



Doctoral Thesis

Isolierung und Sequenzanalyse der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus *Bacillus megaterium*

Author(s):

Portmann, Werner

Publication Date:

1986

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000383744> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 7953

ISOLIERUNG UND SEQUENZANALYSE DER GLYCERINALDEHYD-3-PHOSPHAT-
DEHYDROGENASE AUS BACILLUS MEGATERIUM

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

vorgelegt von
Werner Portmann
Dipl. Natw. ETH
geboren am 26. Februar 1954
von Doppleschwand

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. H. Zuber, Referent

Prof. Dr. H. Dutler, Korreferent

1986

9 ZUSAMMENFASSUNG

Durch Züchtung des *Bacillus megaterium* unter Sauerstofflimitation konnte die Ausbeute an Units GAPDH/Gramm Zelle um einen Faktor 5-10 gegenüber Zellen, die ohne O₂-Limitation gezüchtet worden waren, erhöht werden. Durch den Ersatz des BHI-Mediums durch ein selber zusammengestelltes Kulturmedium konnten zudem die Kosten/Liter Kulturmedium auf ca. einen Fünftel reduziert und gleichzeitig die Ausbeute an Zellen deutlich erhöht werden.

Für die Isolation der GAPDH aus *B. megaterium* wurde ein Zweischnittverfahren, fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und Affinitätschromatographie, erarbeitet. Dafür musste die in der Literatur beschriebene Synthese der NAD-Sepharose verbessert werden. Mit diesem Verfahren konnte nicht nur die GAPDH aus *B. megaterium*, sondern auch diejenige aus *B. psychrosaccharolyticus* isoliert werden.

Schon der Vergleich der Aminosäurezusammensetzungen deutete auf eine aussergewöhnlich hohe Homologie zwischen den bacillären GAPDHs hin. Durch Hydrazinolyse konnte die C-terminale Aminosäure nicht definitiv bestimmt werden, die Resultate waren aber so ähnlich, dass davon ausgegangen werden kann, dass die C-terminale Aminosäure der GAPDHs aus *B. megaterium*, *B. coagulans* und *B. psychrosaccharolyticus* identisch ist.

Durch Spaltung des Enzyms aus *B. megaterium* mit BNPS-Skatol konnten drei aus Homologiegründen erwartete Fragmente erhalten werden, wovon das C-terminale Fragment vollständig, das heisst inklusive der C-terminalen Aminosäure sequenziert werden konnte.

Durch Spaltung des gleichen Enzyms mit BrCN und Auftrennung der Fragmente auf der HPLC konnten fünf der sechs grossen Peptide rein isoliert und sequenziert werden. Die Sequenzanalysen wurden auf einem Gasphasensequenator durchgeführt; mit den Peptidmengen aus einem HPLC-Lauf konnten 2-3 Sequenatorläufe durchgeführt werden.

Von den durch Hydroxylamin-Spaltung erzeugten Fragmenten konnte nur das grösste mit der HPLC rein isoliert werden, es konnten aber nur wenige Aminosäuren identifiziert werden. Mit den andern Fragmenten konnte durch die grosse Homologie der GAPDH aus *B. megaterium* mit derjenigen aus *B. stearothermophilus* die NG-Stellen lokalisiert werden und durch Sequenzieren von Peptidgemischen konnten neben schon bekannten Sequenzen einige weitere Aminosäuren identifiziert werden.

In den 200 bis jetzt identifizierten Aminosäuren der Sequenz des *B. megaterium*s wurden 33 Austausche gegen die Sequenz des *B. stearothermophilus* gefunden. Das entspricht einer Homologie von 84%.

Neben den Sequenzen der GAPDH aus *B. megaterium* wurde folgende Sequenzen ermittelt: die N-terminale Sequenz der GAPDH aus *B. psychrosaccharolyticus* und das C-terminale Tryptophanfragment der GAPDH aus *B. coagulans*, das durch Spaltung mit BNPS-Skatol erhalten wurde.

10 SUMMARY

Bacillus megaterium was cultivated with special conditions, O₂-limitation, to increase the yield of units GAPDH/gram cells 5 to 10 fold. The expensive culture medium BHI was replaced by another one, which was about five times cheaper. In the same time the yield of cells/liter medium increased significantly.

For the isolation of the GAPDH of *B. megaterium* a two step purification could be established: Fractionated ammonium sulfate precipitation and affinity chromatography. For that it was necessary to optimise the syntheses of the NAD-sepharose described in the literature. This purification could be used for the isolation of the GAPDH of *B. psychrosaccharolyticus* too.

The comparison of the amino acid analyses of the GAPDHs from several bacilli showed a very high homology between each other. The c-terminal amino acid could not be identified by hydrazinolysis, but the results were as similar, that one can assume, that the GAPDHs from *B. megaterium*, *B. coagulans* and *B. psychrosaccharolyticus* have the same amino acid at the c-terminus.

After cleavage of the enzyme of *B. megaterium* with BNPS-skatol the c-terminal fragment could be isolated and totally sequenced, including the c-terminal amino acid.

Five of the six large fragments generated by cyanogen bromide-cleavage could be separated on a HPLC and then sequenced with a gasphase

sequenator. From one HPLC run enough peptide material was obtained for two to three sequenator runs.

The separation of the fragments got by hydroxyl amin cleavage didn't work as well on the HPLC. Only the biggest fragment could be isolated pure, unfortunately only a few amino acids could be identified. With the other peaks of the elution pattern of the HPLC the positions of the NG-sequences could be established because of the high homology with the sequence of the GAPDHs from *B. stearothermophilus*. By sequencing peptide mixtures one could identify together with already known sequences some new amino acids.

In the 200 amino acids already known of the GAPDH of *B. megaterium* only 33 exchanges against the sequence of the enzyme of *B. stearthermophilus* could be seen; that means that the homology between these two sequences is 84%.

Beside the sequence of the GAPDH of *B. megaterium* the following sequences were done: The n-terminal sequence of the GAPDH of *B. psychrosaccharolyticus* and the c-terminal tryptophan-fragment of the GAPDH of *B. coagulans* got by BNPS-skatol-cleavage.