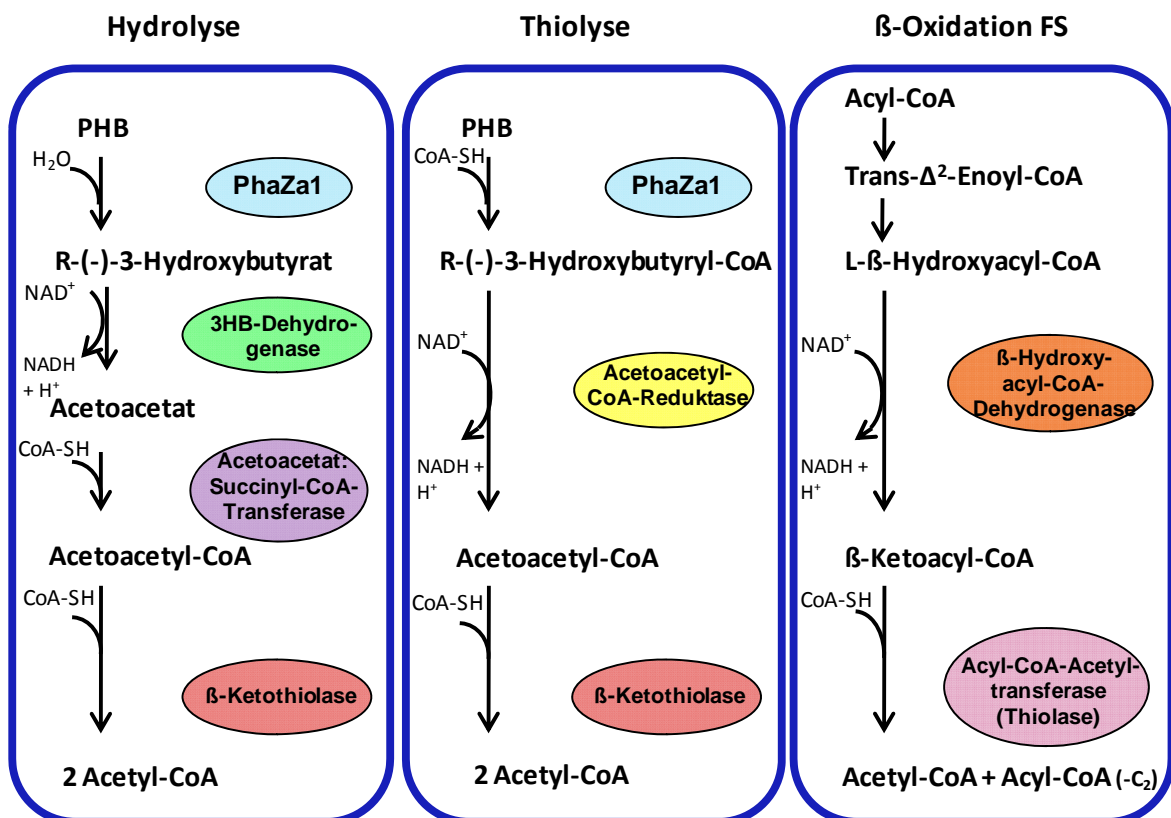


Abb. 3 Schemata der vermutlichen Abbauewege von PHB via Hydrolyse und Thiolyse sowie vergleichbare Schritte der β -Oxidation von Fettsäuren (FS).

1.7 Themen der Doktorarbeit

Vor allem für überexprimierte und isolierte PHA-Depolymerasen wurden bereits diverse Hydrolyse-Aktivitätstests entwickelt. Die Bildung des Monomers 3HB wurde beispielsweise mit Hilfe des beschriebene 3HB-Dehydrogenase-Tests (2.15.2) nachgewiesen oder über die Methylierung der Abbau-Produkte und ihre Analyse per Gaschromatographie (GC) (Brandl et al. 1988). De Eugenio et al. (2007) nutzen zudem radioaktiv markiertes Substrat (^{14}C), um dadurch später den Abbau des Polymers verfolgen zu können. Die Menge an Oligomeren konnte über den Einsatz von Oligomerhydrolasen und die Konzentration ihrer Produkte abgeschätzt werden. Allgemeiner konnte der Abbau des Polymers auch durch Messung der Trübungs- oder Gewichtsabnahme bestimmt werden. Einen vor allem qualitativen Einblick in den Abbau-Verlauf ermöglicht nach Färbung mit Nilrot (2.4) die mikroskopische Untersuchung des zellulären PHB-Gehaltes.

Bisher existierten jedoch keine Standard-Methoden, die sensitiv genug sind, um die Aktivität intrazellulärer Depolymerasen am isolierten, nativen Granulum nachzuweisen. Zudem ermöglichten die Methoden keine genaue Aufschlüsselung der gebildeten Oligomere. An dieser Stelle setzt die vorliegende Arbeit an, in deren Rahmen die dazu notwendigen Nachweismöglichkeiten entwickelt wurden. Dabei ging der Weg von der Etablierung der sogenannten pH-Stat-Methode (3.1) über den Nachweis von 3HB-Oligomeren per HPLC (3.2) bis zur Bestimmung der Größenverteilung einer Granulasuspension (3.3). So wurden die Grundlagen geschaffen, neben rekombinanten, isolierten Depolymerase-Enzymen das System „Granulum“ im Ganzen zu untersuchen. Nur auf diese Weise können endogene Aktivitäten unter weitestgehend natürlichen Bedingungen analysiert werden, bei denen vor allem der Einfluss des Zusammenwirkens der Granulaproteine PhaZ, PhaP, PhaR und PhaC nicht verloren geht.

Entscheidend für die Deklaration und Charakterisierung eines neu identifizierten Enzyms ist die passende Methode zum Aktivitätsnachweis. So lag **der erste Schwerpunkt** dieser Arbeit in der Entwicklung von Methoden zum Nachweis der Depolymeraseaktivität nativer PHA-Granula. Nachdem diese etabliert waren, war es nun möglich, als **zweiten Schwerpunkt** die Eigenhydrolyse nativer PHA-Granula zu charakterisieren. Dabei stand neben Parametern wie dem pH-Optimum, Temperatur-Optimum und der Reaktion auf verschiedene Agentien auch die Untersuchung von nPHB diverser *R. eutropha*-Mutanten sowie anderer Organismen im Vordergrund.

Nachdem sich die Experimente dieser Arbeit auf die Untersuchung der Hydrolyse nativer PHA-Granula konzentriert hatten, lieferte die Idee der thiolytischen Spaltung von PHA (Uchino et al. 2006, 2007) eine neue Herausforderung: Der Vergleich Hydrolyse – Thiolyse bildete **den dritten Schwerpunkt** der Arbeit. Durch parallele Versuche zu Hydrolyse und Thiolyse wurde der Frage nachgegangen, ob die thiolytische Spaltung des Polyesters tatsächlich ein alternativer Weg sein könnte. Dazu gehörten neben der Arbeit mit nativen Granula die Isolierung der Depolymerase PhaZa1 sowie die Untersuchung, wie verbreitet Hydrolyse- und Thiolyseaktivität neben *R. eutropha* bei anderen PHA-Bildnern vorkommen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Organismen

Tab. 2 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz	Stammkultur-Nr. Labor 2
<i>Alcaligenes latus</i>		Palleroni et al. 1978	SK 3355
<i>Bacillus sp. K6</i>			SK 52
<i>Bacillus megaterium</i>		Jahns und Kaltwasser, 1989	SK 1876
<i>Comamonas sp.</i>	Sm-resistent	Jendrossek et al. 1993	SK 576
<i>E. coli JM 109</i>	pJOE4036.2 mit <i>phaZa1</i> aus <i>R. eutropha</i> Wt	Günther, M. 2005	SK 2912
<i>E. coli JM 109</i>	pJOE4036.4 mit <i>phaZa1</i> aus <i>R. eutropha</i> Wt	Günther, M. 2005	SK 2914
<i>E. coli BLR (DE3)</i>	pLysS mit pET171H: pET23b mit <i>phaZa1</i> - Konstrukt	Saegusa et al. 2001	
<i>E. coli HMS 174</i>	pJM9238 (Cm) <i>phaCAB</i> PHB-Synthesegene aus <i>R. eutropha</i> H16 Wt	Kidwell et al. 1995	SK 1186 / 1187 / 1328
<i>E. coli HMS 174</i>	pJM9238 (Cm) <i>phaCAB</i> PHB-Synthesegene aus <i>R. eutropha</i> H16 Wt, pBlueskript KS: <i>phaP</i> (Ap) (Aktivatorprotein)	Kidwell et al. 1995	SK 1170 / 1171 / 1185
<i>Paracoccus denitrificans</i>	PHV-Bildner	Wieczorek et al. 1996	SK 272
<i>Paucimonas lemoignei</i>	PhaZ7-Bildner	Delafield et al. 1965	SK 1559
<i>Pseudomonas putida</i>		de Smet et al. 1983	SK 195
<i>Pseudomonas putida</i> GPo1	PHO-Bildner	de Smet et al. 1983	SK 3277
<i>Pseudomonas putida</i> GPo500	PHO-Bildner	de Smet et al. 1983	SK 3277
<i>Ralstonia eutropha</i> H 16 Wt		Schlegel, 1961	SK 1342 / 1343
<i>Ralstonia eutropha</i> Wt	Glucoseverwerter		SK 1480
<i>Ralstonia eutropha</i> Δ <i>phaP1</i>	<i>phaP1</i> - Deletionsmutante	Pötter	SK 3027
<i>Ralstonia eutropha</i> Δ <i>phaP1-4</i>	<i>phaP1-4</i> - Deletionsmutante	Pötter	SK 3028
<i>Ralstonia eutropha</i> Δ <i>phaZa1</i>	<i>phaZa1</i> - Deletionsmutante	Saito	SK 1544

2.2 Nährmedien und Puffer

2.2.1 *Luria-Bertani-Medium (LB)*

LB-Medium nach Sambrook, 1989

Trypton	10 g / l
Hefeextrakt	5 g / l
NaCl	10 g / l

2.2.2 *Mineralmedium*

Schlegel-Medium nach SCHLEGEL, 1961

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	4,47 g/l
KH_2PO_4	1,5 g/l
NH_4Cl	1,0 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/l
Fe(III)NH ₄ -Citrat	1,2 mg/l
SL 6 (10.000 fach)	0,1 ml/l

pH 7

Die Magnesiumsulfat-, Calciumchlorid- und Eisenammoniumcitrat-Lösungen wurden in 1000facher Konzentration einzeln autoklaviert, um die Bildung und den Ausfall von Calciumsalzen zu verhindern.

2.2.3 *Spurenelementlösung SL6*

Spurenelementlösung SL6 (10.000 fach) nach PFENNIG, 1974

$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1 g/l
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/l
H_3BO_4	3 g/l
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	2 g/l
$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g/l
$\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/l

Zur Herstellung von Agar (LB, NB oder MM) wurden vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agarose zugegeben.

2.2.4 „Stinson & Merrick“-Medium

„Stinson & Merrick“-Medium (1974)

modifiziert von Nakayama et al. (1985)

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	5,8 g
KH ₂ PO ₄	2,3 g
NH ₄ Cl	1,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,01 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	5 mg
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
pH 6,8 (HCl)	

2.2.5 Tris-EDTA-Puffer (TE)

TE-Puffer

10 mM Tris

1 mM EDTA

pH 7,3

2.3 Zellkultivierung

2.3.1 Kultivierung *nPHB*-bildender Stämme

In der Regel lief die Kultivierung nach folgendem Schema ab:

Von Platte wurden morgens 2 x 20 ml NB-Medium angeimpft und als Vorkultur I bis abends (ca. 10 h) bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Die beiden Vorkulturen wurden anschließend vereint und daraus mit je 15 ml zweimal 150 ml NB angeimpft. Am nächsten Morgen wurden insgesamt sechs Kolben mit 400 ml sterilem Hauptkulturmedium mit 40 ml der Vorkultur II angeimpft. Die Zellernte erfolgte nach ungefähr 24 Stunden.

Die Medien der Vor- und Hauptkulturen unterschieden sich je nach Organismus:

Alcaligenes latus

Vorkultur II

NB + 0,2 % Saccharose

Hauptkultur

Abgewandeltes Schlegel-Medium

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	4,47 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
NH ₄ Cl	2,0 g/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g/l
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,02 g/l
Fe(III)NH ₄ -Citrat	2,4 mg/l
SL 6 (10.000 fach)	0,1 ml/l
Hefe	1 g/l
NB	1 g/l

Nach ungefähr 12 Stunden wurden jedem Kolben 8 ml 20 % Saccarose zugegeben (4 % Endkonzentration).

Bacillus

Vorkultur II

NB + 0,1 % Glucose

Hauptkultur

Schlegel-Medium

+ 1 % Glucose

Comamonas

Vorkultur II

NB + 0,2 % NaGluconat

Hauptkultur

Schlegel-Medium

+ 1 % NaGluconat

Nach acht Stunden Hauptkultur wurde 1 % NaGluconat nachgegeben.

Rekomb. *Escherichia coli*

Vorkultur

LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin

Hauptkultur

LB-Medium

+ 100 µg/ml Ampicillin

+ 2 % Rhamnose (Induktion)

Die Inkubation von *E. coli* erfolgte bei 37°C. Außerdem wurde die Hauptkultur von 2 x 500 ml direkt mit der ersten Vorkultur von 2 x 20 ml angeimpft. Die Rhamnose wurde direkt zu Beginn der Hauptkultur zugegeben.

Paracoccus denitrificans

Vorkultur I

NB

Vorkultur II

Medium (siehe Hauptkultur)

+ 1 g/l NB

+ 0,04 % n-Pentanol

Hauptkultur

Medium

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	2 g/l
KH ₂ PO ₄	2,3 g/l
NH ₄ Cl	1 g/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g/l
CaCl ₂	0,01 g/l
NaHCO ₃	0,5 g/l
SL 6 (10.000 fach)	0,5 ml/l

pH 6,8

Mit der ersten Vorkultur (2 x 20 ml NB über Nacht bei 30°C) wurden 2 x 200 ml Vorkultur II angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 4 bei 30°C inkubiert (ca. 12 h). Um ausreichend Zellen für die Granulaisolierung zu gewinnen, wurden anschließend 6 x 500 ml Hauptmedium mit 0,2 % n-Pentanol versetzt und mit je 50 ml Vorkultur II angeimpft. Nach 24 Stunden betrug die OD₆₀₀ 1,5 und es wurden 0,02% nPentanol nachgefüttert. Nach 26,5 Stunden wurde eine OD₆₀₀ von 2,6 gemessen, ebenfalls 0,02% nPentanol nachgegeben. Dasselbe galt nach 30 Stunden, wo das Zellwachstum mit einer OD₆₀₀ von 3,4 den höchsten Wert zeigte. Nach weiteren vier Stunden ohne Zunahme wurden die Zellen geerntet.

Paucimonas lemoignei

Vorkultur II

Stinson & Merrick + 0,3 % 3HB-Na

Hauptkultur

Stinson & Merrick-Medium

aber nur 0,5 g/l NH₄Cl !

+ 0,3 % 3HB-Na als C-Quelle

Um ausreichend Zellmaterial zu erhalten, bestand die Hauptkultur von *Paucimonas lemoignei* aus 10 x 450 ml. Dazu waren drei Vorkultur-Schritte nötig: 2 x 10 ml (VK I), 2 x 100 ml (VK II) und schließlich 10 x 40 ml Medium, das mit je 10 ml VK II angeimpft wurde (VK III). Zu jedem Kolben mit Hauptkulturmedium wurde schließlich eine komplette Vorkultur III gegeben.

Pseudomonas putida

Vorkultur II

NB + 0,15 % Na-Oktanoat

Hauptkultur

Schlegel-Medium

+ 0,15 % Na-Oktanoat

Ralstonia eutropha

Vorkultur II

NB

Hauptkultur

Abgewandeltes Schlegel-Medium

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	4,47 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
NH ₄ Cl	1,5 g/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g/l
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,02 g/l
Fe(III)NH ₄ -Citrat	1,2 mg/l
SL 6 (10.000 fach)	0,1 ml/l
Hefe	1 g/l
NB	1 g/l

pH 6,8

Nach rund 12 Stunden Wachstum werden der Hauptkultur 2% NaGluconat zugegeben.

Die Messung der optischen Dichte (OD) von Bakterienkulturen und nativen Granula erfolgte im Photometer (Varian-Cary 100 Bio) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) in Plastikküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Um die Zellen zu ernten, wurden die Kulturen bei 4°C 15 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert (JA-10-Rotor, Avanti-35 Centrifuge, beides Beckman Coulter, USA).

2.3.2 Lithoautotrophe Kultivierung und Selektion *R. eutropha* H16

Die Fähigkeit, Wasserstoff als Energiequelle zu nutzen und Kohlenstoff über CO_2 -Fixierung zu gewinnen, ermöglicht eine weitgehende Selektion von *R. eutropha*.

Dazu wurde eine Kultur steril auf eine Mineralmedium-Agarplatte (2.2.2.) ohne C-Quelle ausstrichen und die Platte in einem Anaerobentopf unter rund 80% H_2 , 10% CO_2 und 10 % O_2 bei 30°C inkubiert. Wichtig ist, die Platten mit dem Deckel nach unten zu legen, da dieser sich sonst durch den Unterdruck anheben könnte. Nach Verschließen wurde ein Unterdruck angelegt, so dass im Topf nur 0,2 bar statt 1 bar atmosphärischer Druck herrschten. Mit reinem Sauerstoff (oder falls nicht vorhanden mit Luft) wurde um 0,1 bar auf 0,3 bar aufgefüllt. Ebenfalls um 0,1 bar wurde der Druck mit CO_2 auf 0,4 bar erhöht und anschließend um rund 0,5 bar mit H_2 auf ca. 0,9 bar aufgefüllt. Durch diesen leichten Unterdruck konnte gut kontrolliert werden, ob der Behälter dicht und daher das Gasgemisch weiterhin definiert war. Erste Kolonien wurden nach rund 4-5 Tagen erkennbar.

2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Nilrot lassen sich PHB-Granula in der Zelle anfärben. Nach Anregung durch das Spektrum einer Quecksilberlampe (405, 436, 546 nm) heben sie sich rot fluoreszierend vom Rest der Zelle deutlich ab (Steinbüchel et al. 1999).

Zur Herstellung eines Präparates wurden zunächst rund 100 μ l Kultur mit einer OD_{600} von ca. 1 – 2 mit 20 – 40 μ l Nilrotlösung (1 μ g / ml Ethanol) vermischt. Auf einen Objektträger wurden rund 10 μ l davon aufgetropft, rasch mit 10 μ l flüssiger Agarose (1,5 %) mit der Pipettenspitze vermischt und mit einem Deckglas versehen.

Die Ansicht des Präparates erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) bei 1000facher Vergrößerung (100 x Öl-Objektiv und 10 x Okular) mit zugeschalteter Quecksilberlampe. Die Filtereinstellungen waren wie folgt: BP 546 nm, FT 580 nm und LP 590 nm.

2.5 Zellaufschluss

Nach dem Abzentrifugieren einer Bakterienkultur (15 min, 5000 rpm, 4°C, JA-10-Rotor, Beckman Avanti-35 Centrifuge) wurde das Zellpellet auf Eis in 1 mM TrisHCl-Puffer (pH 8,5) komplett resuspendiert. Dabei wurde soviel Puffer verwendet, bis eine dickflüssige Konsistenz erreicht war. Dieser Ansatz wurde anschließend in die vorher gekühlte, große Zelle (max. 35 ml) der French-Press (Fa. Aminco, Maryland, USA) gefüllt und durchlief das Aufschlussverfahren dreimal hintereinander. Nach dem ersten Durchlauf wurden 50 μ l DNaseI (1 mg/ml) (Appllichem, Darmstadt) hinzugegeben, um die fädige DNA aufzulösen.

2.6 DNA-Isolierung

Zur Vorbereitung wurden 10 ml NB-Medium mit der entsprechenden Kultur von einer Agarplatte angeimpft. Nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C auf dem Schüttler wurden zweimal parallel 1,5 ml Kultur in einem Eppendorf-Gefäß abzentrifugiert (2 min, 14.000 rpm). Das Pellet wurde jeweils in 540 µl TE-Puffer (1.2.5.) resuspendiert und mit 30 µl 10 % SDS sowie 3 µl ProteinaseK-Lösung (20 mg/ml) versetzt. Nach Inkubation im Heizblock bei 37°C kamen 100 µl 5 M NaCl sowie 80 µl CTAB in NaCl dazu und die Proben für zehn Minuten in ein Wasserbad bei 65°C. Für die CTAB-Lösung wurden 10 % (w/v) CTAB in 0,7 M NaCl im Wasserbad bei 65°C gelöst.

Anschließend wurden zu den zwei parallelen Proben jeweils 800 µl Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) pipettiert, die Reaktionsgefäße vorsichtig geschwenkt und 45 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die Oberphase kam daraufhin in ein frisches Gefäß und die Zugabe von Chloroform: Isoamylalkohol sowie die Zentrifugation wurden wiederholt. Im nächsten Reinigungsschritt wurden zur erneut isolierten Oberphase rund 550 µl der Mischung Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:25:1) pipettiert. Nach 45 Minuten Zentrifugation bei 12.000 rpm wurden die Oberphasen beider Ansätze schließlich in einem Gefäß vereint. Nach Zugabe von 340 µl Isopropanol, vorsichtigem Schwenken und 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (20 Minuten, 13.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen, 1 ml 70 % reines Ethanol dazugegeben und nach vorsichtigem Schwenken erneut zentrifugiert (5 Minuten, 14.000 rpm). Ein letztes Mal wurde der Überstand entfernt und verworfen. Das Pellet wurde über Nacht am Arbeitsplatz getrocknet und am nächsten Tag mit 30 µl TE-Puffer für 15 Minuten im 37°C-Schrank inkubiert. Gegen störende restliche RNA wurden zudem 3 µl RNase (10 mg/ml, Applichem, Darmstadt) zugefügt.

2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die Deletion der Mutante *R. eutropha ΔphaZa1* zu überprüfen, wurden anhand spezifischer Primer die Fragmente aus Wildtyp- und *ΔphaZa1*-DNA amplifiziert. Während der intakte Wt-Abschnitt 1,5 kb groß ist, müsste die Mutante um den Deletionsabschnitt kleiner sein, das heißt noch ca. 700 bp groß.

Zu einer erfolgreichen PCR führte der folgende Ansatz:

Taq-Puffer (Fa. Genaxxon)	5 µl
DSMO	3 µl
Primer 1	10 µl
Primer 2	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
H ₂ O	20 µl
	49 µl

In der Praxis wurde ein Mastermix erstellt, der mindestens für einen Ansatz mehr als nötig berechnet wurde, um ausreichend davon zu haben. Zu den 49 µl Ansatz wurde in das PCR-Reaktionsgefäß 1µl Taq-Polymerase (1:10 mit H₂O bidest verdünnt, Fa. Genaxxon) pipettiert und sofort das PCR-Programm gestartet:

Tab. 3 Zeitschema PCR-Programm (Gerät: TGradient Thermocycler, Biometra, Göttingen)

0.)	94°C	2 min (hot start)
1.)	94°C	30 sec
2.)	Gradient (10 Punkte: 60°C +/- 5°C) Proben in: 60,6°C / 61,8°C / 64,1°C	30 sec
3.)	70°C	60 sec
4.)	70°C	5 min
5.)	4°C	Ende

30 Zyklen

2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Um das Ergebnis der PCR sichtbar zu machen, wurden die Produkte mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt und die DNA anschließend durch Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Licht sichtbar gemacht. Zur Herstellung eines Gels wurde 1 % (w/v) Agarose im TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und daraus in der Apparatur ein 2-3 mm dickes Gel gegossen, je nach Apparatur und Kamm mit 9-30 Taschen, die 10-15 µl Probe aufnehmen. Nachdem das Gel eine feste Konsistenz hatte, wurde es mit Laufpuffer bedeckt und vorsichtig der Kamm entfernt. Nun konnten die Proben (versetzt mit 10 x Ladepuffer) und der Marker aufgetragen werden. Im Fall der PCR in Kapitel 3.4.5 wurden 9 µl PCR-Ansatz mit 1 µl Ladepuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Bei 140 Volt betrug die Laufzeit ungefähr 30-40 Minuten. Wenn der blaue Laufpuffer am unteren Ende des Gels angekommen war, wurde der Strom abgestellt und das Gel ungefähr 5 Minuten in das Ethidiumbromid-Bad gelegt. Nach kurzem Entfärben im Entfärbebad wurde das Gel unter UV-Licht (365 nm) fotografiert.

Tab. 4 Für Agarose-Gelelektrophorese benötigte Lösungen

TBE-Puffer (Laufpuffer)	50 mM Tris 50 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
Agarose-Gel	1% Agarose in 1x TBE-Puffer
Färbelösung mit Ethidiumbromid	200 - 400 µl Ethidiumbromid (10 mg / ml) in 200- 400 ml H ₂ O
Entfärbelösung	H ₂ O

Fortsetzung Tabelle 4: Für Agarose-Gelelektrophorese benötigte Lösungen

10x Ladepuffer	0,25% Xylencyanol 0,25% Bromphenolblau 50% Glyzerin 0,25 mM EDTA pH 8
Marker	0,3 µg Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas)

2.9 Granulaisolierung und -waschen

Schon vor dem Zellaufschluß wurden Glyceringradienten zur Isolierung des PHB vorbereitet und im Gefrierschrank bei -20°C gelagert. Spätestens mit Beginn des French-Pressing wurden sie zum Auftauen in den Kühlschrank bei 4°C gestellt. Einen Überblick über die je nach PHB-Isolat optimierten Gradienten gibt Tabelle 27 (Kapitel 3.6).

Für PHB des Modellorganismus *R. eutropha* bestand der 1. Gradient aus 5 ml 87% Glycerin, vorsichtig überschichtet mit 10 ml 50% Glycerin. In Einzelfällen wurden die isolierten Granula ca. 1:1 mit 1 mM TrisHCl verdünnt und zur Reinigung auf einen 2. Gradienten gegeben. Dieser bestand aus je 5 ml: 87%, 80%, 60% und 40% Glycerin (Handrick 2000). Das Gießen gelingt gut, wenn man mit einer 5 ml-Pipette das Glycerin langsam an den Innenrand des Gradientenröhrchens pipettiert.

Auf jeden 1. Gradienten wurden vorsichtig maximal 10 -12 ml Zellaufschluß gegeben. Die Röhrchen kamen in die rot-metallenen Zentrifugenröhrchen (Fa. Beckman) und wurden mit dem entsprechenden Deckel genau gegeneinander austariert. Die Plastikröhrchen sollten dabei fast ganz voll sein, sonst verbiegen sie. Gegebenenfalls wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Ultrazentrifugation erfolgte im Fall von nPHB aus *R. eutropha* für 40 Minuten bei 20.000 rpm (Beckman Avanti-35-Ultracentrifuge, SW28-Rotor). Dabei wurde sowohl für das Beschleunigen als auch das Abbremsen der Zentrifugation der „Slow“-Modus eingestellt. Anschließend wurden die Röhrchen vorsichtig auf Eis gestellt und die PHB-Granula wiederum mit Hilfe der 5 ml-Pipette abgenommen. Die Bedingungen für nPHB anderer Organismen finden sich in Tabelle 27 (Kapitel 3.6).

Um möglicherweise unspezifisch gebundene Enzyme von den isolierten nPHB-Granula und um Glycerin zu entfernen, wurden sie vorsichtig gewaschen. Dazu wurde das nPHB mit rund 2 Volumen eiskaltem 0,1 mM TrisHCl (pH 8) verdünnt und kurz zentrifugiert (ca. 20 Sekunden, 12.000 rpm). Als Test, ob die Granula anschließend noch eine amorphe Struktur aufwiesen, wurde nPHB-spezifische Depolymerase PhaZ7 aus *P. lemoignei* zu einer kleinen Menge pipettiert. Dabei waren zwei Nachweis-Varianten möglich: Zum einen wurden als grober Schnelltest in eine 1 ml - Plastikkuvette H₂O und einige µl nPHB pipettiert, so dass die OD₆₀₀ unter 1 lag. Durch Zugabe von ca. 0,5 µl isoliertem PhaZ7 (isoliert von R. Handrick, 0,3 mg /ml) wurde nPHB rasch hydrolysiert und die OD₆₀₀ sank deutlich. Bei denaturiertem PHB war dies nicht der Fall. Eine sensitivere Bestimmung der Nativität erfolgte mit dem pH-Stat. Hier wurden zu dem vorgelegten Tris-Puffer zunächst die Granula zugegeben und gewartet, bis der Soll-pH erreicht war. Anschließend kamen ebenfalls rund 0,5 µl isoliertes Enzym dazu und anhand der Säurefreisetzung bzw. Zugabe von NaOH konnten Rückschlüsse auf die Struktur des PHBs gezogen werden. Auffällig war, dass sich

Granula nach dem Waschen unter gleichen Bedingungen schwerer resuspendieren ließen, wenn sie aus NB-Kultur stammten als aus MM-Kultur. Die Granula klebten eher zusammen und denaturierten so auch schneller.

2.10 Bestimmung des PHB-Gehaltes der isolierten Granulasuspension

Auf der Feinwaage wurden parallel in drei leergewogene 2 ml-Reaktionsgefäße jeweils 500 mg Glycerin-Granulasuspension pipettiert. Die exakte Einwaage wurde notiert, je 1 ml Aqua dest. zupipettiert, gevortext und ca. 10 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge). Anschließend wurden rund 750 µl Überstand abgenommen, verworfen und zum Abbau organischer Zellreste 750 µl Natriumhypochlorit-Lösung dazugegeben. Durch die Entwicklung von Chlorgas stehen die Reaktionsgefäße unter Druck, daher musste ab jetzt mit Handschuhen, Schutzbrille und Sicherheitskappen für die Eppendorftubes gearbeitet werden. Die Ansätze wurden nach vorsichtigem Resuspendieren durch Vortexen einige Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nachdem jeweils zum leichteren Pelletieren weitere ca. 300 µl Aqua dest. zu jeder Probe gegeben worden waren, wurde das inzwischen denaturierte PHB (dPHB) durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 14.000 rpm von den gelösten Zellresten getrennt. Resuspendieren des PHB-Pellets in Aqua dest. und Zentrifugieren entfernte restliches Natriumhypochlorit. Nach Trocknen (im 60°C-Schrank) wurden die Reaktionsgefäße mit den dPHB-Pellets auf der Feinwaage gewogen und das zu Beginn bestimmte Leergewicht abgezogen.

2.11 Herstellung artifizieller PHB-Granula (aPHB)

Mit Hilfe von amphiphilen Detergentien kann denaturiertes PHB (dPHB) in Lösung gehalten werden und erhält dadurch einen ähnlich amorphen Charakter wie natives PHB. Dazu wurden 1,5 g dPHB in 20 ml Chloroform in einer 150 ml Schottflasche rund 30 Minuten bei 60°C auf der Heizplatte gerührt, bis sich das Polymer vollständig gelöst hatte. Nach Zugabe von 100 ml 50 mM Natriumcholat entstand durch Ultraschallbehandlung eine weißliche Emulsion. Dazu wurde die Ultraschallsonde für zwei Minuten (Zyklus = 50, Amplitude = 40%) in die Lösung getaucht. Der Ansatz rührte unterm Abzug über Nacht, um das Chloroform abdampfen zu lassen. Das von Cholat umhüllte aPHB ist nicht lange stabil, es fällt leicht wieder aus. Daher ist es ratsam, im Zweifelsfall lieber frisches herzustellen oder bei Versuchen ein Aliquot Suspension (ohne Bodensatz aufzuwirbeln) zusätzlich zu entnehmen und den wirklichen PHB-Gehalt durch abzentrifugieren, trocknen und wiegen erneut zu bestimmen.

2.12 Isolierung PhaZa1-his

2.12.1 Kultivierung *E. coli* JM 109

Von einer LB-Ampicillin-Agarplatte wurden morgens 20 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Abends wurden 2 x 400 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit 2,5 ml 40 % Rhamnoselösung versetzt und mit der gesamten 20 ml-Vorkultur (*E. coli*, pJoe 4036.4, SK 2914) angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler. Geerntet wurden die Zellen durch 30 Minuten Zentrifugation (Beckman Avanti J-25, JA-10-Rotor) bei 5000 rpm. Das Pellet wurde in 50 mM KP-Puffer, pH 8, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Diesmal erfolgte die Resuspension des Pellets in rund 20 ml 50 mM KP-Puffer, pH 8

und es wurden rund 50 µl DNase I (1 mg/ml) hinzugegeben. Der Zellaufschluss nach der French Press (siehe 2.5) wurde schließlich zweimal für 60 Minuten bei 35.000 rpm in der Ultrazentrifuge (Beckman Optima LE-80K) zentrifugiert und der klare Überstand für die Isolierung von PhaZa1-his auf Eis aufbewahrt.

2.12.2 Aufreinigung PhaZa1

Für die Aufreinigung des Proteins mit his-tag wurden zwei Säulchen mit je 1 ml Ni-NTA-Material (Quiagen) eingesetzt. Pro Säule wurden rund 5 ml Überstand aufgetragen. Der Durchfluss wurde in 15 ml-Falconubes aufgefangen und auf Eis aufbewahrt. Es folgte das Waschen der Probe mit niedrig konzentriertem Imidazol-Puffer und die Elution des Proteins bei höheren Konzentrationen. Jeweils 1 bzw. 2 ml Eluat wurden als eine Fraktion in einem 2 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen und auf Eis gestellt. In der Regel verlief die Reinigung nach folgendem Schema:

Tab. 5 Elutionsgradient Aufreinigung PhaZa1-his aus rekomb. *E. coli* über Nickel-NTA-Säule

Fraktionsbezeichnung	
W1 - W2 (Waschfraktion)	je 2 ml 50 mM Imimidazol-Puffer
W3 - W5	je 1 ml 100 mM
W6 - W8	je 1 ml 150 mM
W9 - W12	je 1 ml 200 mM
W13 - W16	je 1 ml 250 mM
H ₂ O-1 + H ₂ O-2	Je 2 ml H ₂ O bidest

Ni-NTA-Elutionspuffer

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazole	je nach Puffer (50, 100, 150, 200 und 250 mM)
pH 8 (mit 1-10 M NaOH)	

2.13 Proteinbestimmung (Bradford-Test)

2.13.1 Bradford-Reagenz

Coomassie Brilliant Blue G 250	100 mg
Ethanol (96%, vergällt)	50 ml
H ₃ PO ₄ (85%)	100 ml
H ₂ O bidest	Ad 1000 ml

Die Lösung vor Gebrauch über Faltenfilter geben, um Krümel zu entfernen. Dunkel lagern.

2.13.2 Standard-Proteinlösung

Nachdem das Rinderserumalbumin (BSA) in einem Messzylinder eingewogen worden war (2 mg/ml), wurde zunächst nur mit der Hälfte des benötigten Wassers aufgefüllt und die Lösung mit Hilfe eines Magnetrührers vorsichtig gemischt. Starkes Rühren oder Schütteln führt sonst zum Schäumen des Proteins. Sobald das Protein gelöst ist, wurde der Rührmagnet entfernt. Daran möglicherweise haftendes Protein wird dabei in die Lösung abgespült und alles mit dem restlichen Wasser aufgefüllt.

2.13.3 Testmethode

In eine 1 ml-Einweg-Küvette wurden zu 100 µl Probe 900 µl Bradfordreagenz pipettiert. Als Kontrolle dienten 100 µl Wasser. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert und anschließend wurde gegen die Kontrolle die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Inkubationsdauer ist theoretisch zwischen 5 und 30 Minuten variabel, solange für die Kalibriergerade und die Proben die gleiche Zeitspanne gewählt wird.

2.13.4 Kalibriergerade

Die 100 µl Probe enthalten je nach Standard zwischen 0,5 und 20 µg Protein, wobei die Gerade nur bis ca. 8 µg Protein einen linearen Verlauf zeigt.

Tab. 6 Zusammensetzung BSA-Proteinstandards für die Kalibriergerade des Bradfordtests

H₂O	Stammlösung	= µg Protein im Test
0	100	20
50	50	10
60	40	8
70	30	6
80	20	4
90	10	2
95	5	1
100	0	0

2.14 SDS-Gelelektrophorese

2.14.1 SDS-PAGE

Benötigte Lösungen:

SDS-Laufpuffer	12,1 g/l Tris 7,5 g/l Glycin 1 g/l SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl (4 fach) pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl (4 fach) pH 6,8
Gel 30	30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1
SDS-Lösung	10% in H ₂ O
APS-Lösung	10% in H ₂ O
TEMED	(N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
3 x Ladepuffer	15 ml 20% SDS 15 ml 87% Glyzerin 1,5 ml 2-Mercaptoethanol 75 mg Bromphenolblau ad 50 ml mit H ₂ O
Marker	5 µl Precision Plus Protein Standards, All Blue (Biorad)

Ansatz für ein 10%iges Trenngel:

H ₂ O	2 ml
Gel 30	1,7 ml
Trenngelpuffer	1,25 ml
10% SDS	50 µl
10% APS	25 µl
TEMED	2,5 µl

Ansatz für ein 4%iges Sammelgel:

H ₂ O	1,525 ml
Gel 30	325 µl
Sammelgelpuffer	625 µl
10% SDS	25 µl
10% APS	12,5 µl
TEMED	2,5 µl

Durchführung:

Die Bestandteile des Trenngels wurden gemischt, zügig in eine Apparatur der Firma Biorad gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol entfernt und auf das Trenngel das Sammelgel gegossen, in das vorsichtig der Kamm gedrückt wurde. Falls nötig, konnte das fertige Gel in Laufpuffer bei 4°C aufbewahrt werden.

Für ein 1 mm dickes Gel (ca. 10 Taschen) wurde Probe mit ca. 20 µg Protein und 3x Ladepuffer versetzt, 10 Min. bei 95°C gekocht und aufgetragen. Bei 20 mM pro Gel liefen die Proben rund 75-90 Minuten (4°C: Kühlraum).

2.14.2 Coomassie-Färbung

Nach der Auftrennung der Proteine durch die Gelelektrophorese wurden die Gele für die Coomassie-Färbung 20 Minuten in die Färbelösung gelegt (auf Wippe) und 3 x 20 Minuten entfärbt. Nach Abspülen mit Wasser wurden die Gele eingescannt, getrocknet oder vorübergehend in Wasser gelagert. Die Nachweisgrenze für Proteine liegt mit dieser Methode bei ungefähr 50-100 ng Protein.

Färbelösung:

Isopropanol	40 %
Essigsäure	10 %
Coomassie R250	0,1 % (w/v)

Lösung vor Gebrauch durch Faltenfilter geben

Entfärber:

Essigsäure	20 %
------------	------

2.14.3 Silberfärbung

Alternativ zur Coomassie-Färbung wurde für den Nachweis von isoliertem PhaZa1-his die Silberfärbung eingesetzt. Hiermit können bereits Proteinmengen von 1-10 ng nachgewiesen werden.

Tab. 7 Komponenten Silberfärbung

Lösung	Zusammensetzung	Für 250 ml
Fixierlösung	40% Methanol	100 ml
	13,5% Formaldehyd	33,75 ml
Natriumthiosulfat	0,02% Na ₂ S ₂ O ₃	0,05 g
Silberlösung	0,1% AgNO ₃	0,25 g
Entwickler	3% NaCO ₃	7,5 g
	0,05% Formaldehyd (Formalin)	125 µl
	0,000016% Na ₂ S ₂ O ₃	200 µl der 0,02%-Lösung
Stopplösung	50 mM EDTA	4,65 g

Das SDS-Gel wurde für 15 Minuten auf einer Wippe in der Fixierlösung inkubiert und anschließend zweimal je 5 Minuten in Wasser gespült. Es folgte eine Minute Behandlung in der Thiosulfatlösung und nach dreimal rund 20 Sekunden spülen in Wasser zehn Minuten Inkubation in der Silberlösung. Danach wurde das Gel erneut kurz mit Wasser gespült und solange in die Entwicklerlösung gelegt, bis alle Banden sichtbar waren. Die Entwicklung wurde durch Spülen mit EDTA gestoppt.

2.15 Messung Enzymaktivitäten: Hydrolyse

2.15.1 pH-Stat Titration

Die Standard-Titration lief unter folgenden Parametern ab:

- 30°C
- pH 7,5
- 10 ml Ansatz
- 0,1 mM Tris-HCl
- 10 mM NaOH zur Titration

Nach Anschalten des Wasserbades wurden 10 ml des 0,1 mM TrisHCl-Puffers (pH 7,5) in das Reaktionsgefäß pipettiert. Die Bürette des Titranten wurde durch das Spülprogramm von möglichen Luftblasen befreit, mit der 10 mM NaOH-Lösung gefüllt und in den Puffer gehängt. Auch Temperaturfühler und pH-Elektrode wurden vorsichtig in die Lösung getaucht, nur so weit dass der Rührmagnet sie nicht beschädigen kann. Nach Erreichen der Soll-Temperatur von 30°C wurde

zunächst der pH-Wert gemessen und falls nötig von Hand mit verdünnter HCl oder NaOH auf pH 7,5 oder knapp darunter gebracht. Sollte zunächst der Nullwert des Puffers gemessen werden (wegen seiner Ansäuerung durch CO₂ aus Luft), wurde das System ohne die Zugabe von nPHB-Granula gestartet. Die Standard-Methode besteht aus drei Blöcken. Der erste Block des Programmes misst zunächst nur den pH-Wert, im zweiten Block korrigiert der pH-Stat ihn mit 10 mM NaOH gegebenenfalls zum Soll-pH hin. Im dritten Block erfolgt die eigentliche Titration und Messung der Säurefreisetzung. Nachdem hier über 10-15 Minuten eine konstante Rate sichtbar war, wurden native PHB-Granula hinzu pipettiert. In anderen Fällen ohne Puffer-Nullwert wurden die Granula von Anfang an mit in das Reaktionsgefäß gegeben.

Entscheidend bei der Bedienung des Programmes ist, einen Lauf nicht durch das Anklicken der roten Stopp-Taste zu beenden. Hierdurch gehen alle Daten des aktuellen Versuches verloren. Stattdessen muss im dritten Programm-Block eine entsprechende Stopp-Zeit eingegeben werden.

2.15.2 3HB-Dehydrogenase-Test

Während der pH-Stat nur die allgemeine Säurefreisetzung des Probenansatzes misst, kann mit dem enzymatischen 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase-Test spezifisch die Menge an 3-Hydroxybutyrat in einer Probe festgestellt werden. Die Reaktion läuft folgendermaßen ab:

Das Enzym 3HB-Dehydrogenase setzt D(-)-3-Hydroxybutyrat (D-3HB) zu Acetoacetat um, wobei im gleichen stöchiometrischen Verhältnis NAD zu NADH reduziert wird. Die Bildung von NADH kann optisch im Photometer bei 254 nm gemessen werden und die ausgerechnete Konzentration mit der Menge an D-3HB gleichgesetzt werden.

Die Messungen erfolgten im 1 ml-Ansatz in Plastikkuvetten und bestanden aus:

10 mM MgCl ₂	100 µl
33 mM NAD	100 µl
Probe	20 – 200 µl
3-HB-Dehydrogenase (Roche, 5mg/ml bzw. 3 U/mg)	2,5 µl
33 mM Tris-HCl (pH 8)	ad 1000 µl
30°C	

Bevor das Enzym zugegeben wurde, kam die Küvette bereits für 2-3 Minuten in das Photometer. Dadurch wurde der Ansatz auf die benötigten 30°C temperiert und der Absorptionswert vor der Enzymreaktion gemessen. Nach Zugabe des Enzyms wurde die Absorption bei 340 nm solange gemessen, bis keine Zunahme mehr erkennbar war (im Normalfall nach max. 30 Minuten). Über die Absorptionsdifferenz zwischen End- und Anfangswert der Messung (vor Zugabe des Enzyms) konnte die Konzentration an gebildetem NADH und rückschließend auf die Menge an umgesetztem D(-)-3HB ausgerechnet werden. Für die Arbeit mit 3-HB-Standards ist entscheidend, dass das Enzym nur die D-Form des Substrates umsetzen kann. Daher finden sich beim Einsatz von 1 mM 3-HB-Gemisch (R, D) nur 0,5 mM NADH wieder. Da die Absorptionsmessung bei 254 nm nur bis etwas 0,1 linear ist, wurden Proben mit höheren Werten in verdünnter Form erneut analysiert.

2.15.3 HPLC-Analyse Hydrolyseprodukte

Neben der Online-Messung mit dem pH-Stat und dem enzymatischen Nachweis von 3-HB wurden die Hydrolyseprodukte von nPHB, nPHV und nPHO (Monomere und Oligomere) per HPLC analysiert. Die dazu nötige Derivatisierung und die HPLC-Bedingungen sind in Kapitel 2.17 „Derivatisierung mit BPB“ und 2.18 „HPLC-Analytik“ beschrieben.

2.16 Messung Enzymaktivitäten: Thiolyse

2.16.1 Hydrolyse- und Thiolyseansatz

Die Hydrolyseversuche wurden anfangs im 10 – 15 ml Maßstab im pH-Stat ausgeführt. Das hatte den Vorteil, dass sowohl online die Säurefreisetzung verfolgt werden konnte und es zudem möglich war, Proben für den Enzymtest oder die HPLC-Analytik zu entnehmen. Für die Thiolysereaktion nativer Granula muss jedoch eine Mindestmenge CoA (1 mM) im Ansatz enthalten sein, was im großen Maßstab sehr teuer wird. Aus diesem Grund wurde der Versuch in den 1 ml-Maßstab überführt. Zum besseren Vergleich geschah dasselbe mit den Hydrolyse-Versuchen.

Die zu untersuchenden nativen PHB-Granula, gewaschen oder ungewaschen, wurden mit Hilfe der Feinwaage exakt eingewogen und anschließend sofort wieder auf Eis gestellt. Die folgenden Reagenzien wurden ebenfalls vom Eisbad aus zu den nPHB-Granula pipettiert, um eine vorzeitige Hydrolyse oder Thiolyse zu vermeiden: 0,5 M KP-Puffer, pH7, H₂O und für die Thiolyse 10 mM CoA (Tabelle 8). Für Versuche mit ungewaschenen nativen PHB-Granula wurde die mg-Menge an Glycerin-Granulasuspension auf der Feinwaage eingewogen, die 5 mg reinem PHB entspricht. Für die Untersuchung gewaschener nPHB-Granula wurde die gleiche Menge nPHB gewaschen (siehe Kapitel 2.9) und das Pellet vorsichtig in 100 µl 50 mM KP-Puffer, pH 7, resuspendiert. Zur Bestimmung des Anteils an reinem PHB (dPHB) siehe auch Kapitel 2.10.

Tab. 8 Pipettierschema von Hydrolyse- oder Thiolyseansätzen mit nPHB im 1ml-Maßstab

	Hydrolyse	Thiolyse
nPHB	100 µl / 5 mg *	100 µl / 5 mg *
0,5 M KPP, pH 7	100 µl	100 µl
10 mM CoA	100 µl	100 µl
H ₂ O	Ad 1000 µl	Ad 1000 µl

*je nachdem, ob es sich um gewaschene, resuspendierte Granula handelt (100 µl) oder um ungewaschene Granula in Glycerin (soviel mg Glycerinsuspension einsetzen, die 5 mg PHB enthalten)

Die Inkubationstemperatur betrug 30°C im Heizblock. Proben à 200 µl wurden in der Regel nach 0, 15 und 30 Minuten entnommen, sofort auf Eis gestellt und anschließend in einer Eppendorfzentrifuge im Kühlraum bei 4°C 15 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße pipettiert und konnte direkt für eine CoA-Analyse per HPLC eingesetzt bzw. für die 3HB-Bestimmung derivatisiert werden. Das Pellet wurde verworfen.

2.17 Derivatisierung mit Bromphenacylbromid (BPB)

(ausführlich auch unter Kapitel 3.2)

2.17.1 Derivatisierung

Da die Hydrolyseprodukte von PHB keine gut absorbierenden Elemente besitzen, wurde angelehnt an Durst et al. 1975 eine Derivatisierungsvorschrift entwickelt und optimiert. Der Phenolring von Bromphenacylbromid (Abb. 4) absorbiert sehr gut bei 254 nm. Durch Verknüpfung mit diesem Reagenz können 3-HB / 3-HV / 3-HO-Monomere und Oligomere schon in sehr geringen Konzentrationen (nmol) per HPLC detektiert werden.

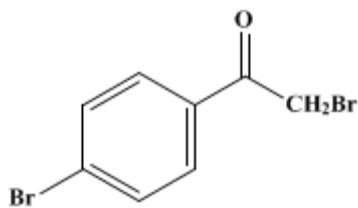


Abb. 4 Strukturformel Bromphenacylbromid, aus: www.orgsyn.org

Für die Derivatisierung werden folgende Reagenzien benötigt:


100 mM Triethanolamin (TEA) in Aceton	➤ 138 µl + 9,86 ml Aceton
10 mM Bromphenacylbromid (BPB) in Acetonitril	➤ 27,8 mg / 10 ml Acetonitril
2 mM Kronenether (KE) in Acetonitril	➤ 50 mM: 202,3 mg / 10 ml Acetonitril 2 mM: 400 µl 50 mM + 9600 µl

Für die Derivatisierung wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 10 – 100 µl Probe oder Standard mit 100 µl 100 mM TEA versetzt und gevortext. Soweit abschätzbar sollte dabei die eingesetzte Substratkonzentration zwischen 1-5 mM liegen. In der Speedvac-Zentrifuge (CON-1000, Fröbel) wurde der Ansatz getrocknet. Je nachdem wieviel Glycerin noch in der Probe enthalten war, bleibt kein sichtbares (bei Standards) oder aber ein erkennbares Glycerin-Pellet zurück. In das Reaktionsgefäß wurden nun je 150 µl 10 mM BPB und 150 µl 2 mM KE (beides in Acetonitril) pipettiert und der Ansatz über 90 Minuten bei 80°C im Heizblock inkubiert. Achtung: Schutzkappen auf die Eppendorf-Cups und Brille und Handschuhe tragen, da Gefäße durch den Überdruck aufspringen können und heißes, giftiges Acetonitril herauspritzen kann! Alle 15-20 Minuten wurden die Proben vorsichtig gevortext. Nach Abkühlen wurden die Ansätze für 10 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert.

Rund 25 µl des Überstandes kamen zur Analyse in ein HPLC-Vial, 2 µl wurden auf die Säule aufgetragen und mit der HPLC-Standardmethode (2.18.1) analysiert. Die restliche Probe wurde sofort bei -20°C eingefroren, damit sich durch Verdampfen des ACN die Konzentration nicht änderte.

Tab. 9 Beispiel Umrechnung: Flächeneinheiten HPLC -> Substratkonzentration der Probe

Enthaltenes 3HB (Bsp.)	Derivatisierungsschritte rückwärts
1 nmol	2 µl injizierte Probe
150 nmol	300 µl ganze Probe (BPB und KE in Acetonitril)
150 nmol	Getrockneter Ansatz
150 nmol	100 µl Probe mit 100 µl TEA
150 nmol	100 µl Probe
→ 1,5 mM 3HB in der Probe	



Faktor 150

2.17.2 Standards

Aus der Arbeit von Rene Handrick (Handrick, 2003) sind Reste an PHB-Oligomerstandards vorhanden. Sie wurden synthetisiert von B.M. Bachmann und P. Waser (AG Prof. Seebach, Organische Chemie, ETH Zürich) und besitzen laut Aufschrift eine Konzentration von 20 µg / µl. Da jedes Oligomer, ob Monomer oder Oktamer, nur eine Carboxylgruppe besitzt, kann daran auch jeweils nur eine Bromphenacyl-Gruppe binden. Diese Gruppe ist alleine entscheidend für die Detektion der Verbindung, so dass darüber alle Oligomere gleich quantifiziert werden können. Zudem konnte gezeigt werden, dass nach 90 Minuten Inkubation auch die länger-kettigen Verbindungen wie das Oktamer vollständig derivatisiert sind.

Jeder Standard wurde einzeln derivatisiert und per HPLC analysiert: 10 µl des Standards und 50 µl 100 mM TEA wurden gemischt und die Derivatisierung wie unter 1.18.1 beschrieben durchgeführt. Alle derivatisierten Standards wurden per HPLC analysiert wodurch ihre jeweilige Elutionszeit bestimmt werden konnte. Für eine Standard-Mischung wurden Aliquots der einzelnen Derivate zusammenpipettiert: um in einer Größenordnung zu liegen, je nach Peakhöhe unterschiedliche Volumina. Eines der derivatisierten Oligomere wurde als interner Standard in höherer Konzentration zugegeben. Anhand einer Konzentrationsreihe mit derivatisiertem 3-HB-Standard (Kap. 3.2.2.3, Abb. 15) kann von den HPLC-Flächeneinheiten (FE) auf die Substratmenge in der Ausgangsprobe zurück gerechnet werden. Dabei gilt für Werte bis ca. 5000 FE die Gleichung 1200 FE = 1 nmol. Ist die Peakfläche größer, liegt das Verhältnis bei ungefähr 1000 FE = 1 nmol. Für genauere Werte sollte die Messung jedoch mit verdünnter Probe wiederholt werden. Tabelle 2 zeigt, welche Faktoren bei der Berechnung beachtet werden müssen: zunächst Faktor 150 vom injizierten Volumen zur Gesamtmenge und schließlich der Bezug auf die ursprünglich zur Derivatisierung eingesetzte Probenmenge.

2.18 HPLC-Analytik

Die HPLC-Analytik der mit Brom derivatisierten 3HB-Oligomere wurde im Rahmen der Arbeit neu erstellt. Daher ist sie im Abschnitt Experimente und Ergebnisse in Kapitel 3.3 sehr detailliert erklärt. Auch die Standard-Chromatogramme sind dort aufgeführt. Zur besseren Übersicht folgt hier jedoch zusätzlich eine Auflistung der Laufmittel, Gradienten und weiteren Messbedingungen. Zudem wird die Methode zur Auftrennung von CoA-Derivaten vorgestellt. Sie wurde zunächst von Uchino und Saito (2006) etabliert und für diese Arbeit leicht abgewandelt.

Bei allen HPLC-Läufen war der Säulenofen auf 30°C temperiert. Die Flussrate betrug 0,8 ml / min und die Detektion fand bei 254 nm statt. Bei der Säule handelte es sich um eine Lichrosphere 100, RP-18, endcapped mit 5 µm-Porendurchmesser und einer Größe von 250 x 4 mm. Die zwischenzeitlich eingebaute Vorsäule bestand ebenfalls aus Lichrosphere 100, RP-18, endcapped, 5 µm, 20 x 4 mm. Der Standardauftrag betrug 5 µl Probe.

2.18.1 Auftrennung Bromphenacyl-Derivate (3HB-Oligomere)

Laufmittel A: 0.01 M Ammoniumformiat mit 2 % Methanol, pH 4.
Laufmittel B: 100 % Methanol.
Säule: RP-18 Lichrosphere 100 endcapped (5 µm, 4,6 x 250 mm) mit Vorsäule (RP-18 Lichrosphere 100, endcapped, 5 µm, 20 x 4 mm)
Flußrate: 0,8 ml / min
Säulentemperatur: 30°C

Tab. 10 Laufmittelgradient zur Auftrennung von mit BPB derivatisiertem 3HB und 3HB-Oligomeren

	A: Ammoniumform.	B: Methanol
0 min	60 %	40 %
28 min	0 %	100 %
33 min	0 %	100 %
34 min	60 %	40 %
39 min	60 %	40 %

2.18.2 Auftrennung CoA-Ester (3HB-Oligomere)

Laufmittel A: 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, mit 5 % Methanol, pH 4,7
Laufmittel B: 100 % Methanol.
Säule: RP-18 Lichrosphere 100 endcapped (5 µm, 4,6 x 250 mm) mit Vorsäule (RP-18 Lichrosphere 100, endcapped, 5 µm, 20 x 4 mm)
Flußrate: 0,8 ml / min
Säulentemperatur: 30°C

Tab. 11 Laufmittelgradient zur Auftrennung von CoA-Estern

	A: Kaliumphosphat	B: Methanol
0 min	95 %	5 %
10 min	85 %	15 %
20 min	80 %	20 %
25 min	50 %	50 %
27 min	0 %	100 %
30 min	0 %	100 %
31 min	95 %	5 %
39 min	95 %	5 %

2.19 ESI-MS (ESI plus)

Um die HPLC-Peaks der derivatisierten 3-HB-Standards - aber auch einzelne unklare Probenpeaks - eindeutig den einzelnen Substanzen zuordnen zu können, wurden die Derivate zusätzlich mit einer Kopplung von HPLC und Massenspektroskopie (MS) untersucht. Dabei handelte es sich um Elektronen-Spray-Ionisations-MS, bei der die Probenmoleküle durch schlagartigen Druckabfall (Sprühen) ionisieren. Im ESI+-Modus lagert sich dabei ein zusätzliches Proton an die Verbindung, bei ESI- löst sich ein Proton ab. Diese Messungen konnten dank der freundlichen Unterstützung von Herrn Dr. Armbruster am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hohenheim durchgeführt werden.

Die Probenvorbereitung, Laufmittel und HPLC-Methode entsprachen der normalen HPLC-Analytik. Lediglich an die Kapillare, die vom UV-VIS-Detektor in den Abfallbehälter führt, wurde ein Splitter-Bauteil angebracht: dadurch wurde die eine Hälfte der Probe in das Massenspektrometer geleitet, die andere in den Abfallbehälter. Für die Interpretation der detektierten Masse/Ladungswerte (m/z) muss beachtet werden, dass Brom in der Natur und im Derivatisierungsreagenz Bromphenacylbromid (BPB) in zwei Isotopen vorkommt: als Br^{79} zu 50,7 % und als Br^{81} zu 49,3 %. Entsprechend tauchen bei BPB-Derivaten immer zwei Massenpeaks auf, die sich um 2 m/z unterscheiden. Im von uns angewandten ESI-plus-Modus erhöht sich außerdem die m/z -Zahl um eins, da sich ein Proton anlagert. Zudem bilden sich bei MS-Messungen durch Substanzen aus dem Laufmittel oft N-Addukte oder Na-Addukte, so dass die m/z -Werte um 17 (N) oder 22 (Na) höher werden (Tabelle 13).

Tab. 12 Berechnung m/z -Werte von derivatisierten Verbindungen (BPB) nach HPLC-ESI-MS-Analyse

ESI-MS-Analyse von Bromphenacyl-Derivaten:	
Berechnung möglicher m/z-Werte von gesuchten Verbindungen (z.B. 3-HB-Oligomere)	
Masse der Verbindung	
+ 278	(Masse von BPB mit je Br^{79} und Br^{81})
- (79+1) oder - (81+1)	(minus ein Brom-Molekül (Br^{79} oder Br^{81}) plus ein Proton)
+ 1 (ESI-plus) / -1 (ESI-minus)	(je nach Mess-Modus: Proton lagert sich an oder löst sich)
+ 17 (N-Addukt) / + 22 (Na-Addukt)	(durch Reaktion mit Pufferbestandteilen: Addukt-Bildung)

Für 3-HB-Monomer, -Oligomere und 3-HO wurde die folgende Tabelle aufgestellt:

Tab. 13 Übersicht Massenverteilung nach HPLC-ESI+ Massenspektroskopie (m/z)

3HB	Säure	BPB-ESI+ Brom79	BPB-ESI+ Brom81	BPB-ESI+ Brom79 & NH ₄	BPB-ESI+ Brom81 & NH ₄	BPB-ESI+ Brom79 & Na	BPB-ESI+ Brom81 & Na
Monomer	104	303	301	320	318	325	323
Dimer	190	389	387	406	404	411	409
Trimer	276	475	473	492	490	497	495
Tetramer	362	561	559	578	576	583	581
Pentamer	448	647	645	664	662	669	667
3HO-Monomer	160	359	357	376	374	381	379

Für die Analyse der Peaks wurden zwei Wege gewählt. Zum einen wurden für Peaks im DAD-Chromatogramms zeitlich passende Peaks im Massenspektrogramm gesucht. Dabei musste beachtet werden, dass die ESI-MS-Analyse um einige Sekunden zeitversetzt stattfand, nachdem die Probe den DAD bereits durchlaufen hatte. Die Masse-Peaks besitzen also immer etwas spätere Elutionszeiten. Das Computerprogramm konnte dabei zeigen, welche Massen hinter den Peaks stehen. Ein anderer Weg war die gezielte Suche nach bestimmten Massen, wie in Abbildung 5, wo nach den Massen der beiden Br⁷⁹- und Br⁸¹-Derivaten des 3HB-Hexamers gesucht wurde (733, 731 m/z). Sie eluieren bei 23,49 Minuten.

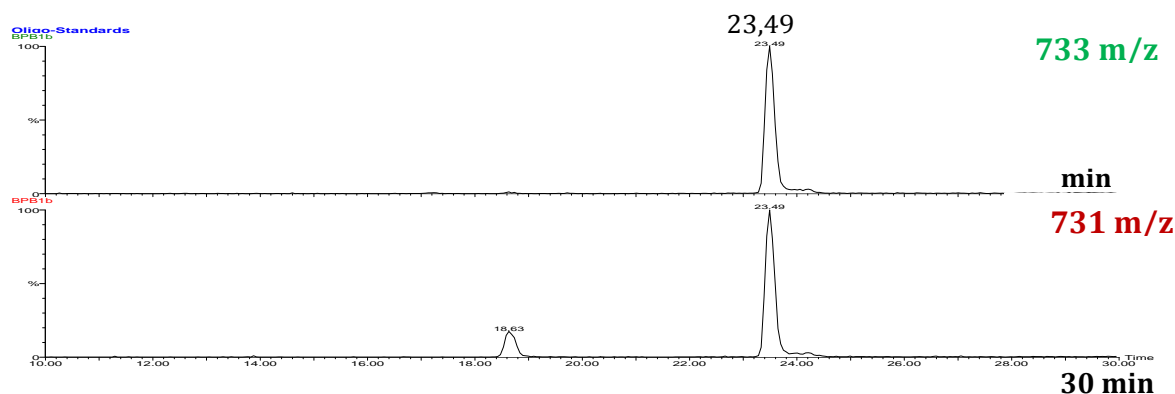


Abb. 5 Massenspektrogramm (ESI+), gezielte Suche nach 733 und 731 m/z, dem Masse/Ladungswert von mit BPB derivatisiertem 3-HB-Hexamer

2.20 Bestimmung Größenverteilung nPHB-Granula per PCS

(Photone Correlation Spectroscopy)

Für die Berechnung von Enzymaktivitäten isolierter nativer PHB-Granula ist die Bestimmung der Granuloberfläche entscheidend. Denn viele kleine Kugeln besitzen bei gleichem Gesamtvolumen bzw. -gewicht eine deutlich größere Oberfläche als wenige große und bieten daher theoretisch mehr Bindekapazität für Enzyme. Da die Methode erstmals für isolierte native PHB-Granula angewandt wurde, sind die Hintergründe ausführlich in Kapitel 3.3 erläutert.

Das Prinzip der Photonen-Korrelations-Spektroskopie ist für die Größenordnung von Granula (ca. 300 – 1500 nm) gut geeignet. Die Entwicklung der Methode erfolgte mit Hilfe von Mitarbeitern

der Arbeitsgruppe Biomimetrische Oberflächen (Leitung Dr. Günter Tovar) am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart. Bei dem PCS-Gerät handelte es sich um den Zetasizer Nano ZS90 von Malvern Instruments.

Für die Messung wurden 3 µl native Granula (in Glycerin, ungewaschen) zu 3 ml H₂O bidest in eine 3 ml-Plastikküvette pipettiert, vermischt, umgehend in das PCS-Gerät gestellt und die Messung gestartet.

Die Messung fand temperiert bei 25°C statt und bestand aus dreimal 10 Einzelmessungen, die jeweils zu einem Graphen gemittelt wurden (Abbildung 6). Je enger die Größenverteilung in der Probe war, desto kürzer war Messdauer, die in der Regel bei rund 15 Minuten lag.

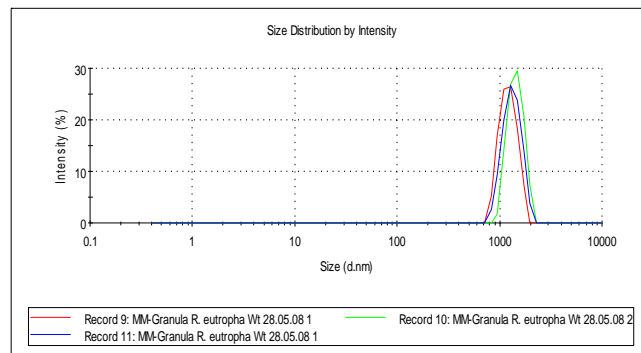


Abb. 6 PCS-Messung nPHB aus *R. eutropha* Wt (aus MM-Kultur), Overlay der drei Graphen gemittelt aus je zehn Einzelmessungen

Für die Auswertung wichtig war die Eingabe der folgenden Parameter:

- Brechungsindex des Substrates: 1,59 (orientiert an Polystyrol, da Daten für PHB fehlten)
- Brechungsindex des Lösungsmittels (Wasser): 1,33
- Viskosität des Lösungsmittels: 0,8872

Abbildung 7 zeigt die Ergebnisdatei nach Messung eines 600 nm Standards (Polystyrene in Wasser, Nanospere™ Size Standards, Duke Scientific Corporation, Palo Alto). Dabei wird deutlich, dass die Probe einen niedrigen Polydispersionsindex (< 0,1) aufweist, das heißt eine enge Größenverteilung – wie für einen Standard üblich. Der Mittelwert liegt jedoch abweichend vom 600 nm-Sollwert bei knapp 660 nm. Bei PCS-Messungen nach den aktuellen Methoden muss daher generell mit einer Abweichung von zehn Prozent gerechnet werden.

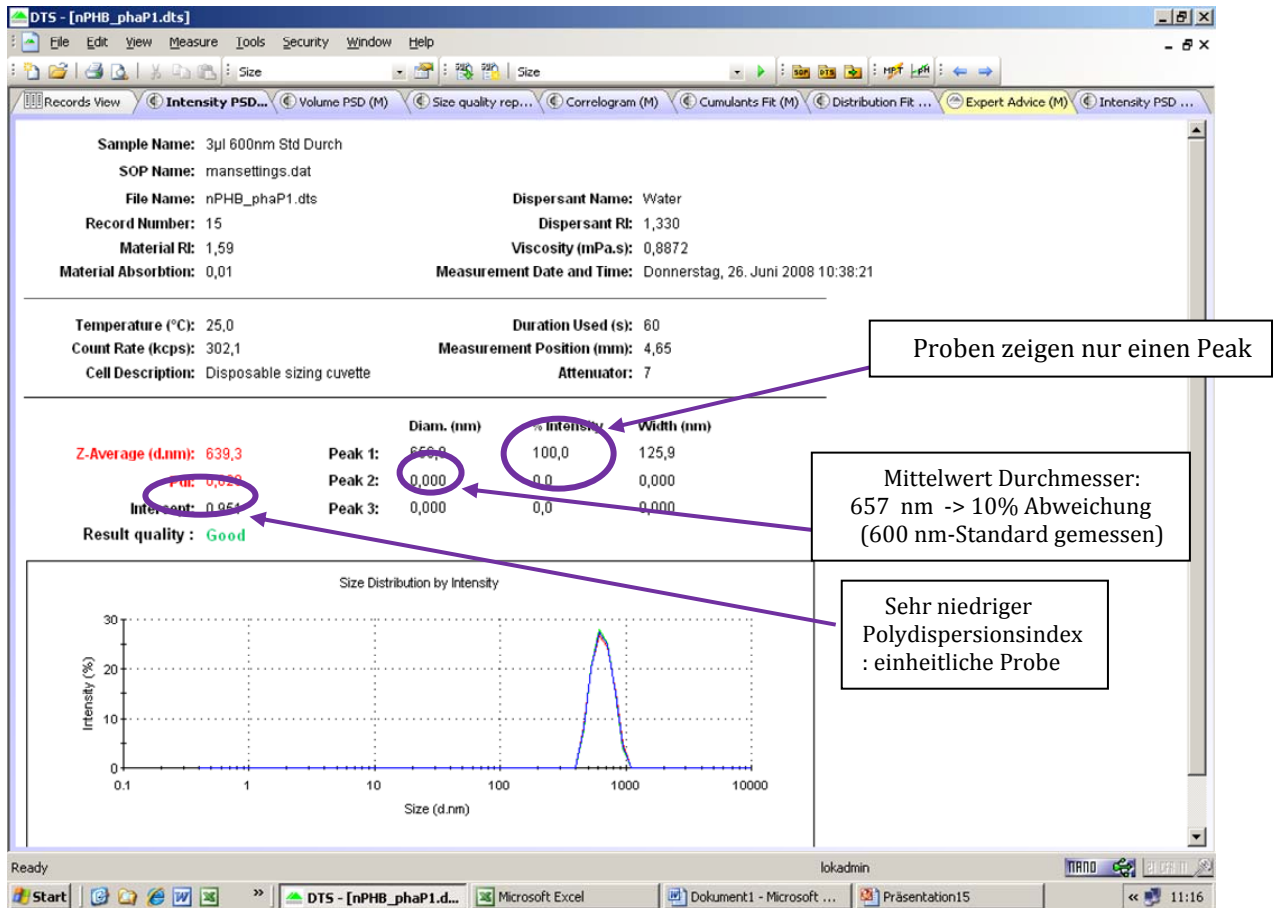


Abb. 7 Screenshot einer Ergebnisdatei nach PCS-Messung eines 600 nm- Nanospere™ Size Standards mit dem Zetasizer Nano ZS90 von Malvern Instruments (zugehöriges Software-Programm: DTS).

3 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

Der erste große Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der **Entwicklung neuer Methoden**. Sie bildeten die Voraussetzung für die im zweiten Teil beschriebenen Versuche zur **Charakterisierung des nativen PHA-Granulum-Komplexes**.

ENTWICKLUNG NEUER METHODEN

Im Vordergrund stand die Detektion der Hydrolyse von nPHB durch Depolymerasen, die an den isolierten nativen Granula haften. Dabei handelt es sich um eine sehr geringe, bisher kaum nachzuweisende Aktivität, die eine besonders sensitive Analytik erfordert. Aktivität bedeutet im Fall der PHB-Hydrolyse Spaltung von Esterbindungen und dadurch Freisetzung von Säuremolekülen: 3HB-Monomer oder -Oligomere.

pH-Stat

Ein etablierter Weg, Depolymeraseaktivität nachzuweisen, ist die Messung der Säurefreisetzung im pH-Stat. Dabei wird der pH-Wert im Reaktionsgefäß kontinuierlich gemessen und durch Zugabe von Lauge konstant gehalten. Über deren Verbrauch lässt sich direkt die Produktbildung feststellen. Bisher funktionierte diese Methode vorwiegend mit isolierten, konzentrierten Enzymen. Die Entwicklung von pH-Elektroden mit höherer Sensitivität und erweiterte Regelungsmöglichkeiten durch eine zunehmend schnellere Datenverarbeitung führten in den letzten Jahren zu deutlich sensitiveren pH-Stat-Geräten. Mit solch einer Titrationseinheit (842 Titrand, Metrohm, Herisau) gelang es in dieser Arbeit, die granula-gebundene Depolymeraseaktivität zu untersuchen.

HPLC

Der pH-Stat ermöglicht es, die Säurefreisetzung „online“ zu verfolgen und Veränderungen sofort detektieren zu können. Diese Methode gibt jedoch keine Auskunft über die Produkte, die entstanden sind. Vor allem bei Versuchen, in denen 3HB-Oligomere gebildet werden, fehlte bisher eine unkomplizierte, möglichst schnelle und ungefährliche Analytik. Im HPLC-Detektor (UV-VIS) zeigen 3HB-Verbindungen kaum Absorption, das Signal ist sehr schwach und nur bei hohen Produkt-Konzentrationen erkennbar. Angelehnt an den Nachweis von Fettsäuren nach Durst et al. (1975) wurde daher im Rahmen dieser Arbeit eine Derivatisierungs-Vorschrift mit Bromphenacylbromid (BPB) für 3HB-Monomer und Oligomere (bis zum Oktamer) entwickelt (2.17.1). Das sich anlagernde Bromphenacyl absorbiert Strahlung bei 254 nm sehr gut und ermöglicht so eine empfindliche Detektion der 3HB-Verbindungen. Zuletzt wurden die Parameter der HPLC-Methode wie die Laufmittel, der Laufmittelgradient und die Säule optimiert.

Photonenkorrelationspektroskopie (PCS)

Anders als bei der Aktivitätsbestimmung isolierter Enzyme fehlt bei der Messung nativer Granula eine klare Bezugsgröße, was vor allem bei vergleichenden Experimenten von Bedeutung ist. Während sich Tests mit gereinigtem Enzym auf „mg Protein“ beziehen, basieren in dieser Arbeit sämtliche Versuche auf der Angabe „mg PHB“. Dieser Wert ergibt sich aus gewaschenen und getrockneten isolierten Granula (2.9). Andere Arbeitsgruppen quantifizieren den PHB-Gehalt ihrer Granulaisolate, indem sie das gesamte PHB in Crotonsäure überführen. Diese ist aufgrund ihrer Doppelbindung per HPLC deutlich besser zu detektieren als 3HB (Karr et al., 1983). Ein anderer Weg ist die saure Methanolyse des Polymers mit anschließender GC-Analyse der gebildeten Methylester (Brandl et al. 1988). Alle diese Ergebnisse machen jedoch keine Aussagen zum Volumen und damit zur Oberfläche der einzelnen Granula, die entscheidend für die Menge

Oberflächen-gebundener Enzyme ist: Viele kleine Granula besitzen trotz gleicher Masse mehr Oberfläche als wenige große.

Die Größe von nPHB-Granula variiert je nach Organismus und Zellstadium. Sie kann mehr als 1000 nm Durchmesser erreichen, wie zum Beispiel für nPHB aus *R. eutropha* Δ phaP1 gezeigt werden konnte (Kap. 3.3.2 Abb. 17). Für die Größenbestimmung wurde zunächst die in der Zellbiologie für eukaryotische Zellen bewährte FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorting) getestet. Sie hat ihr unteres Limit jedoch bei ca. 1 μ m. Für die PCS-Methode (photone correlation spectroscopy) hingegen ist es umso besser, je kleiner die Kugeln sind. Gemessen werden hier die Brownschen Molekularbewegungen der Granula verbunden mit deren räumlicher Veränderung. Je kleiner Teilchen sind, desto höher ist ihre Brown'sche Bewegung und desto schneller ändern sie ihre Position im Lösungsmittel. Ein entsprechendes PCS-Gerät befindet sich in der Arbeitsgruppe Biomimetrische Oberflächen (Leitung Dr. Günter Tovar) des Fraunhoferinstitutes für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart. Mit Hilfe von Mitarbeitern der AG (Marion Herz, Tino Schreiber, Klaus Niedergall) konnte dort die Größenverteilung verschiedener Granulachargen und -typen bestimmt werden.

CHARAKTERISIERUNG DES NATIVEN PHA-GRANULUM-KOMPLEXES

Die ersten Experimente drehten sich dabei darum, die **Depolymeraseaktivität isolierter nPHA-Granula in vitro** nachzuweisen. Nachdem dies mit Hilfe des pH-Statens und der HPLC gelungen war und nach zahlreichen Versuchen zur Hydrolyse nativer PHA-Granula tauchte – angeregt durch Keiichi Uchino – schließlich die Frage nach einem möglichen weiteren PHA-Abbauweg auf: der Thiolysereaktion. Hierbei werden die Esterbindungen des Polymers unter Einsatz von CoA gespalten und es entstehen Thioester wie 3HB-CoA. Vergleichende Experimente zur **Hydrolyse und Thiolyse nativer PHB-Granula** machen daher einen großen Teil der Arbeit aus. Dazu gehören auch die Beobachtungen, inwieweit das **Kultivierungsmedium** einen entscheidenden Einfluss auf die Thiolyse und Hydrolyse nativer PHA-Granula besitzt.

Über die Bestimmung des **pH-Optimums** und der **Substratsättigung mit CoA** wurde die Thiolysereaktion der nativen Granula schließlich näher charakterisiert. Offen blieb jedoch, ob es sich dabei um eine Besonderheit von nPHB aus *R. eutropha* H16 oder aber um ein weiter verbreitetes Phänomen handelt. Um das zu klären, wurden insgesamt zehn **verschiedene PHB-, PHV- und PHO-Bildner** kultiviert, ihre Granula isoliert und auf Thiolyse- und Hydrolyseaktivität untersucht.

Exemplarisch wurde zudem **PhaZa1**, die 2001 von Saegusa et al entdeckte intrazelluläre PHB-Depolymerase aus *R. eutropha* H16 untersucht. Das entsprechende Gen hatte bereits Michael Günther 2005 im Rahmen seiner Studienarbeit als his-tag in *E. coli* JM109 transferiert. Er konnte jedoch mit den damaligen Methoden für das isolierte Enzym keine Hydrolyseaktivität nachweisen. Dies wurde erneut versucht und das Enzym zusätzlich auf eine mögliche Thiolyseaktivität hin charakterisiert.

Interessante Ergebnisse in Bezug auf das **in vivo-Verhalten nativer PHB-Granula** lieferten schließlich die mikroskopischen Beobachtungen. Dabei fiel auf, ähnlich wie in Kapitel 3.5.6 mit isoliertem nPHB, dass der Abbau der Granula in Zellen aus NB-Kultur deutlich rascher abläuft als bei Zellen aus MM-Medium.

Depolymeraseaktivität nativer PHB-Granula im pH-Stat

Mit Hilfe des pH-Staten konnte die Eigenhydrolyse nativer PHB-Granula aus *R. eutropha* erstmals eindeutig nachgewiesen werden. Dazu gehörte der Vergleich mit Kontrollsystemen wie nPHB aus *E. coli phaCAB* und aPHB, die beide über keine Depolymeraseenzyme verfügen und entsprechend keine oder eine nur sehr geringe Säurefreisetzung zeigen. Dass es sich bei der Aktivität von nPHB um kein Artefakt oder um chemische Hydrolyse handelt, wurde zudem über Versuche mit hitzebehandelten Granula als Kontrollen nachgewiesen.

Welchen Einfluss verschiedene Reagentien auf die Säurefreisetzung nativer PHB-Granula haben, ließ sich am pH-Stat sehr gut online verfolgen. Dabei wurden Trypsin, ProteinaseK, verschiedene Detergentien sowie das Reduktionsmittel DTT und das Oxidationsmittel DTNB zur laufenden Messung pipettiert und der pH-Verlauf bzw. die NaOH-Zugabe beobachtet. Auch geringe Unterschiede in der Aktivität von nPHB verschiedener *R. eutropha*-Mutanten konnten mit der neuen Methode untersucht werden.

Hydrolyse und Thiolyse nativer PHB-Granula (aus *R. eutropha* Δ phaZa1)

Die Rolle dieser beiden potentiellen intrazellulären Abbauege von nPHB wurde ausführlich untersucht. Zunächst mussten jedoch auch hier die etablierten Methoden getestet und teilweise verändert werden. Dazu gehörte die Kontrolle, ob der enzymatische 3HB-Nachweis auch mit DTT und CoA aus den Thiolyseansätzen funktioniert. Die HPLC-Chromatogramme der CoA-Ester wurden etabliert. Ein wichtiger neuer methodischer Punkt ist der Einsatz „gewaschener“ nativer Granula, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen.

Die Versuche sind sehr zahlreich, da sowohl Hydrolyse- und Thiolyseansätze untersucht wurden, parallel die zwei Analysemethoden HPLC und 3-HB-DH-Test eingesetzt wurden sowie mit „ungewaschenen“ und „gewaschenen“ Granula gearbeitet wurde.

Einfluss des Kulturmediums auf Hydrolyse- und Thiolyseaktivität

Das Standardmedium zur Kultivierung von *R. eutropha* war leicht verändertes Schlegel-Mineralmedium (2.3.1) mit 2 % NaGlukonat als C-Quelle. Erste pH-Stat Versuche mit nPHB aus NB-gewachsenen Zellen hatten eine deutlich höhere Aktivität gezeigt, verglichen mit nPHB aus MM-Kultur. Vor diesem Hintergrund wurden daher native PHB-Granula aus *R. eutropha* aus zeitgleichen MM- und NB-Kulturen auf ihre Hydrolyse- und Thiolyseeigenschaften untersucht.

Charakterisierung der Thiolyse (nPHB *R. eutropha* Δ phaZa1)

Mit nPHB der Depolymerase-Mutante *R. eutropha* Δ phaZa1 wurden das pH-Optimum und die Substratsättigung (CoA) der Thiolysereaktion untersucht. Dadurch konnten die folgenden Versuche bei optimalem pH-Wert und mit ausreichender Menge an CoA durchgeführt werden.

Hydrolyse und Thiolyse verschiedener PHB-, PHV- und PHO-Bildnern

Das bei *R. eutropha* H16 (erstmalig 2007 von K. Uchino) untersuchte Phänomen der Thiolyse sollte besser eingeordnet werden. Dazu wurden native Granula anderer PHB-Bildner, aber auch PHV- und PHO-speichernder Organismen isoliert und in vitro auf diesen Abbaueg hin untersucht. Bei den Stämmen handelte es sich um: *Alcaligenes latus* (jüngste Bezeichnung = *Azohydromonas lata*), *Bacillus megaterium*, *Comamonas* sp., *Paracoccus denitrificans*, *Paucimonas lemoignei*, *Pseudomonas putida* 195, *Pseudomonas putida* Gpo500 (Depolymerase-Mutante), *Ralstonia eutropha* H16 Δ phaP1 (Phasin-Mutante), *Ralstonia eutropha* H16 Δ phaZa1 (Depolymerase-Mutante).

Isoliertes PhaZa1 – thiolytisch aktiv?

Die Vermutung (u.a. von K. Uchino), dass die Depolymerase PhaZa1 für den thiolytischen Abbau nativer PHB-Granula aus *R. eutropha* verantwortlich ist, sollte mit Hilfe des isolierten Enzyms untersucht werden. Durch die Studienarbeit von P. Kimmig (2005) lag die Gensequenz für PhaZa1 aus *R. eutropha* H16 mit His-tag bereits rekombinant in *E. coli* vor. Das Enzym konnte über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt und per SDS-Gel nachgewiesen werden. Seine Aktivität in Hydrolyse- und Thiolyseansätzen mit nativen PHB-Granula wurde getestet. Zudem wurde das Enzym über pH-Optimum, Temperaturoptimum, Hemm- und Aktivierungsstoffe sowie das Enzym-Substrat-Verhältnis charakterisiert.

Mikroskopie: Das in-vivo-Verhalten nativer PHB-Granula

Ganz ohne empfindliche Analytik lassen sich in bestimmten Fällen die Unterschiede im intrazellulären PHB-Abbau auf einen Blick erkennen: das Abbauverhalten von Zellen aus NB-Kultur und Mineralmediums-Kultur (mit 2% Na-Glukonat) unterscheidet sich deutlich. PHB-freie Zellen (*R. eutropha*) bilden nach Überimpfen in frisches NB- oder MM-Medium sehr rasch viele Granula. Während diese nach rund sechs bis acht Stunden im NB-Medium wieder komplett abgebaut wurden, findet man die Zellen im MM-Medium auch nach 24 Stunden fast unverändert gefüllt. Dies gilt auch bei nur 0,5% NaGlukonat als C-Quelle. Es wurde unter anderem die Frage untersucht, ob der Grund am unterschiedlichen Phosphat/Stickstoff - Kohlenstoff Verhältnis der beiden Medien liegen könnte.

Auch bei einem anderen Vergleich brachte die mikroskopische Beobachtung neue Erkenntnisse. Zellen von *R. eutropha* Wt sowie der Mutanten $\Delta phaZa1$, $\Delta phaP1$ und $\Delta phaP1-4$ wurden darauf untersucht, wie viel und wie lange sie nPHB speichern. Die Ergebnisse geben einen neuen Einblick in die Rolle der Phasin-Proteine beim intrazellulären nPHB-Abbau.

3.1 Etablierung pH-Stat-Methode: Nachweis Säurefreisetzung nPHA-Granula

Für die Aktivitätsbestimmung isolierter PHB-Depolymerasen findet man in der Literatur unter anderem die pH-Stat-Titration (Bachmann 1997). Im Versuchsansatz entstehen durch die Hydrolyse der PHB-Esterbindungen Säuremoleküle und senken den pH. Der pH-Stat misst diesen Wert kontinuierlich und titriert entsprechend Lauge dazu, um den pH konstant zu halten. Dabei entspricht die verbrauchte Menge der Lauge dem genauen Molvolumen des gebildeten Produktes.

In den letzten Jahren hat die Sensitivität der pH-Elektroden und Dosiereinheiten deutlich zugenommen, so dass inzwischen minimale pH-Änderungen detektiert und mit verdünnter Lauge (oder theoretisch auch Säure) in Raten ab 0,01 µl/min gegentitriert werden können. Erste Tests mit einer Suspension nativer PHB-Granula aus *R. eutropha* Wt in 1 mM Tris-HCl-Puffer ohne Zugabe von isolierten Depolymerasen zeigten auch tatsächlich einen signifikanten Verbrauch von 10 mM NaOH (Abb. 11). Die Säurebildung ist mit dieser Methode daher „online“ zu verfolgen, ein Vorteil, den die meisten anderen Methoden der Hydrolyse-Detektion so nicht besitzen. Dies ermöglicht unter anderem, den Einfluss von Hemmstoffen oder auch Aktivatoren sofort zu erkennen und zu sehen, in welchem Ausmaß die Reaktion schwächer oder stärker wird.

Zahlreiche Optimierungsschritte waren nötig in Bezug auf die Einwaage der Granula, das Reaktionsvolumen, die Konzentration der Lauge, Einstellung der Dosiergeschwindigkeiten, Wahl des Puffers und Soll-pH-Wertes.

3.1.1 Optimierung der Messparameter

Quantifizierung nPHB

In den ersten pH-Stat-Versuchen wurden die isolierten Granula je nach Optischer Dichte (OD_{600}) rund 1 zu 10 mit 1 mM Tris-HCl-Puffer auf OD_{600} -Werte von ca. 30 - 40 verdünnt. Das Einstellen von zwei Proben auf eine exakt gleiche OD_{600} ist oft aufwendig und schwer reproduzierbar. Das Pipettieren der teils sehr geringen Volumina (ca. 40-100 μ l) wäre aber aufgrund des hohen Glycerinanteils ebenfalls zu ungenau gewesen. Nach einigen Monaten wurde daher die Masse der Granula auf der Feinwaage bestimmt. Dabei musste der PHB-Gehalt der Glycerin-Suspension bekannt sein, um verschiedene Isolate untereinander vergleichen zu können. Dieser wurde für jede neue Charge isolierter nPHB-Granula nach Waschen und Trocknen eines Aliquots bestimmt (2.10).

Volumen

Das Ansatzvolumen im Reaktionsgefäß ist optimal, wenn die Spitze der pH-Elektrode von Flüssigkeit bedeckt ist und gleichzeitig die Bürettenspitze für die NaOH-Zufuhr sowie der Magnetrührstab (und ggf. der Temperaturfühler) problemlos hineinpassen (Abb. 8). Je nach Gefäß und Größe der pH-Elektrode sind dabei 10 ml das Minimum. Bei geringem Volumen sind die Konzentration der Granula und die des Produktes höher und es muss zur Analyse ggf. nicht eingengt werden. Es besteht aber auch die Gefahr, dass die NaOH-Zufuhr zu nah an der pH-Elektrode sitzt und dadurch die pH-Werte und die Regulation verfälscht werden. Möglich ist auch, dass der Magnetrührstab die pH-Elektroden spitze beschädigt.

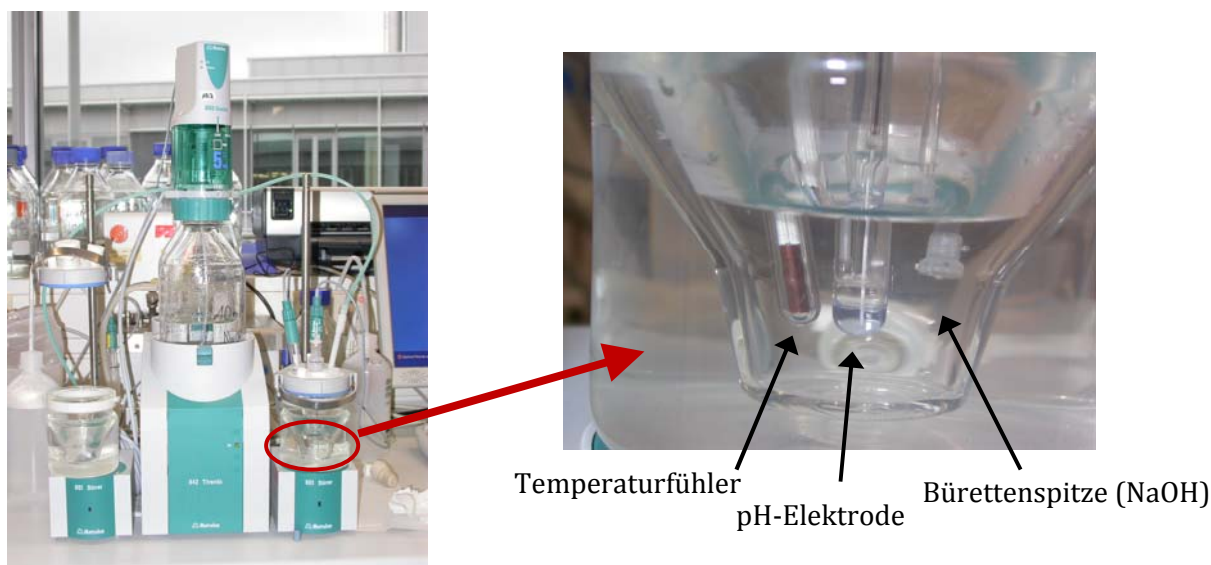


Abb. 8 pH-Stat-Apparatur (842 Titrando, Metrohm, Herisau (CH)) im Überblick und Detailansicht temperierbares Titrationsgefäß mit Temperaturfühler, pH-Elektrode und Bürettenspitze.

NaOH-Konzentration

Die optimale NaOH-Konzentration ist abhängig von der erwarteten Reaktionsstärke. Wurde mit PhaZ7, der sehr aktiven, nPHB-spezifischen Depolymerase aus *Paucimonas lemoignei*, gezielt viel nPHB hydrolysiert, musste 100 mM Lauge eingesetzt werden. Für die Untersuchung isolierter Granula – ohne Zusatz von isoliertem Enzym - wurde zu Beginn mit 2 mM NaOH, nach einiger Zeit standardmäßig mit 10 mM NaOH gearbeitet.

Dosiereinstellung

Die von uns zusammengestellte Methode besteht aus drei Phasen, die das Gerät durchläuft: Im ersten Teil „MEAS pH“ wird zunächst nur der pH-Wert bestimmt. Ist dieser in einem gewissen (auch einstellbaren) Rahmen konstant, springt das Programm in Teil 2 „SET pH“. Hier wird der ggf. abweichende pH-Wert durch automatische Zugabe von NaOH auf den Soll-Wert eingestellt. Ist die Dosiereinstellung (Abb. 9) in dieser Phase zu „vorsichtig“ gewählt, dauert das Erreichen des Soll-pH sehr lange oder wird gar nicht erreicht, wenn der Titrationsansatz parallel entsprechend viel Säure produziert. Werden die maximalen Zugabe-Geschwindigkeiten jedoch zu hoch gewählt, titriert das Gerät leicht über den Soll-Wert hinaus, was sich dann nur durch manuelle Zugabe von HCl korrigieren lässt. Im dritten Teil der Methode, „STAT pH“, bei der der pH über NaOH-Zugabe konstant gehalten wird, gilt das Gleiche. Hier ist es sinnvoll, zunächst einen niedrigeren Wert einzugeben und ihn während der Messung gegebenenfalls manuell höher zu setzen.

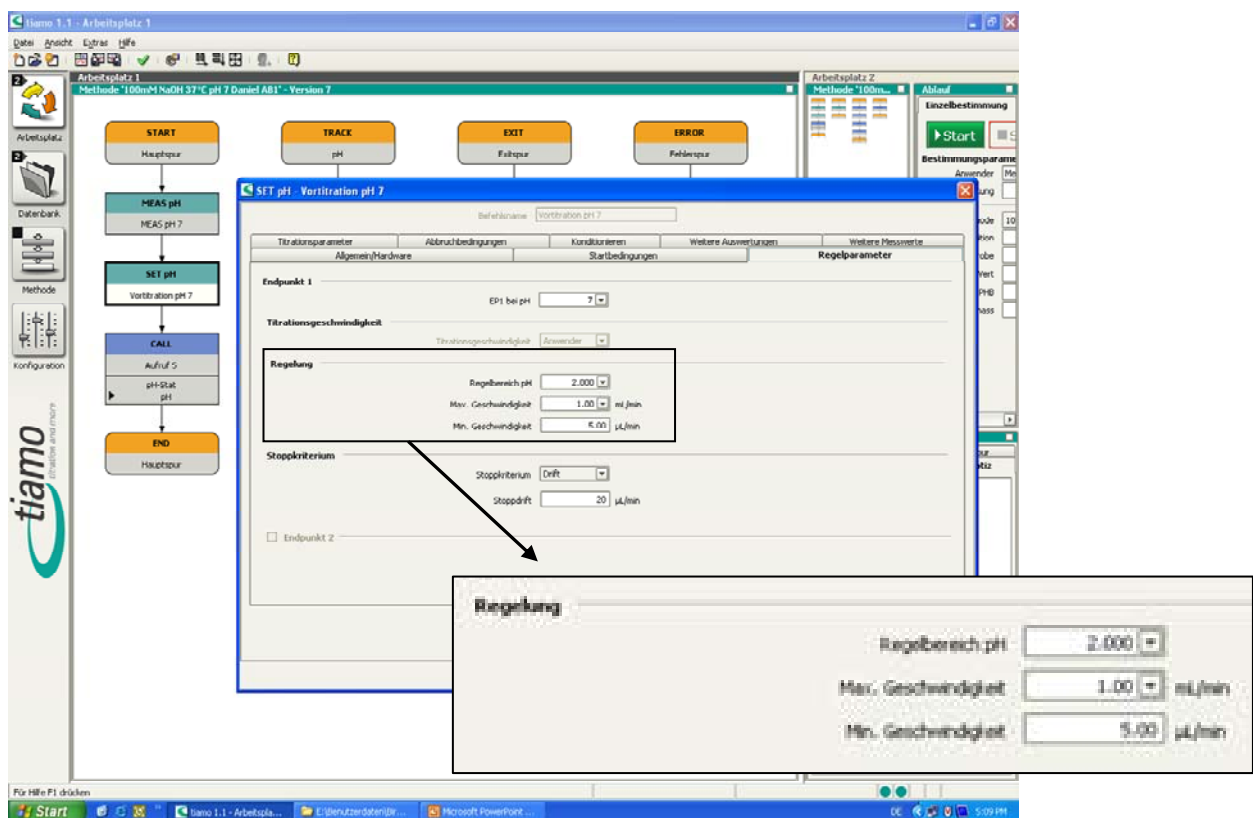


Abb. 9 Screenshot-Aufnahme aus der Tiamo 1.1-Software zur Steuerung des 842 Titrando (Metrohm, Herisau). Im Hintergrund Fenster mit Methoden-Bausteinen, im Vordergrund Fenster zur Einstellung verschiedener Parameter des zweiten Teils „SET pH“, der Vortitration auf den Soll-pH-Wert: Regelbereich, maximale und minimale Titrationsgeschwindigkeit.

Pufferkonzentration

Die Einstellungen der Titrationsgeschwindigkeit und des pH-Bereiches, in dem die Regelung einsetzen soll, sind stark von der Pufferkonzentration abhängig. Ungepuffert konnte keine konstante Säurefreisetzung bzw. NaOH-Zugabe beobachtet werden, die pH-Schwankungen waren zu groß. Hochkonzentrierte Pufferung bewirkt jedoch, dass nur sehr große pH-Änderungen gemessen und entsprechend mit NaOH korrigiert werden. Abhängig von der zu erwartenden Säurefreisetzung hat sich für nPHB aus *R. eutropha* 0,1 mM Tris-HCl als optimal herausgestellt. Native Granula aus *Alcaligenes latus* hingegen zeigen eine sehr hohe Depolymeraseaktivität, so dass bis zu 100 mM Tris-HCl-Puffer eingesetzt wurde. Dasselbe gilt für Hydrolyseversuche mit gereinigtem PhaZ7, einer sehr aktiven nPHB-spezifischen Depolymerase.

pH-Wert

Zur Optimierung der pH-Stat-Methode gehörte es zudem, den für die Hydrolyse nativer Granula optimalen pH-Wert zu finden. Dazu wurde die Säurefreisetzung von rund 50 mg PHB aus *R. eutropha* Wt (SK 1480) bei 37°C in 15 ml 1mM Puffer gemessen. Die Hydrolyseaktivität der Granula wurde bei pH-Werten zwischen 6 und 11 mit den entsprechenden Puffern gemessen: von pH 6 bis pH 7,5 wurde Kalium-Phosphat-Puffer eingesetzt, von pH 7,5 bis pH 10 Tris-HCl-Puffer und für die Proben bei pH 10 und pH 11 GlycinOH-Puffer (Abb. 10). Bestimmt wurde die Rate über die ersten 2000 Sekunden nachdem der Soll-pH erreicht war.

Beim Vergleich der Ansätze lässt sich keine Tendenz zu einem optimalen pH-Wert erkennen. Ab pH 10 steigt die Säurefreisetzung jedoch stark an. Ausgeschlossen werden kann eine Ansäuerung des Puffers selbst durch Aufnahme von CO₂ aus der Luft. Um diese unter 3.1.2. erläuterte Rate wurden die Werte des Diagrammes bereits korrigiert. Vermutlich handelt es sich bei diesem Anstieg um das Ergebnis chemischer Hydrolyse. Für die weiteren Versuche wurde als Standardeinstellung pH 7,5 gewählt. Die Aktivität der Granula ist hier ähnlich wie bei den nächsthöheren Werten, die Ansäuerung des Puffers durch CO₂-Aufnahme jedoch minimal.

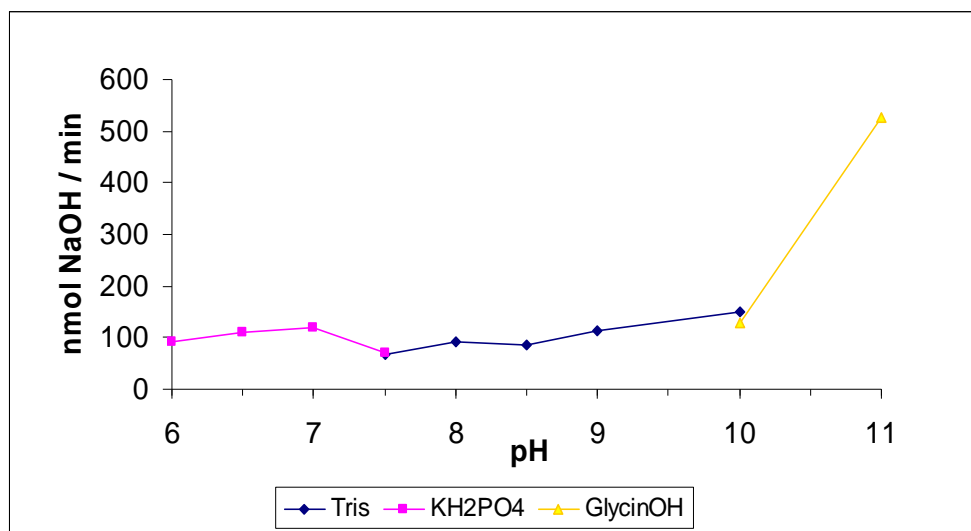


Abb. 10 Bestimmung der Säurefreisetzung (hier Gegentitration durch NaOH gezeigt) durch Eigenhydrolyse von jeweils 50 mg nPHB aus *R. eutropha* H16 bei 37°C über einen pH-Bereich von 6 bis 11. Überlappend mit drei verschiedenen Puffern (je 1 mM): Kaliumphosphatpuffer, Tris-HCl-Puffer und Glycin-NaOH-Puffer.

3.1.2 Messung der Säurefreisetzung

Wie im letzten Abschnitt bereits erwähnt, bindet Tris-HCl-Puffer bei pH-Werten größer pH 7 Kohlensäure aus der Luft. Die daraus resultierende Ansäuerung bewirkt, wie auch die Säurefreisetzung durch hydrolysiertes nPHB, einen pH-Abfall und Zutitration von NaOH. In dem in Abbildung 11 beschriebenen Versuch wurden zunächst 15 ml 1 mM Tris-HCl, pH 8,5, bei 37°C in das Reaktionsgefäß vorgelegt, um die Blindrate des Puffers zu bestimmen. Nach rund 13 Minuten wurden 88 mg nPHB aus *R. eutropha* Wt (SK 1480) und weitere 5 ml Puffer hinzugegeben. Nach einem kurzen Abfall des pH-Wertes durch den leicht sauren pH der isolierten Granula und schneller Gegentitration, stellt sich eine deutliche Säurefreisetzung-Rate ein, die über mindestens 30 Minuten mit konstanter Rate verläuft.

In diesem Fall wurde eine verhältnismäßig große Menge nPHB für den Versuch eingesetzt, so dass die Verfälschung der Werte durch die Blindrate nur gering ausfiel. Bei geringeren Substratkonzentrationen ist es jedoch sinnvoll, zunächst die Rate des Puffers zu bestimmen oder zwischen pH 7 und pH 7,5 zu messen. Dort findet nur eine sehr geringe Ansäuerung des Tris-HCl-Puffers statt. Bei Werten darunter gibt er hingegen CO₂ ab, so dass der pH ansteigt.

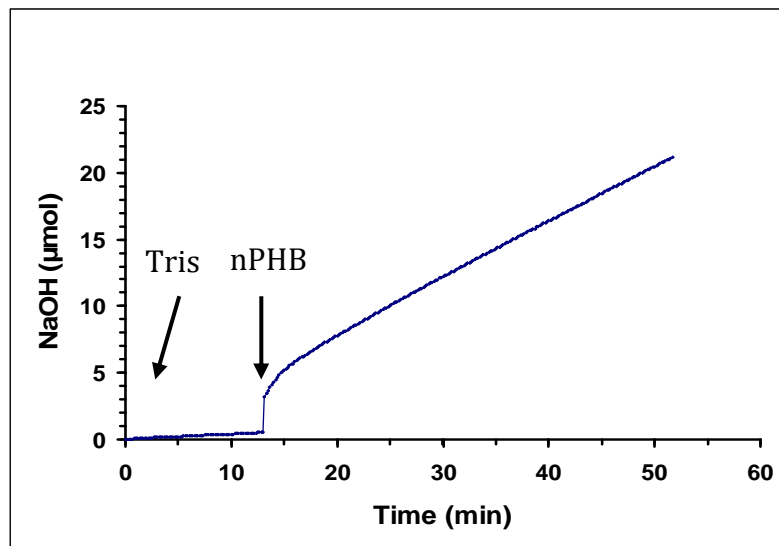


Abb. 11 Analyse der Säurebildung im pH-Staten über Titration mit 10 mM NaOH. Zunächst Messung der Blindrate von 1 mM Tris-HCl-Puffer (10 ml, pH 8,5). Nach rund 13 Minuten Zugabe von 88 mg nPHB aus *R. eutropha* Wt (SK 1480) mit weiteren 5 ml Tris-HCl. Gesamtvolumen: 15 ml.

Aus dem Verbrauch an 10 mM NaOH ergibt sich – nach Abzug der Blindrate – eine geringe, aber signifikante spezifische Hydrolyse-Aktivität von 4 nmol / min x mg PHB. Die Messung von Ansätzen mit verschiedenen Mengen Granula in Abbildung 12 zeigt zudem einen klaren Zusammenhang zwischen Hydrolyseaktivität und Einsatz an nPHB. Die Tatsache, dass es sich dabei um eine Gerade handelt beweist, dass die Beziehung in weiten Konzentrationsbereichen linear verläuft.

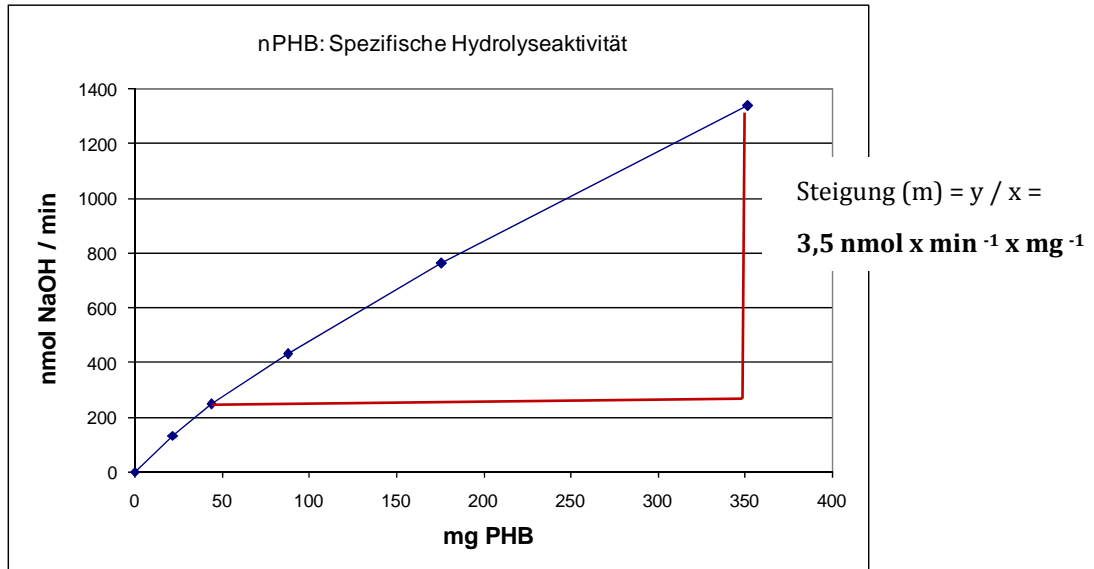


Abb. 12 Abhängigkeit der Säurefreisetzungsrates von der eingesetzten Menge an nPHB-Granula (mg). Die Steigung der Geraden beträgt zwischen 44 und 352 mg PHB $3,5 \text{ nmol NaOH} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$. Durch Titration mit 10 mM NaOH Bestimmung der Säurefreisetzung in pH-Stat-Ansätzen mit 22, 44, 66, 88, 176 und 352 mg PHB aus *R. eutropha* Wt (SK 1480). Messung in 10 ml 1mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,5). Auftrag der NaOH-Verbrauchsrate gegen die Menge an eingesetztem PHB.

3.2 Methodenentwicklung zum Nachweis von 3HB-Oligomeren

Das Repertoire an Nachweismethoden für PHB-Abbauprodukte ist überschaubar: Monomere lassen sich über den enzymatischen 3HB-DH-Test (2.15.2.) bestimmen, Oligomere indirekt und nicht qualitativ über den Abbau durch gereinigte Oligomerhydrolase und anschließenden 3HB-DH-Test (Kobayashi et al. 2003). Mit Hilfe der ESI-MS (Elektronensprayionisations-Massenspektroskopie) lassen sich die Abbauprodukte ebenfalls qualitativ analysieren. Das entsprechende Gerät gehört aber in unserem und vielen anderen Laboren nicht zur Ausstattung, so dass sich hiermit keine umfangreichen Messungen machen lassen.

Für die HPLC-Analyse sind 3HB-Monomer und -Oligomere zunächst ungeeignet. Die Hydroxyfettsäuren besitzen keine Molekülstrukturen, die ausreichend Strahlung absorbieren, um für den Detektor messbar zu sein. Durch die Derivatisierung mit Bromphenacylbromid (BPB), angelehnt an die Arbeit von Durst et al. (1975), gelang es in dieser Arbeit jedoch, die Hydrolyseprodukte von PHB zu analysieren und zu quantifizieren (Gebauer und Jendrossek, 2006). Die Methode erlaubt die Vorbereitung von mindestens 20 – 30 Proben parallel, die anschließend per HPLC gemessen werden. Die Detektion ist durch den bei 254 nm gut absorbierenden aromatischen Ring des BPB sehr sensibel (Abb. 4), so dass geringe Probenmengen ausreichen.

3.2.1 Derivatisierung der Hydrolyseproben

Parallel zur Arbeit an der Derivatisierung mit Bromphenacylbromid (BPB) wurde versucht, die 3HB-Oligomere zur besseren Detektion zu methylieren. Dies geschah nach Bachmann et al. (1999) zunächst mit Hilfe von Diazomethanlösung, später wurde diese durch weniger explosive und giftige Trimethylsilyldiazomethan-Lösung ersetzt. Beide Ansätze waren jedoch nicht erfolgreich und zeigten in der HPLC-Analyse keine Peaks.

Die Derivatisierung mit BPB hingegen funktionierte für die kleineren 3HB-Oligomere gut (Monomer (R1) bis Tetramer (R4)). Durch eine entsprechend längere Inkubationszeit während der Derivatisierungsreaktion wurde es nach einigen Versuchen auch möglich, die länger-kettigen Verbindungen (Pentamer (R5) bis Oktamer (R8)) zu detektieren.

Für die Derivatisierung einer Probe werden je nach erwarteter Produktkonzentration zwischen 10 und 200 µl Probenüberstand nach Zentrifugation (5 Minuten, 14.000 rpm, Centrifuge 5417 C, Eppendorf) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Der Standardansatz ist für 1 – 5 mM 3HB oder 3HB-Oligomere ausgelegt. Zur Probe werden 100 µl 0,1 M Triethylamin (TEA) (gelöst in Aceton) pipettiert, beides mit dem Vortex gemischt und in der Speedvac-Zentrifuge (CON-1000, Fröbel) getrocknet. Das TEA sorgt für einen basischen pH-Wert, bei dem die Hydroxyfettsäuren deprotoniert vorliegen. TEA ist eine leicht flüchtige Substanz, im Gegensatz zu dem laut Durst et al. einzusetzenden KOH. Das hat den Vorteil, dass überschüssiges TEA abdampft. KOH hingegen würde in der Probe verbleiben.

Anschließend werden das Derivatisierungsreagenz Bromphenacylbromid (BPB) sowie Kronenether (decyl-18-crown-6) (KE) in das Reaktionsgefäß gegeben. Nach Versuchsreihen mit verschiedenen Konzentrationsverhältnissen zeigte der 3HB-Standard nach Derivatisierung die größten HPLC-Peaks, wenn im Ansatz fünfmal mehr BPB als KE vorhanden war. In Standardansätzen wurden daher 150 µl 10 mM BPB (in Acetonitril, ACN) und 150 µl 2 mM Kronenether (in ACN) zur Probe pipettiert.

Durst et al. beschreiben den Reaktionsmechanismus als einen nucleophilen Angriff des Carboxylat-Ions auf die Acyl-Bromid-Bindung des BPB. Der Kronenether stabilisiert dabei die Löslichkeit des Salzes im unpolaren Lösungsmittel Acetonitril. Dadurch verstärken sich die nucleophilen Eigenschaften der deprotonierten Carbonsäure.

Je nachdem ob und wie viel Glycerin über die Granulaisolierung in die Probe und die Analyse gelangt, ist dort nach dem Trocknen ein nicht sichtbares oder aber deutliches Pellet erkennbar. Es lässt sich am besten in der BPB- und KE-Lösung resuspendieren, nachdem die Probe bereits einige Minuten im Heizblock stand. Insgesamt 90 Minuten muss der Ansatz dort bei 80°C inkubieren, um Oligomere bis zum Oktamer zu derivatisieren. Da die Reaktionsgefäße durch den entstehenden Überdruck leicht aufspringen, müssen sie zusätzlich mit einem Sicherheits-Clip verschlossen werden. Sowohl Bromphenacylbromid und Kronenether als auch das Lösungsmittel Acetonitril sind stark gesundheitsgefährdend. Auch beim Entnehmen der Proben aus dem Heizblock müssen eine Schutzbrille und Handschuhe getragen werden. Vor dem Öffnen der Reaktionsgefäße sollten sie auf Raumtemperatur abgekühlt sein. Wird die Inkubationszeit von 90 Minuten verkürzt, werden die höheren Oligomere nur unvollständig derivatisiert. Für das Monomer sind hingegen bereits 30 Minuten ausreichend. Während der Inkubation sollten die Proben mehrmals gevortext werden.

3.2.2 Analyse per HPLC

3.2.2.1 Optimierung HPLC-Methode

Nach Zentrifugation der Probe für 15 Minuten bei 14.000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge (Centrifuge 5417 C) wird ausreichend Überstand in ein HPLC-Vial gegeben, um anschließend 5 µl durch den Injektor auftragen zu lassen. Für die Auftrennung der 3HB- und 3HB-Oligomer-Derivate wurde zu Beginn eine 150 mm lange RP18-Säule benutzt (Eclipse XDB-C18, 5 µm, 4,6 x 150 mm). Unter anderem für die Trennung von Acetat- und 3HB-Derivaten bewährte sich später eine längere Säule (Lichrosphere RP18, 5 µm, 4,6 x 250 mm). Eluiert wird bei 30°C über einen Gradienten mit einer Flussrate von 0,8 ml/min. Laufmittel A besteht aus 0,01 M Ammoniumformiat mit 2% Methanol, pH 4. Laufmittel B ist 100% Methanol. Die Detektion der Bromphenacyl-Derivate erfolgt bei 254 nm. Die Methode wird im Folgenden als „40%MetOH“-Methode bezeichnet.

Tab. 14 Laufmittelgradient zur Auftrennung von mit BPB derivatisiertem 3HB und 3HB-Oligomeren über eine RP-18 Lichrosphere-Säule (5 µm, 4,6 x 250 mm) mit 0,8 ml/min bei 30°C. Laufmittel A: 0,01 M Ammoniumformiat mit 2% Methanol, pH 4. Laufmittel B: 100 % Methanol.

	A: Ammoniumformiat	B: Methanol
0 min	60 %	40 %
28 min	0 %	100 %
33 min	0 %	100 %
34 min	60 %	40 %
39 min	60 %	40 %

3.2.2.2 Auftrennung 3HB- und 3HB-Oligomere

Nach getrennter Derivatisierung der vorhandenen Standards (Monomer (R1) bis Oktamer (R8), außer Heptamer (R7)) wurden sie gemischt, auf die HPLC-Säule aufgetragen und mit der unter 3.3.2.1 beschriebenen Methode „40%MetOH“ aufgetrennt. Abbildung 13 zeigt das entsprechende Chromatogramm. Der Heptamerstandard war nicht vorhanden, die Detektion seiner Masse jedoch per ESI-MS als Zerfallsprodukt des Oktamerstandards möglich. Anschließend wurden die Massen hinter den einzelnen Peaks mit ESI-MS (Elektronensprayionisations-Massenspektroskopie) durch Dr. Armbruster am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hohenheim bestimmt. Dadurch bestätigte sich unsere Zuordnung der HPLC-Peaks zu den einzelnen 3HB-Oligomeren.

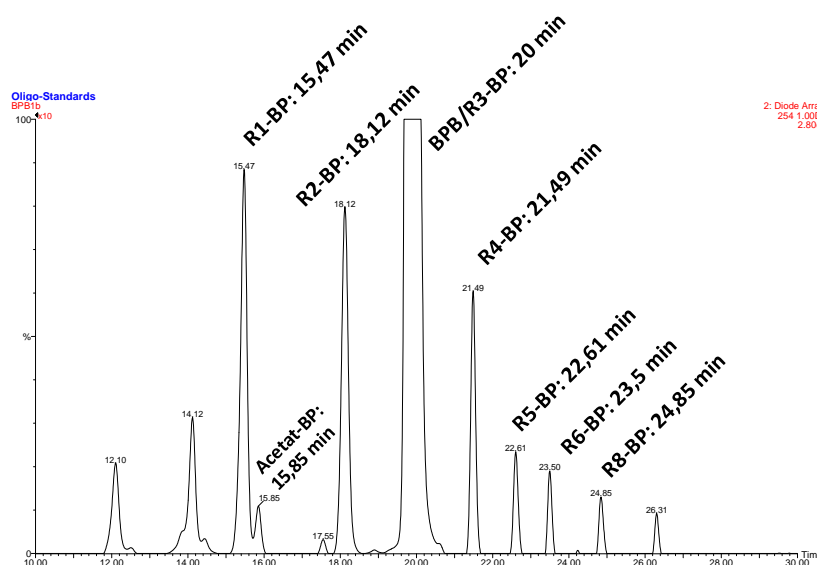
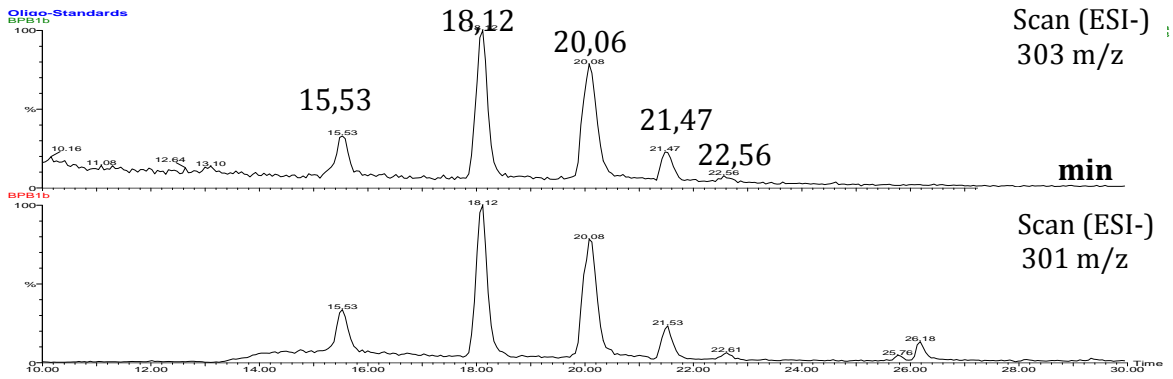


Abb. 13 HPLC-Chromatogramm (254 nm) der derivatisierten 3HB-Oligomer-Standards (Monomer bis Oktamer, außer Heptamer). Überlagerung des Trimer-Peaks durch restliches Derivatisierungsreagenz (BPP), dafür aber Trennung des Monomer von derivatisiertem Acetat möglich (hier nur kleiner Peak erkennbar direkt nach R1-BP: 15,9 min). HPLC-Methode: „40%MetOH“.

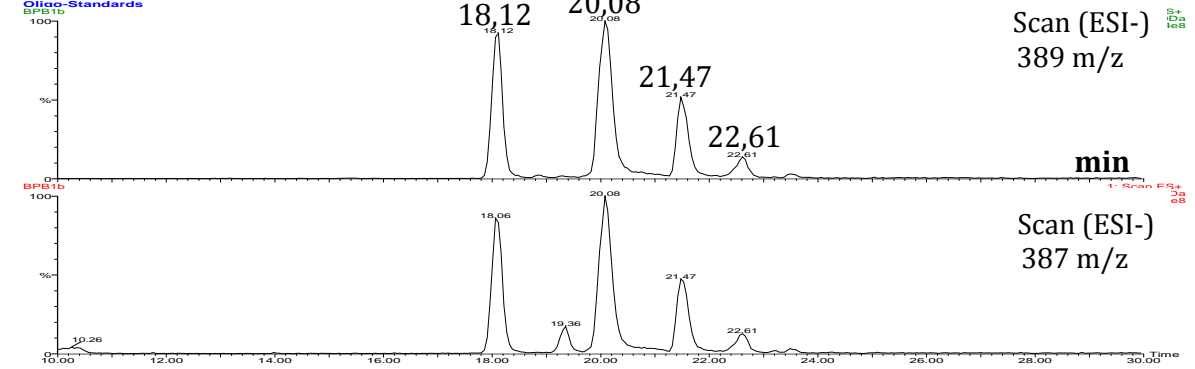
Die folgenden Abbildungen (Abb. 14) zeigen die Elutionspeaks, zu denen die jeweils gesuchte Masse des derivatisierten 3-HB-Oligomers detektiert wurde. Da Brom stets zur Hälfte als ^{79}Br und ^{81}Br auftritt, ergeben bromierte Verbindungen stets ein Massengemisch. Die Massenanalyse von derivatisiertem 3HB ergibt daher 301 m/z und 303 m/z (Masse (m) pro Ladung (z)). Masse-Paare wie dieses des Monomer-Derivates können zudem zu mehreren Zeitpunkten auftauchen. Bei der frühesten Elution handelt es sich stets um das Molekül an sich. Zu späteren Zeitpunkten wird es als Spaltprodukt eines größeren Oligomers detektiert, entstanden durch das ESI-MS-Verfahren.

Somit findet sich die Masse des derivatisierten 3-HB-Monomer nach 15,5 Minuten sowie als Spaltprodukt der höheren Oligomer-Derivate. Deren Massen tauchen auf wie folgt: Dimer (18,1 min), Trimer (20,1 min), Tetramer (21,5 min), Pentamer (22,6 min), Hexamer (23,5 min), Heptamer (24,2 min) und Oktamer (24,8 min). Eine Masse, die dem mit Brom 81 derivatisierten Oktamer entspricht (905 m/z) taucht zusätzlich nach 27,1 Minuten auf. Da zu diesem Zeitpunkt jedoch das zweite Derivat mit Brom 79 (903 m/z) nicht detektiert wird, handelt es sich hierbei um keine bromierte Verbindung. Dem Oktamer-Derivat entspricht daher mit Sicherheit der Masse-Peak nach 24,8 Minuten.

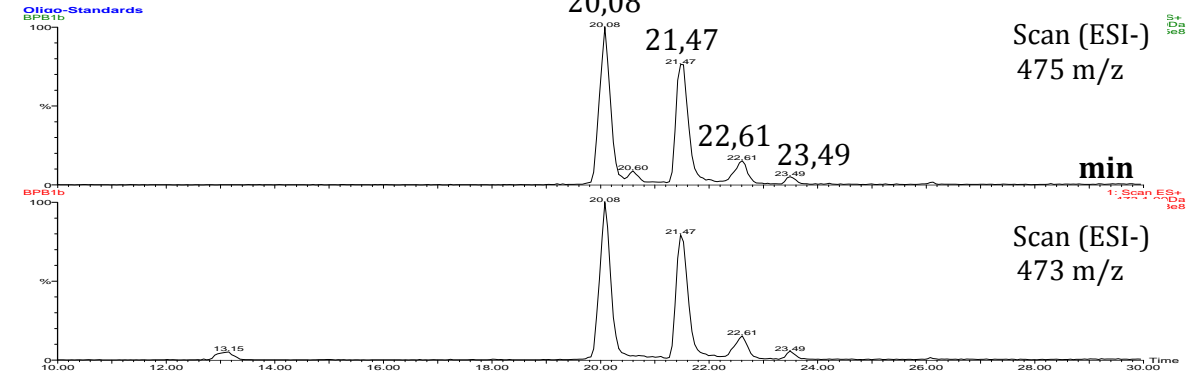
Masse 3HB-Monomer: 303, 301 m/z



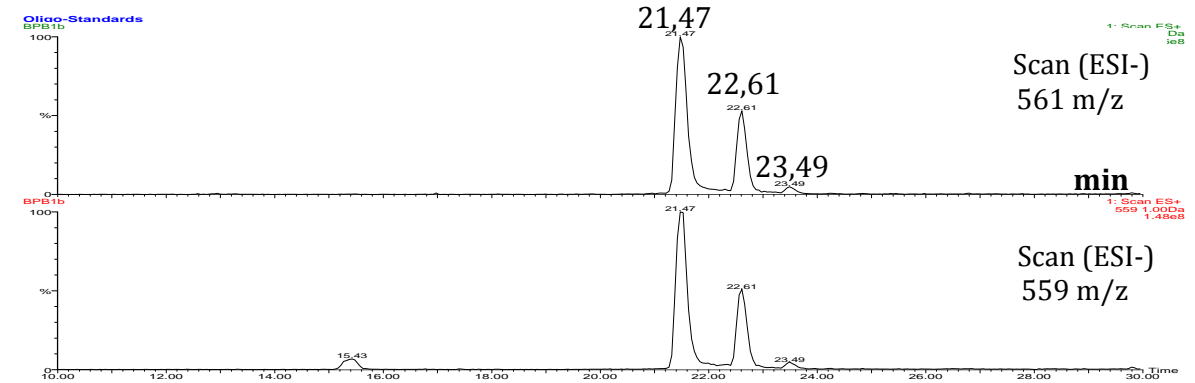
Masse 3HB-Dimer: 389, 387 m/z



Masse 3HB-Trimer: 475, 473 m/z



Masse 3HB-Tetramer: 561, 559 m/z



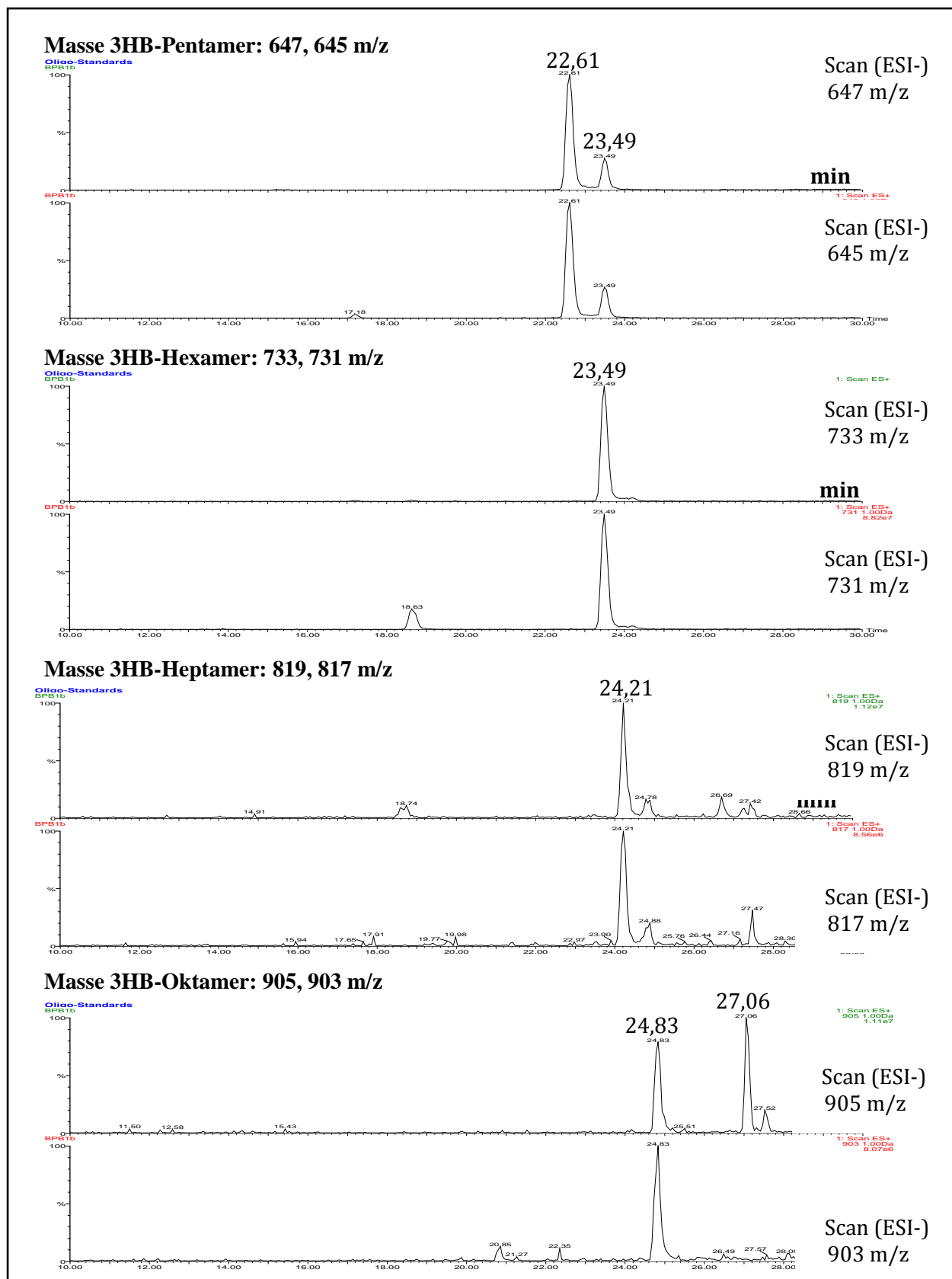


Abb. 14 ESI-minus-MS-Chromatogramme der HPLC-ESI-MS-Analyse des derivatisierten PHB-Oligomerstandards (Monomer bis Oktamer) (ESI: Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie). Hier: Auswertung durch gezielte Suche nach den Massen der einzelnen derivatisierten Oligomere und Angabe von deren Elutionszeiten. Brom-Derivate ergeben jeweils zwei Masse-Peaks: je nachdem ob sich ⁷⁹Br oder ⁸¹Br angelagert hat.

3.2.2.3 Konzentrationsreihe 3-HB-BPB

Um die Flächeneinheiten der HPLC-Chromatogramme quantifizieren zu können, wurde eine Konzentrationsreihe mit derivatisiertem 3-Hydroxybutyrat aufgestellt. Dazu wurden zweimal parallel 30, 60, 120, 240, 480 μ l 1mM 3-HB-Na derivatisiert und je 5 μ l der Proben auf die HPLC-Säule injiziert, was 0,5 bis 8 nmol entsprach (Abb. 15). Der lineare Zusammenhang zwischen Flächeneinheiten und nmol 3-HB-BPB ist vor allem beim Einsatz geringer Mengen sichtbar: für 0,5; 1; 2 und 4 nmol ergibt sich die Umrechnenformel 1200 FE = 1 nmol. Für Werte zwischen 4 und 12 nmol gilt die Gleichung 1000 FE = 1 nmol (o.Abb). Für eine erste Einschätzung kann sie genutzt werden. Um genaue Daten zu erhalten, sollten die Peaks weniger als 5000 Flächeneinheiten besitzen. Andernfalls muss die Probe verdünnt und erneut derivatisiert werden. Nur durch einen neuen Ansatz mit einer niedrigeren Substrat-/Probenkonzentration ist gewährleistet, dass ausreichend Derivatisierungsreagenz vorliegt, um alle Mono- oder Oligomere zu derivatisieren.

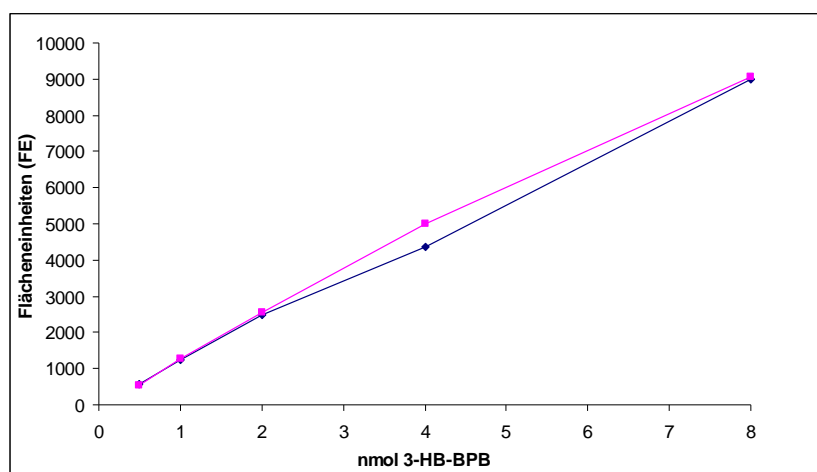


Abb. 15 Zwei parallele Konzentrationsreihen (n=2): mit BPB derivatisiertes 3-Hydroxybutyrat. Auftrag von 0,5; 1; 2, 4 und 8 nmol.

Der Einsatz gleicher molarer Mengen an Oligomerstandards zur Derivatisierung resultierte in annähernd gleichen Flächeneinheiten (o. Abb.). Daraus konnte sichergestellt werden, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Absorption zwischen Monomer-BPB bis Oktamer-BPB gibt. Die Konzentrationsreihe des derivatisierten Monomers kann daher als Standardreihe für alle Oligomere eingesetzt werden.

3.3 Bestimmung Größenverteilung nPHB-Granula

Durch die Methoden und Versuche der vorangegangenen Kapitel konnten die Depolymerase-Aktivität nativer PHB-Granula gezeigt und die Produkte analysiert werden. Um die spezifische Aktivität einzelner nPHB-Chargen berechnen zu können und Granula verschiedener Organismen vergleichen zu können, fehlte bisher jedoch eine klare Bezugsgröße. Die meisten Versuche dieser Arbeit beziehen sich bisher auf die Masse der eingesetzten Granula. Zu dessen Bestimmung werden, wie in Kapitel 2.9 beschrieben, Proben der glycerinhaltigen Granulasuspension gewaschen, getrocknet und gewogen. In anderen Arbeitsgruppen wird PHB durch Überführung in Crotonsäure und dessen Detektion per HPLC quantifiziert (Karr et al. 1983). Eine andere Methode basiert auf der Methylierung und GC-Analyse (Brandl et al. 1988)

Alle diese Methoden vernachlässigen jedoch einen entscheidenden Parameter: die Gesamtoberfläche der Granula. Bei gleichem Volumen bzw. gleicher Masse kann sie je nach durchschnittlicher Größe und somit Anzahl der Granula stark schwanken: viele kleine Kugeln besitzen eine größere Oberfläche als wenige große. Dies beweisen die folgenden Gleichungen (Dank an J. Eck für die mathematische Unterstützung):

Bekannt sind:

Gesamtmasse m_{ges} : durch Wiegen des gewaschenen, denaturierten PHB

Dichte ρ (nPHB): $1,17 \times 10^3$ (kg/dm³) nPHB (dPHB: $1,25 \times 10^3$) (Horowitz et al. 1994)

Radius r : durch PCS-Messung ermittelt

Die Gesamtmasse m_{ges} sei in n gleich große Kugeln mit dem Radius r aufgeteilt.

Gesucht ist:

die Gesamtoberfläche A_{ges} (in Abhängigkeit vom Radius r) aller n -Kugeln im Verhältnis zur Gesamtmasse m_{ges} :

$$\frac{A_{ges}(r)}{m_{ges}} \left[\frac{mm^2}{mg} \right] = ?$$

Das Gesamtvolumen (V_{ges}) sei aufgeteilt auf n gleichgroße Kugeln. Das Volumen einer einzelnen Kugel V_n berechnet sich demnach wie folgt:

$$V_n = \frac{V_{ges}}{n} = \frac{4}{3} \pi \cdot r^3 \quad (1)$$

(Gleichung 1)

Daraus lässt sich die Anzahl der Kugeln n in Abhängigkeit vom Radius r berechnen:

$$n(r) = \frac{3}{4} \cdot \frac{V_{ges}}{\pi \cdot r^3} \quad (2)$$

(Gleichung 2)

Die Oberfläche einer Kugel A_n berechnet sich aus:

$$A_n = 4\pi \cdot r^2 \quad (3)$$

(Gleichung 3)

Die Gesamtoberfläche A_{ges} ergibt sich somit zu:

$$A_{ges}(r) = n(r) \cdot A_n = 4\pi \cdot r^2 \cdot n(r) \quad (4)$$

(Gleichung 4)

Nun wird (Gleichung 2 in (Gleichung 4 eingesetzt:

$$A_{ges}(r) = 4\pi \cdot r^2 \cdot \frac{3}{4} \cdot \frac{V_{ges}}{\pi \cdot r^3} = 3 \cdot \frac{V_{ges}}{r} \quad (5)$$

(Gleichung 5)

(Gleichung 5 beschreibt die Gesamtoberfläche A_{ges} in Abhängigkeit vom Radius r : $A_{ges}(r)$. Nun wird dieses Ergebnis ins Verhältnis zur Gesamtmasse m_{ges} gesetzt, indem auf beiden Seiten der Gleichung durch m_{ges} geteilt wird.

$$\frac{A_{ges}(r)}{m_{ges}} = 3 \cdot \frac{V_{ges}(m_{ges})}{m_{ges}} \cdot \frac{1}{r} \quad (6)$$

(Gleichung 6)

Zu beachten ist dabei, dass das Gesamtvolumen V_{ges} über die Dichte ρ von der Gesamtmasse m_{ges} abhängig ist:

$$V_{ges}(m_{ges}) = \frac{m_{ges}}{\rho} \quad (7)$$

(Gleichung 7)

(Gleichung 7 wird schließlich in (Gleichung 6 eingesetzt:

$$\frac{A_{ges}(r)}{m_{ges}} = 3 \cdot \frac{\frac{m_{ges}}{\rho}}{m_{ges}} \cdot \frac{1}{r}$$

$$\frac{A_{ges}(r)}{m_{ges}} = \frac{3}{\rho \cdot r} \quad (8)$$

(Gleichung 8)

Gleichung 8 zeigt, dass sich die Oberfläche von Kugeln umgekehrt proportional zu ihrem Radius verhalten: je kleiner der Radius, desto größer wird im Verhältnis dazu die Kugeloberfläche.

Im Fall der PHB-Granula ist der Radius r im Verhältnis zur Gesamtmasse m_{ges} sehr klein. Daraus folgt eine sehr große Anzahl n an Granula. Daher kann ein mögliches Restvolumen nach Aufteilen des Gesamtvolumens V_{ges} in gleich große Kugeln vernachlässigt werden. Das folgende Beispiel macht deutlich, wie sehr die Gesamtoberfläche vom Radius der Granula abhängt.

Beispiel:

Gegeben:

$$\rho (\text{nPHB}) = 1,2 \times 10^3 \text{ kg/dm}^3 \text{ (aufgerundet von 1,17)}$$

$$r (\text{Granula}) = 830 \text{ nm}$$

Gesucht:

$$A_{ges}(r) / m_{ges}$$

$$\rho = 1,2 \cdot 10^3 \frac{\text{kg}}{\text{dm}^3} = 1,2 \frac{10^6 \text{ mg}}{10^6 \text{ mm}^3} = \frac{6}{5} \frac{\text{mg}}{\text{mm}^3}$$

$$r = \frac{5}{6} \mu\text{m} = \frac{5}{6} \cdot 10^{-3} \text{ mm}$$

Lösung mit (Gleichung 8:

$$\frac{A_{ges}(r)}{m_{ges}} = \frac{3}{\frac{6}{5} \frac{\text{mg}}{\text{mm}^3} \cdot \frac{5}{6} \cdot 10^{-3} \text{ mm}} = \frac{3}{1 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mg}}{\text{mm}^2}} = 3.000 \frac{\text{mm}^2}{\text{mg}} = 30 \frac{\text{cm}^2}{\text{mg}}$$

Würde man die Gesamtmasse m_{ges} (1 mg) auf nur eine Kugel verteilen, so erhält man den maximalen Radius durch Umformen der (Gleichung 1 mit $n = 1$:

$$r_{\max} = \sqrt[3]{\frac{3 \cdot V_{ges}}{4 \cdot \pi}} = \sqrt[3]{\frac{3 \cdot \frac{m_{ges}}{\rho}}{4 \cdot \pi}} = \sqrt[3]{\frac{3 \cdot \frac{1 \text{ mg} \cdot \text{mm}^3}{\frac{6}{5} \text{ mg}}}{4 \cdot \pi}} = 0,58 \text{ mm}$$

Eine Kugel mit diesem Radius hätte lediglich eine Oberfläche von rund 4,3 mm²/mg. Aufgeteilt auf Granula mit 830 nm Durchmesser vergrößert sich die Oberfläche mit 3000 mm² / mg also um den Faktor 700. Dieses Beispiel macht deutlich, wie entscheidend die Größe von nPHB-Granula für den Auf- und Abbau des Polymers sein kann. Und es bestätigt, dass dieser Faktor bei der Interpretation von Messdaten neben dem Bezug auf die Masse (mg) auf jeden Fall beachtet werden muss.

Mit Hilfe der Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) lassen sich speziell Partikel kleiner als ca. 2 μm vermessen. Nach oben limitiert ist die Methode durch die Sedimentation größerer Teilchen. Das Prinzip beruht darauf, dass sich Teilchen in Lösung - angetrieben durch die Brown'sche Diffusion - je nach Größe unterschiedlich schnell bewegen. Kleine Partikel verändern ihre Position rascher als große. Dies hat Einfluss auf das Streulicht, das bei Bestrahlung der Probe mit einem Laser entsteht. Denn kleine, beweglichere Teilchen bewirken eine größere Schwankungsfrequenz des Streulichts. Die Daten werden durch einen digitalen Autokorrelator ausgewertet. Dieser vergleicht die Signalintensitäten in sehr kurzen Zeitintervallen miteinander und berechnet daraus die Größenverteilung der Partikel. Das Prinzip der PCS wird auch als „Dynamische Lichtstreuung“ bezeichnet.

3.3.1 *Notwendige Parameter*

Den Graphen in Abbildung 17 sind jeweils die wichtigsten Probenparameter und Mess-ergebnisse voranstellt. Z-Average bezeichnet den „mittleren intensitätsgewichteten Partikeldurchmesser“ einer Granula-Probe. Diese Größe wird ausschließlich aus den Signalintensitäten berechnet. Erst durch Umrechnung dieser Daten lassen sich die Werte zunächst in Größenklassen einteilen, aus denen schließlich die Kurve und der durchschnittliche Durchmesser abgeleitet werden. Für die PCS-Messung müssen unter anderem der Brechungs-index (RI) der Probe, des Lösungsmittels und seine Viskosität bekannt sein. In den Versuchen dieser Arbeit wurde statt des unbekanntes RI von PHB der Wert des strukturell ähnlichen Polystyrol (1,59) eingesetzt. Als Lösungsmittel diente Wasser (RI: 1,33; Viskosität: 0,89).

Ein weiterer wichtiger Parameter, der eine Aussage über die Qualität der Probe bzw. der Messung macht, ist der Polydispersionsindex (PDI). Er beschreibt, wie groß die Standardabweichung der Größenverteilung ist. Je kleiner der PDI, desto schmaler und symmetrischer sind die Peaks und desto eher entsprechen sie der Gaußschen Verteilungskurve. Diam. (nm) gibt den durchschnittlichen Durchmesser an, Intensität beschreibt bei der Detektion mehrerer Peaks, wie groß jeweils deren Anteil an der gesamten Streulichtintensität ist. Der Wert "width" ist nicht die Peakbreite, die man am Graph ablesen kann. Es handelt sich dabei laut dem Hersteller (Malvern) um „die errechnete Standardabweichung des Mittelwertes von 66.6 % der Intensitätsverteilung“.

3.3.2 *Bestimmung Größenverteilung nPHB-, nPHV und nPHO-Granula*

Die Größenverteilung von Granulaisolaten der folgenden Stämme konnte bestimmt werden:

- *Ralstonia eutropha* H16 Wt (36h-Kultur auf Mineralmedium mit 2% NaGlukonat)
- *Ralstonia eutropha* H16 Wt (15h-Kultur auf Mineralmedium mit 2% NaGlukonat)
- *Ralstonia eutropha* H16 Wt (12,5h-Kultur auf NB-Medium)
- *Ralstonia eutropha* H16 Δ PhaP1 (Phasin-Mutante)
- *Ralstonia eutropha* H16 Δ PhaZa1 (Depolymerase-Mutante)
- *Alcaligenes latus* DSMZ 1123
- *Bacillus* sp. K6
- *Comamonas* sp.
- *Paucimonas lemoignei*
- *Paracoccus denitrificans* (PHV-Granula)
- *Pseudomonas putida* Gpo1 (PHO-Granula)

Zunächst wird anhand der PCS-Messung eines 600 nm-Polystyrol-Standards die Genauigkeit des Systems gezeigt (Abb. 16). Dazu wurden 3 µl 600 nm-Standard (596 nm +/- 6 nm, Polystyrene in Wasser, Nanospere™ Size Standards, Duke Scientific Corporation, Palo Alto) in eine Küvette mit 3 ml destilliertem Wasser gegeben und gut vermischt.

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 633,1	Peak 1: 655,0	100,0	123,2
Pdl: 0,006	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,951	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			

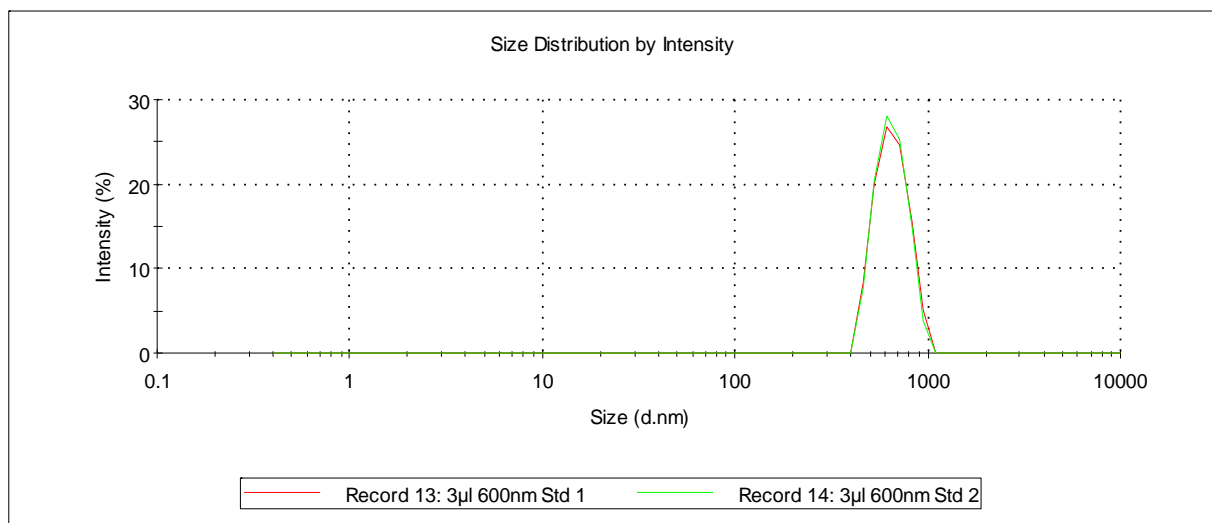


Abb. 16 Größenbestimmung mit Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS): Test eines 600 nm Polystyrol-Standards. Overlay von zwei Graphen (je aus 10 Einzelmessungen erstellt)

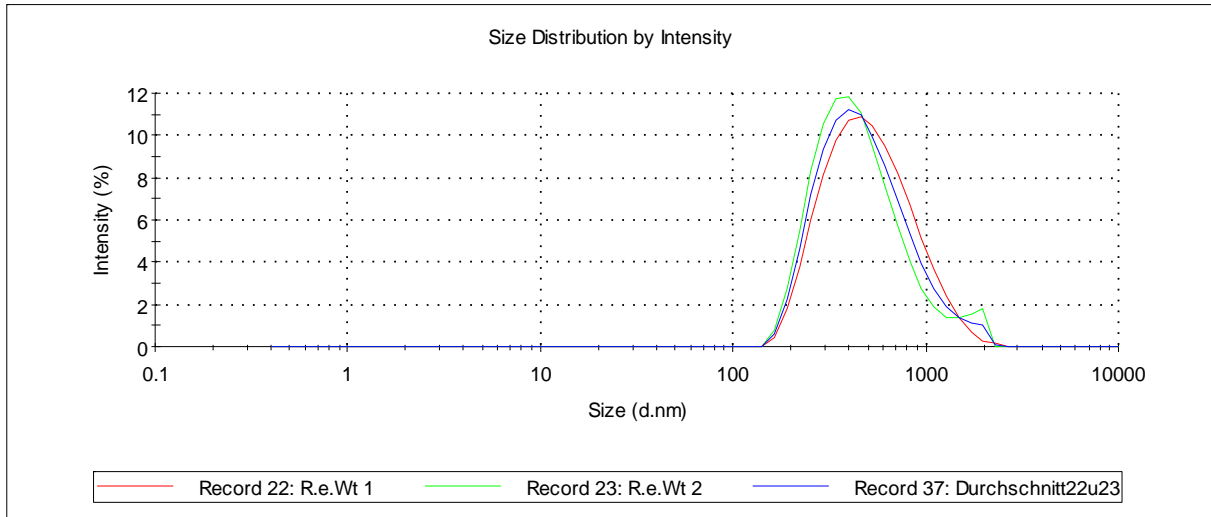
Die Messung ergab einen Durchmesser von 655 nm und eine Peakbreite von 126 nm. Der sehr niedrige PDI von 0,006 weist auf eine sehr enge Größenverteilung hin. Mit einer Messungenauigkeit von rund 10 % muss entsprechend dem erhaltenen Wert also gerechnet werden.

Die Messung einer Probe dauert knapp 15 Minuten. Dabei handelt es sich um drei Durchgänge à zehn Einzelmessungen über das ausgewählte Partikelgrößen-Spektrum (hier: 0,1 – 3000 nm). Aus zehn Einzelmessungen werden jeweils Mittelwerte und daraus ein Graph gebildet. Der Vergleich des ersten und zeitlich letzten Graphen zeigt gut, ob während der Messung womöglich viele Granula verklumpt sind. Oder ob die Größenverteilung auch nach zehn Minuten verdünnt und bei Raumtemperatur noch konstant ist.

Die Bedingungen, unter denen die verschiedenen nPHB-Granula isoliert wurden, sind ausführlich in Kapitel 3.6 dargestellt ("Isolierung Granula aus verschiedenen Stämmen"). Wie die einzelnen Stämme zuvor kultiviert wurden, ist im Material- und Methodenteil in Kapitel 2.3.1 beschrieben.

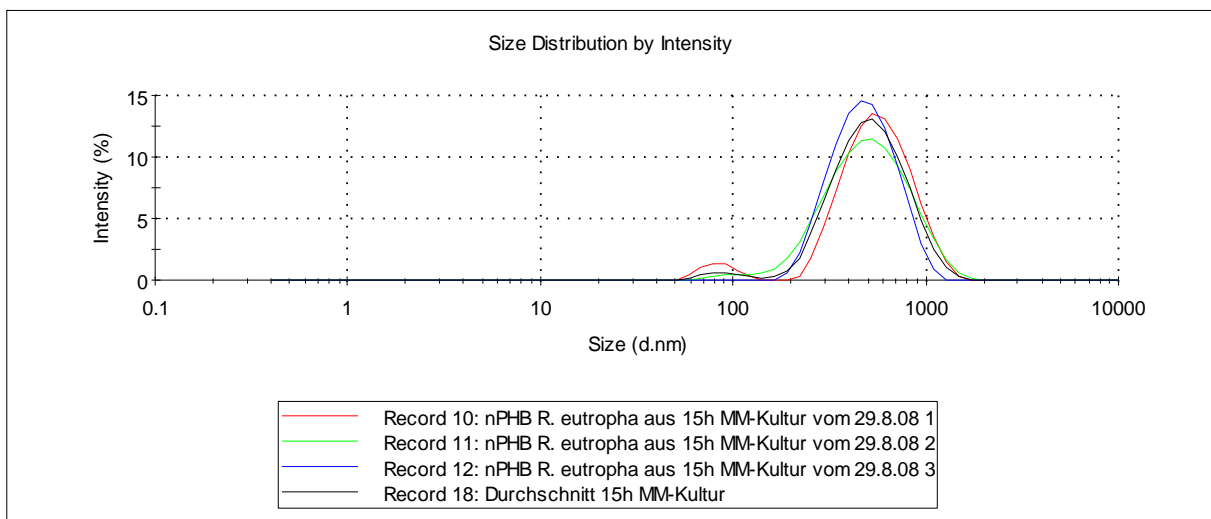
Ralstonia eutropha MM-Granula (36h-Kultur)

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 468,3	Peak 1: 547,0	100,0	335,8
Pdl: 0,335	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,961	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



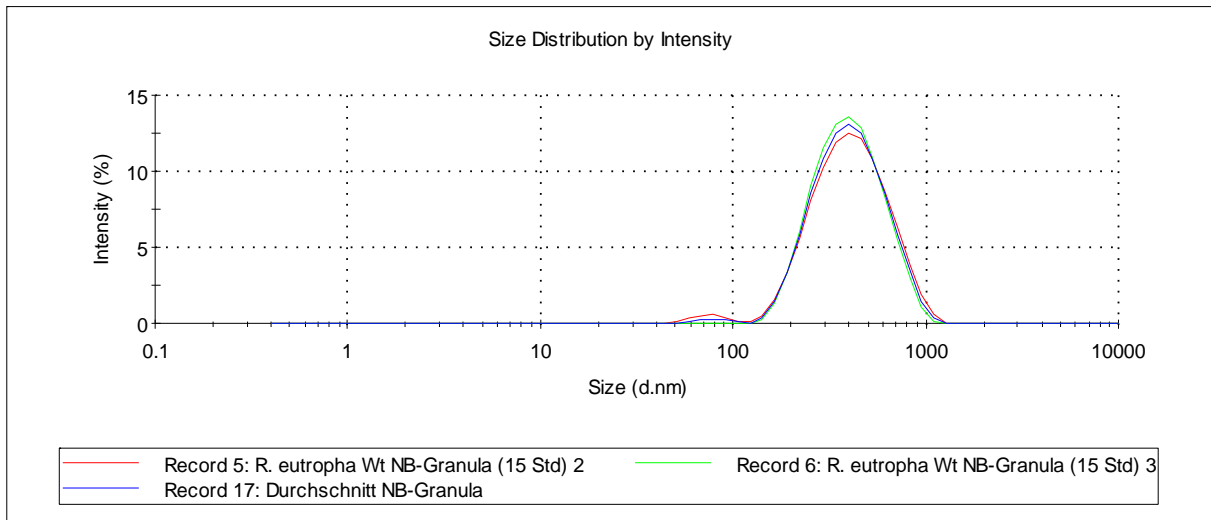
Ralstonia eutropha MM-Granula (15h-Kultur)

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 489,8	Peak 1: 551,0	97,5	231,0
Pdl: 0,334	Peak 2: 92,46	2,5	22,01
Intercept: 0,962	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



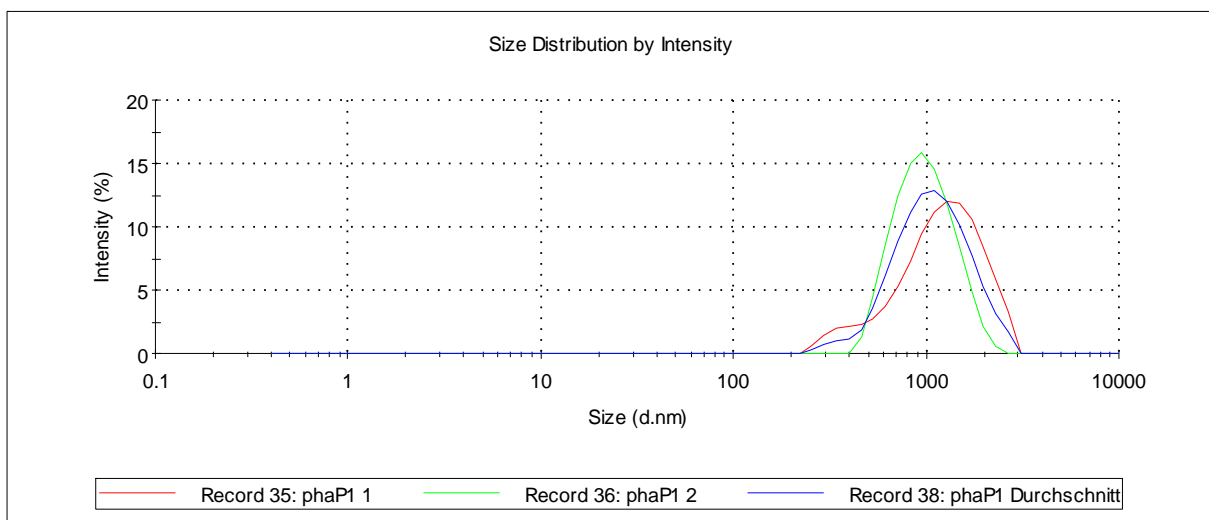
Ralstonia eutropha NB-Granula (15h Kultur)

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 388,6	Peak 1: 430,4	98,9	178,4
Pdl: 0,283	Peak 2: 76,50	1,1	16,26
Intercept: 0,943	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



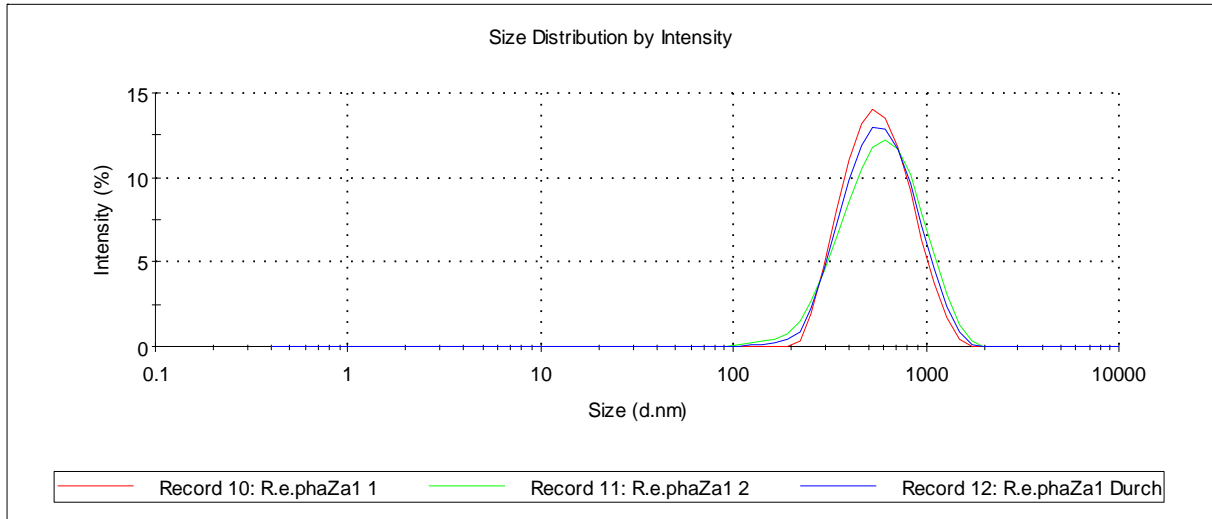
Ralstonia eutropha H16 Δ PhaP1 (Phasin-Mutante, 36h-Kultur)

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 1041	Peak 1: 1153	100,0	499,6
Pdl: 0,245	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,927	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



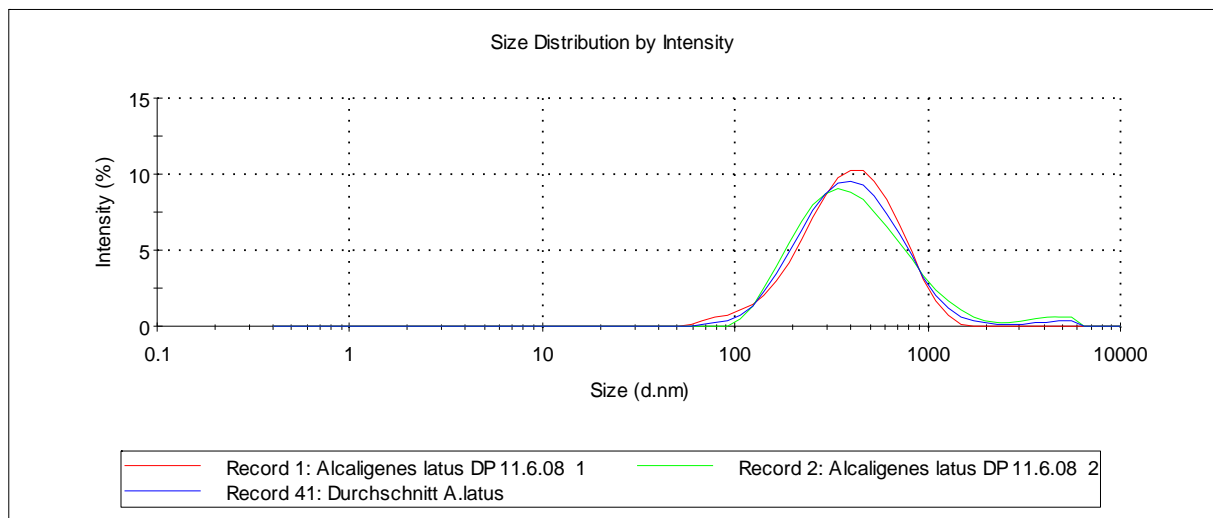
Ralstonia eutropha H16 Δ phaZa1 (Depolymerase-Mutante, 36h-Kultur)

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 530,9	Peak 1: 618,4	100,0	262,1
Pdl: 0,192	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,963	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



Alcaligenes latus (24h-Kultur)

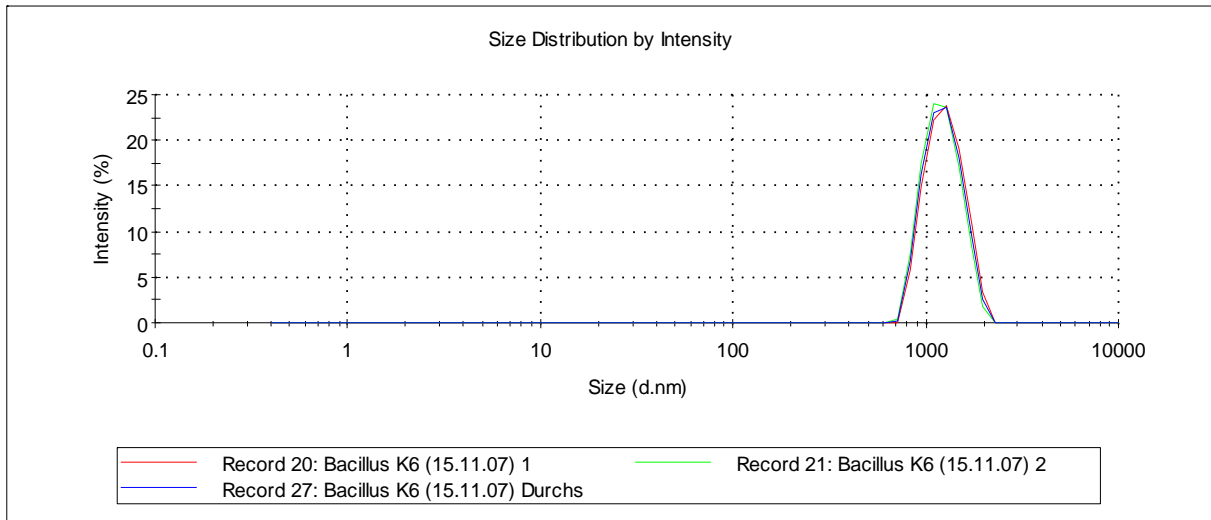
	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 347,6	Peak 1: 463,7	98,6	296,9
Pdl: 0,260	Peak 2: 4247	1,4	958,0
Intercept: 0,950	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



Bacillus sp. K6 (21h-Kultur)

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 1172	Peak 1: 1254	100,0	277,1
Pdl: 0,091	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,939	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

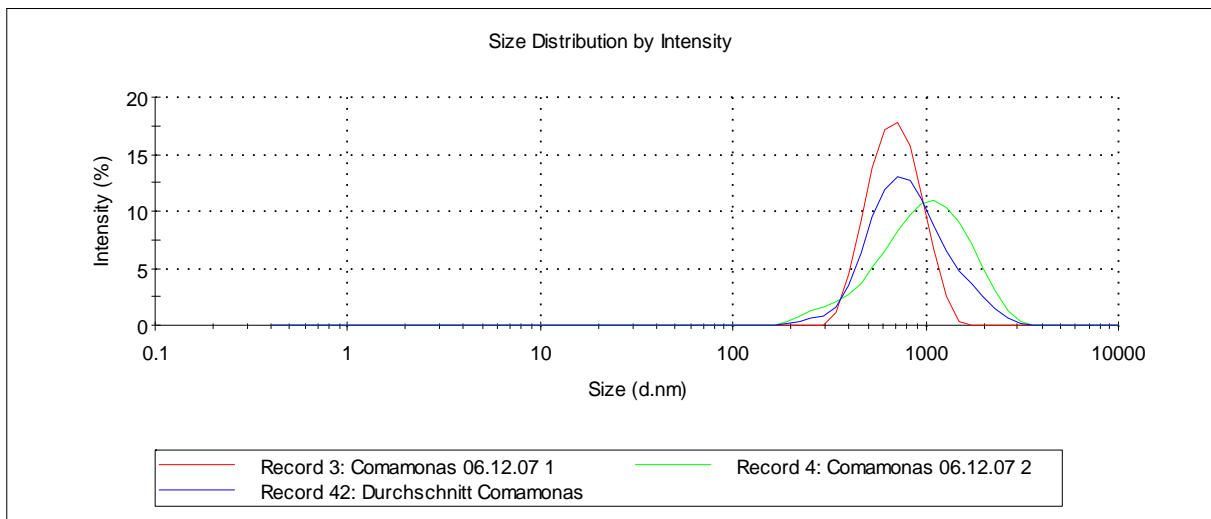
Result quality : Refer to quality report



Comamonas sp. (21,5 h-Kultur)

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 730,8	Peak 1: 899,0	100,0	452,1
Pdl: 0,274	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,969	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

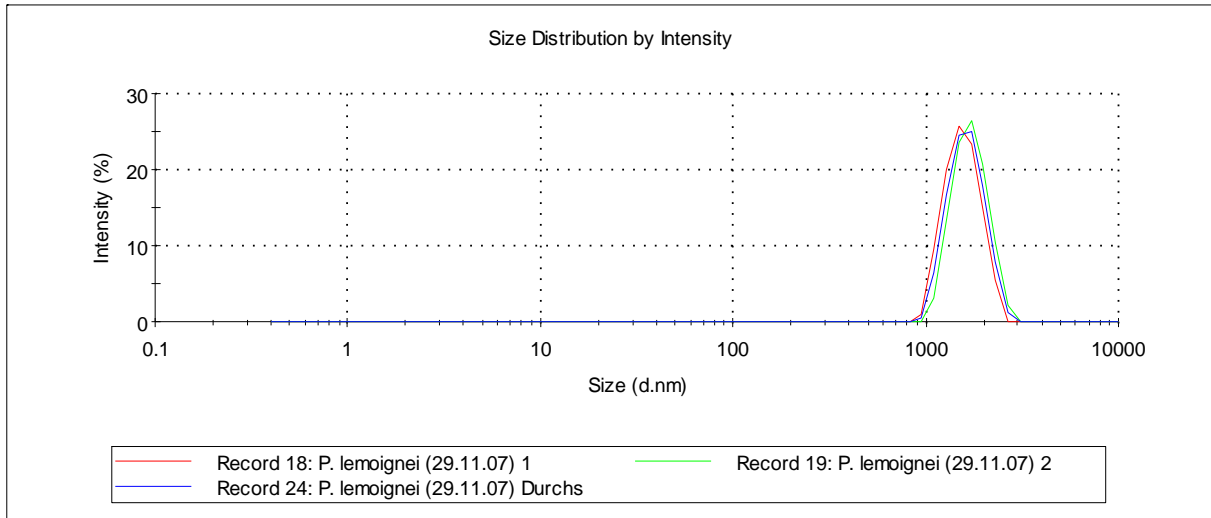
Result quality : Good



Paucimonas lemoignei (25h-Kultur)

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 1651	Peak 1: 1650	100,0	344,0
Pdl: 0,127	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,937	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

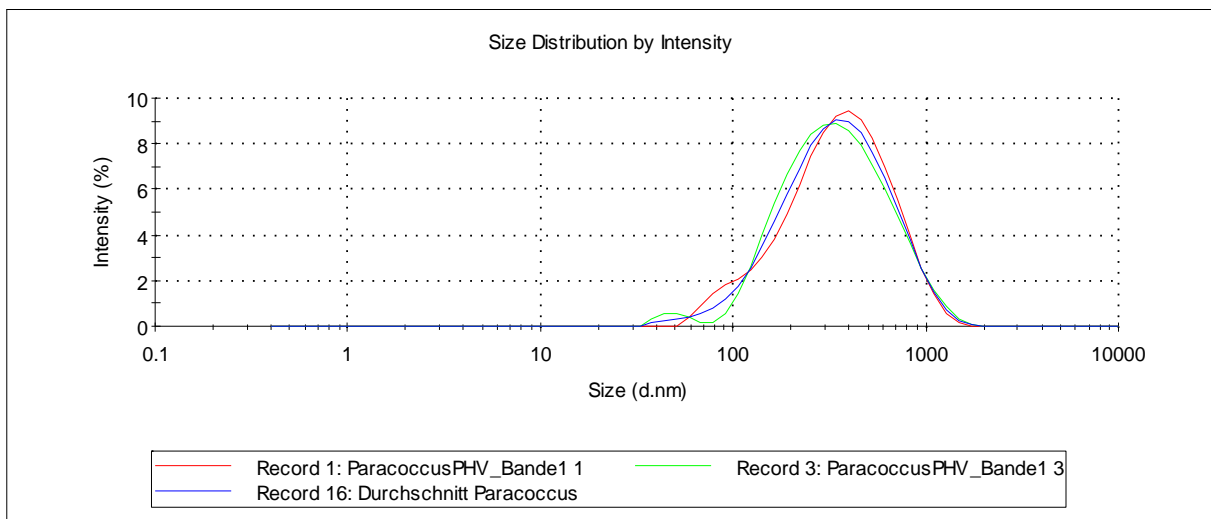
Result quality : **Refer to quality report**



Paracoccus denitrificans (PHV)

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 294,3	Peak 1: 401,3	100,0	247,3
Pdl: 0,351	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,956	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : **Good**



Pseudomonas putida Gpo1 (PHO)(24h-Kultur)

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 312,9	Peak 1: 441,3	99,4	286,6
Pdl: 0,265	Peak 2: 4924	0,6	642,1
Intercept: 0,955	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			

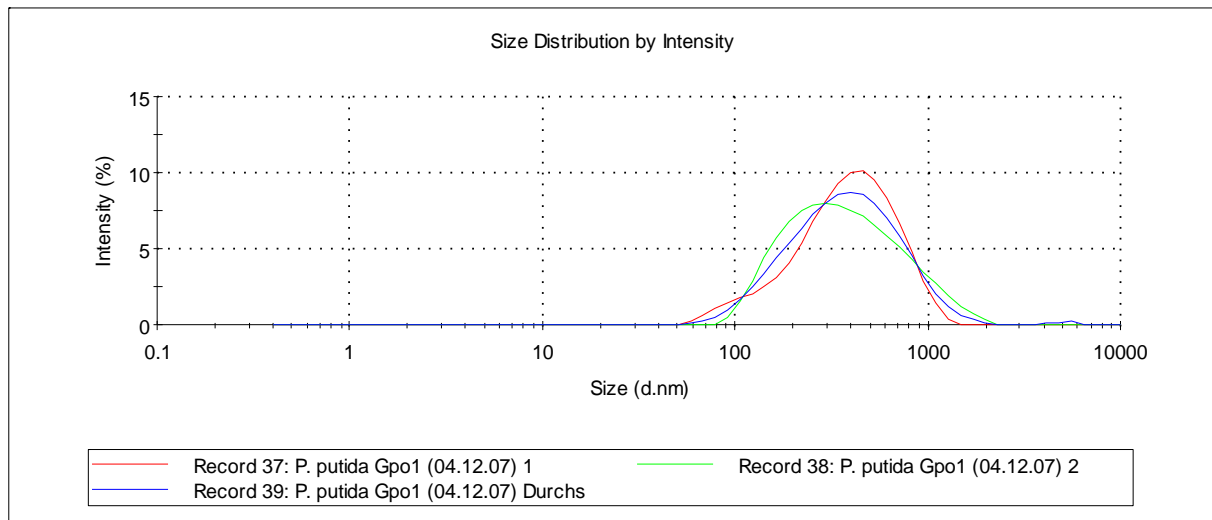


Abb. 17 Größenverteilung (nm) der Durchmesser von nPHB-Granula aus verschiedenen Organismen. Verdünnung der ungewaschenen Granula (Granulasuspension): 3 µl Granula in 3 ml destilliertem Wasser in einer 3 ml-Einweg-Küvette. Im Gerät wird die Messküvette auf 25°C temperiert. Untersuchung mit Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS)(Zetasizer Nano ZS90, Malvern) in der AG Biomimetische Grenzflächen (Dr. Günter Tovar) des Fraunhofer-Institutes Stuttgart (IGB). Ablauf pro Probe: Hintereinander automatisch 2 Messungen mit je 10 Scans. Daraus werden entsprechend 2 Kurven generiert (roter und grüner Graph). Berechnung der Durchschnittswerte (blauer Graph) X-Achse: Durchmesser in nm (logarithmische Skala), Y-Achse: Intensität der Laser-Streuung.

Tabelle 15 zeigt die durchschnittlichen Granula-Durchmesser verschiedener Organismen, sortiert von klein nach groß, sowie die zugehörigen Pdl-Werte. Die kleinsten Granula scheint hiernach mit durchschnittlich 401 nm der PHV-Bildner *Paracoccus denitrificans* zu bilden. Die größten Granula (oder Agglomerate) wurden aus *Bacillus sp.* K6 (1254 nm) und *Paucimonas lemoignei* (1650 nm) isoliert. Dabei fällt auf, dass beide Isolate eine klar reproduzierbare und enge Größenverteilung und entsprechend auch die kleinsten Pdl-Werte aufweisen. Deutlich größer als die Granula des Wildtypen oder der ΔphaZa1 -Mutante sind die der ΔphaP1 -Mutante (1024 nm), was auch mikroskopisch in dieser und anderen Arbeiten (Wieczorek et al. 1995) beobachtet wurde. Mit durchschnittlich 899 nm bilden *Comamonas*-Zellen auf Mineralmedium mit NaGlukonat ebenfalls verhältnismäßig große Granula. Nur rund halb so groß sind die Durchmesser von nPHB aus *Alcaligenes latus* (464 nm), *Pseudomonas putida* Gpo1 (441 nm) sowie *Ralstonia eutropha* nach 12,5 h NB-Kultur (430 nm). Wichtig ist es, hohe Pdl-Werte zu beachten. In den vorliegenden Messungen fallen dabei vor allem die Granula aus *P. denitrificans* sowie aus *R. eutropha* (MM-Kulturen) auf. Die Peaks zeigen alle eine Schulter, ein klares Zeichen einer nicht mehr monomodalen Verteilung, das heißt von Teilchen nur einer Größenklasse.

Tab. 15 Durchschnittl. Durchmesser nativer PHB bzw. PHV und PHO-Granula sowie Polydispersionsindex (PDI), bestimmt per Photon Correlation Spectroscopy (PCS). Der Polydispersionsindex ist ein Maß, wie eng oder weit der nm-Bereich ist, über den die Granuladurchmesser verteilt sind. Je kleiner der Wert, desto einheitlicher sind die Granuladurchmesser einer Probe.

	Diameter (nm)	PDI	cm ² / mg (auf 2 Stellen gerundet)
<i>Paracoccus denitrificans</i>	401	0,35	62
<i>Ralstonia eutropha</i> 12,5h NB	430	0,28	58
<i>Pseudomonas putida</i> Gpo1	441	0,27	57
<i>Alcaligenes latus</i>	464	0,26	54
<i>Ralstonia eutropha</i> 36h MM	547	0,34	46
<i>Ralstonia eutropha</i> 15h MM	551	0,33	45
<i>Ralstonia eutropha</i> Δ <i>phaZa1</i>	618	0,19	41
<i>Comamonas</i> sp	899	0,27	28
<i>Ralstonia eutropha</i> Δ <i>phaP1</i>	1024	0,25	24
<i>Bacillus</i> sp. K6	1254	0,09	20
<i>Paucimonas lemoignei</i>	1650	0,13	15

Wie in der Einleitung des Kapitels 3.3 mathematisch gezeigt wurde, besitzen bei gleichem Gesamtvolumen viele kleine Granula eine größere Gesamtoberfläche als wenige mit großem Durchmesser. Die Konzentration und daher wohl auch Gesamtaktivität Granula-gebundener Enzyme korreliert sehr wahrscheinlich bei den meisten Isolaten mit der Größe der Granulaoberfläche. Damit PHA-Granula aus unterschiedlichen Organismen oder Wachstumsphasen einer Kultur vergleichbar sind, müssen daher neben der eingesetzten Menge PHA in mg die unterschiedlichen Granulagrößen beachtet werden. Zu beachten ist jedoch die mögliche Abweichung der PCS-Ergebnisse um rund zehn Prozent, die die Standardmessung in Abb. 16 zeigt. Daher muss bei Diskussionen über die Aktivität pro Granulaoberfläche besonders auf die Signifikanz der Ergebnisse geachtet werden. Der Einsatz der PCS-Messung eröffnet dennoch neue Perspektiven und Einschätzungen im Vergleich des PHA-Stoffwechsels verschiedener Organismen.

Die Methode ermittelt den Durchmesser von nPHB-Granula in vitro, nach Isolierung aus der Zelle. In vivo lässt sich die Größe der Granula in den Zellen nur grob abschätzen. Deutliche Unterschiede wie zwischen nPHB aus *Paracoccus denitrificans* (400 nm) und *R. eutropha* Δ *phaP1* (620 nm) sind jedoch an Nilrot-gefärbten Zellen (2.4) auch mikroskopisch zu erkennen. Das zeigt die folgenden beiden Aufnahmen (Abb. 18) über das Fluoreszenzmikroskop, die bei der gleichen Vergrößerung (1200 fach: 100 x (Ölimmissions-Objektiv) und 12 x (Okular)) entstanden sind und daher hier direkt vergleichbar.

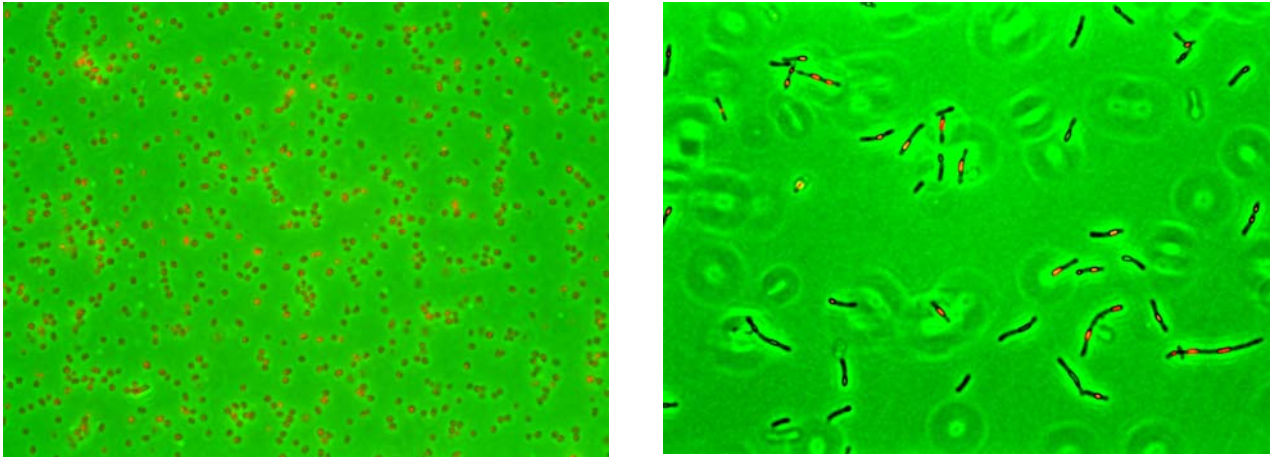


Abb. 18 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *P. denitrificans* (links) und *R. eutropha* Δ phaP1 (rechts). Zellfärbung mit Fluoreszenzfarbstoff Nilrot. Digitale Bildbearbeitung nach Overlay der Aufnahme Phasenkontrast (Grünfärbung) und Fluoreszenzfilter (Nilrotgefärbte PHV/PHB-Granula). Aufnahmezeitpunkt: *P. denitrificans* nach ca. 18 h Hauptkultur, *R. eutropha* Δ phaP1 nach 21 h MM-Hauptkultur. Vergrößerung bei beiden Abbildungen 1200fach (geringe Abweichung durch Datenumwandlung für digitales Photosystem möglich).

3.4 Depolymeraseaktivität nativer PHB-Granula: Charakterisierung mit dem pH-Stat

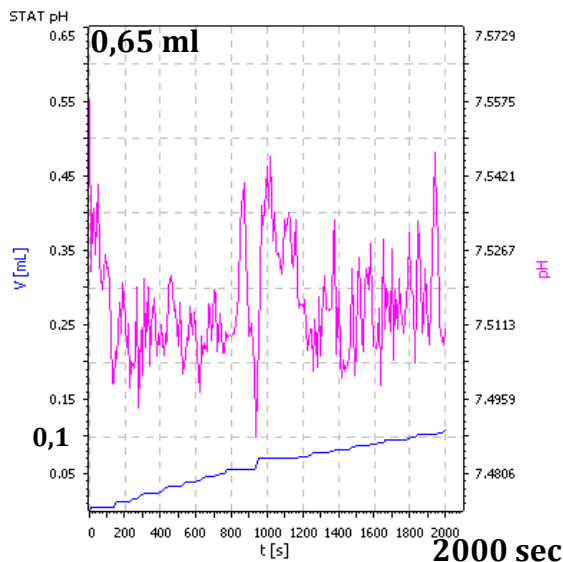
Auf der Oberfläche nativer PHB-Granula sind neben der mengenmäßig dominierenden Gruppe der Phasine verschiedene Depolymerasen identifiziert worden. Eine von ihnen, PhaZa1, wurde ausschließlich an PHB gebunden nachgewiesen (Saegusa et al. 2001), die anderen fanden sich teils am Granulum, teils im Cytosol (PhaZc, PhaZd)(Kobayashi et al. 2005; Abe et al. 2005). Die Oligomerhydrolase PhaZb wurde ebenfalls am Polymer als auch im zellfreien Überstand entdeckt (Kobayashi 2003). Diese Mischung vermutlich hydrolytisch aktiver Enzyme auf der Granulooberfläche erlaubt es nicht, einzelne Typen gesondert zu untersuchen. So wird durch sämtliche Versuche mit isolierten, nativen Wildtyp-Granula zunächst das Granulum als Ganzes charakterisiert. Der direkte Vergleich von nPHB des Wildtypen mit dem einzelner Depolymerase-Mutanten ermöglicht es jedoch, Rückschlüsse auf die einzelnen Enzyme zu ziehen. Dasselbe gilt für parallele Ansätze mit Granula verschiedener Organismen oder aus unterschiedlichen Kultivierungsstadien und -methoden.

Wie in Kapitel 3.1.2 gezeigt, konnte mit Hilfe des pH-Stat-Gerätes die sehr geringe Säurefreisetzung nativer PHB-Granula aus *R. eutropha* nachgewiesen werden (etwa 4 nmol / min x mg). Um sicher zu sein, bei diesen niedrigen Aktivitäten nicht doch Artefakte zu messen, wurden zunächst zahlreiche Kontrollversuche durchgeführt. Erst im Anschluss folgten die eigentlichen Versuche zur Charakterisierung der Granula und dem Vergleich von nPHB verschiedener Kulturen, die in den folgenden beiden Kapiteln (3.4 und 3.5) vorgestellt werden.

3.4.1 Nachweis: Säurefreisetzung durch Enzyme

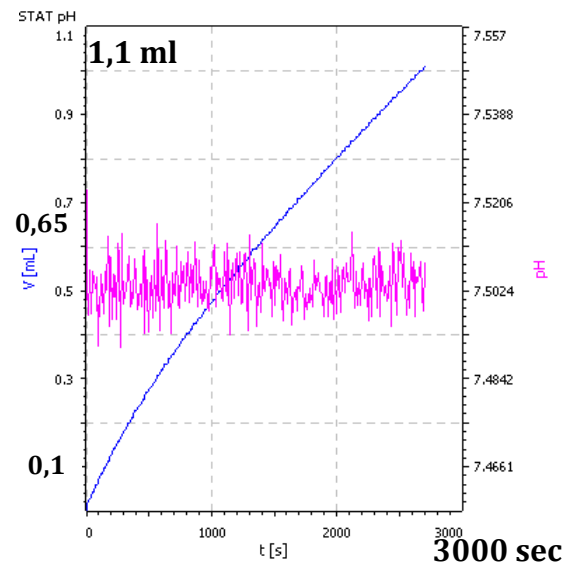
Um zu erkennen, ob wirklich enzymatische Hydrolyseaktivität gemessen worden war, wurden neben nPHB aus *R. eutropha* weitere PHB-Granula untersucht: amorphes artifizielles PHB (aPHB) (2.11) sowie native Granula aus rekombinanten *E. coli*-Zellen. Diese sind mit dem PHB-Synthese-Operon (*phaCAB*) und dem Phasin1-Gen (*phaP1*) ausgestattet und produzieren viele kleine Granula. Beiden Granula-Typen ist gemeinsam, dass das Polymer auf seiner Oberfläche theoretisch keine Enzyme und damit keine Depolymerasen besitzt. Handrick et al. konnten jedoch unter anderem durch das Ablösen mit Trypsin nachweisen, dass die hydrophoben Granula rekombinanter *E. coli*-Zellen durchaus von zahlreichen Proteinen besetzt sind (Handrick et al. 2004a). Diese stammen vermutlich aus dem Cytoplasma.

Der Vergleich mit diesen beiden PHB-Isolaten zeigt, dass native Granula aus *R. eutropha* im pH-Stat eine deutlich höhere Säurefreisetzungsrates aufweisen als Granula aus rekombinanten *E. coli* oder als aPHB (Abb. 19 und Abb. 20). Daraus wird deutlich, dass es sich nicht alleine um eine chemische Hydrolyse handeln kann, sondern dass zusätzlich Enzyme am Abbau des Polymers beteiligt sein müssen.



**Titration nPHB aus *E. coli* (*phaCAB phaP1*)
(25,5 mg)**

Säurefreisetzungsrates = 1,2 nmol / min x mg PHB



**Titration nPHB aus *R. eutropha* Wt
(100 mg)**

Säurefreisetzungsrates = 2,4 nmol / min x mg

Abb. 19 Titration nPHB aus *E. coli* (*phaCAB phaP1*) (A) und *R. eutropha* Wt (B) in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl, pH 7,5, 37°C mit 10 mM NaOH. *E. coli*: 500 mg Glycerinsuspension (= 25,5 mg PHB), *R. eutropha*: 1078 mg Glycerinsuspension (= 100 mg PHB). Linke Y-Achse (blauer Graph): Verbrauch an 10 mM NaOH (ml). Rechte Y-Achse (rosa Graph): pH-Wert. Noch keine Korrektur um Grundrate durch CO₂-Ansäuerung des Puffers. Ansatzvolumen: 10 ml

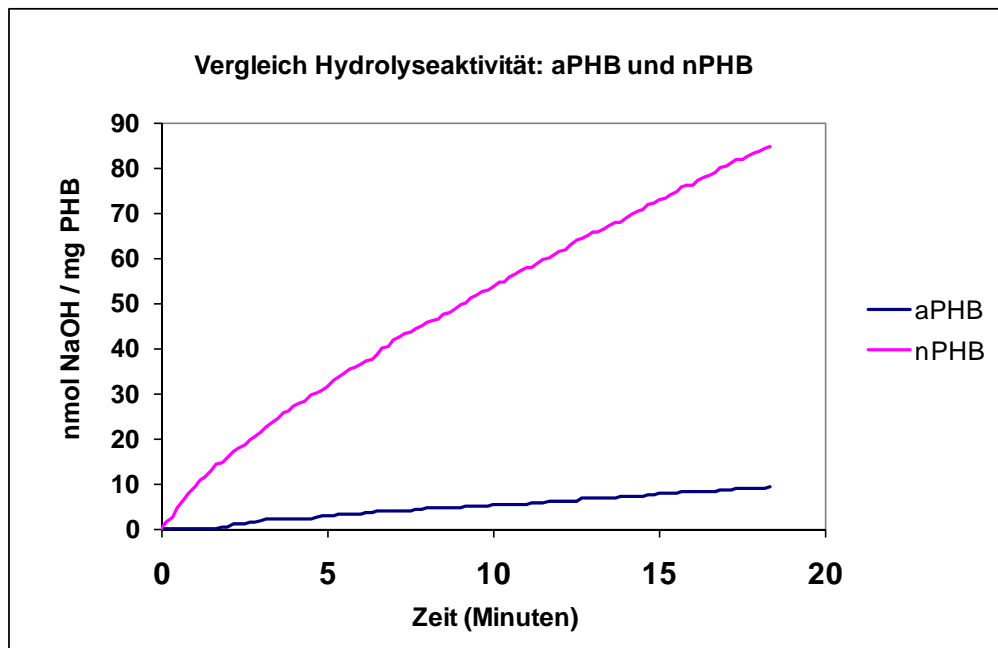


Abb. 20 Vergleich Hydrolyseansätze im pH-Staten von amorphem, artifiziellem PHB (aPHB, blau) und nativem PHB (nPHB, rosa) aus *R. eutropha* Wt. Für die Versuche wurden ursprünglich 79 mg aPHB (in 15 ml 50 mM NaCholat) eingesetzt bzw. 2 g nPHB aus *R. eutropha* Wt (=28 mg PHB nach Waschen/Trocknen) (in 15ml 1mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5). Die Graphen beziehen sich jedoch auf die Säurefreisetzung pro 1 mg PHB. Zudem wurden die Daten um die Messwerte für Tris-HCl-Puffer korrigiert. Gesamtvolumen: 15 ml.

Nach dem Vergleich von Granula aus *R. eutropha* Wt mit nPHB aus rekombinanten *E. coli*-Zellen und mit amorphem, artifiziellem PHB gibt auch die Kinetik der Säurefreisetzung einen Hinweis auf eine enzymatische Reaktion. Chemische Hydrolysen erfolgen bei konstanten Bedingungen und mit Wasser als Lösungsmittel als Reaktion 1. Ordnung. Das heißt, die Reaktionsgeschwindigkeit ist konstant und nur vom Substrat abhängig. Anders sieht es bei der enzymatischen Hydrolyse aus. Hier bestimmt bei Substratsättigung zunächst die Enzymkonzentration bzw. die Gleichgewichtskonstante k die Geschwindigkeit. Die Anfangsaktivität enzymatischer Reaktionen lässt jedoch mit der Zeit nach. Der Vergleich von drei unterschiedlich langen Titrations sollte daher Informationen über den zeitlichen Verlauf der Reaktion liefern. In Abb. 21 sind die Graphen der drei Titrations im pH-Staten bei pH 7,5 gezeigt. Es handelt sich dabei jeweils um die gleichen Versuchsansätze bei 37°C mit 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer und 3,6 g Glycerinsuspension (= 300 mg PHB), isoliert aus *R. eutropha* Wt. Im ersten Fall dauerte die Inkubation eine Stunde (Rot), im zweiten sechs Stunden (Grün) und der letzte Graph zeigt die Säurefreisetzung über zwölf Stunden. In allen drei Verläufen knickt der Graph nach rund 3000 Sekunden (50 Minuten) ab, in der einstündigen Titration erst in Ansätzen erkennbar, bei den anderen beiden Läufen deutlich sichtbar. Diese Kinetik entspricht erkennbar der von Enzymen: die Aktivität - das heißt die Säurefreisetzung - ist zu Beginn am höchsten und lässt mit der Zeit nach.

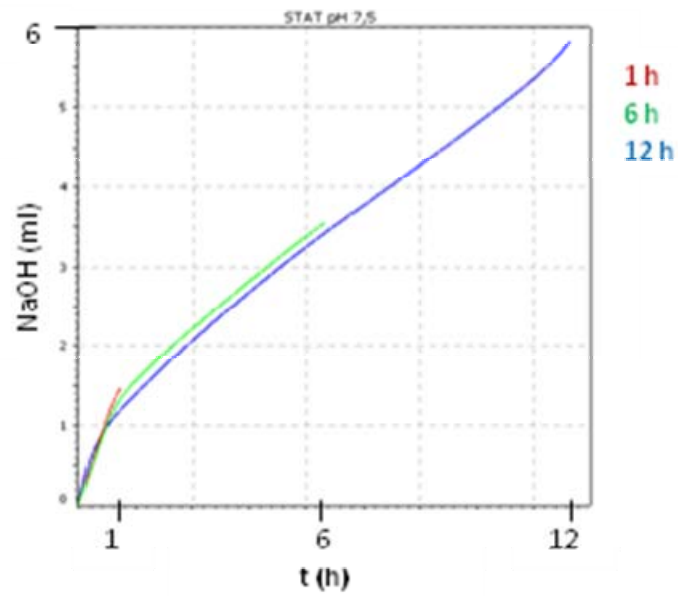


Abb. 21 Überlagerung Titrations im pH-Stat über 1 (rot), 6 (grün) und 12 Stunden (blau). 3,6 g Granulasuspension (300 mg PHB) aus *R. eutropha* Wt in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 37°C. Y-Achse: Verbrauch an 10 mM NaOH (ml).

3.4.2 Titration nPHB aus *Alcaligenes latus*

Aus der Literatur ist *Alcaligenes latus* als typischer PHB-Speicher-Organismus bekannt. Zuerst beschrieben und als Wasserstoff-Bakterium klassifiziert wurde er von Palloni und Palloni 1978. Während sich in den letzten Jahren immer mehr Gruppen mit seinem PHA-Synthesystem beschäftigt haben (Choi et al, 1998; Lee et al, 2000; Seo et al, 2001; Shin et al. 2002), gibt es über den Abbau der nativen Granula in vitro bis auf die Arbeit von Pfeiffer 2009 keine Daten.

Der pH-Stat-Versuch mit nPHB Granula aus *A. latus* in Abbildung 22 macht deutlich, wie erstaunlich hoch ihre Säurefreisetzungsrate ist - verglichen mit nPHB aus *R. eutropha*. Gezeigt ist der Verbrauch von 10 mM NaOH (blau), um den pH von 10 ml 0,1 mM Tris mit 60 mg PHB (= 1 g Granulasuspension) aus *A. latus* bei Raumtemperatur auf pH 7,5 zu halten. Nach 20 Minuten wurde die Temperatur auf 37°C erhöht, was einen deutlichen Anstieg der Säurefreisetzungsrate zur Folge hat. Das regelmäßige Abfallen des blauen Graphen entsteht, da nach einem Verbrauch von 5 ml NaOH-Lösung der Kolben des Dosiergerätes automatisch nachgefüllt wird und so die Zugabe für einige Sekunden stoppt. Die rote Verbrauchskurve zeigt im Vergleich die Säurefreisetzungsrate von 100 mg PHB (= 910 mg Granulasuspension) aus *R. eutropha* Wt. Dieser Ansatz wurde von Beginn an bei 37°C inkubiert, die sonstigen Parameter sind identisch mit dem *A. latus*-Versuch. In beiden Fällen konnte die Säurefreisetzung der Titration durch den 3-HB-Dehydrogenasetest (2.15.2) als 3-Hydroxybutyrat-Bildung bestimmt werden.

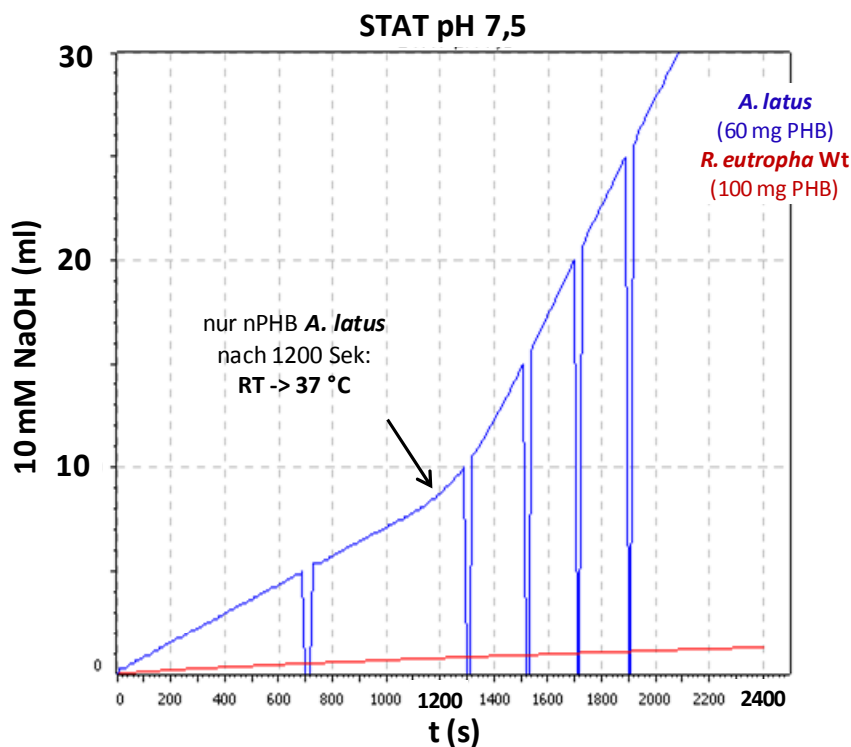


Abb. 22 Overlay pH-Stat-Titration nPHB aus *A. latus* 1123 und *R. eutropha* Wt (aus MM-Kultur). Titration von 1g Glycerinsuspension (= 60 mg PHB) aus *A. latus* 1123 bzw. 910 mg Glycerinsuspension (= 100 mg PHB) aus *R. eutropha* Wt. Titration in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,5 mit 10 mM NaOH. Die Reaktionstemperatur lag für den Ansatz mit *A. latus*-nPHB zunächst bei Raumtemperatur. Nach 1200 Sekunden wurde sie auf 37°C erhöht. Im Ansatz mit nPHB aus *R. eutropha* Wt war sie konstant auf 37°C eingestellt.

Tab. 16 Vergleich Säurefreisetzungsraten von nPHB aus *A. latus* und *R. eutropha* Wt (pH 7,5) bei RT bzw. 37°C (siehe auch Abb. 22)

nPHB	T (°C)	Säurefreisetzungsrates (nmol / min / mg PHB)
<i>R. eutropha</i> Wt - nPHB	37°C	3
<i>A. latus</i> - nPHB	20°C (RT)	70
<i>A. latus</i> - nPHB	37°C	250

Tabelle 16 zeigt die Werte, die den Geradensteigungen aus Abbildung 22 entsprechen. Dabei wurde die Säurefreisetzung pro Minute zusätzlich auf die mg-Menge PHB bezogen, die jeweils im pH-Stat-Versuch eingesetzt war. Im Ansatz mit *A. latus*-nPHB waren es 60 mg, bei *R. eutropha* Wt-nPHB 100 mg. Durch die Berechnung pro mg wird der Unterschied in der Säurefreisetzung zwischen den Granula der beiden Organismen noch deutlicher: im gleichen Puffer (pH 7,5) und bei gleicher Temperatur (37°C) bilden nPHB-Granula aus *A. latus* rund 80mal mehr Säure (3-HB) als nPHB aus *R. eutropha* Wt. Dabei entsprechen 37°C dem Temperaturoptimum von Granula aus *R. eutropha*. Bei 20°C konnte dort keine signifikante Säurefreisetzung festgestellt werden.

Aus PCS-Messungen (3.3.2) ist bekannt, dass Granula aus *A. latus* im Durchschnitt einen Durchmesser von 460 nm besitzen, aus *R. eutropha* Wt 550 nm (Messungenauigkeit ca. 10 Prozent). Daraus folgt, dass die Gesamt-Oberfläche von 1 mg *A. latus* nPHB mit rund 54 cm² um den Faktor 1,2 größer ist als für 1 mg nPHB aus *R. eutropha* Wt mit rund 46 cm².

Aber auch innerhalb eines Ansatzes kann die Rate stark variieren, zum Beispiel abhängig von der Temperatur. So steigt die Säurefreisetzung von nPHB aus *A. latus* bei Temperaturerhöhung von 20°C auf 37°C um den Faktor 3,5.

Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass nPHB aus *A. latus* unter gleichen Bedingungen (pH-Stat, 37°C) pro mg PHB um den Faktor 80 mehr Säure freisetzt als nPHB aus *R. eutropha* Wt. Auf die gleiche Granulaoberfläche bezogen – d.h. geteilt durch den Faktor 1,2 (s.o.) – liegt der Unterschied immer noch bei Faktor 67.

3.4.3 Hemmung Eigenhydrolyse

Ein weiteres starkes Indiz, dass Reaktionen enzymatischen Ursprungs sind, läuft über das Denaturieren der Proteine durch Hitze. Ist eine Aktivität bei Zugabe erhitzter Proteine deutlich geringer als mit unbehandelten, ist dies ein deutlicher Hinweis, dass thermolabile Enzyme an der Reaktion beteiligt sind.

Nach diesem Schema wurden die Granula-gebundenen Enzyme (nPHB aus *R. eutropha* Wt) auf ihren Anteil an der Säurefreisetzung untersucht. 19 ml 1 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8 wurden in das pH-Stat-Reaktionsgefäß bei 37°C vorgelegt. Für den Kontrollversuch wurden 1 g Glycerinsuspension (=25 mg PHB) zugegeben, die zuvor im Eisbad gelagert hatten. Unter den gleichen Bedingungen lief die pH-Stat-Messung mit 1 g Glycerinsuspension ab, die vorher für 30 Minuten im 1,5 ml-Reaktionsgefäß im Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert wurde. Dabei startete die Hitzebehandlung bei Raumtemperatur mit Anschalten des Heizgerätes. Die Endtemperatur von 90°C wurde nach rund 25 Minuten erreicht. Dieses schonende Verfahren war wichtig, um nur die Oberflächenproteine, aber nicht das ganze Granulum zu denaturieren. Die direkte Inkubation bei hohen Temperaturen führte zur Phasenbildung mit verklebtem denaturiertem PHB und einer flüssigen Glycerinschicht. Die Graphen in Abbildung 23 zeigen das Ergebnis der pH-Stat-Titration nativer und erhitzter nPHB-Granula:

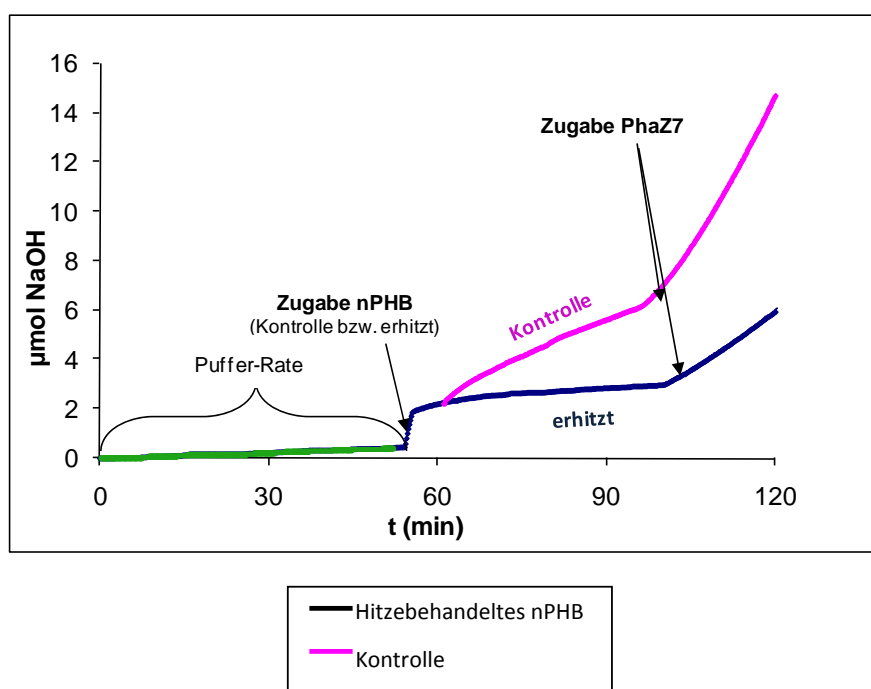


Abb. 23 Vergleich der Säurefreisetzung im pH-Staten durch native PHB-Granula von Eis (Kontrolle, rosa) und Granula nach 30 Minuten Erhitzen von RT bis 90°C (Blau) im Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf). Zunächst Messung der Säurefreisetzung durch vorgelegte 19 ml 1 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 8 und 37°C. Nach gut 50 Minuten je nach Ansatz Zugabe 1 g Glycerinsuspension von Eis bzw. hitzebehandelt. Nach 95 Minuten jeweils Zugabe PhaZ7, nPHB-spezifische Depolymerase aus *P. lemoignei*. Gesamtvolumen: 20 ml.

Nachdem nach Zugabe der Granula der Soll-pH wieder erreicht wurde, zeigten die hitzebehandelten Granula nur noch eine Hydrolyserate, die 12 % der Rate der Kontroll-Granula entsprach. Dass aber in beiden Fällen das PHB noch nativen, amorphen Charakter hatte, zeigte die Wirkung von isoliertem PhaZ7. Diese Depolymerase aus *P. lemoignei* hydrolysiert spezifisch nur natives PHB. Ihre Zugabe nach rund 100 Minuten bewirkte bei der Kontrolle und den erhitzten

Granula einen raschen Anstieg der Säurefreisetzung. Die Hydrolyserate durch PhaZ7 war mit hitzebehandelten Granula etwas niedriger als mit unbehandeltem nPHB. Dies weist darauf hin, dass ein Teil davon doch durch die Hitze denaturiert wurde. Dennoch scheint der Großteil dieser Granula noch eine amorphe, PhaZ7-empfindliche Struktur zu besitzen. Der Rückgang der endogenen Säurefreisetzung nach Erhitzen um fast 90% kann daher nicht alleine auf denaturiertes Granula zurückzuführen sein. Es scheinen durch die Hitzebehandlung in der Hauptsache tatsächlich selektiv die Oberflächenenzyme zerstört worden zu sein.

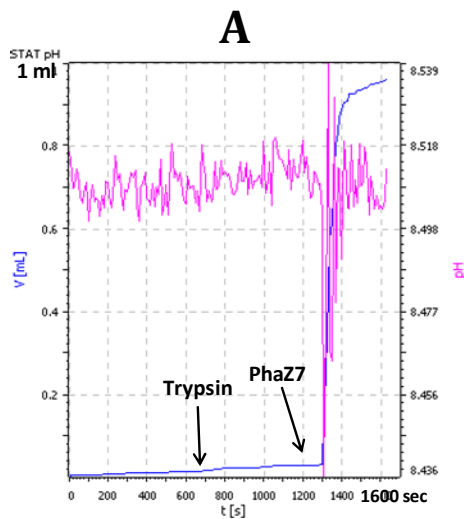
3.4.4 Einfluss verschiedener Reagenzien

Ein großer Vorteil der pH-Stat-Methode ist die „online“-Beobachtung der Säurefreisetzung und damit der Hydrolyseaktivität des Granulumkomplexes. So lässt sich beispielsweise sofort die Wirkung potentieller Hemmstoffe oder Aktivatoren feststellen. In dieser Arbeit wurden eine ganze Reihe dieser Substanzen getestet, deren Einfluss in Tabelle 8 zusammenstellt ist. Umfassend untersucht wurden die Protease Trypsin, im Vergleich dazu ProteinaseK sowie die Detergentien SDS, Triton X-100 und CTAB sowie die Reduktions- und Oxidationsmittel DTT und DTNB. Ihre Wirkung auf native PHB-Granula wird im Folgenden näher erläutert.

Trypsin

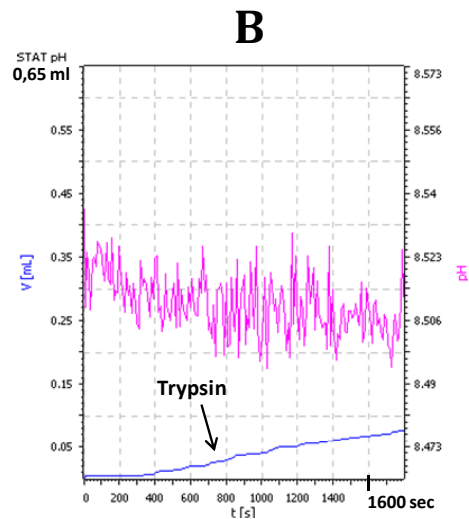
Diese Protease spielt in der Untersuchung der Hydrolyseaktivität nativer PHB-Granula schon länger eine Rolle. Ihr Einsatz in geringen Konzentrationen fördert die Säurefreisetzung durch native PHB-Granula. So zeigten unter anderem Griebel und Merrick 1971, dass die Protease die Säurebildung von nPHB aus *Bacillus megaterium* durch zugegebenen Extrakt aus *Rhodospirillum rubrum* signifikant erhöht. Dazu muss das nPHB vorher mit Trypsin inkubiert worden sein.

In folgenden Versuchen konnte durch die sensitive Messmethode gezeigt werden, wie die fördernde Wirkung des Enzyms unmittelbar nach Zugabe zu nativem PHB einsetzt. Zudem lassen die Ergebnisse vermuten, dass der Einfluss von Trypsin von der bereits bestehenden Eigenhydrolyse-Aktivität des nativen PHB abhängt. Die Zugabe zu aPHB, dPHB (Abb. 24) und nPHB aus *E. coli phaCAB* (o. Abb, Tab. 18) bewirkt keinerlei bzw. nur eine sehr schwache Reaktion. Im Gegensatz dazu steigert 3,75 µg Trypsin/mg PHB die Hydrolyserate nativer PHB-Granula aus einer 36-stündigen *R. eutropha* Wt - Kultur von 0,15 nmol/min/mg PHB um 80 % auf 0,26 nmol/min/mg PHB (Abb. 25, A). Um sogar 100% erhöht die Protease die Säurebildung mit nPHB der Phasin-Mutante $\Delta phaP1$ (Abb. 25, B). Hier stieg die Rate von 4,5 nmol/min/mg PHB auf 9,2 nmol/min/mg PHB. Aus den Angaben geht zudem hervor, dass auch die normale Säurefreisetzung von nPHB der Phasin-Mutante mit 0,60 µmol / min schon deutlich über der Rate von Wildtyp-Granula liegt (0,15 µmol/min).



Titration 25 mg aPHB

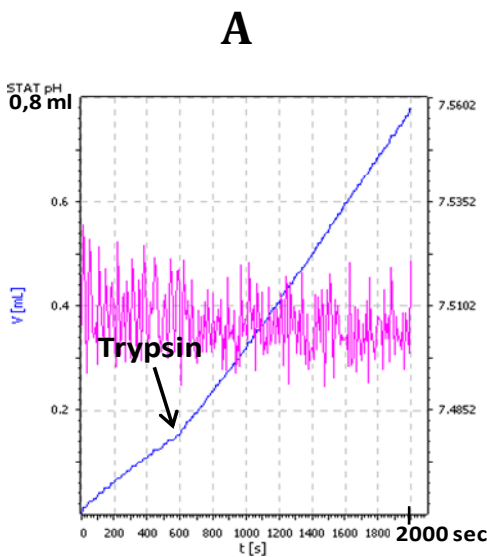
710 Sek: 62,5 µg Trypsin
1300 Sek: 1,5 µl PhaZ7



Titration 20 mg dPHB

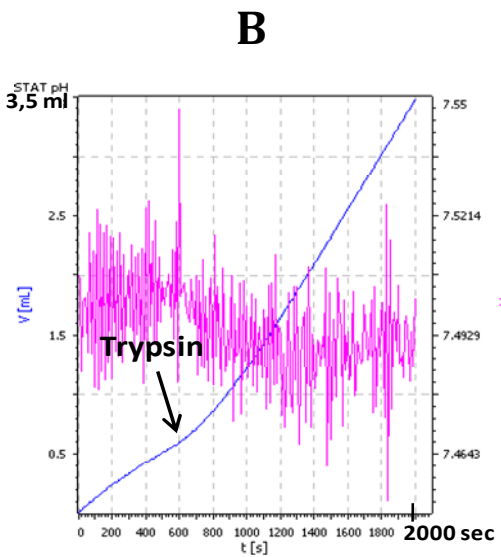
750 Sek: 62,5 µg Trypsin

Abb. 24 Test der Wirkung von Trypsin auf aPHB und dPHB im pH-Stat. Titration mit 10 mM NaOH bei 37°C und pH 8,5. Reaktionsansätze: 12,5 ml 1 mM Tris-HCl, pH 8,5 sowie 2,5 ml aPHB-Lösung (= 2,5 mg aPHB) (A) bzw. 2,5 ml dPHB-Lösung (in Wasser) (=20 mg dPHB) (B). Nach 710 Sekunden (aPHB) bzw. 750 Sekunden Zugabe von je 62,5 µg Trypsin. Zu Ansatz A außerdem nach 1300 Sekunden 1,5 µl PhaZ7 (3 mg/ml, isoliert von R. Handrick 08.05.2001) Gesamtvolumen: 16 ml (A), 15,65 ml (B).



R. eutropha Wt: Titration 103 mg nPHB

Nach 600 Sek: Zugabe 37,5 µg Trypsin
NaOH-Verbrauch nach 2000 Sek: 7,78 µmol
Rate 0 - 600 Sek: 1,5 nmol / min x mg PHB
Rate 600 - 2000 Sek: 2,6 nmol / min x mg PHB



R. eutropha ΔphaP1: Titration 134 mg nPHB

Nach 600 Sek: Zugabe 37,5 µg Trypsin
NaOH-Verbrauch nach 2000 Sek: 34,76 µmol
Rate 0 - 600 Sek: 4,5 nmol / min x mg PHB
Rate 600 - 2000 Sek: 9,2 nmol / min x mg PHB

Abb. 25 Test der Wirkung von Trypsin auf die Säurefreisetzung nativer PHB-Granula aus *R. eutropha* Wt (A) und der Phasinmutante ΔphaP1 (B) im pH-Stat. Titration mit 10 mM NaOH bei 37°C und pH 7,5. Reaktionsansätze: 10 ml 0,1 mM Tris-HCl, pH 7,5 sowie 500 mg Glycerinsuspension (=103 mg PHB für Wt (A), 134 mg PHB für ΔphaP1 (B)). Nach 600 Sekunden Zugabe von je 37,5 µg Trypsin (1,25 mg/ml). Gesamtvolumen: 11,3 ml (A), 14 ml (B)

Abbildung 26 zeigt den direkten graphischen Vergleich zwischen dem Titrationsverlauf der Kontrolle und dem Ansatz mit Trypsin. Daraus lässt sich gut der prozentual fast identische Anstieg der Säureproduktion durch Trypsin mit Granula aus *R. eutropha* Wt und der Phasin-Mutante *R. eutropha* Δ phaP1 erkennen. Mengenmäßig wurde mit nPHB der Mutante jedoch 4,5 Mal mehr Säure gebildet.

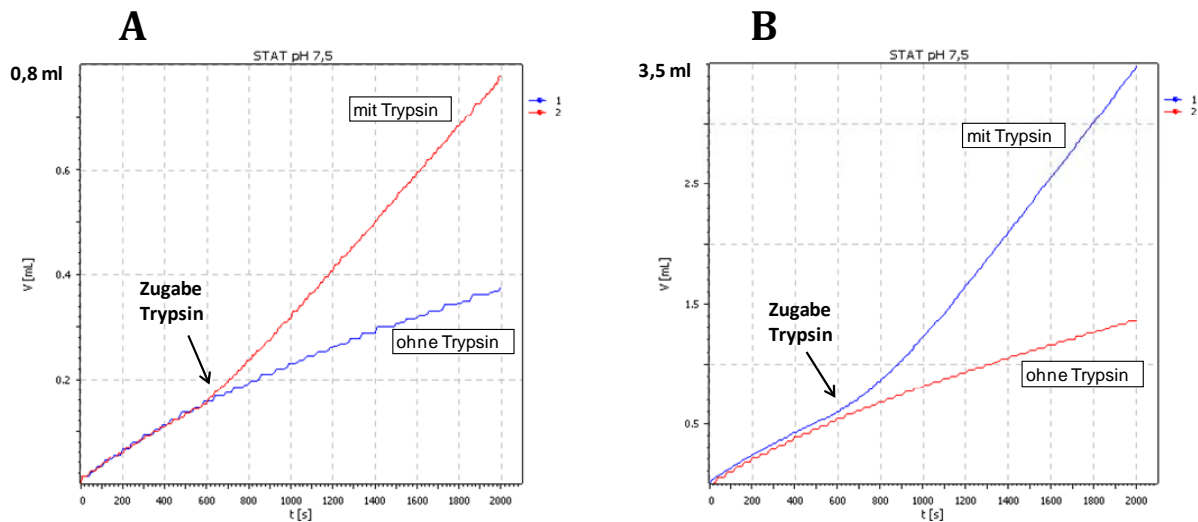


Abb. 26 Overlay pH-Stat-Titrationsen von nativen PHB-Granula (500 mg nPHB aus: *R. eutropha* Wt: A, Δ phaP1: B) mit und ohne Zugabe von 37,5 μ g Trypsin. Zugabe Trypsin nach 600 Sekunden. Inkubation bei 37°C in 0,1 mM Tris-HCl, pH 7,5. Titration mit 10 mM NaOH. Gesamtvolumen = 11,3 ml (A), 14 ml (B).

Wirkweise Trypsin

Die Beobachtung verschiedener Arbeitsgruppen, dass Trypsin die 3HB-Freisetzung nativer PHB-Granula fördern kann, wurde durch die oben aufgeführten Versuche noch einmal bestätigt (Handrick et al. 2004a, 2004b; Tseng et al., 2006) Der Anstieg der Säurebildung durch Trypsin konnte zudem durch den 3HB-Dehydrogenase-Assay (2.15.2) sowie die HPLC-Analyse (2.18) als 3HB-Bildung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Neu ist die durch nPHB der Phasinmutante gemachte Beobachtung, dass der Anstieg proportional zur vorherigen Rate zu verlaufen scheint. Wie das Enzym jedoch wirkt, wurde bisher nicht eindeutig geklärt.

Neue Informationen sollten Versuche mit einem Trypsininhibitor (Ovomucoid, Serva) liefern. Vier Titrationsansätze mit je 1g Glycerinsuspension (= 110 mg PHB) aus *R. eutropha* Wt wurden in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl bei pH 7,5 und 37°C über eine Stunde inkubiert (Abb. 25). Der erste Ansatz (Abb. 27-A) diente als Kontrolle ohne Trypsin, dem zweiten Ansatz (B) wurden nach 600 und 640 Sekunden jeweils 62,5 μ g Trypsin zugegeben. Zu den gleichen Zeitpunkten erhielt auch der dritte Ansatz (C) jeweils 62,5 μ g Trypsin, zusätzlich aber 20 Sekunden später ($t = 660$ sec) die fünffache Menge (625 μ g) Trypsininhibitor. Dem vierten und letzten Ansatz (D) wurden nach 600 Sekunden 62,5 μ g Trypsin mit 625 μ g Inhibitor zugefügt. Die beiden Substanzen waren zuvor gemeinsam zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden.

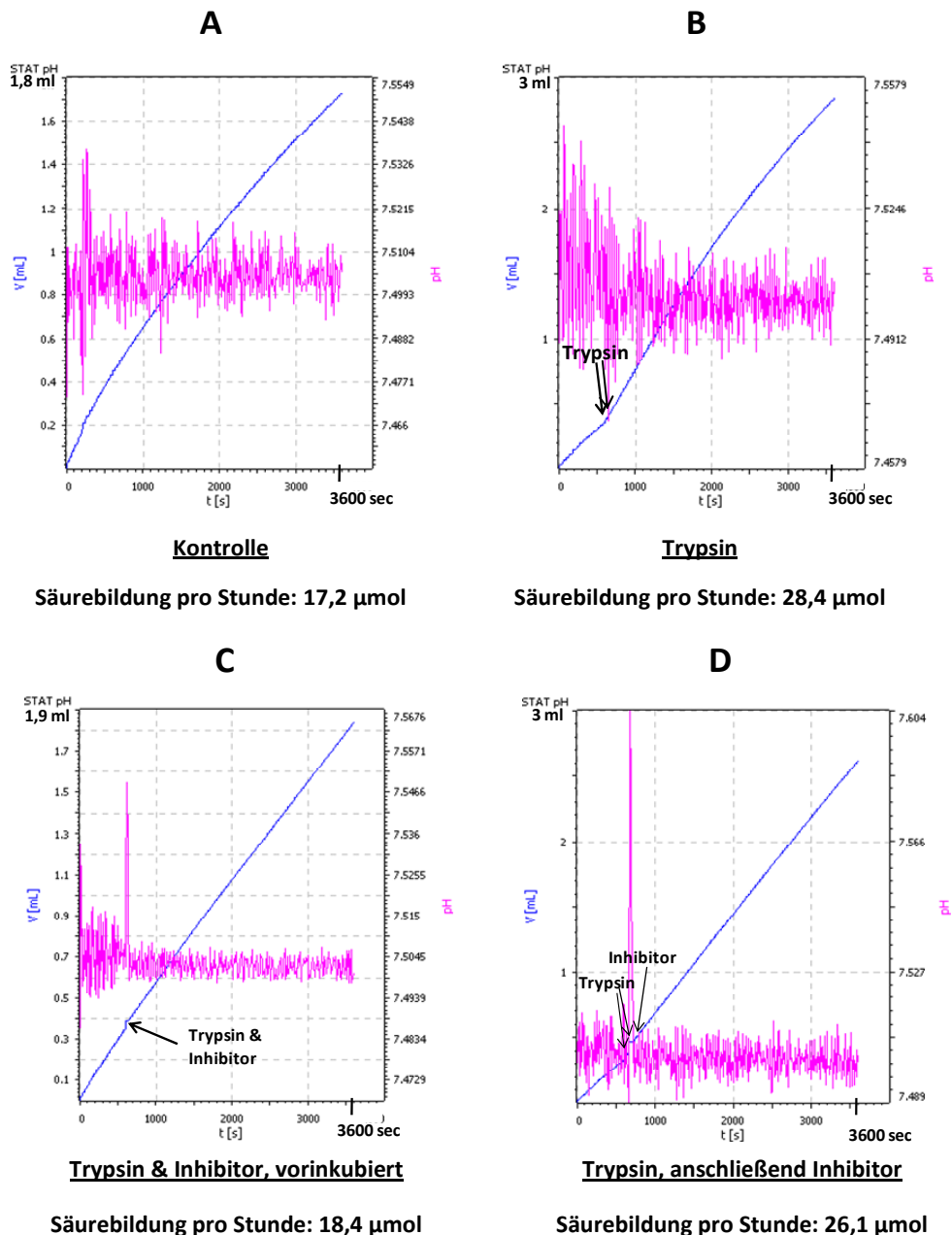


Abb. 27 Untersuchung der Wirkweise von Trypsin auf nPHB: pH-Stat-Titrations mit je 1 g nPHB (= 110 mg PHB) aus *R. eutropha* Wt in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 37°C. **A:** Kontrollansatz ohne Trypsin. **B:** Zugabe je 62,5 μg Trypsin nach 600 und 640 Sekunden. **C:** Zugabe von 62,5 μg Trypsin und 625 μg Trypsininhibitor (Ovomucoid, Firma) nach 600 Sekunden. Trypsin und Inhibitor zuvor 10 Minuten bei RT gemeinsam inkubiert. **D:** Zugabe je 62,5 μg Trypsin nach 600 und 640 Sekunden. Nach 660 Sekunden Zugabe von 625 μg Trypsininhibitor. Gesamtvolumen: 15 ml (A), 15 ml (B), 12,9 ml (C), 14 ml (D).

Die Diagramme B und D (Abb. 27) belegen erneut die hydrolysefördernde Wirkung von Trypsin (125 μg / 110 mg PHB). Dieser Effekt wird nur dann verhindert, wenn die Protease bereits vor Zugabe zum Ansatz mit einem Überschuss an Trypsininhibitor inkubiert wurde (Abb. 27, C). Denn selbst wenn der Zusatz des Inhibitors nur 40 Sekunden nach dem von Trypsin erfolgt (Abb. 27, D), steigt die Säurefreisetzung. Und dies geschieht fast mit der gleichen Rate, als wäre kein Hemmstoff zugegeben worden (26,1 $\mu\text{mol/h}$ bzw. 28,4 $\mu\text{mol/h}$ ohne Inhibitor).

Um sicherzugehen, dass sich hinter der per pH-Stat gemessenen Säurefreisetzung vorwiegend 3HB verbirgt, wurden alle vier Ansätze per 3HB-Dehydrogenase-Test darauf getestet. In Abbildung 28 ist die Absorptionzunahme durch die 3HB-abhängige Reduktion von NAD zu NADH gezeigt. Um im linearen Messbereich ($\Delta \text{Abs} < 0,1$) zu liegen, wurden alle Proben 1 zu 5 mit Wasser verdünnt. Entsprechend der Ergebnisse der pH-Stat-Titrationsen enthielten der Ansatz mit Trypsin sowie mit Trypsin und nachträglicher Zugabe des Inhibitors deutlich mehr 3HB als die Kontrolle und der Versuch mit vorinkubiertem Trypsin und Inhibitor. Tabelle 17 liefert die genauen Zahlen des 3HB-Dehydrogenase-Testes.

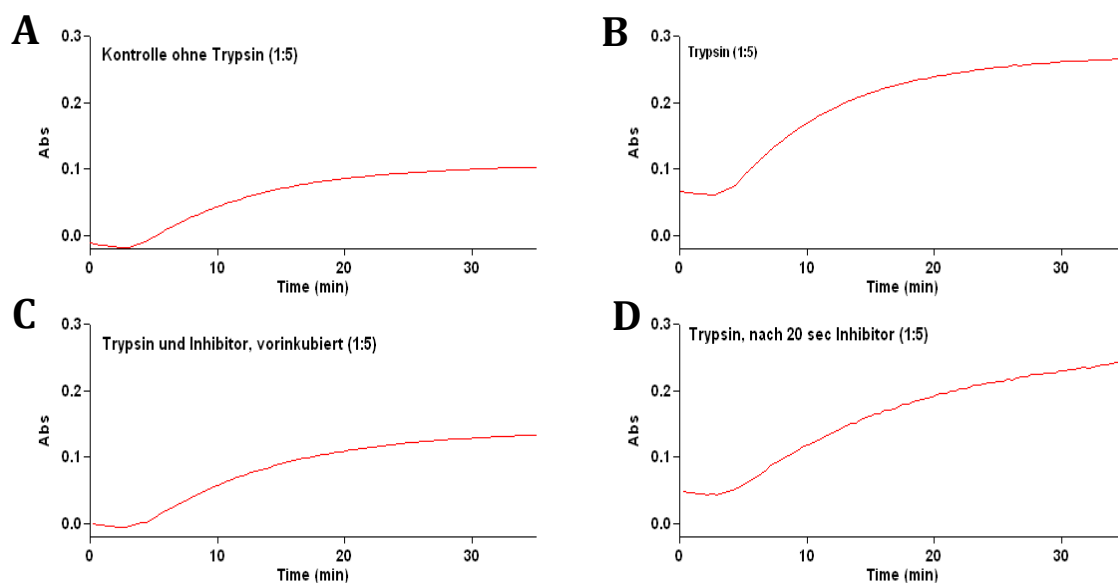


Abb. 28 Auswertung der pH-Stat-Titrationsversuche zur Wirkweise von Trypsin (siehe Abb. 25). Bestimmung der in einer Stunde freigesetzten 3HB-Menge (110 mg PHB aus *R. eutropha* Wt) anhand des 3HB-Dehydrogenase-Tests (2.15.2). Probevolumen: 20 μl Titrationsüberstand und 80 μl H_2O , dest. Photometrische Bestimmung der 3HB-abhängigen NADH-Bildung bei 340 nm.

Tab. 17 Photometrische Bestimmung der 3HB-abhängigen NADH-Bildung durch 3HB-Dehydrogenasetest zur Bestimmung der 3HB-Konzentration der pH-Stat-Versuche aus Abb. 25. Absorption (Abs) bei 340 nm durch NADH kurz vor Zugabe der 3HB-Dehydrogenase (3 Minuten) sowie am Ende der enzymatischen Bestimmung (35 Minuten). Daraus Berechnung der Konzentration an 3HB in den Titrationsansätzen.

	Abs (3 min)	Abs (35 min)	ΔAbs (35–3 min)	$\mu\text{mol 3HB}$ / Ansatz	c (3HB)
Kontrolle	-0,018	0,103	0,121	14	1 mM
Trypsin	0,063	0,266	0,203	23	1,7 mM
Trypsin & Inhibitor, inkub.	-0,005	0,133	0,138	16	1,1 mM
Trypsin, danach Inhibitor	0,043	0,243	0,200	23	1,6 mM

Einfluss der Kulturbedingungen auf die Trypsin-Wirkung

Die nativen Granula für die ersten Versuche mit Trypsin stammen aus 36-stündigen Kulturen in Mineralmedium (MM) mit 2 % Glukonat (2.2.2). Im Zusammenhang mit dem Vergleich von nPHB aus MM und NB-Kultur, wurde die Wirkung von Trypsin auf Granula aus NB-Medium untersucht. Dazu wurden die Granula jedoch bereits nach 17 Stunden Kultivierung bei 30°C geerntet, denn auf NB baut sich nPHB schnell auf und innerhalb von wenigen Stunden wieder restlos ab (siehe auch Kapitel 3.8). Dieses Phänomen ist noch nicht aufgeklärt. Einen Ansatz dazu liefern Versuche zum Einfluss der Ammonium- und Stickstoffkonzentration im Medium (3.8.1). Um einen genauen Vergleich zwischen MM- und NB-Bedingungen ziehen zu können, wurden auch Zellen einer MM-Kultur bereits nach 17 Stunden Wachstum bei 30°C geerntet und die Granula isoliert. Die Abbildungen 29 und 30 zeigen jeweils den Vergleich der Hydrolyse nativer Granula aus *R. eutropha* Wt ohne (A) und mit (B) Zugabe von Trypsin. Dabei handelt es sich im Versuchsansatz von Abbildung 29 um nPHB aus einer 17-Stunden MM-Kultur (mit 2% NaGlukonat) und von Abbildung 30 um nPHB aus einer 17-Stunden NB-Kultur.

nPHB *R. eutropha* Wt aus:
17 h - MM-Kultur

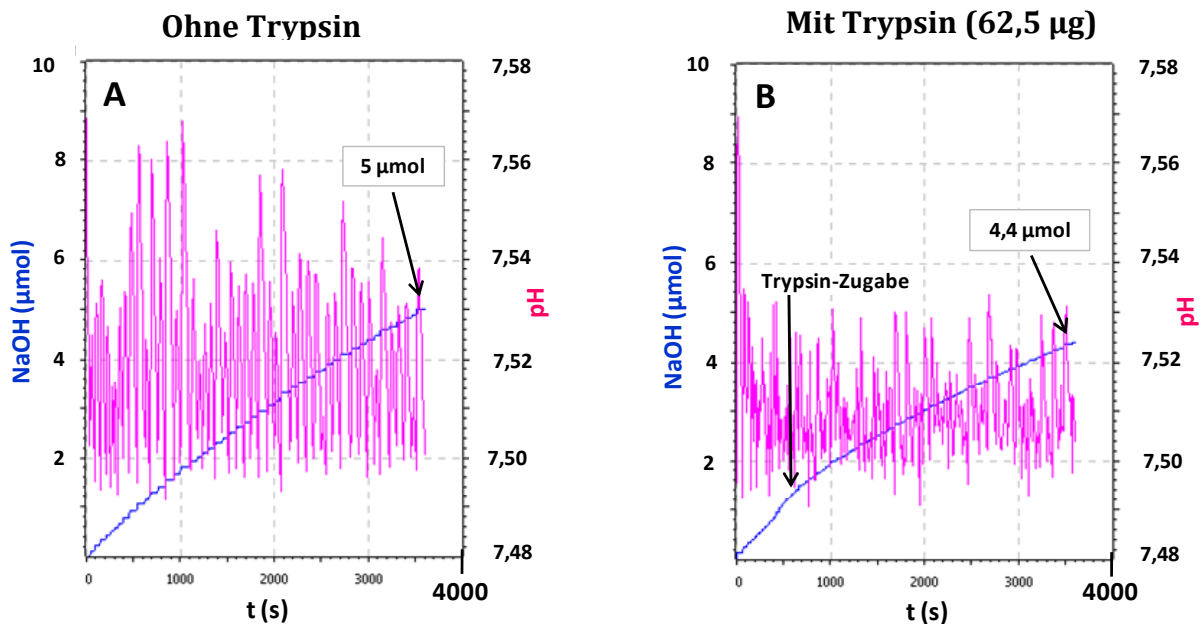


Abb. 29 Vergleich im pH-Statens: Säurefreisetzung nPHB aus 17-stündiger *R. eutropha* Wt-Kultur (MM) ohne Trypsin (A) bzw. nach 600 Sekunden Zugabe 62,5 µg Trypsin = 0,26 µM (B). Titration mit 10 mM NaOH. Titrationsansatz: je 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, 37°C und 0,5 g nPHB (*R. eutropha* Wt = 23 mg gewaschenes PHB). Gesamtvolumen: 10 ml

Der Vergleich zeigt deutlich: Trypsin bewirkt hier keinen Anstieg der Säurefreisetzung. Es scheint diese hingegen sogar eher zu hemmen. Statt 5 µmol NaOH waren im Ansatz mit Trypsin nur 4,4 µmol NaOH nötig, um den Soll-pH bei pH 7,5 zu halten. Im Unterschied zu dieser hemmenden Trypsinwirkung auf nPHB einer 17-stündigen MM-Kultur, fördert die Protease die Säurefreisetzung bei nPHB einer 36-stündigen MM-Kultur signifikant. Dies konnte bereits anhand der Abbildungen 25 und 26 gezeigt werden. Und auch auf native Granula einer 17-stündigen *R. eutropha* Wt-Kultur in NB-Medium haben 0,26 µM Trypsin keine fördernde, sondern sogar eine schwach hemmende Wirkung (Abb. 30). Alle Versuchsergebnisse wurden mehrfach reproduziert.

nPHB *R. eutropha* Wt aus:
17 h - NB-Kultur

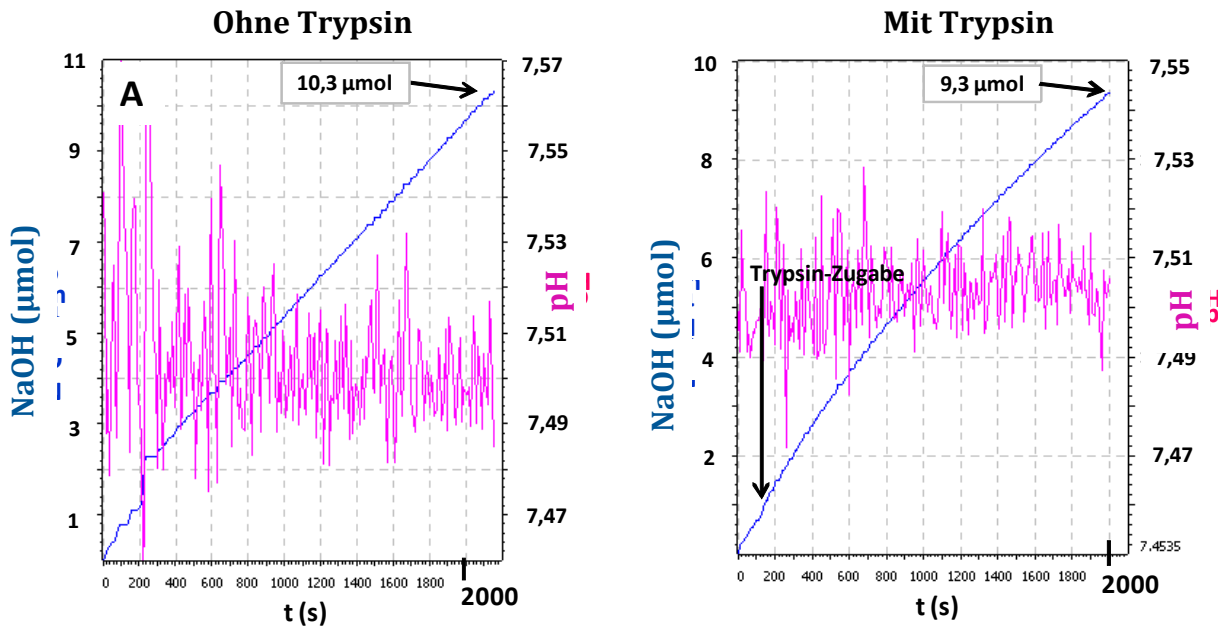


Abb. 30 Vergleich im pH-Stat: Säurefreisetzung nPHB aus 17-stündiger *R. eutropha* Wt-Kultur (NB) ohne Trypsin (A) bzw. nach 120 Sekunden Zugabe 62,5 µg Trypsin (B). Titration mit 10 mM NaOH. Titrationsansatz: je 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, 37°C und 2 g nPHB (*R. eutropha* Wt = 16,4 mg gewaschenes PHB). Gesamtvolumen: 10 ml

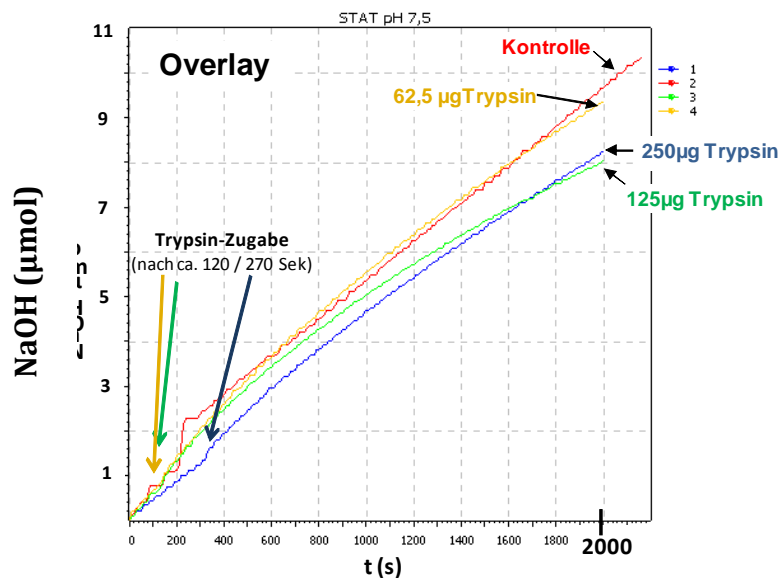


Abb. 31 Overlay vier pH-Stat-Kurven: Titration von nPHB aus *R. eutropha* Wt, isoliert nach 17-stündigem Wachstum auf NB-Medium. Ansatz OHNE Trypsin (Kontrolle: rot) / Zugabe von 62,5 µg Trypsin (nach 120 Sek: gelb) / von 125 µg Trypsin (nach 120 Sek: grün) / von 250 µg Trypsin (nach 270 Sek: blau). Titration mit 10 mM NaOH. Titrationsansatz: je 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer, bei pH 7,5, 37°C und 2 g nPHB (=16,4 mg gewaschenes PHB). Ansatzvolumen: je 10 ml.

Auch hier bleibt der hydrolyse-fördernde Effekt von Trypsin aus, der bei Granula aus 36-stündiger MM-Kultur (*R. eutropha* Wt) so signifikant zu erkennen ist (Abb. 25). Um sicherzugehen, dass die Menge von 62,5 µg Trypsin auf 2 g Glycerinsuspension (=16,4 mg PHB gewaschen) nicht zu

gering für eine erkennbare Wirkung ist, wurde der Versuch mit der Zugabe von 125 µg und 250 µg Trypsin wiederholt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 31. Während die Säurefreisetzung der nativen PHB-Granula durch 62,5 µg Trypsin nicht signifikant verändert wird, sinkt sie durch die Zugabe von 125 µg oder 250 µg deutlich. Dabei fällt auf, dass dieser Effekt gerade bei 125 µg Trypsin erst rund 10 Minuten (600 Sek) nach Zugabe der Protease einsetzt.

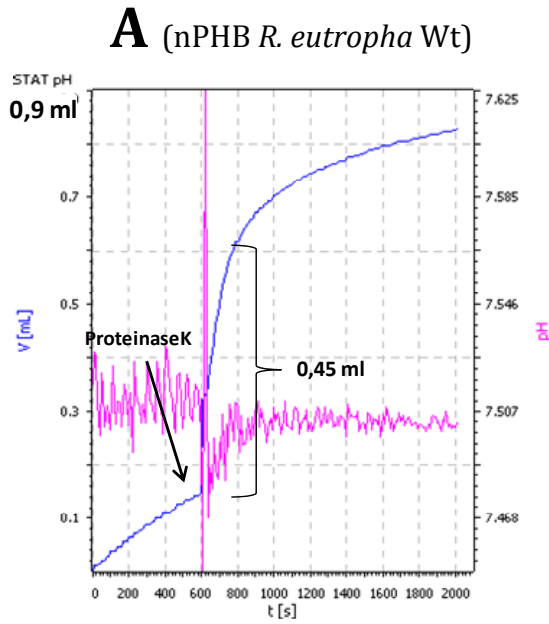
ProteinaseK

Durch den Vergleich mit ProteinaseK sollte untersucht werden, wie spezifisch die Hydrolyse der nativen PHB-Granula auf Proteasen reagiert. Der Reaktionsansatz bestand bei 37°C aus 10 ml 0,1 mM Tris-HCl, pH 7,5 sowie 500 mg Granulasuspension (103 mg PHB), isoliert aus *R. eutropha* Wt (36 h-Kultur). Nach Zugabe des Enzyms (600 Sekunden) stieg die Titrationsrate zunächst sehr steil an, um anschließend wieder abzuflachen und lag mit 1,1 nmol/min x mg PHB unter der Anfangsrate (1,5 nmol/min x mg PHB)(Abb. 32 A).

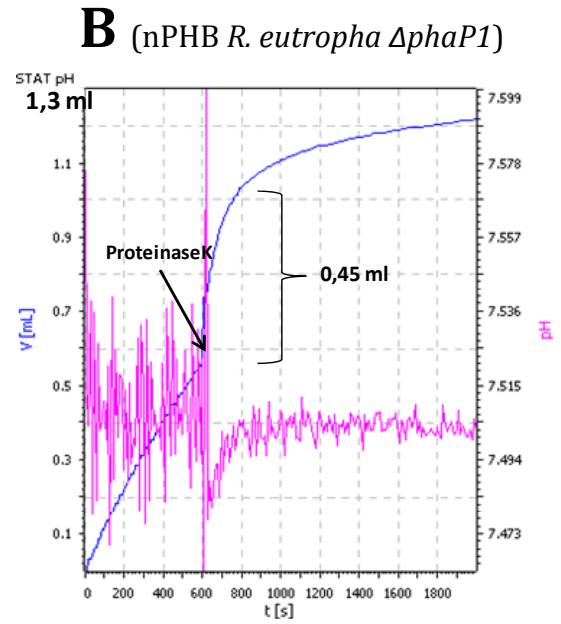
Einen ähnlichen Verlauf ergibt die Zugabe des Enzyms zur Titration von nPHB der Phasin-Mutante *R. eutropha* ΔphaP1 (Abb. 32 B). Wie die ersten zehn Minuten zeigen, ist die generelle Säurefreisetzung der Mutante pro mg PHB deutlich höher als beim Wildtyp. Nach Zugabe des Enzyms steigt die Kurve der NaOH-Titration rasch an, um wenige Minuten später deutlich abzuflachen. Vor Zugabe von ProteinaseK betrug die Säurefreisetzungsrates 4,2 nmol/min x mg PHB. Danach kommt sie fast ganz zum Erliegen, nur noch 0,7 nmol NaOH pro Minute und mg PHB werden zutitriert.

Laut 3HB-Dehydrogenase-Test entstehen insgesamt im Ansatz mit Wt-Granula nur rund 70% des 3HB-Gehaltes der Kontrolle (1,82 µmol/ 2,6 µmol (Kontrolle)). nPHB aus *R. eutropha* ΔphaP1 reagiert auf ProteinaseK sogar mit einem Rückgang der 3HB-Bildung um knapp 50% (6,52 µmol / 12,36 µmol (Kontrolle)). Für die Analyse des 3HB-Gehaltes ist wichtig zu beachten, dass ProteinaseK in der vorliegenden Konzentration die Reaktion der Dehydrogenase (DH) des 3HB-DH-Tests hemmt. Anhand von Tests mit 3HB-Standard wurde festgestellt, dass jedoch eine Inkubation der Proben für 15 Minuten bei 70°C im Heizblock ausreicht, um ProteinaseK zu inaktivieren.

Die hohen Werte der pH-Stat-Titration und die der enzymatischen 3HB-Bestimmung stimmen nicht überein. Hauptgrund ist der pH-Abfall durch die Zugabe der sauren ProteinaseK-Lösung nach 600 Sekunden, der durch Titration mit 10 mM NaOH sofort neutralisiert wird. Daher wird in diesem Abschnitt (siehe Klammern in Abb. 32) in beiden Reaktionen das gleiche Volumen (0,45 ml) titriert. Die beiden Overlay-Graphiken (Abb. 33) zeigen gut, wie die Rate nach dem vermeintlichen Anstieg der Säurefreisetzung bei Wt-Granula leicht, bei nPHB der Phasin-Mutane deutlich sinkt. Klammert man den Bereich von der Zugabe der Protease bis zur Wiederherstellung des Soll-Wertes von pH 7,5 aus, stimmen die Ergebnisse von Titration und 3HB-DH-Test überein: ProteinaseK hemmt die Hydrolyse von nPHB.



Rate 0 - 600 Sek: 1,5 nmol / min x mg PHB
 Rate 1000 - 1300 Sek: 1,1 nmol / min x mg PHB



Rate 0 - 600 Sek: 4,2 nmol / min x mg PHB
 Rate 1000 - 1300 Sek: 0,7 nmol / min x mg PHB

Abb. 32 Untersuchung der Wirkweise von ProteinaseK auf nPHB: pH-Stat-Titrations mit je 500 mg nPHB aus *R. eutropha* Wt (A) (= 103 mg PHB) bzw. *R. eutropha* Δ phaP1 (= 134 mg) (B) in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 37°C. Nach 600 Sekunden Zugabe von je 1 mg ProteinaseK. Nach 2000 Sekunden Stopp der Titration, Ultrazentrifugation des Ansatzes und Analyse des Überstandes auf 3HB. Linke Y-Achse (Blau): Verbrauch 10 mM NaOH. Rechte Y-Achse (Rosa): pH-Verlauf (Soll-pH: pH 7,5). Gesamtvolumen: je 10,95 ml bzw. 11,35 ml

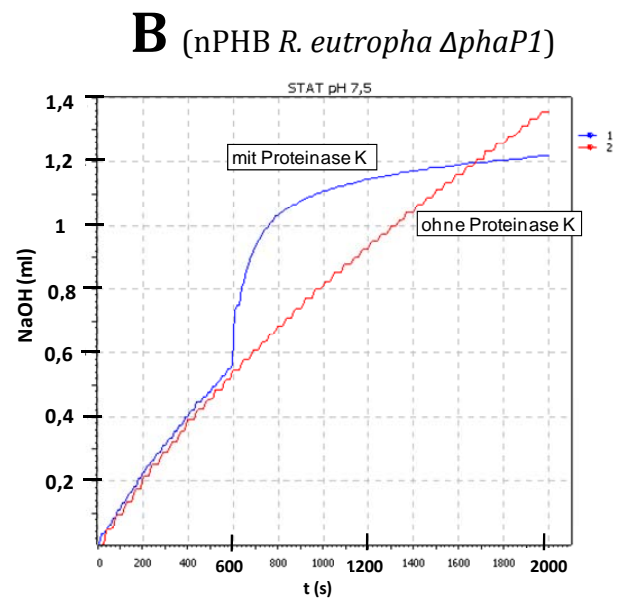
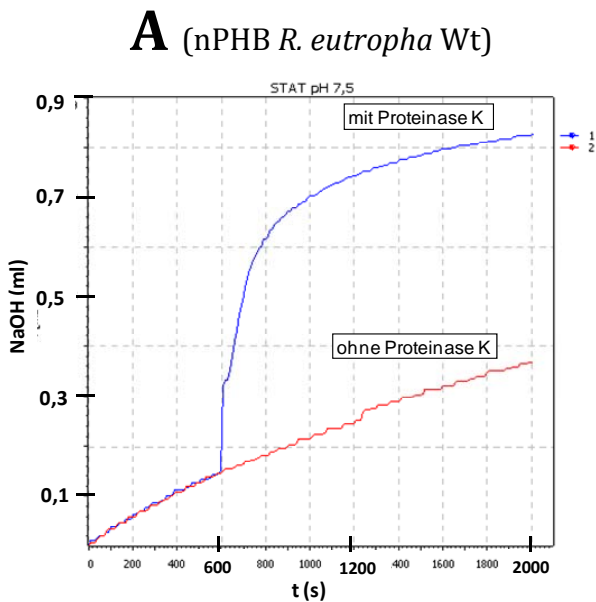


Abb. 33 Graphisches Overlay der Titrationskurven von 500 mg nPHB mit (blau) bzw. ohne (rot) Zugabe von 1 mg ProteinaseK (nach 600 Sekunden). nPHB isoliert aus *R. eutropha* Wt (A) (= 103 mg PHB) bzw. *R. eutropha* Δ phaP1 (= 134 mg) (B). Titration im pH-Stat in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 37°C. Gesamtvolumen: 10,95 ml bzw. 11,45 ml

Allerdings wurden für die Versuche mit ProteinaseK (10 µg/mg PHB) 16-mal mehr Enzym zugegeben als bei den Versuchen mit Trypsin (0,63 µg/mg PHB). Zudem ist nach Angaben der Herstellerfirma Merck ProteinaseK pro mg dreimal aktiver als Trypsin, gemessen an der Hydrolyse von Hämoglobin als Standardsubstrat. Daher folgte ein weiterer Versuch mit weniger Enzym (Abb. 34): 0,9 µg Proteinase K /mg PHB (*R. eutropha ΔphaP1*) bzw. 1,9 µg Proteinase K /mg PHB (*R. eutropha* Wt).

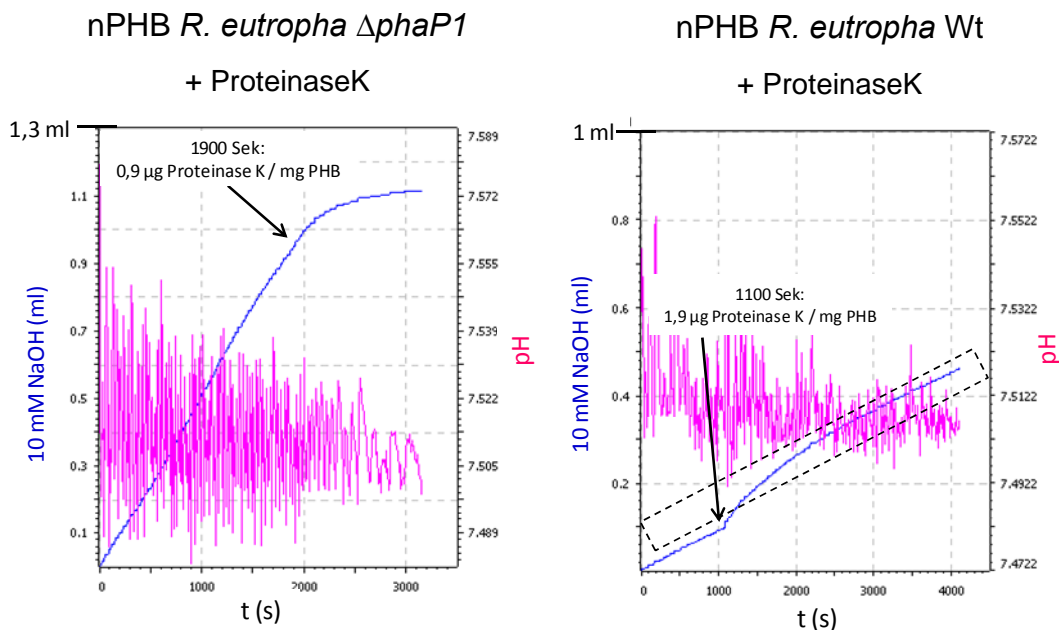


Abb. 34 Test im pH-Staten: Einfluss Proteinase K auf Säurefreisetzung von nPHB (ungew.) aus *R. eutropha ΔphaP1* und Wt. 10 ml 0,1mM Tris-HCl, pH 7,5, 37°C, 45 mg PHB (Δ phaP1) bzw. 21 mg PHB (Wt). Titration mit 10mM NaOH. Nach 1100 Sek. (Wt) bzw. 1900 Sek (Δ phaP1) Zugabe 2 µl Proteinase K (20µg/µl).

Während die Hydrolysereaktion mit nPHB aus *R. eutropha ΔphaP1* innerhalb von wenigen Minuten durch Proteinase K sichtbar gehemmt wird, steigt die Säurefreisetzung bei Granula des Wildtypen zunächst leicht an. Nach rund 15 Minuten kehrt sie jedoch zur ursprünglichen Rate zurück (siehe Parallelogramm in Abb. 34).

Während der Probenaufbereitung tauchte immer wieder ein signifikanter Unterschied zwischen PHB der Wt-Zellen und PHB der Phasin-Mutante auf: nach Inkubation der Granula im pH-Stat und Abzentrifugieren in der Ultrazentrifuge (2.9) zeigte sich das Pellet der Wt-Granula klebrig, das Pellet der Phasin-Mutante hingegen war sehr fest und ließ sich an einem Stück vom Boden des Zentrifugenröhrchens ablösen. Proben aus Proteinase-Versuche ergaben nach Zentrifugation für Wt-Granula einen breiten Schmier, im Fall der Phasin-Mutante war der Streifen sehr viel schmalere.

Detergentien (SDS, CTAB und Triton X-100)

SDS

Hinter den Versuchen mit SDS (Sodiumdodecylsulfat) und nativem PHB stand unter anderem die Frage, ob das Detergenz Proteine von der Granuloberfläche ablösen kann und dadurch die Hydrolyseaktivität verändert. 1ml 1 % SDS wurde dazu nach 600 Sekunden in einen Titrationsansatz (10 ml) mit je 100 mg PHB aus *R. eutropha* Wt bzw. parallel aus *R. eutropha* Δ phaP1 pipettiert (Abb. 35). Daraus resultierte eine Endkonzentration von 0,09 % SDS. Die nativen Granula wurden inkubiert in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl bei einem pH von 7,5 und 37°C. Zur Titration wurde 10 mM NaOH-Lösung benutzt.

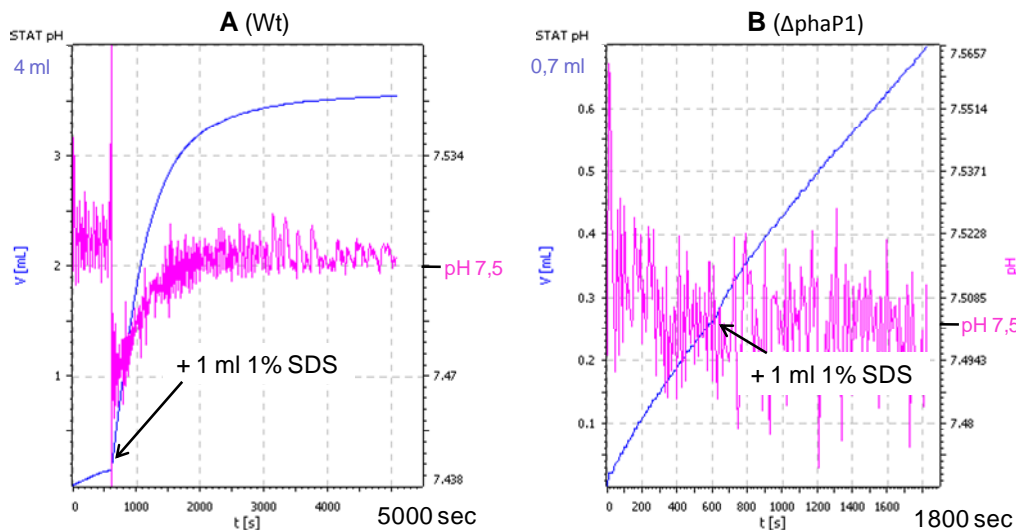


Abb. 35 pH-Stat-Titration von nativen PHB-Granula aus *R. eutropha* Wt (A) und parallel *R. eutropha* Δ phaP, jeweils isoliert aus einer 36 h-Kultur. Titration in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,5 und 37°C (842 Titrand, Metrohm). Einsatz von je 100 mg reinem PHB, entspricht für Wt 1,2 g PHB-Glycerinsuspension, für Δ phaP1 520 mg. Titration mit 10 mM NaOH. Nach 600 Sek. Zugabe von 0,1 % SDS zu beiden Reaktionsansätzen. Gesamtvolumen: 15,7 ml (A), 12,2 ml (B).

Nach Zugabe des Detergenz zu den Granula des Wildtypen sank der pH-Wert des Ansatzes sofort von 7,5 auf 7,4. Innerhalb von 13 Minuten erreichte er durch Titration mit 10 mM NaOH wieder den Ursprungswert. Die Säurefreisetzungsrates des nativen PHB ist anschließend sichtbar niedriger geworden. Ganz anders sieht die Reaktion nativer Granula der Phasin-Mutante aus. SDS ändert weder am pH-Wert noch an der Aktivität des nPHB etwas.

Um diesen überraschenden Unterschied näher zu untersuchen, wurde im pH-Stat die Wirkung von 0,1 % SDS auf 1 mM Tris-HCl-Puffer getestet (Abb. 36). Zu beachten ist, dass in diesen beiden Versuchen der Soll-pH nicht wie in Abbildung 35 bei pH 7,5 sondern pH 8,5 liegt. Nachdem für knapp fünf Minuten die Ansäuerungsrate von 12 ml Puffer bei 37°C gemessen worden war, kamen 2 ml 1% SDS hinzu. Nach einer halben Stunde Messung, in der nur ein geringer Anstieg der Rate festgestellt wurde, folgte die Zugabe von 1 g Glycerinsuspension nativer PHB-Granula aus *R. eutropha* Wt (= 135 mg PHB). Parallel wurde der Versuch in zeitlich umgekehrter Reihenfolge durchgeführt: zu 12 ml 1 mM Tris-HCl-Puffer wurde zunächst 1 g Granulasuspension zugegeben und das SDS erst nach einer halben Stunde. Der Effekt war in beiden Fällen gleich: ohne nPHB löst SDS keine erhöhte NaOH-Titration aus und ohne SDS liegt die Säurefreisetzung der Granula im gewohnt niedrigen Bereich. Erst die Kombination der beiden Komponenten lässt den Verbrauch an 10 mM NaOH hochschnellen, was auf eine entsprechend stark gestiegene Säurebildung im Ansatz

schließen lässt. Die Titrationsrate bleibt auch dann fast 20 Mal größer als vor der Zugabe von SDS, nachdem sich der Soll-pH von 8,5 wieder eingestellt hat.

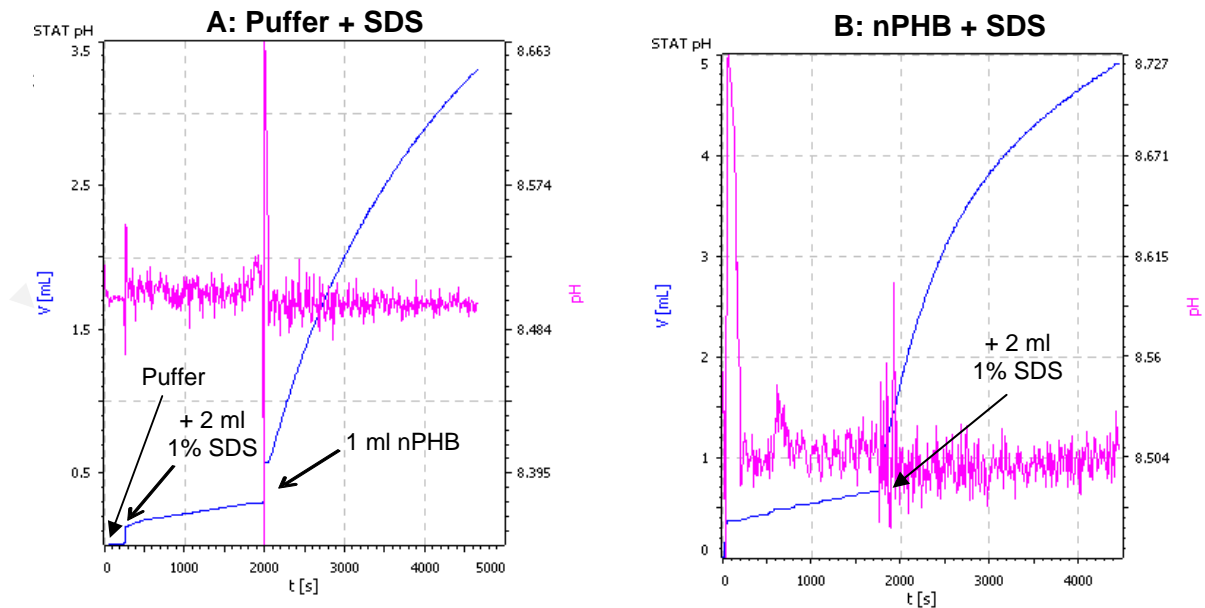


Abb. 36 Test Einfluss SDS auf pH-Stat-Titration (mit 10 mM NaOH, 842 Titrand, Metrohm). A = Kontrolle: Puffer und SDS. Nach 260 Sekunden Zugabe von 2 ml 1% SDS (in 1 mM Tris-HCl) zu 12 ml 1 mM Tris-HCl, pH 8,5 bei 37°C. Nach insgesamt 2000 Sekunden Zugabe 1 ml Glycerinsuspension von nativen PHB-Granula aus *R. eutropha* Wt (ca. 135 mg PHB) B = nPHB und SDS. Von Anfang an 12 ml 1mM Tris-HCl, pH 8,5 und 1 ml Glycerinsuspension (nPHB, *R. eutropha* Wt) im Reaktionsansatz. Nach 1800 Sekunden Zugabe von 2 ml 1% SDS.

Die Untersuchung von nativen Granula aus anderen Organismen zeigt jedoch, dass es sich hierbei um eine Ausnahme zu handeln scheint (Tabelle 18). Wie bereits in Abbildung 35 für nPHB der Phasin-Mutante gesehen, reagieren auch Granula aus rekombinanten *E. coli phaCAB* (*E. coli HMS 174* mit *pJM9238*, SK 1328) nicht auf die Zugabe von SDS (o. Abb.). Auch mit nPHB aus *R. eutropha* Wt, die für 17 h auf MM-Medium kultiviert wurden, verändert sich durch das Detergenz nichts. Granula aus *R. eutropha*-Wt-Zellen nach 17 h Wachstum auf NB zeigen allerdings einen leichten Anstieg der Titrationskurve mit 0,025% SDS (o. Abb.).

Tab. 18 Überblick: Veränderung der Säurefreisetzung nativer PHB-Granula im Titrationsansatz (pH-Stat) durch Zugabe von SDS (Endkonzentration 0,1 %, tw. 0,025 %)

	SDS erhöht Säurefreisetzung	Keine Reaktion auf SDS
<i>R. eutropha</i> Wt (36 h, MM)	+	-
<i>R. eutropha</i> Wt (17 h, MM)	-	+
<i>R. eutropha</i> Wt (17 h, NB) (mit 0,025 % SDS)	+/-	
<i>R. eutropha</i> $\Delta phaP1$ (36 h, MM)	-	+
<i>E. coli phaCAB</i> (mit 0,025 % SDS)	-	+

In einem Hydrolyseansatz mit isoliertem PHB als einzigem Substrat müsste das Hauptprodukt 3HB sein und damit hauptverantwortlich für den Anstieg des NaOH-Verbrauches. Ob und wie viel 3HB wirklich durch die Zugabe von SDS zu diversen Titrationsansätzen entstanden ist, sollten der 3HB-DH-Test (2.15.2) und zusätzlich die HPLC-Analyse (2.18) zeigen.

Mit Hilfe von 3HB-Standard wurde zunächst getestet, ob der 3HB-DH-Test auch mit SDS (Endkonzentration 0,01%) aus den Titrationsproben funktioniert. Dabei kam heraus, dass das Detergenz in dieser Konzentration die Messungen nicht beeinflusst (o. Abb.). Daraufhin wurden zweimal (n=2) pH-Stat-Titrationsen mit nativem PHB aus *R. eutropha* Wt (NB-Kultur) jeweils parallel mit und ohne SDS durchgeführt (Abb. 37).

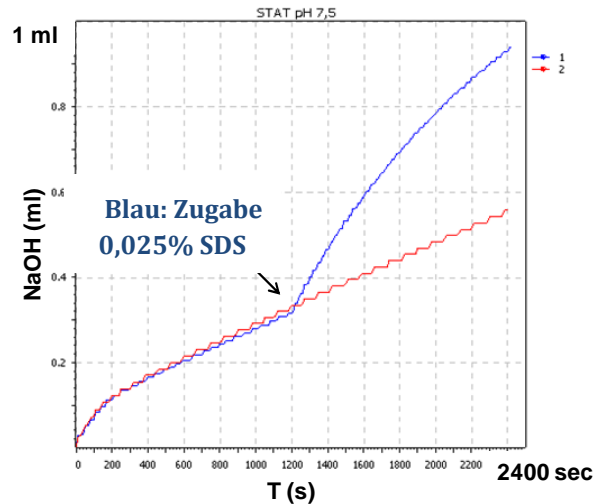


Abb. 37 Overlay: Parallele Titration von nativen PHB-Granula ohne und mit SDS-Zugabe im pH-Staten (842 Titrando, Metrohm, Herisau). Einsatz von je 23 mg PHB (= 400 mg Granulasuspension) aus *R. eutropha* Wt aus NB-Kultur in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5 bei 37°C). Rot: Kontrollansatz, ohne Zugabe von SDS. Blau: nach 20 Minuten Zugabe von 250 µl 1% SDS.

Der 3HB-Gehalt wurde enzymatisch bestimmt und die Ergebnisse mit der Säurefreisetzung laut pH-Stat verglichen (Tab. 19).

Tab. 19 Titration nPHB aus *R. eutropha* Wt (34 mg, aus NB-Kultur) mit und ohne Zugabe von SDS (siehe Abb. 34): Vergleich Säurefreisetzung im pH-Staten und 3HB-Nachweis per 3HB-Dehydrogenase-Test

pH-Stat Mittelwert (n=2)	3HB-DH-Test Mittelwert (n=2)
Kontrolle	
5,8 µmol (+/- 0,3)	4,3 µmol (+/- 0,3)
Mit SDS	
10,2 µmol (+/- 0,8)	4,1 µmol (+/- 0,6)

Die Werte des Enzymtests zeigen deutlich, dass SDS keinen Einfluss auf die Bildung von 3HB hat. Die 3HB-Konzentration des Kontrollansatzes entspricht ungefähr der des Ansatzes mit SDS. Die Werte der pH-Stat-Titration zeigen hingegen große Unterschiede. Im Vergleich mit der Kontrolle musste im Ansatz mit SDS fast doppelt so viel NaOH titriert werden, um den pH-Wert konstant zu halten. Durch die Zugabe von SDS entstand also sehr viel mehr Säure als ohne. Um welche Substanz es sich hierbei handelt, konnte nicht festgestellt werden.

Im Anschluss wurde der Versuch unter sonst gleichen Bedingungen mit zwei weiteren Detergentien durchgeführt. Bei SDS handelt es sich um eine anionische Substanz. Es sollte daher getestet werden, ob die Ladung des Detergenz die Hydrolysereaktion der Granula bzw. die pH-Stat-Messung beeinflusst. Dazu wurde zu einem Ansatz 1ml 10 mM CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid), eine kationische Verbindung, gegeben und zu einem zweiten 1ml 1% Triton X-100, ein nichtionisches Detergenz:

CTAB und Triton X-100

Im Gegensatz zu SDS reagieren die Versuchsansätze mit nativem PHB sowohl auf CTAB als auch auf Triton X-100 mit sinkender Säurefreisetzung. Im Vergleich hemmt CTAB etwas stärker als Triton X-100 und die Granula der $\Delta phaP1$ -Mutante reagieren empfindlicher auf die Detergentien (Abb. 38). Während der Ansatz mit nPHB aus *R. eutropha* Wt nach Zugabe der Reagenzien noch eine signifikante Säurebildung aufweist, stoppt sie mit nPHB der Phasin-Mutante fast komplett.

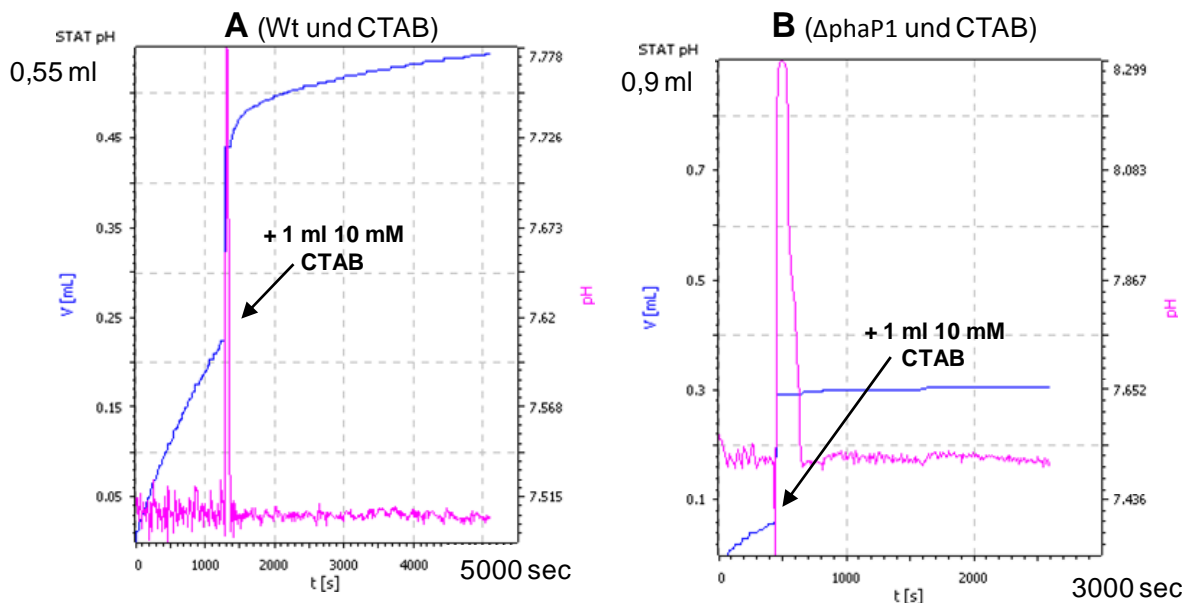


Abb. 38 Titration von 100 mg PHB (= 1,2 g Granulasuspension) aus *R. eutropha* Wt (A) bzw. 100 mg PHB (= 450 μ l Granulasuspension) *R. eutropha* $\Delta phaP1$ (B) in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,5 und 37°C. Titration im pH-Staten (842 Titrando, Metrohm, Herisau) mit 10 mM NaOH. Nach 1300 Sekunden (A) bzw. 440 Sekunden (B) Zugabe von je 1 ml 10 mM CTAB.

Es ist überraschend, dass im Fall von nPHB des Wildtyps NaOH (blau) zum Ansatz titriert wird, obwohl der pH-Wert (rosa) nach Zugabe von CTAB nicht sinkt. Die genaue Analyse der Messdaten zeigt, dass im Fall von Wt-nPHB zum gleichen Zeitpunkt – nach 1290 Sekunden – sowohl die Temperatur um mehr als ein Grad Celsius sinkt als auch mehr als 200 μ l 10 mM NaOH zutitriert werden und der pH-Wert um 0,3 Einheiten ansteigt (Abb. 39). Mit nPHB der Phasin-Mutante hingegen sind ein Abfall des pH-Wertes und die Zugabe von NaOH als Reaktion auf CTAB zu erkennen.

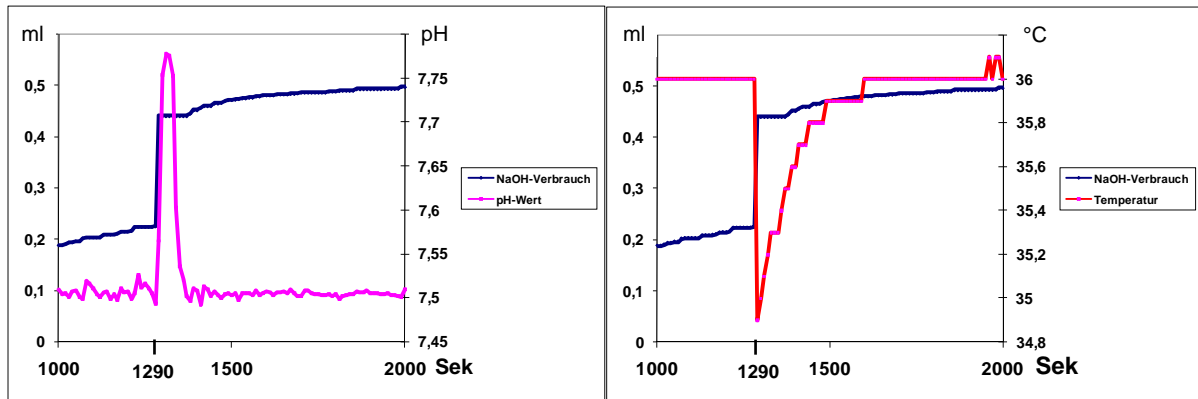


Abb. 39 Zeitlicher Ausschnitt (1000 – 2000 Sek) pH-Stat-Titration von 100 mg PHB (= 1,2 g Granulasuspension) aus *R. eutropha* Wt (siehe Abb.35-A). Nach 1290 Sekunden Zugabe von 1 ml 10 mM CTAB (Raumtemperatur). Auftrag Verbrauch 10 mM NaOH (ml) gegen A: pH-Wert, B: Temperatur des Titrationsansatzes.

Um Artefakte – wie z.B. NaOH-Tropfen, die durch das Pipettieren des CTAB von der Büretten spitze gespült wurden o.a. auszuschließen, wurde eine Nullkontrolle mit Puffer und CTAB durchgeführt. Nach Titration von 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer nach den gleichen Bedingungen wurde 1 ml 10 mM CTAB dazu pipettiert (Abb. 40). Das Ergebnis zeigt mit der Zugabe von CTAB einen pH-Abfall von 7,51 auf 7,25 (Tab. 20). Sofort reagiert der pH-Stat und titriert rund 70 μ l 10 mM NaOH. Daraufhin steigt der pH wieder auf den Soll-Wert 7,5 (890 Sek). Ohne dass gezielt weiter NaOH zugegeben wurde, steigt der pH dennoch weiter bis ca. 7,65. Die Ursache könnten Spuren von NaOH sein, die von der Büretten spitze beim Rühren mitgenommen werden. Dass auch in dieser Kontrolle ein pH-Abfall durch CTAB stattfindet, macht deutlich, dass es sich hierbei nicht um eine Reaktion in Zusammenhang mit nPHB-Granula handelt.

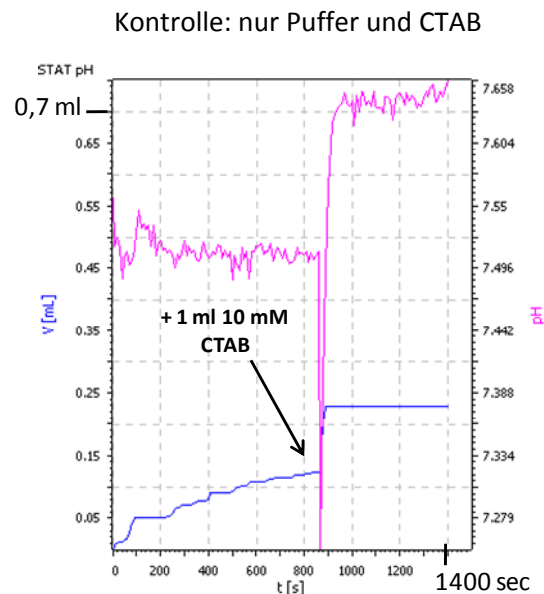


Abb. 40 Kontroll-Titration: 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, 37°C mit 10 mM NaOH. Nach 860 Sekunden Zugabe von 1 ml 10 mM CTAB.

Tab. 20 Ausschnitt Datentabelle pH-Stat-Titration „Kontrolle: Puffer und CTAB“. Zugabe CTAB nach 860 Sekunden.

Sekunden	ml NaOH	pH-Wert	°C
840	0,123	7,503	37,3
850	0,123	7,506	37,3
860	0,123	7,509	37,3
870	0,1275	7,252	37,1
880	0,2005	7,394	36,4
890	0,229	7,495	36,5
900	0,2295	7,566	36,7
910	0,2295	7,583	36,8
920	0,2295	7,622	36,8
930	0,2295	7,629	36,9
940	0,2295	7,634	37

Auch die Zugabe von 1 ml 0,1% Triton-X-100 bewirkt eine sofortige pH-Änderung (Abb. 41). Ähnlich wie beim Versuch mit CTAB sinkt der pH im Ansatz mit nPHB des Wildtypen nicht erkennbar, sondern steigt leicht an (pH 7,5 auf 7,55). Mit Granula der Phasin-Mutante hingegen sinkt der pH zunächst etwas ab und steigt danach deutlich bis pH 7,8. Hier zeigt sich außerdem nach Erreichen des Soll-pH nur noch eine sehr geringe Säurefreisetzung. Die Rate des Wt-Ansatzes ist ebenfalls niedriger als vor Zugabe von Triton, aber nicht so deutlich wie im Ansatz der Mutante.

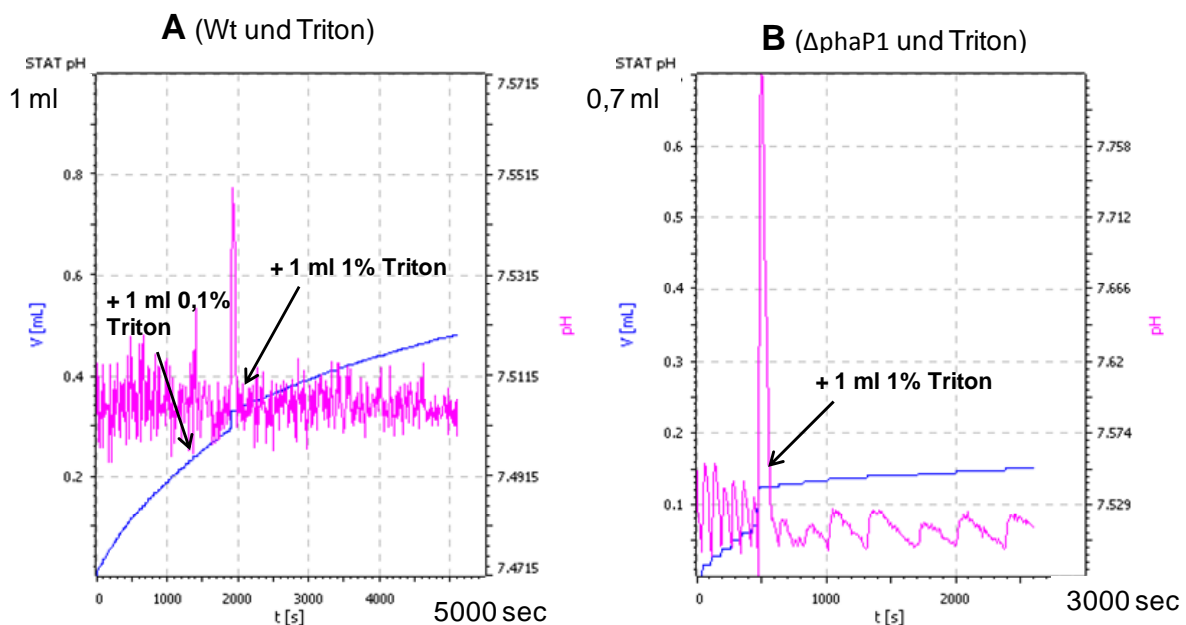


Abb. 41 Titration von 100 mg PHB (= 1,2 g Granulasuspension) aus *R. eutropha* Wt (A) bzw. 100 mg PHB (= 450 μ l Granulasuspension) aus *R. eutropha* Δ phaP1 (B). Inkubation in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,5 und 37°C. Titration im pH-Staten (842 Titrando, Metrohm, Herisau) mit 10 mM NaOH. Zu nPHB aus Wt (A): nach 1400 Sekunden 1 ml 0,1% Triton X-100 und nach 1900 Sekunden 1 ml 1% Triton X-100 dazu. Zu nPHB aus Δ phaP1 (B): nach 440 Sekunden 1 ml 1% Triton X-100 dazu.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass das Detergenz Triton X-100 die Depolymeraseaktivität nativer PHB-Granula beeinträchtigt. Dabei wirkt dieser hemmende Effekt auf nPHB ohne PhaP1-Proteine auf der Oberfläche erkennbar stärker.

DTNB / DTT

Neben der Reaktion auf Detergentien sollten Informationen über optimale Redox-Bedingungen die Granula weiter charakterisieren. Dazu wurden das Oxidationsmittel DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)) und das Reduktionsmittel DTT (Dithiotreitol) eingesetzt.

Einem Titrationsansatz mit 100 mg PHB aus *R. eutropha* Wt (MM-Kultur) wurden nach 700 Sekunden zunächst 1 mM DTNB zugegeben. Nach insgesamt 1400 Sekunden folgte 2 mM DTT (Abb. 42). Die pH-Stat-Messung zeigt bereits, wie der Graph nach Zugabe von DTNB und erneutem Erreichen des Soll-pH von pH 7,5 sichtbar ansteigt. Mit dem Zusatz von 2 mM DTT geht dieser Effekt deutlich zurück und der Säurefreisetzungsrate ist niedriger als zu Beginn.

Zum Nachweis der 3HB-Bildung kann im Fall von DTNB-Proben nicht der photometrische Enzym-Test durchgeführt werden. Die Substanz färbt den Titrationsansatz intensiv gelb und verhindert somit die Bestimmung des NADH, dem Produkt des Enzymtests. Aus diesem Grund wurden Proben mit DNTB generell derivatisiert und per HPLC analysiert.

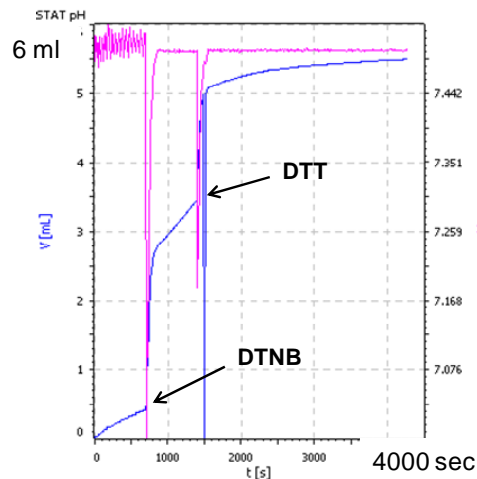


Abb. 42 Titration von 100 mg PHB (= 1080 mg Glycerinsuspension) aus *R. eutropha* Wt (von MM-Kultur, 07.02.07) im pH-Stat (842 Titrando, Metrohm, Herisau) in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl bei pH 7,5 und 37°C. Nach 700 Sek: Zugabe von 100 µl 100 mM DTNB (Endkonzentration ca. 1mM), nach 1400 Sek: 20 µl 1 M DTT (Endkonz. ca. 2 mM).

Um den genauen Einfluss der beiden Substanzen auf die Depolymeraseaktivität nativer PHB-Granula untersuchen zu können, wurden sie jeweils einzeln zu einem Hydrolyseansatz gegeben (Abb. 43). Diese bestanden aus 50 mg PHB (= 790 mg Granulasuspension) aus *R. eutropha* Wt von MM-Kultur in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 37°C. Nach zehn Minuten wurden 1 mM DTT bzw. 1 mM DTNB zugegeben und die Ansätze nach 45 Minuten Inkubation per HPLC auf Hydrolyseprodukte analysiert (Abb. 44).

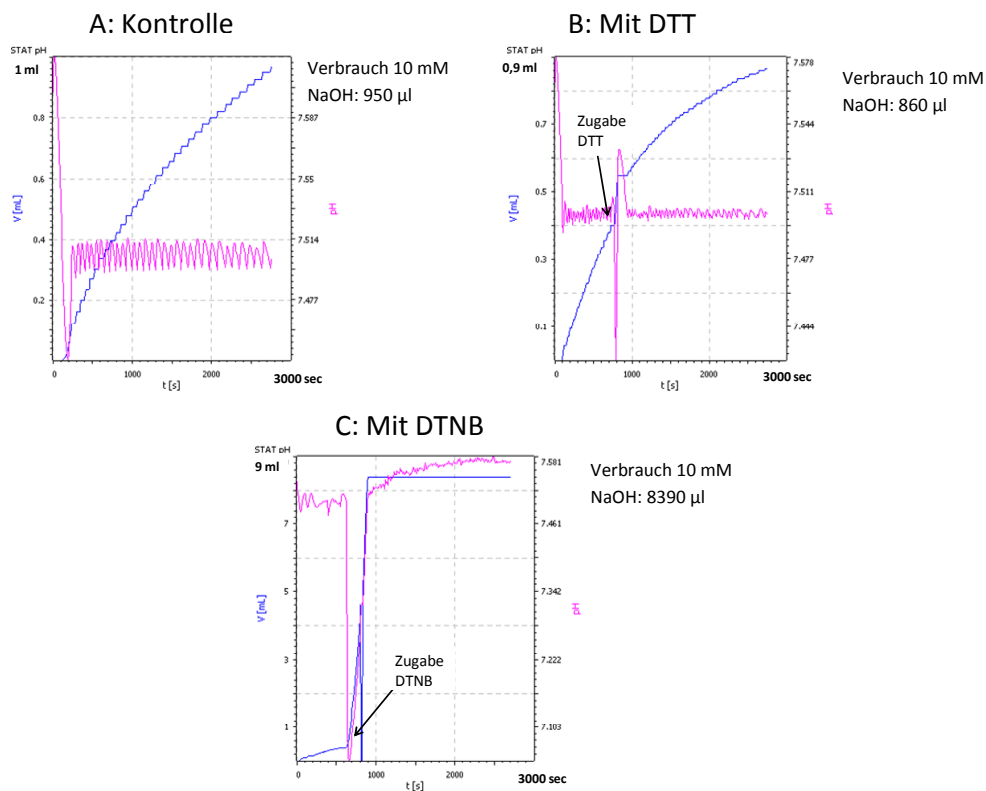


Abb. 43 pH-Stat-Titrations von nativen PHB-Granula aus *R. eutropha* Wt(36 h-Kultur auf MM). Titration in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,5 und 37°C (842 Titrando, Metrohm). Einsatz von jeweils 50 mg PHB. Entspricht 790 mg PHB-Glycerinsuspension, isoliert 17.06.08). Titration durch 10 mM NaOH. Ansatz A: Kontrolle ohne Zusätze. B: Nach 600 Sekunden Zugabe von 200 µl 100 mM DTT (Endkonz. ca. 2 mM). C: Nach 600 Sekunden Zugabe von 1 ml 10 mM DTNB (Endkonz. ca. 1 mM). Linke Y-Achse (blau): Verbrauch an 10 mM NaOH. Rechte Y-Achse: pH-Wert.

Der Kontrollansatz A (Abb.43-A) zeigt im pH-Staten eine konstante Säurefreisetzung. Nach einer hohen Anfangsrate nimmt die Steigung jedoch langsam ab. Ansatz B wurde nach 10 Minuten das Reduktionsmittel DTT (2 mM) zugegeben. Dieses senkt den pH-Wert zunächst, so dass der pH-Stat gegentitriert bis der Soll-Wert (pH 7,5) wieder erreicht wird. Anschließend jedoch verläuft die NaOH-Titration, also die Säurebildung im Ansatz, sichtbar langsamer als vor Zugabe von DTT. Der NaOH-Verbrauch liegt mit 8,6 µmol in 45 Minuten auch unter dem der Kontrolle (9,5 µmol). Durch die Zugabe des Oxidationsmittels DTNB (1 mM) im Ansatz C sank der pH-Wert sofort von 7,5 auf unter pH 7,1. Innerhalb von 3-4 Minuten wurde durch Titration der Soll-Wert wieder erreicht. Dazu waren rund 84 µmol NaOH notwendig. Ob diese nur den pH-Abfall durch die DTNB-Lösung titrierte oder ob doch auch 3HB freigesetzt wurde, zeigt die HPLC-Analyse (Abb. 44).

Wie es zu dem pH-Anstieg nach Erreichen des Soll-pH-Wertes in Ansatz C kam, ist unklar. Möglicherweise gelangten weitere Tropfen NaOH ohne Steuerungssignal aus der Bürettenspitze in den Ansatz. Da der pH-Wert dadurch konstant über dem Soll-Wert liegt, wird kein NaOH titriert. Abb. 42 zeigt, wie die Säurefreisetzung bzw. der NaOH-Verbrauch nach DTNB-Zugabe bei konstantem pH-Wert normalerweise ansteigt.

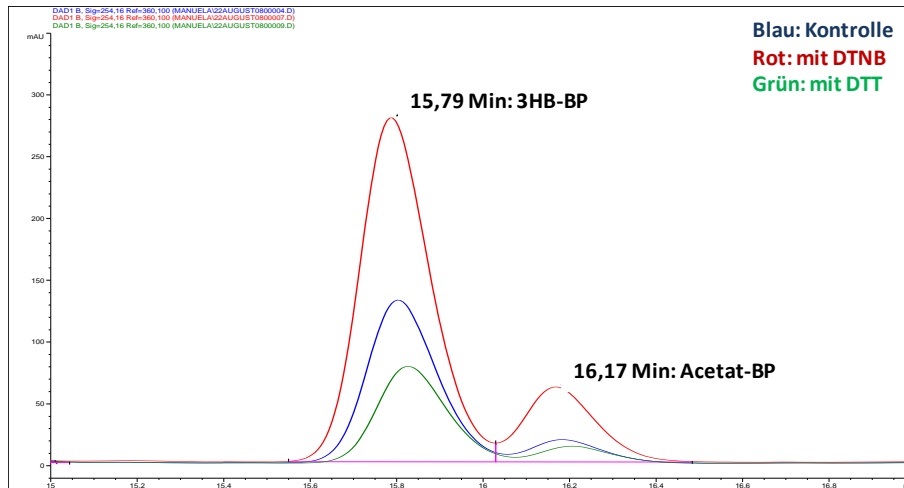


Abb. 44 Overlay HPLC-Analyse von drei Hydrolyseansätzen mit 50 mg PHB aus *R. eutropha* Wt (= 590 mg Granulasuspension) im pH-Staten (in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 37°C mit 10 mM NaOH). Vergleich der Kontrollhydrolyse (blau), mit Zusatz von 2 mM DTT nach 10 Min (grün) und Zusatz von 1 mM DTNB nach 10 Min (rot). Nach 45 Minuten Probenahme und Derivatisierung von 100 µl Probenüberstand mit BPB (2.17.1) und Analyse auf 3HB-Bildung.

Der 3HB-Peak des Kontrollansatzes besitzt eine Fläche von 1350 Flächeneinheiten, was ungefähr 1,62 nmol entspricht (3.2.2.3). Hochgerechnet auf den Gesamtansatz sind dies rund 7,1 µmol 3HB. Im Vergleich dazu sind im Ansatz mit DTNB ungefähr 28,1 µmol und mit DTT nur 4,32 µmol des Hydrolyseproduktes gebildet worden. Die Verdünnung durch die NaOH-Lösung wurde bei der Berechnung beachtet.

Damit konnte in den Proben mit DTNB fast viermal mehr 3HB nachgewiesen werden als im Kontrollansatz. Durch DTT entsprach die Produktmenge hingegen nur rund 60% des Kontrollwertes. Während das Oxidationsmittel in der vorliegenden Konzentration von 1 mM die Hydrolyseaktivität deutlich zu fördern scheint, wirkt das Reduktionsmittel (2 mM) leicht hemmend auf die 3HB-Bildung.

Acetat wurde in allen drei Ansätzen gefunden. Sein Anteil an der Summe von Acetat und 3HB lag mit 8 bzw. 10 % für die Kontrolle bzw. die Probe mit DTT nah beieinander. Die Zugabe von DTNB hingegen scheint den Acetat-Gehalt im Ansatz zu erhöhen, er betrug hier rund 18%.

In Tabelle 21 sind die Reaktionen der oben vorgestellten Reagenzien auf natives PHB und auch andere Sorten von PHB aufgelistet. Hinzu kommt der Test auf Einfluss von EDTA auf aPHB und dPHB. Trypsin wurde zusätzlich auf eine mögliche (spaltende) Wirkung auf BSA, den Überstand nativer Granula, Acetyl-CoA sowie zu Kontrollzwecken mit Glycerin getestet. Mit keiner der Substanzen wurde eine Reaktion erkennbar. Auch zur Kontrolle wurde SDS zu Tris-HCl-Puffer gegeben, was keinen Einfluss auf die Säurefreisetzung im pH-Staten zur Folge hatte.

Tab. 21 Übersicht: Einfluss verschiedener Reagenzien auf die Säurefreisetzung bzw. PHB-Hydrolyse. Zugabe der Reagenzien zu nPHB, aPHB und dPHB in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 (tw. pH 7,5) bei 37°C und Messung der Säurefreisetzung im pH-Stat mit 10 mM NaOH (842 Titrand, Metrohm, Herisau).

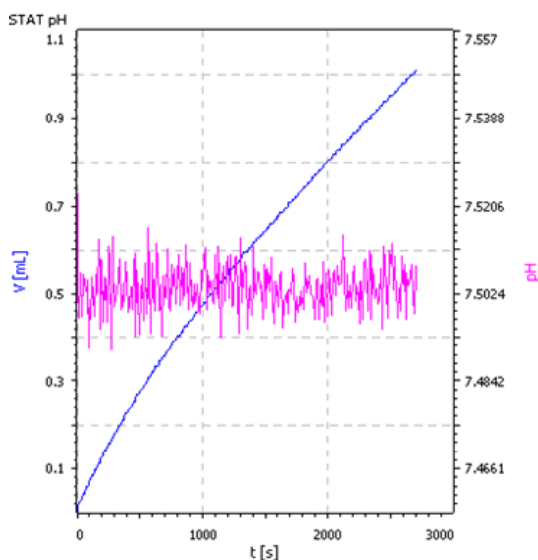
	nPHB <i>R. eutropha</i> Wt	nPHB <i>R. eutropha</i> <i>phaP1</i>-Mut	nPHB <i>E. coli</i> <i>phaCAB</i>	aPHB	dPHB	nPHB <i>R. eutropha</i>, hitzeinaktiviert
SDS (0,1% Endkonz.)	++ (aber kein 3HB)	0	0	0	k.A.	0 / +
Trypsin (25-250µg)	+	++	0 / +	0	0	k.A.
DTT (1mM Endkonz.)	0/-	k.A.	k.A.	0	0	k.A.
DTNB (1mM Endkonz.)	+	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
3-HB (5mM Endkonz.)	0	k.A.	k.A.	0	0	k.A.
EDTA (1mM Endkonz.)	k.A.	k.A.	k.A.	0	0	k.A.
TritonX-100 (0,1% Endkonz.)	-	--	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
CTAB (1mM Endkonz.)	-	--	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

	BSA (1mg)	Überstand nPHB	Acetyl- CoA (2mg)	Glycerin	Tris-HCl
SDS (0,1% Endkonz.)	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	0
Trypsin (25-250µg)	0	0	0	0	0

- 0** = kein Effekt
- = hemmt Säurefreisetzung signifikant
-- = hemmt Säurefreisetzung stark
+ = fördert Säurefreisetzung signifikant
++ = fördert Säurefreisetzung stark
 k.A. = keine Angaben

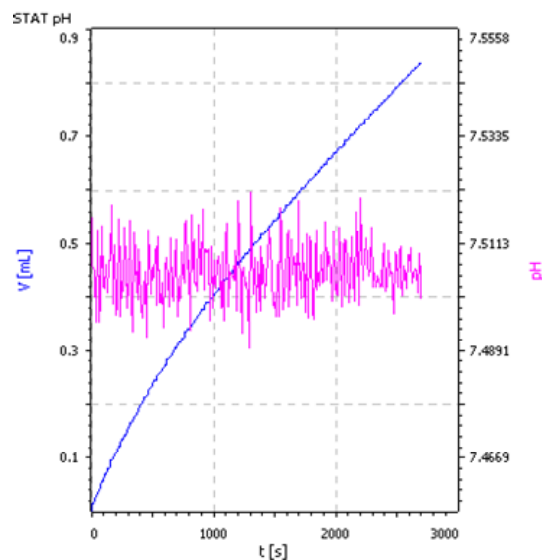
3.4.5 Vergleich Hydrolyseaktivität verschiedener Granula-Isolate

Der pH-Stat eignet sich bei Anschluss von zwei Arbeitsplätzen besonders gut, um parallel und online Unterschiede in der Hydrolyseaktivität zweier Granulaisolats festzustellen. In dieser Arbeit stand dabei der Vergleich des Wildtypen von *R. eutropha* mit der Depolymerase-Mutante ΔphaZa1 sowie der Phasin-Mutante ΔphaP1 im Mittelpunkt. Die folgenden Abbildungen zeigen zunächst die Gegenüberstellung des Wildtypen mit der ΔphaZa1 -Mutante (Abb. 45). Die zeit-gleichen Ansätze bestanden aus 10 ml 0,1 mM Tris-HCl, pH 7,5 und je 100 mg PHB. Dies entsprach für den Wildtyp einer Einwaage von 911 mg Granulasuspension, für die Mutante 752 mg.



Titration nPHB aus *R. eutropha* Wt

Säurefreisetzungsrates = 2,4 nmol / min x mg PHB



Titration nPHB aus *R. eutropha* ΔphaZa1

Säurefreisetzungsrates = 2 nmol / min x mg PHB

Abb. 45 Titration nPHB aus *R. eutropha* Wt (A) und aus *R. eutropha* ΔphaZa1 (B) in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl, pH 7,5, 37°C mit 10 mM NaOH. Wt: 905 mg Glycerinsuspension (= 100 mg PHB), ΔphaZa1 : 748 mg Glycerinsuspension (= 100 mg PHB). Linke Y-Achse (blauer Graph): Verbrauch an 10 mM NaOH (ml). Rechte Y-Achse (rosa Graph): pH-Wert. Keine Korrektur um Grundrate durch CO₂-Ansäuerung des Puffers.

Nach einer Inkubationszeit von 2800 Sekunden bei 37°C zeigte der Ansatz mit Granula des Wildtyp-Stammes einen Verbrauch von 1,009 ml 10 mM NaOH an. Dies entspricht einer Säureproduktion von 10,09 μmol . Nach der gleichen Zeit waren im Reaktionsgefäß der ΔphaZa1 -Mutante 8,37 μmol Säure neutralisiert worden. Nach Ultrazentrifugation der Ansätze wurden die Überstände per 3HB-Dehydrogenase-Test sowie nach Derivatisierung per HPLC auf ihren 3HB-Gehalt untersucht (Tab. 22). Die Werte des Enzymtests liegen etwas unter denen des pH-Statens, die der HPLC-Analyse sind sogar nur halb so groß. Die Ergebnisse aller drei Methoden zeigen jedoch stets das gleiche Mengenverhältnis von 1 zu 0,8 für die 3HB-Werte der Wt-Granula zu den ΔphaZa1 -Granula.

Tab. 22 3HB-Gehalt nach 45 Minuten Titration von je 100 mg nPHB (ungewaschen) aus *R. eutropha* Wt und *R. eutropha* Δ phaZa1 in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 bei 37°C mit 10 mM NaOH. Gegenüberstellung der Auswertung über (A) Menge an zutitrierter 10 mM NaOH-Lösung, (B) enzymatischen 3HB-DH-Test sowie (C) HPLC-Analyse.

	Wildtyp	Δ phaZa1-Mutante
A: pH-Stat	10,1 μ mol	8,4 μ mol
B: 3HB-DH-Test	8,3 μ mol	6,6 μ mol
C: HPLC	5,4 μ mol	4,5 μ mol

Parallele Hydrolyseansätze mit Granula der beiden Stämme im 1 ml-Maßstab (2.16.1) bestätigen den beobachteten Unterschied in der 3HB-Bildung. Auch hier liegt die 3HB-Konzentration, analysiert mit HPLC, mit nPHB aus *R. eutropha* Wt um 10 – 20% höher als mit Granula der PhaZa1-Mutante. Dabei ist der Unterschied sowohl beim Einsatz gewaschener als auch ungewaschener Granula zu beobachten (Abb. 46). 10 mg reinem PHB entsprachen im Fall von *R. eutropha* Wt 159 mg ungewaschenem nPHB. Für nPHB aus *R. eutropha* Δ phaZa1 waren die 10 mg reines PHB in 91 mg Glycerinsuspension enthalten. Beim Einsatz ungewaschener Granula unterscheidet sich dadurch der Anteil an Glycerin in beiden Hydrolyse-Ansätzen. Während er beim Test der Wildtyp-Granula rund 15% ausmacht, sind es mit nPHB der phaZa1-Mutante nur ungefähr 8% des 1 ml-Ansatzes. Dies könnte bei Hydrolyseansätzen mit ungewaschenen Granula möglicherweise Einfluss auf die Depolymeraseaktivität haben. Bei Versuchen mit gewaschenem nPHB ist dieser Faktor aber auszuschließen, da hier das Glycerin weitestgehend entfernt wurde.

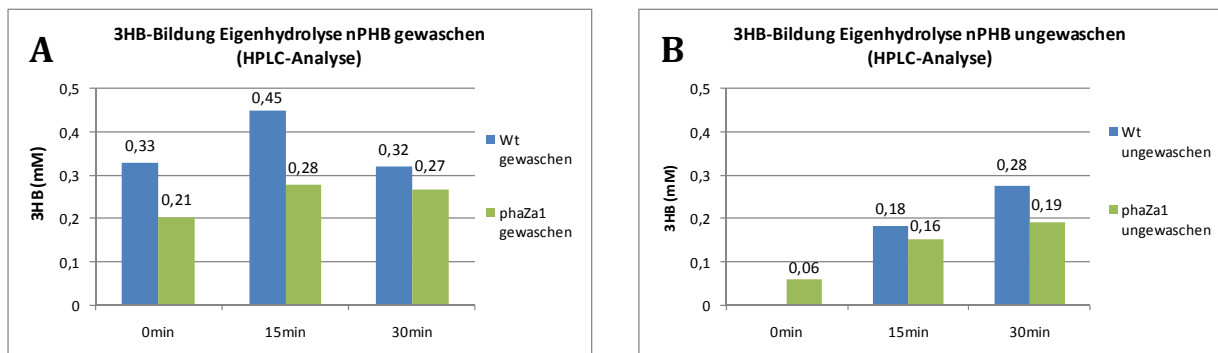


Abb. 46 HPLC-Analyse der 3HB-Bildung durch nPHB aus *R. eutropha* Wt (blau) und Δ phaZa1 (grün) im Hydrolyseansatz nach 0, 15 und 30 Minuten. Einsatz von gewaschenen (A) und ungewaschenen (B) nativen Granula (2.9). Vor HPLC-Analyse Derivatisierung der Proben mit Bromphenacylbromid (BPB).

Abbildung 43 macht deutlich, dass dennoch die 3HB-Bildung bei gewaschenen als auch ungewaschenen nPHB-Granula des Wildtypen (blau) jeweils höher liegt als mit nPHB der PhaZa1-Mutante (grün). Leicht zu erkennen ist zudem, dass die gemessene 3-HB-Konzentration in Ansätzen mit gewaschenen Granula zu allen Probenahme-Zeiten größer war als mit ungewaschenen Granula. Dabei ist die Menge 3HB der Probe zum Zeitpunkt 0 Minuten mit 0,21 mM für nPHB aus *R. eutropha* Δ phaZa1 und 0,33 mM für nPHB des Wildtypen bereits erstaunlich groß. Interessanterweise zeigen die Ansätze mit gewaschenem nPHB für beide Granulaarten den gleichen Verlauf der 3HB-Bildung. Während nach den ersten 15 Minuten ein Anstieg der 3HB-Menge sichtbar ist, wurde nach insgesamt 30 Minuten eine Konzentration gemessen, die ungefähr der

Ausgangsmenge bei 0 Minuten entsprach. Anders sieht der Verlauf für beide Arten nPHB - ungewaschen – aus: Hier weist die Nullprobe nur geringe Mengen Produkt auf (Wert für nPHB aus Wt fehlt). Die Proben nach 15 und 30 Minuten beinhalten hingegen kontinuierlich höhere Konzentrationen an 3HB. Letztendlich liegen die 3-HB-Mengen nach 30 Minuten Inkubation mit gewaschenen und ungewaschenen nPHB-Granula aber mit 0,32 mM (Wt, gew) / 0,28 mM (Wt, ungew) und 0,27 mM ($\Delta phaZa1$, gew) / 0,19 mM ($\Delta phaZa1$, ungew) in einer Größenordnung.

Um sicherzugehen, dass es sich bei dem als Depolymerase-Mutante $\Delta phaZa1$ bezeichneten Stamm wirklich noch um diesen handelt, wurde die Mutation über PCR nachgewiesen. Dazu wurde zunächst DNA aus *R. eutropha* $\Delta phaZa1$ (SK 1544) isoliert (2.6.) und mit den entsprechenden Primern daraus das *phaZa1*-Gen per PCR amplifiziert (2.7). Während das Wildtyp-Gen eine Größe von 1,5 kb aufweist, besitzt das $\Delta phaZa1$ -Gen aufgrund gezielter Deletion nur noch 674 bp (Handrick et al. 2000). Das Agarosegel in Abb. 44 zeigt links vom Marker zwei Spuren mit Wildtyp-DNA als Ausgangsmaterial, rechts zwei Spuren mit $\Delta phaZa1$ -DNA. Ganz rechts wurden 5 μ l Kontroll-DNA mit 1,5 kb aufgetragen.

Anhand des Markers kann man erkennen, dass das aus der PhaZa1-Mutante isolierte und amplifizierte Plasmid deutlich kleiner ist als das Plasmid des Wildtypen. Die Lage der Bande im Agarosegel kurz unterhalb des 700 bp-Markers weist auf die gesuchte Größe von 674 bp hin. Dabei handelt es sich um einen durch die teilweise Deletion des $\Delta phaZa1$ -Gens verkleinerten Abschnitt der chromosomalen DNA des Wildtyps. Somit ist sichergestellt, dass der als *R. eutropha* $\Delta phaZa1$ bezeichnete Stamm tatsächlich noch das deletierte Gen trägt.

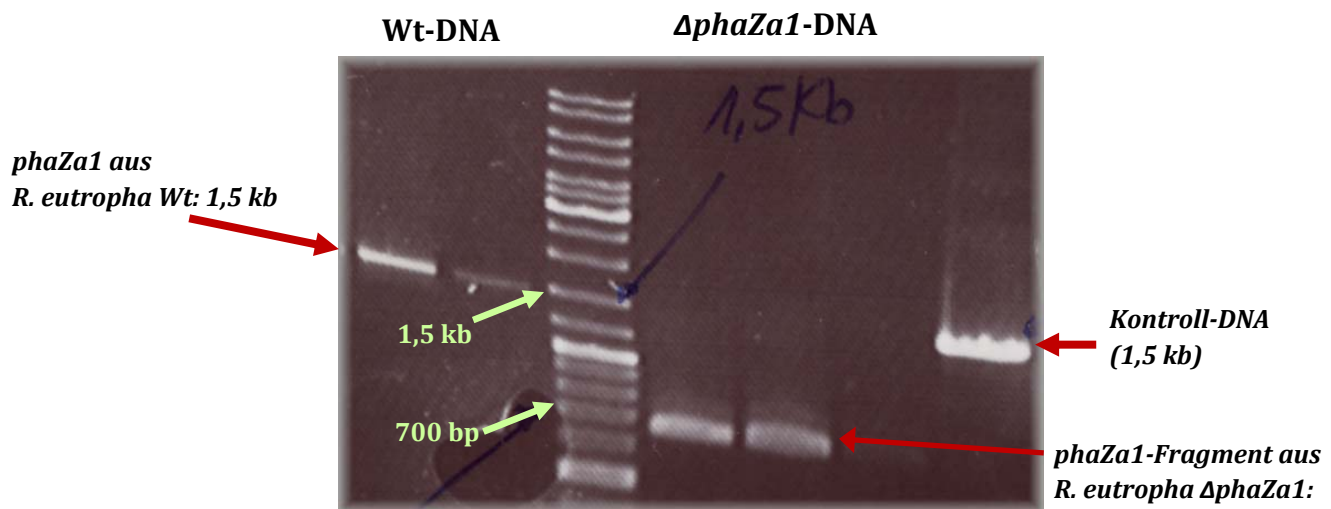


Abb. 47 1% iges Agarosegel mit Auftrag des Produktes der PCR des *phaZa1*-Gens aus *R. eutropha*. Links: Ansatz mit Plasmid-DNA aus *R. eutropha* Wt. Marker: GeneRuler DNA Ladder Mix, 0,1 μ g/ μ l (Fermentas). Rechts: Ansatz mit Plasmid-DNA aus *R. eutropha* $\Delta phaZa1$. Ganz rechts: Kontroll-DNA (1,5 kb).

Ein weiterer Versuch sollte Aufschluss über mögliche Unterschiede der Hydrolyseaktivität von Granula aus *R. eutropha* Wt und *R. eutropha* $\Delta phaZa1$ geben. Beide Stämme wurden über 14 Stunden in NB-Medium mit 0,2 % NaGlukonat kultiviert, geerntet und die PHB-Granula isoliert (2.9). Je 50 mg PHB (Wt: 870 mg Granulasuspension, $\Delta phaZa1$: 940 mg) wurden mit 10 ml 0,1 mM Tris-HCl bei pH 7,5 und 37°C für 2,5 Stunden im pH-Stat (842 Titrande, Metrohm, Herisau) inkubiert. In dieser Zeit wurden in das Reaktionsgefäß mit nPHB aus *R. eutropha* Wt 5,1 ml 10 mM NaOH titriert, um den Soll-pH 7,5 konstant zu halten. Dem Versuch mit Granula der PhaZa1-

Mutante wurden vom Gerät 5 ml 10 mM NaOH zugegeben. Das entspricht einer Konzentration von 8,5 mM NaOH (Wt) bzw. 8,3 mM NaOH ($\Delta phaZa1$) bzw. gebildeter Säure.

Der gesamte Ansatz wurde anschließend zentrifugiert (Ultracentrifuge Beckman, TFT 65.13-Rotor, 30.000 rpm, 15 min) und der Überstand in 50 ml-Falcontubes eingefroren und lyophilisiert. Die Lyophilisate beider Ansätze wurden später jeweils in 6 ml destilliertem Wasser gelöst und per 3HB-Dehydrogenase-Test (2.15.2) auf ihre 3HB-Konzentration analysiert. Um im linearen Bereich zu liegen, mussten die Proben 1:50 verdünnt werden. Die Messung ergab für die Titration der Wt-Granula eine 3HB-Konzentration von 8,15 mM, für den Ansatz mit nPHB der PhaZa1-Mutante waren es 7,95 mM. Zwischen den Hydrolyseaktivitäten von Wt- und $\Delta phaZa1$ -Granula aus NB-Kultur lässt sich somit weder im pH-Stat-Versuch noch durch den 3HB-DH-Test ein wirklich signifikanter Unterschied feststellen.

A: nPHB aus *R. eutropha* Wt

B: nPHB aus *R. eutropha* $\Delta phaZa1$

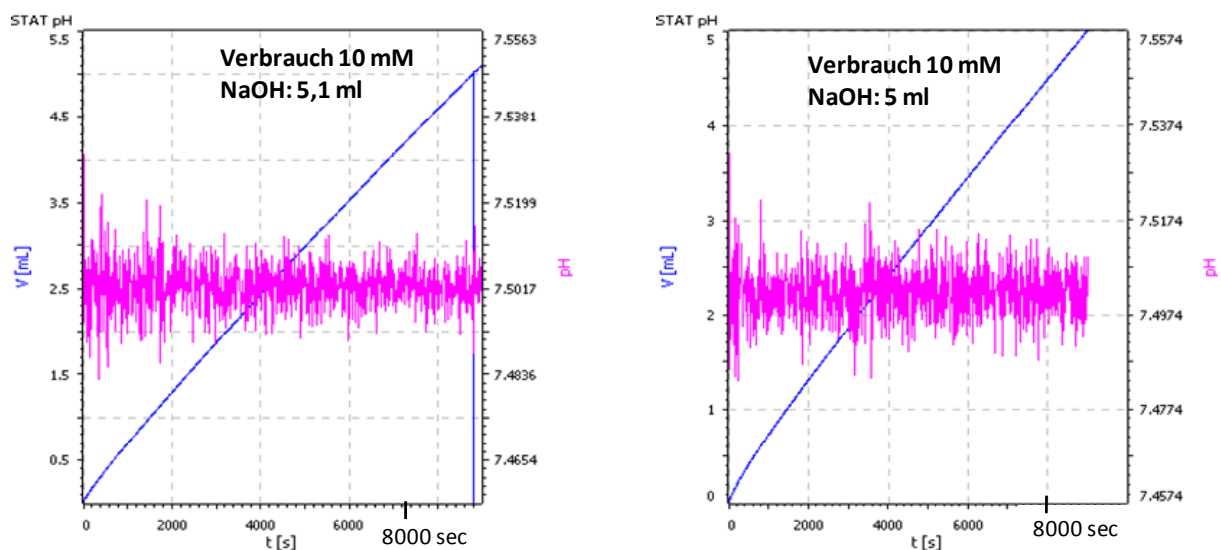
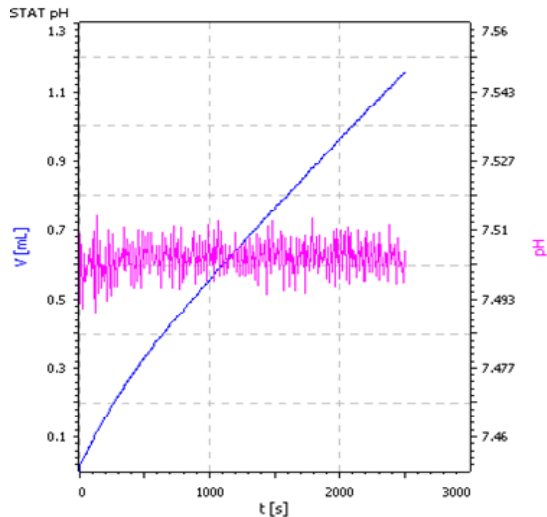


Abb. 48 Titration 50 mg nPHB aus *R. eutropha* Wt (A) und *R. eutropha* $\Delta phaZa1$ (B) in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl bei pH 7,5 und 37°C mit 10 mM NaOH. 50 mg PHB entsprechen bei Wt: 870 mg Granulasuspension, bei $\Delta phaZa1$: 940 mg. Granula jeweils aus Zellen von 14-stündiger Kultivierung (Hauptkultur) in NB-Medium. Linke Y-Achse (blau): Verbrauch an 10 mM NaOH, rechte Y-Achse (rosa): pH-Wert.

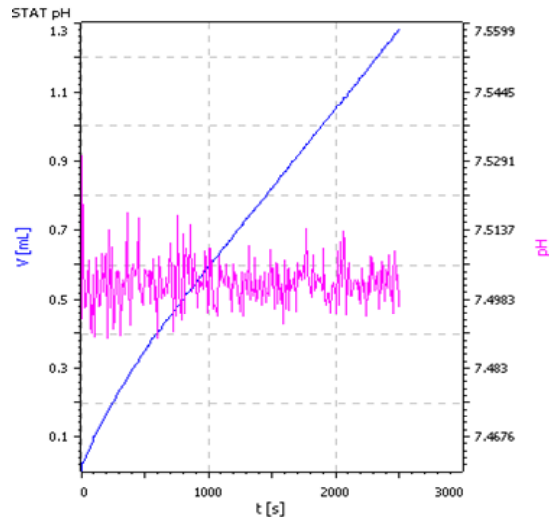
Die Untersuchung von Granula aus Zellen von Mineralmedium oder von einem Vollmedium (NB) im pH-Staten führte zur gleichen Beobachtung wie spätere Hydrolyseansätze mit nachfolgender HPLC-Analytik (Kapitel 3.4.4): beim Einsatz gleicher mg-Mengen nPHB setzen Granula aus NB-gewachsenen Zellen bis zu fünfmal mehr 3HB frei, als wenn sie aus Zellen von Mineralmedium stammen. Besonders interessant ist dabei, dass dies bei *R. eutropha* nicht nur für den Wt sondern auch für die Depolymerasemutanten *R. eutropha* $\Delta phaZa1$ und $\Delta phaZd$ (Abe et al. 2005) gezeigt werden konnte. Alle drei Stämme wurden parallel auf NB kultiviert, die Zellen nach 14 h Hauptkultur geerntet und die nPHB-Granula isoliert. Für jeden der drei Titrationsversuche wurden 500 mg Granulasuspension zu 10 ml 0,1 mM Tris-HCl mit pH 7,5 in das Reaktionsgefäß des pH-Statens gegeben und der Ansatz bei 37°C inkubiert. 500 mg Granulasuspension entsprachen nach Waschen, Natriumhypochlorit-Behandlung und Trocknen (2.10) für den Wildtyp 39 mg PHB, für die $\Delta phaZa1$ -Mutante 50 mg PHB und für die $\Delta phaZd$ -Mutante 31,3 mg PHB. In Abbildung 49 ist zum Vergleich ein späterer Versuch mit nPHB aus *R. eutropha* Wt aus einer Kultivierung auf

Mineralmedium gezeigt (Abb. 49-D). Die dort ebenfalls 500 mg eingesetzte Glycerinsuspension enthielten 103 mg PHB.

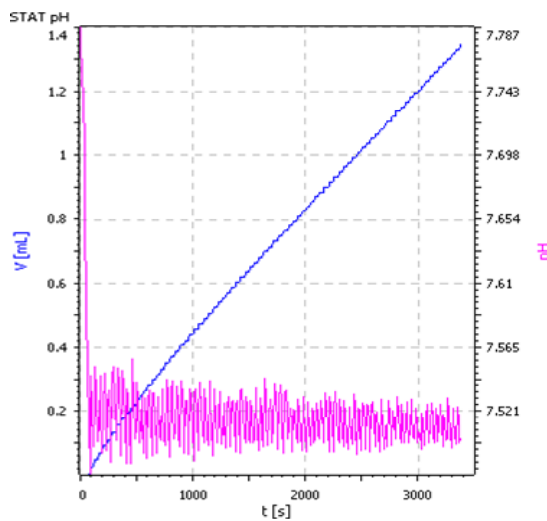
A: nPHB aus *R. eutropha* Wt (NB)



B: nPHB aus *R. eutropha* Δ phaZa1 (NB)



C: nPHB aus *R. eutropha* Δ phaZd (NB)



D: nPHB aus *R. eutropha* Wt (MM)

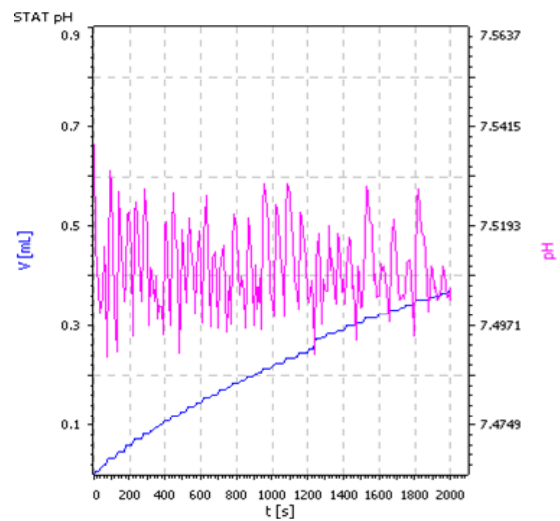


Abb. 49 Titration nPHB (ungewaschen) aus *R. eutropha* Wt (A), Δ phaZa1 (B) und Δ phaZd (C) nach 14 h Kultivierung auf NB-Medium sowie aus *R. eutropha* Wt nach 36 h Kultivierung auf Mineralmedium (MM) mit 2% Glukonat (D). Einsatz nPHB jeweils 500 mg Glycerinsuspension, entspricht für Wt (NB): 39 mg PHB, Δ phaZa1 (NB): 50 mg PHB, Δ phaZd (NB): 31,3 mg PHB und Wt (MM): 103 mg PHB. Titration in 10 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5 und 37°C mit 10 mM NaOH.

Zum Vergleich der Säurefreisetzungsrates wurde das titrierte Volumen an 10 mM NaOH nach 2500 (bei Teil D: nach 2000) Sekunden abgelesen und auf Minuten und die mg-Menge an eingesetztem PHB bezogen. Daraus ergaben sich folgende Werte:

Tab. 23 Vergleich pH-Stat-Versuch: Verbrauch NaOH bzw. Säurefreisetzung in nmol pro Minute und mg PHB von nativen PHB-Granula (ungewaschen) aus *R. eutropha* Wt, Δ *phaZa1* und Δ *phaZd* nach 14 h Kultivierung auf Nutrient Broth-Medium (NB) bzw. 36 h auf Mineralmedium (MM) mit 2% Natriumglukonat.

Herkunft nPHB	mg PHB	Verbrauch NaOH (μmol)	Spezif. Verbrauch nmol/min x mg PHB
<i>R. eutropha</i> Wt (NB, 14 h)	38,6	11,57	7,2
<i>R. eutropha</i> Δ <i>phaZa1</i> (NB, 14 h)	50	12,81	6,1
<i>R. eutropha</i> Δ <i>phaZd</i> (NB, 14 h)	31,3	10,14	7,8
<i>R. eutropha</i> Wt (MM, 36 h)	103	3,75	1,1

Verglichen mit den Granula des Wildtypen (aus NB-Kultur) zeigt die Depolymerase-Mutante Δ *phaZa1* eine um mehr als 10% niedrigere Säurefreisetzung, Δ *phaZd* hingegen liegt fast 10% darüber. Beide Abweichungen könnten noch in den Bereich der Messungenauigkeit oder der natürlichen Schwankung eingeordnet werden. Vergleicht man jedoch nPHB-Granula aus *R. eutropha* Wt-Zellen, die auf NB bzw. Mineralmedium (mit 2% Natriumglukonat) kultiviert worden sind, ist der Unterschied ganz deutlich: Von NB-Kultur stammende Granula produzieren während der Titration fast sieben Mal mehr Säure als nPHB aus Zellen von Mineralmedium. Neben der Zusammensetzung der beiden Medium unterscheiden sich die NB- und MM-Kulturen in der Wachstumsdauer. In Kapitel 3.5.6 (Einfluss Kulturmedium auf PHB-Abbau) wird jedoch nachgewiesen, dass die Säurefreisetzungsrates auch für Granula aus nur 12,5-stündiger MM-Kultur nicht höher ist als aus 36 Stunden gewachsenen Kulturen.

Die in Kapitel 3.4 vorgestellten Versuche zeigten die Hydrolyseaktivität isolierter, nativer PHB-Granula von vielen Seiten. Im Mittelpunkt stand die eindeutige Beweisführung, dass es sich bei der im pH-Stat nachweisbaren Säurefreisetzung von nPHB aus *R. eutropha* Wt um eine enzymatische Reaktion handelt. Dazu wurden die entsprechenden Granula mit nPHB aus rekombinanten *E. coli*-Zellen, mit aPHB und mit nPHB aus *A. latus* verglichen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede, die in Kombination mit dem Test erhitzter Granula darauf hinwiesen, dass bei nPHB aus *R. eutropha* und *A. latus* enzymatische Hydrolyse stattfindet. Durch den Einsatz des pH-Statens war es zudem möglich, „online“ den Einfluss verschiedener Reagentien auf die Säurefreisetzung nativer PHB-Granula zu beobachten. Dazu gehörten Proteinase, Detergentien und Redoxmittel. Wichtig war jedoch, durch den 3HB-Dehydrogenasetest sicherzustellen, ob es sich bei der Säure tatsächlich um das Hydrolyseprodukt 3-Hydroxybutyrat handelte oder der pH-Wert durch andere Produkte gesunken war.

Darüber hinaus wurde die Hydrolyseaktivität von nPHB, isoliert aus einer Minimalmediums-Kultur (mit 2% Na-Glukonat) und einer NB-Kultur nebeneinander gestellt. Verglichen per mg eingesetztes PHB bilden die Granula der NB-Kultur mehr als sechsmal soviel 3-HB. Der Aktivitätsunterschied von nPHB aus NB-Kultur des Wildtypen mit Mutanten ergab für *R. eutropha* Δ *phaZa1* in mehreren Versuchen eine um rund 10-20 % geringere 3-HB-Bildung, für *R. eutropha* Δ *phaZd* eine rund zehn Prozent höherer Aktivität als beim Wildtypen. Die in-vitro-Hydrolyseaktivität nativer PHB-Granula wurde klar gezeigt und untersucht. Das nächste Kapitel vertieft die Untersuchungen zur Hydrolyse und ergänzt sie um zahlreiche Versuche zur Thiolyseaktivität nativer Granula.

3.5 Hydrolyse und Thiolyse: der endogene Abbau nativer PHB-Granula

Im vorigen Kapitel (3.4) wurde die Eigenhydrolyse nativer PHB-Granula mit Hilfe des pH-Statens sowie HPLC und 3HB-Dehydrogenase-Test nachgewiesen und ausführlich untersucht. Dabei zeigte unter anderem der Vergleich der Hydrolyseaktivität (pro mg PHB) von nativen Granula aus dem PHB-Modellorganismus *R. eutropha* mit den deutlich schneller hydrolysierenden Granula aus *A. latus*, wie unterschiedlich ausgeprägt dieser Abbauweg sein kann.

In diesem Kapitel (3.5) wird nun eine mögliche Alternative zur intrazellulären hydrolytischen Spaltung von PHB untersucht: die thiolytische Spaltung. Bereits 2006 tauchte in einer Veröffentlichung von Uchino und Saito die Theorie der Thiolyse von PHB auf. Zunächst untersuchten sie jedoch das Enzym PHB-Synthase aus *R. eutropha* Wt (PhaC) auf eine mögliche Thiolyseaktivität als Rückreaktion des eigentlich katalysierten Polymerisationsschrittes. In der darauf folgenden Arbeit (Uchino et al. 2007) wird 2007 schließlich erstmalig die thiolytische Spaltung von PHB (αPHB) durch intrazelluläre Depolymerasen gezeigt. Speziell für PhaZa1 aus *R. eutropha* Wt konnte diese nachgewiesen werden. Die Esterbindungen des nPHB werden dabei statt mit H₂O mit Hilfe von CoA gespalten. Die dabei entstehenden Thioester wie 3HB-CoA oder 3HB-Oligomer-CoA, aber auch Acetyl-CoA, konnten von uns ebenfalls detektiert werden. Da bei diesen Produkten das freie Säureende fehlt, waren pH-Stat-Versuche nicht sinnvoll. Per HPLC (DAD) konnten die CoA-Verbindungen jedoch gut analysiert werden. Aufbauend auf den ersten Erkenntnissen von Uchino und Saito sollte in dieser Arbeit die Stellung der Thiolysereaktion im PHB-Stoffwechsel untersucht werden. Dazu wurde die Produktbildung parallel in Hydrolyse- und Thiolyseansätzen mit nPHB aus *R. eutropha* sowie anderen PHA-Bildnern analysiert.

Die Abschnitte 3.5.1 bis 3.5.3 beschreiben zunächst die Analytik der Thiolyseprodukte. Im Abschnitt 3.5.4 wird die Eigen-Thiolyse nativer PHB-Granula näher charakterisiert. Anschließend stellt dann Abschnitt 3.5.5 die Ergebnisse aus Thiolyse- und Hydrolyseversuchen vor mit nPHB aus *R. eutropha* Wt sowie der PhaZa1- und PhaP1-Mutante. Statt der beim pH-Stat üblichen 10 ml-Ansätze wurden die Versuche nun im 1 ml-Maßstab in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen durchgeführt. Auf diese Weise musste zum einen weniger des teuren CoA eingesetzt werden. Zum anderen konnten zahlreiche Versuche parallel angesetzt und im Heizblock inkubiert werden. Im Gegensatz zum pH-Stat-Versuch wurden die Proben nicht gerührt oder geschüttelt, so dass der Sauerstoffgehalt wahrscheinlich geringer ist. Dieser Zustand entspricht jedoch noch mehr den reduzierten Bedingungen des Zellinneren und liefert daher möglicherweise realistischere Daten.

Um beim Einsatz von Granula möglichst nah an die in vivo-Abläufe zu gelangen, wurde das über einen Glyceringradienten isolierte PHB nicht nur direkt vom Gradienten, sondern stets parallel dazu auch gewaschen untersucht. Durch das vorsichtige Entfernen von Glycerinresten sollten auch darin enthaltene löslichen Enzyme entfernt werden (2.9). Kapitel 3.4 zeigt, welche unterschiedlichen Produktspektren dadurch entstanden sind.

3.5.1 Einfluss von CoA und DTT auf den 3HB-DH-Test

Sollen einige wenige Proben ohne Derivatisierung und HPLC-Lauf nur auf das PHB-Monomer, 3HB, detektiert werden, geschieht dies mit dem enzymatischen 3HB-Dehydrogenase-Test. Er setzt sich zusammen aus 33 mM Tris-HCl-Puffer pH 8, 33 mM NAD als Elektronenakzeptor, 1 mM MgCl₂ (für 3HB-Dehydrogenase) je nach Konzentration rund 100 µl Probe sowie 2,5 µl 3HB-Dehydrogenase. Beim Nachweis von 3HB in Thiolyseansätzen gelangen durch 100 µl unverdünnte Probe 0,1 mM CoA und 0,1 mM DTT (DTT in späteren Thiolyseansätzen weggelassen) in den 1 ml-Testansatz. Kontrollversuche mit definierten Mengen 3HB-Standard sollten deutlich machen, ob

eine oder beide Substanzen Einfluss auf das Kernstück des Tests, die 3HB-Dehydrogenase, haben. Dazu wurden die folgenden vier Ansätze parallel gestartet (Tab. 24) und der Umsatz von 3HB indirekt über die Bildung von NADH per Photometer (340 nm) verfolgt.

Tab. 24 Pipettierschema zur Untersuchung des 3HB-Dehydrogenase-Tests auf Wirkung von 0,1 mM CoA und/oder 0,1 mM DTT.

	Kontrolle	0,1 mM DTT	0,1 mM CoA	Je 0,1 mM DTT + CoA
33 mM NAD	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10 mM MgCl ₂	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
0,1 mM 3HB-Na	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
33 mM Tris-HCl, pH 8	700 µl	690 µl	690 µl	680 µl
10 mM DTT	-	10 µl	-	10 µl
10 mM CoA	-	-	10 µl	10 µl
3HB-Dehydrogenase	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl

Nach diesem Schema wurde der Test zur Sicherheit der Ergebnisse zweimal durchgeführt. Beide Male zeigten die vier Ansätze nach 40 Minuten ähnlich hohe Absorptionswerte bei 340 nm (Tab. 25). Beide Substanzen scheinen den Test nicht zu verfälschen.

Rein rechnerisch ergäbe sich nach der Formel $E = c \times d \times \epsilon$ beim Umsatz von 0,1 mM 3HB-Na für das gebildete NADH $\Delta E = 0,062$ statt 0,031 (siehe Tabelle 25). Unser Substrat ist jedoch ein Racemat aus R- und S-3HB (je ca. 50 %) und die 3HB-Dehydrogenase katalysiert substratspezifisch nur den Umsatz von R-3HB.

Tab. 25 Untersuchung des Einflusses von 0,1 mM DTT und 0,1 mM CoA auf den 3HB-Dehydrogenase-Test. Gezeigt sind die $\Delta\epsilon$ (340 nm) - Werte von Ansätzen mit/ohne DTT oder CoA-Zugabe aus zwei unabhängigen Versuchsreihen.

DTT	CoA	Test 1	Test 2
-	-	0,031	0,031
+	-	0,031	0,031
-	+	0,037	0,031
+	+	0,032	0,030

3.5.2 Übersicht Analysemethoden

In den folgenden Versuchen wurden die Granula-assoziierten Depolymerasen auf die Fähigkeit zur hydrolytischen und/oder thiolytischen Spaltung des nativen PHB untersucht. Ihre Aktivität entspricht der „Produktbildung pro Zeit“, so dass die exakte Analyse der Produkte Hauptbestandteil der Untersuchungen war.

Einen Überblick der Analysemethoden gibt Tabelle 26. Details zur Durchführung sind unter 2.16.1 erläutert. Sowohl Hydrolyse- als auch Thiolyseansätze wurden parallel über zwei Methoden auf die Bildung von 3HB (und teilweise Acetat) untersucht. Denn trotz 1mM CoA findet in den Thiolyseansätzen nicht ausschließlich thiolytische, sondern auch weiterhin hydrolytische Spaltung statt. Die während der Thiolyse gebildeten CoA-Ester (3HB-CoA, Acetyl-CoA) wurden per HPLC detektiert.

Tab. 26 Übersicht der im folgenden angewandten Nachweismethoden der Thiolyse- und Hydrolyseaktivität nativer PHB-Granula.

Nachweis Depolymerase-Aktivität		THIOLYSE		HYDROLYSE	
		nPHB gewaschen	nPHB ungewaschen	nPHB gewaschen	nPHB ungewaschen
3HB	3HB- Dehydrogenase- Test	+	+	+	+
	HPLC (nach Derivatisierung)	+	+	+	+
CoA- Ester	HPLC	+	+	-	-

3.5.3 Standard-Chromatogramme

3.5.3.1 Nachweis CoA-Ester (HPLC-Analyse)

Die Chromatogramme der Abbildungen 50 und 51 zeigen jeweils zunächst im Überblick und anschließend im Ausschnitt die Trennung der gekauften Standards CoA, Acetyl-CoA und 3HB-CoA. Eine zeitliche Varianz der Peaks, wie sie zwischen Abbildung 50-A/B und 51-A/B hier zu sehen ist, kann verschiedene Gründe haben. Im vorliegenden Fall wurden mit der Säule (Lichrosphere RP18, 5µm, 240 x 4 mm, endcapped) zwischen den beiden Standard-Messungen sehr viele andere Läufe durchgeführt. Die Peak-Verschiebung lässt sich daher wohl vor allem auf eine nachlassende Bindekapazität des Säulenmaterials zurückführen. Zudem veränderten sich die Bedingungen leicht durch den Einbau einer neuen Vorsäule.

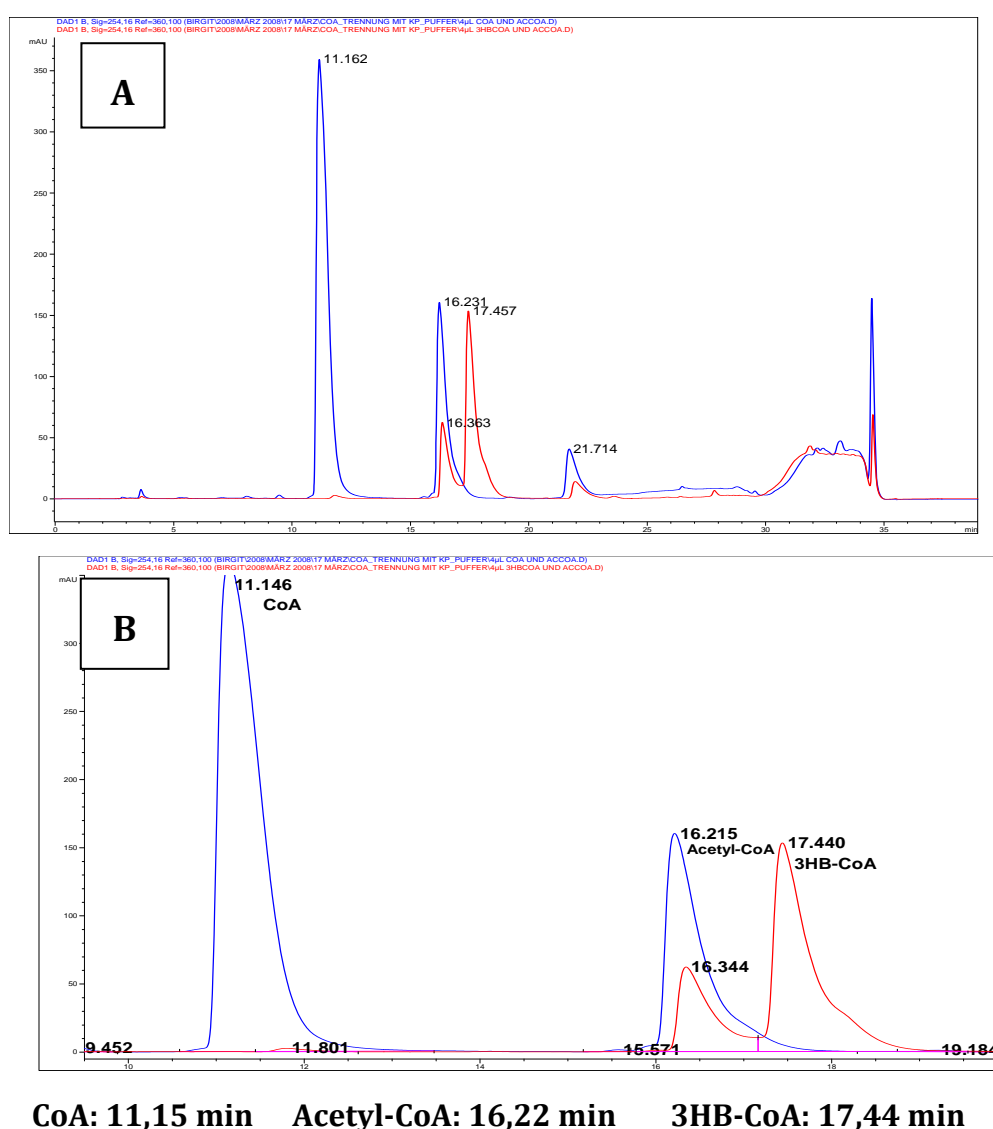
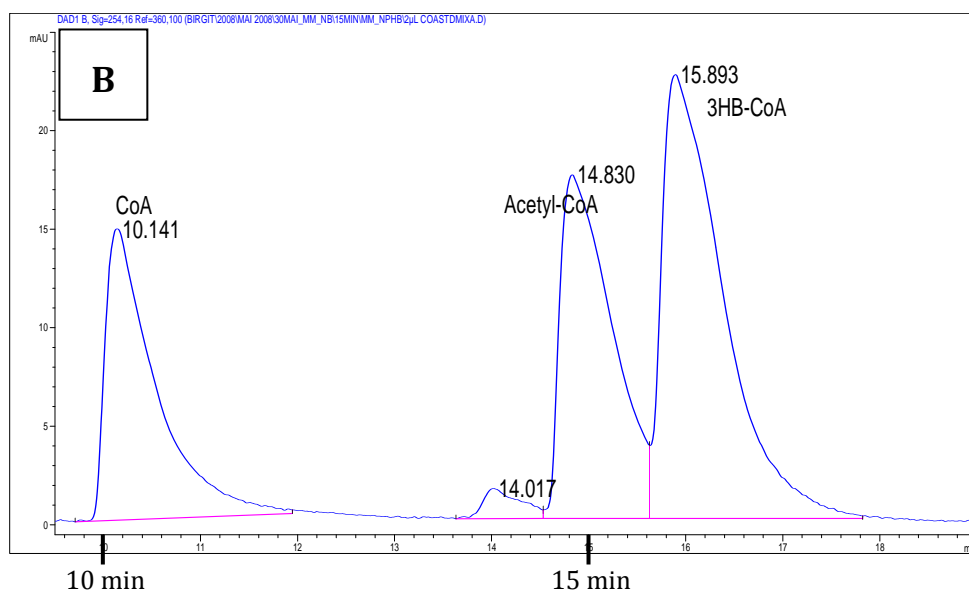
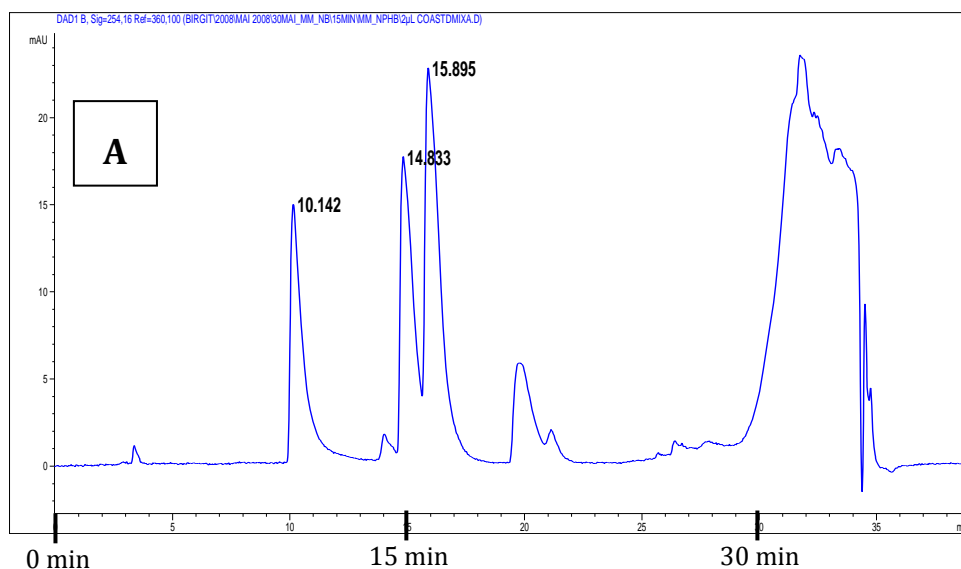


Abb. 50 HPLC-Chromatogramme (A: Übersicht, B: Ausschnitt) CoA-Ester-Standards (März 2008): Blau: Mischung CoA und Acetyl-CoA, Auftrag: 4µl, Rot: Mischung Acetyl-CoA und 3HB-CoA, Auftrag auf HPLC: 4µl. HPLC-Methode: „CoA-Ester“.



CoA: 10,14 min Acetyl-CoA: 14,83 min 3HB-CoA: 15,89 min

Abb. 51 HPLC-Chromatogramm (A: Übersicht, B: Ausschnitt) CoA-Ester-Standards (Mai 2008): Mischung aus CoA, Acetyl-CoA und 3HB-CoA (je 0,5 mM), Auftrag auf HPLC 2µl, Methode: „CoA-Ester“.

Reines CoA eluiert somit je nach Säulenzustand nach 10,1 bis 11,1 Minuten, Acetyl-CoA nach 14,8 -16,2 Minuten und 3HB-CoA wird nach 15,9 – 17,4 Minuten detektiert. Die zeitliche Differenz zwischen den einzelnen Substanzen bleibt dabei jedoch fast gleich. CoA ist bei Thiolyseansätzen immer im Überschuss vorhanden. Es kann daher als interner Standard genutzt werden, um Acetyl-CoA (Elution 4,7 – 5,1 Min nach CoA) oder 3HB-CoA (5,8 – 6,3 Min nach CoA) zu identifizieren.

Zur Quantifizierung der gebildeten Produkte bzw. zur Messung der Abnahme des Substrates CoA wurden entsprechende Kalibriergeraden aufgestellt. Der Umrechnungsfaktor „Flächeneinheiten (FE) in nmol“ wurde aus der Geradensteigung im linear ansteigenden Bereich berechnet. In allen Fällen verschob sich mit zunehmender Konzentration durch den breiteren Peak die Peakspitze und somit die angegebene Retentionszeit. Die Kalibriergerade für CoA zeigt bis 50 nmol einen linearen Verlauf, so dass Proben mit höheren Konzentrationen verdünnt und wiederholt werden müssen. Auch die Bestimmung der Acetyl-CoA-Menge ist nur bis zu einem Auftrag von 50 nmol möglich. Für

3HB-CoA können bis zu 20 nmol aufgetragen werden und über den errechneten Faktor quantitativ genau bestimmt werden. Höhere Konzentrationen wurde in diesem Fall nicht getestet.

Dass das Auftragsvolumen von 1 bis 10 µl keinen Einfluss auf die Peakstruktur hat, zeigt Abbildung 56. Hier wurden je zwei HPLC-Läufe mit der gleichen Substratmenge an 3HB-CoA gestartet. Aber durch den Einsatz einmal von 1 mM und zum anderen 10 mM 3HB-CoA-Stammlösung variierte das Volumen der Doppelproben um den Faktor 10. Die Anzahl der Flächeneinheiten (FE) stimmt jedoch im Rahmen der Standardabweichung überein.

CoA: 9,7min-10,2min

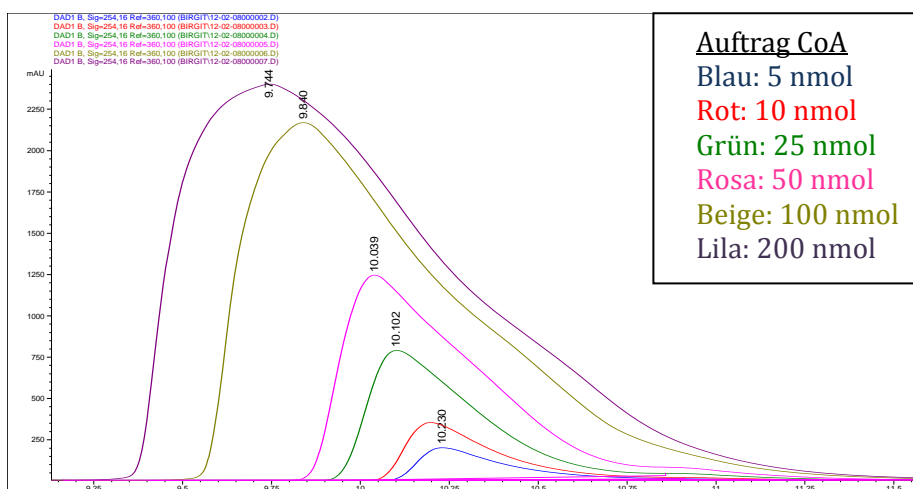
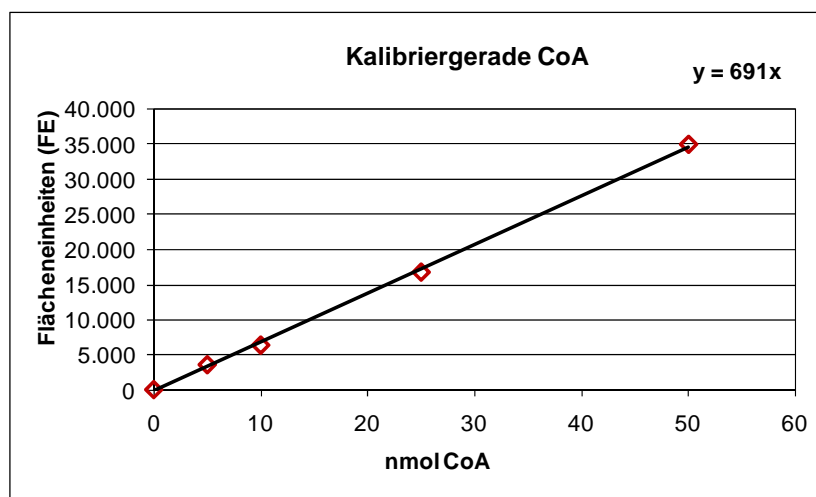


Abb. 52 HPLC-Chromatogramm: Kalibriergerade mit CoA-Standard. Auftrag 5, 10, 25, 50, 100 und 200 nmol CoA. Auftragsvolumen verschieden konzentrierter CoA-Standards: 5 µl. Methode: „CoA-Ester“.



1 nmol CoA = 691 FE
1000 FE = 1,45 nmol CoA

Abb. 53 Kalibriergerade mit CoA-Standard. Auftrag 5, 10, 25, 50, 100 und 200 nmol CoA. Auftragsvolumen verschieden konzentrierter CoA-Standards: 5 µl. Berechnung der Geradensteigung durch Excel. HPLC-Methode: „CoA-Ester“.

Acetyl-CoA: 15,1 min - 15,9 min

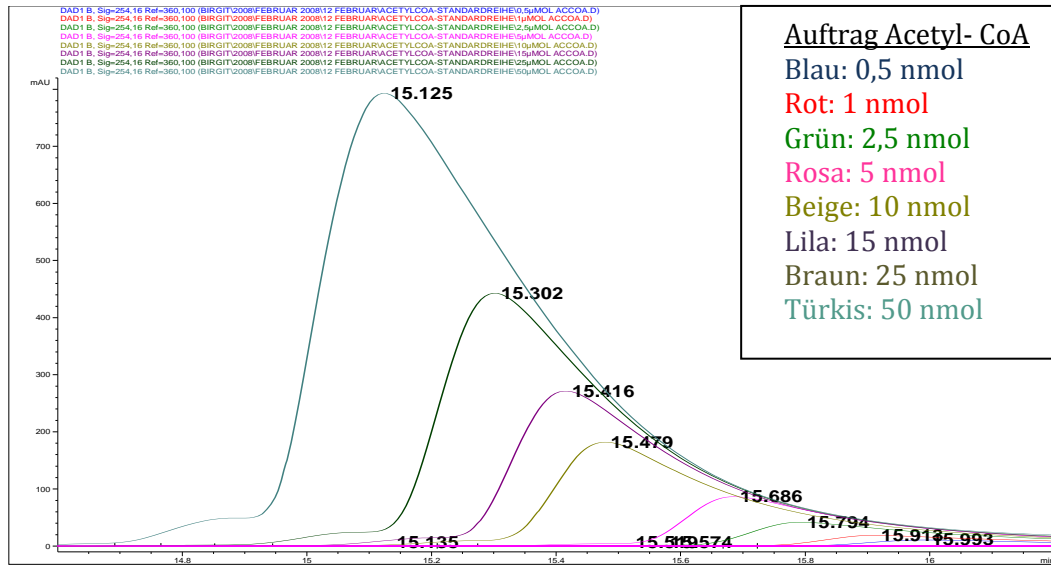
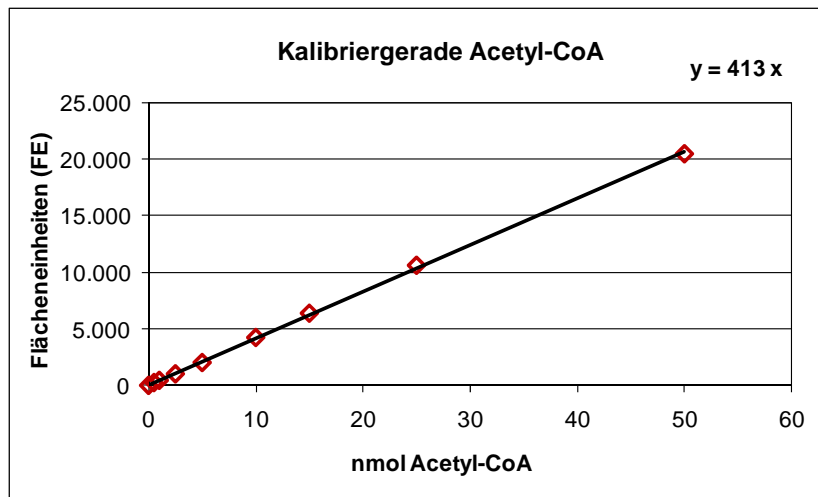


Abb. 54 HPLC-Chromatogramm: Kalibriergerade mit Acetyl-CoA-Standard. Auftrag 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15; 25 und 50 nmol Acetyl-CoA. Methode: „CoA-Ester“. Auftragsvolumen verschieden konzentrierter Acetyl-CoA-Standards. Auftrag: 5 μ l.



1 nmol Acetyl-CoA = 413 FE
 1000 FE = 2,42 nmol Acetyl-CoA

Abb. 55 HPLC-Kalibriergerade mit Acetyl-CoA-Standard. Auftrag 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15; 25 und 50 nmol Co. Berechnung der Geradensteigung durch Excel.

3HB-CoA: 16,9 min - 17,4 min

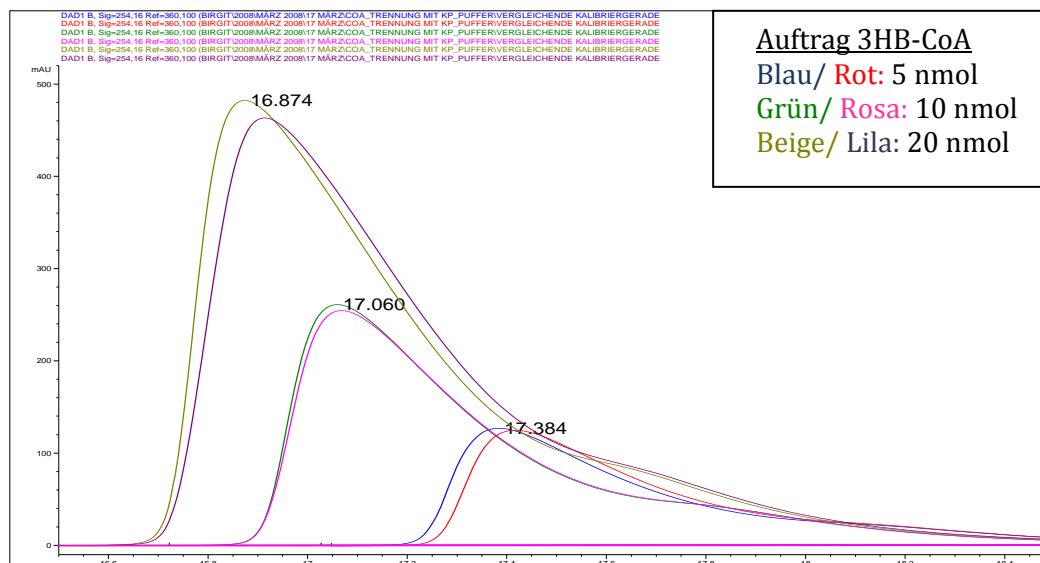
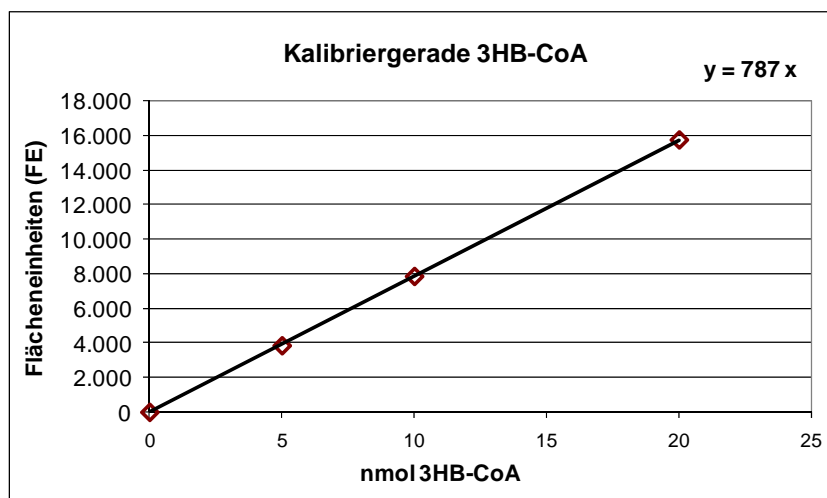


Abb. 56 HPLC-Chromatogramm: Kalibriergerade mit 3HB-CoA-Standard. Zweimal Auftrag 5 nmol (0,5µl 10mM und 5µl 1mM), 10 nmol (1µl 10mM und 10µl 1mM) und 20 nmol CoA (2µl 10mM und 20µl 1mM). HPLC-Methode: „CoA-Ester“.



1 nmol 3HB-CoA = 786 FE
1000 FE = 1,3 nmol 3HB-CoA

Abb. 57 Kalibriergerade mit 3HB-CoA-Standard. Auftrag 5, 10, 25, 50, 100 und 200 nmol CoA Auftragsvolumen verschieden konzentrierter CoA-Standards: 5 µl. Berechnung der Geradensteigung durch Excel. HPLC-Methode: „CoA-Ester“.

3.5.3.2 Nachweis BP-3HB und BP-Acetat (HPLC-Analyse)

Die Bestimmung der 3HB-Konzentration per HPLC ermöglicht im Vergleich mit dem oben beschriebenen enzymatischen Test zusätzlich die Analyse auf Acetat als 3HB-Folgeprodukt. 100µl der entnommenen Hydrolyse- bzw. Thiolyseproben (nPHB aus *R. eutropha* Wt, Δ phaP1 und Δ phaZa1) wurde daher derivatisiert und mit der HPLC-Standardmethode „40% MetOH“ auf die beiden Produkte hin untersucht.

Abbildung 58 zeigt ein Overlay von HPLC-Chromatogrammen von 3HB und Acetat, jeweils nach Derivatisierung mit BPB. Die blauen Peaks zeigen die Trennung der Substanzen aus einem Gemisch von 3HB und Acetat. Der rote Peak stammt vom reinen 3HB-BP-Standard, der grüne Peak von Acetat-BP-Standard. Man erkennt, dass das Acetat-Derivat 0,5 min nach dem 3HB-Derivat eluiert.

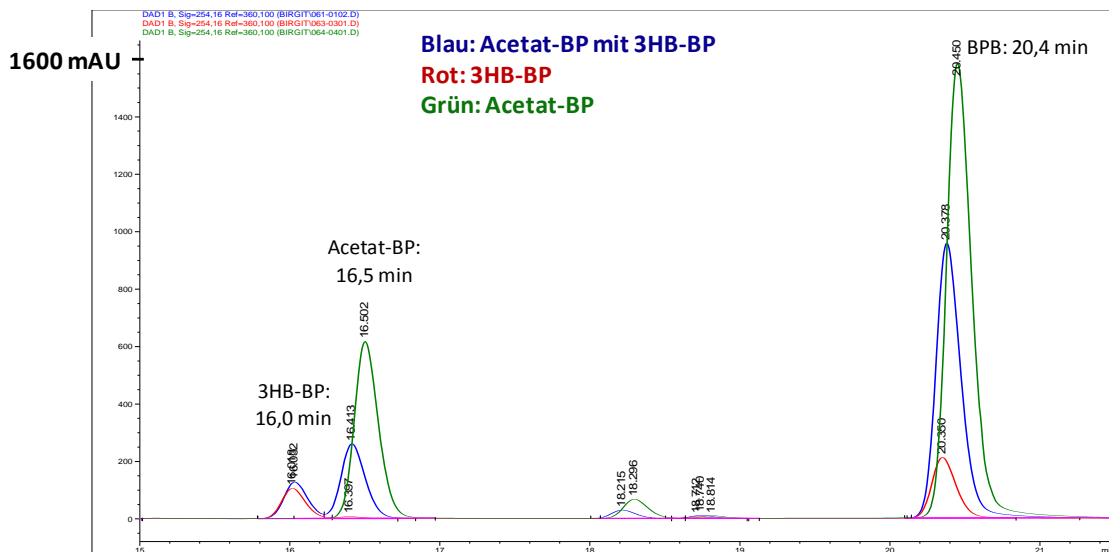


Abb. 58 Overlay HPLC-Chromatogramme. Blau: Mischung 3HB-BP und Acetat-BP (Verhältnis 1:1, 0,5µl), Rot: Grün: 3HB-BP-Standard. Rot: Acetat-BP-Standard. HPLC-Methode: „40%MetOH“.

Die Auftrennung der 3HB-Oligomere vom Monomer bis zum Oktamer mit der 40%MetOH-Methode ist in Kapitel 3.2.2.2. in Abbildung 13 gezeigt.

3.5.4 Charakterisierung der Thiolyse (*nPHB R. eutropha ΔphaZa1*)

Weiter hinten, in Kapitel 3.7, wird ausführlich die Isolierung der intrazellulären Depolymerase PhaZa1 von *R. eutropha* beschrieben. Dazu wurde ein bereits vorhandener und für PhaZa1 rekombinanter *E. coli*-Stamm kultiviert und das Protein über his-tag per Nickel-Agarose aus dem Zellaufschluss isoliert. Das in den folgenden Versuchen eingesetzte PhaZa1 stammt aus diesen Aufreinigungen.

3.5.4.1 HPLC-Chromatogramm einer Thiolyse-Probe

Die Standard-Chromatogramme in Kapitel 3.5.3 haben bereits gezeigt, zu welchen Zeiten und in welcher Peakform CoA, 3-HB-CoA und Acetyl-CoA eluieren. In Abbildung 59 ist nun die Analyse einer Thiolyse-Probe zu sehen. Nach Inkubation von nativen PHB-Granula im Standard-Thiolyseansatz (2.16.1) für 20 min und Zentrifugation wurden 5 µl des Überstandes in die HPLC injiziert und mit der CoA-Methode (2.18.2) analysiert.

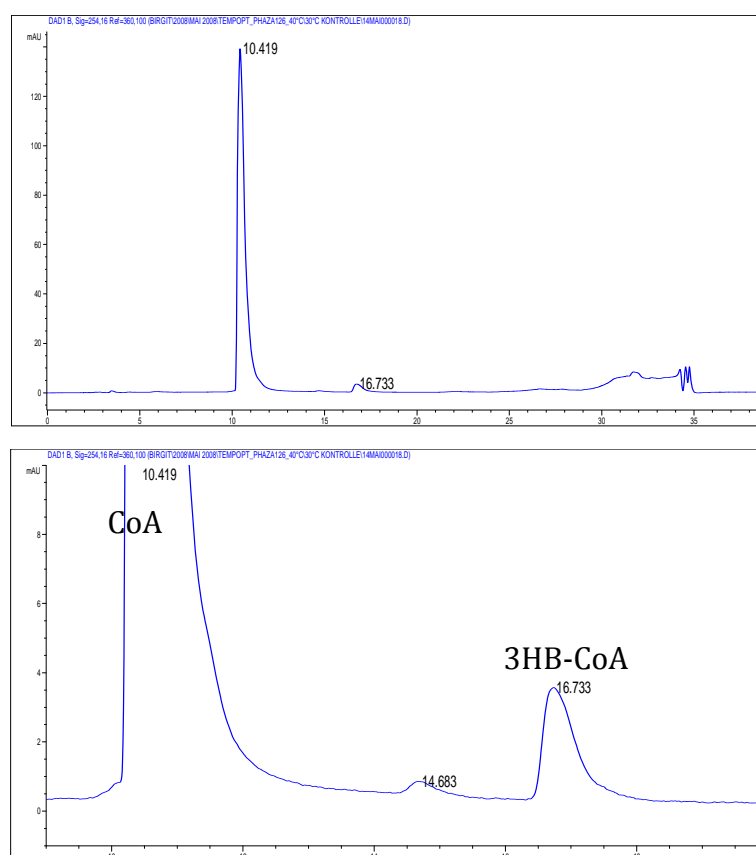


Abb. 59 HPLC-Chromatogramm: Analyse auf CoA-Ester aus Standard-Thiolyseansatz mit 5 mg PHB aus *R. eutropha ΔphaZa1*. Probenahme nach 20 min. A: Übersicht gesamtes Chromatogramm, B: Ausschnitt 9,5 – 16 min.

Das Chromatogramm zeigt neben freiem CoA (10,4 min) einen Elutionspeak nach 16,7 Minuten, hinter dem sich 3HB-CoA verbirgt. Bei dem sehr kleinen Peak nach rund 14,7 Minuten handelt es sich nicht um Acetyl-CoA. Es eluiert mit der angewandten HPLC-Methode nur rund eine Minute vor 3HB-CoA. Hier liegen jedoch zwei Minuten zwischen den beiden Verbindungen.

3.5.4.2 Temperaturabhängigkeit Thiolyse

Zur Temperaturabhängigkeit der Thiolysereaktion durch nPHB-Granula ohne Zugabe von rekombinantem PhaZa1 sei auf die Abbildung 121 in Kapitel 3.7.3 verwiesen. Hier werden die Aktivitäten verglichen von Ansätzen ohne PhaZa1 (Kontrolle) und mit Zugabe des Enzyms. Der Vergleich ergab, dass das Optimum der Thiolyse nativer PHB-Granula **ohne** Zugabe von isoliertem PhaZa1 bei 34°C liegt. Die Proben **mit 0,22 mg PhaZa1** zeigten die höchste Thiolyseaktivität bei 30°C.

3.5.4.3 pH-Optimum Thiolyse

Thiolyseansätze mit unterschiedlichem pH-Wert sollten Hinweise auf ein mögliches pH-Optimum liefern. In einem ersten Versuch wurde nPHB aus *R. eutropha* Wt (je Ansatz 165 mg nPHB, gewaschen) im 1ml-Thiolyseansatz (2.16.1) bei 30°C und folgenden pH-Werten inkubiert:

50mM KP-Puffer:	pH 6,0 / 6,5 / 7,0 / 7,5 / 8,0
50mM Tris-HCl-Puffer:	pH 7,5 / 8,0 / 8,5 / 9,0

Die Entnahme von je 100 µl Probe erfolgte nach 0 min, 60 min und 120 min. Nach Zentrifugation (14.000 rpm, 5 min) wurde der Überstand per HPLC auf die Bildung von Acetyl-CoA und 3-HB-CoA untersucht. Zu diesem Zeitpunkt der wissenschaftlichen Arbeit war die Auftrennung der beiden Esterverbindungen noch nicht optimiert, wie in den folgenden Chromatogrammen zu sehen ist. Durch den Einsatz interner Standards sowie anhand der Breite des Peaks (bei ca. 15 – 16 min) und teilweise sichtbarer Schulterbildung lässt sich aber bereits erkennen, dass sowohl nach 60 min als auch nach 120 min 3HB-CoA und Acetyl-CoA in der Probe vorhanden sind: Abbildung 56 zeigt das Chromatogramm der Thiolyseprobe nach 120 Minuten Inkubation bei pH 7 (KP-Puffer, blau). Darüber liegt in rot die gleiche Probe mit 3HB-CoA als internem Standard, der mit einem deutlichen Peak bei 15,9 min eluiert. Im Vergleich dazu zeigt Abb. 57 die Thiolyseprobe bei pH 8,5 (120 min, Tris-HCl-Puffer, blau) sowie im Overlay die gleiche Probe mit internem Acetyl-CoA-Standard. Auch hier zeigt sich deutlich, dessen Elutionszeitpunkt: 14,9 min. Aus bisher ungeklärten Gründen wird beim Lauf von Acetyl-CoA-Standard immer zusätzlich nach rund 20 min ein zweiter Peak detektiert. Dies wurde bei HPLC-Analysen der Reinsubstanz von drei verschiedenen Herstellern reproduziert.

3HB-CoA als interner Standard

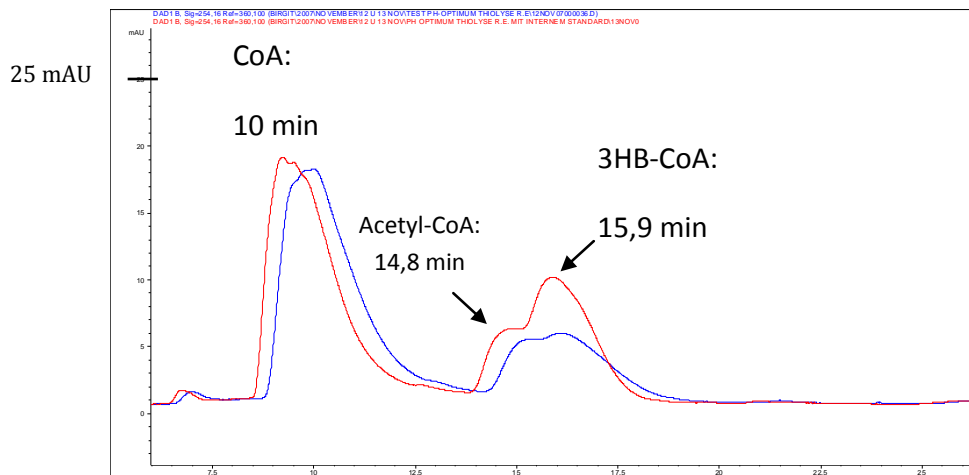


Abb. 60 Overlay HPLC-Chromatogramme: Thiolyseansatz nPHB *R. eutropha* Wt in 50mM KP-Puffer, pH 7: 120 min-Probe ohne (blau) und mit (rot) 0,5 mM 3HB-CoA als internen Standard

Acetyl-CoA als interner Standard

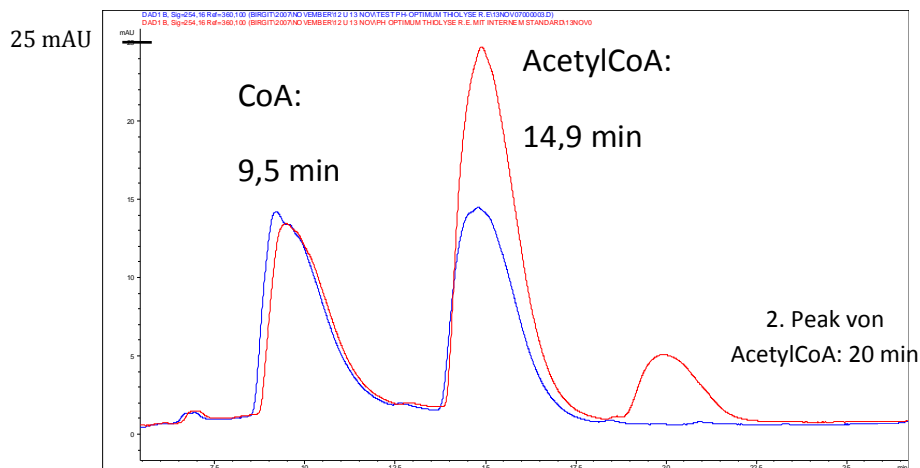


Abb. 61 Overlay HPLC-Chromatogramme: Thiolyseansatz nPHB *R. eutropha* Wt in 50mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,5: 120 min-Probe ohne (blau) und mit (rot) 0,5 mM Acetyl-CoA als internen Standard

Für die beiden Proben von pH 7 und pH 8,5 ergibt die Analyse, dass bei pH 7 (KP-Puffer) nach 120 Minuten sowohl 3HB-CoA als auch Acetyl-CoA vorhanden sind. Bei pH 8,5 (Tris-HCl-Puffer) scheint nach dieser Inkubationszeit nur Acetyl-CoA vorzuliegen. Die Abbildungen 58 und 59 zeigen die Chromatogramme des gesamten getesteten pH-Bereiches von pH 6 – 8 (KP-Puffer) sowie pH 7,5 – 9 (Tris-HCl-Puffer). Niedrigere bzw. höhere pH-Werte wurden hier nicht untersucht, da sie außerhalb der physiologischen Bedingungen von *R. eutropha* liegen.

Spätere Versuche haben gezeigt, dass die Thiolysereaktion bereits nach 30 - 45 min deutlich nachlässt. Daher werden im Folgenden nicht 120 min-Proben sondern nur die 60 min-Proben dieser Versuchsreihe gezeigt.

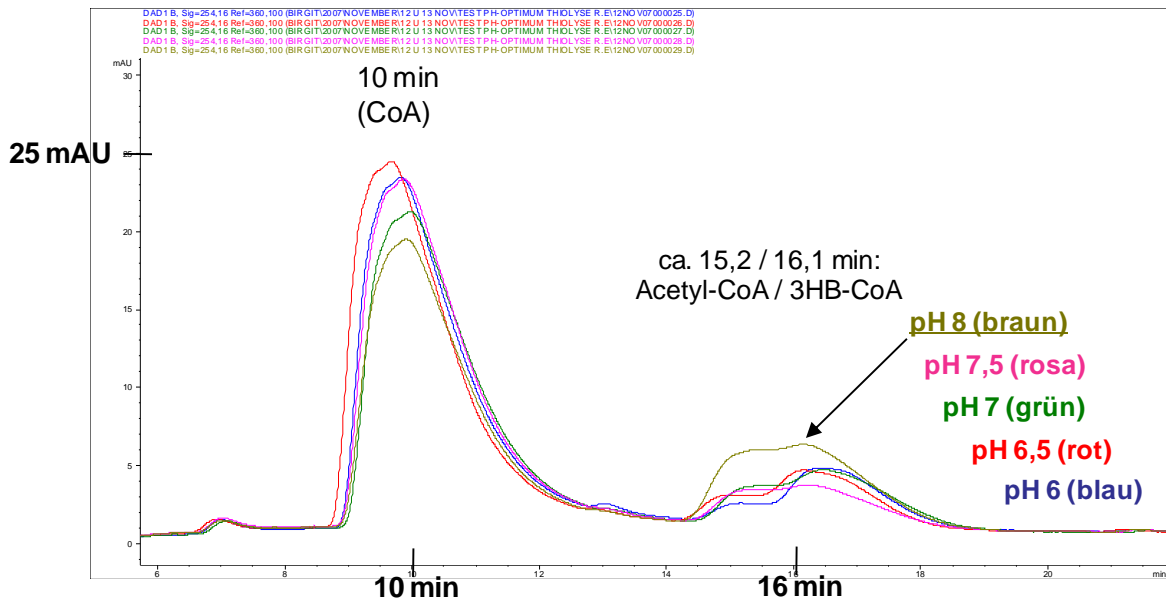


Abb. 62 Overlay HPLC-Chromatogramme 60 min-Proben Thiolyseansatz (1ml) mit 165 mg nPHB aus *R. eutropha* H16 Wt (gewaschen). Inkubation in 50 mM KP-Puffer bei pH 6 / 6,5 / 7 / 7,5 / 8.

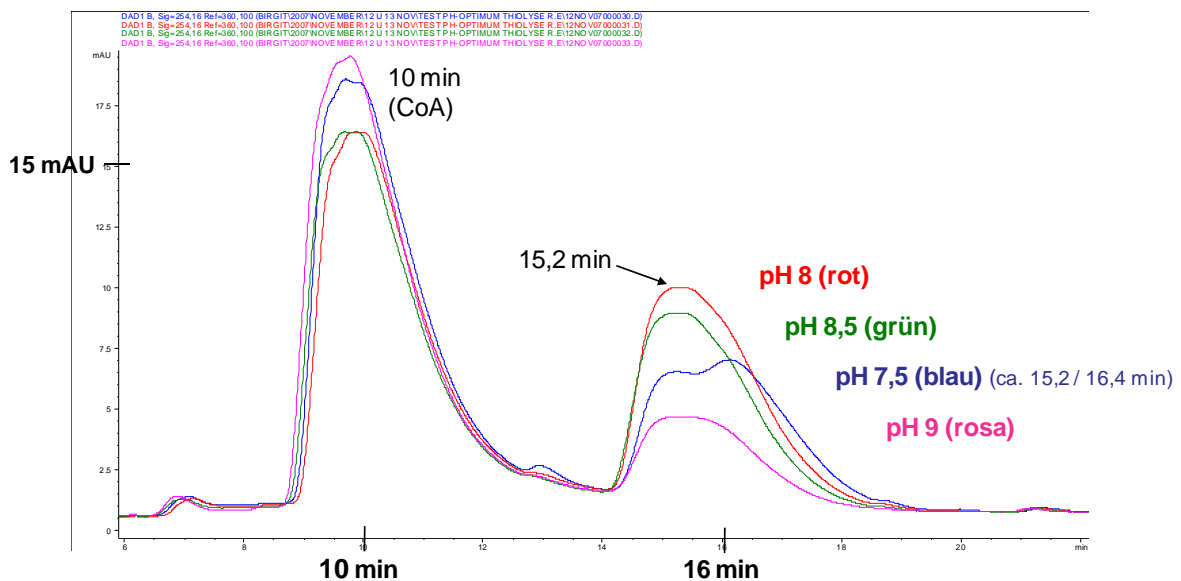


Abb. 63 Overlay HPLC-Chromatogramme 60 min-Proben Thiolyseansatz (1ml) mit 165 mg nPHB aus *R. eutropha* H16 Wt (gewaschen). Inkubation in 50 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,5 / 8 / 8,5 / 9.

Die Analyse der Proben aus Ansätzen mit pH 6 bis pH 9 zeigen auf den ersten Blick den größten Produkt-Peak bei pH 8. Dies gilt für die Inkubation in KP-Puffer (Abb. 62) sowie in Tris-HCl-Puffer (Abb. 63). Auf den zweiten Blick wird aber deutlich, dass es sich hierbei zum Großteil um die Bildung von Acetyl-CoA handelt, vermutlich ein Sekundärprodukt der Thiolyse, aus 3HB-CoA entstanden. Die Analyse der Ansätze mit pH 6 bis pH 7,5 in KP-Puffer lässt zwischen 15 min und 17 min zwei Peakspitzen erkennen (Abb. 62). Das gleiche gilt für die Probe mit TrisHCl-Puffer bei pH 7,5 (Abb. 63). Liegt der pH-Wert bei 8, 8,5 oder pH 9 verschiebt sich die Produktbildung zu Acetyl-CoA (15,2 min). Betrachtet man jedoch die Summe der Produkte, also von Acetyl-CoA und 3HB-CoA, so liegt das Maximum bei pH 8, mit Tris-HCl- oder KP-Puffer.

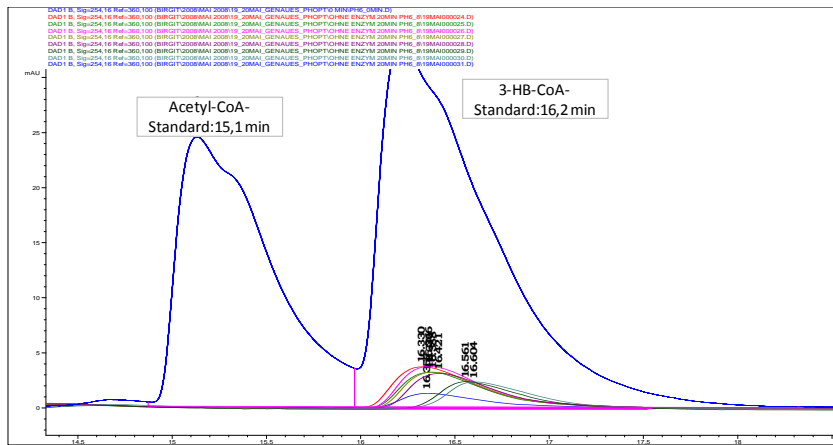
Eine differenziertere Bestimmung des pH-Optimums sollte mehr Klarheit schaffen, unter welchen Bedingungen das Primärprodukt der Thiolyse – 3HB-CoA – am besten gebildet wird. Nachdem klar war, dass die Aktivität nach 30 – 45 Minuten nicht mehr signifikant ansteigt, wurde die Probenahme auf nach 20 min und 40 min beschränkt (Abb. 64, 65). Zusätzlich wurde vom Ansatz mit pH 6 eine Probe nach 0 min als allgemeine Kontrolle entnommen. Jeweils 57 mg nPHB (gewaschen) aus *R. eutropha* Δ *phaZa1* wurden gemäß Abschnitt 2.16.1 bei 30°C inkubiert in:

50mM KP-Puffer pH 6,0 / 6,3 / 6,7 / 7,0 / 7,3 / 7,7 / 8

Der Probenüberstand wurde nach Zentrifugation (14.000 rpm, 5 min) per HPLC auf die Bildung von Acetyl-CoA und 3HB-CoA untersucht.

20 Minuten Inkubation

A



B

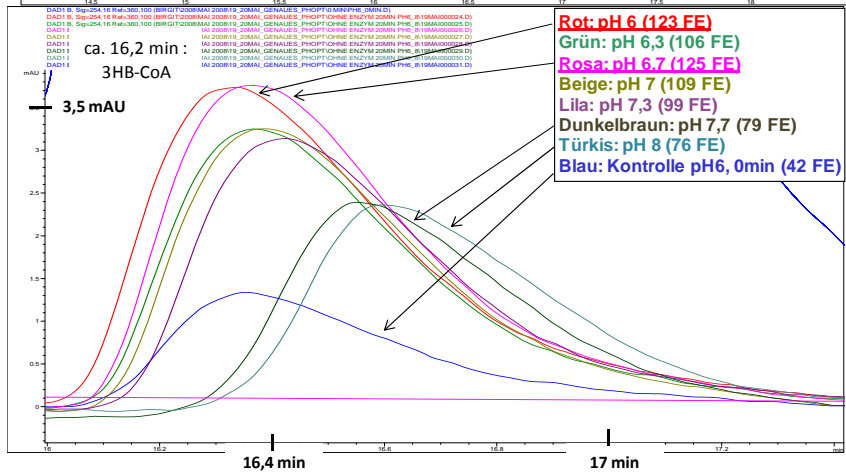


Abb. 64 Übersicht (A) und Detailausschnitt (B): Overlay HPLC-Chromatogramme: Standard (Acetyl-CoA und 3HB-CoA) und Untersuchung pH-Optimum der Thiolase mit nPHB aus *R. eutropha* Δ phaZa. Ansätze in 50 mM KP-Puffer mit pH 6 / 6,3 / 6,7 / 7,0 / 7,3 / 7,7 / 8. Probenahme nach 20 min Inkubation im 1ml-Ansatz bei 30°C.

40 Minuten Inkubation

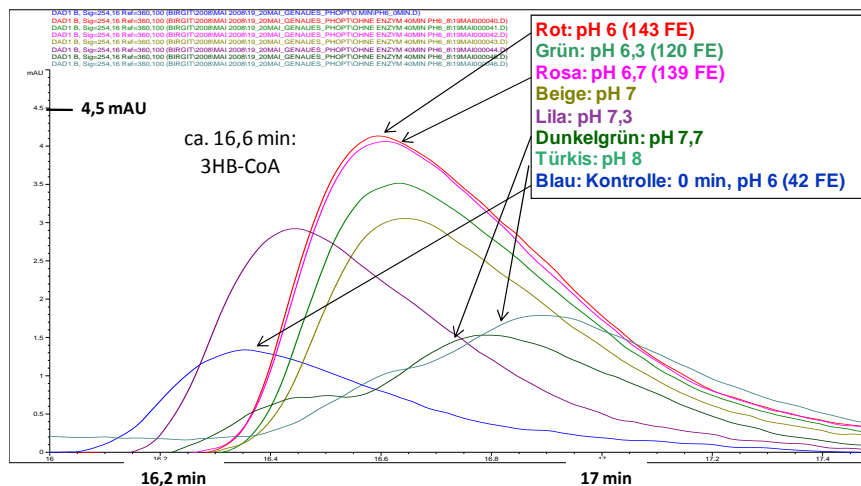


Abb. 65 Detailausschnitt Probenahme nach 40 min Inkubation: HPLC-Chromatogramm Untersuchung pH-Optimum der Thiolase mit nPHB aus *R. eutropha* Δ phaZa. Ansätze in 50mM KP-Puffer mit pH 6 / 6,3 / 6,7 / 7,0 / 7,3 / 7,7 / 8. Inkubation im 1ml-Ansatz bei 30°C.

Das Overlay der Standards mit den Proben (Abb. 64 A) macht deutlich, dass es sich bei den Probenpeaks eindeutig um 3HB-CoA handelt und kein AcetylCoA vorhanden ist. Dessen Bildung scheint erst später als 40 min einzusetzen. Die höchste 3HB-CoA-Konzentration wurde in den Ansätzen mit pH 6 und pH 6,7 detektiert, sowohl nach 20 min als auch 40 min Inkubation. Der Abstand zur 3HB-CoA-Menge bei pH 6,3 und pH 7 ist jedoch sehr gering. Als optimal für die thiolytische Bildung von 3HB-CoA kann daher der Bereich zwischen pH 6 und pH 7 bezeichnet werden. Zwischenzeitlich waren bereits zahlreiche Versuche bei pH 7 durchgeführt worden. Um diese weiterhin als Vergleichsdaten nutzen zu können, wurde dieser Wert beibehalten und als Standard-pH eingeführt.

3.5.4.4 Substratsättigung der Thiolyse (CoA)

Es sollte geprüft werden, wann die Sättigung der in-vitro-Thiolyse erreicht ist und wo das Reaktionsoptimum liegt. Dazu wurden Ansätze mit verschiedenen CoA-Konzentrationen auf die Bildung von 3-HB-CoA und Acetyl-CoA getestet.

160 mg nPHB in Glycerin (= 9,2 mg reines PHB) (*R. eutropha* Wt) wurden in einem 500µl-Ansatz in 50mM Tris-HCl, pH 8 und 1mM DTT mit 0,05 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 und 2mM CoA für 120 min bei 30°C inkubiert. Zu Beginn, nach 60 und 120 min wurden jeweils 100µl Probe entnommen und der Überstand nach Zentrifugation per HPLC auf die Menge an entstandenem AcetylCoA und 3HB-CoA untersucht (Abb. 66).

Die vier zu testenden CoA-Konzentrationen erkennt man deutlich an den verschieden großen Peaks bei 9 Minuten. Ab einer CoA-Konzentration von 0,25 mM taucht nach 60 Minuten bei ca. 14,6 Minuten der erste Peak auf. Je mehr CoA ein Ansatz enthält, desto größer ist auch dieser Peak, bei dem es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um 3HB-CoA handelt. Zu diesem Zeitpunkt war die Trennung der beiden CoA-Ester noch nicht optimiert. Aber auch falls ein Teil des Peaks durch das sehr ähnlich eluierende Acetyl-CoA verursacht ist, bestätigt dies die These, dass mehr CoA (bis 2 mM) zu mehr Thiolyseaktivität führt. Höhere Konzentrationen wurden nicht getestet, da sie außerhalb der physiologischen intrazellulären CoA-Mengen liegen (Boynton et al. 1994).

Wie bereits bei den Messungen zum pH-Optimum im Kapitel 3.5.4.3 ist bis zur 60 min-Probe eine deutliche Zunahme an 3HBCoA zu erkennen. Bis zur 120 min-Probe wird jedoch nur noch ein leichter Anstieg aber keine Verdopplung der 60 min-Menge mehr erreicht. Messungen bis 60 Minuten scheinen daher als letzte Messpunkte auszureichen.

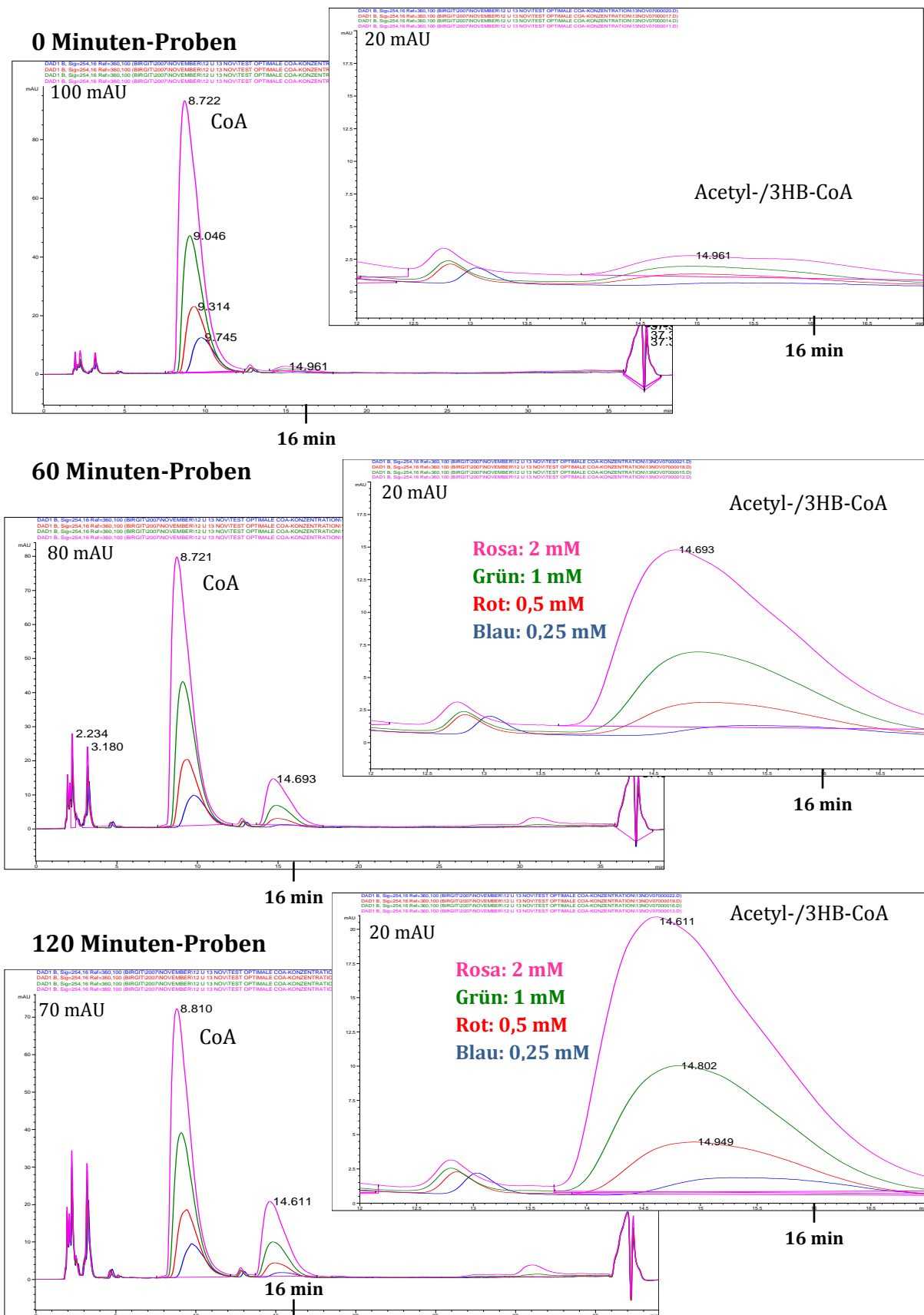


Abb. 66 Bestimmung Substratsättigung der Thiolase von nPHB (*R. eutropha* Wt). Overlay HPLC-Chromatogramme der Überstände von Thiolaseansätzen mit verschiedenen CoA-Konzentrationen (0,25 / 0,5 / 1 / 2 mM). Jeweils gesamtes Chromatogramm (links) und vergrößerter Ausschnitt (rechts). Probenahmen nach 0, 60 und 120 Min. Ansatzvolumen: 1 ml

3.5.4.5 Einfluss CoA auf Hydrolyseaktivität nativer PHB-Granula

Der Versuch zur Substratsättigung mit CoA wurde von Manuela Unsin später wiederholt und ausgebaut. Dabei wurden CoA-Konzentrationen bis 10 mM auf ihren Effekt gemäß der Standardansätze (Kapitel 2.16.1) auf die Thiolyse- und Hydrolysereaktion nativer PHB-Granula aus *R. eutropha* Wt getestet. Pro Thiolyseansatz wurden 160 mg Granula-Suspension gewaschen (siehe Kapitel 2.9), was 10 mg PHB entsprach. Das Pellet wurde in 50 µl 10% Glycerin (1mM Tris, pH 8) aufgenommen und entsprechend dem Standard-Thiolyseansatz mit Puffer, H₂O und CoA sowie 20 µl 100 mM CaCl₂ versetzt. Nach 0, 15, 30 und 60 Minuten wurden 100 µl Probe entnommen und 100 µl H₂O zugegeben. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 13.000 rpm (4°C) wurde der Überstand per HPLC auf die Bildung von CoA-Estern analysiert. Dabei wurden standardmäßig 5 µl injiziert, von der 60-Minuten-Probe nur 2,5 µl. Zudem wurden von jeder mit 100 µl Wasser verdünnten Probe 100 µl mit BPB derivatisiert (2.17.1) und ebenfalls per HPLC auf die Bildung von 3HB oder 3HB-Oligomeren untersucht.

Die Auswertung in Abbildung 67 bestätigt die vorherigen Versuche zur Substratsättigung mit CoA: die thiolytische Bildung von 3HB-CoA nimmt mit bis zu 2mM CoA (violett) im Reaktionsansatz noch zu. Höhere Konzentrationen von 5mM (grün) oder 10mM (rot) CoA haben jedoch keinen steigernden sondern bereits einen hemmenden Effekt auf die Produktbildung.

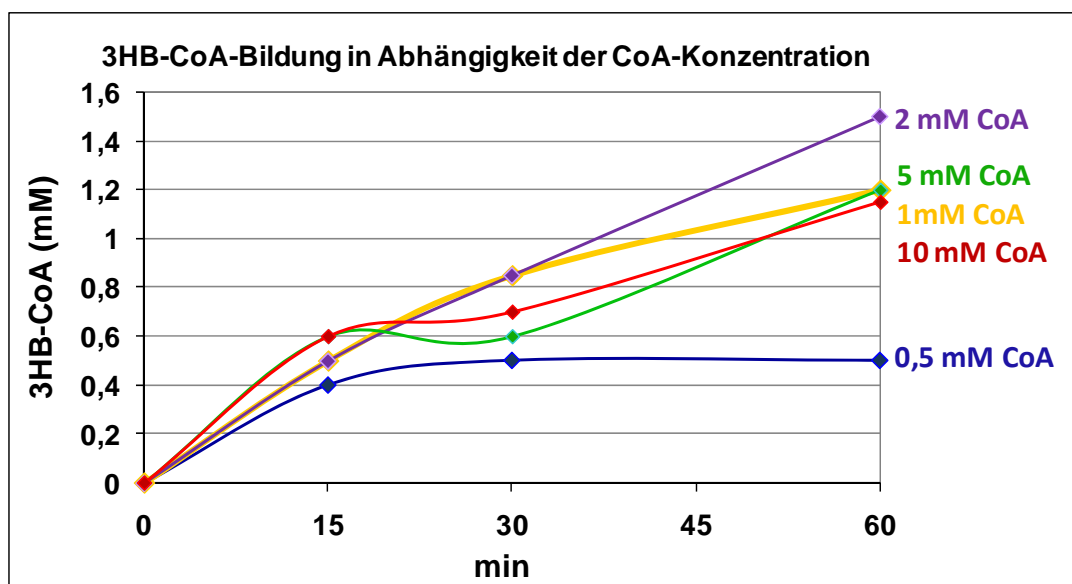


Abb. 67 Bestimmung Substratsättigung der Thiolyse / der 3HB-CoA Bildung von nPHB (*R. eutropha* Wt). Einsatz verschiedener CoA-Konzentrationen (0,5 / 1 / 2 / 5 / 10 mM).

Eine auffällige Wirkung hat das CoA auch auf die Entstehung des Hydrolyseproduktes 3HB (Abb. 68). Auch im sogenannten Thiolyseansatz mit CoA kann es immer auch detektiert werden. Interessant ist jedoch die deutlich zu erkennende Abhängigkeit von der CoA-Konzentration. Dabei wird mit 0,5 mM CoA (blau) und 1mM CoA (gelb) sogar mehr 3HB gebildet, als ganz ohne CoA im Standard-Hydrolyseansatz (türkis). Liegt die Konzentration an CoA jedoch bei 2mM (violett) oder höher bei 5mM (grün) oder 10mM (rot), scheint es die Hydrolyse und ihr Produkt 3HB zu hemmen.

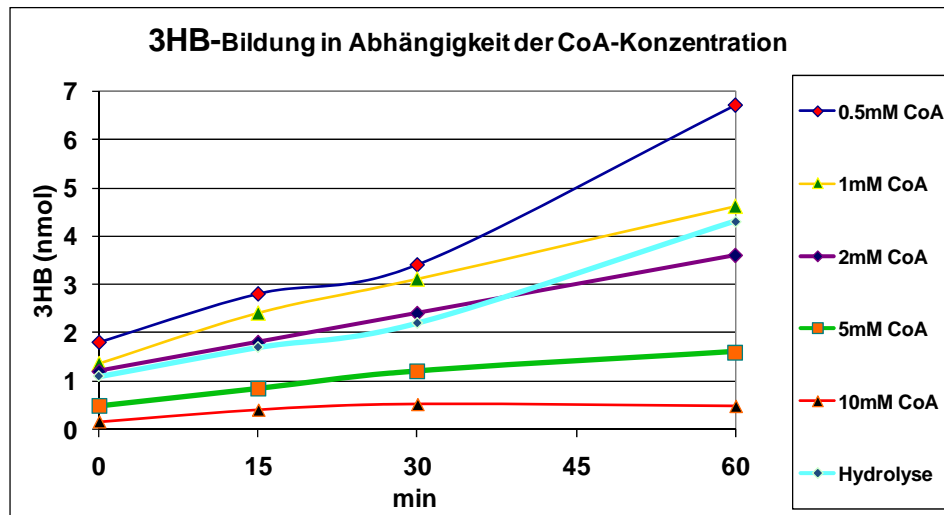


Abb. 68 Bestimmung Einfluss verschiedener CoA-Konzentrationen auf die Hydrolyse / 3HB-Bildung von *nPHB* (*R. eutropha* Wt). Einsatz von 0,5 / 1 / 2 / 5 / 10mM CoA.

3.5.5 Endogene Thiolyse und Hydrolyse von *R. eutropha* Wt / Δ phaP1 / Δ phaZa1

Welche Bedeutung die Thiolyse beim intrazellulären PHB-Abbau verglichen mit der Hydrolyse wirklich spielt, sollte mit den folgenden Versuchen untersucht werden. In dieser Versuchsreihe wurden daher native PHB-Granula aus drei parallel kultivierten *R. eutropha*-Stämmen jeweils auf ihre „endogenen“ Hydrolyse- und Thiolyse-Aktivität untersucht. „Endogen“ bedeutet, die gemessene Enzymaktivität stammt nur von den Granula selber - ohne Zugabe einer isolierten PHB-Depolymerase. Bei den Stämmen handelt es sich um *R. eutropha* Wildtyp sowie die Phasin-Mutante *R. eutropha* Δ phaP1 und die Depolymerase-Mutante *R. eutropha* Δ phaZa1. Um die Versuche quantitativ vergleichen zu können, wurden von allen drei Granulaisolaten gleiche mg-Mengen PHB eingesetzt. Die Anzucht der Kulturen, Isolierung der Granula sowie die Bestimmung „mg PHB pro g Glycerinsuspension“ sind im Methodenteil unter 2.3.1, 2.9 und 2.10 beschrieben. Die Enzymaktivitäten allerdings alleine auf die Masse des PHB zu beziehen, vernachlässigt die teilweise je nach Herkunft deutlich unterschiedliche Größe der Granula. Viele kleine Granula statt weniger großer besitzen eine größere Gesamtoberfläche, auf der somit theoretisch auch mehr Enzyme haften können. Aus diesem Grund wurden die Granula aus *R. eutropha* Wt, Δ phaZa1 und Δ phaP1 mittels Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) auf ihre Größenverteilung untersucht (2.20 bzw Tabelle 15).

Dabei zeigte sich, dass die durchschnittliche Größe der Granula isoliert aus Wildtypzellen nach 36 Stunden Kultivierung auf Mineralmedium 550 nm beträgt. Mit 620 nm liegt der Durchschnitt der Granula der Depolymerase-Mutante Δ phaZa1 in einem ähnlichen Bereich. Deutlich größer hingegen sind mit 1020 nm die Granula der Phasin-Mutante.

Die Bildung besonders großer Granula durch *R. eutropha* Δ phaP1 wurde zuerst in den Arbeiten von Pötter beschrieben (Dissertation M. Pötter, 2004). Auch wir konnten bereits vor der Ernte nach Nilrot-Färbung der Zellen (2.4) den Größenunterschied unter dem Fluoreszenz-Mikroskop erkennen. Im direkten Vergleich mit dem Wildtyp und der Depolymerase-Mutante zeigten die *R. eutropha* Δ phaP1-Granula zudem bei ihrer Isolierung im Glyceringradienten ein deutlich abweichendes Pelletierverhalten (Abb.69). Die Granula des Wildtypen und der Depolymerase-Mutante bilden im Bereich des 70%igen Glycerins jeweils eine knapp 3 cm breite weiße Bande.

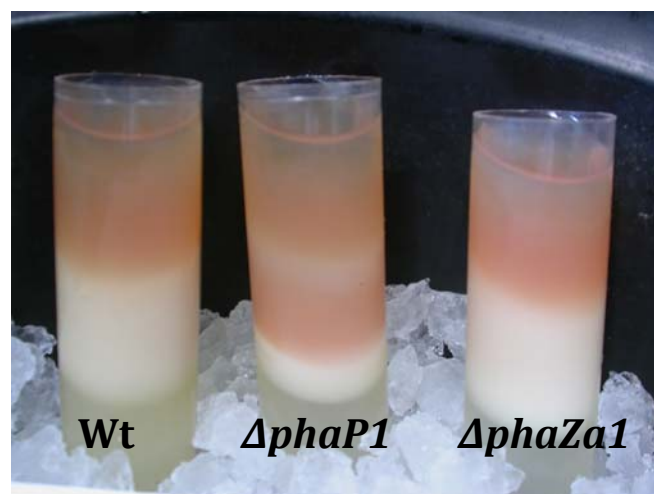


Abb. 69 nPHB-Granula im Glycerin-Gradienten (5 ml 87% - 10 ml 70% - 10 ml 50% Glycerin) nach Ultrazentrifugation. Aufgetragen wurden zuvor die Frenchpress-Extrakte von 5,75 g Zellen (Wt), 5,4 g (Δ phaP1) bzw 5,65 g (Δ phaZa1) (Feuchtgewicht). Dies entsprach pro Gradienten einem Volumen von rund 15 ml. Ultrazentrifugation (siehe Tab. 14) für 35 min bei 12.000 rpm, langsames Starten und Bremsen. Optima LE-80K Ultracentrifuge, Rotor SW-28, beides Beckman Coulter GmbH.

Das nPHB der Phasin-Mutante konzentriert sich hingegen im Grenzbereich 70% zu 87% Glycerin in einer deutlich schmalen (ca. 1 cm) Bande. Es scheint daher eine höhere Dichte zu besitzen als nPHB des Wildtypen und der $\Delta phaZa1$ -Mutante.

Ungewaschene Granula, direkt vom Gradienten abgenommen, werden mit einem hohen Anteil an Glycerin (ca. 60-70 %) isoliert, in dem vermutlich auch Proteine und andere Substanzen aus dem Cytoplasma enthalten sind. Diese könnten die Ergebnisse der Thiolyse- und Hydrolysereaktionen verändern. Daher wurden fast alle Versuche parallel mit ungewaschenen und gewaschenen Granula durchgeführt. Die Thiolyseansätze wurden auf die Bildung von 3HB sowie 3HB-CoA analysiert, die Hydrolyseansätze nur auf ihre 3HB-Konzentration. Um die beiden gängigen Methoden der 3HB-Bestimmung zu vergleichen, geschah dies einmal mit Hilfe des 3HB-Dehydrogenase-Testes, parallel dazu nach Derivatisierung mit BPB per HPLC. Beim Test der beiden Methoden mit den gleichen Proben wurde festgestellt, dass der 3HB-Dehydrogenasetest um den Faktor 2,5 höhere Werte ergibt als die HPLC-Analyse. Der Hauptgrund liegt wahrscheinlich im Verlust von Produkt im Verlaufe der Derivatisierung. In den meist 100 μ l Probe befinden sich außerdem zahlreiche andere Stoffe, unter anderem Glycerin, die nach Inkubation bei 80°C und Zentrifugation ein Pellet bilden und einen gewissen Prozentsatz Produkt darin binden. Im Messverfahren des Enzymtestes kann weniger Produkt verloren gehen. Hier beschränkt sich die Fehlerquelle auf die Pipettiergenauigkeit und exakte Messung des Photometers.

Für die Probenahme wurde 30 Minuten als spätester Zeitpunkt gewählt, denn wie im Abschnitt 3.5.4 gezeigt ist, nimmt die Thiolyseaktivität nativer Granula schon nach 15-20 Minuten deutlich ab.

Für die folgenden Versuche wurden dem Ansatz dazu nach 0 Minuten (Kontrollwert), 15 und 30 Minuten Proben von je 250 μ l entnommen. Die Hydrolysen wurden zwei Mal parallel mit einem Gesamtvolumen von je 1 ml angesetzt und enthielten – wenn nicht anders angegeben – 50 mM KP-Puffer (pH 7), 5 mM $CaCl_2$ und 5 mg PHB. Die Thiolyseansätze enthalten zusätzlich 1 mM CoA. Je nach Konzentration der isolierten, ungewaschenen PHB-Granula beträgt der Anteil an Glycerin zwischen 8,7 % (w/v)(*R. eutropha* $\Delta phaP1$) und 37,9 % (w/v)(*B. megaterium*). Wird das nPHB gewaschen, ist kaum noch Glycerin enthalten (< 5 %).

3.5.5.1 Thiolyse-Versuche mit nPHB aus *R. eutropha* Wt / Δ phaP1 / Δ phaZa1

CoA-Ester-Bildung

nPHB ungewaschen

Die ungewaschenen Granula zeigen im HPLC-Chromatogramm für alle drei Stämme nach 15 und 30 Minuten zwei signifikante Peaks: Acetyl-CoA (14,3 min) und 3HB-CoA (15,4 min) (Abb. 70 und 71). Die Entstehung von Acetyl-CoA ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf den Abbau von 3HB-CoA zurückzuführen. Im Thiolyseansatz mit ungewaschenen PHB-Granula scheinen daher die entsprechenden Enzyme vorhanden zu sein.

In den Ansätzen mit Granula des Wildtypen und der Depolymerase-Mutante Δ phaZa1 konnte nach 15 und 30 Minuten deutlich mehr Acetyl-CoA als 3HB-CoA detektiert werden. So enthalten die 15 Minuten-Probe des Wildtypen 0,34 mM Acetyl-CoA und 0,05 mM 3HB-CoA, die Probe der Depolymerase-Mutante 0,35 mM Acetyl-CoA und 0,07 mM 3HB-CoA.

Ganz anders sieht hingegen die Verteilung in den Proben der Ansätze mit Granula der Phasin-Mutante aus: hier überwiegt im Produktspektrum deutlich 3HB-CoA mit 0,16 mM nach 15 Minuten und 0,34 mM nach 30 Minuten. Entsprechend ist der Anteil an Acetyl-CoA wesentlich geringer als bei Wt und Depolymerase-Mutante: nach 15 Minuten beträgt er 0,12 mM bzw. 0,26 mM nach 30 Minuten.

Ausschnitt: 15 Minuten-Probe

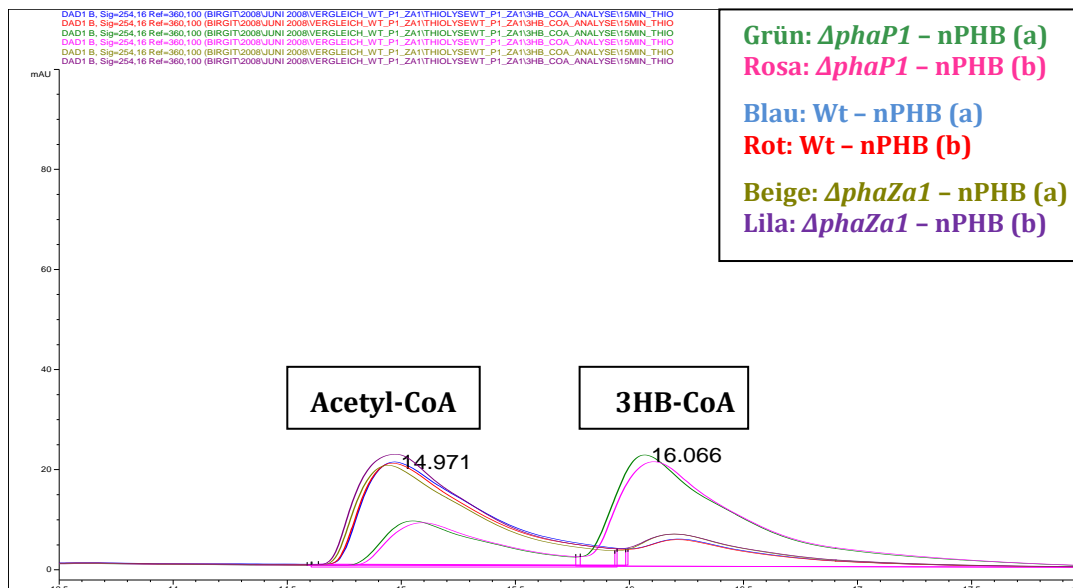


Abb. 70 HPLC-Chromatogramm: Produkte der Thiolyseansätze von je 5 mg PHB *R. eutropha* (Wt, Δ phaP1 und Δ phaZa1), ungewaschen, Inkubation 15 min. 5 mg PHB = Wt: 106 mg Glycerinsuspension, Δ phaP1: 88 mg, Δ phaZa1: 127,5 mg. $\bar{\phi}$ Wt-Granula = 547 nm, Polydispersionsindex (PDI) = 0,335, $\bar{\phi}$ Δ phaP1-Granula = 1024 nm, PDI=0,245. $\bar{\phi}$ Δ phaZa1-Granula = 618 nm, PDI = 0,192.

Ausschnitt: 30 Minuten-Probe

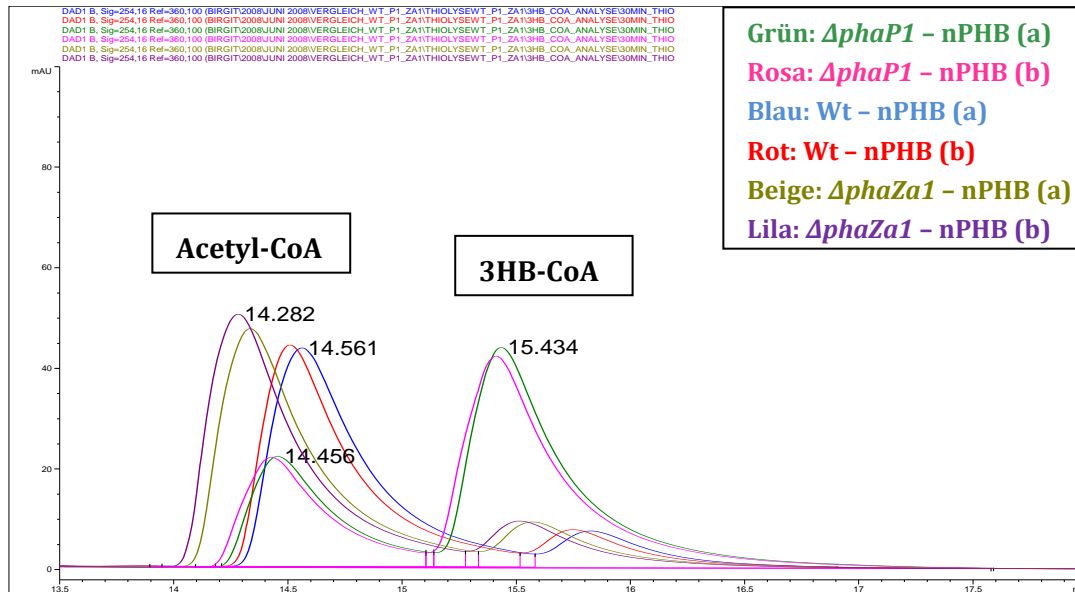


Abb. 71 HPLC-Chromatogramm: Produkte der Thiolysenansätze von nPHB *R. eutropha* (Wt, *ΔphaP1* und *ΔphaZa1*), ungewaschen, Inkubation 30 min. 5 mg PHB = Wt: 106 mg Glycerinsuspension, *ΔphaP1*: 88 mg, *ΔphaZa1*: 127,5 mg. $\bar{\phi}$ Wt-Granula = 547 nm, Polydispersionsindex (PDI) = 0,335, $\bar{\phi}$ *ΔphaP1*-Granula = 1024 nm, PDI = 0,245. $\bar{\phi}$ *ΔphaZa1*-Granula = 618 nm, PDI = 0,192.

Die beiden Balkendiagramme in Abb. 72 fassen die HPLC-Ergebnisse übersichtlich zusammen. Dadurch wird die unterschiedliche Produktbildung von nPHB aus *R. eutropha* Wt bzw. *ΔphaZa1* im Gegensatz zu nPHB der Phasinmutante deutlich. Diese bildet ähnlich viel 3HB-CoA (0,16 mM) wie Acetyl-CoA (0,12 mM). Mit nPHB aus dem Wildtypen und der Depolymerase-Mutante entsteht hingegen fast ausschließlich Acetyl-CoA.

Um Aussagen alleine zur thiolytischen Spaltung des PHB machen zu können, muss die Konzentration an gebildetem Acetyl-CoA auf die Menge seiner Vorläufersubstanz 3HB-CoA zurückgerechnet werden. Da aus einem 3HB-CoA zwei Acetyl-CoA entstehen können, entspricht 1/2 Acetyl-CoA-Konzentration der Menge an vorher entstandenem 3HB-CoA. Der Vergleich der einzelnen Produkte mit der Summe an 3HB-CoA-Äquivalenten in Abb. 72-A und 72-B macht deutlich, dass sich die Granula der drei Stämme im ersten Thiolyseschnitt wohl kaum unterscheiden. Nach 15 Minuten ist die Summe an 3HB-CoA-Äquivalenten mit 0,22 mM für Wt und *ΔphaP1* und 0,24 mM für die *phaZa1*-Mutante quasi identisch. Nach 30 Minuten sind es für die *phaZa1*-Mutante 15 % mehr (0,39 mM) als für den Wildtypen (0,34 mM), nPHB der *phaP1*-Mutante bildet nach 30 Minuten 38 % (0,47 mM) mehr Äquivalente als der Wildtyp.

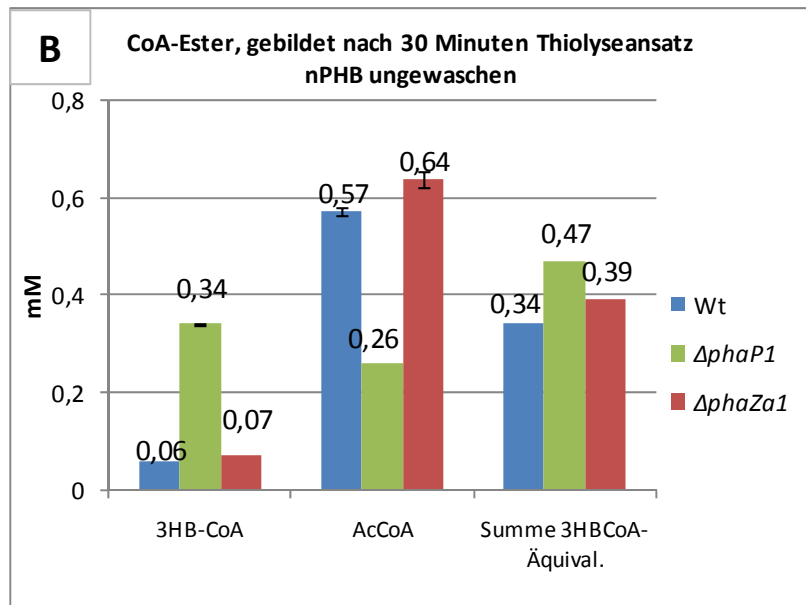
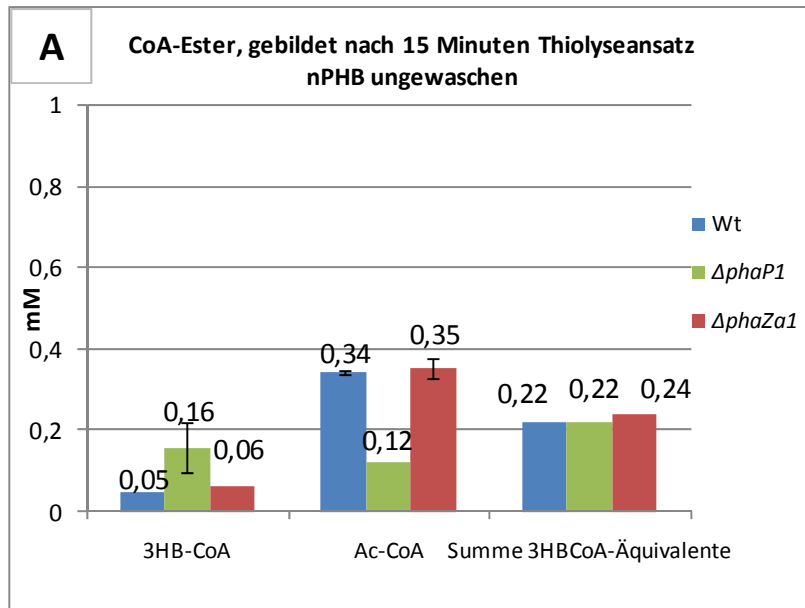


Abb. 72 Bildung von CoA-Estern im Thiolyseansatz mit nPHB (ungewaschen) aus *R. eutropha* Wt (blau), *R. eutropha* $\Delta phaP1$ (grün) und *R. eutropha* $\Delta phaZa1$ (rot). Probenanalyse per HPLC nach 15 Minuten (A) und 30 Minuten (B). Dritter Teil zeigt Gesamtproduktbildung, bei der der Acetyl-CoA-Anteil in 3HB-CoA-Äquivalente umgerechnet wurde (1x Acetyl-CoA = 0,5x 3HB-CoA). Daten sind Mittelwerte von zwei Parallelproben.

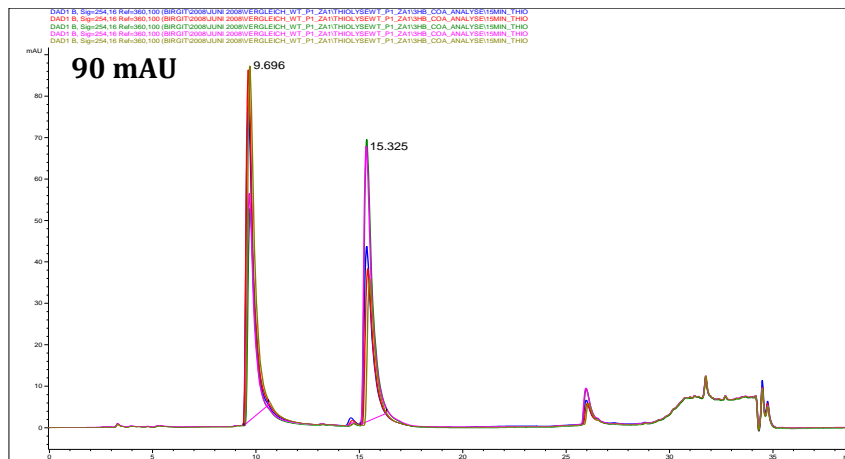
nPHB gewaschen

Die Thiolyse ungewaschener nPHB-Granula bringt neben 3HB-CoA auch dessen Abbauprodukt Acetyl-CoA hervor. Um zu klären, ob die dazu notwendige Aktivität im löslichen, Glycerin haltigen Überstand oder direkt an die Granula gebunden vorkommt, wurden die Thiolyseversuche zusätzlich mit gewaschenem nPHB durchgeführt:

Alle HPLC-Analysen zeigten nur ein Produkt: 3HB-CoA (15,3 min). Dies gilt für alle drei Proben mit nPHB aus *R. eutropha* Wt, Δ phaZa1 und Δ phaP1 und zwar sowohl für die Probenahme nach 15 Minuten als auch nach 30 Minuten Inkubation. Die 3HB-CoA Abbauenzyme scheinen also nicht an die nPHB-Oberfläche gebunden zu sein, sondern können durch vorsichtiges Waschen entfernt werden.

Wie bereits bei den Versuchen mit ungewaschenen Granula unterscheiden sich die Werte der beiden Parallelansätze nur geringfügig, was auf eine gute Reproduzierbarkeit schließen lässt.

A: Überblick 15 Minuten-Probe



B: Ausschnitt 15 Minuten-Probe

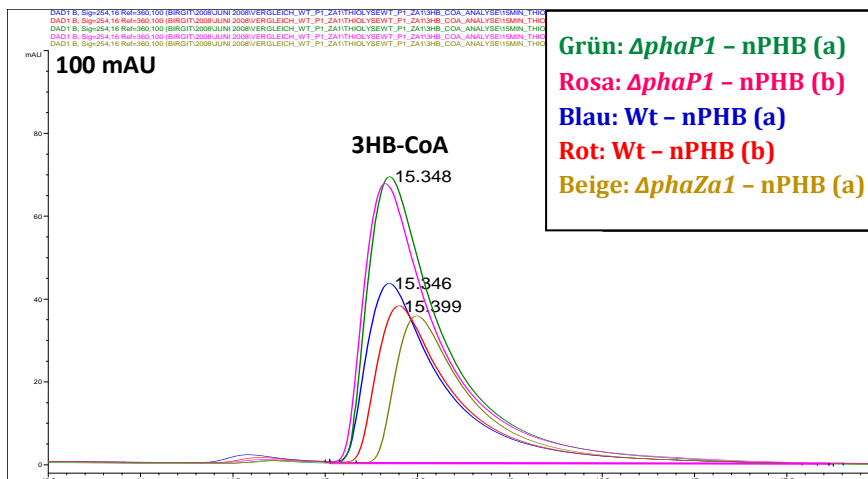


Abb. 73 Überblick (A) und Ausschnitt (B) HPLC-Chromatogramm: Produkte der Thiolyseansätze von nPHB *R. eutropha* (Wt, Δ phaP1 und Δ phaZa1), gewaschen, Inkubation 15 min. Einsatz je 5 mg PHB. Entspricht Glycerinsuspension: Wt: 106 mg, Δ phaP1: 88 mg, Δ phaZa1: 127,5 mg. $\bar{\phi}$ Wt-Granula = 547 nm, Polydispersionsindex (PDI) = 0,335, $\bar{\phi}$ Δ phaP1-Granula = 1024 nm, PDI = 0,245. $\bar{\phi}$ Δ phaZa1-Granula = 618 nm, PDI = 0,192.

Ausschnitt 30 Minuten-Probe

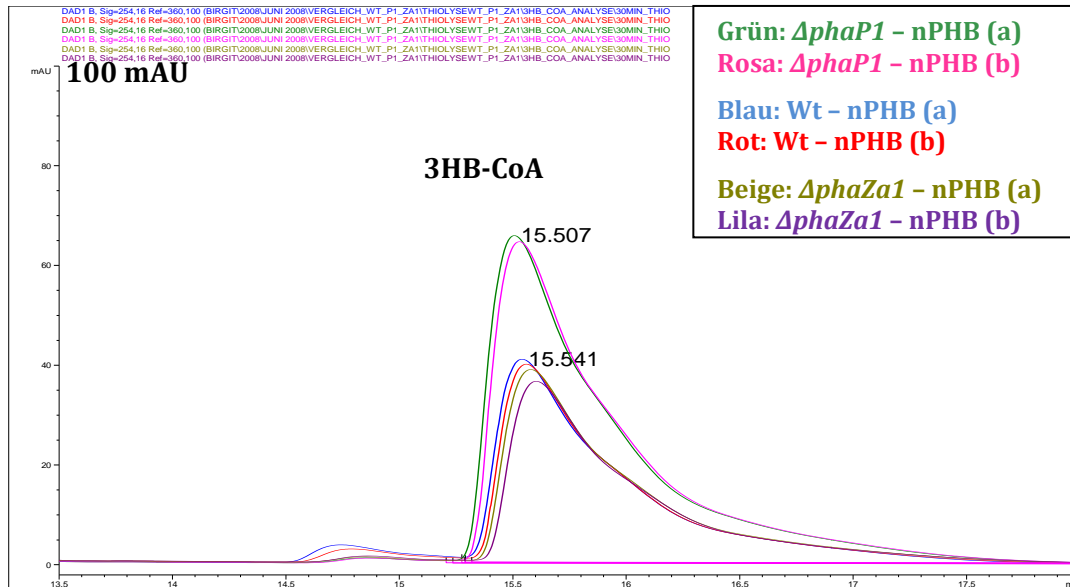


Abb. 74 Ausschnitt HPLC-Chromatogramm: Produkte der Thiolyseansätze von nPHB *R. eutropha* (Wt, *ΔphaP1* und *ΔphaZa1*), gewaschen, Inkubation 30 min. 5 mg PHB = Wt: 106 mg Glycerinsuspension (GlycSusp.), *ΔphaP1*: 88 mg, *ΔphaZa1*: 127,5 mg. $\bar{\phi}$ Wt-Granula = 547 nm, Polydispersionsindex (PDI) = 0,335, $\bar{\phi}$ *ΔphaP1*-Granula = 1024 nm, PDI=0,245. $\bar{\phi}$ *ΔphaZa1*- Granula = 618 nm, PDI = 0,192.

Nach 15 Minuten liegen die 3HB-CoA-Mengen von nPHB aus *R. eutropha* Wt und *ΔphaZa1* bei 0,32 mM und 0,27 mM und damit relativ nah beieinander. Die Granula der *ΔphaZa1*-Mutante bilden geringfügig weniger CoA-Ester. Zwischen 15 und 30 Minuten steigt die 3HB-CoA-Menge noch etwas an, bei Wt-Granula auf 0,4 mM, bei der Depolymerase-Mutante auf 0,37 mM. Die Thiolyseaktivitäten von nativen Granula der beiden Stämme zeigen nach diesen Ergebnissen keinen signifikanten Unterschied.

Die nativen Granula der Phasin-Mutante *R. eutropha ΔphaP1* bilden hingegen signifikant mehr 3HB-CoA. Die Konzentration liegt nach 15 Minuten mit 0,53 mM rund 70 % höher als bei Wildtyp und Depolymerase-Mutante. Zwischen 15 und 30 Minuten nimmt die Konzentration um gut 20 % auf 0,65 mM zu (Abb. 70):

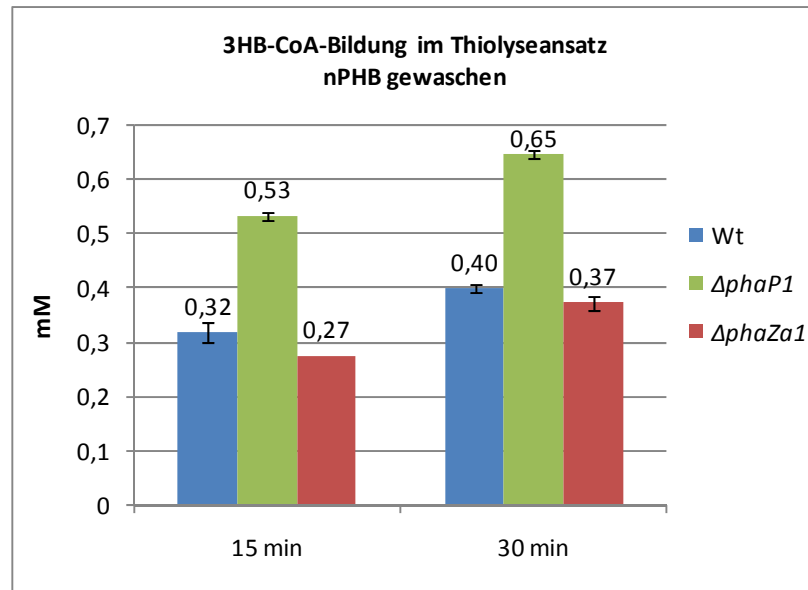


Abb. 75 Bildung von CoA-Estern im Thiolyseansatz mit nPHB (gewaschen) aus *R. eutropha* Wt (blau), *R. eutropha* $\Delta phaP1$ (grün) und *R. eutropha* $\Delta phaZa1$ (rot). 5 mg PHB = Wt: 106 mg Glycerinsuspension (GlycSusp.) , $\Delta phaP1$: 88 mg, $\Delta phaZa1$: 127,5 mg. Probenanalyse per HPLC (Methode „CoA-Ester“) nach 15 Minuten und 30 Minuten. Daten sind Mittelwerte von zwei Parallelproben.

Die Untersuchung der Thiolysereaktion mit nPHB der drei Stämme *R. eutropha* Wt, $\Delta phaZa1$ und $\Delta phaP1$ macht deutlich, dass sich die Granula der Phasin-Mutante von den beiden anderen signifikant unterscheiden. Liegen sie ungewaschen vor, so bilden sie 3HB-CoA und Acetyl-CoA zu ungefähr gleichen Anteilen. Mit nPHB des Wildtypen und der $\Delta phaZa1$ -Mutante hingegen ließ sich nur Acetyl-CoA nachweisen. Auf die Konzentration bezogen entsteht in der Summe in allen drei Ansätzen ungefähr gleich viel Produkt. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass der Bildung von zwei Molekülen Acetyl-CoA **nur eine PHB-Thiolysereaktion** und **ein 3HB-CoA** vorausgingen. Soll die PHB-Thiolyseaktivität der Depolymerase PhaZa1 untersucht werden, muss dies entsprechend beachtet werden.

In allen Thiolyseansätzen mit gewaschenem nPHB wurde als Produkt nur 3HB-CoA detektiert. Auch hier nahmen die Granula der Phasin-Mutante eine Sonderrolle ein. Sie bildeten rund 70% mehr 3HB-CoA im Vergleich mit nPHB aus *R. eutropha* Wt und *R. eutropha* $\Delta phaZa1$.

3HB-Bildung (3HB-DH-Test / HPLC-Analyse)

Die Thiolyseproben wurden sowohl über den Dehydrogenase-Test als auch per HPLC auf 3HB untersucht.

Für den Enzymtest wurden die jeweils 200µl Probe bei 5°C (Kühlraum) für 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert (Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter GmbH). Je nach erwarteter 3HB-Menge wurden 100µl unverdünnt oder bis zu 1:100 verdünnt in den Test eingesetzt. Durch Versuche mit 3HB-Standard-Lösung war zuvor der Einfluss von DTT und CoA aus dem Thiolyseansatz auf die Messgenauigkeit untersucht worden. Dabei konnte gezeigt werden, dass weder CoA noch DTT (jeweils max. 0,1 mM Endkonzentration im Test) die Analyse signifikant stören (3.5.1). Kurz darauf stellte sich im Rahmen von Hemmstofftests jedoch heraus, dass die Thiolyseaktivität zumindest des isolierten PhaZa1-Enzyms ohne DTT höher ist als im Standardansatz mit 1mM DTT. Daraufhin wurde in den folgenden Versuchen auf das Reduktionsmittel verzichtet.

Die HPLC-Analyse auf 3HB ergibt im Vergleich mit dem 3HB-Dehydrogenase-Assay deutlich niedrigere Werte. Eine Ursache könnte der Verlust von Produkt im Verlauf der Derivatisierung sein. Diese Verlustquote sollte aber für alle Proben ähnlich sein. Das Verhältnis zwischen den drei Ansätzen in Bezug auf Produktbildung ist daher unabhängig von der Methode.

nPHB ungewaschen

Der enzymatische Test zeigt für alle drei Granulaisolate eine signifikante 3HB-Bildung im Thiolyseansatz mit CoA (Abb. 76). Zum Zeitpunkt 0 Minuten findet sich in allen Ansätzen kaum 3HB. Während der Inkubation entsteht mit *nPHB* der Phasin-Mutante mit Abstand am meisten Produkt. Nach 30 Minuten lassen sich hier 3,2 mM 3HB nachweisen. Die Werte der Proben mit Granula des Wildtypen und der PhaZa1-Mutante hingegen liegen nur bei 0,84 mM (Wt) bzw. 0,81 mM (*ΔphaZa1*). Die beiden Ansätze unterscheiden sich bereits zum Zeitpunkt 0 Minuten sowie nach 15 Minuten nicht signifikant in ihrer 3HB-Konzentration (0,57 mM (Wt)/0,45 mM (*ΔphaZa1*)). Allen drei Thiolyseansätzen ist gemeinsam, dass auch zwischen 15 und 30 Minuten noch eine Zunahme an 3HB und damit eine Hydrolyseaktivität nachgewiesen werden kann.

Enzymtest

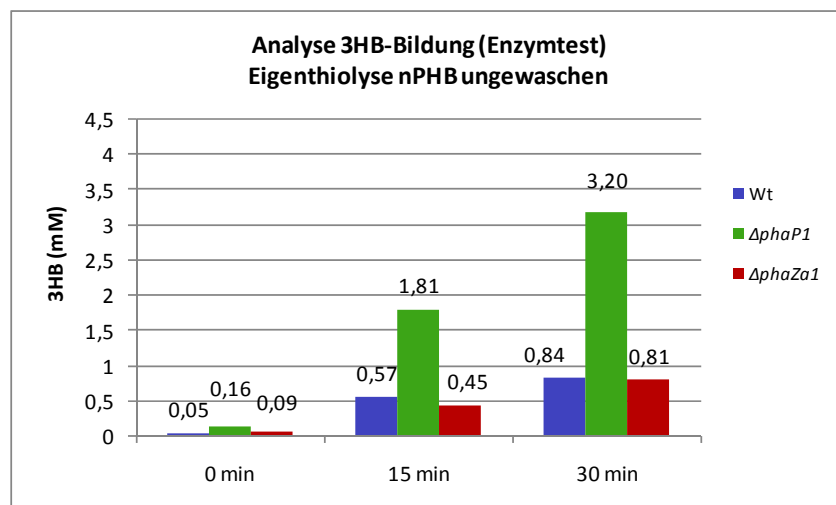


Abb. 76 Analyse der 3HB-Bildung in den Thiolyseansätzen per 3HB-Dehydrogenase-Test. *nPHB*, ungewaschen, aus *R. eutropha* (Wt, *ΔphaP1* und *ΔphaZa1*). 5 mg PHB = Wt: 106 mg Glycerinsuspension, *ΔphaP1*: 88 mg, *ΔphaZa1*: 127,5 mg. Daten sind Mittelwerte der Parallelproben.

Wie mit dem Enzymtest festgestellt, zeigt auch die HPLC-Analyse, dass die Produktmenge in allen drei Ansätzen bis zur 30 Minuten-Probe ansteigt. Dabei besitzt der Thiolyseansatz mit Granula aus *R. eutropha* Δ phaP1 mit Abstand die höchste Produktbildungsrate. Seine Proben enthalten durchschnittlich rund 2,8 mal so viel 3HB wie die des Wildtypen und der Depolymerase-Mutante Δ phaZa1. Die 3HB-Bildung dieser beiden Granulatypen liegt in einer Größenordnung, wobei die Depolymerase-Mutante etwas weniger Aktivität zeigt als der Wildtyp. Dieser Unterschied liegt nicht immer im signifikanten Bereich, wie zum Beispiel in der 15 Minuten-Probe (0,25 mM Wt – 0,2 mM *R. eutropha* phaZa1), ist aber sehr oft zu beobachten.

HPLC-Analyse

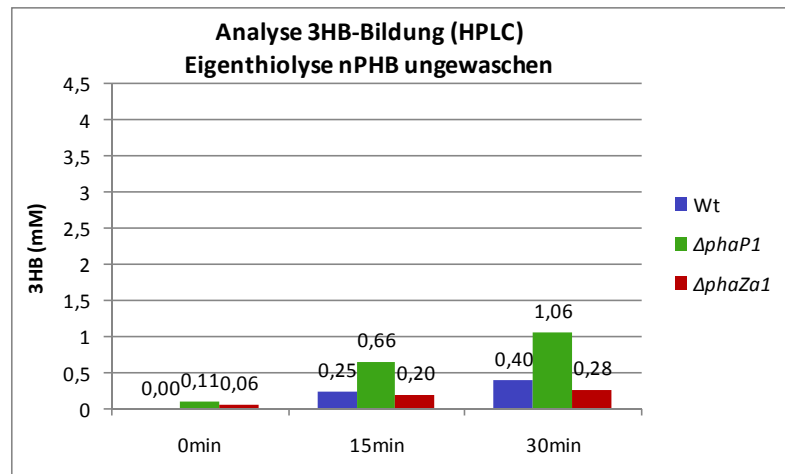


Abb. 77 Bildung von 3HB im Thiolyseansatz mit nPHB (gewaschen) aus *R. eutropha* Wt (blau), *R. eutropha* Δ phaP1 (grün) und *R. eutropha* Δ phaZa1 (rot). 5 mg PHB = Wt: 106 mg Glycerinsuspension (GlycSusp.), Δ phaP1: 88 mg, Δ phaZa1: 127,5 mg. Probenanalyse per HPLC (Methode „40%MetOH“) nach 15 Minuten und 30 Minuten (n=1).

nPHB gewaschen

Schon in der Kontrolle nach 0 Minuten unterscheiden sich gewaschene und ungewaschene Granula in ihrem 3HB-Gehalt deutlich (Abb. 78). Die Thiolyseansätze mit gewaschenem nPHB weisen hier zwischen ungefähr vier- (Δ phaZa1) bis zehnmal mehr (Wt, Δ phaP1) 3HB auf im Vergleich mit ungewaschenem nPHB. Auch nach 15 Minuten und 30 Minuten findet sich in allen Ansätzen gewaschener Granula mehr 3HB als unter gleichen Bedingungen mit ungewaschenem nPHB.

Nach 15 Minuten hat sich die 3HB-Konzentration bei nPHB aus *R. eutropha* Wt und der phaP1-Mutante im Vergleich zum Wert bei 0 Minuten um mehr als das Vierfache (Wt, 2,35 mM) bzw. knapp Dreifache (Δ phaP1, 3,8 mM) erhöht. In den beiden parallelen Ansätzen mit Granula der Depolymerase-Mutante Δ phaZa1 findet sich zu diesem Zeitpunkt gut doppelt so viel 3HB (0,68 mM) wie in der Nullprobe. Hier steigt die Produktmenge bis zur 30 Minuten-Probe auch weiter bis 1,75 mM 3HB. In den Proben mit nPHB aus *R. eutropha* Wt und aus der phaP1-Mutante hingegen wurde je in beiden Parallelproben nach 30 Minuten eine um durchschnittlich rund 25% (Wt) bzw. 10% (Δ phaP1) geringere 3HB-Konzentration gemessen als nach 15 Minuten.

Enzymtest

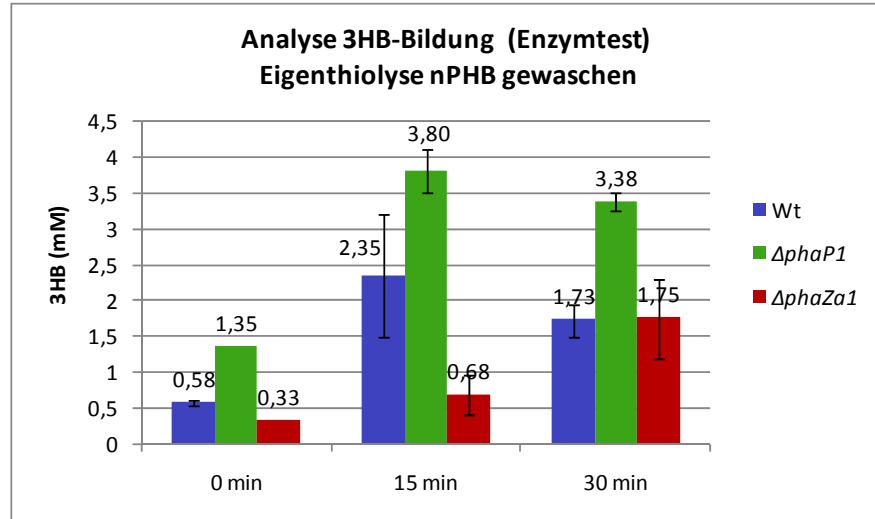


Abb. 78 Analyse der 3HB-Bildung in den Thiolyseansätzen per 3HB-Dehydrogenase-Test. nPHB, gewaschen, aus *R. eutropha* (Wt, $\Delta phaP1$ und $\Delta phaZa1$). 5 mg PHB = Wt: 106 mg Glycerinsuspension, $\Delta phaP1$: 88 mg, $\Delta phaZa1$: 127,5 mg. Daten sind Mittelwerte der Parallelproben.

Die HPLC-Analyse ergibt im Vergleich mit dem 3HB-Dehydrogenase-Assay deutlich niedrigere 3HB-Werte (Abb. 79). Bei den Ansätzen mit nPHB aus *R. eutropha* $\Delta phaP1$ und $\Delta phaZa1$ ist jedoch generell die gleiche Entwicklung zu erkennen: für nPHB der Phasin-Mutante ist nach 15 Minuten mit beiden Messmethoden ein deutliches Absinken der 3HB-Konzentration zu beobachten. Die Depolymerase-Mutante bildet zwischen 15 und 30 Minuten weiteres 3HB.

Unterschiede zeigt die Messung der Wt-Granula. Während hier die Produktmenge laut enzymatischem Test zwischen 15 Minuten und 30 Minuten deutlich sinkt, steigt sie laut HPLC-Analyse in diesem Zeitraum um rund 10% an.

HPLC-Analyse

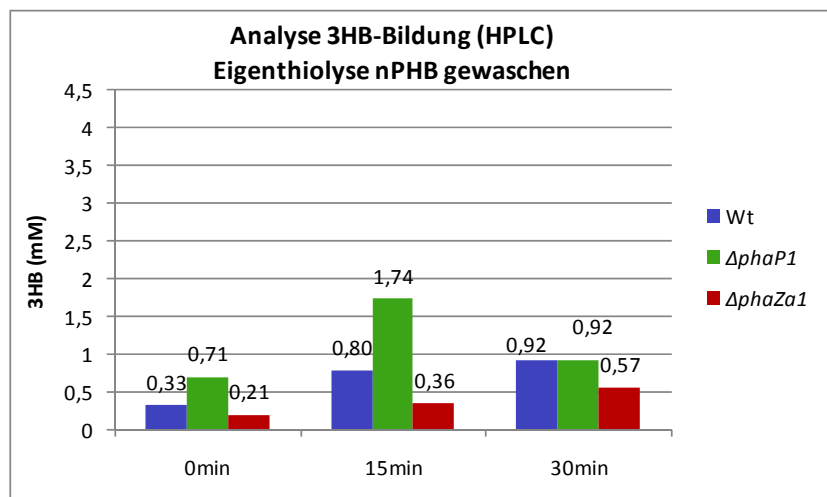


Abb. 79 Bildung von 3HB im Thiolyseansatz mit nPHB (gewaschen) aus *R. eutropha* Wt (blau), *R. eutropha* $\Delta phaP1$ (grün) und *R. eutropha* $\Delta phaZa1$ (rot). Probenanalyse per HPLC (Methode „40%MetOH“) nach 15 Minuten und 30 Minuten. 5 mg PHB = Wt: 106 mg Glycerinsuspension (GlycSusp.), $\Delta phaP1$: 88 mg, $\Delta phaZa1$: 127,5 mg (n=1).

Über die **Thiolyseansätze nativer PHB-Granula** (Wt, *ΔphaP1* und *ΔphaZa1*) lassen sich folgende Beobachtungen zusammenfassen:

Der Einsatz von gewaschenen oder ungewaschenen Granula hat auf das Produktspektrum der Thiolysereaktion großen Einfluss. Während ungewaschene Granula aller drei untersuchten Organismen - direkt vom ersten Glyceringradienten - zur Bildung von Acetyl-CoA **und** 3HB-CoA führen, kann in Ansätzen mit gewaschenen Granula ausschließlich 3HB-CoA detektiert werden.

nPHB aus *R. eutropha ΔphaP1* nimmt in der CoA-Ester-Bildung eine Sonderrolle ein. Zum einen bildet es im ungewaschenen Zustand deutlich weniger Acetyl-CoA und mehr 3HB-CoA als der Wildtyp und die Depolymerase-Mutante. Zum anderen bildet es bei gewaschenen Granula fast doppelt so viel 3HB-CoA wie die beiden anderen Granulaisolate.

Wie auf die Entstehung der CoA-Ester hat das Waschen der Granula auch auf die 3HB-Menge Einfluss. Die Ansätze aller drei Stämme zeigen mit ungewaschenem nPHB bis zur 30 Minuten-Probe einen deutlichen Anstieg der 3HB-Konzentration. Für gewaschene Granula gilt dies eindeutig nur für nPHB aus *R. eutropha ΔphaZa1*. Die Werte für den Ansatz mit nPHB des Wildtyps sind nicht signifikant, da sie je nach Analyseart variieren. Sehr deutlich ist der Unterschied zwischen gewaschenen und ungewaschenen Granula hingegen wiederum bei nPHB aus *R. eutropha ΔphaP1*: während die 3HB-Konzentration im Ansatz mit ungewaschenen Granula zwischen der 15 und 30 Minuten-Probe um gut 50% steigt, sinkt sie bei gewaschenen Granula zur gleichen Zeit um mehr als 10%.

Aus den vorherigen Versuchen wird deutlich, dass nPHB aus *R. eutropha ΔphaP1*-Kulturen in der Regel eine höhere Abbau-Aktivität aufweisen als aus dem Wildtyp oder der Depolymerase-Mutante. Dabei wurden bei allen Ansätzen jeweils die gleiche Menge PHB eingesetzt. Die PCS-Messung (3.3.2) ergab jedoch Unterschiede in der durchschnittlichen Größenverteilung der Granula. So sind die Granula der Phasin-Mutante mit rund 1024 nm Durchmesser am größten, gefolgt von der Depolymerase-Mutante (618 nm) und dem Wildtyp (547 nm). Bei gleichem eingesetztem Volumen an PHB besitzen Phasin-lose Granula daher eine geringere Gesamtoberfläche (Tabelle 15, Kapitel 3.3.2). Sie beträgt für 1 mg PHB aus *R. eutropha ΔphaP1* rund 24 cm², aus *R. eutropha ΔphaZa1* 41 cm² sowie für *R. eutropha* Wt rund 46 cm². Die Gesamtoberfläche von 1 mg PHB der Phasin-Mutante entspricht also nur etwa die Hälfte als von 1 mg PHB des Wildtypen. Die erhöhte Aktivität kann somit nicht auf eine größere Oberfläche zurückzuführen sein. Und bezogen auf die gleiche Fläche sind nPHB-Granula der Phasin-Mutante sogar noch einmal aktiver als der Granulum-Komplex des Wildtypen oder der PhaZa1-Mutante.

3.5.5.2 Hydrolyse-Versuche mit nPHB aus *R. eutropha* Wt / Δ phaP1 / Δ phaZa1

Um die Rolle und die quantitative Bedeutung der Thiolyse einschätzen zu können, ist der direkte Vergleich mit der reinen Hydrolyseaktivität entscheidend. Dazu wurden alle in Kapitel 3.5.5.1 beschriebenen Thiolyseansätze zeitgleich ohne Zugabe von CoA als Hydrolyseansätze inkubiert. Da ohne diese Verbindung auch keine CoA-Ester entstehen können, wurden die Proben nur auf ihren 3HB-Gehalt untersucht. Dies geschah wie bei der Thiolyse sowohl über den 3HB-Dehydrogenase-Test als auch nach Derivatisierung mit BPB per HPLC. Über diese Analysemethode wurde zudem untersucht, ob sich neben (BP-)3HB während der Hydrolyse auch (BP-)Acetat gebildet hat. Die Auswertungen der HPLC-Analytik beider Substanzen werden am Ende des Kapitels gegenübergestellt. Zunächst folgen die Ergebnisse des 3HB-Dehydrogenase-Tests der Hydrolyse ungewaschener und gewaschener nPHB-Granula.

3HB-Bildung (3HB-DH-Test)

nPHB ungewaschen

Ungewaschene Granula der Phasin-Mutante Δ phaP1 aus *R. eutropha* bilden unter Hydrolysebedingungen deutlich mehr 3HB als nPHB des Wildtypen und der Depolymerase-Mutante Δ phaZa1 (Abb. 80). Die 3HB-Konzentration des Hydrolyse-Ansatzes steigt zwischen 0 und 15 Minuten zunächst um den Faktor 10 von 0,16 mM auf 1,6 mM. Bis zur nächsten Probe nach 30 Minuten nimmt die Produktmenge um Faktor 2,3 auf 3,68 mM zu. Nachdem mit nPHB des Wildtypen und der Depolymerase-Mutante Δ phaZa1 zwischen 0 und 15 Minuten signifikante Mengen 3HB gebildet wurden, stagniert die Produktbildung anschließend in beiden Fällen.

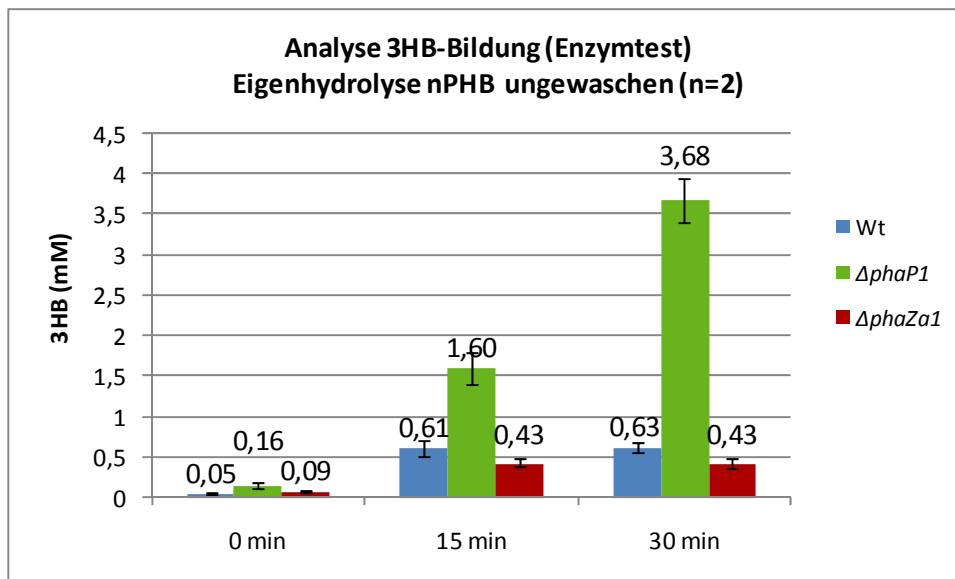


Abb. 80 Analyse der 3HB-Bildung in den Hydrolyseansätzen per 3HB-Dehydrogenase-Test. Je 5 mg nPHB, ungewaschen, aus *R. eutropha* (Wt, Δ phaP1 und Δ phaZa1). Daten sind Mittelwerte der Parallelproben.

nPHB gewaschen

In Proben mit gewaschenen Granula befindet sich bereits in der 0 Minuten-Probe deutlich mehr 3HB als in denen ungewaschener Granula. Auch zu späteren Zeitpunkten liegt die 3HB-Konzentration überall um mindestens 10% niedriger als mit gewaschenen Granula (Ausnahme: 30 min-Probe der $\Delta phaP1$ -Granula) (Abb. 81).

Damit zeigt die Hydrolyse eine ähnliche 3HB-Bildungsdynamik wie die Thiolyseansätze. In den ersten 15 Minuten der Inkubation steigt in allen Hydrolyseansätzen die 3HB-Konzentration signifikant an. Sie erreicht für den Wildtyp 0,76 mM, für *R. eutropha* $\Delta phaP1$ 4 mM und für $\Delta phaZa1$ 0,74 mM 3HB. Zwischen 15 und 30 Minuten nimmt die 3HB-Menge für nPHB des *R. eutropha* Wt weiter zu, während sie bei den beiden Mutanten *R. eutropha* $\Delta phaP1$ und $\Delta phaZa1$ sinkt. Mit ungewaschenen $\Delta phaP1$ -Granula stieg – wie oben gezeigt – die 3HB-Konzentration auch nach 15 Minuten noch an. Verglichen mit den anderen gewaschenen Granula bildete nPHB aus *R. eutropha* $\Delta phaP1$ jedoch mit Abstand am meisten 3HB.

Wie in der Thiolyse zeigen die Granula der Phasin-Mutante $\Delta phaP1$ auch unter Hydrolysebedingungen eine bis zu fünffach höhere 3HB-Bildung als nPHB aus *R. eutropha* Wt oder $\Delta phaZa1$. Die größte Konzentration mit gut 4 mM findet sich in der Probe nach 15 Minuten Inkubation. In den nächsten 15 Minuten sinkt der Gehalt an 3HB im Ansatz mit nPHB der Phasin-Mutante um knapp 20 Prozent.

Die 3HB-Bildung durch gewaschene Granula aus *R. eutropha* Wt und *R. eutropha* $\Delta phaZa1$ ist sehr ähnlich. Ausgehend von 0,58 mM (Wt) bzw. 0,33 mM ($\Delta phaZa1$) zu Beginn der Inkubation enthalten die 15-Minuten-Proben 0,76 mM (Wt) bzw. 1,04 mM 3HB ($\Delta phaZa1$). Während die Konzentration im Ansatz der Wt-Granula bis zur 30-Minuten-Probe noch um etwa 25% ansteigt, sinkt sie im Fall der Granula aus *R. eutropha* $\Delta phaZa1$ um ebenfalls rund 25%.

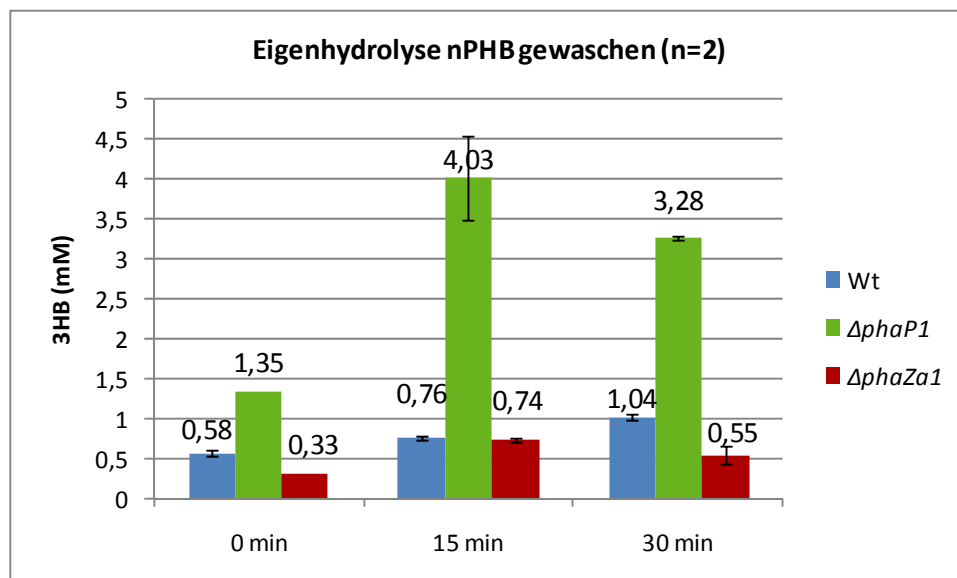


Abb. 81 Analyse der 3HB-Bildung in den Hydrolyseansätzen per 3HB-Dehydrogenase-Test. nPHB, gewaschen, aus *R. eutropha* (Wt, $\Delta phaP1$ und $\Delta phaZa1$). Daten sind Mittelwerte der Parallelproben.

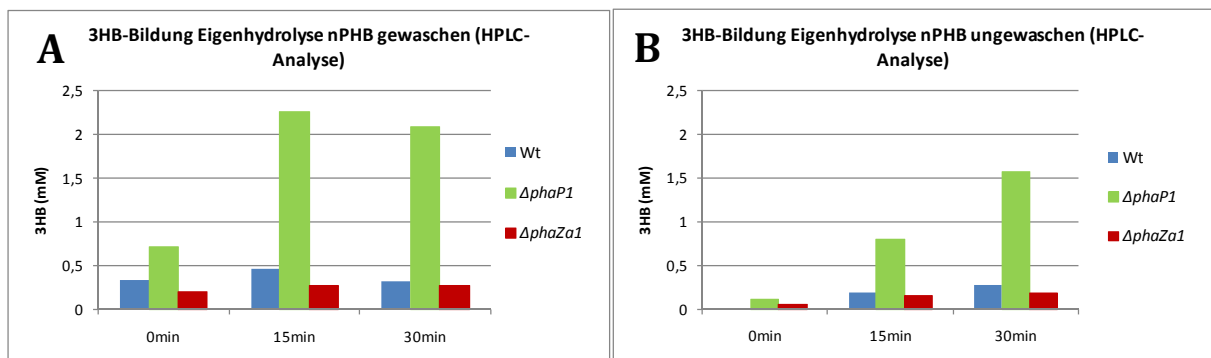
3HB-Bildung (HPLC-Analyse)

Die Auswertung der HPLC-Analysen der **Hydrolyseproben auf 3HB** (Abb. 82-A/-B) ergibt Diagramme, die denen des Enzymtests sehr nahe kommen. Ein Unterschied sind jedoch die absoluten Konzentrationen. Sie liegen um rund die Hälfte niedriger als im 3HB-Dehydrogenase-Test. Die Analyse der **Hydrolyseproben auf Acetat** (Abb. 82-C/-D) ergibt in allen Fällen nur sehr geringe Mengen, die sich von den Konzentrationen der Nullproben oft nicht unterscheiden.

nPHB gewaschen

nPHB ungewaschen

3HB-Bildung



Acetat-Bildung

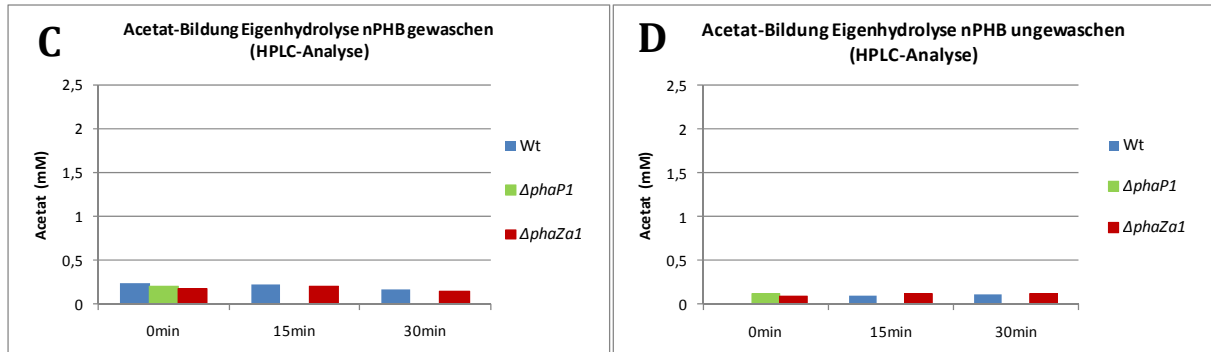


Abb. 82 HPLC-Analyse auf 3HB (A und B) und Acetat (C und D) aus Hydrolyseansätzen mit Granula aus *R. eutropha* (Wt, $\Delta phaP1$, $\Delta phaZa1$). nPHB gewaschen: A und C, nPHB ungewaschen: B und D (n=1).

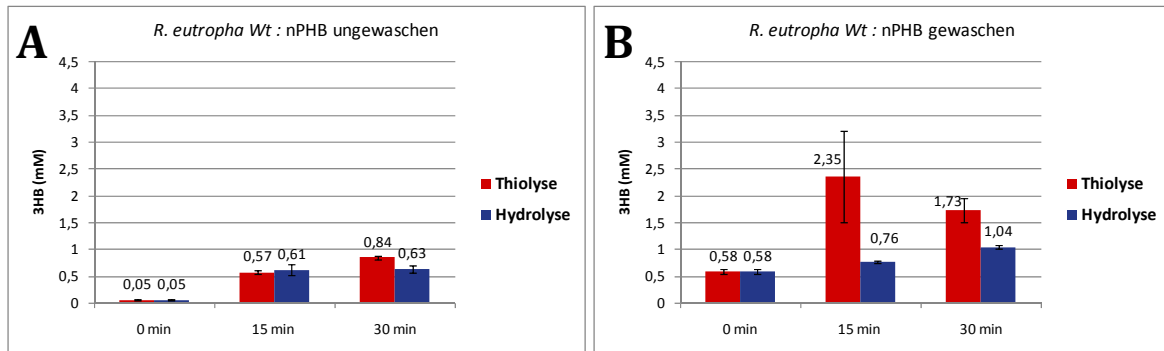
Vergleicht man die 3HB-Bildung unter Hydrolyse- und Thiolysebedingungen (Abb. 83), so zeigen sich einige Auffälligkeiten:

Unabhängig vom Ursprungsstamm enthalten gewaschene Granula zum einen zu Beginn der Inkubation schon deutlich mehr 3HB als ungewaschene. Zum anderen weisen ihre Ansätze auch generell mehr 3HB auf als ungewaschene.

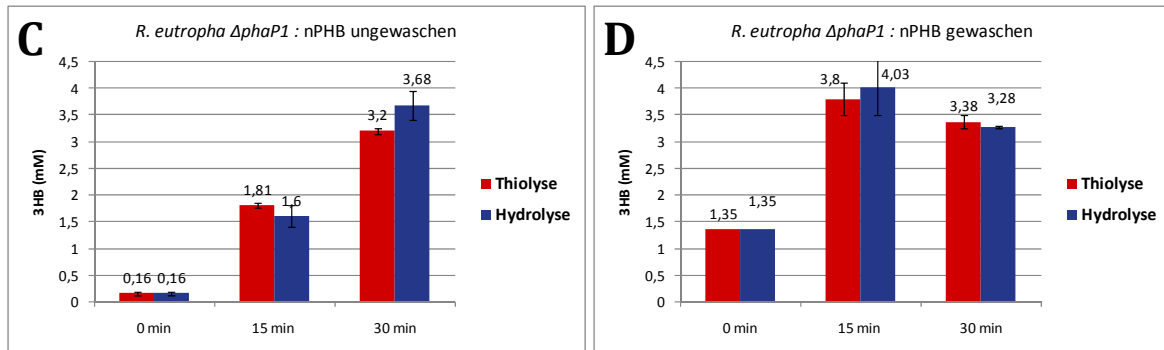
nPHB ungewaschen

nPHB gewaschen

R. eutropha Wt



R. eutropha Δ phaP1



R. eutropha Δ phaZa1

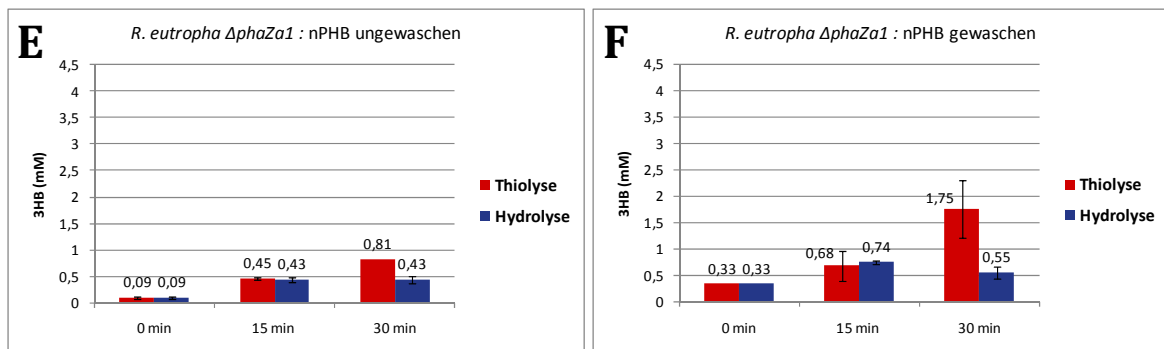


Abb. 83 Gegenüberstellung der 3HB-Bildung unter Thiolyse (rot)- und Hydrolysebedingungen (blau) im 1ml-Versuchsansatz. Analyse per 3HB-Dehydrogenase-Test. Untersuchung von ungewaschenen und gewaschenen nPHB-Granula (je entsprechend 5mg dPHB) aus *R. eutropha* Wt, Δ phaP und Δ phaZa1.

In Proben mit ungewaschenen Granula sind kaum signifikante Unterschiede in der 3HB-Bildung in Thiolyse- und Hydrolyseversuchen zu erkennen. Anders sieht es hingegen mit gewaschenen Granula aus: hier entstand in den CoA-haltigen Thiolyseansätzen mit Granula des Wildtypen (Abb. 83-B) und der Depolymerase-Mutante *ΔphaZa1* (Abb. 83-D) mehr 3HB als in den Hydrolyseansätzen. Mit nPHB der Phasin-Mutante (Abb. 83-F) zeigt sich wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen Thiolyse- und Hydrolysebedingungen.

Bei den Granula der Phasin-Mutante fällt jedoch auf, dass sie, verglichen mit nPHB des Wildtypen oder der Depolymerase-Mutante *ΔphaZa1*, immer die höchste 3HB-Menge bilden. Dabei ist es egal, ob Hydrolyse, Thiolyse oder ob gewaschene oder ungewaschene Granula verglichen werden. Die 3HB-Konzentrationen in den Ansätzen mit nPHB des Wildtypen und der Depolymerase-Mutante *ΔphaZa1* hingegen liegen bis auf wenige Ausnahmen in einer sehr ähnlichen Größenordnung.

Dabei fällt auf, dass die 3HB-Konzentration in den Ansätzen mit nPHB, ungewaschen, aus *R. eutropha* Wt und *R. eutropha ΔphaZa1* nach einem fast identischen Schema zunimmt. Dies gilt für die Thiolyse- wie für die Hydrolyseansätze (Abb. 83-A und Abb. 83-E). Bis 15 Minuten steigt die Produktkonzentration in allen Fällen deutlich auf relativ ähnliche Werte an (0,57/ 0,61 bzw. 0,43/0,45 mM). Nach 30 Minuten kann mit beiden Granula-Sorten nur für die Thiolyseansätze noch ein Anstieg an 3HB gemessen werden, die Konzentration in den Hydrolyseansätzen zeigt keine Änderung zum 15 Minuten-Wert.

Ein weiterer Vergleich gilt dem Unterschied gewaschene und ungewaschene Granula. Betrachtet man den Verlauf der 3HB-Bildung in Thiolyse- und Hydrolyseansätzen, erkennt man, dass das Produkt in allen Ansätzen mit ungewaschenen Granula bis zum Ende mehr oder weniger linear zunimmt. Beim Einsatz gewaschener Granula hingegen wurde in einzelnen Fällen die höchste 3HB-Konzentration bereits nach 15 Minuten gemessen. Nach 30 Minuten lag sie darunter bzw. auf gleichem Niveau, im Hinblick auf die Varianz durch die Fehlerbalken. Dieser Verlauf findet sich bei folgenden Ansätzen: nPHB (gewaschen) aus *R. eutropha* Wt unter Thiolysebedingungen (Abb. 83-B); nPHB (gewaschen) aus *R. eutropha ΔphaP1* unter Thiolyse-, und Hydrolysebedingungen (Abb. 83-D) und mit nPHB (gewaschen) aus *R. eutropha ΔphaZa1* unter Hydrolysebedingungen (Abb. 83-F).

Sinnvoll ist jedoch nicht nur der Vergleich der 3-HB-Bildung unter Thiolyse- und Hydrolysebedingungen alleine. Sehr aufschlussreich ist auch die direkte Gegenüberstellung der beiden Produkte, die parallel im Thiolyseansatz entstehen können: 3HB und 3HB-CoA. In Abbildung 84 sind in der linken Spalte die Konzentrationen an 3HB-CoA und 3HB aufgeführt, die nach 15 Minuten Inkubation unter Thiolysebedingungen per HPLC nachgewiesen wurden. Zu beachten ist, dass die Analyse auf 3HB per Enzymtest in der Regel eine um den Faktor 1,7 bis 2,4 höhere Konzentration ergab. Die rechte Spalte zeigt die Menge an 3HB, die im parallelen Hydrolyseansatz ebenfalls nach 15 Minuten detektiert wurde (auch per HPLC). Dabei fällt sofort auf, dass mit CoA beide Depolymerisations-Wege deutlich mehr Produkt liefern. Und dass die Depolymerasen auf nPHB-Granula ohne PhaP1 sowohl unter Hydrolyse- als auch unter Thiolysebedingungen besonders aktiv zu sein scheinen.

Die 15-Minuten-Werte der 3HB-Bildung wurden für die Diagramme in Abbildung 84 um den 0-Minuten-Wert korrigiert. Da das CoA erst mit Versuchsbeginn in den Ansatz kommt, sind zum Zeitpunkt 0 Minuten noch keine CoA-Ester vorhanden. Hier mussten die 15-Minuten-Werte also nicht korrigiert werden. Durch den Einsatz von gewaschenen nPHB-Granula waren die Mengen an Ac-CoA oder Acetat nur gering. Sie werden daher hier nicht mit in den Vergleich einbezogen.

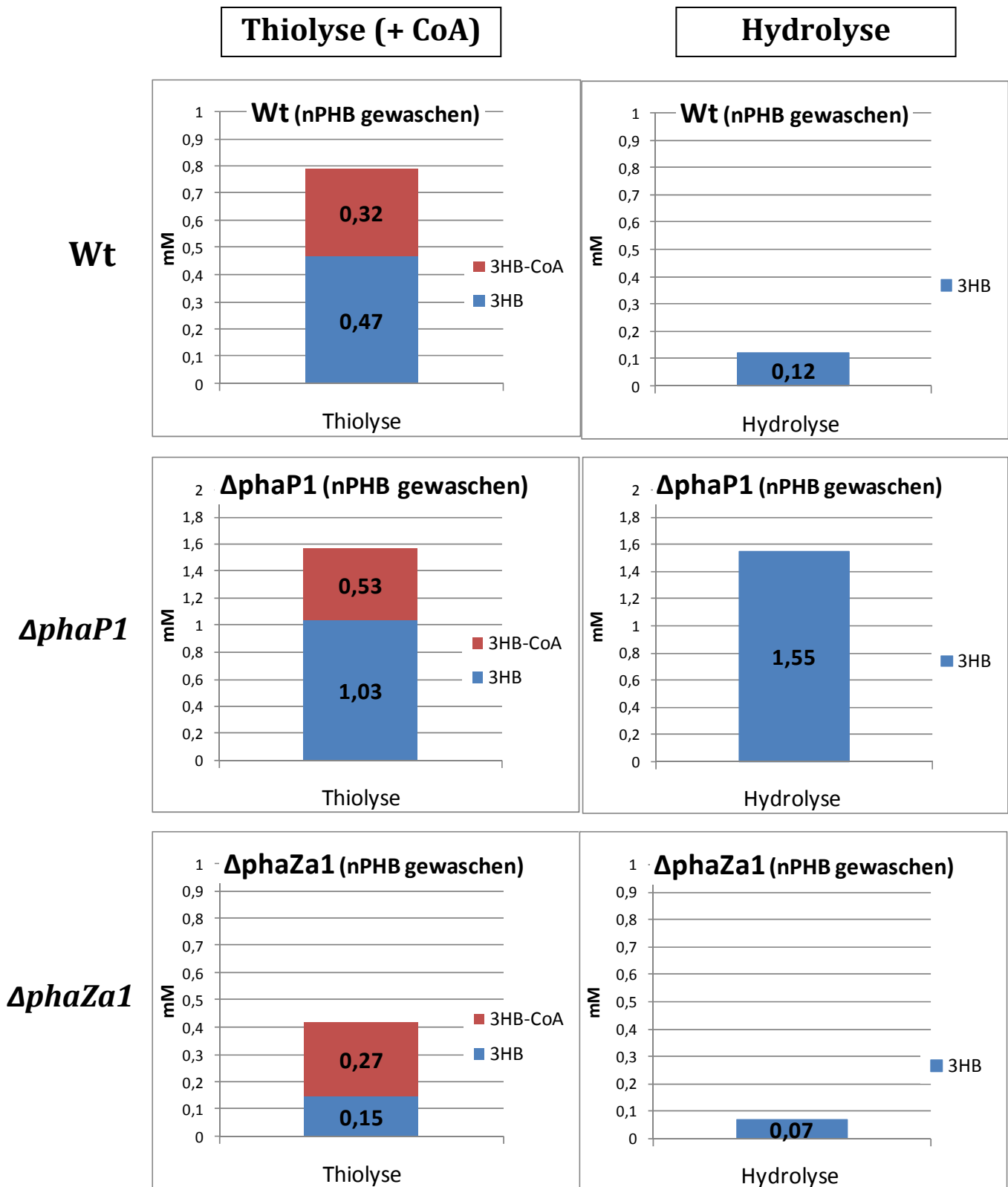


Abb. 84 Übersichts-Diagramm: Vergleich Produktbildung 3HB und 3HB-CoA innerhalb eines Standard-Thiolyseansatzes (linke Spalte) und 3HB-Bildung in einem parallelen Standard-Hydrolyseansatz. Untersucht wurde nPHB, gewaschen und resuspendiert, je entsprechend 5 mg PHB aus *R. eutropha* *Wt*, ΔphaP1 und ΔphaZa1 . Analyse der Probenüberstände (15 Min) per HPLC („CoA-Methode“ und „40%MetOH“).

Gewaschen oder ungewaschen ist nur ein Unterscheidungskriterium bei der Untersuchung nativer PHB-Granula. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Hydrolyse- und Thiolyseaktivität scheinen die Kulturbedingungen zu sein, unter denen die Bakterienzellen sich vermehrt und PHB eingelagert haben. Das folgende Kapitel 3.5.6 vergleicht die Produktbildung von isolierten Granula aus Nutrient Broth (NB)-Kultur und Minimalmedium (MM)-Kultur.

3.5.6 Einfluss des Kulturmediums auf den Abbau der PHB-Granula

Vergleich Hydrolyse- und Thiolyseaktivität von nPHB aus *R. eutropha* aus Mineralmedium (MM) und Nutrient Broth-Medium (NB)

Erste Experimente mit dem pH-Statens hatten deutliche Unterschiede in der Hydrolyse isolierter Granula aus Zellen von NB-Medium und von modifiziertem Mineralmedium (2.2.2) gezeigt. Erstere bildeten pro Minute und mg PHB deutlich mehr 3HB als Granula aus Mineralmediums-Zellen. Diese Beobachtung sollte mit Granula aus Kulturen unter möglichst identischen Bedingungen wiederholt werden: die Hauptkulturen (NB- oder Mineral-Medium) wurden alle aus der gleichen NB-Vorkultur angeimpft und gleichzeitig inkubiert. Entsprechend der Arbeit von K. Uchino (Uchino et al. 2006) wurde die Thiolysereaktion in einem gepufferten 1 ml-Ansatz in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt (2.16.1). Um vergleichbare Bedingungen zu haben, fanden auch die parallelen Hydrolyseversuche nicht wie zu Beginn im pH-Statens sondern ebenfalls im 1ml-Maßstab statt.

In einem ersten Versuch wurden ungewaschene Granula mit und ohne Zugabe von isoliertem PhaZa1 auf ihre Thiolyseaktivität untersucht. Darauf folgten die entsprechenden Experimente mit gewaschenem nPHB. Die Isolierung der intrazellulären Depolymerase PhaZa1 und ihre Charakterisierung werden in Kapitel 3.7 beschrieben. Es handelt sich dabei um das rekombinant mit his-tag in *E. coli* exprimierte und über Nickel-NTA aufgereinigte (2.12.2) PhaZa1-Protein aus *R. eutropha* Wt. Das Gen dieser Depolymerase wurde erstmals 2001 von der Arbeitsgruppe Saito sequenziert und die Aktivität des Proteins gezeigt (Saito et al. 2001). Dabei konnte nach Inkubation von Rohextrakt eines rekombinanten *E. coli*-Stammes mit artifiziellem amorphen PHB die Bildung von 3HB-Oligomeren bzw. 3HB-Monomeren nachgewiesen werden. In dieser Arbeit, in den folgenden Versuchen und vor allem in Kapitel 3.7 wird hingegen versucht, die Aktivität des gereinigten Enzyms mit nativen PHB-Granula nachzuweisen.

3.5.6.2 Kultivierung auf NB/MM und Granulaisolierung

Nach 12,5 Stunden Wachstum der Hauptkultur (2.12.1) hatten die Zellen auf NB-Medium eine OD₆₀₀ von 4,5, auf Mineralmedium von 5,9. Zu diesem Zeitpunkt konnte nach Nilrot-Färbung am Fluoreszenzmikroskop (2.4) beobachtet werden, dass die Zellen voll waren mit vielen (NB) bis sehr vielen (MM) kleinen PHB-Granula. Dabei formten sie auf NB-Medium lange und auch kürzere Stäbchen, auf Mineralmedium ausschließlich sehr lange Stäbchen. Nach Zentrifugation von jeweils 2,4 Liter Kultur bei 5000 rpm für 15 Minuten ergab sich für Zellen aus NB-Medium ein Feuchtgewicht von 9,89 g, aus Mineralmedium von 17,23 g.

Der durch Frenchpressing (2.5) gewonnene Zellaufschluss wurde auf Glyceringradienten pipettiert (2.9). Vorversuche hatten ergeben, dass diese zur Isolierung von nativen Granula aus NB- und MM-Kultur je eine spezielle Zusammensetzung haben sollten. Auf ungünstigen Gradienten verkleben die Granula und bilden eine schmale, feste Bande. Diese ist kaum zu resuspendieren und die Granula verlieren ihren amorphen und dadurch gekennzeichneten nativen Charakter. Auf seine

amorphe Struktur hin kann PHB über die Abbaubarkeit durch PhaZ7 getestet werden, eine nPHB-spezifische Depolymerase aus *Paucimonas lemoignei* (Handrick et al. 2001).

Die rund 25 ml NB-Zellaufschluss wurden auf zwei Gradienten aus jeweils 5 ml 87% Glycerin, 5ml 70% Glycerin und 10ml 40% Glycerin pipettiert, die rund 35ml MM-Zellaufschluss auf drei Gradienten à 5 ml 87%, 10 ml 70% und 10 ml 50% Glycerin. Auch die Zentrifugationsbedingungen (Tab. 27) müssen je nach Granula-Art angepasst werden. Für Granula der NB-Kultur bedeutete dies in der Ultrazentrifuge (Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter GmbH) 20 Minuten bei 15.000 rpm bei langsamem Beschleunigen und Bremsen der Rotation. Danach war eine scharfe blütenweiße, ca. 2 cm breite Bande entstanden. Nach unten, zur 87% Glycerin-Schicht, hatte sich eine gummiartige Grenzschicht gebildet, nach oben eine weitere sehr scharfe Abgrenzung zum rot-bräunlichen Überstand. Die Granula der MM-Kultur ergaben nach 35 Minuten bei 12.000 rpm eine rund 3 cm breite, weiß-rotbräunliche Bande ohne scharfe Grenzen.

Wie unter 2.10 beschrieben wurden die Milligramm an PHB pro g nPHB in Glycerin bestimmt:

PHB aus NB-Kultur: 37,2 mg/g

PHB aus MM-Kultur: 51,5 mg/g

Demnach wurden für den Einsatz von 5 mg PHB für die folgenden Versuche 134 mg nPHB aus NB-Kultur bzw. 97 mg nPHB aus MM-Kultur eingesetzt. Die Hydro- und Thiolyseansätze sowie die Probenahme und -analyse erfolgten wie unter 2.16.1 und 2.18 beschrieben (250 µl Probe nach 0, 15 und 30 Minuten).

Im Folgenden wird die Thiolyseaktivität nPHB-Granula aus Zellen von NB- und MM-Kultur verglichen, zunächst von ungewaschenen und anschließend gewaschenen nativen Granula (2.9). Zu dieser Versuchsreihe gehörte zudem, den Einfluss der isolierten Depolymerase PhaZa1 auf die Thiolyseansätze zu testen. Das Enzym war zuvor rekombinant in *E. coli* JM 109 (2.12.2)(Günther, 2005) als his-tag überexprimiert und über Nickel-Agarose isoliert worden. Die Isolierung dieser intrazellulären Depolymerase aus *R. eutropha* und ihre Charakterisierung werden in Kapitel 3.7 beschrieben.

Zum Vergleich sei zudem auf den Abschnitt 3.5.5.2. verwiesen. Hier wird per HPLC die 3-HB- und Acetat-Bildung nativer Granula rein aus Mineralmediums-Kultur untersucht. Durch Overlay-Darstellung lassen sich hier die Ergebnisse von Thiolyseansätzen, Hydrolyseansätzen, mit und ohne Zugabe von isoliertem PhaZa1 auf einen Blick vergleichen.

3.5.6.3 CoA-Ester-Bildung durch nPHB ungewaschen aus NB- und MM-Kultur

Die Thiolyseansätze enthielten jeweils 5 mg PHB (*R. eutropha* Wt) und wurden einmal mit, einmal ohne Zugabe von isoliertem PhaZa1 (0,34 mg: 50 µl „Pool2“: 3.7.1.4) bei 30°C inkubiert. Die Probenahmen erfolgten nach 0, 15 und 30 Minuten. Nach 15 Minuten waren die Granula aus NB-Kultur auf den Boden des Reaktionsgefäßes gesunken und wurden daher durch leichtes Schütteln wieder aufgewirbelt.

Abbildung 85 vergleicht die vier Versuchskombinationen (MM/NB-Kultur und +/- PhaZa1-Zugabe) anhand der Proben nach 30 Minuten Inkubation. Bei Analysen auf 3HB oder Acetat ist dabei der Vergleich mit der Nullprobe (0 Min) sehr wichtig, um eine Aussage über die Neuentstehung des Produktes machen zu können. Im Fall von CoA-Estern ist dies nicht nötig, denn ohne externe Zugabe von CoA wie im Thiolyseansatz können sie nicht entstehen. Und weder im

Zellextrakt von *R. eutropha* noch im Überstand isolierter PHB-Granula konnten mit unserer HPLC-Analytik CoA oder CoA-Ester wie 3HB-CoA und Acetat-CoA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daher kann die CoA-Ester-Konzentration zum Zeitpunkt 0 Minuten als 0 mM angesehen werden.

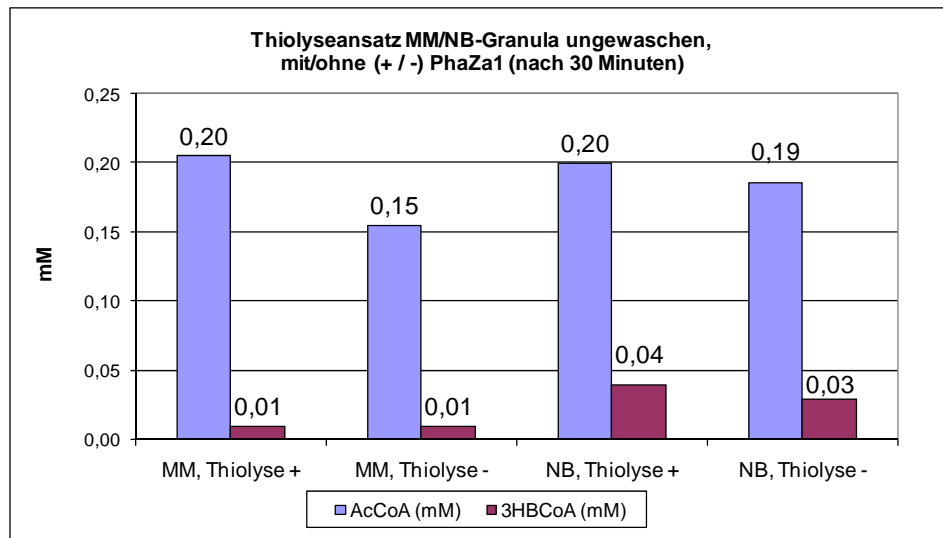


Abb. 85 Vergleich CoA-Esterbildung (Acetyl-CoA, 3HB-CoA) von je 5 mg nPHB (ungewaschen) aus MM- und NB-Kultur von *R. eutropha* Wt nach 30 Minuten unter Thiolyse-Bedingungen mit (+) und ohne (-) Zugabe von isoliertem PhaZa1

Im Thiolyseansatz mit ungewaschenen Granula ist die Produktbildung ganz deutlich von 3HB-CoA zu Acetyl-CoA verschoben. Dabei ist im Ansatz mit nPHB aus NB-gewachsenen Zellen noch etwas mehr 3HB-CoA nachzuweisen als aus Zellen von MM-Kultur. Auf die Bildung von Acetyl-CoA - bzw möglicherweise 3HB-CoA als schnell umgewandelte Vorläufersubstanz - scheint PhaZa1 für Granula aus MM-Zellen einen höheren Einfluss zu haben als für nPHB aus NB-Zellen. Während der Ansatz mit nPHB aus MM-Zellen mit Enzym 33% mehr AcetylCoA zeigt als ohne, ist der Unterschied bei nPHB aus NB-Zellen nicht signifikant. Auch eine erhöhte 3HB-CoA Bildung ist in den Versuchen mit PhaZa1-Zugabe nicht zu erkennen. In diesem Versuch zeigte das isolierte Enzym daher - bis auf die oben erwähnte Beobachtung - keine signifikante Aktivität. Wichtig für die Interpretation der Daten ist, dass es sich bei diesem Versuch nur um Einzelproben handelt (n=1).

Ungewaschene Granula aus NB- oder MM-gewachsenen Zellen zeigen insgesamt keine großen Unterschiede in der Produktbildung: beide Granulaisolate bilden überwiegend Acetyl-CoA statt 3HB-CoA. Die Summe an Produkten liegt stets mehr als doppelt so hoch wie bei gewaschenen Granula, deren Thiolyseaktivität im anschließenden Kapitel vorgestellt wird.

3.5.6.4 CoA-Ester-Bildung durch nPHB **gewaschen** aus NB- und MM-Kultur

Durch den Einsatz gewaschener Granula sollte geklärt werden, welchen Einfluss das Waschen auf die Aktivität sowie die Produktbildung hat (Abb. 86). Für die Interpretation ist zu beachten, dass vor allem nPHB aus NB-gewachsenen Zellen beim Waschen ein schwer zu resuspendierendes Pellet bildet, so dass ein Teil der Granula möglicherweise denaturiert vorliegt. Das könnte auch die - trotz Standard-Einsatz von 5 mg PHB - verhältnismäßig niedrigen Aktivitäten erklären (im μ M-Bereich). Unter anderem wurde festgestellt, dass weder zu Beginn dieses Versuches (t= 0 min) noch zu einem späteren Zeitpunkt in Proben mit gewaschenen Granula Acetyl-CoA nachgewiesen werden konnte.

Es fällt jedoch auf, dass in den Nullproben aus MM-Kultur generell rund 50-100% mehr 3HB-CoA vorhanden ist als in Proben mit nPHB aus NB-Kultur.

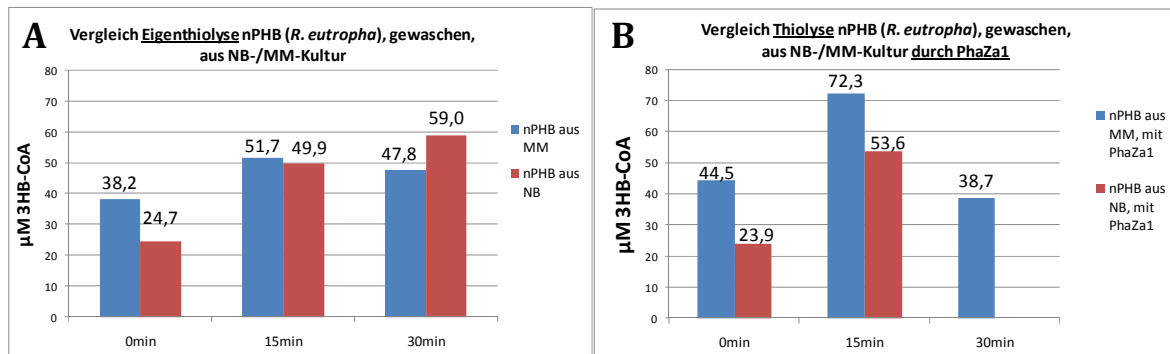


Abb. 86 Bildung von 3HB-CoA im Thiolyseansatz (1ml) mit nPHB (gewaschen) aus *R. eutropha* Wt aus Mineralmedium-Kultur (+2% Glukonat) (blau) und NB-Kultur (rot). Zugabe Glycerinsuspension (nPHB) jeweils entsprechend 5 mg PHB. Jeweils ein Kontrollansatz ohne (A) sowie ein Ansatz mit Zugabe von rekombinantischem (2.12) PhaZa1 (B) (0,337 mg Protein aus „Pool 2“, 3.7.1.4). Probenahme nach 0, 15 und 30 Minuten. 5µl Überstand für HPLC-Analyse eingesetzt („CoA-Methode“)

Nach 15 Minuten Inkubation unter Thiolysebedingungen ohne PhaZa1-Zugabe ist die 3HB-CoA-Konzentration jedoch in beiden Ansätzen fast auf den gleichen Wert (50µM +/- 1,7) gestiegen. Dies bedeutet aufgrund der unterschiedlichen Nullwerte für nPHB aus MM-gewachsenen Zellen ein Plus von rund 35 %, für nPHB aus NB-Zellen von gut 100 %. Während die Menge an 3HB-CoA in Granula aus Zellen von MM nach 30 Minuten nicht weiter zugenommen hat, nimmt sie mit nPHB aus NB-gewachsenen Zellen noch um rund 20 % zu.

In den Versuchen mit PhaZa1 (0,34 mg aus „Pool2“, siehe 3.7.1.4) steigt die 3HB-CoA-Menge in den Ansätzen mit Granula aus MM- und aus NB-gewachsenen Zellen nach 15 Minuten ebenfalls an. Dabei erreicht sie mit nPHB aus MM-Kultur mit 72,3 µM den höchsten absoluten Wert. Den größten Zuwachs pro Zeit zeigt jedoch der Ansatz mit PhaZa1 und nPHB aus NB-Kultur. Hier nimmt die 3HB-CoA-Konzentration in den ersten 15 Minuten um mehr als 120 % von 23,9 auf 53,6 µM zu. Dies ist etwas mehr als ohne PhaZa1 (+100 %). Während die 30 Minuten-Probe des NB-Ansatzes in der HPLC-Analyse keine auswertbaren Daten ergab, zeigen die Werte für nPHB aus MM-Zellen, dass die 3HB-CoA-Menge zwischen 15 und 30 Minuten auf fast die Hälfte (38,7 µM) zurückgeht.

Zusammenfassend gilt, dass der Einfluss von rekombinantischem PhaZa1 auf MM-nPHB bedingt erkennbar ist, auf NB-nPHB jedoch nicht. Dessen Werte unterscheiden sich im Ansatz mit und ohne Enzymzugabe kaum. In den Proben mit MM-nPHB und PhaZa1 hingegen steigt die 3HB-CoA-Konzentration zwischen 0 und 15 Minuten signifikant stärker an als ohne das rekombinante Enzym. Während die absoluten 3HB-CoA-Werte von Granula aus NB-Zellen zwar geringer sind, ist die Konzentrationszunahme pro Zeit, d.h. die Aktivität, höher. Dabei scheint es sich jedoch um die Eigenthiolyse der Granula handeln, denn die Zugabe von PhaZa1 ändert – wie oben erwähnt - die Rate nur geringfügig.

Parallel zum Einfluss auf die Thiolyseaktivität wurde auch die Hydrolyse nativer PHB-Granula aus NB- bzw. MM-Kulturen untersucht:

3.5.6.5 3HB- und Acetat-Bildung durch nPHB *gewaschen* aus NB-/MM-Kultur

Betrachtet man die folgenden sechs HPLC-Overlay-Chromatogramme, so lässt sich die 3HB- und Acetat-Bildungsdynamik mit Granula aus NB- und MM-Kultur gut nachverfolgen. Parallel wurden Hydrolyse- und Thiolyseversuche angesetzt, denen zudem einmal rekombinantes PhaZa1 zugegeben wurde und einmal nicht. Die Produktbildung (3HB, Acetat) dieser vier Versuchsvarianten ist in Form der HPLC-Chromatogramme für jeden Probezeitpunkt (0, 15, 30 Minuten) übereinander gelegt abgebildet. Dabei fällt auf, dass zwischen allen vier Kombinationen keine großen Abweichungen erkennbar sind. Die Bildung von 3-HB und Acetat wird hier scheinbar durch die Anwesenheit von CoA im Thiolyseansatz, aber auch von der Zugabe der isolierten Depolymerase PhaZa1 nicht entscheidend beeinflusst.

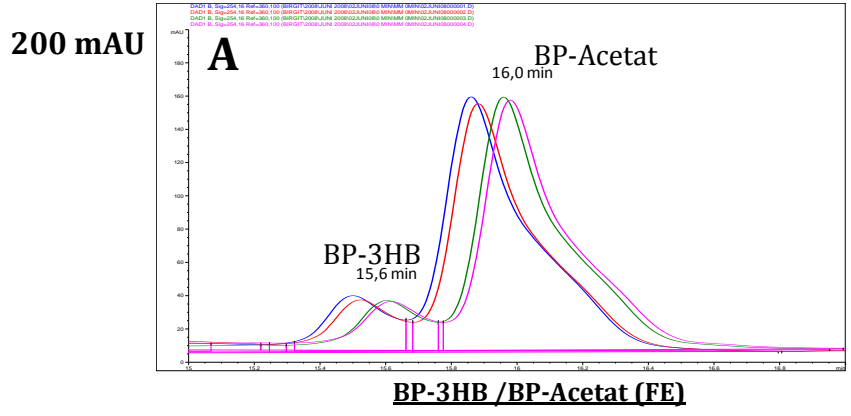
In der 0-Minuten-Probe konnten sowohl mit nPHB aus MM- als auch NB-Kultur bereits deutliche Mengen 3HB und Acetat analysiert werden (Abb. 87-A und 88-A). Dabei überwiegt bei nPHB aus MM-Kultur sehr deutlich Acetat. Mit Granula aus NB-Kultur liegt die Acetatkonzentration nur wenig über der von 3HB. In der Summe findet sich mit nPHB aus NB-Kultur jedoch bereits zum Zeitpunkt 0 Minuten rund doppelt so viel Produkt wie mit nPHB aus MM-Kultur.

Nach 15 Minuten haben die Granula aus MM-Kultur etwas 3-HB und vorwiegend Acetat gebildet (Abb. 87-B). In der Probe nach 30 Minuten (Abb. 87-C) ist die 3HB-Konzentration hingegen leicht zurückgegangen und weiteres Acetat wurde gebildet.

Auch mit Granula aus NB-Kultur steigt zunächst vor allem die 3-HB-Menge an. Hierbei ist an den HPLC-Peaks (Abb. 88-B) ein deutliches Gefälle zu erkennen: Unter Hydrolyse-Bedingungen mit PhaZa1 entsteht am meisten Produkt, unter Thiolysebedingungen mit PhaZa1 am wenigsten. In der 30-Minuten-Probe haben sich die Verhältnisse. Die 3HB-Konzentrationen in allen Versuchsvarianten sind deutlich gesunken. Im Gegensatz zu den Versuchen mit nPHB aus MM-Kultur ist jedoch kein signifikanter Anstieg der Acetatmenge erkennbar.

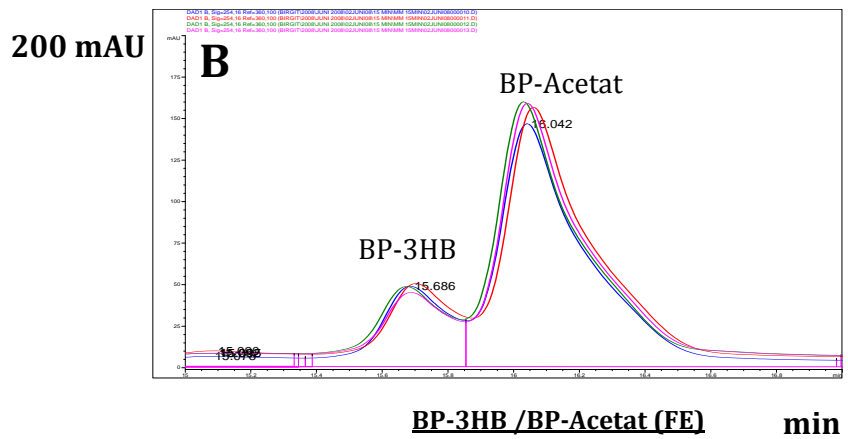
Die Ansätze mit Granula aus NB-Kultur zeigen nach 15 Minuten ebenfalls Acetatbildung, aber das Gleichgewicht liegt deutlich bei 3HB. Bis 30 Minuten nimmt die Acetatkonzentration weiter zu und steigt etwas höher als die 3HB-Menge. Während jedoch in den Ansätzen mit Granula aus MM-Kultur das Verhältnis 3HB zu Acetat zu diesem Zeitpunkt ungefähr 1 zu 6 beträgt, liegt es hier mit 1 zu 1,2 deutlich höher.

nPHB, gewaschen aus MM-Kultur: 0 Minuten-Proben



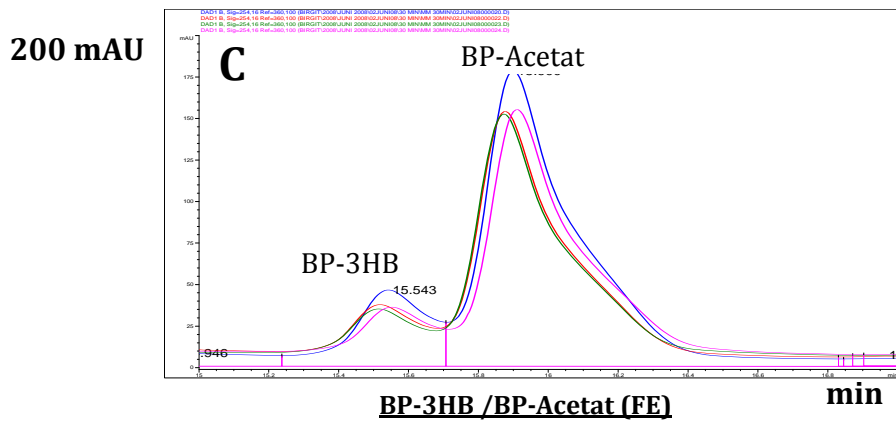
Blau: Hydrolyse + PhaZa1 (382/ 2680 FE), Rot: Hydrolyse pur (260/ 2550 FE)
 Grün: Thiolyse + PhaZa1 (260/ 2570 FE), Rosa: Thiolyse pur (310/ 2540 FE)

nPHB, gewaschen aus MM-Kultur: 15 Minuten-Proben



Blau: Hydrolyse + PhaZa1 (569/2785 FE), Rot: Hydrolyse pur (555/3047 FE)
 Grün: Thiolyse + PhaZa1 (521/3130 FE), Rosa: Thiolyse pur (478/3140 FE)

nPHB, gewaschen aus MM-Kultur: 30 Minuten-Proben

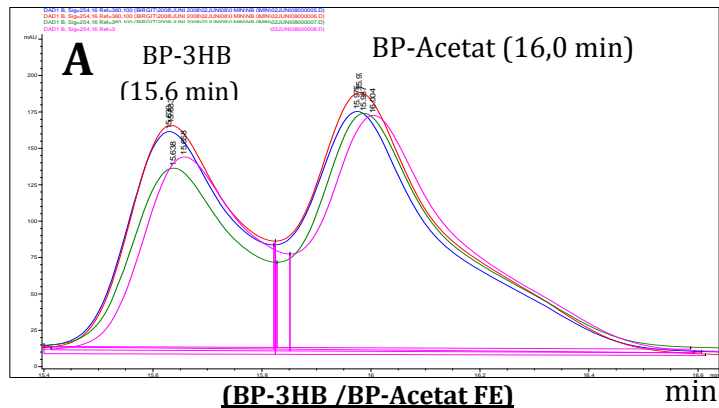


Blau: Hydrolyse + PhaZa1 (515/3317 FE), Rot: Hydrolyse pur (350/2948 FE)
 Grün: Thiolyse + PhaZa1 (298/ 2984 FE), Rosa: Thiolyse pur (306/3040 FE)

Abb. 87 HPLC-Analyse: 3HB- und Acetat-Detektion nach 15 min (A) und 30 min (B) in Hydrolyse- und Thiolyseansätzen mit nPHB gewaschen (aus MM-Kultur). Ausschnitt aus Overlay von vier Chromatogrammen: Blau: Hydrolyseansatz mit Zugabe rekomb. PhaZa1, Rot: Hydrolyseansatz ohne PhaZa1, Grün: Thiolyseansatz mit Zugabe rekomb. PhaZa1, Rosa: Thiolyseansatz ohne PhaZa1. Auftrag auf HPLC: 5µl . -Methode „40%MetOH“.

nPHB, gewaschen aus NB-Kultur: 0 Minuten-Proben

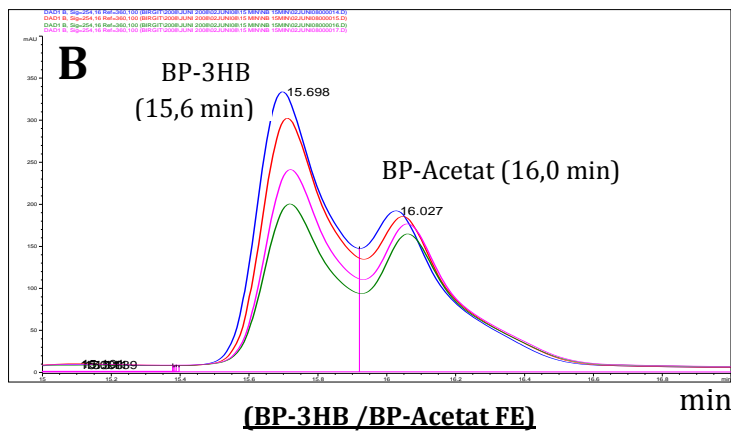
200 mAU



Blau: Hydrolyse + PhaZa1 (1983/2890 FE), Rot: Hydrolyse pur (2139/3160 FE)
Grün: Thiolyse + PhaZa1 (1631/2810 FE), Rosa: Thiolyse pur (1808/2880 FE)

nPHB, gewaschen aus NB-Kultur: 15 Minuten-Proben

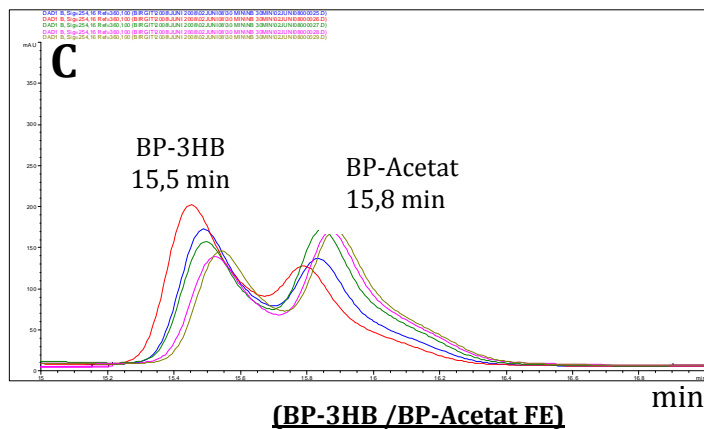
400 mAU



Blau: Hydrolyse + PhaZa1 (4593/3483 FE), Rot: Hydrolyse pur (4132/3394 FE)
Grün: Thiolyse + PhaZa1 (2626/3180 FE), Rosa: Thiolyse pur (3190/3333 FE)

nPHB, gewaschen aus NB-Kultur: 30 Minuten-Proben

400 mAU



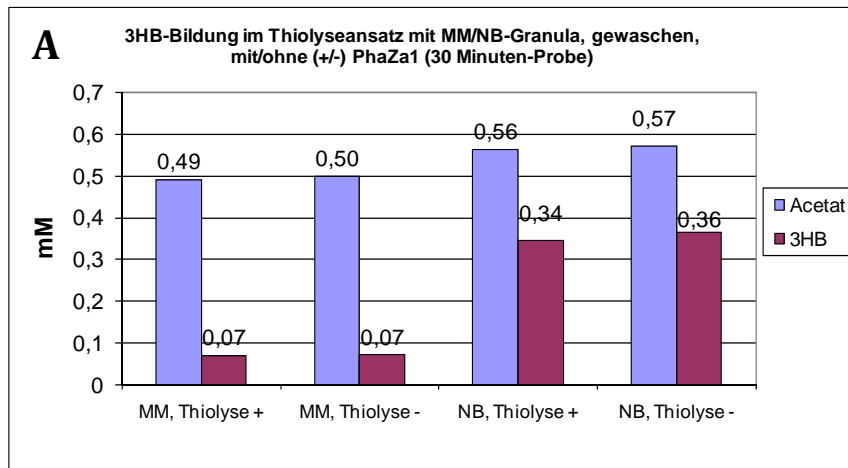
Blau: Hydrolyse + PhaZa1 (2230/2628 FE), Rot: Hydrolyse pur (2007/3296 FE)
Grün: Thiolyse + PhaZa1 (1720/3403 FE), Rosa: Thiolyse pur (1814/3340 FE)

Abb. 88 HPLC-Analyse: 3HB-/Acetat-Bildung nach 15 Minuten (A) und 30 Minuten (B) in Hydrolyse- und Thiolyseansätzen mit nPHB gewaschen (aus NB-Kultur). Ausschnitt Overlay von vier Chromatogrammen: Blau: Hydrolyseansatz mit rekomb. PhaZa1, Rot: Hydrolyseansatz ohne PhaZa1, Grün: Thiolyseansatz mit rekomb. PhaZa1, Rosa: Thiolyseansatz ohne PhaZa1. Auftrag auf HPLC: 5µl Methode „40%MetOH“.

Vergleicht man nur die 30 Minuten-Proben der Ansätze mit gewaschenen Granula (Abb. 89), so wird deutlich:

zwischen den Thiolyse- und Hydrolyseansätzen gibt es hinsichtlich der Acetat- und 3HB-Bildung nur wenige Unterschiede (Abb. 89 A und B). Innerhalb dieser Ansätze jedoch – wie auch aus den Chromatogrammen ersichtlich - fallen die Unterschiede zwischen nPHB aus NB-Kultur bzw. MM-Kultur auf. Wie schon zuvor beobachtet (3.4.4) bilden Granula aus NB-gewachsenen Zellen bis zu fünfmal mehr 3HB (rosa) als Granula aus MM-gewachsenen Zellen.

Thiolyse



Hydrolyse

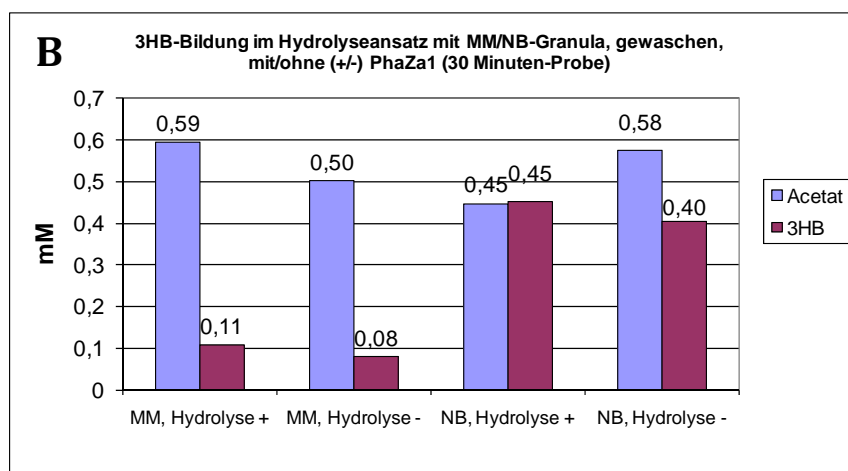


Abb. 89 3HB-Detektion per HPLC nach Derivatisierung: 30 Minuten-Proben Thiolyse- (A) und Hydrolyseansätze (B) mit nPHB gewaschen, aus Zellen von MM- und NB-Medium. Vergleich Ansätze mit und ohne (+/-) Zugabe von rekomb. PhaZa1 (n=1).

Insgesamt dominiert jedoch in allen Proben Acetat (hellblau). Im Ansatz **ohne rekombinantes PhaZa1** (-) bilden die Granula beider Kulturen jeweils unter Thiolyse- und Hydrolysebedingungen die gleiche Menge davon. Mit nPHB aus MM-Kultur beträgt die Konzentration 0,5 mM, aus NB-Kultur 0,57/0,58 mM. **Mit PhaZa1** (+) liegt die Acetatkonzentration bei nPHB aus MM-Kultur im Hydrolyseansatz um rund 20% höher als im Thiolyseansatz. Im Gegensatz dazu taucht mit nPHB aus NB-Kultur im Thiolyseansatz knapp 25% mehr Acetat als unter Hydrolysebedingungen auf. Diese beiden Proben – „MM mit PhaZa1“ und NB mit PhaZa1“ sind jedoch die einzigen, die bei Thiolyse und Hydrolyse deutliche Unterschiede bei der Produktbildung zeigen: „MM-nPHB“ bildet

im Thiolyseansatz nach 30 Minuten 0,49 mM Acetat, im Hydrolyseansatz jedoch 0,59 mM. Bei „NB-nPHB“ ist es anders herum: bei Thiolyse sind es 0,56 mM, bei Hydrolyse nur 0,45 mM Acetat. Dieser Ansatz zeigt auch bei der 3HB-Bildung signifikante Unterschiede. Er weist bei Hydrolyse rund 20% mehr 3HB auf als bei Thiolysebedingungen: 0,45 mM statt 0,34 mM.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich isolierte Granula aus NB- bzw. MM-Kultur in ihrem Hydrolyse- und Thiolyseverhalten unterscheiden. Im Thiolyseansatz bildet NB-nPHB bei gleicher Menge (mg) mehr als doppelt so viel 3HB-CoA wie MM-nPHB. Einen qualitativen Unterschied ergibt zudem die Analyse auf 3HB- und Acetatbildung im Hydrolyseansatz. Gewaschene Granula aus NB-Kultur bilden nach 15 Minuten Inkubation deutlich mehr 3HB als Acetat, während das Verhältnis für nPHB aus MM-Kultur gerade anders herum ist: hier entsteht mehr Acetat als 3HB. Nach 30 Minuten liegen bei nPHB aus NB-Kultur die beiden Produkte annähernd im Gleichgewicht, während im Ansatz mit nPHB aus MM-Kultur weiterhin fast ausschließlich Acetat nachgewiesen werden konnte.

3.6 Isolierung Granula aus versch. Stämmen

R. eutropha ist der bekannteste Modellorganismus der PHB-Speicherung. Parallel dazu werden in der Forschung zahlreiche weitere PHB-Bildner untersucht, über deren Thiolyseverhalten jedoch kaum Informationen vorliegen. Der erste Teil dieser Arbeit hat eine Reihe neuer Informationen über das Verhalten von *R. eutropha* im Bezug auf Eigenhydrolyse, Eigenthioolyse und die Aktivität von PhaZa1 geschaffen. Darauf aufbauend stand die Frage im Mittelpunkt, ob andere PHB- bzw. PHA (PolyHydroxyAlkanoat)-Organismen ihre nativen Granula ebenfalls nachweisbar in-vitro hydrolysieren und / oder thiolysieren. Interessant ist auch, ob das nPHB eines Organismus womöglich besonders schnell abgebaut wird oder ob andere Produkte - d.h. 3HB-Oligomere - gebildet werden. Für die Kultivierung und die Versuche wurden nicht nur PHB- sondern auch PHV- und PHO-Bildner ausgewählt, um ein breites Substrat- und möglicherweise Reaktions-Spektrum abzudecken.

Folgende Stämme wurden im 2,5 Liter-Maßstab im Schüttelkolben kultiviert (teilweise auch 5 oder 10 l) und die PHA-Granula nach Frenchpress-Aufschluss über Glyceringradienten isoliert:

- ✓ *Alcaligenes latus* DSMZ 1123
- ✓ *Bacillus megaterium*
- ✓ *Comamonas* sp.
- ✓ *Paracoccus denitrificans*
- ✓ *Paucimonas lemoignei*
- ✓ *Pseudomonas putida* 195 (Stammkultur-Nummer AG Jendrossek)
- ✓ *Pseudomonas putida* Gpo500 (Depolymerase-Mutante)
- ✓ *Ralstonia eutropha* H16 Wt
- ✓ *Ralstonia eutropha* H16 Δ PhaP1 (Phasin-Mutante)
- ✓ *Ralstonia eutropha* H16 Δ PhaZa1 (Depolymerase-Mutante)

Die DSMZ- bzw. Stammkultur-Nummern sowie die Kultivierungsdetails der Stämme sind im Material- und Methodenteil unter den Punkten 2.1 und 2.3 aufgelistet. Während die optimalen Kultivierungs- und PHB-Speicherbedingungen für die meisten Organismen in der Literatur zu finden sind, gibt es für die Isolierung der nativen Granula (außer für *R. eutropha*) kaum Informationen. Fast immer mussten daher zunächst mit einer geringen Menge Zellaufschluss verschiedene Parameter wie der Aufbau des Glyceringradienten, die Dauer und Intensität der Zentrifugation optimiert werden, denn die Granula jedes Organismus verhalten sich – wohl vor allem aufgrund der Größenverteilung und Oberflächenstruktur - anders. Um amorphes, „nicht verklebtes“ PHB zu erhalten, war es bei allen Isolationen wichtig, die Ultrazentrifuge im langsamen Modus zu starten und zu stoppen. Tabelle 27 gibt einen Überblick über die individuellen Bedingungen, unter denen die Granula der verschiedenen Organismen isoliert worden sind.

Einige Granulachargen sind durch diese individuellen Bedingungen niedrig konzentriert, andere enthalten pro g Glycerin deutlich mehr PHB. In vergleichenden Versuchen wird immer auf die Menge an reinem PHB, ohne Glycerin berechnet, Bezug genommen (2.10). Aus *R. rubrum* konnten keine Granula gewonnen werden. Obwohl die Zellen kurz vor der Ernte im Mikroskop PHB-Granula zeigten, war es nach FrenchPress-Aufschluss und Glyceringradienten nicht möglich eine PHB-Bande zu identifizieren. Zudem war der gesamte Gradient durch die Membranpigmente tiefrot gefärbt.

Tab.27 Aufbau des Glyceringradienten (Verdünnt mit 1 mM Tris-HCl, pH 8,5) und Zentrifugationsbedingungen zur Isolierung von nativen PHA-Granula aus verschiedenen Organismen. (PHB: Polyhydroxybutyrat, PHV: Polyhydroxyvalerat, PHO: Polyhydroxyoktanoat). Liste Konzentration der isolierten Granula sowie das von den Gradienten abgenommene Volumen an nPHB („Glycerinsuspension“). Beckman Ultracentrifuge AVANTI-65, Rotor SW28. k.A.: keine Angaben.

Organismus (und spez. C-Quelle)	Ernte- OD ₆₀₀	Feucht- gewicht (g / l)	Aufbau Glycerin- gradient	Um- drehungs- zahl	Zentri- fugations- dauer	PHB (mg/g Glycerin- suspension)	Isol. Volumen PHB (ca.)	Ca. Gesamt- menge PHB (mg)
PHB								
<i>Alcaligenes latus</i> (1 x 4% Saccharose)	6,5	k.A.	70% - 5 ml 80% - 10 ml 87% - 10 ml	10.000 rpm	25 min	33	9 ml	300
<i>Bacillus megaterium</i> (1 x 1% Glucose)	8,4	10,4	50% - 5 ml 60% - 5 ml 70% - 5 ml 87% - 5 ml	10.000 rpm	35 min	13,2	30 ml	400
<i>Comamonas sp.</i> (2 x 1% NaGluconat)	3,4	5,4	50% - 10 ml 70% - 10 ml 87% - 5 ml	12.000 rpm	35 min	13,4	30 ml	400
<i>Paucimonas lemoignei</i> (1 x 0,3% 3HB-Na)	3,6		70% - 5 ml 80% - 10 ml 87% - 10 ml	10.000 rpm	25 min	56,5	26 ml	1500
<i>Ralstonia eutropha</i> (Wt, ΔphaP1, ΔphaZa1) (1 x 2% NaGluconat)	Wt: 10,3 ΔphaP1: k.A. ΔphaZ: k.A.	Wt: 5,8 ΔphaP1: 7,4 ΔphaZ: 6,2	50% - 10 ml 70% - 10 ml 87% - 5 ml	12.000 rpm	35 min	Wt: 57,6 phaP1: 57,2 ΔphaZ: 88	20 ml 18 ml 17 ml	1200 1000 1500
<i>Ralstonia eutropha</i> (von NB-Kultur)	4,5	4,1	40% - 10 ml 70% - 5 ml 87% - 5 ml	15.000 rpm	20 min	37,2	10 ml	370
PHV								
<i>Paracoccus denitrificans</i> (1 x 0,2% n-Pentanol, 2 x 0,02% n-Pentanol)	k.A.	k.A.	50% - 10 ml 70% - 10 ml 87% - 5 ml	15.000 rpm	20 min	ca. 2	10 ml	20
PHO								
<i>Pseudomonas putida</i> (SK 195) (1 x 0,15% Na- Oktanoat)	4,8	4,9	50% - 5 ml 55% - 10 ml 60% - 5 ml 87% - 5 ml	12.000 rpm	35 min	4,5	20 ml	90
<i>Pseudomonas putida</i> (Gpo 500) (1 x 0,15% Na- Oktanoat)	4,1	2,1	50% - 10 ml 70% - 10 ml 87% - 5 ml	12.000 rpm	35 min	53	10 ml	530

3.6.1 Endogene Thiolyse verschiedener PHA-Bildner

Das Hydrolyse- und Thiolyseverhalten von nativen Granula aus *R. eutropha* Wt und den beiden Mutanten $\Delta phaP1$ (Δ Phasin) und $\Delta phaZa1$ (Δ Depolymerase) wurde ausführlich in Kapitel 3.5.5 beschrieben. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse von Thiolyseversuchen mit PHA-Granula anderer Organismen vorgestellt. Das erste Diagramm (Abb. 90) zeigt vergleichend die 3HB-CoA-Bildung durch Granula aus: *Bacillus megaterium*, *Comamonas* sp. und *Ralstonia eutropha* Wt. Anschließend folgt die Untersuchung von nPHB aus *Alcaligenes latus* und *Paucimonas lemoignei* auf Thiolyseaktivität. Der letzte Teil verdeutlicht das Abbauverhalten nativer Granula der PHV- bzw PHO-bildenden Organismen *Paracoccus denitrificans* und *Pseudomonas putida* 195. Ihm voraus geht ein ausführlicher Abschnitt (3.6.1.4) über die Analyse der Thiolyseprodukte von nPHV und nPHO.

3.6.1.1 *B. megaterium*, *Comamonas* sp., *R. eutropha*

Für den parallelen Versuch mit Granula aus *Bacillus megaterium*, *Comamonas* sp. und *Ralstonia eutropha* Wt wurden je 5 mg gewaschenes nPHB auf Thiolyseaktivität untersucht. Die Probenahmen (200 μ l) erfolgten nach 0, 20, 40 und 60 Minuten.

Der direkte Vergleich (Abb. 90) zeigt auf einen Blick die Unterschiede in der 3HB-CoA-Bildung durch die drei Granulasorten. Im Ansatz mit nPHB aus *Bacillus megaterium* sind zum Zeitpunkt 0 Minuten knapp 20 μ M 3HB-CoA nachweisbar. Diese Konzentration steigt jedoch während der nächsten 60 Minuten nicht mehr signifikant an. Mit Granula aus *Comamonas* und *R. eutropha* Wt hingegen nimmt die Konzentration kontinuierlich zu. Dabei liegt die Bildungsrate durch *R. eutropha* Wt-Granula rund doppelt so hoch wie für *Comamonas*. Beiden gemeinsam ist jedoch, dass ihre Rate nach 40 Minuten absinkt und zwischen 40 und 60 Minuten nur noch wenig Produkt gebildet wird.

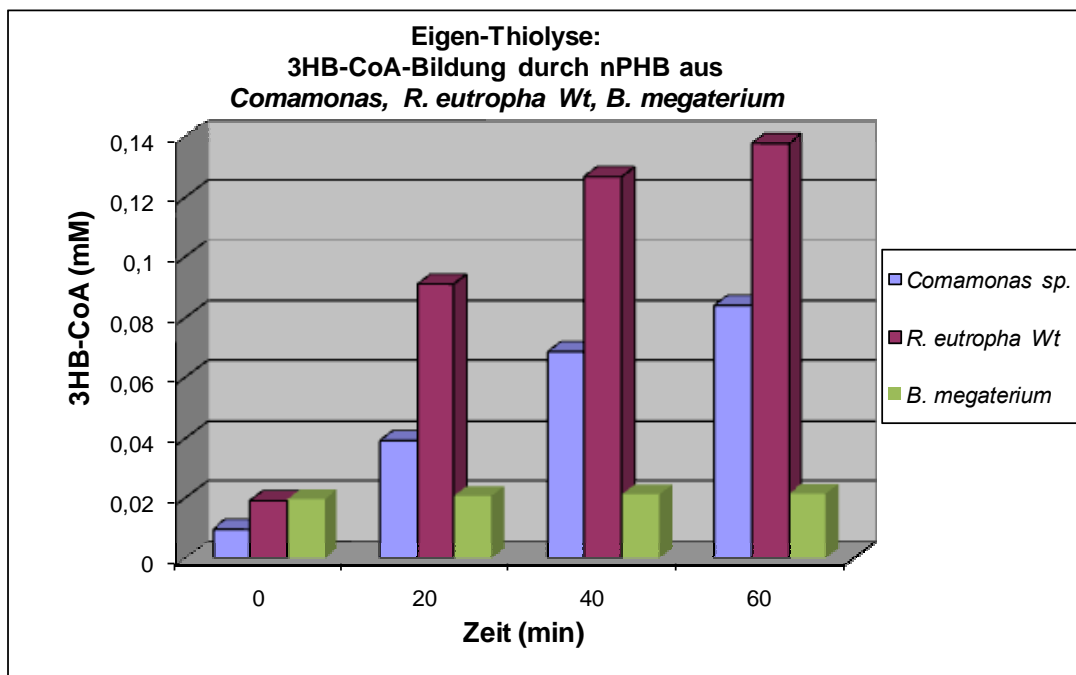


Abb. 90 Vergleich 3HB-CoA-Bildung durch nPHB aus *Comamonas* sp. (blau), *Ralstonia eutropha* Wt (rot) und *Bacillus megaterium* (grün). Jeweils 5 mg PHB, gewaschen, Thiolyseansatz (2.16.1). HPLC-Analyse auf CoA-Esterbildung. Auftrag: je 5 μ l Probenüberstand. HPLC-Methode: „CoA-Ester“. Ansatzvolumen: 1 ml

3.6.1.2 *Alcaligenes latus*

Schon vor den Untersuchungen zur Thiolyse war *Alcaligenes latus* 1123 in Versuchen am pH-Staten durch die hohe Hydrolyseaktivität seiner nativen PHB-Granula aufgefallen (Kapitel 3.4.2). Erste Thiolyseversuche jedoch ergaben keinerlei Hinweis auf die Bildung von CoA-Estern. Um sicherzugehen, dass nicht Mangel an nPHB die Ursache dafür darstellt, wurde die Menge an Granula im Thiolyseansatz deutlich erhöht. So wurden neben 5 mg – als Standardansatz - unter anderem 20 mg PHB eingesetzt (Abb. 91 und Abb. 92).

Trotz mehr Substrat tauchen in den HPLC-Analysen bei Retentionszeiten von 3HB-CoA (ca. 15 min) und Ac-CoA (ca. 14 min) keine signifikanten Peaks auf. Stattdessen zeigen sich zwischen den beiden Ansätze mit 5 bzw 20 mg PHB andere Unterschiede. So ist im Ansatz mit 5 mg PHB nach 90 Minuten Inkubation eine Substanz entstanden, die bei 5,1 min eluiert. Der in der Kontrolle (0 Minuten) erkennbare Peak bei 2,9 min hingegen ist verschwunden. Der deutliche Peak bei ca. 12,8 min verändert sich während des Versuches nicht – genau wie auch der CoA-Peak (ca. 9,2 min) weder signifikant ab- noch zunimmt.

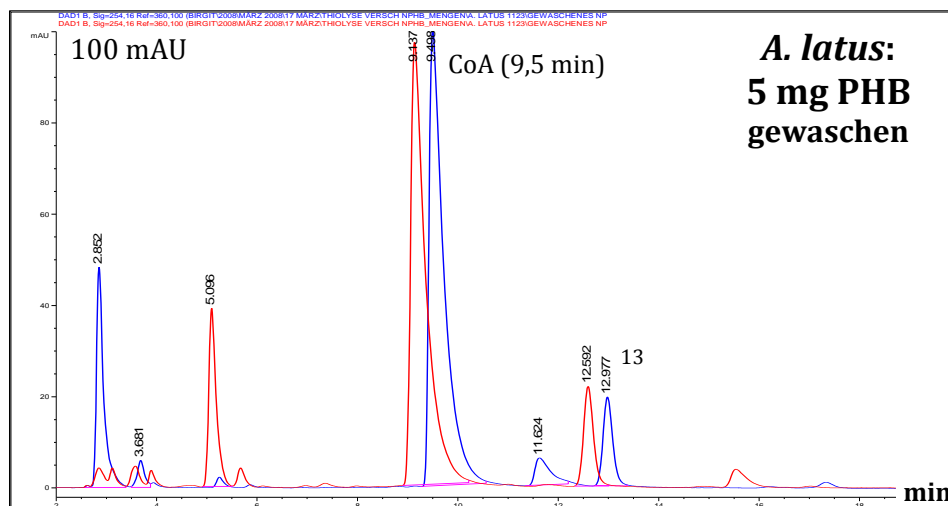


Abb. 91 *Alcaligenes latus* 1123: 5 mg PHB gewaschen, Thiolyseansatz (2.16.1) HPLC-Analyse auf CoA-Esterbildung. Blau: 0 Minuten-Probe, Rot: 90 Minuten-Probe. Auftrag auf HPLC: je 5µl Probenüberstand. HPLC-Methode: „CoA-Ester“.

Anders sieht es hingegen in dem Ansatz aus, in dem 20 mg PHB eingesetzt wurden (Abb. 92). Hier findet sich in der Kontrolle eine deutlich höhere Konzentration der unbekannt Substanz, die nach ca. 12,8 Minuten eluiert. Nach 90 Minuten ist sie jedoch stark zurückgegangen. Überraschend ist auch das Ergebnis der CoA-Analyse: zu Beginn des Versuches wurden nur rund 0,14 mM CoA detektiert, das entspricht 10-20 % verglichen mit der 5 mg-Probe. Nach 90 Minuten hingegen ist die Konzentration stark angestiegen (0,72 mM). Ein Peak (3,7 min) dominiert in der Kontrolle, der beim Ansatz mit 5 mg PHB keine Rolle spielte. Am Ende der Reaktion ist die entsprechende Substanz nicht mehr detektierbar. Die Entwicklung der Peaks nach 2,8 min und 5 min entspricht wieder dem 5 mg-PHB-Ansatz: der erste Peak verschwindet über die 90 Minuten, der zweite Peak nimmt sehr stark zu.

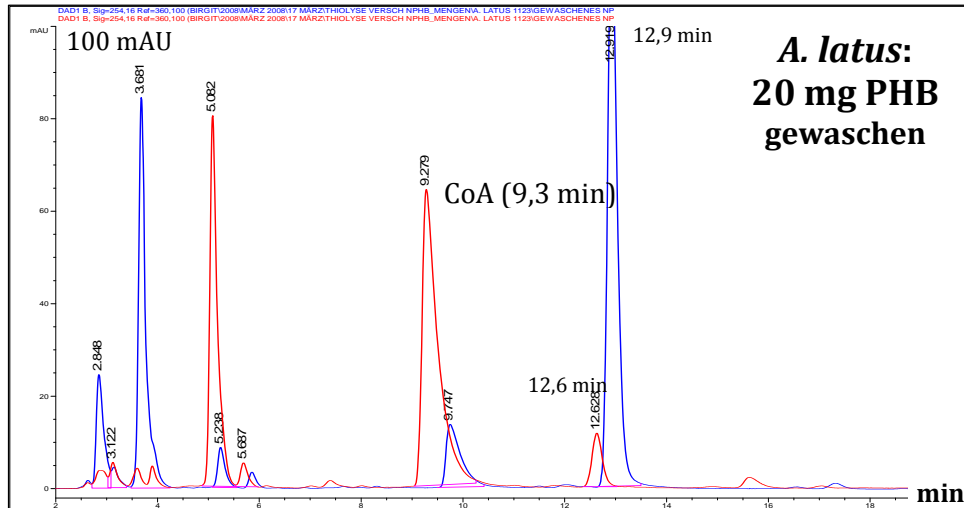


Abb. 92 *Alcaligenes latus* 1123: 20 mg PHB, gewaschen, Thiolyseansatz (2.16.1). HPLC-Analyse auf CoA-Esterbildung. Blau: 0 Minuten-Probe, Rot: 90 Minuten-Probe. Auftrag auf HPLC: je 5µl Probenüberstand. HPLC-Methode: „CoA-Ester“.

Für die CoA-Ester-Bildung macht es keinen Unterschied, ob nPHB gewaschen oder ungewaschen vorlag: auch Thiolyseansätze mit ungewaschenen Granula zeigen in HPLC-Analyse keine Peaks für 3HB-CoA oder Acetyl-CoA (Abb. 93, 94). Allerdings auch kaum bzw. kein CoA mehr, weder nach 0 Minuten noch nach 90 Minuten Inkubation. Einen deutlichen Zusammenhang zwischen eingesetztem nPHB und Peakgröße zeigt die unbekannte Substanz mit der Elutionszeit 5,2 min: je mehr Granula, desto höher der Peak. In beiden Fällen, mit 5 mg und 20 mg nPHB, steigt er zudem bis zur 90 Minuten-Probe stark an. Im Gegensatz dazu zeigen die Chromatogramme beider Ansätze in der jeweiligen 0 Minuten-Probe einen deutlichen Peak nach 3,6 Minuten, der in der 90 Minuten-Probe verschwunden ist.

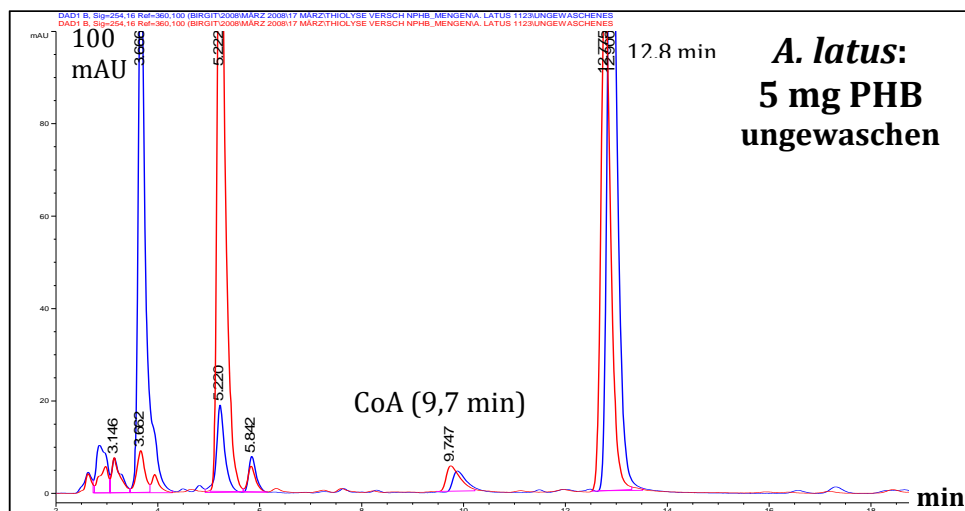


Abb. 93 *Alcaligenes latus* 1123: 5mg PHB, ungewaschen, Thiolyseansatz (2.16.1). HPLC-Analyse auf CoA-Esterbildung. Blau: 0 Minuten-Probe, Rot: 90 Minuten-Probe. Auftrag auf HPLC: je 5µl Probenüberstand. HPLC-Methode: „CoA-Ester“

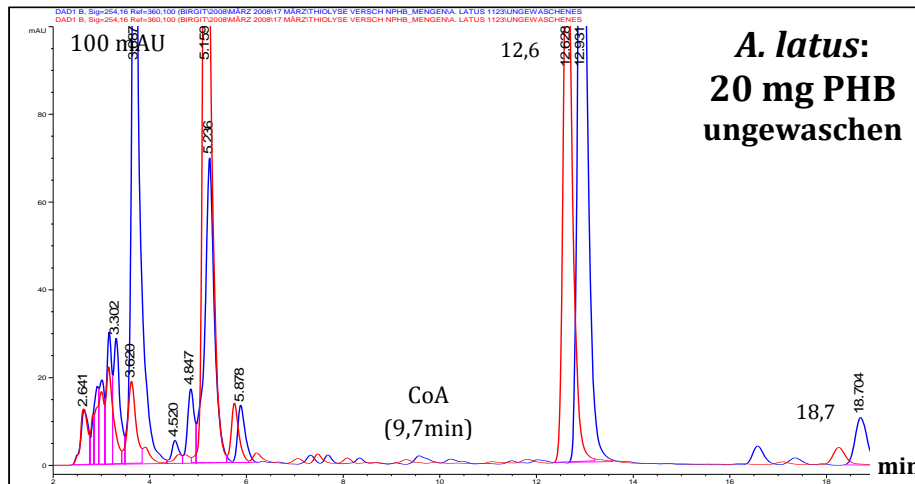


Abb. 94 *Alcaligenes latus* 1123: 20 mg PHB, ungewaschen, Thiolyseansatz (2.16.1). HPLC-Analyse auf CoA-Esterbildung. Blau: 0 Minuten-Probe, Rot: 90 Minuten-Probe. Auftrag auf HPLC: je 5µl Probenüberstand. HPLC-Methode: „CoA-Ester“

3.6.1.3 *Paucimonas lemoignei*

Der Thiolyseansatz mit nativen Granula aus *P. lemoignei*, einem weiteren PHB-Bildner, zeigt nach 60 und 120 Minuten jeweils nur Spuren einer CoA-Ester-Bildung (Abb. 95). Nach 16,8 und 17,4 Minuten tauchen bei Analyse der Proben per HPLC zwar neue Peaks auf, die Acetyl-CoA und 3HB-CoA entsprechen. Die Konzentration der beiden Substanzen im Versuchsansatz, hochgerechnet aus den detektierten HPLC-Flächeneinheiten, ist jedoch mit 9 µM für Acetyl-CoA und 17 µM für 3HB-CoA sehr niedrig.

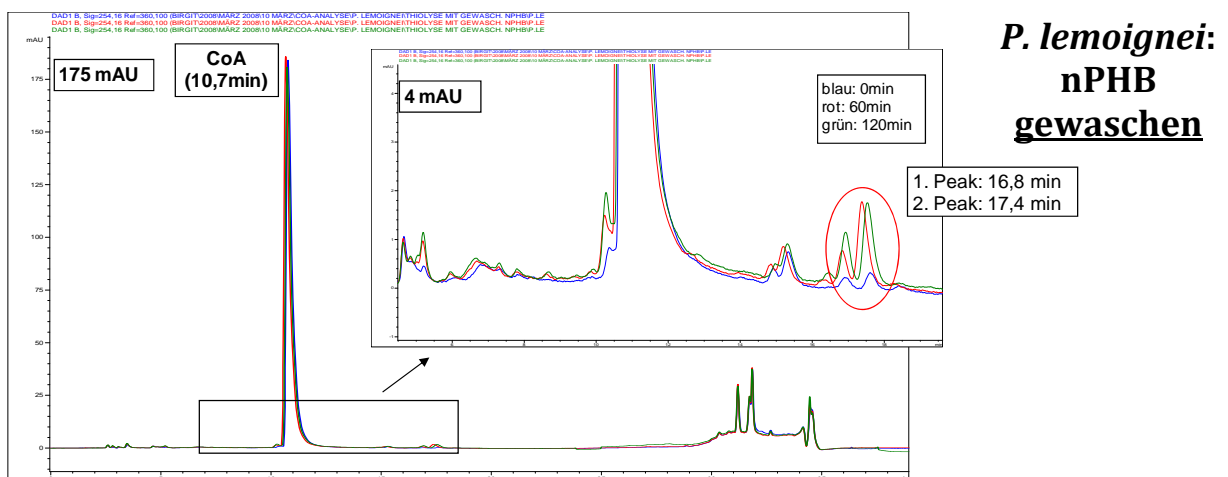


Abb. 95 Ausschnitt: *Paucimonas lemoignei*: 5,8 mg PHB, gewaschen, Thiolyseansatz (2.16.1). HPLC-Analyse auf CoA-Esterbildung. Blau: 0 Minuten-Probe, Rot: 60 Minuten-Probe, Grün: 120 Minuten-Probe. Auftrag auf HPLC: je 5µl Probenüberstand. HPLC-Methode: „CoA-Ester“.

Dabei ergibt die Analyse der Thiolyseproben mit ungewaschenen Granula fast identische Chromatogramme (Abb. 96). Auch hier zeigen sich in der 60 und 90 Minuten-Probe zur Elutionszeit von Acetyl- und 3HB-CoA sehr kleine Peaks. Sie sind nach 120 Minuten geringfügig

größer als nach 60 Minuten und entsprechen insgesamt nur einer Konzentration von 27 μM Acetyl-CoA bzw. 11 μM 3HB-CoA.

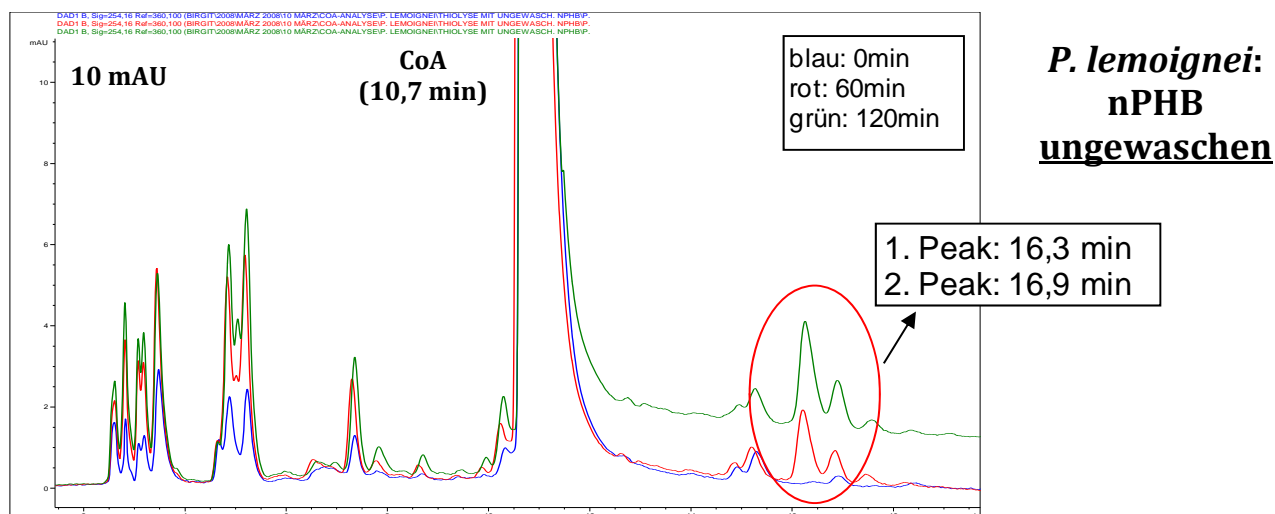


Abb. 96 Ausschnitt: *Paucimonas lemoignei*: 5,8 mg PHB, ungewaschen, Thiolseansatz (2.16.1). HPLC-Analyse auf CoA-Esterbildung. Blau: 0 Minuten-Probe, Rot: 60 Minuten-Probe, Grün: 120 Minuten-Probe. Auftrag auf HPLC: je 5 μl Probenüberstand. HPLC-Methode: „CoA-Ester“.

3.6.1.4 Analyse derivatisiertes 3-HV- und 3HO-Monomer per ESI-MS

Für die Arbeit mit den Granula aus PHO und PHV war es notwendig, entsprechende Monomer-Standards herzustellen. Die Derivatisierung von gekauftem 3-Hydroxyoktanoat (3HO) funktionierte mit Bromphenacylbromid genau wie mit 3HB oder 3HB-Oligomeren (Wang et al. 2007). Das 3HV-Monomer wurde durch alkalische Hydrolyse von PHV aus *Paracoccus denitrificans* gewonnen. Dazu wurden rund 10 mg denaturiertes PHV in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für eine Stunde in 550 μl 0,5 M NaOH bei 85°C inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 185 μl 1M HCl zugegeben. Den knapp 740 μl Probe wurden 750 μl 0,1 M Triethylamin (TEA) zugefügt. Abweichend vom Standardprotokoll wurde der Ansatz nicht komplett abgedampft. Stattdessen wurde die Derivatisierung parallel mit 0,5 μl , 1 μl und 5 μl der Probe durchgeführt. Die Peaks der entsprechenden HPLC-Chromatogramme (Abb. 97, 98) wurden mit Hilfe einer ESI-MS-Analyse (Elektronen-Spray-Ionisations-Massen-Spektroskopie) als 3HO- (Abb. 99-101) bzw. 3HV-Monomer bestätigt (Abb. 102).

Ein Problem stellt nach wie vor der Nachweis möglicher 3HO- und 3HV-CoA-Verbindungen dar. Fertige Standards dieser Verbindung sind nicht erhältlich und die Detektion per ESI-MS funktioniert nur mit Puffern ohne Phosphat. Vergeblich wurde versucht, die Auftrennung der uns bisher bekannten CoA-Ester (3HB-CoA, Acetyl-CoA) mit anderen Lösungsmitteln zu erreichen. Das Resultat waren stets sehr breite Peaks. Mit hoher Wahrscheinlichkeit eluieren 3HO-CoA und 3HV-CoA jedoch später als reines CoA. Tauchen also bis zum Ende des HPLC-Laufes keinerlei Peaks neu auf, kann mit großer Sicherheit angenommen werden, dass keine entsprechende Thioester-Verbindung gebildet wurde.

Für weitere Versuche, CoA-Ester per HPLC-MS zu detektieren, sei auf die jüngsten Veröffentlichungen von Minkler et al. 2008 und Park et al. 2007 verwiesen.

Das folgende Chromatogramm zeigt zunächst die Analyse von derivatisiertem 3-Hydroxyoktanoat-Standard (3-HO) durch die HPLC der AG Jendrossek (Abb. 97). Es tauchen zwei Peaks auf, von denen der erste bereits als Signal für überschüssiges Derivatisierungsmittel (BPB)

bekannt ist. Der zweite größere Peak ist vermutlich der 3HO-BP-Standard. Daran schließt sich das DAD-Chromatogramm der HPLC-MS-Messung am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hohenheim an (Abb. 98). In Abbildung 99 ist zeitgleich zur DAD-Detektion der HPLC die Massenspektrometrie per ESI-MS dokumentiert. Abbildung 100 schließlich zeigt, welche Massen hinter dem per DAD detektierten Peak nach 24,6 bzw. 23 Minuten liegen.

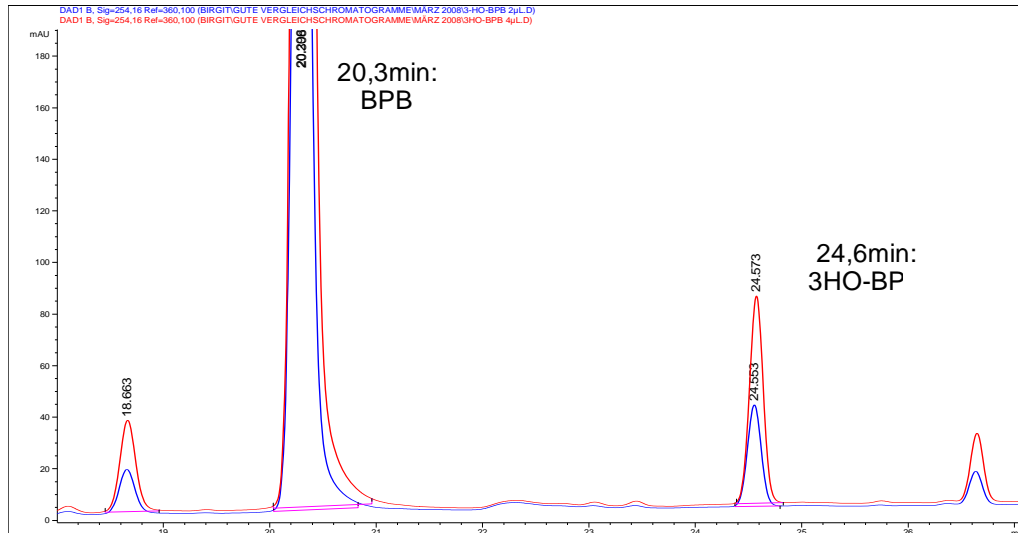


Abb. 97 HPLC-Lauf derivatisierter 3-HO-Standard (3-HydroxyOktansäure). Am Institut für Mikrobiologie, Stuttgart: mit Agilent 1100-Series und Lichrosphere C18, 5µm, 240 x 4 mm, endcapped. DAD-Spektrum (DAD: Diode-Array-Detektor), HPLC-Methode: "40%MetOH".

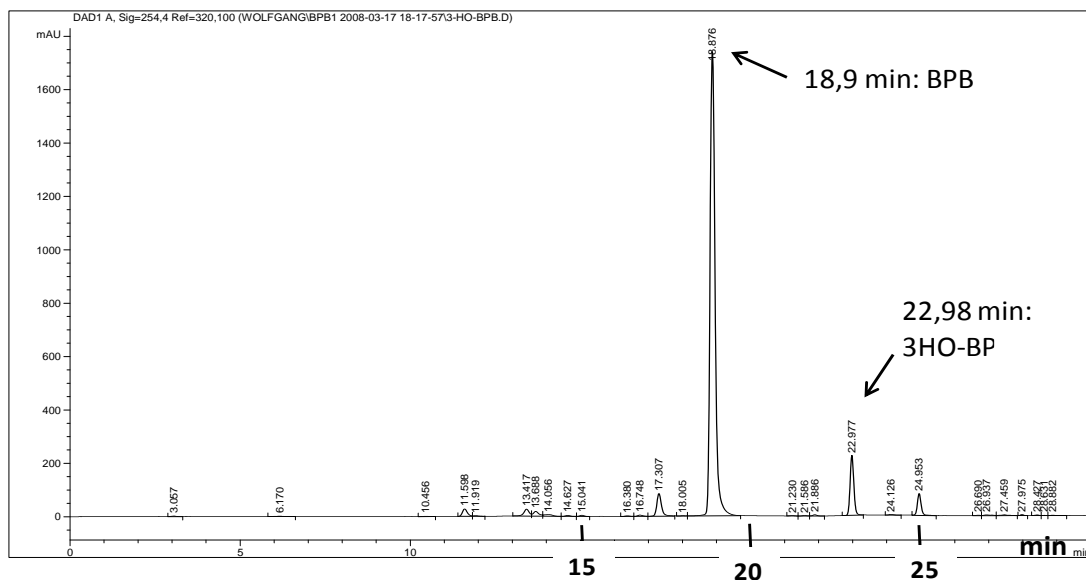


Abb. 98 HPLC-Lauf derivatisierter 3-HO-Standard (3-HydroxyOktansäure). Am Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hohenheim: mit Agilent 1100-Series und Lichrosphere C18, 5µm, 250 x 4 mm, endcapped. Mit angeschlossener Massenspektrometrie (ESI-MS). DAD-Spektrum (DAD: Diode-Array-Detektor), HPLC-Methode: "40%MetOH".

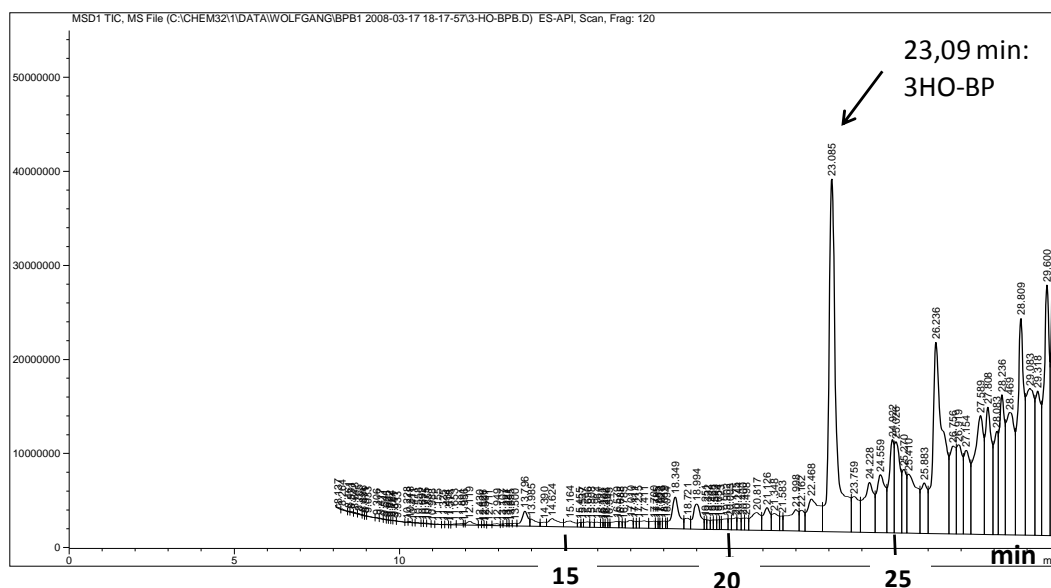


Abb. 99 Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrum (ESI-MS): Angezeigt werden alle während des Laufes detektierten Massen. Nach 23,09 min, zur vermuteten Elutionszeit des derivatisierten 3-HO Standards (3-HydroxyOktansäure, $m/z=160$) erscheint deutlich ein Masse-Peak.

Unabhängig von der Konzentration einer Substanz hängt die Peakgröße im HPLC-Chromatogramm vom Extinktionskoeffizienten der Verbindung ab. Im Massenspektrogramm davon, wie leicht sie sich ionisieren lässt. Daher taucht in Abb. 98 bei 18,88 min ein stark absorbierender Peak auf, dem in der MS (Abb. 99) keine Retentionszeit entspricht. Es handelt sich dabei um überschüssiges Bromphenacylbromid (BPB) aus der Derivatisierungsreaktion. Die Verbindung (siehe auch Abb. 4 in Kapitel 2.17.1) konnte trotz zahlreicher Versuche und Einstellungen nicht in der Masse detektiert werden. Im Gegenzug ergibt unsere Standardsubstanz 3HO(-BPB) ein sehr starkes Signal in der MS (23,09 min), der Peak im HPLC-Chromatogramm ist hingegen eher schwächer (22,98 min). Abb. 94 zeigt, welche Massen sich genau hinter dem Peak nach 23,09 min verbergen.

Tabelle 13 (2.19) bietet eine Übersicht über die verschiedenen Massen die die mit BPB derivatisierten PHB-Oligomere je nach Bromisotop (79/81) besitzen. Hinzu kommen Natrium- oder Kaliumionen aus dem Laufpuffer, die durch die Ionenspray-Ionisation mit der Probe Na- oder K-Addukte bilden können. Im Fall von PHO beträgt die Masse eines Moleküls Hydroxyoktansäure 160 g/mol. Für die Detektion per ESI-MS wird ein geladenes Molekül benötigt. In unserem Fall wurde das Gerät auf die Detektion von Kationen eingestellt und das Hydroxyoktanoat der Probe während des Laufes entsprechend ionisiert (Modus: ESI+). Wie aus M&M x.y.z. zu entnehmen ist, ergibt 3HO mit Brom79 oder Brom81 356 / 358 m/z . Tritt als Addukt nur ein Proton auf, ergeben sich 357 oder 359 m/z , den Natrium, Kalium, Ammoniumaddukten entsprechend, können 379 / 381 m/z , 395/397 m/z oder 374 / 376 m/z gebildet werden. Eine weitere Kombination wäre die Addition eines Proton, gekoppelt an die Abspaltung von H_2O : 339 / 341 m/z .

Zur Retentionszeit 23,09 min detektierte das ESI-MS Massensignale mit m/z 215 und 217, m/z 357 und 359, m/z 374 und 376, m/z 395 und 397, m/z 737 und 739 (Abb. 100). Die Massen (pro Ladung) 215/217 und 737/739 lassen sich dem derivatisierten 3HO-Standard nicht zuordnen. Die Paare 357/359, 374/376 und 395/397 (m/z) jedoch entsprechen der protonierten Verbindung, den Ammoniumaddukten sowie den Kaliumaddukten.

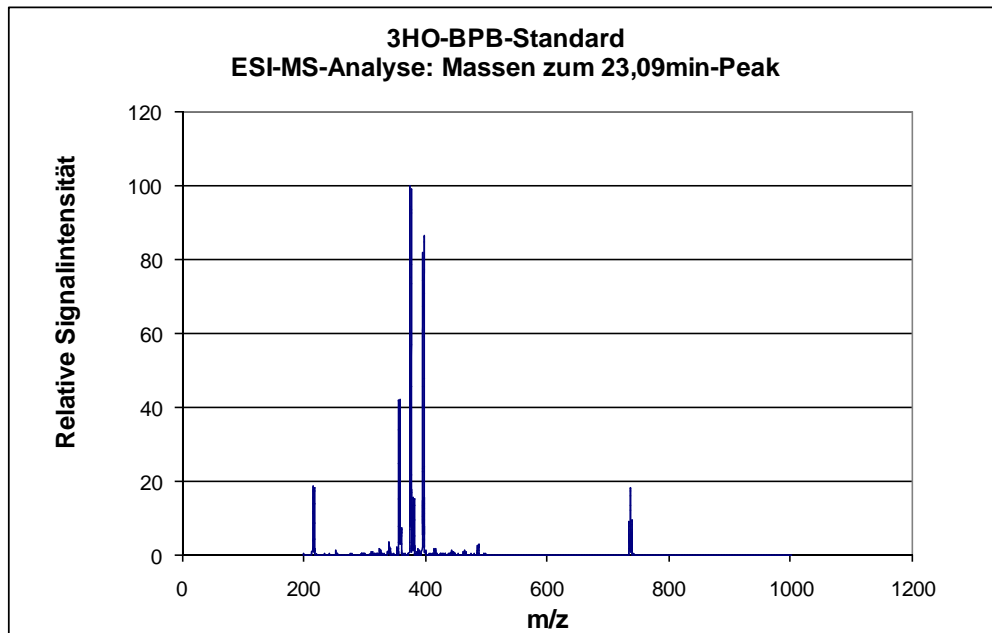


Abb. 100 *ESI-Massenspektrum (ESI⁺) des Peaks „23,09 min“ (Abb. 99) des 3HO-BPB-Standards: Signale bei 215/ 217, 357/ 359, 374/ 376, 395/ 397 und 737/ 739 m/z . Die unterstrichenen Werte entsprechen verschiedenen 3HO-Derivat-Addukten.*

Damit ist sichergestellt, dass unser 3HO-BP-Standard nach 23 min (HPLC-Lauf Uni Hohenheim) bzw. 24,6 min (HPLC AG Jendrossek) eluiert und detektiert wird.

Das gleiche gilt für den 3HV-BP-Standard. Abbildung 101 zeigt zunächst das HPLC-Chromatogramm von hydrolysiertem PHV. Der Peak nach 19,8 min stammt von überschüssigem BPB, der kleine Peak nach 17,5 von derivatisiertem 3-HV. Dies bestätigt Abbildung 102. Hier wurde das Massenspektrogramm gezielt auf die beiden Massen (315, 317 m/z) des derivatisierten 3-HV-Monomer untersucht. Die Masse 317 m/z taucht nach 16; 17,9 und 19,2 Minuten auf. Das Brom⁷⁹-Derivat (315 m/z) jedoch nur nach 17,9 Minuten. Bei den Peaks nach 16 und 19,2 Minuten handelt es sich demnach nicht um mit Brom derivatisierte Verbindungen. Die Masse des derivatisierten 3-HV wurde nach 17,9 Minuten detektiert.

Im Verlauf der HPLC-MS-Messung fließt die Probe nach Auftrennung über die Säule zunächst durch den DAD. Anschließend wird der Volumenstrom gesplittet und nur die Hälfte zur ESI-MS weitergeleitet. Zeitlich erfolgt daher die DAD-Detektion vor der MS-Messung. Verglichen mit dem DAD-Spektrum entspricht die Massen-Detektion des derivatisierten 3HV (17,9 min) dem dortigen Peak nach 17,53 Minuten.

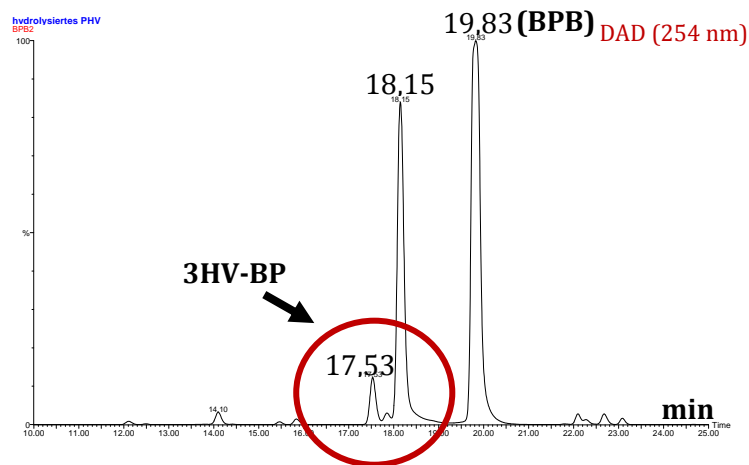


Abb. 101 HPLC-Chromatogramm von derivatisierter 3HV-Lösung, hergestellt durch alkalische Hydrolyse von PHV (siehe oben). HPLC-Methode: „40%MetOH“.

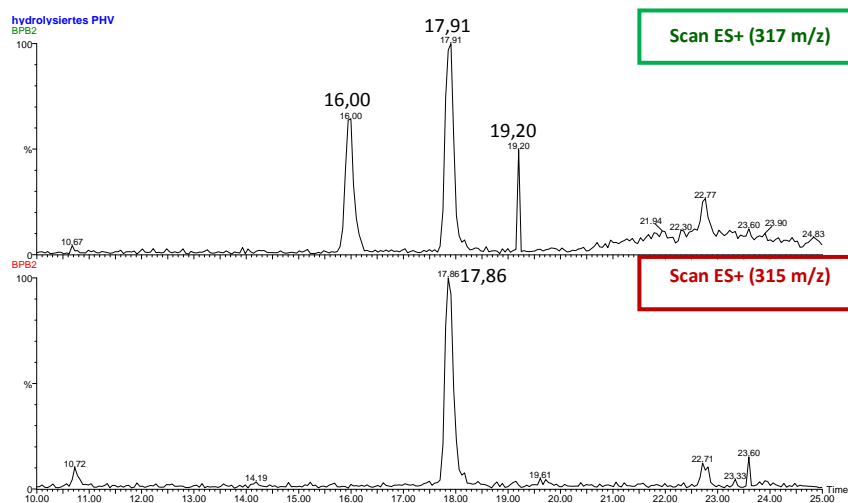


Abb. 102 ESI⁺-Massenspektrogramm von derivatisierter 3HV-Lösung. Gezielte Analyse auf die Massen der bromierten Verbindung (317, 315 m/z) und deren Elutionszeit.

3.6.1.5 *Pseudomonas putida* 195 (PHO), *Paracoccus denitrificans* (PHV)

Im Thiolyseansatz mit Granula aus *Pseudomonas putida* 195 ist weder nach 60 noch 120 Minuten eine CoA-Esterbildung (3HO-CoA oder andere) nachweisbar (Abb. 103). Zwischen dem Signal für CoA bei 10,6 min bis zum Waschschrift bei 100% Methanol nach 27 Minuten tauchen keine signifikanten Peaks auf. Lediglich bei 14,4 min, 15,6 min und 16,5 min zeigen sich schwache Signale. Sie besitzen jedoch zum einen eine sehr geringe Größe (siehe Maßstab: 10 mAU) und verändern sich zum anderen über die Zeit nicht signifikant. Zudem wird angenommen, dass 3HO-CoA aufgrund seines stärker unpolaren C8-Körpers später eluiert als 3HB-CoA (C4-Körper, Elutionszeit ca. 16-17 min).

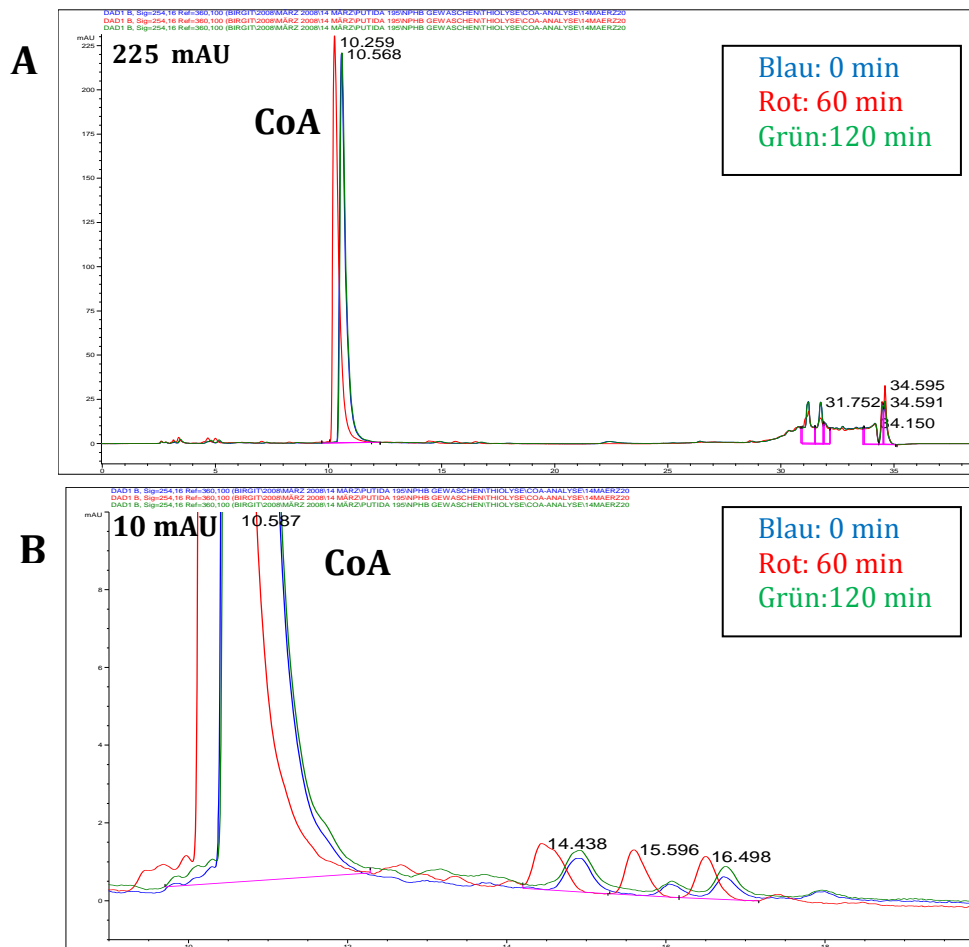


Abb. 103 **Gesamtes Chromatogramm (A) und Ausschnitt (B): *Pseudomonas putida* 195: 2,5 mg PHB, gewaschen, Thiolyseansatz (2.16.1) HPLC-Analyse auf CoA-Esterbildung. Blau: 0 Minuten-Probe, Rot: 60 Minuten-Probe, Grün: 120 Minuten-Probe. Auftrag auf HPLC: je 5µl Probenüberstand. Methode: „CoA-Ester“**

Für native Granula aus *Paracoccus denitrificans* (nPHV) konnte in Thiolyseansätzen zwar keine 3HV-CoA-Ester nachgewiesen werden. Dafür entstanden im Versuchsansatz 3HB-CoA und Acetyl-CoA, wenn auch in sehr geringer Menge. Dies zeigt der Vergleich der HPLC-Analyse der Proben nach 0 und 60 Minuten (Abb. 104) und der Ansatz mit internen Standards (Abb. 105). Der Thiolyseansatz enthielt 500 µl Granulasuspension, was nur rund 1 mg gewaschenem und getrocknetem PHV entspricht. Aber die Ausbeute an nPHV aus *Paracoccus denitrificans* war sehr gering (siehe Tab. 27) und die Granula wurden daher bei der Isolierung stark mit Glycerin verdünnt. Es ist daher möglich, dass ein Fehlen von detektierbaren 3HV-CoA-Verbindungen an einer zu geringen Substratkonzentration liegt.

Dass es sich in der HPLC-Analyse bei dem 13 min-Peak nicht um Acetyl-CoA oder eventuell 3HB-CoA handelt, beweisen die beiden Overlay-Chromatogramme in Abb. 105. Der rote Graph zeigt die nPHV-Thiolyse-Probe, gemischt mit 3HB-CoA-Standard. In der Probe des grünen Chromatogrammes ist zudem Acetyl-CoA-Standard zugefügt worden. Bei dem 13min-Peak muss es sich daher um eine andere Substanz handeln. Da die Auftrennung von CoA-Estern ohne KP-Puffer bisher noch nicht gelungen ist, konnte der Peak nicht per ESI-MS analysiert werden, denn KP-Puffer schadet der Anlage. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass sich 3HV-CoA hinter dem 13 min-Peak verbirgt: die Verbindung ist unpolarer als 3HB-CoA und sollte daher später eluieren.

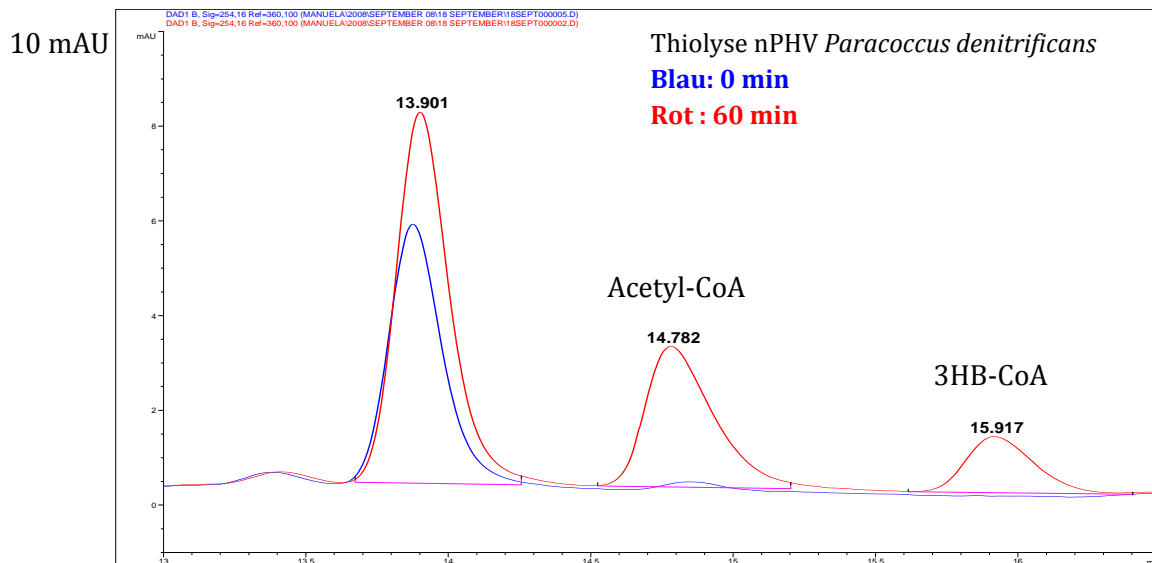


Abb. 104 HPLC-Analyse auf CoA-Esterbildung: Thiolyseansatz (2.16.1) mit nPHV aus *Paracoccus denitrificans* (500µl Granulasuspension = 1mg PHV, gewaschen). Ansatzvolumen: 1ml. Overlay der Chromatogramme von Proben nach 0 min (blau) und 60 min (rot). Auftrag auf HPLC: je 5µl Probenüberstand. Methode: „CoA-Ester“

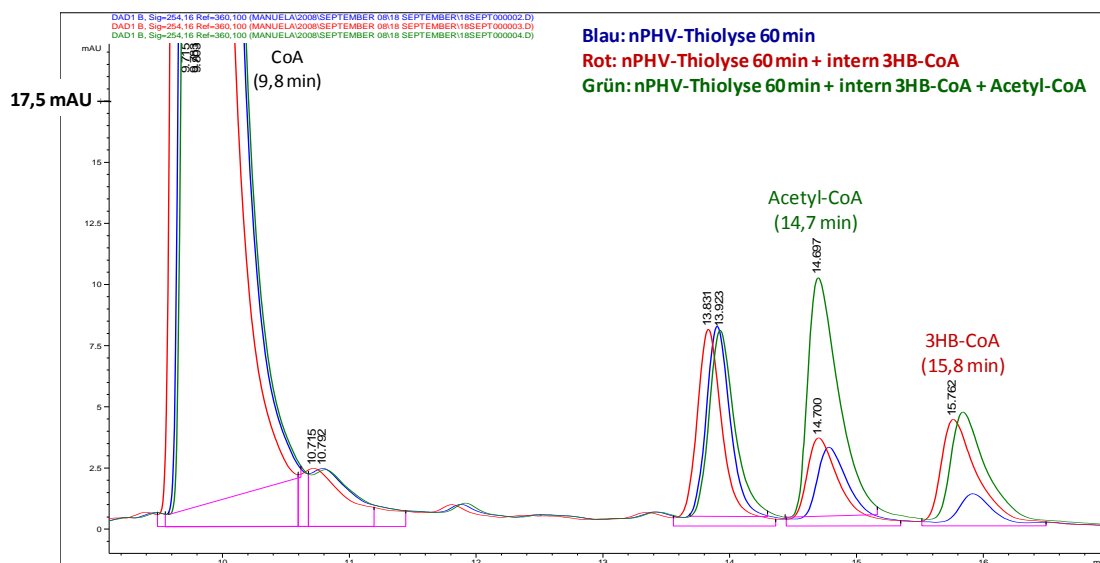


Abb. 105 Thiolyse von nPHV aus *Paracoccus denitrificans*: HPLC-Analyse der 60-Minuten-Probe auf CoA-Ester (blau). Identifizierung der Peaks durch internen 3HB-CoA-Standard (rot) und zusätzlich Acetyl-CoA-Standard (grün). HPLC-Methode „CoA-Ester“

3.6.2 Endogene Hydrolyse verschiedener PHA-Bildnern

3.6.2.1 *Alcaligenes latus*, *B. megaterium*, *Comamonas* sp.

Die folgende Abbildung (Abb. 106) vereint die Ergebnisse der Hydrolyse von nPHB aller drei Organismen in einem Diagramm. Und veranschaulicht dadurch die beachtlichen Unterschiede der Eigen-Hydrolyse dieser nativen PHB-Granula verschiedener Herkunft.

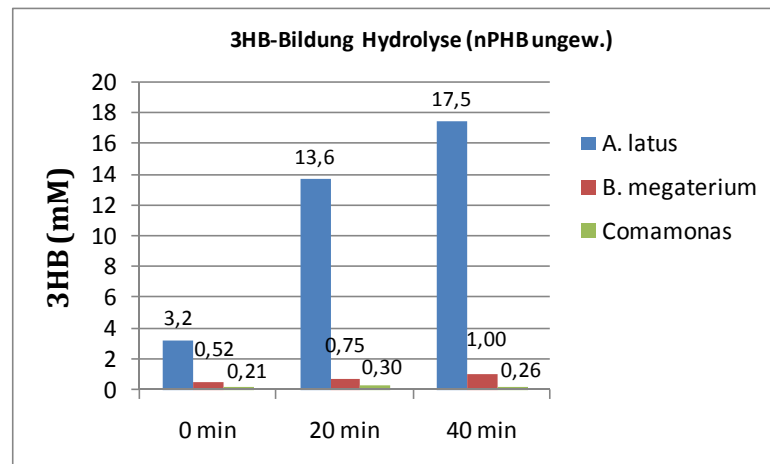


Abb. 106 Vergleich 3HB-Bildung (HPLC-Analyse) im 1ml-Hydrolyseansatz (2.16.1) mit nPHB (ungewaschen, entspricht je 5 mg) aus *A. latus* (152 mg Glycerinsuspension), *B. megaterium* (379 mg) und *Comamonas* (373 mg). Probenahme nach 0, 20 und 40 min.

Im Vergleich mit der 3HB-Bildung von nPHB aus *A. latus* erscheint die Hydrolyseaktivität der Granula aus *B. megaterium* und *Comamonas* verschwindend gering. Alleine betrachtet sind deren Werte aber durchaus signifikant und die Produkte deutlich über der Nachweisgrenze. Alle drei Ansätze weisen bereits in der Nullprobe 3HB auf, *A. latus* mit über 3 mM am meisten. Während sich die Produktmenge hier nach 40 Minuten um den Faktor fünf erhöht hat, verdoppelte sich bei *B. megaterium* in dieser Zeit der 3HB-Gehalt lediglich. Im Ansatz mit nPHB aus *Comamonas* steigt die 3HB-Konzentration von 0,2 auf 0,3 mM in den ersten zwanzig Minuten. Anschließend sinkt der Gehalt jedoch leicht ab. Die Abnahme von 3HB kann mit der Bildung von Acetat zusammenhängen. Abb. 107 zeigt die Konzentrationen dieses 3HB-Folgeproduktes nach 0, 20 und 40 Minuten in den Hydrolyseansätzen aller drei Granula-Arten.

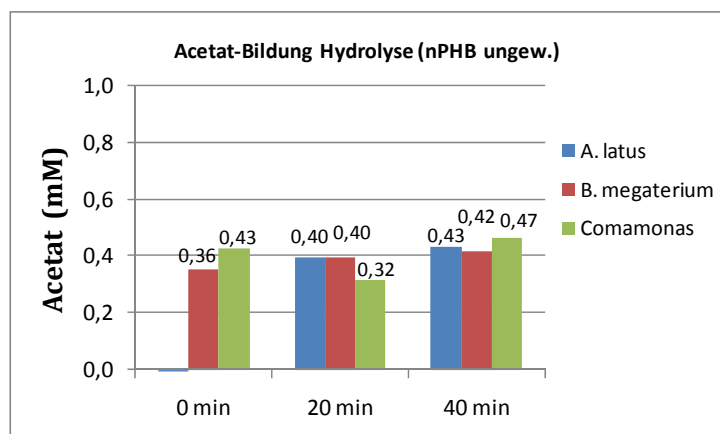


Abb. 107 Analyse (HPLC) auf Acetatbildung im Standard-Hydrolyseansatz (1ml) (2.16.1) mit nPHB aus *Alcaligenes latus*, *B. megaterium*, *Comamonas* sp. Versuch wie Abb. 96. Probenahme nach 0, 20 und 40 min.

Interessanterweise liegt die Acetat-Konzentration mit nPHB aus allen drei Organismen im gleichen Bereich: sie bewegt sich zwischen 0,32 und 0,47 mM, wobei sie für *A. latus* und *B. megaterium* zwischen 0 bzw. 20 min und 40 min minimal ansteigt. Der Ansatz mit nPHB aus *Comamonas* zeigt nach 20 min einen Rückgang an Acetat, nach 40 min ist der Wert jedoch wieder angestiegen.

Besser einordnen lassen sich die absoluten Werte von ca. 0,4 mM im direkten Vergleich mit der 3HB-Bildung. In Abb. 108 sieht man, dass der Acetatanteil am Produkt aus nPHB von *A. latus* verschwindend gering ist. Für *B. megaterium* macht er immerhin rund 30 % der Produktmenge aus. Und *Comamonas* zeigt nach 40 min sogar mehr des Folgeproduktes Acetat als 3HB.

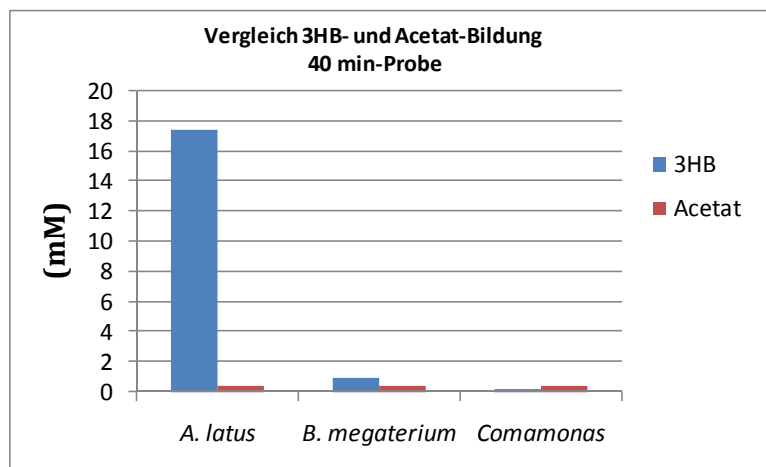


Abb. 108 Vergleich 3HB- und Acetat-Konzentration (HPLC-Analyse) nach 40 Minuten im 1 ml-Standard-Hydrolyseansatz (2.16.1) mit nPHB aus *A. latus*, *B. megaterium*, *Comamonas* sp., Versuch wie Abb. 96.

3.6.2.2 *R. eutropha*

Die Hydrolyseaktivität von nPHB aus *R. eutropha* Wt sowie der *phaZa1*- und *phaP1*-Mutante wurde bereits in Kapitel 3.4.8 („Vergleich Hydrolyseaktivität verschiedener Granula-Isolate“) und 3.5.5.2 („Hydrolyse-Versuche mit nPHB aus *R. eutropha* Wt / Δ *phaP1* / Δ *phaZa1*“) ausführlich behandelt. Isolierte Granula aller drei Stämme bilden im pH-Stat-Versuch und Standard-Hydrolyseansatz 3HB-Monomere als Hydrolyseprodukt. 3HB-Oligomere wurden, wie bereits bei Handrick 2003 beschrieben, nur bei Abbau durch die isolierte Depolymerase PhaZ7 aus *R. rubrum* entdeckt.

3.6.2.3 *Paucimonas lemoignei*

Beim ersten Blick ins HPLC-Chromatogramm scheinen gewaschene native Granula aus *Paucimonas lemoignei* signifikante Mengen 3HB (ca. 14,8 Minuten) zu produzieren (Abb. 109). Der blaue Peak stammt jedoch aus dem Kontrollansatz zum Zeitpunkt 0 Minuten. Im Ansatz selber ist wohl noch BP-3HB oder das sehr ähnlich eluierende BP-Acetat vorhanden, dass im Laufe der zweistündigen Inkubation verbraucht wird, so dass der Peak abnimmt. Ungewöhnlich ist, dass dieses Phänomen bei gewaschenen und nicht ungewaschenen Granula auftaucht. Hier wäre es

wahrscheinlicher, dass sich in der Glycerinsuspension noch signifikante Mengen 3HB oder Acetat aus dem Cytoplasma befinden.

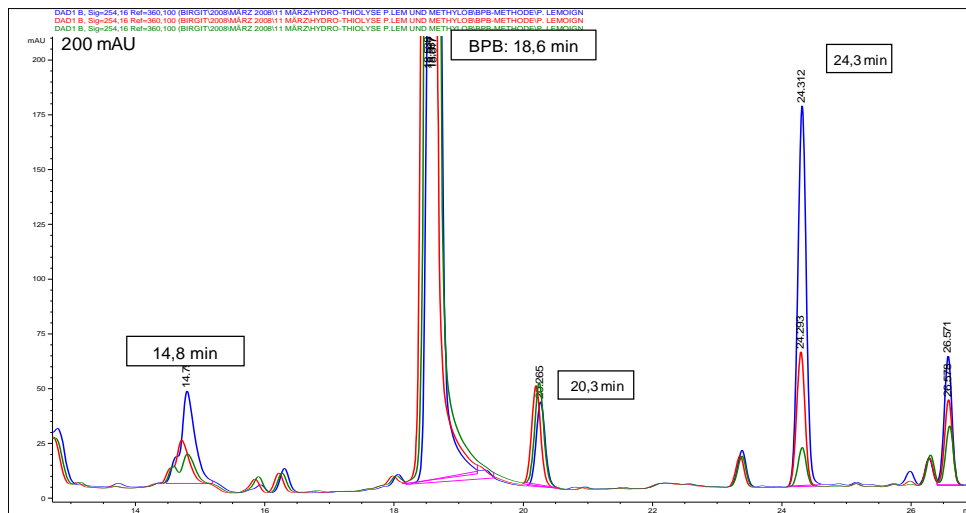


Abb. 109 HPLC-Analyse auf 3HB-Bildung im Thiolyseansatz mit nPHB gewaschen aus *P. lemoignei*. Probenahme nach 0 Minuten (blau), 60 Minuten (rot) und 120 Minuten (grün). HPLC-Methode: „40%MetOH“.

Ungewaschenes nPHB aus *P. lemoignei* zeigt keinerlei Veränderungen im Chromatogrammbereich um das erwartete BP-3HB oder BP-Acetat (Abb. 110). Zu deren Elutionszeit von ca. 14,6 und 14,9 Minuten tauchen in allen drei Proben (0, 60 und 120 Minuten) kleine Peaks auf, die jedoch in Höhe und Breite stets unverändert bleiben.

Im Thiolyseansatz mit ungewaschenem nPHB, wie auch mit gewaschenen Granula, aus *P. lemoignei* lassen sich also kein 3HB und Acetat nachweisen.

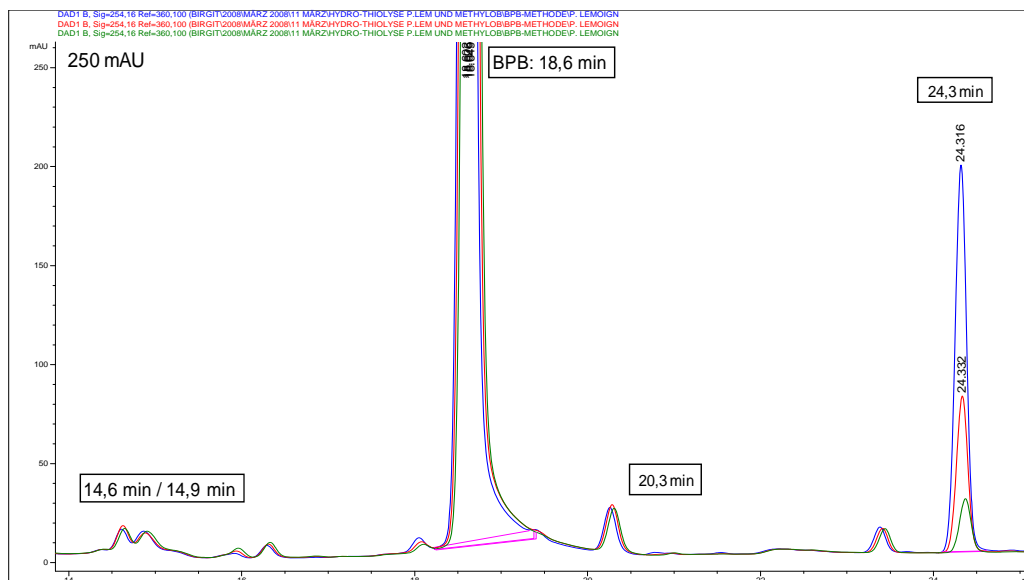


Abb. 110 HPLC-Analyse auf 3HB-Bildung im Thiolyseansatz mit nPHB ungewaschen aus *P. lemoignei*. Probenahme nach 0 Minuten (blau), 60 Minuten (rot) und 120 Minuten (grün). HPLC-Methode: „40ProzentMetOH“.

3.6.2.4 *Paracoccus denitrificans* (PHV), *Pseudomonas putida* 195 (PHO)

Die Hydrolyse-Versuche für nPHA aus *P. denitrificans* ergaben wie für die Thiolysen (3.6.1.5) keine Produkte (3HV-Monomer oder -Oligomeren) (Abb. 111). Zwar ist zur Elutionszeit des 3HV-Monomers (ca. 17,9 min, siehe Abb. 101, 102) ein Peak erkennbar. Seine Größe ändert sich aber zwischen 0 und 60 Minuten nicht. 500 µl Granulasuspension wurde dem Hydrolyseansatz zugegeben. Dies entspricht nur rund 1 mg gewaschenem und getrocknetem PHV: die Ausbeute an nPHV aus *Paracoccus denitrificans* war sehr gering (siehe Tab. 27) und die Granula wurden daher bei der Isolierung stark mit Glycerin verdünnt. Es ist daher möglich, dass ein Fehlen von detektierbaren Produkten der Hydrolyse und Thiolysen an einer zu geringen Substratkonzentration liegt.

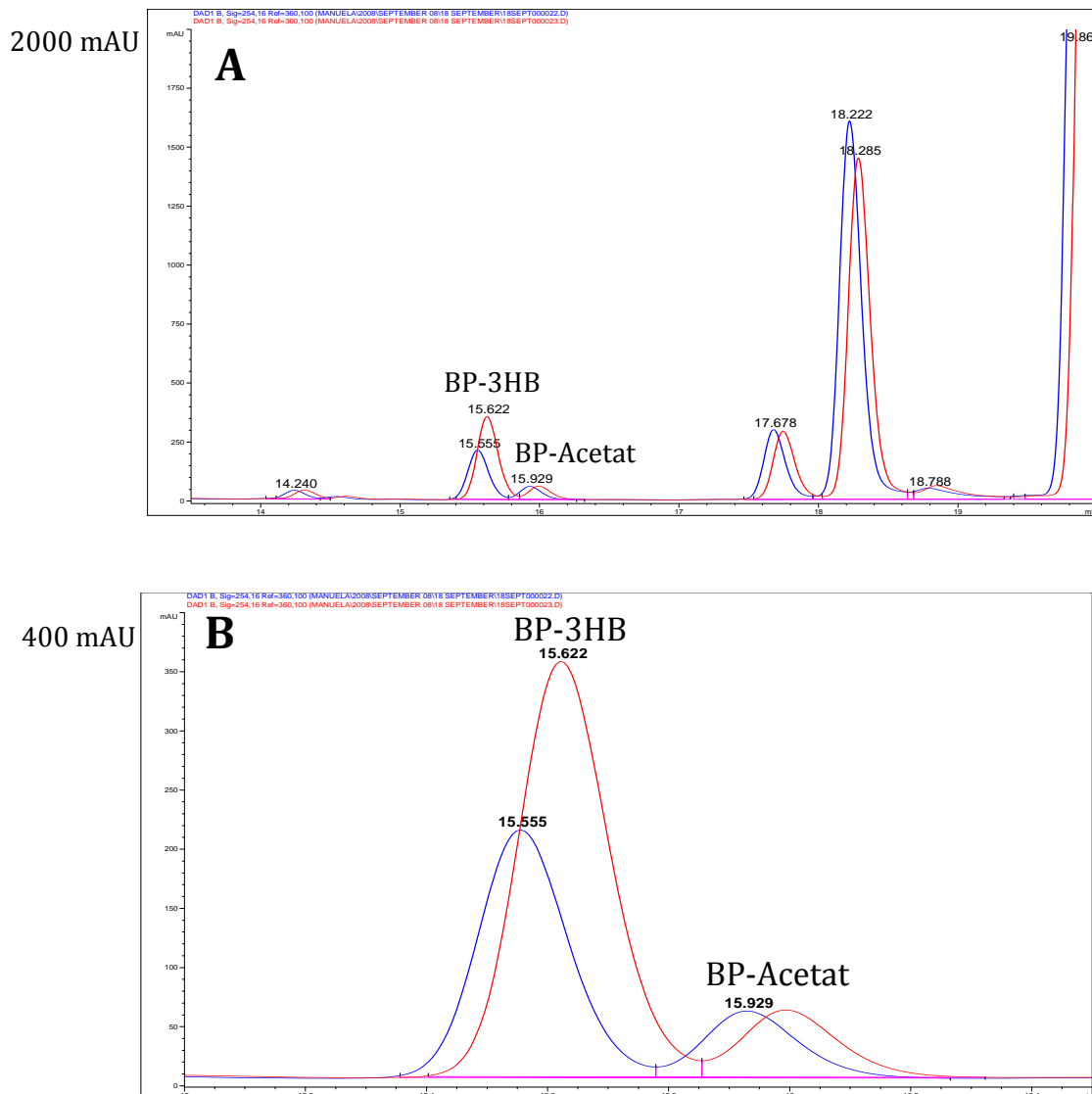


Abb. 111 HPLC-Analyse auf Bildung von 3HV und 3HV-Oligomeren: Hydrolyseansatz (2.16.1) mit nPHV aus *Paracoccus denitrificans* (500 µl Granulasuspension = 1 mg PHV, gewaschen). A = Übersicht, B = Ausschnitt Ansatzvolumen: 1 ml. Blau: 0 Minuten-Probe. Rot: 60 Minuten-Probe. Je 5 µl Probenüberstand. Methode: „40% Methanol“.

Den Beweis, dass die isolierten Granula eine native Struktur besitzen und grundsätzlich enzymatisch hydrolysierbar sind, sollte die Zugabe von PhaZ7 aus *P. lemoignei* liefern. In seiner Doktorarbeit charakterisiert René Handrick diese nPHA-spezifische Depolymerase und weist ihr neben einer hohen Aktivität mit nPHB auch den nachweisbaren Abbau von nPHV nach (Handrick, 2003).

Die erste Abbildung (Abb. 112-A) zeigt zunächst die Kontroll-Reaktion im pH-Staten. Zu 10 ml 0,1 mM Tris-HCl (pH 8,5; 37°C) wurden nach 1200 Sekunden 5 µl isoliertes PhaZ7-Enzym (3 mg/ml) pipettiert. Es ist kein signifikanter Einfluss auf den pH-Wert und die Titration von 10 mM NaOH erkennbar. Im Versuch mit nPHV (Abb. 112-B) war nach 600 Sekunden 1 ml Granulasuspension zu 9 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer gegeben worden und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Nach 2400 Sekunden wurden ebenfalls 5 µl PhaZ7 (3mg/ml) hinzugegeben. Die Graphik zeigt deutlich, wie der pH-Wert leicht absinkt und der Verbrauch an 10 mM NaOH ansteigt. Durch Zugabe der Depolymerase zu nativen Granula aus *P. denitrificans* kommt es also zu einer vermehrten Säurefreisetzung.

Beim Vergleich der beiden Abbildungen ist zu beachten, dass die pH-Skala von Abb. 112-A einen größeren Maßstab besitzt und im Graphen daher mehr Schwankungen erkennbar werden. Im Ansatz mit nPHV liegt der pH-Wert zudem nach Zugabe der Granula wegen Überdosierung mit NaOH leicht über dem Soll-Wert von pH 7,5, sinkt aber auch nicht wieder darunter.

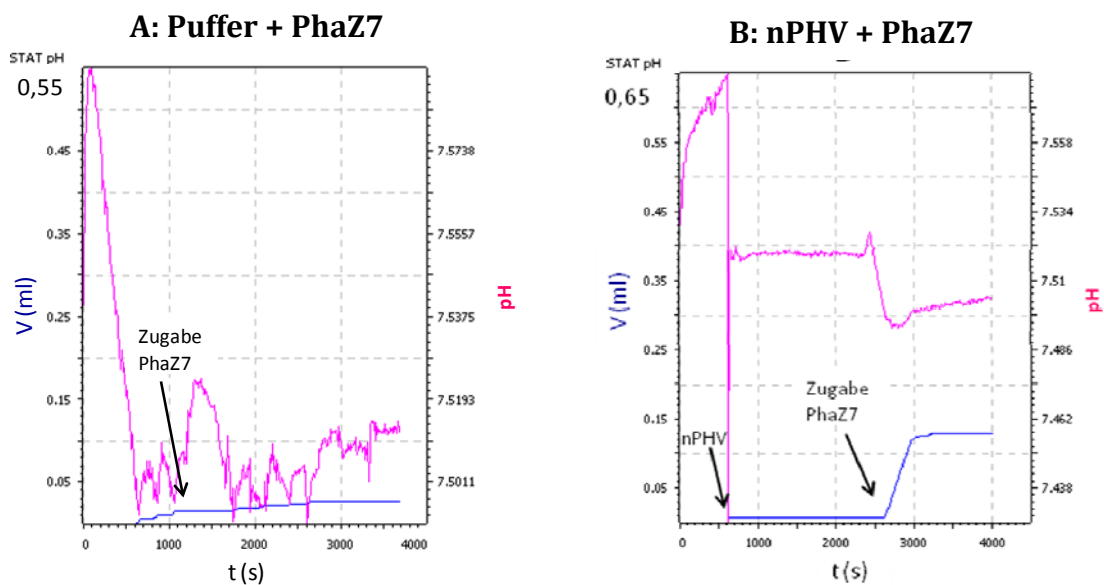


Abb. 112 pH-Stat Titration mit 10 mM NaOH von 0,1 mM Tris-HCl, pH 7,5 und A: Zu 10 ml Puffer nach 1200 Sekunden Zugabe von 5 µl PhaZ7 (3mg/ml) bzw. B: Zu 9 ml Puffer nach 600 Sekunden Zugabe von 1 ml nPHV-Granulasuspension, nach 2400 Sekunden ebenfalls Zugabe von 5 µl PhaZ7.

Der Versuch wurde im kleineren Maßstab in konzentrierter Form wiederholt. 500 µl nPHV-Suspension wurden schonend gewaschen (2.9), resuspendiert und zu einem Standard-Hydrolyseansatz gegeben. Nach Hinzufügen von 5 µl PhaZ7 (3 mg / ml) wurde der Ansatz im Eppendorf-Reaktionsgefäß für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Das HPLC-Chromatogramm der 60-Minuten-Probe ist in Abb. 113 zu sehen. Dabei ist erstaunlich, dass kein Peak zur Elutionszeit von derivatisiertem 3HV (17,6 min) zu erkennen ist. Stattdessen erscheinen Peaks u.a. nach 12,4 min, 15,7 min, 18,3 min und 19,9 min. Zu diesen Zeiten eluieren jedoch die Bromderivate des 3HB-Monomer, -Dimer und -Trimer sowie ungebundenes Derivatisierungsreagenz (BPB). Unsere Produkt-Analyse zeigt somit vor allem die Bildung von PHB-Oligomeren. Diese stammen vermutlich

aus dem geringen PHB-Anteil der Granula des Organismus. René Handrick wies in seiner Arbeit für die Hydrolyse von nPHA aus *P. denitrificans* mit PhaZ7 zudem die Bildung von PHV-Oligomeren durch PhaZ7 nach (Handrick, 2003).

Sowohl die sichtbare Säurefreisetzung im pH-Stat-Versuch (Abb. 112) als auch der Nachweis von Hydrolyseprodukten allgemein zeigen jedoch auch in unserem Fall, dass das isolierte nPHA (nPHV + nPHB) aus *P. denitrificans* eine native Struktur aufweist.

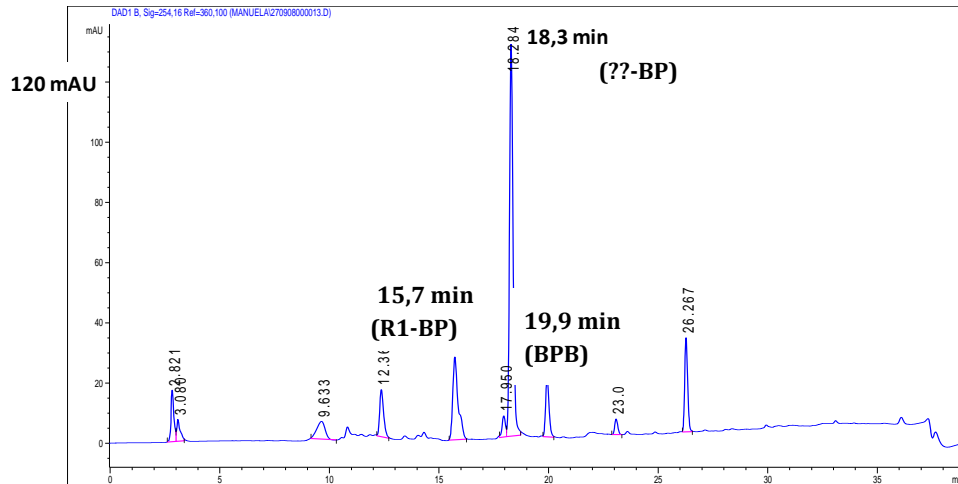


Abb. 113 HPLC-Analyse der PhaZ7-Produkte (60 min-Probe) im Hydrolyse-Standardansatz mit 1 mg PHV. HPLC-Methode: „40%MetOH“. Auftrag auf die HPLC: 1 μ l. R1-BP: derivatisiertes 3HB-Monomer, R2-BP: derivat. 3HB-Dimer, R3-BP: derivat. 3HB-Trimer. BPB: Bromphenacylbromid

Die Isolierung der Granula aus *P. putida* 195 per Dichtegradienten-Zentrifugation ergab sehr breite Banden, was eine gering konzentrierte Granulasuspension ergab. Daher wurden für die Hydrolyse (Standardansatz) 552 mg ungewaschenes nPHB eingesetzt, was 2,5 mg dPHB entsprechen würde.

Es konnten nach 120 Minuten Inkubation sowohl 3-Hydroxy-Oktoan-Monomere (3-HO) als auch 3-Hydroxy-Hexan-Monomere (3-HHx) per HPLC nachgewiesen werden. Die Elutionszeit von 3-HO war bereits bekannt (siehe auch Kap. 3.6.1.4), zum Nachweis anderer Mono- oder Oligomere, wurden die Peaks dennoch per ESI-MS bestimmt (o. Abb.).

Tabelle 28 gibt eine Übersicht über die Hydrolyse- und Thiolysefähigkeit isolierter, nativer PHA-Granula unter den im Abschnitt 2.16.1 beschriebenen Versuchsbedingungen. Dabei fällt auf, dass für die Granula fast aller Organismen (bis auf *Paracoccus denitrificans*) Hydrolyseaktivität nachgewiesen werden konnte.

Tab. 28 Übersicht Hydrolyse- und Thiolyse-Fähigkeit nPHB-Granula verschiedener Organismen. +++: sehr hohe 3HB-Freisetzung (> 100 nmol/mg PHB x min), ++: hohe 3HB-Freisetzung (> 10 nmol/mg PHB x min), +: signifikante 3HB-Freisetzung (> 0,1 nmol/mg PHB x min), +/-: (< 0,1 nmol/mg PHB x min), - : keine 3HB-Freisetzung messbar, k.A. (+): keine eigene Analyse auf 3HO, aber Informationen vorhanden.

	Eigenhydrolyse (3HB/3HV/3HO)	Eigenthiolyse (3HB-CoA/3HV-CoA/3HO-CoA)
<i>A. latus</i>	+++	-
<i>B. megaterium</i>	+	-
<i>Comamonas sp.</i>	+	+
<i>P. denitrificans</i>	-	-
<i>P. lemoignei</i>	+	-
<i>P. putida 195</i>	+	-
<i>P. putida Gpo500</i>	k.A. (+)	-
<i>R. eutropha Wt,</i> <i>ΔphaP1, ΔphaZa1</i>	+	+

3.7 Charakterisierung PhaZa1 (isoliertes Enzym)

3.7.1 Isolierung PhaZa1

3.7.1.1 Anzucht *E. coli* JM109 pJoe4036.4 (SK 2914)

Im Rahmen seiner Studienarbeit in der Arbeitsgruppe Jendrossek hatte Philipp Kimmig das *phaZa1*-Gen einer intrazellären Depolymerase aus *R. eutropha* in den Vektor pJoe 4036 mit his-tag-Sequenzen kloniert. Nach der Transformation des Vektors in *E. coli* JM109 hatte er mehrere Klone für die Stammsammlung der AG Jendrossek konserviert. Die Transformante „4036.4“ (Stammkultur-Nummer (SK) 2914) wurde nun für diese Arbeit im 2l-Maßstab kultiviert (4 x 500 ml in 3 l-Kolben). Auf dem Plasmid befindet sich neben einem Rhamnose-Promotor zur Regulierung des *phaZa1*-Gens ein Ampicillin (Amp)-Resistenzgen. Auf zwei ungefähr zehnstündige Vorkulturen in 20 ml bzw. 200 ml LB-Amp-Medium folgte die Hauptkultur in vier 500 ml-Ansätzen LB-Amp mit direkter Zugabe von 0,2% Rhamnose für rund zwölf Stunden bei 30°C. Die Zellausbeute nach Zentrifugation für 15 min bei 6000 rpm (Ja-10-Rotor, Beckman Avanti-35 Centrifuge) lag bei ungefähr 6 g/l Feuchtgewicht.

3.7.1.2 Aufreinigung PhaZa1

Das Zellpellet (rund 12 g Feuchtgewicht) wurde mit rund 10 ml 1 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) resuspendiert und per Frenchpressing aufgeschlossen. Durch die anschließende Ultrazentrifugation des Zellaufschlusses für zweimal eine Stunde (TFT 65.18-Rotor, 35.000 rpm, Beckman Avanti-35-Ultracentrifuge) wurde der bräunlich-klare, lösliche Überstand für die Aufreinigung über die Ni-NTA-Säulchen (Nickel-NitriloTriAcetic Acid, 1 ml Volumen eingesetzt) gewonnen. Das Material wurde zunächst mit 20 mM Imidazol-Puffer (2.12.2) äquilibriert und anschließend der Überstand des Zellaufschlusses auf die Säule aufgetragen. Darauf folgten zum Eluieren des Proteins Imidazolpuffer mit stufenweise steigendem Imidazolgehalt (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM) (Tab. 29). Der Durchfluss wurde in 2 ml-Fractionen aufgefangen.

Tab. 29 Elutionsschema der Isolierung von PhaZa1 über eine Ni-NTA-Säule mit verschiedenen konzentrierten Imidazolpuffern (50 mM NaH₂PO₄ x H₂O mit 300 mM NaCl und 50 - 250 mM Imidazol)

Überstand	Durchfluss	Je 2ml 50mM		Je 2ml 100mM				Je 2ml 150mM			Je 2ml 200mM				Je 2ml 250 mM					2ml H ₂ O		
		W 1	W 2	W 3	W 4	W 5	W 6	W 7	W 8	W 9	W1 0	W1 1	W1 2	W1 3	W1 4	W1 5	W1 6	W1 7	W1 8		W1 9	H ₂ 0

3.7.1.3 Test der Elutionsfraktionen per SDS-Gel

Die gewonnenen Fraktionen wurden anschließend mit Hilfe eines SDS-Gels (siehe Abb. 114) auf PhaZa1 getestet. Das Protein hat ein apparentes Molekulargewicht von 47,3 kDa (Saegusa et al. 2001). Zur Probenvorbereitung wurden je nach erwarteter Proteinkonzentration 0,5 bis 2,5 µl Eluat auf 10 µl mit Wasser aufgefüllt, mit 5 µl 3fach konzentriertem Denaturierungspuffer (2.14.1) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Das Gesamtvolumen von 15 µl wurde auf das Gel aufgetragen.

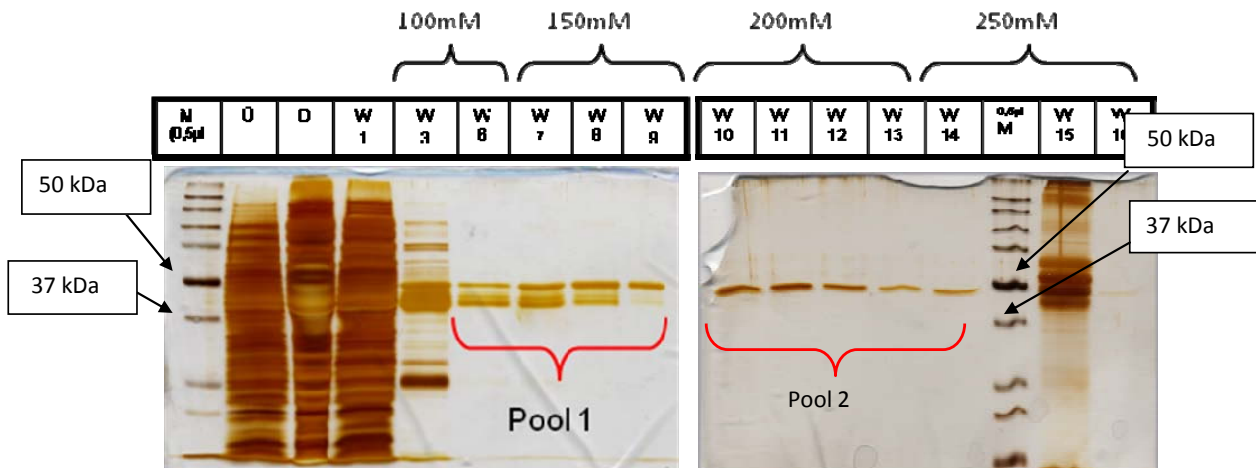


Abb. 114 SDS-Gel mit Auftrag einzelner Fraktionen der Aufreinigung von PhaZa1-his über Ni-NTA-Säule (Aufreinigung 01.04.2008). M: Proteinmarker (Precision All Blue, Biorad)(2µl), Ü: Überstand Zellaufschluss (2,5µl, 1:10 verdünnt), D: Durchfluss nach Auftrag Zellaufschluss (0,5µl), W1-W16: Waschfraktionen mit verschiedenen Konzentrationen Imidazol (100mM, 150mM, 200mM, 250mM)(W1-2: 0,5µl, W3-W19: 1µl).

Bei Elution mit 100 mM und 150 mM taucht nach Silberfärbung (2.14.3) unterhalb der bei 47,3 kDa liegenden Proteinbande von PhaZa1-his bei ungefähr 40 kDa eine weitere Bande auf, die jedoch nach 6 ml 150 mM Imidazolpuffer verschwand. Entsprechend wurden die PhaZa1-Fraktionen mit (W5 bis W9) bzw. ohne (W10 bis W14) diese „Unterbande“ vereint. Im Laufe der Arbeit wurde PhaZa1 auf diese Weise dreimal isoliert. Jedes Mal entstanden die charakteristische Doppelbande und in Eluaten mit höherem Imidazolgehalt auch die reine PhaZa1-his-Bande. Sie wurden stets getrennt gepoolt. Um die einzelnen Isolierungen zu unterscheiden, erhielten die Sammel-Eluate der ersten Aufreinigung vom 01. April 2008 die Benennung „Fraktion A“ (Doppelbande) und „Fraktion B“ (nur PhaZa1-his). Die gepoolten Fraktionen vom 09. Mai 2008 werden im Folgenden als Pool 1 und Pool 2 bezeichnet.

Mit einer Ultrafiltrationskammer (Amicon, Millipore, USA) wurden die jeweiligen Pools von rund 10 ml über eine 10 kDa-Membran (Millipore, USA) auf einen Milliliter eingengt und mit Wasser zum Verdünnen des Imidazol auf ca. 7 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Volumen erneut auf ca. 1,5 ml reduziert und durch Zugabe von 30 µl 0,5 M KP-Puffer (pH 7) schwach gepuffert (10 mM).

3.7.1.4 Proteinbestimmung PhaZa1

Mit Hilfe des Bradford-Tests konnte anschließend der Proteingehalt der PhaZa1-Pools bestimmt werden. Mit BSA-Standards wurde die dazu nötige Kalibriergerade erstellt (2.13.4). Die Untersuchung ergab folgende Proteinkonzentrationen:

Tab. 30 Proteinbestimmung nach Isolierung von PhaZa1-his über Ni-NTA-Säule. Aufreinigung aus drei *E. coli* JM 109-Kulturen und Vereinigung von Fraktionen mit zwei SDS-Gel-Banden (ca. 40 kDa und 47,3 kDa) (Fraktion A, Pool 1) bzw. mit nur einer Bande (47,3 kDa = PhaZa1-his) (Fraktion B, Pool 2).

Fraktion A	92 µg/ml
Fraktion B	22 µg/ml
Pool 1	119 µg/ml
Pool 2	6,7 µg/ml

Der Proteingehalt im jeweils ersten Eluat (Fraktion A, Pool 1) ist wahrscheinlich vor allem durch die zusätzliche Bande sehr viel höher als in der zweiten. Die Herkunft oder Funktion dieses Proteins oder dieser Untereinheit ist noch unklar.

3.7.2 Untersuchung Hydrolyse- und Thiolyseaktivität

Um zu testen, ob das isolierte Enzym PhaZa1 Aktivität zeigt, wurden stets beide Fraktionen auf ihre Hydrolyse- und Thiolyseaktivität untersucht. Die Versuchsansätze bestanden aus:

Tab. 31 Pipettierschema der Hydrolyse- und Thiolyseansätze mit 5 mg PHB (= 45,5 mg nPHB-Glycerin-suspension), gewaschen, aus *R. eutropha* *ΔphaZa*.

	Hydrolyse	Thiolyse	Kontrolle Hydrolyse	Kontrolle Thiolyse
Substrat	5 mg PHB, gew. (<i>R.e.ΔphaZa1</i>)	5 mg PHB, gew. (<i>R.e.ΔphaZa1</i>)	5 mg PHB, gew. (<i>R.e.ΔphaZa1</i>)	5 mg PHB, gew. (<i>R.e.ΔphaZa1</i>)
10 mM CoA	-	100 µl	-	100 µl
0,5 M KP-Puffer, pH 7	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
PhaZa1 (µg-Menge variiert je nach Isolat)	10 µl	10 µl	-	-
H ₂ O, dest.	Add 1000 µl	Add 1000 µl	Add 1000 µl	Add 1000 µl

Zu Beginn der Thiolyseversuche wurde zusätzlich 1mM DTT in den Ansatz gegeben. Da es aber laut Hemmstoff-Test die Reaktion nicht fördert und zudem den 3HB-Dehydrogenase-Test stört, wurde es später – so wie hier - weggelassen. Als Substrat wurden native Granula der *R. eutropha phaZa1*-Mutante eingesetzt. Auf diese Weise sollte ausgeschlossen werden, dass durch natürlich vorhandenes PhaZa1 das isolierte Enzym möglicherweise keinen Zugang zur nPHB-Oberfläche findet bzw. nicht aktiv werden kann.

Wie Abschnitt 3.5.5. gezeigt hat, bilden native Granula auch ohne Zugabe von isoliertem Enzym Hydrolyse- und Thiolyseprodukte. Dies gilt für *R. eutropha* genauso wie für *R. eutropha ΔphaP1* und *R. eutropha ΔphaZa1*, die Phasin- und Depolymerasemutanten. Um das isolierte rekombinante

PhaZa1-Enzym auf seine Aktivität hin zu untersuchen, waren daher entsprechende Ansätze ohne das Protein zur Bestimmung der „Hintergrundaktivität“ wichtig. Die signifikant höhere Bildung von 3HB-CoA und 3HB durch Zugabe von Eluat 1 bzw. Eluat 2 bestätigt, dass hier eine Thiolyl- und Hydrolyseaktivität vorhanden ist (Abb.115 und 116).

**10 µl PhaZa1
„Pool 1“**

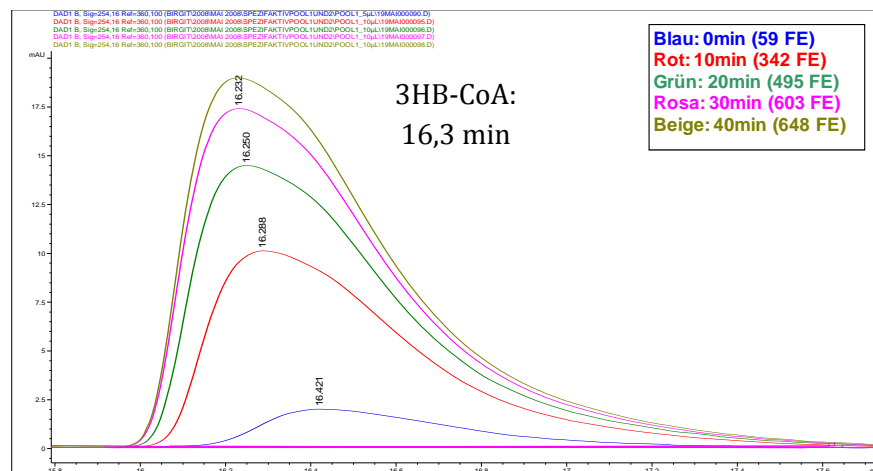


Abb. 115 Overlay HPLC-Chromatogramme: 3HB-CoA-Analyse in Thiolylansätzen. nPHB aus *R. eutropha* Δ phaZa1 und 10 µl Pool 1 (PhaZa1)(=1,19 mg). Probenahmen: nach 0, 10, 20, 30 und 40 min. Auftrag auf HPLC: 5 µl von Überstand nach Zentrifugation. HPLC-Methode: „CoA-Ester“.

**10 µl PhaZa1
„Pool 2“**

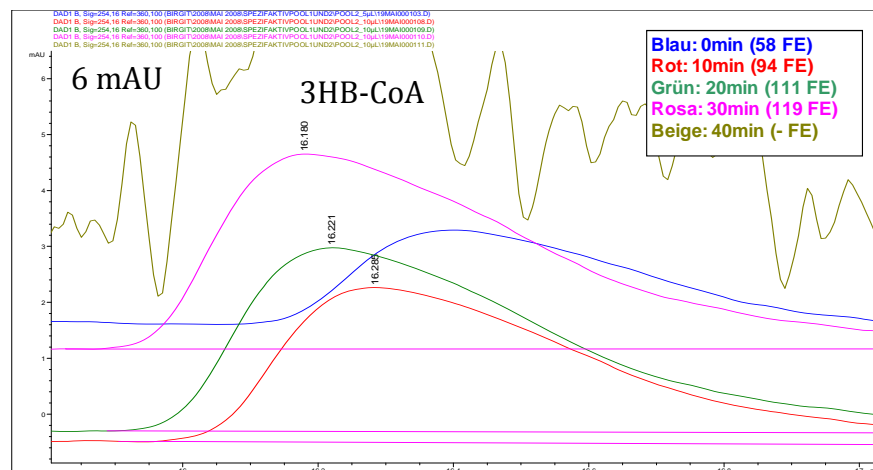


Abb. 116 Overlay HPLC-Chromatogramme: 3HB-CoA-Analyse in Thiolylansätzen. nPHB aus *R. eutropha* Δ phaZa1 und 10 µl Pool 2 (PhaZa1) (= 0,067 mg). Probenahmen: nach 0, 10, 20, 30 und 40 min. Auftrag auf HPLC: 5 µl von Überstand nach Zentrifugation. HPLC-Methode: „CoA-Ester“.

Der Vergleich zwischen Proben der Thiolyse MIT Zugabe von PhaZa1 (aus Pool 1) und OHNE zusätzliches Enzym in Abbildung 117 zeigt einen deutlichen Unterschied: mit Enzym entsteht erkennbar mehr 3HB-CoA.

Ansatz mit 10 µl PhaZa1 (Pool 1: siehe oben)

Kontroll-Thiolyse ohne PhaZa1

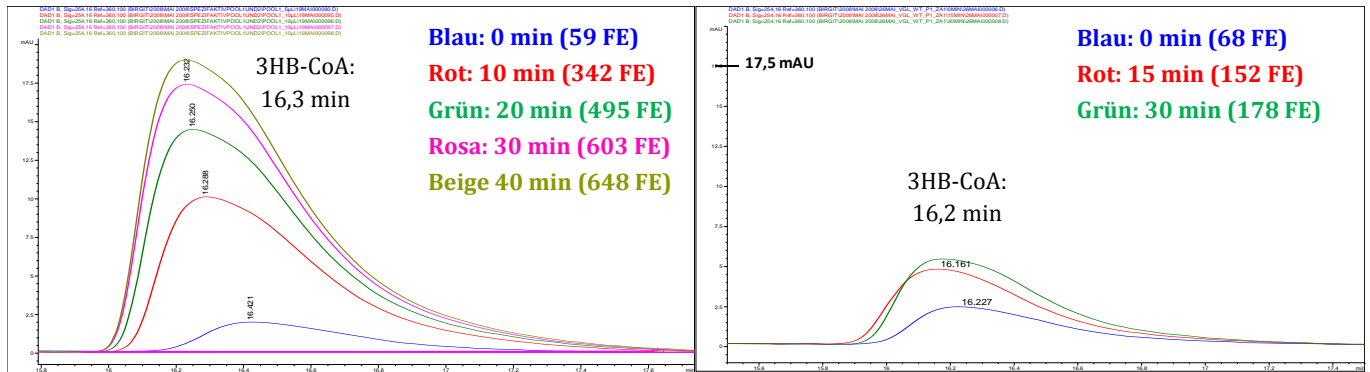


Abb. 117 Overlay HPLC-Chromatogramme: 3HB-CoA-Analyse in Thiolyseansätzen. nPHB aus *R. eutropha* Δ phaZa1. Links: mit Beginn der Thiolyse Zugabe von 10 µl Pool 1 (PhaZa1) (= 0,067 mg). Hier Probenahmen: nach 0, 10, 20, 30 und 40 min. Rechts: Kontrolle: Thiolyse unter sonst gleichen Bedingungen, aber ohne Zugabe isolierte Depoylmerase. Probenahme: 0, 15 und 30 min. Jeweils Auftrag auf HPLC: 5 µl von Überstand nach Zentrifugation. HPLC-Methode: „CoA-Ester“.

3.7.3 pH-Optimum

Um den optimalen pH-Wert für die Thiolyseaktivität von Granula mit isoliertem PhaZa1 zu ermitteln, wurden Reaktionen mit 5 mg nPHB *R.eutropha ΔphaZa1* und PhaZa1 bei pH 5 / 6 / 7 / 7,5 / 8 / 8,5 / 9 / 10 angesetzt. Das breite pH-Spektrum wurde durch den Einsatz von 35 mM NaCitrat-Puffer (pH 5 und 6), 35 mM Phosphatpuffer (pH 6-8) sowie 35 mM Tris-HCl-HCl (pH 8-10) abgedeckt (Endkonzentrationen). Dabei zeigte sich zu allen Probenahme-Zeiten (15, 30, 45 und 60 Min) bei pH 7 die höchste 3HB-CoA-Bildung. Abbildung 118 zeigt exemplarisch die 3HB-CoA-Bildung nach 30 Minuten.

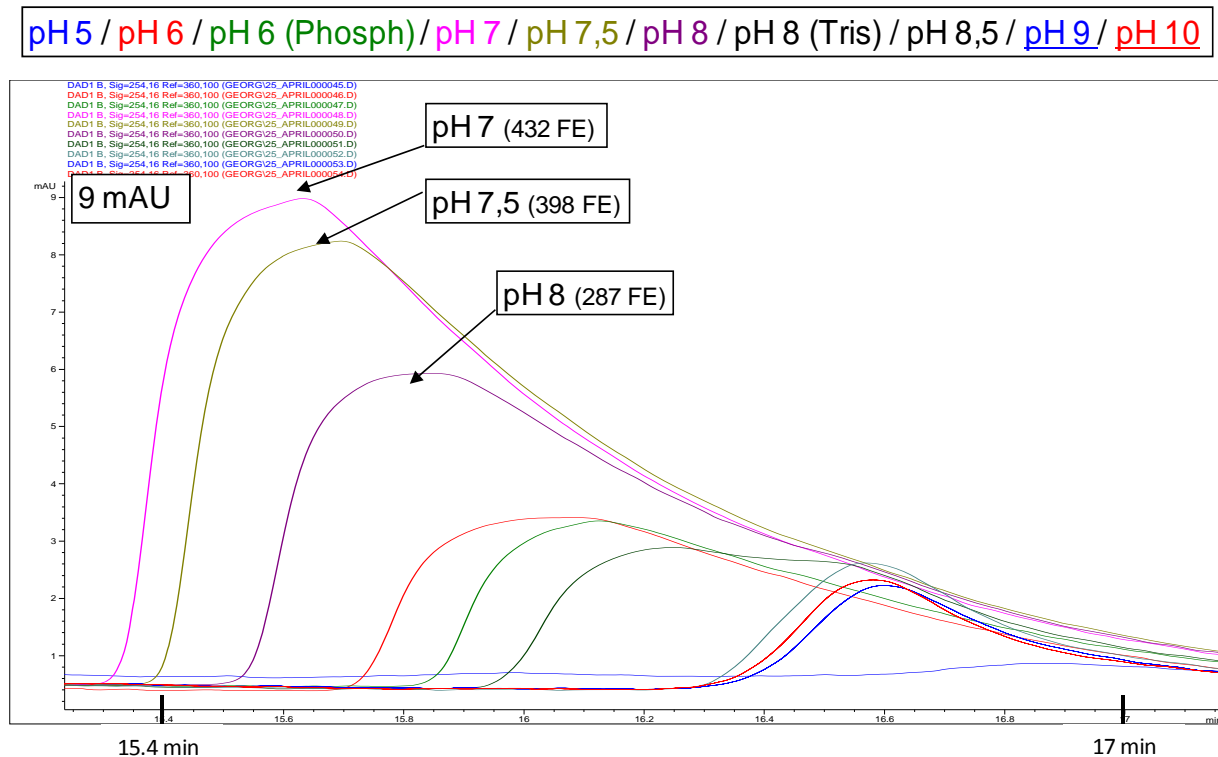


Abb. 118 Bestimmung pH-Optimum der Thiolyse durch PhaZa1 (Fraktion B, 09. Mai 08) mit 5 mg nPHB, gewaschen, aus *R. eutropha ΔphaZa1*. 30 Minuten-Proben. Analyse des Produktes 3HB-CoA per HPLC (Methode: „CoA-Ester“).

Um auszuschließen, dass sich das Optimum zwischen den untersuchten pH-Werten befindet, wurde der Bereich um pH 7 differenzierter untersucht (Abb. 119). Dazu dienten 35 mM KP-Puffer (Endkonzentration) mit pH 6; 6,3; 6,7; 7; 7,3; 7,7 und 8. Die Probenahme von 200 µl erfolgte nach 0 min (beispielhaft nur für Proben mit pH 6 und pH 8), 20 min und 40 min. Parallel zu den Ansätzen mit PhaZa1 wurden 5 mg nPHB aus *R. eutropha ΔphaZa1* unter den gleichen Bedingungen ohne Enzym-Zugabe inkubiert. Die Daten dienten als Kontrollen der Eigenthioolyse der nativen Granula. Ihre Werte wurden zur exakten Aktivitätsbestimmung des isolierten Enzyms von den Ergebnissen abgezogen.

Abweichend von den bereits ermittelten Werten zeigte sich die höchste Thiolyseaktivität nun bei pH 6, jedoch dicht gefolgt von pH 6,3 und pH 7. Bei pH 6,7 bildeten die PHB-Granula ohne Zusatz von PhaZa1 laut HPLC mehr 3HB-CoA als nach Zugabe. Allerdings handelt es sich um eine Einfachbestimmung. Zudem sind die Produktkonzentrationen ohnehin sehr niedrig und die Abweichung im Rahmen der HPLC-Messgenauigkeit kaum signifikant. Im Folgenden wurden die Thiolyse-Versuche daher bei pH 6,5 durchgeführt.

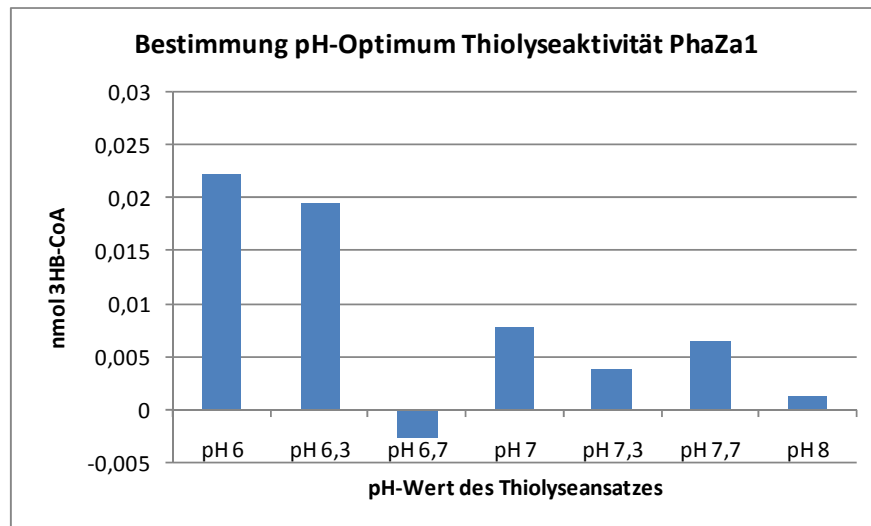


Abb. 119 *Differenzierte Bestimmung pH-Optimum der Thiolyse von 5 mg nPHB aus R. eutropha Δ phaZa1 durch PhaZa1 (Fraktion B, 09. Mai 08) zwischen pH 6 und pH 8. 20 Minuten-Proben. Analyse auf 3HB-CoA per HPLC (Methode: „CoA-Ester“). Aufgetragen ist die Differenz aus Werten mit und ohne (Kontrolle) PhaZa1 im Thiolyseansatz.*

3.7.4 Temperatur-Optimum

Ähnlich wie bei der Ermittlung des pH-Optimums erfolgten auch für die Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur von PhaZa1 zunächst Thiolyseversuche im Temperaturspektrum von 10°C bis 70°C (Abb. 120). Dazu wurden die Standard-Thiolyseansätze im Heizblock (bis 20°C im Kühlraum) bei 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50 60 und 70°C inkubiert und jeweils nach 20, 40 und 60 Minuten Probe entnommen. Anschließend wurde der Bereich zwischen 26°C und 40°C in 2°C-Schritten nach demselben Schema auf das genaue Optimum untersucht (Abb. 121). Die ersten Versuche zeigten bei 30°C deutlich die höchste 3HB-CoA-Bildung. Dieser Wert konnte für die Thiolyse mit PhaZa1 im zweiten Testlauf bestätigt werden. Die Thiolyseaktivität von Ansätzen mit PhaZa1 sinkt ab 34°C signifikant ab. Interessanterweise sieht man genau bei dieser Temperatur im Kontrollansatz mit nPHB ohne PhaZa1 einen Anstieg der 3HB-CoA-Bildung, der sowohl nach 20 als auch 40 Minuten erkennbar ist. Anschließend fällt mit steigender Temperatur aber auch die Thiolyseaktivität der Kontrolle langsam ab.

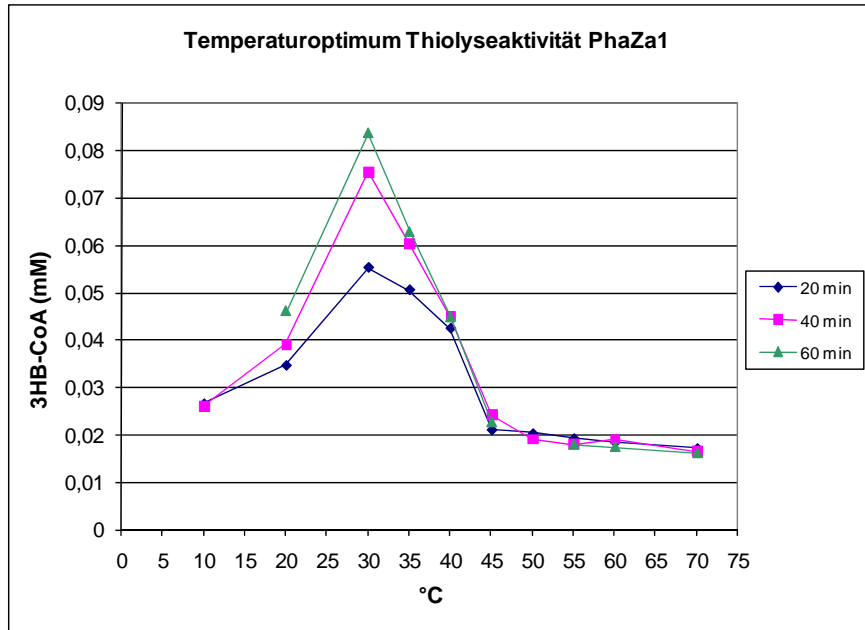


Abb. 120 Bestimmung des Temperaturoptimums der Thiolylse von 5 mg nPHB aus *R. eutropha* ΔphaZa1 durch PhaZa1 (10 μl = 0,22 μg Fraktion B) im Bereich von 10°C bis 70°C, in 0,5 M KP-Puffer, pH 7, inkubiert in Heizblöcken. Probenahme nach 20, 40 und 60 Minuten. Analyse auf 3HB-CoA per HPLC (Methode: „CoA-Ester“).

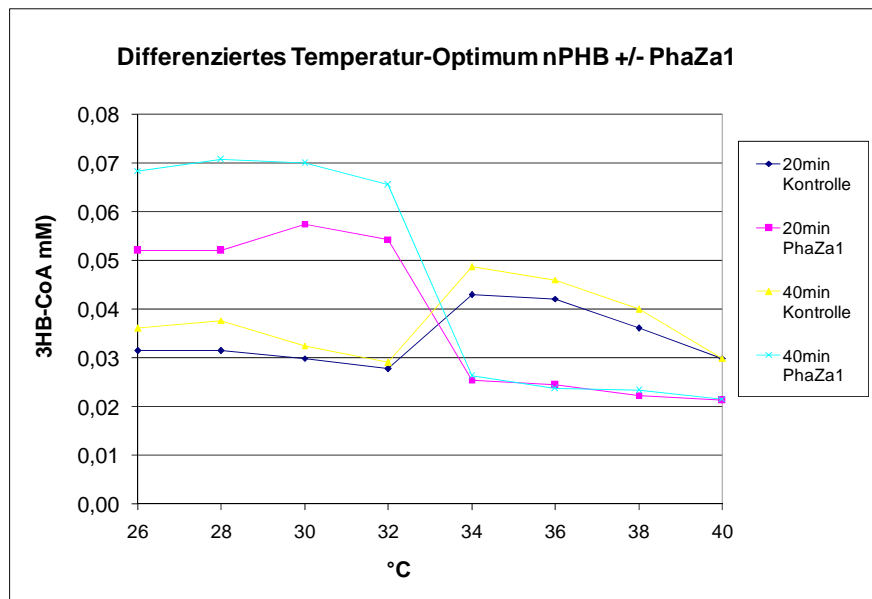


Abb. 121 Differenzierte Bestimmung des Temperaturoptimums der Thiolylse von nPHB aus *R. eutropha* ΔphaZa1 (nPHB-Menge entsprechend 5 mg dPHB). Versuche parallel mit und ohne PhaZa1 (10 μl Fraktion B = 0,22 μg Protein). Ansätze in 0,5 M KP-Puffer, pH 7, in Heizblöcken inkubiert bei 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, und 40°C. Probenahme nach 20 und 40 Minuten. Analyse auf 3HB-CoA per HPLC (Methode: „CoA-Ester“).

3.7.5 Test Aufbewahrung des Enzyms

Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, inwieweit sich die Lagerung von PhaZa1 bei 4°C auf Eis oder bei -20°C negativ auf die Thiolyseaktivität des Enzyms auswirkt. Getestet wurden verschiedene Mengen der Enzymfraktion A (Tab. 30, 3.7.1.4.), von 0,1 µl (9,2 µg Protein) bis 2 µl (184 µg Protein). Dabei war das Enzym für die erste Versuchsreihe über mehrere Tage auf Eis im Kühlraum bei 4°C gehalten worden, für die Parallelreihe wurden einige µl des isolierten Enzyms für eine Stunde bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden von beiden Enzymlösungen zum genauen Arbeiten mit Wasser 1:10-Verdünnungen hergestellt und Volumina von 1 µl bis 20 µl zum Thiolyseansatz pipettiert. Dieser bestand aus 5 mg nPHB gewaschen (isoliert aus *R. eutropha ΔphaZa1*), 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8, 1 mM DTT sowie 1 mM CoA.

Das Diagramm in Abbildung 122 macht deutlich, dass PhaZa1 auch nach mehreren Tagen Lagerung in 4°C auf Eis die thiolytische Bildung von 3HB-CoA noch katalysiert. Zudem zeigt die Thiolyseaktivität des PhaZa1 keine lineare aber eine signifikante Mengenabhängigkeit: je mehr Enzym im Ansatz vorhanden ist, desto mehr Produkt wird gebildet. Bereits eine Stunde Lagerung bei -20°C scheint das Protein allerdings zu inaktivieren. Die erhöhte Zugabe von zuvor eingefrorenem PhaZa1 bewirkt keinen Zuwachs an 3HB-CoA. Dessen Konzentration bleibt weitestgehend konstant, wobei diese Grundaktivität vermutlich die endogene Thiolyseaktivität der nativen Granula darstellt. Die Aufbewahrung des isolierten PhaZa1-Enzyms erfolgte anschließend ausschließlich auf Eis bei 4°C. Versuche zur Stabilität und Aktivität bei Lagerung in verschiedenen Glycerin-Konzentrationen wären hier der nächste Schritt.

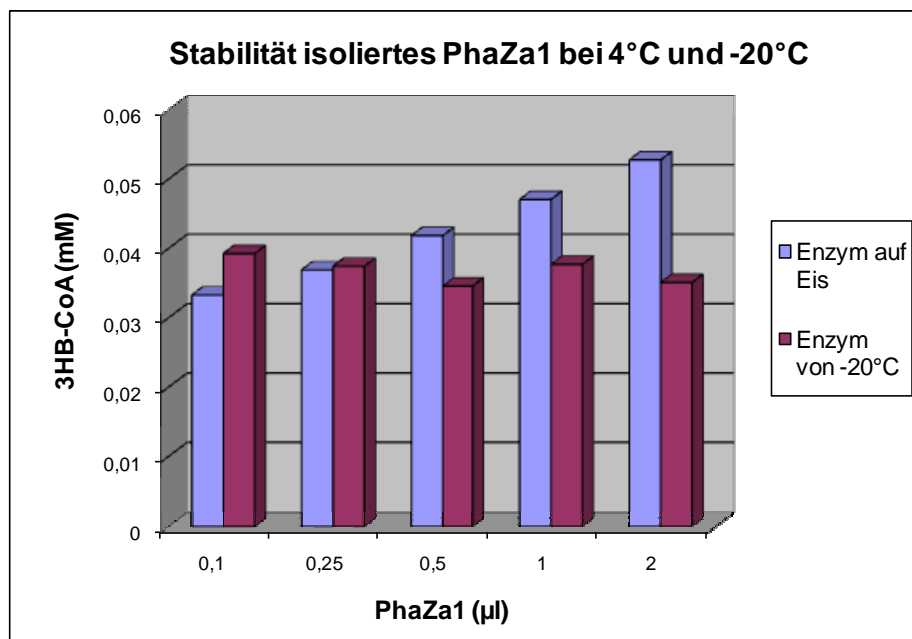


Abb. 122 Vergleich der Thiolyseaktivität von isoliertem PhaZa1 nach Lagerung auf Eis bei 4°C (Blau) sowie für zusätzlich 1 h bei -20°C (direkt vor Versuchsbeginn). Test verschiedener Enzym-Konzentrationen (9,2 – 184 µg Protein, Fraktion A, Tab. 30, Kap. 3.7.1.4)

3.7.6 Zeitabhängigkeit der Thiolyse durch PhaZa1

Um herauszufinden, wie lange native Granula (aus *R. eutropha* Δ phaZa1) mit isoliertem PhaZa1 thiolytisch aktiv sind, wurden einem Standard-Thiolyseansatz (30°C) über drei Stunden zehn Proben entnommen. Dabei waren die Zeitabstände zunächst gering und später weiter auseinander. Um ausreichend Volumen für zehn Proben à 200 μ l zu haben, wurden zwei identische Ansätze mit je 1 ml vorbereitet. Die Probenahme erfolgte abwechselnd aus dem einen und dem anderen Reaktionsgefäß. Ein 1 ml-Ansatz bestand aus 5 mg nPHB (gewaschen, aus *R. eutropha* Δ phaZa1), 1 mM CoA, 1 mM DTT, 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 sowie 90 μ l (1,98 mg Protein) der PhaZa1-Fraktion B (Tab. 30, 3.7.1.4). Da die Zeitabhängigkeit vor dem pH-Optimum bestimmt wurde, fanden die Versuche noch bei pH 8,5 statt. Später wurde die Thiolyse mit PhaZa1 bei pH 7,5 durchgeführt. Analysiert wurden die Proben auf die Bildung von 3HB-CoA und Acetyl-CoA per HPLC. Je 200 μ l wurden entnommen nach 0 (Kontrolle), 5, 10 und 20 Minuten (Abb. 123) sowie nach 30, 45, 60, 90, 120 und 180 Minuten (Abb. 124).

0 – 20 Minuten Inkubation

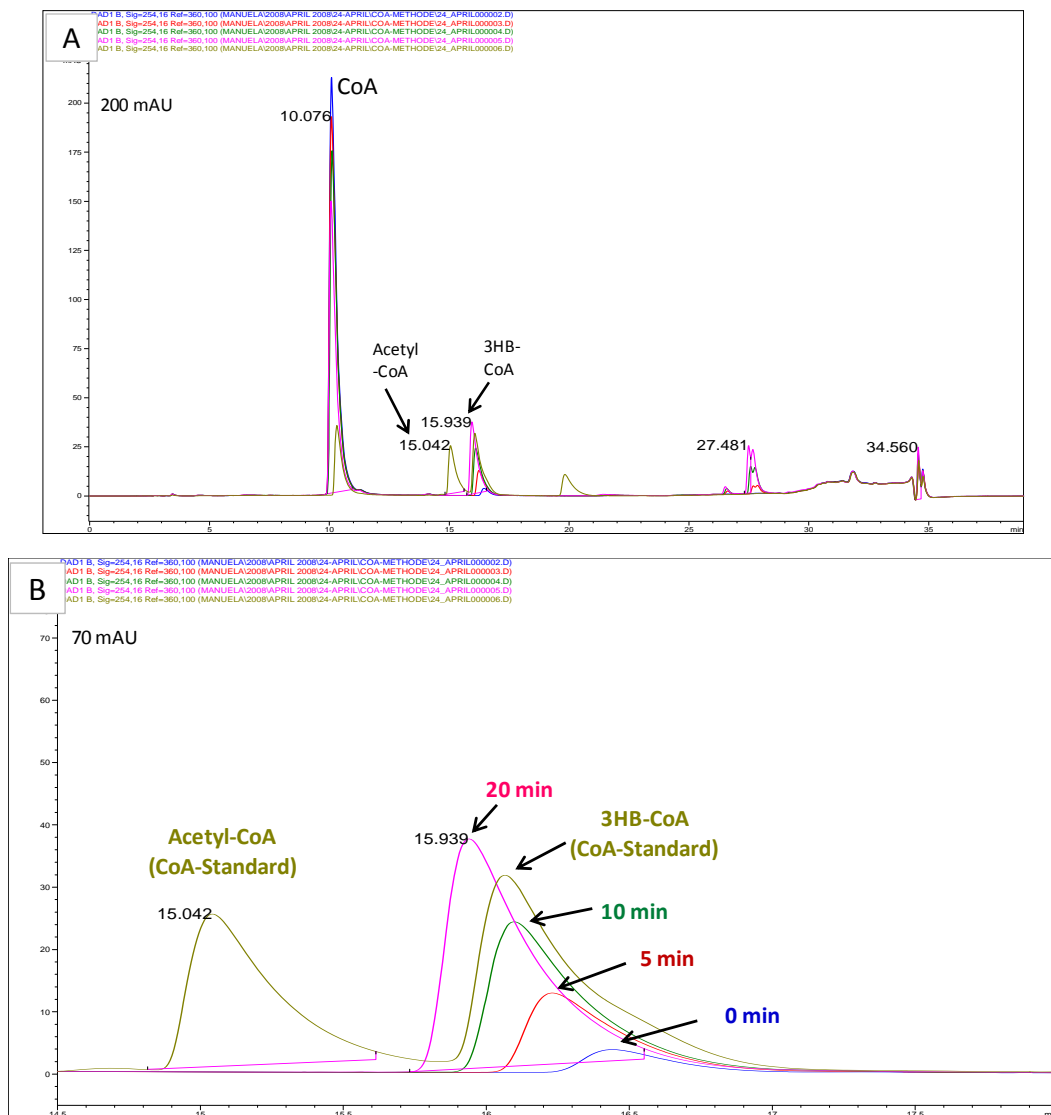


Abb. 123 Zeitabhängigkeit der Thiolyseaktivität von PhaZa1 (Elutionspool „Fraktion B“, siehe Tab. 30) mit 5 mg nPHB aus *R. eutropha* Δ phaZa1. Hier: Overlay der Chromatogramme von Proben nach 0 (blau), 5 (rot), 10 (grün) und 20 Minuten (rosa) sowie von der Standardmischung Acetyl- und 3HB-CoA (beige). Gesamtes Chromatogramm (A) und Detailausschnitt (B).

30 - 180 Minuten Inkubation

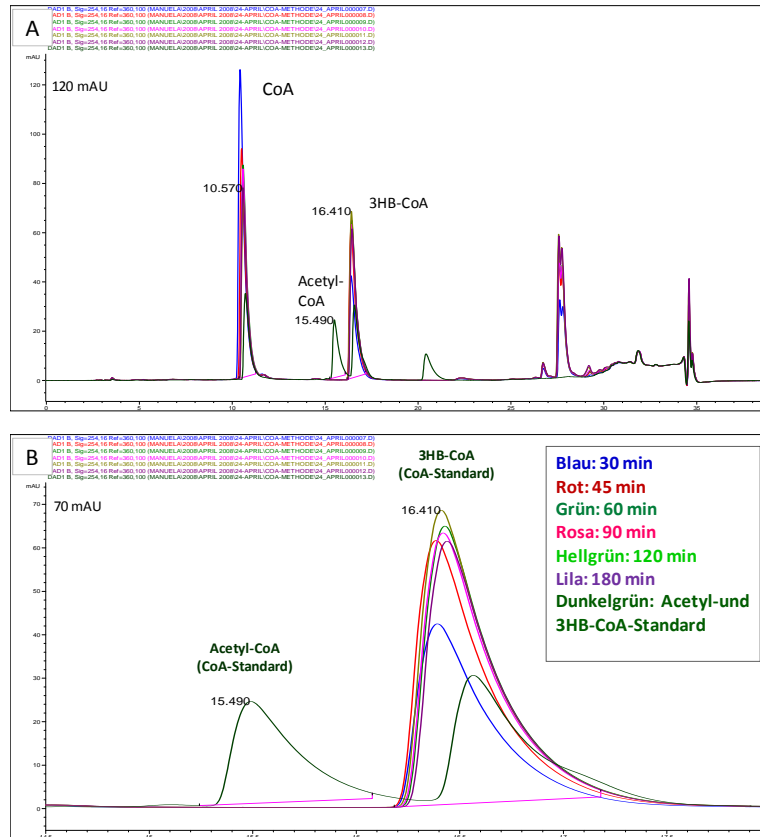


Abb. 124 Zeitabhängigkeit der Thiolylseaktivität von PhaZa1 (Elutionspool „Fraktion B“, siehe Tab. 30) mit 5 mg nPHB aus *R. eutropha* ΔphaZa. HPLC-Analyse auf 3HB-CoA-Bildung. Hier: Overlay der Chromatogramme von Proben nach 30 (blau), 45 (rot), 60 (grün), 90 (rosa), 120 (hellgrün) und 180 Minuten (lila) sowie von der Standardmischung Acetyl- und 3HB-CoA (beige). Gesamtes Chromatogramm (A) und Detailausschnitt (B).

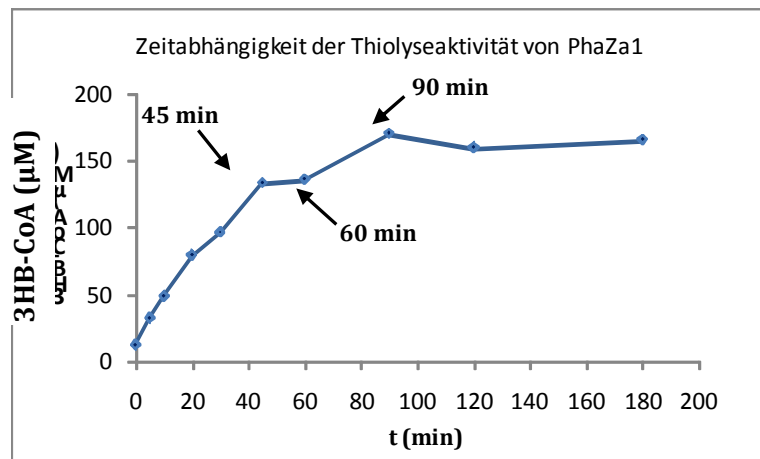


Abb. 125 Gesamtüberblick der Zeitabhängigkeit der Thiolylseaktivität von PhaZa1 (Elutionspool „Fraktion B“, siehe Tab. 30). Probenahme aus 1ml-Thiolylseansatz (2.16.1) nach 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 und 180 Minuten. HPLC-Analyse auf Bildung von 3HB-CoA.

Bis zu einer Inkubationszeit von 45 Minuten steigt der Gehalt an 3HB-CoA in den Thiolyseansätzen signifikant an. Längere Versuchszeiten bewirken keine weitere Erhöhung der Konzentration. Vermutlich beginnt in dieser Phase die Denaturierung des Enzyms. In späteren Versuchen wurden daher meistens 30 oder 40 Minuten als letzter Probenahme-Punkt gewählt.

3.7.7 Optimales Verhältnis „PhaZa1 zu Substrat“

Durch verschiedene Versuchsreihen war ein Großteil der Thiolysebedingungen mit PhaZa1 bereits optimiert worden: pH 6,5; 30°C; Zusatz von 5 mM CaCl₂ und hohe Aktivität bis ca. 20 – 40 Minuten. Ein weiterer Versuch testete das optimale Verhältnis Enzym zu Substrat, indem bei konstanter Enzymmenge (10 µl Pool 1 = 1,2 µg Protein) der Einsatz von gewaschenem PHB zwischen 2,5; 5; 10 und 20 mg variierte. Proben wurden den Thiolyseansätzen nach 5, 10 und 20 Minuten entnommen und per HPLC auf ihren Gehalt an 3-HB-CoA untersucht. Parallel wurden Thiolyseansätze mit den gleichen Mengen nPHB als Kontrollen OHNE PhaZa1 inkubiert. Die Graphen der Abb. 126 sind um die 3HB-CoA-Mengen der Kontrollansätze bereits korrigiert.

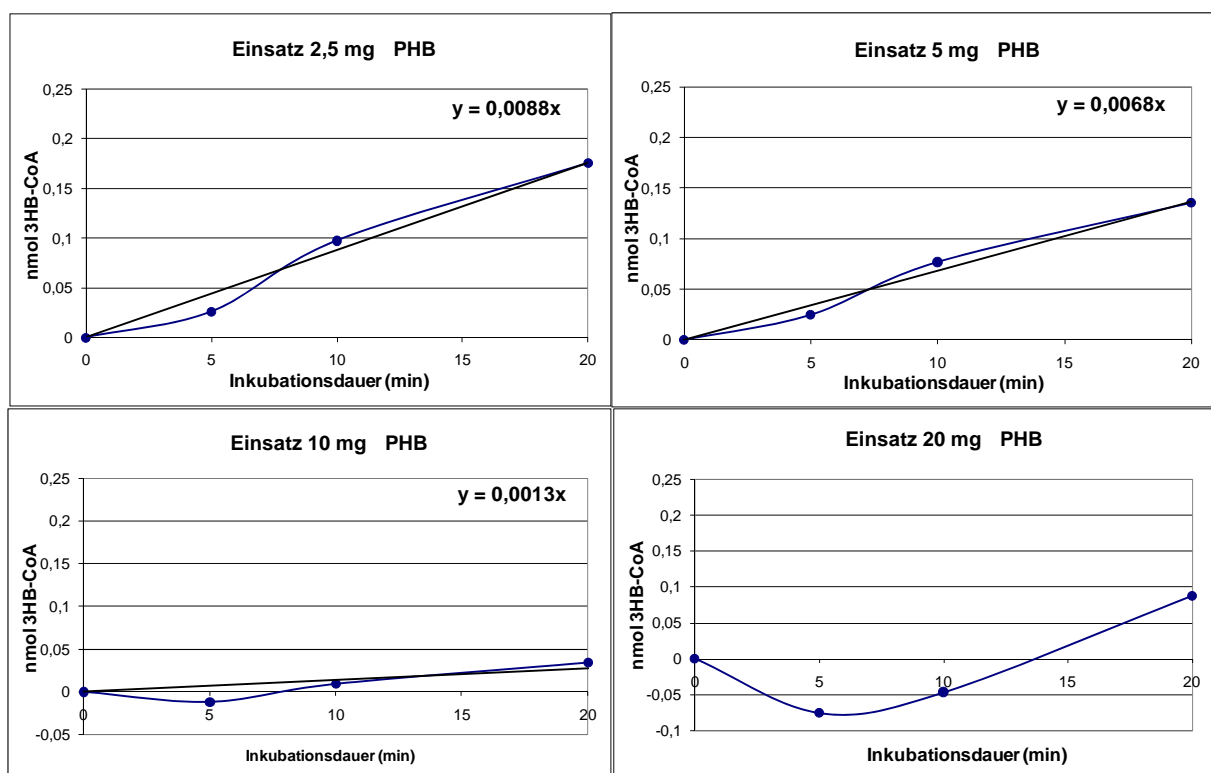


Abb. 126 Abhängigkeit der 3HB-CoA-Bildung von der Menge an Substrat (nPHB gewaschen aus *R. eutropha* AlphaZa1) bei konstanter Enzymmenge (1,2 µg PhaZa1-Isolat „Pool 1“). Einsatz von 2,5; 5; 10 und 20 mg PHB. Korrektur der Produktmenge (nmol) um Werte der entsprechenden Kontrollansätze ohne PhaZa1-Zugabe.

Anhand der Geradensteigung wird deutlich, dass der Einfluss von PhaZa1 auf die 3HB-CoA-Bildung umso größer ist desto geringer die Substratmenge. Die negativen Werte bei 10 mg und 20 mg nPHB-Einsatz treten auf, da in diesen Fällen in der Kontrolle mehr Produkt gebildet wurde als im Ansatz mit PhaZa1.

3.7.8 Spezifische Thiolyseaktivität PhaZa1

Im Ansatz mit 2,5 mg PHB treffen alle nach den bisherigen Versuchen optimierten Thiolysebedingungen aufeinander. Dabei werden 0,009 nmol 3HB-CoA pro Minute durch 1,2 µg Protein mit

2,5 mg PHB-Substrat gebildet. Somit kann für das PhaZa1-Isolat „Pool1“ eine spezifische Thiolyseaktivität von $3 \text{ nmol/min} \times \text{mg PHB}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ berechnet werden.

3.7.9 Hemmstoffe und Aktivatoren

3.7.9.1 Einfluss Trypsin auf PhaZa1

Es konnte gezeigt werden, dass die Protease Trypsin in bestimmten Konzentrationen Proteine von der Granuloberfläche löst (Handrick et al. 2004) bzw. dass Granula nach Behandlung mit Trypsin schneller hydrolysiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass es Proteine auf der Oberfläche gibt, die die Aktivität von Depolymerasen schwächen oder ihnen möglicherweise mechanisch den Zugang zum PHB erschweren. Eine zu hohe Trypsin-Konzentration kann jedoch die Depolymerasen selber ebenfalls schädigen. Aus diesem Grund wurden je zweimal eine 5 mg - Portion nPHB (gewaschen) aus *R. eutropha* *ΔphaZa1* mit 50, 100, 200 und 300 μg Trypsin für zehn Minuten im 40°C -Heizblock vorinkubiert. Der einen Hälfte der Ansätze wurde danach Trypsin-Inhibitor (Ovomucoid, Serva) im Überschuss (10fache Menge) zugegeben, um die Protease zu hemmen. Trypsin sollte somit zunächst auf die Proteine der Granuloberfläche wirken, ohne jedoch später das zugegebene isolierte PhaZa1 abzubauen. Nach weiteren fünf Minuten Inkubation mit bzw. ohne Inhibitor wurden die restlichen Substanzen zugefügt: DTT (1 mM), CoA (1 mM), KP-Puffer (50 mM), Wasser sowie PhaZa1 (10 μl = 0,92 mg Fraktion A).

Nach den zehn Minuten bei 40°C hatten sich in den Reaktionsgefäßen mit nPHB und 200 μg bzw. 300 μg Trypsin zwei Phasen gebildet: unten eine weiße – wohl PHB – Bande, darüber eine klare Schicht. Daraufhin wurde die Probe mit 300 μg Trypsin verworfen, die Versuche mit der 200 μg -Probe jedoch weitergeführt. Die Granula mit 50 μg und mit 100 μg Trypsin zeigten keine Trennung.

Von den kompletten Thiolyseansätzen wurde nach 0, 20, 40 und 60 Minuten je 200 μl Probe entnommen, 5 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und 5 μl per HPLC auf die Bildung von 3HB-CoA untersucht.

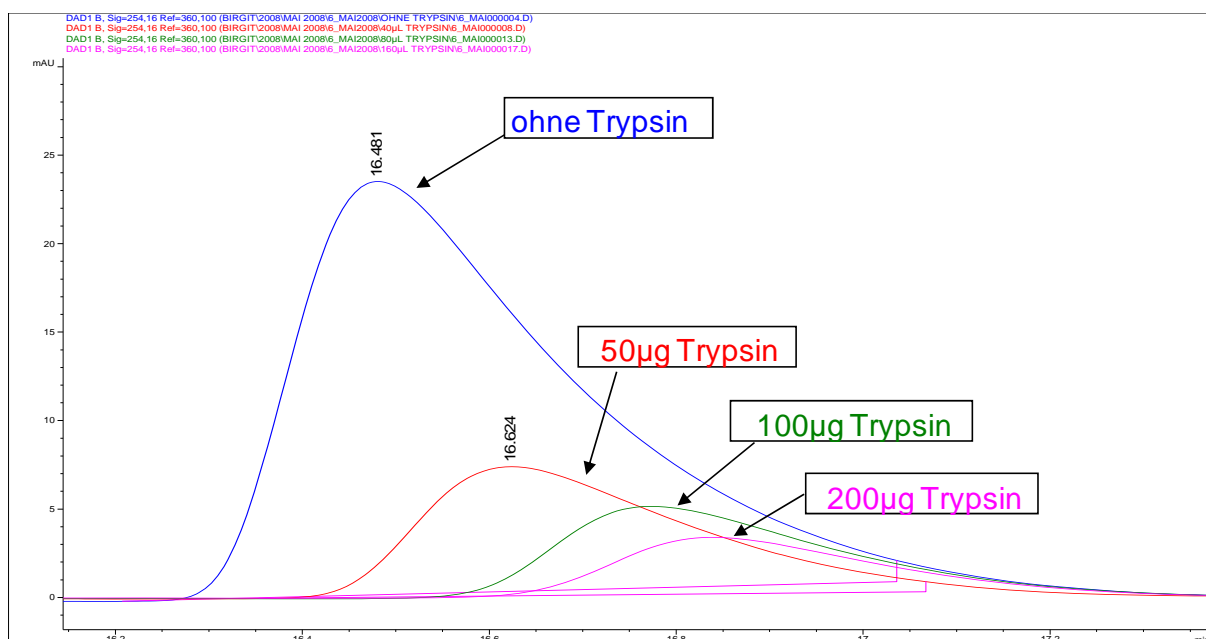


Abb. 127 Vergleich Thiolyseaktivität nach 40 Minuten a) ganz ohne Trypsin (blau) und b) nach Zugabe von 40/80/160 μl Trypsin (rot/grün/rosa). Analyse der 3HB-CoA-Konzentration per HPLC (Methode: „CoA-Ester“).

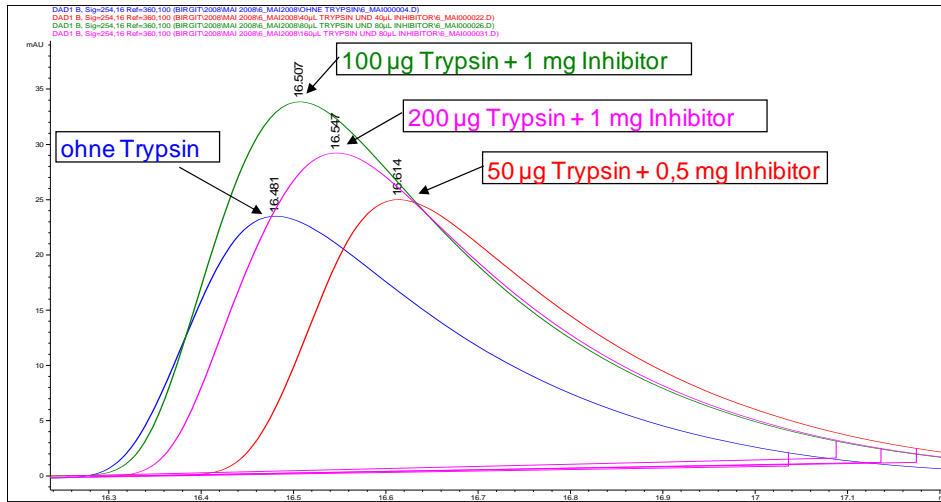


Abb. 128 Vergleich Thiolylseaktivität nach 40 Minuten a) ohne Trypsin (blau), b) nach Zugabe von 40/80/160µl Trypsin und später Inhibitor (rot/grün/rosa). Analyse der 3HB-CoA-Konzentration per HPLC (Methode: „CoA-Ester“).

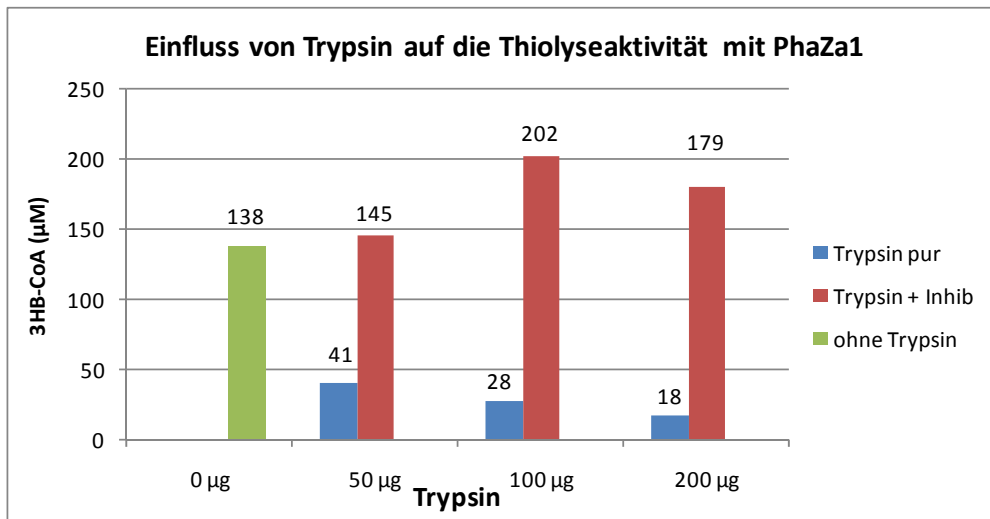


Abb. 129 Einfluss von Trypsin auf die 3HB-CoA-Bildung bei nPHB aus *R. eutropha* Δ phaZa1 mit PhaZa1 (10µl FraktionA = 0,92 mg). Hier gezeigt: 3HB-CoA Konzentrationen nach 40 min Inkubation. Test von drei Mengen Trypsin (50, 100, 200 µg). Eine Versuchsreihe wurde nach Vorinkubation der Granula mit Trypsin standardmäßig (2.16.1) angesetzt und inkubiert (blau). Zu der zweiten Reihe wurde vor Zugabe von PhaZa1 Trypsininhibitor zugegeben (rot). Ein dritter Ansatz blieb zur Kontrolle ganz ohne Trypsin oder Inhibitor (grün). Analyse der 3HB-CoA-Konzentration per HPLC (Methode: „CoA-Ester“).

Der Vergleich mit dem Kontrollansatz zeigt sehr gut, dass Trypsin in den eingesetzten Mengen die 3HB-CoA-Bildung stark beeinträchtigt. 50 µg Trypsin lassen die Konzentration bereits um 70% zurückgehen. Mit 100 µg der Protease entstehen - verglichen mit der Kontrolle - nur noch 20% des Produktes, mit 200 µg noch 13%. Einen deutlichen Unterschied bewirkt die Zugabe des Trypsin-Inhibitors bevor PhaZa1 in den Ansatz pipettiert wird: Während 50 µg Trypsin mit Inhibitor die 3HB-CoA-Bildung noch nicht stark zu beeinflussen scheinen, erhöht sich dessen Konzentration durch 100 µg Trypsin mit Inhibitor um rund 40% auf 201,5 µM. Die doppelte Menge der Protease lässt die Thiolylseaktivität wieder leicht um 10% zurückgehen, die 3HB-CoA-Konzentration liegt aber weiterhin deutlich oberhalb der Kontrolle.

3.7.9.2 Einfluss weiterer Substanzen

Für Trypsin konnte gezeigt werden, wie eine Protease bei richtigem Einsatz und passender – meist sehr niedriger - Konzentration fördernd auf die Thiolysereaktion nativer PHB-Granula wirken kann (Kapitel 3.7.9.1). Höhere Protease-Konzentrationen stoppen die Reaktion in der Regel. Um zu überprüfen, ob unsere isolierte Depolymerase auch durch andere Stoffe in ihrer Aktivität gesteigert oder aber gezielt gehemmt werden kann, wurden zahlreiche bekannte Hemmstoffe und auch Aktivatoren auf ihre Wirkung geprüft (Tab. 32). Für alle Versuche wurden pro Ansatz 5 mg PHB (= 57 mg Granulasuspension) aus *R. eutropha* Δ phaZa1 eingesetzt. Zum Entfernen unspezifischer Proteine aus der Suspension mit rund 60 % Glycerin wurden die Granula gewaschen. Dazu wurden die entsprechenden mg in Eppendorf-Cups eingewogen, mit eiskaltem Puffer versehen, 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und das Pellet anschließend in 50 mM KP-Puffer, pH 7, resuspendiert. Die CoA- und die DTT-Konzentration im 1 ml-Ansatz betragen 1 mM, die Pufferkonzentration (KP-Puffer, pH 7) 50 mM. Wenn nicht anders vermerkt, wurden 10 μ l PhaZa1 zum Test eingesetzt. Zunächst wurde dazu Fraktion B (= 220 μ g) aufgebraucht, später mit Fraktion A (= 920 μ g) weitergearbeitet (Tab. 30).

Kontrollen wurden zum einen für jede der beiden eingesetzten PhaZa1-Fraktionen durchgeführt. Zum anderen waren für einige Tests eigene Kontrollen notwendig. So ist PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) in Isopropanol gelöst und der entsprechende Thiolyseansatz enthält dadurch 1 % des Alkohols. Daher wurde die gleiche Konzentration zur Kontrolle gegeben. Um DTT zu testen, wurde für die Nullkontrolle das sonst im Standard enthaltene Reduktionsmittel weggelassen.

Die Ansätze wurden bei 30°C inkubiert und nach 20 und 40 min Proben entnommen, um per HPLC die Bildung von 3HB-CoA zu verfolgen.

Einige der Agentien hemmten die Thiolyseaktivität bereits nach 20 Minuten völlig. So wirkte das ionische Detergens SDS schon bei 0,01 % komplett hemmend, das Oxidationsmittel DTNB mit einer Konzentration von 1 mM, das nichtionische Detergens TritonX100 mit 0,1 % und das Atmungsgift Quecksilberchlorid (HgCl_2) mit 5 mM.

Eine höhere 3HB-CoA-Bildung als in der Kontrolle wurde durch Zugabe von Tween80 erreicht. 0,1 % des nichtionischen Detergens reichten aus, um die Thiolyseaktivität nach 20 min um das 3,5 fache zu steigern. Mit 0,5 % Tween80 stieg die 3HB-Konzentration nach 20 Minuten nur noch um den Faktor 2,2.

Welche Produktbildung jeweils hinter dem 100 %-Wert der einzelnen Kontrollen steckt, ist in Tabelle 33 aufgelistet.

Tab. 32 Einfluß von Detergentien, oxidierender und reduzierender Agentien, von Atmungsgift und Kationen auf die Thiolyseaktivität von isoliertem PhaZa1 (aus *R. eutropha* Wt).

Hemmstoff	% Aktivität nach 20 min	% Aktivität nach 40 m
Kontrolle 1 (für PhaZa1 aus Fraktion B)	100	100
0,01% SDS	0	0
0,1 % SDS	0	0
1mM EDTA	77	71
10mM EDTA	77	81
Kontrolle mit 10µl 100% Isopropanol	39	51
0,1mM PMSF	91	85
1mM PMSF	84	68
Kontrolle 2 (für PhaZa1 aus Fraktion A)	100	100
1mM DTNB	0	0
5mM DTNB	0	0
5mM Mercaptoethanol	79	67
0,1% TritonX100	0	0
0,5% TritonX100	0	0
0,1% Tween80	349	374
0,5% Tween80	221	256
1mM HgCl ₂	89	72
5mM HgCl ₂	0	0
Kontrolle ohne DTT	100	100
1mM DTT (= Kontrolle 2)	65	60
5mM DTT	43	39
Kontrolle CaCl₂-/MgCl₂-Versuche	100	100
1mM CaCl ₂	139	177
5mM CaCl ₂	164	211
1mM MgCl ₂	97	95
5mM MgCl ₂	107	100

Tab. 33 Produktbildung (3HB-CoA) der Thiolyse-Kontrollansätze, die in Tabelle 32 als 100 %-Werte eingesetzt worden sind.

	20 min (nmol/mg PHB)	40 min (nmol/mg PHB)
Kontrolle 1 (Fraktion B):	5,6	7,2
Kontrolle 2 (Fraktion A):	11,3	15,1
Kontrolle ohne DTT:	4	7,6
Kontrolle CaCl ₂ /MgCl ₂ :	4,9	5

CaCl₂ führte ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg der 3HB-CoA-Bildung. Mit 5 mM CaCl₂ stieg die Thiolyseaktivität nach 20 Minuten auf 164 %, mit 1 mM auf 139 % der Kontrolle. Der Zusatz von MgCl₂ hingegen zeigte keinen signifikanten Einfluss (Abb. 130).

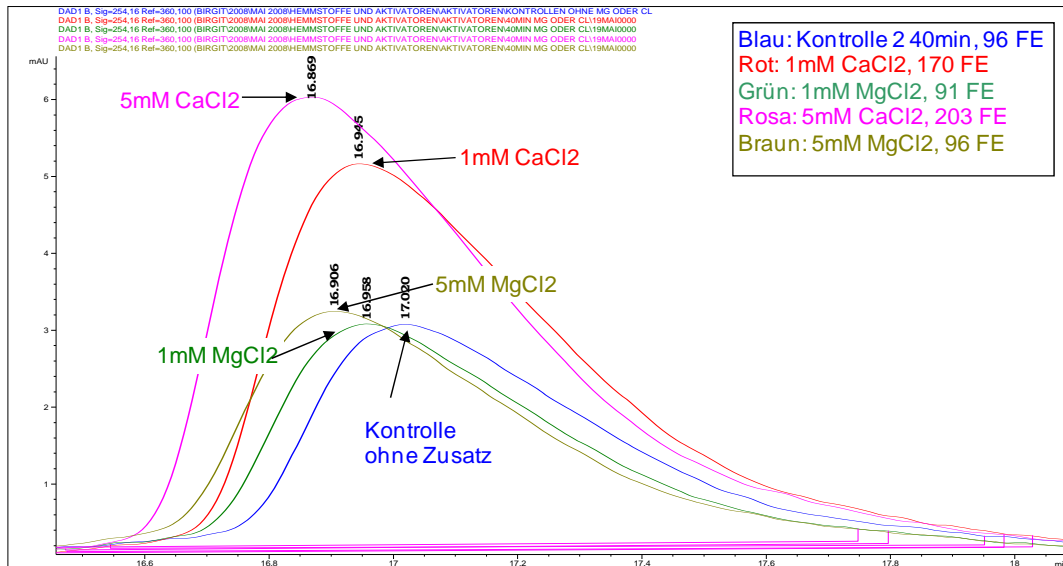


Abb. 130 Einfluss von CaCl₂ und MgCl₂ (je 1 mM und 5 mM) auf die 3HB-CoA-Bildung im Thiolyseansatz mit nPHB aus *R. eutropha* ΔphaZa1 mit PhaZa1. Probenahme nach 20 Minuten. Analyse der 3HB-CoA-Konzentration per HPLC (Methode: „CoA-Ester“).

Einen signifikanten Rückgang, ohne die 3HB-CoA-Bildung komplett zu stoppen, bewirkten außerdem 1 mM EDTA, 5 mM Mercaptoethanol, 1 mM HgCl₂ sowie 1 mM DTT (Abb. 131). Diese Beobachtung war insofern ungewöhnlich, da 1 mM DTT im Protokoll der Thiolysereaktion (Uchino und Saito 2006) angegeben ist. Anknüpfend an dieses Ergebnis wurde das Reduktionsmittel im Folgenden nicht mehr zu den Reaktionsansätzen dazugegeben. Stattdessen kamen 5 mM CaCl₂ hinzu, die im Test nachweislich die Thiolyseaktivität gefördert hatten.

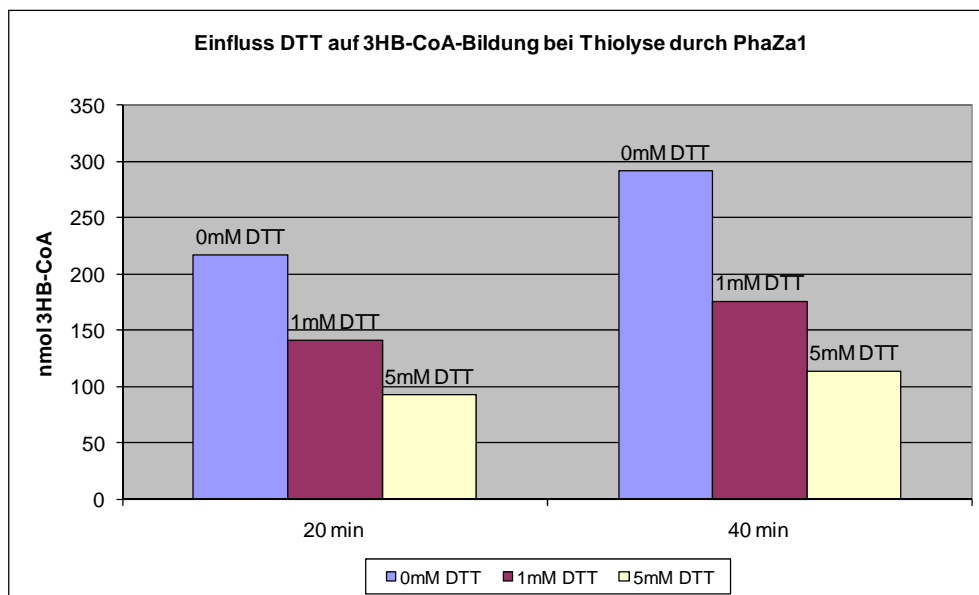


Abb. 131 Einfluss von DTT (1 mM und 5 mM) auf die 3HB-CoA-Bildung im Thiolyseansatz mit nPHB aus *R. eutropha* ΔphaZa1 mit PhaZa1. Probenahme nach 20 und 40 Minuten. Analyse der 3HB-CoA-Konzentration per HPLC (Methode: „CoA-Ester“).

3.7.10 Einfluss PhaZa1 auf nPHB anderer Stämme

Um die Wirkung von PhaZa1 auf Granula anderer Organismen zu untersuchen, wurden Thiolyseversuche mit nPHB aus *Comamonas sp.*, *Bacillus megaterium* und zum Vergleich aus *R. eutropha* H16 Wt angesetzt.

Mit den gewaschenen Granula jedes Organismus wurde je ein Thiolyseansatz mit und einer ohne PhaZa1 (10 µl Fraktion B = 220 µg Protein) inkubiert. Von allen drei nPHB-Isolaten wurde die Menge Granulasuspension eingewogen, die 5 mg PHB nach Behandlung mit Natriumhypochlorit entspricht (2.9). Für nPHB aus *R. eutropha* waren dies 87 mg. Die isolierten Granula der anderen beiden Organismen lagen deutlich verdünnter vor: 5 mg PHB entsprachen bei *Bacillus megaterium* 379 mg und bei *Comamonas sp.* 373 mg glycerinhaltiger Granulasuspension. Die Probenahme erfolgte nach 0, 20, 40 und 60 Minuten.

An isolierten Granula aus *R. eutropha* H16 Wt konnte bereits gezeigt werden, dass sie eine signifikante Eigenthioolyse aufweisen (3.5.4). Der Kontrollansatz (Abb. 132-A) bestätigt dies erneut. Auch im Ansatz mit nativen PHB-Granula aus *Comamonas sp.* entstehen Thiolyseprodukte, wenn auch nur halb so viel im direkten Vergleich mit *R. eutropha* (Abb. 132-B). Der Einsatz von isoliertem PhaZa1 verändert jedoch dieses Verhältnis. In der 20 Minuten-Probe liegt die 3HB-CoA Konzentration für nPHB aus *Comamonas sp.* bereits knapp unter der des *R. eutropha*-Ansatzes. Nach 40 und 60 Minuten Inkubation liegen die Werte sogar darüber.

Vor Beginn der Inkubation – in der 0 Minuten-Probe - findet sich bei *B. megaterium* genau wie bei den beiden anderen Stämmen eine geringe Konzentration an 3HB-CoA (Abb. 132-C). Ohne Zugabe von PhaZa1 ändert sich hier diese Menge jedoch die gesamte Versuchsdauer über nicht. Nur der Ansatz mit der isolierten Depolymerase zeigt nach 20 und 40 Minuten jeweils einen sehr geringen Zuwachs von anfangs 20 µM auf 30 µM und zuletzt 40 µM 3HB-CoA.

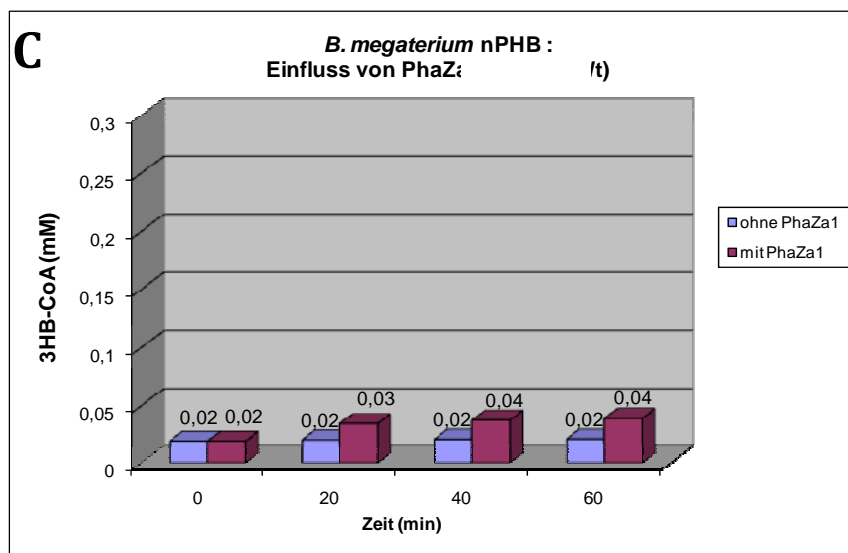
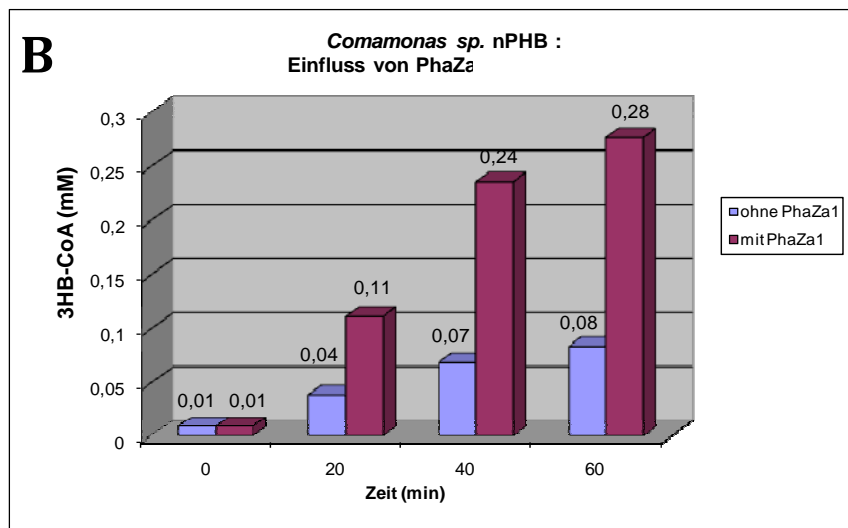
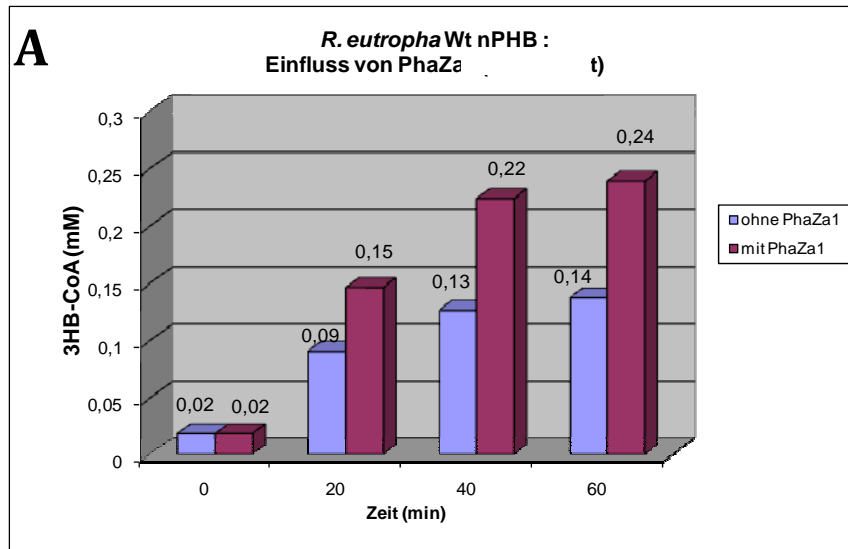


Abb. 132 Wirkung der isolierten Depolymerase PhaZa1 aus *R. eutropha* Wt auf native PHB-Granula aus *R. eutropha* H16 Wt, *Comamonas* sp. und *Bacillus megaterium*. Analyse der 3HB-CoA-Bildung per HPLC (Methode „CoA-Methode“). Blau: Thiolyseansätze ohne Zugabe PhaZa1, Rot: Thiolyseansätze mit 10 μ l PhaZa1 (= 220 μ g Protein: „Fraktion B“, isoliert 11.04.08).

3.7.11 aPHB: Wirkung von gereinigtem PhaZa1-his / Rohextrakt *E. coli phaZa1*

Für den Nachweis der Aktivität der isolierten Depolymerase PhaZa1 wurden stets native PHB-Granula als Substrat eingesetzt. Kontrollansätzen ohne gereinigtes PhaZa1 gaben als eine Art Nullwert die Eigenaktivität des nPHB durch die Enzyme der Granulaoberfläche wieder. Um jeglichen Einfluss durch andere Proteine auszuschließen, stellt theoretisch artifizielles amorphes PHB (aPHB, 2.11) das ideale neutrale Substrat da. Es besitzt keine Proteinhülle, sondern die amorphe Polymerstruktur ist umgeben von einem Detergenz, im vorliegenden Fall Natriumcholat.

Beim Versuch, die Aktivität unseres isolierten Enzyms statt wie bisher erfolgreich mit nPHB jetzt mit aPHB nachzuweisen, konnte in mehreren Anläufen kein Produkt detektiert werden. K. Uchino konnte dies zwar mit PhaZa1 eines anderen *E. coli*-Konstruktes (*E. coli* BLR (DE3)/pLysS mit pET171H: pET23b mit phaZa1-Konstrukt, siehe Saegusa et al. 2001) zeigen. Allerdings war die Aktivität gering und konnte nur durch Einsatz von hochkonzentriertem aPHB und dem Rohextrakt der für phaZa1 rekombinanten *E. coli*-Kultur gelingen.

In dieser Arbeit wurde versucht die Thiolyseaktivität von PhaZa1 aus einem anderen rekombinanten *E. coli*-Stamm (*E. coli* JM 109 pJOE4036::phaZ1, SK 2914, Günther, M. 2005) nachzuweisen. Dazu wurden ebenfalls der Rohextrakt der Kultur sowie aPHB als Substrat eingesetzt. Um sicherzugehen, dass ausbleibende Aktivität am Substrat (aPHB) und nicht am Enzym im Rohextrakt liegt, dienten Ansätze mit nPHB als Kontrolle. Untersucht werden sollte zudem, ob das Natriumcholat des aPHB möglicherweise die Depolymerase hemmt und wir deshalb mit diesem Substrat keine Aktivität erreichen konnten. Dazu wurde einem Ansatz mit nPHB soviel Detergenz beigefügt, wie die entsprechenden Proben mit aPHB enthalten (335 µl 50 mM).

Der Überstand des Rohextraktes war durch Ultrazentrifugation des Frenchpress-Aufschlusses (2.5) gewonnen worden und hatte vor dem Test eine Nacht auf Eis gelagert. Um unter den gleichen Bedingungen zu arbeiten wie K. Uchino (mündliche Informationen), wurde der Überstand mit Glycerin versetzt auf eine Endkonzentration von 50%. Dies dient eigentlich der Lagerung bei -20 °C. Die Probenahme erfolgte nach 0, 20, 40 und 60 Minuten. Tabelle 34 gibt einen Überblick über die Versuchsansätze. Im Kapitel 3.7.9.2 (Tab. 32) wird beschrieben, dass 1 mM DTT leicht hemmend auf die Thiolysereaktion wirkt. Die hier gezeigte Versuchsreihe wurde vor dieser Feststellung durchgeführt und enthält daher noch das Reduktionsmittel. Da der Einfluss gering und DTT in allen Versuchsansätzen enthalten ist, lassen sich die Ergebnisse jedoch problemlos untereinander vergleichen.

Tab. 34 Übersicht Thiolyseansätze: Test Thiolyseaktivität Überstand des Rohextraktes von *E. coli* JM109 mit pJoe 4036.4:phaZ1 (SK 2914, phaZa1-his aus *R. eutropha*). Vergleich von aPHB und nPHB als Substrat sowie Test auf Einfluss von NaCholat. *Gesamtvolumen hier 1080 µl, weil Entscheidung zu Ansatz mit 2x Überstand spontan erst nach Zugabe H₂O.

	aPHB + Überstand	aPHB + 2 x Überstand	nPHB + Überstand	nPHB + Überstand + NaCholat
PHB (aPHB / nPHB)	335 µl aPHB		100 µl nPHB	
50 mM KP-Puffer, pH 7	100 µl			
10 mM DTT	100 µl			
10 mM CoA	100 µl			
Überstand	80 µl	160 µl	80 µl	80 µl
H ₂ O	285 µl	285 µl*	520 µl	185 µl
50 mM Natriumcholat	-	-	-	335 µl

Abb. 133 zeigt das Chromatogramm der 60 min-Probe „nPHB + Überstand“ (blau) überlagert vom Bild der gleichen Probe mit internem 3HB-CoA- / Acetyl-CoA-Standard. Dadurch können die Peaks sicher den entsprechenden Produkten zugeordnet werden. Zudem wird deutlich, dass es sich bei dem in jeder Probe auftauchenden Peak nach 14,7 min weder um 3HB-CoA (16,5 – 16,7 min) noch um Acetyl-CoA (15,4 – 15,5 min) handelt. Auch über ESI-MS-Analyse konnte die Substanz dahinter nicht identifiziert werden. Eine erste Vermutung, dass es sich dabei um das Zwischenprodukt Acetoacetyl-CoA handeln könnte, wurde widerlegt. Uns liegt von dieser Verbindung kein Standard vor, aber andere Arbeitsgruppen, unter anderem Boyton et al. (Boyton et al. 1994) haben gezeigt, dass Acetoacetyl-CoA zwischen Acetyl-CoA und 3HB-CoA eluiert. Dieses Verhalten stimmt auch mit der Größe und Struktur des Moleküls überein.

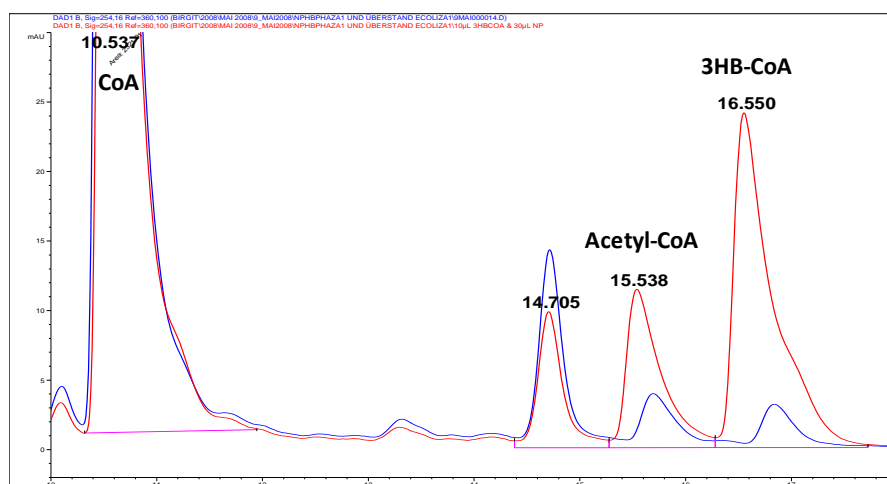


Abb. 133 Overlay Thiolyseprobe mit (rot) und ohne (blau) internem Standard (Acetyl-CoA und 3HB-CoA): 60 min-Probe des Thiolyseansatzes mit nPHB aus *R. eutropha* ΔphaZa1 und 80µl Überstand des *E. coli*-Rohextraktes (*E. coli* JM109, rekombinant für phaZa1). Für internen Standard: Zugabe von ca. 200 mM 3HBCoA und 100 mM Acetyl-CoA. Auftrennung der CoA-Ester per HPLC (Auftrag 5 µl): Methode „CoA-Ester“.

Die Proben ergaben, dass sich in den Ansätzen mit aPHB und Überstand nach 20 Minuten signifikante Mengen an 3HB-CoA gebildet hatten (Abb. 134). Allerdings nahm die Konzentration über diesen Zeitpunkt hinaus nicht wesentlich zu, im Fall mit 80 µl Überstand sank sie sogar leicht. Auch mit nPHB als Substrat konnten Produkte nachgewiesen werden. Die Menge an 3HB-CoA war jedoch deutlich geringer als bei aPHB. Stattdessen wurden signifikante Konzentrationen an Acetyl-CoA gefunden (Abb. 135).

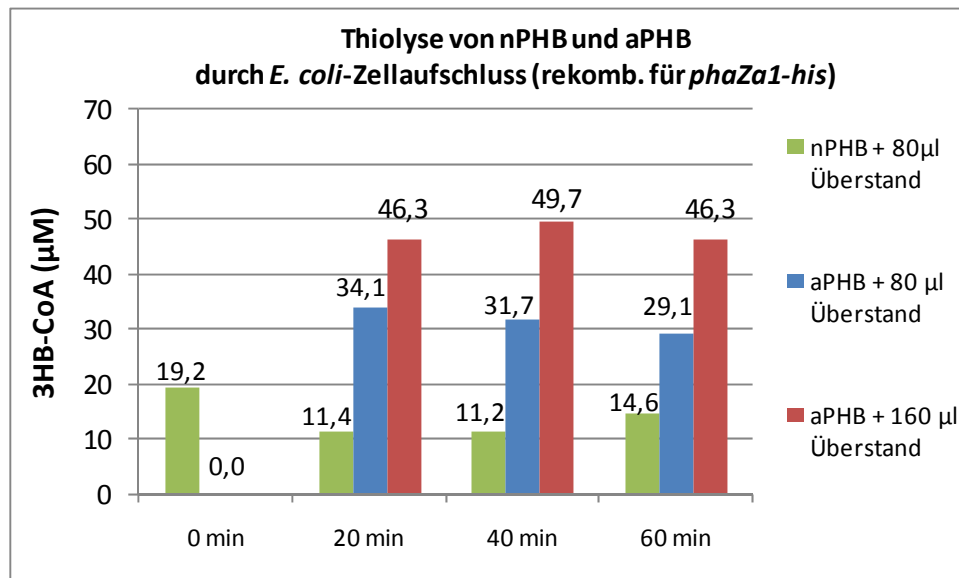


Abb. 134 Thiolyseaktivität des Zellaufschluss-Überstandes der rekombinanten *E. coli*-Kultur (*phaZa1-his*). Vergleich von nPHB (aus *R. eutropha* Δ *phaZa1*) und aPHB als Substrat sowie vom Einsatz der einfachen und doppelten Menge an Überstand. Analyse auf 3HB-CoA per HPLC (Methode: "CoA-Ester").

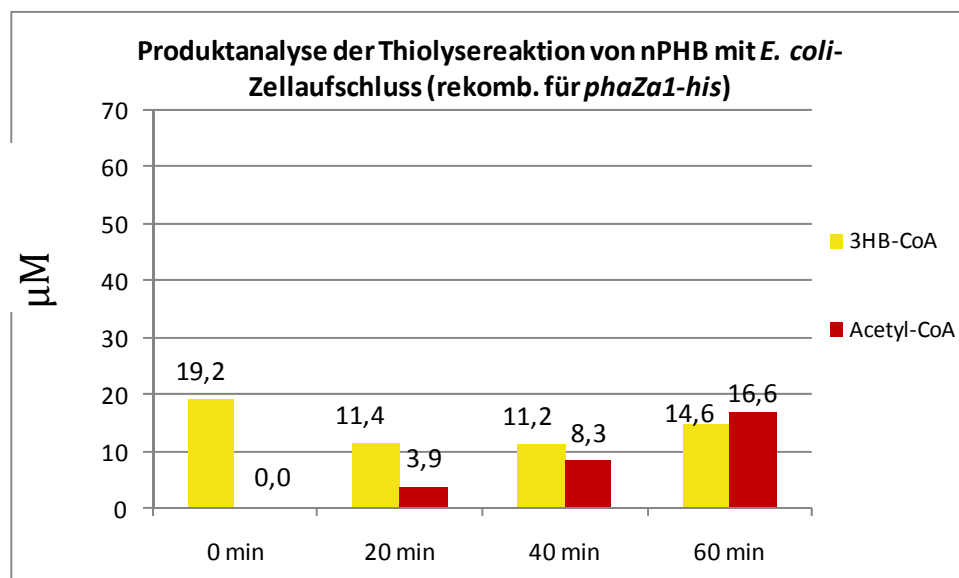


Abb. 135 Analyse auf 3HB-CoA- und Acetyl-CoA-Bildung durch Thiolyse von nPHB (aus *R. eutropha* Δ *phaZa1*) mit Zellaufschluss-Überstand der rekombinanten *E. coli*-Kultur (*phaZa1-his*). Analyse auf CoA-Ester per HPLC (Methode: „CoA-Ester“).

Die höchste Aktivität zeigte sich im Ansatz mit nPHB und Natriumchololat (Abb. 136). Nach 20 Minuten hatten sich knapp 50 μM 3HB-CoA gebildet, was mehr als das Vierfache der Probe ohne das Detergenz darstellt. Die Konzentration stieg über 40 bis zu 60 Minuten weiter leicht an bis auf 63 μM . Acetyl-CoA konnte in diesen Proben mit Natriumchololat nicht nachgewiesen werden.

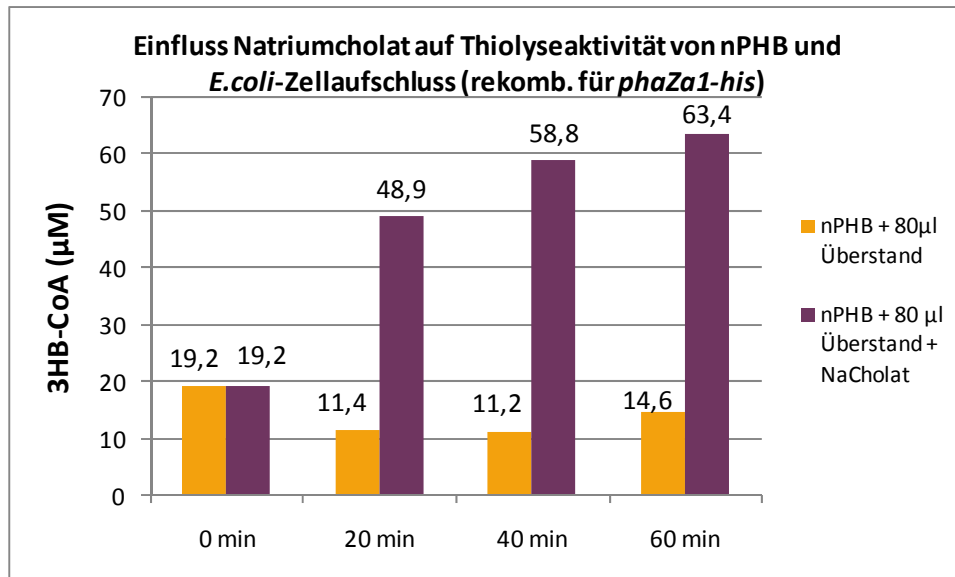


Abb. 136 Untersuchung Einfluss des anionischen Detergenz Natriumchololat (17 mM) auf die Thiolyseaktivität des Zellaufschluss-Überstandes der rekombinanten *E. coli*-Kultur (*phaZa1-his*) mit nPHB (aus *R. eutropha* *ΔphaZa1*). Analyse auf CoA-Ester per HPLC (Methode: „CoA-Ester“)

Zusammenfassend kann zu PhaZa1 gesagt werden, dass die Isolierung des rekombinanten Enzyms gelungen ist. Seine Aktivität ist nachweisbar, wenn auch nicht sehr hoch. Interessanterweise zeigten die Eluate nach 100 mM und 150 mM Imidazolpuffer auf dem SDS-Gel Doppelbanden bei 47,3 kDa und 40 kDa. Nach 6 ml 150 mM Imidazol war nur noch eine Bande bei 47,3 kDa zu erkennen. Die Fraktionen wurden entsprechend isoliert gepoolt. Die Versuche wurden in der Regel mit dem Pool der Doppelbande durchgeführt.

Dabei ergab sich für die Thiolyseaktivität des Proteinisolates ein pH-Optimum zwischen pH 6,5 und pH 7 sowie ein Temperaturoptimum von 30°C. Untersuchungen zur Stabilität des isolierten Enzyms machten deutlich, dass es auf Eis und bei 4°C gehalten einige Tage aktiv bleibt. Nach Einfrieren bei -20°C hingegen war kaum noch Aktivität messbar. Ein Zeitprofil zeigte zudem, dass das Protein im Versuchansatz über rund 45 Minuten zu einer annähernd linearen Produktbildung führt. Ein geringer Anstieg ist noch bis 60 Minuten sichtbar, anschließend jedoch stoppt die 3HB-CoA-Bildung. Als bestes Enzym-Substrat-Verhältnis stellten sich 1,2 μg Protein auf 2,5 mg PHB heraus, also ungefähr „1 zu 2“.

Auf Grundlage dieser optimierten Bedingungen ergab sich schließlich für das Isolat „Pool1“ (Doppelbande) eine spezifische Aktivität von 3 nmol / min x mg PHB⁻¹ x mg Protein⁻¹.

Mit den optimierten Parametern wurde außerdem der Einfluss von Trypin und anderer Substanzen auf die Thiolyseaktivität von isoliertem PhaZa1 untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Protease je nach Konzentration Thiolyse-fördernd oder -hemmend wirken kann. Die anderen Substanzen (Detergentien, Salze, Redoxmittel, Atmungsgifte) hemmten in den getesteten

Konzentrationen fast alle die Enzymaktivität. Lediglich 0,1% / 0,5% Tween80 und 1mM / 5mM CaCl₂ förderten die Thiolyse mit isoliertem PhaZa1.

Zudem wurde getestet, ob isoliertes PhaZa1 auch nPHB aus *Comamonas* und *Bacillus megaterium* thiolytisch spalten kann. Während die Ansätze für *Comamonas*-Granula mit PhaZa1 signifikant mehr 3HB-CoA aufwiesen als ohne das Enzym, konnte dies für nPHB aus *Bacillus* nicht bestätigt werden.

Darüber hinaus wurde der Effekt des Zellaufschlusses von rekombinanten *E. coli*-Zellen (mit PhaZa1-his) auf aPHB getestet. Im Gegensatz zu Ansätzen mit aPHB und gereinigtem PhaZa1 konnten hier Thiolyseprodukte nachgewiesen werden. Auch nPHB als Substrat ergab mit dem Zellextrakt höhere 3HB-CoA-Mengen als ohne.

3.8 Mikroskopische Beobachtung PHB-Speicherung und –Verwertung

3.8.1 Vergleich NB-Kultur versus MM-Kultur *R. eutropha* Wt

Im folgenden Versuch wurde der Zusammenhang zwischen Art des Kulturmediums und der Hydrolyse- und Thiolyseaktivität der aus den Zellen isolierten nativen PHB-Granula untersucht. Kapitel 3.5.6 beschreibt bereits, wie native Granula von *R. eutropha* aus NB-Kultur deutlich höhere Thiolyse- und Hydrolyseaktivität aufweisen als solche von MM-Kultur. Dabei handelt es sich um eine abgewandelte Form des klassischen Mineralmediums nach Schlegel (2.2.2). Der Grund für die unterschiedlichen Abbauaktivitäten liegt vermutlich in verschiedenen physiologischen Stadien, in denen sich die Kulturen zum Zeitpunkt der Granulaisolierung befanden. Die Ernte der parallel in NB und MM kultivierten Zellen fand zwar gleichzeitig statt, beide Ansätze waren aber unter verschiedenen Nährstoffbedingungen gewachsen.

Auf der Suche nach den entscheidenden Unterschieden zwischen NB und MM wurden beide Medien parallel mit *R. eutropha* Wt angeimpft und neben der OD_{600} und dem pH-Verlauf vor allem die Phosphat- und Ammonium-Konzentrationen verfolgt.

Zunächst wurden 20 ml NB-Medium von Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Morgen konnten mit je 9 ml dieser Vorkultur 80 ml MM mit 0,2 % NaGlukonat und 80 ml gepuffertes NB-Medium (50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7) in 500 ml Erlenmeyerkolben angeimpft werden. Nach ungefähr 10 Stunden wurde dem MM zusätzlich 2% NaGlukonat zugegeben. Über eine Kultivierungszeit von 30 Stunden wurden zunächst alle zwei Stunden, später in größeren Abständen, je Kolben 3 ml Kultur entnommen und die Optische Dichte (OD_{600}), der pH-Wert sowie der Phosphat- und Ammonium-Gehalt gemessen. Zur Bestimmung der beiden Verbindungen dienten Küvettentests der Firma Hach-Lange („LCK 303“: NH_4 -Test, „LCK 049“: PO_4 -Test) und das entsprechende Hach-Lange Tischphotometer.

Die OD_{600} der *R. eutropha*-Zellen in NB-Medium steigt in den ersten sechs Stunden der Kultivierung etwas schneller als für die Zellen in MM (Abb. 137). Bei $OD_{600} = 2,1$ scheint nach 8,5 Stunden die größte Zelldichte erreicht zu sein. Für NB-Kulturen ist typisch, dass keine viel höheren Zelldichten erreicht werden können. Ab der 24 Stunden-Probe mit einer OD_{600} von 1,8 sinkt sie bis zum Ende der Messung auf 1,3. Wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Kultur zwischen 8,5 und 24 Stunden höhere Werte erreicht hat. Die Optische Dichte der Zellen des MM hingegen nimmt auch nach 24 Stunden Kultivierung bis zur letzten Probenahme nach 30,5 Stunden weiter zu. Sie erreicht mit einem Wert von 14 mehr als das zehnfache der NB-Kultur, besitzt jedoch mit dem Zusatz an NB, Hefe und Glukonat wesentlich mehr C-Quelle. Zur OD-Messung der beiden Kulturen muss jedoch auch beachtet werden, dass je nach PHB-Gehalt der Lichtstrahl des Photometers anders absorbiert oder auch gestreut wird. Über die Dichtemessung von Zellen unterschiedlichen PHB-Gehaltes können daher keine genauen Vergleiche bezüglich der Zellzahl oder Zellmasse gezogen werden.

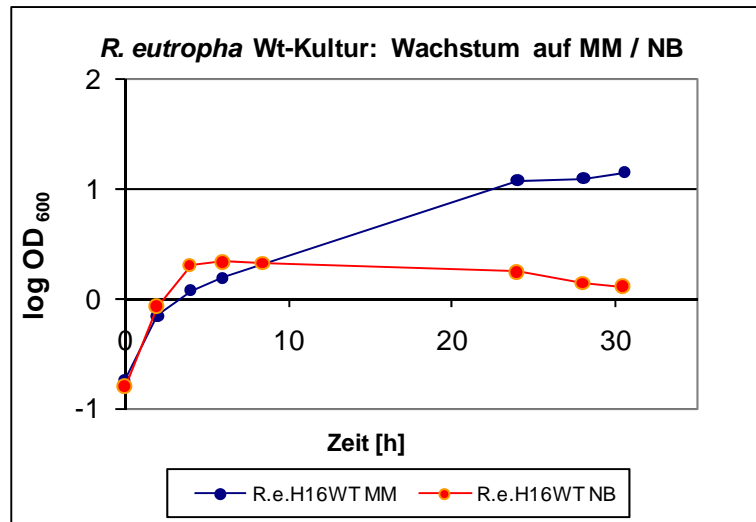


Abb. 137 Aufzeichnung des Wachstums von *R. etropha* H16 Wt auf Mineralmedium mit 2% Glukonat (2.2.2) und Nutrient Broth (NB). Messung der Optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀).

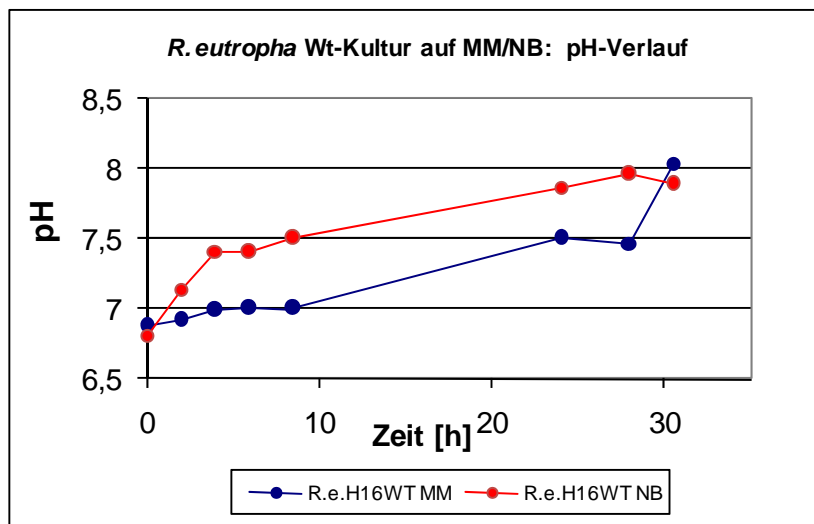


Abb. 138 Verlauf des pH-Wertes während der Kultivierung von *R. etropha* H16 Wt auf Mineralmedium mit 2% Glukonat (2.2.2) und Nutrient Broth (NB).

Bis zur Probenahme nach 8,5 Stunden bleibt der pH-Wert der MM-Kultur mit einer Pufferkonzentration von rund 10 mM weitgehend konstant bei pH 7 (Abb. 138). Nach 24 Stunden ist der Wert auf pH 7,5 angestiegen, nach 30,5 Stunden auf pH 8. In der NB-Kultur, gepuffert mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, wächst der pH-Wert bereits in den ersten vier Stunden von pH 7 auf pH 7,5 und beträgt in den Proben ab 24 Stunden Kultivierung rund pH 7,9. Beide Kulturen sind ähnlich stark gepuffert und unterscheiden sich - bis auf einen etwas rascheren Anstieg des pH-Wertes in den ersten Stunden - kaum in der Säure- oder Basenbildung.

Der Vergleich der Phosphat-Konzentrationen (Abb. 139) zeigt, dass in der MM-Kultur mit 3 g/l gut die dreifache Menge Phosphat enthalten ist wie in der NB-Kultur (ca. 0,9 g/l)(Abb. 140). Hier schwanken die Messwerte zwar leicht, aber der Gehalt an Phosphat bleibt im Mittel über die gesamte Kultivierung von 30,5 Stunden gleich. In der MM-Kultur sinkt die Konzentration an Phosphat in dieser Zeitspanne nur um rund sechs Prozent.

Einen prozentual höheren Verbrauch weist die MM-Kultur für NH₄ auf. Dessen Gehalt im Medium hält sich die ersten 8,5 Stunden bei rund 0,39 g/l, nach 24 Stunden konnten nur noch 0,25 g/l

gemessen werden und nach 30,5 Stunden 0,19 g/l. Die Analyse der NB-Kultur auf Ammonium zeigte in den ersten Stunden eine Konzentration von 0,06 g/l. Nach 8,5 Stunden waren es 0,08 g/l und nach 24 Stunden wurden 0,11 g/l detektiert.

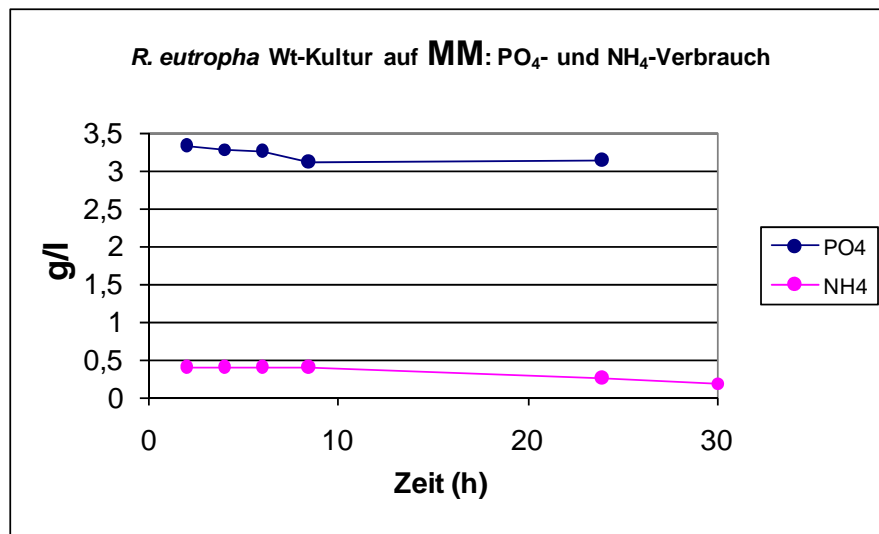


Abb. 139 *Abnahme der Phosphat (PO₄)- und Ammonium (NH₄)-Konzentration während der Kultivierung von R. eutropha H16 Wt auf Mineralmedium mit 2% Glukonat (2.2.2.). Bestimmung des PO₄- und NH₄-Gehaltes photometrisch mittels Küvettentest (Firma Hach-Lange)*

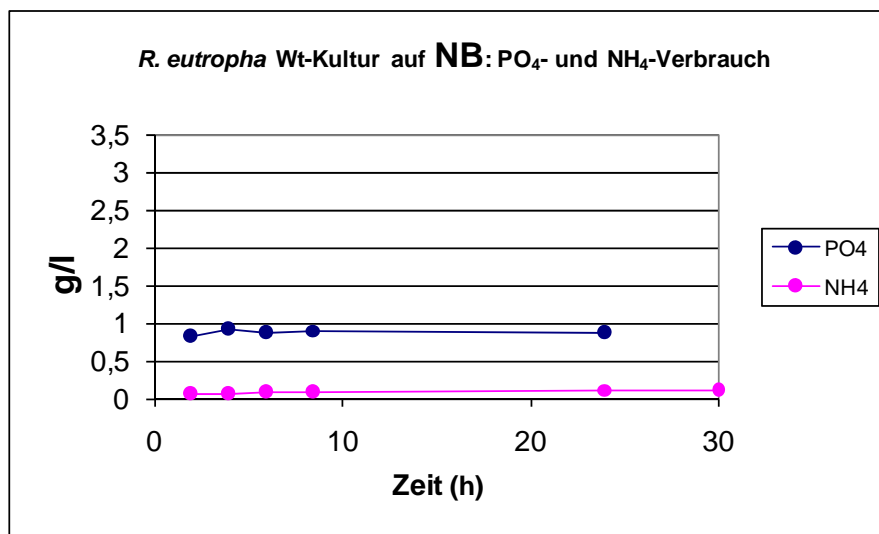


Abb. 140 *Abnahme der Phosphat (PO₄)- und Ammonium (NH₄)-Konzentration während der Kultivierung von R. eutropha H16 Wt in Nutrient Broth (NB)-Medium. Bestimmung des PO₄- und NH₄-Gehaltes photometrisch mittels Küvettentest (Firma Hach-Lange).*

3.8.2 PHB-Speicherung bei *R. eutropha* Wt, $\Delta phaZa1$, $\Delta phaP1$, $\Delta phaP1-4$ (NB)

In vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass mit Vollmedium NB (Nutrient Broth) im Vergleich zu Mineralmedium (mit 2% Glukonat) das Wachstum einer Kultur in den ersten Stunden schneller läuft (3.8.1.). Auch die Bildung, vor allem aber der intrazelluläre Abbau von nPHB-Granula finden früher statt als auf Mineralmedium mit Glukonat. Zudem wiesen die aus NB-Kultur isolierten nPHB-Granula eine höhere Depolymeraseaktivität auf (Abb. 29 und 30, 3.4.4). Und auch „in vivo“ nach Fluoreszenzfärbung (2.4) unter dem Mikroskop betrachtet, erkennt man deutliche morphologische Unterschiede: während *R. eutropha* Wt-Zellen in Mineralmediums-Kultur einige große Granula bilden, liegen mit NB-Medium im gleichen Stadium sehr viele kleine nPHB-Kügelchen vor.

NB-Kulturen scheinen aufgrund ihrer höheren PHB-Bildungs- und -Abbau-Dynamik besonders geeignet, um speziell diese beiden Punkte bei verschiedenen Organismen zu vergleichen. Die folgenden Versuche auf NB-Medium sollten klären, ob das Phasin-Protein PhaP1, die Summe der bekannten Phasin-Proteine (PhaP1-4) sowie die Depolymerasen PhaZa1 und PhaZd Einfluss auf die Granulabildung und den Abbau des nPHB haben. Dazu wurden neben dem Wildtyp (SK 1343) *R. eutropha* $\Delta phaZa1$ (SK 1544), *R. eutropha* $\Delta phaP1$ (SK 3027) sowie *R. eutropha* $\Delta phaP1-4$ parallel in 20 ml NB-Medium angezogen. Über 12 Stunden wurden stündlich (bzw. einmal zweistündlich) rund 500 μ l Probe von allen vier Kulturen entnommen. Die Proben für 14, 17, 21 und 24 h Wachstum stammen von Kulturen, die mit 12 Stunden Zeitverzögerung, aber unter exakt gleichen Bedingungen wie die ersten vier Kolben, angeimpft worden waren.

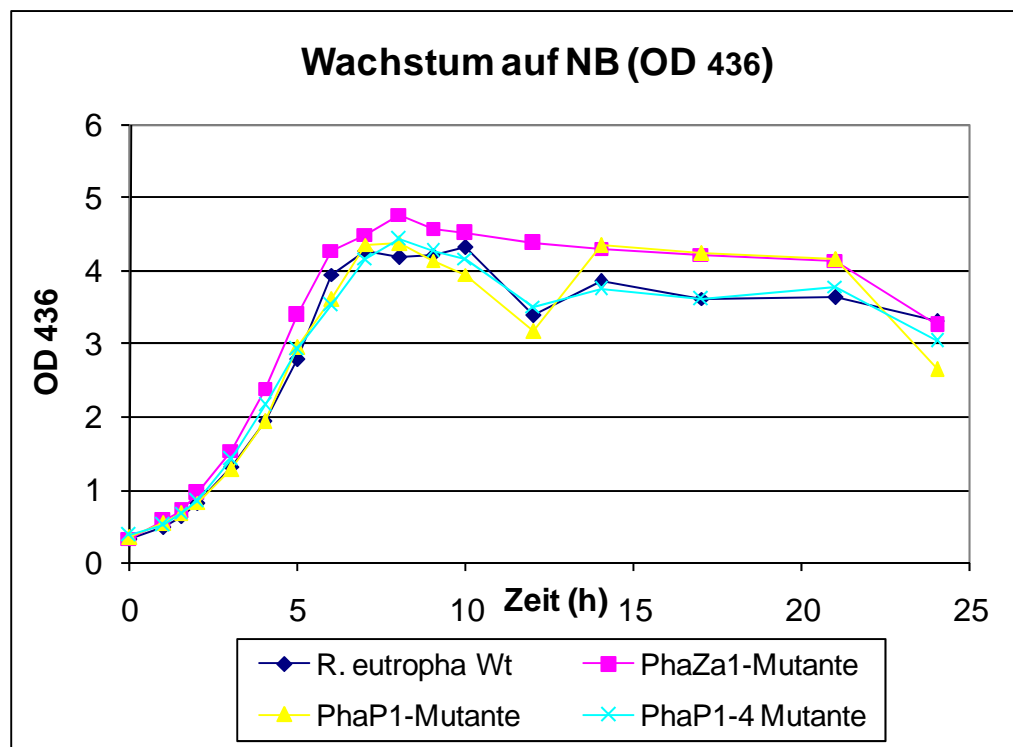
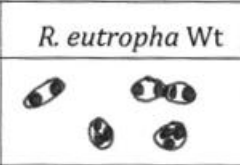
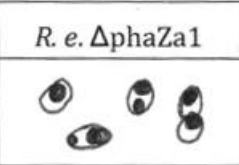
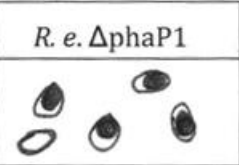
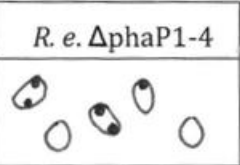
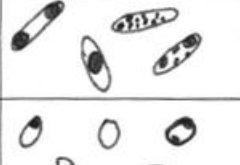

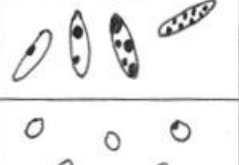

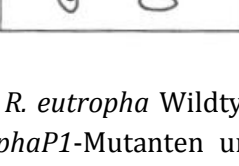
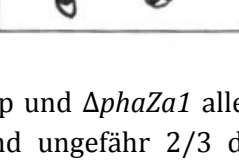
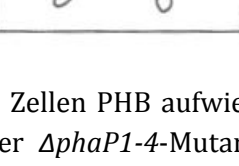
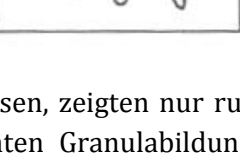


Abb. 141 Wachstumskurven (OD_{436}) der vier Kulturen *R. eutropha* Wt, *R. eutropha* $\Delta phaZa1$, *R. eutropha* $\Delta phaP1$, *R. eutropha* $\Delta phaP1-4$ in 20 ml NB-Medium.

Die höchste optische Dichte, gemessen bei 436 nm, erzielen auf NB-Medium bis auf den Wildtypen alle Kulturen nach rund acht Stunden Wachstum. *R. eutropha* Wt weist nach zehn Stunden mit $OD_{436}=4,31$ ihren höchsten Wert auf.

Das Verhalten des Wildtyps und der drei Mutanten in Bezug auf PHB Auf- und Abbau wurde ebenfalls über 24 Stunden verfolgt. Die mikroskopischen Beobachtungen erfolgten nach Anfärben der Probe mit Nilrot (2.4) bei 1000facher Vergrößerung mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (Axioskop, Zeiss, Oberkochen)(Tab. 35). Nach Animpfen der je 20 ml Vorkultur waren die Zellen aller vier Stämme zunächst PHB-frei und kokkenförmig. Schon nach 20 Minuten konnten überall erste 1-2 kleine Granula entdeckt werden. Signifikante Unterschiede wurden nach ca. 1,5 Stunden sichtbar.

Tab. 35 Typische Zellen und ihr PHB-Speicherzustand (Färbung PHB mit Nilrot, gezeichnet nach Beobachtung mit Fluoreszenzmikroskop) nach Wachstum für 90 min, 6 h und 10 h auf NB-Medium

	<i>R. eutropha</i> Wt	<i>R. e. ΔphaZa1</i>	<i>R. e. ΔphaP1</i>	<i>R. e. ΔphaP1-4</i>
2 h				
6 h				
10 h				

Während bei *R. eutropha* Wildtyp und $\Delta phaZa1$ alle Zellen PHB aufwiesen, zeigten nur rund 80 Prozent der $\Delta phaP1$ -Mutanten und ungefähr 2/3 der $\Delta phaP1-4$ -Mutanten Granulabildung. Die Zellform war überall zunächst kokkenartig, oft hängen zwei Kokken aneinander. Nach 3-4 h bildeten sich daraus Stäbchen.

Nicht nur in der generellen PHB-Bildung, auch in der Anzahl von Granula pro Zelle zeigen die vier Stämme **nach 90 Minuten** Unterschiede. In den Zellen des Wildtypstammes liegen meist 2-3 große Granula, ähnlich der Depolymerase-Mutante, die jedoch oft auch nur 1-2 Granula bildet. Die Phasin-Mutante $\Delta phaP1$ hingegen läßt meistens nur ein Granulum erkennen, das aber dann die ganze Zelle ausfüllt und am Rand anliegt. Beim Stamm $\Delta phaP1-4$ hingegen bilden sich nur 1-2 kleine Granula, die an der Zellwand lokalisiert sind. Auch zu keinem späteren Zeitpunkt tauchen in *R. eutropha ΔphaP1-4* mehr oder größere Granula auf. Genauso besitzt auch *R. eutropha ΔphaP1* nach 3-4 h deutlich weniger Granula als zeitgleich der Wildtyp und die Depolymerase-Mutante.

Die Proben **nach sechs Stunden** zeigen ebenfalls deutliche Unterschiede. Die Zellen des Wildtyps und der PhaZa1-Mutante besitzen alle noch nPHB, ein sehr großes Granulum oder zwei große und einige kleine. Die Zellen der PhaP1-Mutante sind ebenfalls noch mit Granula gefüllt, aber sehr heterogen: 3-6 große und kleine, 6 sehr kleine und teilweise auch leer. $\Delta phaP1-4$ Zellen lassen nur ganz vereinzelt am Ende eines Stäbchens noch 1 oder 2 sehr kleine PHB-Granula erkennen. **Nach zehn Stunden** sind die stäbchenartigen Zellen aller Stämme deutlich kürzer als nach sechs Stunden. Die Zellen der Phasin-Mutanten – inzwischen völlig PHB-frei – sind sogar beinahe wieder kokkenförmig. Nur noch die Hälfte Wildtyp-Zellen besitzt PHB, in Form von 1-2 kleinen Granula. Im Gegensatz dazu sind in fast jeder Zelle der PhaZa1-Mutante 1-2 große Granula erkennbar. **Nach 12-14 Stunden** ist die *R. eutropha* Wt-Kultur schließlich PHB-frei und die Zellen wieder kokkoid. In

der Kultur der Depolymerase-Mutanten weisen jedoch selbst **nach 24 Stunden** noch rund die Hälfte aller Zellen ein großes Granulum auf. Dieser Unterschied zwischen Wildtyp und Depolymerase-Mutante wurde in einem weiteren Experiment sowie durch Beurteilung im Blindtest von drei Personen bestätigt.

4 DISKUSSION

Hintergrund dieser Arbeit war es, den intrazellulären Abbau von nPHB aus *Ralstonia eutropha* weiter zu entschlüsseln. Dabei richtete sich der Blick vom Großen, den ganzen Zellen, über die PHB-Granula bis zum Kleinen: den Molekülen, die beim Abbau des Speicherpolymers entstehen. Entsprechend vielfältig gestalteten sich die Fragestellungen und das Methodenspektrum: von Mikroskopie über die Gewinnung der Granula, den Nachweis der Depolymerase-Aktivität bis zur Analytik der Produkte. Dabei kamen die Methoden immer wieder an ihre Grenzen, so dass ihre Fort- oder Neuentwicklung einen Großteil der vorliegenden Arbeit ausmacht.

4.1 Methoden

Entscheidend für die Erforschung intrazellulärer Depolymerasen sind der Nachweis und die Quantifizierung ihrer Aktivität. Dazu nutzen die Arbeitsgruppen bisher viele verschiedene Methoden: einige Labore messen die Gewichtsabnahme des Polymers (Briese et al. 1994, Foster et al. 1996, Tomasi et al. 1996), was jedoch nur bei einer ausreichend großen Substratmenge und einer Inkubation über viele Stunden funktioniert. Andere Gruppen verfolgen die Abnahme der Trübung einer Polymersuspension (Abe et al. 2005, Handrick et al. 2001, Jendrossek et al. 1993, Jendrossek et al. 1995, Kobayashi et al. 2005, Merrick und Doudoroff 1964, Schöber et al. 2000). Um dabei Unterschiede zu erkennen, wird hier wiederum nur sehr wenig nPHA eingesetzt. Durch die geringe und dadurch oft rasch hydrolysierte Substratmenge kann die Aktivität der Depolymerase-Enzyme jedoch leicht unterschätzt werden.

Eine weitere Methode, um sehr schwache Hydrolyseaktivitäten nachzuweisen, bedient sich radioaktivem PHA. Als erste zeigten Hippe und Schlegel bereits 1967 mit Hilfe von ^{14}C -markiertem PHB die Eigenhydrolyse nativer Granula aus *R. eutropha*. Auch Cho et al. untersuchte nPHB aus *R. eutropha* mit dieser Methode. Prieto et al. (2005) inkubierten eine PHO-bildende *P. putida*-Kultur mit radioaktiver [^{14}C] Oktansäure. Aus dem Produkt stellten sie eine Latex-Lösung her als Substrat für den *E. coli*-Rohextrakt oder das isolierte Enzym. Über die Radioaktivität im Überstand der Versuchsansätze wurde schließlich auf die Menge an PHO-Abbauprodukten rückgerechnet. Alle diese Methoden erfordern jedoch zum einen ein sehr teures Substrat und die entsprechende Analytikausrüstung. Zum anderen darf mit radioaktivem Material nur in speziell dafür ausgewiesenen Bereichen gearbeitet werden. Für den Einsatz als Standardmethode scheinen sie daher nicht geeignet.

Häufig wird die Enzymaktivität an der Bildung der Hydrolyseprodukte gemessen. Zum Nachweis des Monomers 3-Hydroxybutyrat wird oft – auch in dieser Arbeit – der enzymatische Nachweis über die 3HB-Dehydrogenase gewählt. Die Messungen sind jedoch zeitaufwendig und können nur Informationen über die Bildung des Monomers liefern. PHA-Oligomere werden daher zusätzlich entweder mit Oligomer-Hydrolasen (Saegusa et al. 2001) oder durch alkalische Behandlung (Lee und Lee, 2003) zu Monomeren umgesetzt und diese quantifiziert. Nach saurer Methanolyse der Produkte ist auch eine Analyse per Gaschromatographie möglich (Brandl et al. 1988, Timm und Steinbüchel, 1990). Ebenfalls umgewandelt werden mussten die Hydroxyalkanoate bisher, um sie für die Detektion in der HPLC sichtbar zu machen. Dazu wurden die 3-Hydroxybutyrat-Verbindungen durch Hitze zu Crotonsäure reduziert, deren Kohlenstoff-Doppelbindung bei 210 nm Strahlung absorbiert (Karr et al. 1983). Doch auch dieser aufwendige Weg gilt nur für das 3HB-Monomer. Der Bedarf an adäquaten Arbeitsmethoden war deutlich vorhanden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher drei Methoden (weiter-)entwickelt, die die Erforschung des nPHB-Granulums und speziell der intrazellulären PHA-Depolymerasen erleichtern. Dabei

handelt es sich zum einen um den Einsatz eines sehr sensitiven pH-Stat-Gerätes und um die Derivatisierung und HPLC-Analytik der PHA-Hydrolyseprodukte: 3HA-Monomer und - Oligomere. In der dritten Methode wird die Photonenkorrelations-Spektroskopie (PCS) genutzt, um die Größenverteilung von isolierten nPHA-Granula aus versch. Organismen, Medien oder Kultivierungsstadien zu bestimmen.

4.1.1 *pH-Stat-Methode*

Durch den Einsatz der sehr sensitiven **pH-Stat-Methode** können Hydrolyseversuche deutlich genauer beobachtet und ausgewertet werden. Und dazu reichen bereits geringe Substratmengen aus. Zudem waren vor allem Kinetiken vorher sehr viel aufwendiger, für deren Erstellung sonst viele Probenahmen und -analysen nötig sind. Genauso schwierig war es, den direkten Effekt einer zugegebenen Substanz zeitlich abzubilden. Durch die kontinuierliche pH-Messung und -Korrektur des pH-Staten können nun Veränderungen online verfolgt werden. Doch ohne Fehlerrisiko ist diese Methode nicht: So darf nicht sofort jede Änderung des pH-Wertes bzw. der NaOH-Zugabe als Aktivität der nPHB-Granula interpretiert werden. Für jeden neuen Versuchsaufbau müssen Blindtests durchgeführt werden (z.B. nur Puffer messen, Puffer und Zugabe Reagenz messen etc.). Denn zum einen kann der Puffer alleine sich durch Aufnahme von CO₂ aus der Luft bereits ansäuern (z.B. Tris-HCl bei Soll-pH > 7,5). Zum anderen senken auch manche Test-Reagenzien zunächst den pH-Wert des Ansatzes allein durch ihre Zugabe. Wenn ein Versuchsmodell jedoch einmal etabliert ist, ermöglicht es zuverlässige, zeitsparende und ausbaufähige Messungen. So kann durch Einsatz des temperierbaren Reaktionsgefäßes und einer Temperatursonde sehr gut untersucht werden, wie temperaturabhängig die enzymatische Hydrolysereaktion verschiedener Granula-Arten verläuft. Für die Auswertung der Versuche besteht zudem Zugriff auf die umfangreichen Datentabellen des Mess-Systems, die auch in Programme wie Excel kopiert werden können.

4.1.2 *HPLC-Analytik*

Durch die neu entwickelte Methode zur **Derivatisierung von 3HA-Verbindungen** mit Bromphenacylbromid (BPB) können jetzt alle Produkte der Hydrolyse von nPHB auf einmal nachgewiesen werden. Zuvor wurde das Monomer 3HB vor allem enzymatisch bestimmt, die Oligomere indirekt über die Produktbildung bestimmter Oligomer-Hydrolasen analysiert. Die Methode erlaubt es, viele Proben gleichzeitig zu bearbeiten und per HPLC analysieren zu lassen. Mit Hilfe von Oligomer-Standards und deren einmaliger Bestätigung per HPLC-MS sind die Produkt-Peaks eindeutig zu identifizieren. Mit reinem 3HB konnte eine Kalibriergerade erstellt werden, so dass die Produkte leicht quantifizierbar sind. Lediglich die Wiederfindungsrate in Hydrolyseansätzen mit ungewaschenem nativen PHB und daher einem hohen Glycerinanteil liegt deutlich unter 100%. Hier findet sich vermutlich auch die Ursache, wieso die Ergebnisse der enzymatischen 3HB-Bestimmung (3HB-DH-Test) und der HPLC für letztere in der Konzentration grundsätzlich deutlich nach unten abweichen.

4.1.3 *Photonenkorrelations-Spektroskopie (PCS)*

Nach Kenntnis der aktuellen Literatur hat keine Arbeitsgruppe bisher das **PCS-Verfahren** zur Vermessung von nPHB-Granula eingesetzt. Stattdessen erfolgte die aufwendige Größenbestimmung durch Elektronenmikroskop-Aufnahmen nach Kontrastierung mit 3% Phosphorwolframsäure und dem eigenhändigen Ausmessen von 300 Granula (Handrick et al. 2000). Die PCS liefert keine Absolutwerte, so die Aussagen eines Geräteherstellers (Malvern Instruments, England) und anderer Anwender (Fraunhofer IGB, Stuttgart). Dazu seien die Messungen zu ungenau, was durch

rund 10% Abweichung bei Verwendung eines 600 nm-Polystyrol-Standards auch für uns sichtbar wurde (Abb. 16).

Für eine erste Abschätzung der Größenverhältnisse reicht die Methode jedoch aus. Und diese ist vor allem wichtig, wenn Granula verschiedener Organismen oder Kultivierungsstadien verglichen werden sollen. So ergibt sich für nPHB aus *Paracoccus denitrificans* ein Durchmesser von ca. 400 nm, für isolierte Granula aus *Paucimonas lemoignei* 1650 nm. Bei letzteren handelt es sich vermutlich um Agglomerate, die während der Isolierung aus kleineren Granula entstanden sind, da die Zellen solch große Granula gar nicht beinhalten können.

Die Obergrenze des in vivo-Durchmessers ist vermutlich bei rund 1000 nm: Für *R. eutropha ΔphaP1* wurde mikroskopisch beobachtet, dass ein einzelnes Granulum in vivo annähernd die gesamte Zelle ausfüllt. Hier liegen die Durchmesser per PCS-Analyse bei rund 1000 nm, was in etwa auch dem Zelldurchmesser entspricht.

Bei gleichen mg PHB ist damit die Oberfläche der kleinen Granula aus *Paracoccus* fast dreimal größer als für die großen Granula aus *R. eutropha ΔphaP1*. Sie bietet damit auch fast dreimal mehr Platz für Granula-assoziierte Proteine.

Dadurch kann zum Beispiel durch PCS bei *A. latus* oder *R. eutropha ΔphaP1* ausgeschlossen werden, dass ihre nPHB-Granula deshalb die auffallend hohe Depolymeraseaktivität zeigen, weil sie möglicherweise ein besonders großes Verhältnis Oberfläche – Volumen aufweisen. Die deutlich höhere Abbauaktivität im Vergleich zu den Granula der anderen getesteten muss daher auf andere Gründe zurückzuführen sein. Denn nachweislich ist beispielsweise die Oberfläche von nPHB aus *R. eutropha ΔphaP1* signifikant kleiner als beim Wildtyp.

4.2 Charakterisierung – Vergleich Wt, $\Delta phaP1$ und $\Delta phaZa1$

Den Abbau von amorphem PHB durch intrazelluläre Depolymerasen haben bereits verschiedene Arbeitsgruppen nachgewiesen. Dazu gehört der Abbau durch PhaZa1 aus *R. eutropha* (Saegusa et al. 2001), PhaZd (*R. eutropha*, Abe et al. 2005) sowie durch Depolymerasen anderer Organismen wie z.B. PhaZ1 aus *Rhodobacter spheroides* (Kobayashi et al. 2004) oder PhaZ aus *Bacillus thuringiensis* (Tseng et al. 2006). Ihnen allen ist jedoch gemeinsam, dass sie dabei mit isolierten, meist rekombinant exprimierten Enzymen gearbeitet haben. Auch das Substrat war nicht aus einem Organismus isoliertes natives amorphes PHB sondern artifizielles amorphes PHB (aPHB) (nach Horowitz und Sanders, 1994). aPHB wird hergestellt, indem denaturiertes PHB in Chloroform gelöst wird. Nach Zugabe von Natriumcholat entstehen mit Hilfe von Ultraschall Granula-artige PHB-Partikel, umhüllt von dem Detergenz. Dadurch können sie von einigen Depolymerasen ähnlich wie natives PHB hydrolysiert werden, allerdings zumeist mit einer deutlich niedrigeren Rate.

Einzelne Versuche, die Hydrolyse nativer Granula aus *R. eutropha* ohne Zusatz von isolierten Depolymerasen nachzuweisen, zeigen, dass zumindest optisch durch Trübungsmessung oder mit ähnlichen damaligen Messmethoden kaum signifikante Ergebnisse zu erkennen waren (Handrick et al. 2004, Günther 2005).

Mit Hilfe der neuen Generation von pH-Stat-Geräten samt Computerauswertung ist es jedoch inzwischen möglich, kleinste Hydrolyseaktivitäten über minimale Änderungen des pH-Wertes zu messen. Dadurch konnte die Eigenhydrolyse nativer PHB-Granula eindeutig nachgewiesen und charakterisiert werden.

4.2.1 Nachweis Eigenhydrolyse

Dass isolierte native PHB-Granula von sich aus Säure produzieren, war beim Vergleich mit aPHB als Kontrolle schnell zu zeigen (Abb. 20). Dass es sich bei der Säurefreisetzung im pH-Stat aber wirklich um enzymatische Hydrolyse handelt, bestätigte erst ein Hitzetest (Abb. 23): nach vorsichtigem Erhitzen zeigten native PHB-Granula keine Säure-/3HB-Bildung mehr. Dass sie jedoch durch die nPHB-spezifische Depolymerase PhaZ7 (*P. lemoignei*) weiterhin abgebaut werden konnten bewies, dass sie eine noch weitgehend native, amorphe Struktur besaßen. Daraus ist zu schließen, dass wohl nur die Enzyme – u.a. Depolymerasen – auf der Granulaoberfläche durch das Erhitzen denaturiert worden waren. Zudem ist beim Einsatz von nativem PHB im pH-Stat immer wieder die gleiche – typisch zweiphasige – Kinetik in der Säurebildung zu beobachten (Abb. 21): nach rund 50 Minuten sinkt die Rate erkennbar und verläuft über mehrere Stunden konstant auf diesem Niveau.

4.2.2 Einfluss Granula-fremde Proteine auf Produktspektrum

Es ist wahrscheinlich, dass während der Isolierung von nPHA verschiedene cytoplasmatische Proteine oder Membranproteine an die Oberfläche der Granula binden. Daher wurden viele Versuche in dieser Arbeit erstmals auch mit „gewaschenen“ Granula durchgeführt, um möglichst ohne unspezifische Proteine messen zu können. Der Waschschrift an sich ist jedoch auch ein kritischer Punkt, denn nur durch sehr sanftes Waschen gelingt es, die Struktur der Granula weitestgehend nativ zu erhalten. Nach Versuchen von Manuela Unsin (AG Jendrossek) ist dies für nPHB aus *R. eutropha* Wt und *R. eutropha* $\Delta phaZa1$ gegeben, wenn die Granula mit zwei Volumen eiskaltem 0,1mM Tris-HCl verdünnt und 20 Sekunden bei 12.000 rpm zentrifugiert werden (Kapitel 2.9). Auch hier zeigt die Abbaubarkeit durch PhaZ7, ob das PHB weiterhin amorphe Struktur aufweist. Es kommt dennoch oft zu geringen Einbußen der Hydrolyse-Aktivität. Beim Einsatz der

gleichen Wasch-Methode liegt dieser bei ähnlichen Granula-Arten aber in der gleichen Größenordnung. Zudem werden Versuchsreihen immer mit Granula einer Charge durchgeführt, so dass der interne Vergleich der Ergebnisse stets gegeben ist.

Beim Vergleich von ungewaschenen und gewaschenen PHB-Granula konnte für alle drei untersuchten *R. eutropha*-Stämme – Wt, Δ phaP1-Mutante, Δ phaZa1-Mutante – die gleiche Beobachtung gemacht werden: mit **ungewaschenen Granula** wird von 0 Minuten über die 15-Minuten-Probe bis zur 30-Minuten-Probe kontinuierlich 3HB gebildet. Anders bei Hydrolyseversuchen mit **gewaschenen Granula**: hier steigt die 3HB-Konzentration von 0 bis 15 Minuten rasch an und nimmt dann aber bis 30 Minuten nicht mehr zu. In der Summe wird hier jedoch mehr Produkt gebildet als mit ungewaschenen Granula. Als Fazit gilt: **gewaschene Granula** bilden mehr 3HB in kürzerer Zeit, **ungewaschene Granula** bilden weniger 3HB, ihre Abbauenzyme sind aber wohl länger aktiv. Daher liegt die Vermutung nahe, dass den intrazellulären Depolymerasen der Zugang zum Substrat, zum nPHB, bei gewaschenen Granula möglicherweise nicht von „Fremd“-Proteine blockiert ist. So können sie ungehindert den Abbau katalysieren, sind jedoch auch ungeschützt und denaturieren schneller. Das eigentliche Proteinnetzwerk (v.a. aus Phasin1, siehe Dennis et al. 2008) ist vermutlich bei ungewaschenen Granula eher intakt und hat wohl auch die Aufgabe, Enzyme wie die Depolymerasen zu binden und so auch zu stabilisieren (Pötter und Steinbüchel, 2005). Diese beiden Punkte, sowie möglicherweise die Blockierung durch artifiziell gebundene Proteine aus Cytoplasma oder Membran, könnten der Grund für die schwächere, aber länger andauernde Säurefreisetzung ungewaschener nPHB-Granula sein.

Welche Proteine sich unspezifisch im Laufe der Isolierung an native PHB-Granula binden, hat Manuela Unsin untersucht. Dazu wurden nach der Standardmethode nPHB aus dem *R. eutropha* Wt isoliert und anschließend mit SDS die Proteinhülle der Granula gelöst. Über ein SDS-Gel aufgetrennt, wurden mehr als zwanzig verschiedene Proteinbanden sichtbar. Die entsprechenden Proteine wurden über MALDI-MS ansequenziert und per Datenbank-Recherche ergab sich, dass es sich dabei um ein weites Spektrum von granula-eigenen Phasinen über Hitzeschock-Proteine, Transporter-Proteinen bis hin zu Proteinen der äußeren Membran handelte (Daten unveröffentlicht).

Als Produkt konnte für die Eigenhydrolyse von nPHB immer nur das 3HB-Monomer nachgewiesen werden. Dabei war es gleichgültig, ob für die Hydrolyseansätze gewaschene oder ungewaschene Granula eingesetzt wurden, ob die Messung im 10 ml-Ansatz im pH-Stat oder in 1 ml im Eppendorf-Cup stattfand und ob *R. eutropha* Wt oder eine der Mutanten untersucht wurde. Denn neben dem Wildtyp und *R. eutropha* Δ phaP zeigten auch die beiden Depolymerase-Mutanten Δ phaZa1 und Δ phaZd keine Bildung von 3HB-Oligomeren. Demnach müssen wohl in den Ansätzen immer auch Oligomer-Hydrolasen vorhanden sein, denn die beiden Depolymerasen PhaZa1 und PhaZd sind als Endo-Hydrolasen beschrieben: deren Produkte sind demnach PHB-Oligomere (Abe et al. 2005). Es ist bekannt, dass die Oligomerhydrolase PhaZb im Cytosol und auch an den Granula gebunden vorkommt und auch PhaZc zumindest in vitro teilweise an PHB nachgewiesen wurde (Kobayashi 2003 und 2005). Dennoch bleibt die Frage, ob PhaZa1 und PhaZd nicht auch als Exo-Hydrolasen fungieren können oder ob die Hydrolyse der Oligomere vielleicht chemisch oder auch über andere Enzyme (Esterasen) abläuft.

Lediglich beim Einsatz von PhaZ7 konnten in dieser Arbeit, wie schon von anderen Gruppen zuvor (Handrick et al. 2001), PHB-Oligomere als Hydrolyseprodukte nachgewiesen werden. Durch die Bromphenacylbromid-Derivatisierung (Kapitel 2.17) und die Analyse per HPLC wurde sichtbar, wie sich das Produktspektrum der PhaZ7-Hydrolyse mit der Zeit verschiebt. Abbildung 142 zeigt zunächst den Verlauf der pH-Stat-Titration mit PhaZ7 (15 ml 1mM Tris, pH 8,5, 37°C). Nach fünf Minuten Messzeit wurden zum vorgelegten Puffer zunächst 25 mg PHB (*R. eutropha* Wt) pipettiert,

nach weiteren 15 Minuten kamen 20 µl isolierte PhaZ7-Depolymerase (R. Handrick, 0,3 µg/µl) zum Ansatz. Nach einer ersten Phase mit deutlich erhöhter Säurefreisetzung sank die Rate nach 20 Minuten sichtbar ab (Phase 2). Erst die erneute Zugabe von nativen PHB-Granula nach insgesamt 65 Minuten ließ sie wieder ansteigen. Die Analyse der beiden Phasen per Derivatisierung und HPLC ergab, dass im Produktschema der ersten Phase am meisten Pentamer, gefolgt von Tetramer und Trimer entstanden ist (Abb. 143). Die Verteilung der Produkte in Phase 2 hingegen verläuft genau anders herum: Die Konzentration des Trimers lag am höchsten, gefolgt von der des Tetramers und schließlich des Pentamers. Die Kombination pH-Stat und HPLC veranschaulicht also die weitere Spaltung der PhaZ7-Produkte in einem zweiten Schritt sehr deutlich. Allerdings konnte Handrick 2001 zeigen, dass PhaZ7 vor allem das Pentamer als Produkt bildet. Seine Substrataffinität zu kürzeren Oligomeren ist hingegen sehr gering. Daher sind vermutlich PHB-Oligomerhydrolasen für den Abbau des Pentamer und Tetramer im zweiten Schritt verantwortlich, die bei der Granulaisolierung an das nPHB haften.

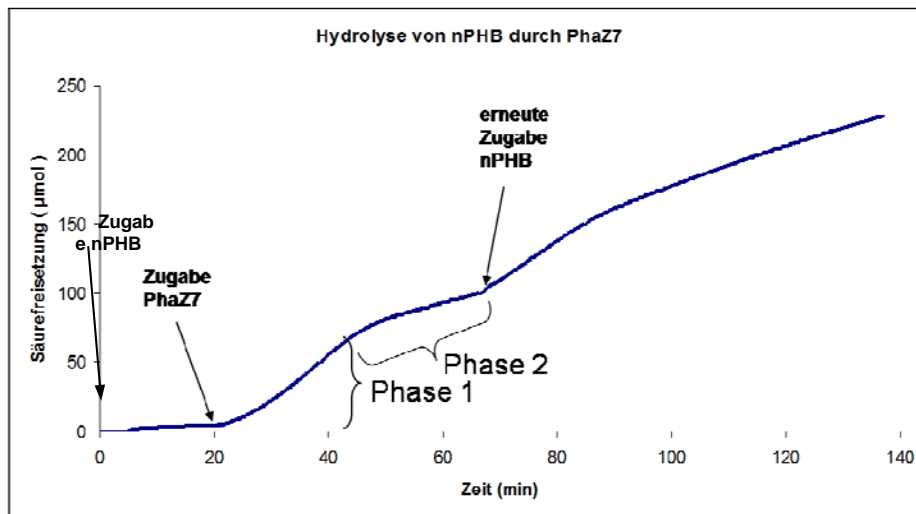


Abb. 142 pH-Stat Titration: 15 ml 1mM Tris, pH 8,5, 37°C. Nach 5 Min. Zugabe von 26 mg PHB (*R. eutropha* Wt, MM-Kultur, entspricht 2 g Glycerinsuspension). Nach weiteren 15 Min. Zugabe 20 µl PhaZ7 (0,3 µg/µl). Nach insgesamt 65 Min. Zugabe 13,5 mg PHB (*R. eutropha* Wt).

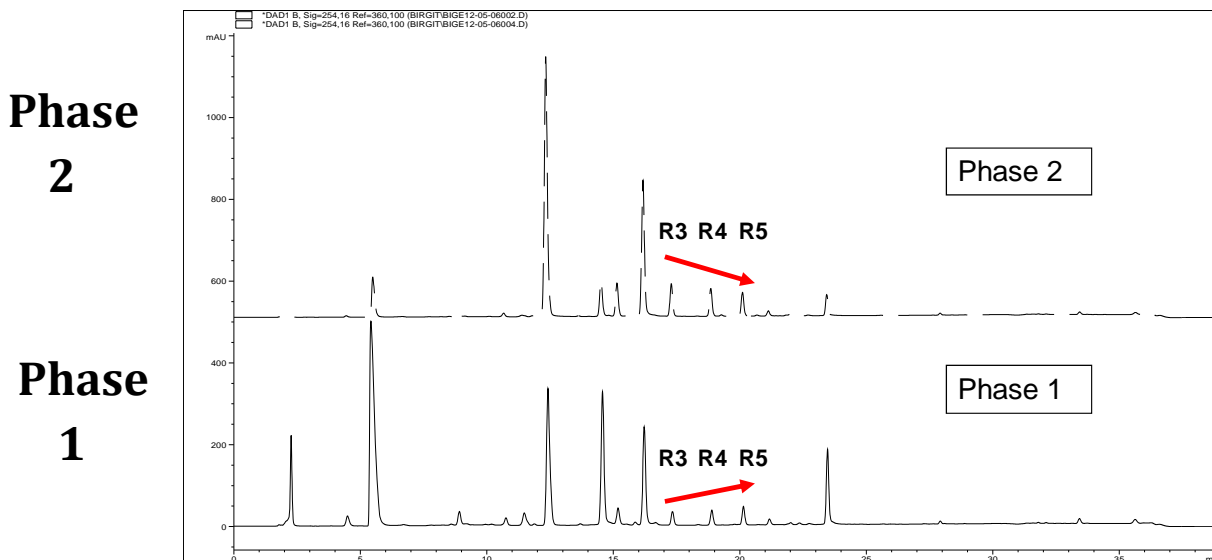


Abb. 143 HPLC-Analyse der pH-Stat-Titration nPHB (*R. eutropha* Wt) und Zugabe PhaZ7 (Abb. 142). Phase 1 = Probenahme 10 Min. nach Zugabe PhaZ7. Phase 2 = Probenahme rund 30 Min. nach Zugabe PhaZ7. HPLC-Methode „40% MetOH“. Roter Pfeil: zur Veranschaulichung der linearen Unterschiede in der Produktkonzentration von 3HB-Trimer (R3), 3HB-Tetramer (R4) und 3HB-Pentamer (R5).

4.3 Vergleich nPHB *R. eutropha* Wt und $\Delta phaZa1$

Sieben mutmaßliche intrazelluläre Depolymerasen (i-PhaZ) sind seit 2001 für *R. eutropha* beschrieben worden und zwei Oligomer-Hydrolasen (Abe et al. 2005, Saegusa et al. 2001, Kobayashi et al. 2003, Kobayashi und Saito, 2003, Kobayashi 2005, York et al. 2003, Pohlmann 2006). Eine biochemisch nachgewiesene Aktivität konnte jedoch bisher nur für die zwei intrazellulären Depolymerasen PhaZa1 (Saegusa et al. 2001) und PhaZd (Abe et al. 2005) sowie für die beiden Oligomerhydrolasen PhaZb (Kobayashi et al. 2003) und PhaZc (Kobayashi et al. 2005) gezeigt werden. Die Depolymerasefunktion der anderen Proteine wird bisher nur aufgrund von Ähnlichkeiten beim Vergleich von Genesequenzen vermutet. Das molekulare Mengenverhältnis der vier nachgewiesenen Enzyme liegt nach Abe et al. (2005) nach 48 h unter PHB-Akkumulations-Bedingungen bei: PhaZa1 / PhaZb / PhaZc / PhaZd = 7,2 / 0,4 / 20 / 1. Es wurde bestimmt nach Western Blotting durch Markierung mit Antikörpern.

Von den beiden intrazellulären Depolymerasen liegt PhaZa1 mengenmäßig klar vor PhaZd. Mit der Frage, welche Rolle das Enzym jedoch wirklich spielt, haben sich bereits einige Gruppen beschäftigt. Und auch diese Arbeit möchte dazu einen Beitrag leisten. PhaZa1 wurde erstmals von Saegusa et al. 2001 über das Screening nach PHA-Abbau-Mutanten beschrieben. Dabei wurde die chromosomale DNA von *R. eutropha* nach Fragmentierung (shotgun-Methode) in *E. coli* DH5 transformiert. 2000 Klone wurden anschließend mit aPHB als Substrat auf 3HB-Depolymerase-Aktivität untersucht. Der Rohextrakt eines Klones bildete schließlich 3HB. Die Aktivität konnte nur mit aPHB und nicht mit dPHB nachgewiesen werden. Das isolierte Enzym PhaZ1 (47,3 kDA, später PhaZa1) besitzt laut Kobayashi und Saito (2003) keine klassische Lipasebox mit Serin. Stattdessen identifizierten sie mit den Aminosäuren Cystein, Aspartat und Histidin die katalytische Triade des Proteins.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit isoliertem PhaZa1-Enzym aus einem anderen *E. coli*-Konstrukt (M. Günther 2005) gearbeitet und es wurde nPHB aus *R. eutropha* $\Delta phaZa1$ (gewaschen) als Substrat eingesetzt. Mit dieser Kombination konnte Enzymaktivität gezeigt werden (Kapitel 3.7.2). Die Aktivität war gering, aber sie hatte ihren Ursprung dafür nicht aus dem undefinierten Rohextrakt, sondern stammte von dem per His-tag isolierten Enzym. Uchino et al. (2007) wiesen die Aktivität von PhaZa1 aus dem Überstand eines entsprechend rekombinanten *E. coli*-Stammes nach. Der gleiche Stamm ohne *phaZa1* diente als Kontrolle und sein Überstand zeigte entsprechend auch keine Depolymerase-Aktivität. Dies macht deutlich, dass die *E. coli*-eigenen Enzyme (v.a. die Esterasen) nicht in der Lage sind – zumindest aPHB – zu hydrolysieren. Denn im Gegensatz zu den Versuchen dieser Arbeit testet vor allem die Gruppe von Saito die Depolymeraseaktivität grundsätzlich mit artifiziellem amorphen PHB.

Unser Ziel war es jedoch, zum einen aktives isoliertes Enzym zu erhalten und zum anderen seine Aktivität durch die Hydrolyse nativer PHB-Granula zu zeigen. Denn die Struktur von nPHB liegt näher am in vivo-Zustand des Granulumkomplexes in der Zelle. Und wenn an diesem System Aktivität nachgewiesen werden kann, so sollte sich aus diesen Erkenntnissen eher auf den in-vivo-Zustand rückschließen lassen.

Für die Diskussion der Versuche mit isoliertem PhaZa1 sei auf das entsprechende Kapitel weiter unten verwiesen. Hier liegt der Fokus zunächst auf Versuchen mit nPHB der PhaZa1-Mutante (*R. eutropha* $\Delta phaZa1$).

Als erster zeigten Saegusa et al (2001), dass $\Delta phaZa1$ -Zellen von *R. eutropha* auf Vollmedium mehr PHB enthalten als Wildtyp-Zellen. Der PHB-Gehalt wurde dazu per Gaschromatographie bestimmt.

In C-reichem Medium ohne N-Zusatz (PHB-Speicherbedingungen) war kein Unterschied erkennbar. Unabhängig davon erscheint es verwunderlich, dass Saegusa et al. die Zellen nur auf Vollmedium und auf Speichermedium beobachtet haben. Interessant wäre der PHB-Gehalt von PhaZa1-Mutante und Wildtyp auf C-Mangel-Medium, also unter PHB-Abbau-Bedingungen.

Diese Versuche finden sich – zumindest für *R. eutropha* Wt - bei Handrick et al 2000. Hier werden nPHB-Granula verglichen aus Kulturen unter Kontroll-Bedingungen (ohne Kohlenstoff und ohne NH₄Cl im Medium: daher keine Mobilisierung möglich/sinnvoll) und unter Mobilisierungs-Bedingungen (ohne Kohlenstoff, aber mit NH₄Cl: interne PHB-C-Quelle wird angezapft). Die Auswertung erfolgte durch Ausmessen der Granuladurchmesser per Elektronenmikroskop. Und während die Granula der Kontroll-Kulturen einen durchschnittlichen Durchmesser von rund 450 nm besaßen, lagen die Granula nach Mobilisierung mit rund 390 nm darunter.

Handrick et al. 2000 arbeitete mit nPHB aus **einem Organismus** (*R. eutropha* Wt), der jedoch auf **zwei Medien** (Kontrolle/Mobilisation) kultiviert wurde. In dieser Arbeit wurden die Kulturen auf **einem Medium** angezogen (MM + 2 x 2% NaGluconat: Speichermedium, 36h), aber dafür wurden **zwei Stämme** kultiviert und deren Granula isoliert: *R. eutropha* Wt und *R. eutropha* Δ PhaZa1. Im Gegensatz zu Saegusa et al. 2001 wurde diesmal - über Größenbestimmung mit PCS – beobachtet, dass die Granula der PhaZa1-Mutante mit 620 nm (+/- 10%) signifikant größer waren als die des Wildtypes (550 nm, +/- 10%). Auch unter PHB-Speicherbedingungen hat es also Einfluss, ob die Depolymerase PhaZa1 vorhanden ist oder nicht. Diese Beobachtung untermauert die Idee von Doi et al. 1990, dass in PHB-bildenden Zellen die Enzyme für PHB-Aufbau und -Abbau konstitutiv exprimiert werden und auch aktiv sind. Über den Sinn dieses vermutlichen „futile cycle“, bei dem Hydrolyseprodukte erneut durch CoA aktiviert und polymerisiert werden, ist sich die Fachwelt noch nicht einig. Diskutiert wird das Phänomen weiter unten im Abschnitt zur Thiolyse.

Noch deutlicher wurde das Fehlen von PhaZa1 beim in-vivo Vergleich von Wt- und Mutanten-Zellen unter dem Fluoreszenz- Mikroskop:

Als Medium diente den Zellen das Vollmedium Nutrient Broth (NB). Es hatte für *R. eutropha* Wt zuvor die Besonderheit gezeigt, dass die Zellen darauf innerhalb von wenigen Minuten nPHB aufbauen und die Granula innerhalb von 12h wieder vollkommen abbauen (Tab. 35). So muss man bei der Arbeit mit NB-Kulturen tatsächlich aufpassen, dass man das Maximum der PHB-Akkumulation nicht verpasst. Daher kamen Wieczorek et al. 1995 vermutlich zu dem falschen Schluss, dass *R. eutropha*-Zellen auf NB-Medium kein PHB bilden und entsprechend keine Phasin-Proteine exprimieren: sie ernteten ihre Kulturen für die PHB-Isolierung erst nach 48h.

Die parallele Kultivierung von *R. eutropha* Wt, Δ PhaZa1 (und Δ PhaP1) zeigte ganz deutlich: während die Zellen von Wildtyp und der Phasin-Mutante nach 12h kein einziges Granulum mehr enthielten, waren die Zellen der PhaZa1-Mutante noch voller nPHB. Spätestens diese Beobachtung liefert einen klaren Hinweis, dass PhaZa1 entscheidende Rolle im PHB-Abbau von *R. eutropha* spielt. Zumal zuvor die Titrationsversuchen mit isolierten Granula kaum signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und PhaZa1-Mutante geliefert hatten: Die Mutante zeigte lediglich eine geringfügig niedrigere Aktivität als der Wildtyp. Aber: dieser Unterschied konnte bei jedem einzelnen Versuch erneut beobachtet werden, was grundsätzlich die aktive Rolle von PhaZa1 bestätigt:

Beispielsweise zeigte nPHB aus MM-Kultur (ungewaschen, 100 mg PHB) im pH-Statens über 45 Minuten gemessen mit Wt-Granula eine Säurebildung von 10,1 μ mol. Für die PhaZa1-Mutante wurden 8,4 μ mol Säure gegentitriert. Das entspricht für den Wildtypen einer durchschnittliche Säurefreisetzungsrates von 2,4 nmol/min/mg. Für nPHB der PhaZa1-Mutante waren es 2 nmol/min/mg (Abb. 45). Der 3HB-DH-Test lag für die Ansätze nach 45 Minuten mit 8,3 μ mol 3HB

(Wt) bzw. 6,6 μmol 3HB (ΔphaZa1) etwas unter den Messergebnissen des pH-Statens (Tab. 22). Auf diese Abweichung wurde bereits zu Beginn der Diskussion unter Methoden eingegangen.

Genauso lag die Säurefreisetzung im pH-Staten mit Granula (ungewaschen) der PhaZa1-Mutante *R. eutropha* aus NB-Kultur (14h) erkennbar unter der mit nPHB des Wildtypen: 6,1 nmol NaOH / min x PHB im Vergleich zu 7,2 (Tab. 23).

Aber nicht nur im pH-Stat-Versuch mit verhältnismäßig viel PHB zeigte sich der Unterschied. Auch im 1ml-Hydrolyse-Ansatz mit nur 10 mg PHB bildete die PhaZa1-Mutante stets weniger 3HB. Dabei spielt es keine Rolle, ob gewaschene oder ungewaschene Granula eingesetzt wurden. (Abb. 80 ff.).

Der Methodenvergleich zeigt, dass der Einsatz des pH-Statens zur Untersuchung von *R. eutropha* Wt und *R. eutropha* ΔphaZa1 möglich ist, aber diese Form des in-vitro-Versuches wohl lange nicht so aussagekräftig ist wie die in-vivo Beobachtungen ganzer Zellen. Möglicherweise gleichen im pH-Stat-Ansatz andere Enzyme/Esterasen das Defizit der Mutante aus, die bei der Isolierung artifiziell an die Granula binden.

4.4 Vergleich nPHB *R. eutropha* Wt und $\Delta phaP1$

Schon 1968 ergaben chemische Analysen, dass nPHB-Granula zu 97,5% aus PHB, zu 2% aus Proteinen und zu 0,5% aus Lipiden bestehen (Griebel et al. 1968). Unter den Proteinen ließen sich in späteren Untersuchungen vier Typen ausmachen: die PHB-Synthase PhaC (Peoples und Sinskey 1989), die Gruppe der intrazellulären PHB-Depolymerasen PhaZa1, PhaZb, PhaZc und PhaZd (Saegusa et al. 2001, Kobayashi et al. 2003, Kobayashi et al. 2005, Abe et al. 2005), das Repressorprotein PhaR (Pötter et al. 2002) und schließlich die vier Phasin-Proteine PhaP1-PhaP4 (Wieczorek et al. 1995, Pötter et al. 2004).

Mengenmäßig dominiert ein Protein: Phasin1 (PhaP1). Laut Tian et al. 2005 sind zum Zeitpunkt der maximalen PHB-Bildung zwischen 27 und 54% der Granulaoberfläche davon bedeckt. Auch die beiden Phasine PhaP3 und PhaP4 konnten an Granula gebunden gefunden werden (Pötter et al. 2004). Ihre Konzentration ist jedoch deutlich geringer und PhaP2 konnte dort kaum nachgewiesen werden (Srinivasan et al. 2002).

Die Versuche der letzten Jahre und auch dieser Arbeit beziehen sich daher vor allem auf PhaP1. Seine Funktion wurde zuerst von Wieczorek et al. 1995 und später von Markus Pötter mit Hilfe der Mutante *R. eutropha* $\Delta phaP1$ untersucht (Pötter et al. 2002, 2004 und 2005). Dabei wurden einige Aufgaben des Proteins schnell offensichtlich: So ist PhaP1 vermutlich verantwortlich für das Verhältnis Oberfläche / Volumen und verhindert die Agglomeration der Granula. Zudem scheint es Einfluss auf den PHB-Gehalt der Zelle zu besitzen. Neuere Beobachtungen der Granulaoberfläche mit Atomic Force Microscopie (AFM) lassen vermuten, dass Phasine ein Netzwerk um die Granula bilden (Dennis et al. 2008). Auf diese Struktur wird später noch genauer eingegangen. Zu PhaP2-PhaP4 ist bisher bekannt, dass sie fehlendes PhaP1 teilweise ersetzen, seinen Ausfall jedoch nicht völlig kompensieren können. Dabei steigt vor allem der Gehalt an PhaP3 (Pötter et al. 2004). Eine mögliche direkte Interaktion zwischen Phasinen und PHA-Depolymerasen vermuten Kutcha et al. (2007). Sie stellten anhand von Rasterkraftmikroskopie fest, dass PHB in der PhaP1-Mutante von *R. eutropha* früher und schneller abgebaut wird als im Wildtyp.

4.4.1 Phasine als Schutz vor Depolymerasen?

Dass PhaP1 eine wichtige Rolle im PHB-Stoffwechsel spielt, zeigen auch die vergleichenden Versuche dieser Arbeit mit nPHB-Granula aus *R. eutropha* Wt und *R. eutropha* $\Delta phaP1$. Dabei zeigt nPHB aus *R. eutropha* $\Delta phaP1$ zum einen im pH-Statens eine deutlich höhere Säurefreisetzungsrates (auf mg bezogen, Abb. 23). Zum anderen bilden die Granula auch später im 1ml-Maßstab mehr Produkt als nPHB des Wildtypens, bestätigt durch den 3HB-DH-Test (Abb. 80, 81). Bekannt ist, dass $\Delta phaP1$ -Mutanten statt mehrerer Granula nur ein oder wenige große bilden (Wieczorek et al. 1995). Unsere PCS-Messungen bestätigen, dass die Granula der PhaP1-Mutante mit rund 1 μm fast den doppelten Durchmesser besitzen wie Granula des Wildtypens (550 nm)(Tab. 15). Die höhere PHB-Abbaurates der Phasin-Mutante erklärt das jedoch nicht. Im Gegenteil: denn die wenigen großen Granula der Phasin-Mutante besitzen pro mg PHB weniger Oberfläche als die vielen kleinen Granula der Wildtyp-Zellen: und somit potentiell weniger Platz für intrazelluläre Depolymerasen.

Interessant sind dazu die Ergebnisse von York et al. 2001, dass PhaP1-Mutanten pro ml Kultur weniger PHB besitzen als der Wildtyp und somit laut Autoren eine **niedrigere PHB-Syntheserate** aufzeigen. Die Versuche liefen über 75 Stunden unter Bedingungen zur PHB-Akkumulation: in Minimalmedium mit 1% Fructose und 0,01% Ammoniumchlorid. Dabei unterschieden sich die Zellen von *R. eutropha* Wt und *R. eutropha* $\Delta phaP1$ laut Graphik (Abb. 2 in York et al. 2001) jedoch erst nach rund 10 - 12 Stunden signifikant in der PHB Produktion (gemessen in mg PHB pro ml

Kultur). Nach insgesamt 75 Stunden lieferte der Wildtyp-Stamm schließlich doppelt so viel PHB wie die Phasin1-Mutante. Beide Stämme wurden aus der gleichen TSB-Kultur (tryptic soy broth) mit einer Anfangs-OD₆₀₀ von 1 angeimpft. Nach unseren Erfahrungen sind *R. eutropha*-Zellen in einer Vorkultur mit Komplexmedium (bei uns Nutrient Broth – NB) spätestens nach 12 Stunden wieder frei von PHB. Und nach 10-12 Stunden Hauptkultur in Mineralmedium mit 2% Na-Gluconat sind die Zellen bereits wieder voller PHB-Granula und somit am Ende der Akkumulationsphase. Der These, dass das Fehlen von PhaP1 zu einer **niedrigeren PHB-Syntheserate** führt, soll daher die Idee entgegengestellt werden, dass PhaP1 den **Abbau** des Polymers kontrolliert. Denn die in dieser Arbeit gemessene, deutlich erhöhte 3HB-Bildung der PhaP1-Mutante (Abb. 25, 26 und Abb. 76, 77) lässt vermuten, dass die Aktivität der intrazellulären Depolymerasen erhöht oder aber ihr Zugang zum Substrat erleichtert ist.

Wieczorek et al. (1995) berichten – ohne erkennbare Quelle –, dass Phasin-Mutanten von *R. eutropha* die PHB-Synthase (PhaC) mit einer geringeren spezifischen Aktivität exprimieren als der Wildtyp. Die in der vorliegenden Arbeit vertretene Theorie wird jedoch wiederum durch die Arbeit von Kuchta et al. 2007 unterstützt. Darin wird gezeigt, dass *R. eutropha* Δ phaP1-Zellen schneller PHB abbauen als der Wildtyp sowie jegliche Mutations-Kombination der vier Phasine PhaP1 – PhaP4. Gemessen wurde hier der PHB-Gehalt per Gaschromatographie während einer fast fünftägigen Kultivierung (114 h). Die Inkubation erfolgte in je 500 ml Mineralmedium in 2l-Kolben mit 1 g/l NH₄Cl und 1,5 % (w/v) NaGlukonat. Nach 64 Stunden wurde erneut 1 g/l NH₄Cl zugegeben. Um jedoch sicher zu klären, ob Phasine alleine die PHB-Bildung, den Abbau oder beides beeinflussen, wäre es sinnvoll, nicht nur – wie bei York et al. 2001 – die PHB-Menge bzw. die Konzentration der PHB-Synthase (PhaC) bei Mutante und Wildtyp zu bestimmen. Es müsste hingegen auch die Enzymaktivität von PhaC gemessen werden, wie in dieser Arbeit für die Depolymerasen geschehen.

4.4.2 *ΔphaP-nPHB länger aktiv als Wt-nPHB*

Native PHB-Granula der PhaP1-Mutante hydrolysieren nicht nur mit einer deutlich höheren Rate, der Granula-eigene in-vitro-Abbauprozess hält auch länger an. Das zeigt der Vergleich mit nPHB (ungewaschen) aus *R. eutropha* Wt und *R. eutropha* Δ phaZa1 (Abb. 80). Während mit nPHB dieser beiden Stämme laut 3HB-DH-Test die 3HB-Konzentration von der 15-Minuten-Probe bis zur 30-Minuten-Probe nicht mehr zunimmt, steigt sie mit nPHB aus *R. eutropha* Δ phaP1 zwischen 15 und 30 Minuten weiter an und zwar um den Faktor 2,3. Möglicherweise ist durch das Fehlen der PhaP1-Proteine die Oberfläche deutlich dichter mit hydrolytisch aktiven Enzymen besetzt, als dies beim Wildtyp der Fall ist. Wie bereits oben nach Tian et al. 2005 zitiert, besetzt PhaP1 beim Wildtypen vermutlich zwischen 27% und 54 % der Granulaoberfläche, auf der bei der Mutante andere Proteine mit dem PHB wechselwirken könnten.

4.4.3 *Ohne PhaP1: mehr 3HB-CoA als Acetyl-CoA*

Auffällig ist bei Granula ohne PhaP1 auch das Verhältnis der Thiolyseprodukte 3HB-CoA und Acetyl-CoA (Dieser Teilaspekt der Thiolyse wird hier vorweg besprochen, die weitere Thiolyse-Diskussion folgt weiter unten). So entsteht durch nPHB (ungewaschen) aus *R. eutropha* Δ phaP1 signifikant mehr 3HB-CoA als Acetyl-CoA (Abb. 73). Im Gegensatz dazu bildet nPHB aus den parallel kultivierten Stämmen *R. eutropha* Wt und *R. eutropha* Δ phaZa1 (alle 36h MM-Kultur + 2 x 2% NaGluconat) deutlich mehr vom Folgeprodukt Acetyl-CoA als 3HB-CoA. Für Granula ohne PhaP1 scheint der Weg von 3HB-CoA zu Acetyl-CoA daher wohl behindert oder eingeschränkt zu sein.

Zu ähnlichen Beobachtungen kamen auch Uchino et al. 2007 bei Versuchen mit nPHB-Granula aus *E. coli*-Zellen, rekombinant für die PHB-Synthesegene *phaCAB*. Nur wenn zusätzlich sowohl die Depolymerase PhaZa1 als auch das Phasinprotein PhaP1 rekombinant exprimiert wurden, bildete sich im Thiolyseansatz überhaupt 3HB-CoA. Acetyl-CoA konnte in diesem artifiziiellen System gar nicht detektiert werden, was ebenfalls darauf hinweist, dass die nötigen down-stream-Enzyme hier nicht vorhanden sind. Im natürlichen PHB-Bildner *R. eutropha* Wt hingegen konnten Uchino et al. (2007) zeigen, dass die Zugabe von NAD⁺ die Oxidation von 3HB-CoA so sehr zu fördern schien, dass nur noch das Abbauprodukt Acetyl-CoA detektiert werden konnte. Ein hohes NADH/NAD⁺-Verhältnis wiederum hemmte seine Entstehung. Diese Reaktion erinnert deutlich an die β -Oxidation der Fettsäuren, bei der während der schrittweisen Abspaltung von Acetyl-CoA ebenfalls NAD⁺ (und FAD) als Elektronenakzeptor benötigt werden.

Alle Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl PhaZa1 als auch PhaP1 für die thiolytische Spaltung von nPHB essentiell sind. Wobei die Rolle der Phasine scheinbar auch von Detergentien wie Natrium-Cholat übernommen werden konnte, wie Versuche von Uchino et al. (2007) mit entsprechend umhülltem aPHB zeigen. Auch mit diesem Substrat und dem Einsatz isolierter PhaZa1-Depolymerase konnte er im Thiolyseansatz die Bildung von 3HB-CoA detektieren. Und somit zugleich ausschließen, dass möglicherweise doch die PHB-Synthase PhaC (alleine) für die thiolytische Spaltung verantwortlich ist, wie in einer früheren Arbeit vermutet (Uchino und Saito, 2005).

Bei allen beschriebenen Versuchen stellt sich jedoch die Frage, wie gut die Bedingungen den in-vivo-Zustand widerspiegeln. Ein wichtiger Punkt sind dabei die down-stream-Enzyme, die die Oxidation von 3HB-CoA zu Acetyl-CoA katalysieren. Möglicherweise binden diese – sehr wahrscheinlich cytosolischen - Enzyme während der Granula-Isolierung an das Phasin-Netzwerk und katalysieren später im Thiolyseansatz die Schritte zum Acetyl-CoA. Die dazu nötigen CoA-abhängigen Oxidoreduktasen sollten gerade in solchen Bakterien sehr zahlreich sein, die wie *Ralstonia eutropha* auch Kohlenwasserstoffe wie Oktan und Hexan als C-Quelle nutzen können. Für die Funktion von PhaP1 als Bindeglied spricht das Modell, das Pötter und Steinbüchel 2005 aufstellten. Hintergrund war die Frage, welche Aufgaben die drei weiteren Phasin-Proteine PhaP2-PhaP4 besitzen. Der Überlegung von Pötter und Steinbüchel 2005 zufolge wäre es möglich, dass sie dafür verantwortlich sind, dass die Depolymerasen an die Granula-Oberfläche binden. Die Autoren spekulieren nicht darüber, ob auch PhaP1 diese Funktion besitzen könnte. Das würde schließlich bedeuten, dass die PhaP1-Mutante schlechter PHA abbaut, was gegen experimentelle Ergebnisse spricht. So wird im aktuellen Review der Gruppe auf dieses Modell auch nicht mehr eingegangen. Es heißt vielmehr: “they most probably serve a different still unknown function“ (Reinecke und Steinbüchel, 2009). Es bleibt daher weiter unklar, ob cytosolische Enzyme in vitro möglicherweise besser an Phasin-besetzte Granula binden als an nPHB ohne Phasin-Netzwerk.

4.4.4 *R. eutropha* Δ *phaP1*: Empfindliche Granula

Die Granula der Phasin-Mutante teilen mit Wildtyp-Granula aus NB-Kultur eine Besonderheit. Beide lassen sich nur mit speziell geschichteten Glyceringradienten und bei einer geringeren Zentrifugalkraft isolieren. Denn unter Standard-Bedingungen bilden die Granula sonst sehr leicht eine feste, klebrige Bande. Es liegt nahe, dass in beiden Fällen die Oberfläche der Granula wohl anders aufgebaut ist als bei nPHB aus *R. eutropha* Wt oder *R. eutropha* Δ *phaZa1* nach Anzucht in Mineralmedium mit Glukonat. Informationen über die Oberfläche von PHB-Granula lieferten in den letzten Jahren die Arbeit mit Phasin-Mutanten (Pötter 2004), Western Blot-Analysen (Tian et al. 2005) und mikroskopische Beobachtungen (Tian et al. 2005). Welche Lokalisation und Rolle die

vier Phasin-Proteine in *R. eutropha* besitzen, untersuchten Pötter et al. 2004. Dabei konnten sie nur für PhaP1 eine deutliche Funktion im PHB-Stoffwechsel ausmachen, dessen Fehlen zur Bildung weniger großer statt mehrerer kleiner Granula führt. PhaP3 wird in der PhaP1-Mutante verstärkt exprimiert und übernimmt zu Teilen die Funktion von PhaP1, kann das Fehlen des Proteins jedoch nicht völlig kompensieren.

Die Western-Blot-Analysen von Tian et al. ergaben für *R. eutropha*, dass die PHA-Synthase (PhaC) und die intrazelluläre Depolymerase PhaZa1 gleichzeitig in der Zelle vorkommen. Die Versuche zeigten zudem, dass die Konzentration der Phasine eng an die von PHB gekoppelt ist und dass diese Proteine und das Repressorprotein PhaR einen deutlichen Einfluss auf Anzahl und Größe der PHB-Granula besitzen. Sehr detaillierte Bilder der Granula-Oberfläche im Nanometer-Bereich ergaben schließlich die Arbeit mit dem Rasterkraftmikroskop (atomic force microscope: AFM) (Tian 2005, Kutcha et al. 2007, Dennis et al. 2008).

Den Untersuchungen von Dennis et al. 2008 zufolge liegt ganz außen auf den Granula eine Hüllschicht. Darunter folgt die sogenannte Netzwerkschicht, die man sich wie das Cytoskelett roter Blutkörperchen vorstellen könne. Sie ist den Aufnahmen zufolge rund 2-4 nm dick und besteht teilweise wohl aus Phasinen, denn auf Granula der PhaP1-Mutante konnte das Netzwerk nicht entdeckt werden. Wird jedoch die Mutation über ein Plasmid mit dem *phaP1*-Gen rekonstituiert, bildete sich auch das Netzwerk wieder aus. Weiter innen liegt schließlich eine feste kristalline, lamellare Schicht auf, die direkt das amorphe PHB umgibt, so Dennis et al (2008). Poren mit einem Durchmesser von 15 nm durchziehen die drei Schichten und ermöglichen so wohl den Durchgang von Molekülen.

Die Tatsache, dass Granula der PhaP1-Mutante rasch zusammenkleben, legt die Vermutung nahe, dass das Netzwerk die Granula in der Regel davor schützt zu denaturieren und sich aneinander zu lagern. Diese Überlegung lieferten nach lichtmikroskopischen Beobachtungen bereits Pötter et al. 2002. Ungewöhnlich bleibt jedoch, dass auch nPHB aus NB-Kultur besonders „klebrig“ sind, nPHB aus einer parallelen MM-Kultur jedoch nicht. Zum Zeitpunkt der Ernte (nach 12,5h) müssen sich die beiden Kulturen daher in unterschiedlichen Stadien befinden, auch wenn beide Kulturen noch / bereits voller PHB waren. Interessant wäre es, die Granula der NB-Kultur auf ihre Oberflächen-Proteine und speziell auf die Menge PhaP1-Protein hin zu untersuchen.

4.5 Charakterisierung – Einfluss Substanzen

4.5.1 Trypsin

Trypsin katalysiert mit Serin im aktiven Zentrum gezielt die endohydrolytische Spaltung von Proteinen an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin (nucleophiler Angriff). Die Protease spielt in der Untersuchung nativer PHB-Granula schon länger eine Rolle. Bereits 1964 behandelten Merrick und Doudoroff nPHB aus *B. megaterium* mit Trypsin (15 µg/ 5 ml Ansatz). Sie konnten damit den gleichen hydrolyse-fördernden Effekt auf die Granula simulieren, den bereits das sogenannte Aktivator-Protein aus *R. rubrum* gezeigt hatte. In beiden Fällen musste für den Abbau der *Bacillus*-Granula jedoch der Depolymerase-haltige Überstand von *R. rubrum* hinzugegeben werden. Denn für *B. megaterium* selber konnte in vitro – wie bei unseren Versuchen auch – keine nennenswerte Eigenhydrolyse gemessen werden.

Mit einer anderen Kombination von Trypsin-behandelten PHB-Granula des einen Organismus und dem zellfreiem Überstand eines anderen Organismus arbeiteten Saito et al. 1992. Sie konnten eine Depolymerase-Aktivität im Überstand von *Zoogloea ramigera* nur mit Protease-behandeltem nPHB aus *R. eutropha* nachweisen. Auch im Überstand von *R. eutropha* konnten Saito et al. drei Jahre später (1995) schließlich Hydrolyseaktivität messen: aber auch dazu mussten die nativen PHB-Granula des Organismus mit Trypsin vorinkubiert werden. Die 3HB-Bildung – gemessen per 3HB-Dehydrogenasetest – lag hier bei 2 nmol / min / mg PHB. Im Vergleich dazu konnte in der vorliegenden Arbeit für die Eigenhydrolyse nativer, unbehandelter PHB-Granula aus *R. eutropha* eine Rate von 4 nmol / min / mg PHB detektiert werden. Saito et al. (1995) erzielten jedoch mit Granula durch Eigenhydrolyse - also ebenfalls ohne Protease-Behandlung und ohne Zugabe von Überstand – sogar Werte mit rund 6 nmol / min / mg PHB (pH 8). Deutlich steigern ließ sich die 3HB-Bildung hier zudem durch 40 mM MgCl₂ auf 33 nmol / min / mg PHB.

Auch ein völlig neuer Depolymerasetyp, PhaZ aus *Bacillus thuringiensis*, hydrolysiert das PHB seines Organismus in-vitro nur nach Trypsin-Behandlung. Darunter verstehen Tseng et al. 2006 die Inkubation von 0,7 mg nPHB mit 4 µg Trypsin für zehn Minuten bei 37°C bevor anschließend das isolierte PhaZ-Enzym hinzugegeben wird.

Der Einsatz des pH-Statens ist nicht neu. Bisher war es jedoch damit nur möglich, die Hydrolyse-Aktivität isolierter Enzyme (Shirakura et al. 1983, Kobayashi et al. 2003) oder mit Rohextrakten (Merrick und Doudoroff, 1964) zu zeigen. Durch die Nutzung eines neuen, sehr sensitiven Gerätes (842 Titrando, Methrohm) konnte in dieser Arbeit die Wirkung der Protease allein auf die Eigenhydrolyse nativer PHB-Granula online verfolgt werden. Dass es sich bei der freigesetzten Säure tatsächlich um 3HB handelt, wurde durch den 3HB-DH-Test sowie per HPLC bestätigt.

Als Kontroll-Granula dienten nPHB aus rekombinanten *E. coli*-Zellen, aPHB und dPHB. Bei keiner der Granula-Arten steigerte Trypsin die ohnehin kaum bzw. nicht vorhandene Hydrolyserate. Im Ansatz mit nPHB aus *R. eutropha* Wt stieg die Rate jedoch bei uns mit rund 70% deutlich an. Überraschend war dabei, dass die Reaktion auf Trypsin mit nPHB der PhaP1-Mutante deutlich stärker verlief als beim Wildtyp: Die Mutante bildete rund dreimal mehr Säure. Um genau diesen Faktor 3 überragten die Granula der PhaP1-Mutante allerdings bereits ohne Trypsin die Wildtyp-Granula in der Säurebildung. Diese Ergebnisse lassen daher vermuten, dass der Einfluss von Trypsin von der bereits bestehenden Eigenhydrolyse-Aktivität des nativen PHB abhängt.

Um den Wirkmechanismus der Protease zu entschlüsseln, sollte eine Versuchsreihe weitere Daten liefern. Dazu wurden Trypsin und Trypsin-Inhibitor in verschiedenen Kombinationen zum Hydrolyseansatz pipettiert (Abb. 27): nur Trypsin, Trypsin und Inhibitor zusammen nach gemeinsamer Vorinkubation und schließlich erst Trypsin und nur 20 Sekunden später der

Inhibitor. In dieser Zeitspanne war die Säurefreisetzung jedoch bereits signifikant angestiegen und der Inhibitor zeigte keinerlei Effekt mehr. Im Gegensatz dazu änderte die Zugabe der vorinkubierten Mischung Trypsin-Inhibitor nichts an der ursprünglichen Eigenhydrolyse der Granula.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Protease grundlegende Strukturen verändert und nicht die Depolymerasen kontinuierlich beeinflusst. In solch einem Fall hätte die Zugabe des Inhibitors nach 20 Sekunden den Effekt weitgehend rückgängig machen müssen. Eine naheliegende Vermutung wäre, dass Trypsin die Oberflächenproteine ablöst und intrazellulären Depolymerasen den Angriff erleichtert. Dagegen sprechen zunächst die Versuche mit nPHB aus *R. eutropha ΔphaP1*, deren Säurefreisetzung durch Trypsin stark erhöht wird, obwohl gar kein PhaP1 vorhanden ist. Andererseits ist gut möglich, dass die Oberfläche dieser Granula in vivo, bestimmt aber in-vitro nach der Isolierung, von unspezifisch gebundenen Proteinen besetzt ist.

Die Wirkung von Trypsin ist zudem auch vom „Alter“ der Granula, das heißt von der Dauer der Zellkultur, abhängig. Während die Zugabe der Protease auf nPHB einer 36h-MM-Kultur sichtbar fördernden Effekt zeigt (Abb. 25), reagieren Granula aus 17h-MM oder NB-Kultur darauf gar nicht (Abb. 29, 30). Wiederum liegt die Vermutung nahe, dass Trypsin unspezifisch gebundene Proteine von der Oberfläche entfernt. In diesem Zusammenhang wären Versuche interessant, in denen trypsin-behandelte nPHB-Granula statt zu einem Hydrolyse- auch einmal zu einem Thiolyseansatz gegeben werden. Würde dadurch bei nPHB des Wildtypen oder der *ΔphaZa1*-Mutante das Produktverhältnis von Acetyl-CoA zu 3HB-CoA verschoben, wäre dies ein starker Hinweis, dass auch hier „fremde“ Proteine abgelöst worden wären: vermutlich Oxidoreduktasen, die den Weg von 3HB-CoA zu Acetyl-CoA katalysieren (siehe auch Diskussion weiter oben).

4.5.2 ProteinaseK

Um den Effekt von Trypsin besser einordnen zu können, wurde die Wirkung eines weiteren Protein-spaltenden Enzyms untersucht: ProteinaseK. Beide Enzyme gehören zu den Serin-Proteasen, bei denen Serin im aktiven Zentrum vorhanden ist. Das pH-Optimum liegt für beide Proteine zwischen 7,5 und 8,5. ProteinaseK wurde 1970 von einer Arbeitsgruppe der Firma Merck aus dem Pilz *Tritirachium album* isoliert, der auf Keratin wachsen kann, was dem Enzym seinen Namenszusatz gab. ProteinaseK hydrolysiert nach Angaben des Herstellers Merck Peptidbindungen vor allem nach den Carboxygruppen hydrophober aliphatischer und aromatischer Aminosäuren. Das Enzym ist sehr aktiv und katalysiert die Spaltung von Hämoglobin laut Merck dreimal schneller als Trypsin (aus Rind) (www.merckbiosciences.co.uk/html/emd/cs_proteinase_k.htm).

Abbildung 33 zeigt parallel für je rund 100 mg nPHB aus *R. eutropha* Wt und *ΔphaP1* im pH-Stat den Einfluss von 1 mg ProteinaseK. Das Ergebnis der Titration zeigte zunächst nach Zugabe von ProteinaseK bei beiden Ansätzen (Wt und *ΔphaP1*) einen klaren Abfall des pH-Wertes. Sobald sich der Soll-pH jedoch wieder eingestellt hatte, verlief die Säurefreisetzung erkennbar schwächer als zuvor. Sowohl die Kontrollreaktion in reinem Puffer als auch die Auswertung mit Hilfe des 3HB-DH-Testes bestätigten, dass der Anstieg lediglich die Ansäuerung durch die Zugabe der Protease kompensiert. Die Hydrolyse wird indes um rund 30% (Wt) bzw. fast 50% (nPHB *R. eutropha ΔphaP1*) gehemmt. Allerdings wurde für diesen pH-Stat-Ansatz mit 10 µg Proteinase K / mg PHB die 16fach Menge Protease eingesetzt wie für Trypsin mit 0,63 µg / mg PHB.

Ein weiterer Versuch folgte mit weniger Enzym (Abb. 34): 0,9 µg ProteinaseK /mg PHB (*R. eutropha ΔphaP1*) bzw. 1,9 µg Proteinase K /mg PHB (*R. eutropha* Wt). Dabei wurde die Hydrolysereaktion mit Granula der Phasin-Mutante (*R. eutropha ΔphaP1*) innerhalb von wenigen Minuten durch Proteinase K sichtbar gehemmt. Bei Granula des Wildtypen bewirkt das Enzym stattdessen

zunächst einen geringen Anstieg der Säurefreisetzung, um nach rund 15 Minuten aber zur ursprünglichen Rate zurückzukehren (siehe Parallelogramm in Abb. 34). Wie schon weiter oben diskutiert, reagieren auch hier die Granula der Phasin-Mutante sensibler auf äußere Einflüsse. Für Wt-Granula ist mit rund 2 µg ProteinaseK/mg PHB jedoch die Hemmschwelle noch nicht erreicht. Es ist zu vermuten, dass eine noch etwas niedrigere Proteinase-Konzentration hier möglicherweise genauso selektiv auf die Phasin-Schicht wirkt wie Trypsin. Dadurch wäre endgültig zu klären, ob das Enzym je nach Konzentration grundsätzlich ebenfalls eine hydrolyse-fördernde Wirkung besitzt.

4.5.3 SDS

Mehrfach wurde bei Versuchen mit Puffer und nPHB im pH-Staten beobachtet, dass die Zugabe von rund 0,1% SDS, einem anionischen Detergenz (Abb. 144), einen kontinuierlichen pH-Abfall und somit eine deutliche Zugabe an NaOH-Lösung bewirkt.

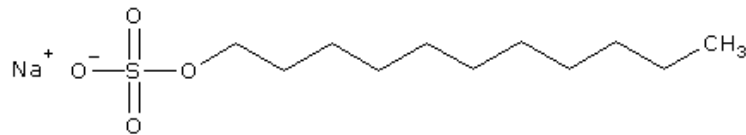


Abb. 144 *Sodium-Dodecyl-Sulfate (SDS)*

Irritierend war jedoch, dass die anschließende Analyse der Proben per 3HB-DH-Test keine Spur von zusätzlich gebildetem 3HB aufwies. Ein Test stellte sicher, dass die entsprechenden Mengen SDS keinen Einfluss auf den 3HB-DH-Test haben. Und auch die Zugabe von SDS alleine in Puffer bewirkte keinerlei pH-Änderung (Abb. 36).

Besonders auffällig war: die Zunahme der Säurebildung galt für nPHB aus *R. eutropha* Wt (36h MM-Kultur), SDS hatte hingegen keinerlei Einfluss auf nPHB der Phasin-Mutante *R. eutropha* Δ phaP1 (36h MM-Kultur) (Abb. 35). Genauso wenig veränderte das Detergenz den pH-Verlauf für Granula, rekombinant aus *E. coli* (*phaCAB*). Für diesen Unterschied spielt vermutlich wiederum die Oberflächenstruktur eine Rolle: pH-Abfall bei intaktem Granulum, aber keine Reaktion, sobald PhaP1 bzw. jegliche Oberflächenproteine fehlen (*E. coli phaCAB*).

Ebenfalls Studien mit SDS und nPHB-Granula (*R. eutropha* Wt) haben Dennis et al. 2003 durchgeführt. Dabei beobachteten sie den Effekt auf die Oberfläche mit Hilfe des Rasterkraftmikroskopes (atomic force microscope, AFM). Durch Zugabe von 0,5% SDS zu PHB-Granula bildeten sich rund um die globalen Strukturen (Poren) der Oberfläche Löcher im 4 nm-Netzwerk. Fazit: SDS löst die phasinhaltige Netzwerkschicht ab, verhindert aber gleichzeitig die Arbeit der Depolymerasen. Hier liegt ein Unterschied zur hydrolyse-fördernden Wirkung von Trypsin (siehe oben). Vermutlich denaturiert die Endkonzentration von 0,09 % SDS die Abbauenzyme. So beschreiben Handrick et al. 2000 beispielsweise, dass die aus *R. eutropha* isolierte Depolymerase PhaZ1 (=PhaZa1) durch 0,2 % SDS komplett gehemmt wird. Es bleibt die Frage, wieso es mit Wt-Granula zum kontinuierlichen Sinken des pH-Wertes kommt, ohne dass 3HB nachgewiesen wird (Abb. 36). Möglicherweise bildet SDS mit den Phasinen einen Komplex, bei dem die sauren Aminosäuren der Proteine nach außen zeigen. Weiterhin unverständlich bleibt jedoch, wie diese oder eine andere Reaktion über mehr als 30 Minuten kontinuierlich den pH-Wert senkt.

Eine weitere Überlegung wäre, dass durch die Bildung von Löchern im Netzwerk im Polymer eingebundene 3HB-Monomere oder – Oligomere freigesetzt werden und den pH-Wert senken. Neue Ansätze zu dieser Frage erhoffte man sich durch den Einsatz von Natrium-Cholat (Abb. 145), einem ebenfalls anionischen Detergenz.

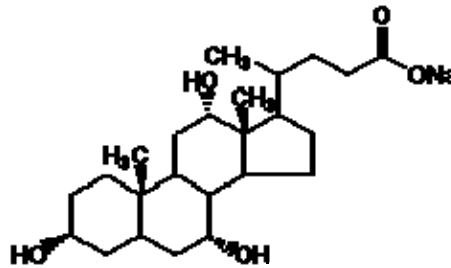


Abb. 145 Natrium-Cholat

In der gleichen Konzentration wie sonst SDS (0,09 % SDS = 0,35 mM = 100 μ l 35 mM) zu nPHB aus *R. eutropha* in den pH-Stat-Versuch gegeben, zeigte Natrium-Cholat jedoch keinerlei Auswirkungen auf den pH-Verlauf (Abb. 146). Auch die Zugabe der vierfachen Menge änderte daran nichts. Womöglich kann sich SDS aufgrund seiner linearen Struktur besser an und in die Proteine lagern und sie leichter denaturieren. Die komplette Aufklärung dieses Phänomens steht aber weiterhin aus.

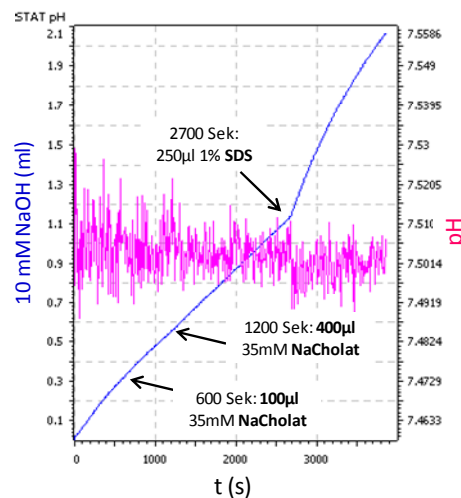


Abb. 146 Test im pH-Stat: Einfluss Natrium-Cholat und SDS auf Säurefreisetzung von nPHB aus *R. eutropha* Wt. 10 ml 0,1mM Tris-HCl, pH 7,5, 37°C, 30 mg PHB. Titration mit 10mM NaOH. Nach 2000 Sek. Zugabe 100 μ l 35 mM NaCholat (0,35 mM). Nach 1200 Sek. 400 μ l 35mM NaCholat. Nach 2700 Sek. 250 μ l 1% SDS.

4.5.4 Weitere Substanzen

Ergänzend zu den beiden anionischen Verbindungen wurden das kationische Detergenz CTAB und das nicht-ionische Triton-X-100 eingesetzt. Beide Substanzen hemmen mit einer Endkonzentration von 0,09 % die Säurefreisetzung nativer PHB-Granula im pH-Staten deutlich. Vermutlich verhindert das Detergenz die Bindung der Depolymerasen an das Substrat. Und wiederum geht die Hydrolyse von nativen Granula der Phasin-Mutante signifikant stärker zurück, was den Schutzmechanismus des Phasin-Netzwerkes deutlich macht. Einen ähnlich stark hemmenden Effekt mit 0,05% Triton-X-100 beobachtete Daniel Pfeiffer (2009) im pH-Staten für nPHB aus *A. latus*. Mit dem Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) sowie dem Oxidationsmittel 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) sollte schließlich der bevorzugte Oxidationszustand des Granulumkomplexes herausgefunden werden. Für ein „Organell“ (Jendrossek 2009), das in vivo innerhalb der Zelle liegt, wäre zu vermuten, dass die Hydrolyseaktivität des Granulumkomplexes unter reduzierten Bedingungen höher ist als nach Einsatz von DTNB. Erstaunlicherweise zeigten die Ergebnisse nach Zugabe von 1 mM DTNB bzw. 2 mM DTT genau das Gegenteil. Sowohl im pH-Staten (Abb. 43) als auch in der HPLC-Analyse (Abb. 44) wurde für die Ansätze mit dem Oxidationsmittel mehr Säure / 3HB identifiziert als ohne. Genauso sank durch das Reduktionsmittel DTT die Produktbildung unter die Kontrollwerte. Zu den gleichen Ergebnissen kamen jedoch auch Foster et al. 1996 mit nativen PHO-Granula aus *Pseudomonas oleovorans*, ohne eine Erklärung mitzuliefern. Und Abe et al. zeigten 2005, dass 1 mM DTT die Aktivität der isolierten Depolymerase PhaZd aus *R. eutropha* - mit aPHB als Substrat - komplett hemmt. Die verbreitete Wirkung des Reduktionsmittels weist darauf hin, dass die getesteten Enzyme Disulfidbrücken besitzen, die das DTT reduziert und löst, wodurch die Enzyme gehemmt werden. Keine Disulfidbrücken sollte jedoch die Aminosäure Cys 183 ausbilden, denn sie wurde von Kobayashi und Saito (2003) als Teil einer katalytischen Triade identifiziert. Ansonsten besitzt das PhaZa1-Protein nur vier Cysteine auf 419 Aminosäuren (=0,95 %), weniger als die Hälfte eines durchschnittlichen Proteins mit 2,8 % (Klapper 1977).

4.6 Thiolyse

4.6.1 „Futile Cycle“ und die Idee der Thiolyse

Doi et al. zeigten bereits 1990, dass Auf- und Abbau von PHA in *R. eutropha* gleichzeitig stattfindet. Dazu überführten sie PHB-haltige Zellen in N₂-freies Medium mit Pentansäure als einziger C-Quelle. Und parallel zum Abbau von PHB konnte die Bildung des Co-Polymers P(HB-co-HV) nachgewiesen werden. Mit einer Transkriptionsanalyse ergänzten Lawrence et al. 2005 die Ergebnisse von Doi und belegten molekularbiologisch, dass **PhaC und PhaZ gleichzeitig** und konstitutiv exprimiert werden. Zum einen entsteht also das Polymer aus der Kondensation von 3HB-CoA-Bausteinen. Zum anderen hydrolysieren die Depolymerasen die Verbindung zu 3HB (Abb. 2). Für diesen nachgewiesenen **zyklischen Auf- und Abbau** konnte bisher keine plausible Erklärung gefunden werden - zumal sogar Energie verloren geht in Form der gespaltenen CoA-Bindung. Das Phänomen dieses „futile cycle“ haben vor kurzem auch Ren et al. (2009) für den PHA_{MCL}-Bildner *Pseudomonas putida* GPo1 untersucht. Sie beobachteten, dass auch hier PhaC und PhaZ in der PHA-Akkumulationsphase aktiv sind. Entsprechend der β -Oxidation der Fettsäuren scheint der Auf- und Abbau über das Konzentrationsverhältnis von Acetyl-CoA zu CoA bzw. NADH zu NAD reguliert zu werden. Die Aktivierung der Hydroxyalkyl-Verbindungen (3HO, 3HHx) für die Polymerisation erfolgt laut Ren et al. mit Hilfe der Acyl-CoA-Synthetase (ACS1). Das Enzym wurde in-vivo nach Fusion am Fluoreszenz-Mikroskopie auf den PHA-Granula lokalisiert (Ruth et al. 2008).

Einen ganz **neuen Ansatz für Auf- und vor allem Abbau von PHA verfolgten Uchino et al. 2006**. Demnach spaltet nicht alleine Hydrolyse sondern auch Thiolyse die Esterbindungen von PHA. Prinzipiell ist die Aktivierung und Spaltung von Verbindungen durch CoA-SH in jeder Zelle etabliert, vor allem für die β -Oxidation von Fettsäuren (Abb. 2). Dieser Schritt verbraucht jedoch in der Regel direkt (Synthetasen) oder indirekt (CoA-Transferasen) Energie in Form von ATP. Durch die Spaltung der energiereichen Esterbindung wäre dies bei der thiolytischen Spaltung von PHB nicht nötig. Die Autoren zeigten, dass die PHB-Synthase (PhaC) aus *R. eutropha* über ihre Umkehrfunktion mit Hilfe von CoA die Bildung von 3HB-CoA katalysieren kann (Abb. 2). Mit aPHB als Substrat entstanden nach 10 Minuten Inkubation rund 10 μ M 3HB-CoA. Beim Einsatz einer ähnlichen Menge nPHB (aus *R. eutropha*) bildeten sich sogar 200 μ M 3HB-CoA. Dieser deutliche Unterschied wies darauf hin, dass vermutlich noch andere Granula-gebundene Enzyme an der Reaktion beteiligt sind. In der Folge-Veröffentlichung (Uchino et al. 2007) wird daher auch die intrazelluläre Depolymerase PhaZa1 (*R. eutropha*) auf ihre Fähigkeit untersucht, die thiolytische Spaltung zu katalysieren. Und auch die vorliegende Arbeit widmet dem Enzym ein ausführliches Kapitel (3.7 bzw. 4.6.4).

Im Folgenden werden zunächst die Charakteristika der Eigen-Thiolyse nativer PHB-Granula (*R. eutropha*) sowie durch isoliertes PhaZa1 diskutiert. Anschließend werden die Ergebnisse dieses Modellorganismus in Bezug auf Hydrolyse und Thiolyse mit Granula sechs weiterer Organismen verglichen, was schließlich in den letzten Diskussionspunkt „Thiolyse in vivo – ja oder nein?“ überleitet.

Uchino et al. untersuchten die Thiolyse mit nPHB aus *R. eutropha* Wt, *R. eutropha* Δ phaP, *R. eutropha* Δ phaZa1 sowie mit Granula aus rekombinanten *E. coli* mit dem PHB-Syntheseoperon *phaCAB* sowie *phaZa1* und *phaP1*. Es stellte sich heraus, dass nur Granula aus *E. coli*-Zellen mit PhaZa1 **und** PhaP1 zur 3HB-CoA-Bildung fähig sind. Im Rahmen der Mitarbeit an der Veröffentlichung von Uchino und für die vorliegende Arbeit wurden ebenfalls diese drei *Ralstonia*-Stämme auf Thiolysefähigkeit untersucht. In der Regel wurden Hydrolyse- und Thiolyseansätze parallel inkubiert. Anschließend wurden die Proben der Hydrolyseversuche per 3HB-DH-Test und HPLC auf 3HB (und -Oligomere) und Acetat untersucht, die Thiolyseversuche per HPLC auf CoA-Ester sowie ebenfalls auf 3HB und Acetat. Denn auch mit CoA im Ansatz werden nicht nur CoA-Ester (3HB-CoA, Acetyl-CoA) gebildet, sondern es findet auch Hydrolyse statt.

Die Thiolysereaktion wurde im Rahmen der Versuche mit isoliertem PhaZa1 charakterisiert (Kapitel 3.7). Dazu wurde nPHB aus *R. eutropha* Δ phaZa1 eingesetzt und es wurden stets Versuche mit und ohne Zusatz des Enzyms durchgeführt. Daraus ergeben sich gleich zwei Charakterisierungen: für Granula komplett ohne PhaZa1 sowie für das isolierte Enzym. Hier werden zunächst die Eigenschaften der Granula alleine diskutiert und in Kapitel 4.6.4 der Einfluss von isoliertem PhaZa1.

4.6.2 Eigenthiolyse native PHB-Granula

4.6.2.1 Temperatur-Optimum

Die 3HB-CoA-Bildung nativer PHB-Granula (*R. eutropha* Δ phaZa1) war bei 34°C am höchsten. Im Vergleich dazu zeigte die Hydrolyse (nPHB *R. eutropha* Wt) zwischen 20 und 30°C die höchste Aktivität (o. Abb.). 1995 bestimmten Saito et al. zwar das pH-Optimum nativer PHB-Granula. Der optimale Temperaturbereich eines ganzen Granulumkomplexes wurde jedoch zuvor noch nicht bestimmt, weder für Hydrolyse noch Thiolysebedingungen. Verglichen mit dem Optimum einzelner Depolymerasen, liegt die beste Thiolyse- und Hydrolyse-Temperatur der PHB-Granula eher im unteren Bereich. So arbeitet beispielsweise PhaZ aus *P. putida* KT2442 bei 43°C am schnellsten, allerdings ist das Enzym bereits bei 37°C nach 30 Minuten inaktiv (de Eugenio et al. 2007). Auch sehr instabil aber effektiv katalysiert die Depolymerase PhaZ1 aus *Rhodospirillum rubrum* die Hydrolyse von nPHB bei 50°C (Handrick et al. 2004b).

4.6.2.2 pH-Optimum

Das pH-Optimum der Thiolysereaktion liegt zwischen pH 6,5 und pH 7. Für die Hydrolyse nativer PHB-Granula (*R. eutropha* Wt) wurden bei Versuchen im pH-Staten zwischen pH 6 und pH 9 keine signifikanten Unterschiede festgestellt (o. Abb.). Erst mit pH 10 stieg die Rate stark an, was sich vermutlich auf chemische Hydrolyse zurückführen lässt. Auch beim pH-Optimum können mangels Literatur statt Thiolyse- nur Hydrolysereaktionen zum Vergleich herangeführt werden. So untersuchten Foster et al. 1996 ebenfalls einen ganzen Granulumkomplex und fanden für nPHO aus *Pseudomonas oleovorans* pH 9 (und 30°C) als Optimum. Daniel Pfeiffer (2009) fand für nPHB aus *A. latus* gleich zwei pH-Optima: zum einen bei pH 5, zum anderen im Bereich pH 8-10. Daraus schloss er auf das Vorhandensein von zwei Depolymerasen. Für die Depolymerase PhaZa1 aus *R. eutropha* (rekomb. aus *E. coli* isoliert) bestimmten Saegusa et al. 2001 das pH-Optimum zwischen pH 8,5 und pH 10. Auch für PhaZ1 aus *R. rubrum* lag es mit pH 9 in diesem Bereich (Handrick et al. 2004b). Es fällt auf, dass der Granulumkomplex aus *R. eutropha* wie beim Temperaturoptimum eher im unteren Bereich liegt. Anders als bei isolierten Enzymen ist es hier jedoch gut möglich, dass die restlichen Proteine der Oberfläche anders – empfindlicher – auf die Außenfaktoren reagieren und

so die Aktivität der Depolymerasen ab einer bestimmten Temperatur oder pH einschränken. Insgesamt spiegelt dieses System die in-vivo-Zustände jedoch besser wider, so dass die erhaltenen Optima-Werte für weitere Überlegungen zur Rolle von Thiolyse und Hydrolyse sicher geeigneter sind als Tests mit isoliertem Enzym.

4.6.2.3 Substratsättigung (CoA)

In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage, in welcher Größenordnung sich die wirkliche intrazelluläre CoA-Konzentration befindet. Laut den Arbeiten von Boynton et al (1994) liegt der physiologischen Bereich in Zellen von *Clostridium acetobutylicum* bei rund 0,1 – 0,2 mM. Somit scheint die für die Thiolyse eingesetzte Standard-Menge von 1 mM zunächst sinnvoll gewählt (Uchino et al. 2006).

In Thiolyseversuchen mit Einsatz von 0,25 bis 2 mM CoA stieg die 3HB-CoA-Konzentration mit der Menge an CoA auch sichtbar an. Die Zunahme an Produkt steht jedoch in keinem Verhältnis zur Verdopplung der CoA-Konzentration: unverbrauchtes CoA liegt weiterhin deutlich im Überschuss vor, so dass vermutlich doch das Enzym den limitierenden Faktor darstellt. Ungewöhnlich war die Beobachtung, dass vor allem mit 0,5 mM CoA und auch mit 1 mM CoA im Ansatz mehr 3HB gebildet wurde als unter Hydrolysebedingungen. Waren es jedoch 2 mM CoA, entstand maximal soviel 3HB wie parallel in der Hydrolyse. Scheinbar muss die Konzentration des Coenzym erst eine kritische Grenze überschreiben, um den Hydrolyseweg abzuschalten. Um dies näher zu untersuchen, führte Manuela Unsin (AG Jendrossek) Versuche mit bis zu 10 mM CoA durch (Abb. 67, 68). Dabei zeigte sich zum einen, dass 5 mM und 10 mM die Bildung von 3HB-CoA hemmen und deutlich unter die Rate mit 2 mM CoA fallen lassen. Noch stärker beeinflussen die höheren CoA-Konzentrationen die oben erwähnte 3HB-Bildung. Liegt sie bei 5 mM oder 10 mM entstehen nur noch rund 40 % bzw. 10 % 3HB verglichen mit dem Hydrolyseansatz ganz ohne CoA. Konzentrationen oberhalb von 2 mM CoA schaden demnach sowohl der Thiolyse- als auch der Hydrolyse-Produktbildung.

4.6.2.4 Produkte der Eigenthioolyse

Durch den Zellaufschluss und die Dichtegradienten-Zentrifugation handelt es sich bei den isolierten Granula nicht mehr um das eigentliche in-vivo System. Dennoch können deutliche Unterschiede im Abbauverhalten der Granula Hinweise auf die Struktur der Oberfläche und das Vorhandensein weiterer Proteine geben. Tabelle 36 zeigt, für wen welche Produkte detektiert wurden. Dabei ist das Verhältnis 3HB-CoA zu Acetyl-CoA bzw. 3HB zu Acetat nur schematisch dargestellt. Auch die Summe der Produkte kann nicht quantitativ verglichen werden. So bildet zum Beispiel *R. eutropha* Δ *phaP1* fast immer mehr Produkte als der Wildtyp oder *R. eutropha* Δ *phaZa1*. Und *A. latus* liegt bei der 3HB-Bildung nochmal um den Faktor 50-100 höher. Gezeigt ist hier die Produktverteilung nach 30 Minuten (nPHB aus *R. eutropha*) bzw. 40 Minuten Inkubation (nPHB anderer Organismen) im Thiolyse- bzw. Hydrolyseansatz.

Tab. 36 Übersicht Produktbildung nPHB verschiedener Organismen unter Thiolyse- und Hydrolysebedingungen. Auswertung von Proben nach 30 min (*R. eutropha*) / 40 min (restl. Stämme) Inkubation im Standardansatz (2.16.1). *nur Spuren (*P. lemoignei*) bzw. sehr geringe Konz. : nicht nachweisbar

Organismus	Medium	Kultivierungsdauer, gew/ungew	3HB-CoA Acetyl-CoA (Thiolyse)	3HB Acetat (Hydrolyse)
<i>Ralstonia eutropha</i>				
<i>R. eutropha</i> Wt	MM + Gluconat	36 h, ungew.		
<i>R. eutropha</i> Δ phaZa1	MM + Gluconat	36 h, ungew.		
<i>R. eutropha</i> Δ phaP1	MM + Gluconat	36 h, ungew.		
<i>R. eutropha</i> Wt	MM + Gluconat	36 h, gewasch.		
<i>R. eutropha</i> Δ phaZa1	MM + Gluconat	36 h, gewasch.		
<i>R. eutropha</i> Δ phaP1	MM + Gluconat	36 h, gewasch.		
<i>R. eutropha</i> Wt	NB	12,5 h, ungew.		
<i>R. eutropha</i> Wt	MM + Gluconat	12,5 h, ungew.		
<i>R. eutropha</i> Wt	NB	12,5 h, gewasch.		
<i>R. eutropha</i> Wt	MM + Gluconat	12,5 h, gewasch.		
Andere PHB-Bildner				
<i>A. latus</i>	MM + Saccharose	Gew./Ungew.	—	
<i>B. megaterium</i>	MM + Glucose	Gew.	—	*
<i>Comamonas</i> sp.	MM+ Gluconat	Gew.		*
<i>P. lemoignei</i>	Stinson&Merrick + 3HB	Gew./Ungew.	*	—
PHV- und PHO-Bildner				
			CoA-Ester	3HV / 3HO / 3Hx
<i>P. denitrificans</i>	s. 2.3.1 (+ Pentanol)	Gewasch.	Trotz PHV: Spuren von Acetyl-Coa und 3HB-CoA!	
<i>P. putida</i> 195	MM + Oktanoat	Ungew.	—	

Thiolyse-Produkte

Die Tabelle macht deutlich, in welchen Fällen der PHA-Stoffwechsel in-vitro bei 3HB-CoA / 3HB stehengeblieben oder aber bis zu Acetyl-CoA / Acetat weitergelaufen ist. In den meisten Versuchsansätzen bleibt es bei 3HB-CoA bzw. 3HB. Für *R. eutropha* zum Beispiel bilden im Thiolyseansatz nur ungewaschene nPHB-Granula Acetyl-CoA.

Für den hydrolytischen Abbau liegen zwischen 3HB und Acetat drei Abbauschritte und entsprechend drei Enzyme (siehe Abb. 2). Das bereits durch CoA aktivierte Thiolyseprodukt 3HB-CoA wird vermutlich über nur zwei Schritte und die Umkehrreaktionen der Polymerisation bis zum nachgewiesenen Acetyl-CoA abgebaut: mit Hilfe der Rückreaktion der Acetoacetyl-CoA-Reduktase und der β -Ketothiolase. Für beide Enzyme konnte die Reaktion in Gegenrichtung in anderen Organismen nachgewiesen werden. So zum Beispiel für die Acetoacetyl-CoA-Reduktase (Saito et al. 1977) und für die β -Ketothiolase (Nishimura et al. 1978) aus *Zoogloea ramigera*.

Uchino et al. (2007) vermuteten zudem, dass für die komplette Umwandlung von 3HB-CoA zu Acetyl-CoA ein Cofaktor notwendig ist. 1 mM NADP⁺ zeigte mit nPHB aus *R. eutropha* Wt keinen Einfluss. Aber nach Zugabe von 1 mM NAD⁺ befand sich nach 30 Minuten nur noch Acetyl-CoA und kein 3HB-CoA mehr im Thiolyseansatz. Im Gegenzug konnte mit den reduzierten Formen NADH oder NADPH (je 1 mM) das weitere Abbauprodukt Acetyl-CoA nicht detektiert werden. Vermutlich haften mögliche Cofaktoren und die in-vivo löslichen 3HB-CoA-Abbauproteine während der Isolierung an den Granula und werden beim Waschen entfernt.

Eine Sonderrolle besitzt jedoch wieder einmal die Phasin1-Mutante. Trotz Kultivierung und Granulaisolierung parallel zum Wildtyp und zur PhaZa1-Mutante bilden ihre ungewaschenen Granula kaum Acetyl-CoA – die Granula der anderen beiden Stämme jedoch fast ausschließlich. Auf die Funktion der Phasinproteine als mögliche Bindeglieder für andere Proteine an den Granulumkomplex wurde bereits weiter oben eingegangen: ohne Phasine können die 3HB-CoA-Abbauproteine möglicherweise nicht binden.

Interessant ist auch die Beobachtung, dass nPHB (ungewaschen, Wt, MM-Kultur) aus einer 12,5 h Kultur wesentlich weniger Acetyl-CoA bilden als aus einer 36 h Kultur. Eventuell beeinflusst das Kultivierungsstadium die Oberfläche der Granula so, dass beim Zellaufschluss und der Isolierung Abbauproteine unterschiedlich gut daran binden können. „Junge“ Granula sind möglicherweise so dicht mit Phasinen und den anderen Granulaproteinen besetzt, dass sie nPHB-fremden Proteinen keinen Platz bieten. Auf Granula einer älteren Kultur könnten sie sich jedoch als Artefakte leichter festsetzen. Denn durch die unnatürlichen Bedingungen wie das Überangebot an Kohlenstoff (Mineralmedium + 2 x 2 % NaGluconat) sind nach 36 h so viele Granula in den *R. eutropha*-Zellen, dass sie teilweise fusionieren oder auch lysierte Zellen beobachtet werden konnten. Daher ist es hier selbst bei ganzen Zellen oft schwer, vom „in-vivo“-Zustand zu sprechen.

Vergleich Hydrolyse / Thiolyse

Beim Vergleich Thiolyse-/Hydrolyseprodukte fallen zwei Unterschiede auf: zunächst scheinen auch die weiteren Abbauproteine des Hydrolyseweges an den ungewaschenen Granula von *R. eutropha* Wt zu haften. An den parallel isolierten Granula der PhaZa1- und PhaP1-Mutante jedoch nicht. Gerade für die Depolymerase-Mutante ist der Unterschied erstaunlich, da sich die Granula beider Stämme sonst sehr ähnlich verhalten. Mengemäßig kann das Fehlen von PhaZa1 auf der Oberfläche jedoch nicht mit dem Ausfall des Phasin-Proteins verglichen werden, so dass der entsprechende Erklärungsversuch nicht übernommen werden kann (siehe oben).

Der zweite Unterschied zwischen Hydrolyse und Thiolyse beim Produktabbau betrifft Granula der 12,5 h Kultur. Interessanterweise wird diesmal bei der Hydrolyse mit **gewaschenem nPHB** das

Produkt 3HB zum Großteil weiter zu Acetat abgebaut. Mit **ungewaschenen Granula** geschieht dies im Gegensatz zur Thiolyse jedoch nicht. Möglicherweise befinden sich in diesem Ansatz Substanzen, die die 3HB-Dehydrogenase oder ein anderes Enzym der Abbaukette inhibieren. Hinweise dazu liefert die Arbeit von Takanashi et al. (2004). Die Gruppe isolierte und charakterisierte erstmals eine 3HB-Dehydrogenase eines PHB-abbauenden Organismus, *Acidovorax* sp. strain SA1. Das Enzym weist nach Angaben der Autoren eine hohe Aminosäuresequenz-Homologie zu der PHB-Depolymerase aus *R. eutropha* H16 auf. Nach rekombinanter Gewinnung aus *E. coli* war das Enzym rund fünfmal aktiver als isoliert aus *Acidovorax*. Takanashi et al. bringen diesen Unterschied mit dem Fehlen möglicher Inhibitoren im *E. coli*-Rohextrakt in Verbindung.

4.6.3 Isoliertes PhaZa1

Mit Hilfe von isoliertem PhaZa1 sollte seine Funktion als hydrolytisch und vor allem als potentiell thiolytisch aktives Enzym ausgelotet werden. Bis heute wurden vier Klassen intrazellulärer PHA-Depolymerasen gefunden. Sie werden bezeichnet als Typ A bis Typ D. PhaZa1 (Typ A) aus *R. eutropha* ist die erste beschriebene PHB-Depolymerase (Saegusa et al. 2001). Im Gegensatz dazu sind PhaZb und PhaZc aus *R. eutropha* als Oligomer-Hydrolasen klassifiziert worden und PhaZd gehört von der Funktion und Lokalisation her wie PhaZa1 zu den intrazellulären Depolymerasen. Das Protein passt aber zumindest der Aminosäure-Sequenz nach eher zu den extrazellulären Depolymerasen wie denen aus *R. pickettii* T1 oder *P. lemoignei*.

Die Depolymerasen des PhaZa-Typs – wie PhaZa1 - setzen sich von den drei anderen Gruppen ab, da sie als einzige Cystein statt Serin im aktiven Zentrum besitzen. Den Einfluss von PhaZa1 auf den PHB-Stoffwechsel zeigten zum einen Δ *phaZa1*-Mutanten, die signifikant weniger PHB abbauten als der Wildtyp (Saegusa et al. 2001, diese Arbeit). Zum anderen hydrolysierte das rekombinant aus *E. coli* isolierte Enzym aPHB (Saegusa et al. 2001). York et al. (2003) fanden über degenerierte Primer zwei zu PhaZa1 paraloge AS-Sequenzen in *R. eutropha*. Die entsprechenden Proteine sind bisher jedoch nicht als Depolymerasen des PhaZa-Typs bestätigt und charakterisiert worden. Auch Kobayashi und Saito (2003) suchten über Ähnlichkeiten in der AS-Sequenz nach Proteinen mit einer möglichen Verwandtschaft zu PhaZa1. Dabei konnten sie über eine BLAST-Analyse zeigen, dass intrazelluläre Depolymerasen einer Reihe von PHA-Bildnern (u.a. *Xanthomonas axonopodis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Methylobacterium extorquenz*) sowie zwei PHA-Synthasen (aus *Bacillus megaterium* und *Chromatium vinosum*) in einigen konservierten Bereichen mit PhaZa1 übereinstimmen. Vor allem aber waren die drei Aminosäuren Cystein (183), Aspartat (355) und Histidin (388) in allen untersuchten Sequenzen konserviert, was auf ein entsprechendes katalytisches Zentrum schließen lässt (Kobayashi und Saito, 2003).

Wie bereits oben erwähnt, taucht unter den Depolymerasen und Oligomerhydrolasen aus *R. eutropha* nur bei PhaZa1 Cystein im katalytischen Zentrum auf. Bei alle anderen liegt dort stattdessen Serin. Beide Aminosäuren besitzen eine nucleophile Gruppe, wobei die Nucleophilie der Thiogruppe des Cystein stärker ist als die der Hydroxylgruppe des Serin. Daher ermöglicht vermutlich auch nur Cystein die Bindung von CoA und die Katalyse einer thiolytischen Spaltung. In dem Fall sollte für andere Thiolasen ebenfalls Cystein im katalytischen Zentrum vorhanden sein. Thiolasen lassen sich in zwei Kategorien einteilen: in abbauende (EC 2.3.1.16) und biosynthetisch aktive Enzyme (EC 2.3.1.9). So konnte für eine Thiolase von *Zoogloea ramigera* Cystein im aktiven Zentrum nachgewiesen werden, die die Kondensation von Acetyl-CoA zu Acetoactyl-CoA katalysiert (Masamune et al. 1989, Modis et al. 1999). Aber auch für eine 3-Ketoacyl-CoA Thiolase mit spaltender Funktion wurde unter anderem anhand der Kristallstruktur gezeigt, dass zwei konservierte Cysteine und ein Histidin das aktive Zentrum des Enzyms bilden (Mathieu et al. 1994).

Dabei handelte es um ein Protein des Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae*. Der BLAST-Vergleich mit prokaryotischen Sequenzen ergibt jedoch auch 43 % Identität und 58 % Übereinstimmung zu einer vermutlichen 3-Ketoacyl-CoA Thiolase aus *Cupriavidus taiwanensis*, einem nahen Verwandten von *R. eutropha*. Homolog zur Thiolase aus *Saccharomyces* weist auch dieses Enzym zwei konservierte Cysteine auf. Die Übereinstimmung wird aus Abbildung 148 gut ersichtlich.

Query	: KRPEDVVIVAANRSAIGKGFKGAFKDVNTDYLLYNFLNEFIGRFPEPLRADLNLII	31-85
	: K+ +D IVAA RS IGK KGAFK+ D LL L + + P D LI	
B2AH24	: KQLQDAYIVAATRSPIGKAPKGFKNTRPDDLATILKAAVAQVPN--LDPKLI	2-53
Query	: EEVACGNVL-NVGAGATEHRAACLASGIPYSTPFVALNRQCS SGLTAVNDIANKI	86-139
	: E+ G + G R L SG+P + + +NR C+SG++AV A++I	
B2AH24	: EDAIVGCAIPEAQQLNVARIGALLSGLPNTVGGITVNRFCASGVSAMAAADRI	54-108
Query	: KVGQIDIGLALGVESMTNNYKVNPLGMISSEELQKNREAKKCLIPMGITNENVA	140-194
	: +VG+ D+ +A GVESM+ N M S E+ E MG+T E VA	
B2AH24	: RVGESDVMIAAGVESMSMVPMMGNPSM--SPEIFTRDENVGIAYGMGLTAEKVA	109-161
Query	: ANFKISRKQDEFAANSYQKAYKAKNEGLFEDEILPIKL----PDGSICQS----	195-241
	: +K+SR+DQD F+ S+QKA A+ G F+DEI PI++ PD + Q	
B2AH24	: QQWKSREDQDAFSLASHQKAIAAQGAFKDEITPIEIVERFPDLASGQVSVKT	162-216
Query	: -----DEGPRPNVTAESLSSIRPAFIKDRGTTTASNQVSDGVAGVLLARRSVA	242-291
	: DEGPRP + E L +RP F ++G+ TAGN+SQ SDG ++L +	
B2AH24	: RTISLDEGPRPETSLEGLGKLRPVFA-NKGSVTAGNSSQTS DGAGALILVSEKIL	217-270
Query	: NQLNLPVLGRYIDFQTVGVPPEIMGVGPAYAI PKVLEATGLQVQDIDIFEINEAF	292-346
	: Q NL L R++ F GVPPEIMG+GP AIP L+A GL ID E+NEAF	
B2AH24	: KQFNLVPLARFVSFAVRGVPPEIMGIGPKEAIPAALKAAGLTQDQIDWIELNEAF	271-325
Query	: AAQALYCIHKLGIDLNKVNPRGGAIALGHPLGCTGARQVATILRELKDKQI--GV	347-399
	: AAQ+L + L +D +VN GGAIALGHPLG TGA + AT++ L++ + G+	
B2AH24	: AAQSLAVMRDLDDLDPARVNRMGGAIALGHPLGATGAIRSATVVHALRRHNLKYGM	326-380
Query	: VSMCI GTMGAAAIF	400-414
	: V+MC+ETMGAA IF	
B2AH24	: VTMCVGTMGAA GIF	381-395

Abb. 147 Sequenzvergleich *Saccharomyces cerevisiae* (3-ketoacyl-CoA thiolase = Query) und *Cupriavidus taiwanensis* (Putative 3-ketoacyl-CoA thiolase = B2AH24)(BLAST-Programm). Rot umrandet: konservierte Cysteine.

Dieser sehr wahrscheinliche Zusammenhang zwischen Cystein im katalytischen Zentrum und thiolytischer Aktivität legt nahe, dass es sich bei PhaZa1 vermutlich tatsächlich um ein Enzym mit katalytischer Doppelfunktion handelt. Denn es bildet zum einen nachweislich Hydrolyse- und Thiolyseprodukte und besitzt zudem – wie klassische Thiolasen – als einzige Depolymerase aus *R. eutropha* Cystein im katalytischen Zentrum.

4.6.4 Thiolyse durch isoliertes PhaZa1

4.6.4.1 Isolierung des Enzyms

Nach der Aufreinigung von PhaZa1 über Nickel-NTA und SDS-Gel war auffällig, dass ab der Fraktion mit 100 mM Imidazol zwei Banden erschienen (Abb. 114). Erst in der dritten Elution mit 150 mM Imidazol tauchte nur noch eine Proteinbande auf. Sie lag knapp unterhalb des 50 kDa-

Markers und entspricht damit sehr wahrscheinlich dem gesuchten PhaZa1 (47,3 kDa). Das andere Protein lag etwas darunter und besitzt ungefähr 40 kDa. Seine Bindung bis zur vollkommenen Elution mit 150 mM Imidazol ist ungewöhnlich. Möglicherweise handelt es sich um degradiertes PhaZa1. Oder die Konzentration dieses Proteins ist im Zellextrakt so groß, dass ein Teil auch nach den Wasch- und ersten Elutionsschritten vorhanden ist. Das Phasin-Protein PhaP1 wäre ein Beispiel, denn es kann in PHB-reichen Zellen von *R. eutropha* bis zu 5 % des Gesamtproteins ausmachen (Wieczorek et al. 1995). Dagegen spricht, dass es nur 20 kDa besitzt. Die Fraktionen mit der Doppelbande und mit reinen PhaZa1 wurden getrennt gepoolt. Erstere zeigte stets eine deutlich höhere Proteinkonzentration. Um aber gezielt die Aktivität von PhaZa1 messen zu können, wurden die Versuche mit dem zweiten Pool durchgeführt. Dabei lag der Schwerpunkt der Versuche auf der Charakterisierung der Thiolylseaktivität des Enzyms.

4.6.4.2 pH-Optimum

Für die Thiolylse von nPHB aus *R. eutropha* Δ *phaZa1* mit isoliertem PhaZa1 ergab sich ein pH-Optimum bei pH 6, dicht gefolgt von pH 6,3 und pH 7. Für die Auswertung wurden parallel Ansätze nur mit nPHB ohne PhaZa1 inkubiert und ihre CoA-Ester-Bildung als Blindwert von den Versuchen mit Zugabe von PhaZa1 abgezogen. Die PhaZa1-Versuche dieser Arbeit liefen bei pH 7 ab. Der Unterschied zu pH 6 war gering und so konnten neue Ergebnisse mit zuvor bereits bei pH 7 gewonnenen verglichen werden.

4.6.4.3 Temperatur-Optimum

Auf die Temperatur bezogen, erreichten die Thiolylseansätze mit PhaZa1 ein deutliches Maximum bei 30°C. Sowohl nach 20, 40 als auch 60 Minuten lag hier die CoA-Ester-Konzentration am höchsten. Interessant ist der Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne PhaZa1. Abbildung 114 zeigt anschaulich, wie hier das Optimum auf 34°C verschoben ist. Vermutlich sind die anderen Depolymerasen der nativen PHB-Granula (aus *R. eutropha* Δ *phaZa1*) durch den Granulumkomplex thermostabiler als das isolierte Enzym. Dass PhaZa1 über dieser Temperatur vermutlich tatsächlich denaturiert bzw. zumindest inaktiv wird, zeigt der steile Aktivitätsabfall zwischen 32 und 34°C (Abb. 121). Hierbei ist allerdings auch zu beachten, dass die verschiedenen Temperaturproben nach 0, 20, 40 und 60 Minuten auf ihre Thiolylseaktivität untersucht wurden. Zeigt daher nach 20 Minuten eine Probe bei 34°C kaum noch Aktivität, könnte sie nach wenigen Minuten - zu Beginn der Messung - durchaus eine sehr hohe CoA-Ester-Bildung aufgewiesen haben. Daher handelt es sich bei 30°C um einen Bereich, in dem PhaZa1 auch langfristig stabil ist. Für eine intrazelluläre Depolymerase aus *P. putida* bestimmten Prieto et al. (2007) beispielsweise ein Temperaturoptimum von 43°C. Das Enzym war jedoch bereits nach kurzer Zeit bei 37°C instabil.

Empfindlich scheint isoliertes PhaZa1 auch auf Einfrieren und dadurch bedingte Kristallbildung zu reagieren. Beim Aufbewahrungs-Test zeigte sich, dass das Protein bereits nach einer Stunde bei -20°C fast völlig an Aktivität verliert (Abb. 122). Nach Aufbewahrung auf Eis bei 4°C hingegen zeigte das Enzym weiter CoA-Ester-Bildung. Diese Rate nahm mit höheren PhaZa1-Konzentrationen auch zu, allerdings nicht proportional. Weitere Versuche zum Zusatz von Glycerin könnten zeigen, in welcher Konzentration die Substanz das Enzym auch bei Kälte stabilisieren kann und ab wann Glycerin womöglich dessen Aktivität ebenfalls hemmen würde.

Annähernd proportional verlief die Thiolylse nativer PHB-Granula (*R. eutropha* Δ *phaZa1*) in Bezug auf die Produktbildung pro Zeit. Dies galt für die ersten 45 Minuten, danach sank die Rate und nach etwas 90 Minuten konnte keine Produktzunahme mehr festgestellt werden.

4.6.4.4 Hemmstoffe und Aktivatoren

Vollständig gehemmt wurde die Thiolyse mit PhaZa1 durch 1 mM DTNB, 0,01 % SDS, 0,1 % TritonX100 und 5 mM HgCl₂. Vor allem die Hemmung durch DTNB bestätigt die Ergebnisse von Kobayashi und Saito (2003), dass es sich bei PhaZa1 um eine Cysteinhydrolase handelt. In diesem Zusammenhang ist jedoch erstaunlich, dass die Hydrolyseaktivität nativer PHB-Granula (*R. eutropha*) durch DTNB sichtbar gesteigert wird (Abb. 43, 44). Möglicherweise oxidiert DTNB das CoA. Sinkt durch den dadurch entstehenden Substratmangel dann die Thiolyserate, wirkt dies vermutlich hydrolysefördernd. Dies könnte erklären, wie eine Substanz auf vermutlich ein Enzym – PhaZa1 – scheinbar zugleich hemmend (Thiolyse) und fördernd (Hydrolyse) wirken kann.

Deutlich erhöht wurde die Bildung von CoA-Estern mit PhaZa1 durch 0,1 % Tween80 (350 % Aktivität für die 20 Minuten-Probe) und 1 mM bzw. 5 mM CaCl₂ (140 % / 165 %) (Tab. 32). Das Detergenz wirkt dabei möglicherweise auf die Granuloberfläche und erleichtert so beispielsweise PhaZa1 den Zugang zum Substrat. Allerdings ist dieser Mechanismus noch genauso wenig bekannt wie der von andere Detergentien wie SDS, CTAB und TritonX100, die stattdessen hemmend auf Hydrolyse und Thiolyse wirken.

4.7 Hydrolyse / Thiolyse – Vergleich andere Organismen

Ergänzend zu den Thiolyse- und Hydrolyseversuchen mit nPHB aus *R. eutropha* wurden die folgenden PHB-, PHV und PHO-Bildner untersucht: *A. latus*, *B. megaterium*, *Comamonas sp.*, *P. lemoignei*, *Paracoccus denitrificans* (nPHV) sowie *Pseudomonas putida* 195 (nPHO). Für die Isolierung dieser Granula konnte nicht das Standardverfahren (Kapitel 2.9) angewendet werden, da PHA von jedem Organismus eigene Oberflächenstrukturen und/oder Granulagrößen aufzuweisen scheint. Beim Auftrag auf den Standard-Glyceringradienten verteilten sich die Granula entweder diffus oder wurden zu einer festen Bande aus denaturiertem PHA gepresst.

4.7.1 Hydrolyse

In den Abbau-Versuchen mit nativen Granula konnten für alle Organismen – bis auf *P. denitrificans* – die entsprechenden Hydrolyseprodukte nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich in allen Fällen um das jeweilige Monomer, also um 3HB, 3HHx und 3HO. Oligomere wurden nicht detektiert, was auf das Vorhandensein von Oligomerhydrolasen oder aber exo-aktiven PHA-Depolymerasen hinweist. Dass ein Enzym grundsätzlich eine endo- und exo-Funktion besitzen kann, zeigten de Eugenio et al. (2007) und Ren et al. (2009) für die intrazelluläre Depolymerase aus *P. putida* GPo1. Sie bildet sowohl 3HO-Monomere als auch -Dimere als Hydrolyseprodukt. Sugiyama et al. (2004) lieferten mit der Charakterisierung von PhaZb aus *R. eutropha* ebenfalls den Nachweis, dass ein Enzym sowohl im endo- als auch im exo-Modus hydrolytisch aktiv sein kann.

Die Rate, mit der PHA in der vorliegenden Arbeit hydrolysiert wurde, variierte sehr stark und reichte von 1 µM 3HB / min x mg PHB⁻¹ bei *Comamonas sp.* bis zu mehr als 100 µM 3HB / min x mg PHB⁻¹ bei *A. latus*. Dabei hängen diese Unterschiede sicherlich zum einen mit abweichenden Enzym-Strukturen zusammen. Vor allem *A. latus* besitzt vermutlich eine deutlich andere intrazelluläre Depolymerase als der Modellorganismus *R. eutropha*, denn die nativen Granula von *A. latus* hydrolysieren außerordentlich schnell. Und auch das pH-Optimum der Hydrolyse weicht erkennbar von dem der Depolymerase PhaZa1 aus *R. eutropha* ab. Hier liegt das pH-Optimum bei pH 8,5-10 (Saegusa et al. 2001), für *A. latus* fand Daniel Pfeiffer (2009) gleich in zwei Bereichen besonders hohe Aktivität: bei pH 5 und bei pH 8-11. Vermutlich handelt es sich dabei auch um zwei eigenständige Enzyme. Dafür spricht unter anderem, dass die Aktivität bei pH 5 durch die

Cysteinhydrolase-Inhibitoren DTNB und Iodacetamid deutlich gehemmt wurde. Bei pH 8 hatten sie keinen Einfluss auf die Hydrolyseaktivität. Hier wirkte aber stattdessen Diisopropylfluorophosphat (DFP) hemmend, ein Serinhydrolyse-Inhibitor. Vermutlich handelt es sich daher um eine Cysteinhydrolyse mit höchster Aktivität bei pH 5 und um eine Serinhydrolyse mit einem pH-Optimum bei pH 8, dem Bereich in dem auch die Versuche dieser Arbeit stattfanden.

In *Bacillus thuringiensis* wurde 2006 eine PHA-Depolymerase gefunden, deren Sequenz kaum Ähnlichkeit mit anderen bisher bekannten intra- und extrazellulären Depolymerasen aufweist (Tseng et al. 2006). Sie enthält eine Lipasebox-artige Sequenz (G-W-S₁₀₂-M-G). Die inaktive Serin102A-Mutante zeigt zudem, dass diese Aminosäure für die Hydrolyseaktivität entscheidend ist. Vermutlich besitzt auch der in dieser Arbeit untersuchte Organismus *B. megaterium* ein Depolymerase-Enzym dieses neuen Types, entsprechende Sequenzen sind jedoch noch nicht bekannt.

Einen weiteren entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse besitzen vermutlich auch der Zustand und die Konzentration der eingesetzten Granula. So kann trotz Optimierung der Isolierung und Tests mit PhaZ7 auf die native amorphe Struktur nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Granula einzelner Organismen in-vitro kaum Eigenhydrolyse zeigen, in-vivo jedoch eine deutlich höhere Rate aufweisen. Im Fall von *P. denitrificans* wiederum könnte das Fehlen von 3HV an der geringen PHA-Konzentration im Versuchsansatz liegen. Hier hatten die Kultivierung und Granula-Isolierung nur zu einer sehr niedrigen nPHA-Ausbeute geführt. Die Entstehung von geringen Mengen an 3HB und Acetat – vermutlich aus einem gewissen Anteil PHB neben dem eigentlichen Speicherstoff PHV - zeigen jedoch, dass eine in-vitro Hydrolyseaktivität grundsätzlich vorhanden ist.

4.7.2 Thiolyse

4.7.2.1 Eigenthioolyse nPHA-Granula

Von den sechs anderen untersuchten PHA-Bildnern produzierte nur nPHB aus *Comamonas* sp. signifikante Mengen an Thiolyseprodukten. Um daher Aufschluss über das grundsätzliche Vorkommen von PhaZa1-artigen Enzymen zu erhalten, sollte herausgefunden werden, wie verbreitet die Struktur der Depolymerase ist. Dazu wurde die Depolymerase PhaZa1 aus *R. eutropha* H16 über das BLAST-System (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) zunächst mit allen bekannten bakteriellen Aminosäuresequenzen verglichen. Parallel wurde die Depolymerase-Datenbank der Universität Stuttgart genutzt, in der die Sequenzen von alleine 53 identifizierten oder vermeintlichen intrazellulären PHA_{SCL}-Depolymerasen verzeichnet sind, die wie PhaZa1 keine Lipasebox aufweisen (Knoll et al. 2009, www.ded.uni-stuttgart.de).

Ralstonia

Dabei ergab die BLAST-Suche für ein Protein aus *Cupriavidus taiwanensis* eine Identität von 404 der 419 Aminosäuren von PhaZa1 aus *R. eutropha* H16. Das katalytische Zentrum dieses Proteins bestand aus Cys 183, Asp 355 und His 388. Aufgrund der nahen Verwandtschaft der beiden Organismen (*Ralstonia eutropha* H16 = *Cupriavidus necator*) und der sehr hohen Übereinstimmung der Aminosäuren handelt es sich dabei mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls um eine intrazelluläre Depolymerase. Das gleiche gilt für entsprechend gefundene Proteine anderer *Ralstonia*-Stämme wie *R. JMP 134*, *R. metallidurans*, *R. pickettii* und *R. solanaceum*. Auch hier findet das Programm per Sequenzvergleich Übereinstimmungen zwischen 85 % und 93 %. Es schließen

sich zahlreiche Proteine aus Burkholderia-Stämmen an, die rund 75 % gleiche Aminosäuren mit PhaZa1 aufweisen.

Comamonas sp.

Und nach Stämmen wie *Lepothrix* mit 69 % gleichen Aminosäuren, *Polynucleobacter* (68 %), *Xanthomonas* (66 %) und *Hydrogenophaga* (63 %) folgt *Comamonas*. Der Vergleich ergab, dass zwischen PhaZa1 und einer intrazellulären PHB-Depolymerase aus *Comamonas testosteroni* 64 % der Aminosäuren übereinstimmen und es sich bei 79 % um Aminosäuren ähnlicher Eigenschaften handelt. Die gezielte Suche nach PhaZa1-ähnlichen Proteinen nur in dem von uns kultivierten Organismus *Comamonas* sp. war hingegen erfolglos. Der Grund ist vermutlich jedoch, dass für ihn kaum oder keine Sequenzen in der Datenbank zum Vergleich vorliegen. Denn von allen untersuchten Stämmen bildete neben *Ralstonia eutropha* nur *Comamonas* sp. signifikante Mengen 3HB-CoA, was für das Vorhandensein eines PhaZa1-ähnlichen Proteins spricht. Dabei lag die Rate der nativen, gewaschenen PHB-Granula mit $0,3 \mu\text{M}$ 3HB-CoA/min x mg PHB⁻¹ für *Comamonas* sp. und $0,7 \mu\text{M}$ 3HB-CoA/min x mg PHB⁻¹ für *R. eutropha* ungefähr in einer Größenordnung. Im Vergleich dazu bildet gewaschenes nPHB aus *R. eutropha* in einem Hydrolyseansatz mit $6,3 \mu\text{M}$ 3HB / min x mg PHB⁻¹ fast zehnmal mehr Produkt. Dieser Abbauweg ist daher unter den gegebenen Versuchsbedingungen offensichtlich der gängigere.

A. latus

Besonders von Interesse in Bezug auf Thiolyse-Versuche war *A. latus*, denn in Hydrolyse-ansätzen hatten seine Granula rund 80-mal mehr 3HB gebildet als *R. eutropha*. Und dass, ohne dass die durchschnittlichen Granuladurchmesser zu großen Unterschieden in der Gesamtoberfläche führen würden: so misst der Durchmesser bei *A. latus* rund 460 nm und bei *R. eutropha* 550 nm. Daniel Pfeiffer konnte während seiner Diplomarbeit (Pfeiffer 2009) zeigen, dass *A. latus* für die Hydrolyse von nPHB vermutlich zwei Depolymerasen mit verschiedenen pH-Optima besitzt. Sowohl bei pH 4 als auch im Alkalischen (pH 8-11) setzten ganze Zellen vermehrt 3HB frei. Bei ähnlichen pH-Werten (pH 5 und pH 8-10) wiesen auch die isolierten nPHB-Granula hohe 3HB-Freisetzungsraten auf. Vermutlich handelt es sich bei den Depolymerasen von *R. eutropha* und *A. latus* um verschiedene Typen. Das bestätigt ein Stück weit die Tatsache, dass die Datenbank-Recherche nach PhaZa1-ähnlichen Proteinen auf Basis bekannter Sequenzen für *A. latus* keine Übereinstimmungen aufweist. Die Auswertung der Thiolyseversuche per HPLC ergab im Gegensatz zur hohen Hydrolyserate, dass unter diesen Bedingungen mit Granula aus *A. latus* kein Produkt, also 3HB-CoA, entstanden war. Während im Chromatogramm weder nach 15 Minuten (3HB-CoA) noch nach 14 Minuten (Acetyl-CoA) ein Peak zu erkennen ist, nimmt CoA (9,5 min) dennoch ab und bei einer Elutionszeit von 13 Minuten taucht eine unbekannte Substanz auf (Abb. 92 ff.). Ihre Analyse per ESI-MS war leider nicht möglich, da dieses System (Institut für Lebensmittelchemie, Uni Hohenheim) nicht mit Kaliumphosphat(KP)-Puffer laufen darf und sich die CoA-Ester mit anderen Lösungsmitteln nicht trennen ließen.

Aus den Ergebnissen von *A. latus* wird deutlich, dass man nicht von (hoher) Hydrolyseaktivität auf (hohe) Thiolyseaktivität schließen kann. Uchino et al. 2007 und die vorliegende Arbeit beschreiben zwar die gleichzeitige Hydrolyse und- Thiolyseaktivität von isolierten nPHB-Granula aus *R. eutropha* sowie der isolierten Depolymerase PhaZa1. Scheinbar besitzen aber nicht alle Depolymerasen diese Doppelfunktion oder sie ist unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht aktiv.

Bacillus megaterium

Vertreter der gram-positiven Organismen war in der vorliegenden Arbeit *Bacillus megaterium*. In seiner Aminosäuresequenz findet sich laut BLAST-Recherche zwar keine Depolymerase mit Ähnlichkeit zu PhaZa1. Stattdessen stimmt aber die Sequenz seiner PHA-Synthase PhaC zu immerhin 21 % mit der Depolymerase PhaZa1 aus *R. eutropha* überein. Und genau wie die Depolymerase aus *Paracoccus denitrificans* findet sich auch hier an Position 183 ein Cystein. Wie bereits weiter vorne in Kapitel 4.7.1 erwähnt, wurde allerdings 2006 von Tseng et al. in *Bacillus thuringiensis* - nah verwandt mit dem untersuchten *Bacillus megaterium* - eine intrazelluläre Depolymerase gefunden, die keinerlei Ähnlichkeit mit PhaZa1 aus *R. eutropha* aufweist. Sie besitzt unter anderen ein Serin im katalytischen Zentrum und kein Cystein. Die deutlich andere Enzymstruktur könnte eine Erklärung dafür sein, dass *B. megaterium* keine Thiolyseaktivität aufweist. Dabei zeigen native Granula aus *B. megaterium* jedoch auch keine erkennbare Hydrolyseaktivität, oder „self-digestion“, wie schon 1964 Merrick und Doudoroff feststellten.

Bei *A. latus* zeigte sich, dass eine mögliche Theorie „viel Hydrolyse = viel Thiolyse“ nicht haltbar ist. Es stellt sich die Frage, ob vielleicht aber die Vermutung „keine Hydrolyse = keine Thiolyse“ zutreffen könnte. Merrick und Doudoroff konnten allerdings zeigen, dass sich nPHB aus *B. megaterium* durch Zugabe von *R. rubrum*-Extrakt schließlich doch abbaut (Merrick und Doudoroff, 1964). Daher wäre es in diesem Zusammenhang interessant, ob der Extrakt auch eine Thiolyseaktivität auslösen könnte. Wenn beispielsweise dadurch erst die Bindung der Depolymerase an das Polymer möglich wird, kann das Enzym anschließend eventuell auch beide Abbauewege verfolgen.

Paucimonas lemoignei

Spuren von Acetyl-CoA und 3HB-CoA konnten nach 60 Minuten Inkubation von nPHB aus *Paucimonas lemoignei* nachgewiesen werden. Die Konzentration der Produkte liegt bei rund 10 - 20 µM, im Vergleich dazu bildet *R. eutropha* bei gleicher nPHB-Menge jedoch 10 - 20 mM 3HB-CoA, also die 1000fache Menge. Die Suche nach PhaZa1-ähnlichen Proteinen ergab für *P. lemoignei* allerdings auch keine Treffer. Lediglich mit einem Vorläuferprotein einer PHB-Depolymerase aus *P. lemoignei* stimmen einzelne sehr kurze Folgen von 2-3 Aminosäuren überein.

Pseudomonas putida

Im Thiolyseansatz mit nPHA des PHO-Bildners *Pseudomonas putida* 195 konnten keine CoA-Ester analysiert werden. Beim Vergleich der Aminosäuren von PhaZa1 mit den Sequenzen von *P. putida*-Stämmen lag die größte Übereinstimmung mit 27% gleichen Aminosäuren bei einem Membran-Porin-Protein aus *P. putida* W619. Dieser Organismus wurde bereits vollständig sequenziert (NCBI Genome Project, 2008) und ist mit dem untersuchten *P. putida* 195 eng verwandt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass auch dort kein PhaZa1-ähnliches Protein vorhanden ist.

Paracoccus denitrificans

Mit einer vermeintlichen intrazellulären Depolymerase aus *Paracoccus denitrificans* stimmen 42 % der Aminosäuren von PhaZa1 überein und 57 % besitzen ähnliche Eigenschaften. Und wie PhaZa1 besitzt auch dieses Protein an Position 183 ein Cystein, was auf ein sehr ähnliches oder gleiches katalytisches Zentrum schließen lässt. Der PHV-Bildner *Paracoccus denitrificans* produzierte zwar kein 3HV-CoA, aber stattdessen konnten in den Proben nach 60 Minuten geringe Mengen 3HB-CoA und Acetyl-CoA nachgewiesen werden. Die Konzentration war jedoch so gering, dass der Organismus hier nicht zu den signifikant thiolytisch aktiven gerechnet wird. Diese Beobachtung ist aber vor allem deshalb so interessant, da für *P. denitrificans* bereits unter Hydrolysebedingungen mit nativen Granula in-vitro kein 3HV sondern nur 3HB und Acetat

gefunden wurden. Für die Gewinnung eines 3HV-Standards zur HPLC-Analytik wurde jedoch ein Aliquot der isolierten Granula durch alkalische Hydrolyse abgebaut und die Produkte durch ESI-MS u.a. als 3HV identifiziert. Die *P. denitrificans*-Kultur bildete also nachweislich (auch) PHV. Dass weder 3HV noch 3HV-CoA detektiert wurden, sondern stattdessen 3HB/3HB-CoA und Acetat/Acetyl-CoA, deutet zum einen auf ein 3HB-HV-Copolymer hin. Zum anderen gibt es einen Hinweis auf die mögliche Existenz von zwei unterschiedlich spezifischen oder aktiven Depolymerasen: für den Abbau von PHB und PHV.

4.7.2.2 Einfluss isoliertes PhaZa1 auf andere nPHB-Arten

Um die Wirkung von PhaZa1 auf Granula anderer Organismen zu untersuchen, wurden Thiolyseversuche mit nPHB aus *Comamonas sp.*, *Bacillus megaterium* und zum Vergleich aus *R. eutropha* Wt angesetzt. Dabei erhöhte PhaZa1 wie erwartet die CoA-Ester-Bildung von nPHB aus *R. eutropha* und zugleich aber auch für Granula von *Comamonas sp.*. Mit *Bacillus*-nPHB konnte hingegen keine Thiolyseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 132). Aus diesen Versuchen schließend wirkt PhaZa1 scheinbar nur auf Granula, die bereits selber die Fähigkeit zur Thiolysereaktion besitzen. Diese wird dann – wie bei *Comamonas* – intensiv verstärkt. Wie an anderer Stelle ausführlich diskutiert, wurde für *Comamonas testosteroni* - nah verwandt mit *Comamonas sp.* - Cystein im aktiven Zentrum seiner intrazellulären Depolymerase gefunden (Pohlmann et al. 2006). Für *Bacillus thuringiensis* - nah verwandt mit *Bacillus megaterium* - wurde stattdessen eine Serinhydrolase identifiziert (Tseng et al. 2006). Für die Fähigkeit, durch PhaZa1 thiolytisch gespalten zu werden, sollten hier aber theoretisch nicht die granula-eigenen Depolymerasen verantwortlich sein. Vielmehr scheint der gesamte Granulumkomplex von *Ralstonia* und *Comamonas* thiolysefreundliche Bedingungen zu besitzen, so dass auch fremde Depolymerasen das PHB als Substrat nutzen können.

4.7.2.3 Einfluss isoliertes PhaZa1 auf aPHB

Anders als in dieser Arbeit (isoliertes PhaZa1) untersuchte vor allem die AG Saito die Thiolysefunktion von PhaZa1 fast ausschließlich über den Einsatz des Rohextraktes rekombinanter *E. coli* und mit artifiziellem, amorphem PHB (aPHB) als Substrat. Mit dieser Kombination konnte die Gruppe auch Thiolyseaktivität nachweisen. Auffallend ist vor allem, wie sehr Cholat die Thiolyseaktivität des Rohextraktes steigern kann. Wurde in dieser Arbeit einem Ansatz mit nativen PHB-Granula (*R. eutropha* Δ phaZa1) und PhaZa1-haltigen Überstand (rekomb. *E. coli*) 17 mM Natriumcholat zugegeben, konnte nach 20 Minuten Inkubation viermal mehr 3HB-CoA detektiert werden als ohne Zugabe (Abb. 136). Acetyl-CoA fand sich in den Proben mit Natriumcholat nicht. Unklar ist dabei, ob das Detergenz Einfluss auf die nativen Granula hat oder aber auf die Proteine des Rohextraktes. Aus Hydrolyseversuchen mit nPHB ist jedoch bekannt, dass diverse andere Detergentien (SDS, TritonX-100, CTAB) die Produktbildung blockieren. Möglicherweise wirkt Natriumcholat daher eher, indem es hemmende Proteine aus dem Rohextrakt denaturiert. Während die PhaZa1-Konzentration hoch genug ist, so dass ausreichend aktives Enzym vorhanden ist.

4.8 Thiolyse in vivo: ja oder nein?

Der Test von drei *R. eutropha*-Stämmen (Wt, Δ phaZa1, Δ phaP1) und sechs weiteren PHA-Bildner auf ihre Thiolyse-Fähigkeit zeigte eine geringe Ausbeute: lediglich *R. eutropha* und *Comamonas sp.* wiesen bei in-vitro-Versuchen signifikante 3HB-CoA-Mengen auf. Dennoch könnte die Spaltung des

Polymers mit Hilfe von CoA auch in-vivo generell eine Alternative zur bisher angenommenen PHA-Hydrolyse darstellen. Im Folgenden werden die Gründe diskutiert, die generell für oder wider diesen zweiten Abbauweg sprechen.

Für eine in-vivo Funktion der Thiolyse spricht vor allem, dass der scheinbare „Futile Cycle“ erklärt werden könnte. Denn die thiolytische Spaltung speichert die Energie der Esterbindung, indem statt der Säure (3HB) der aktivierte CoA-Ester (3HB-CoA) entsteht. Im Fall, dass sich das Stoffwechsel-Gleichgewicht von PHB-Abbau in Richtung -Speicherung verlagert, kann mit 3HB-CoA zudem rascher darauf reagiert werden, als wenn zuerst 3HB aktiviert werden muss.

Die bisherigen Thiolyse-Ergebnisse in Frage stellen könnte die folgende Überlegung: Lenz und Marchessault (2005) beschreiben in ihrem Schema des PHB-Abbaus, dass **3HB zu 3HB-CoA und anschließend zu AcetoacetylCoA** umgewandelt wird. In den meisten anderen Übersichten (z.B. Stubbe et al. 2005, Lee et al. 1999) wird der Ablauf jedoch folgendermaßen dargestellt: **3HB -> Acetoacetat -> Acetoacetyl-CoA**. Belege dieser Varianten durch gezielte Enzymtests gingen aus keiner Publikation hervor, so dass durchaus beide Wege diskutiert werden können. Dass beispielsweise in *R. eutropha* zahlreiche potentielle Thiolasen und Reduktasen für verschiedene mögliche Stoffwechselvarianten vorhanden sind, zeigt das *R. eutropha* Genom, das 2006 von Pohlmann et al. vollständig sequenziert wurde.

Die erste Variante würde bedeuten, dass die Aktivierung durch CoA bereits einen Schritt früher stattfindet und statt einer Acetoacetyl-CoA-Transferase (oder -Synthetase) eine Acyl-CoA-Synthetase mit Spezifität für 3HB aktiv werden müsste. Dieser Weg würde aber vor allem zur Folge haben, dass 3HB-CoA entstehen kann, ohne dass PHB thiolytisch gespalten wird. Der Nachweis des CoA-Esters in einem Versuchsansatz muss daher nicht automatisch als Beweis für die Existenz der PHB-Thiolyse gelten.

Um diese Überlegung auszuschließen, testeten Uchino et al. (2006) zum einen den *E. coli*-Extrakt mit der rekombinant exprimierten PHB-Synthase (PhaC) und zum anderen den Extrakt des nicht-rekombinanten *E. coli*-Stammes ohne PhaC. Und während der Extrakt mit PhaC im Versuchsansatz 3HB-CoA bildete (nPHB aus *R. eutropha*), konnte der CoA-Ester nach Zugabe des Extraktes nur mit *E. coli*-eigenen Enzymen nicht detektiert werden. Daraus schlossen die Autoren, dass 3HB-CoA wirklich nur durch die PHB-Synthase PhaC und nicht durch eine 3HB-Thiokinase oder CoA-Transferase aus *E. coli* gebildet wurde. Somit zeigt der Test, dass der oben diskutierte alternative Schritt von 3HB zu 3HB-CoA wenig wahrscheinlich ist. Er schließt jedoch nicht aus, dass – abweichend von *E. coli* – im Stoffwechsel von *R. eutropha* die entsprechenden Enzyme vorhanden sind. Schließlich handelt es sich bei *E. coli* um keinen natürlichen PHB-Bildner oder -Verwerter. Erst Versuche ohne Einsatz des *E. coli*-Extraktes sondern mit dem isolierten Enzym könnten hier Klarheit schaffen.

4.9 Resumée und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Methoden neu- oder weiterentwickelt, die anschließend die Grundlage für neue Erkenntnisse bildeten. So ermöglichen Versuche mit dem pH-Stat – nach Durchführung einiger Kontrolltitrationen – quasi online die in-vitro Beobachtung nativer PHA-Granula und ihre Reaktion auf Veränderungen von pH, Temperatur oder auf die Zugabe von Agentien. Die Produktanalyse kam durch den Einsatz der Derivatisierung mit Bromphenacylbromid einen Schritt weiter, indem neben dem 3HB-Monomer auch -Oligomere sowie andere PHA-Abbauprodukte (3HV, 3HO und Oligomere) detektiert und quantifiziert werden

können. Weniger exakt, aber sehr schnell durchzuführen, ist die Größenbestimmung nativer Granula durch die Photonenkorrelations-Spektroskopie (PCS). Ihre Ergebnisse reichen aus, um die Größenverhältnisse und damit die Gesamtoberfläche von Granula verschiedener Organismen oder auch nur Kultivierungsansätzen zu vergleichen.

Mit Hilfe dieser neuen und mit bereits etablierten Methoden wurde schließlich erstmals die Eigenhydrolyse nativer PHA-Granula (v.a. aus *R. eutropha*) charakterisiert, indem u.a. das pH-Optimum, Temperatur-Optimum und die Wirkung verschiedener Agentien bestimmt wurden. Ähnlich ausführlich wurde der von Uchino et al. 2006 postulierten Thiolyseaktivität der intrazellulären Depolymerase PhaZa1 aus *R. eutropha* nachgegangen. Dazu wurden wiederum isolierte Granula untersucht, aber auch das Enzym selber aus einem rekombinanten *E. coli*-Stamm gewonnen und auf seine Hydrolyse- und Thiolysefähigkeit hin getestet. Beim Vergleich von nPHA verschiedener Organismen konnte nur für den Modellorganismus *R. eutropha* sowie für *Comamonas sp.* eine signifikante Thiolyseaktivität festgestellt werden. Spuren von Thiolyseprodukten bzw. PhaZa1-ähnliche Proteine bei anderen Stämmen lassen jedoch vermuten, dass das Potential auch dort vorhanden ist.

In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Granula weiterer Organismen zu untersuchen, die laut Sequenzanalyse solche PhaZa1-ähnlichen Proteine – potentielle intrazelluläre Depolymerasen - aufweisen. Ein Beispiel wäre *Methylobacterium sp.*. Sein Genom wurde vor kurzem vollständig sequenziert (Copeland et al. 2008) und zeigt vier ORF (open reading frames), die ähnlich zu PhaZa1 sind und ebenfalls ein Cystein im katalytischen Zentrum aufweisen. Dabei lassen sich durchaus auch die Testbedingungen zu Hydrolyse und Thiolyse noch optimieren. Beispielsweise könnte die Ionenstärke der Ansätze variiert werden. So zeigten Prieto et al. 2007, dass die Aktivität der Depolymerase PhaZ_{MCL} aus *P. putida* bei 300 mM NaCl am höchsten ist. Und laut Saito et al. (1992) benötigt auch die intrazelluläre Depolymerase aus *Zoogloea ramigera* eine hohe Ionenkonzentration (200 mM NaCl) für ihre Abbauaktivität.

Die Hydrolyse nativer PHA-Granula bietet noch viele weitere Fragestellungen. Dazu gehört der deutliche Einfluss, den das Medium auf das Abbauverhalten der Granula besitzt. Denn während nPHB aus MM-Kultur (mit NaGlukonat) nur sehr langsam abgebaut wird, kann der gesamte PHB-Auf- und Abbau auf dem Vollmedium NB innerhalb von 12 Stunden ablaufen. Hier wäre zu testen, inwieweit sich nPHB bzw. nPHA anderer Organismen – z.B. aus *Comamonas sp.* - ähnlich verhält.

Native PHB-Granula bilden CoA-Ester und isoliertes PhaZa1 scheint ebenfalls thiolytisch aktiv zu sein. Bei allen Überlegungen zu PhaZa1 und seiner Thiolysefähigkeit sollte jedoch beachtet werden, dass erstaunlicherweise die Thiolyse-Untersuchungen mit nPHB aus *R. eutropha* Wt und der PhaZa1-Mutante kaum signifikante Unterschiede aufweisen. Genauso wenig wie dies für Hydrolyseansätze nachweisbar war, mit Ausnahme der eindeutigen mikroskopischen Aufnahmen. Die thiolytische Spaltung gilt es also im Rahmen der PHA-Forschung weiter im Blick zu behalten. Und auch PhaZa1 liefert dazu vermutlich nur eines von vielen Puzzlestücken.

5 LITERATUR

- Abe, T.; Kobayashi, T.; Saito, T. 2005. Properties of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase with high specific activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16. J. Bacteriol. **187**:6982-6990.
- Anderson, A.J.; Dawes, E.A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol. Rev. **54**(4): 450-472.
- Babel, W.; Ackermann, J.-U.; Breuer, U. 2001. Physiology, regulation and limits of the synthesis of Poly(3HB). Advan. Biochem. Engin. Biotechnol. **71**: 126-140.
- Bachmann, B.M. und Seebach D. 1999. Investigation of the enzymatic cleavage of diastereomeric oligo(3-hydroxybutanoates) containing two to eight HB units. A model for the stereoselectivity of PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. Macromolecules **32**,6:1777-1784.
- Barnard, G.N.; Sanders, J.K.M. 1989. The poly- β -hydroxybutyrate granule in vivo. J. Biol. Chem. **264** (6): 3286-3291.
- Bode, H.B.; Kerkhoff, K.; Jendrossek, D. 2001. Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. Biomacromolecules **2**(1): 295-303.
- Boynton, Z.L.; Bennett, G.N.; Rudolph F.B. 1994. Intracellular concentrations of Coenzyme A and its derivatives from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and their roles in enzyme regulation. Appl. Environ. Microbiol. **60**(1): 39-44.
- Brandl, H.; Gross, R.A.; Lenz, R.W. und Fuller, R.C. 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. Appl. Environ. Microbiol. **54**: 1977-1982.
- Braaz, R.; Handrick, R.; Jendrossek, D. 2003. Identification and characterisation of the catalytic triad of the alkaliphilic thermotolerant PHA depolymerase PhaZ7 of *Paucimonas lemoignei*. FEMS Microbiol Lett. **224**(1):107-12.
- Briese, B.H.; Jendrossek, D.; Schlegel, H.G. 1994. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by aerobic sewage sludge. FEMS Microbiol Lett. **117**(1): 107-111
- Cai, L.; Yuan, M.-Q.; Liu, F. ; Jian, J. ; Chen, G.-Q. 2009. Enhanced production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHA) by PHA depolymerase knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. Bioresour Technol. **100**(7): 2265-2270.
- Cho, C.-H.; Jeong, S.-J., Kim, J.W. 1994. Stimulation of poly(3-hydroxybutyrate) degradation by nitrogen nutrient in *Alcaligenes eutrophus* H16. Korean Biochem. J. **27**: 316-322.
- Choi, J.-I.; Lee, S.-Y.; Han, K. 1998. Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of Poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. **64**(12): 4897-903.
- Copeland, A.; Lucas, S.; Lapidus, A.; Glavina del Rio, T.; Dalin, E.; Tice, H.; Bruce, D.; Goodwin, L.; Pitluck, S.; Kiss, H.; Brettin, T.; Detter, J.C.; Han, C.; Kuske, C.R.; Schmutz, J.; Larimer, F.; Land, M.; Hauser, L.; Kyrpides, N.; Mikhailova, N.; Marx, C.J.; Richardson, P. 2008. Complete sequence of chromosome of *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831. EMBL/GenBank/DBJ databases.
- Cramm, R. 2009. Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **16**: 38-52.

- Davis, D.H., Doudoroff, M.; Stanier, R.Y.; Mandel, M. 1969. Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: Taxonomic implications. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**: 375-390.
- de Almeida, A.; Nikel, P.I.; Giordano, A.M.; Pettinari, M.J. 2007. Effects of granule-associated protein PhaP on glycerol-dependent growth and polymer production in poly(3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73(24)**: 7912-7916.
- de Eugenio, L.I.; García, P.; Luengo, J.M.; Sanz, J.M.; Román, J.S.; García, J.L.; Prieto, M.A. 2007. Biochemical evidence that *phaZ* gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: characterization of a paradigmatic enzyme. *J Biol Chem.* **282(7)**:4951-4962
- Dennis, D.; Liebig, C.; Holley, T.; Thomas, K.S.; Khosla, A.; Wilson, D.; Augustine, B. 2003. Preliminary analysis of polyhydroxyalkanoate inclusions using atomic force microscopy. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**: 113-116.
- Dennis, D.; Sein, V.; Martinez, E.; Augustine, B. 2008. PhaP is involved in the formation of a network on the surface of polyhydroxyalkanoate inclusions in *Cupriavidus necator* H16. *J Bacteriol.* **190(2)**: 555-63.
- Doi, Y.; Segawa, A.; Kawaguchi, Y.; Kunioka, M. 1990. Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 165-170.
- Durst, H.D.; Milano, M.; Kikta, E.J Jr.; Connelly, S.A.; Grushka, E. 1975. Phenacyl esters of fatty acids via crown ether catalysts for enhanced ultraviolet detection in liquid chromatography. *Anal. Chem.* **47(11)**:1797-1801.
- Elbanna, K.; Lütke-Eversloh, T.; Jendrossek, D.; Luftmann, H.; Steinbüchel A. 2004. Studies on the biodegradability of polythioester copolymers and homopolymers by polyhydroxyalkanoate (PHA)-degrading bacteria and PHA depolymerases. *Arch Microbiol.* **182(2-3)**:212-25.
- Foster, L.J.R.; Lenz, R.W.; Fuller, R.C. 1994. Quantitative determination of intracellular depolymerase activity in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing poly-3-hydroxyalkanoates with long alkyl substituents. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**: 279-282.
- Foster, L.J.R.; Lenz, R.W.; Fuller, R.C. 1999. Intracellular depolymerase activity in isolated inclusion bodies containing polyhydroxyalkanoates with long alkyl and functional substituents in the side chain. *Int. J. Biol. Macromol.* **26**: 187-192.
- Foster, L.J.R.; Stuart, E.S.; Tehrani, A.; Lenz, R.W.; Fuller, R.C. 1996. Intracellular depolymerase and polyhydroxyoctanoate granule integrity in *Pseudomonas oleovorans*. *Int. J. Biol. Macromol.* **19**: 177-183.
- Gao, D.; Maehara, A.; Yamane, T.; Ueda, S. 2001. Identification of the intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase gene of *Paracoccus denitrificans* and some properties of the gene product. *FEMS Microbiol. Lett.* **196**: 159-164.
- Gebauer, B.; Jendrossek, D. 2006. Assay of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase activity and product determination. *Appl Environ Microbiol.* **72(9)**: 6094-100.
- Genser, K.F.; Renner, G.; Schwab, H. 1998. Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis genes from *Alcaligenes latus* DSM1124. *J Biotechnol.* **64(2-3)**: 125-35.

- Gerngross, T.U.; Reilly, P.; Stubbe, J.; Sinskey, A.J.; Peoples, O.P. 1993. Immunocytochemical analysis of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthase in *Alcaligenes eutrophus* H16: localization of the synthase enzyme at the surface of PHB granules. *J. Bacteriol.* **16**: 5289-5293.
- Graumann, P.L. 2007. Cytoskeletal elements in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 589-618.
- Griebel, R.J.; Smith, Z.; Merrick, J.M. 1968. Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate. I. Purification, composition and properties of native poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* **7**:3676-3681.
- Griebel, R.J.; Merrick, J.M. 1971. Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate: effect of mild alkaline extraction on native poly- β -hydroxybutyrate granules. *J. Bacteriol.* **108 (2)**: 782-789.
- Günther, Michael 2005. Studienarbeit AG Jendrossek. Universität Stuttgart.
- Hänisch, J.; Wältermann, M.; Robenek, H.; Steinbüchel, A. 2006. The *Ralstonia eutropha* H16 phasin PhaP1 is targeted to intracellular triacylglycerol inclusions in *Rhodococcus opacus* PD630 and *Mycobacterium smegmatis* mc²155, and provides an anchor to target other proteins. *Microbiol.* **152**: 3271-3280.
- Handrick, R. 2003. Neuartige Poly(3-Hydroxybutyrat) Depolymerasen aus *Paucimonas lemoignei* und *Rhodospirillum rubrum*. Dissertation Universität Stuttgart, 2003
- Handrick, R.; Reinhardt, S.; Focarete, M.L.; Scandola, M.; Adamus, G. et al. 2001. A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short-chain-length hydroxyalkanoic acids. *J. Biol. Chem.* **276**:36215-36224.
- Handrick, R.; Reinhardt, S.; Jendrossek, D. 2000. Mobilization of Poly(3-Hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* **182**: 5916-5918.
- Handrick, R.; Reinhardt, S.; Kimmig, P. und Jendrossek, D. 2004b. The „Intracellular“ Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. *J. Bacteriol.* **186**:7243-7253.
- Handrick, R.; Reinhardt, S.; Schultheiss, D.; Reichart, T.; Schüler, D.; Jendrossek, V. und Jendrossek, D. 2004a. Unraveling the function of the *Rhodospirillum rubrum* Activator of Polyhydroxybutyrate (PHB) Degradation: the Activator is a PHB-Granula-Bound Protein (Phasin). *J. Bacteriol.* **186**:2466-2475.
- Handrick, R.; Technow, U.; Reichart, T.; Reinhardt, S.; Sander, T.; Jendrossek, D. 2004. The activator of the *Rhodospirillum rubrum* PHB depolymerase is a polypeptide that is extremely resistant to high temperature (121°C) and other physical or chemical stresses. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**: 265-274.
- Hermawan, S.; Jendrossek, D. 2007. Microscopical investigation of poly(3-hydroxybutyrate) granule formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol Lett.* **266(1)**: 60-64.
- Hippe, H. 1967. Abbau und Wiederverwertung von Poly- β -hydroxybuttersäure durch *Hydrogenomonas* H16. *Archiv für Mikrobiol.* **56**: 248-277.
- Hippe, H.; Schlegel, H.G. 1967. Hydrolyse von PHBS durch intracelluläre Depolymerase von *Hydrogenomonas* H16. *Archiv für Mikrobiol.* **56**: 278-299.
- Horowitz, D.M.; Sanders, J.K.M. 1994. Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: preparation, characterization and biological implications. *J. Am. Chem. Soc.* **116 (7)**: 2695-2702.

- Hrabak, O. 1992. Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate. FEMS Microbiol. Reviews 103: 251-256.
- Huisman, G.W.; Wonink, E.; Meima, R.; Kazemier, B.; Terpstra, P.; Witholt, B. 1991. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHA) by *Pseudomonas oleovorans*. J. Bio. Chem. **266(4)**: 2191-2198.
- James, B.W.; Mauchline, W.S.; Dennis, P.J.; Keevil, C.W.; Wait, R. 1999. Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an energy source for survival in low-nutrient environments. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 822-827.
- Jendrossek, D. 1998. Microbial degradation of polyesters: a review on extracellular poly(hydroxyalkanoic acid) depolymerises. Polymer Degradation and Stability **59**: 317-325.
- Jendrossek, D. 2001. Extracellular PHA depolymerases: the key enzymes of PHA degradation. In: Steinbüchel, A.; Doi, Y. (eds): Biopolymers, vol 3b, 41-83. Wiley-VCH: Weinheim.
- Jendrossek, D. 2005. Fluorescence microscopical investigation of Poly(3-hydroxybutyrate) granule formation in bacteria. Biomacromolecules **6**: 598-603.
- Jendrossek, D. 2007. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. Appl Microbiol Biotechnol. **74(6)**: 1186-96.
- Jendrossek, D. 2009. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). J. Bacteriol. **191**: 3195-3202.
- Jendrossek, D.; Backhaus, M.; Andermann, M. 1995. Characterization of the extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase of *Comamonas sp.* and of its structural gene. Can J Microbiol. **41(1)**:160-169.
- Jendrossek, D.; Frisse, A.; Behrends, A.; Andermann, M.; Kratzin, H.D.; Stanislawski, T.; Schlegel, H.G. 1995. Biochemical and molecular characterization of the *Pseudomonas lemoignei* polyhydroxyalkanoate depolymerase system. J. Bacteriol. **177**: 596-607.
- Jendrossek, D.; Handrick, R. 2001. Diversität bakterieller PHB-Depolymerasen am Beispiel von *Paucimonas gen. Nov. lemoignei* comb. nov.. Biospektrum 6/01: 521-526.
- Jendrossek, D.; Handrick, R. 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. Annu. Rev. Microbiol. **56**:403-432.
- Jendrossek, D.; Knoke, I.; Habibian, R.B.; Steinbüchel, A.; Schlegel, H.G. 1993. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purification of a novel PHB depolymerase from *Comamonas sp.* J. Environ. Polymer Degrad. **1(1)**: 53-63.
- Jendrossek, D.; Müller, B. und Schlegel, H.G. 1993. Cloning and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid)-depolymerase gene locus, *phaZ1*, of *Pseudomonase lemoignei* and its gene product. Eur. J. Biochem. **218**:701-710.
- Jendrossek, D.; Schirmer, A. und Schlegel, H.G. 1996. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. Appl. Microbiol. Biotechnol. **46**:451-463.
- Jendrossek, D.; Schirmer, A.; Handrick, R. 1996. Recent advances in characterization of bacterial PHA depolymerases. Internat. Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates.
- Jendrossek, D.; Schirmer, A.; Schlegel, H.G. 1996. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. Appl Microbiol Biotechnol. **46(5-6)**: 451-63

- Jendrossek, D.; Selchow, O.; Hoppert, M. 2007. Poly(3-hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane in *Caryophanon latum*. Appl Environ Microbiol. **73(2)**: 586-93.
- Jendrossek, D.; Steinbüchel, A.; Schlegel, H.G. 1987. Three different proteins exhibiting NAD-dependent acetaldehyde dehydrogenase activity from *Alcaligenes eutrophus*. Eur. J. Biochem. **167**: 541-548.
- Karr, D.B.; Waters, J.K.; Emerich, D.W. 1983. Analysis of poly- β -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. Appl. Environ. Microbiol. **46**:1339-1344.
- Kawaguchi, Y.; Doi, Y. 1990. Structure of native poly(3-hydroxybutyrate) granules by X-ray diffraction. FEMS Microbiol. Lett. **70**: 401-407.
- Kim, M.; Cho, K.-S.; Ryu, H.W.; Lee, E.G.; Chang Y.K. 2003. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. Biotechnol. Lett. **25**: 55-59
- Kimmig, Philipp 2005. Studienarbeit AG Jendrossek. Universität Stuttgart.
- Klapper, M.H. 1977. The independent distribution of amino acid near neighbor pairs into polypeptides. Biochem Biophys Res Commun. **78**: 1018-24.
- Knoll, M.; Hamm, T.; Wagner, F.; Martinez, V.; Pleiss, J. 2009. The PHA depolymerase engineering database: a systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. BMC Bioinformatics **10**: 89
- Kobayashi, T.; Nishikori, K.; Saito, T. 2004. Properties of an intracellular poly(3-hydroxy-butyrat)e depolymerase (PhaZ1) from *Rhodobacter spheroids*. Current Microbiol. **49**: 199-202.
- Kobayashi, T.; Saito, T. 2003. Catalytic triad of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ1) in *Ralstonia eutropha* H16. J Biosci Bioeng. **96(5)**: 487-92.
- Kobayashi, T.; Shiraki, M.; Abe, T.; Sugiyama, A. und Saito, T. 2003. Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its identification as a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate)depolymerase. J. Bacteriol. **185**: 3485-3490.
- Kobayashi, T.; Uchino, K.; Abe, T.; Yamazaki, Y.; Saito, T. 2005. Novel Intracellular 3-Hydroxybutyrate-Oligomer Hydrolase in *Wautersia eutropha* H16. J. Bacteriol. **187**: 5129-5135.
- Kuchta, K.; Chi, L.; Fuchs, H.; Pötter, M.; Steinbüchel, A. 2007. Studies on the Influence of Phasins on Accumulation and Degradation of PHB and Nanostructure of PHB Granules in *Ralstonia eutropha* H16. Biomacromol. **8**: 657-662.
- Lawrence, A.G.; Schoenheit, J.; He, A.; Tian, J.; Liu, P.; Stubbe, J.A.; Sinskey, A.J. 2005. Transcriptional analysis of *Ralstonia eutropha* genes related to poly-R-3-hydroxybutyrate homeostasis during batch fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **68**: 663-672.
- Lee, S.Y.; Lee, Y.; Wang, F. 1999. Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals. Biotechnol Bioeng. **65(3)**: 363-8.
- Lee, S.Y.; Lee, Y. 2003. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of enantiomerically pure (R)-(-)-hydroxycarboxylic acids. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 3421-3426.

- Lee, Y.-H.; Seo, I.-S.; Jung, Y.-M.; Huh, T.-L. 2000. Construction of transformant *Alcaligenes latus* enforcing its own cloned phbC gene and characterization of poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis. *Biotechnol. Lett.* **22**: 961-967.
- Lemoigne, M. 1926. Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide β -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **8** : 770-782.
- Lenz, W.R.; Marchessault R.H. 2005. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules.* **6(1)**: 1-8
- Liebergesell, M.; Hustede, E.; Timm, A.; Steinbüchel, A.; Fuller, R.C.; Lenz, R.W.; Schlegel, H.G. 1991. Formation of poly(3-hydroxyalkanoates) by phototropic and chemolithotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* **155**: 415-421.
- Makkar, N.S.; Casida, L.E. 1987. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 323-326.
- Madison, L.L.; Huisman, G.W. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63(1)**: 21-53.
- Martin, D.P.; Williams, S.F. 2003. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Eng. J.* **16**: 97-105.
- Masamune, S.; Palmer, M.A.J.; Gamboni, R.; Thompson, S.; Davis, J.T.; Williams, S.F.; Peoples, O.P.; Sinskey, A.J.; Walsh, C.T. 1989. Bio-Claisen condensation catalyzed by thiolase from *Zoogloea ramigera*. Active site cysteine residues. *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 1879-1881
- Mathieu, M.; Zeelen, J.P.; Pauptit, R. A.; Erdmann, R.; Kunau, W.H.; Wierenga, R.K. 1994. The 2.8 Å crystal structure of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*: a five-layered alpha beta alpha beta alpha structure constructed from two core domains of identical topology. *Structure* **2**: 797-808.
- Matsumoto, K.; Nagao, R.; Murata, T.; Arai, Y.; Kichise, T.; Nakashita, H.; Taguchi, S.; Shimada, H.; Doi, Y. 2005. Enhancement of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production in the transgenic *Arabidopsis thaliana* by the in vitro evolved highly active mutants of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase from *Aeromonas caviae*. *Biomacromolecules* **6**: 2126-2130.
- Mayer, F.; Madkour, M.H.; Pieper-Fürst, U.; Wieczorek, R.; Liebergesell, M.; Steinbüchel, A. 1996. Electron microscopic observations on the macromolecular organization of the boundary layer of bacterial PHA inclusion bodies. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **42**: 445-455.
- Mayer, F.; Hoppert, M.J. 1997. Determination of the thickness of the boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies, and implications for models describing the molecular architecture of this layer. *J. Basic Microbiol.* **37**: 45
- McCool, G.J.; Cannon, M.C. 1999. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **181**: 585-592.
- Merrick, J.M.; Doudoroff, M. 1964. Depolymerization of poly- β -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *J. Bacteriol.* **88(1)**: 60-71.
- Merrick, J.M.; Steger, R.; Dombroski, D. 1999. Hydrolysis of native poly(hydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *Int. J. Biol. Macromol.* **25**: 129-134

- Minkler, P.E.; Kerner, J.; Ingalls, S.T.; Hoppel, C.L. 2008. Novel isolation procedure for short-, medium, and long-chain acyl-coenzyme A esters from tissue. *Anal. Biochem.* **376**: 275-276.
- Modis, Y.; Wierenga, R.K. 1999. A biosynthetic thiolase in complex with a reaction intermediate: the crystal structure provides new insights into the catalytic mechanism. *Structure* **7**: 1279-1290.
- Molitoris, H.P.; Moss, S.T.; de Koning, G.J.M.; Jendrosseck D. 1996. Scanning electron microscopy of polyhydroxyalkanoate degradation by bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 570-579
- Neumann, L.; Spinozzi, F.; Sinibaldi, R.; Rustichelli, F.; Pötter, M.; Steinbüchel, A. 2008. Binding of the major phasin, PhaP1, from *Ralstonia eutropha* H16 to poly(3-hydroxybutyrate) granules. *J Bacteriol.* **190(8)**: 2911-2919.
- Nishimura, T.; Saito, T.; Tomita, K. 1978. Purification and properties of beta-ketothiolase from *Zoogloea ramigera*. *Arch Microbiol.* **116(1)**: 21-27
- Oeding, V.; Schlegel, H.G. 1973. β -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. *Biochem. J.* **134**: 239-248
- Peoples, O.P.; Sinskey, A.J. 1989a. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J Biol Chem.* **264(26)**: 15293-15297.
- Peoples, O.P.; Sinskey, A.J. 1989b. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *J Biol Chem.* **264(26)**: 15298-15303.
- Pfeiffer, D. 2009. Biochemische Charakterisierung des intrazellulären PHB-Abbaus bei *Azohydromonas lata*. Diplomarbeit Universität Stuttgart.
- Pieper-Fürst, U.; Madkour, M.H.; Mayer, F. und Steinbüchel, A. 1994. Identification of the region of a 14-kilodalton protein of *Rhodococcus ruber* that is responsible for the binding of this Phasin to polyhydroxyalkanoic acid granules. *J. Bacteriol.* **176**: 4328-4337.
- Pohlmann, A.; Fricke, W.F.; Reinecke, F.; Kusian, B.; Liesegang, H.; Cramm, R.; Eitinger, T.; Ewering, C.; Pötter, M.; Schwartz, E.; Strittmatter, A.; Voss, I.; Gottschalk, G.; Steinbüchel, A.; Friedrich, B.; Bowien, B. 2006. Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat Biotechnol.* **24(10)**: 1257-1262.
- Poirier, Y.; Erard, N.; MacDonald-Comber Petétot, J. 2001. Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* by using intermediates of fatty acid β -oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5254-5260.
- Pötter, M. 2004. Phasins – important proteins for poly(3-hydroxybutyrate) granule formation: biochemical and molecularbiological studies on occurrence and regulation in *Ralstonia eutropha*. Dissertation Universität Münster.
- Pötter, M.; Madkour, M.H., Mayer, F. und Steinbüchel, A. 2002. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* **148**: 2413-2426.
- Pötter, M.; Müller, H.; Reinecke, F.; Wiczorek, R.; Fricke, F.; Bowien, B.; Friedrich, B. und Steinbüchel, A. 2004. The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology.* **150**:2301-2311.

- Pötter, M.; Müller, H.; Steinbüchel, A. 2005. Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiol.* **151(3)**: 825-33.
- Pötter, M.; Steinbüchel, A. 2005. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules.* **6(2)**:552-60
- Pötter, M.; Steinbüchel, A. 2006. Biogenesis and structure of polyhydroxyalkanoate granules. In: Inclusion in procaryotes, *Microbiology Monographs* (1) (Springer), 109 – 136.
- Prieto, M.A. 2007. From oil to bioplastics, a dream come true? *J. Bacteriol.* **189**: 289-290.
- Reddy, C.S.K.; Ghai, R.; Rashmi; Kalia, V.C. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technol.* **87**: 137-146.
- Rehm, B.H.A.; Steinbüchel, A. 2002. PHA synthases: the key enzymes of PHA biosynthesis. In: Doi, Y.; Steinbüchel, A. (Eds.), *Biopolymers – Vol. 3A (Polyesters I – Biological systems and biotechnological production)*, WILEY-VCH, Weinheim, pp. 173-216.
- Reinecke, F.; Steinbüchel, A. 2009. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 91-108.
- Reinhardt, S.; Handrick, R.; Jendrossek, D. 2002. The "PHB depolymerase inhibitor" of *Paucimonas lemoignei* is a PHB depolymerase. *Biomacromolecules* **3(4)**: 823-827.
- Ren, Q.; Grubelnik, A.; Hoerler, M.; Ruth, K.; Hartmann, R.; Felber, H.; Zinn, M. 2005. Bacterial poly(hydroxyalkanoates) as a source of chiral hydroxyalkanoic acids. *Biomacromolecules* **6(4)**:2290-8.
- Ren, Q.; Guy de Roo, G.; Ruth, K.; Witholt, B.; Zinn, M.; Thöny-Meyer, L. 2009. Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation? *Biomacromol.* **10(4)**: 916–922
- Ruth, K.; Grubelnik, A.; Hartmann, R.; Egli, T.; Zinn, M.; Ren, Q. 2007. Efficient production of (R)-3-hydroxycarboxylic acids by biotechnological conversion of polyhydroxyalkanoates and their purification. *Biomacromolecules* **8(1)**: 279-86.
- Saito, T.; Fukui, T.; Ikeda, F.; Tanaka, Y.; Tomita, K. 1977. An NADP-linked acetoacetyl CoA reductase from *Zoogloea ramigera*. *Arch. Microbiol.* **114**: 211-217.
- Saegusa, H., Shiraki, M., Kanai, C. und Saito T. 2001. Cloning of an Intracellular Poly[D(-)-3-Hydroxybutyrate] Depolymerase Gene from *Ralstonia eutropha* H16 and Characterization of the Gene Product *J. Bacteriol.* **183**:94-100.
- Saito, T.; Kobayashi, T. 2002. Intracellular degradation of PHAs. In: Doi, Y. and Steinbüchel, A. (ed.), *Biopolymers, Vol. 3b: Polyesters II*, p. 23-40. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Saito, S.; Saegusa, H.; Miyata, Y.; Fukui, T. 1992. Intracellular degradation of poly(3-hydroxybutyrate) granules of *Zoogloea ramigera* I-16-M. *FEMS Microbiol. Rev.* **9**: 333-338.
- Saito, T.; Takizawa, K.; Saegusa, H. 1995. Intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Alcaligenes eutrophus*. *Can. J. Microbiol.* **41 (Suppl. 1)**: 187-191.
- Schöber, U.; Thiel, C.; Jendrossek, D. 2000. Poly(3-hydroxyvalerate) depolymerase of *Pseudomonas lemoignei*. *Appl Environ Microbiol.* **66(4)**:1385-1392.

- Schubert, P.; Steinbüchel, A.; Schlegel, H.G. 1988. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *E. coli*. J. Bacteriol. **170**(12): 5837-5847.
- Schwartz, E.; Henne, A.; Cramm, R.; Eitinger, T.; Friedrich, B.; Gottschalk, G. 2003. Complete nucleotide sequence of pHG1: a *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H₂-based lithoautotrophy and anaerobiosis. J. Mol. Biol. **332**:369-383.
- Shirakura, Y.; Fukui, T.; Tanio, T.; Nakayama, K.; Matsuno, R.; Tomita, K. 1983. An extracellular D(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase from *Alcaligenes faecalis*. Biochim. Biophys. Acta. **748**: 331-339.
- Seo, I.-S.; Jung, Y.-M.; Lee, Y.-H. 2001. Production of P(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) and P(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate) using transformant *Alcaligenes latus* enforcing its own phbC gene. J. Microbiol. Biotechnol. **11**(2): 333-336.
- Shin, H.-D.; Oh, D.-H.; Jung, Y.-M.; Ghim, S.-Y.; Lee, Y.-H. 2002. Comparison of phbC genes cloned from *Ralstonia eutropha* and *Alcaligenes latus* for utilization in metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. Biotechnol. Lett. **24**: 539-545.
- Shiraki, M.; Endo, T.; Saito, T. 2006. Fermentative production of (R)-(-)-3-hydroxybutyrate using 3-hydroxybutyrate dehydrogenase null mutant of *Ralstonia eutropha* and recombinant *Escherichia coli*. J Biosci Bioeng. **102**(6): 529-34.
- Somleva, M. N.; Snell, K. D.; Beaulieu, J. J.; Peoples, O. P.; Garrison, B. R.; Patterson, N. A. 2008. Production of polyhydroxybutyrate in switchgrass, a value-added co-product in an important lignocellulosic biomass crop. Plant Biotechnol. J. **6**: 663-678
- Steinbüchel, A.; Aerts, K.; Babel, W.; Föllner, C.; Liebergesell, M. et al. 1995. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. Can. J. Microbiol. **41**(Suppl.1):94-105.
- Steinbüchel, A.; Hein, S. 2001. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **71**: 81-123.
- Stuart, E.S.; Foster, L.J.R.; Lenz, R.W.; Fuller, R.C. 1996. Intracellular depolymerase functionality and location in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing polyhydroxyoctanoate. Int. J. Biol. Macromol. **19**: 171-176.
- Stubbe, J.; Tian, J. 2003. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of PHA synthase. Nat Prod Rep. **20**(5): 445-57.
- Stubbe, J.; Tian, J.; He, A.; Sinskey, A.J.; Lawrence A.G.; Liu P. 2005. Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. Annu Rev Biochem. **74**: 433-80.
- Srinivasan, S.; Barnard, G. C.; Gerngross, T.U. 2002. A novel high-cell-density protein expression system based on *Ralstonia eutropha*. Appl Environ Microbiol **68**: 5925-5932.
- Sugiyama, A.; Kobayashi, T.; Shiraki, M.; Saito, T. 2004. Roles of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase and 3HB-oligomer hydrolase in bacterial PHB metabolism. Curr Microbiol. **48**(6):424-7.
- Su-Qin, C.; Shan, C.; Liu, D.-B.; Xia, H.-M. 2006. An extracellular poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Penicillium* sp. DS9713a-01. World Journ. Microbiol. Biotechnol. **22**: 729-735

- Taidi, B.; Mansfield, D.A.; Anderson, A.J. 1995. Turnover of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**: 201-206.
- Takanashi, M.; Shibahara, T.; Shiraki, M.; Saito, T. 2004. Biochemical and genetic characterization of a D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Acidovorax sp.* strain SA1. *J. Biosci. Bioeng.* **97**: 78-81.
- Tian, J.; He, A.; Lawrence, A.G.; Liu, P.; Watson, N.; Sinskey, A.J.; Stubbe, J. 2005. Analysis of transient polyhydroxybutyrate production in *Wautersia eutropha* H16 by quantitative western analysis and transmission electron microscopy. *J. Bacteriol.* **187**: 3825-3832.
- Tian, J.; Sinskey, A.J.; Stubbe, J. 2005. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy. *J. Bacteriol.* **187(11)**: 3814-3824.
- Tomasi, G.; Scandola, M.; Briese, B.H.; Jendrossek, D. 1996. Enzymatic Degradation of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate) by a Depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*. *Macromol.* **29 (2)**: 507-513.
- Tseng, C.L.; Chen, H.J.; Shaw, G.C. 2006. *Identification and characterization of the Bacillus thuringiensis phaZ gene, encoding new intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase.* *J. Bacteriol.* **188(21)**: 7592-9.
- Uchino, K.; Saito, T. 2006. Thiolysis of poly(3-hydroxybutyrate) with polyhydroxyalkanoate synthase from *Ralstonia eutropha*. *J. Biochem. (Tokyo)* **139 (3)**:615-21.
- Uchino, K.; Saito, T.; Gebauer, B.; Jendrossek, D. 2007. Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA. *J. Bacteriol.* **189(22)**: 8250-8256.
- Uchino, K.; Saito, T.; Jendrossek, D. 2008. Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *App. Environ. Microbiol.* **74**: 1058-1063.
- Vandamme, P.; Coenye, T. 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2285-2289.
- Vanechoutte, M.; Kämpfer, P.; De Baere, T.; Falsen, E.; Verschraegen, G. 2004. *Wautersia gen. nov.*, a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia [Pseudomonas] syzygii* (Roberts et al. 1990) *comb. nov.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 317-327.
- Wang, L.; Armbruster, W.; Jendrossek, D. 2007. Production of medium-chain-length hydroxyalkanoic acids from *Pseudomonas putida* in pH stat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75(5)**: 1047-1053.
- Wieczorek, R.; Pries, A.; Steinbüchel, A und Mayer, F. 1995. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **177**: 2425-2435.
- Wilde, E. 1962. Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydro-genomonas*. *Arch. Microbiol.* **43**: 109-137.
- Williamson, D.H.; Wilkinson, J.F. 1958. The isolation and estimation of the poly- β -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* **19**: 198-209.

- Wu, Q.; Wang, Y.; Chen, G.Q. 2009. Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* **37**:1-12.
- Yabuuchi, E.; Kosako, Y.; Yano, I.; Hotta, H.; Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* *gen. Nov.*: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) *comb. Nov.*, *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) *comb. Nov.* and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) *comb. Nov.* *Microbiol Immunol.* **39**: 897-904.
- Yamane, T.; Chen, X.; Ueda, S. 1996. Growth-Associated Production of Poly(3-Hydroxyvalerate) from n-Pentanol by a Methylophilic Bacterium, *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol.* **62**(2):380-384.
- Yoon, S.C.; Choi, M.H. 1999. Local sequence dependence of polyhydroxyalkanoic acid degradation in *Hydrogenophaga pseudoflava*. *J. Biol. Chem.* **274**/53: 37800-37808.
- York, G.M.; Lupberger, J.; Tian, J.; Lawrence, A.G.; Stubbe, J.; Sinskey, A.J. 2003. *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular poly[d-(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes. *J. Bacteriol.* **185**:3788-3794.
- York, G.M.; Stubbe, J.; Sinskey, A.J. 2002. The *Ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. *J. Bacteriol.* **184**:59-66
- York, G.M.; Stubbe, J.A.; Sinskey, A.J. 2001. New insight into the role of the PhaP Phasin of *Ralstonia eutropha* in promoting synthesis of polyhydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* **183**: 2394-2397.
- Zinn, M.; Witholt, B.; Egli, T. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**: 5-21.

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Jendrossek für die Betreuung meiner Dissertation bedanken. Die zahlreichen Gespräche mit ihm haben mich immer wieder ermutigt und neue Lösungsansätze entdecken lassen. Viel zur Motivation beigetragen hat auch der von ihm ermöglichte Besuch der Fachtagung ISBP 2006 in Minneapolis.

Herrn Prof. Dr. Georg Sprenger danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut arbeiten zu können und für die Denkanstöße im Rahmen der Gespräche zum Halbjahresbericht und der Seminarvorträge.

Viel Zeit und Geduld hat Herr Dr. Wolfgang Armbruster vom Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hohenheim für die Messung meiner zahlreichen HPLC-MS-Proben aufgebracht. Dafür ein besonderes Dankeschön.

Wie kleinste Kügelchen vermessen werden, zeigten mir Marion Herz, Tino Schreiber und Klaus Niedergall. Sie wiesen mich in die Handhabung des PCS-Gerätes des IGB-Fraunhofer Institutes Stuttgart ein, vielen Dank.

Am Beginn meiner Arbeit stand die Gewinnung von viel, viel PHB. Mit Hilfe und nächtlichem Einsatz von Prof. Martin Siemann und Andreas Freund konnte ich am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart dann auch tatsächlich kiloweise *R. eutropha*-Zellen ernten. Danke schön!

Ohne nette Kollegen, die mit einem ihr steriles Medium – aber auch ihre Kekse - teilen, ist die Arbeit nur halb so schön. Daher ein herzliches Dankeschön allen Mitarbeitern des Institutes für Ihre Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre, besonders natürlich dem Team aus Labor 2. Dabei möchte ich zwei Kollegen besonders danken: Simone Reinhardt, die mir sehr geduldig vom ersten Tag an viele Tipps und Tricks fürs Labor vermittelt und mir bei vielen Versuchen geholfen hat. Und Manuela Unsin für ihre Mitarbeit bei zahlreichen Projekten, fürs Diskutieren, fürs Teilen von Freud („Eine Traum-Bande!“) und Leid („Wieso wachsen die schon wieder nicht?“) und die Versorgung mit Kaffee, Lindt-Schokolade und Klettergeschichten.

Und zum Schluss: ein herzliches Dankeschön an meine Familie und an meine Freunde!