

# **Mikrobielle Biosynthese**

## **Fermentative und chemoenzymatische Synthese zur Erzeugung komplexer Terpene und Polyketidderivate**

### **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. Nat.)

an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie  
der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Julia Arens

aus Warstein

Dortmund

Mai 2015

Dekanin:

Prof. Dr. Insa Melle

1. Gutachter:

Prof. Dr. Frank Schulz

2. Gutachterin:

Prof. Dr. Susanne Brakmann



---

Diese Arbeit wurde in der Zeit von November 2011 bis Mai 2015 unter der Leitung von Prof. Dr. Frank Schulz in den Laboren des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie in Dortmund und der Fakultät für Chemie und Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum angefertigt.

Eingereicht am: 26.05.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2015

---

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht oder wurden zur Veröffentlichung eingereicht:

J Arens, B Engels, S Klopries, S Jennewein, C Ottmann, F Schulz, *Exploration of biosynthetic access to the shared precursor of the fusicoccane diterpenoid family*  
*Chem Commun*, **2013**, 49, 4337-4339

J Arens, D Bergs, M Mewes, J Merz, G Schembecker, F Schulz, *Heterologous fermentation of a diterpene from *Alternaria brassicicola**  
*Mycology*, **2014**, 5, 207-219

K Bravo-Rodriguez, S Klopries, K R M Koopmans, U Sundermann, S Yahiaoui, J Arens, S Kushnir, F Schulz, E Sanchez-Garcia, *Substrate flexibility of a mutated acyltransferase domain and implications for polyketide biosynthesis*  
*Chemistry & Biology*, **2015**, im Druck

S Klopries, K Bravo-Rodriguez, K R M Koopmans, U Sundermann, S Yahiaoui, J Arens, S Kushnir, E Sanchez-Garcia, F Schulz, *Data in support of Substrate flexibility of a mutated acyltransferase domain and implications for polyketide biosynthesis*  
*Data in brief*, **2015**, im Druck

---

Ohne die Mitwirkung zahlreicher Personen, wäre diese Arbeit wohl nie in dieser Form entstanden:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Frank Schulz danke ich für die Themenstellung und die Möglichkeit diese facettenreiche Arbeit in seiner Gruppe durchgeführt haben zu dürfen. Insbesondere bedanke ich mich für sein entgegengebrachtes Vertrauen und die gewährte Freiheit sowie die Unterstützung bei der Bearbeitung der Themen.

Bei Frau Prof. Dr. Susanne Brakmann bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann danke ich, dass ich große Teile der Experimente in seinen Laboren durchführen und die gesamte Promotionszeit über von der Infrastruktur seiner Abteilung profitieren durfte.

Besonders möchte ich mich bei Kyra Koopmans bedanken, die mich beim AT6-Projekt ins Boot geholt, mich viel über Actinomyceten gelehrt und stets anstandslos meine Poster, Artikel sowie schließlich meine Dissertation korrigiert hat. Danke Kyra, für die lustigen gemeinsamen Stunden im Labor und in der Freizeit, dass Du eine gute Freundin bist und ich mich immer auf dich verlassen kann!

Außerdem bedanke ich mich bei meinen ehemaligen Master- und Bachelorstudenten Michael Dirkmann, Hendrik Ebke, Mirja Mewes, Arsenij Kokorin und Pina Eichert für die Zusammenarbeit und die erbrachten Leistungen in vielen Teilprojekten dieser Dissertation. Es hat mir wirklich Spaß gemacht Euch zu betreuen.

Ein besonderer Dank gilt Michael, der als mein Nachfolger nun das Mevalonatwegprojekt bearbeitet. Danke für die vielen persönlichen und fachlichen Gespräche sowie für die gründliche Korrektur dieser Arbeit.

Bei Dr. Stephan Klopries bedanke ich mich für die Hilfe bei chemischen Fragestellungen, für die Mitarbeit an der Derivatisierung des FCdiens, für die Bereitstellung der synthetischen Bausteine für das AT6- und Monensinprojekt sowie für viele witzige Diskussionen.

Auch bei Dr. Susanna Kushnir und Dr. Uschi Sundermann möchte ich mich für viele wertvolle Tipps bedanken.

---

Ahmed Ali danke ich für die Zusammenarbeit im Monensinprojekt sowie Niclas Pryk für die Bereitstellung von synthetischen Bausteinen im AT6-Projekt.

Bei meinen Praktikanten Janina Krause, Robin Dorau und Oliver Lampret möchte ich mich ebenfalls für ihre Mitarbeit bedanken.

Dem Analytikteam des Max-Planck-Instituts, insbesondere Dr. Petra Janning und Jens Warmers, danke ich für die Hilfe und Kooperation bei zahlreichen Messungen.

Den Kooperationspartnern in den Arbeitskreisen C. Ottmann, S. Jennewein, G. Schembecker, J. Merz, R. Wichmann, S. Höbenreich und E. Sanchez-Garcia danke ich herzlich für die spannenden Diskussionen und die fruchtbare Zusammenarbeit in vielen Bereichen dieser Dissertation.

Ebenso danke ich allen Arbeitskreisen, die mir Plasmide oder Stämme bereitgestellt haben.

Allen weiteren Mitgliedern des Arbeitskreises Schulz, der Abteilung Waldmann oder Personen aus den Kooperationsarbeitskreisen, die keine persönliche Erwähnung gefunden haben, danke ich für die Arbeitsatmosphäre, für die tolle Zusammenarbeit oder die entspannenden Mittags- sowie Kaffeepausen.

Dem IMPRS-Team danke ich für die Möglichkeit viele interessante Seminare und Konferenzen besucht haben zu dürfen. Insbesondere bedanke ich mich bei Christa Hornemann für ihre große Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der chemischen Industrie e.V. danke ich für die Gewährung meines Doktoranden-Stipendiums, sowie ebenfalls für die finanzielle Unterstützung für den Besuch verschiedener Konferenzen.

Der größte Dank gilt meiner Familie:

meinem Freund Sebastian, meinen Eltern, meinen Geschwistern Verena und Andreas sowie meiner Nichte Marie. Ohne Eure Unterstützung wäre ich nicht so weit gekommen! Danke Sebastian, dass Du mich auch als schlecht gelaunte Julia magst!

Vielen, vielen DANK!

---

Für Sebastian.

„Once you become informed, you start seeing complexities and shades of gray. You realize that nothing is as clear and simple as it first appears.”  
(Calvin aus William B. Wattersons II “Calvin & Hobbes”)





## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>Naturstoffe</b> .....	<b>3</b>
1.1	Terpene und Terpenoide .....	4
1.1.1	Terpenoidbiosynthese .....	5
1.1.2	Die Terpenfamilie der Fusicoccane .....	11
1.2	Polyketide.....	16
1.2.1	Polyketidbiosynthese .....	17
<b>2</b>	<b>Herausforderungen in der Naturstoffforschung</b> .....	<b>22</b>
<b>III</b>	<b>ZIELSETZUNG</b> .....	<b>24</b>
<b>IV</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>26</b>
<b>1</b>	<b>Heterologe Fermentation des Diterpens FCdien</b> .....	<b>26</b>
1.1	Vorarbeiten und heterologe Fermentation des FCdiens in verschiedenen Stämmen.....	27
1.1.1	Manuelle Überlagerung des Ringsystems des Fusicoccin A mit dem Ringsystem des FCdiens.....	27
1.1.2	Erzeugung eines stabilen, für die FS codierenden Konstrukts als Grundlage zur Klonierung verschiedener Expressionsplasmide.....	28
1.1.3	Fermentation des FCdiens durch <i>E. coli</i> .....	29
1.1.4	Fermentation des FCdiens durch <i>Aspergillus nidulans</i> .....	31
1.1.5	Fermentation des FCdiens durch <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	34
1.2	Versuche zur Skalierung und Übertragung der FCdien-Fermentation in einen Bioreaktor .....	40
1.3	Optimierung der FCdien-Fermentation durch <i>S. cerevisiae</i> .....	43
1.3.1	Etablierung einer Standardsubstanz zur Quantifizierung des FCdiens über GC-FID/MS.....	43
1.3.2	Verwendung eines für <i>S. cerevisiae</i> codonoptimierten <i>abfs</i> -Gens .....	44
1.3.3	Systematische Variierung der Fermentationsparameter .....	45

1.3.4	Übertragung der FCdien-Fermentation im Selektivmedium SD-His-Leu-Ura in einen Bioreaktor .....	57
1.3.5	Optimierung der integrierten Produktgewinnung bei der FCdien-Fermentation.....	60
1.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	64
<b>2</b>	<b>Untersuchungen zur löslichen Expression der AbFS .....</b>	<b>70</b>
2.1	Variationen des <i>E. coli</i> -Expressionssystems .....	71
2.1.1	Variation des Vektorsystems .....	71
2.1.2	Variation des Expressionsstamms und Koexpression von Chaperonen .....	74
2.2	Gerichtete Proteinevolution der AbFS .....	77
2.2.1	Wahl und Etablierung des Auswahlverfahrens zur Identifikation von AbFS-Varianten mit verbesserter Löslichkeit.....	79
2.2.2	Erzeugung von AbFS-Varianten.....	85
2.3	Untersuchungen einzelner Domänen der AbFS .....	92
2.3.1	Festlegung der Domänengrenzen in der AbFS .....	93
2.3.2	Expression und Aktivitätstests der einzelnen Domänen in <i>E. coli</i> .....	95
2.3.3	Gerichtete Proteinevolution der FCyc-Domäne .....	96
2.3.4	Testung der Enzymaktivität einzelner Domänen der AbFS in <i>S. cerevisiae</i> .....	102
2.4	Expression der AbFS in <i>Pichia pastoris</i> .....	104
2.4.1	Konstitutive Expression der AbFS mit Hilfe des pGAP-Vektorsystems .....	104
2.4.2	Induzierbare Expression der AbFS mit Hilfe des pPink-Vektorsystems .....	107
2.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	110
<b>3</b>	<b>Versuche zur Oxidation des FCdiens .....</b>	<b>112</b>
3.1	Oxidation des FCdiens mittels Varianten der Monooxygenase Cytochrom P450 BM3 .....	113
3.1.1	Etablierung eines Kofaktorregenerationssystems für die biokatalysierten BM3-Reaktionen .....	115
3.1.2	Etablierung des Screenings der BM3-Variantenbibliothek für die Oxidation des FCdiens.....	117
3.1.3	Verwendung von ionischen Flüssigkeiten und Cyclodextrinen für die BM3-katalysierte Oxidation des FCdiens .....	120
3.1.4	BM3-katalysierte Oxidationsreaktion in zweiphasigen Systemen .....	122
3.1.5	Versuche zur Terpenoxidation in organischen Lösungsmitteln mittels lyophilisierter Zellen .....	123

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2	Zusammenfassung und Ausblick .....	125
<b>4</b>	<b>Versuche zur enzymatischen Totalsynthese von Terpenen.....</b>	<b>127</b>
4.1	<i>Genome mining</i> zur Identifizierung thermostabiler Enzyme zur Synthese der Terpenintermediate IPP und DMAPP .....	129
4.2	Expression der MVA I-Enzyme aus <i>S. solfataricus</i> in <i>E. coli</i> .....	131
4.3	Zusammenfassung und Ausblick .....	135
<b>5</b>	<b>Versuche zur mikrobiellen Derivatisierung von Polyketiden .....</b>	<b>137</b>
5.1	Enzymgeleitete Mutagenese am Beispiel des Erythromycins.....	138
5.1.1	Theoretische Erkenntnisse zur Substraterkennung und Substratscreening zur Testung der Substrattoleranz der V295-Varianten .....	143
5.1.2	Mutagenese des CoA-Bindebereichs zur Erhöhung der Substratspezifität für SNAC-aktivierte Malonsäuren.....	147
5.2	Ausnutzung der natürlichen Substratpromiskuität einer AT-Domäne zur Erzeugung von Monensinderivaten .....	154
5.3	Zusammenfassung und Ausblick .....	159
<b>6</b>	<b>Allgemeine Zusammenfassung.....</b>	<b>161</b>
<b>V</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>166</b>
<b>1</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>166</b>
<b>2</b>	<b>Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide.....</b>	<b>167</b>
2.1	Mikroorganismen .....	167
2.2	Vektoren und Plasmide.....	174
2.3	Oligonukleotide.....	188
<b>3</b>	<b>Nährmedien und Medienadditive .....</b>	<b>195</b>
3.1	Nährmedien.....	195
3.2	Antibiotika und andere instabile Medienadditive .....	200
<b>4</b>	<b>Lösungen, Puffer, kommerzielle Enzyme und Kits .....</b>	<b>201</b>
4.1	Lösungen und Puffer .....	201
4.2	Kommerziell erhältliche Enzyme, Lösungen und Kits.....	207
<b>5</b>	<b>Molekularbiologische Arbeitstechniken .....</b>	<b>209</b>
5.1	Analyse von DNA mittels Agarosegelelektrophorese .....	209

5.2	Isolation von DNA .....	210
5.2.1	Vervielfältigung und Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	210
5.2.2	Isolation der Gesamt-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	212
5.3	PCR .....	212
5.3.1	Amplifikation von <i>abfs</i> , einzelnen Domänen der <i>abfs</i> und von <i>bm3</i> .....	213
5.3.2	Amplifikation einzelner Gensegmente und oePCR zur Erzeugung der pVV214duett-Konstrukte .....	214
5.3.3	Amplifikation einzelner Gensegmente und oePCR zur Erzeugung der $\beta$ -Galactosidase-Reporterkonstrukte .....	217
5.3.4	epPCR zur zufälligen Mutagenese von <i>abfs</i> und <i>fcyc</i> .....	218
5.3.5	Amplifikation der MVA-Gene <sup>[244]</sup> .....	219
5.3.6	oePCR zur zielgerichteten Mutagenese der AT6-Domäne aus DEBS .....	220
5.3.7	Kolonie-PCR .....	224
5.4	Restriktionsverdau von DNA .....	226
5.4.1	Präparativer Verdau von DNA für Klonierungen .....	226
5.4.1	Kontrollverdau von Plasmid-DNA .....	228
5.5	DNA-Reinigungsmethoden.....	229
5.5.1	P/C/I-Extraktion.....	229
5.5.2	Ethanol- oder Isopropanolpräzipitation .....	229
5.5.3	SureClean-Fällung .....	229
5.5.4	Reinigung durch präparative Agarosegelelektrophorese .....	230
5.6	Strategien zur Klonierung neuer Vektoren.....	230
5.6.1	Klonierung mittels Ligation .....	230
5.6.2	Klonierung mittels SLIC-MIX .....	231
5.6.3	Klonierung über IVC ( <i>in vivo cloning</i> ) .....	233
5.6.4	Klonierung über Gateway® .....	234
5.6.5	Klonierung von kurzen Sequenzen durch Hybridisierung von Oligonukleotiden .....	235
5.7	Klonierung neuer Vektoren.....	235
5.7.1	Klonierung von AbFS-codierenden <i>E. coli</i> -Vektoren.....	236
5.7.2	Klonierung der AbFS-codierenden <i>S. cerevisiae</i> -Vektoren.....	237
5.7.3	Klonierung der AbFS-codierenden <i>P. pastoris</i> -Vektoren .....	239
5.7.4	Klonierungen der $\beta$ -Galactosidase-Reporterkonstrukte und der epPCR-Bibliotheken für die zufällige Mutagenese von <i>abfs</i> .....	240
5.7.5	Klonierung der BM3-codierenden <i>E. coli</i> -Vektoren.....	241
5.7.6	Klonierung der MVA-codierenden <i>E. coli</i> -Vektoren <sup>[244]</sup> .....	241

## Inhaltsverzeichnis

---

5.7.7	Klonierungen von Mutagenesebibliotheken der DEBS-AT6-Domäne.....	242
5.8	Sequenzierung von DNA .....	242
<b>6</b>	<b>Mikrobiologische Arbeitstechniken .....</b>	<b>243</b>
6.1	Einführung rekombinanter DNA in Mikroorganismen .....	243
6.1.1	Transformation von <i>E. coli</i> .....	243
6.1.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit der Lithiumacetat-Methode <sup>[289]</sup> .....	245
6.1.3	Transformation von <i>P. pastoris</i> mit der PEG-Methode.....	246
6.1.4	Konjugation von <i>S. erythraea</i> .....	247
6.2	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	249
6.2.1	Präparation von Glycerolstammlösungen .....	249
6.2.2	Expressionen von AbFS und einzelnen Domänen .....	249
6.2.3	$\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassay und Expression der AbFS- Varianten und Varianten der FCyc-Domäne in <i>E. coli</i> .....	251
6.2.4	Fermentation des FCdiens durch <i>E. coli</i> .....	251
6.2.5	Expression von BM3 aus <i>B. megaterium</i> und BM3-Varianten in <i>E. coli</i> ....	252
6.2.6	Expression der GDH aus <i>B. megaterium</i> in <i>E. coli</i> .....	252
6.2.7	Koexpression der BM3-F87A-Variante mit der ADHL.b. in <i>E. coli</i> .....	253
6.2.8	Expression der MVA-Enzyme aus <i>S. solfataricus</i> in <i>E. coli</i> <sup>[244]</sup> .....	253
6.3	Kultivierung und Lagerung von Hefen.....	254
6.3.1	Lagerung der Hefekulturen .....	255
6.3.2	Fermentation des FCdiens und Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> im Schüttelkolben.....	255
6.3.3	Fütterungen von Glucose zur Optimierung der Fermentation des FCdiens durch <i>S. cerevisiae</i> .....	256
6.3.4	Fermentation des FCdiens durch <i>S. cerevisiae</i> in Bioreaktoren.....	256
6.3.5	Expressionen der AbFS in <i>Pichia pastoris</i> .....	259
6.4	Kultivierung und Lagerung von Actinomyceten .....	260
6.4.1	Lagerung von Actinomyceten .....	260
6.4.2	Fermentation von Erythromycin und Erythromycinderivaten durch <i>S. erythraea</i> .....	261
6.4.3	Fermentationen von Monensin und Monensinderivaten durch <i>S. cinnamomensis</i> im Schüttelkolben .....	262
<b>7</b>	<b>Proteinchemische Arbeitstechniken.....</b>	<b>262</b>
7.1	SDS-PAGE.....	262

7.2	Aufarbeitung von Expressionskulturen zur Analyse oder Isolation von Proteinen .....	264
7.2.1	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> .....	264
7.2.2	Zellaufschluss von <i>S. cerevisiae</i> .....	264
7.2.3	Zellaufschluss von <i>P. pastoris</i> .....	265
7.2.4	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen.....	265
7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration durch Bradford .....	265
7.4	Reinigung der MVA-Enzyme HMGS und HMGR.....	266
7.4.1	Affinitätsreinigung über Ni-NTA.....	266
7.4.2	Anreicherung thermostabiler Proteine durch Thermobehandlung <sup>[244]</sup> .....	267
7.5	Proteinrückfaltung aus <i>Inclusion Bodies</i> <sup>[244]</sup> .....	267
7.6	Bestimmung der Aktivität von Enzymen .....	268
7.6.1	NADPH-Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität der GDH .....	268
7.6.2	Bestimmung der Enzymaktivität der HMGS.....	269
<b>8</b>	<b>Biotransformationen für die Oxidation von Terpenen .....</b>	<b>270</b>
8.1	Biotransformationen in wässrigen Lösungen.....	270
8.2	Biotransformationen in organischen Lösungsmitteln .....	271
<b>9</b>	<b>Methoden zur Isolation von Naturstoffen und Kleinmolekülen .....</b>	<b>271</b>
9.1	Extraktion von Naturstoffen .....	271
9.1.1	Extraktionen von FCdien.....	271
9.1.2	Extraktion von Erythromycin und Erythromycinderivaten <sup>[258f]</sup> .....	273
9.1.3	Extraktion von Monensin und Monensinderivaten .....	273
9.2	Säulenchromatographie des FCdiens .....	274
<b>10</b>	<b>Methoden zur Analyse von Naturstoffen und Kleinmolekülen .....</b>	<b>274</b>
10.1	DC des FCdiens.....	274
10.2	Massenspektrometrie.....	275
10.2.1	GC-FID/MS .....	275
10.2.2	HPLC-ESI/MS.....	276
10.2.3	HRMS 278	
10.3	NMR-Spektroskopie des FCdiens .....	278
<b>VI</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>280</b>
<b>VII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>284</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

VIII ANHANG .....	293
IX LEBENSLAUF.....	299





## I Abstract

This work describes different (chemo-)fermentative and (chemo-)enzymatic procedures to enhance the availability or to enable the derivatisation of terpenes or polyketides.

To enhance the availability of the natural product family of the diterpene fusicoccanes, the heterologous fermentation of the biosynthetic intermediate fusicocca-2,10(14)-diene in a metabolic engineered baker's yeast strain was established. Through systematic variation of the fermentation parameters the yield was increased from 6 mg/L to 30 mg/L.

Besides the variation of fermentation parameters, it was also intended to enhance the yield by addressing inherent limitations. The individual expression of the two domains of the bifunctional key enzyme responsible for the biosynthesis of fusicocca-2,10(14)-diene, revealed low soluble expression of the N-terminal terpene cyclase domain. To increase folding stability of the whole enzyme or the terpene cyclase domain directed evolution was used. In a first generation already several hot spots for the production of variants with a higher solubility were identified.

To mimic the phytotoxic or anticarcinogenic bioactivities of the diterpene fusicoccanes, enzymatic oxidation tools were applied to produce simple fusicoccane analogs starting from fusicocca-2,10(14)-diene.

As an alternative to the use of whole cell biocatalysts for the production of complex terpenes, also a concept for the *in vitro* enzymatic total synthesis with thermostable enzymes was introduced.

Furthermore this thesis deals with the substrate recognition in the polyketide biosynthesis. By targeted mutagenesis and feeding of unnatural substrates two new erythromycin derivatives were produced and the incorporation of artificial building blocks was enhanced. Alternatively, by exploiting the natural substrate tolerance of the polyketide synthase of the monensin biosynthesis and feeding of artificial substrates three new monensin derivatives were detected by mass spectrometry.

Diese Arbeit beschäftigt sich anhand ausgewählter Beispiele aus den zwei großen Naturstoffklassen der Terpene und Polyketide mit unterschiedlichen (chemo-)fermentativen und (chemo-)enzymatischen Verfahren, um die Verfügbarkeit von Naturstoffen zu verbessern oder deren Derivatsierbarkeit zu ermöglichen.

Zur Verbesserung der Verfügbarkeit der Naturstofffamilie der Diterpenfusiococcane wurde die präparative, heterologe Fermentation des biosynthetischen Intermediats Fusicocca-2,10(14)-diens in einem durch *Metabolic Engineering* optimierten Bäckerhefestamm etabliert. Dabei wurde die Ausbeute durch eine systematische Variation der Fermentationsparameter von anfänglich 6 mg/L auf 30 mg/L gesteigert.

Neben der Optimierung äußerer Parameter, wurde sich auch mit der Identifizierung inhärenter, limitierender Schritte beschäftigt. Eine Analyse der unabhängigen Expression der beiden Domänen des bifunktionellen Schlüsselenzyms bei der Biosynthese des Fusicocca-2,10(14)-diens wies darauf hin, dass die lösliche Expression des Gesamtproteins durch die schlechte lösliche Expression der N-terminalen Terpenocyclasedomäne limitiert sein könnte. Um die intrinsische Stabilität dieses Enzyms oder der Cyclasedomäne zu erhöhen, wurde ein Verfahren für die gerichtete Proteinevolution dieses Enzyms und einzelner Domänen entwickelt. In einer ersten Generation wurden bereits *Hot Spots* für die Erzeugung löslicherer Enzymvarianten identifiziert.

Zur Erzeugung einfacher Diterpenfusiococcananaloge, um die phytotoxischen und anticarcinogenen Wirkungen dieser Substanzfamilie nachzuahmen, wurde die enzymatische, oxidative Derivatisierung des Fusicocca-2,10(14)-diens *in vitro* anvisiert.

Alternativ zu der Ganzzellfermentation wurde auch ein Konzept zur *in vitro* Totalsynthese von Terpenen mittels thermostabiler Enzyme vorgestellt.

Außerdem wurde sich mit der Substraterkennung in der Polyketidbiosynthese beschäftigt. Durch gezielte Mutagenese und Fütterung unnatürlicher Substratderivate konnten zwei neue Erythromycinderivate erzeugt sowie die Einbauraten der artifiziellen Bausteine verbessert werden. Alternativ konnten durch die Ausnutzung der natürlichen Substrattoleranz der Polyketidsynthase in der Monensinbiosynthese durch die Fütterung artifizieller Bausteine drei neue Monensinderivate massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

## II Einleitung

### 1 Naturstoffe

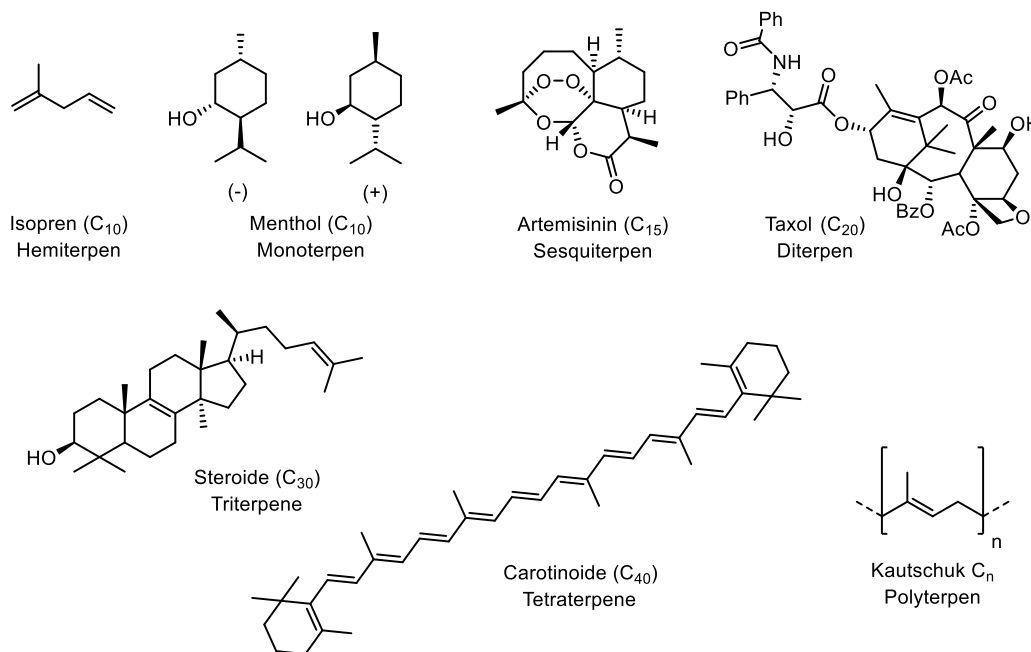
Erste Dokumentationen über die Verwendung von Naturstoffen zur Heilung von Krankheiten können auf etwa 2600 v. Chr. datiert werden.<sup>[1]</sup> Aufgrund ihrer vielfältigen physiologischen Wirkungen und ihrer strukturellen Diversität, finden Naturstoffe auch heute noch eine breite Anwendung in der pharmazeutischen Industrie. Dabei werden sie nicht nur als direkte Quelle für medizinische Produkte verwendet, sondern bieten sich auch als Leitstrukturen zur Erzeugung neuartiger Wirkstoffe an.<sup>[1]</sup> So sind 64% aller zwischen 1981 und 2010 zugelassenen Medikamente Naturstoffe oder besitzen ein von ihnen abgeleitetes Pharmakophor.<sup>[2]</sup> Neben der therapeutischen Effekte, spielen Naturstoffe auch in der chemischen Industrie, z.B. als Farb-, Aroma- oder Duftstoffe, sowie in der Agrochemie zur Bekämpfung von Schädlingen, eine wichtige Rolle.<sup>[3]</sup>

Für die Pharmazie und chemische Industrie sind insbesondere die als Sekundärmetabolite bezeichneten Verbindungen relevant. Während Primärmetabolite von allen Organismen als Bestandteil lebenswichtiger anaboler und kataboler Prozesse produziert werden, sind die Sekundärmetabolite nicht essentiell, vermitteln den Produzenten aber oft einen Überlebensvorteil. Zum Beispiel dienen sie als Pigmente zum Schutz vor der UV-Strahlung oder werden in das äußere Milieu abgegeben, wo sie zur intra- und interspezifischen Kommunikation oder zur Abwehr von Fressfeinden genutzt werden können.<sup>[4]</sup> In der Natur wurden diese Substanzen und die zugrundeliegenden Biosynthesewege über Jahrtausende in den unterschiedlichsten biologischen Umfeldern evolviert, wodurch die enorme strukturelle Diversität der Naturstoffe und ihre vielfältige Interaktion mit therapeutischen Angriffsziele erklärt werden kann.

Unabhängig von ihrer strukturellen Komplexität werden alle Sekundärmetabolite aus einer kleinen Anzahl an Vorläufermolekülen des Primärmetabolismus hergestellt. Je nach biosynthetischem Ursprung können die fünf traditionellen Sekundärmetabolitklassen der Terpene, Polyketide, Peptide (Nicht-Ribosomale Peptide und Ribosomal translatierte, posttranslational modifizierte Peptide), Oligosaccharide und Alkaloide unterschieden werden. Aufgrund des Fokus dieser Arbeit, wird auf die Bedeutung sowie auf die Biosynthese der Terpene und Polyketide im Folgenden näher eingegangen.

## 1.1 Terpene und Terpenoide

Terpene und die von ihnen abgeleiteten, funktionalisierten Terpenoide bilden mit über 50.000 bekannten Strukturen vermutlich die größte und vielfältigste Substanzklasse in der Natur.<sup>[5]</sup> Sie werden ubiquitär in allen Formen des Lebens - im prokaryotischen Einzeller bis hin zum Menschen - produziert und erfüllen dort diverse Funktionen. Als Mitglieder des Primärstoffwechsels findet man sie beispielsweise als Vitamine (Vitamin A und D), als Elektronenüberträger in der Atmungskette (Ubiquinon) und der Photosynthese (Plastoquinon) oder als wichtige posttranslationale Modifikationen von Proteinen (z.B. Farnesylrest an Ras).<sup>[6]</sup> Den überwiegenden Teil der Terpene und Terpenoide bilden Sekundärmetabolite, die zum Teil relevante physiologische Wirkungen für den Menschen aufweisen oder industriell genutzt werden (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Isopren und einige pharmazeutisch sowie industriell relevante Terpene.**

So bilden Terpenoide und Terpene Geschmacksstoffe wie Menthol, das Malariamedikament Artemisinin, das Krebstherapeutikum Taxol, medizinisch relevante anabole Steroide, die als Farbstoffe in der Lebensmittelindustrie verwendeten Carotinoide oder das für die Textilindustrie wichtige Kautschuk. Die Klassifizierung in Mono-, Sesqui-, Di-, Tri-, Tetra- oder höher polymerisierte Verbindungen hat seinen Ursprung in der zu Anfang der 1920er Jahre durch Leopold Ruzicka eingeführten Isoprenregel.<sup>[7]</sup> Diese Klassifizierung stützte sich auf die Hypothese, dass alle terpenoiden Grundkörper durch eine unterschiedliche Anzahl an C<sub>5</sub>-Isopreneinheiten aufgebaut sind (siehe Abbildung 1). Durch die schrittweise Aufklärung der Terpenbiosynthese konnte der systematische Aufbau aller Terpene erklärt werden. Es zeigte sich, dass die beiden aktivierten Formen des Isoprens IPP (Isopentenylpyrophosphat) und

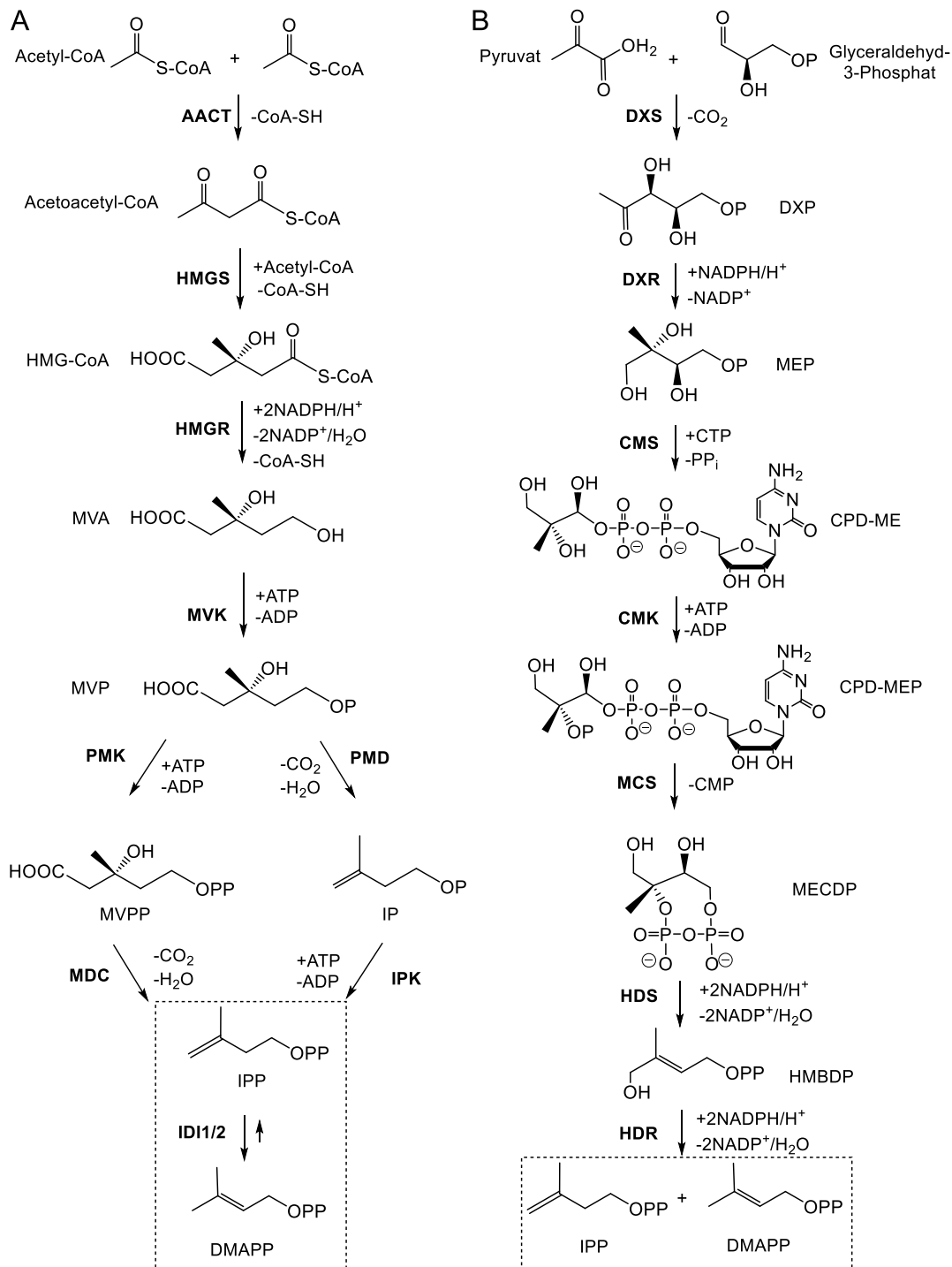
DMAPP (Dimethylallylpyrophosphat) die universellen Vorläufer aller Terpene und Terpeneide sind (siehe Kapitel II1.1.1, Abbildung 2).

### 1.1.1 Terpenoidbiosynthese

#### a) Biosynthese der universellen Terpenvorläufer IPP und DMAPP

Evolutionär haben sich drei unterschiedliche Biosynthesewege für die Bereitstellung der essentiellen Terpenvorläufer IPP und DMAPP entwickelt. Man findet in unterschiedlichen Organismen und Kompartimenten die Biosynthesewege MVA I, MVA II (Mevalonatweg I und II) und MEP (2C-Methylerythriol-4-phosphat-Weg, manchmal auch DXP-Weg nach dem Intermediat 1-Deoxyxylulose-5-Phosphat genannt), die nach zentralen Intermediaten des jeweiligen Biosynthesewegs benannt sind (Abbildung 2).<sup>[8]</sup> Alle drei Biosynthesewege beziehen ihre Vorstufen aus Zwischenprodukten des Energiestoffwechsels.

Die ersten vier Schritte des MVA I- und MVA II-Wegs sind identisch (siehe Abbildung 2A).<sup>[8e,g]</sup> Zunächst wird durch die Claisenkondensation von zwei Einheiten Acetyl-CoA (Acetyl-Coenzym A) Acetoacetyl-CoA gebildet. Über eine stereospezifische Adoladdition erfolgt die Kondensation eines dritten Äquivalents Acetyl-CoA zur Erzeugung von HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA). Unter Verbrauch von zwei Äquivalenten NADPH (reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotidphosphats) wird das Schlüsselintermediat MVA gebildet. Dieser geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird von der HMGR (HMG-CoA-Reduktase) katalysiert.<sup>[9]</sup> MVA wird dann unter Verwendung eines ATPs (Adenosintri-phosphat) zu MVP (MVA-5-Phosphat) phosphoryliert. Anschließend erfolgt im MVA I-Weg zuerst eine weitere Phosphorylierung zur Bildung von MVPP (MVA-5-Pyrophosphat), ausgehend davon wird IPP durch eine Decarboxylierung erzeugt. Die Enzyme des MVA II-Wegs hingegen katalysieren zuerst die Decarboxylierung und dann ausgehend von IP (Isopentenylphosphat) die Phosphorylierung zu IPP.<sup>[8f-i]</sup> Eine Isomerisierung von IPP zu DMAPP wird anschließend in beiden Wegen von zwei nicht miteinander verwandten Enzymen, der IDI1 oder IDI2 (IPP-Isomerase), katalysiert.<sup>[8d]</sup>



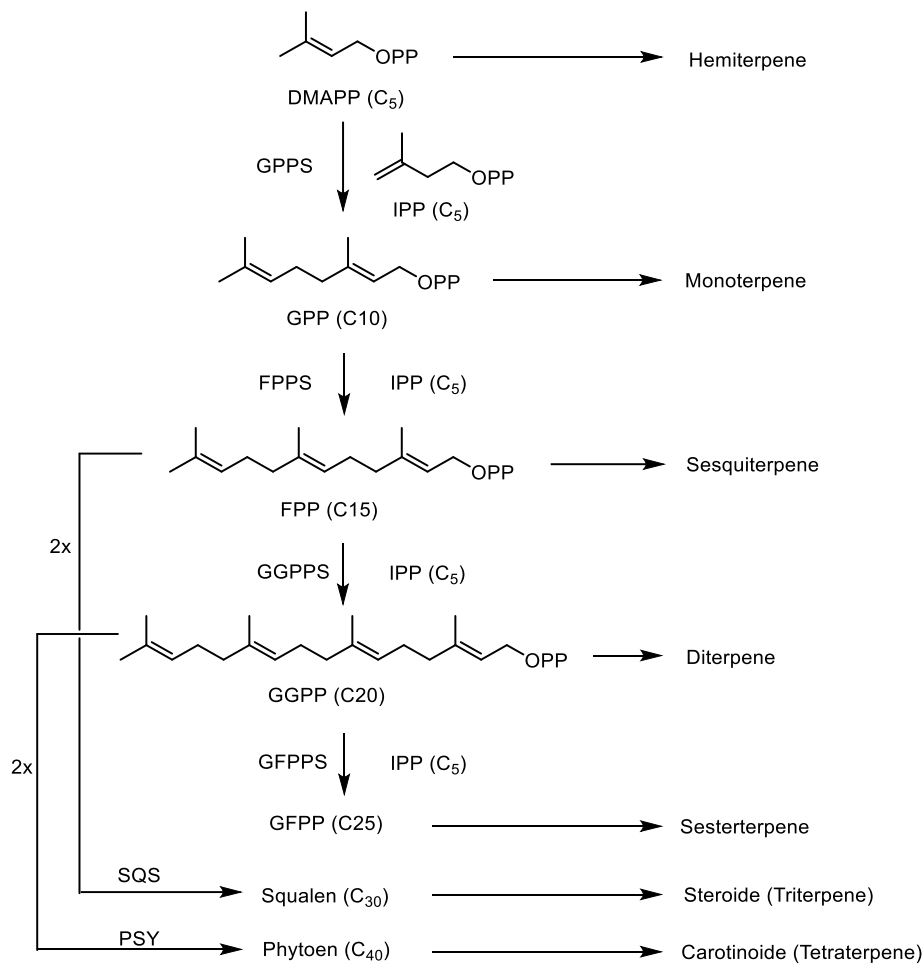
**Abbildung 2: Die drei Biosynthesewege MVA I, MVA II (A) und MEP (B) zur Synthese der universellen Vorläufermoleküle der Terpene IPP und DMAPP.** AACT: Acetoacetyl-CoA-Thiolase, HMGS: HMG-CoA-Synthase, MVK: Mevalonatkinase, PMK: Phosphomevalonatkinase, MDC: MVAPP-Decarboxylase, PMD: Phosphomevalonatdecarboxylase, IPK: Isopentenylkinase, CPD-ME: 4-Diphosphocitidyl-2-C-methylerythiol, CDP-MEP: CDP-2-MEP, DXS: DXP-Synthase, DXR: DXP-Reduktase, CMS: CDP-ME-Synthase, CMK: CDP-ME-Kinase, MCS: MECDP-Synthase, HDS: HMBDP-Synthase. Die Beschreibung der Reaktionen sowie die Definitionen aller weiteren Abkürzungen erfolgen im Text.

Im MEP-Weg (siehe Abbildung 2 B) hingegen wird zunächst eine, durch die Decarboxylierung des Pyruvats freiwerdende, aktivierte Aldehydgruppe auf Glyceraldehyd-3-phosphat übertragen, um DXP zu bilden.<sup>[10]</sup> MEP wird anschließend durch eine intramolekulare Umlagerung und Reduktion des DXPs unter Aufwendung eines Äquivalents NADPH erhalten.<sup>[11]</sup> Durch schrittweise Cytidylierung, Phosphorylierung und Abspaltung von CMP (Cytidylmonophosphat) entsteht das cyclische MECDP (ME-2,4-cyclodiphosphat).<sup>[12]</sup> Durch eine reduktive Ringöffnung wird das HMBDP (1-Hydroxy-2-Methyl-2-(*E*)-Butenyl-4-Diphosphat) gebildet, welches durch die katalysierten Reaktionen des letzten Enzyms HDR (HMBDP-Reduktase) zu einer Mischung aus IPP und DMAPP in einem ungefähren Verhältnis von 5:1 umgesetzt werden kann.<sup>[13]</sup>

Während man in Eukaryoten hauptsächlich den klassischen MVA I-Weg findet, bilden die meisten Bakterien Terpenmetabolite über den MEP-Weg.<sup>[8c,e,14]</sup> Pflanzen oder andere photosynthetisch wirksame Eukaryoten verwenden, konform zur Endosymbiontenhypothese, in ihrem Cytoplasma den MVA I-Weg und in ihren Plastiden den MEP-Weg zur IPP- und DMAPP-Produktion.<sup>[8c,g,15]</sup> Mono-, Di- und Tetraterpenoide werden dabei vorwiegend durch den MEP-Weg in den Plastiden gebildet, während der cytosolische MVA I-Weg hauptsächlich zur Produktion von Sesqui- und Triterpenen genutzt wird.<sup>[8b,c,15]</sup> Der MVA II-Weg wird in vielen Archaeen und in einigen Bakterien gefunden.<sup>[8d-i]</sup>

### **b) Biosynthese der längerkettigen Terpen- und Terpenoidvorläufermoleküle**

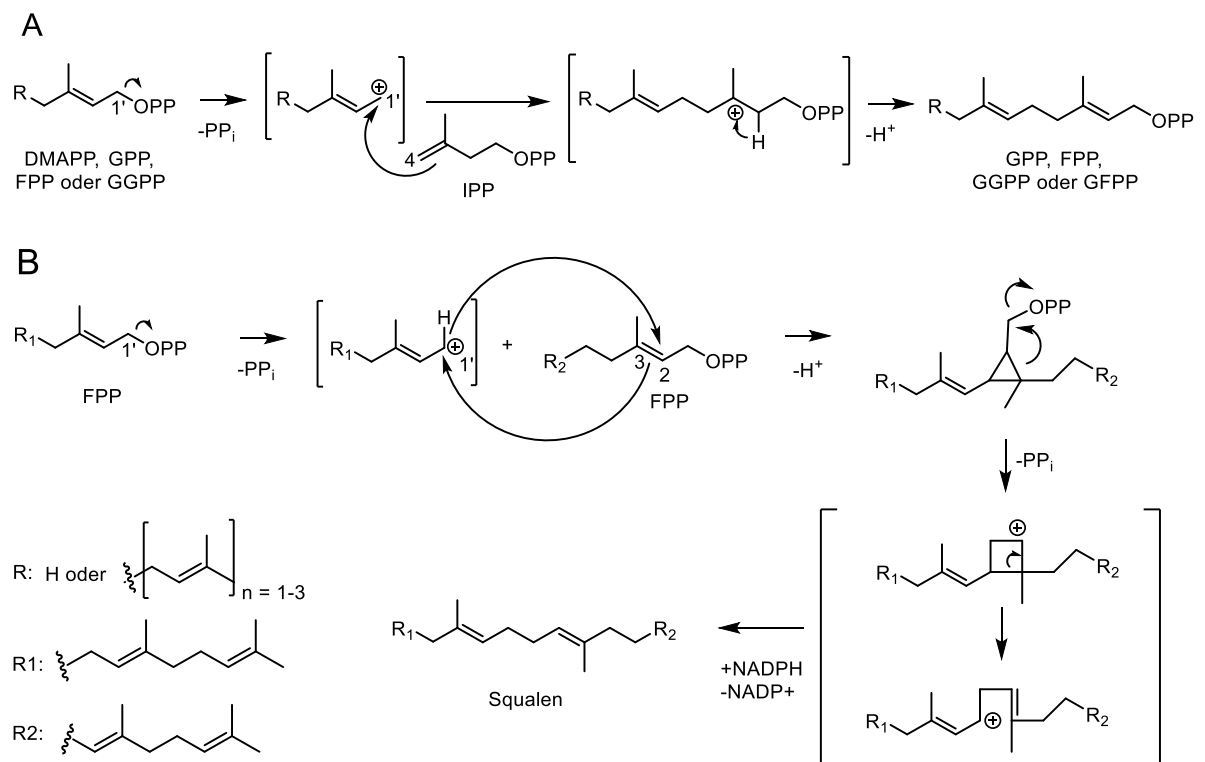
IPP und DMAPP werden schließlich für die Synthese der längerkettigen, direkten Vorläufermoleküle der Terpene verwendet. Die Kondensationen von IPP mit DMAPP oder größeren Substraten werden durch Prenyltransferasen katalysiert, die nach ihren jeweiligen Produkten benannt sind (Abbildung 3). Die Vorläufermoleküle GPP (Geranylpyrophosphat, C<sub>10</sub>), FPP (Farnesyl-PP, C<sub>15</sub>), GGPP (Geranylgeranyl-PP, C<sub>20</sub>) und GFPP (Geranylarnesyl-PP, C<sub>25</sub>) der Mono-, Sesqui-, Di- und Sesterterpene werden jeweils über eine 1'-4-Verknüpfung (oder auch Kopf-Schwanz-Verknüpfung genannt) der Substrate erhalten (siehe Abbildung 4A).<sup>[16]</sup> Zur Synthese der längerkettigen Vorläufermoleküle der Tri-, Tetra- oder höher polymerisierten Terpene werden jeweils zwei der zuvor genannten Prenylpyrophosphate in einer 1'-2,3-Verknüpfung (oder auch Kopf-Kopf-Verknüpfung genannt) miteinander kondensiert (siehe Abbildung 4B, am Beispiel des Steroidvorläufers Squalen gezeigt).<sup>[17]</sup> Je nach Konformation des Produktes wird in *cis*-, *trans*- oder *cis,trans*-Prenyltransferasen unterschieden. Für die Synthese der Vorläufermoleküle des Großteils der bekannten Mono-, Sesqui-, Di-, Sester- und Triterpene spielen aber lediglich *trans*-Prenyltransferasen eine Rolle (siehe Abbildung 4).<sup>[16a]</sup>



**Abbildung 3: Schema über die schrittweise Kettenverlängerung in der Terpenbiosynthese.** Die Elongation wird von den Prenyltransferasen katalysiert. GPP(S): Geranylpyrophosphat(synthase), FPP(S): Farnesylpyrophosphat(synthase), GGPP(S): Geranylgeranylpyrophosphat(synthase), GFPP(S): Geranylarnesylpyrophosphat(synthase), SQS: Squalensynthase, PSY: Phytoensynthase.

Bereits in den 1970er Jahren wurde ein Mechanismus für die von den *trans*-Prenyltransferasen katalysierten Reaktionen formuliert, der bis heute Gültigkeit hat.<sup>[18]</sup> Danach verlaufen die Reaktionen nach einem speziellen Ionisierungs-Kondensations-Eliminierungs-Mechanismus über ein allylisches Kation, welches durch die Abspaltung eines Pyrophosphatrestes generiert wird (Abbildung 4). Für die Ionisierung der jeweiligen allylischen Intermediate werden zweiwertige Kationen, meist  $Mg^{2+}$ , als Kofaktoren verwendet.<sup>[19]</sup> Obwohl *cis*-Prenyltransferasen keine Sequenzidentitäten mit den *trans*-Prenyltransferasen aufweisen, wird für sie ein ähnlicher Mechanismus vermutet.<sup>[16a]</sup> Die Formation einer *cis*- oder *trans*-Doppelbindung scheint von der räumlichen Orientierung der beiden Substrate in der Bindetasche abhängig zu sein.<sup>[16a,18c,20]</sup> Zahlreiche Kristallstrukturen und Mutagenesestudien der Prenyltransferasen weisen darauf hin, dass die jeweilige Kettenlänge der Produkte durch aromatische (*trans*-Prenyltransferasen) oder andere sterisch anspruchsvolle Aminosäurereste (*cis*-Prenyltransferasen) in der Substratbindetasche determiniert ist.<sup>[20-21]</sup>





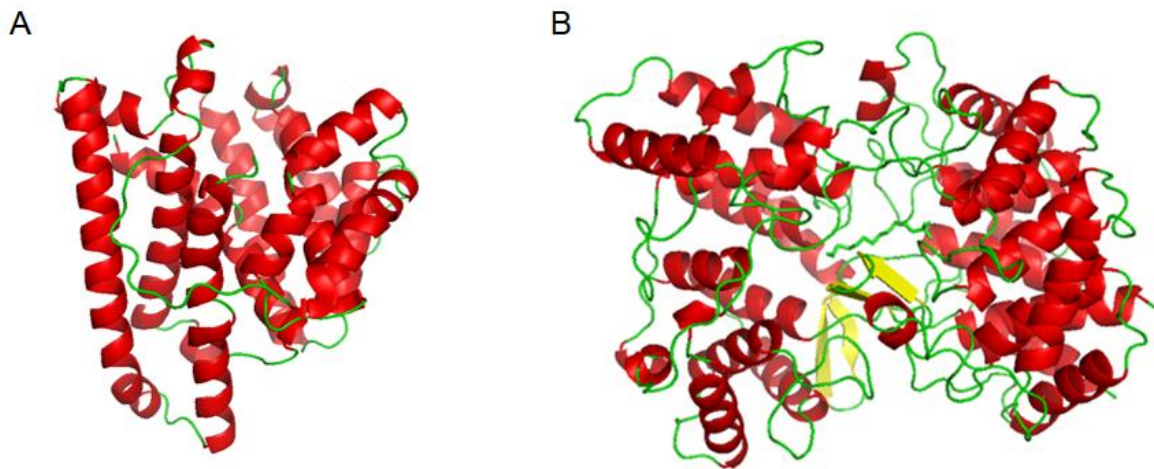
**Abbildung 4: Kopf-Schwanz-Verknüpfung bei der Biosynthese der Prenylpyrophosphate (A) und Kopf-Kopf-Verknüpfung zur Biosynthese des längerkettigen Vorläufers der Steroidbiosynthese Squalen (B).**

### c) Biosynthese der Terpene und Terpenoidgrundgerüste

Unterschiedliche Terpensynthasen katalysieren schließlich verschiedene Umlagerungen und meist Cyclisierungen der Terpenvorläufermoleküle und bilden dabei die enorme Vielfalt der physiologisch aktiven Terpene oder der Terpenoidgrundgerüste. Dabei werden, je nach Struktur und Mechanismus, zwei nicht miteinander verwandte Klassen von Terpensynthasen unterschieden.<sup>[22]</sup> Terpensynthasen der Klasse I besitzen eine konservierte  $\alpha$ -Bündelstruktur, wohingegen Klasse II-Terpensynthasen eine  $\alpha/\alpha_6$ -Fassstruktur aufweisen (Abbildung 5).<sup>[22a]</sup> Bis auf wenige Ausnahmen (Iridoidsynthese), katalysieren die Terpensynthasen typischerweise analog zu den Prenyltransferasen die Bildung eines reaktiven Carbokations zu Beginn der Reaktion.<sup>[23]</sup>

Klasse I-Terpensynthasen ähneln in ihrer Struktur und dem Mechanismus den *trans*-Prenyltransferasen.<sup>[18d,24]</sup> Die Abspaltung der Pyrophosphatgruppe des Substrats am Anfang der Reaktion wird durch die Ionisierung mittels eines dreikernigen Magnesiumionenclusters bewerkstelligt, welches durch die konservierten Sequenzabschnitte DDXX[D,E] und [L,V][V,L,A][N,D]DXX[S,T]XXXE (mit X: beliebige Aminosäure) am Eingang des Substratbindetunnels stabilisiert wird.<sup>[25]</sup> Klasse II-Terpensynthasen hingegen sind nicht  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängig und aktivieren das Substrat durch die Protonierung einer Doppelbindung oder eines

Epoxids (z.B. Oxidosqualensynthase), wobei die zentrale Asparginsäure des konservierten DXDD-Motivs als Protonendonator wirkt.<sup>[22b,26]</sup>



**Abbildung 5: Trotz großer Sequenzunterschiede weisen bislang alle kristallisierten Typ I-Terpensynthasen eine konservierte  $\alpha$ -Bündelstruktur (A) und alle Typ II-Terpensynthasen eine konservierte  $\alpha/\alpha_6$ -Fasstruktur auf (B).** Hier am Beispiel der Pantalensynthase (PDB: 1PS1, A) und der Squalen-Hopen-Synthase (PDB: 1SQC, B) exemplarisch dargestellt.

Durch eine Reihe von Wagner-Meerwein-Umlagerungen, wie Hydrid-, Methyl- oder Alkyl-Wanderungen, sowie häufig auch Cyclisierungen, werden unterschiedliche Carbokationintermediate stabilisiert und dabei die unterschiedlichen Terpengerüstgeformt (siehe FCdien-Cyclisierung Kapitel IV1.3, Abbildung 32).<sup>[27]</sup> Schließlich werden die Reaktionen durch einen Deprotonierungsschritt oder durch den Angriff eines Nucleophils (meist Wasser) terminiert.<sup>[22]</sup>

Bislang sind nur etwa 20 Kristallstrukturen von unterschiedlichen Terpensynthasen veröffentlicht.<sup>[18d,25a,c,d,f,g,26,28]</sup> Auf Grundlage der bekannten Kristallstrukturen mit unterschiedlichen Substrat- oder Produktanaloga geht man aber davon aus, dass die Terpensynthasen chemisch nur eine kleine Rolle bei den Umlagerungen der Substrate und den Cyclisierungen spielen.<sup>[19,22c,d,29]</sup> Bis auf die Initiierung der Carbokationformation dienen die aktiven Zentren dieser Enzyme vermutlich nur als produktgebendes Templat zur Stabilisierung unterschiedlicher Carbokationintermediate und zur Abschirmung des reaktiven Substrats vor nucleophilen Substanzen aus der Umgebung.<sup>[25d]</sup> Während die aktiven Zentren der Typ II-Terpensynthasen eine vorgeformte, produktähnliche Konformation besitzen, scheint bei den Typ I-Terpensynthasen eine solche Konformation durch die Koordinierung des Substratpyrophosphatrests mit dem dreikernigen Magnesiumionencluster am Anfang der Reaktion induziert zu werden.<sup>[25a,c,d,26,30]</sup> Nach Eintritt des Substrats wird das aktive Zentrum durch die Konformationsänderungen flexibler Proteinschleifen von den umgebenden Lösungsmittelmolekülen abgegrenzt.<sup>[25a,c,d]</sup> Häufig kann der abgespaltene Pyrophosphatrest,

ein assoziiertes Wassermolekül oder, wie im Falle der Taxadiencyclisierung, eine C-C-Doppelbindung des Substrats als generelle Base für den abschließenden Deprotonierungsschritt dienen.<sup>[25c-e,31]</sup>

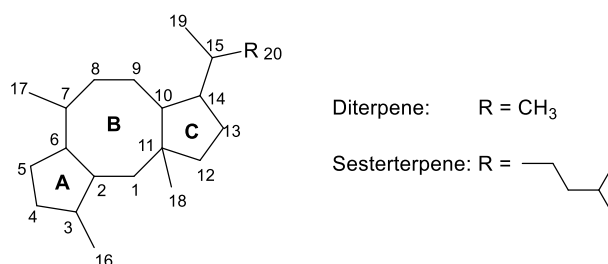
Bei der Mono- und Sesquiterpenbiosynthese findet man ausschließlich Klasse I-Terpensynthasen, während die Cyclisierungen der Tri- und Tetraterpene durch Terpensynthasen der Klasse II katalysiert werden.<sup>[22c]</sup> Unter den Diterpensynthasen findet man katalytisch aktive Vertreter des Typs I und des Typs II, sowie bifunktionelle Enzyme die aus beiden Terpensynthasentypen bestehen.<sup>[28f-h,28j,k,32]</sup> Sie bilden daher eine evolutionäre Brücke zwischen beiden Terpensynthaseklassen.<sup>[22c]</sup>

#### d) Dekoration der Terpengrundgerüste zur Generierung physiologisch aktiver Terpenoide

Neben den Umlagerungen und den Cyclisierungen zu unterschiedlichen Grundgerüsten, stellen die darauffolgenden Dekorationen mit verschiedenen funktionellen Gruppen eine weitere Quelle für die chemische Diversität in der Substanzklasse der Terpenoide dar. Typische Reaktionen sind Oxygenierungen, Glycosylierungen, Alkylierungen, Acetylierungen oder Reduktionen (siehe auch Kapitel II.1.1, Abbildung 1).<sup>[33]</sup> Seltener findet man aminierte, thiolierte oder halogenierte Terpenoide.<sup>[34]</sup>

### 1.1.2 Die Terpenfamilie der Fusicoccane

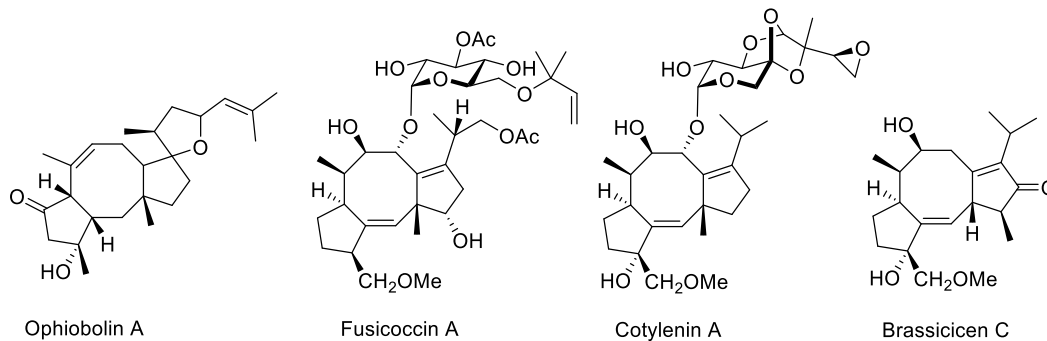
Die Fusicoccane stellen eine große Terpenfamilie dar, deren Vertreter durch eine Vielzahl an Land lebender Bakterien, Pilze, Insekten oder höherer Pflanzen, sowie durch marine Pilze oder Algen produziert werden.<sup>[34c,35]</sup> Sie werden über ihr charakteristisches Strukturmerkmal, dem 5-8-5-tricyclischen Grundgerüst (Abbildung 6), definiert und sind nach ihrem bekanntesten Vertreter, dem Fusicoccin A, benannt.<sup>[35b,36]</sup>



**Abbildung 6: Das 5-8-5-tricyclische Grundgerüst als gemeinsames Strukturmerkmal der Fusicoccane.**

Einige Untergruppen der Fusicoccane, wie die Ophioboline (siehe Abbildung 7) oder die Ceroplastole, repräsentieren Sesterterpene (C<sub>25</sub>) dieser Substanzfamilie.<sup>[35c,d]</sup> Eine weitaus größere Anzahl an bekannten Fusicoccanen gehört jedoch zu den Diterpenen (C<sub>20</sub>).

Allein durch die drei phytopathogenen Pilze *Phomopsis amygdali* (früher *Fusicoccum amygdali* Del. genannt), *Cladosporium* sp. und *Alternaria brassicicola* werden eine beachtliche Zahl an Diterpenfusicoccanen produziert, die entsprechend ihrer Herkunft oder zuerst identifizierter Wirkung Fusicoccine, Cotylenine und Brassicene genannt werden.<sup>[35b,e,37]</sup> Sie weisen das stereochemisch identische Kohlenstoffgerüst Fusicocca-1,10(14)-dien auf und unterscheiden sich lediglich in den dekorierenden Seitenketten voneinander (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Struktur des Sesterterpenfusicoccan Ophiobolin A im Vergleich zu den drei bekanntesten Vertretern der Diterpenfusicocane Fusicoccin A, Cotylenin A und Brassicene C, die das identische Fusicocca-1,10(14)-dien-Grundgerüst aufweisen.**

Aufgrund ihrer zahlreichen physiologischen Wirkungen traten insbesondere Fusicoccin A und Cotylenin A früh in den Fokus der Forschung.

Fusicoccin A wurde 1964 aus dem Kulturextrakt des Pilzes *P. amygdali* - dem Verursacher der Welkkrankheit von Pfirsich- und Mandelbäumen in Italien - als Pflanzentoxin isoliert.<sup>[35b]</sup> Neben dieser herbiziden Wirkung weist Fusicoccin A noch zahlreiche weitere physiologische Effekte in Pflanzenzellen auf.<sup>[38]</sup> Dabei scheint es verschiedene Phytohormone nachzuahmen oder ihnen entgegenzuwirken, indem es das Wachstum von Pflanzenkeimlingen oder –schnitten stimuliert.<sup>[38a,39]</sup> Die biologische Aktivität von Fusicoccin A ist jedoch nicht nur auf höhere Pflanzen beschränkt. Es kann auch die amphibische Embryogenese beeinflussen und in Kombination mit Interferon- $\alpha$  die Apoptose von verschiedenen Krebszelllinien induzieren.<sup>[40]</sup>

Auch Cotylenin A wurde in den 1970er Jahren zunächst als potenter Wachstumsregulator von Pflanzenzellen aus dem phytopathogenen Pilz *Cladosporium* sp. 501-7W isoliert.<sup>[35e]</sup> Cotylenin A kann ebenfalls in Kombination mit anderen anticarcinogenen Substanzen, wie Interferon- $\alpha$  und Rapamycin, oder alleine die Apoptose verschiedener Krebszelllinien induzieren.<sup>[41]</sup> Im Gegensatz zu Fusicoccin A, wurde für Cotylenin A auch eine zelldifferenzierende Wirkung auf verschiedene Krebszelllinien nachgewiesen.<sup>[42]</sup> Die Induktion der Differenzierung von retinoidresistenten Leukämiezellen wurde sogar bereits *in vivo* an Mausmodellen belegt.<sup>[43]</sup>

### a) Wirkmechanismus der Fusicoccane

Die gemeinsamen, zum Teil unterschiedlichen und organismusübergreifenden, biologischen Aktivitäten des Fusicoccin A und Cotylenin A können durch die Stabilisierung unterschiedlicher, binärer 14-3-3-Zielproteinkomplexe erklärt werden.<sup>[44]</sup>

14-3-3-Proteine sind in Eukaryoten konservierte Adapterproteine, die selber keine katalytische Aktivität besitzen, aber durch die Wechselwirkungen mit zahlreichen, an der Signaltransduktion beteiligten Enzymen verschiedene zelluläre Prozesse regulieren.<sup>[45]</sup> Durch die Bindung der 14-3-3-Proteine an meist phosphorylierte Motive kann der Aktivitätsstatus der Bindungspartner beeinflusst werden.<sup>[46]</sup> Fehlregulationen dieser Prozesse können zur Entstehung unterschiedlicher neurodegenerativer Krankheiten oder Krebs führen.<sup>[47]</sup> Für die Interaktion der 14-3-3-Proteine mit ihren Zielenzymen wurden bislang drei Bindungsmotive identifiziert, die mit Modus I – III bezeichnet werden (Tabelle 1).<sup>[44e,48]</sup>

**Tabelle 1: Die drei konservierten Bindemotive der 14-3-3-Strukturproteine an verschiedene Zielenzyme.** +: basische, Ø: aromatische oder X: beliebige Aminosäure, p: phosphoryliert.

Modus	Bindemotiv
I	R[S/Ø][+][pS/pT]XP
II	RX[Ø/S][+][pS/pT]XP
III	[pS/pT]X <sub>1-2</sub> -COOH

Der gemeinsame herbizide Effekt von Fusicoccin A und Cotylenin A resultiert aus einer Stabilisierung der Interaktion zwischen einer 14-3-3-Isoform mit dem C-Terminus der ATP-abhängigen Protonenpumpe PMA2 in der pflanzlichen Plasmamembran im Modus III-Bindemotiv (siehe auch Kapitel IV1.1.1, Abbildung 18).<sup>[44e,f,49]</sup> Die Protonenpumpe bleibt dadurch permanent aktiviert, wodurch der osmotische Druck steigt, was schließlich zur irreversiblen Öffnung der stomatalen Schließzellen auf der Blattunterseite und zum Wasserverlust der betroffenen Pflanzen führt.<sup>[50]</sup> Die zum Teil unterschiedliche Wirkung von Fusicoccin A und Cotylenin A in Säugetierzellen kann in erster Linie auf eine verschiedene Oxyfunktionalisierung an C12- und C16-Position der gemeinsamen Grundstruktur der beiden Fusicoccane zurückgeführt werden (siehe Abbildung 7).<sup>[44f,51]</sup> Während für Fusicoccin A durch seinen sterischen Anspruch an C12 bislang nur die Stabilisierung von 14-3-3-Zielproteinkomplexen im Modus III-Bindemotiv nachgewiesen wurde, scheint Cotylenin A auch Modus I- und Modus II-Bindemotive stabilisieren zu können.<sup>[44e-i]</sup>

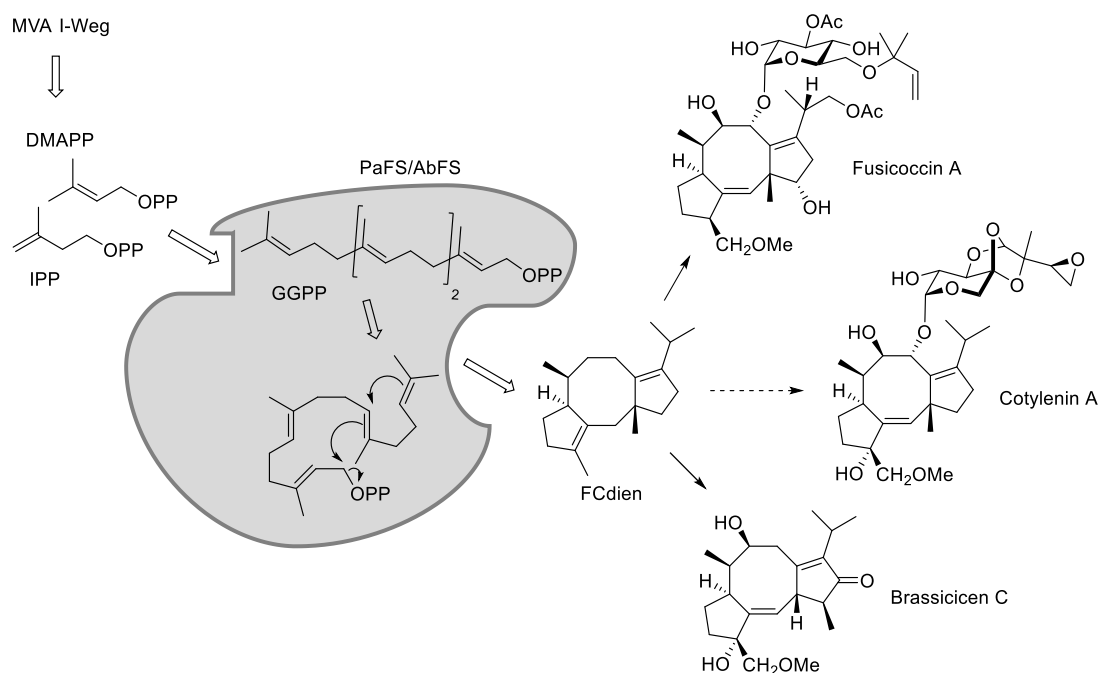
Die biologischen Aktivitäten der Brassicicene wurden noch nicht studiert. Da die Brassicicene jedoch in ihrer Kernstruktur eine strukturelle Homologie zu den Fusicoccinen und Cotyleninen aufweisen, kann für sie ebenfalls ein Wirkmechanismus vermutet werden, der auf der Stabilisierung von 14-3-3-Zielenzymkomplexen beruht.

Im Gegensatz zu den hier diskutierten Diterpenfusicoccanen konnte für das Sesterterpenfusicoccan Ophiobolin A (siehe Abbildung 7), welches eine andere Konformation und andere Funktionalisierung des tricyclischen Grundgerüsts besitzt, der Ca<sup>2+</sup>-bindende, zellinterne Rezeptor Calmodulin identifiziert werden.<sup>[52]</sup>

### **b) Biosynthese der Fusicoccine, Cotylenine und Brassicene**

Aufgrund des identischen Kohlenstoffgrundgerüsts der Fusicoccine, Cotylenine und Brassicene kann für sie ein gemeinsames biosynthetisches Intermediat vermutet werden. Tatsächlich konnte im Rahmen der Aufklärung der Biosynthese der Fusicoccine und Brassicene das gemeinsame Vorläufermolekül Fusicocca-2,10(14)-dien (siehe Abbildung 8) identifiziert werden, welches im Rahmen dieser Arbeit mit FCdien abgekürzt wird.<sup>[37f,53]</sup> Dabei handelt es sich um ein Doppelbindungsisomer des gemeinsamen Grundkörpers dieser Diterpenfusicocane (siehe Abbildung 8). Auch bei der Biosynthese der Cotylenine wird FCdien als Intermediat vermutet. Jedoch konnte bislang kein Nachweis dafür erbracht werden, da der natürliche Produzent *Cladosporium* sp. 501-7W unter Laborbedingungen seine Wachstumsfähigkeit eingebüßt hat und eine Reisolation des Pilzes aus der Natur nicht gelang.<sup>[51,53b]</sup>

Zur Katalyse der Reaktionen zur Bildung des tricyclischen FCdiens wurden in *P. amygdali* und *A. brassicicola* zwei Enzymisoformen mit einer Sequenzhomologie von 47% identifiziert.<sup>[53]</sup> Bei beiden FS-Isoformen (FCdiensynthaseisoformen) handelt es sich um ungewöhnliche chimäre Enzyme, die sowohl eine Prenyltransferase- als auch eine Terpensynthasefunktion aufweisen (Abbildung 8). Die C-terminale Prenyltransferasedomäne der FS akzeptiert sowohl DMAPP, GPP als auch FPP zusammen mit IPP als Substrate für die Bildung des linearen C20-Prenylpyrophosphats *all-trans*-GGPP.<sup>[53a]</sup> Ausgehend davon katalysiert die N-terminale Terpensynthasedomäne die Cyclisierung zu FCdien.<sup>[53]</sup> In beiden Domänen der Enzymisoformen wurden charakteristische Motive für die Stabilisierung von Magnesiumionenclustern identifiziert, was zeigt, dass die Cyclisierung des FCdiens (siehe Kapitel IV1.3, Abbildung 32) nach dem Klasse I-Terpensynthasemechanismus (Kapitel II1.1.1 c) verläuft.<sup>[53]</sup>



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Biosynthese des FCdiens, als gemeinsames Intermediat der Diterpenfusiccane Fusicoccin A, Cotylenin A und Brassicicen C.** Die chimäre FS (grau hinterlegt) kann durch ihre Prenyltransferase- und Terpen cyclaseaktivität sowohl die Synthese des GGPPs als auch die Cyclisierung des FCdiens katalysieren. PaFS: FS aus *P. amygdali*, AbFS: FS aus *A. brassicicola*.

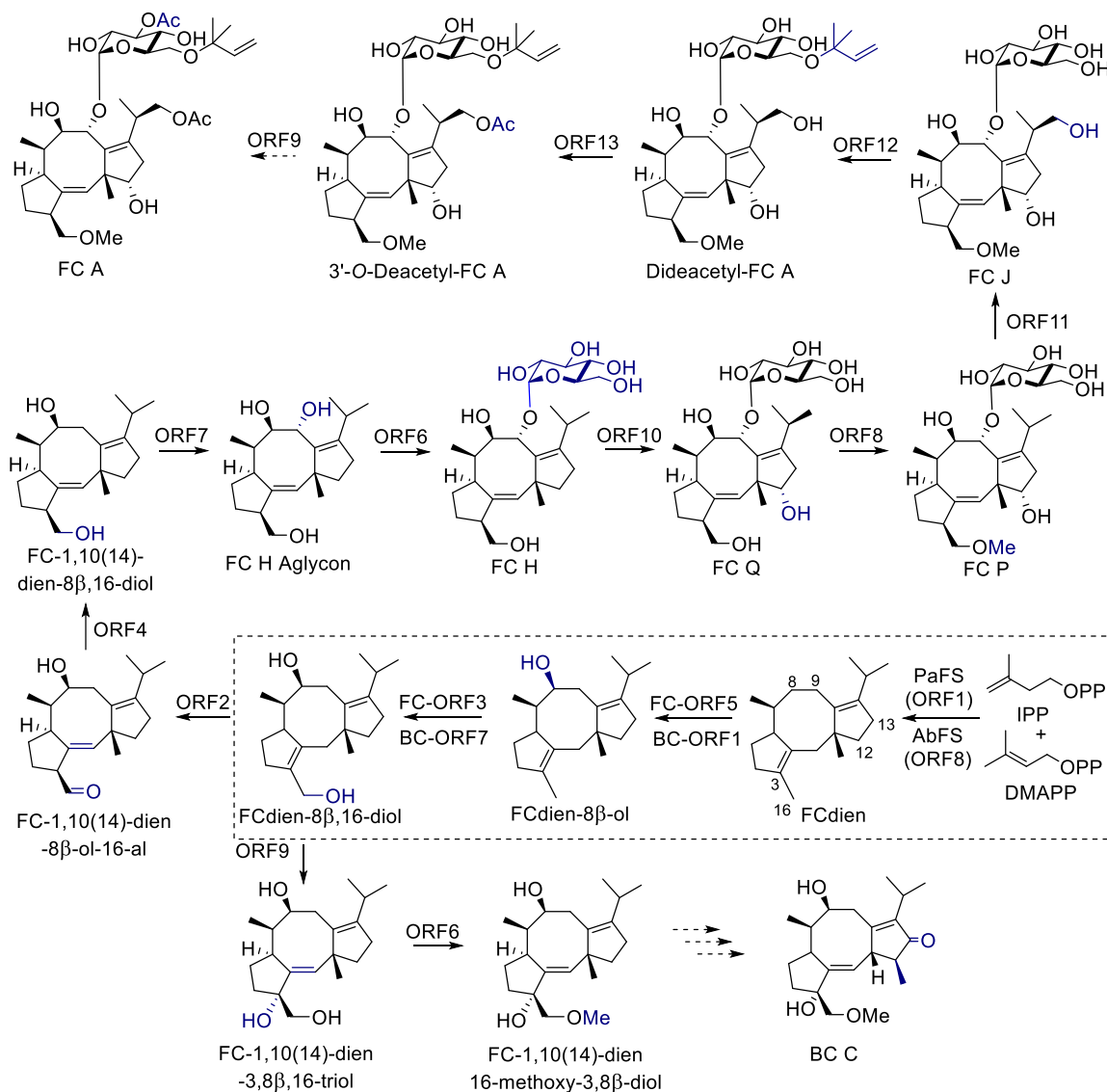
Mittlerweile wurden fast alle Schritte des Fusicoccin- und Brassicicenbiosyntheseclusters durch die Charakterisierung der Enzyme *in vitro* oder durch die Disruption der verantwortlichen Gene *in vivo* aufgeklärt (Abbildung 9).<sup>[51,53-54]</sup>

In beiden Biosynthesewegen werden zunächst die C8- und C16-Hydroxylierungen durch zwei Cytochrom P450-Monooxygenasen katalysiert.<sup>[51b,54a]</sup> Obwohl der darauffolgende Schritt in beiden Biosynthesen von einer  $\alpha$ -ketoglutaratabhängigen Dioxygenase katalysiert wird, resultieren unterschiedliche Produkte.<sup>[51a]</sup> In der Biosynthese der Brassicicene führt die Reaktion zu der gleichzeitigen Hydroxylierung der C3-Position und zur Isomerisierung der Doppelbindung im A-Ring, wohingegen die Dioxygenase der Fusicoccinbiosynthese ebenfalls die Isomerisierung und eine weitere Oxidation der C16-Hydroxyfunktion katalysiert.<sup>[51a]</sup>

Die Brassicicen C-Biosynthese wird anschließend durch die Methylierung der 16-Hydroxyfunktion, weiteren Oxidationen an C13 und durch einen Methylgruppentransfer komplementiert, wobei lediglich die Methyltransferase für die O-16-Methylierung bislang charakterisiert ist.<sup>[53b]</sup>

Fusicoccin A wird ausgehend von FC-1,10(14)-dien-8 $\beta$ -ol-16-al durch eine nachfolgende Reduktion, verschiedene Hydroxylierungen, den Transferierungen einer Glycosyl-, Methyl- und Prenylgruppe, sowie zwei Acetylierungen biosynthetisiert.<sup>[51b,54b]</sup> Mit Ausnahme der Acetyltransferase im letzten Schritt der Fusicoccin A-Biosynthese sind die beteiligten Enzyme

bereits durch *in vitro*-Reaktionen oder durch die Inaktivierung ihrer Gene *in vivo* identifiziert.<sup>[51,53a,54b]</sup>



**Abbildung 9: Aufgeklärte Schritte in der Biosynthese des Fusicoccin A (FC A) und Brassicinen C (BC C).** Die gemeinsamen Schritte sind in der gestrichelten Box dargestellt. Die bei den einzelnen Reaktionen neu eingeführten Funktionen oder Isomerisierungen sind in blau hervorgehoben. Die zuvor identifizierten Fusicoccine FC H, FC J, FC P und FC Q sind Intermediate bei der Biosynthese des FC A. Noch nicht experimentell belegte Transformationen sind als gestrichelte Pfeile dargestellt. ORF: Genprodukt des jeweiligen offenen Leserahmens in den beiden Biosyntheseclustern. Eine genauere Erläuterung zu den einzelnen Schritten erfolgt im Text.

## 1.2 Polyketide

Polyketide stellen ebenfalls mit etwa 7000 bekannten Strukturen eine große und diverse Naturstoffklasse dar.<sup>[55]</sup> Im Gegensatz zu den Terpenen werden Polyketide ausschließlich als

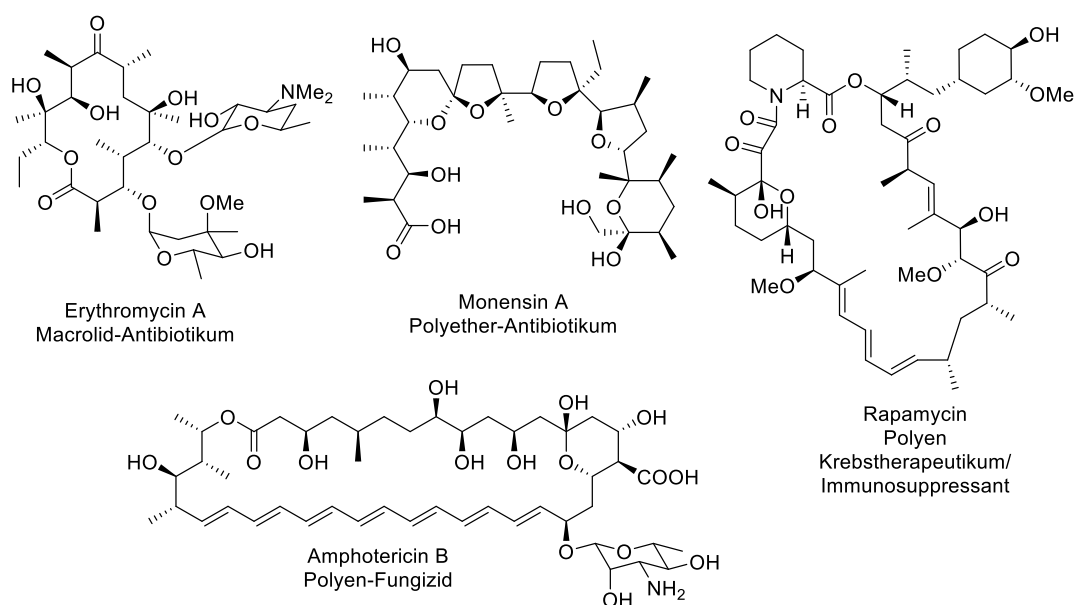


Sekundärmetabolite von etlichen an Land lebenden und im Meer vorkommenden Bakterien, Pilzen oder Pflanzen produziert.<sup>[56]</sup>

Viele Vertreter dieser Naturstoffklasse wirken antibiotisch, fungizid, anticarcinogen oder immunsuppressiv, wodurch sie oder ihre Derivate breite Anwendung in der Human- oder Veterinärmedizin finden (Abbildung 10).

Zur Klassifizierung wird in aromatische (meist Polyphenole oder polycyclische Verbindungen) und reduzierte Polyketide (Macrolide, Polyene oder Polyether) unterschieden (siehe Abbildung 10). Diese Einteilung nach dem Redoxzustand der Grundgerüste hat ihren Ursprung in der Biosynthese der Polyketide.

#### reduzierte Polyketide:



#### aromatische Polyketide:

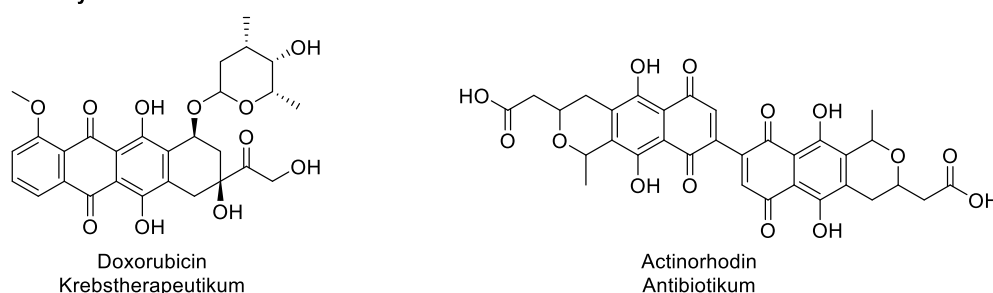


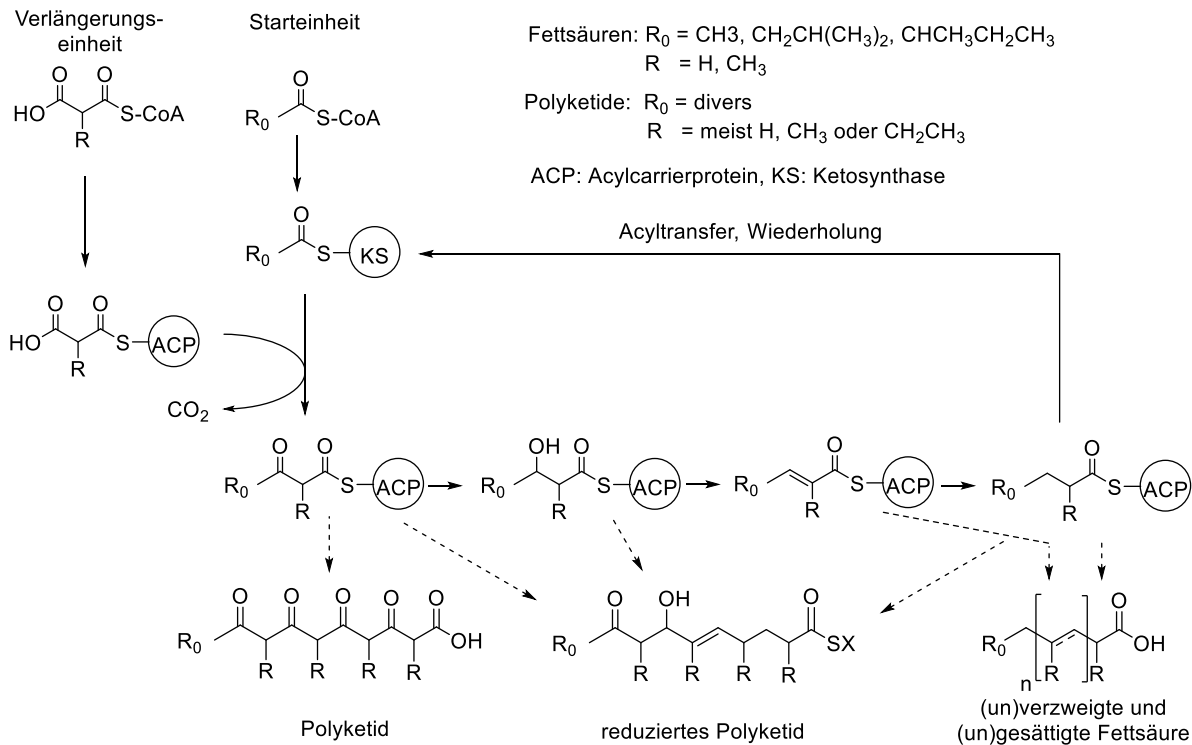
Abbildung 10: Einige relevante Polyketide für die Human- oder Veterinärmedizin.

### 1.2.1 Polyketidbiosynthese

Die Polyketidbiosynthese ähnelt sowohl in den ablaufenden chemischen Reaktionen als auch in den verwendeten Bausteinen der Fettsäurebiosynthese aus dem Primärmetabolismus.<sup>[57]</sup>

In Analogie zu der Fettsäurebiosynthese wird das Polyketidrückgrat durch eine Reihe von decarboxylierenden Claisen-Thioesterkondensationen von einer Acyl-CoA-Starteinheit mit

mehreren aktivierten Malonsäuren aufgebaut, wodurch  $\beta$ -Ketoacylpolymere entstehen.<sup>[57-58]</sup> In beiden Fällen wird die Struktur der gebildeten Metabolite primär durch die Anzahl und Art der verwendeten Bausteine bei der Kettenverlängerung und dem Grad der Reduktion der entstehenden  $\beta$ -Ketogruppen bestimmt (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Vergleich der (bakteriellen) Fettsäure- mit der Polyketidbiosynthese.** Die Polyketidgrundgerüste besitzen eine wesentlich größere strukturelle Diversität, da eine größere Zahl an Bausteinen für die Kettenverlängerung akzeptiert wird und eine größere Variation bei der schrittweisen Reduktion der entstehenden  $\beta$ -Ketothioester besteht. Abbildung in Anlehnung an D. Hopwood.<sup>[58]</sup>

Die Vielfalt der Polyketide ist im Vergleich zu den Fettsäuren jedoch wesentlich größer, da die Wahl der Start- und Verlängerungseinheiten und die Schritte zur Reduktion der  $\beta$ -Ketogruppen flexibler sind (siehe Abbildung 11).<sup>[57,59]</sup> Die Polyketidrückgrate sind dadurch, im Vergleich zu den Fettsäuren, mit einer größeren Anzahl verschiedener Seitenketten versehen, weisen neben Methylen- und Alkengruppen auch Keto- oder Hydroxyfunktionalitäten auf und werden häufig während oder nach Beendigung der Kettenverlängerung cyclisiert.<sup>[58]</sup>

Die an den Reaktionen zur Bildung der Polyketidrückgrate beteiligten PKS (Polyketidsynthasen) werden analog zu den FAS (engl. *fatty acid synthases*) nach ihrem strukturellen Aufbau klassifiziert.<sup>[57,60]</sup> Typ I-PKS sind große multifunktionelle Enzyme, in denen die katalytischen Domänen kovalent miteinander verknüpft und in einzelne Module zusammengefasst sind.<sup>[61]</sup> Als Typ II-PKS werden hingegen Enzymkomplexe bezeichnet, die aus einzelnen monofunktionellen Enzymen bestehen und über nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten sind.<sup>[62]</sup> Desweiteren werden Typ III-PKS abgegrenzt,

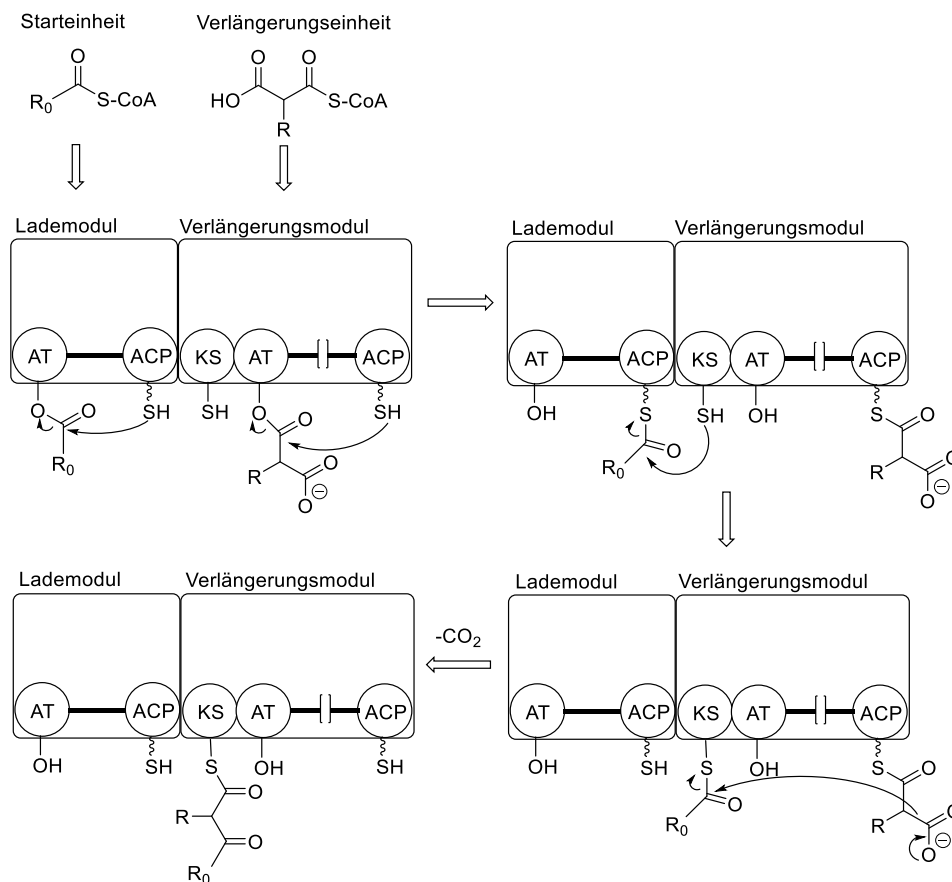
die Homodimere aus zwei KS (Ketosynthasen) darstellen und deren Produkte meist auf Tri- oder Tetraketide limitiert sind.<sup>[60,63]</sup> Weiterhin wird in nicht-iterative und iterative PKS unterschieden.<sup>[60]</sup> Während bei nicht-iterativen PKS jede katalytische Domäne für genau einen Schritt bei der Biosynthese des Polyketidrückgrats zuständig ist, werden bei iterativen PKS mehrere Cyclen der Kettenverlängerung durch das gleiche Set an Domänen oder Enzymen katalysiert.

Für das Verständnis dieser Arbeit sind lediglich die nicht-iterativen Typ I-PKS von Bedeutung, die als molekulares Fließband nach dem Prinzip der Kolinearität agieren, wodurch man anhand des Aufbaus des Enzyms die Struktur des Produktes vorhersagen kann.<sup>[60,61d,64]</sup> Daher fokussieren sich die folgenden Abschnitte auf die katalysierten Schritte der nicht-iterativen Typ I-PKS.

### **a) Start der Polyketidbiosynthese und Kettenverlängerung in modularen Typ I-PKS**

Zur Erkennung und Übertragung der jeweiligen Substrate sind in jedem Modul die essentiellen AT- (Acyltransferase-) und ACP-Domänen (Acylcarrierproteindomänen) vertreten. Des Weiteren wird in jedem Verlängerungsmodul eine KS-Domäne (Ketosynthasedomäne) benötigt (Abbildung 12). Die AT-Domäne des Lademoduls erkennt die Starteinheit, typischerweise eine thioesteraktivierte Carbonsäure, und katalysiert deren Übertragung auf die freie Thiolgruppe des posttranslational angebrachten Phosphopantetheinylarms der benachbarten ACP-Domäne.<sup>[65]</sup> Die ACP-Domäne des Lademoduls überträgt die Starteinheit anschließend auf die KS-Domäne des ersten Verlängerungsmoduls. In dem Verlängerungsmodul wird die AT-Domäne mit einem Malonsäurederivat beladen, welches auf die ACP-Domäne des gleichen Moduls transferiert und in die Nähe der mit der Starteinheit beladenen KS-Domäne gebracht wird. Schließlich katalysiert die KS-Domäne des Verlängerungsmoduls die decarboxylierende Claisenkondensation zwischen den beiden Substraten, wodurch ein  $\beta$ -Ketothioester resultiert. In nachfolgenden Modulen kann durch eine Wiederholung der hier beschriebenen Schritte das wachsende Polyketidrückgrat nach und nach verlängert werden.

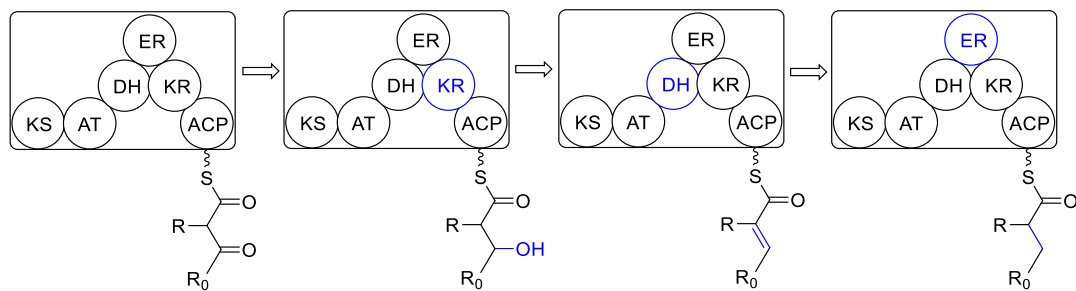
Während die Starteinheiten in der Polyketidbiosynthese sehr divers in ihrer Struktur und Größe sein können, ist die Wahl der Verlängerungseinheiten auf wenige beschränkt.<sup>[66]</sup> Am häufigsten werden als Verlängerungseinheiten Malonyl-, Methylmalonyl- und Ethylmalonyl-CoA verbaut.<sup>[66b]</sup> Erst in der letzten Zeit wurden Biosynthesewege für seltenere Verlängerungseinheiten, wie CoA-aktivierte Allylmalonyl-, Propylmalonyl- und Haloethylmalonylderivate, sowie ACP-aktivierte Methoxymalonyl-, Hydroxymalonyl- oder Haloethylmalonylderivate identifiziert.<sup>[66b,67]</sup>



**Abbildung 12: Reaktionen bei der Polyketidkettenverlängerung.** Hier anhand des Lademoduls und der ersten Verlängerungseinheit einer modularen Typ I-PKS dargestellt. AT: Acyltransferase, ACP: Acylcarrierprotein, KS: Ketosynthase. Weitere optionale Domänen zur Reduktion des  $\beta$ -Ketothioesters sind hier ausgeblendet (durch die geschlossene Klammer dargestellt). Genauere Erläuterungen der Reaktionen erfolgen im Text. Abbildung in Anlehnung an S. Klopries.<sup>[68]</sup>

### b) Optionale Reduktion der $\beta$ -Ketogruppen

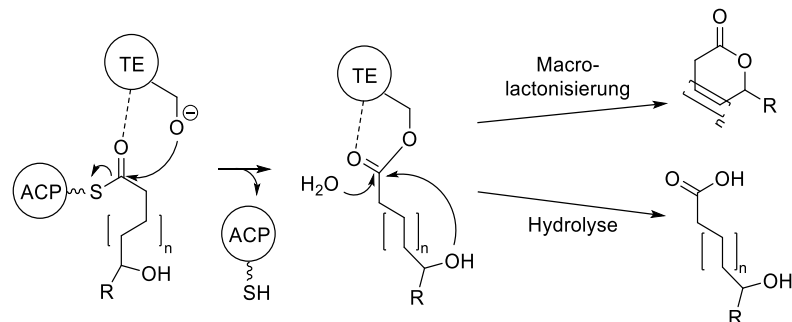
Neben den essentiellen Elongationsdomänen können die Module auch die optionalen reduktiven Domänen KR (Ketoreduktase), DH (Dehydratase) und ER (Enoylreduktase) aufweisen.<sup>[61d,64b]</sup> Je nach Anwesenheit dieser reduktiven Domänen sind Unterschiede im Redoxmuster möglich. Besitzt ein Modul beispielsweise alle reduktiven Domänen wird die  $\beta$ -Ketofunktion vollständig zu einer Methylengruppe reduziert (Abbildung 13). Fehlt die ER-Domäne, resultiert eine Alkenfunktion. Kommt in einem Modul hingegen nur die KR-Domäne vor, wird eine  $\beta$ -Hydroxygruppe gebildet. Beim Fehlen aller reduktiven Domänen bleibt die  $\beta$ -Ketofunktion bestehen.



**Abbildung 13: Optional stattfindende Reaktionen zur Reduktion der  $\beta$ -Ketothioestergruppe bei der Polyketidbiosynthese.** Hier anhand einer vollständigen reduktiven Schleife durch die katalytische Aktivität aller reduktiven Domänen KR (Ketoreduktase), DH (Dehydratase) und ER (Enoylreduktase) dargestellt. Die bei jedem Reaktionsschritt ablaufenden Transformationen sind in blau hervorgehoben. Abbildung in Anlehnung an Sundermann *et al.*<sup>[69]</sup>

### c) Terminierungsschritt zur Freisetzung des Polyketidrückgrats und nachfolgende Post-PKS-Prozesse

Nach Erreichen der vollständigen Länge der Polyketidkette, wird der Polyketidthioester in den meisten Fällen als lineares Molekül hydrolytisch gespalten oder das Polyketid durch einen intramolekularen Angriff als cyclisches Produkt freigesetzt. Beide Reaktionen können durch unterschiedliche TE (Thioesterasen) katalysiert werden (Abbildung 14).<sup>[70]</sup>



**Abbildung 14: Macrolactonisierung oder Hydrolyse zur Freisetzung der prozessierten Polyketidkette von der PKS.** Beide Reaktionen können über die katalytische Triade verschiedener TEs (Thioesterasen) katalysiert werden. Abbildung in Anlehnung an S. Klopries.<sup>[68]</sup>

Dabei kann die TE entweder als Domäne in die modulare PKS integriert sein (z.B. Erythromycinbiosynthese) oder als freistehendes Enzym agieren (z.B. Monensinbiosynthese).<sup>[61b,c,71]</sup> Weitaus seltener kommen auch reduktive oder oxidative Spaltungen vor.<sup>[64b]</sup>

Die im Anschluss stattfindenden Post-PKS-Prozesse stellen eine weitere Quelle für die strukturelle Diversität dar und sind häufig maßgeblich für die biologische Aktivität der Polyketide.<sup>[72]</sup> Typische Reaktionen sind die Cyclisierung linearer Polyketide oder einzelner Teile des Moleküls, weitere Veränderungen des Redoxzustands, sowie Einführungen funktioneller Gruppen, wie Glycosylierungen, Aminierungen oder weiterer Hydroxy-, Epoxid-

und Ketofunktionen (siehe Abbildung 10). Wesentlich seltener werden halogenierte oder alkinhaltige Polyketide isoliert.<sup>[73]</sup>

## 2 Herausforderungen in der Naturstoffforschung

Obwohl die Natur die größte Quelle physiologisch aktiver Substanzen darstellt, können viele Naturstoffe aufgrund ihrer geringen Verfügbarkeit nicht kommerziell oder effizient genutzt werden.

Beispielsweise wurde das potente Chemotherapeutikum Taxol (unter dem Namen Paclitaxel vermarktet) ursprünglich rein aus der Rinde seines natürlichen Produzenten, der Pazifischen Eibe, isoliert, wo es nur einen Anteil von etwa 0,01% des Gesamttrockengewichts ausmacht.<sup>[74]</sup>

Dies entspricht einer Abholzung von bis zu vier dieser seltenen und langsam wachsenden Bäume für eine therapeutische Anwendung am Patienten zur Behandlung eines Tumors.<sup>[75]</sup>

Aufgrund der hohen strukturellen Komplexität von Naturstoffen scheitert auch die Nutzung chemisch totalsynthetischer Ansätze häufig an der technischen Durchführbarkeit und der geringen Gesamtausbeute der gewünschten Produkte. Zum Beispiel umfasst die von Nicolaou 1994 beschriebene Totalsynthese für Taxol 33 Stufen mit einer Gesamtproduktausbeute von etwa 0,02%.<sup>[76]</sup>

Eine andere Herausforderung stellt die Derivatisierbarkeit von Naturstoffen dar. Viele unmodifizierte Naturstoffe können nicht als Arzneimittel genutzt werden, da sie toxische Nebeneffekte, eine schlechte Bioverfügbarkeit oder geringe Halbwertszeiten am Wirkort aufweisen. Zudem stellt die Entwicklung von Resistenzmechanismen gegen bekannte Wirkstoffe gerade bei lebensbedrohlichen Krankheiten, wie Krebs oder die Infektion mit pathogenen Bakterien, ein zentrales Problem dar.<sup>[77]</sup>

Obwohl viele in der pharmazeutischen Industrie genutzten Naturstoffderivate durch chemische Partialsynthese erzeugt wurden, gelingt eine Derivatisierung nicht in allen Fällen chemo-, regio- oder stereoselektiv.

Sowohl zur Erzeugung ganzer Naturstoffe als auch zur Synthese von Naturstoffderivaten bieten sich daher (chemo-)fermentative oder (chemo-)enzymatische Verfahren an, da Biokatalysatoren unter milden Reaktionsbedingungen Aktivität zeigen und meist eine hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität vermitteln, ohne auf eine aufwendige Schutzgruppenchemie zurückgreifen zu müssen.

In der Industrie werden fermentative Verfahren für viele Naturstoffe angewendet. So wird heutzutage, um den Bedarf an Taxol zu decken, neben der partialsynthetischen Herstellung, Taxol auch über eine optimierte Pflanzenzellfermentation gewonnen.<sup>[78]</sup> Ein anderes

---

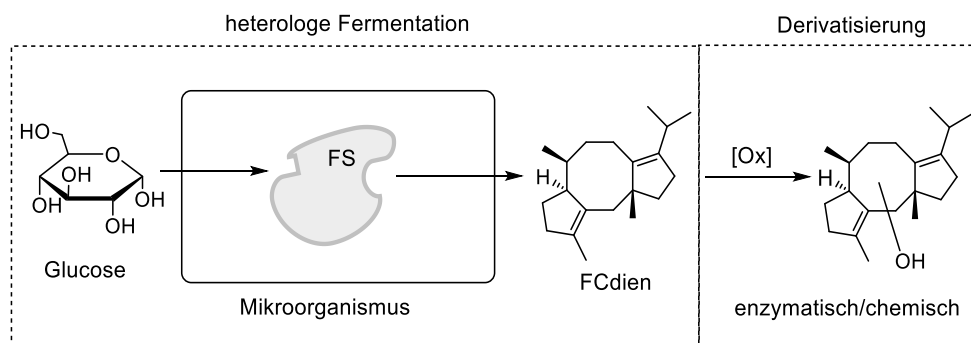
prominentes Beispiel stellt die teils mikrobielle, heterologe Fermentation und teils photochemische Partialsynthese des wichtigen Antimalariamedikaments Artemisinin dar.<sup>[79]</sup>

Um das Potential (chemo-)fermentativer und (chemo-)enzymatischer Techniken breit anwenden zu können, müssen Wege gefunden werden, diese auf andere Systeme zu übertragen. Des Weiteren bedarf es neuer generalisierbarer Strategien, um komplexe Naturstoffe oder Naturstoffderivate zugänglich zu machen.

### III Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen unterschiedliche fermentative oder enzymatische Verfahren genutzt werden, um Analoga oder Derivate teils schwer zugänglicher Naturstoffe zu erzeugen. Als ein Kernthema dieser Arbeit steht die mikrobielle Fermentation des Fusicoccanvorläufers FCdien im Vordergrund. Obwohl die Fusicoccane interessante physiologische Aktivitäten aufweisen (siehe Kapitel II1.1.2), sind sie aufgrund ihrer geringen Verfügbarkeit nicht ausreichend erforscht. Ihre Isolation aus ihren natürlichen Quellen wird durch eine genetische Instabilität der produzierenden Organismen erschwert.<sup>[51,53b,80]</sup>

Durch eine optimierte heterologe Fermentation sollen präparative Mengen des Diterpens FCdien hergestellt und durch eine anschließende enzymatische oder chemische Oxidation einfache Fusicoccananaloga erzeugt werden (Abbildung 15).



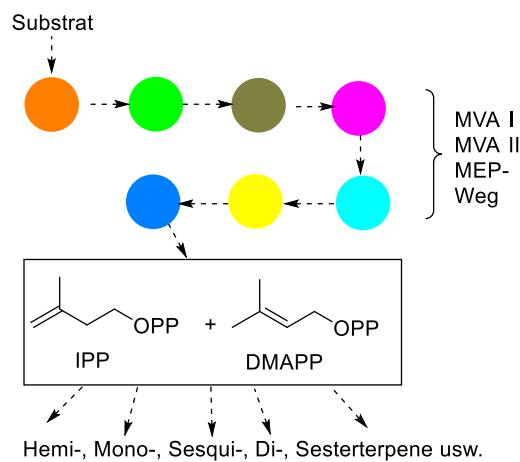
**Abbildung 15: Heterologe Fermentation des FCdiens und anschließende enzymatische oder chemische Derivatisierung zur Erzeugung von einfachen Fusicoccananaloga.**

Dabei soll die Produktausbeute des FCdiens nicht nur durch eine systematische Variation der Fermentationsparameter optimiert, sondern auch, im besten Falle, wichtige inhärente Limitationen identifiziert werden.

Ein Angriffsziel stellt dabei die allgemeine geringe lösliche Expression von Terpensynthasen in heterologen Fermentationssystemen dar. Um die lösliche Expression der Terpensynthase AbFS (FS aus *A. brassicicola*) zu steigern, sollen daher limitierende Faktoren in einfachen Expressionssystemen wie *Escherichia coli* identifiziert und die intrinsische Stabilität des Enzyms durch gerichtete Proteinevolution erhöht werden.

Alternativ zu der heterologen Fermentation soll ein Konzept für die zellfreie, enzymatische Totalsynthese von Terpenen formuliert werden (Abbildung 16).

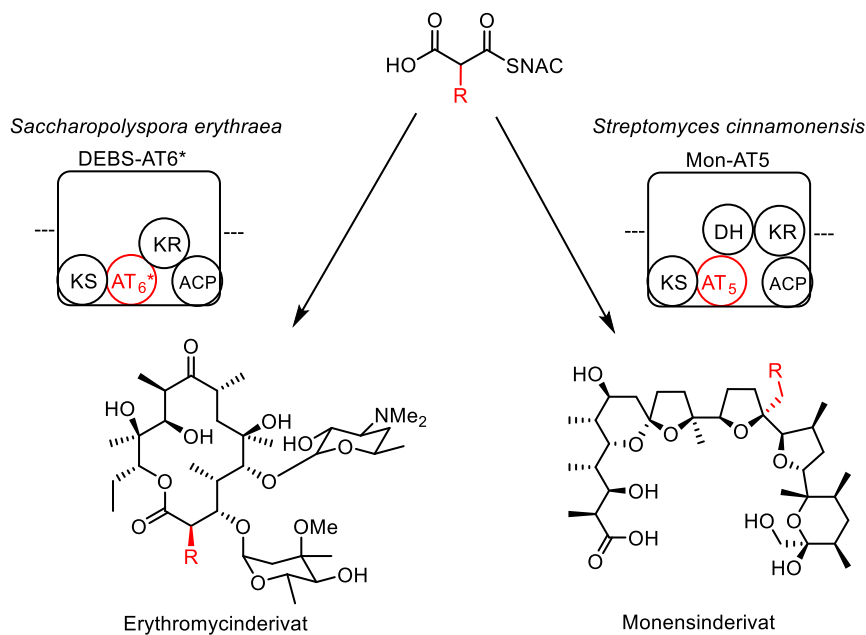




**Abbildung 16: *In vitro* Rekonstitution der Terpenbiosynthese.** Ausgehend von IPP und DMAPP können prinzipiell alle bekannten Terpene erzeugt werden.

Dabei liegt der Fokus insbesondere auf der Identifizierung und Isolation thermostabiler Enzyme, um die *in vitro*-Synthese der universellen Terpenvorläufer IPP und DMAPP zu bewerkstelligen.

Als zusätzliches Thema sollen enzymgeleitete und mikrobielle Verfahren zur Derivatisierung von Polyketiden genutzt werden. Dabei steht die Untersuchung der AT-Domänen der modularen Typ I-PKS der Erythromycin- und Monensinbiosynthese im Vordergrund. Durch die gezielte Mutagenese oder die Ausnutzung der natürlichen Substratpromiskuität einzelner AT-Domänen, soll der Einbau unterschiedlicher synthetischer Bausteine vorhergesagt und bewerkstelligt werden (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Enzymgeleitete und mikrobielle Derivatisierung der reduzierten Polyketide Erythromycin A und Monensin.** DEBS: 6-Desoxyerythronolid B Synthase, Mon: PKS aus der Monensinbiosynthese.

## IV Ergebnisse und Diskussion

### 1 Heterologe Fermentation des Diterpens FCdien

Die vom biosynthetischen Intermediat FCdien abgeleiteten Diterpenfusicoccane bilden aufgrund ihrer stabilisierenden Eigenschaft auf 14-3-3-Zielproteinkomplexe interessante Forschungsziele (siehe Kapitel II 1.1.2 a).<sup>[44d,81]</sup> Einzelne Vertreter dieser Substanzfamilie sind jedoch nur begrenzt oder, im Falle des Cotylenin A, gar nicht mehr durch ihre natürlichen Quellen verfügbar.<sup>[51,53b,80]</sup> Bisher gelang nur die Synthese einzelner Strukturelemente, nicht aber die Totalsynthese dieser Moleküle.<sup>[37f,82]</sup>

Eine Strategie, die auf der präparativen Bereitstellung des 5-8-5-Ringsystems als Kernstruktur dieser Fusicoccane mit einer anschließenden Derivatisierung beruht, sollte daher im Rahmen dieser Arbeit einen Zugang zur Erforschung der Fusicoccane durch Struktur-Wirkungsstudien ermöglichen. Die chemische Synthese der Kernstruktur der Diterpenfusicoccane ist zwar veröffentlicht, gelang aber genauso wie die Synthese andere komplexer Diterpenoide und –terpene, z.B. (-)-Cotylenol oder Taxadien (Taxa-4(5),11(12)-dien), nur in analytischen Ausbeuten.<sup>[37f,82a,83]</sup> Ein biosynthetischer Zugang mit genetisch veränderten Mikroorganismen kann eine Alternative zur rein chemischen Synthese bieten. Dabei können kostengünstige und nachwachsende Rohstoffe für die Produktion hochkomplexer und enantioselektiver Verbindungen eingesetzt werden.<sup>[84]</sup> Heterologe Wirte bieten dabei gegenüber den natürlichen Produktionsorganismen den Vorteil, dass die Regulation der eingebrachten Fremdgene steuerbar und besser nachvollziehbar wird.<sup>[85]</sup> In der Regel werden gut erforschte, leicht kultivierbare und einfach zu manipulierende Mikroorganismen verwendet. Eine Kombination mit dem *Metabolic Engineering*, bei dem einzelne Biosynthesewege im Hinblick auf die Bereitstellung größerer Mengen Vorläufermoleküle für die Erzeugung des gewünschten Metabolits optimiert werden, kann ein enormes Potential für die präparative Produktion komplexer Naturstoffe bieten.<sup>[85d,86]</sup>

Als biosynthetisches Intermediat der Fusicoccane, Cotylenine und Brassicene, könnte FCdien als Startmolekül für die Herstellung verschiedener bioaktiver Fusicoccananaloga durch eine anschließende chemische oder enzymatische Derivatisierung (Kapitel III, Abbildung 15) genutzt werden. Daher wurde die heterologe Fermentation des FCdiens anvisiert.

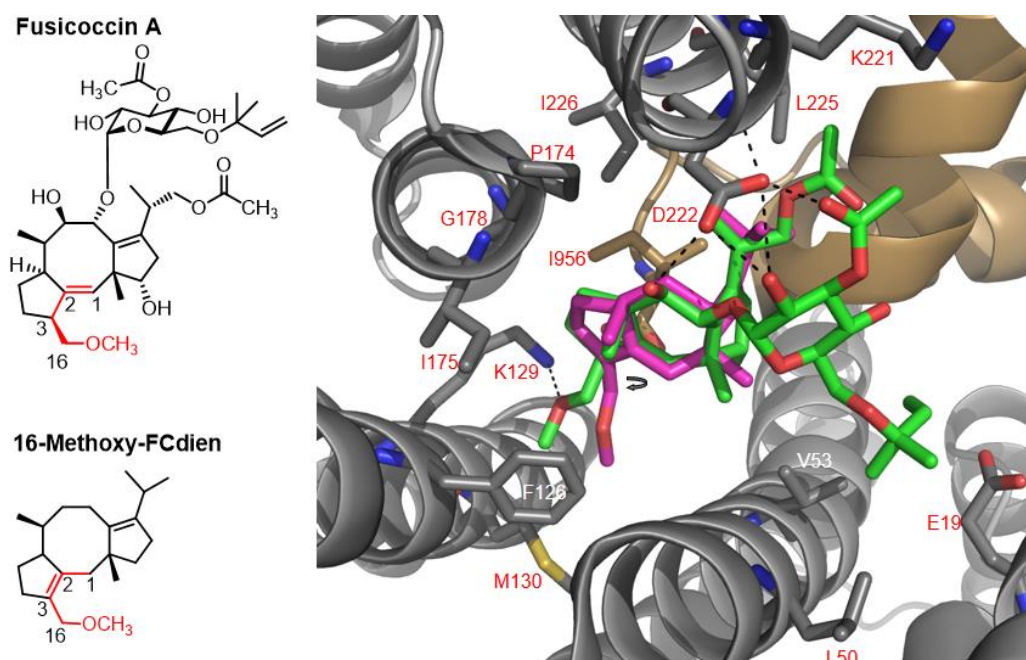
## 1.1 Vorarbeiten und heterologe Fermentation des FCdiens in verschiedenen Stämmen

Einige der in Kapitel IV1.1 beschriebenen Ergebnisse stammen aus meiner Masterarbeit, die in einem Kooperationsprojekt mit dem Arbeitskreis Ottmann (Technische Universität Eindhoven) erzielt und zusammen mit weiteren Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit in Arens *et al.* veröffentlicht wurden.<sup>[87]</sup> Zur Verbesserung der Lesbarkeit der vorliegenden Schrift, werden sie kurz diskutiert und im Rahmen dieser Arbeit in neue Erkenntnisse eingegliedert.

### 1.1.1 Manuelle Überlagerung des Ringsystems des Fusicoccin A mit dem Ringsystem des FCdiens

Zunächst wurde die Wechselwirkung der Kernstruktur und der dekorierenden funktionellen Gruppen der Diterpenfusicoccane am Beispiel des Fusicoccin A mit einem Zielproteinkomplex analysiert.<sup>[80]</sup> Der ternäre Komplex zwischen dem Kleinmolekül und den Zielproteinen wird vor allem durch hydrophobe Wechselwirkungen und durch eine Wasserstoffbrücke, ausgehend von der 16-Methoxyfunktion des Kohlenstoffgrundgerüsts der Diterpenfusicoccane, stabilisiert (siehe Abbildung 18).<sup>[44e,f]</sup> Damit sind die konformelle Anordnung des Ringsystems und die räumliche Orientierung der 16-Methoxyfunktion ausschlaggebend für die physiologische Aktivität der Fusicoccane. Bei dem biosynthetischen Intermediat FCdien handelt es sich jedoch um ein Doppelbindungsisomer der eigentlichen Diterpenfusicoccankernstruktur, dem Fusicocca-1,10(14)-dien (siehe Abbildung 18). Eine analoge physiologische Wirkung auf die 14-3-3-Proteine und den entsprechenden Zielenzymen durch FCdien-Derivate ist nur zu erwarten, falls die Ringstruktur des FCdiens eine ähnliche Konformation aufweist, wie die Kernstruktur der Diterpenfusicoccane. Daher wurde die dreidimensionale Struktur des FCdien-Derivats 16-Methoxy-FCdien simuliert (MM2 MD, Chem3D Pro 11.0) und in der Arbeitsgruppe Ottmann mit einem Kristallstrukturmodell für die Stabilisierung eines 14-3-3-Zielenzym-Proteinkomplexes durch Fusicoccin A (pdb: 2o98) überlagert (Marvin Scetch, Abbildung 18).<sup>[44e,80]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die tricyclischen Kohlenstoffgerüste des 16-Methoxy-FCdiens und des Fusicoccin A eine ähnliche U-förmige Konformation besitzen. Damit treten viele der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Fusicoccin A und der Proteinumgebung auch bei dem 16-Methoxy-FCdien auf. Die freie Rotation der  $\sigma$ -Bindung zwischen C3 und C16 des 16-Methoxy-FCdiens, lässt einen Ausgleich der abweichenden Bindungswinkel an dieser Position zwischen den beiden betrachteten Kleinmolekülen zu. Diese theoretischen Überlegungen legitimierten die Auswahl des FCdiens als Startmolekül für die Herstellung verschiedener Diterpenfusicoccananaloga mit ähnlichen physiologischen Wirkungen wie die Fusicoccine und Cotylenine. Als Grundlage der heterologen Erzeugung von

Naturstoffen ist allerdings auch die Kenntnis und Verfügbarkeit der für die Schlüsselenzyme codierenden Gene notwendig.



**Abbildung 18:** Überlagerung der modellierten Struktur von 16-Methoxy-FCdien (Chem3D Pro 11.0, MM2 MD) mit dem Kristallstrukturmodell des durch Fusicoccin A stabilisierten Proteinkomplexes der Tabak 14-3-3c-Isoform (dunkelgrau) mit dem C-terminalen Fragment der Protonenpumpe PMA2 (bronzefarbig, pdb: 2o98).<sup>[80,87]</sup> Essentielle Aminosäuren zur Stabilisierung sind benannt. Sauerstoffatome sind in rot und Stickstoffatome in blau gekennzeichnet. Wasserstoffatome sind nicht gezeigt. Der Pfeil beschreibt die freie Rotation um die gekennzeichnete Einfachbindung zwischen C3 und C16 des 16-Methoxy-FCdiens.

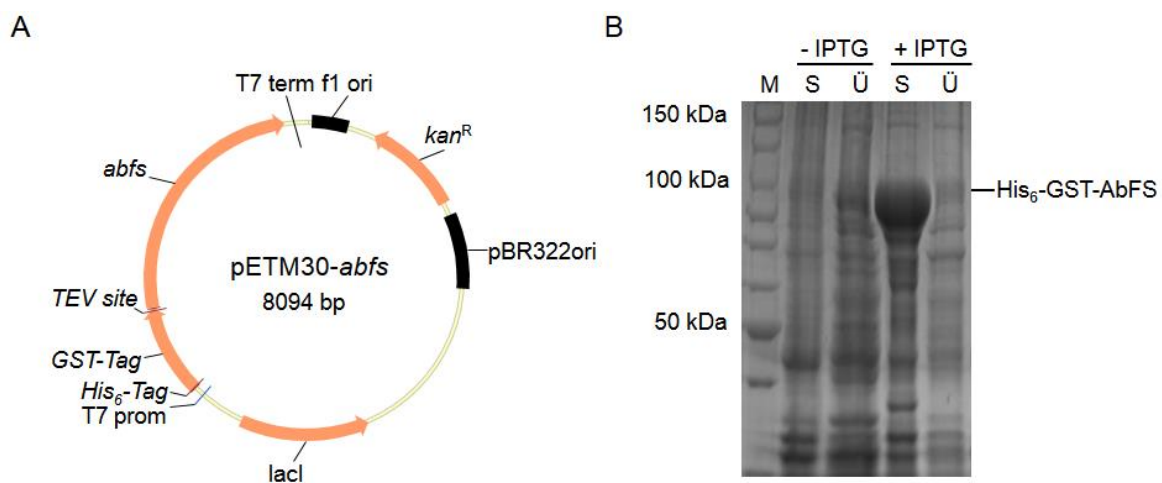
### 1.1.2 Erzeugung eines stabilen, für die FS codierenden Konstrukts als Grundlage zur Klonierung verschiedener Expressionsplasmide

Isoformen des *fs*-Gens wurden bereits aus *P. amygdali* und *A. brassicicola* isoliert (siehe Kapitel II 1.1.2 b).<sup>[53]</sup> Die Gesamt-RNA des Brassicicen produzierenden Stammes *A. brassicicola* UAMH 7474 (Verfügbar durch die Arbeitsgruppe Ottmann) wurde zur Synthese des *abfs*-Gens (Gen der *A. brassicicola*-Fusicoccadiensynthese) durch RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) verwendet.<sup>[371,80]</sup> Anschließend wurde über eine *blunt*-Ligation des Gens das Plasmid pUC18-*abfs* erzeugt.<sup>[80]</sup> Die Sequenzanalyse des Gens lieferte eine nahezu 100%-ige Übereinstimmung zu der Sequenz des zuvor isolierten *fs*-Gens aus dem Stamm *A. brassicicola* ATCC 96836 (GenBank AB465604.1). Lediglich an Position 240 wurde eine stille Mutation gefunden, die auf der Variation des für die RNA-Isolation eingesetzten Stammes beruhen könnte. pUC18-*abfs* wurde im Anschluss als Startpunkt zur Klonierung verschiedener Expressionsplasmide für unterschiedliche Mikroorganismen verwendet.

### 1.1.3 Fermentation des FCdiens durch *E. coli*

Die ersten Experimente zur Fermentation des FCdiens wurden mit Hilfe des Prokaryoten *E. coli* realisiert. Sowohl die FS aus *A. brassicicola* als auch aus *P. amygdali* wurden bereits zuvor erfolgreich als GST-Fusionsproteine (Glutathion-S-Transferase) in *E. coli* exprimiert und FCdien in den Kulturextrakten nachgewiesen.<sup>[53,80,87]</sup>

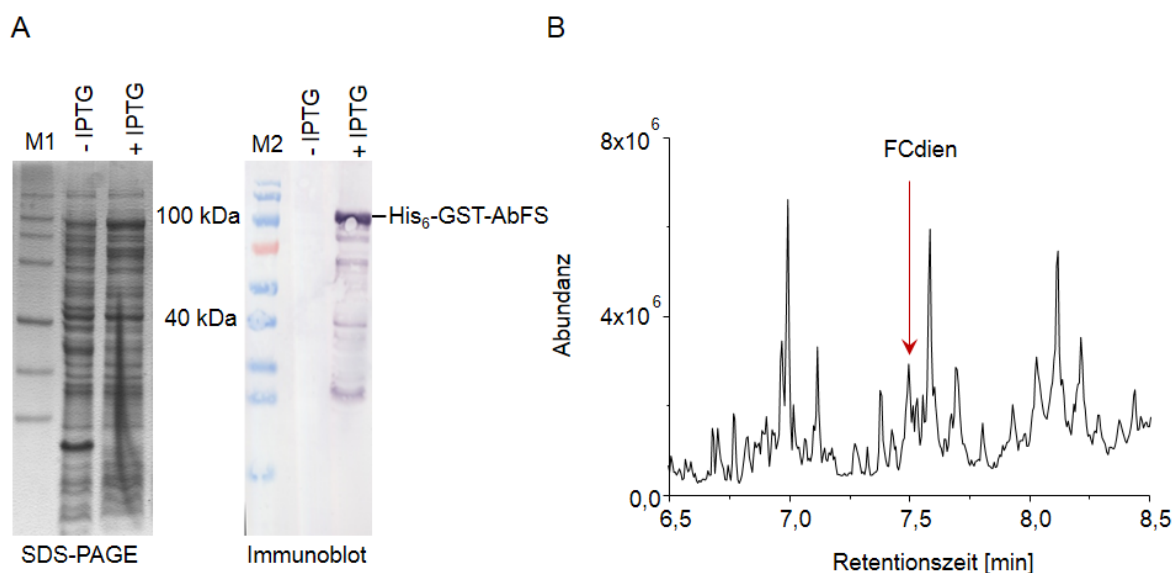
Zur Reproduktion dieser Versuche und zur Kalibrierung der GC-MS-Analytik (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) für FCdien, wurde das Plasmid pETM30-*abfs* (Abbildung 20 A) über die sequenz- und ligationsunabhängige Klonierungsmethode SLIC-MIX (engl. *sequence and ligation independent cloning*, Kapitel V5.6.2) konstruiert (Abbildung 19 A).<sup>[80]</sup>



**Abbildung 19: Vektorkarte des *E. coli*-Expressionsvektors pETM30-*abfs* (A)<sup>[80,87]</sup> und heterologe Expression des His<sub>6</sub>-GST-AbFS-Fusionsproteins in *E. coli* (B).** ori: Replikationsursprung, *kan<sup>R</sup>*: Kanamycinresistenzgen, *lacl*: Gen für den Lactoserepressor, T7 prom: Promoter der T7-Polymerase, *His<sub>6</sub>-Tag*: Hexahistidin-Tag, *GST-Tag*: Glutathion-S-Transferase-Tag, *TEV site*: Codierende Sequenz für die *Tabacco Etch Virus* Proteaseschnittstelle, *abfs*: Codierende Sequenz für die AbFS, T7 term: T7-Polymeraseterminatorsequenz, M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific), S/Ü: Zellsediment bzw. Zellüberstand nach Zellaufschluss, kDa: Kilodalton.

Dieses Plasmid ermöglicht eine Expression der AbFS in Fusion mit den N-terminalen Fusionstags His<sub>6</sub> (Hexahistidin) und GST. Zur Expression der AbFS unter der Kontrolle des starken T7/*lac*-Promotersystems, wurden *E. coli* BL21-Gold(DE3) mit pETM30-*abfs* transformiert (Kapitel V6.1.1).<sup>[80,87]</sup> Die Proteinexpression wurde mit 1 mM des Lactosederivats IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) bei einer OD<sub>600</sub> (optischen Dichte bei 600 nm) von 0,6 induziert und die Zellen in TB-Medium (engl. *terrific broth*, Tabelle 33) kultiviert (Kapitel V6.2.4).<sup>[80,87]</sup> Da die AbFS eine Terpensynthese des Typs I und damit Mg<sup>2+</sup>-abhängig ist, wurde dem Medium 1 mM MgCl<sub>2</sub> hinzugemischt.<sup>[53a]</sup> Es wurde bei einer Temperatur von 19°C exprimiert, da die Verringerung der Translationsgeschwindigkeit bei niedrigen Temperaturen in vielen Fällen die lösliche Expression rekombinanter Proteine erhöhen kann.<sup>[88]</sup> Zum Abgleich

mit dem Hintergrund, der durch die Expression *E. coli*-eigener Proteine hervorgerufen wird, wurde eine Expressionskontrolle ohne IPTG-Zugabe und mit 1% (w/v) Glucose zur Kataboliturdrückung der Transkription des *abfs*-Gens durchgeführt.<sup>[89]</sup> Nach 18 h Expression erfolgte die Lyse der Zellen (Kapitel V7.2.1) mit einer anschließenden SDS-PAGE-Analyse (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, Kapitel V7.1) des Zelllysats. Dabei konnte eine deutliche Überexpression des His<sub>6</sub>-GST-AbFS-Proteins mit einer berechneten Größe von 115 kDa (ExPASy) detektiert werden (Abbildung 19 B).<sup>[80,87,90]</sup> Die lösliche Expression des Fusionsproteins konnte jedoch durch die SDS-PAGE nicht eindeutig nachgewiesen werden, da auch in dem Zellüberstand der Expressionskontrolle nach Zellaufschluss ein Protein mit einem ungefähren Molekulargewicht von 110 kDa detektiert wurde. Erst eine nähere Analyse durch einen Immunoblot mit einem Anti-GST-Antikörper ermöglichte den Nachweis einer kleinen Fraktion löslichen His<sub>6</sub>-GST-AbFS-Fusionsproteins im Zellüberstand (Abbildung 20 A).<sup>[80]</sup>



**Abbildung 20: Nachweis der löslichen Expression des His<sub>6</sub>-GST-AbFS-Fusionsproteins im Überstand nach Zellaufschluss der mit pETM30-*abfs* transformierten *E. coli* BL21-Gold(DE3) durch Immunoblot (A) und Nachweis der enzymatischen Aktivität des Enzyms durch die Detektion von FCdien im *E. coli*-Kulturextrakt mittels GC-MS (B).**<sup>[80,87]</sup> M1: Roti®-Mark 10-150 (Carl Roth), M2: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas), kDa: Kilodalton.

Eine Variation der Induktionsmittelkonzentration von 1 mM auf 0,5 mM IPTG und des Nährmediums von TB zu 2xTY (Tabelle 33) konnte die lösliche Expression der AbFS in *E. coli* nicht steigern (nicht gezeigt). Neben dem His<sub>6</sub>-GST-AbFS-Fusionsprotein wurden in den Zelllysaten bei den Immunoblots auch noch eine Reihe weiterer GST-fusionierter Proteine mit einem geringeren Molekulargewicht angefärbt. Dies könnte auf eine unvollständige Synthese oder einen proteolytischen Abbau der AbFS in *E. coli* hinweisen.

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der AbFS in *E. coli* wurde nach 48 h Expression in TB-Medium die gesamte Kultur mit *n*-Pentan extrahiert (Kapitel V9.1.1). Bei der GC-MS-Analyse des Gesamtkulturextrakts konnte eine Substanz mit dem literaturbeschriebenen Massenspektrum für FCdien detektiert werden (Abbildung 20 B).<sup>[53]</sup> Auf eine Isolation des FCdiens aus den Kulturextrakten wurde wegen zu geringer Ausbeuten verzichtet.

Für die geringe Produktion des FCdiens durch *E. coli* kommen der veränderte Codongebrauch und die abweichende Proteinmaschinerie von *E. coli* im Vergleich zu dem eukaryotischen *abfs*-Ursprungsorganismus in Betracht. Tatsächlich wurde ein großer Teil des Proteins als *Inclusion Bodies* in dem Zellsediment nach Zellyse detektiert (Abbildung 19) und ein proteolytischer Abbau oder ein frühzeitiger Abbruch der Translation der AbFS in *E. coli* beobachtet (Abbildung 20). Außerdem wird die freie Verfügbarkeit der Terpenvorläufermoleküle IPP und DMAPP in *E. coli* allgemein als gering betrachtet.<sup>[91]</sup> Die Optimierung von *E. coli*-Stämmen zur präparativen Fermentation von Sekundärmetaboliten, wie Terpenen oder Polyketiden, ist ein aufwendiger und langwieriger Prozess.<sup>[92]</sup> Eine schnelle Steigerung des Fermentationslevels war daher eher durch einen Wechsel des Fermentationsorganismus als durch eine systematische Stammoptimierung zu erwarten.

#### 1.1.4 Fermentation des FCdiens durch *Aspergillus nidulans*

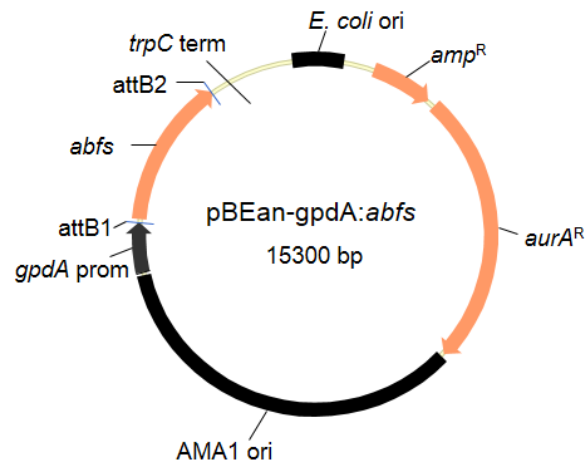
Der seit Jahrzehnten in der eukaryotischen Zellbiologie als Modellorganismus verwendete filamentöse Pilz *A. nidulans* ist bekannt für seinen starken Sterol- und Terpenmetabolismus.<sup>[93]</sup> Trotz seines Potentials, sind bislang nur wenige Beispiele für die heterologe Fermentation von Terpenen durch *A. nidulans* beschrieben. Lediglich die heterologen Fermentationen des pflanzlichen Sesquiterpens Amorphadien (Amorpha-4,11-dien) als Vorstufe des Antimalariamedikaments Artemisinin und des aus dem Pilz stammenden Sesquiterpens 6-Protoilluden als Vorstufe der antibiotisch und anticarcinogen wirksamen Illudine wurden veröffentlicht.<sup>[94]</sup>

Zur mikrobiellen Produktion von kleinen organischen Molekülen, Naturstoffen oder Enzymen ist ein steigendes Interesse an der Festphasenfermentation (engl. SSF = *solid state fermentation*) zu erkennen.<sup>[95]</sup> 99% aller in der Biotechnologie und Wissenschaft verwendeten höheren Pilze wurden von festen Substraten isoliert.<sup>[96]</sup> Um eine Beeinträchtigung der metabolischen Prozesse und des Produktspektrums durch die Kultivierungsbedingungen in Flüssigmedien auszuschließen, wird bei der Festphasenfermentation das natürliche Habitat der Mikroorganismen nachgeahmt. Dabei werden sowohl inerte Substrate als auch Substrate, die gleichzeitig als Energiequelle für das Wachstum der Mikroorganismen dienen, als Untergründe verwendet.<sup>[97]</sup> Darüber hinaus bietet die Festphasenfermentation ökonomische und prozesstechnische Vorteile, weil keine komplizierte Rührtechnik entwickelt werden muss,



Energiekosten eingespart und die Entsorgung großer kontaminierter Abfälle vermieden werden können.<sup>[96]</sup>

Die heterologe Fermentation des Diterpens FCdien durch *A. nidulans* wurde in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Jennewein (Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Aachen) erarbeitet.<sup>[80,87]</sup> Da die genetische Manipulation von *A. nidulans* bereits etabliert war, wurde der *A. nidulans*-Expressionsvektor pBEan-gpdA:abfs (Abbildung 21) durch Dr. Benedikt Engels in der Arbeitsgruppe Jennewein kloniert und über Protoplastentransformation in den Stamm *A. nidulans* M 4194 (DSMZ 820, Tabelle 17) eingebracht.<sup>[80,87,94b]</sup> Der *E. coli* - *A. nidulans* Shuttlevektor pBEan-gdpA wurde im Vorfeld für die heterologe Expression des Sesquiterpens 6-Protoilluden in der Arbeitsgruppe Jennewein entwickelt.<sup>[94b]</sup> Der Vektor basiert auf dem kommerziell erhältlichen Plasmidrückgrat pAUR316 (Takara Clontech) und enthält neben dem AMA1-Element zur autonomen Replikation des Plasmids in *A. nidulans* auch einen Replikationsursprung zur Propagierung des Vektors in *E. coli*.<sup>[98]</sup> Für die Regulation der Proteinexpression und für das schnelle Einbringen von Fremdgenen wurde eine Expressionskassette bestehend aus dem starken konstitutiven *gpdA*-Promoter (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenasepromoter), der Destinationskassette aus dem Gateway™-Vektor pDEST14 (Invitrogen) und dem *trpC*-Terminator aus der Tryptophanbiosynthese in das Plasmidrückgrat eingebracht.<sup>[99]</sup>

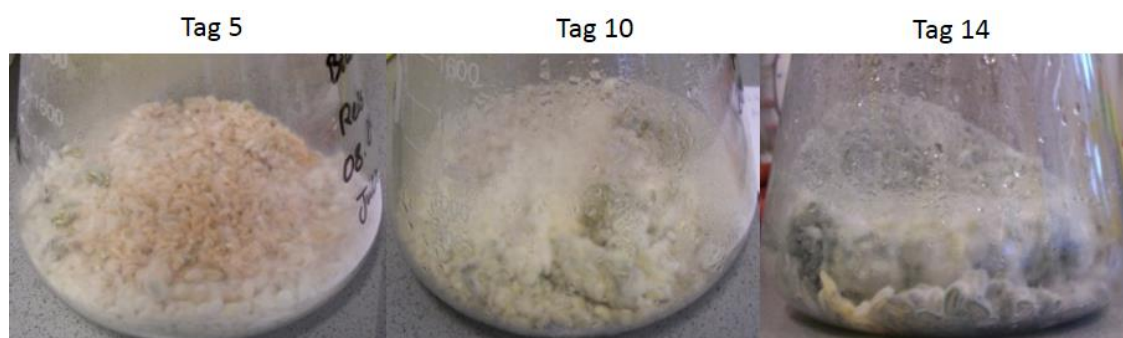


**Abbildung 21: Plasmidkarte des *A. nidulans*-Expressionsvektors pBEan-gdpA:abfs.<sup>[80,87]</sup>** *E. coli* ori: Replikationsursprung zur Vervielfältigung des Vektors in *E. coli*, *amp<sup>R</sup>*: Ampicillinresistenzgen zur Selektion von *E. coli*, *aurA<sup>R</sup>*: Aureobasidin A-Resistenzgen zur Selektion von *A. nidulans*<sup>[100]</sup>, AMA1 ori: Element zur Replikation des Plasmids in *A. nidulans*<sup>[98]</sup>, *gpdA prom*: Promoterregion des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenasegens aus *A. nidulans*, attB1 und attB2: Gateway®-Rekombinationsstellen, *abfs*: Codierende Sequenz für die AbFS, *trpC term*: Transkriptionsterminatorregion des *trpC*-Gens der Tryptophanbiosynthese aus *A. nidulans*. Dieser Vektor wurde in der Arbeitsgruppe Jennewein (Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Aachen) im Rahmen der Dissertation von Benedikt Engels erstellt.<sup>[94b]</sup>

Zum Nachweis der heterologen Produktion des FCdiens durch *A. nidulans* M 4194 wurden im Rahmen meiner Masterarbeit jeweils drei mit pBEan-gpdA:abfs transformierte *A. nidulans*-

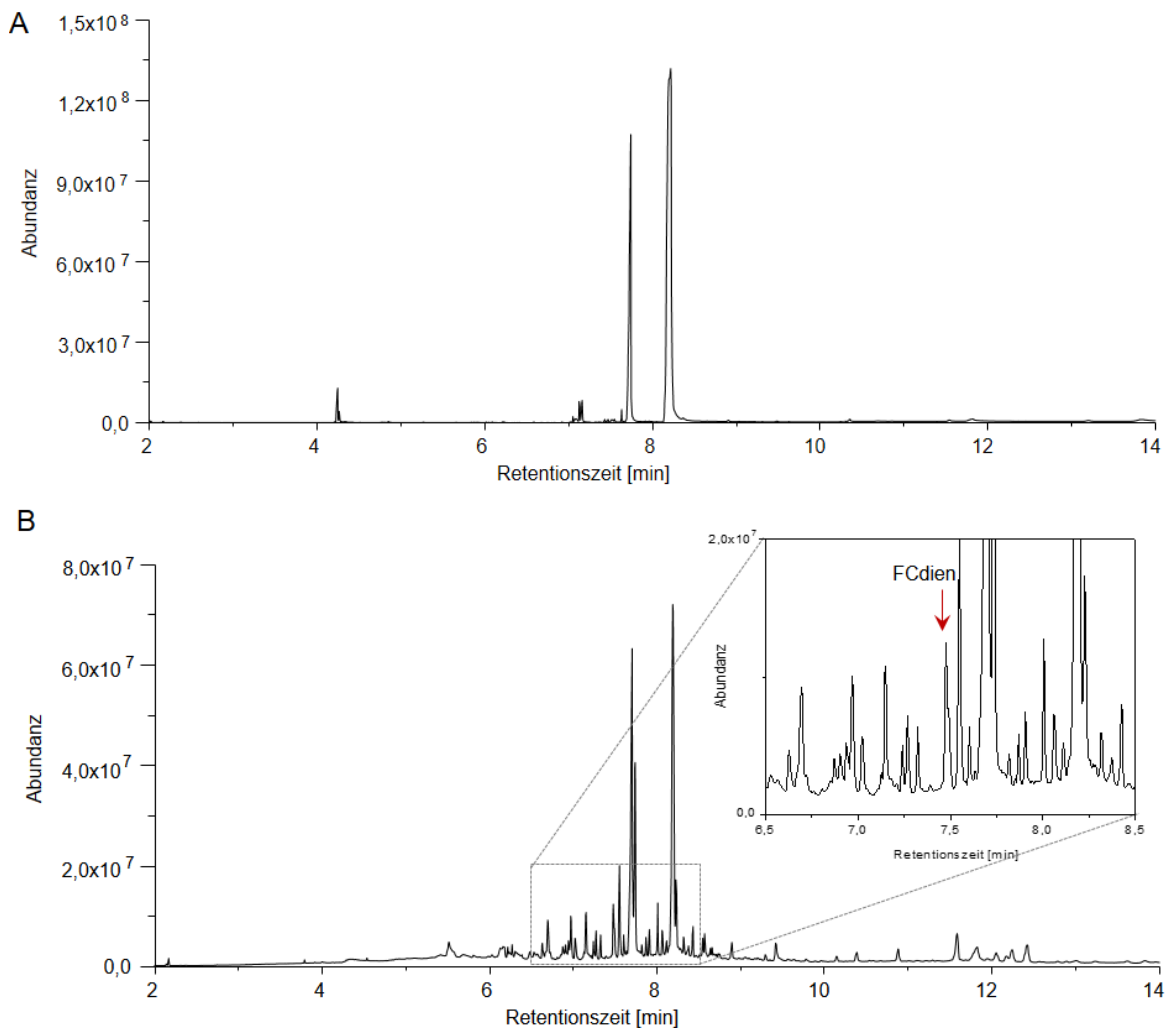


Klone zur Inokulation von feuchtem, autoklavierten Reis verwendet (Abbildung 22) und für 14 Tage unter Lichtausschluss inkubiert.<sup>[80,87]</sup>



**Abbildung 22: Verschiedene Zeitpunkte einer Festphasenfermentation auf Reis mit einem durch pBEan-gpdA:abfs transformierten *A. nidulans*-Klon.**<sup>[80,87]</sup>

Da Sequenzanalysen auf ein orthologes *fs*-Gen im Genom des nah verwandten Stammes *A. nidulans* FGSC A4 hinwiesen, wurde außerdem ein mit dem pBEan-gpdA-Leervektor transformierter Klon getestet (Abbildung 23 A).<sup>[93b]</sup> Nach Extraktion der Kulturen mit Petrolether konnte nur bei den mit pBEan-gpdA:abfs transformierten Klonen jeweils ein kleines Signal mit dem für FCdien charakteristischen Massenspektrum detektiert werden (exemplarisch Klon 3, Abbildung 23 B). Dies belegte zweifelsfrei eine Überexpression des Fremdgens *abfs* in diesem Fermentationssystem. Durch verschiedene Extraktionsmethoden und unterschiedliche Lösungsmittel für die Extraktion konnte die relative Intensität des FCdien-Signals im Gaschromatogramm nicht gesteigert werden.<sup>[80]</sup> Dafür wurde jeweils, ähnlich wie bei der Expression der pflanzlichen Amorphadiensynthase durch Lubertozzi *et al.*, eine erhöhte Produktdiversität durch die Expression der AbFS in *A. nidulans* im Vergleich zur Leervektorkontrolle beobachtet.<sup>[94a]</sup> Eine mögliche Erklärung für die Produktdiversität wäre eine Umsetzung des FCdiens durch wirtseigene Enzyme, wie beispielsweise durch die zahlreich in *A. nidulans* vorkommenden Cytochrom P450 Monooxygenasen.<sup>[101]</sup> Da in einem *A. nidulans*-Stamm bereits per Sequenzanalyse ein orthologes *fs*-Gen identifiziert wurde, kommen in dem hier verwendeten *A. nidulans*-Stamm ebenfalls FCdien-modifizierende Enzyme in Betracht.<sup>[93b]</sup> Andererseits sind viele Terpensynthasen für ihre Produktpromiskuität bekannt.<sup>[102]</sup> Auch bei der Untersuchung der FS aus dem Fusicoccinproduzierenden Pilz *P. amygdali* wurden mindestens neun Beiprodukte detektiert, die zum Teil als Cyclisierungsintermediate bei der Umsetzung von GGPP zu FCdien identifiziert werden konnten (näheres dazu in Kapitel IV1.3.3).<sup>[53a]</sup> Obwohl einzelne Signale im Gaschromatogramm in ihrem Massenspektrum charakteristische Ionen für Terpene aufwiesen, war eine zweifellose Zuordnung dieser Ionen zu einzelnen Terpenen und Terpenoiden auch nach gründlicher Literaturrecherche nicht möglich.



**Abbildung 23: Gaschromatogramme der mit dem Leervektor pBEan-gpdA transformierten Kontrolle (A) und eines mit dem Expressionsvektor pBEan-gpdA:abfs transformierten *A. nidulans* Klons (B).**<sup>[80,87]</sup>

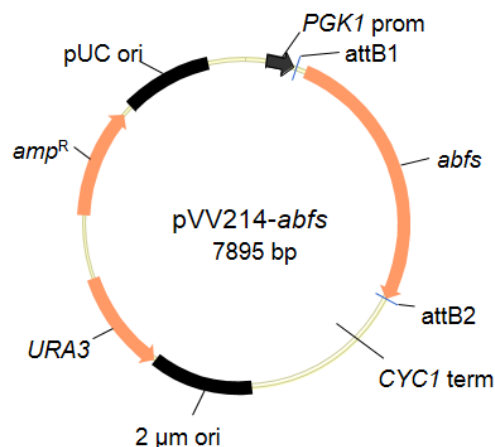
Eine spezifische Fermentation von FCdien mittels *A. nidulans* ist vermutlich nur durch aufwendige Optimierungen möglich. Im Sinne des Projekts wurde erneut der Fermentationsstamm gewechselt.

### 1.1.5 Fermentation des FCdiens durch *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde im Gegensatz zu *A. nidulans* in den letzten Jahren vielfach für die heterologe Fermentation von Terpenen und Terpenoiden genutzt.<sup>[86,103]</sup> Durch die intensiven Optimierungen der beteiligten Biosynthesewege durch *Metabolic Engineering* konnten in einigen Fällen die gewünschten Substanzen in präparativen Mengen erzeugt werden. Das wohl prominenteste Beispiel für das erfolgreiche *Metabolic Engineering* sind die Arbeiten der Arbeitsgruppe um Jay Keasling zur präparativen Erzeugung von Vorstufen bis hin zur Semi-synthese des Antimalariamedikaments Artemisinin.<sup>[79,104]</sup>

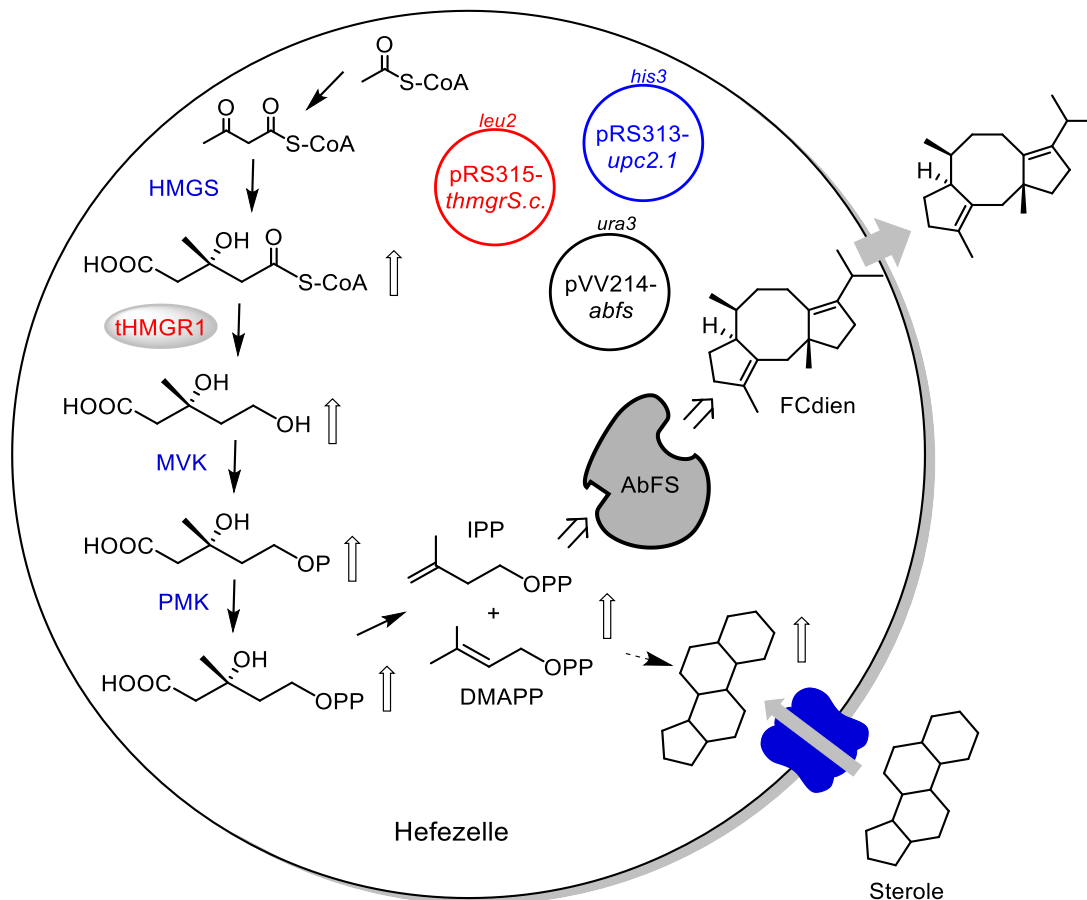
Im Rahmen der Aufklärung der Biosynthese der Fusicoccane wurde die AbFS bereits in *S. cerevisiae* YPH500 unter der Kontrolle des ADH-Promoters (Alkoholdehydrogenase-promoter) exprimiert und die Produktion des FCdiens auf etwa 5 mg/L geschätzt.<sup>[54a]</sup>

Im Rahmen meiner Masterarbeit und der vorliegenden Dissertation wurde für die heterologe Fermentation des FCdiens das sich autonom replizierende Plasmid pVV214-*abfs* (Abbildung 24) verwendet, das über die Gateway<sup>TM</sup>-Technologie kloniert (Kapitel V5.7.2) wurde.<sup>[80,87]</sup> Dies ermöglichte die Expression der AbFS unter der Kontrolle des starken konstitutiven *PGK1*-Promoters (Promoter der 3-Phosphoglyceratkinase Isoform 1).<sup>[105]</sup>



**Abbildung 24: Plasmidkarte des *S. cerevisiae*-Expressionsvektors pVV214-*abfs*.**<sup>[80,87]</sup> pUC ori: Replikationsursprung zur Vervielfältigung des Vektors in *E. coli*, *PGK1* prom: Promoterregion des *PGK1*-Gens aus *S. cerevisiae*, *attB1* und *attB2*: Gateway<sup>®</sup>-Rekombinationsstellen, *abfs*: Codierende Sequenz für die AbFS, *CYC1* term: Transkriptionsterminatorregion des Cytochrom C 1-Gens aus *S. cerevisiae*, 2 μm ori: 2 micron Replikationsursprung für die Vervielfältigung des Plasmids in *S. cerevisiae*, *URA3*: Gen zur Komplementierung der Uracilbiosynthese in *S. cerevisiae*, *amp<sup>R</sup>*: Ampicillinresistenzgen zur Selektion von *E. coli*.

Im Anschluss wurde das Hefeexpressionsplasmid für die Transformation (Kapitel V6.1.2) eines von der Arbeitsgruppe Jennewein (Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Aachen) bereitgestellten *S. cerevisiae* CEN.PK2-1c-Stammes verwendet. Dieser war in seinem Terpenmetabolismus manipuliert und wurde bereits im Vorfeld erfolgreich für die heterologe Fermentation des Diterpens Taxadien genutzt.<sup>[80,87,106]</sup> Zur erhöhten Produktion von Terpenen war dieser Stamm mit den beiden kompatiblen Plasmiden pRS313-*upc2.1* und pRS315-*thmgrS.c.* (Tabelle 20) kotransformiert (Abbildung 25).<sup>[106]</sup>



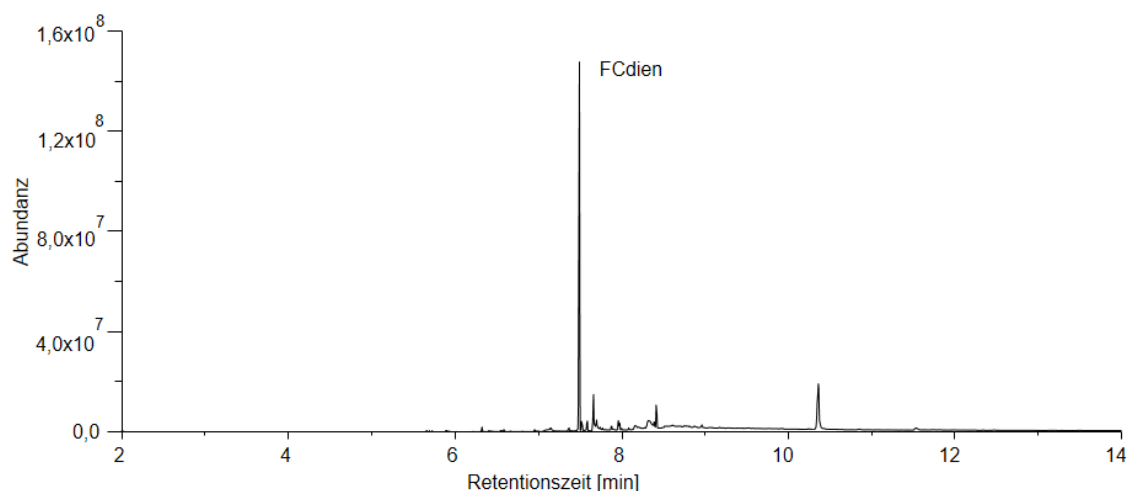
**Abbildung 25: Schematische Darstellung des mit den drei Plasmiden kotransformierten *S. cerevisiae*-Stamms CEN.PK2-1c zur heterologen Fermentation des FCdiens.** Hochregulierte Enzyme des Mevalonatwegs und des Sterolimports durch die Expression der UPC2-1-Variante sind in blau dargestellt. Die hochregulierte tHMGR1 durch die Deletion der N-terminalen regulatorischen Domäne ist in rot gekennzeichnet. Beide Manipulationen können in Kombination die Anreicherung von Terpenbiosyntheseintermediaten und die Synthese von fremden Terpenen fördern.<sup>[107]</sup>

Das Gen *upc2.1* codiert für eine Variante des Transkriptionsfaktors UPC2 (engl. *Uptake Control*), der einer der globalen Regulatoren des Ergosterollevels in der Hefe ist.<sup>[108]</sup> Die Expression der UPC2-1-Variante kann über zwei Mechanismen die Verfügbarkeit der Terpenvorläufermoleküle innerhalb der Zelle erhöhen. Der Import von essentiellen Sterolen findet in *S. cerevisiae* normalerweise nur unter anaeroben Bedingungen statt, wenn die sauerstoffabhängige Biosynthese der Sterole unterdrückt wird.<sup>[109]</sup> Unter aeroben Bedingungen hingegen werden keine Sterole aufgenommen, da die verantwortlichen Gene für die Sterolaufnahme vermutlich indirekt auf der Transkriptionsebene durch Sauerstoff inhibiert werden.<sup>[110]</sup> Stattdessen werden die essentiellen Sterole über die Stoffwechselprodukte IPP und DMAPP des Mevalonatwegs synthetisiert.<sup>[108a]</sup> Wird in der Hefezelle die UPC2-1-Variante überexprimiert, können Sterole auch unter aeroben Bedingungen aus dem äußeren Milieu aufgenommen werden.<sup>[108a,b]</sup> Weil die Sterolbiosynthese mit den gleichen Vorläufermolekülen wie die FCdien-Biosynthese konkurriert, könnten durch diese Mutation

größere Mengen der Terpenvorläufermoleküle IPP und DMAPP für die Synthese des FCdiens bereitstehen.<sup>[106]</sup> Neben dem Sterolimport wird auch die verstärkte Transkription einer Reihe der an der Terpenbiosynthese beteiligten Gene bei Anwesenheit der UPC2-1-Variante gefördert.<sup>[108c,111]</sup> Obwohl dieser Effekt bislang nur für zwei direkt an der Ergosterolbiosynthese beteiligten Gene untersucht wurde, weisen Sequenzhomologien auf eine Hochregulierung der Transkription etlicher anderer, an dem Mevalonatweg beteiligter Gene durch die *upc2.1*-Mutation hin.<sup>[108c]</sup> Dies würde ebenfalls zu einer Anreicherung der Mevalonatwegintermediate innerhalb der Zelle führen.<sup>[104a,107]</sup>

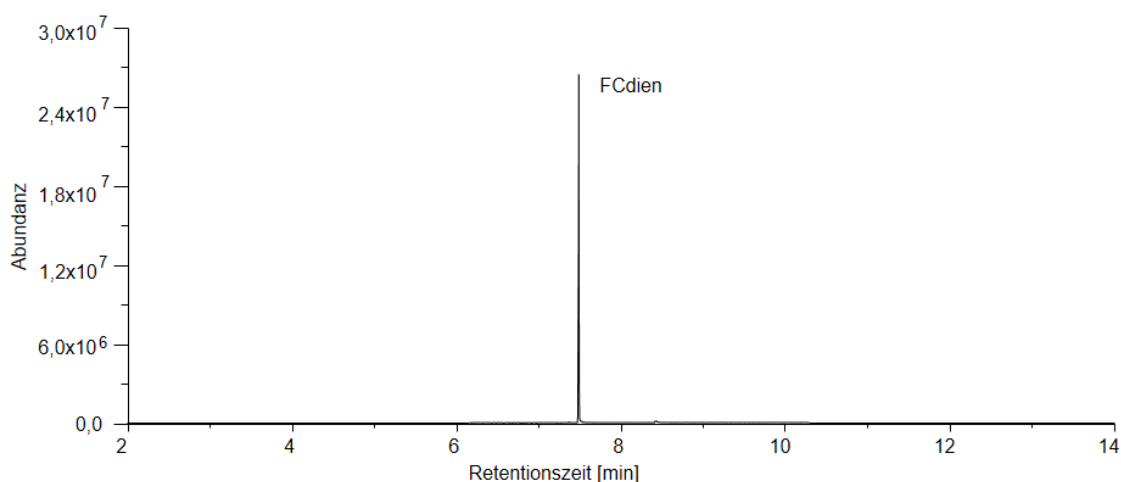
Das Gen *thmgr* hingegen codiert für eine verkürzte Variante des Schlüsselenzyms des Mevalonatwegs HMGR1 (HMGR-Isoform 1).<sup>[9b]</sup> Die HMGR katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Terpenbiosynthese in *S. cerevisiae* und wird innerhalb der Zelle durch unterschiedliche Mechanismen reguliert.<sup>[9a]</sup> Eine Deletion der N-terminalen Transmembrandomäne führt zu einer Deregulation dieses Enzyms und zur Anreicherung von Stoffwechselprodukten des Mevalonatwegs innerhalb der Zelle.<sup>[9b]</sup> Beide hier beschriebenen Manipulationen wurden in Kombination bereits erfolgreich für die heterologe Fermentation von Sesquiterpenen in *E. coli* und in *S. cerevisiae* verwendet.<sup>[92b,104c,e,107]</sup>

Der mit den drei Plasmiden kotransformierte *S. cerevisiae*-Stamm wurde auf SD-His-Leu-Ura-Agar (engl. *synthetic dropout*, Tabelle 34) selektiert und zur heterologen Fermentation des FCdiens in gep. YPD-Medium (engl. *yeast peptone dextrose*, Tabelle 34) für 48 h bei 30°C kultiviert (Kapitel V6.3.2).<sup>[80,87]</sup> Da viele Terpene flüchtig sind und eine Toxizität des Terpens auf die Hefe nicht ausgeschlossen ist, wurden analog zu Engels *et al.* zur *in situ* Produktadsorption 0,5% (w/v) C18-Silicagel (*C18 silica gel spherical*, Supelco) dem Fermentationsmedium hinzugefügt.<sup>[106,112]</sup> Nach Abschluss der Fermentation wurde das Kulturmedium filtriert und nur die festen Bestandteile, bestehend aus Hefezellen und Adsorbermaterial, mit *n*-Pentan zur Produktisolation extrahiert (Kapitel V9.1.1).<sup>[80,87]</sup> Durch eine GC-MS-Analyse des Kulturextrakts konnte FCdien als Hauptprodukt der Fermentation durch *S. cerevisiae* identifiziert werden (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Gaschromatogramm eines Gesamtrohextrakts nach Kultivierung des mit pVV214-*abfs* kotransformierten *S. cerevisiae*-Fermentationsstamms (siehe Abbildung 25) in gep. YPD bei 30°C und für 48 h.<sup>[80,87]</sup>

Im Anschluss wurde eine Reinigungsmethode für FCdien entwickelt. Das stark lipophile FCdien kann durch eine Filtration über eine Silicagelsäule mit *n*-Pentan als Laufmittel zusammen mit der Laufmittelfront eluieren, wohingegen hydrophilere Bestandteile des Kulturextraktes länger auf der Säule verweilen. Eine DC (Dünnschichtchromatographie) auf Silicagel und *n*-Pentan als Laufmittel (Kapitel V10.1) bestätigte dies, da das olefinische FCdien mit einem  $R_f$ -Wert von 0,9 mit Hilfe einer Iodkammer spezifisch detektiert werden konnte.<sup>[80,87]</sup> Eine unspezifische Kaliumpermanganatfärbung hingegen wies auf weitere Substanzen in dem Kulturextrakt mit niedrigeren  $R_f$ -Werten hin. Schließlich konnten durchschnittlich 6 mg/L eines farblosen Öls in hoher Reinheit mittels Silicagelsäulenchromatographie isoliert werden (Kapitel V9.2, Abbildung 27).<sup>[80,87]</sup>

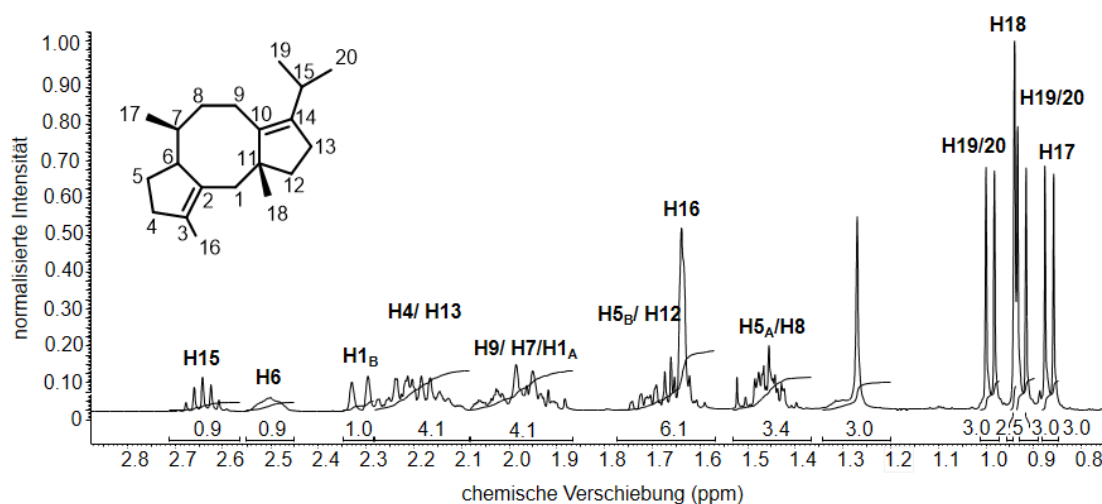


**Abbildung 27:** Gaschromatogramm nach Reinigung des *S. cerevisiae*-Kulturextraktes durch Silicagelfiltration mit *n*-Pentan als Laufmittel.<sup>[80,87]</sup>

Eine parallel durchgeführte *Argentation Chromatographie*, bei der silberimprägniertes Silicagel verwendet wurde und die eine spezifische Reinigung olefinischer Produkte ermöglicht, führte zu einer ähnlichen Reinheit des FCdiens.<sup>[113]</sup> Aufgrund des wesentlich höheren Aufwands, wurde diese Reinigungsmethode nicht weiter verfolgt.

Die isolierte Substanz wurde sowohl mittels hochauflösender GC-MS/EI (Kapitel V10.2.3) als auch durch NMR-Spektroskopie (Kapitel V10.3) charakterisiert.<sup>[80,87]</sup> Das detektierte Masse-zu-Ladungsverhältnis  $m/z$  stimmte mit 272,2506 mit der berechneten absoluten Masse des einfachgeladenen FCdien-Radikations von 272,2504 g/mol überein. Eine vollständige Zuordnung der Signale des  $^1\text{H-NMR}$ - (Abbildung 28) und des  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrums (siehe Anhang, Abbildung A1) zu den Atomen des FCdiens erfolgte mit Hilfe der 2D-Spektren aus gCOSY- (engl. *gradient enhanced CORrelation SpectroscopY*) und gHSQC-Messungen (engl. *gradient enhanced Heteronuclear Single Quantum Correlation*, siehe Anhang, Abbildung A2 und A3) sowie durch Abgleich mit den teilweise bekannten Zuordnungen für Fusicocca-2,10(14)-dien durch Kato *et al.*<sup>[37f]</sup> Damit konnte die spezifische Fermentation des gewünschten Terpens durch *S. cerevisiae* bestätigt werden.

Die Zuordnungen aller  $^1\text{H}$ -Signale (Kapitel V10.3, Tabelle 96) waren insbesondere für die geplante Derivatisierung des FCdiens zur Erzeugung von Fusioccananaloga von Bedeutung, um die funktionalisierten Positionen identifizieren zu können.



**Abbildung 28:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Fusicocca-2,10(14)-diens.<sup>[80,87]</sup> Darstellung nach Fourier-Transformation mit dem Programm ACD/NMR Processor.

Ein Vergleich der FCdien-Ausbeute mit den Befunden der Arbeitsgruppe Jennewein zur heterologen Fermentation des Taxadiens mit dem gleichen Fermentationsstamm und den gleichen Kultivierungsbedingungen zeigte, dass die isolierten FCdien-Ausbeuten mit durchschnittlich 6 mg/L unterhalb der quantifizierten Taxadienausbeuten mit etwa 9 mg/L lagen.<sup>[106]</sup>

Es ist zu berücksichtigen, dass die Quantifizierung der Taxadienausbeute über einen Vergleich der Signalfächen mit einer Kalibrierkurve in der GC erfolgte. Im Falle des FCdien wurde hingegen eine isolierte Ausbeute nach der Reinigung zum Vergleich herangezogen. Daher ist ein Ausbeuteverlust durch die Reinigungsprozedur nicht auszuschließen. Die größte Steigerung der Taxadienausbeute wurde in den Versuchen der Arbeitsgruppe Jennewein durch die Koexpression einer GGPP-Synthase aus dem Archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* beobachtet.<sup>[106]</sup> Dieses Enzym katalysiert bevorzugt die schrittweise Kondensation von DMAPP mit IPP zur Erzeugung des Diterpensynthesubstrats GGPP.<sup>[114]</sup> Im Vergleich zu der GGPP-Synthase aus der Taxolproduzierenden Pflanze *Taxus chinensis*, die bevorzugt FPP und IPP akzeptiert, konkurriert die archaeale GGPP-Synthase damit weniger um das Steroidintermediat FPP.<sup>[106,115]</sup> Die AbFS liegt bereits in Fusion mit einer GGPP-Synthasedomäne vor. Für die FS aus *P. amygdali* wurden DMAPP, GPP und FPP jeweils zusammen mit IPP als Substrate beschrieben.<sup>[53a]</sup> Welche dieser Substrate bevorzugt akzeptiert werden, ist nicht bekannt. Daher ist eine geringere FCdien-Ausbeute durch eine möglicherweise höhere Konkurrenz um FPP als Substrat mit der Sterolbiosynthese nicht auszuschließen. Des Weiteren wurde in den Arbeiten von Engels *et al.* eine für *S. cerevisiae* codonoptimierte Genvariante der Taxadiensynthase eingesetzt, dessen Expression ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Taxadienausbeute hatte (näheres dazu siehe Kapitel IV1.3.2). Um genügend FCdien für die geplante Derivatisierung zu isolieren, wurde im Rahmen dieser Dissertation zunächst eine Skalierung und Übertragung der FCdien-Fermentation in einen Bioreaktor anvisiert.

## 1.2 Versuche zur Skalierung und Übertragung der FCdien-Fermentation in einen Bioreaktor

Zur Skalierung der FCdien-Fermentation wurden die in Kapitel IV1.1.5 diskutierten Kultivierungsbedingungen ohne weitere Anpassungen auf eine Fermentation in einen Bioreaktor mit 30 L Gesamtfassungsvolumen übertragen. Dafür wurde der Fermentationsservice der Medienküche des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie in Dortmund genutzt (Kapitel V6.3.4 a). Die Fermentation fand in dem Bioreaktor Biostat C der Firma B. Braun mit einem Kulturvolumen von 25 L gep. YPD-Medium mit 0,5% (w/v) C18-Silicagel zur *in situ* Produktextraktion mit einem fixen pH von 7,8 statt. Nach 48 h Kultivierung bei 30°C, einer konstanten Durchmischung bei 600 rpm und einer Begasungsrate von 0,5 vvm (in den ersten 24 h) - 1 vvm (in den letzten 24 h) konnte im Vergleich zu den Schüttelkolbenfermentationen (siehe Kapitel IV1.1.5) eine dreifach höhere FCdien-Ausbeute von etwa 18 mg/L isoliert werden.<sup>[87]</sup>



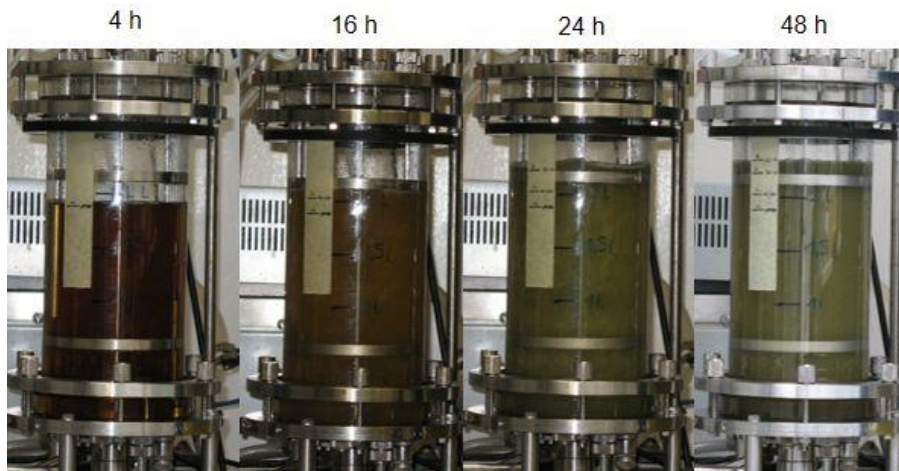
Dieses Ergebnis motivierte dazu die FCdien-Fermentation durch *S. cerevisiae* und entscheidende Faktoren zur Optimierung der Produktausbeute näher zu untersuchen. Für dieses Vorhaben wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe Wichmann (Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, TU Dortmund) initiiert, da diese Arbeitsgruppe über verschiedene Bioreaktoren mit Fassungsvermögen zwischen 3,1 – 300 L verfügt.

Die zuvor durchgeführte Fermentation in der Medienküche des Max-Planck-Instituts sollte zunächst in kleinem Maßstab reproduziert und anschließend die Produktausbeute durch gezielte Variation der Fermentationsparameter weiter optimiert werden. Alle naturwissenschaftlichen und mikrobiologischen Arbeiten sowie die Quantifizierungen der FCdien-Ausbeuten wurden dabei im Rahmen der vorliegenden Dissertation erbracht. Christian Nowacki des Arbeitskreises Wichmann hingegen hat den Bioreaktor bedient, die Fermentation überwacht und Proben für die Quantifizierung der Produktausbeute entnommen.

Da befürchtet wurde, dass das feinkörnige C18-Silicagel sich nach einer Fermentation nicht mehr restlos aus dem Reaktorkessel entfernen ließe, wurde im Gegensatz zu allen vorherigen Versuchen in diesen Fermentationen kein Material zur *in situ* Produktadsorption verwendet. Ansonsten wurden die Fermentationsparameter weitestgehend nach Vorlage der zuvor durchgeführten 25 L-Fermentation in der Medienküche des Max-Planck-Instituts eingestellt.

Die Versuche wurden in dem Bioreaktor KFL2000 der Firma Bioengineering mit einem Kulturvolumen von 1,8 L gep. YPD, einem fixen pH von 7,8 und einer Temperatur von 30°C durchgeführt (Kapitel V6.3.4 b). Verschiedene konstante Begasungsraten von 0,5 – 1 vvm über die gesamte Fermentationsdauer von 48 h wurden getestet. Durch die Herabsetzung der Begasungsrate von 1 vvm auf 0,5 vvm konnte die FCdien-Ausbeute zwar verdreifacht werden, jedoch waren die FCdien-Ausbeuten mit maximal 3 mg/L in diesen Fermentationen ungewöhnlich gering. Außerdem wurde eine Grünfärbung des Mediums nach bereits 16 h beobachtet, die im Laufe der Fermentation zunahm (Abbildung 29). Dieser Effekt trat reproduzierbar bei Fermentationen im gep. YPD in dem Bioreaktor bei einer Begasungsrate von 0,5 vvm bei 30°C auf. Vergleichsfermentationen im Schüttelkolben, die mit der gleichen Vorkultur angeimpft wurden, zeigten keine grüne Verfärbung des Mediums und resultierten in der gewohnten Produktausbeute von ca. 6 mg/L FCdien in gep. YPD-Medium. Durch mikroskopische Untersuchungen wurden mögliche Kontaminationen ausgeschlossen. Dahingegen können durch eine nicht vollständige Häm biosynthese unterschiedliche, farbige Häm vorstufen in der Hefe angesammelt und in das Medium exkretiert werden.<sup>[116]</sup> Daher wurde vermutet, dass die Ansammlung eines grünen Pigments in der Hefe unter den verwendeten Fermentationsbedingungen bevorzugt auftrat. Da das Phänomen jedoch nicht weiter untersucht wurde und meines Wissens bislang nicht in der Literatur berichtet wurde, kann

keine Aussage darüber gemacht werden, ob die grüne Färbung des Mediums im Zusammenhang mit den niedrigen Produktausbeuten in den Fermentationen stand.



**Abbildung 29: Zeitabhängige Grünfärbung des Mediums während einer FCdien-Fermentation in gep. YPD-Medium mit einem konstanten pH von 7,8, bei einer Begasungsrate von 0,5 vvm und einer Temperatur von 30°C.** Diese Bilder wurden in der Arbeitsgruppe Wichmann (Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, TU Dortmund) während einer Fermentation in dem Bioreaktor KLF2000 der Firma Bioengineering aufgenommen.

Die eingestellten Parameter, wie pH, Begasungsrate, Temperatur und Rührerfrequenz sowie Medium, unterschieden sich in der zuerst durchgeführten Fermentation im Bioreaktor der Medienküche des Max-Planck-Instituts nicht signifikant von denen bei den Fermentationen im Bioreaktor der Arbeitsgruppe Wichmann. Trotzdem konnte die, im ersten Versuch im Vergleich zu Schüttelkolbenexperimenten beobachtete, dreifache Steigerung der FCdien-Ausbeute in den Versuchen in den Laboren der Arbeitsgruppe Wichmann nicht reproduziert werden. Allerdings waren sowohl das Kulturvolumen als auch das Fassungsvermögen der beiden verwendeten Bioreaktoren deutlich unterschiedlich. Der Bioreaktor in der Medienküche des Max-Planck-Instituts besitzt ein Fassungsvermögen von 30 L und die FCdien-Fermentation wurde in insgesamt 25 L gep. YPD-Medium durchgeführt. Der verwendete Bioreaktor der Arbeitsgruppe Wichmann hingegen besitzt ein maximales Fassungsvermögen von 3,1 L und die Fermentationen wurden in einem Kulturvolumen von 1,8 L durchgeführt. Daher mag eine schlechtere Durchmischung und eine daraus resultierende inhomogene Sauerstoffverteilung im Medium eine mögliche Ursache für die stark unterschiedlichen Produktausbeuten bei der Verwendung unterschiedlicher Bioreaktoren sein.<sup>[17]</sup> Dabei wäre im Falle des FCdiens wohl ein geringerer Sauerstofftransfer, wie es in einem größeren Bioreaktor der Fall ist, vorteilhaft. Dieses Ergebnis würde auch die Steigerung der Produktausbeute durch eine geringere Begasungsrate (3 mg/L bei 0,5 vvm im Vergleich zu 1 mg/L bei 1 vvm) bei den Fermentationen in den Laboren der Arbeitsgruppe Wichmann erklären.

Außerdem ist zu beachten, dass im ersten Versuch ein Material zur effizienten Adsorption des FCdiens eingesetzt wurde, in weiteren Experimenten, aufgrund potentiell resultierender technischer Probleme, jedoch nicht. Ein starkes Ausdampfen des FCdiens zusammen mit anderen Gasen während der Fermentation ohne Adsorber ist damit nicht auszuschließen. In der Tat wurden signifikante Mengen des FCdiens in dem Kondensat des Gasauslasses bei den Fermentationen in dem Arbeitskreis Wichmann gefunden. Weil dahinter keine Kühlfalle angebracht war, könnten größere Mengen des FCdiens in die Laborluft entwichen sein.

Da eine Übertragung der FCdien-Fermentation in einen Bioreaktor unter den gegebenen Fermentationsbedingungen nicht reproduzierbar gelang, wurden weitere Optimierungen der FCdien-Fermentation im Rahmen der vorliegenden Dissertation zunächst in Schüttelkolben durchgeführt.

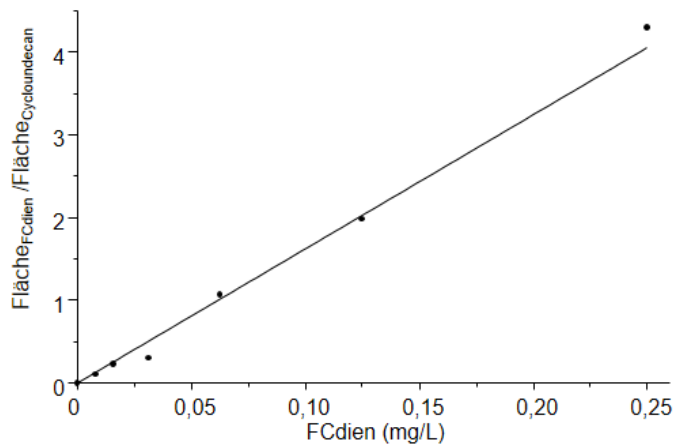
### **1.3 Optimierung der FCdien-Fermentation durch *S. cerevisiae***

Teile der in Kapitel IV1.3 präsentierten Ergebnisse wurden bereits in Arens *et al.* veröffentlicht.<sup>[118]</sup>

#### **1.3.1 Etablierung einer Standardsubstanz zur Quantifizierung des FCdiens über GC-FID/MS**

Um präzise und schnelle Aussagen über die FCdien-Produktausbeuten bei verschiedenen Testfermentationen und Fermentationsoptimierungen machen zu können, wurde zunächst die Verwendung einer Referenzsubstanz als interner Standard zur Quantifizierung in der GC-FID/MS (FID: Flammenionisationsdetektor) etabliert.

Cycloundecan besaß eine 2 min geringere Retentionszeit als FCdien und wurde daher als Referenzsubstanz in Betracht gezogen. Zur Kalibrierung wurden unterschiedliche Mengen des gereinigten FCdiens (Kapitel IV1.1.5) zusammen mit einer bekannten Menge des Cycloundecans in der GC-MS/FID gemessen (Abbildung 30). Da ein linearer Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Signalfächen in dem Gaschromatogramm dieser beiden Substanzen mit zunehmender FCdien-Konzentration bestand, konnte Cycloundecan als interner Standard zur Quantifizierung der unbekannt Menge des FCdiens in den nachfolgenden Fermentationen genutzt werden.



**Abbildung 30: Kalibrierung der internen Referenzsubstanz Cycloundecan für die Quantifizierung des FCdiens mittels GC-FID/MS.**

Da eine Zugabe des C18-Silicagels zum Kulturmedium zwecks einer *in situ* Produktextraktion aufgrund einer ungleichmäßigen Verteilung der Adsorberpartikel eine zuverlässige Quantifizierung des FCdiens über GC-FID/MS zu verschiedenen Zeitpunkten einer Fermentation verbot, wurde zum besseren Vergleich aller durchgeführten Testfermentationen zunächst auf das C18-Silicagel in den Fermentationen zur Optimierung verzichtet.

### 1.3.2 Verwendung eines für *S. cerevisiae* codonoptimierten *abfs*-Gens

Die meisten proteinogenen Aminosäuren werden durch mehrere Basentriplets bei der Translation codiert. Der genetische Code ist zwar universell für alle Lebewesen, aber die verschiedenen Codons einer Aminosäure werden organismusspezifisch unterschiedlich häufig verwendet.<sup>[119]</sup> Die Konzentration der tRNA-Moleküle (Transport-RNA-Moleküle) ist nicht nur von Organismus zu Organismus unterschiedlich, sondern auch von der Wachstumsphase abhängig.<sup>[120]</sup> Gerade bei der Überexpression von Fremdgenen kann es zu einer Limitation einzelner tRNA-Moleküle kommen. Dies kann zum Einbau von falschen Aminosäuren, zum Abbruch der Translation oder zu Fehlfaltungen des translatierten Enzyms führen und damit die Aktivität des rekombinanten Enzyms beeinträchtigen.<sup>[121]</sup> Die Anpassung der Codons eines rekombinanten Gens auf die tRNA-Konzentration einer Zelle kann somit einen Einfluss auf die Geschwindigkeit und die Präzision der Translation haben.

Da die erfolgreiche heterologe Fermentation von der Aktivität und der fehlerfreien Translation der verantwortlichen rekombinanten Enzyme abhängig ist, wurden codonoptimierte Gene bereits vielfach für die mikrobielle Produktion von Terpenen und anderen Molekülen verwendet.<sup>[106-107,122]</sup> Im Falle der heterologen Fermentation des Taxadiens in *S. cerevisiae* wurde die Produktivität durch den Einsatz eines codonoptimierten Taxadiensynthasegens sogar um das 27-fache erhöht.<sup>[106]</sup>

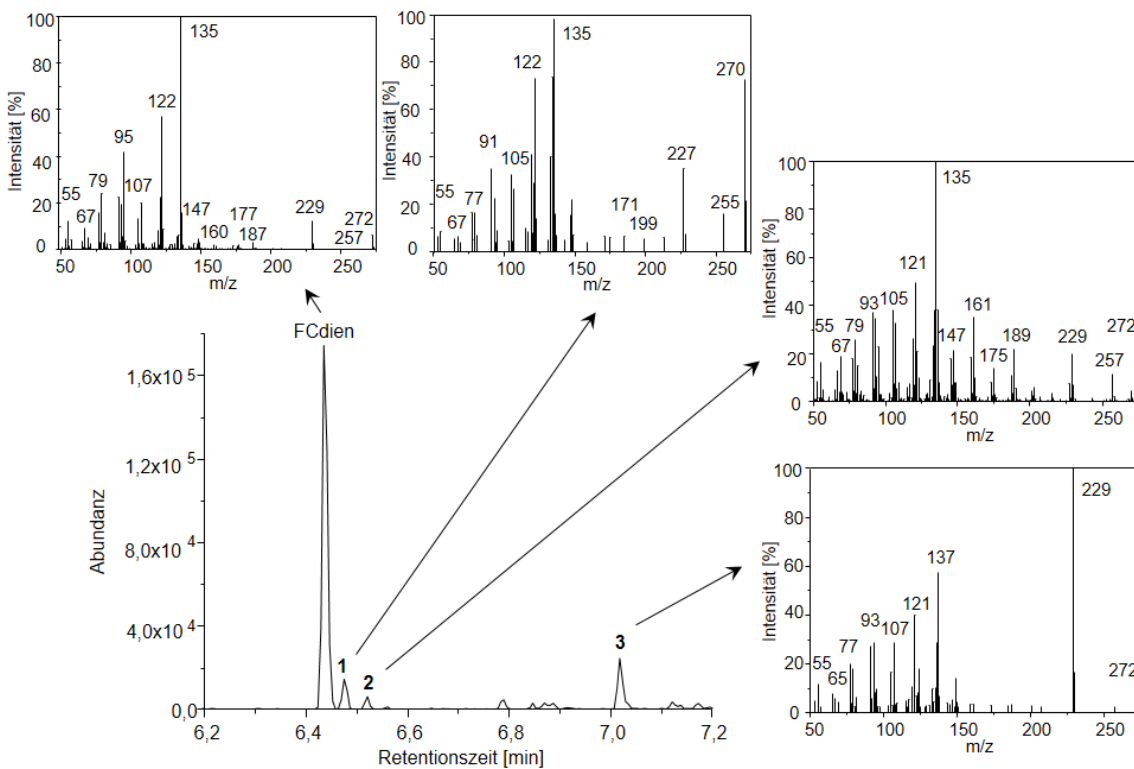
Ein Vergleich zwischen den verwendeten Codons im *abfs*-Gen und in *S. cerevisiae* (Graphical Codon Usage Analyzer 2.0) wies auf eine durchschnittliche Differenz des Codongebrauchs von etwa 30% hin.<sup>[123]</sup> Deswegen sollte auch im Falle der heterologen Fermentation des FCdiens ein für *S. cerevisiae* codonoptimiertes *abfs*-Gen getestet werden. Zur Adaption des Codongebrauchs von *S. cerevisiae* für das *abfs*-Gen wurde der GENEius-Algorithmus und der Gensyntheservice der Firma MWG genutzt.<sup>[124]</sup> Anschließend wurde das für *S. cerevisiae* codonoptimierte Gen *abfsS.c.* (siehe Anhang, Abbildung A4) über die Gateway<sup>TM</sup>-Technologie in das Hefeexpressionsplasmid pVV214 eingebracht (Kapitel V5.7.2) und der in seinem Terpenmetabolismus manipulierte *S. cerevisiae*-Stamm (Abbildung 25) mittels Lithium-Acetat-Methode mit dem Expressionsplasmid transformiert (Kapitel V6.1.2). Eine Analyse der mechanisch lysierten *S. cerevisiae*-Zellen (Kapitel V7.2.2) über SDS-PAGE (Kapitel V7.1) nach 48 h Kultivierung in gep. YPD-Medium, konnte keinen Aufschluss über eine gesteigerte Expressionsrate der AbFS durch das Einbringen des codonoptimierten *abfsS.c.*-Gens im Vergleich zum Wildtyp-Gen *abfs* liefern. In beiden Fällen konnte keine der detektieren Expressionsbanden eindeutig der AbFS (erwartete Größe etwa 79 kDa) zugeordnet werden (nicht gezeigt). Daher wurde im Anschluss jeweils die FCdien-Produktivität dieser beiden Stämme quantifiziert. Unter gleichen Fermentationsbedingungen, konnte die Fermentation des FCdiens durch die Expression des codonoptimierten Gens nicht gesteigert werden. Entgegen der Erwartungen wurden sogar durchschnittlich 30% weniger FCdien quantifiziert. Dies deutet darauf hin, dass das Expressionslevel der AbFS in *S. cerevisiae* nicht limitierend war. Folglich wurden alle folgenden Versuche weiterhin mit dem mit pVV214-*abfs* transformierten *S. cerevisiae*-Stamm durchgeführt.

Eine ähnliche Beobachtung konnte zuvor auch bei den Arbeiten zur heterologen Fermentation von Amorphadien und Artemisininsäure in den Studien von Westfall *et al.* gemacht werden, bei denen der Einsatz einer für *S. cerevisiae* codonoptimierten Variante des Amorphadiensynthasegens ebenfalls keinen positiven Einfluss auf die Produktivität des Fermentationsstammes hatte.<sup>[104e]</sup>

Um die Fermentation des FCdiens in Hefe besser verstehen und positive Bedingungen im Hinblick auf die Produktausbeute identifizieren zu können, wurde die FCdien-Fermentation durch eine systematische Variierung der Fermentationsparameter näher untersucht.

### 1.3.3 Systematische Variierung der Fermentationsparameter

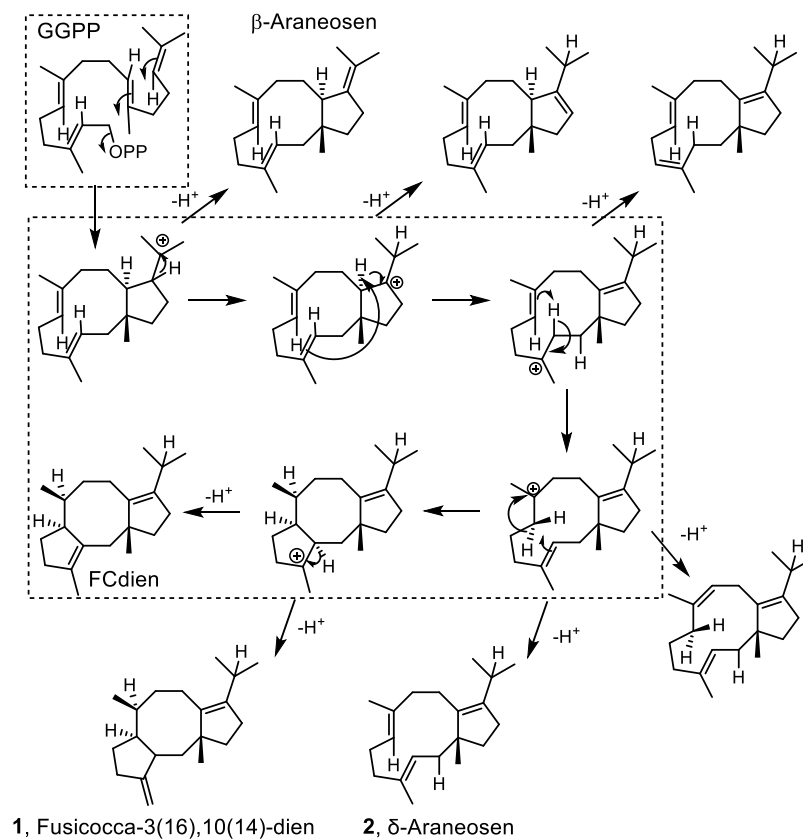
Bei einer genaueren Analyse der GC-MS-Spektren der FCdien-Fermentationen in gep. YPD-Medium fiel auf, dass neben FCdien mindestens drei spezifische Beiprodukte detektiert werden konnten (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Massenspektren des FCdiens und der spezifischen Beiprodukte 1, 2 und 3.**

Die Massenspektren dieser Substanzen ähnelten dem des FCdiens stark und ließen die Vermutung zu, dass es sich dabei um Intermediate oder Nebenprodukte bei der Cyclisierung des GGPP zu FCdien handelte (Abbildung 32). Das Massenspektrum des Beiprodukts **1** ähnelt dem Massenspektrum des Fusicocca-3(16),10(14)-dien.<sup>[37h]</sup> Das Beiprodukt **2** konnte anhand seines Fragmentierungsmusters  $\delta$ -Araneosen zugeordnet werden.<sup>[82c]</sup> Beide Substanzen wurden sowohl in Kulturextrakten des Fusicoccinproduzierenden Pilzes *P. amygdali* als auch bei *in vitro*-Experimenten mit der gereinigten FS aus *P. amygdali* gefunden.<sup>[37h,53a]</sup> Substanz **3** konnte nach intensiver Literaturrecherche keiner bekannten Verbindung zugeordnet werden. Die Betrachtung des Massenspektrums ließ aber die Vermutung zu, dass es sich dabei um ein Doppelbindungsisomer des FCdiens handelte. Dabei könnte es sich ebenfalls um ein Nebenprodukt oder Intermediat bei der Cyclisierung des FCdiens handeln. Die Ansammlung dieser Cyclisierungsintermediate oder –nebenprodukte weist auf einen vorzeitigen Abbruch der Cyclisierung zu FCdien hin und könnte als Ursache mit einer geringen Aktivität und Umsatzrate der AbFS begründet werden. Eine geringe Enzymaktivität könnte die Produktpromiskuität vieler bekannter Terpenocyclasen erklären.<sup>[102]</sup> Auf der anderen Seite könnte das Auftreten von FCdien-Doppelbindungsisomeren auch durch eine säurekatalysierte Umlagerung der Doppelbindungen innerhalb des FCdiens durch niedrige äußere pH-Werte während der Fermentation erklärt werden. Daher war es notwendig die Fermentation des

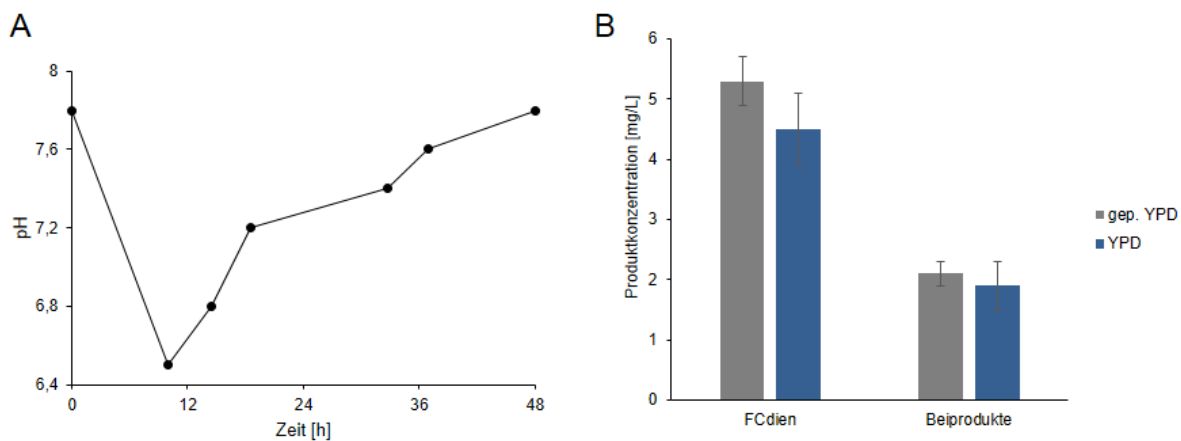
FCdiens näher zu untersuchen. Neben der Produktausbeute, wurde durch die Variierung der Fermentationsbedingungen auch eine Optimierung der Produktspezifität angestrebt.



**Abbildung 32: Vorgeschlagene durch die FS katalysierte Cyclisierung des FCdiens (durch gestrichelte Linien umrandet) und mögliche FCdien-Nebenprodukte.<sup>[125]</sup>**

### a) Untersuchung der Auswirkungen des äußeren pH auf die FCdien-Fermentation

Zur Untersuchung der Pufferkapazität des in dem YPD-Medium eingesetzten 100 mM Tris-Puffers (pH 8), wurden Proben an unterschiedlichen Zeitpunkten während der FCdien-Fermentation im Schüttelkolben entnommen und mit Hilfe eines Indikatorpapiers der pH-Wert untersucht. Es wurde eine Abnahme des pH-Werts zwischen 6,5 bis 7 innerhalb der ersten 14 h beobachtet, anschließend stellte sich wieder der anfängliche pH von etwa 7,8 ein (Abbildung 33 A). Die Schwankungen des pH-Werts am Anfang der Fermentation können durch die metabolische Umwandlung der Glucose in kurze organische Säuren und deren Diffusion ins Medium erklärt werden.<sup>[89b,126]</sup> Die Pufferkapazität des eingesetzten Tris-Puffers war nicht hoch genug, um den pH des Mediums über die gesamte Zeit der Fermentation zu stabilisieren. Um zu überprüfen, ob der pH-Wert des Mediums einen Effekt auf die FCdien-Produktivität und die Bildung der spezifischen Beiprodukte **1**, **2** und **3** hatte, wurden die Fermentationen in gep. YPD-Medium mit Fermentationen in ungepuffertem YPD mit einem anfänglichen pH von etwa 6,5 verglichen (Abbildung 33 B).



**Abbildung 33: Typischer Verlauf des pH-Werts während einer Fermentation in gep. YPD (A) und Vergleich der FCdien-Konzentration sowie Beiproduktkonzentrationen 1, 2 und 3 bei Fermentationen in gep. und ungepuffertem YPD-Medium (B).**

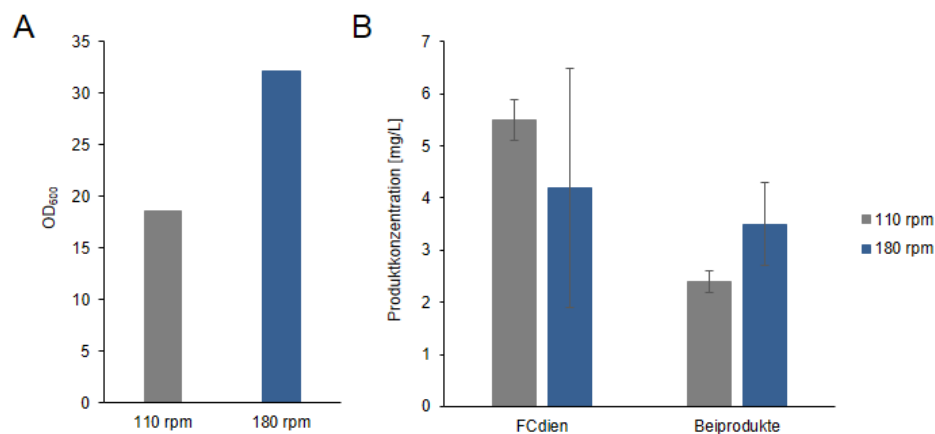
Die Analyse der Fermentationsextrakte zeigte, dass sich die FCdien-Ausbeuten bei Kultivierungen in ungepuffertem YPD mit durchschnittlich  $4,5 \pm 0,6$  mg/L nicht signifikant von Kultivierungen in gep. YPD mit  $5,3 \pm 0,4$  mg/L unterscheiden. Auch die Produktion der spezifischen Beiprodukte 1, 2 und 3 wurde im Rahmen dieser Experimente nicht durch den pH-Wert des Mediums signifikant beeinflusst.

### b) Auswirkungen des Sauerstofflevels auf die FCdien-Fermentationen

In vielen Fällen wird durch eine Steigerung der Biomasse eine Produktivitätserhöhung der Fermentation bezogen auf das Medienvolumen beobachtet.<sup>[127]</sup> Zur Steigerung der Biomasseproduktion spielt beispielsweise die Sauerstoffkonzentration eine entscheidende Rolle, da die Energieeffizienz bei der respiratorischen Verstoffwechslung von Zuckern höher ist als beim fermentativen Wachstum.<sup>[128]</sup>

Um zu überprüfen, ob die FCdien-Ausbeute mit der Biomasseproduktion korreliert, wurde der Sauerstoffeintrag durch die Steigerung der Schüttelfrequenz von 110 rpm auf 180 rpm (5 cm Auslenkung/Schüttelhub) in Schüttelkolbenexperimenten erhöht. Die Zelldichte war bei erhöhter Schüttelfrequenz bei 30°C in gep. YPD nach 48 h mit einer  $OD_{600}$  von etwa 30 tatsächlich höher als bei einer Vergleichsfermentation bei 110 rpm mit einer  $OD_{600}$  von etwa 20 (Abbildung 34 A). Die FCdien-Ausbeute war aber im Durchschnitt mit  $4,2 \pm 2,3$  mg/L etwas niedriger und schwankte stärker als bei Fermentationen unter sauerstofflimitierenden Bedingungen mit  $5,3 \pm 0,4$  mg/L. Zudem wurde eine Zunahme des FCdien-Beiprodukts 3 bei erhöhten Sauerstofftransferaten detektiert (Abbildung 34 B).



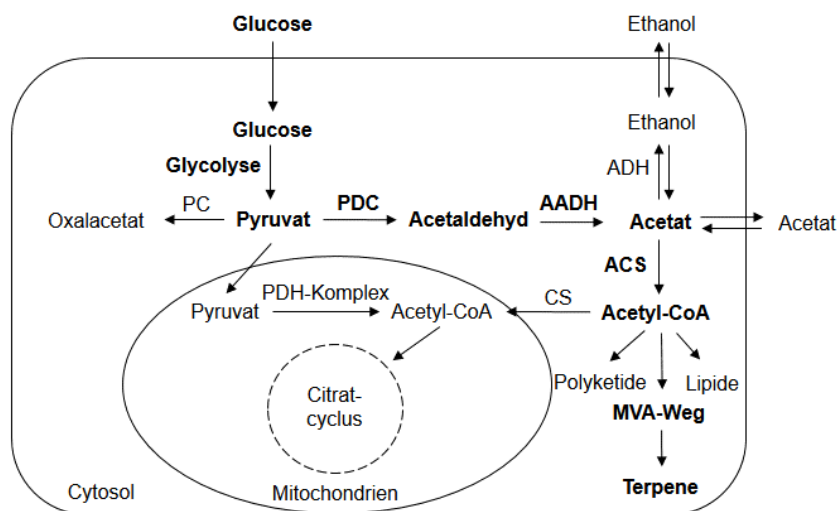


**Abbildung 34: Vergleich der Biomasse (A) und der Produktion des FCdiens sowie der FCdien-Beiprodukte 1, 2 und 3 (B) bei Fermentationen bei geringen Sauerstofftransferraten (110 rpm) und hohen Sauerstofftransferraten (180 rpm).**

Da der pH-Wert des Mediums während der Fermentation bei höheren Sauerstofftransferraten ebenfalls nicht unterhalb von 6,5 sank, schien die vermehrte Bildung des FCdien-Beiprodukts **3** unabhängig vom äußeren pH-Wert zu sein, wodurch als Begründung eine säurekatalysierte Verschiebung der Doppelbindungen des FCdiens unwahrscheinlich erschien.

Die erniedrigten FCdien-Ausbeuten waren aufgrund der starken Ausbeuteschwankungen im Rahmen dieser Experimente zwar nicht statistisch relevant, konnten aber durch präparative Fermentationen mit einem hydrophoben Adsorbentmaterial zur *in situ* Produktentfernung reproduziert werden, in denen lediglich 3 mg/L FCdien isoliert werden konnten (im Vergleich zu 6 mg/L unter sauerstofflimitierenden Bedingungen). Diese Ergebnisse waren im Einklang mit den beobachteten Ausbeutesteigerungen bei niedrigeren Begasungsraten in den Versuchen zur Übertragung der FCdien-Fermentationen in einen Bioreaktor (siehe Kapitel IV1.2). Um diese Beobachtungen zu erklären, hilft möglicherweise ein genauerer Blick in die Mechanismen zur Regulierung des respirativen und fermentativen Wachstums von *S. cerevisiae*. Die Regulierung des respirativen und fermentativen Wachstums in *S. cerevisiae* ist komplex. Pyruvat ist eines der Schlüsselintermediate des respirativen und fermentativen Abbaus von Zuckern (Abbildung 35).<sup>[129]</sup> Der PDH-Komplex (Pyruvatdehydrogenasekomplex) katalysiert die oxidative Decarboxylierung des aus der Glycolyse stammenden Pyruvats in den Mitochondrien zu Acetyl-CoA, welches zur Energiegewinnung direkt in den Citratcyclus fließt.<sup>[129]</sup> Unter anaeroben Bedingungen hingegen, wird Pyruvat ausschließlich im Cytosol über Acetaldehyd und Acetat zu Acetyl-CoA über den sogenannten Pyruvatdehydrogenasebypass durch die drei Enzyme PDC (Pyruvatdecarboxylase), AADH (Acetaldehyddehydrogenase) und ACS (Acetyl-CoA-Synthetase) umgesetzt.<sup>[104b]</sup> Da Acetyl-CoA in Hefe nicht direkt von den Mitochondrien in das Cytosol transportiert werden kann, ist der Pyruvatdehydrogenasebypass auch unter aeroben Bedingungen aktiv, indem er die

Acetyl-CoA-Quelle für die Lipid- und Terpenbiosynthese in *S. cerevisiae* darstellt.<sup>[130]</sup> Da unter sauerstofflimitierenden Bedingungen der Flux durch die respiratorische Metabolisierung von Pyruvat erniedrigt ist, könnte im Gegenzug spekuliert werden, dass der Flux durch den Pyruvatdehydrogenasebypass erhöht ist. Dadurch könnten größere Mengen des Acetyl-CoAs im Cytosol für die FCdien-Produktion durch den Mevalonatweg bei niedrigen Sauerstoffleveln bereitstehen.



**Abbildung 35: Schematische Darstellung des Pyruvatstoffwechsels in der Hefe.** Der Weg von dem Abbau der Glucose als primäre Kohlenstoffquelle über den Pyruvatdehydrogenasebypass bis hin zur Synthese der Terpene aus Acetyl-CoA im Cytosol der Zelle ist in fett hervorgehoben. PC: Pyruvatcarboxylase, PDH: Pyruvatdehydrogenase, PDC: Pyruvatdecarboxylase, AADH: Acetaldehyddehydrogenase, ACS: Acetyl-CoA-Synthetase, ADH: Alkoholdehydrogenase, CS: Carnitin-Shuttle, MVA: Mevalonat.

Bislang gibt es nur wenige Studien zur gezielten Manipulierung der um Pyruvat konkurrierenden Biosynthesewege in *S. cerevisiae* zur Steigerung der heterologen Fermentation von Terpenen. Trotzdem konnten bislang durch die Erhöhung des Acetyl-CoA-Levels im Cytosol der Hefe sowohl eine Steigerung der Transkriptionslevel der sieben codierenden Gene des Mevalonatwegs als auch eine verbesserte Produktion der Sesquiterpene Amorphadien und  $\alpha$ -Santalene nachgewiesen werden.<sup>[104b,131]</sup>

Da sowohl eine verbesserte Produktivität als auch eine verbesserte Spezifität der FCdien-Fermentation bei geringen Sauerstofftransferaten in gep. YPD-Medium beobachtet werden konnten, wurden die folgenden Experimente ausschließlich bei niedrigen Schüttelfrequenzen durchgeführt.

### c) Effekt des Fermentationsmediums auf die FCdien-Produktion

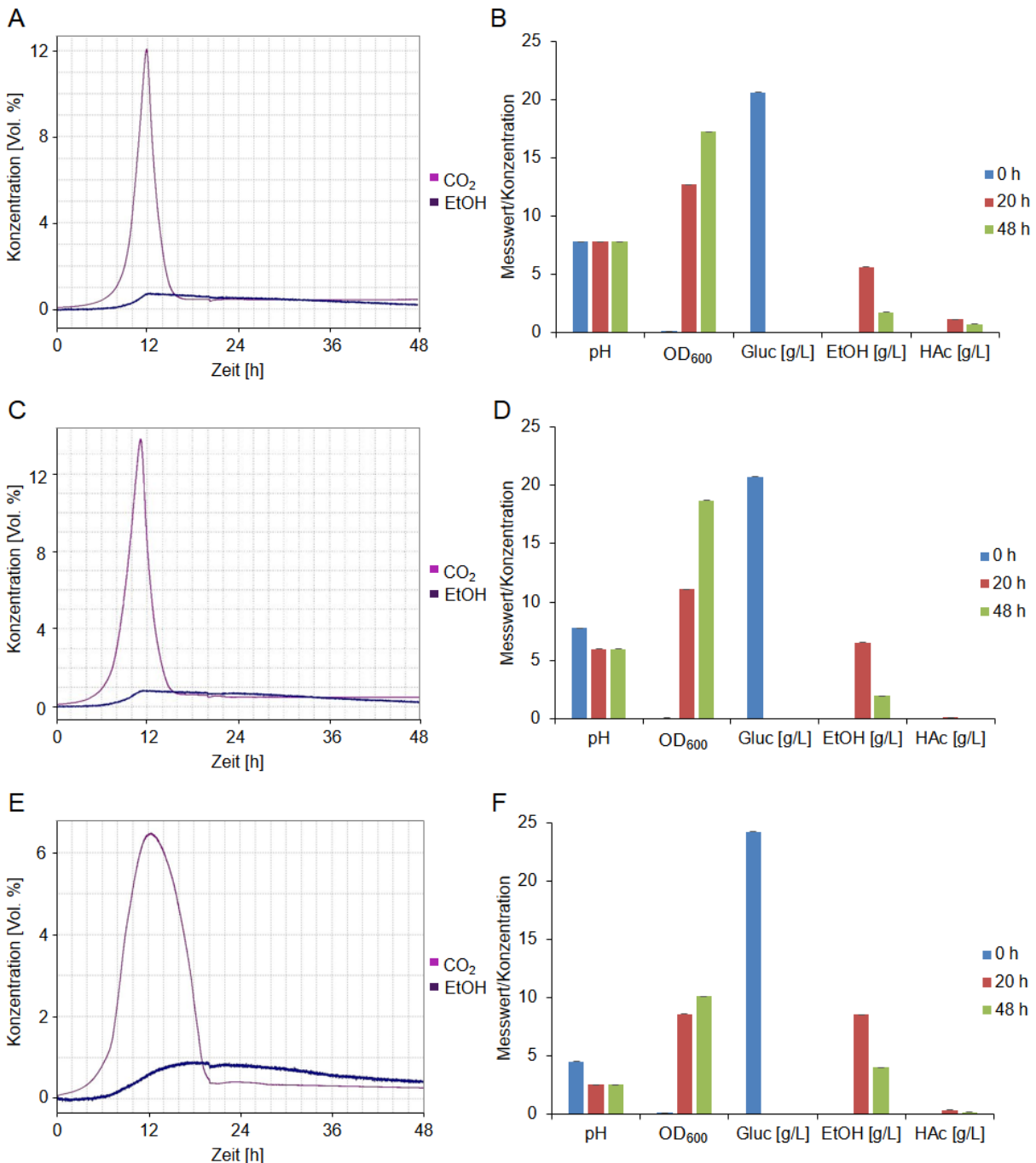
Ein bekanntes Problem in der heterologen Expression von Proteinen ist die genetische Instabilität der manipulierten Wirtsorganismen.<sup>[89b,104c]</sup> Sowohl die Mutationen in den Genen *upc2.1* und *thmgr* zur Steigerung der Terpenintermediate IPP und DMAPP als auch das

Terpensynthasegen *abfs* wurden in dem zur FCdien-Fermentation verwendeten *S. cerevisiae*-Stamm über Plasmide codiert (siehe Abbildung 25). Zur Selektion der plasmidtragenden Hefezellen, codieren diese Plasmide für Gene aus der Amino- oder Nukleinsäurebiosynthese, um die genetisch eingeführten Auxotrophien des verwendeten Hefestammes zu kompensieren. Da Komplexmedien wie YPD in der Regel zelluläre Extrakte (z.B. Hefeextrakt) und damit sämtliche Amino- und Nukleinsäuren enthalten, wirkt kein Selektionsdruck auf den Erhalt dieser Plasmide über mehrere Hefegenerationen hinweg.

Um zu überprüfen inwiefern die FCdien-Produktion von einer genetischen Instabilität des Fermentationsstammes in gep. YPD-Medium beeinflusst wurde, wurden während einer Fermentation alle vier Stunden Proben entnommen und auf Komplexagar plattiert. Anschließend wurden jeweils einzelne Kolonien von den Agarplatten in Selektivmedium ohne die Zugabe der auxotrophen Stoffwechselintermediate Histidin, Leucin und Uracil (SD-His-Leu-Ura, siehe Tabelle 34) überführt und wiederum für 48 h bei 30°C kultiviert. Eine Wachstumsaktivität in dem Selektivmedium war nur zu erwarten, falls die getesteten Hefezellen noch mit allen drei Plasmiden kotransformiert waren. Es konnte gezeigt werden, dass nach 20 h Fermentation in gep. YPD-Medium bereits über die Hälfte der Hefezellen mindestens eines der drei Plasmide verloren hatte. Zudem machen es die Bestandteile des YPD-Mediums generell schwierig zu beurteilen, welche Kohlenstoffquellen der Hefe zum Wachstum und zur Produktion des FCdiens bereit stehen. Neben Glucose enthält das YPD-Medium auch die komplexen Bestandteile Hefeextrakt und Pepton, die vermutlich nach der vollständigen Verstoffwechslung der Glucose ebenfalls als Kohlenstoffquellen dienen können. Zusammengenommen motivierten diese Ergebnisse dazu, alternative Medien für die FCdien-Fermentation zu testen.

Das Komplexmedium gep. YPD wurde mit dem Komplexmedium gep. BVT (Tabelle 34), das zwar Hefeextrakt aber im Gegensatz zu YPD kein Pepton enthält, und dem definierten Selektivmedium SD-His-Leu-Ura bei einer niedrigen Sauerstofftransferate, Kultivierungstemperatur von 30°C und –dauer von 48 h für die FCdien-Fermentation verglichen. Da die Zugabe von 100 mM Tris-HCl (pH 8) zur Präzipitation einzelner Medienbestandteile (wahrscheinlich einzelne Aminosäuren) im SD-His-Leu-Ura-Medium führte, wurde in den Experimenten auf die Pufferung dieses Minimalmediums verzichtet. Um neben den bislang bestimmten Parametern, wie die FCdien-Ausbeute, die Wachstumsdichte und dem pH-Wert auch das Wachstumsverhalten der Hefezellen während der Fermentation näher analysieren zu können, wurde pro Medium jeweils ein Schüttelkolben mit Abgassensoren (Kapitel V6.3.2) im Arbeitskreis Wichmann (Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, TU Dortmund) versehen. Dies ermöglichte die Aufzeichnung der Abgasproduktion von Ethanol und CO<sub>2</sub>. Außerdem wurden Stichprobenkontrollen der

Glucose-, Ethanol- und Acetatkonzentration im Medium jeweils zu Beginn und nach 20 h, sowie nach 48 h durch *offline*-Messungen an der HPLC durchgeführt. Die entsprechende Analytik wurde durch Christian Nowacki in der Arbeitsgruppe Wichmann durchgeführt (Abbildung 36).



**Abbildung 36:** Zeitabhängige CO<sub>2</sub>- und Ethanolkonzentrationen (EtOH) im Abgas (A, C und E), sowie pH-Wert des Mediums, Biomasseproduktion, Glucose- (Gluc), Ethanol- und Essigsäurekonzentration (HAc) im Medium (B, D und F) während der Fermentation in gep. YPD- (A und B), gep. BVT- (C und D) und SD-His-Leu-Ura-Medium (E und F) bei 30°C und 48 h. Die Messergebnisse wurden zusammen mit Christian Nowacki des Arbeitskreises Wichmann (Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, TU Dortmund) aufgenommen.

Betrachtet man die Abgas- und die *offline*-Messungen, lassen sich für die Fermentationen in den getesteten Medien Ähnlichkeiten herausstellen (siehe Abbildung 36). Die schnelle Zunahme der Biomasse und die schnelle Produktion großer Mengen CO<sub>2</sub> bei den Fermentationen in allen getesteten Medien resultieren aus einer respiratorischen Verstoffwechslung der Glucose über den Citratcyclus und die Atmungskette (siehe Abbildung 35). Die gleichzeitige Produktion von Ethanol und im geringeren Maße Essigsäure weisen auf den *Crabtree*-Effekt hin. Der *Crabtree*-Effekt beschreibt die fermentative Verstoffwechslung von Pyruvat unter aeroben Bedingungen in Anwesenheit von Glucose zu Ethanol und Essigsäure (siehe Abbildung 35). Dieser Effekt lässt sich durch die ungenügende Kapazität der respiratorischen Metabolisierung von Pyruvat durch eine teilweise Repression der beteiligten Gene durch Glucose erklären.<sup>[132]</sup> Der weitere geringere Anstieg der Biomasse nach der vollständigen Metabolisierung der Glucose ist auf ein Wachstum der Hefezellen auf alternativen Kohlenstoffquellen, wie Ethanol und Essigsäure, zurückzuführen.

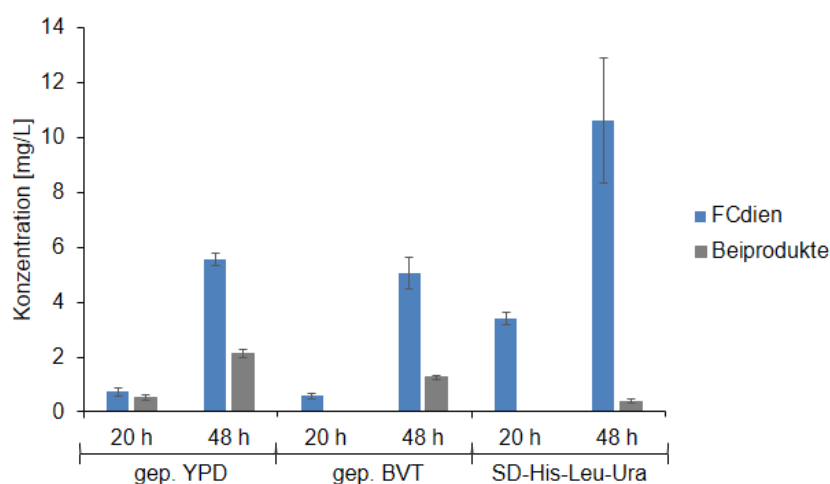
Vergleicht man die ermittelten Daten für die unterschiedlichen Medien fällt auf, dass sich das Wachstumsverhalten der Hefen bei Kultivierungen in den Komplexmedien gep. YPD und gep. BVT stark ähnelte (Abbildung 36, Vergleich zwischen A und B mit C und D). Sowohl die Biomasse und die Profile der Graphen für die CO<sub>2</sub>- und Ethanolkonzentrationen im Abgas als auch die Ethanolkonzentrationen im Medium zeigten keine signifikanten Unterschiede. Lediglich die Essigsäurekonzentrationen und die pH-Werte der Medien waren verschieden. Während bei der Fermentation in gep. YPD nach 20 h in etwa 1 g/L Essigsäure quantifiziert wurden, wurde in der BVT-Fermentation nur etwa ein Zehntel der Menge detektiert.

Trotz der erhöhten Produktion von Essigsäure in gep. YPD und obwohl beide Komplexmedien mit 100 mM Tris-HCl (pH 8) gepuffert wurden (anfänglicher pH des Mediums = 7,8), lag der pH-Wert bei dem gep. YPD-Medium zu den gemessenen Zeitpunkten jeweils bei ca. 7,8 und der des gep. BVT-Mediums nach jeweils 20 h und 48 h bei 6. Vorherige Versuche (Kapitel IV1.3.3 a) hatten gezeigt, dass der pH-Wert des gep. YPD-Mediums ebenfalls innerhalb der ersten 14 h abnahm, sich anschließend jedoch wieder auf den Ausgangs-pH von etwa 7,8 einstellte. Dies könnte auf eine Metabolisierung größerer Mengen Aminosäuren aus dem Pepton des YPD-Mediums zurückzuführen sein. Nach der vollständigen Verstoffwechslung der Glucose könnten die Aminosäuren möglicherweise ebenfalls als Kohlenstoffquelle verwendet werden, was zu einer Anreicherung von basischen Ammoniumionen führen könnte. Im BVT-Medium hingegen ist kein Pepton enthalten.

Die Graphen der CO<sub>2</sub>- und Ethanol-Abgaskonzentrationen sowie die Konzentration des Ethanols im Medium unterschieden sich bei der Fermentation im Minimalmedium SD-His-Leu-Ura hingegen stark von den Profilen in Komplexmedien (Abbildung 36 E und F). Der Graph für die CO<sub>2</sub>-Konzentration war deutlich breiter und flacher. Außerdem schien die

Ethanolkonzentration im Abgas mit etwa 17 h etwas später sein Maximum zu erreichen, als die Ethanolkonzentrationen im Falle der Komplexmedien bei etwa 12 h. Daher wurden nach 20 h und 48 h auch höhere gelöste Ethanolkonzentrationen im Minimalmedium gemessen. Die Beobachtungen lassen sich möglicherweise durch ein langsames Wachstum und eine langsamere Anpassung des Metabolismus auf das fermentative Wachstum der Hefen in dem Minimalmedium zurückführen. Dies spiegelte sich auch an der verminderten Biomasseproduktion wider, mit einer  $OD_{600}$  nach 48 h von ca. 10, im Vergleich zu etwa 20 bei den Komplexmedien.

Betrachtet man die Produktion des FCdiens in den unterschiedlichen Medien (Abbildung 37), lässt sich das ähnliche Wachstumsverhalten der Hefen in den Komplexmedien auch auf eine ähnliche Produktausbeute von durchschnittlich etwa 5 mg/L übertragen. Dies lässt sich wahrscheinlich durch eine höhere genetische Stabilität des Fermentationsstammes in dem Selektivmedium erklären. Außerdem war die Fermentation in SD-His-Leu-Ura-Medium wesentlich spezifischer, da die Beiprodukte **1**, **2** und **3** kaum nachweisbar waren. Damit gehen deutlich geringere Mengen des Diterpenvorläufers GGPP an die Cyclisierung der Nebenprodukte verloren. Die im Rahmen dieses Experiments ermittelten Ergebnisse widersprechen ebenso wie die Ergebnisse aus Kapitel IV1.3.3 a und b der zuvor aufgestellten Vermutung, dass die Produktion der spezifischen FCdien-Beiprodukte aus einer säurekatalysierten Umlagerung der Doppelbindungen in Folge der Säureproduktion in gep. YPD-Medium resultieren könnte. Vergleicht man die pH-Werte der Fermentationen, so erkennt man dass in SD-His-Leu-Ura-Medium (mit einem pH von 2,5) im Vergleich zu der Fermentation in gep. YPD-Medium wesentlich geringere pH-Werte gemessen werden (siehe Abbildung 36). Die dennoch höhere beobachtete Spezifität der Fermentation in SD-His-Leu-Ura könnte daher möglicherweise durch eine erhöhte spezifische Aktivität der AbFS bei geringen pH-Werten erklärt werden. *S. cerevisiae* reagiert auf geringe pH-Werte in der Umgebung unter anderem mit der Produktion von molekularen Chaperonen.<sup>[133]</sup> Da molekulare Chaperone in der Zelle bei der nativen Faltung von Proteinen behilflich sein können, wäre eine Produktivitäts- und Spezifitätssteigerung der Fermentation durch eine erhöhte Anzahl an korrekt gefalteter rekombinanter AbFS im Cytosol der Zelle durch die Kultivierung in ungepuffertem SD-His-Leu-Ura-Medium denkbar. Auch bei den Fermentationen in gep. BVT-Medium war trotz des ähnlichen Wachstumsverhaltens ebenfalls eine verringerte Produktion der spezifischen FCdien-Beiprodukte um etwa 40% im Vergleich zu Fermentationen in gep. YPD-Medium zu erkennen (siehe Abbildung 37).



**Abbildung 37: Zeitabhängige Konzentrationszunahme des FCdien und der spezifischen Beiprodukte 1, 2 und 3 während der Fermentationen in gep. YPD-, gep. BVT- und SD-His-Leu-Ura-Medium.**

Eine gesteigerte Produktspezifität könnte daher auch möglicherweise durch eine veränderte Metallionenkonzentration im Medium erklärt werden. In *in vitro* Experimenten konnte bereits für verschiedene Terpensynthasen eine Beeinflussung der enzymkatalytischen Parameter  $K_M$  oder  $k_{cat}$  zusammen mit einer verbesserten Produktspezifität durch den Austausch des Kofaktors  $Mg^{2+}$  durch größere zweiwertige Kationen, wie  $Mn^{2+}$  oder  $Co^{2+}$ , beobachtet werden.<sup>[102a,f]</sup> Der genaue Einfluss der Metallionenkonzentration im Medium auf die FCdien-Fermentation wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings bislang nicht weiter untersucht.

Bei dem Vergleich der Produktausbeuten nach jeweils 20 h und 48 h fiel auf, dass die FCdien-Produktion in den letzten 28 h der Fermentation wesentlich stärker war, als in den ersten 20 h (siehe Abbildung 37). Die primäre Kohlenstoffquelle Glucose war jedoch bereits nach den ersten 20 h der Fermentation vollständig metabolisiert (siehe Abbildung 36 B, D und E). Nach der Metabolisierung der Glucose passt sich der Metabolismus der Hefe auf die Energiegewinnung mittels alternativer Kohlenstoffquellen, wie beispielsweise Ethanol, an. Diese Phase ist begleitet durch einen transienten Wachstumsstopp der Hefezellen, der *Diauxic Shift* genannt wird (siehe Kapitel IV1.3.3 d, Abbildung 38). Darauf folgt eine Phase, in der die Hefezellen nur noch langsam durch die Verstoffwechslung von alternativen Kohlenstoffquellen wachsen. Transkriptionsanalysen konnten zeigen, dass während des *Diauxic Shifts* und der stationären Wachstumsphase unter anderem auch die Gene für die AADH und die ACS des Pyruvatdehydrogenasebypasses (siehe Kapitel IV1.3.3 b, Abbildung 35) hochreguliert werden.<sup>[134]</sup> Die Hochregulierung dieser Gene könnte in einer höheren Bereitstellung von Acetyl-CoA im Cytosol der Hefe für die Terpenproduktion resultieren und damit die verstärkte Zunahme der FCdien-Produktion am Ende der Fermentation erklären (siehe Abbildung 37).

Außerdem könnte es sich bei Ethanol um die effizientere Kohlenstoffquelle für die heterologe Fermentation von Terpenen handeln. Die Umsetzung des Ethanols über Acetat zu Acetyl-CoA über die im Cytosol lokalisierten Enzyme des Pyruvatdehydrogenasebypasses, könnte zu einer erhöhten cytosolischen Konzentration von Acetyl-CoA führen (siehe Kapitel IV1.3.3 b, Abbildung 35).<sup>[104e,135]</sup> Außerdem ist eine indirekte inhibitorische Wirkung des Ethanols auf die Acetyl-CoA-Carboxylase bekannt, wodurch eine geringere Umsetzung des Acetyl-CoAs zu dem Fettsäureintermediat Malonyl-CoA resultiert.<sup>[135]</sup> Beides könnte zu einem erhöhten Flux des Mevalonatwegs durch die Bereitstellung größerer Mengen Acetyl-CoAs führen.

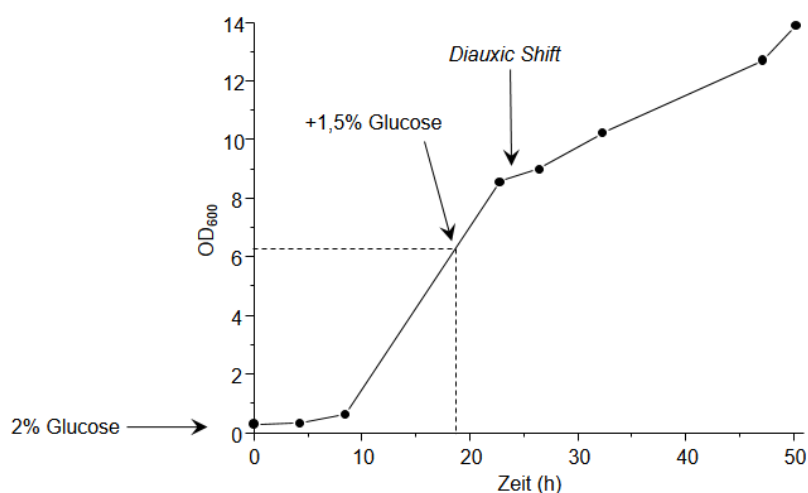
Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch bislang keine alternativen Kohlenstoffquellen für die FCdien-Produktion getestet. Vielmehr wurde der Fokus auf Fütterungsexperimente mit der bewährten Kohlenstoffquelle Glucose gelegt. Da durch die Verwendung des SD-His-Leu-Ura-Mediums sowohl die Produktausbeute als auch die Produktspezifität der Fermentation verbessert werden konnte, wurden alle weiteren Versuche fortan in diesem Minimalmedium durchgeführt.

#### **d) Einfluss der Nachfütterung der Kohlenstoffquelle Glucose auf die FCdien-Ausbeute**

Anhand einer Wachstumskurve wurde der Zeitpunkt für die Nachfütterung der Glucose bestimmt (Abbildung 38). Es ist sinnvoll die Glucose in der exponentiellen Wachstumsphase der Hefezellen, kurz vor dem *Diauxic Shift*, zu füttern, da dann noch keine Umstellung des Metabolismus auf andere Kohlenstoffquellen erfolgt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Steigerung der FCdien-Ausbeute auf durchschnittlich etwa 20 mg/L durch eine einmalige Nachfütterung von 1,5% (w/v) Glucose in der exponentiellen Wachstumsphase der Hefe in SD-His-Leu-Ura-Medium erzielt (Kapitel V6.3.3). Da bei der Verstoffwechslung von Glucose diverse organische Säuren gebildet werden (siehe Kapitel IV1.3.3 b, Abbildung 35), die für eine Abnahme des pH-Werts während der FCdien-Fermentation verantwortlich sind, wurde bei den Fütterungsexperimenten eine Übersäuerung des Mediums durch die zusätzliche Glucose befürchtet. Daher wurde das Medium mit 20 mM Succinat gepuffert.<sup>[89b,136]</sup> Dies führte zu einer Stabilisierung des pH-Werts auf 4,5 – 5 über den gesamten Zeitraum der Fermentation hinweg, womit der Pufferungseffekt wesentlich stärker war, als der des Tris-HCl bei Fermentationen in den Komplexmedien YPD und BVT. Als Intermediat des Citratcyclus liegt eine Verstoffwechslung des Succinats als zusätzliche Kohlenstoffquelle nahe. In zukünftigen Experimenten sollte daher der Einfluss des Succinats auf die FCdien-Ausbeute näher untersucht werden.





**Abbildung 38:** Wachstumskurve des FCdien-Fermentationsstammes in SD-His-Leu-Ura-Medium bei 30°C und Kennzeichnung des *Diauxic Shifts*, sowie des geeigneten Zeitpunkts der Nachfütterung von 1,5% (w/v) Glucose.

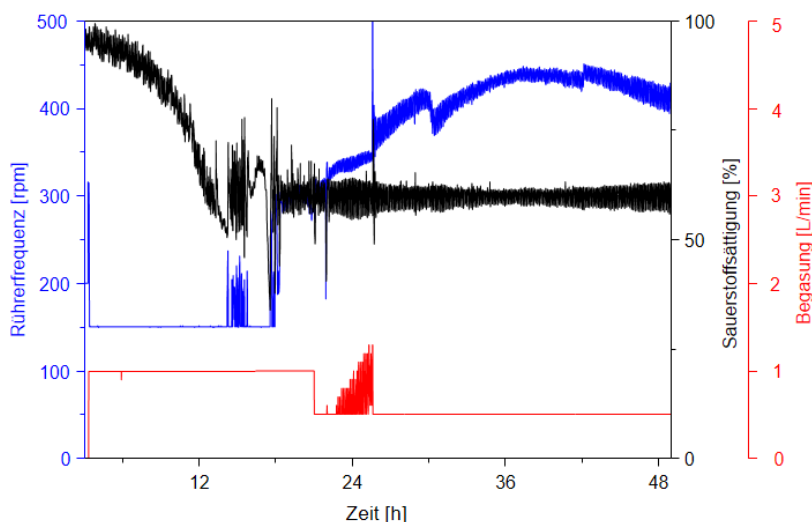
### 1.3.4 Übertragung der FCdien-Fermentation im Selektivmedium SD-His-Leu-Ura in einen Bioreaktor

Zur Verifizierung der in Kapitel IV1.3.3 erarbeiteten Hypothesen zur Produktivitätssteigerung, wurde erneut eine Übertragung der FCdien-Fermentation in einen Bioreaktor anvisiert. Alle Experimente wurden dabei ausschließlich in SD-His-Leu-Ura-Medium durchgeführt. Es sollte nicht nur die FCdien-Fermentation, sondern gleichzeitig der Umgang mit dem neuen Laborbioreaktor BIOFLO® 415 Fermentor der Firma New Brunswick/Eppendorf in unserer Arbeitsgruppe etabliert werden.

Während einer Testfermentation, bei der das Adsorbermaterial zusammen mit dem Medium in dem Bioreaktor sterilisiert wurde, waren Adsorberpartikel in den Luftzulauf gelangt, wodurch die Regulierung der Begasungsrate nicht mehr akkurat möglich war. Auch eine Zugabe des Materials über den Inokulationsport nach der Sterilisation des Mediums gestaltete sich kompliziert. Daher musste auch in diesen Versuchen auf eine *in situ* Produktextraktion verzichtet werden.

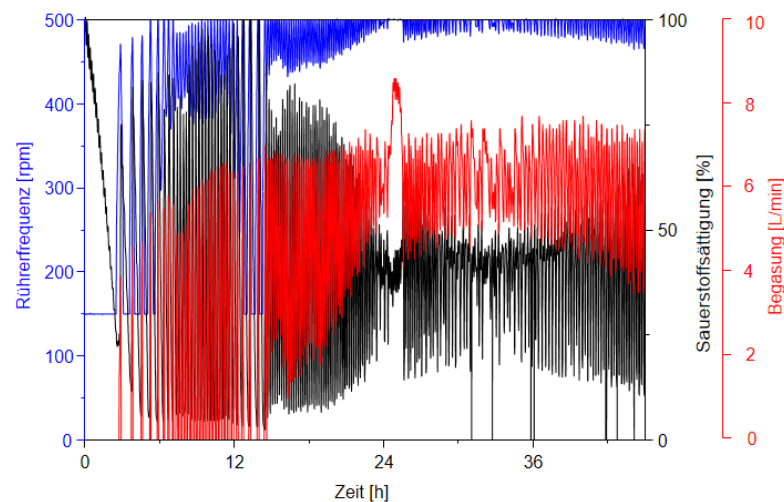
Um die zuvor durch Schüttelkolbenexperimente (siehe Kapitel IV1.3.3 b) angedeuteten Korrelationen zwischen niedrigem Sauerstofftransfer und erhöhter FCdien-Ausbeute zu verifizieren, war geplant, unterschiedliche Fermentationen unter kontrollierten Bedingungen (30°C, fix eingestellter pH-Wert) mit verschiedenen Sauerstoffsättigungen im Medium durchzuführen. Dabei sollte die Sauerstoffsättigung beginnend bei 60% schrittweise erniedrigt werden. Die Sauerstoffkonzentration im Medium wird sowohl durch die Rührerfrequenz als auch die Begasung bestimmt. Daher wurde die Kaskadenregelung dieser drei Parameter ausgenutzt, bei denen Rührerfrequenz und Begasung automatisch in Abhängigkeit der

gemessenen und eingestellten Sauerstoffsättigung in den Fermentationen variierten. Dabei wird manuell ein Rahmen für die minimalen und maximalen Rührerfrequenzen und Begasungen während der Fermentation vorgegeben (siehe Kapitel V6.3.4, Tabelle 93). Bei einer ersten Fermentation konnte die Sauerstoffsättigung von 60% während der Fermentation weitestgehend konstant gehalten werden (Abbildung 39). Die in den ersten 12 h der Fermentation gemessene Sauerstoffsättigung von über 60% ist auf die Kalibrierung der Sauerstoffsonde und durch die langsame Veratmung des Sauerstoffs in der anfänglichen lag-Phase bei dem Wachstum der Hefen zurückzuführen. Allerdings wurden in dieser ersten Fermentation im Bioreaktor lediglich etwa 1 mg/L FCdien nachgewiesen, was weit unterhalb der in den Schüttelkolben quantifizierten Ausbeuten von etwa 10 mg/L FCdien lag (siehe Kapitel IV1.3.3 c).



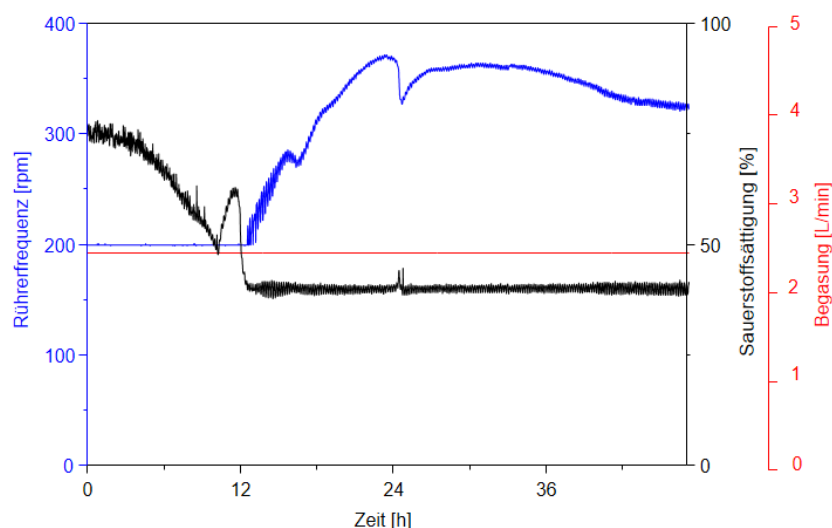
**Abbildung 39:** Verlauf der drei voneinander abhängigen, über eine Kaskadenregelung geschalteten Parameter Rührerfrequenz, Sauerstoffsättigung und Begasung während einer FCdien-Fermentation bei 30°C, pH 3,6 und einer eingestellten Sauerstoffsättigung von 60% im BIOFLO® 415. Verwendete Kaskade: Rührerfrequenz von 150 – 800 rpm und Begasung von 1 (bzw. nach 22 h herabgesetzt auf 0,5) – 10 L/min (siehe Kapitel V6.3.4, Tabelle 93, Fermentation Nr. 1).

Auch eine Fermentation bei 50% Sauerstoffsättigung führte zu einer ähnlich geringen FCdien-Ausbeute. Obwohl ähnliche Kaskadeneinstellungen, wie in den ersten beiden Fermentationen verwendet wurden, kam es bei Fermentationen mit einer gewünschten Sauerstoffsättigung von 40% oder darunter reproduzierbar zu sehr hohen Schwankungen der drei in Kaskade geschalteten Parameter Rührerfrequenz, Sauerstoffsättigung und Begasung (Abbildung 40).



**Abbildung 40:** Typischer Verlauf der drei voneinander abhängigen, über eine Kaskadenregelung geschalteten Parameter Rührerfrequenz, Sauerstoffsättigung und Begasung bei einer eingestellten Sauerstoffsättigung von 40% und einer geringen anfänglichen Begasung von 0,1 – 1 L/min (entspricht Begasungsraten von 0,03 – 0,3 vvm). Verwendete Kaskaden: siehe Kapitel V6.3.4, Tabelle 93, Fermentationen Nr. 3 – 6.

Trotzdem konnten mit 9 mg/L ähnliche FCdien-Ausbeuten wie in den Schüttelkolbenfermentationen quantifiziert werden (siehe Kapitel IV1.3.3 c). Im Anschluss wurden schrittweise die Kaskadeneinstellungen verändert und eine konstante Sauerstoffsättigung von 40% angestrebt. Maßgeblich für einen konstanten Verlauf der Sauerstoffsättigung war die Erhöhung der minimalen Begasung auf 2,4 L/min, was einer Begasungsrate von 0,8 vvm entspricht (Abbildung 41).



**Abbildung 41:** Konstanter Verlauf der Sauerstoffsättigung von 40% durch die Anpassung der minimalen Begasungsrate auf 2,4 L/min. Verwendete Kaskade: Rührerfrequenz von 200 – 650 rpm und Begasung von 2,4 – 10 L/min (siehe Kapitel V6.3.4, Tabelle 93, Fermentation Nr. 8)

In dieser Fermentation wurden allerdings wiederum nur etwa 2,5 mg/L FCdien detektiert. Möglicherweise können durch eine konstant hohe Begasungsrate von 0,8 vvm größere Mengen des FCdiens zusammen mit dem Abgas in die Laborluft gelangen (vergleiche auch Kapitel IV1.2).

Obwohl immer noch Optimierungsbedarf für die Fermentation im BIOFLO® 415 besteht, war dies im Rahmen dieser Arbeit aufgrund immer neu auftretender technischer Probleme des Bioreaktors nicht mehr möglich. Auch Fermentationen bei Sauerstoffsättigungen unterhalb von 30% oder geplante Fütterungsexperimente mit verschiedenen Kohlenstoffquellen konnten nicht mehr getestet werden. Aktuell hat sich ergeben, dass zahlreiche Defekte in der Hardware des Fermenters eine feine Justierung des DOT-Wertes unmöglich machten.

### **1.3.5 Optimierung der integrierten Produktgewinnung bei der FCdien-Fermentation**

Insgesamt zeigen die Versuche aus Kapitel IV1.3.3, dass durch eine gezielte Optimierung der Fermentationsbedingungen eine effiziente Nutzung des Biosynthesepotentials eines Mikroorganismus möglich ist. Neben der Variierung der Fermentationsparameter, kann aber auch die Optimierung der Fermentationsaufarbeitung und der Prozessführung zu einer enormen Verbesserung der Produktausbeuten führen.

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften vieler Terpene machen es häufig notwendig, sie direkt während der Fermentation von den produzierenden Mikroorganismen zu separieren, aber gleichzeitig die Entweichung dieser wertvollen Produkte in die Gasphase zu verhindern. Gerade für toxische, schlecht lösliche und leicht flüchtige Substanzen, kann eine *in situ* Produktextraktion durch eine zweite Phase innerhalb des Mediums (siehe Kapitel IV1.3.5 a, Abbildung 42) oder durch eine *ex situ* Produktentfernung durch eine gekoppelte externe Säule (siehe Kapitel IV1.3.5 b, Abbildung 43), zu einer Steigerung der isolierten Produktausbeute führen.<sup>[112,137]</sup> Darüber hinaus vereinfacht eine *in situ*- oder *ex situ*-Separation des Fermentationsproduktes von dem wässrigen Medium auch die Produktisolierung. Im besten Falle wird das gewünschte Produkt je nach verwendetem Material durch eine einfache Destillation oder Desorption nach der Fermentation gewonnen.

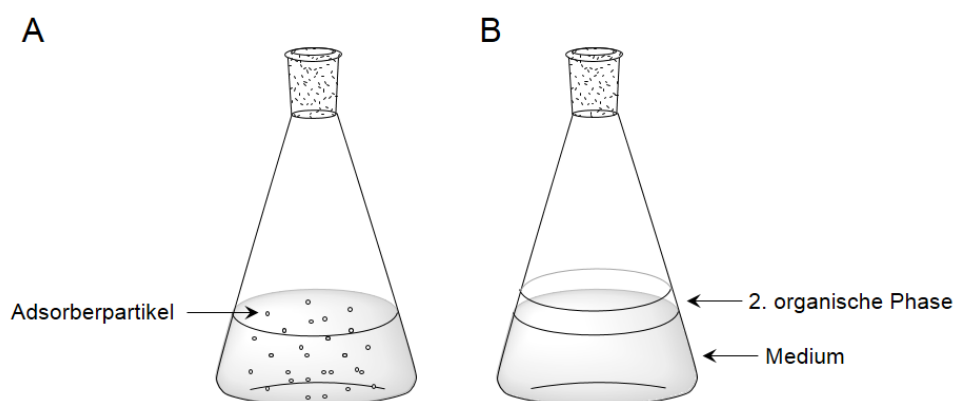
#### **a) Adsorberscreening zur *in situ* Produktadsorption während der FCdien-Fermentation**

Der Nachweis von FCdien in dem Kondensat am Gasauslass nach Fermentationen im Bioreaktor ohne eine kontinuierliche *in situ* Extraktion des FCdiens zeigten, dass FCdien flüchtig ist und eine signifikante Menge des Terpens zusammen mit anderen Gasen während der Kultivierung aus dem Medium entwich (siehe Kapitel IV1.2). Außerdem wurden bei der getrennten Untersuchung des Fermentationsmediums und der Biomasse sowohl FCdien als

auch der Steroidvorläufer Squalen in der Zellfraktion gefunden.<sup>[138]</sup> Die Stabilität der Zellmembran wird durch die Einlagerung hydrophober Substanzen beeinflusst, wodurch eine Toxizität des FCdiens auf die Hefe nicht auszuschließen ist.<sup>[139]</sup> Neben dem Einfluss auf die Membranfluidität, ist auch eine stressinduzierte Regulierung verschiedener Stoffwechselwege durch den hydrophoben Charakter eines toxischen Terpens zu erwarten.<sup>[104c,140]</sup> Zur effektiven Fermentation des FCdiens war eine kontinuierliche Extraktion des Produktes daher unerlässlich.

Die Verwendung des hydrophoben *C18 silica gel spherical* (Supelco) (siehe Kapitel IV1.1.5) in präparativen Fermentationen in SD-His-Leu-Ura führte reproduzierbar zur Steigerung der FCdien-Ausbeute auf durchschnittlich 30 mg/L, im Vergleich zu etwa 10 mg/L ohne Adsorbens (siehe Kapitel IV1.3.3 c). Da aber das Adsorbentmaterial durch die irreversible Anhaftung von Hefezellen nach der Fermentation nicht wiederverwertet werden konnte, war die Verwendung dieses teuren C18-Silicagels aus ökonomischer Sicht nicht sinnvoll.

Alternativ zur Verwendung fester Adsorbentmaterialien können auch zweiphasige Systeme, bei denen die Fermentationskultur mit einem biokompatiblen und inerten organischen Lösungsmittel übersättigt wird, zur *in situ* Produktextraktion verwendet werden (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Konzept der *in situ* Produktextraktion durch feste Adsorberpartikel (A) oder durch eine zweite biokompatible organische Phase (B).**

*n*-Dodecan wird bei der Gewinnung heterolog fermentierter Terpene am häufigsten verwendet.<sup>[112,141]</sup> Unter Laborbedingungen gestaltete sich die destillative Trennung des FCdiens von dem langkettigen Alkan jedoch als aufwendig. Idealerweise würden sich Lösungsmittel anbieten, die einen sehr niedrigen Siedepunkt aufweisen. Diese könnten im Anschluss unter Vakuum oder durch das Verdampfen unter einem Stickstoffstrom entfernt werden und damit die Isolation des FCdiens vereinfachen. Daher wurden die kürzerkettigen Alkane *n*-Heptan, *n*-Octan, *n*-Nonan, *n*-Decan und *n*-Undecan in einer Konzentration von jeweils 10% (v/v) des Gesamtmedienvolumens zur Übersättigung der Fermentationskulturen getestet. Obwohl die getesteten Alkane einen Logarithmus des Partitionskoeffizienten, LogP,

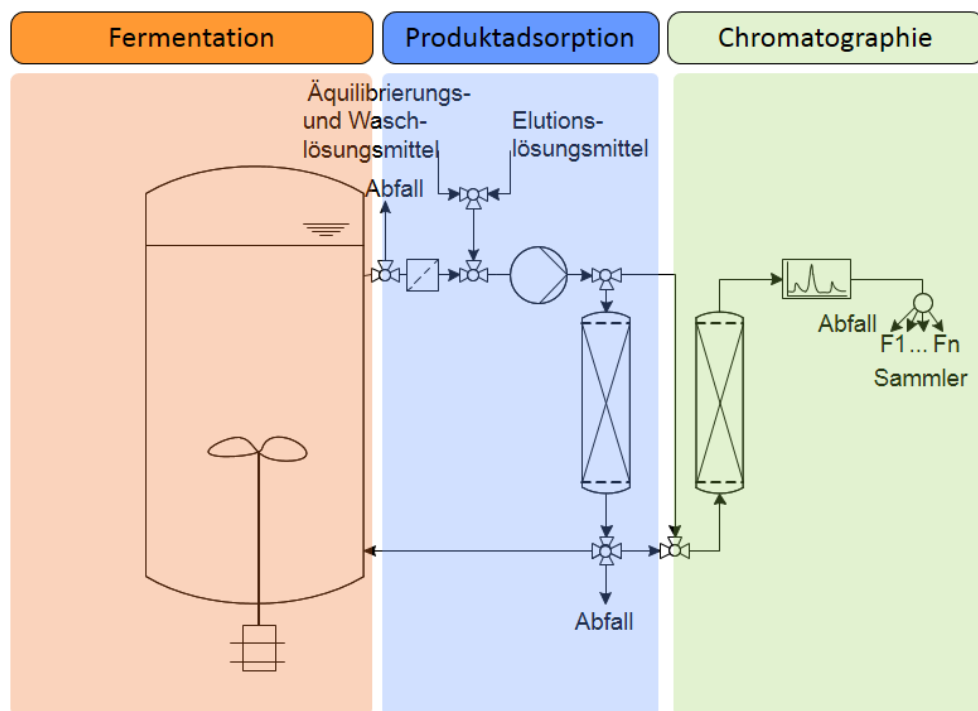
von vier oder darüber aufweisen und sie daher biokompatibel sein sollten, wurde in allen Fällen ein wachstumsinhibierender Effekt auf den FCdien-Fermentationsstamm beobachtet.<sup>[142]</sup> Bei der Verwendung der Alkane mit Kettenlängen von C7 - C10 stellte sich das Wachstum der Hefezellen komplett ein. Bei *n*-Undecan wurde eine starke Schaumbildung beobachtet, was mit einer Lyse der Hefezellen in Verbindung gebracht werden kann.<sup>[143]</sup> In allen Fällen wurde kein FCdien in den Fermentationskulturen detektiert.

Daher wurde im Anschluss nach alternativen, kostengünstigen festen Adsorbermaterialien gesucht. Während das im Rahmen dieser Arbeit getestete unfunktionalisierte Polysterol Amberlite® XAD16N (Sigma-Aldrich) im Vergleich zum C18-Silicagel schlechtere Adsorptionseigenschaften gegenüber dem FCdien aufwies, wurde das unfunktionalisierte Polysterolharz Lewatit® VP OC 1064 MD PH (Lanxess) bei einem Adsorberscreening im Rahmen der Dissertation von Dominik Bergs in der Arbeitsgruppe Schembecker (Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, TU Dortmund) mit einer hohen Beladungskapazität von 2,88 mg FCdien pro Gramm Adsorber identifiziert.<sup>[144]</sup> Die Adsorptionseigenschaften dieser Harze werden daher nachweislich nicht nur durch ihre chemische Struktur, sondern auch durch ihre Porengröße (XAD: 20 nm, Lewatit: 5 – 10 nm) und ihr Quellverhalten (XAD: 0,55 mL/g, Lewatit: 1,2 mL/g) bestimmt.

Das von Dominik Bergs durchgeführte Adsorberscreening wurde mit gereinigtem FCdien ohne das Vorhandensein komplexer Medienbestandteile und weiterer Fermentationsprodukte durchgeführt. Deswegen wurden im Rahmen dieser Arbeit die Adsorptionseigenschaften des Lewatit® VP OC 1064 MD PH zusätzlich in realen, präparativen Fermentationen bestätigt. Bei Fermentationen mit 1% (w/v) Lewatit® VP OC 1064 MD PH wurden mit durchschnittlich 30 mg/L gleiche FCdien-Ausbeuten isoliert, wie bei der Verwendung von 0,5% (w/v) des C18-Silicagels. Die Kosten konnten jedoch bei der Verwendung des Polysterolharzes im Vergleich zum C18-Silicagel um 80% gesenkt werden.

### **b) Konzept der *ex situ* Produktentfernung zur semi-kontinuierlichen FCdien-Fermentation**

In der Bioprozesstechnik unterteilt man in *batch*-, *fed-batch*-, semi-kontinuierliche und kontinuierliche Fermentationsverfahren.<sup>[145]</sup> Im Hinblick auf ökonomische Aspekte und die Volumenproduktivität einer Fermentation können semi-kontinuierliche und kontinuierliche Verfahren einen Vorteil gegenüber *batch*-Verfahren bieten.<sup>[146]</sup> In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schembecker (Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen, TU Dortmund) wurde im Rahmen der Dissertation von Dominik Bergs ein Konzept für die semi-kontinuierliche Fermentation von FCdien mit integrierter Produktanalyse entwickelt (Abbildung 43).<sup>[144]</sup>



**Abbildung 43: Konzept zur semi-kontinuierlichen Fermentation von FCdien mit integrierter Produktabführung und –analytik.** Diese Abbildung wurde im Rahmen der Dissertation von Dominik Bergs erstellt.<sup>[144]</sup>

Ein Charakteristikum der klassischen semi-kontinuierlichen Fermentation ist die nachhaltige Ausnutzung des biosynthetischen Potentials des Fermentationsstammes durch die wiederholte Zuführung frischer Nährlösung und gleichzeitiger Abführung der gleichen Menge Kulturlösung.<sup>[145]</sup> Die abgelassene Kulturlösung kann dann zur Aufarbeitung des fermentierten Naturstoffes dienen. Da FCdien flüchtig und potentiell toxisch für die Hefezellen ist (siehe Kapitel IV1.3.5 a), musste aber im Falle des FCdiens eine kontinuierliche Produktabführung in dem System realisierbar sein, um einen enormen Ausbeuteverlust, sowohl durch die Ausdunstung des FCdiens als auch durch eine potentielle Wachstumsinhibition der Hefezellen während der Fermentation auszuschließen. Daher sollte eine extern angebrachte Säule, die mit einem geeigneten Adsorbermaterial gepackt war, zur kontinuierlichen *ex situ* Produktadsorption für FCdien verwendet werden.

Zunächst wurde in Betracht gezogen, dass zur *ex situ* Adsorption des FCdiens ein Teil der Kulturlösung samt Hefezellen über die Säule gepumpt werden könne. Dabei sollte das FCdien an das Adsorbermaterial binden, die Hefezellen jedoch unbeschadet das Adsorbermaterial passieren, um eine Rückführung der Biomasse in den Reaktorkessel zu ermöglichen. Anschließend sollte FCdien durch die Desorption in einem externen Kreislauf mittels eines organischen Lösungsmittels isoliert werden.

Zur Umsetzung des in Abbildung 43 veranschaulichten Konzepts wurden im Rahmen dieser Dissertation erste Vorexperimente mit der isolierten Komponente zur Produktadsorption durchgeführt. Eine für 48 h in einem Schüttelkolben kultivierte FCdien-Fermentation wurde über eine mit dem Adsorbermaterial Lewatit® VP OC 1064 MD PH gepackte Säule gepumpt. Die Rückgewinnung der Biomasse scheiterte aufgrund der Verstopfung der Hohlräume zwischen den Adsorberpartikeln durch die Ausbildung größerer Hefezellaggregate, die als Flockenbildung aus dem Bierbrauen bekannt sind.<sup>[147]</sup> Dieses Experiment zeigt, dass ein weiteres Modul zur integrierten Filtration der Hefezellen vor dem Modul zur *ex situ* Adsorption des FCdiens mit einbezogen werden muss, um die geplante semi-kontinuierliche Fermentation des FCdiens zu realisieren.

Außerdem wurden unterschiedliche potentielle Lösungsmittel für die Äquilibrierung und das Waschen der Säule vor der FCdien-Desorption getestet. Um einen Gradienten zwischen dem polaren, wässrigen Fermentationsmedium und dem unpolaren Elutionsmittel *n*-Pentan zu schaffen, sollte das verwendete Lösungsmittel mit Wasser gut mischbar sein und eine sehr geringe bis gar keine Elutionswirkung gegenüber FCdien aufweisen. Die Lösungsmittel Methanol, Ethanol, Isopropanol, Acetonitril und Aceton wurden getestet. Dabei wies Isopropanol die geringste Elutionswirkung gegenüber FCdien auf und würde sich daher in Folgeexperimenten am besten als Lösungsmittel für die Äquilibrierung und das Waschen der Säule eignen.

An einem effizienten Modul zur Produktabführung wird momentan in der Arbeitsgruppe Merz im Lehrstuhl Schembecker (Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen, TU Dortmund) gearbeitet.

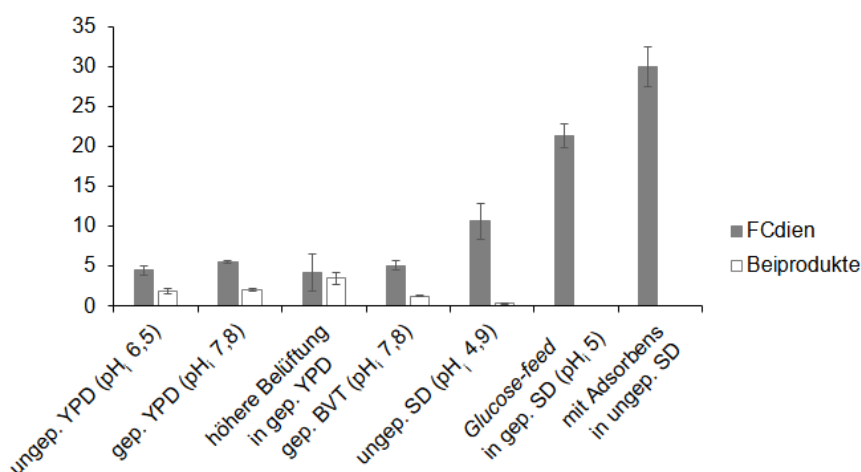
## 1.4 Zusammenfassung und Ausblick

Um die Verfügbarkeit von Naturstoffen zu erhöhen, gewinnt die heterologe Fermentation für die chemische Industrie und Pharmazie immer weiter an Bedeutung. Eines der bekanntesten Beispiele ist die Herstellung des Antimalariamedikaments Artemisinin durch den pharmazeutischen Großkonzern Sanofi. Seit 2013 wird Artemisinin durch einen semisynthetischen Ansatz im Tonnenmaßstab durch Sanofi gewonnen.<sup>[148]</sup> Die fermentative Erzeugung der Vorstufe Artemisininsäure durch *S. cerevisiae* ist dabei maßgeblich für die Produktion des sesquiterpenoiden Antimalariawirkstoffs.<sup>[79]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die präparative heterologe Fermentation des Diterpens FCdien, als Vorstufe der phytopathogenen und anticarcinogenen Fusicoccane, etabliert. Die Wahl des Fermentationsorganismus ist ein entscheidendes Element zur schnellen und effizienten Bereitstellung des gewünschten Naturstoffs. In einer komparativen Studie wurde



das Schlüsselenzym der FCdien-Biosynthese - die Terpensynthase AbFS - in dem Prokaryoten *E. coli*, dem filamentösen Pilz *A. nidulans* und dem einzelligen Eukaryoten *S. cerevisiae* heterolog exprimiert.<sup>[80]</sup> Aufgrund der limitierten löslichen Expression des Enzyms im zellulären Umfeld des Prokaryoten und einer vermutlich geringen Bereitstellung der Terpenvorläufer IPP und DMAPP, konnte FCdien durch *E. coli* nur in analytischen Mengen produziert werden (siehe Kapitel IV1.1.3). Mit dem erfolgreichen Nachweis des FCdiens in den Kulturextrakten von *A. nidulans* (siehe Kapitel IV1.1.4) konnte zum ersten Mal ein Beispiel für eine heterologe Fermentation eines Diterpens in diesem filamentösen Pilz veröffentlicht werden.<sup>[87]</sup> Die erzielte Produktvielfalt durch die Expression des Fremdenzyms AbFS und die marginale Produktion des FCdiens schloss *A. nidulans* als geeigneten Fermentationsstamm jedoch ebenfalls aus. Im Gegensatz dazu lieferte die unoptimierte Fermentation des FCdiens durch *S. cerevisiae* bereits isolierte Produktausbeuten von durchschnittlich 6 mg/L (siehe Kapitel IV1.1.5). Der dabei verwendete Hefestamm war mit zwei Plasmiden zur Überexpression von zwei am Terpenmetabolismus beteiligten Enzymvarianten kotransformiert (siehe Kapitel IV1.1.5, Abbildung 25), die eine erhöhte Produktion heterologer Terpene in der Zelle ermöglichen.<sup>[92b,104a,e,106-107]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die systematische Variierung der Fermentationsbedingungen in Schüttelkolben sowohl eine Verbesserung der Fermentationsspezifität als auch der isolierten Produktausbeute um das Fünffache auf 30 mg/L erreicht werden (Abbildung 44).

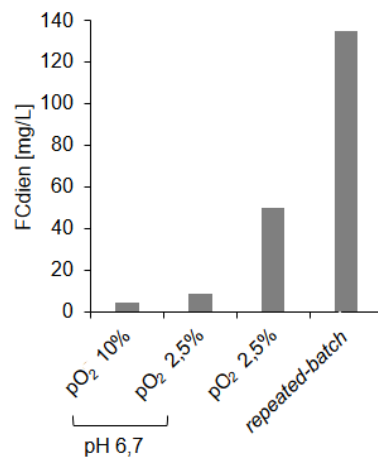


**Abbildung 44: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Optimierungen zur Steigerung der FCdien-Fermentation durch *S. cerevisiae*.** Die Konzentrationen der spezifischen Beiprodukte wurden für die Fütterungsexperimente (*Glucose-feed*) und für die Versuche mit Adsorbens nicht exakt bestimmt, waren aber qualitativ abgeschätzt in etwa so hoch wie bei Fermentationen in ungep. SD-Medium, pH<sub>i</sub>: Initialer pH.

In den durchgeführten Experimenten wurden zunächst Ansatzpunkte für eine Verbesserung der FCdien-Fermentation identifiziert. Sowohl geringe Sauerstofftransferraten (siehe Kapitel IV1.3.3 a) als auch geringe pH-Werte (siehe Kapitel IV1.3.3 c) schienen relevant für die

Produktausbeute und –spezifität zu sein. Signifikante Steigerungen der Produktausbeute wurden vor allem durch die Wahl des Fermentationsmediums SD-His-Leu-Ura (siehe Kapitel IV1.3.3 c), eine Nachfütterung der Kohlenstoffquelle Glucose (siehe Kapitel IV1.3.3 d) und die Verwendung eines festen Adsorbermaterials zur *in situ* Produktextraktion (siehe Kapitel IV1.3.5 a) beobachtet.

Die Experimente zur Übertragung der FCdien-Fermentation in einen Bioreaktor zur Verifizierung der herausgestellten Parameter und zur weiteren Verbesserung der Fermentationsausbeute konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig abgeschlossen werden (siehe Kapitel IV1.3.4). Weitere Experimente dazu werden momentan in der laufenden Dissertation von Lisa Marie Halka in der Arbeitsgruppe Wichmann (Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, TU Dortmund) durchgeführt.<sup>[149]</sup> Bislang konnte dabei durch die Einhaltung der in dieser Arbeit herausgestellten Optimierungen und unter den kontrollierten Bedingungen eines Bioreaktors eine Steigerung der Produktausbeute auf 135 mg/L in Fütterungsexperimenten mit Glucose - hier *repeated-batch* genannt - erhalten werden (Abbildung 45).<sup>[149]</sup> Dabei bestätigten sich insbesondere Parameter, wie eine niedrige Sauerstoffkonzentration und ein (unregulierter) niedriger pH-Wert.<sup>[149]</sup>



**Abbildung 45: Zusammenfassung der bislang im Kooperationsarbeitskreis Wichmann in der Dissertation von Lisa Marie Halka (Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, TU Dortmund) erhaltenen Ergebnisse bei der Übertragung der im Rahmen dieser Arbeit etablierten FCdien-Fermentation in einen Bioreaktor.**<sup>[149]</sup> Alle Fermentationen wurden im Bioreaktor KFL2000 der Firma Bioengineering in 1,6 L SD-His-Leu-Ura bei 30°C für 60 h bzw. im Falle des *repeated-batch*-Experiments für 72 h durchgeführt. Bei den ersten beiden Fermentationen wurde der pH fix auf 6,7 eingestellt, bei den letzten beiden hingegen wurde der pH-Wert unreguliert belassen, wodurch analog zu den Schüttelkolbenexperimenten niedrige pH-Werte von bis zu 2,5 erreicht wurden. *repeated-batch*: Prozessführung bei der immer dann 1% Glucose nachgefüttert wurde, wenn sich die Glucosekonzentration im Medium Null näherte.

Da in den *repeated-batch*-Versuchen bislang noch kein Adsorber verwendet wurde, ist eine weitere Steigerung der FCdien-Ausbeute analog zu den Schüttelkolbenexperimenten um etwa das Dreifache durch die *in situ* Produktextraktion zu erwarten (siehe Kapitel IV1.3.5 a).

Außerdem wurden bislang noch keine anderen C-Quellen oder die Variierung anderer Medienbestandteile genauer untersucht. Beispielsweise könnte ein Wechsel der Kohlenstoffquelle zu Ethanol unter Ausnutzung höherer cytosolischer Acetyl-CoA-Konzentrationen (siehe Kapitel IV1.3.3 c) erfolgsversprechend sein. Hier wäre zu berücksichtigen, dass das Wachstum bei der Metabolisierung von Ethanol wesentlich langsamer ist als bei der Verstoffwechslung von Glucose. Daher sollte in einem zukünftigen Experiment eine Mischung dieser beiden Kohlenstoffquellen verwendet werden. Sinnvoll wäre eine Anzucht der Hefen in Anwesenheit von Glucose als Kohlenstoffquelle zur schnellen Produktion der Biomasse. Anschließend könnte nach dem *Diauxic Shift* und der Anpassung des Metabolismus auf alternative Kohlenstoffquellen mit Ethanol nachgefüttert werden. In der Literatur findet man ebenfalls *mixed-feeding* Strategien für die heterologe Fermentation von Terpenen.<sup>[104e,f]</sup> Entsprechende Versuche werden in Zukunft in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Wichmann an der TU Dortmund fortgeführt.

Ein weiteres Ziel zukünftiger Experimente ist die Weiterentwicklung der *repeated-batch*-Versuche zu einer semi-kontinuierlichen Fermentation des FCdiens. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Konzept dafür erarbeitet und erste Vorversuche dahingehend durchgeführt werden (siehe Kapitel IV1.3.5 b).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass signifikante Steigerungen der FCdien-Ausbeute durch die systematische Variierung der Fermentationsbedingungen möglich sind. Die Arbeiten der Arbeitsgruppe Keasling zu der heterologen Fermentation der Vorstufen des Antimalariamedikaments Artemisinin zeigen, dass eine weitere Verbesserung der Terpenfermentation um mehrere Größenordnungen nur unter großem Zeitaufwand möglich ist.<sup>[104]</sup> Verschiedene Beispiele zur heterologen Fermentation von Terpenen in *S. cerevisiae* (Tabelle 96) veranschaulichen, dass das *Metabolic Engineering* zwar einen signifikanten Effekt auf die Terpenausbeuten hat, aber die Konzentrationen einzelner Metabolite stark variieren. Diese Variationen beruhen zum Teil auf der Adressierung verschiedener Manipulationen in dem Metabolismus der Hefe und auf unterschiedlichen Prozessführungen. Jedoch lassen sich bei weitem nicht alle Unterschiede in den Terpenausbeuten durch diese beiden Einflüsse erklären. Beispielsweise liegt die Ausbeute des heterolog fermentierten *epi*-Cedrols in *S. cerevisiae* weit unterhalb der in dieser Arbeit erzielten FCdien-Ausbeute - selbst bei einem Vergleich mit der unoptimierten FCdien-Fermentation - obwohl jeweils durch das *Metabolic Engineering* die Manipulationen der gleichen Gene im Terpenmetabolismus anvisiert wurden (siehe Tabelle 2).<sup>[106-107]</sup>

**Tabelle 2: Übersicht über eine Auswahl von Terpenen und deren Produktausbeuten bei der heterologen Fermentation durch *S. cerevisiae*.** ↑: Hochregulierung oder Überexpression, ↓: Repression oder Deletion, []: Modifikation hatte keinen Effekt auf die Terpenproduktion, unopt.: unoptimiert, opt.: optimiert, *ts*: Terpensynthasegen, *upc2.1*: Gen für die mutierte Version von UPC2, *thmgr*: Gen für die verkürzte Version der HMGR1, *ggppsS.a.*: GGPP-Synthasegen aus *S. acidocaldarius*, *erg9*: Squalensynthasegen aus *S. cerevisiae*, *cyp71av1*, *cpr1*, *cyb5*, *adh1* und *aldh1*: Codierende Gene für die Enzyme zur Transformation von Amorphadien zu Artemisininsäure, *erg20-ts*: Gen für das Fusionsprotein aus der FPP/GPP-Synthase aus *S. cerevisiae* und einer Terpensynthase, *lpp1/dpp1*: Gene für die verantwortlichen Enzyme für die Dephosphorylierung von FPP, *gdh1*: Gen für die NADP(H)-abhängige Glutamatdehydrogenase, GDH2: NAD(H)-abhängige GDH, IDI1: IPP-Isomerase 1, *hmgr2\_K6R*: Gen für eine stabilere Variante der HMGR2, *gppsS.a.*: GPP-Synthase aus *Picea abis*, *hsp90*: Gen für das Chaperon Hsp90.

Terpen	Klasse	Modifikation	Prozess	Ausbeute
FCdien	Diterpen	<i>upc2.1</i> ↑, <i>thmgr</i> ↑, <i>ts</i> ↑	<i>batch</i> (unopt.)	6 mg/L
			<i>batch</i> (opt.)	30 mg/L
			<i>repeated-batch</i>	135 mg/L <sup>[149]</sup>
Taxadien <sup>[106]</sup>	Diterpen	<i>upc2.1</i> ↑, <i>thmgr</i> ↑, <i>ggppsS.a.</i> ↑, <i>ts</i> ↑	<i>batch</i>	8,9 mg/L
Amorphadien <sup>[104e]</sup>	Sesquiterpen	<i>upc2.1</i> ↑, <i>thmgr</i> ↑, <i>erg9</i> ↓, MVA-Enzyme↑, <i>ts</i> ↑	<i>fed-batch</i>	41 g/L
Artemisininsäure <sup>[104f]</sup>	Sesquiterpenoid	<i>upc2.1</i> ↑, <i>thmgr</i> ↑, <i>erg9</i> ↓, MVA-Enzyme↑, <i>ts</i> ↑, <i>cyp71av1</i> ↑, <i>cpr1</i> ↑, <i>cyb5</i> ↑, <i>adh1</i> ↑, <i>aldh1</i> ↑	<i>fed-batch</i>	25 g/L
<i>epi</i> -Cedrol <sup>[107]</sup>	Sesquiterpen	<i>upc2.1</i> ↑, <i>thmgr</i> ↑, <i>ts</i> ↑	<i>batch</i>	0,37 mg/L
Cubelol <sup>[135]</sup>	Sesquiterpenoid	<i>thmgr</i> ↑ [, <i>erg9</i> ↓], <i>ts</i> ↑	<i>batch</i>	9,9 mg/L
Patchoulo <sup>[141b]</sup>	Sesquiterpenoid	<i>erg9</i> ↓, <i>erg20-ts</i> ↑	<i>batch</i>	41 mg/L
			<i>thmgr</i> ↑, <i>erg9</i> ↓, <i>lpp1/dpp1</i> ↓, <i>ts</i> ↑	<i>fed-batch</i>
$\alpha$ -Santalol <sup>[141c,150]</sup>	Sesquiterpen	<i>upc2.1</i> ↑, <i>thmgr</i> ↑, <i>erg9</i> ↓, <i>lpp1/dpp1</i> ↓, <i>gdh1</i> ↓, GDH2↑, <i>erg20</i> ↑, <i>ts</i> ↑	kontinuierlich	24,9 mg/L und pro Tag
Cineol <sup>[151]</sup>	Mono-terpenoid	<i>hmgr2_K6R</i> ↑, <i>erg9</i> ↓, IDI1↑, <i>erg20</i> ↑, <i>gppsP.a.</i> ↑, <i>ts</i> ↑, <i>hsp90</i> ↑	<i>batch</i>	1,1 g/L

Bei der heterologen Fermentation des Amorphadiens wurde ein kumulativer Effekt durch die gleichzeitige Überexpression der tHMGR und der Repression von Erg9 (Squalensynthase) beobachtet, wohingegen durch die gleichzeitige Einführung beider Manipulationen bei der heterologen Fermentation des Cubelols keine Steigerung der Ausbeute erzielt wurde.<sup>[104a,135]</sup> Neben der Erhöhung der Terpenintermediate IPP und DMAPP, könnte daher die gezielte

Adressierung anderer, inhärenter Limitationen in der Terpenbiosynthese entscheidend für eine weitere Steigerung einzelner Terpenausbeuten sein.<sup>[92h,152]</sup> Naheliegender ist dabei die nähere Untersuchung der, hinter die erhöhte IPP- und DMAPP-Biosynthese geschalteten, Prenyltransferasen und Terpensynthasen, die verantwortlich für die Synthese der einzelnen Zielmetabolite sind. Während einige Studien sich auf die Expressionslevel dieser Schlüsselenzyme konzentrieren, fokussieren sich andere Forschergruppen auf die Veränderung der Faltungstabilität und eine damit verbundene erhöhte Enzymaktivität.<sup>[91b,92h,151-153]</sup>

Im Falle der heterologen Fermentation des FCdien wurde eine limitierte Expressionsrate der bifunktionellen Terpensynthase AbFS ausgeschlossen, da durch die Überexpression einer für *S. cerevisiae* codonoptimierten *abfs*-Genvariante keine Steigerung der FCdien-Ausbeute erzielt wurde (siehe Kapitel IV1.3.2). Stattdessen wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Cyclisierungsintermediate oder -nebenprodukte detektiert (siehe Kapitel IV1.3) und eine intrazelluläre Ansammlung des Steroidvorläufers Squalen bei den FCdien-Fermentationen festgestellt (siehe Kapitel IV1.3.5). Die Produktpromiskuität wird oftmals im Zusammenhang mit schlechten katalytischen Eigenschaften der Enzyme beobachtet.<sup>[152]</sup> Auch eine Ansammlung von Squalen könnte für eine zu geringe Kapazität der AbFS in dem Umfeld der erhöhten Terpenvorläuferkonzentration sprechen, indem überschüssige Terpenintermediate in der konkurrierenden Steroidbiosynthese verwendet werden.

Eine Erhöhung der aktiven AbFS-Population in der Zelle durch eine Steigerung der Faltungstabilität des Enzyms könnte zu einer optimierten heterologen Fermentation des gewünschten Diterpens FCdien führen. Daher beschäftigt sich das nächste Kapitel mit der löslichen Expression der AbFS im Allgemeinen und der Mutagenese dieses Enzyms in Hinblick auf eine erhöhte intrinsische Faltungstabilität.

## 2 Untersuchungen zur löslichen Expression der AbFS

Terpensynthasen (siehe Kapitel II1.1.1) stellen die Schlüsselenzyme in der Bildung der diversen Naturstoffklasse der Terpene dar. Obwohl ein großes Interesse an der Aufklärung der Katalysemechanismen dieser komplexen Enzyme besteht, sind bis heute nur wenige Kristallstrukturen unterschiedlicher Terpensynthasen bekannt, mit lediglich fünf Strukturen für Diterpensynthasen.<sup>[28f-h,28j,k]</sup> Oftmals scheitert die Strukturaufklärung schon an der Isolation ausreichender Mengen löslichen und aktiven Enzyms. In den nativen Produktionsorganismen findet meist eine starke Regulation der Expression auf der Transkriptions- oder Translationsebene statt, was die Reinigung größerer Mengen dieser Enzyme erschwert.<sup>[85a-d]</sup> In heterologen Expressionsorganismen werden häufig unlösliche *Inclusion Bodies*, begleitet von einer geringen Enzymaktivität, detektiert.<sup>[154]</sup>

Auch im Falle der bifunktionellen AbFS, als eines der Schlüsselenzyme in der Biosynthese der Diterpenfusiccane, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine sehr geringe lösliche Expression und Aktivität in *E. coli* festgestellt (siehe Kapitel IV1.1.3). Durch den Wechsel des Wirtsorganismus zu dem eukaryotischen Einzeller *S. cerevisiae*, konnte zwar eine vielfache Steigerung der FCdien-Ausbeute pro Kulturvolumen erreicht werden (siehe Kapitel IV1.1.5), der Nachweis der überexprimierten AbFS in den Hefelysaten war jedoch über SDS-PAGE-Analyse nicht eindeutig möglich (siehe Kapitel IV1.3.2).

Bislang ist keine Kristallstruktur der FS oder einer anderen dimeren Terpensynthase dieser Art bekannt. Um ein Verständnis über den Katalysemechanismus und die Weiterreichung des Intermediats GGPP innerhalb des Enzyms zu erlangen, wäre die Isolation der nativ gefalteten AbFS ein erster Schritt in der Aufklärung der Kristallstruktur dieses bifunktionellen Enzyms.

Zur Steigerung der löslichen Expression von Enzymen gibt es etliche Ansätze. Der Erfolg der verwendeten Methode ist meist von dem einzelnen Protein abhängig. Bekannte Verfahren zur Steigerung der löslichen Expression sind beispielsweise die Variation der Expressionsbedingungen, des Vektorsystems, des Expressionsstammes oder des heterologen Wirtsorganismus.<sup>[85e,88]</sup> Handelt es sich bei dem untersuchten Enzym um ein Multidomänenprotein, kann auch eine separate Expression einzelner Teilbereiche des Zielproteins erfolgsversprechend sein.<sup>[155]</sup> Auch das *Enzyme Engineering* wird immer häufiger zur Erhöhung der Faltungsstabilität und der löslichen Expression von rekombinanten Proteinen verwendet.<sup>[156]</sup> Zur Steigerung der löslichen Expression der AbFS, wurden im Rahmen dieser Arbeit eine große Auswahl an Methoden getestet.

Am häufigsten wird das Bakterium *E. coli* zur heterologen Expression und Bereitstellung großer Mengen rekombinanter Proteine verwendet. Neben der immensen Zeitersparnis im Vergleich zu den sich langsamer reproduzierenden eukaryotischen Expressionssystemen,

existieren für *E. coli* zahlreiche etablierte Protokolle. Außerdem konnte im Gegensatz zu *S. cerevisiae* bereits eine deutliche Überexpression der AbFS in *E. coli* detektiert werden. Daher wurde sich zunächst auf die Steigerung der löslichen Expression der AbFS in *E. coli* konzentriert.

## 2.1 Variationen des *E. coli*-Expressionssystems

Im Rahmen der fermentativen Erzeugung des FCdiens mittels *E. coli*, wurde die Variation der Expressionsbedingungen, wie Temperatur, Induktionsmittelkonzentration und Wahl des Nährmediums bereits diskutiert (siehe Kapitel IV1.1.3). Eine Steigerung der löslichen Expression von rekombinanten Proteinen kann in vielen Fällen auch durch die Variation des *E. coli*-Expressionssystems, bestehend aus Expressionsvektor und -stamm, erreicht werden.<sup>[88]</sup>

### 2.1.1 Variation des Vektorsystems

Der in den ersten Experimenten eingesetzte *E. coli*-Vektor pETM30-*abfs* ermöglichte eine Expression der AbFS in N-terminaler Fusion mit dem GST-Tag unter der Kontrolle des starken T7/*lac*-Promotersystems (siehe Kapitel IV1.1.3).<sup>[157]</sup> In einigen Fällen kann der GST-Fusionstag die Produktivität und Löslichkeit rekombinanter Proteine in *E. coli* steigern.<sup>[158]</sup> Beeinflusst der gewählte Fusionspartner aber die Aktivität und korrekte Faltung des Zielproteins, kann eine C-terminale Fusion oder die Wahl eines kleineren Fusionstags zur gesteigerten löslichen und aktiven rekombinanten Proteinexpression führen.<sup>[159]</sup> In vielen Fällen sind pET-Vektoren die erste Wahl bei der Expression von Fremdproteinen in *E. coli*, da sie sehr hohe Expressionslevel versprechen.<sup>[160]</sup> Jedoch führt gerade die hohe Expression rekombinanter Proteine zu einer schnellen Limitation einzelner tRNA-Moleküle und einer damit verbundenen Bildung von unlöslichen *Inclusion Bodies* sowie zu einer genetischen Instabilität des Expressionssystems.<sup>[89]</sup> Daher kann es vorteilhaft sein Vektoren mit anderen Promotersystemen zu wählen, die ein geringeres Expressionslevel erlauben. Darüber hinaus kann auch die Kopienzahl des Vektors einen erheblichen Einfluss auf die Expression von rekombinanten Proteinen haben. Während in manchen Fällen die Ausbeute löslich exprimierter Proteine durch eine erhöhte Kopienzahl des Plasmids gesteigert werden kann, wirkt sich in anderen Fällen eine sehr hohe Kopienzahl negativ auf die Zellviabilität und die Expression aus.<sup>[88a]</sup>

Um zu überprüfen, ob eine gesteigerte lösliche Expression der AbFS in *E. coli* durch die Wahl eines anderen Vektorsystems möglich war, wurden die Vektoren pETM11-*abfs*, pET27mod-*abfs*, pUC19I-*abfs* und pBADM30-*abfs* (Tabelle 3) kloniert (Kapitel V5.7.1).

**Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Vektorsysteme zur Expression der AbFS in *E. coli*.**

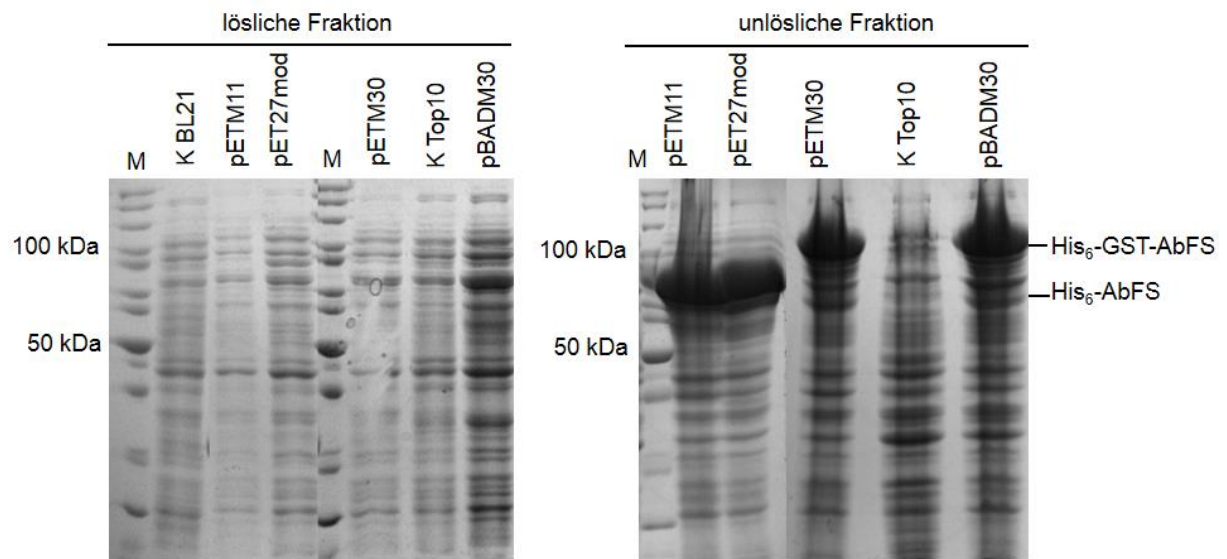
Vektor	Fusionstag	Promoter	Kopienzahl/Zelle
pETM30- <i>abfs</i>	N-term. His <sub>6</sub> -GST	T7/ <i>lac</i> , sehr stark	10 – 20
pETM11- <i>abfs</i>	N-term. His <sub>6</sub>	T7/ <i>lac</i> , sehr stark	10 – 20
pET27mod- <i>abfs</i>	C-term. His <sub>6</sub>	T7/ <i>lac</i> , sehr stark	10 – 20
pUC19I- <i>abfs</i>	ohne	<i>lac</i> , gering bis mittel	100 – 200
pBADM30- <i>abfs</i>	N-term. His <sub>6</sub> -GST	<i>araBAD</i> , regulierbar	10 – 20

Wohingegen die Vektoren pETM11-*abfs* und pET27mod-*abfs* die Expression der AbFS in N- oder C-terminaler Fusion mit dem wesentlich kleineren His<sub>6</sub>-Tag unter der Kontrolle des starken T7/*lac*-Promotersystems ermöglichen, erlauben pUC19I-*abfs* und pBADM30-*abfs* geringere Expressionslevel. Im Falle des pUC19I-Vektors werden rekombinante Proteine unter der Kontrolle des schwachen bis mittelstarken *lac*-Promoters ohne Fusionstag exprimiert.<sup>[161]</sup> Der *araBAD*-Promoter aus pBADM30-*abfs* ermöglicht eine stufenlose Regulation von sehr niedrigen bis hin zu sehr hohen Expressionsleveln des His<sub>6</sub>-GST-AbFS-Fusionsproteins in Abhängigkeit der Konzentration des Induktionsmittels L-(+)-Arabinose.<sup>[162]</sup> Außerdem erlaubt der Replikationsursprung des pUC19I-Vektors im Gegensatz zu den pET- und pBAD-Vektoren eine sehr hohe Kopienzahl des Expressionsplasmids.<sup>[163]</sup> Daher sollte die Auswahl des pUC-Vektors auch einen Vergleich der Plasmidkopienzahl im Hinblick auf die Expression der AbFS in *E. coli* erlauben.

Da bei der Verwendung pET-basierter Vektoren die Anwesenheit einer chromosomalen Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens notwendig ist, welches in der Regel unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promoters steht, wurde für die Expression der AbFS aus pETM30-*abfs*, pETM11-*abfs* und pET27mod-*abfs* der Expressionsstamm BL21-Gold(DE3) verwendet.<sup>[160]</sup> Auch pUC19I-*abfs* wurde zunächst über Hitze-Schock-Transformation (Kapitel V6.1.1) in BL21-Gold(DE3) eingebracht. Lediglich pBADM30-*abfs* wurde für die Transformation des *araBAD*C<sup>-</sup> *E. coli*-Stamms Top10 (Tabelle 17) verwendet, der, im Gegensatz zu BL21-Gold(DE3), die zur Induktion der Proteinexpression verwendete L-(+)-Arabinose nicht verstoffwechseln kann und damit konstante Expressionslevel bei der Verwendung dieses Vektorsystems sicherstellt.<sup>[164]</sup> Die Expression der AbFS wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 für etwa 16 – 18 h in TB-Medium plus 1 mM MgCl<sub>2</sub> je nach Vektor mit 1 mM IPTG oder 0,2% L-(+)-Arabinose induziert (Kapitel V6.2.2). In allen Fällen wurde eine feste Expressionstemperatur von 19°C verwendet, da im Allgemeinen die Bildungen von *Inclusion Bodies* durch geringe Expressionstemperaturen herabgesetzt werden können (siehe Kapitel IV1.1.3). Nach der chemischen Lyse der Zellen (Kapitel V7.2.1) wurden die löslichen und unlöslichen Fraktionen getrennt per SDS-PAGE (Kapitel V7.1) analysiert.

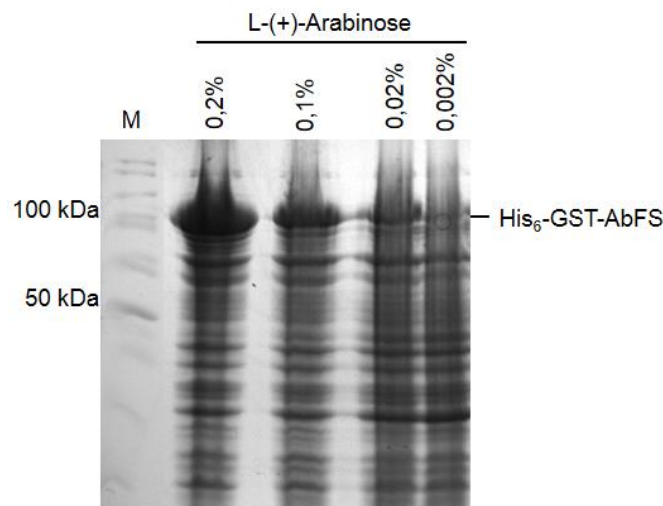


Bei der Expression aus pUC19I-*abfs* konnte in *E. coli* BL21-Gold(DE3) keine Expression der AbFS festgestellt werden. Auch durch die Testung unterschiedlicher Expressionsstämme (Top10, JM101, DH5 $\alpha$ , Origami(DE3) und Rosetta-gami<sup>TM</sup> 2(DE3), Tabelle 17) oder bei dem Wechsel des Expressionsmediums (Autoinduktionsmedium, Tabelle 33) konnte keine Expression für pUC19I-*abfs* erzielt werden (nicht gezeigt). Bei dem Vergleich der unterschiedlichen pET-Vektoren und des pBADM30-Rückgrats hingegen unterschied sich die Expression der AbFS in Hinblick auf Effektivität und Löslichkeit nicht (Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Ausschnitte aus 10%-igen SDS-Gelen zum Vergleich der löslichen und unlöslichen Fraktion nach Expression der AbFS aus den Vektoren pETM11-*abfs*, pET27mod-*abfs*, pETM30-*abfs* und pBADM30-*abfs* in *E. coli* BL21-Gold(DE3) bzw. Top10. M: PageRuler<sup>TM</sup> Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific), K BL21 und K Top10: Negativkontrollen für die beiden *E. coli*-Stämme, bei denen die Expression der AbFS nicht induziert und eine potentielle Basalexpression durch die Zugabe von 0,5% Glucose unterdrückt wurde.

Auch die Verringerung der L-(+)-Arabinosekonzentration auf 0,1%, 0,02% und 0,002% (w/v) bei der Expression aus pBADM30-*abfs* führte zwar erwartungsgemäß zu einer arabinosekonzentrationsabhängigen Abnahme (Abbildung 47) der AbFS-Expression, aber ebenfalls zu keiner erhöhten löslichen Expression (lösliche Fraktion nicht gezeigt). Da auch bei geringen Induktionsmittelkonzentrationen von 0,02% L-(+)-Arabinose ein klarer Nachweis der AbFS-Expression möglich war, legt dieses Experiment nahe, dass im Falle von pUC19I-*abfs* eher die hohe Kopienzahl des Vektors einen negativen Einfluss auf die AbFS-Expression hatte, als die vergleichsweise geringere Promoterstärke.



**Abbildung 47: 10%-iges SDS-Gel zum Vergleich verschiedener L-(+)-Arabinosekonzentrationen bei der Expression von AbFS aus pBADM30-*abfs* in *E. coli* Top10.** Gezeigt ist lediglich die unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss, M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Insgesamt konnte im Rahmen der durchgeführten Experimente keine gesteigerte lösliche Expression der AbFS durch einen Wechsel des Vektorsystems in *E. coli* erzielt werden. Neben den diskutierten Faktoren, wie die Wahl und Position des Fusionstags, die Stärke des Promoters und die Anzahl der Kopien des Expressionsvektors in *E. coli*, spielen für die lösliche Expression eines Proteins auch häufig der Codongebrauch, die Anwesenheit von Disulfidbrücken und das Vorhandensein von Chaperonen eine Rolle.<sup>[88]</sup> Am einfachsten können Limitationen dieser Art durch einen Wechsel oder die Modifikation eines *E. coli*-Expressionsstamms adressiert werden. Daher wurde im Weiteren der Einfluss des *E. coli*-Expressionsstamms auf die AbFS-Expression getestet.

### 2.1.2 Variation des Expressionsstamms und Koexpression von Chaperonen

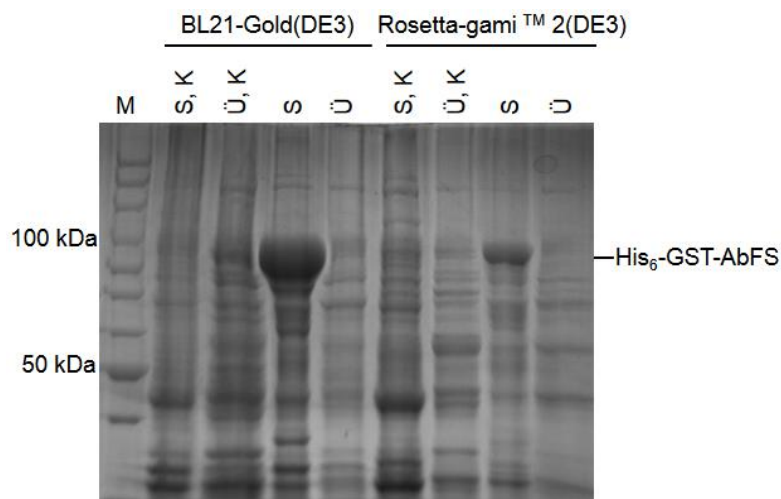
Oftmals ist ein Misserfolg bei der Isolation rekombinanter Proteine durch einen Unterschied in dem Codongebrauch des verwendeten Expressionsstamms und der Häufigkeit bestimmter Codons in dem zu exprimierenden Fremdgen zu begründen.<sup>[88]</sup> Die Limitation individueller tRNAs innerhalb der Zelle kann dazu führen, dass einzelne Proteine gar nicht, unvollständig oder fehlgefaltet exprimiert werden (siehe Kapitel IV1.3.2).<sup>[121]</sup> In anderen Fällen kann die Stabilisierung einzelner Proteinstrukturen von kovalenten Disulfidbrücken abhängig sein, deren Ausbildungen unter den reduzierenden Bedingungen im Cytoplasma erschwert werden.<sup>[88]</sup>

Daher wurde für die Expression der AbFS in *E. coli* eine Reihe unterschiedlicher Expressionsstämme verwendet, die im Einzelnen oder in Kombination eine Kompensation individueller tRNA-Limitationen und die Bildung von Disulfidbrücken ermöglichten (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Übersicht über die getesteten Expressionsstämme zur verbesserten löslichen Expression der AbFS in *E. coli*.** Einige Stämme adressieren mögliche tRNA-Limitationen und andere ermöglichen die Ausbildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma von *E. coli*. Tet: Tetracyclin, Str: Streptomycin, Cam: Chloramphenicol, Kan: Kanamycin.

Stamm	Besondere Eigenschaft	Resistenz
BL21-Gold(DE3)	BL21-Derivat, Proteasedefizient, hohe genetische Stabilität von Plasmid-DNA und erhöhte Transformationseffizienz	Tet
Top10	K-12-Derivat, keine Metabolisierung von Arabinose, erhöhte genetische Stabilität von Plasmid-DNA	Str
Rosetta(DE3)	BL21-Derivat, Proteasedefizient, trägt pRARE2-Plasmid für die Codierung von tRNAs für sechs seltene Codons AGA, AGG, AUA, CUA, CCC und GGA (Arg, Ile, Leu, Pro, Gly)	Cam
Origami(DE3)	K-12-Derivat, <i>trxB/gor</i> -Mutant für die Ausbildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma	Kan, Tet, Str
Rosetta-gami™ 2(DE3)	K-12-Derivat, <i>trxB/gor</i> -Mutant (siehe Origami(DE3)), trägt pRARE2-Plasmid (siehe Rosetta(DE3))	Tet, Str, Cam

Da bei einem Wechsel des Vektorsystems (siehe Kapitel IV2.1.1), keine Unterschiede in der löslichen Expression der AbFS detektiert werden konnten, wurden die verschiedenen Expressionsstämme, je nach Kompatibilität, lediglich in Kombination mit pETM30-*abfs* und pBADM30-*abfs* unter den gleichen Expressionsbedingungen wie zuvor getestet (Kapitel IV2.1.1). Jedoch zeigte sich auch durch die Variation des Expressionsstamms nur in wenigen Fällen ein verändertes Expressionsniveau, aber in keinem Fall eine verbesserte lösliche Expression der AbFS. Zum Beispiel war für die Expression aus pETM30-*abfs* in Rosetta-gami™ 2(DE3) eine Anpassung der Expressionsbedingungen notwendig. Eine Überexpression der AbFS wurde nur durch eine vergleichsweise späte Induktion der Proteinexpression bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 1,2 (OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 bei allen anderen getesteten Expressionssystemen) detektiert und die dabei erzielten Expressionslevel waren wesentlich geringer (Abbildung 48). Da auch durch Rosetta-gami™ 2(DE3) keine lösliche Expression der AbFS erreicht wurde, sind sowohl tRNA-Limitationen als auch die Ausbildung essentieller Disulfidbrücken möglicherweise nicht limitierend für die Faltung der AbFS. Eine weitere Methode zur Steigerung der löslichen Expression rekombinanter Proteine, stellt die Koexpression von Chaperonen dar.<sup>[88]</sup> Chaperone können nicht-gefaltete Polypeptidketten binden, dadurch die Aggregation der Proteine verhindern und unter Energieaufwand dessen native Faltung unterstützen.<sup>[165]</sup>



**Abbildung 48: 10%-iges SDS-Gel zum Vergleich der Expressionslevel der AbFS aus pETM30-*abfs* in BL21-Gold(DE3) und Rosetta-gami™ 2(DE3) bei 19°C in TB-Medium.** M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific), K: Negativkontrolle, bei der die Expression der AbFS nicht induziert und eine potentielle Basalexpression durch die Zugabe von 0,5% Glucose unterdrückt wurde, S/Ü: Sediment bzw. Überstand nach der Zellyse.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Chaperone GroES, GroEL1 und GroEL2 aus *Streptomyces coelicolor* für die Expression der AbFS getestet (Kapitel V6.2.2). Die codierenden Sequenzen dieses Chaperonsatzes wurden in der Arbeitsgruppe Leadlay in das pETcoco2-Expressionsrückgrat von Novagen (Tabelle 18) eingefügt und als pL1SL2-Plasmid (Tabelle 19) kloniert.<sup>[166]</sup> Der verwendete Expressionsvektor besitzt einen dualen Replikationsursprung, so dass das Expressionslevel der Chaperone durch die Kopienzahl des Plasmids reguliert werden kann. Bei Zugabe von L-(+)-Arabinose wird die Replikation des Vektors in mittlerer Kopienzahl aktiviert, wohingegen die Zugabe von D-(+)-Glucose eine geringere Kopienzahl des Vektors ermöglicht.<sup>[166b]</sup> In der Regel werden für die Steigerung der löslichen Expression rekombinanter Proteine Chaperone aus den nativen Produktionsorganismen der Zielproteine koexprimiert. Da das pL1SL2-Plasmid bereits in unserer Arbeitsgruppe vorhanden war und die Koexpression der hier beschriebenen Chaperone aus *S. coelicolor* bereits zur löslichen Expression eines archaealen Terpenbiosyntheseproteins in *E. coli* geführt hatte (siehe Kapitel IV4.2), wurde die Aktivität dieser Chaperone auch hinsichtlich der Terpensynthese AbFS in unterschiedlichen *E. coli*-Expressionsstämmen getestet (Tabelle 5). Jedoch konnte bei der Chaperonkoexpression weder der Wechsel des Expressionsmediums von TB- zu Autoinduktionsmedium noch die Wahl der Kopienzahl des pL1SL2-Plasmids (Kapitel V6.2.2) die lösliche Expression der AbFS in den getesteten Expressionsstämmen steigern.

**Tabelle 5: Übersicht über die getesteten Expressionsstämme zur Koexpression der AbFS aus pETM30-abfs und der durch pL1SL2 codierten Chaperone GroES, GroEL1 und GroEL2 aus *S. coelicolor*.** Tet: Tetracyclin, Amp: Ampicillin, Cam: Chloramphenicol, Str: Streptomycin.

Stamm	Besondere Eigenschaft	Resistenz
BL21-Gold(DE3) [pL1SL2]	BL21-Gold(DE3)-Derivat (siehe Tabelle 4) für die Chaperonkoexpression GroES/GroEL aus <i>S. coelicolor</i>	Tet, Amp
BL21-CodonPlus(DE3)- RIL [pL1SL2]	BL21-Derivat für die Chaperonkoexpression GroES/GroEL aus <i>S. coelicolor</i> , codiert für tRNAs mit den seltenen Codons AGA, AGG, AUA, CUA (Arg, Ile, Leu)	Cam, Amp
BL21-CodonPlus(DE3)- RP [pL1SL2]	BL21-Derivat für die Chaperonkoexpression GroES/GroEL aus <i>S. coelicolor</i> , codiert für tRNAs mit den seltenen Codons AGA, AGG, CCC (Arg, Pro)	Cam, Amp
Rosetta-gami™ 2(DE3) [pL1SL2]	Rosetta-gami™ 2(DE3)-Derivat (siehe Tabelle 4) für die Chaperonkoexpression GroES/GroEL aus <i>S. coelicolor</i>	Tet, Str, Cam, Amp

Da die getesteten konventionellen Methoden zur Steigerung der löslichen Expression der AbFS in *E. coli* nicht zum Erfolg führten, sollten im nächsten Schritt stattdessen nicht rational vorhersagbare Limitationen durch die gerichtete Proteinevolution des Enzyms adressiert werden.

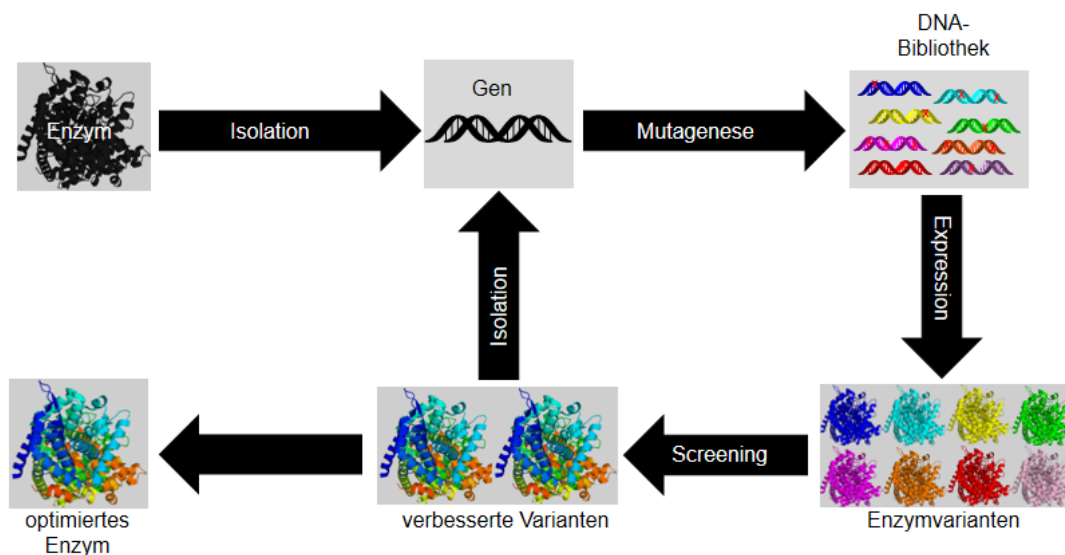
## 2.2 Gerichtete Proteinevolution der AbFS

Im Gegensatz zu konventionellen Methoden, bei denen die Expressionsbedingungen im Hinblick auf die Löslichkeit von Proteinen in einem spezifischen Wirtsorganismus variiert werden (siehe Kapitel IV2.1), können Mutageneseexperimente die intrinsische Faltungstabilität einzelner Enzyme steigern. Durch eine erhöhte Faltungstabilität kann häufig auch die lösliche Expression eines Proteins gesteigert werden. Daher könnte die Steigerung der intrinsischen Stabilität der AbFS die Isolation der aktiv gefalteten Terpensynthase für die Strukturaufklärung vereinfachen. Darüber hinaus könnte die Expression einer stabileren AbFS-Variante in *S. cerevisiae*, durch die Erhöhung der Population aktiver Terpensynthasen, auch zu einer gesteigerten heterologen Fermentation des FCdiens genutzt werden (siehe Kapitel IV1.4).

Existiert ein Kristallstruktur- oder Homologiemodell für ein Enzym, kann die Stabilität in vielen Fällen gezielt durch die ortsgerichtete Mutagenese erhöht werden.<sup>[167]</sup> Im Falle der Terpensynthasen sind jedoch nur wenige Kristallstrukturen bekannt (siehe Kapitel II1.1.1). Obwohl die  $\alpha$ -Bündelstruktur innerhalb der Klasse I-Terpensynthasen und die  $\alpha/\alpha_6$ -Fasstruktur innerhalb der Klasse II-Terpensynthasen konserviert zu sein scheint, besteht nur

eine geringe Sequenzidentität zwischen den Enzymen einer Terpensynthaseklasse.<sup>[22d]</sup> Dies erschwert die Erstellung von Homologiemodellen zusätzlich. Für die AbFS und nah verwandte Enzyme wurden bislang keine Kristallstrukturen veröffentlicht. Bei dem Versuch, ein Homologiemodell für die AbFS mit Hilfe des Onlineservices I-Tasser zu erstellen, konnte keine glaubwürdige dreidimensionale Struktur für dieses Enzym berechnet werden.<sup>[168]</sup> Zwar faltete sich die Prenyltransferasedomäne des Enzyms laut Homologiemodell erwartungsgemäß zu der konservierten  $\alpha$ -Bündelstruktur, im Bereich der Terpenicyclasedomäne jedoch ergab sich jeweils eine beliebige Knäuelstruktur (siehe Anhang, Abbildung A5).

Daher wurde zur Erhöhung der intrinsischen Faltungstabilität der AbFS die gerichtete Proteinevolution (Abbildung 49) angestrebt, bei der keinerlei Kenntnis über die Struktur des Zielenzyms vorliegen muss.



**Abbildung 49: Schematische Darstellung der gerichteten Proteinevolution.**

Bei der gerichteten Proteinevolution werden zunächst große Genbibliotheken durch zufällige Mutagenese erzeugt und nach der Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus Enzymvarianten mit verbesserten Eigenschaften über ein Selektions- oder Screeningverfahren im Hochdurchsatz identifiziert.<sup>[169]</sup> Die für die verbesserten Varianten codierenden Gene können als Template für weitere Cyclen der Proteinevolution dienen, bei denen harschere Selektions- oder Screeningbedingungen eingesetzt werden.<sup>[170]</sup>

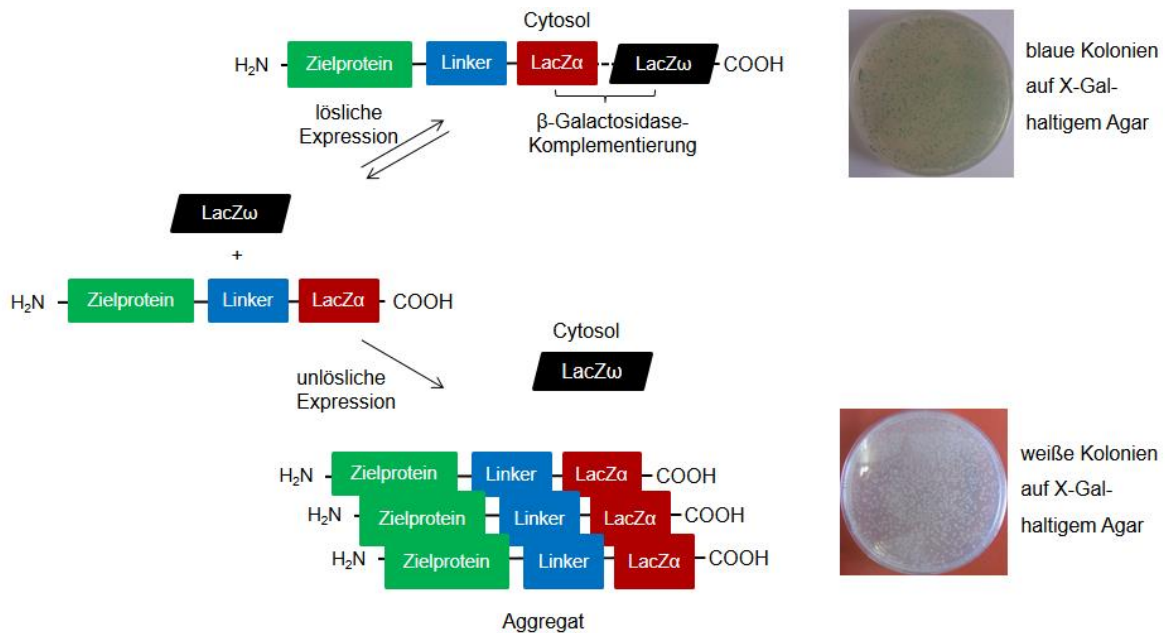
Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Wirtsorganismus *E. coli* aufgrund seiner hohen Transformationseffizienz und schnellen Kultivierbarkeit zur Erzeugung großer Enzymbibliotheken bei der gerichteten Proteinevolution der AbFS ausgewählt.

### 2.2.1 Wahl und Etablierung des Auswahlverfahrens zur Identifikation von AbFS-Varianten mit verbesserter Löslichkeit

Ein kritischer Faktor bei der gerichteten Proteinevolution ist die Wahl eines geeigneten Selektions- oder Screeningverfahrens zur Identifikation von Varianten mit verbesserten Eigenschaften aus großen Enzymbibliotheken.

Die zur Verfügung stehenden Verfahren zur Identifikation löslicherer Varianten eines Proteins können allgemein in zwei große Kategorien eingeteilt werden.<sup>[171]</sup> Während bei den direkten Methoden die Eigenschaften der untersuchten Proteine selber, wie z.B. die physikalische Separierbarkeit löslicher und unlöslicher Varianten, genutzt werden, basieren die indirekten Methoden auf der Untersuchung der Eigenschaften eines Reporterproteins.<sup>[172]</sup> Bei den indirekten Verfahren wird in Stressreporter- und Fusionsreportermethoden unterschieden. Stressreportermethoden beruhen auf der nativen Stressantwort des Wirtsorganismus auf die Bildung ungefalteter Proteine innerhalb der Zelle und eine daran gekoppelte Expression eines Reporterproteins.<sup>[173]</sup> Die Fusionsreportermethoden werden am häufigsten verwendet und sind mit dem wenigsten Aufwand verbunden. Dabei werden die Zielproteine direkt in Fusion mit den Reporterproteinen exprimiert und über die Aktivität der Reporterproteine Rückschlüsse auf die lösliche Expression des untersuchten Proteins gezogen.<sup>[174]</sup>

Auch das im Rahmen dieser Arbeit verwendete visuelle, agarplattenbasierte Screeningsystem zur Identifizierung von löslicheren AbFS-Varianten, beruht auf der Fusion eines Reporters an das Zielprotein und stellt eine Adaption des bei der Klonierung von Genfragmenten häufig genutzten Blau-Weiß-Screenings dar.<sup>[174c,175]</sup> Das etwa 80 Aminosäuren lange lacZ $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase wird C-terminal an das Zielprotein fusioniert. Erfolgt eine lösliche Expression des fusionierten Zielproteins in einem Wirt, der lediglich für das größere LacZ $\omega$ -Fragment des Reporterproteins codiert (lacZ $\Delta$ M15-Genotyp), kann durch die Interaktion der beiden Fragmente im Cytoplasma die  $\beta$ -Galactosidase komplementiert und die Aktivität dieses Enzyms wieder hergestellt werden. Befindet sich in dem Kultivierungsmedium das Galactosederivat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-Galactosidasepyranosid), äußert sich eine aktive Expression der  $\beta$ -Galactosidase in einer Blaufärbung der Kolonien, wohingegen bei einer unlöslichen Expression des Zielproteins keine Komplementierung der  $\beta$ -Galactosidase stattfindet und in einer weißen Färbung der Kolonien resultiert (Abbildung 50).



**Abbildung 50: Schematische Darstellung des  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassays.** Bei einer löslichen Expression des Zielproteins kann die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase im Wirtsorganismus wieder hergestellt werden und es werden blaue Kolonien auf X-Gal-haltigen Agarplatten gebildet.

Bei vielen Fusionsreportermethoden werden ganze Proteine, wie beispielsweise GFP (grünfluoreszierendes Protein) oder CAT (Chloramphenicolacetyltransferase), kovalent an das Zielprotein gebunden. Im Gegensatz dazu werden bei *split*-Protein-Komplementierungen, wie bei dem hier genutzten  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassay, relativ kleine Peptide fusioniert, wodurch die Faltung und Löslichkeit des Zielproteins durch den Fusionstag weniger stark beeinflusst wird.<sup>[174c,176]</sup> Wichtig für die Etablierung eines Fusionsreporterassays ist die Position des Fusionstags. Da der N-Terminus eines frisch synthetisierten Proteins das Ribosom immer zuerst verlässt, kann eine N-terminale Fusion einen starken Einfluss auf die Faltung des Zielproteins haben.<sup>[121c]</sup> Wenn die Aktivität des Zielproteins es zulässt, ist es also vorteilhaft den Reportertag an den C-Terminus des Zielproteins zu fusionieren.

Im Falle des  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassays ist eine C-terminale Fusion des lacZα-Fragments an das Zielprotein essentiell, da ansonsten keine Komplementierung zu einer aktiven  $\beta$ -Galactosidase möglich ist.

#### a) Nachweis funktioneller Aktivität einer C-terminal fusionierten AbFS

Um zu überprüfen, ob die AbFS einen C-terminalen Fusionstag tolerierte, wurde der zuvor klonierte Vektor pET27mod-*abfs*, der eine Expression der AbFS mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Fusionstag ermöglichte (siehe Kapitel IV2.1.1), für die Fermentation des FCdiens in *E. coli* BL21-Gold(DE3) eingesetzt (Kapitel V6.2.4). Die Analyse des Kulturextrakts per GC-MS ermöglichte, analog zu der Expression des His<sub>6</sub>-GST-AbFS-Fusionsproteins aus pETM30-*abfs* (siehe Kapitel IV1.1.3), die Detektion des charakteristischen FCdien-Massenspektrums (nicht

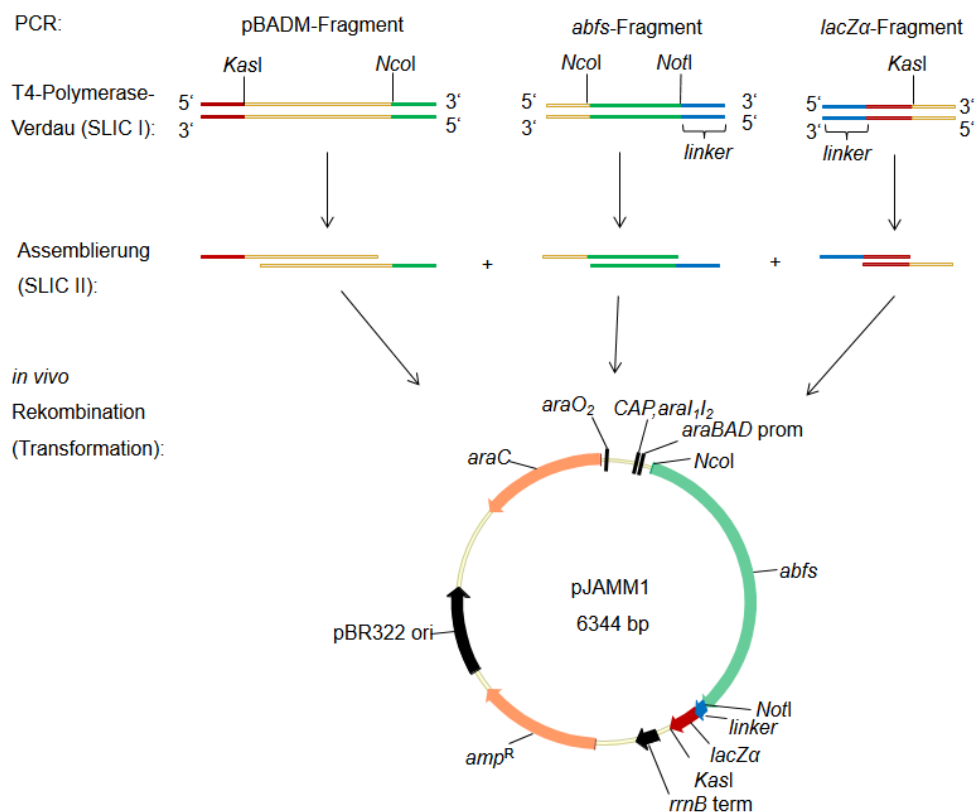


gezeigt). Dies zeigte, dass die funktionelle Aktivität der AbFS durch eine C-terminalen Fusion nicht gestört wird.

Daher wurde im Anschluss, im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Mirja Mewes, das Reporterplasmid pJAMM1 kloniert und der  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassay für die Herstellung löslicher AbFS-Varianten etabliert.<sup>[177]</sup>

### b) Konstruktion eines $\beta$ -Galactosidase-Reporterplasmids

Um eine präzise Regulation über die Expressionsrate des AbFS-lacZ $\alpha$ -Fusionsproteins in den gerichteten Proteinevolutionsexperimenten ermöglichen zu können, wurde für die Konstruktion des Reporterplasmids pJAMM1 (Abbildung 51) das Rückgrat aus den pBADM-Vektoren ausgewählt (siehe Kapitel IV2.1.1).



**Abbildung 51: Schematische Darstellung der Klonierung und Vektorkarte des Reporterkonstrukts pJAMM1.** *araC*: Gen für das Transkriptionsregulatorprotein AraC, *araO<sub>2</sub>/CAP,araI,araBAD prom*: Regulatorische Transkriptionseinheiten, *araBAD prom*: Promoterregion, *abfs*: Gen für AbFS, *linker*: Codierender Abschnitt für „GSAGSAAGSGAS“, *lacZ $\alpha$* : Gen für das LacZ $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase aus pUC18, *rrnB term*: Terminatorregion, *amp<sup>R</sup>*: Ampicillinresistenzgen pBR332 ori: Replikationsursprung. Das Plasmid wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Mirja Mewes kloniert.<sup>[177]</sup>

Neben der Amplifikation des Plasmidrückgrats pBADM, des Zielgens *abfs* und des codierenden Abschnitts für den Reportertag *lacZ $\alpha$*  aus pUC18, wurden über die

Oligonukleotide bei der PCR codierende Abschnitte für einen Linker und für verschiedene Restriktionsschnittstellen an die Enden der Amplifikate eingefügt (siehe Abbildung 51). Die Sequenz für den Linker „GSAGSAAGSGAS“ stammte aus einer Publikation des Arbeitskreises Reetz und sollte zur Sicherstellung eines genügenden Abstands und einer ausreichenden Flexibilität zwischen dem Zielprotein und dem Reportertag dienen.<sup>[175]</sup> Die neu eingeführten Restriktionsschnittstellen *NcoI*, *NotI* und *KasI* sollten einen schnellen Austausch einzelner Elemente des Reporterkonstrukts erlauben. Insbesondere waren die *abfs*-flankierenden Schnittstellen *NcoI* und *NotI* wichtig, da diese bei der gerichteten Proteinevolution die Klonierung großer DNA-Bibliotheken durch die Restriktions-Ligations-Methode ermöglichen sollten. Die einzelnen PCR-Fragmente wurden über SLIC-MIX miteinander assembliert (Kapitel V5.7.4).

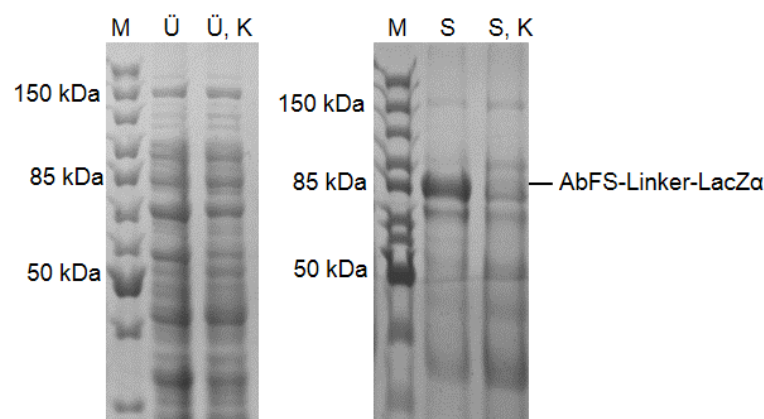
### c) Etablierung des $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassays

Das pJAMM1-Plasmid sollte bei der Etablierung des  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassays und bei den späteren Experimenten als Negativkontrolle dienen, da die Expression des unmutierten und unlöslichen AbFS-Linker-LacZ $\alpha$ -Fusionsproteins auch bei Anwesenheit von X-Gal in der Bildung von weißen Kolonien resultieren sollte. Als Positivkontrolle für die Bildung blauer Kolonien wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Mirja Mewes der Vektor pBADM11-*lacZ $\alpha$*  kloniert (Kapitel V5.7.4), welcher die Expression des löslichen His<sub>6</sub>-LacZ $\alpha$ -Fragments in *E. coli* ermöglichte.

Nach der Transformation von *E. coli* Top10 mit diesen beiden Kontrollplasmiden auf L-(+)-Arabinose- (0,2%), X-Gal- (40  $\mu$ g/ $\mu$ L) und antibiotikahaltigen LB-Agarplatten (Kapitel V6.2.3), wurden jedoch entgegen der Erwartungen in beiden Fällen blaue Kolonien erhalten. Auch bei der Variation der Arabinosekonzentration (0,02 – 0,4%), durch den Wechsel des Komplexmediums LB zum Minimalmedium M9 (Tabelle 33) oder durch die Verwendung eines Proteaseinhibitorcocktails, der einen möglichen unspezifischen proteasomalen Abbau des AbFS-Linker-LacZ $\alpha$ -Fusionsproteins verhindern sollte, konnte eine Blaufärbung der Kolonien nicht verhindert werden. Erst durch einen Wechsel des *E. coli*-Stammes konnten Bedingungen identifiziert werden, die ein zuverlässiges Screening von AbFS-Varianten mit einer erhöhten löslichen Expression zulassen sollten. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Mirja Mewes wurden die *E. coli*-Stämme Top10, DH5 $\alpha$ , JM109 und OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> (Tabelle 17) verglichen, die sich alle aufgrund ihres *lacZ $\Delta$ M15*-Genotyps für das Blau-Weiß-Screening eignen sollten.<sup>[177]</sup> Da die Expression des *lacZ $\omega$* -Fragments in allen getesteten Stämmen, mit Ausnahme von Top10, unter der Kontrolle des *lac*-Operons steht, enthielten die verwendeten Agarplatten zusätzlich 0,1 mM IPTG. Obwohl in den beiden bislang veröffentlichten Studien zum  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassay der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  für das Screening

verwendet wurde, konnte im Rahmen der hier beschriebenen Experimente lediglich bei der Verwendung von OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> reproduzierbar die erwartete Weißfärbung für die pJAMM1-Negativkontrolle und Blaufärbung für die pBADM11-*lacZ* $\alpha$ -Positivkontrolle detektiert werden.<sup>[174c,175]</sup> Alle anderen Stämme wiesen unabhängig von der Expression der Negativ- und Positivkontrolle unzuverlässig mal eine Weißfärbung, mal eine Blaufärbung der Kolonien auf. Vergleicht man die Genotypen aller getesteten *E. coli*-Stämme, fällt auf, dass einzig allein OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> zwei Kopien der *lacZ* $\Delta$ M15-Mutation codiert, wohingegen die anderen Stämme nur eine Kopie aufweisen (siehe Tabelle 17). Diese Tatsache ließe allerdings allenfalls eine Intensivitätssteigerung der Blaufärbung im Falle der Positivkontrolle beim Einsatz von OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> erklären, jedoch nicht das hier beobachtete zuverlässigere Screeningergebnis.

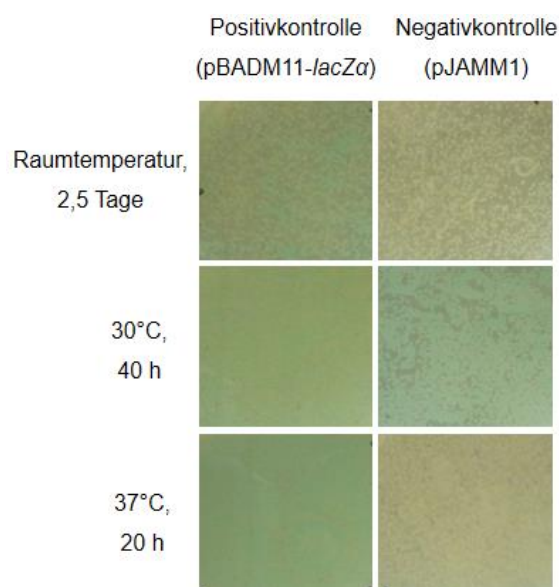
Da OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup>, im Gegensatz zu Top10, dazu in der Lage ist, die zur Induktion der Proteinexpression verwendete L-(+)-Arabinose zu verstoffwechseln, war es wichtig, die Expression des AbFS-Linker-LacZ $\alpha$ -Fusionsproteins in OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> nachzuweisen. Außerdem musste sichergestellt werden, dass die Fusion des Linker-LacZ $\alpha$ -Fragments keinen löslichkeitserhöhenden Einfluss auf die Expression der AbFS hatte. Daher wurde eine Testexpression in Flüssigkultur unter den etablierten Expressionsbedingungen (siehe Kapitel V6.2.2) durchgeführt.<sup>[177]</sup> Eine SDS-PAGE-Analyse wies zweifelsohne auf eine klare, unlösliche Überexpression des AbFS-Linker-LacZ $\alpha$ -Fusionsproteins hin (Abbildung 52).



**Abbildung 52: 10%-iges SDS-Gel zum Nachweis des AbFS-Linker-LacZ $\alpha$ -Fusionsproteins aus pJAMM1 in *E. coli* OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> bei 19°C in TB-Medium.** M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific), Ü/S: Überstand bzw. Sediment nach der Zellyse, K: Negativkontrolle, bei der die Expression der AbFS nicht induziert und eine potentielle Basalexpression durch die Zugabe von 0,5% Glucose unterdrückt wurde. Diese Gele wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Mirja Mewes erstellt.<sup>[177]</sup>

In der löslichen Fraktion nach der Zellyse konnte im Vergleich zu vorherigen Expressionen (siehe Kapitel IV2.1) keine stärkere Expressionsbande für das Zielprotein mit einem berechneten Molekulargewicht von etwa 80 kDa detektiert werden.<sup>[90]</sup>

Nachdem ein geeigneter Wirtsstamm für den  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassay ermittelt werden konnte, wurde die Zuverlässigkeit des Screeningverfahrens bei unterschiedlichen Temperaturen getestet. Bei der gerichteten Proteinevolution ist es essentiell, dass von Generation zu Generation immer harschere Screeningbedingungen verwendet werden, um die Identifikation von Enzymvarianten mit immer besseren Eigenschaften zu ermöglichen.<sup>[170]</sup> Um eine erhöhte Faltungsstabilität und verbesserte lösliche Expression des Zielproteins zu erhalten, bietet sich eine Variation der Inkubationstemperatur an. Die mit den beiden Kontrollplasmiden transformierten *E. coli* OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> wurden bei unterschiedlichen Temperaturen auf induktionsmittel-, X-Gal- und antibiotikahaltigen LB-Agarplatten inkubiert (Abbildung 53).



**Abbildung 53: Vergleich verschiedener Inkubationstemperaturen für den  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassay.** Eine Inkubationstemperatur von 30°C eignet sich nicht, da auf beiden Kontrollplatten blaue Kolonien erhalten wurden. Das hier dargestellte Experiment wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Mirja Mewes durchgeführt.<sup>[177]</sup>

Da die Wachstumsgeschwindigkeit der *E. coli*-Zellen von der Temperatur abhängt, waren bei den getesteten Inkubationstemperaturen auch verschiedene Inkubationszeiten notwendig. Bei der Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur wurde nach etwa 2,5 Tagen eine gleichmäßige Verteilung blauer Kolonien auf den Positivkontrollplatten und weißer Kolonien auf den Negativkontrollplatten beobachtet. Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C hingegen wurden die gleichen Ergebnisse schon nach etwa 20 h erhalten. Die Inkubationstemperatur von 30°C stellte sich als nicht geeignet heraus. Hierbei setzte die Bildung der blauen Kolonien auf beiden Kontrollplatten etwa zur gleichen Zeit, nach etwa 40 h, ein. Dies kann vermutlich durch den beschleunigten Zerfall des X-Gals durch eine veränderte Reaktionskinetik bei 30°C im Vergleich zu dem Zerfall bei Raumtemperatur erklärt werden.

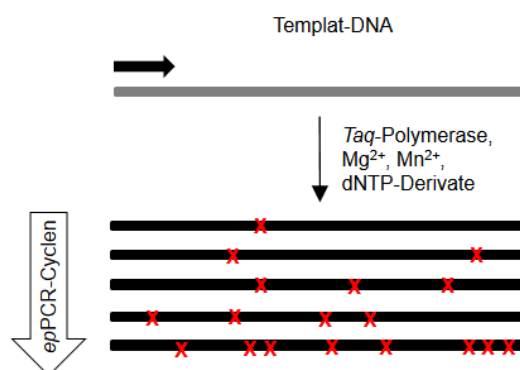
Mit einem etablierten Screeningverfahren in der Hand, konnte im Rahmen dieser Dissertation mit der gerichteten Proteinevolution der AbFS begonnen werden.

## 2.2.2 Erzeugung von AbFS-Varianten

Neben einem geeigneten Screeningverfahren, stellt auch die Mutagenesetechnik einen wichtigen Faktor für die gerichtete Proteinevolution dar.

### a) Wahl der Mutagenesetechnik

Für die randomisierte Mutagenese von Genen gibt es mittlerweile eine große Auswahl etablierter Methoden. Die wohl bekanntesten sind die *epPCR* (engl. *error prone PCR*), die Sättigungsmutagenese einzelner Genbereiche, sowie das *DNA-Shuffling* oder davon abgewandelte Methoden.<sup>[178]</sup> Während das *DNA-Shuffling* auf der homologen Rekombination von mindestens zwei Genen mit hoher Sequenzidentität beruht, werden bei der Sättigungsmutagenese nur einzelne Bereiche des Zielgens randomisiert mutiert.<sup>[179]</sup> Die *epPCR* (Abbildung 54) stellt im Gegensatz dazu eine Methode zur rekombinationsunabhängigen und gleichmäßigen, zufälligen Mutagenese von ganzen Genen dar.<sup>[180]</sup>



**Abbildung 54: Schematische Darstellung der *epPCR*.** Durch fehlerbehaftete PCR-Bedingungen können mit zunehmender *epPCR*-Cyclenanzahl eine gesteigerte Anzahl an Mutationen in eine Templat-DNA eingeführt werden.

Bei der *epPCR* sind, im Gegensatz zu Standard-PCR-Anwendungen, zufällige Basenfehlpaarungen erwünscht. Aufgrund ihrer fehlenden 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt die *Taq*-DNA-Polymerase eine hohe natürliche Fehlerrate und wird daher häufig in der *epPCR* verwendet.<sup>[181]</sup> Die Anzahl der Basenfehlpaarungen bei der *epPCR* kann außerdem durch eine erhöhte PCR-Cyclenanzahl und Magnesium(II)-Ionenkonzentration, eine erniedrigte DNA-Templatkonzentration, eine unausbalancierte dNTP-Konzentration sowie durch den Einsatz von Mangan(II)-Ionen oder dNTP-Analoga gesteigert werden.<sup>[180,182]</sup>

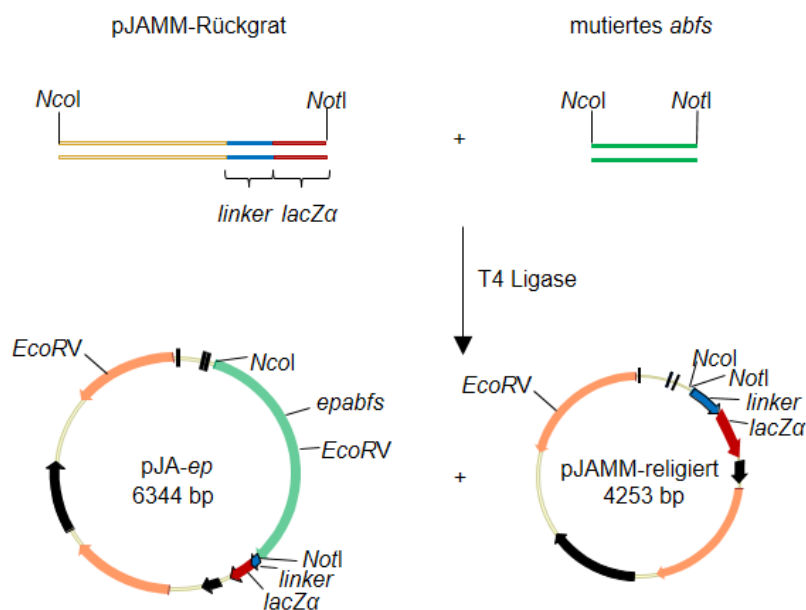
Obwohl eine Isoform der AbFS auch in dem filamentösen Pilz *P. amygdali* exprimiert wird, liegt die Sequenzidentität der beiden Proteine bei unter 50%.<sup>[53b]</sup> Bis auf die katalytisch

konservierten Bereiche der AbFS, sind bislang keine Sequenz-Wirkungsbeziehungen für die AbFS oder das homologe Enzym aus *P. amygdali* beschrieben. Daher wurde für die gerichtete Proteinevolution der AbFS die *ep*PCR als Mutagenesetechnik ausgewählt.

### b) *ep*PCR zur Erzeugung von *abfs*-Mutanten und Optimierung der Transformations- und Klonierungseffizienzen

Für die zufällige Mutagenese der AbFS wurde die Fehlerrate der *Taq*-Polymerase während der *ep*PCR durch eine erhöhte PCR-Cyclenzahl (35 Cyclen), eine höhere  $Mg^{2+}$ -Konzentration (7 mM), eine unausbalancierte dNTP-Konzentration (0,2 mM dATP/dGTP und 1 mM dCTP/dTTP) und durch die Anwesenheit von  $Mn^{2+}$ -Ionen (0,05 mM) gesteigert (Kapitel V5.3.4).<sup>[183]</sup>

Zur Klonierung der dabei erzeugten *ep*PCR-Produkte wurde das pJAMM1-Plasmidrückgrat (siehe Abbildung 51) über eine Standard-PCR amplifiziert (Kapitel V5.7.4). Nach dem simultanen Verdau der *ep*PCR-Produkte und des Plasmidrückgrats mit *Nco*I, *Not*I sowie *Dpn*I und Reinigung über Ethanolpräzipitation (Kapitel V5.5.2), wurden die mutierten *abfs*-Gene über die neu eingeführten Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Not*I des Reporterkonstrukts in das Plasmidrückgrat ligiert (Abbildung 55, Kapitel V5.7.1).

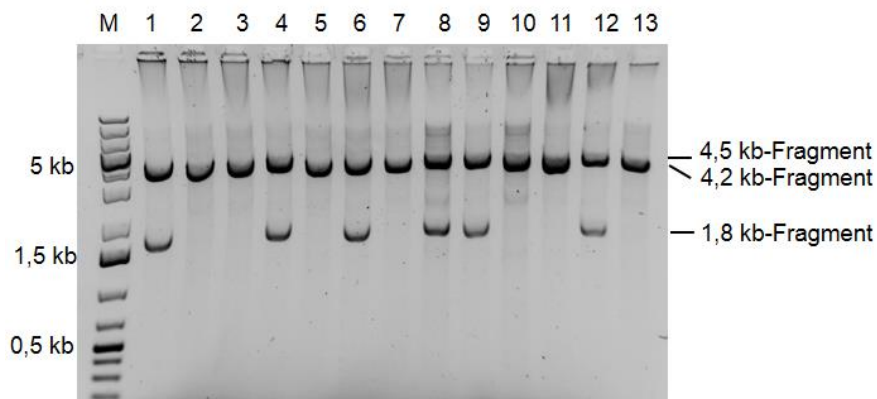


**Abbildung 55: Schematische Darstellung zur Ligation der mit *Nco*I und *Not*I verdauten PCR-Produkte des Reporterkonstruktrückgrats und der mutierten *abfs*-Gene, als Nebenprodukt entsteht das religierte pJAMM-Plasmid.**

Anschließend wurden die mit dem Ligationsansatz transformierten *E. coli* OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> für den  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassay auf Induktionsmittel, X-Gal- (40  $\mu$ g/mL) und antibiotikahaltigen LB-Agarplatten (siehe Kapitel IV2.2.1) ausgestrichen und zur Erzeugung einer ersten Variantengeneration für 2,5 Tage bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss

inkubiert (siehe Kapitel IV2.2.1 c). Mit pBADM11-*lacZ* $\alpha$  und pJAMM1 transformierte *E. coli* OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> dienten dabei als Positiv- und Negativkontrollen für die Blaufärbung der Kolonien.

Zunächst wurden nach der Klonierung jedoch lediglich 50 – 200 Kolonien pro Agarplatte erhalten. Um eine qualitativ hochwertige und statistisch relevante Enzybibliothek nach Löslichkeitserhöhenden Mutationen durchsuchen zu können, ist sowohl eine hohe Transformations- als auch Klonierungseffizienz der erstellten DNA-Bibliotheken notwendig. Zur Optimierung dieser beiden Parameter wurden unterschiedliche DNA-Reinigungstechniken sowie Ligations- und Klonierungsbedingungen getestet. Die Transformationseffizienz wurde durch das Auszählen aller erhaltenen Kolonien auf den Agarplatten bestimmt. Neben den Löslichkeitserhöhenden Mutationen in dem Zielprotein AbFS, kann eine bei dem Screening erhaltene Blaufärbung der Kolonien auch durch eine Religation des Reporterkonstruktückgrats erklärt werden (siehe Abbildung 55). Dies ermöglicht die von AbFS unabhängige Expression des LacZ $\alpha$ -Fragments, wodurch es ebenfalls, ähnlich wie bei der im Screening eingesetzten Positivkontrolle, zu einer Komplementierung der  $\beta$ -Galactosidase im Cytoplasma der *E. coli*-Zellen kommen kann. Eine weiße Färbung der Kolonien hingegen kann nur durch die Expression von AbFS-Varianten erklärt werden, die keine Löslichkeitserhöhenden Mutationen tragen. Zur Bestimmung der Klonierungseffizienz wurden daher lediglich die blauen Kolonien betrachtet. Da die üblicherweise eingesetzte Kolonie-PCR nicht funktionierte, wurde zur gleichzeitigen Analyse vieler Kolonien eine Isolation der Plasmide über alkalische Lyse im 96-Lochplattenformat etabliert (Kapitel V5.2.1 b). Ein zweifelsfreier Nachweis des erwünschten Reporterkonstrukts mit insertiertem Zielgen lieferte ein Kontrollverdau mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* (Kapitel V5.4.1). Die zwei Erkennungssequenzen dieses Enzyms befinden sich im Plasmidrückgrat und in dem insertierten Zielgen des pJAMM1-Plasmids (siehe Abbildung 55). Sofern die Erkennungssequenz durch eine zufällig eingeführte Mutation in dem Zielgen nicht zerstört wird, sollten sich für das erfolgreich klonierte Reporterkonstrukt zwei Fragmente in der Größe von etwa 1,8 und 4,5 kb ergeben, für das religierte Plasmidrückgrat hingegen nur ein Fragment in der Größe von ca. 4,2 kb (Abbildung 56).



**Abbildung 56: 0,8%-iges Agarosegel zur Identifikation von erfolgreich klonierten Reporterkonstrukten mit insertiertem *epabfs*-Gen.** Nach *EcoRV*-Verdau sind erfolgreich klonierte Plasmide als zwei 1,8 kb und 4,5 kb große Fragmente auf dem Agarosegel zu erkennen, religierte Plasmide bilden lediglich ein Fragment in der Größe von 4,2 kb. M: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), 1 – 13: Plasmide aus verschiedenen blauen Kolonien.

Zunächst wurde anhand eines festen molaren Verhältnisses von 1:3 zwischen Vektorrückgrat und *epPCR*-Produkten bei der Ligation nur die Transformationseffizienz betrachtet. Im Vergleich zur präparativen Gelelektrophorese, Ethanolpräzipitation und SureClean-Fällung (Kapitel V5.5), wurden für die Reinigung der verdauten DNA-Fragmente über P/C/I-Extraktion (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1, Kapitel V5.5.1) die meisten Kolonien pro Agarplatte erhalten. Als vorteilhaft für die Bildung vieler Kolonien stellte sich auch die Verwendung von wenig DNA-Material (20 ng vs. 50 ng Vektorrückgrat) und T4-Ligase (1 U vs. 5 U) als auch eine kurze Inkubationszeit (20 min vs. 2 h bei 22°C) bei der Ligation heraus. Zudem war das Volumen des zur Transformation genutzten Ligationsansatzes relevant für die Transformationseffizienz. Im Vergleich zu den anderen getesteten Volumina (1 µL und 3 – 5 µL), wurden bei der Verwendung von 2 µL des Ligationsansatzes für die Transformation die meisten Kolonien pro Platte erhalten.

Diese optimierten Bedingungen wurden für einen Vergleich unterschiedlicher molarer Verhältnisse zwischen Vektorrückgrat und den *epPCR*-Produkten bei der Ligation verwendet (Tabelle 6). Die besten Transformationseffizienzen wurden für die molaren Verhältnisse zwischen 1:2 und 1:4 bestimmt. Insgesamt wurden mit bis zu 4,5% unerwartet viele blaue Kolonien erhalten. Eine Überprüfung dieser Kolonien über *EcoRV*-Testverdau zeigte, dass die blaue Färbung der meisten Kolonien durch die Religation des Vektors und nicht durch löslichkeitserhöhende Mutationen in der AbFS zu begründen waren. Für ein molares Verhältnis von 1:5, bei der lediglich 17% der blauen Kolonien laut Testverdau das Zielgen aufwiesen, wurde unter den getesteten Bedingungen die beste Klonierungseffizienz bestimmt.



**Tabelle 6: Übersicht über die getesteten molaren Verhältnisse von Vektorrückgrat zu insertierendem *abfs*-Gen bei der Ligation für die Klonierung der *epPCR*-Produkte und die dabei erhaltenen Resultate in Bezug auf Transformations- und Klonierungseffizienz.** Die durchschnittlich erhaltenen Kolonien wurden zur Bestimmung der Transformationseffizienz ausgezählt. Der Anteil blauer Kolonien und blauer Kolonien mit Zielgen wurde zur Bestimmung der Klonierungseffizienz berechnet.

molares Verhältnis	Ø der Kolonien/Platte	blaue Kolonien	blaue Kolonien mit Zielgen
1:2	1620	0,7%	0%
1:3	1550	1,3%	4%
1:4	1180	1,2%	5%
1:5	750	3,9%	17%
1:6	420	2,9%	8%
1:8	450	4,5%	9%

Insgesamt wurden etwa 39.000 Kolonien gescreent. Davon wiesen 740 Kolonien eine blaue Farbe auf. Laut *EcoRV*-Testverdau besaßen nur 44 Klone das gewünschte Zielgen, welche im Anschluss näher analysiert wurden.

### c) Analyse der ersten AbFS-Variantengeneration

Eine nähere Untersuchung der positiven Klone (siehe Kapitel IV2.3.3 b) erfolgte über DNA-Sequenzanalyse (Kapitel V5.8). Mit einer Länge von 2091 bp (mit Start- aber ohne Stoppcodon) wurden pro *abfs*-Gen und *epPCR*-Reaktion durchschnittlich fünf Mutationen erhalten. Das unausgeglichene Verhältnis der eingesetzten dNTP-Konzentrationen (dCTP/dTTP 1 mM, dGTP/dATP 0,2 mM, siehe Kapitel IV2.2.2 b), sollte neben der Erhöhung der Fehlerrate, eine gleichmäßige Substitution der vier Nukleotide während der *epPCR* erlauben.<sup>[180b]</sup> Trotzdem wurde im Rahmen der analysierten *abfs*-Sequenzen eine Tendenz für den Austausch von A/T zu G/C und von A/T zu T/A beobachtet (Tabelle 7). Das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen war hingegen in etwa gleich.

**Tabelle 7: Übersicht über die Nukleotidsubstitutionen bei der *epPCR* von *abfs*.**

A/T → G/C	A/T → T/A	G/C → A/T	G/C → C/G	Transitionen	Transversionen
45%	39%	16%	0%	44%	56%

Bei einem Großteil der analysierten Klone war es zu Leserasterverschiebungen durch Nukleotideinschübe oder -deletionen in der *abfs*-Sequenz gekommen. Die dabei entstandenen Leserahmen enthielten mehrere Stoppcodons, noch vor dem eigentlichen Ende des *abfs*-Gens. Seltener wurden Stoppcodons innerhalb des Gens durch Nukleotidsubstitutionen generiert. Da durch die Einführung von Stoppcodons ein vorzeitiger Abbruch der Translation des Fusionsproteins resultiert, konnte die blaue Färbung dieser

Kolonien nicht durch Löslichkeitserhöhende Mutationen im Zielprotein erklärt werden. Die Blaufärbung und die hohe Anzahl an falsch-positiven Klonen mit Leserasterverschiebungen lassen sich möglicherweise durch eine Reinitiation der Translation der mRNA (engl. *messenger RNA*) durch ein im Leseraster liegendes Startcodon mit einer vorangestellten Pseudo-Shine-Dalgarno-Sequenz erklären.<sup>[184]</sup> Dabei könnte die Komplementierung der  $\beta$ -Galactosidase im Cytosol der Zelle sowohl durch die Expression von verkürzten, löslichen Varianten des Zielproteins in Fusion mit dem LacZ $\alpha$ -Fragment als auch durch eine proteolytische Abspaltung des LacZ $\alpha$ -Fragments von unlöslichen, verkürzten Zielproteinvarianten erklärt werden.<sup>[184-185]</sup> Bei der Analyse der Sequenz des unmutierten *abfs*-Gens können bereits drei Stellen identifiziert werden, bei denen eine Reinitiation der Translation der *abfs*-mRNA denkbar wäre (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Sequenzen der drei Stellen im *abfs*-Gen, an denen eine Reinitiation der Translation der mRNA durch ein im Leseraster liegendes Startcodon (groß geschrieben und in Fett dargestellt) möglich wäre, da ihnen Teile der SD (Shine-Dalgarno)-Konsensussequenz (groß geschrieben) im richtigen Abstand vorangestellt sind.**

Position im Gen	Gensequenz (5' → 3')	Abstand zwischen SD und Start
315 – 333 nt	GGAGaaccgataagttg <b>ATG</b>	12 nt
557 – 573 nt	AGGAcgtggcgag <b>ATG</b>	10 nt
2064 – 2079 nt	GGAGctgatgcta <b>ATG</b>	9 nt

An diesen Stellen werden Teile der Shine-Dalgarno-Konsensussequenz 5' AGGAGGU 3' im richtigen Abstand von 4 – 14 nt vor einem im Leseraster liegenden Startcodon codiert und könnten damit eine schwache, aber ausreichende Wechselwirkung der mRNA mit der 16S-Untereinheit des Ribosoms ermöglichen.<sup>[186]</sup> Durch die mittels *ep*PCR eingeführten, zufälligen Mutationen sind sowohl eine Verstärkung dieser Wechselwirkung als auch die Entstehung weiterer solcher Translationsinitiationsstellen denkbar. Im Rahmen dieser Arbeit konnten beide Phänomene anhand der analysierten Sequenzen jedoch nicht beobachtet werden.

V. Sieber berichtet außerdem im Zusammenhang mit der Verwendung eines ähnlich aufgebauten CAT-Reporterkonstrukts von einer vom Zielprotein unabhängigen Expression der CAT auch ohne die Anwesenheit einer vorangestellten Shine-Dalgarno-Sequenz, die nur durch die Eliminierung des CAT-eigenen Startcodons unterbunden werden konnte.<sup>[185]</sup> Da im Rahmen dieser Arbeit die codierende Sequenz für das LacZ $\alpha$ -Fragment ebenfalls mit seinem Startcodon in das Reporterplasmid eingefügt wurde, ist eine vom Zielprotein unabhängige Expression des LacZ $\alpha$ -Fragments ebenfalls eine mögliche Erklärung für die Detektion vieler falsch-positiver Klone in den hier präsentierten Experimenten.

Bei weiteren zwei der 44 analysierten Klone konnten durch die Sequenzanalyse gar keine Veränderungen im *abfs*-Gen detektiert werden. Damit resultierten lediglich sieben Klone, die potentielle Löslichkeitserhöhende Mutationen trugen (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Übersicht über die Mutationen, die im Rahmen des  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassays einen Löslichkeitserhöhenden Effekt auf die Expression der AbFS gezeigt haben.** Laut Sequenzvergleich mit anderen Terpensynthasen im katalytisch wichtigen Bereich liegende, mutierte Reste sind in rot hervorgehoben.

Name des Klons	Mutation auf Nukleotidebene	Mutation auf Aminosäureebene
pJA2-epG12	G1113T	T371T
pJA3-epH	C1954T	L652L
pJA4-epB	T461A, T581A, A653T, A873G, A1054T, A1624C, T1868A, A1965T	L139Q, F194Y, E218V, E291E, T352S, K542Q, F623Y, T655T
pJA5-epG	A236T, C312A, T572A, A686G, T781C, A862C, C911T, A1316G, A1401T	E79V, S104S, F192Y, <b>D229G</b> , F261L, I288L, A304V, Q439R, K467N
pJA6-epF	A67G, A248C, T388A, A413G, A467T, A967T, A1929G, T1949C, T1955C	I23V, Y82S, S130T, Q138N, K156I, N323Y, K643K, M650T, L652P
pJA7-epJ	T164A, T205A, A409G, A848G, nach Pos. 2097 Einschub von 75 nt	F55Y, C69S, K137E, D283G, 698 – 725: AAGGINHGYEIPIF HHCGSNIISLMLMA
pJA8-ep11	C476T	A159V

Die Analyse der Sequenzen zeigte, dass die Verteilung der eingeführten Mutationen über die gesamte Länge des *abfs*-Gens erfolgte. Mit etwa 70% wurden anteilig mehr Aminosäuresubstitutionen in der ersten Hälfte des Enzyms detektiert. Bei dem Vergleich der erhaltenen Sequenzen traten keine Aminosäuresubstitutionen an der gleichen Position häufiger als einmal auf, so dass keine *Hot Spots* identifiziert werden konnten. Trotzdem wiesen einige Klone Besonderheiten auf. Bei Klon pJA7-epJ wurde zum Beispiel, neben den vier detektierten Mutationen auf Proteinebene, ein Einschub von insgesamt 75 nt zwischen dem *abfs*-Gen und der *linker*-Sequenz beobachtet. Dadurch resultiert eine Verlängerung des exprimierten Fusionsproteins um 25 Aminosäuren. Im Falle von pJA5-epG war durch die Mutationen eine der katalytisch relevanten Bereiche der Terpen cyclasedomäne betroffen. Zwar ist D229 laut Sequenzvergleich mit anderen Terpen cyclasen nicht an der Stabilisierung des Kofaktors Mg<sup>2+</sup> beteiligt, jedoch scheint die Aminosäure Aspartat an dieser Stelle des

Sequenzmotivs konserviert zu sein (siehe Kapitel II1.1.2). Zwei der Klone, pJA2-epG12 und pJA3-epH, enthielten jeweils lediglich eine stille Mutation. Nur im Falle des Klons pJA3-epH wurde durch die Nukleotidsubstitution eine Anpassung des Leucincodons an den Codongebrauch in *E. coli* erreicht. Vorherige Versuche zur Anpassung der tRNA-Konzentration in *E. coli* auf die Codonhäufigkeit in *abfs* hatten jedoch keinen Einfluss auf die Expression des Zielproteins gezeigt (siehe Kapitel IV2.1.2). Ein Einfluss der Mutationen in den Klonen pJA2-epG12 und pJA3-epH auf die lösliche Expression der AbFS konnte daher als zweifelhaft eingestuft werden. Diese Klone wurden nicht weiter betrachtet.

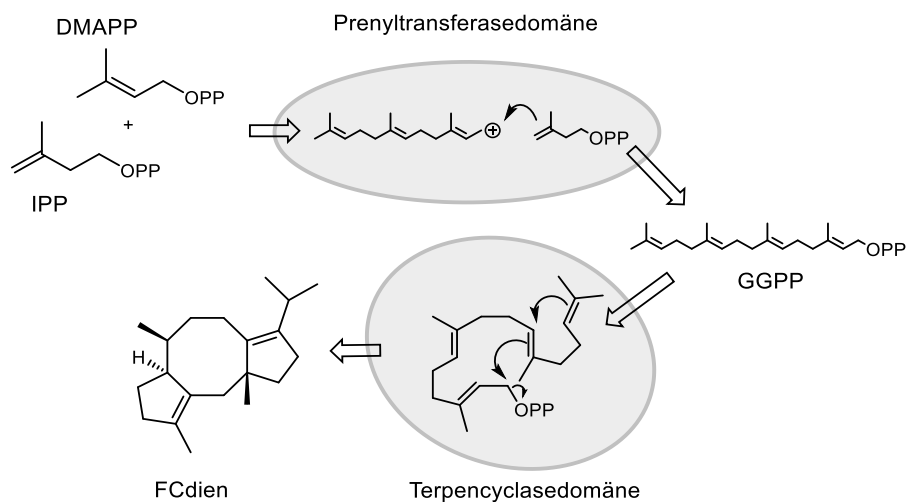
Um die eingeführten Mutationen im Hinblick auf die Erhöhung der löslichen Expression und der Aktivität der AbFS zu überprüfen, wurden Testexpressionen (Kapitel V6.2.2) und -fermentationen (Kapitel V6.2.4) in *E. coli* Top10 und *E. coli* OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> unter den etablierten Expressionsbedingungen (siehe Kapitel IV2.1) für die AbFS bei 19°C und 37°C durchgeführt. Bis auf eine geringere Expressionsrate in OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup>, im Vergleich zu Top10, wurden keine Unterschiede in der Expression der Varianten festgestellt. Im Vergleich zu der unmutierten AbFS, wiesen die Varianten keine erhöhte lösliche Expression auf (nicht gezeigt). Die Testung der Aktivität der Varianten gestaltete sich kompliziert, da bei der Fermentation in *E. coli* kaum nachweisbare Mengen des Cyclisierungsprodukts FCdien gebildet wurden (siehe Kapitel IV1.1.3). Um überhaupt FCdien in den *E. coli*-Fermentationsextrakten nachweisen zu können, war ein Kulturvolumen von mindestens 500 mL notwendig. Auch dann war der Nachweis der Aktivität unzuverlässig. Ein zweifelsfreier Nachweis für die Enzymaktivität erfolgte lediglich für pJA8-ep11 (nicht gezeigt).

In der Regel wird eine signifikante Steigerung der Faltungsstabilität und einer damit verbundenen erhöhten löslichen Expression eines Zielproteins erst in der zweiten oder dritten Generation einer gerichteten Proteinevolution erreicht. Jedoch wurde die Anzahl der in der ersten Generation isolierten AbFS-Varianten dem Aufwand nicht gerecht. Weitere Versuche noch mehr Enzymvarianten durch die zufällige Mutagenese zu erzeugen scheiterten an der hohen Anzahl falsch-positiv identifizierter Klone, hervorgerufen durch die bereits oben angesprochene Einführung von Stoppcodons in das *abfs*-Gen durch Leserasterverschiebungen oder ungünstigen Nukleotidsubstitutionen. Daher wurden die Experimente zur gerichteten Proteinevolution der AbFS zunächst eingestellt.

### 2.3 Untersuchungen einzelner Domänen der AbFS

Einzelne Proteindomänen können eine von dem Rest des Proteins unabhängige dreidimensionale Faltung aufweisen. Dieser Umstand kann genutzt werden, wenn die lösliche Expression eines Multidomänenenzym in seiner Gesamtlänge nicht gelingt.<sup>[159]</sup> Gerade bei

der Verwendung von *E. coli* als heterologen Wirt, dessen Translationsmaschinerie auf die Synthese kleiner bis mittelgroßer Proteine ausgelegt ist, kann es vorteilhaft sein einzelne Domänen des Zielproteins unabhängig voneinander zu exprimieren.<sup>[159]</sup> Daher wurde die unabhängige heterologe Expression der Prenyltransferase- und Terpenicyclasedomäne der AbFS (Abbildung 57) angestrebt.



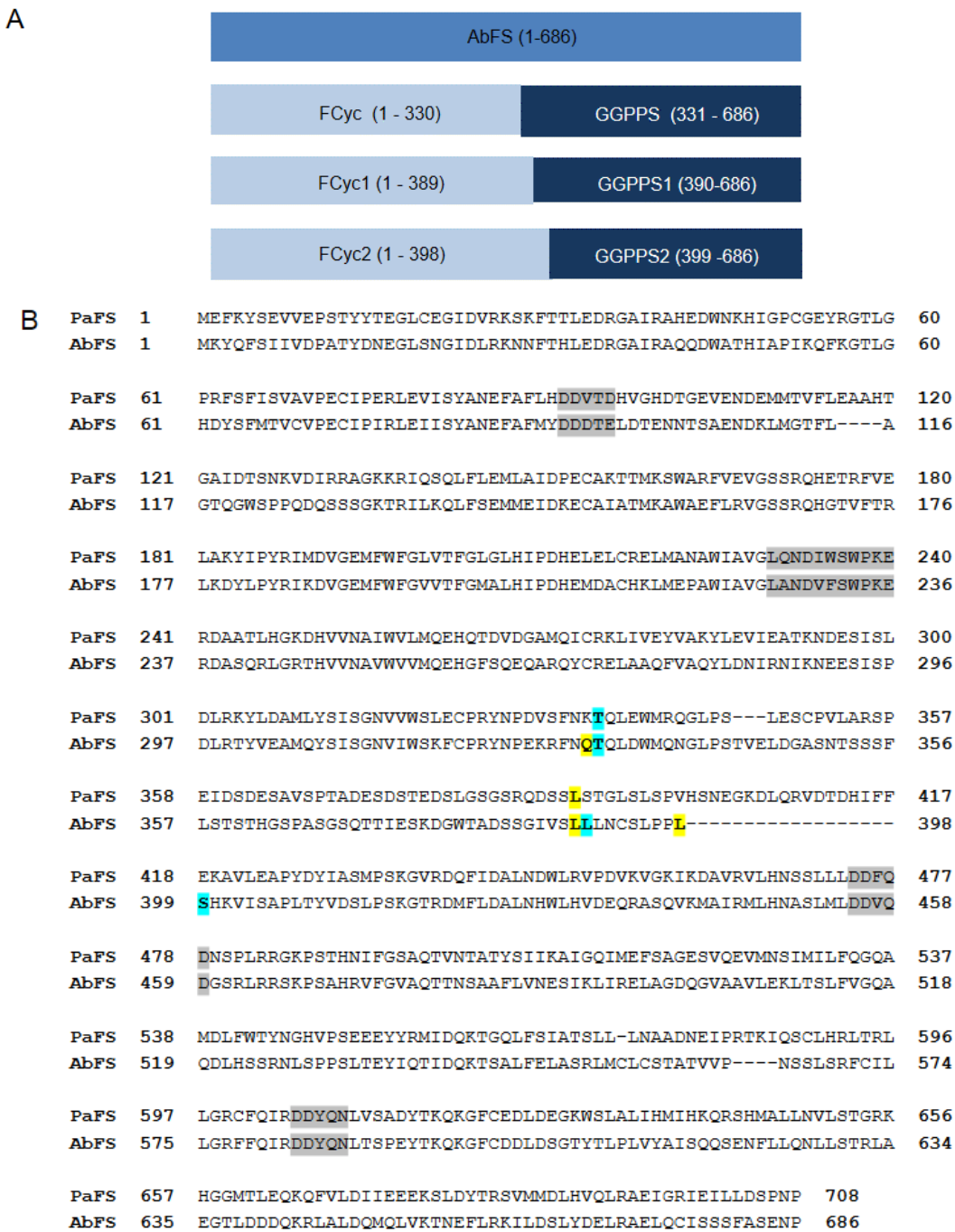
**Abbildung 57: Schematische Darstellung für die unabhängige Expression der beiden Domänen der AbFS.** Die Prenyltransferasedomäne katalysiert die schrittweise Kondensation von DMAPP und IPP zur Erzeugung von GGPP und die Terpenicyclasedomäne katalysiert die Cyclisierung von GGPP zu FCdien.

### 2.3.1 Festlegung der Domänengrenzen in der AbFS

Bei der Teilung eines Enzyms in seine einzelnen Domänen, ist die Kenntnis der genauen Lage der einzelnen Domänengrenzen innerhalb einer Proteinsequenz essentiell.

Für die PaFS (FS-Isoform aus *P. amygdali*) wurden bereits die Sequenzbereiche für die jeweiligen Enzymdomänen definiert. Nach Toyomasu *et al.* wird die Terpenicyclasedomäne für die Cyclisierung des FCdiens in der PaFS durch die Aminosäuren 1 – 390 begrenzt, wohingegen eine Prenyltransferaseaktivität zur Synthese des GGPP durch die Expression der Aminosäuren 335 – 708 erhalten wird.<sup>[53a]</sup> Die Schnittstellen für die Expression der einzelnen Domänen der AbFS (Abbildung 58 A), wurden mit Hilfe eines Sequenzvergleiches zwischen den beiden FS-Isoformen (Abbildung 58 B) ermittelt. Bei einer direkten Übertragung der Domänengrenzen der PaFS auf die AbFS erhält man für die Terpenicyclasedomäne FCyc1 der AbFS den Sequenzbereich zwischen Aminosäurepositionen 1 und 389. Für die Prenyltransferasedomäne GGPPS ergibt sich der Bereich zwischen Position 331 und 686. Zusätzlich wurden die jeweiligen Sequenzgegenstücke FCyc (Positionen 1 – 330) und GGPPS1 (Positionen 384 - 686) exprimiert. Außerdem fiel bei dem Vergleich der Primärsequenzen der beiden FS-Isoformen auf, dass in der Nähe der für die PaFS definierten

Domänengrenzen eine zusätzliche, 18 Aminosäuren lange Peptidsequenz codiert wurde, die in AbFS nicht vorkam (Positionen in PaFS: 400 – 417, siehe Abbildung 58 B).



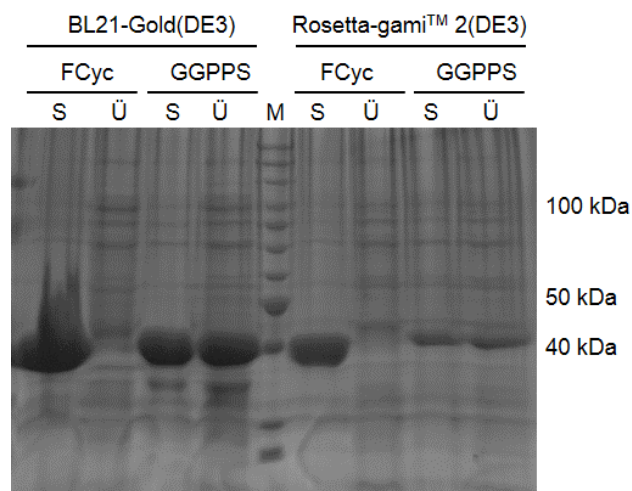
**Abbildung 58: Graphische Darstellung der getesteten Terpen cyclase- (FCyc) und Prenyltransferasedomänengrenzen (GGPPS) der AbFS (A) und Sequenzalignment zwischen der PaFS aus *P. amygdali* und der AbFS aus *A. brassicicola*.** Katalytisch relevante Bereiche sind grau hinterlegt. Die erste Aminosäure einer Prenyltransferasedomäne ist jeweils blau und die letzte der Terpen cyclasedomäne jeweils gelb gekennzeichnet.

Die strukturell abgegrenzten Domänen eines Enzyms werden häufig durch flexible Linker verbunden, die keine konservierten Sequenzbereiche aufweisen. Die Vermutung lag nahe, dass es sich bei der zusätzlichen, 18 Aminosäuren langen Sequenz aus PaFS um einen

solchen Linker oder um einen Teil des Linkers handelte. Daher wurde die Expression der Fragmente FCyc2 (Positionen 1 – 398) und GGPPS2 (399 – 686) ebenfalls als sinnvoll betrachtet.

### 2.3.2 Expression und Aktivitätstests der einzelnen Domänen in *E. coli*

Zur Expression der einzelnen Domänen in *E. coli* wurden die jeweiligen codierenden Sequenzabschnitte in die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NotI* des Vektors pETM11 eingefügt (Kapitel V5.7.1). Um die unbeeinflusste lösliche Expression der Domänen beurteilen zu können, wurde mit pETM11 absichtlich ein Vektor gewählt, der für keinen Löslichkeitserhöhenden Fusionstag, wie zum Beispiel GST, codierte (siehe Kapitel IV2.1.1). Unter den für AbFS etablierten Expressionsbedingungen (siehe Kapitel IV2.1.1) wurde lediglich für die GGPPS-Domäne, bei einer späten Induktion der Proteinexpression mit einer  $OD_{600}$  von etwa 2, eine deutliche lösliche Expression in BL21-Gold(DE3) und in Rosetta-gami<sup>TM</sup> 2(DE3) erhalten (Abbildung 59).



**Abbildung 59:** 10%-iges SDS-Gel zum Nachweis einer löslichen Expression der GGPPS-Domäne der AbFS in *E. coli* bei 19°C in TB-Medium. Alle anderen Domänen (GGPPS1, GGPPS2, FCyc, FCyc1 und FCyc2) zeigten unter den getesteten Expressionsbedingungen keine lösliche Expression, hier stellvertretend nur für FCyc gezeigt. M: PageRuler<sup>TM</sup> Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific), S: Sediment nach der Zellyse, Ü: Überstand nach der Zellyse.

Im Vergleich dazu konnte für alle weiteren getesteten Domänen FCyc (siehe Abbildung 59), FCyc1, FCyc2, GGPPS1 und GGPPS2 (nicht gezeigt) keine lösliche Expression in *E. coli* über SDS-PAGE nachgewiesen werden.

Bei der Analyse der Expressionskulturen über GC-MS nach der Extraktion mit *n*-Pentan konnten lediglich für FCyc einzelne charakteristische Ionen für FCdien in schwacher Intensität bei der Retentionszeit dieses Metabolits detektiert werden (nicht gezeigt). Um die Aktivität von Prenyltransferasen per GC-MS nachzuweisen, ist eine Hydrolyse des GGPPs zu dem

entsprechenden Alkohol GGOH (Geranylgeraniol) notwendig. Hierfür wurde eine Methode nach Vallon *et al.* verwendet, bei der die Hydrolyse des Pyrophosphatrests durch die Behandlung mit einer alkalischen Phosphatase erreicht wird.<sup>[187]</sup> Obwohl eine deutliche lösliche Expression der GGPPS-Domäne in *E. coli* erzielt worden war, konnte das Massenspektrum des GGOHs in den *E. coli*-Kulturextrakten nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die Aktivität der einzelnen Domänen schien um ein vielfaches geringer, als die Aktivität des Gesamtproteins AbFS. Dadurch wurde die ohnehin schon unzuverlässige Bestimmung der Enzymaktivität in *E. coli* (siehe Kapitel IV2.2.2 c) zusätzlich erschwert.

Dennoch zeigten die erzielten Ergebnisse, dass die lösliche Expression des AbFS-Gesamtproteins durch eine geringe Faltungstabilität der Terpenocyclasedomäne limitiert sein könnte. Daher stand zunächst die gerichtete Proteinevolution der kleineren FCyc-Domäne zur Erhöhung der Faltungstabilität und löslichen Expression im Vordergrund.

### 2.3.3 Gerichtete Proteinevolution der FCyc-Domäne

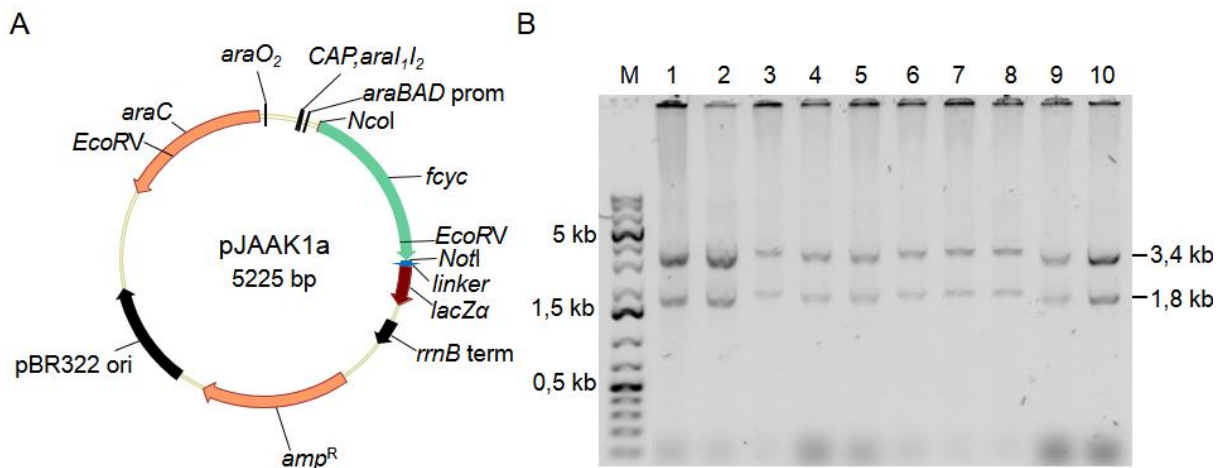
Bei der gerichteten Proteinevolution des AbFS-Gesamtproteins wurden viele falsch-positive Klone beim  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassay erhalten (Kapitel IV2.2). Dies war zum einen auf die geringe Klonierungseffizienz des etwa 2 kb großen *abfs*-Gens zurückzuführen, wodurch viele blaue Kolonien lediglich das religierte Reporterplasmidrückgrat aufwiesen (siehe Kapitel IV2.2.2 a). Zum anderen konnte die Blaufärbung der Klone mit Leserasterverschiebungen vermutlich durch die Reinitiation der Translation der mRNA erklärt werden (siehe Kapitel IV2.2.2 c).<sup>[184]</sup> Dabei ist eine Komplementierung der  $\beta$ -Galactosidase im Cytosol der Zelle durch die Expression von verkürzten, löslichen AbFS-Linker-LacZ $\alpha$ -Fusionproteinen, durch die proteolytische Abspaltung des LacZ $\alpha$ -Fragments vom Zielprotein oder durch eine vom Zielprotein unabhängige Expression des LacZ $\alpha$ -Fragments denkbar.<sup>[184-185]</sup>

Um die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung falsch-positiver Klone zu verringern, wurde das zuvor erstellte Reporterkonstrukt pJAMM1 (siehe Kapitel IV2.2.1 a) an zwei Stellen modifiziert (Klonierung von pJAMM1b, siehe Kapitel V5.7.4). Da prolinreiche Sequenzen weniger anfällig für proteolytischen Abbau sind, wurde der im pJAMM1-Plasmid verwendete glycin- und serinreiche Linker „GSAGSAAGSGAS“ zwischen Zielprotein und LacZ $\alpha$ -Fragment durch die prolinenthaltende Peptidsequenz „WPGSPAS“ ausgetauscht.<sup>[185]</sup> Außerdem wurde analog zu den Studien von V. Sieber zum CAT-Selektionsverfahren das Startcodon des *lacZ $\alpha$* -Gens aus dem Reporterkonstrukt entfernt, um eine vom Zielprotein unabhängige Expression des Reporterfragments zu unterbinden.<sup>[185]</sup>

Im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Arsenij Kokorin wurde eine Negativkontrolle für den  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassay zur gerichteten



Proteinevolution der FCyc-Domäne erzeugt.<sup>[188]</sup> Dabei erfolgte die Ligation des durch P/C/I-Extraktion gereinigten *fcyc*-Gens in die *Nco*I- und *Not*I-Restriktionsschnittstellen des modifizierten und durch P/C/I-Extraktion gereinigten Reporterkonstruktückgrats von pJAMM1b im Verhältnis von 1:3 (Kapitel V5.7.4). Die Verifizierung der neu erstellten Negativkontrolle pJAAK1a (Abbildung 60 A) erfolgte analog zu den Versuchen zur gerichteten Proteinevolution der AbFS über einen *Eco*RV-Verdau der isolierten Plasmide (Abbildung 60 B) und einer anschließenden DNA-Sequenzanalyse.

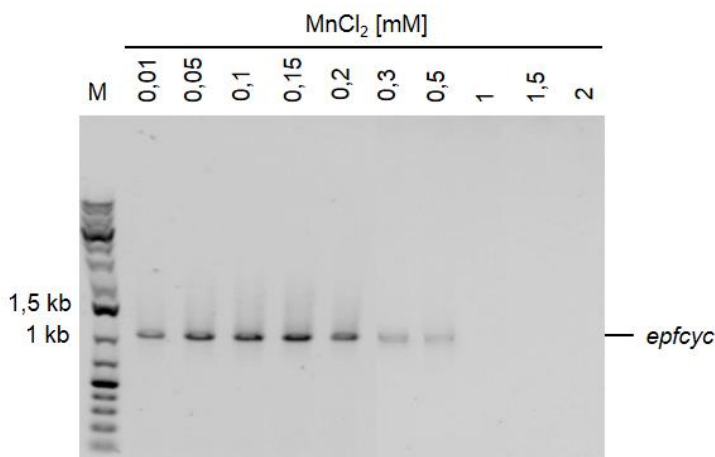


**Abbildung 60: Plasmidkarte des Reporterkonstrukts pJAAK1a für die gerichtete Proteinevolution von FCyc (A) und 0,8%-iges Agarosegel zur Restriktionsanalyse von zehn unabhängigen Klonen nach der Klonierung des Plasmids (B).** *araC*: Gen für das Transkriptionsregulatorprotein AraC, *araO<sub>2</sub>/CAP, araI<sub>1/2</sub>*: Regulatorische Transkriptionseinheiten, *araBAD* prom: Promoterregion des Arabinoseoperons, *fcyc*: Gen für die FCyc-Domäne, *linker*: Codierender Abschnitt für „WPGSPAS“, *lacZα*: Gen für das LacZα-Fragment der β-Galactosidase aus pUC18, *rrnB term*: Terminatorregion, *amp<sup>R</sup>*: Ampicillinresistenzgen, pBR322 ori: Replikationsursprung, M: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Das hier dargestellte Plasmid wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Arsenij Kokorin erstellt.<sup>[188]</sup>

Für das erfolgreich klonierte Reporterplasmid pJAAK1a wurden nach *Eco*RV-Verdau zwei Fragmente in der Größe von etwa 1,8 kb und 3,4 kb erwartet. Für das religierte Plasmidrückgrat hingegen sollte sich nur ein Fragment in der Größe von etwa 4,2 kb ergeben. Da eine Klonierungseffizienz von 100% festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 60 B), wurden die gleichen Klonierungsbedingungen auch bei Herstellung großer DNA-Bibliotheken bei der gerichteten Proteinevolution der FCyc-Domäne verwendet.

Sowohl im Rahmen der Bachelorarbeit von Arsenij Kokorin als auch in einem unter meiner Leitung durchgeführten Forschungspraktikum von Hendrik Ebke wurden unterschiedliche Varianten der FCyc-Domäne durch gerichtete Proteinevolution erzeugt.<sup>[188-189]</sup> Mutationen wurden mittels der bereits etablierten *ep*PCR-Bedingungen (siehe Kapitel IV2.2.2) in das *fcyc*-Fragment eingefügt. Zusätzlich wurden bei gleichbleibender Templatkonzentration von etwa

1 ng/μL verschiedene  $Mn^{2+}$ -Konzentrationen zwischen 0,01 und 2 mM in der *ep*PCR zur Erzeugung variabler Fehlerraten getestet (Abbildung 61).<sup>[188-189]</sup>



**Abbildung 61: Ausschnitte aus 0,8%-igen Agarosegelen zur Testung unterschiedlicher  $MnCl_2$ -Konzentrationen bei der *ep*PCR von *fcyc*.** M: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Die Gele wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Arsenij Kokorin und des Forschungspraktikums von Hendrik Ebke erstellt.<sup>[188-189]</sup>

Durch eine zunehmende Destabilisierung des DNA-Polymerase-Komplexes konnte die Amplifikation des *fcyc*-Fragments bei  $Mn^{2+}$ -Konzentrationen von über 0,5 mM durch Agarosegelelektrophorese nicht mehr nachgewiesen werden. Daher wurden lediglich die *ep*PCR-Produkte aus den Ansätzen mit 0,01 – 0,5 mM  $MnCl_2$  für die Klonierung verwendet. Nach der Transformation von *E. coli* OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> und Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit Hilfe des bereits etablierten agarplattenbasierten  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassays (siehe Kapitel IV.2.2.1) nach FCyc-Varianten mit erhöhter Löslichkeit gescreent. Zur genauen Bestimmung der Inkubationszeit dienten, analog zu den vorherigen Versuchen, die mit pBADM11-*lacZ* $\alpha$  und pJAAK1a transformierten OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> als Positiv- und Negativkontrollen.

Anhand der ausgezählten Kolonien konnte ein Einfluss der zunehmenden  $Mn^{2+}$ -Konzentration während der *ep*PCR des *fcyc*-Fragments auf die Transformationseffizienz beobachtet werden, da die Anzahl der Kolonien mit zunehmender  $Mn^{2+}$ -Konzentration abnahm (Tabelle 10). Der Anteil blauer Kolonien und blauer Kolonien mit Zielgen schwankte hingegen zufällig. Mit 0,9 - 4,2% war der Anteil blauer Kolonien in etwa so hoch wie bei der gerichteten Proteinevolution des AbFS-Gesamtlängenproteins (vgl. Tabelle 6).

**Tabelle 10: Übersicht über Transformations- und Klonierungseffizienzen für unterschiedliche  $Mn^{2+}$ -Konzentrationen während der epPCR des *fcyc*-Fragments.** Die Experimente zu den hier zusammengefassten Ergebnissen wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Arsenij Kokorin und des Forschungspraktikums von Hendrik Ebke durchgeführt.<sup>[188-189]</sup>

$Mn^{2+}$ - Konzentration	Ø der Kolonien/Platte	blaue Kolonien	blaue Kolonien mit Zielgen
0,01 mM	1400	2,8%	4%
0,05 mM	1100	4,2%	3%
0,1 mM	1020	3,1%	1%
0,15 mM	990	2,9%	3,5%
0,2 mM	720	3,5%	0%
0,3 mM	55	2,4%	50%
0,5 mM	270	0,9%	100%

Ein *EcoRV*-Testverdau der isolierten Plasmide zeigte, dass ebenfalls ca. 90% aller blauen Kolonien das Zielgen nicht enthielten und lediglich für das religierte Plasmidrückgrat codierten (nicht gezeigt). Trotzdem konnte eine leichte Verbesserung der Screeningprozedur beobachtet werden. Die Expression, der durch Testverdau identifizierten Klone, in *E. coli* Top10 zeigte, dass bei über 50% erfolgreich ein Protein in der Größe des FCyc-Linker-LacZ $\alpha$ -Fusionsproteins exprimiert wurde (nicht gezeigt), wodurch das Vorhandensein eines vorzeitigen Stoppcodons in dem *fcyc*-Gen oder eine Leserasterverschiebung innerhalb der Sequenz für diese Klone ausgeschlossen werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigten bei der gerichteten Proteinevolution von AbFS nur etwa 20% der Klone mit Zielgen eine erfolgreiche Expression des Zielproteins (siehe Kapitel IV2.2.2). Die Verbesserung dieser Screeningergebnisse war vermutlich auf die zwei oben beschriebenen Modifikationen des Reporterkonstrukts zurückzuführen, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer proteolytischen Abspaltung und einer autonomen Expression des LacZ $\alpha$ -Fragments verringert wurde. Die eingeführten Modifikationen hatten jedoch keinen Einfluss auf die Expression von verkürzten, löslichen Varianten des FCyc-Linker-LacZ $\alpha$ -Fusionsproteins durch die Anwesenheit von Pseudo-Shine-Dalgarno-Sequenzen im richtigen Abstand zu im Leseraster liegenden Startcodons (siehe Kapitel IV2.2.2 c). Dies wäre eine plausible Erklärung für die Detektion von immer noch recht vielen falsch-positiven Klonen mit Leserasterverschiebungen mittels des hier verwendeten Screeningsystems.

Von insgesamt etwa 18.000 gescreenten Klonen wiesen 366 eine blaue Farbe auf. Nur etwa 28 Klone enthielten nach erfolgtem Testverdau das erwünschte Zielgen, wovon wiederum 15 Klone eine erfolgreiche Expression des FCyc-Linker-LacZ $\alpha$ -Fusionsproteins zeigten. Laut DNA-Sequenzanalyse wiesen 14 dieser Klone Nukleotidsubstitutionen auf (Tabelle 11).

Analog zu der gerichteten Proteinevolution der AbFS, konnte auch bei der Mutagenese der FCyc-Domäne ein in etwa ausgeglichenes Verhältnis von Transitionen (56%) zu Transversionen (44%) beobachtet werden. Es ergab sich ebenfalls eine Tendenz zu A/T-zu-G/C- (40%) und zu A/T-zu-T/A-Substitutionen (32%), im Vergleich zu G/C-zu-A/T- (24%) und G/C-zu-C/G-Substitutionen (1%). Aufgrund der statistisch geringen Zahl an sequenzierten Klonen ist kein Zusammenhang zwischen  $Mn^{2+}$ -Konzentration während der epPCR des *fcyc*-Fragments und Anzahl an erhaltenen Mutationen zu erkennen (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11: Übersicht über die Mutationen, die im Rahmen des  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassays einen löslichkeitserhöhenden Effekt auf die Expression der FCyc-Domäne zeigten.** *Hot spots* sind in grün hervorgehoben. Laut Sequenzvergleich mit anderen Terpensynthasen sind im katalytisch wichtigen Bereich liegende, mutierte Reste in rot hervorgehoben. Die Experimente zu den hier zusammengefassten Ergebnissen wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Arsenij Kokorin und des Forschungspraktikums von Hendrik Ebke durchgeführt.<sup>[188-189]</sup>

Name des Klons	$Mn^{2+}$ -Konzentration	Mutation auf Nukleotidebene	Mutation auf Aminosäureebene
pJAAK-2B1	0,05 mM	T344A	L115E
pJAAK-3B	0,05 mM	G129A, A281T	Q43Q, <b>D94V</b>
pJAAK-9B	0,05 mM	C659G	A220G
pJAAK-4D	0,15 mM	T155C, A331T, G349A, C502T, T938A	I52T, M111L, G117S, R168C, V313D
pJAAK-7D	0,15 mM	T310C	S104P
pJAAK-1D/ pJAHE-3G	0,15 und 0,5 mM	T361A, T711C, A961G	<b>W121R, R237R, R321G</b>
pJAHE-1C/ pJAHE-4G	0,3 und 0,5 mM	G990T	<b>Q330H</b>
pJAHE-1B	0,5 mM	A789G	Q263Q
pJAHE-1D	0,5 mM	T361A, C594T, T711C, A961G	<b>W121R, T198T, R237R, R321G</b>
pJAHE-5G	0,5 mM	T361A, T711C, G990T	<b>W121R, R237R, Q330H</b>
pJAHE-2G	0,5 mM	G990T, Einschub von TGC hinter 990	<b>Q330H plus A331</b>

Die Zahl der erhaltenen Mutationen pro Gen schwankte zwischen ein und fünf Nukleotidsubstitutionen, wobei für Klon pJAAK-4D und eine  $Mn^{2+}$ -Konzentration von 0,15 mM mit fünf Mutationen, auf Nukleotid- und Aminosäureebene, die höchste Mutationsrate erhalten wurde. Für  $Mn^{2+}$ -Konzentrationen von 0,01 mM, 0,1 mM und 0,2 mM wurden keine Klone mit Mutationen isoliert.

Bei Klon pJAAK-3B war durch die Mutationen eine der katalytisch relevanten Bereiche der Terpencyclasedomäne betroffen. Allerdings sollte die Mutation D94V die Aktivität der Terpencyclasedomäne nicht beeinträchtigen, da D94 vermutlich nicht an der Stabilisierung des Kofaktors  $Mg^{2+}$  beteiligt ist. Die Aminosäure Valin wird in dem homologen Enzym aus *P. amygdali* an gleicher Position dieses Sequenzmotivs gefunden (siehe Abbildung 58). pJAHE-1B wies lediglich eine stille Mutation auf, bei der keine Codonoptimierung an die tRNA-Konzentration des *E. coli*-Expressionsstamms festgestellt werden konnte. Daher wurde ein Einfluss dieser Mutation auf die lösliche Expression der FCyc-Domäne ausgeschlossen. Nur zwei der Klone, pJAAK-9B und pJAAK-4D, besaßen Mutationen im Anfangsbereich des Proteins. Die meisten Mutationen konzentrierten sich auf die letzten 230 Aminosäuren der Proteindomäne. Bei einem Vergleich der erstellten Varianten zeigte sich eine starke Redundanz der Mutantenbibliothek. Die Mutation Q330H, bei der die letzte Aminosäure der FCyc-Domäne vor dem artifiziellen Linker des Reporterfragments betroffen war, kam in den vier unabhängigen Klonen pJAHE-1C, pJAHE-4G, pJAHE-5G und pJAHE-2G vor. Bei pJAHE-2G wurde ein zusätzlicher Einschub der Aminosäure A331 beobachtet. Die Mutationen W121R, R237R und R321G traten in der gleichen Kombination in den drei unabhängigen Klonen pJAAK-1D, pJAHE-3G und pJAHE-1D auf. W121R und die stille Mutation R237R kamen zusätzlich in Klon pJAHE-5G vor. Die Identifikation von *Hot Spots* ist in vielen Fällen ein erster Hinweis darauf, dass bei den Mutationen tatsächlich Aminosäuren betroffen sind, die eine Verbesserung der gewünschten Eigenschaft bewirken.

Eine Analyse der unlöslichen und löslichen Fraktionen der Zellysate nach Expression in Top10, bei der nach Bradfordbestimmung (Kapitel V7.3) jeweils die gleiche Gesamtproteinkonzentration eingestellt wurde, zeigte weder einen Unterschied im Expressionslevel noch in der löslichen Expression der FCyc-Varianten (nicht gezeigt).<sup>[189]</sup> Daher blieb es fraglich, ob die identifizierten Mutationen tatsächlich einen Einfluss auf die lösliche Expression der FCyc-Domäne oder des Gesamtproteins AbFS hatten. Die Blaufärbung der Kolonien könnte auch durch eine artifizielle, verstärkte Interaktion des LacZ $\alpha$ -Fragments mit dem LacZ $\omega$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase im Cytosol der Zelle erklärt werden. Des Weiteren stimmte keine der Aminosäuresubstitutionen der FCyc-Domäne (Tabelle 11) mit den Mutationen bei der gerichteten Proteinevolution des Gesamtproteins AbFS (siehe Kapitel IV2.2.2, Tabelle 9) überein.

Eine weiterführende Analyse der erhaltenen Mutationen wurde nur als sinnvoll betrachtet, falls die Aktivität der FCyc-Domäne durch die Aminosäuresubstitutionen nicht negativ beeinträchtigt wurde. Schon bereits bei der Aktivitätsbestimmung der unmutierten FCyc-Domäne in *E. coli* (siehe Kapitel IV2.3.2) konnten lediglich einzelne Ionen des FCdiens, nicht aber das gesamte Massenspektrum des Cyclisierungsprodukts, in den *n*-Pentan-

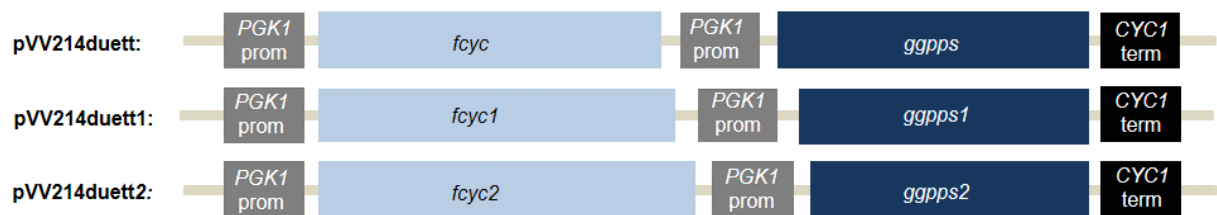
Kulturextrakten nachgewiesen werden. Auch die präparative Fermentation der unterschiedlichen FCyc-Varianten ermöglichte keinen eindeutigen Nachweis der Enzymaktivität.<sup>[188-189]</sup> Generell gestaltete sich die Analyse der Enzymaktivität nach Expression in *E. coli* als unzuverlässig, da, selbst bei der Expression des Gesamtproteins AbFS, nur sehr geringe Mengen des FCdiens detektiert werden konnten (siehe Kapitel IV1.1.3).

Im Gegensatz zu *E. coli* konnte eine deutliche Produktion des FCdiens durch die Expression des Gesamtproteins AbFS in *S. cerevisiae* erreicht werden (siehe Kapitel IV1.1.5). Daher wurde die Überprüfung der Enzymaktivitäten der einzelnen, zunächst unmutierten AbFS-Domänen in *S. cerevisiae* angestrebt.

### 2.3.4 Testung der Enzymaktivität einzelner Domänen der AbFS in *S. cerevisiae*

Um die erhaltenen *Hot Spots* bei der gerichteten Proteinevolution der FCyc-Domäne näher analysieren zu können, stand der eindeutige Nachweis der Enzymaktivität der unmutierten Terpenyclasedomäne im Vordergrund. Daher sollte das im Rahmen der FCdien-Fermentation etablierte *S. cerevisiae*-Fermentationssystem (siehe Kapitel IV1.1.5) zur Expression der FCyc-Domäne, im Vergleich zu FCyc1 und FCyc2 (siehe Abbildung 58 A), verwendet werden. Die Vektoren pVV214-*fcyc*, pVV214-*fcyc1* und pVV214-*fcyc2* wurden im Rahmen dieser Dissertation über Restriktion und Ligation kloniert (Kapitel V5.7.2). Im Rahmen des Forschungspraktikums von Hendrik Ebke wurden nach Transfomation des Stammes *S. cerevisiae* CEN.PK2-1c [pRS313-UPC2.1 + pRS315-tHMGR-S.c.] (siehe Abbildung 25) jeweils zwei Klone unter den optimierten Kultivierungsbedingungen (siehe Kapitel IV1.3) für die Fermentation des FCdiens im Schüttelkolben und einem Kulturvolumen von 50 mL für 48 h fermentiert.<sup>[189]</sup> Eine GC-MS-Analyse des Gesamtkulturextraktes zeigte für keine der getesteten Fragmente einen eindeutigen Nachweis für FCdien. Im Gegensatz zu den erzielten Ergebnissen in *E. coli* (siehe Kapitel IV2.3.2), konnten in *S. cerevisiae* lediglich in den Kulturextrakten von FCyc1 und FCyc2 einzelne Ionen des FCdiens in den jeweiligen Massenspektren identifiziert werden (nicht gezeigt). Neben der geringen Enzymaktivität der AbFS-Fragmente FCyc, FCyc1 und FCyc2, kam auch eine Limitation des FCdien-Vorläufermoleküls GGPP in dem Cytosol der Hefe für die geringe Produktion des FCdiens in Betracht.

Im Falle der AbFS erfolgt, aufgrund der bifunktionellen Eigenschaft des Enzyms, neben der Überexpression der FCdien-Cyclase auch automatisch eine Überexpression der GGPP-Synthase. Zur dualen, unabhängigen Expression der Terpenyclase- und Prenyltransferasedomänen wurde im Rahmen dieser Dissertation der *S. cerevisiae*-Expressionsvektor pVV214duett und im Rahmen der Bachelorarbeit von Pina Eichert die Vektoren pVV214duett1 und pVV214duett2 konstruiert (Abbildung 62, Kapitel V5.7.2).<sup>[190]</sup>



**Abbildung 62: Schematische Darstellung der Expressionskassetten der Vektoren pVV214duett, pVV214duett1 und pVV214duett2 zur dualen Expression der unterschiedlichen Terpen cyclase- und Prenyltransferasedomänenverkürzungen in *S. cerevisiae*.**

Anschließend wurde die Aktivität der einzelnen Domänen aus diesen Vektoren im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Pina Eichert untersucht.<sup>[190]</sup> Jedoch konnte auch nach Fermentation der, mit diesen Vektoren transformierten, *S. cerevisiae* keine klare Produktion des FCdiens in den Kulturextrakten nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Eine deutliche Produktion des FCdiens erfolgte daher weder in *E. coli* noch in *S. cerevisiae* nach Expression des FCyc-Fragments oder nach Expression einer der anderen getesteten Sequenzbereiche (FCyc1, FCyc2, GGPPS, GGPPS1, GGPPS2). Im Falle der FS-Isoform aus *P. amygdali* wurde die enzymatische Aktivität der einzelnen Domänen *in vitro* und in Anwesenheit sehr hoher Substratkonzentrationen nachgewiesen.<sup>[53a]</sup> Möglicherweise sind die katalytischen Aktivitäten der einzelnen Domänen der AbFS so gering, dass ein Nachweis der enzymatischen Aktivität bei kleinen *in vivo* Substratkonzentrationen nicht möglich ist. Andererseits könnte die aktive Faltung der einzelnen Domänen auch von einer gegenseitigen Stabilisierung abhängig sein, die in der Regel nur durch die Nähe der Domänen bei der Translation an einem Polypeptidstrang ermöglicht wird. Letzten Endes kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Teilung des Gesamtproteins in seine einzelnen Domänen falsche Positionen als Schnittstellen gewählt wurden.

Es ist nicht auszuschließen, dass die bei der gerichteten Proteinevolution eingeführten Mutationen in das FCyc-Fragment sogar eine inaktive Konformation der Terpen cyclasedomäne stabilisieren. In Zukunft sollten daher die ins FCyc-Fragment eingeführten Mutationen im Umfeld des Gesamtproteins AbFS analysiert werden. Momentan wird im Rahmen der Masterarbeit von Hendrik Ebke an der Übertragung der Mutationen des FCyc-Fragments auf die Gesamtproteinsequenz der AbFS über MEGAWHOP (*Megaprimer PCR of Whole Plasmid*) gearbeitet.<sup>[191]</sup> Die dabei erzeugten AbFS-Varianten sollen sowohl in Hefe, als auch in *E. coli* auf ihre lösliche und aktive Expression untersucht werden. Zur näheren Analyse der löslichen Expression ist dabei eine Detektion der Varianten über Immunoblot angedacht.

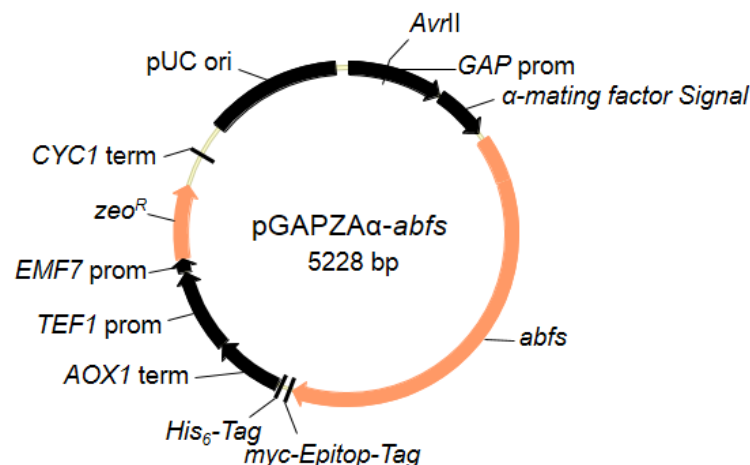
## 2.4 Expression der AbFS in *Pichia pastoris*

Sowohl konventionelle Methoden zur Steigerung der löslichen Expression der AbFS in *E. coli* (siehe Kapitel IV2.1) als auch die gerichtete Proteinevolution der AbFS (siehe Kapitel IV2.2) oder der Terpenyclasedomäne (siehe Kapitel IV2.3), führten bislang zu keiner Isolation des Zielenzym in seiner aktiven Form. Eine Expression in der Hefe *S. cerevisiae* erlaubte zwar ein hohes Produktionslevel des Zielmetaboliten FCdien (siehe Kapitel IV1.3), nicht aber des Zielenzym AbFS (siehe Kapitel IV1.3.2). Immer noch mit dem Ziel vor Augen die Terpensynthese zum Zwecke der Charakterisierung in ihrer aktiven Form zu isolieren, wurde ein erneuter Wechsel des Expressionssystems vorgenommen. Zur heterologen Expression der AbFS wurde der alternative Hefestamm *P. pastoris* etabliert. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* handelt es sich bei *P. pastoris* um einen *Crabtree*-negativen Stamm. Unter aeroben Bedingungen wird kein Ethanol produziert, wodurch wesentlich höhere Zelldichten und Proteinkonzentrationen erreicht werden können.<sup>[192]</sup>

### 2.4.1 Konstitutive Expression der AbFS mit Hilfe des pGAP-Vektorsystems

Analog zu den Experimenten in *S. cerevisiae* sollte zunächst mit der Auswahl des pGAP-Vektorsystems die starke, konstitutive Expression der AbFS unter der Kontrolle des *GAP*-Promoters (Promoter des *P. pastoris* Glyceraldehyd-3-dehydrogenasegens) in *P. pastoris* ermöglicht werden.<sup>[193]</sup> Zur Expression der AbFS wurden im Rahmen dieser Dissertation die *E. coli*-*P. pastoris* Shuttlevektoren pGAPZA-*abfs* und pGAPZA $\alpha$ -*abfs* kloniert (Kapitel V5.7.3). „ $\alpha$ “ steht dabei für die Signalsequenz des  $\alpha$ -mating factors aus *S. cerevisiae* und wurde zur sekretorischen Expression der AbFS N-terminal an das Zielprotein fusioniert (siehe Abbildung 63). Bei der sekretorischen Expression in eukaryotischen Systemen kann es zu einer Glycosylierung der Zielproteine durch die Prozessierung im ER (Endoplasmatischen Retikulum) und im Golgi-Apparat kommen.<sup>[194]</sup> Außerdem wird bei der sekretorischen Expression die Möglichkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken erleichtert. Da die Biosynthese von Terpenen in Pilzen ausschließlich im Cytosol stattfindet, spielen Glycosylierungen oder exponierte Disulfidbrücken für die Tertiärstruktur der AbFS vermutlich keine Rolle. Die sekretorische Expression kann aber trotzdem genutzt werden, um rekombinante Proteine von der komplexen Zellmatrix zu reinigen, da nur sehr wenige *P. pastoris*-eigene Proteine in den extrazellulären Raum sekretiert werden.<sup>[195]</sup>





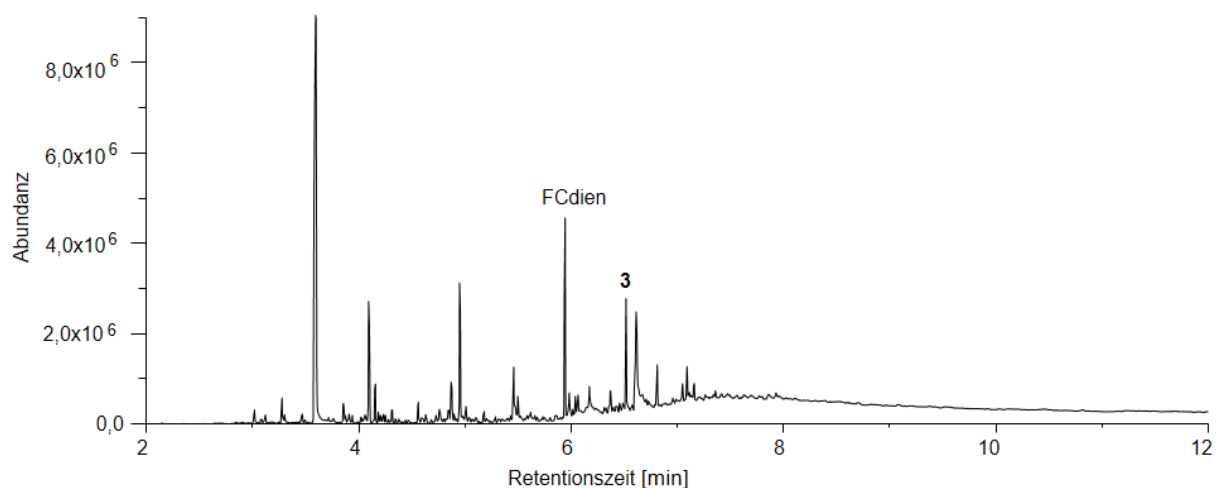
**Abbildung 63: Plasmidkarte des *P. pastoris*-Expressionsvektors pGAPZA $\alpha$ -abfs.** pGAPZA-abfs besitzt die gleichen Eigenschaften, mit Ausnahme des  $\alpha$ -mating factor Signals. pUC ori: Replikationsursprung zur Vervielfältigung des Vektors in *E. coli*, GAP prom: Promoterregion des GAP-Gens aus *P. pastoris*,  $\alpha$ -mating factor Signal: Codierende Sequenz zur sekretorischen Expression, abfs: Codierende Sequenz für die AbFS, Myc-Epitop-Tag: Codiert für die Erkennungssequenz durch den myc-Antikörper, His<sub>6</sub>-Tag: Codierende Sequenz für den Hexahistidin-Tag, AOX1 term: Transkriptionsterminatorregion des Alkoholoxidase 1-Gens aus *P. pastoris*, TEF1 prom: Promotorregion zur Expression des Zeocinresistenzgens in Hefe, EMF7 prom: Promotorregion zur Expression des Zeocinresistenzgens in *E. coli*, zeo<sup>R</sup>: Zeocinresistenzgen, CYC1 term: Transkriptionsterminatorregion des CYC1-Gens aus *S. cerevisiae*.

Die Selektion der pGAP-Vektoren erfolgt sowohl in *E. coli* als auch in *P. pastoris* über eine durch den Vektor vermittelte Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin. Da die Stabilität des Zeocins als Kupferkomplex sowohl von der Salzstärke als auch von dem pH-Wert der Umgebung abhängig ist, ist die Wahl des Expressionsmediums eingeschränkt.<sup>[196]</sup> Zusätzlich variiert die effektive Konzentration dieses Antibiotikums auch von Stamm zu Stamm.<sup>[196]</sup> Die Stabilität des Zeocins bei unterschiedlichen pH-Werten und Zusammensetzungen des Komplexmediums YPD, wurde anhand der Wachstumsfähigkeit des untransformierten Expressionsstammes *P. pastoris* SMD1168H untersucht (Tabelle 12). Die Auswertung des Wachstumsverhaltens erfolgte nach 36 h Kultivierung bei 30°C. Sowohl das starke Wachstum des Expressionsstammes bei Abwesenheit von Zeocin als auch die effiziente antibiotische Wirkung des Zeocins bei geringen Konzentrationen von 50 µg/mL, rechtfertigten die Auswahl des gep. YPD-Mediums (siehe Kapitel IV1.1.5) zur Expression der AbFS in *P. pastoris*. Für das *P. pastoris*-Expressionssystem wurden bislang keine autosomal replizierenden Plasmide entwickelt. Die Integration des Vektors erfolgte über homologe Rekombination in den GAP-Lokus des Wirtsgenoms. Um die Wahrscheinlichkeit einer Insertion an diese Stelle zu erhöhen, wurden die Vektoren vor der Transformation jeweils mit AvrII linearisiert, dessen Schnittstelle in der GAP-Promoterregion der Plasmide liegt (siehe Abbildung 63).

**Tabelle 12: Wachstum von *P. pastoris* SMD1168H in YPD-Medium mit unterschiedlichen pH-Werten und Zeocinkonzentrationen.** <sup>1</sup>: YPD-Medium mit Pepton aus Casein, <sup>2</sup>: Tris-gepuffertes YPD-Medium mit Pepton aus Soja und 1 mM MgCl<sub>2</sub>, ++: starkes Wachstum, +: geringes Wachstum, -: kein Wachstum.

Zeocin [µg/mL]	YPD <sup>1</sup> (pH 6,5)	YPD <sup>1</sup> (pH 7)	YPD <sup>1</sup> (pH 7,5)	YPD <sup>1</sup> (pH 8)	gep. YPD <sup>2</sup> (pH 7,6)
0	++	++	+	-	++
50	+	++	+	-	-
100	+	+	-	-	-
150	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-

Nach der Transformation von *P. pastoris* SMD1168H (Tabelle 17) mit pGAPZA-*abfs* und pGAPZA $\alpha$ -*abfs* über die PEG-Methode (Polyethylenglycolmethode, Kapitel V6.1.3) wurden die Zellen auf zeocinhaltigen gep. YPD-Agarplatten selektiert.<sup>[197]</sup> Im Rahmen der Masterarbeit von Hendrik Ebke wurden schließlich Testexpressionen durchgeführt.<sup>[191b]</sup> Die Expression von jeweils vier Klonen erfolgte für 48 h in gep. YPD-Medium bei 30°C. Zur Analyse der cytosolischen Expressionen wurden die Zellen anschließend mechanisch lysiert (Kapitel V7.2.3). Im Falle der sekretorischen Expressionen wurden die Zellen von dem Medium durch Zentrifugation abgetrennt und lediglich der Medienüberstand untersucht. Selbst nach starker Aufkonzentrierung des Medienüberstandes oder des Lysats (Kapitel V7.2.4) war über SDS-PAGE-Analyse keine sekretorische oder cytosolische Überexpression eines Enzyms mit dem Molekulargewicht der AbFS erkennbar (nicht gezeigt). Trotzdem konnte durch die Analyse der Gesamtkulturextrakte über GC-MS eine deutliche Produktion des FCdien- und des FCdien-Isomers **3** (siehe Kapitel IV1.3) bei der cytosolischen Expression der AbFS (Abbildung 64) detektiert werden. Dies zeigte, dass die AbFS in dem gewählten Expressionssystem aktiv war. Dennoch wurde das Zielenzym mit einer sehr geringen Expressionsrate im Cytosol von *P. pastoris* exprimiert, so dass ein Nachweis über SDS-PAGE nicht möglich war (nicht gezeigt). Erwartungsgemäß wurde bei der sekretorischen Expression der AbFS kein FCdien-Signal erhalten. Bei der sekretorischen Expression wird das Zielenzym durch die Signalsequenz des  $\alpha$ -*mating signal factors* direkt ins ER dirigiert. Dadurch kommt das Enzym nicht in Kontakt mit den Terpenintermediaten im Cytosol der Zelle und die nachzuweisende Reaktion zu FCdien kann nicht katalysiert werden.



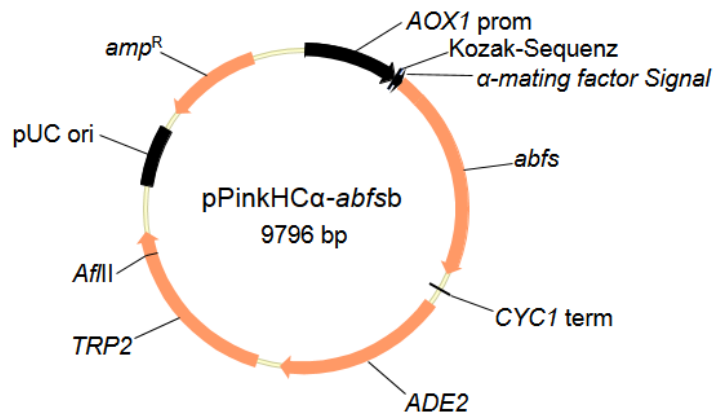
**Abbildung 64: Gaschromatogramm eines Gesamtrohextrakts nach Kultivierung des mit pGAP-abfs transformierten *P. pastoris* SMD1168H-Expressionsstamms.** Sowohl FCdien als auch das FCdien-Isomer **3** wurden in signifikanten Mengen gebildet. Das hier dargestellte Ergebnis wurde im Rahmen der Masterarbeit von Hendrik Ebke erzeugt.<sup>[191b]</sup>

#### 2.4.2 Induzierbare Expression der AbFS mit Hilfe des pPink-Vektorsystems

Neben konstitutiven Promotoren stehen für die Expression von rekombinanten Proteinen in *P. pastoris* auch induzierbare Promotoren zur Auswahl. Als methylotrrophe Hefe ist *P. pastoris* dazu in der Lage Verbindungen mit einem Kohlenstoffatom, wie Methanol, als Kohlenstoffquelle und Energiequelle zu metabolisieren.<sup>[198]</sup> Die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd wird durch das Enzym AOX (Alkoholoxidase) katalysiert.<sup>[199]</sup> Zur Kompensation der schlechten Affinität dieses Enzyms zu molekularem Sauerstoff wird die AOX in sehr hohen Leveln in *P. pastoris* exprimiert. Insbesondere das *AOX1*-Gen ist für den Großteil der AOX-Population in der Zelle verantwortlich und wird strikt auf Transkriptionsebene reguliert.<sup>[200]</sup> Ist Glucose im Medium, findet überhaupt keine Expression der AOX statt, wohingegen in Anwesenheit von Methanol und Abwesenheit von Glucose, bis zu 5% der mRNA allein für *AOX1* codieren.<sup>[199]</sup> Diese Eigenschaft des *AOX1*-Promoters, kann zur starken induzierbaren Überexpression rekombinanter Enzyme eingesetzt werden.<sup>[201]</sup>

Um zu überprüfen, ob ein hohes Expressionslevel der AbFS in *P. pastoris* durch den Einsatz des induzierbaren *AOX1*-Promoters erzielt werden kann, wurden die Vektoren pPinkHC-abfsa und pPinkHCα-abfsb zur cytosolischen und sekretorischen Expression des Zielenzym im Rahmen dieser Dissertation kloniert (Kapitel V5.7.3). Zur 2 – 3-fach verstärkten Initiation der Translation wurden die Zielgene in das Leseraster der Kozak-Konsensus-Sequenz dieser Vektoren eingefügt (siehe Abbildung 65). Neben dem Ampicillinresistenzgen zur Selektion und Klonierung der Vektoren in *E. coli*, codieren die pPink-Vektoren für den auxotrophen Marker *ADE2* zur Selektion in *P. pastoris*. Das Genprodukt von *ADE2* katalysiert den sechsten Schritt

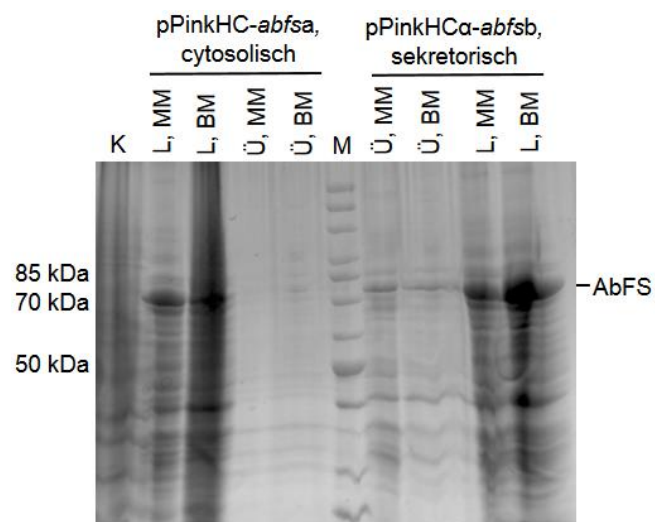
in der Adeninbiosynthese.<sup>[202]</sup> Kompatible Expressionsstämme weisen im untransformierten Zustand eine Auxotrophie gegenüber Adenin auf. Eine Ansammlung von Purinintermediaten in der Vacuole der Zellen führt zu einer roten Pigmentierung der Hefekolonien.<sup>[203]</sup> Daher können nach einer erfolgreichen Transformation, anhand der Färbung der Kolonien, Rückschlüsse auf die Häufigkeit der Integration des Expressionsplasmids in das Genom gezogen werden. Desto mehr Kopien des Vektors in das Genom integriert werden, desto weißer sind die Kolonien. Leicht rosafarbene Kolonien erscheinen, wenn nur wenige Kopien des Plasmids ins Genom integriert wurden.



**Abbildung 65: Plasmidkarte des *P. pastoris*-Expressionsvektors pPinkHCα-abfsb.** pPinkHC-abfsa besitzt die gleichen Eigenschaften, mit Ausnahme des  $\alpha$ -mating factor Signals. pUC ori: Replikationsursprung zur Vervielfältigung des Vektors in *E. coli*, amp<sup>R</sup>: Ampicillinresistenzgen, AOX1 prom: Promoterregion des AOX1-Gens aus *P. pastoris*, Kozak-Sequenz: Sequenz zur 2-3-fachen Verstärkung der Translationsinitiation,  $\alpha$ -mating factor Signal: Codierende Sequenz zur sekretorischen Expression, abfs: Codierende Sequenz für die AbFS, CYC1 term: Transkriptionsterminatorregion des CYC1-Gens aus *S. cerevisiae*, ADE2: ADE2-Gen als auxotropher Marker, TRP2: TRP2-Gen zur Integration des Vektors in das Genom der Hefe.

Zur Integration der AbFS-codierenden pPink-Vektoren in den TRP2-Lokus des *P. pastoris*-Genoms wurden die Plasmide vor der Transformation mit AflI linearisiert (siehe Abbildung 65). Nach der Selektion der transformierten PichiaPink™ 2-Zellen (Tabelle 17) auf PTA-Selektivmedium ohne Adenin (*Pichia* Transformationsagar, Tabelle 34), wurden nur weiße Kolonien für die Expression der AbFS ausgewählt. Zur schnellen Erzeugung hoher Biomassen wurden die Zellen zunächst in dem glycerolhaltigen, gepufferten Komplexmedium BMGY (Tabelle 34) bis zu einer OD<sub>600</sub> von mindestens 5 angezüchtet und nach Sedimentation in 1/5 des ursprünglichen Kulturvolumens methanolhaltigem Minimalmedium MM oder gepuffertem Komplexmedium BMM (Tabelle 34) aufgenommen. Sowohl die cytosolische als auch sekretorische Expression der AbFS erfolgte für insgesamt 72 h Stunden bei 30°C (Kapitel V6.3.5). Das zur Induktion der Proteinexpression verwendete Methanol kann von dem Expressionsstamm PichiaPink™ 2 metabolisiert werden. Daher wurden während der Kultivierung alle 24 h 0,5% (v/v) Methanol zu dem Medium hinzugegeben. Zur Analyse der

cytosolischen und sekretorischen Expression wurden sowohl das Lysat als auch der Medienüberstand der Expressionskulturen mittels SDS-PAGE untersucht (Abbildung 66).



**Abbildung 66: 10%-iges SDS-Gel zur Analyse der cytosolischen und sekretorischen Expression der AbFS in PichiaPink™ 2 in MM- und BMM-Medium.** K: Kontrolleexpression mit dem untransformierten Expressionsstamm, L: Zellysate, Ü: Medienüberstand (20-fach aufkonzentriert), M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Im Vergleich zu dem untransformierten PichiaPink™ 2-Stamm wies der mit pPinkHC-abfsa transformierte Klon eine deutliche cytosolische Überexpression eines Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 80 kDa auf. Dies entsprach in etwa dem berechneten Molekulargewicht der AbFS mit 79 kDa (ExpASy).<sup>[90]</sup> Eine vergleichbare Bande wurde erwartungsgemäß in den Medienüberständen der zur cytosolischen Expression genutzten Zellen, auch nach starker Aufkonzentrierung, nicht gefunden. In den Medienüberständen der mit pPinkHCα-abfs transformierten Zellen konnte erst nach 20-facher Aufkonzentrierung, eine schwache Bande für ein etwa 80 kDa großes Protein sowohl in der MM- als auch BMM-Kultur, detektiert werden. Eine viel stärkere Intensität dieser Bande wurde jedoch im Cytosol dieser Zellen nachgewiesen. Sofern es sich dabei um die AbFS handelte, konnte also davon ausgegangen werden, dass ein großer Anteil dieses Enzyms nicht effizient sekretiert wurde und in der Zelle zurück blieb.

Bei der Analyse der Gesamtkulturextrakte mittels GC-MS konnten sowohl in den Extrakten der cytosolischen als auch der sekretorischen Expression der AbFS kleine Mengen des FCdiens anhand seines Massenspektrums nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Sowohl die erzielten Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse, als auch die GC-MS-Untersuchungen der Kulturextrakte, wiesen daher auf eine lösliche und aktive cytosolische Expression des Zielenzyms in *P. pastoris* hin. Der Nachweis des FCdiens in den Kulturextrakten der mit pPinkHCα-abfs transformierten Zellen unterstützte die Vermutung, dass eine vollständige sekretorische Expression der AbFS nicht gelang.

Weitere Experimente zur Expression der AbFS in *P. pastoris* werden momentan im Rahmen der Masterarbeit von Hendrik Ebke durchgeführt.<sup>[191b]</sup> Im Vordergrund steht die Reinigung der Terpensynthase, mit dem Ziel das Enzym an die Arbeitsgruppe Ottmann (Universität Eindhofen) für Kristallisationsexperimente weiterzugeben. Desweiteren könnte das hier vorgestellte Expressionssystem auch für die nähere Analyse der löslichen Expression und Aktivität der im Rahmen der gerichteten Proteinevolution (siehe Kapitel IV2.2 und Kapitel IV2.3.3) erstellten Enzymvarianten verwendet werden.

## 2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die lösliche Expression von rekombinanten Proteinen stellt in vielen Fällen eine Herausforderung dar. Viele bekannte Methoden beruhen auf der Variation einer Vielzahl an verschiedenen Bedingungen und sind nicht auf jedes Protein übertragbar. Auch für die AbFS wurden zunächst die Expressionsbedingungen (siehe Kapitel IV1.1.3), das Vektorsystem (siehe Kapitel IV2.1.1) oder der Expressionsstamm (siehe Kapitel IV2.1.2) zur Steigerung der löslichen Expression in *E. coli* variiert. Dabei wurden sowohl Löslichkeitserhöhende Fusionstags, verschiedene Promotersysteme, mögliche Codonlimitierungen als auch die Koexpression von Chaperonen berücksichtigt. Keiner dieser Ansätze führte zu einer erhöhten löslichen Expression der AbFS in dem Prokaryoten.

Alternativ zu Methoden, die auf der Erhöhung der löslichen Expression eines Zielproteins in einem spezifischen Wirtsorganismus beruhen, kann das *Enzyme Engineering* einen Ansatz zur intrinsischen Steigerung der Faltungstabilität und einer damit verbundenen löslichen Expression liefern. Da keinerlei Strukturinformationen für die AbFS oder homologe Enzyme bekannt sind, bot sich für die Einführung von Löslichkeitserhöhenden Mutationen in die AbFS die gerichtete Proteinevolution an. Dabei wurden verschiedene AbFS-Varianten über *epPCR* erzeugt und potentiell lösliche Enzyme über den agarplattenbasierten  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassay (siehe Kapitel IV2.2.2) isoliert. Bei Testexpressionen in Flüssigmedium zeigte jedoch keine der isolierten Varianten eine detektierbare erhöhte lösliche Expression. Außerdem gestaltete sich der Nachweis der Enzymaktivität der erstellten Varianten als unzuverlässig. Die Experimente zur gerichteten Proteinevolution wurden zunächst eingestellt.

Im Gegensatz zu der Expression des Gesamtproteins AbFS konnte für die separate Expression der Prenyltransferasedomäne GGPPS eine Bande im löslichen Überstand des *E. coli*-Zelllysats nachgewiesen werden (siehe Kapitel IV2.3.2). Die Terpenicyclasedomäne FCyc wurde in *E. coli* jedoch nicht löslich exprimiert. Dies legte nahe, dass die lösliche Expression des Gesamtproteins AbFS durch die unlösliche Expression der FCyc-Domäne

limitiert war. Um eine Steigerung der löslichen Expression der FCyc-Domäne zu erreichen wurde die gerichtete Proteinevolution der FCyc-Domäne etabliert (siehe Kapitel IV2.3.3).<sup>[188-189]</sup> Hierbei konnten bereits in einer ersten Generation unterschiedliche *Hot Spots* identifiziert werden.<sup>[188-189]</sup> Der Nachweis der enzymatischen Aktivität und der löslichen Expression der erstellten Varianten sind momentan Gegenstand der Masterarbeit von Hendrik Ebke.<sup>[191b]</sup> Hierbei sollen die Mutationen aus dem FCyc-Fragment in das Gesamtprotein AbFS übertragen werden und alle erstellten AbFS-Varianten sowohl in Hefe, als auch in *E. coli* untersucht werden.

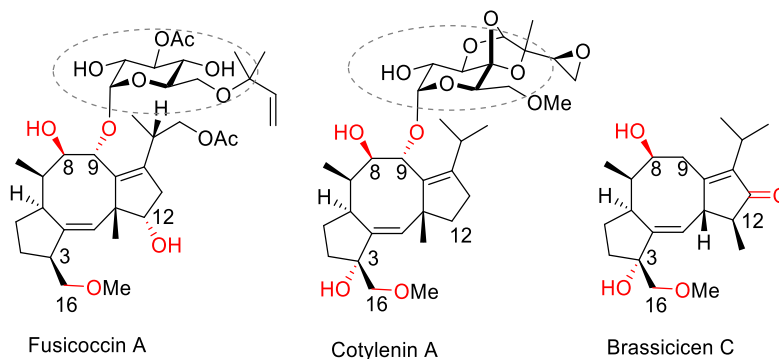
Obwohl im Falle des FCyc-Fragments *Hot Spots* mit Hilfe des  $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassays identifiziert wurden, stellte sich das Screeningsystem insgesamt als unzuverlässig dar. Es wurden trotz etlicher Optimierungsversuche des Reporterkonstrukts und der Screeningbedingungen sehr viele falsch-positive Klone mit Leserasterverschiebungen isoliert (siehe Kapitel IV2.2.2 c und Kapitel IV2.3.3), dessen Entstehungen vermutlich zum größten Teil auf eine Reinitiation der Translation der mRNA durch im Leseraster liegende Startcodons und im richtigen Abstand vorangestellten Pseudo-Shine-Dalgarno-Sequenzen zurück geführt werden können. Diese Probleme sind auch für andere Fusionsreportermethoden bekannt (persönliche Mitteilung, Andreas Vogel, c-LEcta). Daher wäre es in Zukunft sinnvoll andere Screeningprozeduren für die Identifikation löslicher Varianten zu verwenden. Zur Auswahl ständen beispielsweise Stressreportermethoden oder direkte Methoden (siehe Kapitel IV2.2.1).

Neben *E. coli* wurde der Wirtsorganismus *P. pastoris* für die Expression der AbFS etabliert (siehe Kapitel IV2.4). SDS-PAGE- und GC-MS-Analysen wiesen auf eine lösliche und aktive Überexpression der AbFS in dem induzierbaren Expressionssystem PichiaPink™ 2 hin (siehe Kapitel IV2.4.2). Damit stellt dieses System ein hohes Potential zur Isolation der nativ und aktiv gefalteten AbFS dar. Sowohl die Expressionsoptimierung als auch die Reinigung der AbFS sind ebenfalls momentan Ziele der Masterarbeit von Hendrik Ebke.<sup>[191b]</sup> Die isolierte, nativ gefaltete AbFS könnte an den Arbeitskreis Ottmann (Universität Eindhofen) zur Kristallisation dieses interessanten und seltenen bifunktionellen Enzyms weitergereicht werden. Außerdem könnte *P. pastoris* einen geeigneten Wirtsorganismus zur gleichzeitigen Analyse der aktiven und löslichen Expression der erstellten AbFS-Varianten liefern.

### 3 Versuche zur Oxidation des FCdiens

Neben der Etablierung einer Methode zur präparativen Erzeugung des Fusicoccanintermediats FCdien (siehe Kapitel IV1) und der Isolation der nativ gefalteten Terpensynthase AbFS (siehe Kapitel IV2), rückte die Derivatisierung des unfunktionalisierten Diterpens in den Fokus. Struktur-Wirkungsstudien und Kokristallstrukturanalysen legen die Vermutung nahe, dass neben den vorwiegend hydrophoben Wechselwirkungen auch einige Wasserstoffbrückenbindungen essentiell für die Bindung der Fusicocane an ihre Zielproteinkomplexe sind (siehe Kapitel IV1.1.1).<sup>[39b,c,g,44e,f,h,204]</sup> Unterstützt wurden diese Befunde durch die im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit dem Arbeitskreis Ottmann (Universität Eindhoven) durchgeführten Fluoreszenz-Polarisations- und Kristall-*Soaking*-Experimente, bei denen keine Bindung des unfunktionalisierten FCdiens mit den 14-3-3-Protein/PMA2-Peptid-Komplexen nachgewiesen werden konnten.

Die Kohlenstoffgrundgerüste der Diterpenfusicocane werden vorwiegend durch Oxyfunktionen dekoriert und tragen häufig eine Zuckereinheit an C9 (Abbildung 67).



**Abbildung 67:** Die Diterpenfusicocane sind vorwiegend mit Oxyfunktionen dekoriert (rot) und sind häufig an C9 glycosyliert (umkreist). Hier am Beispiel der drei bekanntesten Vertreter Cotylenin A, Fusicoccin A und Brassicinen C veranschaulicht.

Während Kristallstrukturmodelle (siehe z.B. Kapitel IV1.1.1, Abbildung 18) zeigen, dass die Glycosidreste vorwiegend lösungsmittlexponiert sind und daher vermutlich eher eine Löslichkeitsvermittelnde Rolle spielen, ist insbesondere die Oxyfunktionalisierung an C16 direkt an der Bindung der Fusicocane am ubiquitären Strukturprotein 14-3-3 beteiligt.<sup>[44e,f]</sup> Weiterhin scheint die Wasserstoffbrücke ausgehend von der Hydroxyfunktion an C8 ein konserviertes Bindungsmotiv bei der Stabilisierung der Zielproteinkomplexe durch die Fusicocane zu sein. Unterstützt wird dieses Bild durch Struktur-Wirkungsbeziehungen, bei denen die Aktivität der Fusicocane durch Modifikationen im Glycosidrückgrat nur marginal beeinflusst wird.<sup>[39b,c,204]</sup> Veränderungen in der 5-8-5-Diterpengrundstruktur und im Oxidationsmuster können hingegen einen großen Einfluss auf die physiologische Wirkung haben. Epimerisierungen an C3 oder C9 werden gar nicht toleriert und resultieren in einem vollständigen Verlust der Affinität der



Fusicoccanderivate an den binären 14-3-3-PMA2-Komplex.<sup>[39b,204a]</sup> Die Hydroxylgruppe an C12 des Fusicoccin A scheint verantwortlich für die Bindung des Metabolits im Modus III-Motiv (siehe Kapitel II1.1.2, Tabelle 1) an die Zielproteinkomplexe und eine damit verbundene, im Vergleich zu Cotylenin A, geringere Aktivität in Säugetierzellen zu sein.<sup>[44f,54b]</sup> Eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von myeloischen Leukämiezellen könnte außerdem die Hydroxylgruppe an C3 spielen, die sowohl in Cotylenin A als auch in Brassicinen C, nicht aber in Fusicoccin A vorkommt.<sup>[51a]</sup>

Um simple, bioaktive Fusicoccananaloge zu erzeugen, wurde sich daher auf die Oxidation des biosynthetisch hergestellten FCdiens konzentriert. Während rein chemische Methoden die Funktionalisierung von aktivierten Kohlenstoffzentren ermöglichen können, bieten enzymatische Ansätze eine Strategie zur regio- und stereoselektiven Oxidation unaktivierter Kohlenstoffatome.<sup>[205]</sup>

Im Rahmen der Aufklärung der Fusicoccanbiosynthese wurden fast alle Enzyme zur Dekoration des FCdiens und zur Komplementierung der Fusicoccan A-Biosynthese und die verantwortlichen Enzyme zur C3-, C8- und C16-Hydroxylierung sowie O16-Methylierung des Brassicinen C identifiziert (siehe Kapitel II1.1.2, Abbildung 9).<sup>[51,53b,54]</sup> Prinzipiell könnten daher die nativen Mono- und Dioxygenasen aus der Fusicoccanbiosynthese zur Oxidation des FCdiens genutzt werden. Um dabei präparative Ausbeuten der oxidierten FCdien-Derivate zu erzeugen, wäre jedoch eine intensive Optimierung der Koexpression dieser Enzyme notwendig.<sup>[51a,53b,54a]</sup> Darüber hinaus könnten lediglich bereits bekannte Derivate des FCdiens erzeugt werden. Um den Herstellungsprozess der FCdien-Derivate zu vereinfachen und eine höhere Diversität zu ermöglichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Varianten der, in der Biokatalyse etablierten, Monooxygenase BM3 (Cytochrom P450 BM-3) aus *Bacillus megaterium* für die Oxidation des biosynthetisch hergestellten FCdiens verwendet.<sup>[206]</sup>

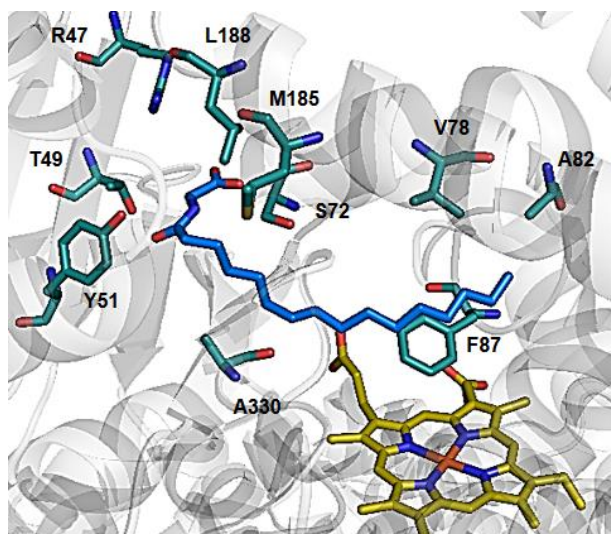
### **3.1 Oxidation des FCdiens mittels Varianten der Monooxygenase Cytochrom P450 BM3**

CYP (Cytochrom P450) Monooxygenasen sind ubiquitäre Hämproteine, die sowohl an der Biosynthese von komplexen Naturstoffen als auch an der Degradierung und Detoxifizierung von lipophilen Substanzen in der Zelle beteiligt sind.<sup>[206b]</sup> Die katalysierten Reaktionen umfassen *N*- und *O*-Dealkylierungen, *S*-Oxidationen, Epoxidierungen von C-C-Doppelbindungen, *N*-Hydroxylierungen sowie Hydroxylierungen von unaktivierten C-H-Bindungen.<sup>[207]</sup> Dabei wird ein Sauerstoffatom aus molekularem O<sub>2</sub> unter reduzierenden Bedingungen auf das Substrat übertragen, wobei NAD(P)H (reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)s) bis auf wenige Ausnahmen als Elektronendonator

dient.<sup>[208]</sup> Während die Aktivität vieler CYPs abhängig von der Interaktion mit anderen Redoxpartnerproteinen ist, wird die elektronenübertragende FAD-FMN-Reduktasedomäne (Flavinmononukleotid-Flavindiadeninnukleotid-Reduktase) in BM3 zusammen mit der Monooxygenasedomäne an einem etwa 119 kDa schweren Polypeptidstrang translatiert.<sup>[209]</sup> Dies verleiht dem Enzym vorteilhafte katalytische Eigenschaften, was sich in einer hohen Umsatzgeschwindigkeit ( $k_{cat}$ ) und einer guten Kupplungseffizienz (seltene Reduktion des Häms in Abwesenheit des gebundenen Substrats) auswirkt.<sup>[210]</sup> Darüber hinaus ist BM3 nicht membrangebunden und kann, im Gegensatz zu vielen anderen CYPs, im großen Maßstab löslich in *E. coli* exprimiert werden.<sup>[209,211]</sup>

Mittlerweile sind Kristallstrukturmodelle der Hämdomäne dieses Enzyms im ungebundenen und substratgebundenen Zustand veröffentlicht.<sup>[212]</sup> Obwohl BM3 langkettige Fettsäuren als natürliche Substrate akzeptiert (siehe Abbildung 68), konnten in zahlreichen zufälligen, semi-rationalen sowie rationalen Mutagenesestudien BM3-Varianten zur Oxidation unterschiedlicher unnatürlicher Substrate isoliert werden.<sup>[209,213]</sup> Die Substratbreite reicht dabei von kurzkettigen Alkanen, cyclischen Molekülen, bis hin zu großen, sterisch anspruchsvollen Terpenen und Steroiden.<sup>[104d,206a,214]</sup> Eine wichtige Rolle bei der Orientierung des Substrats innerhalb der Hämdomäne scheint die Aminosäure F87 zu spielen (siehe Abbildung 68). Eine Mutation zu Alanin oder anderen kleineren Aminosäuren an dieser Position kann den Raum in der Nähe des Häms vergrößern und dadurch die Regio- und Stereoselektivität der katalysierten Oxidationsreaktionen beeinflussen sowie die Akzeptanz sterisch anspruchsvoller und cyclischer Substrate ermöglichen.<sup>[206a,214b,e,215]</sup>

Um zu überprüfen, ob FCdien ebenfalls durch BM3 oder einer seiner Varianten oxidiert werden konnte, wurden die Plasmide pETM11-*bm3* und pET27mod-*F87A* konstruiert (Kapitel V5.7.5). Außerdem wurde unserem Arbeitskreis eine BM3-Bibliothek zur Verfügung gestellt, die ursprünglich in der Arbeitsgruppe Reetz von Sabrina Höbenreich (Universität Marburg) für die Oxidation des multicyclischen Steroids Testosteron erstellt wurde und auf der BM3-F87A-Variante als Templat beruhte.<sup>[206a]</sup> Testosteron konnte bereits durch die F87A-Variante unselektiv oxidiert werden.<sup>[206a]</sup> Mit der Absicht eine kleine und fokussierte BM3-Bibliothek für die regio- und stereoselektive Oxidation des sterisch anspruchsvollen Steroids zu erzeugen, wurden anhand des Kokristallstrukturmodells zwischen der BM3-Hämdomäne und der Fettsäure *N*-Palmitoylglycin verschiedene, in den Substratbindetunnel zeigende, Aminosäurereste für die Mutagenese ausgewählt (Abbildung 68).<sup>[206a,212b]</sup>



**Abbildung 68:** Ausschnitt des Kokristallstrukturmodells der BM3-Hämdomäne (PDB: 1JPZ) mit der Fettsäure N-Palmitoylglycin (blau) und gekennzeichneten Aminosäureresten (türkisfarbend), die zur Oxidation des Steroids Testosteron mutiert wurden.<sup>[206a,216]</sup> Das Häm im katalytischen Zentrum ist in Gelb dargestellt.

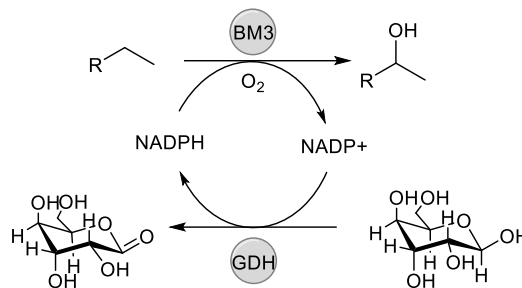
Um kooperative Effekte nebeneinander liegender Aminosäurereste zu ermitteln wurden nach dem CAST-Konzept (*Combinatorial Active Site-Saturation Test*) die drei Bereiche A (R47, T49, Y51), B (V78, A82) und C (M185, L188) in einer ersten Generation zunächst einzeln über Sättigungsmutagenese randomisiert mutiert, wobei bei den Bereichen A und C zur Reduzierung des Screeningaufwandes ein reduzierter Codonsatz verwendet wurde.<sup>[206a,217]</sup> Außerdem wurden ebenfalls zur Verringerung des Screeningaufwands S72 und A330 lediglich als einzelne Aminosäurereste mutiert.<sup>[206a]</sup> In der zweiten Generation wurden die Mutationen der Bereiche A und B miteinander kombiniert und dabei etwa insgesamt 150 verschiedene BM3-Varianten mit einem veränderten Substratbindetunnel erstellt.<sup>[216]</sup> Neben der anvisierten regioselektiven Oxidation des Testosterons durch einzelne Varianten waren andere Varianten auch in der Lage die regioselektive Oxidation des Steroids Progesteron zu katalysieren.<sup>[206a]</sup> Unter der Annahme, dass die eingeführten Mutationen auch die Oxidation nicht-steroidaler, sterisch anspruchsvoller Substrate ermöglichen können, wurden ausgewählte Varianten dieser Bibliothek auch für die Oxidation des tricyclischen Diterpens FCdien getestet.

### 3.1.1 Etablierung eines Kofaktorregenerationssystems für die biokatalysierten BM3-Reaktionen

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits eine Methode zur Isolation des gereinigten FCdiens etabliert wurde (siehe Kapitel IV1.1.5), lag eine *in vitro* Oxidation des Diterpens durch die BM3-Varianten nahe. Dabei sollten die Enzymvarianten einzeln in *E. coli* BL21-Gold(DE3)

exprimiert werden und nach Permeabilisierung der bakteriellen Zellwand die Oxidation nach Zugabe des FCdiens in Lösung bewerkstelligt werden.<sup>[206a]</sup>

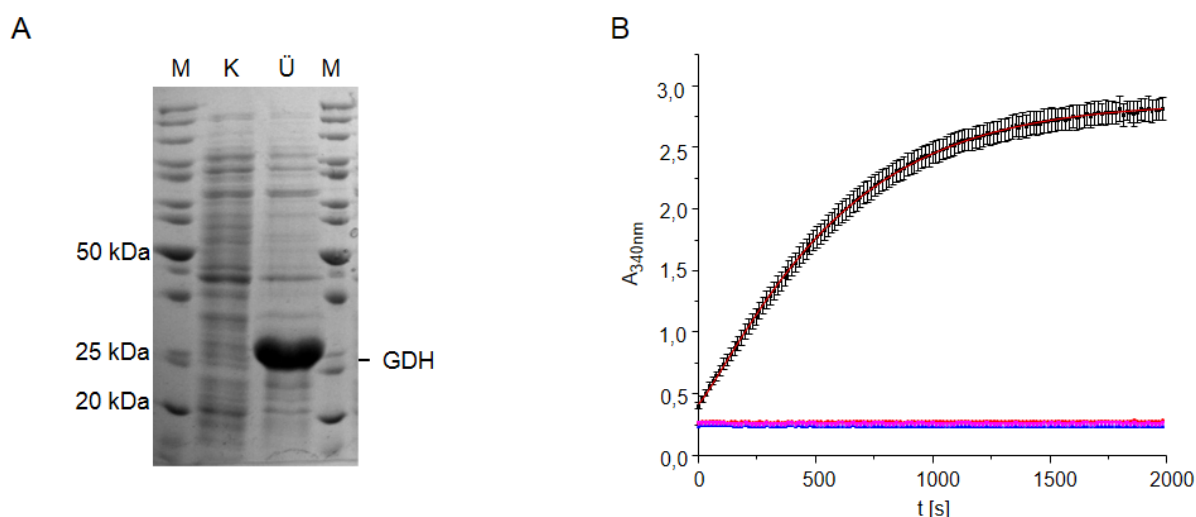
Die Aktivität der BM3 ist von der Anwesenheit des Kofaktors NADPH abhängig. Um Kosten zu sparen, werden in der Biokatalyse routinemäßig Systeme zur *in situ* Regeneration teurer Kofaktoren verwendet, die einen Einsatz der Kofaktoren in einem katalytischen Maßstab ermöglichen.<sup>[218]</sup> Am häufigsten wird die Kofaktorregeneration durch die Kupplung mit anderen enzymatischen Reaktionen erreicht. Hier wurde zunächst die BM3-katalysierte Reaktion mit der Reaktion der GDH (Glucose-1-Dehydrogenase) aus *B. megaterium* kombiniert.<sup>[219]</sup> Während BM3 bei der Oxidation von kohlenstoffreichen Verbindungen NADPH zu NADP<sup>+</sup> umwandelt, reduziert die GDH unter Verbrauch des Substrats Glucose NAD(P)<sup>+</sup> zu NAD(P)H (Abbildung 69).



**Abbildung 69: Schematische Darstellung der durch die BM3 und GDH katalysierten Reaktionen.**

Das Plasmid pACYC-*gdhB.m.* (Tabelle 23) zur Expression der GDH in *E. coli* wurde ebenfalls im Arbeitskreis Reetz durch Sabrina Höhenreich kloniert. Die Expression erfolgte in BL21-Gold(DE3) durch die Induktion mit 1 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 für insgesamt 6 h bei 30°C (Kapitel V6.2.6). Zum Nachweis der löslichen Expression (Abbildung 70 A) und der Aktivität dieses Enzyms (Abbildung 70 B) wurden die Expressionszellen mechanisch lysiert (Kapitel V7.2.1). Der Nachweis enzymatischer Aktivität erfolgte durch die photometrische Messung bei dem NADPH-Absorptionsmaximum von 340 nm direkt aus dem Zelllysat (Kapitel V7.6.1). Eine Zunahme der NADPH-Konzentration konnte erwartungsgemäß nur beobachtet werden, wenn sich gleichzeitig Zelllysat, NADP<sup>+</sup> und Glucose in der Reaktionsmischung befanden. Eine Aktivität *E. coli*-eigener Proteine wurde durch entsprechende Kontrollen ausgeschlossen.

Anschließend wurde das aktive Zelllysat aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung für die BM3-katalysierten Reaktionen eingefroren. Die Aktivität der Präparate wurde vor der Verwendung für die NADPH-Regeneration durch eine erneute Messung bestätigt.

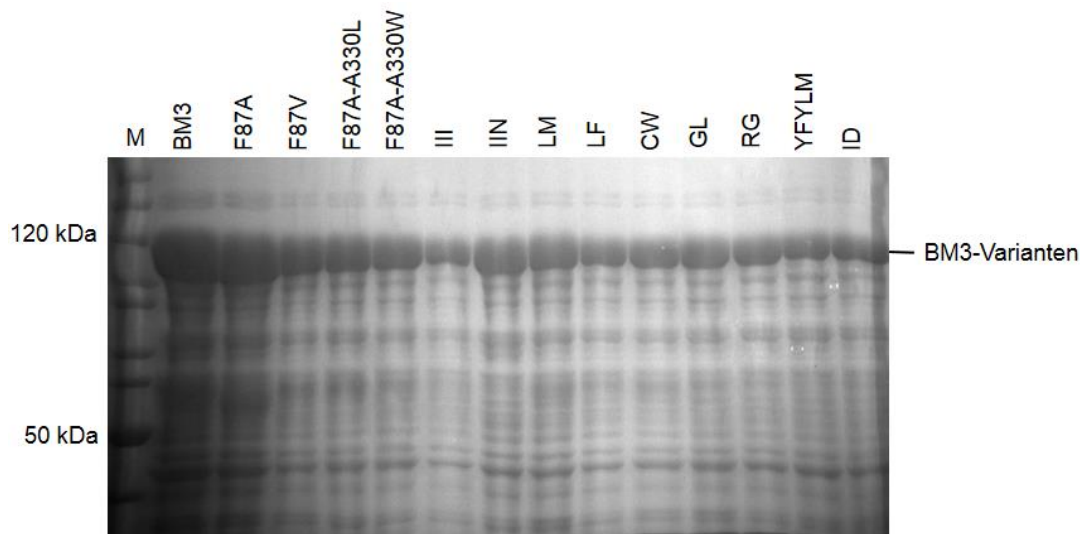


**Abbildung 70: 10%-iges SDS-Gel zur Analyse der Expression der GDH in BL21-Gold(DE3) (A) und NADPH-Assay zum Nachweis der enzymatischen Aktivität (B).** M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific), K: Negativkontrolle, Ü: Löslicher Überstand nach Zellyse, rote Kurve: Zeitlicher Verlauf der Absorption bei 340 nm bei Anwesenheit aller benötigten Reagenzien (Zelllysat, NADP<sup>+</sup> und Glucose), pinkfarbene Kurve: Messung ohne Lysat, violette Kurve: Messung ohne NADP<sup>+</sup>, blaue Kurve: Messung ohne Glucose.

### 3.1.2 Etablierung des Screenings der BM3-Variantenbibliothek für die Oxidation des FCdiens

Um ein effizientes Screening der BM3-Bibliothek zu ermöglichen, wurde zunächst eine standardisierte Methode zur gleichzeitigen Expression vieler Enzymvarianten etabliert. Da für ein erstes Screening zunächst geringe Mengen des Enzyms ausreichen sollten, wurde für die Expression ein 2 mL-Maßstab in Reagenzgläsern gewählt (Kapitel V6.2.5). Zur effektiven Expression der Enzymvarianten in *E. coli* BL21-Gold(DE3), wurde das optimierte BM3-Medium (Tabelle 33) verwendet, bei dem das bekannte Expressionsmedium TB mit einer Spurenelementlösung, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und einer Mischung aus Glycerol, Natriummonoglutamat sowie KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4) angereichert war.<sup>[220]</sup> Außerdem befanden sich in dem BM3-Medium 100 µM IPTG. Dies ermöglichte eine gleichzeitige Induktion der Proteinexpression aller exprimierten Varianten für 16 h bei 30°C durch die Inokulation des Mediums mit 10% einer stark angewachsenen Übernachtskultur.<sup>[216]</sup>

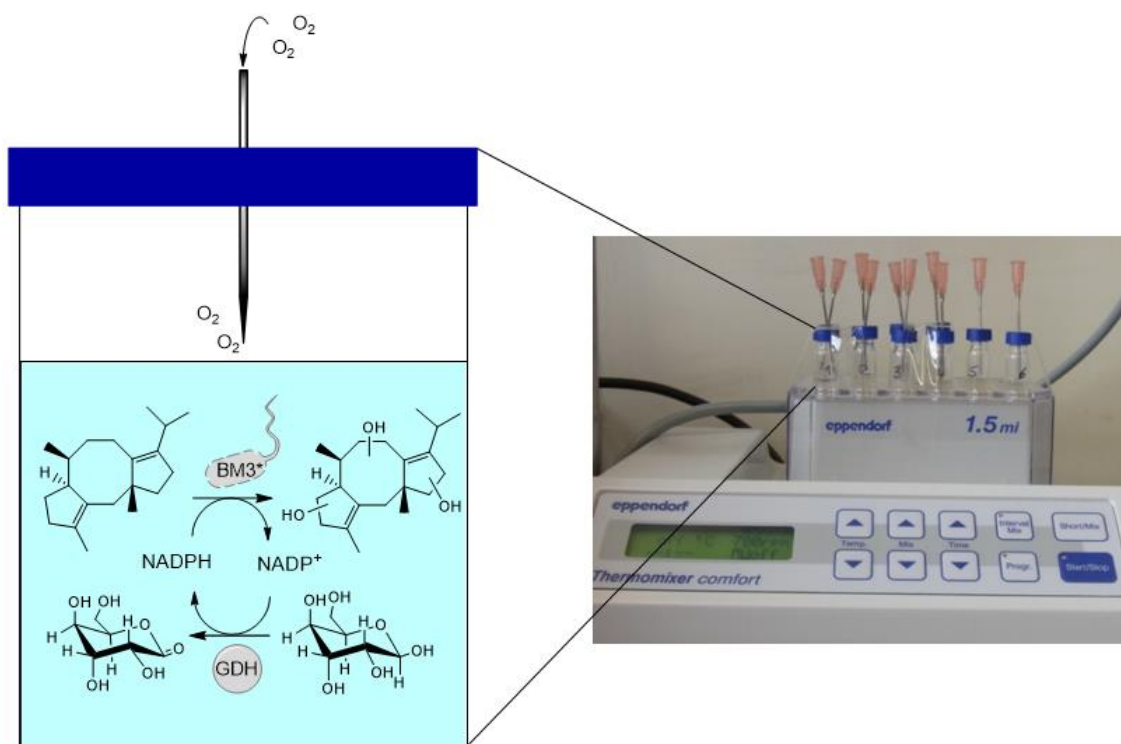
Zur Oxidation des FCdiens wurde sich zunächst auf eine kleine Anzahl an BM3-Varianten konzentriert. Die Auswahl beruhte auf den 13 besten Varianten (Abbildung 71) zur Oxidation des Testosterons und Progesterons im Arbeitskreis Reetz.<sup>[206a]</sup>



**Abbildung 71: 10%-iges SDS-Gel zur Analyse der Expression der verschiedenen BM3-Varianten.** Aufgetragen ist hier jeweils der lösliche Überstand nach der chemischen Zelllyse. Die jeweiligen Mutationen der aufgeführten BM3-Varianten können Tabelle 23 entnommen werden. M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Eine Permeabilisierung der Zellwand wurde durch ein Schockgefrieren der sedimentierten Expressionszellen in flüssigem Stickstoff und einer anschließenden Resuspension der Zellen im EDTA-haltigen BM3-Reaktionspuffer (Tabelle 53) erzielt (Kapitel V8.1). NADPH wurde *in situ* durch die Zugabe von 0,25 mM NADP<sup>+</sup> und 3 µL des GDH enthaltenden Zelllysats (siehe Kapitel IV3.1.1) generiert. Durch das Hinzufügen von 1 mM in *n*-Pentan vorgelöstem Terpen, wurde die BM3-katalysierte Reaktion gestartet. Anschließend wurden die Reaktionslösungen für 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt (Abbildung 72).

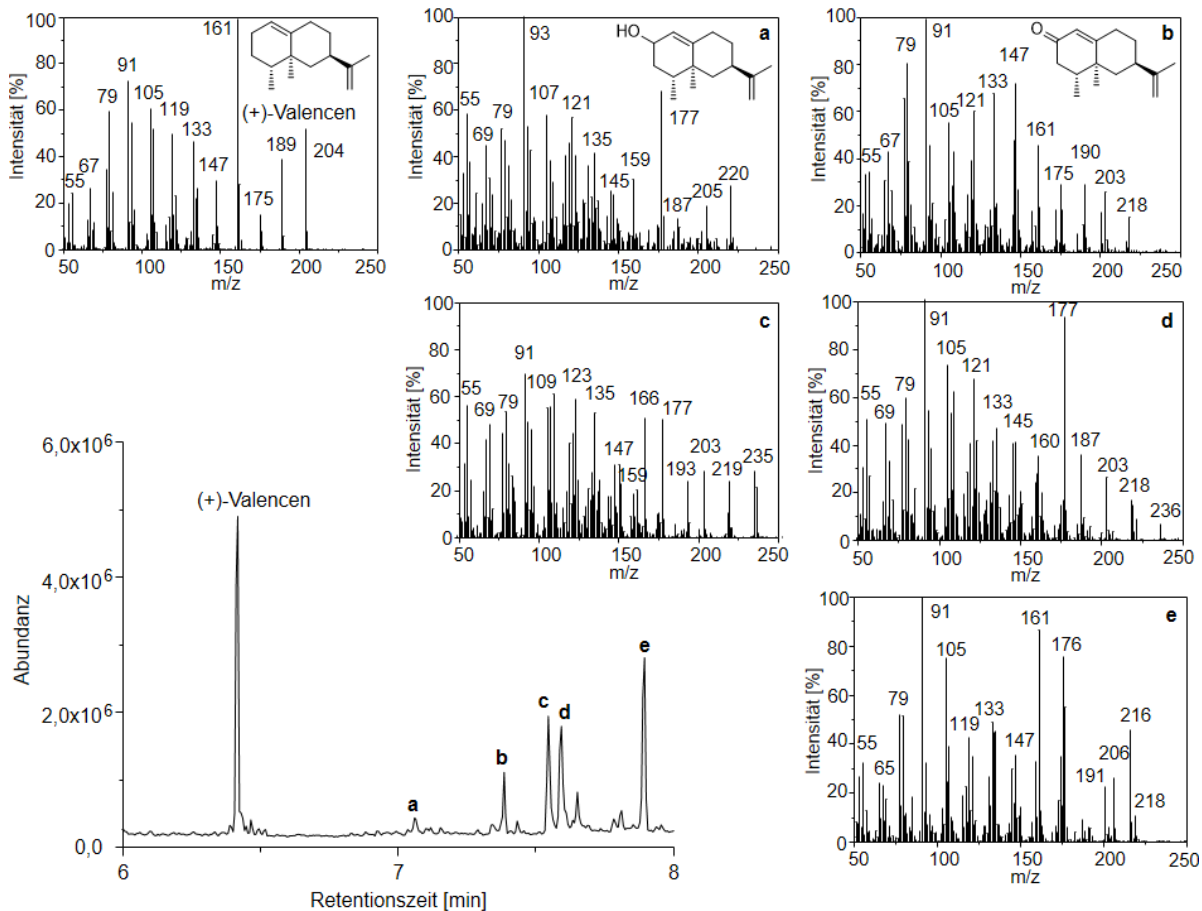
Die Sauerstoffversorgung wurde dabei durch eine in den Deckel des Reaktionsgefäßes befestigte Kanüle gewährleistet. Die Reaktionslösung wurde am nächsten Tag mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert und die organische Phase über GC-MS analysiert. Dabei erfolgte ein Nachweis der Aktivität der getesteten BM3-Varianten und der GDH unter den verwendeten Reaktionsbedingungen jeweils durch eine Kontrollreaktion des unfunktionalisierten Sesquiterpens (+)-Valencen mit der BM3-F87A-Variante.<sup>[214d,e]</sup> Als Negativkontrolle wurden jeweils mit dem pETM11-Leervektor transformierte Zellen mit FCdien inkubiert, um eine Hintergrundreaktion *E. coli*-eigener Enzyme auszuschließen.



**Abbildung 72: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der BM3-katalysierten FCdien-Oxidationen im BM3-Reaktionspuffer.**

Erwartungsgemäß konnte in dem Extrakt der Negativkontrolle nur FCdien in hoher Intensität neben mehreren kleinen Signalen detektiert werden, bei denen es sich vermutlich um, bei der Extraktion gelöste, organische Moleküle aus den *E. coli*-Zellen handelte. Abweichend von den in der Literatur beschriebenen sieben Oxidationsprodukten, konnten unter den hier getesteten Reaktionsbedingungen fünf oxidierte (+)-Valencenderivate detektiert werden (Abbildung 73).<sup>[214d]</sup> Durch den Abgleich mit bekannten Massenspektren konnten die Verbindungen **a** und **b** *cis*- oder *trans*-Nootkatol und Nootkaton zugeordnet werden.<sup>[221]</sup> Die Massenspektren der Signale **c**, **d** und **e** wiesen auf andere di- oder monooxidierte (+)-Valencenderivate hin. Obwohl der Kontrollversuch mit (+)-Valencen darauf hinwies, dass die Enzymvarianten unter den getesteten Reaktionsbedingungen aktiv sein sollten, wurde weder im Falle des Wildtypenzym BM3 noch für eine der 13 Enzymvarianten (siehe Abbildung 71) ein Oxidationsprodukt für FCdien erhalten.

Möglicherweise könnten diese Ergebnisse auf die Auswahl der BM3-Varianten zurückzuführen sein, bei denen eine Bindung des tricyclischen FCdiens innerhalb des Substratbindetunnels nicht möglich war. Die schlechte Wasserlöslichkeit des unfunctionalisierten Diterpens konnte als Ursache für den fehlenden Umsatz jedoch auch nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde sich zunächst im Rahmen unterschiedlicher Ansätze mit dieser Problematik beschäftigt.



**Abbildung 73: Gaschromatogramm und erhaltene Massenspektren bei der F87A-katalysierten Kontrollreaktion von (+)-Valencen in BM3-Reaktionspuffer. a und b konnten cis-/trans-Nootkatol und Nootkaton zugeordnet werden. Bei c, d und e handelt es sich vermutlich um andere mono- oder dioxidierte (+)-Valencenderivate.**

### 3.1.3 Verwendung von ionischen Flüssigkeiten und Cyclodextrinen für die BM3-katalysierte Oxidation des FCdiens

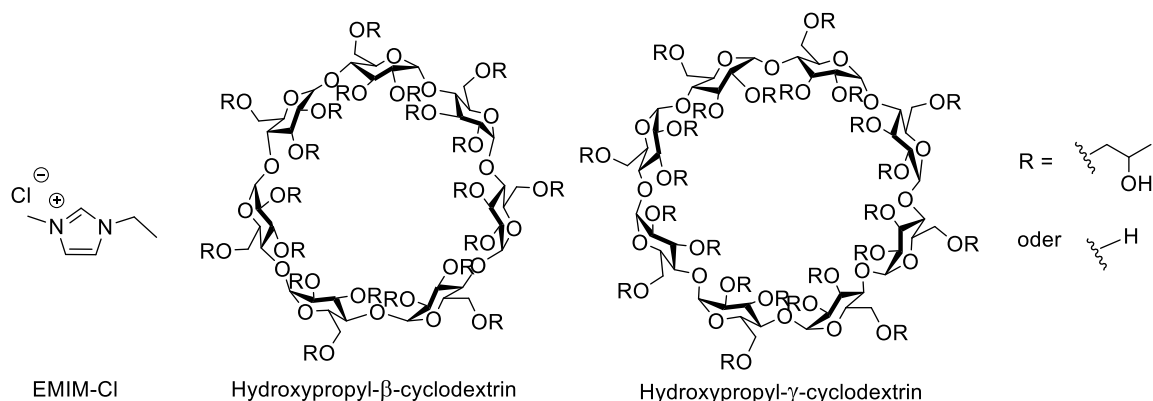
Um die Löslichkeit von hydrophoben Substraten in wässrigen Lösungen zu erhöhen, können mit Wasser mischbare Additive verwendet werden.<sup>[222]</sup>

Bekanntermaßen spielt die Aminosäure F87 der Monooxygenase BM3 eine wichtige Rolle bei der Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln.<sup>[223]</sup> So konnte für die F87A-Variante eine inhibitorische Wirkung durch die Cosolventien DMSO (Dimethylsulfoxid), THF (Tetrahydrofuran), Ethanol, DMF (Dimethylformamid) und Acetonitril nachgewiesen werden.<sup>[223-224]</sup> Im Gegensatz dazu können ionische Flüssigkeiten ebenfalls die Löslichkeit organischer Substrate in wässrigen Lösungen erhöhen, zeigen aber weniger häufig eine inhibitorische Wirkung auf die eingesetzten Biokatalysatoren.<sup>[225]</sup> Auch Cyclodextrine sind durch ihre hydrophilen, außenliegenden funktionellen Gruppen und ihre innenliegenden, etwas lipophileren Kavitäten dazu in der Lage, die Löslichkeit von hydrophoben Substanzen in



wässrigen Lösungen zu vermitteln.<sup>[226]</sup> Die gebildeten Cyclodextrin-Substanz-Komplexe können frei dissoziieren und die Größe der innenliegenden Kavität wird dabei durch die Anzahl der  $\alpha$ -1,4-verknüpften Glucoseeinheiten bestimmt.<sup>[226]</sup>

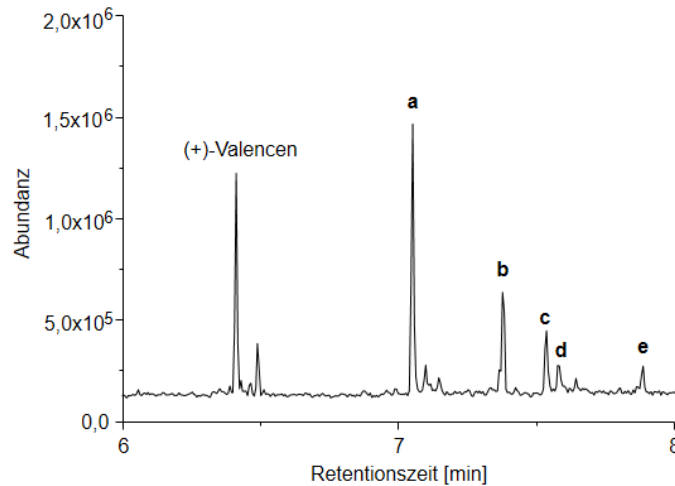
Um den Effekt der ionischen Flüssigkeit EMIM-Cl (1-Ethyl-3-Methylimidazoliumchlorid, Tabelle 53) und der Cyclodextrine Hydroxypropyl- $\beta$ - und Hydroxypropyl- $\gamma$ -Cyclodextrin (Tabelle 53) zu studieren (Abbildung 74), wurden diese Substanzen zunächst in der F87A-katalysierten Kontrollreaktion mit (+)-Valencen als Substrat getestet.<sup>[227]</sup>



**Abbildung 74: Strukturen der eingesetzten löslichkeitserhöhenden Additive EMIM-Cl, Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin und des längerkettigen Hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrins.** Bei den Hydroxypropylcyclodextrinen sind 10 – 45% der freien Hydroxylgruppen der klassischen Cyclodextrine zufällig mit Hydroxypropylgruppen funktionalisiert.

Die Zugabe von BSA (Bovinseryalbumin, Tabelle 53) zu dem Reaktionspuffer sollte dabei eine Stabilisierung der an der Reaktion beteiligten Enzyme gewährleisten.<sup>[228]</sup> Durch das Hinzufügen der verwendeten Additive konnte eine schrittweise Erhöhung der Löslichkeit des (+)-Valencens in den biokatalysierten Reaktionen erzielt werden. Erkennbar ist dies an, der im Vergleich zu der Reaktion ohne Additive, kleineren relativen Intensität des Substrats (+)-Valencens im Verhältnis zu den Oxidationsprodukten **a** - **e** (vgl. Abbildung 73 mit Abbildung 75). Außerdem wurde eine leicht veränderte Intensitätsverteilung der Oxidationsprodukte beobachtet. Während in den Reaktionen ohne Additive und bei der Anwesenheit von EMIM-Cl das Oxidationsprodukt **e** die höchste relative Intensität aufwies (siehe Abbildung 73), wurde bei Anwesenheit der Cyclodextrine eine stärkere Umsetzung zu **a** beobachtet (siehe Abbildung 75). Neben den bereits zuvor getesteten 13 BM3-Varianten (siehe Abbildung 71), wurden weitere 25 Varianten (Tabelle 23) unter Verwendung der optimierten Reaktionsbedingungen für die Oxidation des FCdiens getestet. Dabei konnten bei den Varianten FVY (Mutationen: R47F, T49V und F87A) und LF (Mutationen: V78C, A82F und F87A) Signale mit sehr geringer Intensität detektiert werden, die von ihren Massenspektren her auf mono- oder dioxidierte FCdien-Derivate hinwiesen (nicht gezeigt). Jedoch waren diese Reaktionen nicht reproduzierbar und die entsprechenden Produkte konnten nicht isoliert werden. Diese

Ergebnisse wurden wiederum mit der nicht hinreichenden Löslichkeit des FCdiens in dem wässrigen Puffersystem erklärt. Um den Umsatz zu steigern, wurden daher weitere Systeme für schlecht wasserlösliche Substrate getestet.

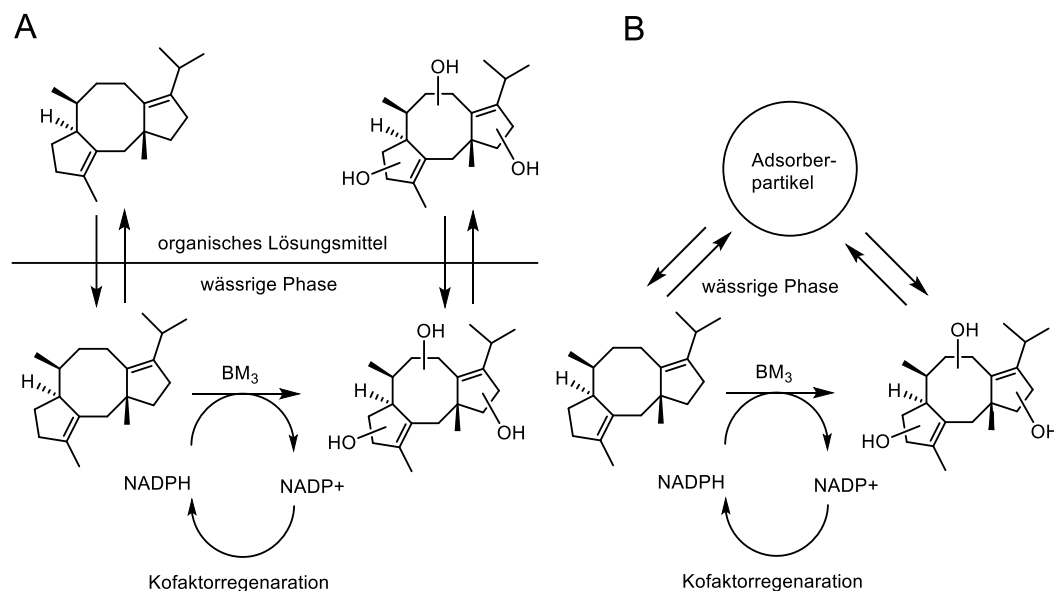


**Abbildung 75: Gaschromatogramm der F87A-katalysierten Kontrollreaktion (+)-Valencen in BM3-Reaktionspuffer mit EMIM-Cl und den beiden Hydroxypropyl- $\beta$ - und - $\gamma$ -cyclodextrinen.**

### 3.1.4 BM3-katalysierte Oxidationsreaktion in zweiphasigen Systemen

Findet ein ständiger Stoffaustausch zwischen einer wässrigen und einer hydrophoben Phase statt, können zweiphasige Systeme den Umsatz schlecht wasserlöslicher Substrate steigern und gleichzeitig eine *in situ* Extraktion der dabei generierten Produkte gewährleisten.<sup>[229]</sup> Bei der zweiten Phase kann es sich entweder um ein organisches Lösungsmittel oder um feste Adsorberpartikel handeln (Abbildung 76). Bei biokatalysierten Reaktionen ist die Wahl der verwendeten, hydrophoben Phase sowohl abhängig von dem Verteilungskoeffizienten des Substrats in den beiden Phasen als auch von der Stabilität des Biokatalysators.<sup>[142,230]</sup> Die Kompatibilität der Monooxygenase BM3 und der zur NADPH-Regeneration genutzten GDH mit einer zweiten hydrophoben Phase wurde anhand der Kontrollreaktion der F87A-Variante mit (+)-Valencen überprüft. Es wurden sowohl die organischen Lösungsmittel MTBE (Methyl-*tert*-butylether), Dodecan, Toluol und Chloroform in unterschiedlichen Konzentration (20 – 40% (v/v)) als auch das feste Adsorbermaterial XAD16N Amberlite® (Sigma-Aldrich) als zweite Phase getestet. Die Sauerstoffversorgung wurde über eine mit Druckluft begaste Kanüle gewährleistet. Bei der Verwendung von Chloroform und Toluol kam es zur sofortigen Denaturierung der Biokatalysatoren. Bei Dodecan und dem Adsorbermaterial Amberlite XAD16N Amberlite® wurde kein Umsatz beobachtet, was vermutlich auf eine starke Retention oder Adsorption des (+)-Valencens in bzw. an die hydrophobe Phase zurückzuführen war. Bei der Verwendung des Ethers MTBE wurden nur sehr geringe Intensitäten der (+)-Valencenoxidationsprodukte detektiert. Dies wies allgemein auf eine verminderte Stabilität der

eingesetzten Biokatalysatoren in MTBE oder auf eine inhibitorische Wirkung des Lösungsmittels hin. Daher wurde auf ein Screening der Variantenbibliothek zur Oxidation des biosynthetisch hergestellten FCdiens verzichtet.



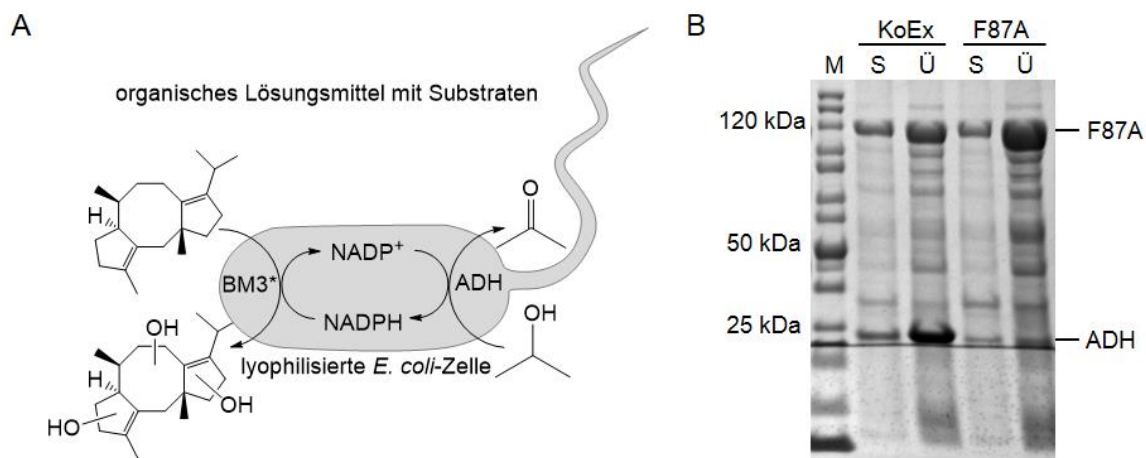
**Abbildung 76: Schematische Darstellung der FCdien-Transformationen in zweiphasigen Systemen.** Als zweite Phase können organische Lösungsmittel (A) oder feste Adsorberpartikel (B) dienen.

### 3.1.5 Versuche zur Terpenoxidation in organischen Lösungsmitteln mittels lyophilisierter Zellen

Um das Problem der schlechten Wasserlöslichkeit hydrophober Substrate zu umgehen, können Biotransformationen unter Ausschluss größerer Mengen Wasser in unverdünnten organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden.<sup>[142,230-231]</sup> Der dabei erzielte Umsatz ist auch hier in erster Linie von der Lösungsmitteltoleranz der eingesetzten Biokatalysatoren abhängig. Eine Stabilitätserhöhung kann durch unterschiedliche, meist aufwendige Methoden, wie das Screening von Additiven oder das *Enzyme Engineering* (siehe Kapitel IV2.2), erreicht werden.<sup>[232]</sup> Ein alternativer Ansatz könnte die Verwendung von lyophilisierten Ganzzellbiokatalysatoren sein.<sup>[231]</sup> Durch die Lyophilisierung wird eine Permeabilisierung der Zellwand erreicht, so dass das Substrat in das Innere der Zelle gelangen kann. Trotzdem wird meist eine hohe Stabilität der in den Zellen befindlichen Enzyme gegenüber der verwendeten Lösungsmittel beobachtet (persönliche Mitteilung A. Jakoblinnert, AG Rother).

Ein lyophilisierter Ganzzellbiokatalysator wurde im Rahmen dieser Arbeit nach Jakoblinnert *et al.* (Arbeitsgruppe Rother, Forschungszentrum Jülich) auch für die  $BM_3$ -katalysierten Oxidationsreaktionen getestet (Abbildung 77 A).<sup>[231]</sup> Anhand der F87A-katalysierten Kontrollreaktion des (+)-Valencens sollte dieses System etabliert werden. Zur effizienten

Regeneration des Kofaktors NADPH wurde, neben der F87A-Variante, auch die ADH aus *Lactobacillus brevis* in *E. coli* BL21-Gold(DE3) koexprimiert (Kapitel V6.2.7, Abbildung 77 B).



**Abbildung 77: Schematische Darstellung des für die Biotransformationen in organischen Lösungsmitteln eingesetzten Ganzzellbiokatalysators (A) und 10%-iges SDS-Gel zum Nachweis der erfolgreichen Koexpression der beiden für die Kontrollreaktion mit (+)-Valencen benötigten Enzyme F87A und ADH (B).** M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific), S/Ü: Sediment und Überstand nach Zellyse, KoEx: Koexpression der F87A und ADH in BL21-Gold(DE3).

Der dafür eingesetzte Expressionsvektor pET21b-*adhL.b.* wurde dafür von der Arbeitsgruppe Schwaneberg (RWTH Aachen Universität) zur Verfügung gestellt (Tabelle 23).

Die lyophilisierten Koexpressionszellen wurden anschließend in MTBE (siehe Kapitel IV3.1.4) aufgenommen und 10 mM (+)-Valencen, sowie unterschiedliche Mengen Isopropanol, als Substrat der ADH, für die Biotransformationen hinzugefügt (Kapitel V8.2). Zur Hydratisierung der in den lyophilisierten Zellen befindlichen Enzyme wurde die Reaktion durch die Zugabe einer geringen Menge BM3-Reaktionspuffer gestartet. Nach 1 h und 20 h wurden Proben als Reaktionskontrolle genommen, jedoch konnten keine Oxidationsprodukte des (+)-Valencens per GC-MS nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Zur Kontrolle der Reaktionen wurde die Aktivität der koexprimierten Enzyme unter den zuvor verwendeten wässrigen Bedingungen (siehe Kapitel IV3.1.3) in den lyophilisierten und in den nicht-lyophilisierten Zellen überprüft. Dabei konnte im Falle der lyophilisierten Zellen kaum Umsatz detektiert werden, während im Falle der nicht-lyophilisierten Zellen die (+)-Valencenoxidationsprodukte **a - e** in der gewohnten Intensität erhalten wurden (nicht gezeigt). Dies wies darauf hin, dass die Aktivität zumindest eines der beiden Enzyme durch den Prozess der Lyophilisierung beeinträchtigt wurde.

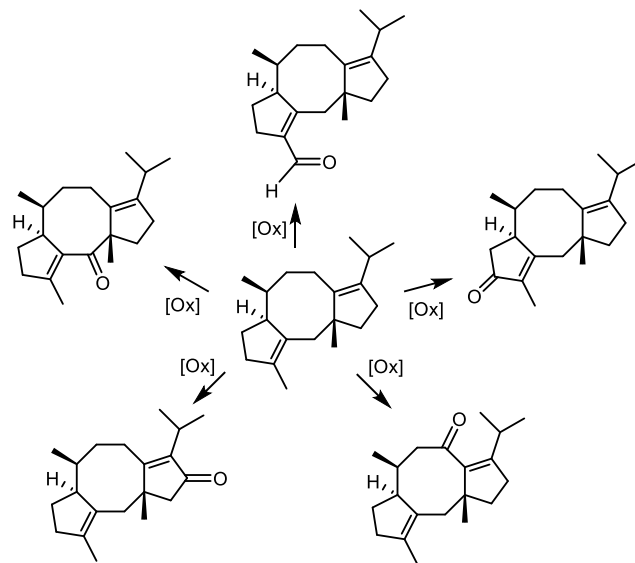
Eine Optimierung der Stabilität der Biokatalysatoren unter den gewählten Bedingungen wurde als aufwendig eingeschätzt. Daher wurden die Versuche zur BM3-katalysierten Oxidation des FCdiens an dieser Stelle eingestellt.

### 3.2 Zusammenfassung und Ausblick

Mit der Absicht neue physiologisch aktive Fusicoccananaloge, ausgehend von dem biosynthetisch hergestellten FCdien (siehe Kapitel IV1), zu erzeugen, wurden unterschiedliche Systeme zur *in vitro* und Ganzzellbiokatalyse getestet. Da CYPs sowohl aktivierte als auch unaktivierte Kohlenstoffzentren oxidieren können, wurde eine Variantenbibliothek der gut charakterisierten Monooxygenase BM3 verwendet. Diese Variantenbibliothek wurde ursprünglich durch Sabrina Höbenreich im Arbeitskreis Reetz (Universität Marburg) zur Oxidation multicyclischer Steroide erstellt (siehe Kapitel IV3.1).<sup>[206a]</sup>

Während die Oxidation des Kontrollsubstrats (+)-Valencen bereits im wässrigen System ohne Löslichkeitserhöhende Additive gelang, konnten unter den gleichen Bedingungen keine Oxidationsprodukte für das Diterpen FCdien detektiert werden (siehe Kapitel IV3.1.2). Zur Erhöhung der Löslichkeit des FCdiens wurden die ionische Flüssigkeit EMIM-Cl und die komplexbildenden Verbindungen Hydroxypropyl- $\beta$ - und - $\gamma$ -cyclodextrin in dem wässrigen Puffersystem eingesetzt (siehe Kapitel IV3.1.3). Dabei konnten zwar bei einzelnen Varianten Signale geringer Intensität mit dem erwarteten *m/z* der FCdien-Oxidationsprodukte detektiert werden, jedoch waren diese Reaktionen nicht reproduzierbar. Um den Umsatz des hydrophoben FCdiens zu steigern, wurden sowohl zweiphasige Systeme (siehe Kapitel IV3.1.4) als auch ein System zur Biokatalyse im organischen Lösungsmittel MTBE mit lyophilisierten Zellen (siehe Kapitel IV3.1.5) getestet. In beiden Fällen wurde eine starke Inhibition der Biokatalysatoren beobachtet. Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit kein zweifelsfreier Nachweis für die Oxidation des FCdiens durch BM3 oder einer seiner Varianten erbracht werden.

Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit des FCdiens werden momentan chemische Methoden, bei denen die benötigten Reaktionen ohnehin in organischen Lösungsmitteln ablaufen, für die Oxidation des FCdiens getestet. Durch die Verwendung allylischer Oxidationsmethoden könnte ein Zugang zu 16-Hydroxyl-FCdien ermöglicht werden, um durch eine anschließende Alkylierung die potentiell physiologisch relevante Verbindung 16-Methoxy-FCdien zu erhalten. Im Rahmen der Dissertation von Stephan Klopries wurden bereits verschiedene, unspezifische allylische Oxidationsmethoden getestet.<sup>[68]</sup> Dabei wurden bislang lediglich bei der Verwendung von einem oder drei Äquivalenten Selenoxid in DCM (Dichlormethan) verschiedene Peaks mit einem *m/z* von 286 in der GC-MS detektiert, bei denen es sich um eines der möglichen allylischen, monooxydierten FCdien-Derivate handeln könnte (Abbildung 78).<sup>[68]</sup>



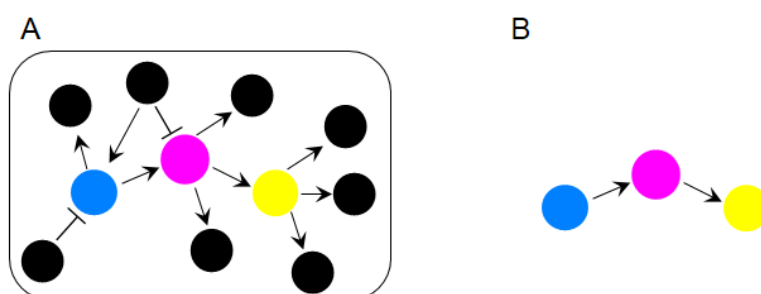
**Abbildung 78: Übersicht über die möglichen allylischen, monooxidierten FCdien-Derivate mit einem  $m/z$  von 286.**

Da jedoch alle Versuche zur Skalierung dieser Reaktionen scheiterten, konnten die dabei gebildeten Produkte bislang nicht isoliert werden. Weitere Methoden zur chemischen Oxidation des FCdiens werden momentan untersucht.

Außerdem wurde biosynthetisch hergestelltes FCdien an die Arbeitskreise von Jullien Drone (Institut Charles Gerhardt Montpellier) und Wolfgang Maison (Universität Hamburg) weitergereicht. In beiden Arbeitskreisen wird an der biokatalytischen Oxidation von komplexen organischen Molekülen gearbeitet. In Zukunft wird sich daher sowohl über chemische als auch über enzymatische Methoden ein Zugang zu oxidierten FCdien-Derivaten erhofft.

## 4 Versuche zur enzymatischen Totalsynthese von Terpenen

Alternativ zu fermentativen Prozessen, bei denen einzelne Biosynthesewege im komplexen Umfeld einer ganzen Zelle optimiert werden (siehe Kapitel IV1), könnte eine zellfreie *in vitro* enzymatische Totalsynthese einen Ansatz für die Erzeugung schwer zugänglicher Substanzen bieten (Abbildung 79).



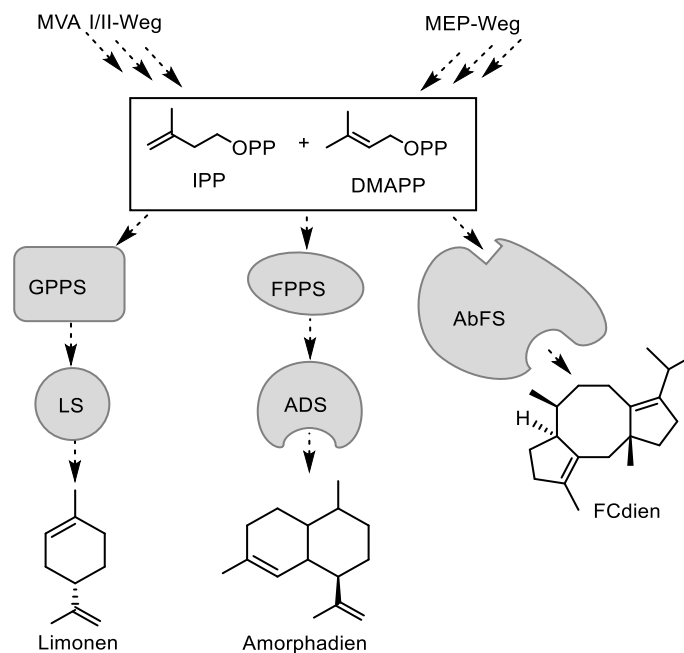
**Abbildung 79:** Im Vergleich zu dem Proteinnetzwerk in einer Zelle (A) offeriert das zellfreie System (B) eine wesentlich geringere Komplexität. Die Enzyme des untersuchten Biosynthesewegs sind als bunte Kreise dargestellt.

Eine solche Strategie profitiert, genauso wie fermentative Prozesse, von der hohen Präzision und Stereoselektivität biokatalysierter Reaktionen. Darüber hinaus ergeben sich gegenüber fermentativen Prozessen einige Vorteile. Wohingegen bei fermentativen Prozessen Probleme mit der genetischen Stabilität der Produktionsorganismen auftreten können, spielt dies für zellfreie Systeme keine Rolle. Durch die reduzierte Komplexität der zellfreien Systeme ist eine einfachere Reaktionskontrolle möglich, so dass einzelne Reaktionen gezielt optimiert und die erwünschten Produkte in hoher Reinheit und hoher Raum-Zeit-Ausbeute erhalten werden können.<sup>[233]</sup> Die Wahl der Substrate ist generell flexibler, es muss weder Rücksicht auf die Zellpermeabilität, noch auf eine mögliche Zelltoxizität der Substanzen genommen werden.<sup>[234]</sup> Im Vergleich zu einer sequentiellen Anordnung, kann durch eine Kolokalisation von Multienzymkaskaden das thermodynamische Gleichgewicht zur Formation des gewünschten Produktes verschoben und eine Ansammlung inhibierender Intermediate unterbunden werden.<sup>[235]</sup> Teure Kofaktoren können dabei durch eine geeignete Kopplung mit anderen enzymatischen Reaktion *in situ* regeneriert werden (siehe Kapitel IV3.1.1).<sup>[218]</sup>

Um die eingesetzten Enzyme wiederverwerten und in weiteren Katalysezyklen verwenden zu können, bietet sich eine Immobilisierung der Biokatalysatoren auf festen Substraten an.<sup>[236]</sup> Im Anschluss an die Reaktion kann eine einfache Trennung der Enzyme von den Reaktanten und Produkten in Lösung erfolgen. Eine geeignete Wahl der Immobilisierungstechnik kann darüber hinaus eine erhöhte Stabilität, Aktivität und Selektivität der eingesetzten Enzyme ermöglichen.<sup>[236]</sup> In den letzten Jahren wurden mehrere Studien zur Koimmobilisierung von zwei oder drei Enzymen veröffentlicht.<sup>[237]</sup> Dabei befinden sich die Biokatalysatoren in direkter

Nachbarschaft zueinander, wodurch die, in der Zelle vorliegende, hohe Enzymdichte und die Ausbildung von Multienzymkomplexen nachgeahmt werden können. Da die Reaktionsintermediate nur kurze Diffusionswege zurücklegen müssen, werden hohe lokale Konzentrationen erreicht, was letztendlich einen positiven Einfluss auf die Reaktionskinetik haben kann.<sup>[237b]</sup> Das Verhältnis der eingesetzten Biokatalysatoren muss dabei genau aufeinander abgestimmt werden, da ansonsten einzelne limitierende Schritte die katalytische Effizienz des gesamten Systems beeinträchtigen können.<sup>[237c]</sup>

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe von Lorena Betancor (Universität ORT Uruguay), sollte ein Konzept für die enzymatische Totalsynthese von Terpenen, ausgehend von kostengünstigen und einfach zu synthetisierenden Substraten, erarbeitet werden. Ist eine enzymatische *in vitro* Erzeugung der gemeinsamen Terpenintermediate IPP und DMAPP einmal etabliert, könnten unterschiedliche Prenyltransferasen und Terpensynthasen daran gekoppelt und strukturell diverse Terpene effizient erzeugt werden (Abbildung 80).



**Abbildung 80: Schematische Darstellung der enzymatischen *in vitro* Totalsynthese von Terpenen.** Es stehen die drei Biosynthesewege MVA I, MVA II und MEP zur Erzeugung von IPP und DMAPP zur Verfügung. LS: Limonensynthase, ADS: Amorphadiensynthase.

Dabei sollten die notwendigen Enzyme für die Synthese von IPP und DMAPP in unserer Arbeitsgruppe ausgewählt und Methoden zur Expression und Reinigung sowie zum Nachweis der Enzymaktivitäten etabliert werden. Die Immobilisierung und eine Anordnung der Multienzymkaskade sollten im Anschluss im Arbeitskreis von Lorena Betancor stattfinden.

Um eine effiziente *in vitro* Synthese von IPP und DMAPP zu gewährleisten, sollten die eingesetzten Enzyme eine langanhaltende und hohe Stabilität aufweisen. Neben Methoden



wie *Enzyme Engineering* (siehe Kapitel IV2.2) oder der Verwendung von Immobilisationstechniken, bei denen Einfluss auf die Stabilität von Enzymen genommen werden kann, liefert die Natur bereits eine Quelle für stabile Biokatalysatoren. In der industriellen Biokatalyse wird routinemäßig auf Enzyme aus thermophilen Mikroorganismen zurückgegriffen.<sup>[238]</sup> Neben ihrer Thermostabilität und hohen Halbwertszeit, weisen diese Enzyme meist auch eine erhöhte Lösungsmitteltoleranz und Proteolysestabilität sowie hohe Stabilitäten in Reaktionsgemischen auf. Darüber hinaus können Reaktionen bei hohen Temperaturen durchgeführt werden, wodurch höhere Reaktionsraten durch gesteigerte Löslichkeiten und Diffusionsraten der Substrate sowie geringere Viskositäten der Lösungsmittel erreicht werden.

Vorwiegend aufgrund der hohen intrinsischen Stabilität und Lösungsmitteltoleranz, sollten Enzyme aus thermophilen Organismen auch für die geplante multienzymkatalysierte *in vitro* Synthese von IPP und DMAPP genutzt werden.

#### **4.1 *Genome mining* zur Identifizierung thermostabiler Enzyme zur Synthese der Terpenintermediate IPP und DMAPP**

Thermophile Organismen werden vorwiegend durch Bakterien und Archaeen dominiert. Während Bakterien meist den MEP-Weg verwenden, benutzt der Großteil der Archaeen den MVA II-Weg (siehe Kapitel II1.1.1).<sup>[8c,e]</sup> Der MEP-Weg beginnt mit Pyruvat und dem teuren sowie instabilen Glyceraldehyd-3-phosphat. Der MVA II-Weg hingegen verwendet Acetyl-CoA als Substrat. In unserer Arbeitsgruppe ist bereits die Synthese von kostengünstigen CoA-Analoga etabliert.<sup>[68]</sup> Daher wurde sich bei der Suche nach geeigneten Enzymen für die *ex vivo* Rekonstitution der Terpenbiosynthese auf thermophile Archaeen beschränkt.<sup>[68]</sup>

Da thermophile Archaeen aus extremen Habitaten isoliert werden, wird für die Kultivierung im Labor meist spezielles Equipment benötigt. Häufig gelingt jedoch eine effiziente heterologe Überexpression der archaealen Proteine in dem einfach zu kultivierenden Bakterium *E. coli*.<sup>[8f,239]</sup> Darüber hinaus können thermostabile Enzyme meist durch eine einfache Hitzedenaturierung der *E. coli*-eigenen Proteine angereichert werden. Daher sollten auch die Enzyme zur Erzeugung der Terpenintermediate IPP und DMAPP zunächst einzeln in *E. coli* überexprimiert und durch geeignete Methoden isoliert werden.

Um geeignete Enzyme für die Rekonstitution des Terpenbiosynthesewegs zu identifizieren, wurden zunächst die Onlinedatenbanken KEGG und MetaCyc nach charakterisierten MVA II-Enzymen durchsucht.<sup>[240]</sup> Der bevorzugt von Archaeen verwendete MVA II-Weg unterscheidet sich lediglich in den letzten drei Schritten von dem klassischen eukaryotischen MVA I-Weg (siehe Kapitel, II1.1.1 a, Abbildung 2).

Zum Zeitpunkt der Planung dieses Projektes (Anfang 2012), waren in den Datenbanken allerdings lediglich fünf der archaealen MVA-Enzyme – AACT, HMGR, MVK, IPK und IDI2 – aus unterschiedlichen Spezies als charakterisiert beschrieben.<sup>[8f,239,241]</sup> Die Identität des Enzyms PMD, das den drittletzten Schritt des MVA II-Weges katalysiert, war bis 2013 sogar vollkommen unbekannt. Erst in den letzten zwei Jahren konnten PMD-Isoformen aus dem Bakterium *Roseiflexus castenholzii* und dem Archaeon *Haloferax volcanii* isoliert und charakterisiert werden.<sup>[8h,i]</sup> Daher konnte der MVA II-Weg zum besagten Zeitpunkt nicht vollständig rekonstituiert werden.

Allerdings war bekannt, dass einige thermoacidophile Archaeen aus den Gattungen *Sulfolobus*, *Metallosphaera* und *Acidianus* für die Enzyme PMK und MDC, zur Katalyse der beiden vorletzten Schritte, des klassischen und vollständig charakterisierten MVA I-Weges codieren.<sup>[8e,g,242]</sup> Daher wurde eine Rekonstitution des MVA I-Weges aus einer dieser Spezies angestrebt. *S. solfataricus* wurde ausgewählt, da sein Genom bereits vollständig sequenziert und in der *Nucleotide*-Datenbank des NCBI (National Center of Biotechnology Information) veröffentlicht war. Außerdem wurde bereits eines der Enzyme des MVA-Weges aus *S. solfataricus*, die HMGR, vollständig charakterisiert.<sup>[239a]</sup> Die potentiell codierenden Sequenzen der restlichen sechs MVA I-Enzyme aus *S. solfataricus* wurden mit Hilfe des blastp-Algorithmus (engl. *basic local alignment search tool*) ermittelt. Dafür wurden die bekannten eukaryotischen MVA I-Enzyme aus *S. cerevisiae* mit der *non-redundant protein sequences*-Datenbank des Stammes *S. solfataricus* P2 (taxID: 273057) abgeglichen (exemplarisch anhand der HMGS in Abbildung 81 gezeigt) und die zu der jeweils höchsten Übereinstimmung passenden Gensequenzen (siehe Anhang, Abbildung A6 – A12) aus dem Genom des Archaeons (GeneBank: AE006641.1) herausgesucht. Zur Klonierung der sieben Gene wurde das Genom des Archaeons schließlich bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) bestellt (DSM 1617).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
42.0 bits (97)	4e-05	Compositional matrix adjust.	85/376 (23%)	134/376 (35%)	78/376 (20%)
HMGS_ <i>s.c.</i>	50	GIKGIQIYIPTQCVNQELEKFDGVSQGKYTIGLGQTNMSFVNDREDIYSMSLTVLSKLI			109
		GI G YIP + ++ K G + LG T S ED +++ I			
HMGS_ <i>s.s.</i>	4	GILGWGAYIPRYRIKVEDIAKMWGYDEA-VVKSLGLTEKSVPGHDEDSTTIAWESSINAI			62
HMGS_ <i>s.c.</i>	110	KSYNIDTNKIGRLEVGTETLIDKSKSVKSVLMQLFGENTDVEGIDTLNACYGGTNALFNS			169
		K +DT+KI + G+E+ + K ++L+ G N D AC + L +			
HMGS_ <i>s.s.</i>	63	KRAQVDTSKIRLVLFGSESQVYAVKPTSTILIDALGINNYSATADMEFACRAASVGLRLA			122
HMGS_ <i>s.c.</i>	170	LNWIESNAWDGRDAIVVCGDIAIYDKG-AARPTGGAGTVAMWIGP-----DAPIVFDSVR			223
		+++ N + A+V+ D A + G + A VA +G A ++			
HMGS_ <i>s.s.</i>	123	SSFVLHN--NDSYALVIGADTAQSNPGDVLELSSAAAGVAFVVGKTDEKHSAAVI--EYS			178
HMGS_ <i>s.c.</i>	224	ASYMEHAYDFYKPDFTSEYPYVDGHFSLTCYVKALDQVYKSYSKKAIKGL-VSDPAGSD			282
		+SY DF++ D T PY T + + + + GL +SD			
HMGS_ <i>s.s.</i>	179	SSYTSDDTPDFWRRDGT---PYPVHGEFTGEPAYFHIIISAVNDLLQNSGLKISD-----			230
HMGS_ <i>s.c.</i>	283	ALNVLKYFDYNVHVPTCKLVTKSYGRLLYNDFRANPQLFPEVDAELATRDYDESLTDKN			342
		FDY VFH P K FP			
HMGS_ <i>s.s.</i>	231	-----FDYFVFHQPNKG-----FP-----			244
HMGS_ <i>s.c.</i>	343	IEKTFVNVAKPFHK--ERVAQSLIVPTNTGNMYTASVYAAFASLLNLYVGSDDLQGKRVGL			400
		+ VAK E+V Q L+ P GN Y AS A +L+ G+R+ +			
HMGS_ <i>s.s.</i>	245	-----IQVAKKLGVPLEKVKQLVSPY-IGNPYNASALLGLAKVLDIAK----PGERILV			294
HMGS_ <i>s.c.</i>	401	FSYGSGLAASLYSCKI 416			
		+GSG + +S +			
HMGS_ <i>s.s.</i>	295	APFGSGAGSDAFSILV 310			

**Abbildung 81: Erstes blastp-Ergebnis für den Sequenzvergleich der HMGS aus *S. cerevisiae* S288c mit dem Genom von *S. solfataricus* P2.** HMGS\_*s.c.*: HMGS aus *S. cerevisiae* S288c (Protein-ID: P54839), HMGS\_*s.s.*: hypothetical protein SSO0534 aus *S. solfataricus* P2 (Protein ID: NP\_342064).

## 4.2 Expression der MVA I-Enzyme aus *S. solfataricus* in *E. coli*

Lediglich für die HMGR waren geeignete Bedingungen zur Expression in *E. coli* bekannt.<sup>[239a]</sup> Da eine erfolgreiche Expression in vielen Fällen schon allein durch die Wahl des Vektors bestimmt werden kann, wurden die sieben identifizierten Gene jeweils in unterschiedliche *E. coli*-Expressionsvektoren eingefügt. Dafür wurde zunächst der Hochdurchsatz-Klonierungsservice der DPF (Dortmund Protein Facility) des Max-Planck-Instituts genutzt.<sup>[243]</sup> Zur Testung unterschiedlicher Fusionstags an verschiedenen Positionen wurden dabei die drei Expressionsplasmide pOPIN-His-SUMO, pET19b-nHis-3C und pET19b-3C-cHis ausgewählt, bei denen die Expression von Fremdproteinen in *E. coli* unter der Kontrolle des starken T7*lac*-Promotersystems steht (Tabelle 18 und Tabelle 24).

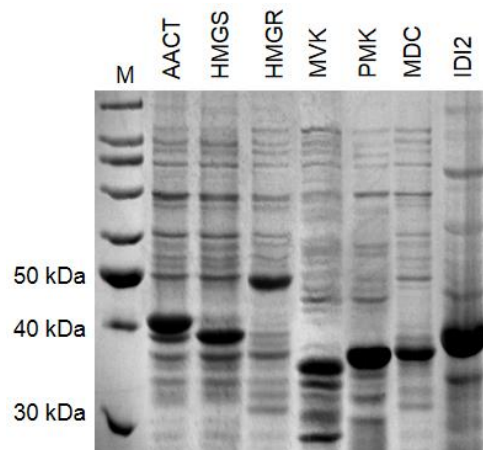
Erste Versuche zur heterologen Expression der sieben MVA I-Enzyme aus *S. solfataricus* wurden im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von Michael Dirkmann erarbeitet, die im Rahmen des Kapitels IV.4.2 lediglich kurz zusammengefasst werden sollen.<sup>[244]</sup>

Da bei der Verwendung der insgesamt 21 Vektoren aus der DPF schnell deutlich wurde, dass aufgrund von Plasmidinstabilitäten die Expressionen der MVA I-Enzyme nicht zuverlässig

reproduzierbar waren, wurden die sieben Gene anschließend in die in unserer Arbeitsgruppe etablierten *E. coli*-Vektoren pETM11, pET27mod und pBADM11 (siehe Kapitel IV2.1.1) eingebracht (Kapitel V5.7.6).<sup>[244]</sup> Eine Amplifikation der Zielgene erfolgte jeweils aus den gencodierenden pOPIN-Vektoren der DPF (Kapitel V5.3.5).<sup>[244]</sup> Schrittweise wurden die Expressionsbedingungen für alle sieben MVA I-Enzyme angepasst (Kapitel V6.2.8, Tabelle 13 und Abbildung 82).<sup>[244]</sup>

**Tabelle 13: Übersicht über die optimierten Expressionsbedingungen, bei denen reproduzierbar eine Expression aller sieben potentiellen MVA I-Enzyme aus *S. solfataricus* in *E. coli* gelang.** Die Expressionen (Kapitel V6.2.8) erfolgten jeweils bei 30°C über Nacht in LB-Miller-Medium (engl. *lysogeny broth*, Tabelle 33). Es sind jeweils die Bedingungen aufgeführt, bei denen die höchste Expressionsrate oder die höchste Menge löslichen Proteins detektiert wurde. Die hier zusammengefassten Ergebnisse wurden im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von Michael Dirkmann erarbeitet.<sup>[244]</sup>

Enzym	Expressionssystem	spezielle Eigenschaft	Expression
AACT	BL21-Gold(DE3)[pETM11- <i>aactf</i> ]	-	unlöslich
HMGS	BL21-Gold(DE3)[pL1SL2 + pETM11- <i>hmgs</i> ]	Chaperonkoexpression	löslich
HMGR	Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3)[pBADM11- <i>hmgr</i> ]	zusätzliche tRNAs und	löslich
MVK	Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3)[pBADM11- <i>mvk</i> ]	Ausbildung von	unlöslich
PMK	Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3)[pBADM11- <i>pmk</i> ]	Disulfidbrücken möglich	unlöslich
MDC	BL21-Gold(DE3)[pETM11- <i>mdc</i> ]	-	unlöslich
IDI2	BL21-CodonPlus <sup>®</sup> (DE3)-RIL[pETM11- <i>idi2</i> ]	zusätzliche tRNAs	unlöslich

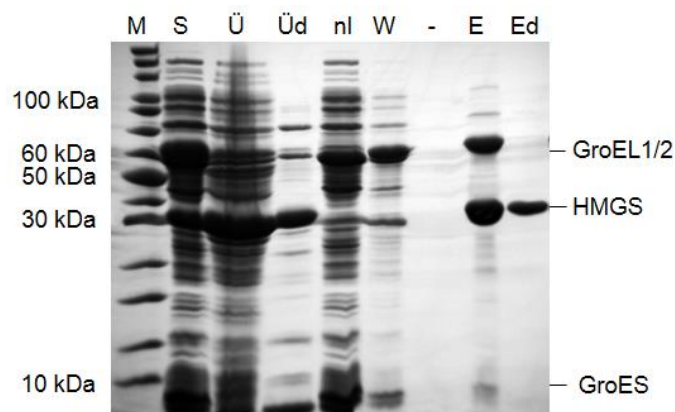


**Abbildung 82: Ausschnitte aus verschiedenen 12%-igen SDS-Gelen zur Veranschaulichung der erfolgreichen Expression aller sieben potentiellen MVA I-Enzyme aus *S. solfataricus* P2 in *E. coli*.** Die jeweiligen Expressionsbedingungen können Tabelle 13 entnommen werden. M: PageRuler<sup>TM</sup> Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific). Die hier dargestellten Ergebnisse wurden im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von Michael Dirkmann erarbeitet.<sup>[244]</sup>

Neben der Variation der Expressionstemperatur (20 – 37°C) und des Mediums (LB, TB, Autoinduktionsmedium I und II, Tabelle 33), wurden unterschiedliche potentielle Limitationen durch die Auswahl verschiedener Medienadditive und Expressionsstämme adressiert. Dabei

wurden sowohl potentielle Proteaseinstabilitäten, Limitationen im Codongebrauch durch die Codierung seltener tRNAs, Probleme bei der Ausbildung von Disulfidbrücken, sowie proteinstabilisierende, chemische Osmolyte oder molekulare Chaperone berücksichtigt.<sup>[244]</sup> Viele der dabei getesteten Expressionssysteme wurden bereits im Rahmen der Optimierung der löslichen Expression der Diterpensynthase AbFS in *E. coli* detaillierter diskutiert (siehe Kapitel IV2.1).

Jedoch konnte dadurch neben der löslichen Expression der bereits charakterisierten HMGR, lediglich die lösliche Expression eines weiteren Enzyms erzielt werden.<sup>[244]</sup> Die lösliche Expression der HMGS wurde durch die Koexpression des GroEL/GroES-Chaperonsystems aus *S. coelicolor*, mit Hilfe des aus dem Arbeitskreis Leadlay stammenden pL1SL2-Plasmids (Tabelle 18), erreicht (näheres dazu siehe Kapitel IV2.1.2). Während sich in den drei getesteten Expressionsstämmen BL21-Gold(DE3)[pL1SL2], BL21-CodonPlus(DE3)-RIL[pL1SL2] und BL21-CodonPlus(DE3)-RP[pL1SL2] (siehe Kapitel IV2.1.2) für die Koexpression der Enzyme AACT, HMGS, MDC und IDI2 aus den jeweiligen pETM11-Vektoren nur unlösliche *Inclusion Bodies* ergaben, konnte die HMGS jeweils löslich exprimiert werden.<sup>[244]</sup> Das beste Ergebnis wurde für die Koexpression in BL21-Gold(DE3) erhalten.<sup>[244]</sup> Das Enzym konnte anschließend in hoher Reinheit durch eine zweistufige Reinigungstechnik über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Nickel-Nitrilotriessigsäure, Kapitel V7.4.1) und Hitzedenaturierung (Kapitel V7.4.2) isoliert werden (Bahn Ed, Abbildung 83).<sup>[244]</sup>

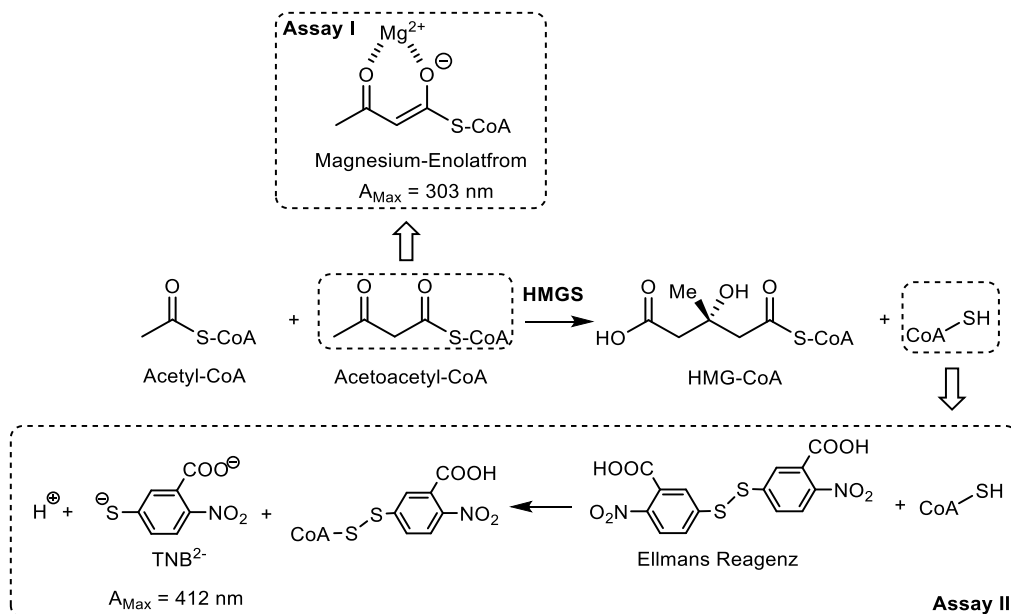


**Abbildung 83: 12%-iges SDS-Gel zur Analyse der Expression und Reinigung der HMGS aus *S. solfataricus* nach Koexpression der Chaperone GroES, GroEL1 und GroES2 aus *S. coelicolor* in *E. coli* BL21-Gold(DE3).** M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific), S: Sediment nach Zellyse, Ü: Überstand nach Zellyse, Üd: Überstand thermobehandelt bei 70°C für 15 min, nl: Fraktion nach Inkubation mit Ni-NTA-Beads, W: Waschfraktion, E: Eluat, Ed: thermobehandeltes Eluat. Das hier dargestellte Gel wurde im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von Michael Dirkmann erzeugt.<sup>[244]</sup>

Außerdem gelang parallel die Isolation der löslichen HMGS über eine Rückfaltung aus *Inclusion Bodies* (Kapitel V7.5).<sup>[244]</sup> Die Rückfaltung aus *Inclusion Bodies* war allerdings mit

wesentlich mehr Aufwand verbunden, weshalb zur Isolation löslicher HMGS nachfolgend jeweils auf die Koexpression der Chaperone aus *S. coelicolor* zurückgegriffen wurde.

Um die HMGS nachfolgend näher zu charakterisieren wurde sowohl im Rahmen der Masterarbeit von Michael Dirkmann als auch im Rahmen dieser Dissertation an der Etablierung eines Aktivitätsassays für dieses Enzym gearbeitet.<sup>[244]</sup> Die HMGS katalysiert den zweiten Schritt des Mevalonatwegs und ist damit an der Bildung von HMG-CoA ausgehend von Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA beteiligt (siehe Abbildung 84). Zum Nachweis dieser Reaktion wurden zwei verschiedene, in der Literatur beschriebene, photometrische Assays getestet (Abbildung 84).<sup>[244]</sup>



**Abbildung 84: Übersicht über die durch die HMGS katalysierte Reaktion und die beiden in der Literatur beschriebenen photometrischen Assays.<sup>[245]</sup>**

Zum einen kann die zeitabhängige Abnahme des Substrats Acetoacetyl-CoA spektrometrisch verfolgt werden (Kapitel V7.6.2 a).<sup>[245a]</sup> Die Enolatform des Acetoacetyl-CoAs weist ein Absorptionsmaximum bei 303 nm im UV-Bereich auf und kann bei leicht alkalischem pH-Wert durch die Zugabe von zweiwertigen Kationen stabilisiert werden.<sup>[245b]</sup> Der zweite Assay beruht auf dem Nachweis des frei werdenden CoAs durch die Zugabe von Ellmans Reagenz (DTNB, 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure) zum Nachweis von Thiolen bei einer Wellenlänge von 412 nm im sichtbaren Bereich (Kapitel V7.6.2 b).<sup>[246]</sup> Die katalysierte Reaktion der bereits charakterisierten HMGR, in dessen Verlauf ebenfalls ein Äquivalent CoA frei wird (siehe Kapitel III.1.1), wurde als Positivkontrolle für den Assay mit Ellmans Reagenz verwendet. Insbesondere wurden im Rahmen dieser Dissertation verschiedene pH-Werte des Aktivitätspuffers (pH 5,5 – 11) und Konzentrationen des Kofaktors Mg<sup>2+</sup> (10 – 40 mM MgCl<sub>2</sub>)

im Puffer variiert (siehe Kapitel V7.6.2). Trotzdem konnte bislang keine eindeutige Aktivität der unter mesophilen Bedingungen exprimierten HMGS nachgewiesen werden.

Einzelne HMGS-Isoformen werden durch die Anwesenheit von zweiwertigen Schwermetallkationen inhibiert.<sup>[247]</sup> Daher ist eine Inhibierung der Aktivität der HMGS aus *S. solfataricus* durch die Ni<sup>2+</sup>-Ionen aus der, bei der Affinitätsreinigung des Enzyms verwendeten, Ni-NTA-Matrix nicht auszuschließen. Bei einer Änderung der Reinigungsprozedur könnte somit bereits ein Nachweis der Aktivität dieses Enzyms gelingen. Momentan werden diese und weitere Bedingungen für die Aktivitätsbestimmung der HMGS im Rahmen der laufenden Dissertation von Michael Dirkmann getestet.<sup>[248]</sup>

### 4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Zur enzymatischen Totalsynthese von Terpenen *in vitro* wurden im Rahmen dieser Arbeit sieben potentielle MVA I-Enzyme aus dem thermophilen Archaeon *S. solfataricus* über Literaturrecherche und *Genome Mining* identifiziert (siehe Kapitel IV4.1).

Eine enzymatische *in vitro* Synthese der Terpenintermediate IPP und DMAPP kann eine effektive Alternative zu dem *Metabolic Engineering* bei der fermentativen Erzeugung von Terpenen darstellen. Die zellfreie enzymatische Totalsynthese zeichnet sich durch eine geringere Komplexität aus und erlaubt dadurch eine bessere Reaktionskontrolle, höhere Reaktionsraten und eine höhere Reinheit der isolierten Produkte.<sup>[233]</sup>

Das hohe Potential dieser Strategie zeigt sich an der Anfang 2014 publizierten *in vitro* enzymatischen Totalsynthese des IPPs durch die Gruppe um James U. Bowie.<sup>[249]</sup> Dabei gelang der Nachweis des IPPs durch eine sequentielle Anordnung von teils mesostabilen, teils thermostabilen Enzymen in Lösung.

Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Rekonstitution aus rein thermostabilen, immobilisierten Enzymen angestoßen, um eine Wiederverwertung und eine höhere Langzeitstabilität der eingesetzten Biokatalysatoren zu ermöglichen.

Bislang wurden alle sieben Enzyme des MVA I-Biosynthesewegs aus dem thermophilen Archaeon *S. solfataricus* durch intensive Optimierungen in *E. coli* exprimiert, jedoch zeigten nur zwei Enzyme eine reproduzierbare, lösliche Expression (siehe Kapitel IV4.2).<sup>[244]</sup> Dabei handelte es sich um die beiden Enzyme HMGS und HMGR. Während ein Nachweis enzymatischer Aktivität für die bereits charakterisierte HMGR gelang, konnte die enzymatische Aktivität der HMGS im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.<sup>[239a,244]</sup>

Momentan wird im Rahmen der Dissertation von Michael Dirkmann sowohl an dem Nachweis der enzymatischen Aktivität der bereits löslich exprimierten HMGS, als auch an der löslichen Expression der restlichen MVA I-Enzyme aus *S. solfataricus* durch einen Wechsel zu dem

eukaryotischen Expressionssystem *P. pastoris* gearbeitet.<sup>[248]</sup> Kann die erwartete Aktivität der HMGS aus *S. solfataricus* nachgewiesen werden, soll im Anschluss getestet werden, ob das Enzym auch kostengünstige Acetoacetyl- und Acetyl-CoA-Analoga als Substrate akzeptiert. Dies würde die Verkürzung der notwendigen Enzymkaskade zur Synthese der Terpenintermediate IPP und DMAPP um das erste Enzym des Biosynthesewegs (AACT) ermöglichen. Die Synthesen der Substrat-CoA-Analoga Acetyl-SNAC (*N*-Acetylcysteamin) und Acetoacetyl-SNAC wurden im Rahmen der Dissertation von Stephan Klopries bereits etabliert (mehr zu SNAC-Verbindungen, siehe Kapitel IV5).<sup>[68]</sup>

Erst in den letzten zwei Jahren wurden zwei Enzyme mit einer PMD-Aktivität nachgewiesen, die für eine vollständige Rekonstitution des, häufig in Archaeen verwendeten, MVA II-Wegs benötigt wird. Sollte eine Rekonstitution des MVA I-Wegs aus *S. solfataricus* nicht gelingen, steht mittlerweile eine größere Anzahl thermostabiler und charakterisierter Enzyme für eine zellfreie Rekonstitution der Terpenbiosynthese zur Verfügung.<sup>[8h,i]</sup>



## 5 Versuche zur mikrobiellen Derivatisierung von Polyketiden

Bislang wurden vorwiegend Strategien zur Verbesserung der allgemeinen Verfügbarkeit von Naturstoffen oder einfachen Naturstoffanaloga am Beispiel der Terpene diskutiert (siehe Kapitel IV1 - IV4). Im Gegensatz dazu fokussiert sich dieses Kapitel auf die spezifische Derivatisierung von komplexen Naturstoffen am Beispiel der prominenten, reduzierten Polyketide Erythromycin und Monensin.

Insbesondere in der Pharmazie besteht ein Interesse an der Entwicklung neuer Strategien zur gezielten Derivatisierung von komplexen Naturstoffen, um die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften zu verändern, Resistenzmechanismen entgegenzuwirken oder völlig neue funktionelle Gruppen in die Naturstoffe einzufügen (siehe Kapitel II1).

Mit Hilfe der organischen Partialsynthese kann prinzipiell eine hohe chemische Diversität in eine Naturstoffbibliothek eingebracht werden. Aufgrund der komplexen Struktur mit vielen Stereozentren und redundanten funktionellen Gruppen ist die organische Partialsynthese von Naturstoffen jedoch oftmals mit einem hohen Aufwand, einer komplizierten Schutzgruppenchemie oder einer nicht zufriedenstellenden Ausbeute verbunden.<sup>[250]</sup> In vielen Fällen können nur einzelne Positionen chemisch adressiert werden.<sup>[251]</sup> Im Gegensatz dazu erlauben biokatalysierte Reaktionen eine hohe Regio- und Stereoselektivität, unabhängig von der Komplexität des Moleküls. Die chemische Diversität bei der Biosynthese ist jedoch häufig auf eine geringe Anzahl an funktionellen Gruppen beschränkt. Um den regioselektiven Einbau von beliebigen funktionellen Gruppen zu erlauben, wäre also eine Strategie ideal, die gleichzeitig auf der Flexibilität der organischen Chemie und der Komplexität der Biosynthese beruht.

Schlüsselenzyme bei der Biosynthese des Erythromycins und des Monensins sind nicht-iterative, modulare Typ I-PKS (siehe Kapitel II1.2.1). Allein durch die Manipulation der reduktiven Domänen einer PKS wurden bereits große Polyketidbibliotheken mit einer veränderten Stereochemie oder Anzahl an Keto-, Hydroxy- und Olefinfunktionen, sowie gesättigten Kohlenstoffketten erzeugt.<sup>[252]</sup> Eine größere chemische Diversität kann prinzipiell jedoch durch den Einbau nicht-nativer oder artifizierender Malonsäurederivate bei der Kettenverlängerung erreicht werden.<sup>[64b,66c,67,253]</sup> Für die primäre Auswahl und Übertragung der Verlängerungseinheiten sind die AT-Domänen verantwortlich (siehe Kapitel II1.2.1 a), welche daher einen wichtigen Selektivitätsfilter bei der Biosynthese von Polyketiden darstellen.<sup>[254]</sup> Der *Pool* an Verlängerungseinheiten ist in der Natur jedoch begrenzt. Bis auf wenige Ausnahmen, werden im Großteil der Organismen lediglich M-CoA (Malonyl-Coenzym A), MM-CoA (2S-Methylmalonyl-CoA) und EtM-CoA (2S-Ethylmalonyl-CoA) zum Einbau in die wachsende

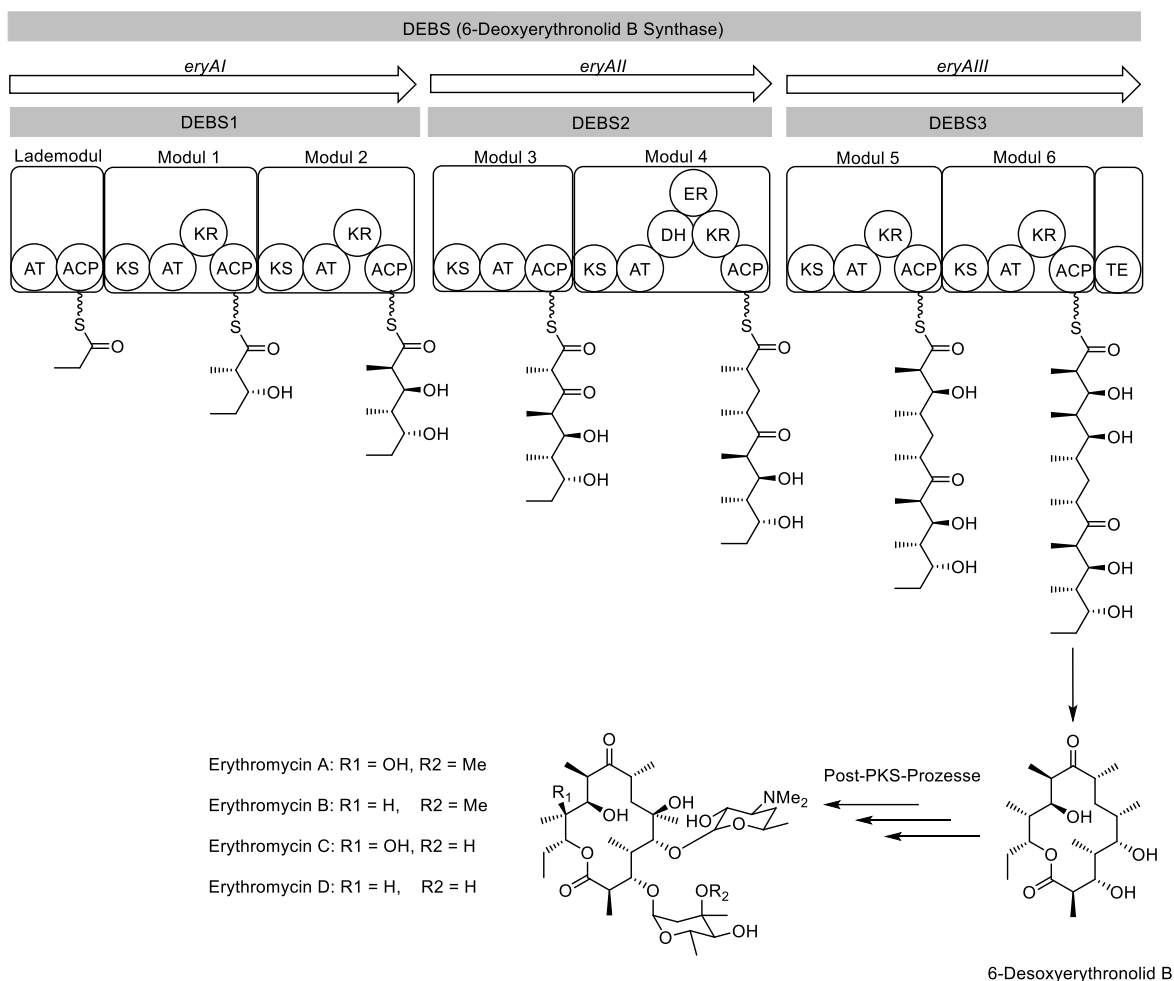
Polyketidkette bereitgestellt.<sup>[66b,c,67]</sup> Um eine größere chemische Diversität zu erzeugen, wurden bereits sowohl enzymatische als auch chemische Methoden zur Synthese von nicht-nativen oder nicht-natürlichen Verlängerungseinheiten beschrieben.<sup>[67,253c,255]</sup> In letzter Zeit wurden zwar Beispiele veröffentlicht bei denen einzelne AT-Domänen eine natürliche Promiskuität gegenüber artifiziellen Verlängerungseinheiten besitzen (siehe auch Kapitel IV5.2), häufig ist die Substraterkennung insbesondere unter *in vivo* Bedingungen jedoch strikt.<sup>[253d-f,255a,256]</sup> Daher werden generalisierbare Strategien zur Vorhersage des Einbaus artifizierender Verlängerungseinheiten und zur Verschiebung der Substratspezifität in AT-Domänen benötigt.

## 5.1 Enzymgeleitete Mutagenese am Beispiel des Erythromycins

Als Modellsystem zur Entwicklung generalisierbarer Strategien zur Verschiebung der Substratspezifität in der Polyketidbiosynthese eignet sich die gut charakterisierte modulare PKS DEBS (6-Deoxyerythronolid B Synthase, Abbildung 85). DEBS katalysiert die Bildung des Polyketidrückgrats des Antibiotikums Erythromycin A und wird in dem natürlichen Produzenten *Saccharopolyspora erythraea* durch die drei großen Gene *eryAI*, *eryAII* und *eryAIII* codiert, die eine Expression der drei Proteine DEBS1 - 3 erlauben.<sup>[61b,c]</sup> DEBS stellt die wohl am besten untersuchte PKS dar. Seit der Aufklärung ihrer Sequenzinformation Anfang der 1990er Jahre, wurde sie in etlichen Studien genetisch verändert, um ein besseres Verständnis über die Polyketidbiosynthese zu bekommen und unterschiedliche Erythromycinderivate zu erzeugen.<sup>[55,61b,c]</sup> Mit Ausnahme des Lademoduls akzeptieren alle AT-Domänen dieses Enzymkomplexes MM-CoA als Verlängerungseinheit und übertragen dieses auf die ACP-Domänen des gleichen Moduls (siehe Abbildung 85).

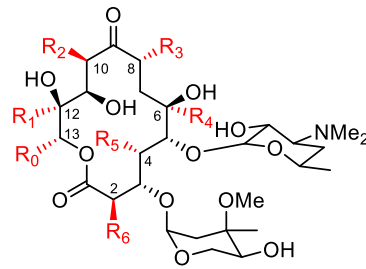
Eine Verschiebung der Substratspezifität bei der Polyketidbiosynthese wurde in der Vergangenheit vorwiegend durch das *Domain Swapping* erreicht, bei dem einzelne AT-Domänen mit Domänen aus anderen Modulen oder Spezies ausgetauscht wurden.<sup>[55,257]</sup> Ein häufiges Problem stellt dabei jedoch allgemein die Bildung gering aktiver oder nicht-aktiver Hybridenzyme dar.<sup>[258]</sup> Zudem wird die chemische Diversität der erzeugten Polyketide von der natürlichen Substrattoleranz der ausgetauschten AT-Domänen limitiert. Daher könnte die zielgerichtete Mutagenese ausgewählter Aminosäurereste innerhalb einer AT-Domäne einen flexibleren Ansatz zur Verschiebung der Substratspezifität darstellen.<sup>[253e,258b]</sup> Die Wahrscheinlichkeit funktionelle Enzymvarianten zu erzeugen steigt dabei, da der Einfluss auf die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen einzelner Domänen im Kontext des Gesamtproteinkomplexes geringer ist. Außerdem kann die Substratspezifität der AT-Domänen

gezielter modelliert werden, um den Einbau nicht-natürlicher Verlängerungseinheiten zu realisieren.



**Abbildung 85: Schematische Darstellung der Erythromycinbiosynthese.** Der aus den drei Proteinen DEBS1 – 3 bestehende Enzymkomplex katalysiert ausgehend von Propionyl-CoA und sechs Äquivalenten MM-CoA die Bildung des Polyketidrückgrats 6-Deoxyerythronolid B. Die drei Enzyme bestehen jeweils aus kovalent miteinander verknüpften Modulen (schwarze Kästen), in denen die Domänen für die Kettenverlängerung und der optionalen reduktiven Schritte angeordnet sind (siehe Kapitel II1.2). Durch nachfolgende Post-PKS-Prozesse, wie Oxygenierungen, Glykosylierungen und Methylgruppenübertragungen, werden schließlich die biologisch aktiven Erythromycine mit Erythromycin A als Hauptprodukt gebildet.

Stehen zuverlässige Methoden zur Synthese unterschiedlicher, aktivierter Malonsäurederivate bereit, könnte durch die gezielte Mutagenese der AT-Domänen in allen Modulen einer PKS prinzipiell jede zweite Position eines Polyketids mit einer anderen chemischen Gruppe derivatisiert werden (Abbildung 86).

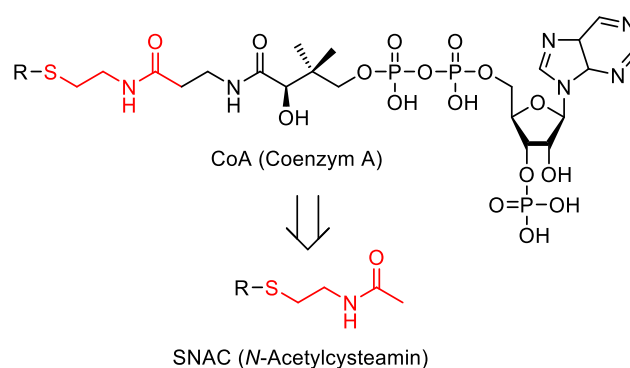


**Abbildung 86: Struktur eines an mehreren Stellen modifizierten Erythromycin A-Derivats.** Durch die Verschiebung der Substratspezifität in jeder einzelnen AT-Domäne von DEBS könnte prinzipiell jede zweite Position des Erythromycins derivatisiert werden. Die Nummerierung der verschiedenen Reste entspricht dem jeweiligen Modul der mutierten AT-Domäne. R0 wird durch die Substratspezifität der AT-Domäne des Lademoduls bestimmt, R1 – R6 durch die jeweiligen AT-Domänen aus Modul 1 – 6.

Ein erster Nachweis der Machbarkeit dieser Strategie, bei der die Substratspezifität einer AT-Domäne gezielt durch Punktmutagenese verändert und dadurch der Einbau eines synthetisch hergestellten, unnatürlichen Malonsäurethioesters gelang, konnte in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen der Dissertationen von Uschi Sundermann und Stephan Klopries bereits erarbeitet und veröffentlicht werden.<sup>[68,253e,255b,258f]</sup> Da diese Pionierarbeiten grundlegend für das Verständnis der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind, soll an dieser Stelle eine kurze Zusammenfassung der dabei gemachten Überlegungen und erhaltenen Resultate erfolgen.

Um generalisierbare Strategien zur Verschiebung der Substratspezifität von AT-Domänen zu entwickeln, beschränkten sich die Versuche lediglich auf die AT6-Domäne des letzten Moduls von DEBS. Da die eingeführten Manipulationen im Gesamtkontext der Erythromycinbiosynthese erprobt werden sollten, wurden alle Experimente in dem natürlichen Produzenten *S. erythraea* *in vivo* durchgeführt. Durch die Wahl der letzten AT-Domäne von DEBS sollte die Beeinflussung nachfolgender enzymkatalysierter Schritte und eines damit verbundenen frühzeitigen Abbruchs der Biosynthese durch den Einbau eines unnatürlichen Substrats auf ein Minimum reduziert werden (siehe Abbildung 85). Durch die genetische Manipulation und Kultivierung von Actinomyceten ergibt sich zwar im Vergleich zu vereinfachten Systemen, bei denen einzelne Module heterolog in *E. coli* exprimiert und isoliert *in vitro* untersucht werden, ein wesentlich höherer experimenteller Aufwand, jedoch sind die erzielten Ergebnisse generalisierbarer und besser auf andere Systeme übertragbar.<sup>[259]</sup> Beispielsweise weisen Versuche mit dem isolierten DEBS-Modul 6 auf eine natürliche Substratpromiskuität der AT6-Domäne bei hohen Konzentrationen artifizieller Verlängerungseinheiten hin.<sup>[253d]</sup> In dem natürlichen Produzenten hingegen, in dem der Einbau artifizieller Verlängerungseinheiten mit dem nativen Substrat MM-CoA konkurriert, konnte ohne Manipulation der Substratspezifität der PKS bislang kein solcher Einbau nachgewiesen werden.<sup>[253e,258f]</sup>

Bei *in vivo*-Experimenten müssen die extern, in das Medium hinzugegeben, thioesteraktivierten Malonsäurederivate vor dem Einbau in die wachsende Polyketidkette zunächst die Zellmembran des Naturstoffproduzenten passieren. Da CoA-aktivierte Substanzen nicht zellpermeabel sind, kann zur Aktivierung der Substrate das membrangängige und zudem kostengünstige CoA-Mimetikum SNAC verwendet werden (Abbildung 87).<sup>[255b]</sup>



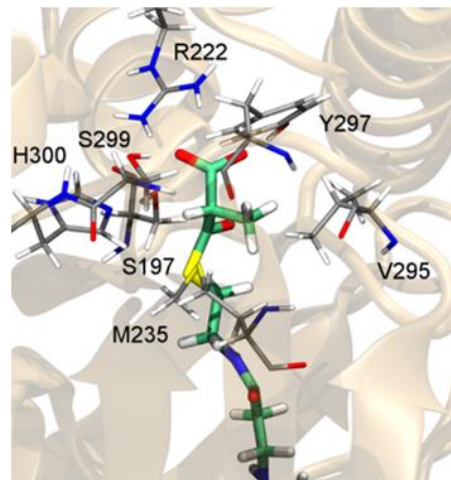
**Abbildung 87: Vergleich des CoAs mit seinem kostengünstigen und zellpermeablen Mimetikums SNAC.**

Während Uschi Sundermann die ersten Versuche zur Verschiebung der Substratspezifität der AT6-Domäne durchführte, wurden im Rahmen der Dissertation von Stephan Klopries Methoden zur Synthese nicht-nativer, SNAC-aktivierter Malonsäurederivate entwickelt.<sup>[68,253e,255b,258f]</sup>

Um die Substratspezifität der AT6-Domäne zu verschieben, wurden zunächst auf Grundlage eines Sequenzvergleichs mit zwei AT-Domänen aus der Epothilonbiosynthese, die eine andere oder relaxierte Substratspezifität aufweisen, insgesamt 14 Aminosäurereste zur Mutagenese ausgewählt.<sup>[253e,258f]</sup> Über Sättigungsmutagenese wurden insgesamt 266 DEBS-Varianten erstellt und *in vivo* gegen das unnatürliche Substratanalogon PropargylM-SNAC (Propargylmalonyl-SNAC) gescreent (siehe Abbildung 89). Dabei konnte zwar kein Einbau der artifiziellen Verlängerungseinheit nachgewiesen werden, jedoch gelang die Erzeugung einer umfangreichen Sequenz-Aktivitäts-Studie der DEBS-AT6.<sup>[68,253e,258f]</sup>

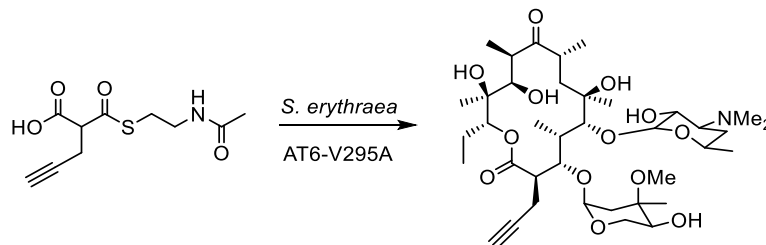
Eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Elsa Sanchez-Garcia (MPI Mühlheim), die auf die computerbasierte Berechnung von Strukturmodellen spezialisiert ist, erlaubte einen detaillierteren Einblick in die Substraterkennung der AT6-Domäne. Dabei wurde durch Kenny Bravo-Rodriguez, auf Grundlage literaturbekannter Kristallstrukturen von DEBS-AT3 und DEBS-AT5, ein Strukturmodell für DEBS-AT6 modelliert.<sup>[260]</sup> Die Konformation des natürlichen Substrats MM-CoA in der aktiven Tasche wurde durch Docking auf Basis der experimentell gewonnenen Sequenz-Aktivitäts-Beziehungen ermittelt.<sup>[253e]</sup> Der in den Sequenzvergleich

konservierte Aminosäurerest V295 schien laut Modell die Größe der Seitenkette des Malonsäurederivats einzuschränken (Abbildung 88).



**Abbildung 88: Darstellung des aktiven Zentrums der modellierten DEBS-AT6-Domäne (sandfarbend) mit dem natürlichen Substrat MM-CoA (Kohlenstoffgerüst in grün).** Die zu spaltende Thioesterbindung befindet sich in der Nähe des katalytisch aktiven Rests S197. Damit ein nukleophiler Angriff stattfinden kann wird S197 vermutlich durch H300 deprotoniert. Zur richtigen Orientierung des Substrats in der aktiven Tasche wird die Carboxylatgruppe des Malonats durch die Aminosäuren R222, Y297 und S292 stabilisiert. Die Seitenkette des Malonats in 2-Position ist zwischen die beiden Aminosäuren M235 und V295 positioniert. Die Größe der Seitenkette wird augenscheinlich durch den *Gatekeeper*-Rest V295 bestimmt. Kohlenstoffgerüste der Aminosäuren: grau, Wasserstoffatome: weiß, Stickstoffatome: blau, Sauerstoffatome: rot und Schwefelatome: gelb. Diese Abbildung wurde mit Erlaubnis der Dissertation von Kenny Bravo-Rodriguez entnommen.<sup>[261]</sup>

Um diese Hypothese experimentell zu belegen, wurde der Aminosäurerest V295 durch Punktmutagenese jeweils gegen die kleineren Aminosäuren G und A sowie gegen die größere, aber flexiblere Aminosäure L ausgetauscht.<sup>[253e,258f]</sup> Während V295G zu keiner detektierbaren Produktion von Erythromycin A oder des erwarteten Derivats führte und V295L nur das Wildtypprodukt in geringerer Intensität lieferte, konnte bei der Expression der V295A-Variante ein Einbau des PropargylM-SNACs bei einer Fütterung des Substrats in einer Konzentration von 10 mM über HPLC-ESI/MS (engl. *High Pressure Liquid Chromatography - Electrospray Ionisation coupled with Mass Spectrometry*) nachgewiesen werden (Abbildung 89).<sup>[68,253e,258f]</sup>



**Abbildung 89: Schematische Darstellung des Einbaus des PropargylM-SNACs durch die *S. erythraea* AT6-V295A-Variante.**<sup>[68,253e,258f]</sup>

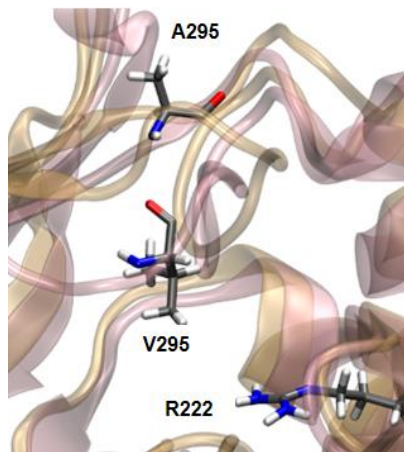
Dabei wurde das vorhergesagte 2-Propargylerythromycin A als Mischung neben dem Hauptprodukt Erythromycin A erhalten.<sup>[68,253e,258f]</sup> Anhand der Intensitäten der beiden Signale berechnet, ergab sich für den besten Klon immer noch lediglich ein Verhältnis zwischen 2-Propargylerythromycin A und Erythromycin A von 0,033.<sup>[258f]</sup> Trotzdem konnte dadurch erstmalig gezeigt werden, dass die Substratspezifität von AT-Domänen gezielt im Kontext der gesamten PKS durch Punktmutagenese verändert und dadurch der Einbau eines synthetischen, nicht-natürlichen Malonsäurederivats erzielt wurde.

In Anlehnung an die klassische Mutasyntese, bei der die Bildung von unnatürlichen Naturstoffderivaten ebenfalls auf der externen Zugabe von artifiziellen Bausteinen zu einem mutierten System beruht, wurde dieses Konzept in unserer Arbeitsgruppe „enzymgeleitete Mutasyntese“ getauft.<sup>[253e]</sup> Bei der klassischen Mutasyntese liegt der Fokus auf der Inaktivierung einzelner Biosyntheseschritte, um den Einbau der natürlichen Bausteine zu verhindern.<sup>[262]</sup> Dabei ist der Einbau nicht-nativer Bausteine immer noch durch die natürliche Substrattoleranz der untersuchten Biomachinery beschränkt. Zudem konzentriert sich die klassische Mutasyntese vorwiegend auf die Derivatisierung der Starteinheiten, sowie wesentlich seltener auf die Modifikation der Endeinheiten.<sup>[262b]</sup> Eine Modifikation der Verlängerungseinheiten wurde durch die klassische Mutasyntese bislang nicht adressiert. Im Gegensatz dazu ist die enzymgeleitete Mutasyntese potentiell wesentlich flexibler bei der Wahl der chemischen Funktionalitäten und der dabei derivatisierten Positionen, da die Substratspezifität beliebiger Domänen direkt verändert wird.

### **5.1.1 Theoretische Erkenntnisse zur Substraterkennung und Substratscreening zur Testung der Substrattoleranz der V295-Varianten**

Die hier präsentierten Ergebnisse wurden bereits von zwei Fachjournalen zur Veröffentlichung akzeptiert.<sup>[263]</sup>

Um die Substraterkennung in DEBS-AT6 besser verstehen zu können, wurde durch Kenny Bravo-Rodriguez ein neues Strukturmodell für die V295A-Variante berechnet.<sup>[261]</sup> Ein Vergleich dieses Strukturmodells mit dem Modell des Wildtypenzym ohne Substrat zeigte, dass durch die V295A-Mutation die Gesamtstruktur der Proteindomäne kaum beeinflusst wird. Die V295A-Mutation beeinflusst hauptsächlich die Flexibilität der Proteinschleife, in der diese Aminosäure positioniert ist. Während der Aminosäurerest V295 im Strukturmodell des Wildtypenzym in Richtung der aktiven Tasche zeigt, ist A295 im Modell für die Enzymvariante um 180° gedreht. Dadurch entsteht wesentlich mehr Platz in der aktiven Tasche (Abbildung 90).

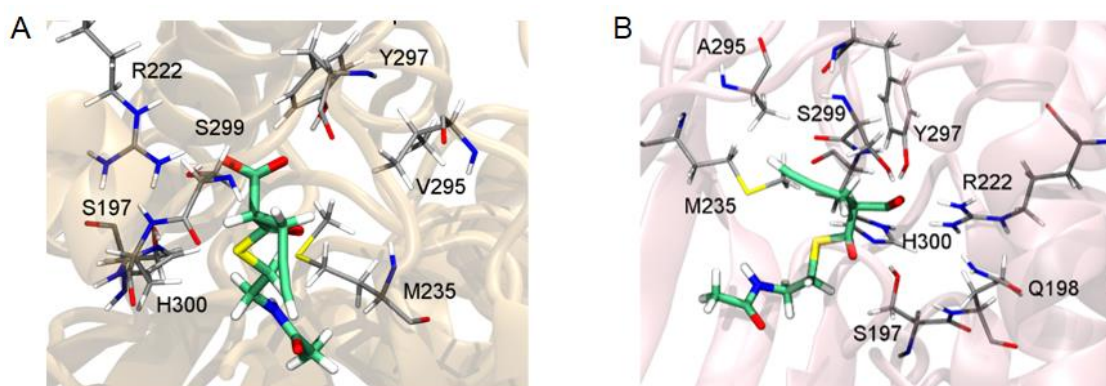


**Abbildung 90: Vergleich der aktiven Zentren der Wildtyp-AT6 (rosafarben) und der V295A-Variante (sandfarben).** Die Substitution der Aminosäure V295 zu der kleineren Aminosäure Alanin resultiert in einer wesentlich größeren Flexibilität der aktiven Tasche. Kohlenstoffgerüste der Aminosäuren: grau, Wasserstoffatome: weiß, Stickstoffatome: blau und Sauerstoffatome: rot. Die hier dargestellten Strukturmodelle wurden im Rahmen der Dissertation von Kenny Bravo-Rodriguez erstellt.<sup>[263a]</sup>

Eine Modellierung der Struktur der Wildtyp-AT6 mit PropargylM-SNAC zeigte, dass PropargylM-SNAC zwar in die aktive Tasche positioniert werden kann, aber Schlüsselwechselwirkungen dadurch verzerrt oder geschwächt werden (Abbildung 91 A). Diese theoretischen Berechnungen sind im Einklang mit Experimenten von Koryakina *et al.*, in denen ein Einbau des PropargylM-CoAs durch das isolierte und unmutierte Modul 6 von DEBS *in vitro* nachgewiesen werden konnte.<sup>[253d]</sup> Die dabei eingesetzten Konzentrationen können *in vivo* nicht erreicht werden. Im Gegensatz dazu erlaubt die größere Flexibilität in der aktiven Tasche der V295A-Variante eine korrekte Positionierung des PropargylM-SNACs (Abbildung 91 B), was den Einbau dieses Substrats durch die V295A-Variante bei wesentlich geringeren *in vivo*-Konzentrationen erklärt.<sup>[253e]</sup>

Neben 2-Propargylerythromycin wurde in den vorangegangenen Experimenten Erythromycin A als Hauptprodukt produziert (siehe Kapitel IV.5.1). Dies zeigt, dass die eingeführte Mutation keine Verschiebung der Substratspezifität, sondern vielmehr eine Erhöhung der Substrattoleranz bewirkte. Die Analyse der Strukturmodelle ließ die Vermutung zu, dass durch die größere Flexibilität der aktiven Tasche auch weitere Malonsäurederivate mit einem sterisch anspruchsvollen Rest an 2-Position durch die V295A-Variante akzeptiert werden könnten.



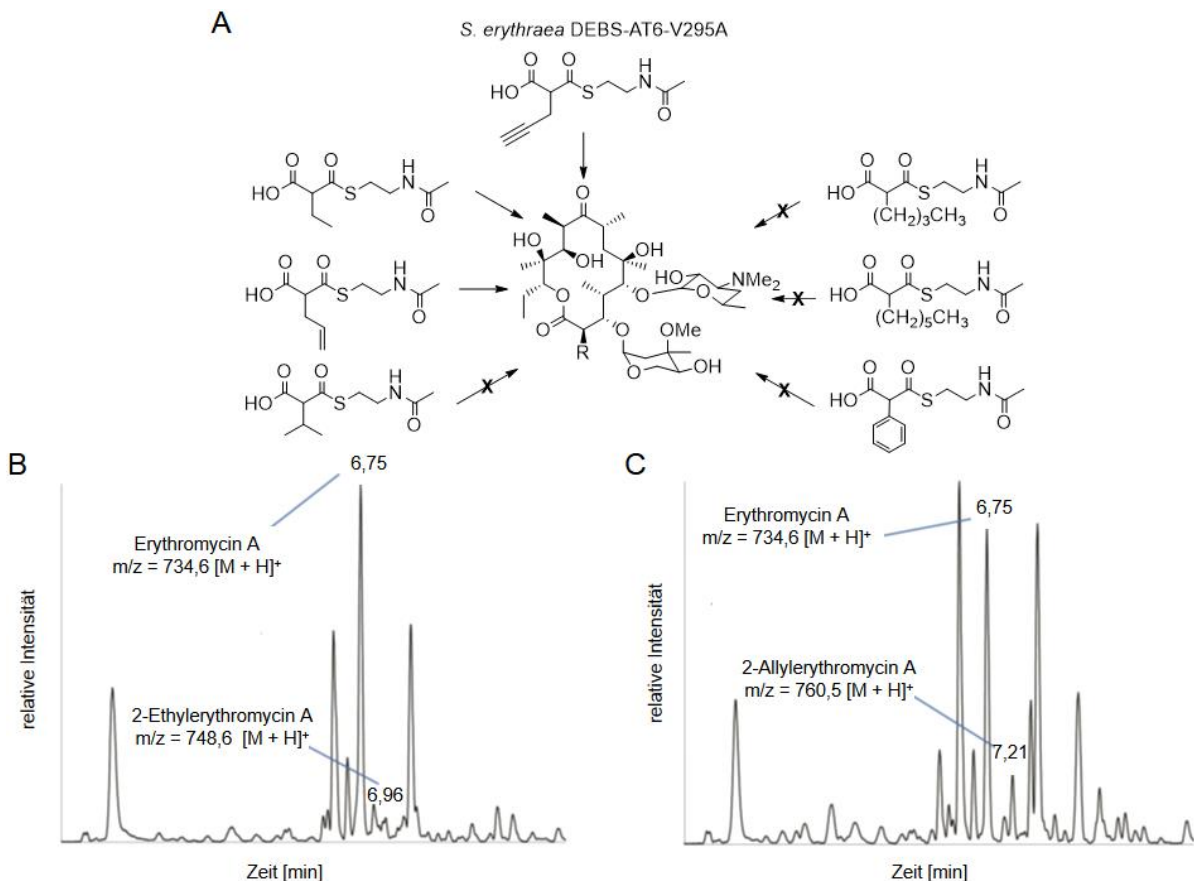


**Abbildung 91: Vergleich der Bindung des PropargylM-SNACs (grünes Kohlenstoffgerüst) in der aktiven Tasche des Wildtypenzym (A) mit der Positionierung im aktiven Zentrum der V295A-Variante (B).** Bei der Bindung des PropargylM-SNACs in der aktiven Tasche des Wildtypenzym ergibt sich eine Umstrukturierung von Schlüsselwechselwirkungen. Die Aminosäure R222 richtet sich neu aus und zeigt aus der aktiven Tasche heraus. Die Wechselwirkungen der Aminosäuren Q198 und S299 werden deutlich geschwächt. Zudem kann die Dreifachbindung der Propargylgruppe nicht zwischen die beiden Aminosäuren M235 und V295 positioniert werden. Bei der V295A-Variante hingegen ist das aktive Zentrum deutlich relaxierter, so dass alle wichtigen Schlüsselwechselwirkungen rekonstituiert werden können (Vergleiche mit Abbildung 88). Kohlenstoffgerüste der Aminosäuren: grau, Wasserstoffatome: weiß, Stickstoffatome: blau, Sauerstoffatome: rot und Schwefelatome: gelb. Diese Abbildungen sind mit Erlaubnis der Dissertation von Kenny Bravo-Rodriguez entnommen worden.<sup>[261]</sup>

Von diesen theoretischen Überlegungen motiviert wurde in einem Folgeexperiment zusammen mit Kyra Koopmans und unter Nutzung der von Stephan Klopries synthetisierten Malonsäurederivate die Substrattoleranz der drei Varianten V295G, V295A und V295L (siehe Kapitel IV5.1) getestet.<sup>[68,264]</sup> Obwohl V295G und V295L bei der Fütterung von PropargylM-SNAC keine Akzeptanz des artifiziellen Substrats und keine oder nur eine geringe Produktion des Erythromycin A zeigten (siehe Kapitel IV5.1), konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese Varianten eine Toleranz gegenüber anderen artifiziellen Malonsäurederivaten aufwiesen. Neben PropargylM-SNAC als Kontrolle, wurden die racemischen Substrate EtM-SNAC, AllylM-SNAC (Allylmalonyl-SNAC), *i*PropM-SNAC (*iso*-Propylmalonyl-SNAC), BuM-SNAC (Buthylmalonyl-SNAC), HexM-SNAC (Hexylmalonyl-SNAC) und PhM-SNAC (Phenylmalonyl-SNAC) (siehe Abbildung 92) jeweils in Konzentrationen zwischen 10 – 50 mM zu den Kulturen von vier unabhängigen Klonen der drei *S. erythraea*-Varianten und des Wildtyps hinzugegeben. Nach Abschluss der Kultivierung (Kapitel V6.4.2) für insgesamt fünf Tage bei 30°C in SM3-Medium (Tabelle 35) wurden die Fermentationen jeweils mit Ethylacetat extrahiert (Kapitel V9.1.2) und über HPLC-ESI/MS analysiert (Kapitel V10.2.2).

Bei den Wildtypfütterungen und für die Varianten V295G und V295L wurde kein Einbau eines der getesteten, nicht-nativen Substrate festgestellt. Zudem konnte bei der Expression der V295G-Variante erneut keine Produktion und bei der Expression der V295L-Variante eine verminderte Produktion des Erythromycin A detektiert werden. Vermutlich wird durch die

V295G-Variante eine unfunktionelle Enzymvariante exprimiert.<sup>[253e,258f]</sup> Die V295L-Variante besitzt im Vergleich zum Wildtypenzym entweder eine geringere Aktivität oder eine verminderte Substratspezifität für das natürliche Substrat MM-CoA. Gleichzeitig ist die Aminosäure L295 nicht flexibel genug, um genügend Platz für eines der synthetischen Malonsäurederivate zu schaffen. Im Gegensatz dazu konnten bei der Analyse der Fütterungsexperimente der V295A-Variante neben dem bekannten 2-Propargylerythromycin A zwei neue Erythromycinderivate identifiziert werden (Abbildung 92).



**Abbildung 92: Strukturen der getesteten SNAC-aktivierten Malonsäurederivate PropargylM-SNAC, EtM-SNAC, AllylM-SNAC, *i*PropM-SNAC, BuM-SNAC, HexM-SNAC und PhM-SNAC (A) und HPLC-Chromatogramme zum Nachweis der neu erzeugten Erythromycinderivate 2-Ethylerythromycin A (B) und 2-Allylerythromycin A (C).**

Der Einbau von EtM-SNAC und AllylM-SNAC führte zur Produktion von 2-Ethylerythromycin A und 2-Allylerythromycin A. Wie zuvor wurden die Erythromycinderivate in wesentlich geringerer Intensität als das Hauptprodukt Erythromycin A erhalten (siehe Kapitel IV5.1). Der erfolgreiche Einbau beider Substanzen wurde durch MS/MS- und HRMS-Untersuchungen bestätigt (Kapitel V10.2.2 und V10.2.3).

Für die sterisch anspruchsvolleren Substrate *i*PropM-SNAC, BuM-SNAC, HexM-SNAC und PhM-SNAC konnte kein Einbau festgestellt werden. Bei der Fütterung von PhM-SNAC wurde

in allen Fällen ein geringeres Zellwachstum beobachtet, was auf eine Toxizität des Substrats hinweist.

Im Vergleich zu Konzentrationen zwischen 10 mM und 20 mM führten Malonsäurederivatkonzentrationen ab 30 mM zu einer verringerten Polyketidproduktion. Die Fütterung von 50 mM Substrat resultierte in allen Fällen sichtbar in der Verminderung des Bakterienwachstums. Eine erhoffte Steigerung der Ausbeute von Erythromycinderivaten durch eine Erhöhung der Konzentration der artifiziellen Substrate im Medium konnte somit nicht erzielt werden.

Zur Validierung der berechneten DEBS-AT6-Strukturmodelle wurden alle getesteten Substrate jeweils durch Dockingexperimente in das Modell der V295A-Variante simuliert.<sup>[261]</sup> Dabei wurden die experimentell erhaltenen Daten bestätigt. Während eine Bindung der Substrate EtM-SNAC und AllyIM-SNAC modelliert werden konnte, war eine Positionierung der sterisch anspruchsvollen Substrate *i*PropM-SNAC, BuM-SNAC und HexM-SNAC im aktiven Zentrum der V295A-Variante nicht möglich.<sup>[261]</sup> Laut Molekulardynamikberechnungen kann die planare Phenylgruppe des PhM-SNACs ebenfalls in der richtigen Orientierung in das aktive Zentrum der V295A-Variante binden.<sup>[261]</sup> Da sich dieses Substrat bei den Fütterungen jedoch als toxisch auf *S. erythraea* herausstellte, konnte dieses Ergebnis experimentell nicht nachgewiesen werden.

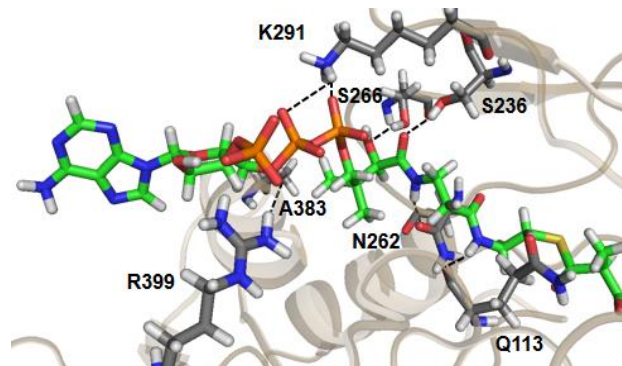
Im Allgemeinen wurde durch den Vergleich der experimentellen Daten und den theoretischen Berechnungen belegt, dass die erstellten Strukturmodelle einen realistischen Einblick in die Kontrolle der Substratspezifität in der DEBS-AT6-Domäne lieferten. Daher waren diese Modelle geeignet um weitere Mutageneseexperimente zu planen.

Bei den Fütterungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Substratkonzentration im Fermentationsmedium auf 10 – 20 mM begrenzt ist. Daher ist eine Steigerung der Ausbeute der erzeugten Polyketidderivate durch eine einfache Erhöhung der Substratkonzentration im Fermentationsmedium nicht möglich. Anstatt der hier beobachteten vergrößerten Substrattoleranz, müssen daher Schlüsselmutationen gefunden werden, die eine Verschiebung der Substratspezifität zum Einbau nicht-nativer Malonsäurederivate erlauben.

### **5.1.2 Mutagenese des CoA-Bindebereichs zur Erhöhung der Substratspezifität für SNAC-aktivierte Malonsäuren**

Alle nicht-nativen Substratderivate haben, im Gegensatz zum natürlichen Substrat MM-CoA, als gemeinsames Strukturmerkmal die SNAC-Aktivierung. Um eine erhöhte Substratspezifität für den Einbau nicht-nativer Malonsäurederivate zu erreichen, wurde daher eine Schwächung der Affinität des Enzyms zur CoA-Gruppe des nativen Substrats angestrebt.

Auf Grundlage des erstellten Strukturmodells der DEBS-AT6-Domäne mit dem natürlichen Substrat (siehe Kapitel IV5.1) wurden die drei solventsexponierten Aminosäuren K291, A383 und R399 für Mutageneseexperimente ausgewählt (Abbildung 93).



**Abbildung 93: CoA-Bindebereich der DEBS-AT6-Domäne (sandfarbend) mit gebundenem MM-CoA (Kohlenstoffgerüst grün eingefärbt) im berechneten Strukturmodell.** Die zur Schwächung der Affinität für das natürliche Substrat ausgewählten Aminosäuren K291, A383 und R399 und alle weiteren Aminosäuren, die polare Wechselwirkungen zu der Enzymdomäne ausüben, sind durch Stabmodelle hervorgehoben. Kohlenstoffgerüste der Aminosäuren: grau, Wasserstoffatome: weiß, Stickstoffatome: blau, Sauerstoffatome: rot, Phosphoratome: orange und Schwefelatome: gelb. Das hier dargestellte Strukturmodell wurde im Rahmen der Dissertation von Kenny Bravo-Rodriguez erstellt.<sup>[263a]</sup>

Während die Aminosäuren K291 und R399 elektrostatische Wechselwirkungen mit den drei Phosphatgruppen des CoAs ausüben, stabilisiert der Rest A383 über hydrophobe Wechselwirkungen die Isopropylseitenkette des CoAs.

Um die Affinität der CoA-Gruppe des Substrats zu der AT6-Domäne zu verringern, sollten in dieser Arbeit durch die Einführung negativ geladener Aminosäurereste repulsive Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den negativ geladenen Phosphatresten des CoAs induziert werden. Die positiv geladenen Reste K291 und R399 wurden gezielt durch die negativ geladenen Aminosäuren D oder E ersetzt. Diese Mutationen wurden sowohl einzeln als auch in Kombination und im Umfeld der A383- sowie V295A-Mutationen untersucht, so dass sich Varianten mit maximal vier Aminosäuresubstitutionen ergaben (Tabelle 14).

**Tabelle 14: In dieser Studie getestete Aminosäuresubstitutionen.** Die jeweiligen Mutationen wurden sowohl isoliert, als auch in Kombination betrachtet, so dass sich insgesamt 48 Varianten ergaben.

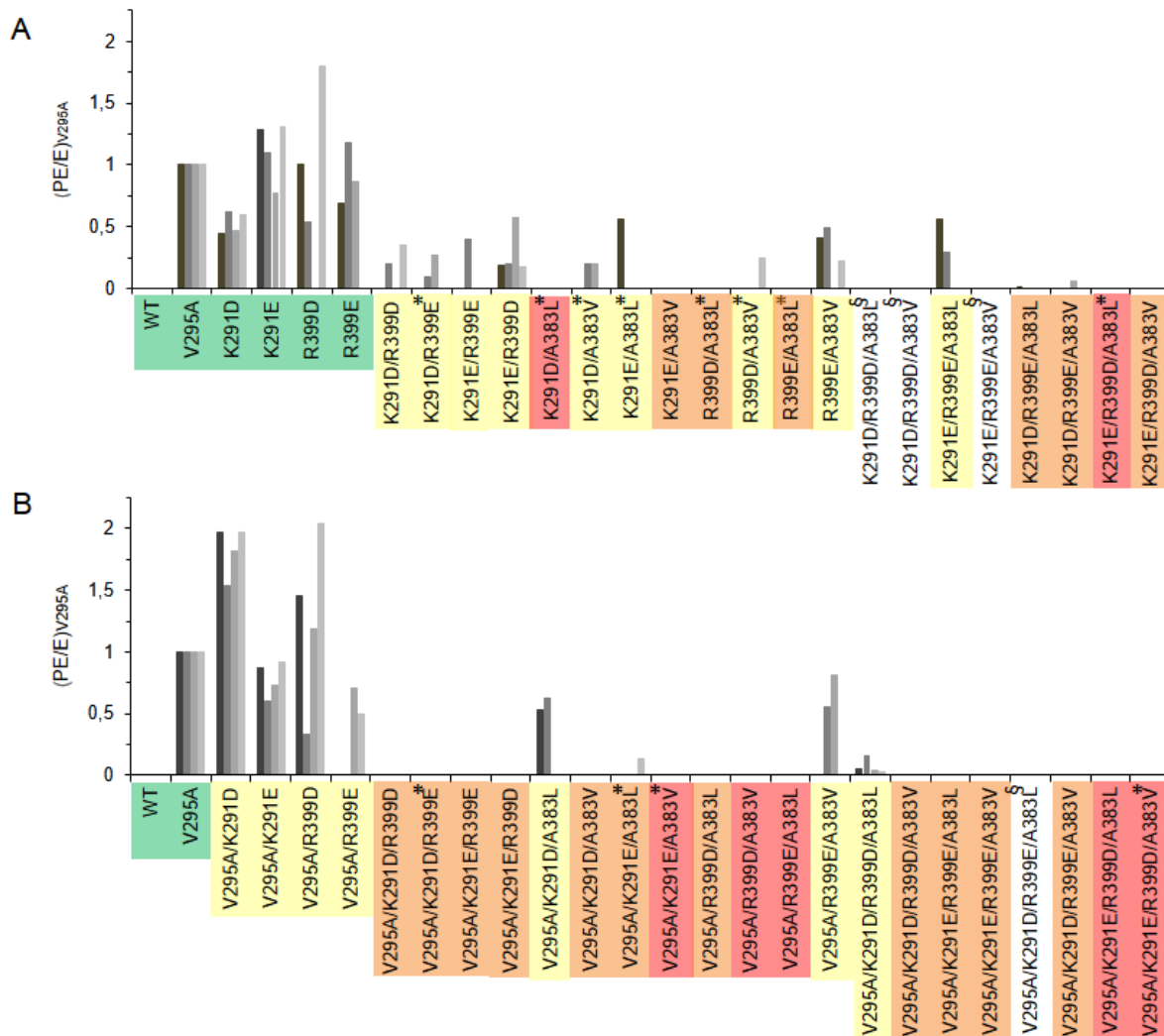
Rest	Austausch gegen
V295	A
K291	D oder E
R399	D oder E
A383	L oder V

Die Mutationen wurden jeweils über *oe*PCR generiert (*overlap extension* PCR, Kapitel V5.3.6) und über SLIC-MIX die *E. coli*-Actinomyceten-*Shuttlevektoren* pJA-W6 – M29 (Tabelle 25)

erstellt (Kapitel V5.7.7). Alle Expressionsvektoren sind Varianten des in der Dissertation von Uschi Sundermann erstellten integrativen Vektors pKSSU89, der eine effiziente Expression von DEBS3 in *S. erythraea* unter der Kontrolle des *actI-actIIorf4*-Promotersystems aus der Actinorhodinbiosynthese ermöglicht.<sup>[258f,265]</sup>

Um eine Untersuchung der Enzymvarianten im Umfeld des gesamten Erythromycinbiosyntheseclusters zu ermöglichen, wurden die mutierten DEBS3-Expressionskassetten anschließend über Konjugation (Kapitel V6.1.4) in die  $\Delta$ AT6hyg<sup>R</sup>-Variante von *S. erythraea* (Tabelle 17) eingebracht. Diese Variante wurde ebenfalls im Rahmen der Dissertation von Uschi Sundermann erstellt und ist nicht dazu in der Lage Erythromycin zu produzieren.<sup>[258f]</sup> Im codierenden Abschnitt der endogenen DEBS3 wurde anstelle der *at6*-Domäne das Hygromycinresistenzgen *hyg*<sup>R</sup> eingeführt.<sup>[258f]</sup> Erst durch die sequenzspezifische Rekombination eines funktionellen *eryAIII*-Gens mittels der plasmidcodierten  $\Phi$ C31-Phagenintegrase in die chromosomale DNA von *S. erythraea* kann die Erythromycinbiosynthese komplementiert werden.<sup>[258f]</sup> Dadurch wird eine Hintergrundexpression der Wildtyp-DEBS vermieden und die detektierte Produktion des Erythromycins oder eines Erythromycinderivats stammt allein von den erstellten DEBS-Varianten.

Jeweils vier Klone, der auf diese Weise generierten *S. erythraea*-Varianten, wurden anschließend gegen das durch Stephan Klopries oder Niclas Pryk synthetisierte PropargylM-SNAC gescreent.<sup>[68,266]</sup> Das racemische Substrat wurde dafür in einer Konzentration von 10 mM in das Fermentationsmedium SM3 (Tabelle 35) gegeben und nach fünf Tagen Kultivierung bei 30°C (Kapitel V6.4.2) die Ethylacetatextrakte der Fermentationskulturen (Kapitel V9.1.2) über HPLC-ESI/MS untersucht (Kapitel V10.2.2). Aufgrund wiederholter technischer Probleme mit der HPLC-ESI/MS konnten bislang nur für 44 der 48 Varianten Ergebnisse erzeugt werden (siehe Abbildung 94, alle nicht gescreenten Varianten sind mit § markiert). Trotz der Einführung repulsiver Wechselwirkungen gegenüber dem natürlichen Substrat wurde in keinen der Proben 2-Propargylerythromycin A als Hauptprodukt erhalten. In den Fällen, in denen 2-Propargylerythromycin A produziert wurde, konnte es wie zuvor (siehe Kapitel IV5.1) nur mit wesentlich geringerer Intensität als das Erythromycin A-Signal detektiert werden (vergleiche auch Abbildung 95). Um die Einbauraten der neu erstellten Varianten mit der V295A-Variante vergleichen zu können, wurde jeweils das Verhältnis zwischen 2-Propargylerythromycin A und Erythromycin A gebildet und auf das Verhältnis des besten Klons der V295A-Variante (PE/E = 0,033, siehe Kapitel IV5.1) normiert (Abbildung 94). Dieses normierte Verhältnis wird hier als (PE/E)<sub>V295A</sub> bezeichnet. Aufgrund der hohen Klon-zu-Klon-Variation, die vermutlich auf die genetische Manipulation des Wirtsorganismus zurückgeführt werden kann, wurde auf die Angabe von Mittelwerten verzichtet.<sup>[258f]</sup>



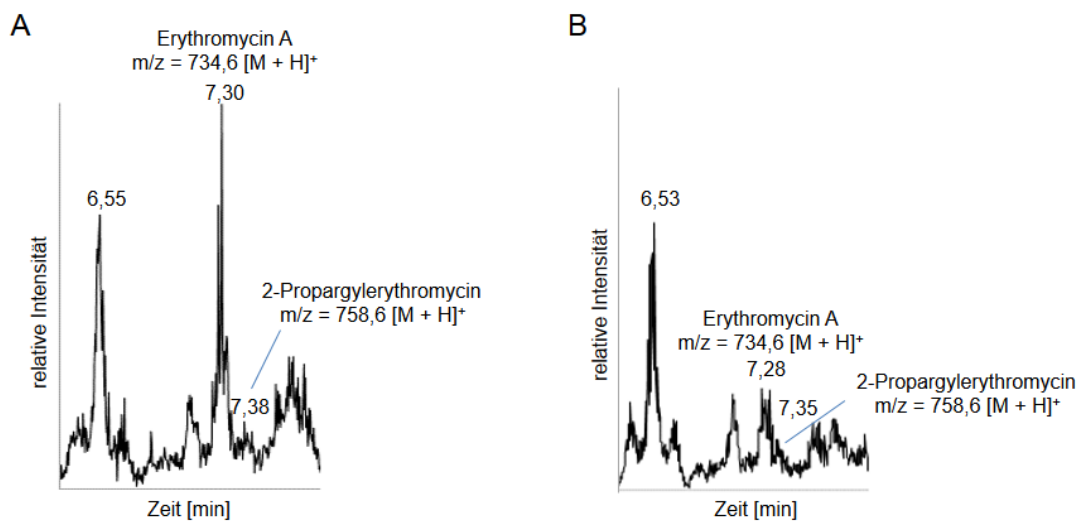
**Abbildung 94: Vergleich der in dieser Studie generierten Varianten mit der V295A-Variante.**  $(PE/E)_{V295A}$  beschreibt das auf die V295A-Variante normierte Verhältnis zwischen der Signalintensität des 2-Propargylerythromycin A und des Erythromycin A. Die Farbcodierung gibt die relativen Erythromycinproduktivitäten der verschiedenen Varianten wieder. Grün: Variante weist zwischen 50 und 100% der Erythromycin A-Produktion der V295A-Variante auf, gelb: zwischen 10 und 50%, orange: unter 10%, rot: gar keine Produktion des Erythromycins oder des 2-Propargylerythromycins. §: Varianten wurden noch nicht gescreent, \* Varianten wurden von Kyra Koopmans während des Verfassens der vorliegenden Schrift gescreent.<sup>[264]</sup>

Die Analyse der Einzelmutationen (Abbildung 94 A) zeigte, dass jede Mutation im CoA-Bindebereich isoliert betrachtet, wie erwünscht, die Affinität für das natürliche Substrat schwächte, da im Gegensatz zum Wildtyp jeweils ein Einbau für PropargylM-SNAC nachgewiesen wurde (Varianten K291D, K291E, R399D und R399E). Einzelne Klone der drei Varianten K291E, R399D und R399E zeigten im Vergleich zu der V295A-Variante sogar einen 1,25-fachen bis 1,8-fachen stärkeren Einbau des PropargylM-SNACs. Jedoch führte die Kombination dieser Mutationen sowohl zu einer signifikanten Abnahme der Produktivität (gelbe, orangefarbene und rote Codierung der Varianten) als auch zu einer Abnahme des  $(PE/E)_{V295A}$ -Verhältnisses. Mit Ausnahme der K291E/R399E/A383L-Variante wiesen alle



bislang getesteten Triplemutanten im Schnitt kleinere  $(PE/E)_{V295A}$ -Verhältnisse auf als die Doppelmutanten. Die Varianten K291D/A383L und K291E/R399D/A383L stellten ihre 2-Propargylerythromycin A- und Erythromycin A-Produktivität sogar komplett ein, was auf einen Aktivitätsverlust der AT6-Domäne oder des DEBS3-Enzyms hinweist.

Eine Kombination der Mutationen im CoA-Bindebereich mit der V295A-Mutation (Abbildung 94 B) im katalytischen Zentrum der AT6-Domäne führte vereinzelt im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutationen zu einem größeren  $(PE/E)_{V295A}$ -Verhältnis (vgl. K291D mit V295A/K291D oder R399D mit Klon 4 von V295A/R399D). Alle Klone der Variante V295A/K291D und Klon 4 der Variante V295A/R399D wiesen einen doppelt so hohen Einbau für PropargylM-SNAC auf als die V295A-Variante. Am Intensitätsverhältnis der beiden Signale in der ESI/MS abgelesen, produziert der beste Klon aus dieser Studie (Klon 4 der Variante V295A/R399D) jedoch immer noch 15-mal mehr Erythromycin A als 2-Propargylerythromycin A. Außerdem zeigten die Varianten mit einer Mutation im CoA-Bindebereich in Kombination mit der V295A-Mutation im katalytischen Zentrum im Vergleich zu den Einzelmutanten ein wesentlich geringeres Produktionsniveau (Abbildung 94 B, vgl. gelb eingefärbte Varianten mit den grün eingefärbten Varianten ohne V295A-Mutation und Abbildung 95).



**Abbildung 95: Ausschnitte aus zwei HPLC-Chromatogrammen zum Vergleich der Produktivitäten der Varianten mit einer Mutation im CoA-Bindebereich (A) und in Kombination mit der Mutation V295A im katalytischen Zentrum der AT6-Domäne (B).** Hier exemplarisch für K291E (A) und V295A/R399D (B) gezeigt. Nimmt man das Signal bei einer Retentionszeit von 6,53 – 6,55 min als interne Referenz, erkennt man die geringe Produktivität der V295A/R399D-Variante.

Die Einführung mehrerer Mutationen im CoA-Bindebereich führte auch in Kombination mit der V295A-Mutation in allen Fällen zu einer Abnahme des  $(PE/E)_{V295A}$ -Verhältnisses im Vergleich zu den Einzelmutationen und der V295A-Variante. Bei der Variante V295A/K291D/R399D, die eine Kombination der beiden besten Varianten darstellt, konnte wie bei vielen weiteren Varianten gar keine Produktion des 2-Propargylerythromycins A nachgewiesen werden.

Lediglich vier der insgesamt 19 getesteten Varianten mit zwei oder mehr Mutationen im CoA-Bindebereich in Kombination mit der V295A-Mutation zeigten überhaupt eine Produktion des gewünschten 2-Propargylerythromycins A. Fünf der 19 Varianten stellten ihre Produktivität komplett ein (Abbildung 94 B, rot codierte Varianten V295A/K291E/A383V, V295A/R399D/A383V, V295A/R399E/A383L, V295A/K291E/R399D/A383L und V295A/K291E/R399D/A383V).

Insgesamt scheint eine Produktion des Erythromycins oder des gewünschten Erythromycinderivats im Rahmen der hier präsentierten Ergebnisse nicht rational vorhersagbar zu sein, da die Produktivität über die untersuchten Varianten zufällig verteilt zu sein scheint. Während beispielsweise K291D/A383L gar keine Produktivität aufweist, sind einzelne Klone der Variante V295A/K291D/A383L dazu in der Lage sowohl Erythromycin A als auch 2-Propargylerythromycin A zu produzieren.

Eine generelle Abnahme oder der Verlust der Produktivität durch die gleichzeitige Einführung mehrerer Mutationen, kann mehrere Ursachen haben. Beispielsweise könnten die Mutationen einen destabilisierenden Effekt auf die Proteinfaltung der AT6-Domäne und damit auf das gesamte DEBS3-Enzym haben. Alternativ wäre eine Fernwirkung der mutierten Reste auf das aktive Zentrum der AT6-Domäne denkbar, ohne die äußere Struktur der Proteindomäne zu beeinflussen. Neben der beabsichtigten Schwächung der Bindung des natürlichen Substrats könnte auch durch die Umstrukturierung des CoA-Bindebereichs die Bindung des artifiziellen Substrats beeinträchtigt werden. Zudem stellt der CoA-Bindebereich gleichzeitig den Bindebereich für die ACP-Domäne dar.<sup>[267]</sup> Kann nach der Acylierung des katalytisch aktiven S197 in dem aktiven Zentrum der AT6-Domäne, die für den Transfer des Malonylrestes auf die KS-Domäne wichtige ACP-Domäne nicht mit genügend hoher Affinität binden, so wirkt sich dies negativ auf die Gesamtproduktivität der Variante aus.

Um die im Rahmen dieser Experimente beobachtete Abnahme des  $(PE/E)_{V295A}$ -Verhältnisses bei der Kombination der Mutationen im CoA-Bindebereich (mit und ohne Kombination mit der V295A-Variante) zu erklären, hilft möglicherweise ein genauerer Blick in das berechnete Strukturmodell (siehe Abbildung 93).<sup>[261]</sup> Der CoA-Rest wird neben den, im Rahmen dieser Dissertation, mutierten Resten nur über vier weitere polare, aber zahlreiche hydrophobe Kontakte stabilisiert (nicht gezeigt). Laut Modell ließe der Platz innerhalb des Bindetunnels die Stabilisierung des CoA-Rests in einer veränderten Konformation in einem mutierten Bindetunnel durch zahlreiche hydrophobe Wechselwirkungen zu. Im Gegensatz dazu wird der kleinere SNAC-Rest des artifiziellen Substrats über wesentlich weniger Wechselwirkungen innerhalb der AT-Domäne stabilisiert, wodurch die stets höhere Affinität für den CoA-Rest bei allen getesteten Varianten erklärt werden könnte.



Im Rahmen der hier präsentierten Ergebnisse konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die berechneten AT6-Strukturmodelle geeignet sind, um Mutageneseexperimente gezielt für den variablen CoA- bzw. ACP-Bindebereich zu planen. Zwar konnte eine Schwächung der Affinität für das native MM-CoA (oder des ACPs) induziert werden, eine vollständige Repulsion des natürlichen Substrats wurde durch die eingeführten Mutationen jedoch nicht erzielt. Daher wird auch für die bislang noch nicht getesteten Varianten keine signifikante Steigerung der 2-Propargylerythromycinproduktion erwartet. Trotzdem werden die letzten vier Varianten der Vollständigkeit halber momentan im Rahmen der Dissertation von Kyra Koopmans getestet.<sup>[264]</sup> In weiteren Experimenten bietet es sich an zu überprüfen, ob eine Kombination der Einzelmutationen und der beiden besten Varianten V295A/K291D und V295A/R399D mit anderen Mutationen im katalytischen Zentrum zu einer weiteren Steigerung des Einbaus des PropargylIM-SNACs führen kann. Entsprechende Versuche werden momentan ebenfalls im Rahmen der Dissertation von Kyra Koopmans durchgeführt.<sup>[264]</sup>

Außerdem bietet sich an, verschiedene Varianten aus dieser Studie zusammen mit dem natürlichen und dem artifiziellen Substrat zu modellieren, um die hier erhaltenen Ergebnisse besser rationalisieren zu können.

Obwohl der Bindemodus für CoA-Ester in verschiedenen Enzymen nicht konserviert zu sein scheint, lassen sich bei dem Vergleich mehrerer Kristallstrukturen von CoA-esterbindenden Enzymen mit Substrat bzw. Substratanaloga zwei Gemeinsamkeiten herausstellen.<sup>[268]</sup> In allen Fällen scheint das Adenin des CoAs durch Wasserstoffbindungen mit dem Protein stabilisiert zu sein und zum Protein hinzuzeigen, wohingegen das 3'-Phosphat der Ribose vom Protein wegzeigt.<sup>[268]</sup> In dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Strukturmodell scheinen diese Schlüsselwechselwirkungen jedoch für den AT6-MM-CoA-Komplex nicht bestätigt zu werden (siehe Abbildung 93). Vielmehr zeigt der Adeninrest vom Protein weg und ist vollständig solventsexponiert, wohingegen der 3'-Phosphatrest zum Protein orientiert zu sein scheint. Daher kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Modell zumindest im stark solventsexponierten Bereich die realen Wechselwirkungen des Substrats mit der AT-Domäne nicht richtig wiedergibt.

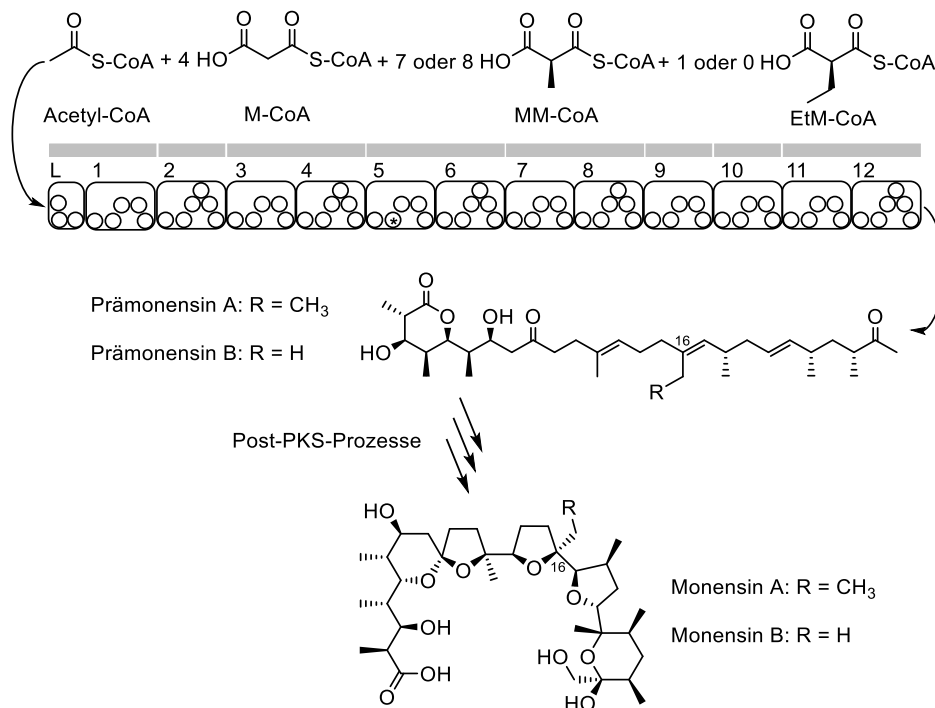
Berücksichtigt man die möglicherweise ungenaue Beschreibung der Wechselwirkungen im solventsexponierten Bereich, könnten Mutageneseexperimente mit Resten, die weiter im Inneren der Proteindomäne liegen, möglicherweise präzisere Vorhersagen erlauben. Es bietet sich an, die polaren Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren des CoA-Bindetunnels und dem Substrat zu unterbinden (siehe Abbildung 93). Da die Mutation der Aminosäure Q113 auch die Affinität für den SNAC-Rest schwächen würde, kommen für neue Mutageneseexperimente nur die Aminosäuren S237, N262 und S266 in Betracht. Aufgrund der partiellen Strukturidentität des gebundenen CoA-Esters mit dem Phosphopantetheinylarm

des ACPs in dem Positionsbereich der genannten Reste, ist dabei die Gefahr jedoch noch höher die Bindung des ACPs ebenfalls negativ zu beeinflussen.

## 5.2 Ausnutzung der natürlichen Substratpromiskuität einer AT-Domäne zur Erzeugung von Monensinderivaten

Monensin A und B (siehe Abbildung 96) sind Polyketide aus der Gruppe der Polyetherionophore aus *Streptomyces cinnamonensis*.<sup>[258e,269]</sup> Für Monensin A ist eine antibakterielle, antiparasitäre, antivirale sowie anticarcinogene Wirkung nachgewiesen.<sup>[270]</sup> Die physiologische Wirkung wird durch die starke Komplexbildung einwertiger Kationen und deren Transport über Zellmembranen und eine damit verbundene Depolarisation der Membran erklärt.<sup>[271]</sup> Aufgrund seiner allgemeinen Zelltoxizität findet Monensin A lediglich breite Verwendung als Antibiotikum und Zusatz zu Futtermitteln in der Viehzucht.<sup>[271b]</sup> Zudem eignen sich Monensin und seine Derivate als Bestandteil von ionenselektiven Elektroden zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen in unterschiedlichen Lösungen.<sup>[272]</sup>

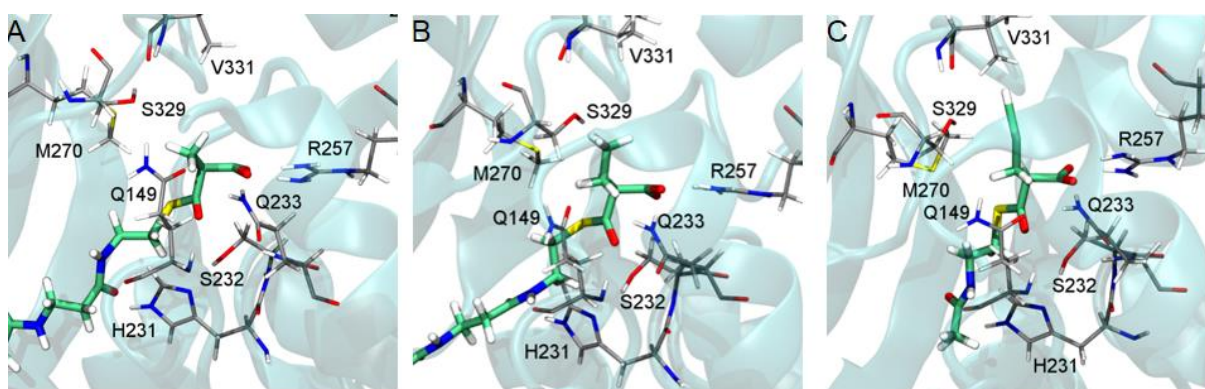
Die Biosynthese der Polyketidrückgrate von Monensin A und B wird durch eine modulare Typ I-PKS mit insgesamt 12 Modulen katalysiert (Abbildung 96).<sup>[269]</sup>



**Abbildung 96: Schematische Darstellung der Monensinbiosynthese.** Die promiske AT5-Domäne (mit \* gekennzeichnet) akzeptiert sowohl EtM-CoA als auch MM-CoA zur Synthese von Prämonensin A und B. Die Post-PKS-Enzyme katalysieren die oxidative Cyclisierung zu Monensin A und B. Einzelne Module der Monensin-PKS sind als Kästen dargestellt mit L als Bezeichnung für das Lademodul und 1 – 12 für die 12 Verlängerungsmodule. Die verschiedenen Domänen sind durch Kreise symbolisiert und die grauen Kästen kennzeichnen die insgesamt acht Enzyme aus denen die Monensin-PKS zusammengesetzt ist.

Die Mon-AT5-Domäne (AT-Domäne aus Modul 5 der Monensin-PKS) weist eine natürliche Substratpromiskuität zum Einbau der natürlichen Verlängerungseinheit EtM-CoA zur Bildung des Prämonensin A und zur Akzeptanz des MM-CoAs zur Synthese des Prämonensin B auf.<sup>[273]</sup> In den anschließenden Post-PKS-Prozessierungen wird die Biosynthese von Monensin A und B durch oxidative Cyclisierungen vervollständigt.<sup>[269,274]</sup>

Da die Mon-AT5-Domäne eine natürliche *in vivo* Substratpromiskuität zu Verlängerungseinheiten mit unterschiedlichen sterischen Ansprüchen aufweist, lag die Vermutung nahe, dass sie auch andere unnatürliche Verlängerungseinheiten akzeptieren könnte. In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits Untersuchungen zur natürlichen Substratpromiskuität der Mon-AT5 gegenüber unnatürlichen Verlängerungseinheiten veröffentlicht.<sup>[68,253f]</sup> Dabei wurden in einer Kooperation mit dem Arbeitskreis von Elsa Sanchez-Garcia und ihrem Mitarbeiter Kenny Bravo-Rodriguez, analog zu den Studien zur Verschiebung der Substratspezifität in der Erythromycinbiosynthese (siehe Kapitel IV5.1), mehrere Strukturmodelle für die Mon-AT5 ohne Substrat und im Komplex mit unterschiedlichen Verlängerungseinheiten berechnet (Abbildung 97).<sup>[253f,261]</sup>



**Abbildung 97: Darstellung des aktiven Zentrums der modellierten Mon-AT5-Domäne (blau) mit den beiden natürlichen Substraten MM-CoA (A) und EtM-CoA (B) sowie der artifiziellen Verlängerungseinheit PropargylM-CoA (C).** Die konservierten Schlüsselwechselwirkungen der Aminosäuren R257, zur Stabilisierung der Malonylcarboxylatgruppe, und Q149, zur Stabilisierung des Thioesters und der angrenzenden Amidgruppe des CoA-Restes, positionieren die Substrate in der Nähe des katalytisch aktiven S232. Sterisch anspruchsvolle Substrate können nur positioniert werden, wenn der Rest an 2-Position des Malonylrestes in Richtung V331 orientiert ist. Kohlenstoffgerüste der Aminosäuren: grau, Kohlenstoffgerüste der Substrate: grün, Wasserstoffatome: weiß, Stickstoffatome: blau; Sauerstoffatome: rot und Schwefelatome: gelb. Diese Abbildungen wurden mit Erlaubnis der Dissertation von Kenny Bravo-Rodriguez entnommen.<sup>[261]</sup>

Im Gegensatz zu der DEBS-AT6 (siehe Abbildung 91 A), zeigte sich das aktive Zentrum der Mon-AT5 wesentlich relaxierter und exponierter für die Bindung unterschiedlicher Substrate.<sup>[253f]</sup> Selbst bei dem Docking des sterisch anspruchsvollen PropargylM-SNACs konnten die, für die Bindung von MM-CoA und EtM-CoA, ermittelten Schlüsselwechselwirkungen mit der

aktiven Tasche im Wesentlichen aufrecht erhalten werden, falls die Propargylseitenkette die richtige Orientierung zu dem Rest V331 aufwies.

Ein experimenteller Nachweis für den Einbau unterschiedlicher und unnatürlicher Verlängerungseinheiten erfolgte anschließend durch unsere Arbeitsgruppe.<sup>[68,253f,275]</sup> Dabei wurde der Stamm *S. cinnamomensis* PFL A495 und eine Redoxvariante dieses Stammes verwendet. Da *S. cinnamomensis* PFL A495 eine Gendeletion für eines der verantwortlichen Post-PKS-Enzyme für die Cyclisierung der Monensine aufweist, sammeln sich in dieser Variante die beiden artifiziellen Abbruchprodukte Prämonensin A und B an.<sup>[274]</sup> Vier der fünf getesteten SNAC-aktivierten Malonsäurederivate AllylM-SNAC, PropargylM-SNAC, PropM-SNAC (PropylM-SNAC) und BuM-SNAC konnten erfolgreich durch die Monensin-PKS eingebaut werden und ermöglichten den Nachweis von insgesamt sieben neuen Prämonensinderivaten.<sup>[68,253f]</sup>

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Ergebnisse stellen eine Erweiterung zur Übertragung der Resultate der vorangegangenen Studie auf das gesamte Biosynthesecollier von Monensin in *S. cinnamomensis* dar. Dadurch sollte die Toleranz der Post-PKS-Enzyme gegenüber dem Einbau unnatürlicher Verlängerungseinheiten überprüft und die Synthese neuer Monensinderivate ermöglicht werden.

Unter Nutzung der durch Stephan Klopries synthetisierten SNAC-aktivierten Malonsäurederivate und in Zusammenarbeit mit Ahmed Ali wurden die beiden in unserer Gruppe vorliegenden Monensinproduzenten *S. cinnamomensis* PFL A001 und A519 (Tabelle 17) für den Einbau unnatürlicher Substrate verglichen.<sup>[68,275]</sup> Während *S. cinnamomensis* PFL A001 den aus der Natur isolierten Wildtypstamm bezeichnet, handelt es sich bei *S. cinnamomensis* PFL A519 um einen aus der Industrie stammenden Überproduzenten für Monensin A.<sup>[276]</sup> Das Verhältnis von Monensin A und Monensin B ist für beide Stämme in den meisten Medien in etwa ausgeglichen.<sup>[277]</sup> Lediglich in ölbasierten Medien wird bevorzugt Monensin A produziert, wobei im Vergleich zu dem Wildtypstamm für den industriellen Stamm größere Monensin A-zu-Monensin B-Verhältnisse detektiert werden (siehe Anhang, Abbildung A13).<sup>[277-278]</sup> Es wird vermutet, dass die stärkere Produktion des Monensin A in ölbasierten Medien durch eine größere intrazelluläre Konzentration von EtM-CoA resultiert, hervorgerufen durch die  $\beta$ -Oxidation gradzahliger Fettsäuren des Mediums zu Butyryl-CoA, dem direkten Vorläufer von EtM-CoA.<sup>[278]</sup>

Da sowohl die Wahl des Stamms als auch die Wahl des Mediums einen Einfluss auf den Einbau unterschiedlicher Verlängerungseinheiten in der Polyketidbiosynthese hat, wurden alle Fütterungen der beiden Stämme jeweils in SM16- und dem ölhaltigen BM-Medium (Tabelle 35) durchgeführt (Kapitel V6.4.3).<sup>[276]</sup> Die racemischen Malonsäurederivate AllylM-SNAC, PropargylM-SNAC, PropylM-SNAC, BuM-SNAC, HexM-SNAC und PhM-SNAC wurden

jeweils in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. Nach Abschluss der Fermentationen wurden die Kulturen extrahiert (Kapitel V9.1.3) und die organischen Phasen mittels HPLC-ESI/MS auf die Anwesenheit neuer Monensinderivate überprüft (Kapitel V10.2.2). Um die Einbauraten der unnatürlichen Verlängerungseinheiten für alle Fermentationen vergleichen zu können, wurden jeweils die Intensitätsverhältnisse zwischen den Signalen der Monensinderivate und den beiden natürlichen Monensinen gebildet (Tabelle 15). Diese Verhältnisse werden im folgenden D/MonA und D/MonB genannt.

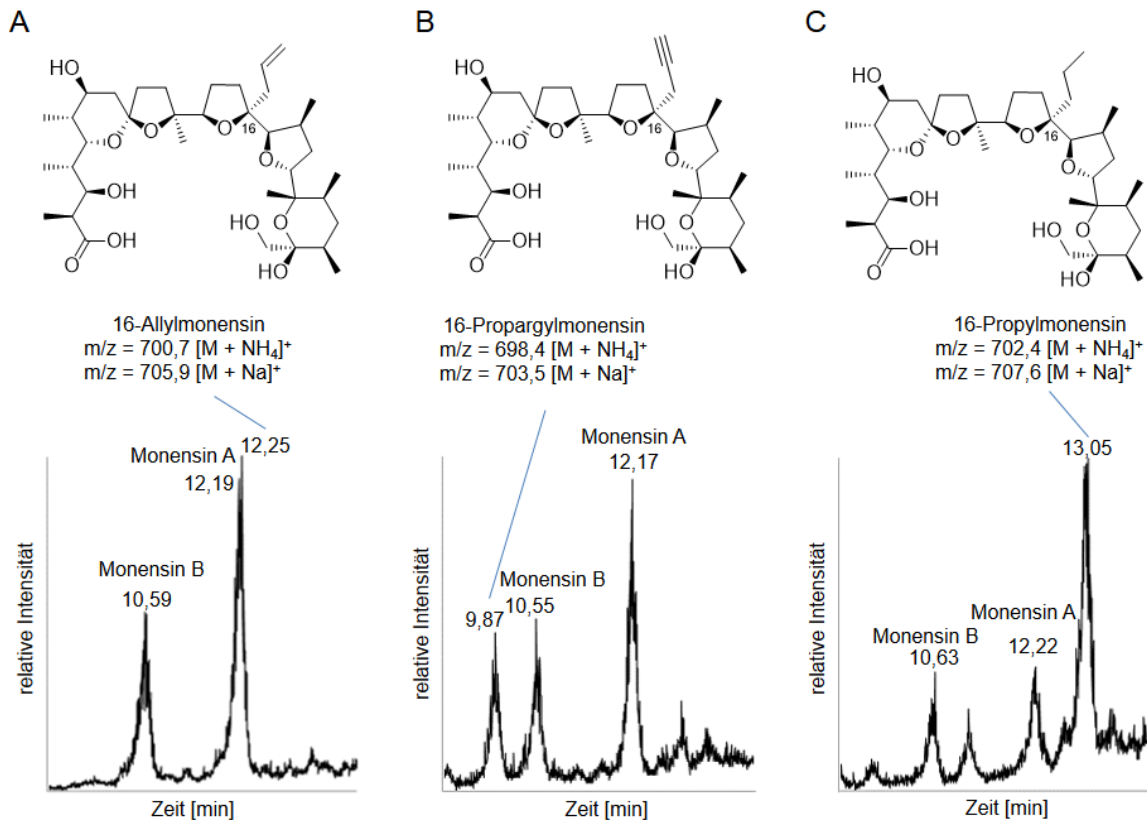
**Tabelle 15: Übersicht über die erzeugten Ergebnisse bei der Fütterung der beiden Monensinproduzenten *S. cinnamomensis* PFL A001 und PFL A519 mit unterschiedlichen SNAC-aktivierten Malonsäurederivaten.** Es wurden zum Vergleich aller Fermentationen jeweils die Verhältnisse D/MonA und D/MonB gebildet. D bezeichnet die Signalintensitäten der jeweils erhaltenen Monensinderivate und MonA und MonB die Signalintensitäten der Wildtypprodukte Monensin A und Monensin B. Rest bezeichnet jeweils die Seitenkette des Malonsäurederivats an 2-Position.

Rest	SM16-Medium				BM-Medium			
	PFL A001		PFL A519		PFL A001		PFL A519	
	D/MonA	D/MonB	D/MonA	D/MonB	D/MonA	D/MonB	D/MonA	D/MonB
Allyl	1,19	1,35	0,88	0,87	0	0	0	0
Propargyl	0,74	0,95	0,83	0,88	0,80	7,96	0,03	0,32
Propyl	1,86	1,94	0,27	0,32	0,40	1,01	0,03	0,26
Butyl	0	0	0	0	0	0	0	0
Hexyl	0	0	0	0	0	0	0	0
Phenyl	0	0	0	0	0	0	0	0

Die Malonsäurederivate mit den größten sterischen Ansprüchen BuM-SNAC, HexM-SNAC und PhM-SNAC konnten nicht eingebaut werden. Bei HexM-SNAC zeigte sich, wie auch schon bei den Versuchen zur Derivatisierung von Prämonensin, eine wachstumsinhibierende Wirkung auf *S. cinnamomensis*, so dass generell eine sehr geringe Monensinproduktivität beobachtet wurde.<sup>[253f]</sup> Für die kleineren Seitenketten hingegen wurden je nach Medium verschiedene Ergebnisse erhalten. Für PropargylIM-SNAC und PropM-SNAC wurde in beiden Medien und in beiden Stämmen ein erfolgreicher Einbau nachgewiesen, wohingegen für AllylIM-SNAC in beiden Stämmen nur in SM16-Medium ein eindeutiger Nachweis gelang.

Die höhere intrazelluläre Konzentration des EtM-CoA durch die Fermentation in dem ölasierten Medium BM spiegelte sich an den berechneten Verhältnissen wider. Da dabei wesentlich mehr Monensin A gebildet wurde, war das jeweilige D/MonB-Verhältnis in allen Fällen höher als das D/MonA-Verhältnis. Insgesamt wurden in BM geringere Intensitäten für die neuen Monensinderivate erhalten. Der industrielle Stamm PFL A519 zeigte sich intoleranter gegenüber dem Einbau unnatürlicher Verlängerungseinheiten als der Wildtypstamm *S. cinnamomensis* PFL A001. Es ergaben sich für den Wildtypstamm PFL A001

in SM16-Medium die besten Einbauraten. Die jeweiligen neuen Monensinderivate 16-Allylmonensin, 16-Propargylmonensin und 16-Propylmonensin wurden jedoch immer noch als Mischung mit Monensin A und B in den Fermentationsextrakten erhalten (Abbildung 98).



**Abbildung 98:** Ausschnitte aus den HPLC-Chromatogrammen der Kulturextrakte der Fermentationen von *S. cinnamonensis* PFL A001 in SM16-Medium mit 10 mM AllylM-SNAC (A), PropargylM-SNAC (B) und PropM-SNAC (C) zum Nachweis der neuen Monensinderivate 16-Allylmonensin, 16-Propargylmonensin und 16-Propylmonensin.

Für die Verlängerungseinheit mit der flexibelsten Seitenkette wurden die besten Einbauraten erhalten, so dass 16-Propylmonensin das Hauptfermentationsprodukt darstellte (Abbildung 98C). 16-Allylmonensin konnte nur als Koeluat mit Monensin A und in der gleichen Intensität wie Monensin A erhalten werden (Abbildung 98 A). 16-Propargylmonensin wies die geringste Intensität im Vergleich zu Monensin A und B auf (Abbildung 98 B). Die Identität der drei neuen Monensinderivate wurde anschließend sowohl über MS/MS/MS als auch über HRMS bestätigt (Kapitel V10.2.2 und V10.2.3).

Im Vergleich zu den Experimenten mit dem Prämonensinproduzenten *S. cinnamonensis* PFL A495 zeigte sich ein ähnliches Substratprofil.<sup>[68,253f,275]</sup> Lediglich für BuM-SNAC konnte im Falle des Prämonensins ein Einbau beobachtet werden, für Monensin jedoch nicht.<sup>[253f]</sup> Dies könnte darauf hinweisen, dass sehr große Reste an 16-Position des Prämonensins nicht von den Enzymen der Post-PKS-Prozessierung in dem Monensinbiosynthesecluster toleriert werden.

Da 16-Allylmonensin in etwa die gleiche Hydrophilie aufwies wie Monensin A, wird eine Trennung dieser beiden Substanzen als kritisch eingeschätzt. Im Gegensatz zu 16-Propylmonensin, weist 16-Propargylmonensin eine orthogonale Funktionalität für semi-synthetische Ansätze auf. Daher könnte sich die Skalierung der Fermentation dieses Monensinderivats in Zukunft lohnen.

### 5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Durch eine Kombination von computerbasierten Methoden, zur Modellierung von Proteinstrukturen, mit der organischen Synthese und mit mikrobiologischen sowie molekularbiologischen Methoden, konnten insgesamt fünf neue Polyketidderivate chemofermentativ erzeugt werden. Grundlegend für den Einbau nicht-nativer Malonsäurederivate in die Polyketidbiosynthese ist die Substrattoleranz der AT-Domänen, die für die primäre Substraterkennung zuständig sind.<sup>[254]</sup> Die Analyse simulierter Strukturmodelle verschiedener AT-Domänen im Komplex mit unterschiedlichen Substraten erlaubte die Planung von Mutageneseexperimenten und die Vorhersage des Einbaus nicht-nativer Malonsäurederivate zur Bildung von neuen Erythromycin- und Monensinderivaten.

Die Substratpromiskuität der, unter natürlichen Bedingungen, spezifischen AT6-Domäne aus DEBS konnte bereits in Vorarbeiten durch strukturgeleitete Mutagenese erhöht und der Einbau des artifiziellen Substrats PropargylM-SNAC zur Bildung von 2-Propargylerythromycin A *in vivo* nachgewiesen werden.<sup>[68,253e,258f]</sup> Durch ein Substratscreening der dabei erzeugten V295A-Variante, konnten im Rahmen dieser Arbeit, die zusätzlichen Erythromycinderivate 2-Ethylerythromycin A und 2-Allylerythromycin A erzeugt werden (siehe Kapitel IV5.1). Zur Reduzierung des als Hauptprodukt erhaltenen Erythromycin A wurden mit Hilfe des simulierten AT6-Strukturmodells mit gebundenem Substrat gezielt neue Varianten erstellt. Tatsächlich konnte durch einzelne Mutationen im CoA-Bindebereich der AT6-Domäne die Affinität für das natürliche Substrat MM-CoA geschwächt und ein gesteigertes Verhältnis der Signalintensitäten von 2-Propargylerythromycin A zu Erythromycin A erhalten werden (siehe Kapitel IV5.1.2). Die höchsten Einbauraten wurden für einzelne Klone der Varianten V295A/K291D und V295A/R399D beobachtet, die jeweils eine Kombination von einzelnen Mutationen in der aktiven Tasche und in dem CoA-Bindebereich der AT6-Domäne aufweisen. Eine weitere Kombination der Mutationen führte jedoch zu einer abnehmenden Gesamtproduktivität der Varianten. Bislang wurden die gewünschten Derivate nur in analytischen Mengen erhalten. Die Arbeiten im Rahmen der Dissertation von Kyra Koopmans werden zeigen, in welchem Maße die Produktion von artifiziellen Erythromycinderivaten durch

weitere Mutationen in unterschiedlichen Bereichen der AT6-Domäne gesteigert werden kann.<sup>[264]</sup>

Im Gegensatz zu den AT-Domänen in DEBS, besitzt die AT5-Domäne aus der PKS der Monensinbiosynthese eine natürliche Substratpromiskuität. Die Modellierung dieser Domäne mit unterschiedlichen Substraten erlaubte einen detaillierten Einblick in die Substraterkennung und die Vorhersage des Einbaus weiterer, sterisch anspruchsvoller Substrate.<sup>[253f,261]</sup> In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde dies bereits experimentell, anhand der artifiziell abgebrochenen Monensinbiosynthese zur Erzeugung von Prämonensinderivaten, bestätigt.<sup>[68,253f,275]</sup> Diese Ergebnisse wurden hier auf das gesamte Monensinbiosynthesecolony übertragen. Durch Fütterungen von artifiziellen Verlängerungseinheiten zu zwei Monensinproduzenten wurden die neuen Monensinderivate 16-Allylmonensin, 16-Propargylmonensin und 16-Propylmonensin erhalten (siehe Kapitel IV.5.2). Die Wahl des Stammes und des Mediums zeigten sich dabei als sensibler Faktor für die Einbauraten unterschiedlicher artifizieller Bausteine. Im Vergleich zum industriellen Stamm zur Überproduktion von Monensin A, wurden bessere Einbauraten der artifiziellen Verlängerungseinheiten für den Wildtypstamm *S. cinnamomensis* PFL A001 erhalten. Im Gegensatz zu dem Prämonensinproduzenten wurde durch die Monensinproduzenten kein Einbau des BuM-SNACs toleriert. Die Post-PKS-Prozessierung stellte sich somit auch kritisch für den Einbau nicht-nativer Verlängerungseinheiten heraus.

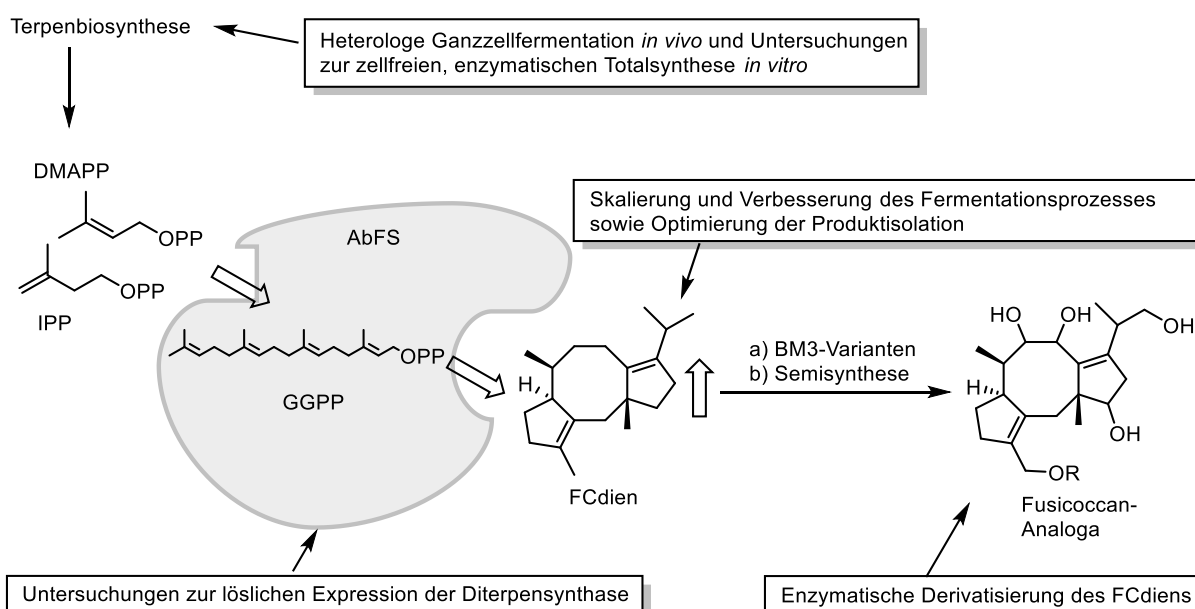
Da die Mon-AT5-Domäne eine allgemein relaxiertere aktive Tasche aufweist (Vergleich Abbildung 88 und Abbildung 97), konnten im Vergleich zu der manipulierten DEBS-AT6-Domäne *in vivo* wesentlich höhere Einbauraten für unnatürliche Substrate ermittelt werden. Die Skalierung der Fermentation des 16-Propargylmonensins könnte durch chemische Derivatisierung zu weiteren, neuen Monensinderivaten führen. Zudem könnte sich auch die Mutagenese der Mon-AT5-Domäne in Zukunft lohnen, um die Substratspezifität für den Einbau nicht-natürlicher Malonsäurederivate weiter zu erhöhen.



## 6 Allgemeine Zusammenfassung

Naturstoffe haben in allen Bereichen des Lebens eine wichtige Bedeutung für den Menschen (siehe Kapitel II1). Die industrielle Nutzung vieler Naturstoffe ist jedoch durch ihre geringe Verfügbarkeit oder ihr unspezifisches bzw. unzureichendes Wirkspektrum begrenzt (siehe Kapitel II2). Aufgrund der hohen strukturellen Komplexität ist die organische Totalsynthese von Naturstoffen vielstufig, häufig mit hohen Kosten, einem enormen Aufwand und geringen Ausbeuten verbunden. Die partialsynthetische Funktionalisierung von komplexen Molekülen kann durch fehlende orthogonale Gruppen limitiert sein und erfordert oftmals eine elaborierte Schutzgruppenchemie. Alternativ bieten sich Ganzzellfermentationen oder enzymatische Ansätze für die biokatalysierte Totalsynthese oder Derivatisierung von komplexen Molekülen an. Dabei kann die natürliche Chemo-, Regio- und Stereospezifität der Enzyme genutzt oder manipuliert werden, um Naturstoffe, Naturstoffderivate, -vorstufen oder -analoga zu erzeugen. Am Beispiel ausgewählter Vertreter der zwei großen Naturstoffklassen der Terpene und der Polyketide wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene mikrobielle, enzymatische oder chemoenzymatische Strategien zur Verbesserung der Verfügbarkeit und zur Derivatisierung von Naturstoffen etabliert und angewendet.

Zunächst wurde sich mit unterschiedlichen Herangehensweisen der Verbesserung der Verfügbarkeit von Terpenen beschäftigt (Abbildung 99).



**Abbildung 99: Übersicht über alle Teilprojekte dieser Arbeit, die sich mit der Verbesserung der Verfügbarkeit von Terpenen im Allgemeinen oder der Substanzfamilie der Diterpenfusicocane beschäftigten.**

Ein wichtiges Kernprojekt dieser Arbeit bildete dabei die Erzeugung von einfachen Analoga der Diterpenfusicocane (siehe Kapitel IV1 - IV3), um einen besseren Zugang zu dieser

Substanzfamilie mit phytotoxischen und anticarcinogenen Wirkungen zu bekommen.<sup>[35b,e,40b,41-43]</sup> Dafür wurde zunächst die präparative, heterologe Fermentation des gemeinsamen biosynthetischen Diterpenfusicoocanvorläufers FCdien etabliert (siehe Kapitel IV1).<sup>[53]</sup> Durch schrittweise Optimierung der Fermentation konnte die heterologe Erzeugung des FCdiens um das 5-fache von 6 mg/L auf 30 mg/L gesteigert werden. Relevant für die präparative Fermentation des FCdiens stellte sich die Verwendung eines genetisch manipulierten *S. cerevisiae*-Stammes heraus (siehe Kapitel IV1.1). Zur Steigerung der intrazellulären Konzentration der universellen Terpenvorläufer IPP und DMAPP war dieser Stamm mit zwei Plasmiden zur Codierung zweier, mutierter Schlüsselenzyme der Terpenbiosynthese kotransformiert.<sup>[92b,104a,e,106-107]</sup> Signifikante Steigerungen der Fermentationsausbeuten und der Produktspezifität konnten durch die Verringerung der Sauerstoffkonzentration und des pH-Werts, die Wahl des Fermentationsmediums, den Wechsel der Prozessführung vom *batch*- auf ein *Glucose-feed*-Verfahren und schließlich durch die *in situ* Produktextraktion erreicht werden (siehe Kapitel IV1.3). Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und aufgestellten Hypothesen sind momentan die Grundlage für weiterführende Projekte in den Arbeitsgruppen von Rolf Wichmann und von Juliane Merz aus der Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen der TU Dortmund, um die FCdien-Ausbeute weiter zu steigern. Dabei stehen sowohl weitere Variationen der Fermentationsparameter als auch eine optimierte integrierte Produktisolierung im Vordergrund. Bislang konnte dabei unter Berücksichtigung der im Rahmen dieser Arbeit erarbeiteten Optimierungen eine Steigerung der FCdien-Produktausbeute auf 135 mg/L im Bioreaktor erreicht werden.<sup>[149]</sup>

Neben der Optimierung äußerer Parameter, ist die Identifizierung inhärenter, limitierender Schritte bei der Fermentation von entscheidender Bedeutung. Ein Faktor könnte die limitierte Stabilität und die damit verbundene geringe Halbwertszeit der jeweiligen Schlüsselenzyme in den heterologen Fermentationssystemen sein. Eine Analyse der unabhängigen Expression der beiden Domänen der bifunktionellen AbFS in *E. coli* wies darauf hin, dass die lösliche Expression des Gesamtproteins durch die Cyclasedomäne FCyc limitiert sein könnte (siehe Kapitel IV2.3.2). Um die intrinsische Stabilität der AbFS und der FCyc-Domäne zu steigern, wurde ein, auf dem Blau-Weiß-Screening basierender, Assay zur Identifikation löslicher Varianten bei der gerichteten Proteinevolution etabliert (Kapitel IV2.2.1).<sup>[174c,177]</sup> Für die FCyc-Domäne konnten bereits in der ersten Generation der gerichteten Proteinevolution mehrere *Hot Spots* identifiziert werden (siehe Kapitel IV2.3.3).<sup>[188-189]</sup> In Zukunft könnten diese Varianten die Grundlage für weitere Generationen in der Proteinevolution darstellen. Ist dadurch eine signifikante Steigerung der intrinsischen Stabilität möglich, könnte die Expression solcher Varianten in *S. cerevisiae* zu einer weiteren Optimierung der FCdien-Fermentation führen.

Parallel konnte mit PichiaPink™ 2 potentiell ein geeigneter Expressionsstamm zur Isolation nativ und aktiv gefalteter AbFS identifiziert werden (siehe Kapitel IV2.4.2).

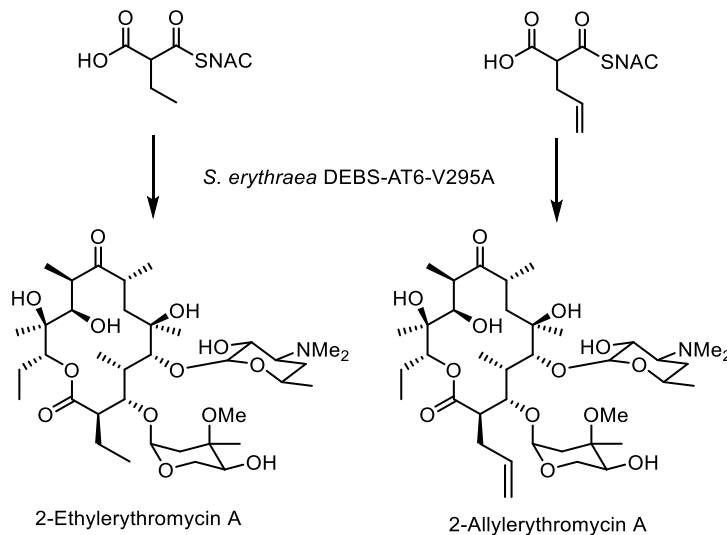
Zur oxidativen Derivatisierung des FCdiens wurden schließlich enzymatische Methoden (siehe Kapitel IV3.1) angewendet. Dabei wurde zur Oxidation aktivierter und unaktivierter Kohlenstoffzentren eine Variantenbibliothek der gut charakterisierten Monooxygenase BM3 in einphasigen und zweiphasigen Systemen getestet.<sup>[206a]</sup> Auf Grund der geringen Aktivität der BM3 in organischen Lösungsmitteln und der geringen Löslichkeit des FCdiens in wässrigen Lösungen, konnten dabei jedoch keine zuverlässigen Ergebnisse generiert werden. Die selenoxidkatalysierte unspezifische, allylische Oxidation des FCdiens gelang schließlich im Rahmen der Dissertation von Stephan Klopries im analytischen Maßstab, scheiterte bislang jedoch an der Skalierung.<sup>[68]</sup>

Alternativ zu Ganzzellfermentationen könnte die *in vitro* Totalsynthese der universellen Terpenvorläufer IPP und DMAPP einen präparativen Zugang zu unterschiedlichen Terpenen ermöglichen.<sup>[249]</sup> Zellfreie Systeme profitieren nicht nur von ihrer geringeren Komplexität, sondern können auch viele der Probleme umgehen, die üblicherweise in Fermentationsorganismen auftreten.<sup>[233]</sup> Es muss weder Rücksicht auf die Zellpermeabilität oder Toxizität von Reaktanten und Intermediaten genommen werden, noch spielen die häufig auftretenden genetischen Instabilitäten von Produktionsorganismen eine Rolle. Als Grundlage eines neuen Dissertationsprojekts in unserer Gruppe wurden, als Teilprojekt dieser Arbeit, über Literaturrecherche und *Genome Mining*, thermostabile Enzyme aus der Terpenbiosynthese aus dem Archaeon *S. solfataricus* identifiziert und die ersten Schritte zur Expression, Reinigung und des Aktivitätsnachweises begleitet oder selbst durchgeführt (siehe Kapitel IV4).<sup>[244]</sup> Weitere Schritte zur Etablierung der enzymatischen Totalsynthese sind momentan Bestandteil der Dissertation von Michael Dirkmann.<sup>[248]</sup>

Zuletzt wurde sich mit der Substraterkennung in der Polyketidbiosynthese am Beispiel von zwei modularen Typ I-PKS beschäftigt (siehe Kapitel IV5). Der Einbau der Verlängerungseinheiten für die Polyketidbiosynthese wird primär durch die Spezifität der AT-Domänen bestimmt.<sup>[254]</sup> Durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Elsa Sanchez-Garcia wurden in unserer Arbeitsgruppe die Strukturmodelle verschiedener AT-Domänen zugänglich.<sup>[263a]</sup>

In Vorarbeiten von Uschi Sundermann und Stephan Klopries wurde, im Rahmen einer enzymgeleiteten Mutasynthese, bereits der Einbau des artifiziellen Substrats PropargylM-SNAC in die Erythromycinbiosynthese durch die promiske V295A-Variante der DEBS-AT6-Domäne nachgewiesen (siehe Kapitel IV5.1).<sup>[68,253e,258f]</sup> Aufbauend auf diesen Studien und durch weitere Analysen des AT6-Strukturmodells mit unterschiedlichen Substraten, konnte der

Einbau weiterer artifizierlicher Verlängerungseinheiten erfolgreich vorhergesagt werden (siehe Kapitel IV5.1.1).<sup>[263a]</sup> Dadurch gelang, als Bestandteil dieser Arbeit, der Nachweis der zwei neuen Polyketidderivate 2-Ethylerythromycin A und 2-Allylerythromycin A (Abbildung 100).



**Abbildung 100: Strukturen der zwei neuen Erythromycinderivate 2-Ethylerythromycin A und 2-Allylerythromycin A.**

Zur Reduzierung des neben den Derivaten gebildeten Hauptprodukts Erythromycin A, wurden strukturgeleitet, gezielt Aminosäuren in dem CoA-Bindebereich der AT6-Domäne für weitere Mutageneseexperimente ausgewählt. Durch die Schwächung der Wechselwirkungen des natürlichen Substrats MM-CoA mit der AT6-Domäne konnte ein verbesserter Einbau für das artifizierliche Substrat PropargylM-SNAC erzielt werden (siehe Kapitel IV5.1.2). Trotzdem werden die erwünschten Erythromycinderivate momentan nur in analytischen Mengen erhalten und Erythromycin A stellt immer noch das Hauptprodukt in den Fermentationen dar. Weitere Experimente zur Verschiebung der Substratspezifität in der DEBS-AT6-Domäne sind momentan Bestandteil der Dissertation von Kyra Koopmans.<sup>[264]</sup>

Unter Ausnutzung der natürlichen Substratpromiskuität der AT5-Domäne (siehe Kapitel IV5.2) aus der Monensinbiosynthese konnten die drei neue Monensinderivate 16-Allylmonensin, 16-Propargylmonensin und 16-Propylmonensin erzeugt werden (Abbildung 101).



## V Material und Methoden

### 1 Geräte

Tabelle 16: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Beschreibung	Produkt	Hersteller
Autoklav	VB-65	Systemec
Bioreaktor	BIOFLO® 415 Fermentor	New Brunswick/Eppendorf
	BIOSTAT C	B. Braun Biotech Int.
	KFL2000	Bioengineering
Geldokumentation	Gel Logic 200	Kodak
	Science Imaging	Intas
Gelelektrophorese	PowerPac™ HC	Biorad
	PowerPac™ basic	Biorad
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Inkubatoren	IPP400	Memmert
	INB5	Memmert
Inkubationsschüttler	HT Multitron Standard, 5 cm Auslenkung	Infors
	HAT Minitron, 2,5 cm Auslenkung	Infors
	HT Ecotron, 2,5 cm Auslenkung	Infors
Massenspektrometrie	GC-System Serie 6890	Hewlett Packard
	GC-System Serie 7890A	Agilent
	HPLC-System Serie 1100	Agilent
Mikroskop	Serie SFC-100	Motic® Microscopes
Mixer	intelliMixer	Neolab®
	Mini Gyro-Rocker SSM3	Stuart®
	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
NMR-Spektroskopie	Mercury 400	Varian
PCR-Bank	Captair® bio	Erlab
PCR- <i>Thermocycler</i>	Mastercycler ep gradient S	Eppendorf
	T100™ Thermal Cycler	Biorad
	Piko™ Thermal Cycler	Finnzymes
Photometer	BioPhotometer (verschiedene Serien)	Eppendorf
Reinstwasseranlage	Purelab Classic	Elga
Sterilbank	Biological Safety Cabinet, ClassII	Labgard
Ultraschallstab	SonoPlus HD 2070 Homogenisator	Bandelin
	Sonifier 250	Branson
Vakuumkonzentrator	miVac	Schlee

Beschreibung	Produkt	Hersteller
Zentrifuge	Rotavapor® (verschiedene Serien)	Büchi
	Centrifuge 5418 mit Rotor FA-45-18-11	Eppendorf
	Centrifuge 5430R mit Rotor FA-45-30-11	Eppendorf
	Centrifuge 5810R mit Rotoren FA-45-6-30 und S-4-104	Eppendorf

## 2 Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide

### 2.1 Mikroorganismen

**Tabelle 17: Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Mikroorganismen.** Die hier verwendeten Abkürzungen sind der *E. coli*-Genotypes OpenWetWare Online-Datenbank zu entnehmen.<sup>[279]</sup> n.a: nicht angegeben, *amp<sup>R</sup>*: Ampicillin-, *am<sup>R</sup>*: Apramycin-, *cam<sup>R</sup>*: Chloramphenicol-, *hyg<sup>R</sup>*: Hygromycin-, *kan<sup>R</sup>*: Kanamycin-, *str<sup>R</sup>*: Streptomycin-, *tet<sup>R</sup>*: Tetracyclin- und *zeo<sup>R</sup>*: Zeocinresistenzgen, Ade<sup>+</sup>, His<sup>+</sup>, Leu<sup>+</sup> und Ura<sup>+</sup>: Stamm besitzt keine Auxotrophie mehr für Adenin, Histidin, Leucin und/oder Uracil.

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	<i>B F omp T hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> tet<sup>R</sup> gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW cam<sup>R</sup>]</i>	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL [pETM11- <i>idi2</i> ]	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert mit dem Expressionsvektor pETM11- <i>idi2</i> ( <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	Michael Dirkmann <sup>[244]</sup>
<i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL [pETM30- <i>abfs</i> + pL1SL2]	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert mit den Expressionsvektoren pETM30- <i>abfs</i> und pL1SL2 ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RP	<i>B F omp T hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> tet<sup>R</sup> gal λ(DE3) endA Hte [argU proL cam<sup>R</sup>]</i>	Agilent Technologies
<i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RP [pETM30- <i>abfs</i> + pL1SL2]	BL21-CodonPlus(DE3)-RP transformiert mit den Expressionsvektoren pETM30- <i>abfs</i> und pL1SL2 ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3)	<i>B F omp T hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> tet<sup>R</sup> gal λ(DE3) endA Hte</i>	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pACYC- <i>gdhB.m.</i> ]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pACYC- <i>gdhB.m.</i> ( <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pET27mod- <i>abfs</i> ]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pET27mod- <i>abfs</i> ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pET27mod-f87a]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pET27mod-f87a ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pET27mod-f87a + pET21b-adhL.b.]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit den Expressionsvektoren pET27mod-f87a und pET21b-adhL.b. ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM11- aacI]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM11-aacI ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	Michael Dirkmann <sup>[244]</sup>
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM11- abfs]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM11-abfs ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM11- bm3]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM11-bm3 ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM11- bm3*]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit verschiedenen <i>bm3</i> – Mutanten ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	AK Reetz (Dr. Sabrina Höbenreich) <sup>[206a,216]</sup>
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM11- fcyc]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM11-fcyc ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM11- fcyc1]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM11-fcyc1 ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM11- fcyc2]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM11-fcyc2 ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM11- ggpps]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM11-ggpps ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM11- ggpps1]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM11-ggpps1 ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM11- ggpps2]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM11-ggpps2 ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit



Stamm	Genotyp/Phänotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM11- <i>hmgs</i> + pL1SL2]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit den Expressionsvektoren pETM11- <i>hmgs</i> und pL1SL2, ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	Michael Dirkmann <sup>[244]</sup>
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM11- <i>mdc</i> ]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM11- <i>mdc</i> ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	Michael Dirkmann <sup>[244]</sup>
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM30- <i>abfs</i> ]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM30- <i>abfs</i> ( <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	meine Masterarbeit <sup>[80]</sup>
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3) [pETM30- <i>abfs</i> + pL1SL2]	BL21-Gold(DE3) transformiert mit den Expressionsvektoren pETM30- <i>abfs</i> und pL1SL2 ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> DB3.1 [pDONR221]	<i>F</i> - <i>gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) ara14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm<sup>r</sup>) xyl5 Δleu mtl1</i> transformiert mit pDONR221 ( <i>kan<sup>R</sup></i> )	meine Masterarbeit <sup>[80]</sup>
<i>Escherichia coli</i> DB3.1 [pVV214]	<i>F</i> - <i>gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) ara14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm<sup>r</sup>) xyl5 Δleu mtl1</i> transformiert mit pVV214 ( <i>amp<sup>R</sup></i> )	meine Masterarbeit <sup>[80]</sup>
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>F</i> Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ<sup>-</sup></i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> DH5α [pGAPZαA]	DH5α transformiert mit dem Expressionsvektor pGAPZαA ( <i>zeo<sup>R</sup></i> )	AG Kayser
<i>Escherichia coli</i> DH5α [pGAPZA- <i>bapA</i> ]	DH5α transformiert mit dem Expressionsvektor pGAPZA- <i>bapA</i> ( <i>zeo<sup>R</sup></i> )	AG Kayser
<i>Escherichia coli</i> ET12567/pUZ8002	<i>F</i> <i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR zjj- 202::Tn10 recF143 galk2 galT22 ara-14 lacY1 xyl15 leuB6 thi1 tonA31 rpsL136 his64 tsx78 mtlI glnV44</i> pUZ8002 ( <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>kan<sup>R</sup></i> )	AK Leadlay
<i>Escherichia coli</i> K12 JM101	<i>F</i> <i>traD36 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV thi</i>	NEB/
<i>Escherichia coli</i> JM101[pETM30- <i>abfs</i> ]	JM101 transformiert mit dem Expressionsvektor pETM30- <i>abfs</i> ( <i>kan<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> K12 JM109	$F'$ <i>traD36 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB)</i> <i>glnV44 e14<sup>+</sup> gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi</i> <i>hsdR17</i>	NEB
<i>Escherichia coli</i> OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup>	$F'$ [ <i>proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(tet<sup>R</sup>) Δ(ccdAB)</i> ] <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15</i> <i>Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1 tonA panD</i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> [pBADM11- <i>lacZα</i> ]	OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> transformiert mit dem Expressionsvektor pBADM11- <i>lacZα</i> ( <i>amp<sup>R</sup>, tet<sup>R</sup></i> )	Mirja Mewes <sup>[177]</sup>
<i>Escherichia coli</i> OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> [pDONR221- <i>abfsS.c.</i> ]	OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> transformiert mit dem Klonierungsvektor pDONR221- <i>abfsS.c.</i> ( <i>kan<sup>R</sup>,</i> <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> [pJAAK1a]	OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> transformiert mit dem Expressionsvektor pJAAK1a ( <i>amp<sup>R</sup>, tet<sup>R</sup></i> )	Arsenij Kokorin <sup>[188]</sup>
<i>Escherichia coli</i> OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> [pJAAK*]	OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> transformiert mit verschiedenen <i>fcyc</i> – Mutanten ( <i>amp<sup>R</sup>, tet<sup>R</sup></i> ) <sup>R</sup>	Arsenij Kokorin <sup>[188]</sup>
<i>Escherichia coli</i> OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> [pJAHE*]	OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> transformiert mit verschiedenen <i>fcyc</i> – Mutanten ( <i>amp<sup>R</sup>, tet<sup>R</sup></i> )	Hendrik Ebke <sup>[189]</sup>
<i>Escherichia coli</i> OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> [pJAMM1]	OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> transformiert mit dem Expressionsvektor pJAMM1 ( <i>amp<sup>R</sup>, tet<sup>R</sup></i> )	Mirja Mewes <sup>[177]</sup>
<i>Escherichia coli</i> OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> [pJAMM1b]	OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> transformiert mit dem Expressionsvektor pJAMM1b ( <i>amp<sup>R</sup>, tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> [pJA*]	OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> transformiert mit verschiedenen <i>abfs</i> – Mutanten ( <i>amp<sup>R</sup>, tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> [pVV214- <i>abfsS.c.</i> ]	OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup> transformiert mit dem Hefe- Expressionsvektor pVV214- <i>abfsS.c.</i> ( <i>amp<sup>R</sup>, tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Origami(DE3)	$Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA P_{vull} phoR$ <i>araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac+lacI<sup>q</sup>pro]</i> (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB (kan<sup>R</sup>, str<sup>R</sup>, tet<sup>R</sup>)</i>	Novagen

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> Origami(DE3)[pBADM30- <i>abfs</i> ]	Origami(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pBADM30- <i>abfs</i> ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Rosetta(DE3)	<i>F-ompT hsdSB(rB-mB-)gal dcm (DE3) pRARE2 (cam<sup>R</sup>)</i>	Novagen
<i>Escherichia coli</i> Rosetta(DE3) [pETM30- <i>abfs</i> ]	Rosetta(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM30- <i>abfs</i> ( <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>kan<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3)	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA P_{vull} phoR$ <i>araD139 ahpC galE galK rpsL(DE3)</i> <i>F'[lac+lacI<sup>q</sup>pro] gor522::Tn10 trxB pRARE23 (cam<sup>R</sup>, str<sup>R</sup>, tet<sup>R</sup>)</i>	Novagen
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) [pETM11- <i>fcyc</i> ]	Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM11- <i>fcyc</i> ( <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) [pETM11- <i>ggpps</i> ]	Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM11- <i>ggpps</i> ( <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) [pBADM11- <i>hmgr</i> ]	Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pBADM11- <i>hmgr</i> ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	Michael Dirkmann <sup>[244]</sup>
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) [pBADM11- <i>mvk</i> ]	Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pBADM11- <i>mvk</i> ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	Michael Dirkmann <sup>[244]</sup>
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) [pBADM11- <i>pmk</i> ]	Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pBADM11- <i>pmk</i> ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	Michael Dirkmann <sup>[244]</sup>
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) [pETM30- <i>abfs</i> ]	Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) transformiert mit dem Expressionsvektor pETM30- <i>abfs</i> ( <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) [pETM30- <i>abfs</i> + pL1SL2]	Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3) transformiert mit den Expressionsvektoren pETM30- <i>abfs</i> und pL1SL2, ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>kan<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Top10	<i>F- mcrA <math>\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80 lacZ \Delta M15</math></i> $\Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara leu) 7697 galU$ <i>galK rpsL (str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pBADM11- <i>fcyc1</i> ]	Top10 transformiert mit dem Expressionsvektor pBADM11- <i>fcyc1</i> ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pBADM11- <i>fcyc2</i> ]	Top10 transformiert mit dem Expressionsvektor pBADM11- <i>fcyc2</i> ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pBADM11- <i>ggpps1</i> ]	Top10 transformiert mit dem Expressionsvektor pBADM11- <i>ggpps1</i> ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pBADM11- <i>ggpps2</i> ]	Top10 transformiert mit dem Expressionsvektor pBADM11- <i>ggpps2</i> ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pBADM11- <i>lacza</i> ]	Top10 transformiert mit dem Expressionsvektor pBADM11- <i>lacZa</i> ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> )	Mirja Mewes <sup>[177]</sup>
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pBADM30- <i>abfs</i> ]	Top10 transformiert mit dem Expressionsvektor pBADM11- <i>abfs</i> ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pGAPZA- <i>abfs</i> ]	Top10 transformiert mit dem Expressionsvektor pGAPZA- <i>abfs</i> ( <i>str<sup>R</sup></i> , <i>zeo<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pGAPZaA- <i>abfs</i> ]	Top10 transformiert mit dem Expressionsvektor pGAPZaA- <i>abfs</i> ( <i>str<sup>R</sup></i> , <i>zeo<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pJAAK1a]	Top10 transformiert mit dem Expressionsvektor pJAAK1a ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> )	Arsenij Kokorin <sup>[188]</sup>
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pJAAK1a*]	Top10 transformiert mit verschiedenen <i>fcyc</i> – Mutanten ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> )	Arsenij Kokorin <sup>[188]</sup>
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pJAHE*]	Top10 transformiert mit verschiedenen <i>fcyc</i> – Mutanten ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> )	Hendrik Ebke <sup>[189]</sup>
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pJAMM1]	Top10 transformiert mit dem Expressionsvektor pJAMM1 ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> )	Mirja Mewes <sup>[177]</sup>
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pJAMM1b]	Top10 transformiert mit dem Expressionsvektor pJAMM1b ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pJA*]	Top10 transformiert mit verschiedenen <i>abfs</i> – Mutanten ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Top10 [pBADM30- <i>abfs</i> ]	Top10 transformiert mit dem Expressionsvektor pBADM30- <i>abfs</i> ( <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>str<sup>R</sup></i> )	diese Arbeit
<i>Pichia pastoris</i> SMD1168H	$\Delta pep4$	Invitrogen
<i>Pichia pastoris</i> SMD1168H [pGAPZA- <i>abfs</i> ]	<i>Pichia pastoris</i> SMD1168H transformiert mit pGAPZA- <i>abfs</i> ( <i>zeo<sup>R</sup></i> )	Hendrik Ebke <sup>[191b]</sup>
<i>Pichia pastoris</i> SMD1168H [pGAPZaA- <i>abfs</i> ]	<i>Pichia pastoris</i> SMD1168H transformiert mit pGAPZaA- <i>abfs</i> ( <i>zeo<sup>R</sup></i> )	Hendrik Ebke <sup>[191b]</sup>
PichiaPink™ 2	$\Delta ade2$ , $\Delta pep4$	Invitrogen

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Quelle
PichiaPink™ 2 [pPinkHC- <i>abfsa</i> ]	PichiaPink™ 2 transformiert mit dem Expressionsvektor pPinkHC- <i>abfsa</i> (Ade <sup>+</sup> )	diese Arbeit
PichiaPink™ 2 [pPinkHCα- <i>abfsb</i> ]	PichiaPink™ 2 transformiert mit dem Expressionsvektor pPinkHC- <i>abfsb</i> (Ade <sup>+</sup> )	diese Arbeit
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C [pRS313- <i>upc2.1</i> + pRS315- <i>thmgrS.c.</i> ]	<i>MATa ura3-52 trp1-289 leu2-3_112 his3Δ 1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2</i> mit Hefe-Expressionsvektoren pRS313- <i>upc2.1</i> und pRS315- <i>thmgrS.c.</i> (His <sup>+</sup> , Leu <sup>+</sup> )	AG Jennewein
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C [pRS313- <i>upc2.1</i> + pRS315- <i>thmgrS.c.</i> + pVV214- <i>abfs</i> ]	CEN.PK2-1C transformiert mit den Hefeexpressionsvektoren pRS313- <i>upc2.1</i> und pRS315- <i>thmgrS.c.</i> und pVV214- <i>abfs</i> (His <sup>+</sup> , Leu <sup>+</sup> , Ura <sup>+</sup> )	meine Masterarbeit <sup>[80]</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C [pRS313- <i>upc2.1</i> + pRS315- <i>thmgrS.c.</i> + pVV214- <i>abfsS.c.</i> ]	CEN.PK2-1C transformiert mit den Hefeexpressionsvektoren pRS313- <i>upc2.1</i> und pRS315- <i>thmgrS.c.</i> und pVV214- <i>abfsS.c.</i> (His <sup>+</sup> , Leu <sup>+</sup> , Ura <sup>+</sup> )	diese Arbeit
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C [pRS313- <i>upc2.1</i> + pRS315- <i>thmgrS.c.</i> + pVV214- <i>fcyc</i> ]	CEN.PK2-1C transformiert mit den Hefeexpressionsvektoren pRS313- <i>upc2.1</i> und pRS315- <i>thmgrS.c.</i> und pVV214- <i>fcyc</i> (His <sup>+</sup> , Leu <sup>+</sup> , Ura <sup>+</sup> )	Hendrik Ebke <sup>[189]</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C [pRS313- <i>upc2.1</i> + pRS315- <i>thmgrS.c.</i> + pVV214- <i>fcyc1</i> ]	CEN.PK2-1C transformiert mit den Hefeexpressionsvektoren pRS313- <i>upc2.1</i> und pRS315- <i>thmgrS.c.</i> und pVV214- <i>fcyc1</i> (His <sup>+</sup> , Leu <sup>+</sup> , Ura <sup>+</sup> )	Hendrik Ebke <sup>[189]</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C [pRS313- <i>upc2.1</i> + pRS315- <i>thmgrS.c.</i> + pVV214- <i>fcyc2</i> ]	CEN.PK2-1C transformiert mit den Hefeexpressionsvektoren pRS313- <i>upc2.1</i> und pRS315- <i>thmgrS.c.</i> und pVV214- <i>fcyc2</i> (His <sup>+</sup> , Leu <sup>+</sup> , Ura <sup>+</sup> )	Hendrik Ebke <sup>[189]</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C [pRS313- <i>upc2.1</i> + pRS315- <i>thmgrS.c.</i> + pVV214duett: <i>fcyc-ggpps</i> ]	CEN.PK2-1C transformiert mit den Hefeexpressionsvektoren pRS313- <i>upc2.1</i> und pRS315- <i>thmgrS.c.</i> und pVV214duett: <i>fcyc-ggpps</i> (His <sup>+</sup> , Leu <sup>+</sup> , Ura <sup>+</sup> )	Pina Eichert <sup>[190]</sup>

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Quelle
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C [pRS313- <i>upc2.1</i> + pRS315- <i>thmgrS.c.</i> + pVV214duett: <i>fcyc1-ggpps1</i> ]	CEN.PK2-1C transformiert mit den Hefeexpressionsvektoren pRS313- <i>upc2.1</i> und pRS315- <i>thmgrS.c.</i> und pVV214duett: <i>fcyc1- ggpps2</i> (His <sup>+</sup> , Leu <sup>+</sup> , Ura <sup>+</sup> )	Pina Eichert <sup>[190]</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C [pRS313- <i>upc2.1</i> + pRS315- <i>thmgrS.c.</i> + pVV214duett: <i>fcyc2-ggpps2</i> ]	CEN.PK2-1C transformiert mit den Hefeexpressionsvektoren pRS313- <i>upc2.1</i> und pRS315- <i>thmgrS.c.</i> und pVV214duett: <i>fcyc2- ggpps2</i> (His <sup>+</sup> , Leu <sup>+</sup> , Ura <sup>+</sup> )	Pina Eichert <sup>[190]</sup>
<i>Saccharopolyspora</i> <i>erythraea</i> NRRL-B-24071	n.a.	ARS Culture Collection
<i>Saccharopolyspora</i> <i>erythraea</i> $\Delta$ AT6hyg <sup>R</sup>	NRRL-B-24071 mit Austausch der AT6-Domäne innerhalb von <i>eryAIII</i> gegen $\Omega$ hyr <sup>R</sup> ( <i>hyg</i> <sup>R</sup> )	Dr. Uschi Sundermann <sup>[258f]</sup>
<i>Saccharopolyspora</i> <i>erythraea</i> <i>at6</i> <sup>*</sup>	NRRL-B-24071 transformiert mit verschiedenen <i>at6</i> – Mutanten ( <i>hyg</i> <sup>R</sup> , <i>am</i> <sup>R</sup> )	diese Arbeit/ Dr. Uschi Sundermann <sup>[258f]</sup>
<i>Streptomyces</i> <i>cinnamomensis</i> PFL-A001 (ATCC 15413)	n.a.	AK Leadlay
<i>Streptomyces</i> <i>cinnamomensis</i> PFL-A519	n.a./Überproduzent/“ <i>bulgarian strain</i> “	AK Leadlay

## 2.2 Vektoren und Plasmide

**Tabelle 18: Allgemeine Übersicht über die Eigenschaften, der in dieser Arbeit verwendeten Vektor- und Plasmidrückgrate.** *amp*<sup>R</sup>: Ampicillin-, *am*<sup>R</sup>: Apramycin-, *cam*<sup>R</sup>: Chloramphenicol-, *kan*<sup>R</sup>: Kanamycin- und *zeo*<sup>R</sup>: Zeocinresistenzgen.

Plasmid	Größe	Beschreibung/codiert für	Quelle
pACYCDuet-1	4 kb	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor: <i>T7</i> -Promoter-1, <i>lacO 1</i> , His <sub>6</sub> -Tag, MCS-1, <i>T7</i> -Promoter-2, <i>lacO 2</i> , MCS-2, S-Tag, <i>T7</i> -Terminator, <i>P15A ori</i> , <i>cam</i> <sup>R</sup> , <i>lacI</i>	Novagen/ AK Reetz

Plasmid	Größe	Beschreibung/codiert für	Quelle
pBADM11	4,1 kb	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor: <i>araBAD</i> -Promoter, His <sub>6</sub> -Tag, TEV-Protease-schnittstelle, MCS, <i>rrnB</i> -Terminator, <i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>pUC ori</i> , <i>araC</i>	EMBL/ G. Stier
pBADM30	4,8 kb	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor: <i>araBAD</i> -Promoter, His <sub>6</sub> -Tag, GST-Tag, TEV-Proteaseschnittstelle, MCS, <i>rrnB</i> -Terminator, <i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>pUC ori</i> , <i>araC</i>	EMBL/ G. Stier
pDONR221	4,8 kb	Gateway- <i>E. coli</i> -Klonierungsvektor: <i>attP1</i> , <i>ccdB</i> , <i>cam</i> <sup>R</sup> , <i>attP2</i> , <i>kan</i> <sup>R</sup> , <i>pUC ori</i> , <i>rrnB</i> -Terminator 2, <i>rrnB</i> -Terminator 1	Invitrogen/A K Jennewein
pET19b-3C-nHis	5,7 kb	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor: <i>T7</i> -Promoter, <i>lacO</i> , His <sub>6</sub> -Tag, C3-Poteaseschnittstelle, MCS, <i>T7</i> -Terminator, <i>lacI</i> , <i>pBR322 ori</i> , <i>amp</i> <sup>R</sup>	DPF <sup>[243]</sup>
pET19b-cHis-3C	5,7 kb	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor: <i>T7</i> -Promoter, <i>lacO</i> , MCS, C3-Poteaseschnittstelle, His <sub>6</sub> -Tag, <i>T7</i> -Terminator, <i>lacI</i> , <i>pBR322 ori</i> , <i>amp</i> <sup>R</sup>	DPF <sup>[243]</sup>
pET21b(+)	5,4 kb	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor: <i>T7</i> -Promoter, <i>lacO</i> , <i>T7</i> -Tag, MCS, His <sub>6</sub> -Tag, <i>T7</i> -Terminator, <i>lacI</i> , <i>pBR322 ori</i> , <i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>f1 ori</i>	Novagen/ AK Rother
pET27mod	5,3 kb	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor: <i>T7</i> -Promoter, <i>lacO</i> , MCS, His <sub>6</sub> -Tag, <i>T7</i> -Terminator, <i>f1 ori</i> , <i>M13 ori</i> , <i>kan</i> <sup>R</sup> , <i>ColE1 ori</i> , <i>lacI</i>	AK Engelhard
pETcoco-2	12,4 kb	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor: <i>T7</i> -Promoter, <i>lacO</i> , MCS, His <sub>6</sub> -Tag, S-Tag, HSV-Tag, <i>T7</i> -Terminator, <i>araC</i> , <i>trfA</i> , <i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>oriV</i> , <i>oriS</i> , <i>repE</i> , <i>parA</i> , <i>parB</i> , <i>parC</i> , <i>lacI</i>	Novagen/ AK Leadlay
pETM11	6 kb	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor: <i>T7</i> -Promoter, <i>lacO</i> , His <sub>6</sub> -Tag, TEV-Proteaseschnittstelle, MAD, His <sub>6</sub> -Tag, <i>T7</i> -Terminator, <i>f1 ori</i> , <i>kan</i> <sup>R</sup> , <i>pBR322 ori</i> , <i>lacI</i>	EMBL/ G. Stier
pETM30	6,3 kb	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor: <i>T7</i> -Promoter, <i>lacO</i> , His <sub>6</sub> -Tag, GST-Tag, TEV-Protease-schnittstelle, MAD, His <sub>6</sub> -Tag, <i>T7</i> -Terminator, <i>f1 ori</i> , <i>kan</i> <sup>R</sup> , <i>pBR322 ori</i> , <i>lacI</i>	EMBL/ G. Stier
pEX-K	2,5 kb	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor; <i>lac</i> -Promoter, MCS, <i>kan</i> <sup>R</sup> , <i>pUC ori</i>	MWG

Plasmid	Größe	Beschreibung/codiert für	Quelle
pEXP42	7,2 kb	Gateway- <i>E. coli</i> -Expressionsvektor: <i>T7</i> -Promoter, <i>lacO</i> , <i>attR1</i> , <i>ccdB</i> , <i>cam<sup>R</sup></i> , <i>attR2</i> , V5 epitope, His <sub>6</sub> -Tag, <i>T7</i> -Terminator, <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>ColE1 ori</i> , <i>lacI</i>	AK Niemeyer
pGAPZA	2,9 kb	<i>E. coli</i> - <i>P. pastoris</i> -Shuttle-Expressionsvektor: <i>GAP</i> -Promoter, MCS, <i>myc</i> -Epitop-Tag, His <sub>6</sub> -Tag, <i>AOX1</i> -Terminator, <i>zeo<sup>R</sup></i> , <i>pUC ori</i>	Invitrogen/ AK Julsing (pGAPZA- <i>bapA</i> )
pGAPZαA	3,1 kb	<i>E. coli</i> - <i>P. pastoris</i> -Shuttle-Expressionsvektor: <i>GAP</i> -Promoter, $\alpha$ - <i>mating factor</i> -Sekretionssignal, MCS, <i>myc</i> -Epitoptag, His <sub>6</sub> -Tag, <i>AOX1</i> -Terminator, <i>zeo<sup>R</sup></i> , <i>pUC ori</i>	Invitrogen/ AK Julsing
pOPIN-His-SUMO	5,8 kb	<i>Multi-Host</i> -Expressionsvektor: <i>CAG</i> -Promoter, <i>T7</i> -Promoter, <i>lacO</i> , <i>P10</i> -Promoter, His <sub>6</sub> -Tag, SUMO-Tag, SUMO-Proteaseschnittstelle, MCS, <i>T7</i> -Terminator, <i>lacI</i> , <i>pUC ori</i> , <i>amp<sup>R</sup></i>	DPF <sup>[243]</sup>
pPinkHC	7,7 kb	<i>E. coli</i> - <i>P. pastoris</i> -Shuttle-Expressionsvektor: <i>AOX1</i> -Promoter, MCS, <i>CYC1</i> -Terminator, <i>ADE2</i> , <i>TRP2</i> , <i>pUC ori</i> , <i>amp<sup>R</sup></i>	Invitrogen/ AK Kayser
pRS313	5 kb	<i>E. coli</i> - <i>S. cerevisiae</i> -Shuttle-Expressionsvektor: <i>T7</i> -Promoter, <i>lacZ'</i> , MCS, <i>T3</i> -Promoter, <i>pBM1 ori</i> , <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i> , <i>HIS3</i> , <i>f1 ori</i>	AACT/AK Jennewein
pRS315	6 kb	<i>E. coli</i> - <i>S. cerevisiae</i> -Shuttle-Expressionsvektor: <i>T7</i> -Promoter, <i>lacZ'</i> , MCS, <i>T3</i> -Promoter, <i>pBM1 ori</i> , <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i> , <i>LEU2</i> , <i>f1 ori</i>	AACT/AK Jennewein
pSET152	5,5 kb	<i>E. coli</i> -Actinomyceten-Konjugationsvektor: <i>lacZ'</i> , MCS, <i>int<sup>φC31</sup></i> , <i>oriT</i> , <i>am<sup>R</sup></i> , <i>pUC ori</i>	<sup>[280]</sup> /AK Leadlay
pKSSU40	6,1 kb	basierend auf pSE152 mit veränderter <i>lacZ'</i> -MCS	Dr. Susanna Kushnir <sup>[258f]</sup>
pUC18	2,7 kb	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor: <i>lacZ'</i> , MCS, <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>ColE1 ori</i>	Invitrogen



Plasmid	Größe	Beschreibung/codiert für	Quelle
pUC19I	3,9 kb	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor: <i>lacO</i> , <i>lacZ'</i> , MCS, <i>lacI</i> , <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>ColE1 ori</i>	AK Brakmann <sup>[161b]</sup>
pVV214	7,5 kb	<i>S. cerevisiae</i> - <i>E. coli</i> -Gateway-Shuttle-Expressionsvektor: <i>PGK1</i> -Promoter, <i>attR1</i> , <i>ccdB</i> , <i>Cam<sup>R</sup></i> , <i>attR2</i> , <i>CYC1</i> -Terminator, <i>2<math>\mu</math>m ori</i> , <i>URA3</i> , <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>pUC ori</i>	Euroscarf <sup>[105]</sup> / AK Jenne- wein

**Tabelle 19: Plasmide zur Expression der AbFS und einzelner Domänen der AbFS in *E. coli*.** AbFS: Fusicocciadiensynthase aus dem filamentösen Pilz *Alternaria brassicicola*, FCyc, FCyc1 und FCyc2: verschieden verkürzte Abschnitte der Terpencyclasedomäne (siehe Kapitel IV.2.3.1) von AbFS, GGPPS, GGPPS1 und GGPPS2: verschieden verkürzte Abschnitte der Prenyltransferasedomäne von AbFS.

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pBADM11- <i>fcyc1</i>	5,2 kb	pBADM11 codierend für die FCyc1-Domäne, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pBADM11- <i>fcyc2</i>	5,3 kb	pBADM11 codierend für die FCyc2-Domäne, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pBADM11- <i>ggpps1</i>	5 kb	codierend für die GGPPS1-Domäne, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pBADM11- <i>ggpps2</i>	4,9 kb	pBADM11 codierend für die GGPPS2-Domäne, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pBADM30- <i>abfs</i>	6,8 kb	pBADM30 codierend für AbFS, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pET27mod- <i>abfs</i>	7,4 kb	pET27mod codierend für AbFS, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pETM11- <i>abfs</i>	7,4 kb	pETM11 codierend für AbFS, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pETM11- <i>fcyc</i>	6,3 kb	pETM11 codierend für die FCyc-Domäne, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pETM11- <i>fcyc1</i>	6,5 kb	pETM11 codierend für die FCyc1-Domäne, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pETM11- <i>fcyc2</i>	6,5 kb	pETM11 codierend für die FCyc2-Domäne, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pETM11- <i>ggpps</i>	6,4 kb	pETM11 codierend für die GGPPS-Domäne, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pETM11- <i>ggpps1</i>	6,2 kb	pETM11 codierend für die GGPPS1-Domäne, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pETM11- <i>ggpps2</i>	6,2 kb	pETM11 codierend für die GGPPS2-Domäne, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pETM30- <i>abfs</i>	8,1 kb	pETM30 codierend für AbFS, eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>HindIII</i>	meine Masterarbeit <sup>80]</sup>
pL1SL2	17 kb	basierend auf pETcoco2, codierend für die Chaperone aus <i>S. coelicolor</i> GroES/EL	AK Leadlay <sup>[166a]</sup>
pUC19I- <i>abfs</i>	6 kb	pUC19I codierend für AbFS, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>SacI</i>	diese Arbeit

**Tabelle 20: Plasmide zur Expression der AbFS und einzelner Domänen der AbFS in *S. cerevisiae*.**  
k.A.: keine Angabe, da nicht bekannt.

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pEX-K- <i>abfsS.c.</i>	4,6 kb	pEX-K codierend für eine für <i>S. cerevisiae</i> codonoptimierte Variante der AbFS	MWG
pDONR221- <i>abfsS.c.</i>	4,6 kb	pDONR221 codierend für eine für <i>S. cerevisiae</i> codonoptimierte Variante der AbFS, Gen eingefügt über <i>attP1</i> und <i>attP2</i>	diese Arbeit
pRS313- <i>upc2.1</i>	k.A.	pRS313 mit Expressionskassette codierend für <i>PGK</i> -Promoter, eine Variante des Transkriptionsfaktors UPC2 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>Cyc1</i> -Terminator	AK Jenne- wein <sup>[106]</sup>

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pRS315- <i>thmgrS.c.</i>	k.A.	pRS315 mit Expressionskassette codierend für <i>PGK</i> -Promoter, eine verkürzte Variante der 3-Hydroxy-3-Methylglutary-CoA-Reduktase aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>Cyc1</i> -Terminator	AK Jennewein <sup>[106]</sup>
pVV214- <i>abfs</i>	7,9 kb	pVV214 codierend für AbFS, Gen eingefügt über <i>attR1</i> und <i>attR2</i>	meine Masterarbeit <sup>[80]</sup>
pVV214- <i>abfsS.c.</i>	7,9 kb	pVV214 codierend für eine für <i>S. cerevisiae</i> codonoptimierte Variante der AbFS, Gen eingefügt über <i>attR1</i> und <i>attR2</i>	diese Arbeit
pVV214- <i>fcyc</i>	6,8 kb	pVV214 codierend für die FCyc-Domäne, Gen eingefügt über <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pVV214- <i>fcyc1</i>	7,0 kb	pVV214 codierend für die FCyc1-Domäne, Gen eingefügt über <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pVV214- <i>fcyc2</i>	7,0 kb	pVV214 codierend für die FCyc2-Domäne, Gen eingefügt über <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pVV214- <i>ggpps</i>	6,9 kb	pVV214 codierend für die GGPPS-Domäne, Gen eingefügt über <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pVV214- <i>ggpps1</i>	6,7 kb	pVV214 codierend für die GGPPS1-Domäne, Gen eingefügt über <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pVV214- <i>ggpps2</i>	6,7 kb	pVV214 codierend für die GGPPS2-Domäne, Gen eingefügt über <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pVV214duett: <i>fcyc-ggpps</i>	8,2 kb	pVV214 codierend für die FCyc-Domäne und die GGPPS-Domäne, beide Male unter der Kontrolle des PGK-Promoters, Gen eingefügt über <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i>	diese Arbeit
pVV214duett: <i>fcyc1-ggpps1</i>	8,2 kb	pVV214 codierend für die FCyc1-Domäne und die GGPPS1-Domäne, beide Male unter der Kontrolle des PGK-Promoters, konstruiert ausgehend von pVV214- <i>abfs</i> über die Schnittstellen <i>AcclII</i> und <i>EcoRI</i>	Pina Eichert <sup>[190]</sup>

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pVV214duett: <i>fcyc2-ggpps2</i>	8,2 kb	pVV214 codierend für die FCyc2-Domäne und die GGPPS2-Domäne, beide Male unter der Kontrolle des PGK-Promoters, konstruiert ausgehend von pVV214- <i>abfs</i> über die Schnittstellen <i>AccIII</i> und <i>EcoRI</i>	Pina Eichert <sup>[190]</sup>

**Tabelle 21: Plasmide zur Erzeugung von AbFS- und FCyc-Varianten mit erhöhter Löslichkeit. AS: Aminosäure.**

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pBADM11- <i>lacZα</i>	4,3 kb	pBADM11 codierend für das <i>lacZα</i> -Fragment der $\beta$ -Galactosidase aus <i>Escherichia coli</i> , amplifiziert aus pUC18 und eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	Mirja Mewes <sup>[177]</sup>
pJAMM1	6,3 kb	pBADM-Rückgrat codierend für das Fusionsprotein AbFS-linker-LacZ $\alpha$ , <i>abfs</i> kann über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i> herausgeschnitten werden	Mirja Mewes <sup>[177]</sup>
pJAMM1b	6,3 kb	pBADM-Rückgrat codierend für das Fusionsprotein AbFS-linker <sub>opt.</sub> -LacZ $\alpha$ <sub>ohne ATG</sub> , <i>abfs</i> kann über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i> herausgeschnitten werden	diese Arbeit
pJA4_epB	6,3 kb	pJAMM1 mit AS-Austausch in AbFS: L139Q, F194Y, E218V, K542Q, F623Y	diese Arbeit
pJA5_epG	6,3 kb	pJAMM1 mit AS-Austausch in AbFS: E79V, F192Y, D229G, F261L, I288L, A304V, Q439R, K467N	diese Arbeit
pJA6_epF	6,3 kb	pJAMM1 mit AS-Austausch in AbFS: I23V, Y82S, S130T, Q138N, K156I, N323Y, M650T, L652P	diese Arbeit
pJA7_epJ	6,3 kb	pJAMM1 mit AS-Austausch in AbFS: F55Y, C69S, K137E, D283G, Einschub: AAGGINHGYEIPIFHHCGSNIISLMLMA	diese Arbeit
pJAb8_ep11	6,3 kb	pJAMM1b mit AS-Austausch in AbFS: A159V	diese Arbeit

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pJAAK1a	5,2 kb	basierend auf pJAMM1b, <i>abfs</i> ausgetauscht durch <i>fcyc</i>	Arsenij Kokorin <sup>[188]</sup>
pJAAK_ep2B1	5,2 kb	pJAAK1a mit AS-Austausch in FCyc: L115E	Arsenij Kokorin <sup>[188]</sup>
pJAAK_ep3B	5,2 kb	pJAAK1a mit AS-Austausch in FCyc: D94V	Arsenij Kokorin <sup>[188]</sup>
pJAAK_ep9B	5,2 kb	pJAAK1a mit AS-Austausch in FCyc: A220G	Arsenij Kokorin <sup>[188]</sup>
pJAAK_ep1D/pJAHE_1D/3G	5,2 kb	pJAAK1a mit AS-Austausch in FCyc: W121R, R321G	Arsenij Kokorin <sup>[188]</sup> / Hendrik Ebke <sup>[189]</sup>
pJAAK_ep4D	5,2 kb	pJAAK1a mit AS-Austausch in FCyc: I52T, M111L, G117S, R168C, V313D	Arsenij Kokorin <sup>[188]</sup>
pJAAK_ep7D	5,2 kb	pJAAK1a mit AS-Austausch in FCyc: S104P	Arsenij Kokorin <sup>[188]</sup>
pJAHE_ep1C/4G	5,2 kb	pJAAK1a mit AS-Austausch in FCyc: Q330H	Hendrik Ebke <sup>[189]</sup>
pJAHE_ep2G	5,2 kb	pJAAK1a mit AS-Austausch in FCyc: Q330H + A331 hinzugefügt	Hendrik Ebke <sup>[189]</sup>
pJAHE_5G	5,2 kb	pJAAK1a mit AS-Austausch in FCyc: W121R, Q330H	Hendrik Ebke <sup>[189]</sup>

Tabelle 22: Vektoren zur Expression der AbFS in *P. pastoris*.

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pGAPZA- <i>abfs</i>	5 kb	pGAPZA codierend für AbFS, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pGAPZαA- <i>abfs</i>	5,2 kb	pGAPZαA codierend für AbFS, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>KpnI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pPinkHCab	7,7 kb	pPinkHC codierend für die Kozak-Sequenz und der Sekretionssignalsequenz des $\alpha$ - <i>mating factors</i> aus <i>S. cerevisiae</i> , Sequenzen eingefügt über die Schnittstellen <i>EcoRI</i> und <i>SphI</i>	diese Arbeit

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pPinkHC- <i>abfsa</i>	9,7 kb	pPinkHC codierend für die Kozak-Sequenz und für AbFS, Sequenz und Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>EcoRI</i> und <i>SwaI</i>	diese Arbeit
pPinkHC $\alpha$ - <i>abfsb</i>	9,8 kb	pPinkHC $\beta$ codierend für AbFS, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>SphI</i> und <i>SwaI</i>	diese Arbeit

**Tabelle 23: Plasmide, die bei der biokatalysierten Oxidation von Valencen und FCdien Verwendung fanden.** BM3: Cytochrom P450 BM3 aus *Bacillus megaterium*, k.A.: keine Angabe, da nicht bekannt, AS: Aminosäure.

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pACYC- <i>gdhB.m.</i>	k. A.	pACYCDuet-1 codierend für die Glucosedehydrogenase aus <i>Bacillus megaterium</i>	AK Reetz
pET21b- <i>adhL.b.</i>	k. A.	pET21b(+) codierend für die Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>	AK Rother/ AK Schwaneberg
pEXP42- <i>bm3</i>	9 kb	pEX42 codierend für BM3	AK Niemeyer
pEXP42- <i>bm3</i> -F87A	9 kb	pEXP42- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: F87A	AK Niemeyer
pETM11- <i>bm3_A</i>	8,5 kb	pETM11 codierend für BM3, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pETM11- <i>bm3</i>	8,5 kb	pETM11 codierend für BM3, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>SacI</i>	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11-F87A	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pET27mod-F87A	8,5 kb	pET27mod codierend für BM3 mit AS-Austausch F87A, Gen eingefügt über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>NotI</i>	diese Arbeit
pETM11-F87V	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: F87V	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11-F87T	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: F87T	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11-S72A-F87A	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: S72A, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pETM11- <i>F87A-A330L</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: F87A, A330L	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>F87A-A330V</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: F87A, A330V	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>F87A-A330W</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: F87A, A330W	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>VYF</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47V, T49Y, Y51F, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>FVY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47F, T49V, (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>CFC</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47C, T49F, Y51C, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>YYY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47Y, T49Y, (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>YNY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47Y, T49N, (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>FFY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47F, T49F, (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>YFY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47Y, T49F, (Y51Y,) F87A, K244E, V314I	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>FIY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47F, T49I, (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>III</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47I, T49I, Y51I, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>NIY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47N, T49I, (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>NCF</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47N, T49C, Y51F, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>FFF</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47F, T49F, Y51F, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>FPY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47F, T49P, (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>CCY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47C, T49C, (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>YIN</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47Y, T49I, Y51N, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pETM11- <i>FSY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47CF T49S, (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>FNF</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47F, T49N, Y51F, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>CFY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47C, T49F, (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>FYY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47F, T49Y, (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>YFF</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47Y, T49F, Y51F, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>IFY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47I, T49F, (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>ITY</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47I, (T49T,) (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>NY Y</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47N, T49Y, (Y51Y,) F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>IIN</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47I, T49I, Y51N, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>ID</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: V78I, A82D, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>LM</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: V78L, A82M, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>LF</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: V78L, A82F, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>CW</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: V78C, A82W, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>RG</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: F87A, M185R, L188G	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>GL</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: F87A, M185G, (L188L)	AK Reetz <sup>[216]</sup>
pETM11- <i>YFYLM</i>	8,5 kb	pETM11- <i>bm3</i> mit AS-Austausch in BM3: R47Y, T49F, (Y51Y,) V78L, A82M, F87A	AK Reetz <sup>[216]</sup>



**Tabelle 24: Plasmide zur *ex vivo* Rekonstitution des Mevalonatwegs aus *Sulfolobus solfataricus*.**

AACT: Acetoacetyl-CoA-Thiolase, HMGS: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Synthase, HMGR: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase, MVK: Mevalonatkinase, PMK: Phosphomevalonatkinase, MDC: Mevalonatdecarboxylase, IDI2: Isopentenylidiphosphatisomerase Isoform 2.

Plasmidrückgrat	Größe	codiert für	Quelle
pOPIN-His-SUMO	6,1 - 6,4 kb	AACT, HMGS, HMGR, MVK, PMK, MDC, IDI2	DPF <sup>[243]</sup>
pET19b-nHis-3C	6,6 - 6,9 kb	AACT, HMGS, HMGR, MVK, PMK, MDC, IDI2	DPF <sup>[243]</sup>
pET19b-3C-cHis	6,4 - 6,6 kb	AACT, HMGS, HMGR, MVK, PMK, MDC, IDI2	DPF <sup>[243]</sup>
pBADM11	5,0 - 5,3 kb	AACT, HMGR, MVK, PMK, MDC, IDI2	Michael Dirkmann <sup>[244]</sup>
pET27mod	6,3 - 6,5 kb	AACT, HMGS, HMGR, MVK, PMK, MDC, IDI2	Michael Dirkmann <sup>[244]</sup>
pETM11	6,3 - 6,5 kb	AACT, HMGS, HMGR, MVK, PMK, MDC, IDI2	Michael Dirkmann <sup>[244]</sup>

**Tabelle 25: Plasmide zur Veränderung der Substratspezifität der AT6-Domäne von DEBS.**

AT6: Acyltransferasedomäne im Modul 6 von DEBS (6-Desoxyerythronolid B Synthase)  $\Omega$ hyg: Hygromycinresistenzkassette, AS: Aminosäure. pJA-W6 – pJA –M28: mutierte *at6* wurde über die Schnittstellen von *Scal* in den Vektor pKSSU96 eingefügt.

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pKSSU89	16,9 kb	basierend auf pKSSU40 codierend für DEBS3 unter der Kontrolle des <i>actI-actIIorf4</i> - Promoters	Dr. Uschi Sundermann <sup>[258f]</sup>
pKSSU96	16,8 kb	Austausch der AT6 Kassette innerhalb von pKSSU89 gegen $\Omega$ hyg	Dr. Susanna Kushnir <sup>[258f]</sup>
pKSSU655	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: V295G	Dr. Uschi Sundermann <sup>[258f]</sup>
pKSSU656	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: V295A	Dr. Uschi Sundermann <sup>[258f]</sup>
pKSSU657	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: V295L	Dr. Uschi Sundermann <sup>[258f]</sup>
pJA-W6	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291E	diese Arbeit

<b>Plasmid</b>	<b>Größe</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Quelle</b>
pJA-W7	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: R399E	diese Arbeit
pJA-W8	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291E, R399E	diese Arbeit
pJA-W9	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291E, A383L	diese Arbeit
pJA-W10	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291E, A383V	diese Arbeit
pJA-W11	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291D	diese Arbeit
pJA-W12	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: R399D	diese Arbeit
pJA-W13	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291D, R399D	diese Arbeit
pJA-W14	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291D, A383L	diese Arbeit
pJA-W15	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291D, A383V	diese Arbeit
pJA-W16	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: R399E, A383L	diese Arbeit
pJA-W17	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: R399E, A383V	diese Arbeit
pJA-W18	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291E, A383L, R399E	diese Arbeit
pJA-W19	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291E, A383V, R399E	diese Arbeit
pJA-W20	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: R399D, A383L	diese Arbeit
pJA-W21	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: R399D, A383V	diese Arbeit
pJA-W22	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291D, A383L, R399D	diese Arbeit
pJA-W23	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291D, A383V, R399D	diese Arbeit
pJA-W24	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291E, R399D	diese Arbeit

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pJA-W25	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291D, R399E	diese Arbeit
pJA-W26	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291E, A383L, R399D	diese Arbeit
pJA-W27	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291E, A383V, R399D	diese Arbeit
pJA-W28	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291D, A383L, R399E	diese Arbeit
pJA-W29	16,9 kb	pKSSU89 mit AS-Austausch in AT6: K291D, A383V, R399E, Gen eingefügt über die Schnittstellen Scal	diese Arbeit
pJA-M6	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291E	diese Arbeit
pJA-M7	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: R399E	diese Arbeit
pJA-M8	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291E, R399E	diese Arbeit
pJA-M9	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291E, A383L	diese Arbeit
pJA-M10	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291E, A383V	diese Arbeit
pJA-M11	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291D	diese Arbeit
pJA-M12	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: R399D	diese Arbeit
pJA-M13	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291D, R399D	diese Arbeit
pJA-M14	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291D, A383L	diese Arbeit
pJA-M15	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291D, A383V	diese Arbeit
pJA-M16	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: R399E, A383L, Gen eingefügt über die Schnittstellen Scal	diese Arbeit
pJA-M17	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: R399E, A383V	diese Arbeit

Plasmid	Größe	Beschreibung	Quelle
pJA-M18	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291E, A383L, R399E	diese Arbeit
pJA-M19	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291E, A383V, R399E	diese Arbeit
pJA-M20	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: R399D, A383L	diese Arbeit
pJA-M21	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: R399D, A383V	diese Arbeit
pJA-M22	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291D, A383L, R399D	diese Arbeit
pJA-M23	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291D, A383V, R399D	diese Arbeit
pJA-M24	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291E, R399D	diese Arbeit
pJA-M25	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291D, R399E	diese Arbeit
pJA-M26	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291E, A383L, R399D	diese Arbeit
pJA-M27	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291E, A383V, R399D	diese Arbeit
pJA-M28	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291D, A383L, R399E	diese Arbeit
pJA-M29	16,9 kb	pKSSU656 mit AS-Austausch in AT6: K291D, A383V, R399E	diese Arbeit

### 2.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG und Sigma-Aldrich als Lyophilisat bezogen. Oligonukleotide mit einer Gesamtlänge von über 50 nt wurden als RPC- gereinigte (engl. *reversed phase chromatography*) Lyophilisate bestellt. Um eine 100 µM Stammlösung der Oligonukleotide zu erzeugen, wurden die Lyophilisate jeweils in dem vom Hersteller angegeben Volumen sterilfiltriertem (0,22 µm Filterporengröße, PES-Membran) ddH<sub>2</sub>O (doppelt deionisiertes Wasser, Reinstwasseranlage: Tabelle 16) resuspendiert. Diese Stammlösungen wurden für die PCR und Sequenzierungsreaktionen auf 10 µM mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Alle wässrigen Oligonukleotidlösungen wurden bei -20°C gelagert.

Oligonukleotide für Klonierungen (Kapitel V5.6) besaßen meist Sequenzbereiche, die nach Abschluss der PCR (Kapitel V5.3) das zu klonierende Fragment flankierten. Wenn möglich,

wurden diese flankierenden Bereiche so entworfen, dass eine Klonierung sowohl über Ligation (Kapitel V5.6.1) als auch über SLIC-MIX (Kapitel V5.6.2) mit dem gleichen Oligonukleotid möglich war. Diese Oligonukleotide besaßen also sowohl Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen als auch an den jeweiligen Enden 20 nt lange vektorhomologe Sequenzen. Das Leseraster des zu exprimierenden Gens war dabei zu beachten.

Die hier angegebenen  $T_A$  (Anlagerungstemperaturen) der Oligonukleotide wurden mit dem Programm DNAClub berechnet.<sup>[281]</sup> Bei Oligonukleotiden mit flankierenden Sequenzbereichen sind zwei  $T_A$  angegeben. Die Kennzeichnung „ $T_{A\text{ spez.}}$ “ bezieht sich dabei auf den genspezifischen Bereich des Oligonukleotids, wohingegen „ $T_{A\text{ ges.}}$ “ das gesamte Oligonukleotid beschreibt. Genspezifische Bereiche der Oligonukleotide sind in Kleinbuchstaben, vektorspezifische oder unspezifische Bereiche in Großbuchstaben dargestellt. Restriktionsschnittstellen sind zur Kennzeichnung unterstrichen. Codons die eine Mutation einer Aminosäure beschreiben sind fett gedruckt.

**Tabelle 26: Oligonukleotide für die Expression der AbFS und einzelner Domänen der AbFS in *E. coli*.**

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'→3')	$T_{A\text{ spez.}}$	$T_{A\text{ ges.}}$
AbFS2_fw	25 nt	atgaaataccaat <del>tttccatcattg</del>	-	46°C
AbFS2_re	24 nt	ttatcaaagc <del>ttgagcatcattag</del>	-	46°C
582pETUpstream_fw	16 nt	ATGCGTCCGGCGTAGA	-	49°C
585T7-Terminator_re	19 nt	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	-	47°C
590AbFS_seq_fw	21 nt	caaaggctcggacgtactcac	-	54°C
591AbFS_seq_re	20 nt	cataagtcaacgggtgcgctg	-	51°C
839AbFSNco_fw	46 nt	AGTTGATACCATGGCGatgaaataccaat <del>tttc catcattgtggac</del>	53°C	64°C
840AbFSM11_re	46 nt	ATTAATTTGCGGCCG <del>C</del> ttatcaaagc <del>ttgagca tcattagcatcag</del>	53°C	64°C
841AbFS27m_re	41 nt	CTTAATTTGCGGCCG <del>C</del> aagc <del>ttgagcatcatta gcatcagc</del>	53°C	65°C
845pGEX_fw	18 nt	ATAGCATGGCCTTTGCAG	-	46°C
846pBAD_re	22 nt	TGCTTAATTTGATGCCTGGCAG	-	51°C
879pBAD_fw	26 nt	CTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATC	-	48°C
1096pUCseq_fw	23 nt	TTACACTTTATGCTTCCGGCTCG	-	53°C
1097pUCseq_re	23 nt	TAAGGAGAAAATACCGCATCAGG	-	50°C
1115pUC19LIC_fw	42 nt	GCCTGCAGGTCGACT <del>C</del> TAGATatgaaataccaa ttttccatc	41°C	63°C
1116pUC19LIC_re	44 nt	CGGCCAGTGAATTC <del>GAGCTC</del> ttatcaaagc <del>ttg agcatcattag</del>	46°C	65°C
1166FCyc_fw	47 nt	TTATTTTCAGGGCGCCatggcaaaataccaatt ttccatcattgtgg	56°C	65°C
1167FCyc_re	46 nt	AAGCTCTCGAGT <del>GCGGCCG</del> Cttatcactgggtg aaacgcttctcag	54°C	71°C

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'→3')	T <sub>A</sub> spez.	T <sub>A</sub> ges.
1173GGPPS_fw	47 nt	TTATTTTCAGGGCGCCatggcaactcaactagattggatgcaaaatg	56°C	66°C
1174GGPPS_re	39 nt	AAGCTCTCGAGTGCGGCCGcttatcaaagcttagcatc	41°C	68°C
1218FCyc1_re	46 nt	AAGCTCTCGAGTGCGGCCGcttatcacaaggacacgatgccggaag	58°C	73°C
1219FCyc2_re	48 nt	AAGCTCTCGAGTGCGGCCGcttatcacaaggcggtaatgagcaattg	54°C	70°C
1220GGPPS1_fw	43 nt	TTATTTTCAGGGCGCCatggcaccgcctttgtctcataagggtg	60°C	69°C
1221GGPPS2_fw	45 nt	TTATTTTCAGGGCGCCatggcagattcgcttccctctaaagggtac	59°C	68°C

**Tabelle 27: Oligonukleotide für die Expression der AbFS und einzelner Domänen in *S. cerevisiae*.**

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'→3')	T <sub>A</sub> spez.	T <sub>A</sub> ges.
1039pVVAfFSSC_fw	60 nt	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAA AAatgaagtaccagtttctccatcattg	51°C	68°C
1040pVVAfFSSC_re	59 nt	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTttac aatttcaacatcatcaacattaattc	48°C	66°C
1042AbFSSCseq_fw	24 nt	ttttcagaaatgatggagatagac	-	46°C
1043AbFSSCseq_re	24 nt	agtcttttaaacgtgtaaacactg	-	47°C
1044AbFSSCseq_fw	25 nt	tattacttaattgctctctacctcc	-	47°C
1045AbFSSCseq_re	24 nt	aacatatctctagtagccttttgag	-	47°C
1046AbFSSCseq_re	25 nt	tcatacaaaagaatccaaaattttcc	-	46°C
1185DuettPgk_fw	41 nt	gagaagcgtttcaaccagtgaTCACCGTCATCA CCGAAACG	-	68°C
1186DuettPgk_re	47 nt	ttgcatccaatctagttgagtcatTTTTGAAGC CTGCTTTTTGTAC	-	63°C
1187DuettFyc1_fw	26 nt	aaCAAGATCTCGACTCTAGAGGATCC	-	53°C
1188DuettFyc1_re	24 nt	tcactggttgaaacgcttctcagg	-	56°C
1189DuettGGPPS_fw	28 nt	atgactcaactagattggatgcaaaatg	-	52°C
1190DuettGGPPS_re	24 nt	CCTAGGACTAGTGCTAGCGAATTC	-	52°C
1191pVVseq_fw	16 nt	GCTGCGCCCCGACACC	-	57°C
1192pVVseq_re	25 nt	CCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAG	-	58°C
1273DuettFyc1/2_fw	52 nt	caagaacgaagagtcgatatctccggaccttcg cacttatggtgaagccatg	-	69°C
1274DuettFyc1_re	43 nt	CGTTTCGGTGATGACGGTGAtcacaaggacacg atgccggaag	-	72°C
1275DuettFyc2_re	48 nt	CGTTTCGGTGATGACGGTGAtcacaaggcgggt aatgagcaattgagg	-	70°C
1276DuettPgk1_fw	43 nt	cttccggcatcgtgtccttgtgaTCACCGTCAT CACCGAAACG	-	72°C
1277DuettPgk1_re	57 nt	gatcaccttatgagacaaaggcggcatTTTTGA AGCCTGCTTTTTGTACAACTTG	-	67°C
1278DuettPgk2_fw	48 nt	cctcaattgctcattaccgcctttgtgaTCACC GTCATCACCGAAACG	-	70°C
1279DuettPgk2_re	57 nt	ggtaccttagagggaagcgaatccatTTTTGA AGCCTGCTTTTTGTACAACTTG	-	67°C

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'→3')	T <sub>A</sub> spez.	T <sub>A</sub> ges.
1280DuettGGPPS1_fw	61 nt	CAAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAA Aatgccgcctttgtctcataaggtgatc	-	68°C
1281DuettGGPPS2_fw	61 nt	CAAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAA Aatggattcgcttccctctaaaggtacc	-	68°C
1282DuettGGPPS1/2_re	45 nt	CTAGGACTAGTGCTAGCGAATTCCTGCAGCCCCA TCAACCACTTTG	-	69°C
1345pVVFCyc_fw	84 nt	ACTCTAGAGGATCCCCCATCAAACAAGTTTGT CAAAAAAGCAGGCTTCAAAAatgaaataccaat tttccatcattgtggacc	55°C	71°C
1346pVVFCyc_re	84 nt	GTGCTAGCGAATTCCTGCAGCCCATCAACCACT TTGTACAAGAAAGCTGGGTtcaactggttgaaac gcttctcaggattatatac	57°C	74°C
1347pVVFCyc1_re	75 nt	GTGCTAGCGAATTCCTGCAGCCCATCAACCACT TTGTACAAGAAAGCTGGGTtcacaaggacacga tgccggaag	58°C	77°C
1348pVVFCyc2_re	80 nt	GTGCTAGCGAATTCCTGCAGCCCATCAACCACT TTGTACAAGAAAGCTGGGTtcacaaaggcggta atgagcaattgagg	58°C	75°C
1349pVVGPPS_fw	82 nt	ACTCTAGAGGATCCCCCATCAAACAAGTTTGT CAAAAAAGCAGGCTTCAAAAatgactcaactag attggatgcaaaatgg	54°C	71°C
1350pVVGPPS1_fw	80 nt	ACTCTAGAGGATCCCCCATCAAACAAGTTTGT CAAAAAAGCAGGCTTCAAAAatgccgcctttgt ctcataaggtgatc	57°C	73°C
1351pVVGPPS2_fw	80 nt	ACTCTAGAGGATCCCCCATCAAACAAGTTTGT CAAAAAAGCAGGCTTCAAAAatggattcgcttc cctctaaaggtacc	57°C	73°C
1352pVVGPPS_re	79 nt	GTGCTAGCGAATTCCTGCAGCCCATCAACCACT TTGTACAAGAAAGCTGGGTtcaaagcttgagca tcattagcatcag	53°C	74°C
1428pVVabfs_re	82 nt	GTGCTAGCGAATTCCTGCAGCCCATCAACCACT TTGTACAAGAAAGCTGGGTttatcaaagcttga gcatcattagcatcag	53°C	73°C

Tabelle 28: Oligonukleotide für die Expression der AbFS in *P. pastoris*.

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'→3')	T <sub>A</sub> spez.	T <sub>A</sub> ges.
1175pGAPAbFS_fw	52 nt	GAACAACACTATTTTCGAAACGAGGAATTCatgaaa taccaatthttccatcattg	46°C	62°C
1176pGAPAbFS_re	42 nt	TGGCGGCCCGCCGCGGGTCGACccaagcttgagc atcattagc	48°C	76°C
1177pGAPaAbFS_fw	41 nt	GGCCGTCTCGGATCGGTACCatgaaataccaat tttccatc	41°C	66°C
1178pGAPaAbFS_re	39 nt	TCTAGAAAGCTGGCGGCCGCaagcttgagcatc attagc	43°C	67°C
1179pGAPseq_fw	24 nt	AGGCGAACACCTTTCCCAATTTTG	-	55°C
1180pGAPseq_re	23 nt	CAGGCAATGGCATTCTGACATC	-	52°C
1306pPinkseq_fw	29 nt	ATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGC	-	56°C
1307pPinkseq_re	28 nt	TCTAACTCCTTCCTTTTCGGTTAGAGCG	-	57°C
1310pPinkAbFSA_fw	59 nt	CAACTAATTATTCGAAACGGAATTCGAAACGat gaaataccaatthttccatcattgtgg	51°C	64°C
1311pPinkAbFSA/B_re	55 nt	AGGAAAAGGGCCTGTATTTAAATTTAtcaaag cttgagcatcattagcatcagc	55°C	66°C

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'→3')	T <sub>A</sub> spez.	T <sub>A</sub> ges.
1312SigSeqB_fw	73 nt	aattcgaaacgATGAGATTTCTTCAATTTTTC CTGCTGTTTTATTTCGAGCATCTCCGCATTAG CTgcatg	-	69°C
1313SigSeqB_re	65nt	cAGCTAATGCGGAGGATGCTGCGAATAAAACAG CAGTAAAAAATTGAAGGAAATCTCATcgtttcg	-	68°C
1314pPinkAbFSB_fw	51 nt	CATCTCCGCATTAGCTGCATGCatgaaatacc aattttccatcattgtgg	51°C	67°C

**Tabelle 29: Oligonukleotide zur Erzeugung von Konstrukten für das Screening von AbFS- und FCyc-Varianten mit erhöhter Löslichkeit.**

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'→3')	T <sub>A</sub> spez.	T <sub>A</sub> ges.
867_A1_fw	34 nt	tgataaGGCGCCAGCTTGGCTGTTTTGGCGGAT G	-	67°C
868_A1_re	46 nt	ggatattcatAGCCATGGTTAATTCCTCCTGTT AGCCCAAAAAACG	-	65°C
869_A2_fw	48 nt	AGGAGGAATTAACCATGGCTatgaaataccaat tttccatcattgtgg	51°C	64°C
870_A2_re	52 nt	CAGCAGATCCAGCAGATCCTGCGGCCGCaagct tgagcatcattagcatcag	50°C	73°C
871_A3_fw	60 nt	GGATCTGCTGGATCTGCTGCTGGTTCTGGCGCA TCTatgaccatgattacgaattcgagc	51°C	73°C
872_A3_re	50 nt	TCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGCGCCttatcag cgccattcgccattcag	56°C	75°C
873lacZaNco_fw	39 nt	TAATTAACCATGGCTatgaccatgattacgaat tcgagc	51°C	60°C
874lacZaNot_re	39 nt	TTTATATGCGGCCGcttatcagcgccattcgcc attcag	56°C	66°C
894pJAMMseq1_fw	22 nt	atcgcccttcccaacagttgcg	-	59°C
895pJAMMseq2_fw	25 nt	GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCA	-	52°C
896pJAMMseq3_re	27 nt	GTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC	-	49°C
897pJAMMseq4_fw	20 nt	AGGGTCGGAACAGGAGAGCG	-	58°C
898pJAMMseq5_re	24 nt	GTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCT	-	56°C
899pJAMMseq6_fw	16 nt	CAGACGCGACGGCGAC	-	53°C
900pJAMMseq7_re	22 nt	TTCCCGCCAGGAGAGATTCATC	-	56°C
901pJAMMseq8_re	24 nt	TGTTAGCCCAAAAAACGGGTATGG	-	54°C
1093_A2b_re	52 nt	TAGCAGGGGACCCAGGCCATGCGGCCGCaagct tgagcatcattagcatcag	50°C	76°C
1094_A3b_fw	45 nt	TGGCCTGGGTCCCTGCTAGCaccatgattacg aattcgagctcg	53°C	73°C
1114_linkerb_fw	40 nt	tgctaataatgatgctcaagcttGCGGCCGCATGGC CTGGGTC	45°C	72°C
1266_A2c_re	40 nt	ACCCAGGCCATGCGGCCGctggttgaaacgct tctcagg	52°C	75°C
1424fcycWHOP_fw	30 nt	atgaaataccaattttccatcattgtggac	-	53°C
1425fcycWHOP_re	29 nt	ctggttgaaacgcttctcaggattatatac	-	54°C
1426fcyc1cWHOP_re	29 nt	atggttgaaacgcttctcaggattatatac	-	53°C
1427fcyc2gWHOP_re	23 nt	cgcatggttgaaacgcttctcag	-	55°C



Tabelle 30: Oligonukleotide für die Expression von BM3 und der F87A-Variante in *E. coli*.

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'→3')	T <sub>A</sub> spez.	T <sub>A</sub> ges.
781p11BM3_fw	44 nt	CTTTATTTTCAGGGCGCCatgacaattaaagaa atgcctcagcc	52°C	64°C
813p11BM3_re	42 nt	CGAGTTCGGCCGCAAGCTttaccagcccacac gtcttttgc	58°C	74°C
821BM3seq1_fw	22 nt	ttttaccgagatcagcctcatc	-	50°C
822BM3seq2_fw	24 nt	cttcaccgtgataaaacaatttgg	-	49°C
824BM3seq4_re	20 nt	tttcagggctcttttggcagc	-	51°C
825BM3seqNEW3_re	25 nt	tgcgaggaataaacacctaaatgatc	-	51°C
826BM3seq5_re	20 nt	atcgctttgttcaccgcttg	-	51°C
832BM3RLM_fw	42 nt	GATTTATACCATGGACatgacaattaaagaaat gcctcagcc	52°C	60°C
836BM3RLM_re	43 nt	CTTAATTTGCGGCCGCTtattaccagcccaca cgtcttttgc	58°C	68°C

Tabelle 31: Oligonukleotide für die *ex vivo*-Rekonstitution des Mevalonatwegs.

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'→3')	T <sub>A</sub> spez.	T <sub>A</sub> ges.
1063pE11_1_fw	48 nt	GAATCTTTATTTTCAGGGCGCCatggtagagg ttacttaaattcttc	47°C	62°C
1064pE11_1_re	51 nt	GTGCTCGAGTTCGGCCGCAAGCTTAttacctcg ataaattaataaccataac	44°C	66°C
1065pE11_2_fw	45 nt	GAATCTTTATTTTCAGGGCGACatgttatctgg tattcttggatg	45°C	61°C
1066pE11_2_re	51 nt	GTGCTCGAGTTCGGCCGCAAGCTTAttactcat acacctttatcttattag	43°C	67°C
1067pE11_3_fw	44 nt	GAATCTTTATTTTCAGGGCGCCatggcgatgaa aattgatgaag	47°C	63°C
1068pE11_3_re	49 nt	GTGCTCGAGTTCGGCCGCAAGCTTAtttagactt tcatagctcttccaag	48°C	70°C
1069pE11_4_fw	41 nt	GAATCTTTATTTTCAGGGCGCCatggcgatgat ggttgaag	47°C	65°C
1070pE11_4_re	49 nt	GTGCTCGAGTTCGGCCGCAAGCTTAttatagta tcgaaaaaatgacacc	44°C	68°C
1071pE11_5_fw	43 nt	GAATCTTTATTTTCAGGGCGCCatggcgatgat aaaggttagc	47°C	64°C
1072pE11_5_re	45 nt	GGTGCTCGAGTTCGGCCGCTTAttagtttagatt cgagccttaatc	45°C	68°C
1073pE11_6_fw	50 nt	GAATCTTTATTTTCAGGGCGACatgttaaagtc tgtaacagtttctgcac	52°C	63°C
1074pE11_6_re	52 nt	GTGCTCGAGTTCGGCCGCAAGCTTAttattctc tacttaataacttttgggtcc	47°C	68°C
1075pE11_7_fw	52 nt	CTTTATTTTCAGGGCGCCATGGCGatgcctgat atagtaaataggaaagttg	48°C	66°C
1076pE11_7_re	59 nt	TGGTGCTCGAGTTCGGCCGCAAGCTTAttattc tctctttctaactttctcgtatatag	49°C	69°C
1079pB11_7_fw	52 nt	CTTTATTTTCAGGGCGCCATGGCGatgcctgat atagtaaataggaaagttg	48°C	66°C

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'→3')	T <sub>A</sub> spez.	T <sub>A</sub> ges.
1080pB11_7_re	53 nt	GCTCTCGAGT <b>GCGGCCGCT</b> Attatttctctctt tctaacttttctcgatatag	49°C	66°C
1081p27_7_fw	48 nt	GAAGGAGATATACCATGGCGatgcctgatata taaataaggaaagtgtg	48°C	62°C
1082p27_7_re	50 nt	CTCGAGT <b>GCGGCCGCAAGCT</b> Attatttctctct tctaacttttctcgatatag	49°C	66°C

**Tabelle 32: Oligonukleotide für den gezielten Austausch von einzelnen Aminosäuren in der AT6-Domäne von DEBS und zur Verifizierung der erstellten Konstrukte.**

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'→3')	T <sub>A</sub> spez.	T <sub>A</sub> ges.
206_DEBS_AT6_fw	49 nt	TTACGGCAAGTCGCGCGGGTCGTCGGGCCCGGT GCTGTCGGGTTCGGTG	-	82°C
207_DEBS:AT6_re	48 nt	AAGCCGCCTTCCAGGTCCACCGCGTGGTGGCC AGCGGTCCAGTCG	-	83°C
213_hygSca-100_fw	25 nt	atcacgggagcgatgtggccgtgg	-	69°C
452_Sonde_AT6_re	26 nt	tggcggcacgcccgcggagatgccg	-	73°C
1062_AT6seq_fw	28 nt	tgcgcgctcgggccctgcgcgcgaaggc	-	74°C
1087_A383L_fw	56 nt	accggtgctcaccgcg <b>CTG</b> gtgcaggagatcg ccgcggaacgcccgtggccatcggg	-	85°C
1088_A383L_re	56 nt	tccgcgcgatctcctgcac <b>CAG</b> cgcggtgagc accgggtgcccgtcatctcgac	-	82°C
1089_A383V_fw	56 nt	accggtgctcaccgcg <b>GTG</b> gtgcaggagatcg ccgcggaacgcccgtggccatcggg	-	85°C
1090_A383_re	56 nt	tccgcgcgatctcctgcac <b>CAC</b> cgcggtgagc accgggtgcccgtcatctcgac	-	82°C
1283_K291E_fw	59 nt	aggacgagggcgtgcgcgcc <b>GAG</b> acgctcccgg tggactacgcctcgcactcccgccac	-	85°C
1284_K291E_re	56 nt	aggcgtagtcaccgggagcgt <b>CTC</b> ggcgcgca cgccctcgtcctcgcaacgtgcg	-	83°C
1285_R399E_fw	59 nt	tggccatcgggtcgtgcac <b>GAG</b> gacaccgcg aggagcacctgatcgccgagctcgcc	-	83°C
1286_R399E_re	57 nt	atcaggtgctcctccgcggtgtc <b>CTC</b> gtgcagc gaccgatggccacggcgtccgcg	-	83°C
1287_VA_K291E_fw	59 nt	aggacgagggcgtgcgcgcc <b>GAG</b> acgctcccgg <b>CC</b> gactacgcctcgcactcccgccac	-	85 °C
1288_VA_K291E_re	56 nt	aggcgtagtc <b>GGC</b> gggagcgt <b>CTC</b> ggcgcgca cgccctcgtcctcgcaacgtgcg	-	83°C
1291_K291D_fw	59 nt	aggacgagggcgtgcgcgcc <b>GAC</b> acgctcccgg tggactacgcctcgcactcccgccac	-	85°C
1292_K291D_re	59 nt	aggcgtagtcaccgggagcgt <b>GTC</b> ggcgcgca cgccctcgtcctcgcaacgtgcg	-	83°C
1293_R399D_fw	59 nt	tggccatcgggtcgtgcac <b>GAC</b> gacaccgcg aggagcacctgatcgccgagctcgcc	-	83°C
1294_R399D_fw	57 nt	atcaggtgctcctccgcggtgtc <b>GTC</b> gtgcagc gaccgatggccacggcgtccgcg	-	83°C
1295_VA_K291D_fw	59 nt	aggacgagggcgtgcgcgcc <b>GAG</b> acgctcccgg <b>CC</b> gactacgcctcgcactcccgccac	-	85°C

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'→3')	T <sub>A</sub> spez.	T <sub>A</sub> ges.
1296_VA_K291D_re	56 nt	agggcgtagtc <b>GGC</b> cgggagcgt <b>GTC</b> ggcgcgca cgccctcgtcctcgcaacgtgcg	-	82°C

### 3 Nährmedien und Medienadditive

#### 3.1 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden bei 121°C für 20 min sterilisiert (Autoklav: Tabelle 16). Die Herstellung von Festmedien erfolgte, falls nicht anders angegeben, durch die Zugabe von 2% (w/v) Kobe Agar (Carl Roth) vor dem Autoklavieren. Für alle Medien wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet. Alle mit dem Symbol \* gekennzeichneten Bestandteile wurden erst nach dem Autoklavieren der Basismedien als sterilfiltrierte Lösungen hinzugegeben. Bestandteile die mit dem Symbol \*\* gekennzeichnet sind, wurden nach dem Autoklavieren als separat autoklavierte Lösungen hinzugegeben. Verwendete Antibiotika und andere instabile Medienadditive sind in Kapitel V3.2 separat aufgeführt.

**Tabelle 33: Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*.**

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
LB-Miller	10 g/L Trypton	pH 7,4
	5 g/L Hefeextrakt	
	10 g/L NaCl	
LB-Lennox	10 g/L Trypton	pH 7,4
	5 g/L Hefeextrakt	
	5 g/L NaCl	
SOB	20 g/L Trypton	pH 7
	5 g/L Hefeextrakt	
	0,58 g/L NaCl	
	0,19 g/L KCl	
	2,03 g/L MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	
	2,46 g/L MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	
SOC	SOB-Medium	pH 7
	+ 20 mM D-Glucose	
2xTY	16 g/L Trypton	pH 7,4
	10 g/L Hefeextrakt	
	5 g/L NaCl	
TB-Medium	15 g/L Pepton	pH 7,2
	24 g/L Hefeextrakt	
	4 mL/L Glycerol	

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
BM3-Medium <sup>[220]</sup>	50 mL/L 1,7 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ** 50 mL/L 7,2 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ** TB-Medium + 1 mL/L 1000 x BM3 SE-Mix** + 10 mL/L 100 x BM3 Power Mix** + 1 mL/L 1M MgCl <sub>2</sub> **	pH 7,2
1000 x BM3 SE-Mix** <sup>[220]</sup>	8,1 g/L FeCl <sub>3</sub> 2,94 g/L CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O 2 g/L MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O 1,36 g/L ZnSO <sub>4</sub> 0,476 g/L CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O 0,341 g/L CuCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O 0,276 g/L NiCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O 0,124 g/L H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (nicht löslich) 0,372 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	
100 x BM3-Powermix** <sup>[220]</sup>	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4) 40% Glycerol (v/v) Natrium-Monoglutamat (gesättigt)	
Autoinduktionsmedium I <sup>[244]</sup>	TB-Medium + 20 mL/L 10% α-Lactose-Monohydrat* (w/v) + 1 mL/L 2 M MgSO <sub>4</sub> ** + 1,25 mL/L 40% D-Glucose (w/v)**	für pET-Vektoren
Autoinduktionsmedium II <sup>[244]</sup>	TB-Medium + 5 mL/L 1,2 M L-(+)-Arabinose* + 1 mL/L 2M MgSO <sub>4</sub> ** + 1,25 mL/L 40% D-Glucose (w/v)**	für pBAD-Vektoren
M9	200 mL/L 5 x M9-Salze** 1 mL/L 1 M MgSO <sub>4</sub> * 1 mL/L 0,1 M CaCl <sub>2</sub> *	Minimalmedium
5 x M9-Salze	8 mL/L 50% D-Glucose (w/v)** 42,5 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O 15 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,5 g/L NaCl 5 g/L NH <sub>4</sub> Cl	

**Tabelle 34: Nährmedien zur Kultivierung von *S. cerevisiae* und *P. pastoris*.** YNB w/o AA and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Yeast nitrogen base without amino acids and ammoniumsulfate.

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
YPD	10 g/L Hefeextrakt 20 g/L Pepton aus Soja 50 mL/L 40% D-Glucose (w/v)**	
YPAD	YPD-Medium + 40 mg/L Adenin-Hemisulfat	
gep. YPD <sup>[106]</sup>	YPD-Medium + 50 mL/L 2 M Tris-HCl (pH 8)** + 1 mL/L 1 M MgCl <sub>2</sub> **	
BVT <sup>[282]</sup>	8,5 g/L Hefeextrakt 6 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,9 g/L NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,45 g/L MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O 0,28 g/L CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O 0,1% Antifoam 204 (v/v) 50 mL/L 40% D-Glucose (w/v)**	
SD (-His, -Leu, -Ura)	1,7 g/L YNB w/o AA and (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 590 mg/L Aminosäure-Mix 16 mg/L Adenin-Hemisulfat 20 mg/L L-Tryptophan 50 mL/L 40% D-Glucose (w/v)** 1 mL/L 1 M MgCl <sub>2</sub> **	für Agarmedien auf pH 6 titrieren
SD (-His, -Leu)	SD (-His, -Leu, -Ura) + 20 mg/L Uracil	für Agarmedien auf pH 6 titrieren
Aminosäure-Mix	50 mg/L L-Arginin 80 mg/L L-Aspartat 50 mg/L L-Isoleucin 50 mg/L L-Lysin-HCl 20 mg/L L-Methionin 50 mg/L L-Phenylalanin 100 mg/L L-Threonin 50 mg/L Tyrosin 140 mg/L L-Valin	50 x Stammischung abwiegen und mörsern, 580 mg/L
PT-Agar	3,4 g/L YNB w/o AA and (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 590 mg/L Aminosäure-Mix	pH 6

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
BMGY <sup>[283]</sup>	20 mg/L L-Histidin 100 mg/L L-Leucin 20 mg/L L-Tryptophan 50 mL/L 40% D-Glucose(w/v)** 20 g/L Kobe Agar 3,4 g/L YNB w/o AA and (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 g/L Hefeextrakt 20 g/L Pepton aus Casein 100 mL 1 M K <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer (pH 6)** 20 mL 0,02% Biotin (w/v)* 100 mL 10% Glycerol (v/v)**	Lagerung bei 4°C, Biotinlsg. bei 4°C lagern
BMM <sup>[283]</sup>	3,4 g/L YNB w/o AA and (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 g/L Hefeextrakt 20 g/L Pepton aus Casein 100 mL 1 M K <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer (pH 6)** 20 mL 0,02% Biotin (w/v)* 100 mL 5% Methanol (v/v)*	Lagerung bei 4°C, Biotin- und Methanollsg. bei 4°C lagern
1 M K <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer	132 mL 1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 868 mL 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 6
MM <sup>[283]</sup>	3,4 g/L YNB w/o AA and (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20 mL 0,02% Biotin (w/v)* 100 mL 5% Methanol (v/v)*	Lagerung bei 4°C, Biotin- und Methanollsg. bei 4°C lagern

Tabelle 35: Nährmedien zur Kultivierung von Actinomyceten.

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
TSB <sup>[284]</sup>	17 g/L Pepton aus Casein 3 g/L Pepton aus Soja 2,5 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 g/L NaCl 2,5 g/L D-Glucose	pH 7,3 30 g/L <i>Tryptic Soy Broth</i> von Fluka eingewogen
Actinomyceten- Isolierungsagar	2 g/L Natrium-Casein 0,1 g/L L-Asparagin 4 g/L Natrium-Propionat 0,5 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	pH 8,1 22 g/L <i>Actinomycete</i> <i>Isolation Agar</i> von Fluka Eingewogen und 5 mL

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
SY <sup>+</sup> -Agar <sup>[285]</sup>	0,1 g/L MgSO <sub>4</sub> 0,0001 g/L FeSO <sub>4</sub> 0,5% Glycerol (v/v) 15 g/L Agar 10 g lösliche Stärke 2 g Hefeextrakt in 600 mL ddH <sub>2</sub> O autoklavieren + 20 g Kobe Agar in 400 mL ddH <sub>2</sub> O** + 1 mL 1% Thiamin (w/v)* + 1 mL 1,2% FeSO <sub>4</sub> (w/v)* + 10 mL 10 mM MgCl <sub>2</sub> **	Glycerol hinzu  pH 7,2 und Lagerung bei 4°C, Herstellung der FeSO <sub>4</sub> -Lsg.: ddH <sub>2</sub> O leicht mit HCl ansäuern, Lagerung der Thiamin- und FeSO <sub>4</sub> -Lsg. bei 4°C
ABB13-Agar <sup>[286]</sup>	5 g Pepton aus Soja 3 g CaCO <sub>3</sub> 2,1 g MOPS 5 g lösliche Stärke in 600 mL ddH <sub>2</sub> O autoklavieren + 20 g Kobe Agar in 400 mL ddH <sub>2</sub> O**	pH 7,2
Soft-Agar SM3 <sup>[287]</sup>	0,4% Kobe Agar (w/v) in TSB 50 g/L Glucidex IT29 25 g/L Sojabohnenmehl 3 g/L Rübenkraut 0,25 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,5 g/L CaCO <sub>3</sub> 5 g/L D-Glucose	pH 7
SM16 <sup>[288]</sup>	20,9 g/L MOPS 10 g/L Prolin 0,5 g/L NaCl 2,1 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,25 g/L EDTA 0,49 g/L MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O 0,029 g/L CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O 1 mL/L Spurenelementlösung* 20 mL/L 1 M MgCl <sub>2</sub> ** 20 g/L D-Glucose	pH 7
Spurenelementlösung	0,04 g/L ZnCl <sub>2</sub> 0,2 mg/L FeCl <sub>3</sub> × 6 H <sub>2</sub> O 0,009 g/L CuCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O 0,009 g/L MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	Lagerung bei 4°C

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
BM <sup>[276]</sup> ( <i>Bulgarian medium</i> )	0,009 g/L NaB <sub>4</sub> O <sub>7</sub> × 10 H <sub>2</sub> O 0,009 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> × 4 H <sub>2</sub> O 32,6 g/L Sojabohnenmehl 10,66 mL/L Ölsäuremethylester 2,2 g/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 g/L CaCO <sub>3</sub> 0,705 g/L Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> 0,33 g/L MnCl <sub>2</sub> 0,11 mg/L FeSO <sub>4</sub> 0,075 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,019 g/L Ascorbinsäure 200 µL Antifoam A** 6% Sojaög I (v/v)** 20 g/L D-Glucose	pH 6,6 – 6,9

### 3.2 Antibiotika und andere instabile Medienadditive

Die Verwendung von Antibiotika erfolgte immer dann, wenn Mikroorganismen Antibiotikaresistenzgene trugen und unter Selektionsdruck kultiviert werden sollten. Die genetische Information für Resistenzgene kann durch Plasmide, Vektoren oder dem Genom des Mikroorganismus selbst vermittelt werden. Da Antibiotika in der Regel in gelöster Form nicht lange stabil sind, wurden diese erst direkt vor der Verwendung als sterilfiltrierte Lösungen zu den entsprechenden Medien hinzugegeben. Medien, die lichtempfindliche Medienadditive, wie Doxycyclin oder X-Gal, enthielten, wurden vor Licht geschützt aufbewahrt.

**Tabelle 36: Antibiotika und andere Medienadditive.** Alle hier aufgeführten Medienadditive wurden nach der Herstellung sterilfiltriert. Die meisten dieser Stammlösungen wurden zur längeren Lagerung bei -20°C aufbewahrt. Ausgenommen sind die Stammlösungen der L-(+)-Arabinose, die bei 4°C gelagert wurde, und des Succinats, welche bei Raumtemperatur gelagert wurde. \*: zum Lösen erhitzen.

Medienadditiv	Stammlösung	Endkonzentration	Quelle
Apramycin-Sulfatsalz	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	50 µg/mL	Sigma-Aldrich
L-(+)-Arabinose	1,2 M in ddH <sub>2</sub> O	6 oder 12 mM	Carl Roth
Carbenicillin	100 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	100 µg/mL	Carl Roth
Chloramphenicol	25 mg/mL in EtOH	25 µg/mL	MP Biomedicals
Doxycyclin	20 mg/mL in 70% EtOH	20 µg/mL	Sigma-Aldrich
Erythromycin	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	50 µg/mL	Sigma-Aldrich
FAD	50 mM in ddH <sub>2</sub> O	50 µM	Santa Cruz
Hygromycin B Lsg.	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	25 µg/mL	Carl Roth
IPTG	1 M in ddH <sub>2</sub> O	1, 0,1 oder 0,025 mM	Carl Roth



Kanamycin	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	50 oder 100 µg/mL	Carl Roth
Nystatin	50 mg/mL in DMSO	50 µg/mL	Sigma-Aldrich
Phosphomycin-Dinatriumsalz	100 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	100 oder 300 µg/mL	Sigma-Aldrich
Polymyxin B-Sulfatsalz	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	50 µg/mL	Sigma-Aldrich
Streptomycin-Sulfatsalz	25 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	25 µg/mL	Carl Roth
Dinatriumsuccinat-Hexahydrat	200 mM in ddH <sub>2</sub> O*	20 mM	Carl Roth
X-Gal	40 mg/mL in DMF	40 µg/mL	Carl Roth
Zeocin	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	50 µg/mL	Invivogen

## 4 Lösungen, Puffer, kommerzielle Enzyme und Kits

### 4.1 Lösungen und Puffer

Falls nicht anders angegeben wurden die Puffer und Lösungen mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert. Sterilfiltrierte Puffer und Lösungen sind mit dem Symbol \* markiert.

**Tabelle 37: Allgemeine Puffer, Lösungen und Materialien.**

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
TE 10 x*	100 mM Tris-HCl 10 mM EDTA	pH 7,5 oder pH 8
RNase A (DNase-frei)	10 mg RNase A 1 mL 10 mM Natriumacetat (pH 5,5) 15 min aufkochen und abkühlen + 0,1 mL 1 M Tris-HCl (pH 8)	Lagerung bei -20°C
säuregewaschene Glasperlen*	Glasperlen mit 0,25 – 0,5 mm oder mit 1,7 – 2,1 mm Durchmesser (Carl Roth)	mit verd. HNO <sub>3</sub> waschen und mit ddH <sub>2</sub> O spülen bis der Durchfluss pH-neutral ist

**Tabelle 38: Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.**

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
TAE 50 x	2 M Tris 2 M Essigsäure 50 mM EDTA	pH 8,5
0,8% Agarose	0,8% Agarose (w/v) in TAE 1 x GelRed 1x	in der Mikrowelle erhitzen
DNA-Ladepuffer 6 x*	30% Saccharose (w/v) 20% Glycerol (v/v)	Lagerung bei 4°C

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
	0,2% Orange G (w/v)	

Tabelle 39: Lösungen für die Plasmidisolierung aus *E. coli*.

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
Lösung I*	25 mM Tris-HCl (pH 8) 10 mM EDTA 50 mM D-(+)-Glucose 10 µL/mL RNase A (DNase-frei)	Lagerung bei 4°C
Lösung II*	0,2 M NaOH 1% SDS (w/v)	
Lösung III*	3 M Natriumacetat	pH 5,5, Lagerung bei 4°C
Lösung IV*	5 M LiCl	

Tabelle 40: Lösungen für die Isolierung von Gesamt-DNA aus *S. cerevisiae*.

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
DNA-Isolationspuffer* <sup>[289]</sup>	10 mM Tris-HCl (pH 8) 1 mM EDTA 0,2% Triton X-100 (w/v) 0,1% SDS (w/v) 100 mM NaCl	

Tabelle 41: Lösungen für die epPCR.

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
dNTP epMix 5,55 x	7,2 µL 10 mM dNTP (Bioline), 1,1 mM 28,8 µL 10 mM dCTP (Bioline), 4,4 mM 28,8 µL 10 mM dTTP (Bioline), 4,4 mM	für 36 Reaktionen, Lagerung bei -20°C

Tabelle 42: Lösungen für die sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung (SLIC-MIX).

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
Pol 4 Puffer*	NEB2 5 x 1:20 mit ddH <sub>2</sub> O verdünnt	Lagerung bei -20°C
10 x LIC Puffer*	319 µL T4 Ligase Puffer 5 x (Fermentas) 1 µL β-Mercaptoethanol	Lagerung bei -20°C

**Tabelle 43: Puffer für die Hybridisierung von Oligonukleotiden.**

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
10 x Hybridisierungs-Puffer*	0,2 M Tris-HCl 0,1 M MgCl <sub>2</sub> 0,5 M NaCl	pH 7,5

**Tabelle 44: Puffer für die Präparation von kompetenten und ultrakompetenten *E. coli*.**

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
TFB I <sup>[290]</sup>	10 mM PIPES 15 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM KCl 55 mM MnCl <sub>2</sub> , Zugabe nach pH-Titration	pH 6,7, Lagerung bei 4°C
DMSO	1,4 mL DMSO für die Molekularbiologie (Carl Roth)	nach dem Öffnen 1,4 mL- Aliquots einfrieren (-20°C)
TFB II*	10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM NaCl 15% Glycerol	pH 7 und Lagerung bei 4°C

**Tabelle 45: Lösungen und Puffer für die Transformation von *S. cerevisiae*.<sup>[289]</sup>**

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
Carrier-DNA	20 mg DNA type III (Sigma #D1626) 10 mL TE 1 x*	über Nacht bei 4°C Rühren, Lagerung bei -20°C
Lithiumacetat 10 x*	1 M Lithiumacetat	pH 8,4
PEG 4000*	50% PEG 4000 (w/v)	

**Tabelle 46: Lösungen und Puffer für die Transformation von *P. pastoris*.<sup>[197]</sup>**

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
Puffer A*	1 M Sorbitol 10 mM Bicin (pH 8,35) 3% Ethylenglycol (v/v)	Lagerung bei -20°C
Puffer B*	40% PEG 1000 (w/v) 0,2 M Bicin (pH 8,35)	Lagerung bei -20°C
Puffer C*	0,15 M NaCl 10 mM Bicin (pH 8,35)	Lagerung bei -20°C
Carrier-DNA	20 mg DNA type III (Sigma #D1626)	Lagerung bei -20°C

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
	10 mL TE 1 x* über Nacht bei 4°C Rühren 3 x 30 s Ultraschall	

**Tabelle 47: Lösungen und Puffer für die SDS-Gelelektrophorese.**

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
Trenngelpuffer	1,5 M Tris 0,4% (w/v) SDS	pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,4% (w/v) SDS	pH 6,8
10 x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 1% SDS (w/v) 2 M Glycin	
10 x SDS-Ladepuffer	1,25 M Tris 10% (w/v) SDS 50% Glycerol (v/v) 1 Spatelspitze Bromphenolblau 125 µL/mL β-Mercaptoethanol	pH 6,2
Coomassie-Lösung	2 g Coomassie Blue in 250 mL ddH <sub>2</sub> O lösen 75 mL/L Eisessig 500 mL/L technisches EtOH	
Entfärbelösung	100 mL/L Eisessig 200 mL/L technisches EtOH	

**Tabelle 48: Lösungen zur Lyse von *E. coli* und *P. pastoris* zur Untersuchung der Proteinexpression.**

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
Lysepuffer I	50 mM Tris-HCl (pH 8) 150 mM NaCl 0,1% Tween-20 (w/v) 10% Glycerol (v/v) 1 mM MgCl <sub>2</sub>	Zugabe direkt vor der Verwendung: 500 mg/L Lysozym und 20 mg/L DNase I (5 mM TCEP)
Lysepuffer II <sup>[244]</sup>	50 mM Tris-HCl (pH 8) 150 mM NaCl 20% Glycerol (v/v) 0,7% 3-(N,N-Dimethylmyristylammonio)-	Zugabe direkt vor der Verwendung: 500 mg/L Lysozym und 20 mg/L DNase I

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
Lysepuffer III <sup>[206a]</sup>	propansulfat	(5 mM TCEP)
	0,07% C7BzO	
GDH-Puffer <sup>[291]</sup>	100 mM K <sub>x</sub> PO <sub>4</sub>	pH 7,8, Zugabe direkt vor der Verwendung:
	20% Glycerol (v/v)	500 mg/L Lysozym und
	0,1% Tween-20 (w/v)	20 mg/L DNase I
	1 mM MgCl <sub>2</sub>	pH 7,4, Zugabe direkt vor der Verwendung:
	100 mM K <sub>x</sub> PO <sub>4</sub>	500 mg/L Lysozym und
	5% Glycerol (v/v)	20 mg/L DNase I
	5 mM EDTA	

Tabelle 49: Puffer zur Lyse von *S. cerevisiae* zur Untersuchung der Proteinexpression.

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
Glasperlenpuffer* <sup>[289]</sup>	20 mM Tris-HCl (pH 8)	Zugabe direkt vor der
	10 mM MgCl <sub>2</sub>	Verwendung:
	1 mM EDTA	2 mM β-Mercaptoethanol
	5% Glycerol (v/v)	1 mM PMSF
	0,3 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 mM 1,10-Phenanthrolin

Tabelle 50: Puffer zur Proteinaufreinigung über Ni-NTA.<sup>[244]</sup>

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
Waschpuffer	50 mM Tris	pH 7,4
	50 mM NaCl	
	20 mM Imidazol	
Elutionspuffer	50 mM Tris	pH 6,5
	50 mM NaCl	
	400 mM Imidazol	

Tabelle 51: Puffer für die Proteinrückfaltung aus *Inclusion Bodies*.<sup>[244]</sup>

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
Denaturierungspuffer	10 mM Tris	pH 8,5, Lagerung bei 4°C
	10 mM Imidazol	
	6 M Guanidinhydrochlorid	
	5 mM TCEP	
Waschpuffer II	10 mM Tris	pH 7,4, Lagerung bei 4°C
	50 mM NaCl	

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
Elutionspuffer II	20 mM Imidazol	pH 7
	6 M Guanidinhydrochlorid	
	5 mM TCEP	
	10 mM Tris	
	50 mM NaCl	
Rückfaltungspuffer	400 mM Imidazol	pH 8
	6 M Guanidinhydrochlorid	
	5 mM TCEP	
	10 mM Tris	
	50 mM NaCl	
	2 mM DTT	
20% Glycerol (v/v)		
	0,5 M Guanidinhydrochlorid	

**Tabelle 52: Lösungen und Puffer für die Aktivitätsbestimmung von Proteinen.** Ac-CoA: Acetyl-Coenzym A, AcAc-CoA: Acetoacetyl-CoA.

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
GDH-Aktivitätspuffer	100 mM $K_xPO_4$	pH 7,4
	5% Glycerol (v/v)	
	5 mM EDTA	
NADP <sup>+</sup> - Stammlsg.	100 mM NADP <sup>+</sup>	in GDH-Aktivitätspuffer, Lagerung bei -20°C
Glucose - Stammlsg.	220 mM Glucose	in GDH - Aktivitätspuffer
HMGS-Aktivitätspuffer	67 mM Tris	pH 5,5 – 11
	10 mM $MgCl_2$	
AcAc-CoA-Stammlsg.	0,4 mM AcAcCoA	Lagerung bei -80°C
Ac-CoA-Stammlsg.	10 mM AcCoA	Lagerung bei -80°C
DTNB-Stammlsg.	3,9 mM DTNB	in 100 mM Tris (pH 7,2), Lagerung bei 4°C

**Tabelle 53: Lösungen und Puffer für die Biotransformation durch BM3.**

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
BM3-Waschpuffer* <sup>[216]</sup>	100 mM $K_xPO_4$	pH 7,4
	5% Glycerol (v/v)	
BM3-Reaktionspuffer* <sup>[216]</sup>	100 mM $K_xPO_4$	pH 7,4, Zugabe direkt vor der Verwendung:
	5 mM EDTA	
	5% Glycerol (v/v)	50 µg/mL Kanamycin

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
NADP <sup>+</sup> -Stammlsg.	10% D-Glucose (w/v) 100 mM NADP <sup>+</sup>	in BM3-Reaktionspuffer, Lagerung bei -20°C
BSA-Stammlsg.	10 mg/mL BSA (AppliChem)	Lagerung bei -20°C
EMIM-Cl-Stammlsg.	4 M EMIM-Cl (Sigma-Aldrich)	Lagerung bei -20°C
Hydroxypropyl-β-cyclo- dextrinstammlsg. <sup>[220]</sup>	134,5 mg/L Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (AppliChem)	Lagerung bei -20°C
Hydroxypropyl-γ-cyclo- dextrinstammlsg.	222 mg/mL CavaSol® W8 HP Pharma (Wacker Chemie AG)	Lagerung bei -20°C
Valencenstammlsg.	100 mM (+)-Valencen (≥ 70%, Sigma- Aldrich)	in <i>n</i> -Pentan, Lagerung bei -20°C
FCdien-Stammlsg.	100 mM gereinigtes FCdien (Kapitel V9.2)	in <i>n</i> -Pentan, Lagerung bei -20°C

Tabelle 54: Lösungen zur Analyse von Naturstoffen durch Dünnschichtchromatographie.

Bezeichnung	Bestandteil	Anmerkung
Kaliumpermanganatlsg.	20 mL/L 5% NaOH (w/v) 66 g/L K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10 g/L KMnO <sub>4</sub>	lichtgeschützt und kühl aufbewahren

## 4.2 Kommerziell erhältliche Enzyme, Lösungen und Kits

Tabelle 55: Übersicht über die verwendeten Restriktionsendonukleasen.

Name	5'→3'-Erkenn.seq.	Aktivität	Puffer	Quelle
FD <sup>®</sup> <i>AflI</i> ( <i>Eco47I</i> )	G <sup>ν</sup> GWCC	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> <i>AflII</i> ( <i>Bsp7I</i> )	C <sup>ν</sup> TTAAG	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> <i>BamHI</i>	G <sup>ν</sup> GATCC	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> <i>BglII</i>	A <sup>ν</sup> GATCT	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> <i>DpnI</i>	GA <sub>Met</sub> <sup>ν</sup> TC	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> <i>Eco47I</i> ( <i>AflI</i> )	G <sup>ν</sup> GWCC	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> <i>EcoRI</i>	G <sup>ν</sup> AATTC	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> <i>EcoRV</i> ( <i>Eco32I</i> )	GAT <sup>ν</sup> ATC	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> <i>HindIII</i>	A <sup>ν</sup> AGCTT	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> <i>KpnI</i>	GGATC <sup>ν</sup> C	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> <i>NcoI</i>	C <sup>ν</sup> CATGG	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> <i>NotI</i>	GC <sup>ν</sup> GGCCGC	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> <i>PvuII</i>	CAG <sup>ν</sup> CTG	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific

Name	5'→3'-Erkenn.seq.	Aktivität	Puffer	Quelle
FD <sup>®</sup> SacI	G <sup>ν</sup> AGCTC	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> Scal	AGT <sup>ν</sup> ACT	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> XbaI	T <sup>ν</sup> CTAGA	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
FD <sup>®</sup> XhoI	C <sup>ν</sup> TCGAG	1 U/μL	Fast Digest	Thermo Scientific
PaeI (SphI)	GCATG <sup>ν</sup> C	10 U/μL	Puffer B	Thermo Scientific
AvrII	C <sup>ν</sup> CTAGG	5 U/μL	NEB 2/CutSmart	NEB
BspEI (AccIII)	T <sup>ν</sup> CCGGA	10 U/μL	NEB3.1	NEB
BstAPI	GCANNNN <sup>ν</sup> NTGC	5 U/μL	CutSmart	NEB
DpnI	GA <sub>Met</sub> <sup>ν</sup> TC	20 U/μL	NEB 3/4	NEB
EcoRI	G <sup>ν</sup> AATTC	10 U/μL	NEB 2	NEB
FseI	GGCCGG <sup>ν</sup> CC	2 U/μL	NEB 4	NEB
HindIII	A <sup>ν</sup> AGCTT	20 U/μL	NEB 2	NEB
NcoI	C <sup>ν</sup> CATGG	10 U/μL	NEB 2/3/3.1	NEB
NotI	GC <sup>ν</sup> GGCCGC	10 U/μL	NEB 3/3.1	NEB
PciI	A <sup>ν</sup> CATGT	10 U/μL	NEB 3	NEB
SalI	G <sup>ν</sup> TCGAC	20 U/μL	NEB 2	NEB
SphI-HF	GCATG <sup>ν</sup> C	20 U/μL	CutSmart	NEB
SwaI	ATTT <sup>ν</sup> AAAT	10 U/μL	NEB 3.1	NEB

**Tabelle 56: Übersicht über verwendete Enzyme für Klonierungen, PCR und andere Anwendungen.**

Name	Aktivität	Puffer
BP Klonase Mix II (Invitrogen)	-	-
BSA/Albumin Fraktion V (NEB/Carl Roth)	-	verschiedene
DNaseI (Roche)	2 U/μg	verschiedene
ET-SSB (NEB)	500 ng/μL	NEB 2 5x, 1:20 verdünnt
Exonuclease I (Thermo Scientific)	20 U/μL	Restriktionsverdau-Puffer
FastAP (Thermo Scientific)	1 U/μL	Restriktionsverdau-Puffer
LR Klonase Mix II (Invitrogen)	-	-
Lysozym (Carl Roth)	20 U/μg	verschiedene
Phusion Flash High Fidelity Master Mix (Biozym/Thermo Scientific)	2x	-
PhireII Polymerase (Thermo Scientific)	-	5x Phire Reaction Buffer
RecA (Biozym)	5 μg/μL	T4 Ligase Puffer (Thermo Scientific)
RNase A (AppliChem)	70 U/mg	siehe Tabelle 37
T4 Ligase (Thermo Scientific)	5 U/μL	T4 Ligase Puffer
T4 Polymerase (NEB)	3 U/μL	Pol 4 Puffer (Tabelle 42)



Name	Aktivität	Puffer
Taq Polymerase (NEB)	-	Standard Puffer

**Tabelle 57: Übersicht über kommerziell erhältliche Lösungen und Kits.**

Anwendung	Produkt	Quelle
DNA-Detektion	GelRed™ Nucleic acid stain 10.000x in water	Biotrend
DNA-Extraktion aus Lösungen	Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohl	Carl Roth
DNA-Extraktion aus Gelen	PeqGold Gel Extraction Kit	Peqlab
DNA-Fällung	SureClean	Bioline
DNA-Größenstandard	GeneRuler™ 1 kb DNA Plus DNA Ladder	Thermo Scientific
Proteingrößenstandard	PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Thermo Scientific
	Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific
Proteinkonzentrationsbestimmung	Bradford reagent (#R1271)	Fermentas
Mutagenese von DNA	JBS Error-Prone Kit	Jena Bioscience

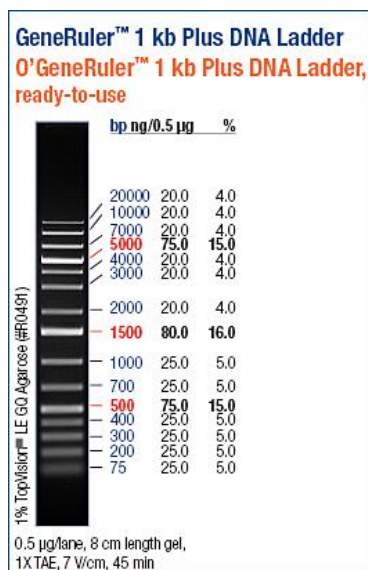
## 5 Molekularbiologische Arbeitstechniken

Für die Präparation von Gelen wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet, für alle anderen molekularbiologischen Arbeiten wurde autoklaviertes und sterilfiltriertes ddH<sub>2</sub>O verwendet.

### 5.1 Analyse von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

Die Zusammensetzungen der Puffer für die Agarosegelelektrophorese sind in Tabelle 38 beschrieben. Zum Nachweis von DNA wurden 0,8%-ige Agarosegele verwendet. Um die Agarose zu lösen wurde sie in TAE 1x Puffer in der Mikrowelle erhitzt bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Pro Gießkammer wurden 50 mL der noch flüssigen, warmen Agaroselösung mit 5 µL „GelRed™ Nucleic acid stain 10.000x in water“ (Tabelle 57) zur späteren Detektion der DNA vermischt. Je nach Probenvolumen und Verwendung wurden Gele mit unterschiedlich großen Taschen erzeugt. Für die Reinigung von DNA durch Agarosegelelektrophorese (Kapitel V5.5.4) wurden beispielsweise Gele mit größeren Taschen benötigt. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine Laufkammer gelegt und mit TAE 1x Puffer bedeckt. Neben 2 µL des Längenstandards „GeneRuler™ 1 kb DNA Plus DNA Ladder“ (Tabelle 57, siehe Abbildung 102) wurden die mit DNA-Ladepuffer 6x gemischten

nachzuweisenden DNA-Fragmente in die Taschen des Gels geladen und für ca. 35 min bei 110 V aufgetrennt.



**Abbildung 102: Verwendeter DNA-Standard „GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder“ der Firma Thermo Scientific für die Größenbestimmung und Quantifizierung von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen.** 100 µL des DNA-Standards (Volumen eines kommerziell erhältlichen Reaktionsgefäßes) wurden vor der Beladung des Gels mit 100 µL DNA-Ladepuffer 6x und 400 µL ddH<sub>2</sub>O vermischt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Im Anschluss erfolgte die Detektion der Interaktion zwischen dem DNA-Doppelstrang und dem UV-aktiven Farbstoff GelRed™ durch Bestrahlung bei 306 nm und die Dokumentation der Gele.

## 5.2 Isolation von DNA

### 5.2.1 Vervielfältigung und Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden die Lösungen I – IV (Tabelle 39) verwendet. Für die Vervielfältigung von Plasmiden wurden Klonierungsstämme wie *E. coli* OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup>, Top10 oder DH5α (Tabelle 17) transformiert (Kapitel V6.1.1). Eine Ausnahme bilden Gateway®-kompatible Plasmide, die eine codierende Sequenz für einen Gyraseinhibitor *ccdB* enthalten. Da die Gyraseaktivität überlebensnotwendig für die Bakterien ist, müssen die Gateway®-kompatiblen Plasmide in *E. coli* DB3.1 (Tabelle 17) propargiert werden, welche eine Resistenz gegenüber dem Gyraseinhibitor aufweisen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in der Regel aus Einzelkolonien in LB- oder 2xTY- Medium (Tabelle 33). Dem Medium waren 1 mM MgCl<sub>2</sub> und die zur Selektion der transformierten *E. coli* benötigten Antibiotika hinzugesetzt (siehe Tabelle 17). Angeimpfte Kulturen wurden entweder bei 30°C über Nacht

oder bei 19°C und 180 rpm (Infors Multitron Standard, 5 cm Auslenkung) über das Wochenende inkubiert.

#### **a) Plasmidisolierung aus Schüttelkolben oder Röhrenkulturen**

Die Kultivierung der *E. coli*-Zellen erfolgte entweder in 2 mL in 13 mL-Röhren (Sarstedt) oder in 25 mL in 250 mL-Erlenmeyerkolben. Anschließend wurden jeweils 1,5 mL dieser Kulturen bei 4°C und 20.000 x g sedimentiert und die Bakterienzellen in 50 µL Lösung I resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte in 100 µL Lösung II durch mehrmaliges Invertieren und kurzer Inkubation (maximal 5 min) bis die Lösung klar wurde. Die Neutralisation der Lösung zur Abtrennung genomischer DNA von gefällten Proteinen und anderen Zellbestandteilen erfolgte durch mehrmaliges Invertieren mit 75 µL Lösung III und 220 µL Lösung IV sowie durch die Zentrifugation bei 16.000 x g und 10 min bei Raumtemperatur. Der klare Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Zentrifugengefäß überführt und die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 900 µL kaltem absoluten Ethanol und Zentrifugation bei 4°C und 20.000 x g für 20 min gefällt. Anschließend wurden Salze durch das Waschen der DNA mit 900 µL 70%-igem Ethanol und Zentrifugation bei 4°C und 20.000 x g für 5 min entfernt. Nach dem Trocknen der Plasmid-DNA für ca. 30 min bei 45°C wurde diese in 50 µL ddH<sub>2</sub>O gelöst. Für die Transformation von Hefe wurden Plasmide in der Regel in hoher Konzentration und besonders hoher Reinheit benötigt. Deswegen wurden für diese Anwendungen mehrere Plasmidisolierungen vereinigt und die Plasmid-DNA über PCI-Extraktion (Kapitel V5.5.1) gereinigt.

#### **b) Plasmidisolierung aus 96-Lochplatten**

Die Plasmidisolierung aus 96-Lochplatten (MegaBlock® 96 Well, 2,2 mL, PP von Sarstedt) erfolgte immer dann, wenn mehr als 40 unterschiedliche Plasmide gleichzeitig isoliert werden sollten. Dies war beispielsweise zur Analyse von DNA-Bibliotheken durch *ep*PCR (Kapitel V5.3.4) notwendig. Die Kultivierung erfolgte jeweils in einem Volumen von 750 µL Medium. Die 96-Lochplatten wurden mit einem selbstklebenden und gasdurchlässigen Film auf Polyurethanbasis (T093.1 von Carl Roth) steril verschlossen und im Duetz-System (Kuhner) bei 30°C und 180 rpm (Infors Multitron Standard, 5 cm Auslenkung) über Nacht kultiviert. Die Zentrifugation erfolgte am nächsten Tag bei 3200 x g für 10 min und 4°C. Nach dem Abgießen des Medienüberstands wurden die Zellen mit Hilfe einer Multi-Pipette in jeweils 25 µL Lösung I resuspendiert und mit 50 µL Lösung II durch mehrmaliges Pipettieren gemischt. Nach 5 min Inkubation wurden 37 µL Lösung III und 110 µL Lösung IV hinzugegeben und durch mehrmaliges Pipettieren durchmischt. Es folgte eine Zentrifugation bei 3200 x g für 40 min. Der klare Überstand wurde mit einer Multi-Pipette in eine saubere 96-Lochplatte überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 600 µL kaltem absoluten Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation bei 3200 x g für 40 min bei 4°C wurde das absolute Ethanol schnell abdekantiert

und die DNA mit 600  $\mu\text{L}$  70%-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min und Entfernen des Überstands wurde die DNA über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und in 25  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 5.2.2 Isolation der Gesamt-DNA aus *S. cerevisiae*

Zum Nachweis erfolgreicher Hefetransformationen wurde die Gesamt-DNA aus *S. cerevisiae* isoliert.<sup>[289]</sup> 10 mL YPD- oder SD-Medium wurden mit einer Hefekolonie angeimpft, bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 2 (dauert in etwa 24 h) bei 30°C und 150 - 180 rpm (Infors Multitron Standard, 5 cm Auslenkung) kultiviert und bei 3000 x g für 2 min sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 500  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, in ein 1,5 mL Zentrifugengefäß überführt und die Zellen durch kurze Zentrifugation erneut sedimentiert. Anschließend wurde in 200  $\mu\text{L}$  DNA-Isolationspuffer (Tabelle 40) resuspendiert und 200  $\mu\text{L}$  P/C/I (Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, Carl Roth) sowie in etwa das gleiche Volumen säuregewaschene Glasperlen mit 0,25 - 0,5 mm Durchmesser (Tabelle 37) hinzugefügt. Nach der mechanischen Lyse der Zellen durch intensives Schütteln (Vortex, Tabelle 16) für 3 min wurden 200  $\mu\text{L}$  TE-Puffer pH 8 (Tabelle 37) hinzugefügt und für 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde unter dem Abzug abgenommen, mit 1 mL Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gewaschen und nach kurzer Zentrifugation die Nukleinsäuren aus der wässrigen Phase mit 1 mL kaltem absolutem Ethanol durch Zentrifugation für 30 min bei 20.000 x g und 4°C gefällt. Zur Beseitigung der RNA wurden die sedimentierten Nukleinsäuren in 400  $\mu\text{L}$  TE-Puffer und 3  $\mu\text{L}$  RNase A-Lösung (Tabelle 37) resuspendiert und für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels Ethanolpräzipitation (Kapitel V5.5.2) gefällt und in 50  $\mu\text{L}$  TE-Puffer aufgenommen.

### 5.3 PCR

Für die Amplifikation oder für die zufällige Mutagenese bestimmter DNA-Abschnitte aus Plasmiden, genomischer DNA oder aus lysierten Zellen fanden unterschiedliche PCR-Protokolle Anwendung. Das jeweilige PCR-Protokoll wurde dabei auf die Polymerase, die unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen der Oligonukleotide, auf notwendige Additive und auf den jeweiligen *Thermocycler* angepasst. Falls nicht anders angegeben wurden die hier beschriebenen PCR-Protokolle alle in dem „Mastercycler ep gradient S“ oder dem „T100™ Thermal Cycler“ (Tabelle 16) durchgeführt. Bei präparativen Ansätzen wurde zur besseren Reproduzierbarkeit die gesamte Reaktion zunächst in einem Reaktionsgefäß als *MasterMix* angesetzt und anschließend auf einzelne PCR-Gefäße aufgeteilt.

### 5.3.1 Amplifikation von *abfs*, einzelnen Domänen der *abfs* und von *bm3*

Da die Phusion® DNA-Polymerase eine extrem hohe Genauigkeit und geringe Fehlerrate bei der Elongation von DNA-Strängen besitzt, wurde sie als „Phusion® High-Fidelity Flash Master Mix“ (Tabelle 56) für die Klonierung von unterschiedlichsten Genen und Genfragmenten verwendet. Die allgemeine Zusammensetzung und das allgemeine Temperaturprofil der PCR-Protokolle zur Amplifikation von *abfs*, einzelner Domänen von *abfs*, sowie von *bm3* sind in Tabelle 58 und Tabelle 59 zu finden. Eine Übersicht über die zu amplifizierenden Fragmente und die verwendeten Template sowie Oligonukleotide sind in Tabelle 60 zu finden.

**Tabelle 58: Allgemeine Zusammensetzung der PCR zur fehlerfreien Klonierung von Genen und Genfragmenten.**

Komponente	Test	8x
Templat-DNA (10 – 100 ng)	1 µL	8 µL
Oligonukleotid_fw (10 µM)	1 µL	8 µL
Oligonukleotid_re (10 µM)	1 µL	8 µL
ddH <sub>2</sub> O	2 µL	16 µL
Phusion® Master Mix 2 x	5 µL	40 µL

**Tabelle 59: Allgemeines Temperaturprofil zur Amplifikation von DNA-Segmenten mittels Phusion® DNA-Polymerase.** Die spezifischen T<sub>A</sub> (Anlagerungstemperaturen) und t<sub>E</sub> (Elongationszeiten) der einzelnen PCR-Protokolle sind Tabelle 60 zu entnehmen.

T	98°C	98°C	T <sub>A</sub> °C	72°C	98°C	T <sub>A</sub> °C	72°C	72°C	4°C
Dauer	3 min	5 s	10 s	t <sub>E</sub> s/kb	5 s	10 s	t <sub>E</sub> s/kb	7 min	∞
Cyclen	1	5			25			1	1

**Tabelle 60: Übersicht über die spezifischen Anlagerungstemperaturen und Elongationszeiten für die fehlerfreie Amplifikation von Gensegmenten via Phusion® DNA-Polymerase.** Oligos: Oligonukleotide, T<sub>Aspez.</sub>: Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide in den ersten fünf Cyclen der PCR, T<sub>Ag.</sub>: Anlagerungstemperatur in den letzten 25 Cyclen der PCR, t<sub>E</sub>: Elongationszeit, #: Einstellung eines Temperaturgradienten von 48 – 58°C lieferte PCR-Produkte über alle Temperaturen hinweg, wohingegen die PCR bei einer T<sub>Aspez.</sub> (ohne Temperaturgradient) kein PCR-Produkt lieferte.

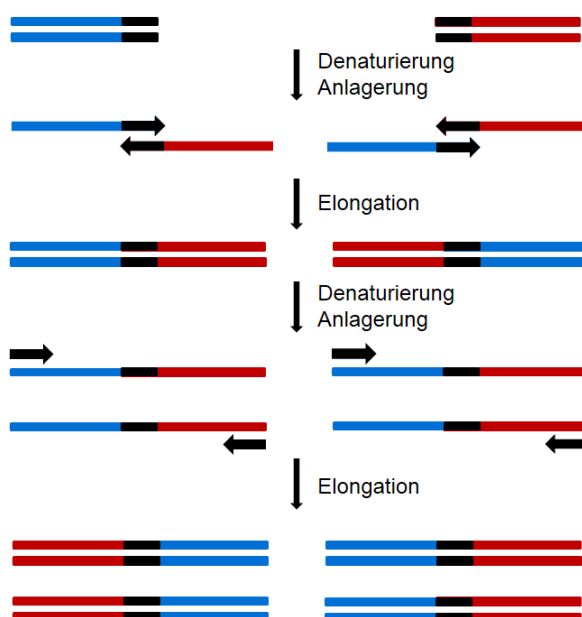
Fragment	Größe	Templat	Zielvektor	Oligos	T <sub>Aspez./ges.</sub>	t <sub>E</sub>
<i>abfs</i>	2091 bp	pUC18- <i>abfs</i>	pBADM30	839/840	53°C/65°C	90 s
		pUC18- <i>abfs</i>	pET27mod	839/841	53°C/65°C	90 s
		pUC18- <i>abfs</i>	pETM11	839/840	53°C/65°C	90 s
		pETM11- <i>abfs</i>	pUC19I	1115/1116	50°C/63°C	60 s
		pUC18- <i>abfs</i>	pGAPZA	1175/1176	52°C/66°C	90 s
		pUC18- <i>abfs</i>	pGAPZαA	1177/1178	52°C/66°C	90 s
		pET27mod- <i>abfs</i>	pPinkHC	1310/1311	51°C/64°C	45 s

Fragment	Größe	Templat	Zielvektor	Oligos	T <sub>Aspez./ges.</sub>	t <sub>E</sub>
		pET27mod- <i>abfs</i>	pPinkHCb	1314/1311	51°C/64°C	45 s
<i>abfsS.c.</i>	2091 bp	pEX-K- <i>abfsS.c.</i>	pDONR221	1039/1040	50°C/66°C	90 s
<i>fcyc</i>	993 bp	pETM11- <i>abfs</i>	pETM11	1166/1167	50°C/70°C	45 s
		pET27mod- <i>abfs</i>	pVV214	1345/1346	52°C#/71°C	45 s
<i>fcyc1</i>	1170 bp	pUC18- <i>abfs</i>	pBADM11	1166/1218	50°C/69°C	45 s
		pUC18- <i>abfs</i>	pETM11	1166/1218	50°C/69°C	45 s
		pET27mod- <i>abfs</i>	pVV214	1345/1347	52°C/71°C	45 s
<i>fcyc2</i>	1197 bp	pUC18- <i>abfs</i>	pBADM11	1166/1219	50°C/69°C	45 s
		pUC18- <i>abfs</i>	pETM11	1166/1219	50°C/69°C	45 s
		pET27mod- <i>abfs</i>	pVV214	1345/1348	52°C#/71°C	45 s
<i>ggpps</i>	1107 bp	pETM11- <i>abfs</i>	pETM11	1173/1174	50°C/70°C	45 s
		pET27mod- <i>abfs</i>	pVV214	1349/1352	52°C#/71°C	45 s
<i>ggpps1</i>	912 bp	pUC18- <i>abfs</i>	pBADM11	1220/1174	50°C/69°C	45 s
		pUC18- <i>abfs</i>	pETM11	1220/1174	50°C/69°C	45 s
		pET27mod- <i>abfs</i>	pVV214	1350/1352	52°C#/71°C	45 s
<i>ggpps2</i>	867 bp	pUC18- <i>abfs</i>	pBADM11	1221/1174	50°C/69°C	45 s
		pUC18- <i>abfs</i>	pETM11	1221/1174	50°C/69°C	45 s
		pET27mod- <i>abfs</i>	pVV214	1351/1352	52°C#/71°C	45 s
<i>bm3</i>	3150 bp	pEX42- <i>bm3</i>	pETM11	781/813	55°C/72°C	90 s
<i>bm3-F87A</i>	3150 bp	pEX42-F87A	pET27mod	832/836	55°C/69°C	90 s

### 5.3.2 Amplifikation einzelner Gensegmente und oePCR zur Erzeugung der pVV214duett-Konstrukte

Für die Klonierung der pVV214duett-Vektoren mussten einzelne Fragmente über oePCR (Abbildung 103) miteinander verknüpft werden, um die Anzahl der Fragmente bei der späteren Klonierung (Kapitel V5.7.2) einzuschränken.

Die oePCR ist eine Methode zur Erzeugung eines längeren DNA-Fragments aus mehreren kurzen DNA-Fragmenten. Dabei müssen die kürzeren Fragmente zueinander komplementäre Bereiche aufweisen, um eine Teilhybridisierung dieser Bereiche zu ermöglichen. Die freien 3'-OH-Gruppen dieser Fragmente werden dann während der PCR als Startpunkt für die Elongation durch die DNA-Polymerase genutzt. Befinden sich in der Reaktionsmischung außerdem Oligonukleotide die an die beiden Enden des zu erzeugenden großen DNA-Fragments hybridisieren, wird das oePCR-Produkt wie in einer konventionellen PCR exponentiell amplifiziert.



**Abbildung 103: Schematische Darstellung einer oePCR zur Erzeugung von einem großen DNA-Fragment aus zwei kleinen.**

Für die Erzeugung der pVV214duett-Konstrukte wurden zunächst einzelne Genfragmente mit der Phusion® DNA Polymerase nach Tabelle 58 und Tabelle 59 amplifiziert. Die zu amplifizierenden Fragmente, die verwendeten Template und Oligonukleotide, sowie die eingesetzten Anlagerungstemperaturen und Elongationszeiten, sind in Tabelle 61 zusammengefasst.

**Tabelle 61: Übersicht über die spezifischen Anlagerungstemperaturen und Elongationszeiten für die Amplifikation einzelner Gensegmente für die Erzeugung der pVV214duett-Vektoren.** Definitionen der Abkürzungen und Symbole: siehe Tabelle 60.

Fragment	Größe	Templat	Zielvektor	Oligos	T <sub>Aspez./ges.</sub>	t <sub>E</sub>
<i>fcyc</i>	993 bp	pETM11- <i>abfs</i>	pVV214duett	1187/1188	52°C	45 s
<i>fcyc1</i>	286 bp	pETM11- <i>abfs</i>	pVV214duett1	1273/1274	53°C/68°C	45 s
<i>fcyc2</i>	313 bp	pETM11- <i>abfs</i>	pVV214duett2	1273/1275	53°C/68°C	45 s
<i>pgk</i>	316 bp	pVV214	pVV214duett	1185/1186	50°C/63°C	9 s
<i>pgk1</i>	316 bp	pVV214- <i>abfs</i>	pVV214duett1	1276/1277	53°C/68°C	9 s
<i>pgk2</i>	316 bp	pVV214- <i>abfs</i>	pVV214duett2	1278/1279	53°C/68°C	9 s
<i>ggpps</i>	1107 bp	pUC18- <i>abfs</i>	pVV214duett	1189/1190	52°C	45 s
<i>ggpps1</i>	912 bp	pVV214- <i>abfs</i>	pVV214duett1	1280/1282	53°C#/68°C	45 s
<i>ggpps2</i>	867 bp	pVV214- <i>abfs</i>	pVV214duett2	1281/1282	53°C#/68°C	45 s

Für die oePCR dieser Fragmente wurden jeweils gelgereinigte (Kapitel V5.5.4) PCR-Produkte verwendet.

Für die Klonierung von pVV214duett:*fcyc-ggpps* wurde das *fcyc*-Fragment mit der Promotersequenz *pgk* aus Tabelle 61 über oePCR nach Tabelle 62 zusammengesetzt. Das Temperaturprofil entspricht Tabelle 59, wobei Anlagerungstemperaturen von 50°C in den ersten fünf Cyclen, 54°C in den letzten 25 Cyclen und eine Elongationszeit von 45 s verwendet wurden.

**Tabelle 62: Zusammensetzung für die oe-PCR von *fcyc* mit *pmk* für die Konstruktion von pVV214duett:*fcyc-ggpps*.**

Komponente	Test	8x
<i>fcyc</i> (1:10)	1 µL	8 µL
<i>pmk</i> (1:10)	1 µL	8 µL
1187 (10 µM)	1 µL	8 µL
1186 (10 µM)	1 µL	8 µL
ddH <sub>2</sub> O	1 µL	8 µL
Phusion® Master Mix 2 x	5 µL	40 µL

Auch für die Klonierungen von pVV214duett:*fcyc1-ggpps1* und pVV214duett:*fcyc2-ggpps2* wurden zunächst die *fcyc1*- bzw. *fcyc2*-Amplifikate mit den jeweiligen Promotersequenzen *pgk1* und *pgk2* aus Tabelle 61 über oePCR nach Tabelle 63 zusammengefügt.<sup>[190]</sup> Das Temperaturprofil entspricht Tabelle 59, wobei Anlagerungstemperaturen von 53°C in den ersten fünf Cyclen, 68°C in den letzten 25 Cyclen und eine Elongationszeit von 45 s verwendet wurden.

**Tabelle 63: Zusammensetzungen für die oePCR von *fcyc1* bzw. *fcyc2* mit *pgk1* bzw. *pgk2* für die Konstruktion von pVV214duett:*fcyc1-ggpps1* bzw. pVV214:*fcyc2-ggpps2*.<sup>[190]</sup>**

pVV214duett: <i>fcyc1-ggpps1</i>	pVV214duett: <i>fcyc2-ggpps2</i>	Test	Präparativ
<i>fcyc1</i> (10 ng)	<i>fcyc2</i> (10 ng)	1 µL	8 µL
<i>pgk1</i> (10 ng)	<i>pgk2</i> (10 ng)	1 µL	8 µL
1273 (10 µM)	1273 (10 µM)	1 µL	8 µL
1277 (10 µM)	1279 (10 µM)	1 µL	8 µL
ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O	1 µL	8 µL
Phusion® Master Mix 2x	Phusion® Master Mix 2x	5 µL	40 µL

Anschließend wurde das oePCR-Produkt *fcyc1-pgk1* bzw. *fcyc2-pgk2* aus Tabelle 63 mit den *ggpps1*- bzw. *ggpps2*-Fragmenten aus Tabelle 61 wiederum über oePCR nach Tabelle 64 zusammengesetzt.<sup>[190]</sup> Es fand erneut das Temperaturprofil aus Tabelle 59 Anwendung, wobei eine Anlagerungstemperatur von 69°C und eine Elongationszeit von 45 s verwendet wurden.



**Tabelle 64: Zusammensetzung für die oePCR von *fcyc1-pgk1* bzw. *fcyc2-pgk2* mit *ggpps1* bzw. *ggpps2* für die Konstruktion von pVV214duett:*fcyc1-ggpps1* bzw. pVV214:*fcyc2-ggpps2*.<sup>[190]</sup>**

pVV214duett: <i>fcyc1-ggpps1</i>	pVV214duett: <i>fcyc2-ggpps2</i>	Test	Präparativ
<i>fcyc1-pgk1</i> (10 ng)	<i>fcyc2-pgk2</i> (10 ng)	1 µL	8 µL
<i>ggpps1</i> (10 ng)	<i>ggpps2</i> (10 ng)	1 µL	8 µL
1273 (10 µM)	1273 (10 µM)	1 µL	8 µL
1282 (10 µM)	1282 (10 µM)	1 µL	8 µL
ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O	1 µL	8 µL
Phusion® Master Mix 2x	Phusion® Master Mix 2 x	5 µL	40 µL

### 5.3.3 Amplifikation einzelner Gensegmente und oePCR zur Erzeugung der β-Galactosidase-Reporterkonstrukte

Für die visuelle Durchmusterung von Proteinbibliotheken nach Enzymen oder Enzymdomänen mit erhöhter Löslichkeit wurden verschiedene Reporterkonstrukte hergestellt.<sup>[177,188]</sup> Die einzelnen Genfragmente wurden analog zu Tabelle 58 und Tabelle 59 mit der Phusion® DNA Polymerase amplifiziert. Eine Übersicht über die amplifizierten Fragmente, die verwendeten Template und Oligonukleotide sowie die eingesetzten Anlagerungstemperaturen und Elongationszeiten sind in Tabelle 65 dargestellt.

**Tabelle 65: Übersicht über die spezifischen Anlagerungstemperaturen und Elongationszeiten für die Amplifikation einzelner Fragmente für die Erzeugung der Plasmide pBADM11-*lacZα*, pJAMM1, pJAMM1b pJAAK1a, pJAep\*, pJAepb\* und pJAAKep\*.** \*: Plasmid codiert für verschiedene, durch epPCR erzeugte Mutanten des insertierten Gens, Definitionen der Abkürzungen: siehe Tabelle 60.

Fragment	Größe	Templat	Zielvektor	Oligos	T <sub>Aspez./ges.</sub>	t <sub>E</sub>
<i>lacZα</i>	237 bp	pUC18	pBADM11	873/874	57°C/65°C	5 s
pBAD	3971 bp	pBADM11	pJAMM1/1b	867/868	53°C/65°C	120 s
<i>abfs-linker</i>	2091 bp	pETM11- <i>abfs</i>	pJAMM1	869/870	50°C/65°C	70 s
<i>abfs-linkerb</i>	2091 bp	pETM11- <i>abfs</i>	pJAMM1b	869/1093	53°C/65°C	70 s
<i>linker-lacZα</i>	285 bp	pUC18	pJAMM1	875/876	51°C/73°C	10 s
<i>linkerb-lacZα</i>	267 bp	pUC18	pJAMM1b	1094/872	53°C/65°C	10 s
pJAMM	4253 bp	pJAMM1	pJAep*	882/868	53°C/65°C	120 s
pJAMMb	4235 bp	pJAMM1b	pJAAK1a	1114/868	53°C/65°C	120 s
<i>fcyc</i>	993 bp	pETM11- <i>abfs</i>	pJAAK1a	869/1266	53°C/65°C	25 s

Für die Konstruktion von pJAMM1b wurden die Fragmente *abfs-linkerb* und *linkerb-lacZα* vor der Klonierung mittels oePCR (siehe Kapitel V5.3.2) nach Tabelle 66 zusammengefügt. Das Fragment *linkerb-lacZα* diente dabei als *Megaprimer*. Das Temperaturprofil entsprach Tabelle

59, wobei Anlagerungstemperaturen von 53°C (in den ersten fünf Cyclen) und 65°C (in den letzten 25 Cyclen) sowie Elongationszeiten von 70 s verwendet wurden.

**Tabelle 66: Zusammensetzung für die oePCR von *abfs-linkerb* mit *linkerb-lacZα* für die Konstruktion von pJAMM1b.**

Komponente	Test	8x
A2b (1:10)	1 µL	8 µL
A3b (1:10)	1 µL	8 µL
869 (10 µM)	1 µL	8 µL
ddH <sub>2</sub> O	2 µL	16 µL
Phusion® Master Mix 2 x	5 µL	40 µL

#### 5.3.4 epPCR zur zufälligen Mutagenese von *abfs* und *fcyc*

In den Versuchen zur zufälligen Mutagenese von *abfs* oder *fcyc* fand die *Taq* DNA-Polymerase von NEB mit einer natürlichen Fehlerrate von  $10^{-4}$  -  $10^{-6}$  Verwendung. Die Reaktionskomponenten wurden nach dem Protokoll von Cirino *et al.* zusammengemischt.<sup>[183]</sup> Dadurch konnte die Mn<sup>2+</sup>-Konzentration in den Reaktionen variiert werden. Die Zusammensetzung und das Temperaturprofil zu diesen Versuchen sind in Tabelle 67 und Tabelle 68 dargestellt. Außerdem ist eine Übersicht über die amplifizierten Fragmente, die verwendeten Oligonukleotide sowie die eingesetzten Anlagerungstemperaturen und Elongationszeiten in Tabelle 69 dargestellt.

**Tabelle 67: Zusammensetzungen der epPCRs von *abfs* und *fcyc*.**

Komponente	Test	6x
pETM11- <i>abfs</i> (1 ng/µL)	1 µL	6 µL
Oligonukleotid_fw (10 µM)	0,3 µL	1,2 µL
Oligonukleotid_re (10 µM)	0,3 µL	1,2 µL
10 x Standard Buffer (NEB)	1 µL	6 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM, Sigma)	1,5 µL	9 µL
dNTP epMix 5,5 x	1,8 µL	10,8 µL
ddH <sub>2</sub> O	auf 10 µL	-
Taq Polymerase	0,1 µL	0,6 µL
MnCl <sub>2</sub> (1 - 10 mM)	0 – 0,5 mM	-

**Tabelle 68: Temperaturprofil der epPCRs.**

<b>T</b>	95°C	95°C	T <sub>A</sub> °C	72°C	95°C	T <sub>A</sub> °C	72°C	72°C	4°C
<b>Dauer</b>	30 s	30 s	30 s	t <sub>E</sub> s	30 s	30 s	t <sub>E</sub> s	5 min	∞
<b>Cyclen</b>	1	5			30			1	1

**Tabelle 69: Übersicht über die spezifischen Anlagerungstemperaturen und Elongationszeiten für die epPCRs von *abfs* und *fcyc*.**<sup>[188-189]</sup> Definitionen der Abkürzungen und Symbole: siehe Tabelle 60 und Tabelle 65.

Fragment	Größe	Zielvektor	Oligos	T <sub>Aspez./ges.</sub>	t <sub>E</sub>
<i>abfs</i>	2091 bp	pJAep*	869/870	50°C/62°C	120 s
<i>fcyc</i>	993 bp	pJAAK*/pJAHE*	869/1266	53°C/65°C	120 s

### 5.3.5 Amplifikation der MVA-Gene<sup>[244]</sup>

Für die Klonierung aller MVA-Gene aus *S. solfataricus* konnte durch das geeignete Design der Primer ein gemeinsames Temperaturprofil nach Tabelle 70 genutzt werden.<sup>[244]</sup> Die Zusammensetzungen der PCRs entsprachen Tabelle 58. Als Templat wurden die für die jeweiligen Gene codierenden pPOPIN-His-SUMO-Plasmide der DPF (Tabelle 24) verwendet.<sup>[243]</sup> Eine Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide und die jeweiligen Zielvektoren sind in Tabelle 71 zu finden.

**Tabelle 70: Gemeinsames Temperaturprofil zur Amplifikation der MVA-Gene zur enzymatischen Totalsynthese von Terpenen mittels Phusion® DNA-Polymerase.**<sup>[244]</sup>

<b>T</b>	99°C	99°C	50°C	72°C	98°C	68°C	72°C	72°C	4°C
<b>Dauer</b>	3 min	5 s	10 s	15 s	5 s	10 s	15 s	7 min	∞
<b>Cyclen</b>	1	5			25			1	1

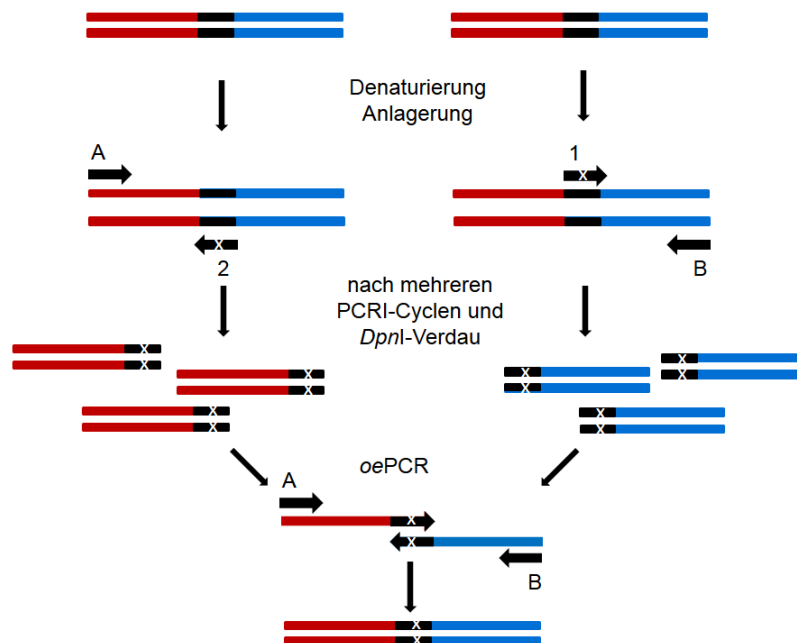
**Tabelle 71: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide für die Amplifikation MVA-Gene.**<sup>[244]</sup>

Gen	Größe	Zielvektor	Oligonukleotide
<i>aact</i>	1080 bp	pBADM11 pET27mod pETM11	1063/1064
<i>hmgs</i>	1053 bp	pET27mod pETM11	1065/1066
<i>hmgr</i>	1230 bp	pBADM11 pET27mod pETM11	1067/1068
<i>mvk</i>	945 bp	pBADM11	1069/1070

Gen	Größe	Zielvektor	Oligonukleotide
		pET27mod pETM11	
<i>pmk</i>	972 bp	pBADM11 pET27mod pETM11	1071/1072
<i>mdc</i>	978 bp	pBADM11 pET27mod pETM11	1073/1074
<i>idi2</i>	1107 bp	pBADM11 pET27mod pETM11	1075/1076 1079/1080 1081/1082

### 5.3.6 oePCR zur zielgerichteten Mutagenese der AT6-Domäne aus DEBS

Die oePCR (Kapitel V5.3.2) kann auch zur zielgerichteten Mutagenese von Genen verwendet werden (siehe Abbildung 104).



**Abbildung 104: Schematische Darstellung der PCRI und der oePCR zur zielgerichteten Mutation von Genen.** x: eingeführte Mutation.

Dabei finden zwei verschiedene Oligonukleotidpaare Verwendung. Oligonukleotide A und B hybridisieren jeweils in separaten PCRI-Reaktionen an unterschiedliche Enden des Gens. Die miteinander komplementären Oligonukleotide 1 und 2 hybridisieren jeweils in den separaten PCRI-Reaktionen an die Stelle im Gen, an der die Mutation eingeführt werden soll. Das Gen wird dadurch in den beiden PCRI-Reaktionen als separate Teilfragmente amplifiziert. Durch

ein geeignetes Design der Oligonukleotide 1 und 2 wird die Mutation an eines der Enden beider Teilstücke eingeführt. Dabei ist die Mutation auf beiden Seiten von 10 – 15 nt umgeben, die komplementär zum Gen sind. In der eigentlichen oePCR werden schließlich die beiden Teilfragmente miteinander vermischt. Dabei können die beiden komplementären Bereiche der Teilstücke im Anlagerungsschritt der PCR überlappen. Durch die Verwendung der Oligonukleotide A und B wird das Gen wieder zusammengefügt, welches nun an gewünschter Stelle eine Mutation trägt.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Protokolle zur Amplifikation und Mutagenese (Tabelle 72 - Tabelle 76) der *at6*-Domäne orientierten sich an den, im Rahmen der Dissertation von Uschi Sundermann, etablierten Protokollen.<sup>[258f]</sup> Die Versuche zur zielgerichteten Mutagenese der AT6-Domäne aus DEBS wurden in dem „Piko™ Thermal Cycler“ (Tabelle 16) durchgeführt. Dieser weist höhere Heiz- und Kühlraten als die konventionellen Thermocycler auf, so dass die entsprechenden PCR-Protokolle wesentlich kürzer sind. Außerdem hat sich gezeigt, dass die Qualität und Quantität der Amplifikation von großen GC-reichen DNA-Fragmenten im „Piko™ Thermal Cycler“ besser sind.<sup>[258f]</sup> In diesen Experimenten wurde ebenfalls die hochpräzise Phusion® DNA-Polymerase eingesetzt.

**Tabelle 72: Allgemeine Zusammensetzung der PCRI zur gezielten Einführung von Mutationen in das Gen der AT6-Domäne von DEBS.**<sup>[258f]</sup> Eine Übersicht über die erzeugten PCR-Produkte und verwendeten DNA-Template sowie die verwendeten Oligonukleotide ist in Tabelle 74 zu finden.

Komponente	Volumen
DNA-Templat, mit <i>EcoRV</i> linearisiert	1 µL
Oligonukleotid_fw (10 µM)	1 µL
Oligonukleotid_re (10 µM)	1 µL
Betain (5M)	2 µL
Phusion® Master Mix 2 x	5 µL

**Tabelle 73: Temperaturprofil für PCRI zur gezielten Einführung von Mutationen in das Gen der AT6-Domäne von DEBS.**<sup>[258f]</sup>

<b>T</b>	99°C	99°C	70°C	72°C	99°C	72°C	72°C	4°C
<b>Dauer</b>	3 min	15 s	1 s	30 s	15 s	30 s	1 min	∞
<b>Cyclen</b>	1	5			20		1	1

**Tabelle 74: Übersicht über die erzeugten PCR-Produkte, die verwendeten DNA-Template und verwendeten Oligonukleotide in PCRI.** W: Varianten, die keine zusätzliche Mutation im katalytischen Zentrum der AT6 aufweisen, M: Varianten, die zusätzlich die V295A-Mutation codieren.

Mutationen	PCR-Produkt	Templat	Oligos
(V295A), K291E	W6 A	pKSSU89	206/1284
	W6 B		207/1283
	M6 A	pKSSU656	206/1288
	M6 B		207/1287
(V295A), R399E	W7 A/M7 A	pKSSU89/656	206/1286
	W7 B/M7 B		207/1285
(V295A), K291E, R399E	W8 A/M8 A	pJA-W6/M6	206/1286
	W8 B/M8 B		207/1285
(V295A), K291E, A383L	W9 A/M9 A	pJA-W6/M6	206/1288
	W9 B/ M9 B		207/1287
(V295A), K291E, A383V	W10 A/M10 A	pJA-W6/M6	206/1290
	W10 B/M10 B		207/1289
(V295A), K291D	W11 A	pKSSU89	206/1292
	W11 B	pKSSU89	207/1291
	M11 A	pKSSU656	206/1296
	M11 B	pKSSU656	207/1295
(V295A), R399D	W12 A/M12 A	pKSSU89/565	206/1294
	W12 B/M12 B	pKSSU89/565	207/1293
(V295A), K291D, R399D	W13 A/M13 A	pJA-W11/M11	206/1294
	W13 B/M13 B		207/1293
(V295A), K291D, A383L	W14 A/M14 A	pJA-W11/M11	206/1088
	W14 B/M14 B		207/1087
(V295A), K291D, A383V	W15 A/M15 A	pJA-W11/M11	206/1090
	W15 B/M15 B		207/1089
(V295A), R399E, A383L	W16 A/M16 A	pJA-W7/M7	206/1088
	W16 B/M16 B		207/1087
(V295A), R399E, A383V	W17 A/M17 A	pJA-W7/M7	206/1090
	W17 B/M17 B		207/1089
(V295A), K291E, A383L, R399E	W18 A	pJA-W16	206/1284
	W18 B		207/1283
	M18 A	pJA-M8	206/1088
	M18 B		207/1087
(V295A), K291E, A383V, R399E	W19 A	pJA-W17	206/1284
	W19 B		207/1283

Mutationen	PCR-Produkt	Templat	Oligos
	M19 A M19 B	pJA-M8	206/1090 207/1089
(V295A), R399D, A383L	W20 A/M20 A W20 B/M20 B	pJA-W12/M12	206/1088 207/1087
(V295A), R399D, A383V	W21 A/M21 A W21 B/M21 B	pJA-W12/M12	206/1090 207/1089
(V295A), K291D, A383L, R399D	W22 A W22 B M22 A M22 B	pJA-W20  pJA-M13	206/1292 207/1291 206/1088 207/1087
(V295A), K291D, A383V, R399D	W23 A W23 B M23 A M23 B	pJA-W21  pJA-M13	206/1292 207/1291 206/1090 207/1089
(V295A), K291E, R399D	W24 A/M24 A W24 B/M24 B	pJA-W6/M6	206/1294 207/1293
(V295A), K291D, R399E	W25 A/M25 A W25 B/M25 B	pJA-W11/M11	206/1286 207/1285
(V295A), K291E, A383L, R399D	W26 A W26 B M26 A M26 B	pJA-W20  pJA-M24	206/1284 207/1283 206/1088 207/1087
(V295A), K291E, A383V, R399D	W27 A W27 B M27 A M27 B	pJA-W21  pJA-M24	206/1284 207/1283 206/1090 207/1089
(V295A), K291D, A383L, R399E	W28 A W28 B M28 A M28 B	pJA-W16  pJA-M25	206/1292 207/1291 206/1088 207/1087
(V295A), K291D, A383V, R399E	W29 A W29 B M26 A M26 B	pJA-W17  pJA-M25	206/1292 207/1291 206/1090 207/1089

Anschließend wurden die in PCRI erzeugten Fragmente mit *DpnI* verdaut (Tabelle 83), mit SureClean gefällt (Kapitel V5.5.3) und die teilweise miteinander überlappenden Fragmente in einer oePCR nach Tabelle 75 und Tabelle 76 umgesetzt.

**Tabelle 75: Allgemeine Zusammensetzung der oePCR zum Zusammenfügen der beiden in PCRI erzeugten mutierten Genabschnitte (siehe Tabelle 72 und Tabelle 73).<sup>[258f]</sup>**

Komponente	Volumen
PCRI-Produkt A	2,5 µL
PCRI-Produkt B	2,5 µL
206 (10 µM)	5 µL
207 (10 µM)	5 µL
Betain (5M)	10 µL
Phusion® Master Mix 2x	25 µL

**Tabelle 76: Temperaturprofil für die oePCR.<sup>[258f]</sup>**

T	99°C	99°C	72°C	72°C	4°C
Dauer	3 min	15 s	40 s	1 min	∞
Cyclen	1	25		1	1

### 5.3.7 Kolonie-PCR

#### a) Analyse von *E. coli*-Kolonien

Die Kolonie-PCR wurde zur ersten Verifikation der neu erstellten Konstrukte für die zielgerichtete Mutagenese der AT6-Domäne aus DEBS verwendet. In der Regel wurden vier bis acht Klone pro eingeführter Mutation getestet. Einzelne Kolonien wurden leicht mit einer Pipettenspitze angetippt und in jeweils 6 µL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde für 10 min bei 98°C im Thermocycler erhitzt und anschließend 1 µL der aufgekochten Lösung für die eigentliche PCR verwendet. Die Kolonie-PCR wurde mit der „Phire Hot Start Polymerase II“ (Tabelle 56) im „Piko™ Thermal Cycler“ (Tabelle 16) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Reaktion und das Temperaturprofil sind in Tabelle 77 und Tabelle 78 dargestellt.

**Tabelle 77: Zusammensetzung der Kolonie-PCR zur Überprüfung erstellter DEBS-Konstrukte.<sup>[258f]</sup>**

Komponente	Volumen
DNA-Lösung	1 µL
231 (10 µM)	1 µL
452 (10 µM)	1 µL



Komponente	Volumen
5x Phire buffer	2 $\mu$ L
dNTPs (10 mM, Bioline)	0,2 $\mu$ L
Betain (5 M)	2 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	2,6 $\mu$ L
Phire Hot Start Polymerase II	0,2 $\mu$ L

**Tabelle 78: Temperaturprofil der Kolonie-PCR der DEBS-Konstrukte.**<sup>[258f]</sup>

T	99°C	99°C	72°C	72°C	4°C
Dauer	3 min	15 s	55 s	1 min	$\infty$
Cyclen	1	25		1	1

### b) Analyse von PichiaPink™-Kolonien

Um zu überprüfen, ob die weißen PichiaPink™-Kolonien auch tatsächlich das gewünschte Gen *abfs* enthielten, wurden einzelne Kolonien nach einem Protokoll von Invitrogen lysiert und über PCR analysiert.<sup>[283]</sup>

Es wurden jeweils 75  $\mu$ L TE-Puffer (Tabelle 37) in 1,5 mL Zentrifugengefäße vorgelegt und etwas von einer Kolonie darin gelöst. Die Lösungen wurden für 210 s, 120 s, 90 s, 60 s und 30 s in der Mikrowelle bei höchster Leistung erhitzt und zwischendurch kräftig durchmischt (Vortex, Tabelle 16). Im Anschluss wurden die Lösungen über Nacht eingefroren (-80°C) und am nächsten Tag für 2 min bei 95°C im Heizblock erhitzt (Tabelle 16). Nach Zentrifugation für 15 min bei 2000 x g wurden 5  $\mu$ L der so behandelten Lösung nach Tabelle 79 und Tabelle 80 in der PCR eingesetzt. Für die PCR wurde die Phusion® DNA-Polymerase eingesetzt.

**Tabelle 79: Zusammensetzung für die PCR zur Überprüfung der PichiaPink™-Kolonien auf Vorhandensein des Gens *abfs*.**

Komponente	Volumen
DNA-Lösung	5 $\mu$ L
abfs2_fw (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
abfs2_re (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	3 $\mu$ L
Phusion® Master Mix 2 x	10 $\mu$ L

**Tabelle 80: Temperaturprofil für die PichiaPink™ Kolonie-PCR.**

<b>T</b>	98°C	98°C	62°C	72°C	72°C	4°C
<b>Dauer</b>	3 min	5 s	10 s	45 s	7 min	∞
<b>Cyclen</b>	1	30			1	1

## 5.4 Restriktionsverdau von DNA

Eine Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen mit ihren spezifischen Erkennungssequenzen ist in Tabelle 55 dargestellt.

### 5.4.1 Präparativer Verdau von DNA für Klonierungen

Um Plasmid-DNA oder PCR-Produkte für Klonierungen via Ligation mit spezifischen Überhängen zu versehen oder die Plasmid-DNA für Klonierungen via SLIC-MIX zu linearisieren, wurde ein präparativer Restriktionsverdau mit zwei unterschiedlichen konventionellen Enzymen von NEB im 100 µL-Maßstab durchgeführt. Der Vorteil dieser Enzyme gegenüber den FastDigest-Enzymen von Thermo Scientific liegt in der enormen Kosteneffizienz. Die Kompatibilität zweier NEB-Enzyme und die Auswahl des Puffers, lassen sich durch das Internet-Tool „Double Digest Finder“ von NEB nachvollziehen. Im Rahmen dieser Arbeit fanden unterschiedliche Puffer von NEB Anwendung. Zum einen waren das die Puffer NEB 2, 3 und 4, sowie Puffer der neueren optimierten Pufferserie NEB 3.1 und CutSmart™. Bei Verwendung der alten Pufferserie war zum Teil die Addition von BSA zur optimalen Aktivität der Restriktionsenzyme notwendig. Um eine Religation bei der Klonierung zu vermeiden, wurde bei dem Verdau von Plasmiden parallel mit einer alkalischen Phosphatase (FastAP, Tabelle 56) verdaut. Dieses Enzym entfernt Phosphatreste von den 5'- und 3'-Enden der DNA. PCR-Produkte wurden immer dann zusätzlich mit Exonuklease I (Tabelle 56) und *Dpnl* verdaut, wenn sie nicht gelgereinigt wurden (Kapitel V5.5.4). Die Exonuklease I verdaut einzelsträngige DNA und wurde zum entfernen überschüssiger Oligonukleotide hinzugefügt. *Dpnl* wurde zum Abbau methylierter, parentaler Templat-DNA hinzugefügt. Die allgemeinen Zusammensetzungen eines präparativen Verdau von Plasmid-DNA sind in Tabelle 81 und eines präparativen Verdau von PCR-Produkten in Tabelle 82 und Tabelle 83 dargestellt.

**Tabelle 81: Zusammensetzung eines präparativen Verdau von Plasmid-DNA für Klonierungen.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Plasmid	30 – 50 µL
Puffer 10 x (NEB)	10 µL
BSA 100 x (NEB, optional)	1 µL

Komponente	Volumen
ddH <sub>2</sub> O	auf 10 µL
FastAP (Thermo Scientific)	2 µL
Enzym 1	4 µL
Enzym 2	4 µL
37°C/2 h	

**Tabelle 82: Zusammensetzung eines präparativen Verdau von PCR-Produkten für Klonierungen mittels Ligation.**

Komponente	Volumen
PCR-Produkt	20 µL
Puffer 10 x (NEB)	10 µL
BSA 100x (NEB, optional)	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	auf 100 µL
Exo I (Thermo Scientific, optional)	1 µL
<i>DpnI</i> (NEB, optional)	1 µL
Enzym 1	4 µL
Enzym 2	4 µL
37°C/2 h	

Falls die verwendeten Enzyme nicht miteinander kompatibel waren, wurde die DNA sequentiell erst mit einem Enzym verdaut, mit P/C/I extrahiert (Kapitel V5.5.1), mit Ethanol gefällt (Kapitel V5.5.2) und nach dem Trocknen mit dem zweiten Enzym verdaut.

PCR-Produkte für Klonierungen via SLIC-MIX oder Gateway<sup>®</sup> wurden entweder gelgereinigt (Kapitel V5.5.4) oder durch *DpnI*- und Exonuklease I-Verdau von störenden Bestandteilen nach Tabelle 83 befreit.

**Tabelle 83: Zusammensetzung eines präparativen Verdau von PCR-Produkten für Klonierungen mittels SLIC-MIX oder Gateway<sup>®</sup>.**

Komponente	Volumen
PCR-Produkt	20 µL
Puffer 10 x (NEB oder FD-Puffer)	10 µL
ddH <sub>2</sub> O	auf 100 µL
Exo I (Thermo Scientific)	1 µL
<i>DpnI</i> (NEB oder FastDigest)	1 µL
37°C/2 h (NEB) oder 37°C/30 min (FastDigest)	

### 5.4.1 Kontrollverdau von Plasmid-DNA

Die Verifikation von Plasmiden mittels Restriktionsverdau wurde wenn möglich mit den FastDigest-Enzymen von Thermo Scientific im 10  $\mu\text{L}$ -Ansatz durchgeführt (Tabelle 84), da diese nur kurze Inkubationszeiten für einen vollständigen Verdau benötigen (laut Herstellerangaben nur 5 – 10 min). Zur eindeutigen Verifizierung der Plasmide fiel die Wahl der Restriktionsenzyme in der Regel so aus, dass die Plasmide sowohl im Rückgrat als auch im insertierten Fragment geschnitten wurden.

**Tabelle 84: Allgemeine Zusammensetzung eines Kontrollverdaus durch FastDigest-Enzyme.**

Komponente	Test
Plasmid	2 $\mu\text{L}$
FD-Puffer 10 x	1 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	auf 10 $\mu\text{L}$
Enzym 1	0,5 $\mu\text{L}$
Enzym 2 (optional)	0,5 $\mu\text{L}$
37°C/20 min	

Zur Analyse der eingefügten  *$\alpha$ -mating factor*-Signalsequenz in den pPinkHC-Vektor war das gewählte Enzym nicht aus der FastDigest-Serie erhältlich, deswegen wurde *BstAPI* von NEB nach Tabelle 85 verwendet.

**Tabelle 85: Zusammensetzung des pPinkHCb-Kontrollverdaus.**

Komponente	Volumen
Plasmid	2 $\mu\text{L}$
CutSmart™ 10 x (NEB)	1 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	6,5 $\mu\text{L}$
<i>BstAPI</i>	0,5 $\mu\text{L}$
60°C/1 h	

Anschließend wurden die Ansätze mit 2  $\mu\text{L}$  DNA-Ladepuffer 6x (Tabelle 38) gemischt und die entstandenen Fragmentgrößen per Agarosegelelektrophorese durch einen Vergleich mit einem DNA-Längenstandard analysiert (Kapitel V5.1).

## 5.5 DNA-Reinigungsmethoden

### 5.5.1 P/C/I-Extraktion

Nach dem Restriktionsverdau von Plasmiden oder PCR-Produkten wurde die DNA meist mit P/C/I (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1) extrahiert, um die Enzyme aus der Lösung zu entfernen. Dazu wurde die wässrige DNA-Lösung mit einem Volumenäquivalent Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Tabelle 57) gemischt (Vortex, Tabelle 16) und für 2 min bei 16.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase unter dem Abzug in ein neues 1,5 mL Zentrifugengefäß überführt und mit einem Volumenäquivalent Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und erneut zentrifugiert. Zur Fällung der DNA mittels Ethanol oder Isopropanol (Kapitel V5.5.2) wurde die wässrige Phase unter dem Abzug erneut in ein neues 1,5 mL Zentrifugengefäß überführt.

### 5.5.2 Ethanol- oder Isopropanolpräzipitation

Für die Reinigung und Fällung von PCR-Produkten oder geschnittenen Plasmiden aus wässrigen Lösungen wurden je nach Probevolumen entweder Ethanol oder Isopropanol zur DNA-Präzipitation verwendet. Es wurden 1/10 Volumenäquivalente Lösung III (Tabelle 39) und 2,5 Volumenäquivalente absolutes Ethanol bzw. ein Volumenäquivalent Isopropanol zu der DNA-Lösung hinzugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach der Zentrifugation bei 20.000 x g für 20 min und 4°C wurde der Überstand abdekantiert und die DNA im zweifachen Ausgangsvolumen 70%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA bei Raumtemperatur oder bei 55°C getrocknet und in 10 µL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 5.5.3 SureClean-Fällung

Das Protokoll zur SureClean-Fällung fand immer dann Anwendung, wenn eine große Anzahl an unterschiedlichen DNA-Proben gleichzeitig von Puffer- oder Proteinbestandteilen gereinigt werden sollte. Ein Volumenäquivalent SureClean (Tabelle 57) wurde zu der DNA-Lösung hinzugegeben und die beiden Lösungen intensiv miteinander gemischt (Vortex, Tabelle 16). Nach Inkubation für 10 – 30 min bei Raumtemperatur wurde für 10 – 30 min bei 16.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entnommen. Die sedimentierte DNA wurde mit dem doppelten Ausgangsvolumen 70%-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 5 – 10 µL H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 5.5.4 Reinigung durch präparative Agarosegelelektrophorese

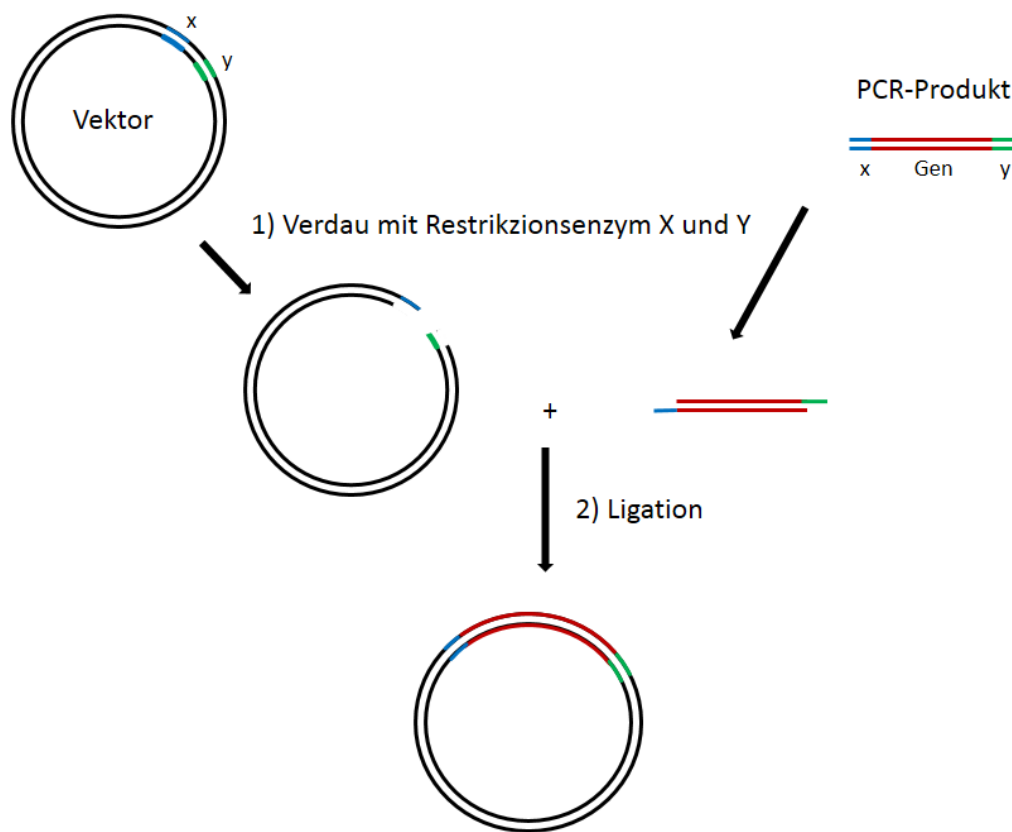
Um DNA für Klonierungen (Kapitel V5.7) oder die *oe*PCR (V5.3.2 und V5.3.3) von störenden Bestandteilen zu befreien, wurde über Agarosegelelektrophorese gereinigt. Dafür wurde die DNA nach Kapitel V5.1 präpariert und aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA zur Detektion auf einem UV-Tisch bei niedriger Intensität bestrahlt und die gewünschten Fragmente mit einem, durch Ethanol und ddH<sub>2</sub>O, gereinigten Skalpell ausgeschnitten. Die Isolation der DNA erfolgte in der Regel durch Zerkleinern und wiederholtes Einfrieren mit anschließender Zentrifugation der Gelstücke. Dafür wurden die isolierten Gelstücke zum Zerkleinern durch eine 1 mL-Spritze in ein Zentrifugengefäß gedrückt und für 10 min bei -80°C oder kurz in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Die Agarose wurde durch Zentrifugation bei 20.000 x g für 1 h und 4°C sedimentiert, der Überstand mit der DNA in ein frisches Zentrifugengefäß überführt und das Sediment erneut eingefroren und zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und die DNA durch Ethanol- oder Isopropanolpräzipitation isoliert (Kapitel V5.5.2). Die getrocknete DNA wurde schließlich in 10 µL ddH<sub>2</sub>O gelöst.

Eine Ausnahme bilden die *oe*PCR-Produkte zur Mutagenese der AT6 aus DEBS (Kapitel V5.3.6). Aufgrund der hohen Anzahl der dabei erzeugten Proben wurde die DNA mit Hilfe des zeitsparenden „peqGOLD Gel extraction“ Kits der Firma peqLab nach Herstellerangaben isoliert.

### 5.6 Strategien zur Klonierung neuer Vektoren

#### 5.6.1 Klonierung mittels Ligation

Bei der Klonierung mittels Ligation (Abbildung 105) werden sowohl Vektor-DNA als auch das zu insertierende PCR-Produkt separat mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut und im Anschluss *in vitro* miteinander ligiert. Im Idealfall handelt es sich um Restriktionsenzyme die kurze Überhänge erzeugen (*sticky ends*). Wählt man dabei zwei unterschiedliche Enzyme für das 5'- und 3'-Ende der jeweiligen DNA-Fragmente aus, so ist bei der nachfolgenden Ligation die Insertion des Gens in den Vektor nur in erwünschter Leserichtung möglich.



**Abbildung 105: Schematische Darstellung zur Klonierung durch Ligation.** x und y werden hier die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen X und Y genannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Ligation die T4 Ligase (Tabelle 56) nach Tabelle 86 verwendet.

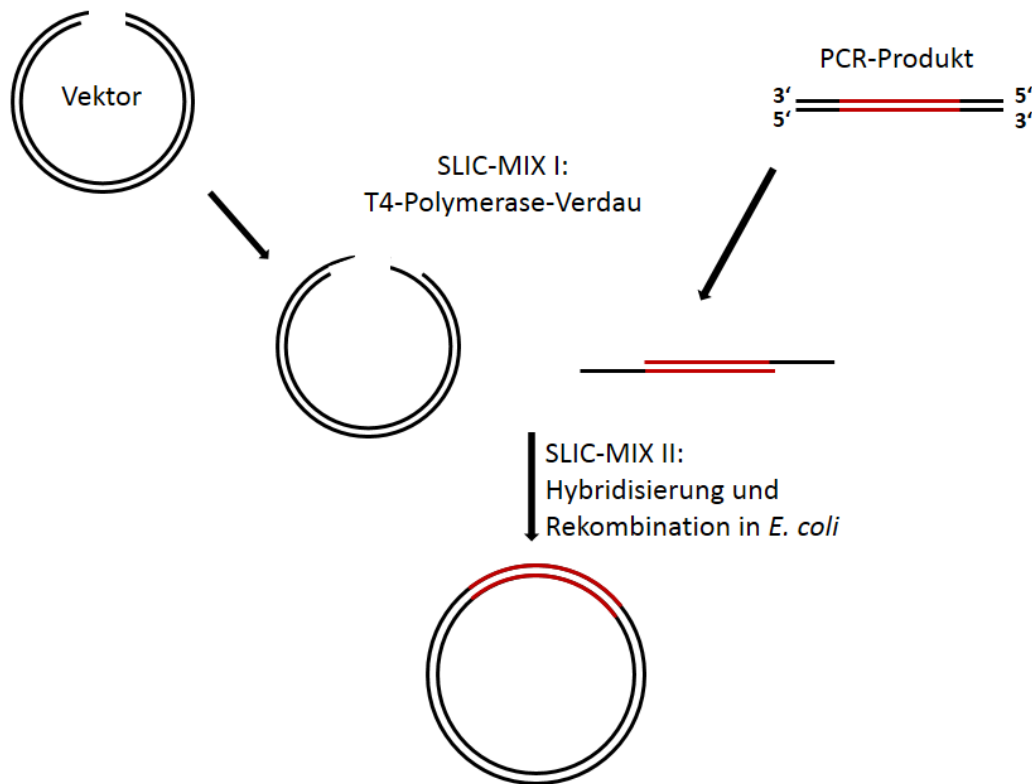
**Tabelle 86: Allgemeine Zusammensetzung einer Ligationsreaktion.**

Komponente	Menge/Ansatz
geschnittenes Plasmid	20 ng
geschnittenes PCR-Produkt	3 – 16 Moläquivalente
T4 Ligase Puffer 5 x	2 µL
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 µL
T4 Ligase (Thermo Scientific)	0,2 µL
22°C/20 min – 2h	

### 5.6.2 Klonierung mittels SLIC-MIX

Die SLIC-MIX-Methode (Abbildung 106) beruht auf der sequenz- und ligationsunabhängigen Klonierungsmethode nach Li und Elledge und wurde zur effektiven Klonierung großer Gene durch Dr. Susanna Kushnir und Dr. Uschi Sundermann in der Arbeitsgruppe entwickelt und später durch Dr. Susanna Kushnir noch einmal auf neue Puffersysteme angepasst.<sup>[258f,292]</sup> In

dieser Arbeit wurde die Klonierungsmethode routinemäßig zur Klonierung von zwei und drei Fragmenten verwendet.



**Abbildung 106: Schematische Darstellung zur SLIC-MIX-Klonierung.**<sup>[258f,292]</sup>

Das Vektorrückgrat wird zunächst über einen Restriktionsverdau (Tabelle 81) oder über eine PCR (Kapitel V5.3) linearisiert. Die zu insertierenden Gensequenzen werden in der Regel via PCR (Kapitel V5.3) amplifiziert. Beim Design der Oligonukleotide (Kapitel V2.3) ist zu beachten, dass der genspezifische Bereich an den 5'- und 3'-Enden mit 20 nt langen Überhängen versehen wird, die homolog zu der jeweiligen Zielsequenz (Vektor oder andere zu insertierende Gensequenzen) sind.

In SLIC-MIX I werden der linearisierte Vektor und die zu insertierenden Sequenzen separat in Abwesenheit von dNTPs über die 3' → 5'-Exonukleaseaktivität der T4 DNA Polymerase verdaut, wobei einzelsträngige komplementäre Überhänge entstehen. Der Verdau wird durch die Zugabe eines der vier dNTPs gestoppt. Bei der Klonierung von GC-reichen Fragmenten wurde in der Regel dCTP hinzugegeben, bei der Klonierung von AT-reichen Fragmenten dATP. Zur Stabilisierung der einzelsträngigen Überhänge befindet sich in der Reaktionsmischung ET-SSB (*enhanced thermostable single stranded DNA binding protein*, Tabelle 56).

In SLIC-MIX II werden die komplementären, einzelsträngigen Bereiche miteinander hybridisiert und im Anschluss die Restaktivität der sich in der Reaktionsmischung befindlichen Enzyme durch die Zugabe von EDTA zerstört. Die Schließung der Doppelstrangbrüche erfolgt *in vivo*



durch die Transformation von *E. coli* OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> (Kapitel V6.1.1) mit der hybridisierten DNA (maximal 5 µL).

In Tabelle 87 und Tabelle 88 sind die allgemeinen Zusammensetzungen der Reaktionen SLIC-MIX I und SLIC-MIX II dargestellt.

**Tabelle 87: Allgemeine Zusammensetzung von SLIC-MIX I.**

Komponente	Vektor	Insert(s)
DNA	50 ng	1 Vektor-Mol-äq.
Pol 4 buffer (1:20)	0,5 µL	0,5 µL
BSA 100 x (NEB)	0,1 µL	0,1 µL
DTT (100 mM)	0,5 µL	0,5 µL
ddH <sub>2</sub> O	auf 10 µL	auf 10 µL
ET-SSB (1:10, NEB)	0,8 µL	0,8 µL
T4 Polymerase (NEB)	0,25 µL	0,25 µL
22°C/30 min		
jeweils 1 µL dCTP (GC-reich) oder dATP (AT-reich)		

**Tabelle 88: Allgemeine Zusammensetzung von SLIC-Mix II.**

Komponente	Vektor
SLIC-MIX I Vektor	2 µL
SLIC-MIX II <i>Insert(s)</i>	(je) 2 µL
LIC buffer 10 x	1/10 des Gesamtvolumens
22°C/30 min	
1 µL EDTA (100 mM) hinzu und 22°C/30 min	

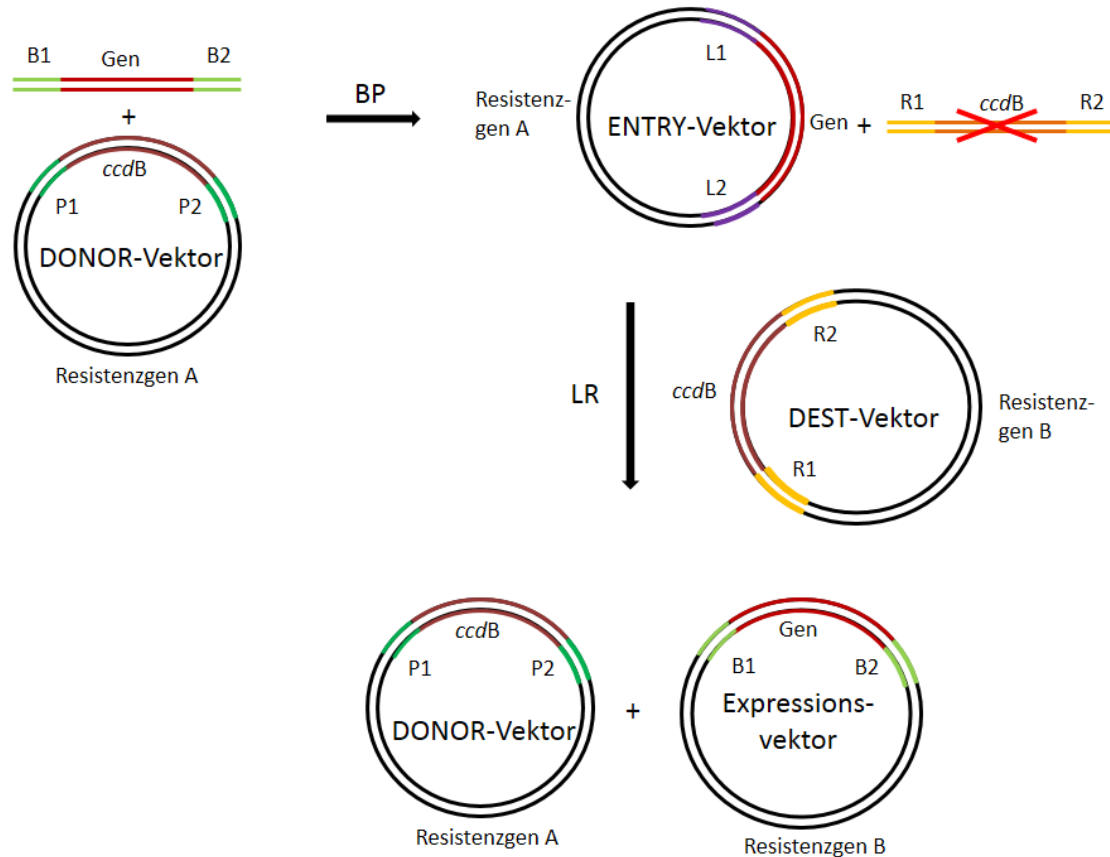
### 5.6.3 Klonierung über IVC (*in vivo cloning*)

Die IVC (*in vivo cloning*) nach Vogelstein beruht ebenfalls auf homologer Rekombination in *E. coli*.<sup>[293]</sup> Dafür müssen die zu rekombinierenden Fragmente mindestens 15 nt lange komplementäre Bereiche aufweisen. Dies wurde durch das Einfügen von vektorhomologen Sequenzen an den 5'- und 3'-Enden in die zu insertierenden Fragmente via PCR (Kapitel V5.3) über das geeignete Design der Oligonukleotide erreicht.<sup>[244]</sup>

Für eine erfolgreiche Klonierung wurde das linearisierte (Kapitel V5.4.1) Plasmidrückgrat mit dem linearen, zu rekombinierenden Fragment in einem äquimolaren Verhältnis gemischt und für 30 min auf Eis zusammen mit 50 µL chemisch kompetenten *E. coli* OmniMAX 2T1<sup>R</sup> (Kapitel V6.1.1) inkubiert. Im Anschluss wurde direkt mit dem Hitzeschock zur Transformation der *E. coli* fortgefahren (Kapitel V6.1.1).

### 5.6.4 Klonierung über Gateway®

Die Gateway®-Methode von Invitrogen beruht auf der sequenzspezifischen Rekombination von DNA (Abbildung 107).<sup>[294]</sup>



**Abbildung 107: Schematische Darstellung zur Gateway®-Klonierung.**

Die Klonierung verläuft in zwei Schritten. In der BP-Reaktion wird der sogenannte ENTRY-Vektor erzeugt. Der dafür verwendete DONOR-Vektor besitzt spezifische Rekombinationsstellen *attP1* und *attP2*. Die zu insertierende Gensequenz wird über PCR (Kapitel V5.3) mit den Sequenzen *attB1* und *attB2* flankiert. Unter Einsatz des BP Klonase Mix, der die  $\lambda$ -Phagenintegrase und den *E. coli* IHF (*Integration Host Factor*) enthält, wird das gereinigte PCR-Amplifikat mit dem DONOR-Vektor rekombiniert. Dabei entstehen *insert*flankierende Sequenzen mit veränderter Nukleotidabfolge, die im Folgenden *attL1* und *attL2* genannt werden. Gleichzeitig wird die *ccdB*-Sequenz, die für einen Gyraseinhibitor codiert, aus dem Vektor entfernt. Damit und durch das Antibiotikaresistenzgen im Vektorrückgrat werden nach erfolgter Transformation nur *E. coli*-Zellen selektiert, die den ENTRY-Vektor mit entsprechendem, gewünschtem Gen aufgenommen haben. Im zweiten Schritt, der LR-Reaktion, wird schließlich der eigentliche Vektor für die Expression des Zielgens konstruiert. Dabei rekombinieren die *attR1*- und *attR2*-Stellen aus dem Gateway®-kompatiblen DEST-Vektor mit den *attL1* und *attL2*-Stellen aus dem ENTRY-Vektor. Der dabei

eingesetzte LR Klonase Mix enthält, zusätzlich zur Integrase und dem IHF, die  $\lambda$ -Phagenexcisionase.

### 5.6.5 Klonierung von kurzen Sequenzen durch Hybridisierung von Oligonukleotiden

Sehr kurze Sequenzen wurden durch die Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide (bis zu 95 nt Länge) mit anschließender Ligation (Kapitel V5.6.1) in das linearisierte Plasmidrückgrat (Kapitel V5.4.1) kloniert. Die Oligonukleotide wurden dafür mit Überhängen designt, die zu den Restriktionsüberhängen der jeweiligen Vektoren kompatibel waren. Für die Hybridisierung wurden die Oligonukleotide mit dem Hybridisierungspuffer (Tabelle 43) nach Tabelle 89 miteinander gemischt.

**Tabelle 89: Zusammensetzung der Reaktionslösung zur *in vitro*-Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden.**

Komponente	Menge/Ansatz
Oligonukleotid_fw (10 $\mu$ M)	9 $\mu$ L
Oligonukleotid_re (10 $\mu$ M)	9 $\mu$ L
10 x Hybridisierungspuffer	2 $\mu$ L

Anschließend wurde die Reaktionsmischung in einen Heizblock (Tabelle 16) gestellt, gewartet bis er auf 95°C erhitzt war und die Reaktionsmischung für weitere 20 min bei 95°C inkubiert. Danach wurde die Reaktionsmischung für 3 h bei Raumtemperatur abgekühlt und mit dem linearisierten Vektor ligiert (Kapitel V5.6.1).

## 5.7 Klonierung neuer Vektoren

Für die Klonierung neuer Vektoren wurden die Vektorrückgrate (Tabelle 18) als auch die zu insertierenden DNA-Fragmente in einem präparativen Ansatz mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen behandelt (Kapitel V5.4.1). Zur Reinigung der DNA wurden entweder Ethanolpräzipitation (Kapitel V5.5.2), P/C/I-Extraktion (Kapitel V5.5.1), SureClean-Fällung (Kapitel V5.5.3) oder präparative Agarosegelelektrophorese (Kapitel V5.5.4) verwendet. Die Konzentration der DNA wurde über Agarosegelelektrophorese (Kapitel V5.1) abgeschätzt. Nach Zusammenfügen der zu klonierenden Fragmente durch eine der Klonierungsstrategien (Kapitel V5.6) wurden *E. coli* OmniMAX™ 2T1<sup>R</sup> mit den Ansätzen transformiert (Kapitel V6.1.1). Die Selektion der plasmidtragenden Zellen erfolgte auf LB-Agarplatten durch die Zugabe spezifischer Antibiotika. Dabei wurden sowohl die durch den Stamm vermittelten Resistenzgene (OmniMAX™ 2T1<sup>R</sup>: *tet*<sup>R</sup>) als auch die durch die jeweiligen

Vektoren vermittelten Resistenzen (Tabelle 18) beachtet. Positive Klone wurden nach Plasmidisolierung (Kapitel V5.2.1) in der Regel durch Testverdau (Kapitel V5.4.1) und DNA-Sequenzierung (Kapitel V5.8) verifiziert.

### 5.7.1 Klonierung von AbFS-codierenden *E. coli*-Vektoren

#### a) pBADM30-*abfs*, pET27mod-*abfs*, pETM11-*abfs*

pBADM30, pET27mod, pETM11 und das PCR-Produkt *abfs* (Tabelle 60) wurden mit *NcoI* und *NotI* geschnitten und durch Ethanolpräzipitation gereinigt. Anschließend wurden die Vektoren jeweils mit *abfs* in einem molaren Verhältnis von 1:3 miteinander ligiert (Kapitel V5.6.1, 100 ng Vektor: 120 ng *abfs* für die Ligation mit den pET-Vektoren bzw. 130 ng für die Ligation mit dem pBAD-Vektor). Nach erfolgreicher Transformation wurden positive Klone über einen Kontrollverdau mit *BglII* ermittelt. Die AbFS-codierenden pET-Vektoren wurden mit den Oligonukleotiden 582, 585, *abfsseq\_fw* und *abfsseq\_re* sequenziert, der pBADM30-*abfs*-Vektor mit den Oligonukleotiden 845, 846, *abfsseq\_fw* und *abfsseq\_re*.

#### b) pUC19I-*abfs*

pUC19I wurde mit *XbaI* und *SacI* verdaut und durch P/C/I-Extraktion gereinigt. Das PCR-Produkt *abfs* (Tabelle 60) wurde gelgereinigt und über SLIC-MIX (Kapitel V5.6.2) mit dem linearisierten Vektor umgesetzt. Nach Transformation wurden positive Klone über Testverdau mit *EcoRV* und über Sequenzierung mit den Oligonukleotiden 1096, 1097, *abfsseq\_fw* und *abfsseq\_re* verifiziert.

#### c) Klonierung der einzelnen Domänen *fcyc*, *fcyc1*, *fcyc2*, *ggpps*, *ggpps1* und *ggpps2*

Für die Klonierung der Vektoren pETM11-*fcyc*, pETM11-*fcyc1*, pETM11-*fcyc2* und pETM11-*ggpps* wurden pETM11 und die PCR-Produkte *fcyc*, *fcyc1*, *fcyc2* und *ggpps* (Tabelle 60) jeweils mit *NcoI* und *NotI* verdaut. Der linearisierte Vektor wurde über präparative Agarosegelelektrophorese gereinigt, die verdauten PCR-Produkte über P/C/I-Extraktion. Anschließend erfolgte jeweils eine Ligation (Kapitel V5.6.1) in einem molaren Verhältnis von etwa 1:3 (20 ng Vektor:15 ng PCR-Produkt). Nach der Transformation wurden positive Klone durch einen Testverdau mit *EcoRV* identifiziert und mit den vektorspezifischen Oligonukleotiden 582 und 585 sequenziert.

Die Klonierung der Vektoren pBADM11-*fcyc1*, pBADM11-*fcyc2*, pBADM11-*ggpps1* und pBADM11-*ggpps2* erfolgte über SLIC-MIX (Kapitel V5.6.2). Dafür wurde pBADM11 mit *NcoI* und *NotI* linearisiert und gelgereinigt. Die PCR-Produkte *fcyc1/2* und *ggpps1/2* (Tabelle 60) wurden ebenfalls gelgereinigt. Nach Transformation erfolgte eine Verifizierung der positiven Klone für pBADM11-*fcyc1/2* durch einen Testverdau mit *EcoRV* und für pBADM11-*ggpps1/2*

mit *Bam*HI und *Hind*III. Die Sequenzierungen erfolgten jeweils mit den vektorspezifischen Oligonukleotiden 846 und 879.

## 5.7.2 Klonierung der AbFS-codierenden *S. cerevisiae*-Vektoren

### a) pVV214-*abfsS.c.*

Die Klonierung der codonoptimierten *abfsS.c.*-DNA erfolgte über die Gateway®-Methode (Kapitel V5.6.3). Die Zusammensetzungen der beiden Gateway®-Reaktionen für die Erzeugung von pVV214-*abfsS.c.* sind in Tabelle 90 und Tabelle 91 dargestellt. Der pDONR221-Vektor wurde in *E. coli* DB3.1 propargiert und isoliert (Kapitel V5.2.1). Das *abfsS.c.*-Gen wurde amplifiziert (Tabelle 60) und über präparative Agarosegelelektrophorese gereinigt.

**Tabelle 90: BP-Reaktion der Gateway®-Klonierungsmethode.**

Komponente	Menge/Ansatz
pDONR221	1 µL (150 ng)
gelgereinigtes <i>abfsS.c.</i>	3 µL (150 ng)
TE 5x (pH 8)	2 µL
ddH <sub>2</sub> O	2 µL
BP Clonase® Enzyme MixII (Invitrogen)	2 µL
30 s mischen (Vortex-Genie 2, Scientific Industries), 10 s zentrifugieren	
Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur	
Stoppen der Reaktion mit 1 µL Proteinkinase K	
Inkubation bei 37°C/400 rpm/15 min (Thermomixer comfort, Eppendorf)	

Anschließend wurden chemisch kompetente *E. coli* OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> mit je 1, 2 und 5 µL des BP-Reaktionsansatzes transformiert und nach Verifikation positiver Klone durch Kontrollverdau mit *EcoRV* mit den Oligonukleotiden M13\_fw, M13\_re und 1042 – 1046 sequenziert. Anschließend wurde pDONR221-*abfsS.c.* für die LR-Reaktion verwendet.

**Tabelle 91: LR-Reaktion der Gateway®-Klonierungsmethode.**

Komponente	Menge/Ansatz
pVV214	1 µL (150 ng)
pDONR221- <i>abfsS.c.</i>	5 µL (90 ng)
TE 5x (pH 8)	2 µL
LR Clonase® Enzyme MixII (Invitrogen)	2 µL
30 s mischen (Vortex-Genie 2, Scientific Industries), 10 s zentrifugieren	
Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur	

Komponente	Menge/Ansatz
Stoppen der Reaktion mit 1 $\mu$ L Proteinkinase K	
Inkubation bei 37°C/400 rpm/15 min (Thermomixer comfort, Eppendorf)	

Nach Transformation und Plasmidisolierung wurde die Richtigkeit der Plasmide über Kontrollverdau mit *Afl* und *XhoI* überprüft. Da die pENTR-Plasmide bereits sequenziert wurden und das zu exprimierende Gen fehlerfrei durch die Rekombination in den Expressionsvektor übertragen wird, war eine Sequenzierung der isolierten pVV214-*abfsS.c.*-Vektoren nicht notwendig.

#### **b) pVV214duett:*fcyc-ggpps*, pVV214duett:*fcyc1-ggpps1* und pVV214duett:*fcyc2-ggpps2***

Für die Klonierung von pVV214duett:*fcyc-ggpps* wurde der Vektor pVV214-*abfs* mit *Bam*HI und *Eco*RI präparativ verdaut, über Gelextraktion gereinigt und über SLIC-MIX (Kapitel V5.6.2) mit dem gelgereinigten *oe*PCR-Produkt *fcyc-pgk* (Tabelle 62) und dem gelgereinigten PCR-Produkt *ggpps* (Tabelle 61) umgesetzt.

Für die Klonierung von pVV214duett:*fcyc1/2-ggpps1/2* wiederum wurden pVV214duett:*fcyc-ggpps* und die *oe*PCR-Produkte *fcyc1-pgk1-ggpps1* und *fcyc2-pgk2-ggpps2* (Tabelle 64) mit *Bsp*EI (*Ac*cIII) und *Eco*RI linearisiert und über präparative Agarosegelelektrophorese gereinigt.<sup>[190]</sup> Die Ligation (Kapitel V5.6.1) erfolgte jeweils in einem molaren Verhältnis von 1:3 (20 ng Vektor:13 ng PCR-Produkt).<sup>[190]</sup>

Nach Propargierung erfolgte die Verifizierung positiver Klone aller pVV214duett-Vektoren durch einen Kontrollverdau über *Bam*HI. Die korrekten Sequenzen wurden außerdem über Sequenzierungen mit den Oligonukleotiden 1191, 1192, *abfsseq\_fw*, *abfsseq\_re*, *abfs2\_fw* und *abfs2\_re* bestätigt.

#### **d) pVV214-*fcyc1/2* und pVV214-*ggpps1/2***

pVV214-*abfs* wurde mit *Bam*HI und *Eco*RI verdaut und gelgereinigt. Die PCR-Produkte *fcyc*, *fcyc1*, *fcyc2*, *ggpps*, *ggpps1* und *ggpps2* (Tabelle 60) wurden ebenfalls mit *Bam*HI und *Eco*RI verdaut und über P/C/I-Extraktion gereinigt. Anschließend wurden jeweils 20 ng des Vektors mit drei Moläquivalenten PCR-Produkt (*fcyc/ggpps*: 10 ng, *fcyc1/2*: 12,5 ng, *ggpps1/2*: 10,5 ng) ligiert (Kapitel V5.6.1). Die Verifizierung der positiven Klone nach Propargierung erfolgte durch Testverdau mit *Bam*HI und *Eco*RI und durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden 1191 und 1192.

### 5.7.3 Klonierung der AbFS-codierenden *P. pastoris*-Vektoren

#### a) pGAPZA-*abfs* und pGAPZ $\alpha$ A-*abfs*

Für die Klonierung von pGAPZA-*abfs* wurde pGAPZA-*bapA* mit *EcoRI* und *XhoI* linearisiert und gelgereinigt. Das PCR-Produkt *abfs* (Tabelle 60) wurde ebenfalls gelgereinigt und über SLIC-MIX (Kapitel V5.6.2) mit dem Vektor umgesetzt. Nach Transformation wurden positive Klone mittels Kontrollverdau mit *BamHI* und *KpnI* ermittelt.

Für die Klonierung von pGAPZ $\alpha$ A-*abfs* wurde pGAPZ $\alpha$ A mit *KpnI* und *NotI* linearisiert und gelgereinigt. Das PCR-Produkt *abfs* (Tabelle 60) wurde ebenfalls gelgereinigt und über SLIC-MIX (Kapitel V5.6.2) mit dem Vektor umgesetzt. Positive Klone wurden über einen Kontrollverdau mit *XhoI* ermittelt.

Sequenzierungen der klonierten pGAP-Vektoren erfolgten mit den Oligonukleotiden 1179, 1180, *abfsseq\_fw* und *abfsseq\_re*.

#### b) pPinkHC-Vektoren

Beim Design der Oligonukleotide wurde darauf geachtet, dass sich die Kozak-Konsensussequenz GAAACGatg direkt oberhalb des zu exprimierenden Gens befand.

Für die Klonierung des Vektors pPinkHC-*abfsa* zur intrazellulären Expression der *abfs* wurde pPinkHC mit *EcoRI* und *SwaI* sequentiell linearisiert und das PCR-Produkt *abfs* (Tabelle 60) mit *DpnI* verdaut. Anschließend wurden beide DNA-Fragmente über P/C/I-Extraktion gereinigt und über SLIC-MIX (Kapitel V5.6.2) kloniert.

Zur Klonierung des pPinkHC $\alpha$ -*abfsb*-Vektors zur sekretorischen Expression der *abfs* wurde zunächst der Vektor pPinkHCb kloniert. pPinkHC wurde dafür mit *EcoRI* und *SphI* sequentiell verdaut und über P/C/I-Extraktion gereinigt. Anschließend wurde der Vektor mit den *in vitro* hybridisierten Oligonukleotiden (Kapitel V5.6.5) ligiert (Kapitel V5.6.1), die für die Vorsequenz des  $\alpha$ - *mating*-Faktors (Oligonukleotide 1312 und 1313) aus *S. cerevisiae* codieren. Alle getesteten molaren Verhältnisse (1:16, 1:1,6 und 1:0,4) von Vektor zu hybridisierten Oligonukleotiden führten zu einer erfolgreichen Klonierung des pPinkHCb-Vektors. Positive Klone wurden via Testverdau mit *BstAPI* und Sequenzierung mit dem vektorspezifischen Oligonukleotid 1306 verifiziert.

Anschließend wurde pPinkHCb sequentiell mit *SphI* und *SwaI* verdaut und über P/C/I-Extraktion gereinigt. Das PCR-Produkt *abfs* (Tabelle 60) wurde mit *DpnI* verdaut und ebenfalls über P/C/I-Extraktion gereinigt. Danach wurde über SLIC-MIX (Kapitel V5.6.2) kloniert.

Positive Klone der AbFS-codierenden pPink-HC-Vektoren wurden über einen Kontrollverdau mit *BglII* identifiziert und mit den Oligonukleotiden 1306, 1307, *abfsseq\_fw* und *abfsseq\_re* sequenziert.

#### 5.7.4 Klonierungen der $\beta$ -Galactosidase-Reporterkonstrukte und der epPCR-Bibliotheken für die zufällige Mutagenese von *abfs*

##### a) pBADM11-*lacZ* $\alpha$ <sup>[177]</sup>

Für die Klonierung des Plasmids pBADM11-*lacZ* $\alpha$ , das während des Screenings (Kapitel V6.2.3) als Positivkontrolle verwendet wurde, wurden sowohl pBADM11 als auch das PCR-Produkt *lacZ* $\alpha$  (Tabelle 65) mit *Nco*I und *Not*I verdaut und über Ethanolpräzipitation gereinigt. Die Ligation (Kapitel V5.6.1) erfolgte in einem molaren Verhältnis von 1:5 (20 ng Vektor: 6 ng *lacZ* $\alpha$ ). Nach der Transformation wurden positive Klone via Testverdau mit *Eco*RV und *Pvu*II und über DNA-Sequenzierung mit den Oligonukleotiden 846 und 879 verifiziert.

##### b) pJAMM1<sup>[177]</sup>, pJAMM1b, pJAAK1a<sup>[188]</sup>

pJAMM1 wurde mittels SLIC-MIX (Kapitel V5.6.2) über die drei *Dpn*I-verdauten und Ethanolpräzipitierten PCR-Produkte pBAD, *abfs-linker* und *linker-lacZ* $\alpha$  (Tabelle 65) zusammengesetzt.

pJAMM1b wurde ebenfalls mittels SLIC-MIX (Kapitel V5.6.2) über das *Dpn*I- und P/C/I-gereinigte PCR-Produkt pBAD (Tabelle 65) und das gelgereinigte oePCR-Produkt *abfs-linkerb-lacZ* $\alpha$  (Tabelle 66) zusammengesetzt.

Die Klonierung von pJAAK1a erfolgte über die Ligation (Kapitel V5.6.1) der *Nco*I und *Not*I-verdauten und P/C/I-gereinigten PCR-Produkte pJAMMb und *fcyc* (Tabelle 65) im Verhältnis von 1:3 (20 ng pJAMMb und 15 ng *fcyc*).

Nach Transformation wurden positive Klone der Konstrukte pJAMM1, pJAMM1b und pJAAK1a via Kontrollverdau mit *Eco*RV und über DNA-Sequenzierung mit den Oligonukleotiden 846, 879, *abfsseq\_fw* und *abfsseq\_re* verifiziert.

##### c) Klonierung der epPCR-Bibliotheken

Zur Klonierung der epPCR-Bibliotheken wurde das jeweilige Reporterkonstruktückgrat (pJAMM, pJAMMb oder pJAAK) via PCR amplifiziert (Tabelle 65), mit *Nco*I und *Not*I verdaut und durch P/C/I-Extraktion gereinigt. *abfs* oder *fcyc* wurden durch epPCR (Tabelle 69) mutiert und ebenfalls mit *Nco*I und *Not*I geschnitten und durch P/C/I-Extraktion gereinigt.<sup>[188-189]</sup> Für die Klonierung wurden jeweils 20 ng Vektor-DNA mit drei Moläquivalenten (30 ng *abfs*, 15 ng *fcyc*) des mutierten Gens ligiert (Kapitel V5.6.1) und mit *E. coli* OmniMAX™ 2T1<sup>R</sup> transformiert. Die Analyse positiver Klone und von Screeningtreffern erfolgte in mehreren Schritten nach Kapitel V6.2.3.



### 5.7.5 Klonierung der BM3-codierenden *E. coli*-Vektoren

Für die Klonierung von pETM11-*bm3* wurde der Zielvektor pETM11 mit *Nco*I und *Hind*III geschnitten und über Ethanolpräzipitation gereinigt. Das PCR-Produkt *bm3* (Tabelle 60) wurde mit *Dpn*I verdaut und ebenfalls über Ethanolpräzipitation gereinigt. Anschließend wurden die Fragmente über SLIC-MIX (Kapitel V5.6.2) miteinander umgesetzt.

Für die Erzeugung von pET27mod-*f87a* wurden pET27mod und *f87a* (Tabelle 60) mit *Nco*I und *Not*I präparativ verdaut und über Ethanolpräzipitation gereinigt. Für die Ligation (Kapitel V5.6.1) wurde ein molares Verhältnis von 1:3 (100 ng pET27mod:180 ng *f87a*) verwendet. Nach der Transformation wurden für beide Konstrukte positive Klone über Testverdau mit *Eco*RV und DNA-Sequenzierung mit den Oligonukleotiden 582, 585, 821, 822 und 824 – 826 identifiziert.

### 5.7.6 Klonierung der MVA-codierenden *E. coli*-Vektoren<sup>[244]</sup>

Für die hier beschriebenen Klonierungen wurden die PCR-Produkte aus Tabelle 71 verwendet. Alle Konstrukte wurden nach erfolgreicher Klonierung zur Überprüfung mit den jeweiligen vektorspezifischen Oligonukleotiden sequenziert (pBADM11: 846 und 879, pET27mod/pETM11: 582 und 585).

#### a) Klonierung von *aact*, *hmgr* und *mvk*

Die Zielvektoren pBADM11, pET27mod und pETM11 und PCR-Amplifikate der *aact*, *hmgr* und *mvk* wurden mit *Nco*I und *Hind*III verdaut und durch P/C/I-Extraktion gereinigt. Schließlich wurden 20 ng der geschnittenen Vektoren jeweils mit etwa 3 Moläquivalenten (15 ng) der geschnittenen PCR-Produkte ligiert (Kapitel V5.6.1). Positive Klone wurden via Kontrollverdau mit *Nco*I und *Hind*III identifiziert.

#### b) Klonierung von *hmgs* und *mdc*

Die Zielvektoren pBADM11, pET27mod und pETM11 wurden mit *Nco*I und *Hind*III verdaut, wohingegen die PCR-Amplifikate der *hmgs* und *mdc* mit *Pci*I und *Hind*III geschnitten wurden. Sowohl geschnittene Plasmide als auch geschnittene PCR-Produkte wurden über P/C/I-Extraktion gereinigt und in einem molaren Verhältnis von 1:3 (20 ng Vektor:15 ng PCR-Produkt) miteinander ligiert (Kapitel V5.6.1). Der Kontrollverdau für pETM11-*hmgs* und pET27mod-*hmgs* erfolgte mit *Sac*I und *Hind*III. pBADM11-*hmgs* konnte nicht erfolgreich kloniert werden. Die MDC-codierenden pET-Vektoren wurden über einen Kontrollverdau mit *Scal* und *Hind*III identifiziert und pBADM11-*mdc* wurde zur Kontrolle mit *Bam*HI und *Hind*III verdaut.

### c) Klonierung von *pmk*

Die Klonierung von *pmk* erfolgte durch den Verdau der Zielvektoren pBADM11, pET27mod und pETM11 und des PCR-Produktes *pmk* durch *NcoI* und *NotI*. Nach Reinigung durch P/C/I-Extraktion wurden beide Komponenten in einem molaren Verhältnis von 1:3 (20 ng Vektor:15 ng PCR-Produkt) miteinander ligiert (Kapitel V5.6.1). Die PMK-codierenden Vektoren wurden über einen Kontrollverdau mit *NcoI* und *NotI* identifiziert.

### d) Klonierung von *idi2*

Nach erfolgreicher PCR der *idi2* wurde der parentale Templatvektor durch *DpnI*-Verdau entfernt und die DNA über P/C/I-Extraktion gereinigt. Die Zielvektoren pBADM11, pET27mod und pETM11 wurden mit *NcoI* und *NotI* linearisiert und ebenfalls über P/C/I-Extraktion gereinigt. Anschließend wurden jeweils 50 ng gereinigter Vektor und 50 ng gereinigtes PCR-Produkt über ICV (Kapitel V5.6.3) miteinander umgesetzt. Die IDI2-codierenden pET-Vektoren wurden über einen Kontrollverdau mit *BglII* und *NotI* identifiziert und pBADM11-*idi2* über einen Kontrollverdau mit *NotI* und *HindIII*.

## 5.7.7 Klonierungen von Mutagenesebibliotheken der DEBS-AT6-Domäne

Für die Klonierung der Bibliotheken zur Mutation der AT6 aus DEBS wurde der Vektor pKSSU96 (Tabelle 25) mit Hilfe eines sequentiellen Verdau mit *Scal* und *FseI* linearisiert und über SureClean-Fällung gereinigt. *Scal* wurde zur Entfernung des *hyg<sup>R</sup>*-Gens aus dem Vektorrückgrat verwendet. *FseI* eignet sich zum Verdau des *hyg<sup>R</sup>*-Gens, um die Wahrscheinlichkeit einer Religation in den Vektor zu verringern. Die Mutation und Amplifikation der *at6*-Gene erfolgte über oePCR (Kapitel V5.3.6).

5 ng der gelgereinigten oePCR-Produkte (Tabelle 74) wurden schließlich mit 50 ng des geschnittenen Vektors über SLIC-MIX (Kapitel V5.6.2) umgesetzt. Positive Klone wurden über Kolonie-PCR (Kapitel V5.3.7), Testverdau mit *NotI* und über DNA-Sequenzierung mit dem Oligonukleotid 1062 verifiziert. Einige Vektoren wurden zusätzlich mit den Oligonukleotiden 206 und 207 sequenziert.

## 5.8 Sequenzierung von DNA

Alle im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Plasmide wurden zur Verifizierung von der Firma StarSEQ sequenziert. Da es bei der PCR zum fehlerhaften Einbau von dNTPs kommen kann, wurden meist nur die neu eingefügten Amplifikate durch geeignetes Design der Oligonukleotide (siehe Kapitel V2.3) überprüft. Auf die Sequenzierung des gesamten Plasmids wurde in der Regel aus Kostengründen verzichtet. Die Zusammensetzungen der an StarSEQ

versendeten U-Mix-Ansätze sind in Tabelle 92 dargestellt. Es wird dabei nach AT- und GC-reichen DNA-Fragmenten unterschieden.

**Tabelle 92: Zusammensetzung des U-Mix-Ansatzes für die Sequenzierung durch die Firma StarSEQ.**

Komponente	AT-reiche DNA	GC-reiche DNA
Plasmid	2 µL	2 µL
Oligonukleotid (10 µM)	1 µL	1 µL
Betain (5 M)	-	2 µL
ddH <sub>2</sub> O	4 µL	2 µL

## 6 Mikrobiologische Arbeitstechniken

Für die Kultivierung von Mikroorganismen wurden im Rahmen dieser Arbeit Orbitalschüttler mit unterschiedlichen Auslenkungen der Schüttlertablare verwendet. Die Schüttler „HT Ecotron“ und „HT Minitron“ besaßen eine Auslenkung von 2,5 cm, wohingegen der Schüttler „HT Multitron“ eine Auslenkung von 5 cm besaß (Tabelle 16). Ist die Schüttelfrequenz wichtig für den Erfolg des Experiments, ist sie stets angegeben. Bei Kultivierungen in 13 mL-Röhren (Sarstedt) wurden die Halterungen in einem schrägen Winkel im Schüttler befestigt, um eine bessere Sauerstoffaufnahme des Mediums über die vergrößerte Flüssigkeitsoberfläche zu erreichen. Falls nicht anders angegeben wurden die in diesem Abschnitt beschriebenen Lösungen und Medien stets steril verwendet und die beschriebenen Arbeitstechniken unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für die Bestimmung der OD<sub>600</sub> wurden die „Biophotometer“ von Eppendorf unterschiedlicher Baureihen verwendet.

### 6.1 Einführung rekombinanter DNA in Mikroorganismen

#### 6.1.1 Transformation von *E. coli*

*E. coli*-Zellen lassen sich am effizientesten in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase transformieren. Es gibt verschiedene Verfahren, um die Permeabilität der Zellmembran zur Aufnahme von DNA zu erhöhen. Beispielsweise kann dies chemisch durch ein Überschuss an Ca<sup>2+</sup>-Ionen ermöglicht werden. Während der eigentlichen Transformation erhöht man die Zellpermeabilität der chemisch kompetenten Zellen durch einen Hitzeschock kurzzeitig. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Protokolle a) und b) zur Präparation und Lagerung chemisch kompetenter Zellen verwendet. Klonierungsstämme wie *E. coli* OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> wurden dabei ausschließlich mit dem unter a) beschriebenen Protokoll präpariert, da hiermit Transformationseffizienzen von bis zu 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> Transformanten pro µg

pUC18 erzielt werden können.<sup>[290]</sup> Die zur Konjugation von Actinomyceten eingesetzten *E. coli* ET12567/pUZ8002 ließen sich nur mit dem unter a) beschriebenen Protokoll chemisch kompetent machen. Einige Expressionsstämme wurden zur Zeitersparnis mit dem unter b) beschriebenen Protokoll präpariert. Für *E. coli* Rosetta-gami™ 2(DE3) eignete sich dieses Protokoll im Hinblick auf die Transformationseffizienz sogar besser. Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Schritte wurden auf Eis und mit Puffern und Lösungen, dessen Zusammensetzungen sich in Tabelle 44 finden, durchgeführt.

#### **a) Protokoll zur Präparation von ultra-kompetenten *E. coli*-Zellen<sup>[290]</sup>**

250 mL SOB-Medium (Tabelle 33) mit für den *E. coli*-Stamm genotypspezifischen Antibiotika (Tabelle 17) wurden mit einer frisch ausplattierten *E. coli*-Kolonie inokuliert und in einem 2 L Erlenmeyerkolben bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,6 bei 19°C unter kräftigem Schütteln kultiviert. Je nach Zelltyp dauerte die Kultivierung 36 – 48 h. Im Anschluss wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und das Kulturmedium in fünf separate, sterile 50 mL Zentrifugengefäße (Sarstedt) überführt. Nach Sedimentierung der Zellen bei 3200 x g und 4°C für 10 min wurden die Zellen zunächst vorsichtig in jeweils 1 mL eiskaltem TFB I resuspendiert, die Zellsuspension in zwei Zentrifugengefäße aufgeteilt und die Zentrifugengefäße jeweils auf 40 mL aufgefüllt. Nach erneuter Inkubation für 10 min auf Eis und Zentrifugation bei 4°C, wurde das Zellsediment in insgesamt 20 mL eiskaltem TFB I und 1,4 mL des bei -20°C gelagerten DMSO aufgenommen. 50 µL Aliquote dieser Zellsuspension wurden in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die so präparierten Zellen wurden ca. vier Monate ohne Verlust ihrer Transformationseffizienz verwendet.

#### **b) Präparation von kompetenten *E. coli*-Zellen**

Das hier beschriebene Protokoll wurde von Dr. Susanna Kushnir basierend auf einer Kombination mehrere bekannter Herstellungsverfahren chemisch kompetenter *E. coli* entwickelt.

100 mL LB-Medium (Tabelle 33) mit für den *E. coli*-Stamm genotypspezifischen Antibiotika (Tabelle 17) wurden mit 1 mL einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bei 30°C und kräftigem Schütteln kultiviert. Anschließend wurde 15 min auf Eis inkubiert und die Kultur in zwei 50 mL Zentrifugengefäße aufgeteilt. Nach Zentrifugation für 8 min bei 2900 x g und 4°C wurden die Zellen vorsichtig in insgesamt 4 mL 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert, in ein 50 mL Zentrifugengefäß vereinigt und erneut zentrifugiert. Nach Resuspension in 4 mL TFB II wurden 50 µL Aliquots der Zellsuspension in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### c) Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Zur Transformation der Zellen wurden 50 µL der chemisch kompetenten Zellen aus a) oder b) auf Eis aufgetaut und durch mehrmaliges Pipettieren mit 1 – 5 µL der zu transformierenden DNA gemischt. Nach Inkubation für 15 – 30 min auf Eis wurden die Zellen für 1 min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und anschließend für 2 – 5 min auf Eis inkubiert. Die Regenerierung der Zellen erfolgte durch die Inkubation der Zellen in 250 µL SOC-Medium (Tabelle 33) ohne Antibiotika für 60 min bei 37°C und 350 rpm (Heizblock: Tabelle 16). Zur Selektion plasmidtragender *E. coli* wurde die Zellsuspension im Anschluss auf vorgewärmte LB-Agarplatten ausgestrichen, die das Antibiotikum enthielten, gegen welches die transformierten Zellen durch Aufnahme des Plasmids (Kapitel V2.2) resistent waren. Für die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität, enthielten die LB-Agarplatten außerdem die genotypspezifischen Antibiotika des transformierten Stammes (Tabelle 17). Zur Kultivierung der Zellen wurden die Agarplatten über Nacht bei 37°C oder über das Wochenende bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 6.1.2 Transformation von *S. cerevisiae* mit der Lithiumacetat-Methode<sup>[289]</sup>

Auch die Transformation von Hefe ist am effektivsten in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase. Dabei eignen sich monovalente Kationen wie Li<sup>+</sup>, im Gegensatz zu den bei der Transformation von *E. coli* eingesetzten divalenten Kationen, besser.<sup>[295]</sup> Es wird vermutet, dass Li<sup>+</sup> zur Anlagerung der transformierenden DNA an die Zellmembran und zur Permeabilisierung führt.<sup>[295]</sup> Ein Hitzeschock führt zur weiteren Permeabilisierung der Zellmembran und die DNA wird schließlich vermutlich durch Endozytose in die Zelle geschläust.<sup>[295]</sup> Die Transformationseffizienz wird durch den Einsatz von PEG und einzelsträngiger *Carrier*-DNA gesteigert.<sup>[295]</sup>

Die Transformation des zur Terpenfermentation eingesetzten Stammes *S. cerevisiae* CEN-PK2-1c mit den auf pVV214 basierten Vektoren (Tabelle 20) erfolgte mit der Lithiumacetat-Methode.<sup>[289]</sup> Dabei fanden die Puffer und Lösungen aus Tabelle 45 Verwendung.

10 mL YPAD- oder SD-His-Leu-Medium (Tabelle 34) wurden mit einer auf SD-His-Leu-Agar frisch ausgestrichenen Kolonie des Hefestamms in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben angeimpft und ca. 24 h bei 30°C und unter kräftigem Schütteln kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Hefezellen mit 50 mL YPAD in einem 500 mL-Erlenmeyerkolben so verdünnt, dass sich eine OD<sub>600</sub> von 0,1 – 0,2 ergab. Die Hefen wurden anschließend solange bei 30°C unter kräftigem Schütteln inkubiert, bis die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,8 - 1 aufwies (entspricht bei CEN.PK2-1c-Zellen in etwa einer Dichte von 2 x 10<sup>7</sup> Zellen/mL). Dies dauerte in etwa 5 – 8 Stunden. In der Zwischenzeit wurde die *Carrier*-DNA vorbereitet. Dafür wurde ein 100 µL

Aliquot der gelösten *Carrier*-DNA auf Eis aufgetaut, für 5 min bei 98°C denaturiert (Thermomixer comfort, Eppendorf) und erneut für 5 min auf Eis aufbewahrt. Die Denaturierung wurde für weitere zwei Male auf die gleiche Weise wiederholt und die *Carrier*-DNA bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Die Kultur wurde nach Erreichen der erwünschten Zelldichte in ein steriles Zentrifugengefäß überführt und für 3 min bei 3000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde zum Waschen in 25 mL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Zur schrittweisen Verringerung des Gesamtvolumens, wurden die Zellen zunächst in 1 mL 100 mM Lithiumacetatlösung aufgenommen, in ein 1,5 mL Zentrifugengefäß überführt und kurz für 5 s bei 16.000 x g sedimentiert und anschließend in so viel 100 mM Lithiumacetatlösung resuspendiert, dass sich ein Gesamtvolumen von 500 µL ergab (Zelltitert von etwa 2 x 10<sup>9</sup> Zellen/mL).

Je 50 µL der so präparierten Zellsuspension wurden schließlich auf verschiedene 1,5 mL Zentrifugengefäße verteilt und in der hier beschriebenen Reihenfolge mit folgenden Lösungen gemischt (Vortex, Tabelle 16):

- 240 µL 50%-igen PEG 4000 (zum Schutz der Zellen vor der hohen Lithiumacetat-Konzentration)
- 36 µL 1 M Lithiumacetat
- 25 µL *Carrier*-DNA (2 mg/mL)
- 1 – 10 µg Plasmid-DNA in 50 µL ddH<sub>2</sub>O

Es folgte eine Inkubation bei 30°C für 30 min mit anschließendem Hitzeschock bei 42°C für 20 – 25 min im Heizblock (Tabelle 16). Die Zellen wurden durch kurze Zentrifugation sedimentiert, in 200 µL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und auf SD-His-Leu-Ura-Agar (Tabelle 34) ausplattiert.

### 6.1.3 Transformation von *P. pastoris* mit der PEG-Methode

Die Transformation von *P. pastoris* mit entsprechenden Vektoren (Tabelle 22) erfolgte mit der durch Cregg und Russel beschriebenen PEG-Methode.<sup>[197]</sup> PEG kann durch die Dehydrierung der Membran, die Steigerung der Gel-Fluid-Transitionstemperatur und einer damit einhergehenden Herabsenkung der Fluidität, die Zellmembran permeabilisieren.<sup>[295]</sup>

Die Zusammensetzungen der bei der Transformation verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 46 zu finden. Alle Puffer und das DMSO wurden vor der Verwendung bei Raumtemperatur aufgetaut. Die ultraschallbehandelte *Carrier*-DNA wurde dreimal für 5 min analog zu Kapitel V6.1.2 aufgekocht und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Um die Effizienz einer Integration der Expressionskassette durch homologe Rekombination in das Genom von *P. pastoris* zu ermöglichen, musste die Vektor-DNA vor der Transformation linearisiert werden (Kapitel V5.4.1, bei den AbFS-codierenden pPink-HC-Vektoren: *AfII*,

Schnittstelle in der *TRP2*-Region; bei den AbFS-codierenden pGAP-Vektoren: *AvrII*, Schnittstelle im *GAP*-Promoter).

#### a) Präparation von kompetenten Zellen

10 mL YPAD-Medium (Tabelle 34) wurden mit einer auf YPD-Agar frisch ausgestrichenen Kolonie des Hefestamms angeimpft und ca. 24 h bei 30°C und unter kräftigem Schütteln kultiviert. Zur Verbesserung der Sauerstofftransferrate im Medium wurde ein 100 mL-Erlenmeyerkolben mit Stahlspirale und Styroporstopfen verwendet. Am nächsten Tag wurde die Kultur in einem 2 L-Erlenmeyerkolben mit 250 mL YPAD auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 verdünnt und solange bei 30°C und kräftigem Schütteln inkubiert bis die Hefekultur eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 aufwies. Dies dauerte in etwa 8 Stunden. Nach Zentrifugation bei 2000 x g für 5 min wurden die Zellen in 50 mL Puffer A gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 4 mL Puffer A und 220 µL DMSO aufgenommen. Die Lösung wurde in 0,2 mL Aliquoten auf 1,5 mL Zentrifugengefäße verteilt, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C bis zur Transformation gelagert.

#### b) Transformation von *P. pastoris*

Zu den gefrorenen Zellen wurden jeweils ca. 1 µg in 10 µL ddH<sub>2</sub>O linearisierte Plasmid-DNA und 20 µL der *Carrier*-DNA (2 mg/mL) auf Eis hinzugegeben. Während der Inkubation bei 37°C für 5 min im Heizblock (Tabelle 16) wurde die Reaktionslösung dreimal durch Invertieren gemischt. Anschließend wurde die gesamte Lösung in 2 mL Zentrifugengefäße überführt und mit 1,5 mL Puffer B gemischt. Die Proben wurden bei 30°C für 1 h im Wasserbad (Tabelle 16) inkubiert, bei 2000 x g für 5 min zentrifugiert und jeweils in 1,5 mL Puffer C gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die sedimentierten Zellen in 0,2 mL Puffer C aufgenommen und auf PT-Agar (Tabelle 34) ausplattiert. Nach drei bis fünf Tagen wuchsen Kolonien. Im Falle von *PichiaPink*<sup>TM</sup> können diese weiß und pinkfarben sein. Nur weiße Kolonien wurden weiterhin durch Kolonie-PCR (Kapitel V5.3.7 b) und Expressionstests analysiert (Kapitel V6.3.5).

### 6.1.4 Konjugation von *S. erythraea*

Für die Konjugation von *S. erythraea* zur Untersuchung unterschiedlicher Mutanten der AT6-Domäne aus DEBS wurde ein durch Dr. Susanna Kushnir, Dr. Uschi Sundermann und Kyra Koopmans optimiertes Protokoll verwendet.<sup>[258f,264]</sup> Die Zusammensetzungen der Medien dieses Abschnitts sind in Tabelle 35 zu finden.

Als Donor wurde *E. coli* ET12568/pUZ8002 eingesetzt. Dieser methylierungsdefiziente Stamm ist mit dem Helferplasmid pUZ8002 (RP4-Derivat) transformiert, welches den Stamm zum

DNA-Transfer über eine Plasmabrücke mit dem Rezipienten befähigt. Dabei wird pUZ8002 selber nicht transferiert. Als Rezipient wurde *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> verwendet, dessen AT6-Domäne aus DEBS durch eine Hygromycinresistenzkassette ersetzt wurde.<sup>[258f]</sup> Die konjugierte DNA wird durch sequenzspezifische Rekombination in das Genom des Rezipienten integriert.<sup>[258f]</sup>

#### **a) Vorbereitung des Donorstammes *E. coli* ET12568/pUZ8002**

Je ein 50 µL Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* ET12568/pUZ8002 (Kapitel V6.1.1) wurden mit 1 – 4 µL zu konjugierendem Plasmid transformiert (Kapitel V6.1.1) und auf LB-Agar mit Kanamycin (50 µg/mL), Chloramphenicol (20 µg/mL) (Resistenzen durch pUZ8002 vermittelt) und Apramycin (50 µg/mL) (Resistenz durch die Plasmide pJA-W6 – W29 und pJA-M6 – M29 vermittelt) plattiert. Anschließend wurden je 2 mL LB-Medium mit den genannten Antibiotika in 13 mL-Röhren (Sarstedt) mit je einer Kolonie der Zellen angeimpft und über Nacht bei 30°C und kräftigem Schütteln kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen auf das Doppelte bis Dreifache mit dem Medium verdünnt und nochmals für zwei Stunden kultiviert. Um die Antibiotika aus dem Medium zu entfernen wurde insgesamt dreimal mit TSB-Medium gewaschen. Dafür wurden die Zellen jeweils bei 3200 x g für 5 min sedimentiert und jeweils in 2 mL TSB-Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut sedimentiert und jeweils in lediglich 50 µL TSB-Medium resuspendiert.

#### **b) Vorbereitung des Rezipientenstammes *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup>**

Am Tag der Konjugation wurden Sorbitolstammlösungen von *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> (Kapitel V6.4.1) bei Raumtemperatur aufgetaut oder in TSB-Medium frisch kultiviertes Mycel verwendet. Pro Konjugation wurden ca. 5 mL Sorbitolstammlösung oder 2 mL der frischen Kultur verwendet. Um das Sorbitol und die Antibiotika aus dem Medium zu entfernen wurde dreimal mit TSB-Medium gewaschen. Dafür wurde jeweils bei 3200 x g für 5 – 8 min zentrifugiert und das Mycel in 5 mL TSB-Medium resuspendiert. Abschließend wurde das Mycel erneut sedimentiert und in so wenig Volumen TSB-Medium wie möglich aufgenommen.

#### **c) Konjugation und Selektion**

Für die eigentliche Konjugation wurden jeweils 200 µL vorbereiteter Rezipient mit je 50 µL Donorstamm vermischt und auf vorgewärmten SY<sup>+</sup>-Agarplatten punktweise verteilt. Die Zellsuspension wurde kurz bei geöffneter Petrischale unter der Sterilbank (Tabelle 16) getrocknet bis das Medium nicht mehr auf der Platte verlief. Im Anschluss wurde mit Hilfe eines Einwegspatels plattiert. Nach Inkubation für 27 h bei 30°C wurden die Zellen mit je 3 mL *Soft*-Agar überschichtet. Zur Selektion der konjugierten Actinomyceten enthielt der *Soft*-Agar Phosphomycin (80 µL einer 100 mg/mL Stammlösung pro Platte) und Apramycin (16 µL einer



50 mg/mL Stammlösung pro Platte). Auf das Gesamtvolumen einer Agarplatte berechnet ergab sich damit eine Phosphomycinkonzentration von etwa 300 µg/mL, um Kokontaminationen mit den als Donor verwendeten *E. coli* zu vermeiden. Die Agarplatten wurden solange bei 30°C inkubiert bis einzelne braune Actinomycetenkolonien durch die obere Schicht wuchsen. Dies konnte bis zu zehn Tage dauern. Einzelne Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern *gepatched* und jeweils in etwa 1 cm x 1 cm großen Quadraten auf ABB13-Agar mit Phosphomycin (100 µg/mL) und Apramycin (50 µg/mL) verteilt. Nach fünf bis sieben Tagen Inkubation bei 30°C bildeten die Transkonjuganten braunes Mycel und konnten zur Fermentation verwendet werden.

## 6.2 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Die Rezepte der in diesem Abschnitt beschriebenen Medien sind in Tabelle 33 zu finden. Die jeweiligen Konzentrationen der Antibiotika sind in Tabelle 36 aufgeführt. Kultivierungen von *E. coli* fanden in unterschiedlichen Volumina statt, wobei in der Regel ein Medien-zu-Kolbenvolumen-Verhältnis von 1:10 eingehalten wurde. Kulturen in 13 mL-Röhren (Sarstedt) wurden in einem Medienvolumen von 2 mL durchgeführt. Bei Expressionen von rekombinanten Protein wurden zusätzlich Negativkontrollen verwendet, um schwach exprimierte Proteine durch einen Vergleich von *E. coli*-eigenen Proteinen unterscheiden zu können. Die Medien enthielten dafür 1% Glucose (w/v) zur Kataboliturdrückung der Transkription transformierter Zellen. Falls nicht anders angegeben wurden die Zellen nach einer Expression lysiert (Kapitel V7.2.1) und die Proteine über SDS-PAGE (Kapitel V7.1) analysiert. Fermentationskulturen hingegen wurden extrahiert (Kapitel V9.1) und über Massenspektrometrie analysiert (Kapitel V10.2).

### 6.2.1 Präparation von Glycerolstammlösungen

*E. coli* Kulturen wurden stets in Glycerolstammlösungen gelagert. Dafür wurden dicht angewachsene, bei 30°C kultivierte Übernachtskulturen mit dem gleichen Volumen 80%-igem Glycerol (v/v) gemischt und in 1 mL-Aliquoten bei -80°C eingefroren.

### 6.2.2 Expressionen von AbFS und einzelnen Domänen

#### a) Expressionen der AbFS

Die AbFS wurde im Rahmen dieser Arbeit in *E. coli* Origami(DE3) [pBadM30-*abfs*], Rosetta-gami™ 2(DE3) [pBadM30-*abfs*], Top10 [pBadM30-*abfs*], BL21-Gold(DE3) [pET27mod-*abfs*], BL21-Gold(DE3) [pETM11-*abfs*], BL21-Gold(DE3) [pETM30-*abfs*], Rosetta(DE3) [pETM30-

*abfs*] und Rosetta-gami<sup>TM</sup> 2(DE3) [pETM30-*abfs*] zwar erfolgreich, aber im Wesentlichen unlöslich exprimiert.

Für die Vorkulturen wurde jeweils TB-Medium mit 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% (w/v) Glucose und den zur Selektion der Stämme benötigten Antibiotika (Tabelle 17) mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C und kräftigem Schütteln inkubiert. Für die Hauptkultur wurde TB-Medium mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> und den zur Selektion der Plasmide benötigten Antibiotika (Tabelle 18) verwendet. Die Hauptkultur wurde mit 1% Inokulum angeimpft und bei 30°C und kräftigem Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,9 kultiviert. Die Expression wurde je nach Vektorsystem mit 12 mM Arabinose (pBAD-Vektoren) oder mit 1 mM IPTG (pET-Vektoren) induziert und die Zellen für 18 – 24 h bei 19°C und kräftigem Schütteln kultiviert. Nur im Falle der Expression aus Rosetta-gami<sup>TM</sup> 2(DE3) [pETM30-*abfs*] musste die Kultur vor der Induktion bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,2 kultiviert werden. Andernfalls wurde kein rekombinantes Protein durch die Zellen produziert. Die hier beschriebenen Expressionen erfolgten in Kulturvolumina von 2,5 mL in 25 mL-Erlenmeyerkolben bis zu 500 mL in 5 L-Erlenmeyerkolben.

### **b) Expression einzelner AbFS-Domänen**

Auch die Expression einzelner Domänen der AbFS in *E. coli* Top10 [pBADM11-*fcyc*1/2], Top10 [pBADM11-*ggpps*1/2], BL21-Gold(DE3) [pETM11-*fcyc*/1/2], BL21-Gold(DE3) [pETM11-*ggpps*/1/2], Rosetta-gami<sup>TM</sup> 2(DE3) [pETM11-*fcyc*] und Rosetta-gami<sup>TM</sup> 2(DE3) [pETM11-*ggpps*] erfolgte nach den Kultivierungsbedingungen aus Kapitel V6.2.2 a).

Lösliche Expression der GGPPS aus BL21-Gold(DE3) [pETM11-*ggpps*] wurde nur erhalten wenn die OD<sub>600</sub> der Zellen vor der Induktion mit IPTG zwischen 1,3 und 2 lag.

### **c) Koexpression der AbFS mit Chaperonen aus *S. coelicolor***

Das für die Chaperone GroEL1, GroEL2 und GroES aus *S. coelicolor* codierende Plasmid pL1SL2 stammt aus der Arbeitsgruppe Leadlay und basiert auf dem pETcoco-2-Vektor von Novagen.<sup>[166a]</sup> Die pETcoco-Vektoren besitzen zwei unterschiedliche Replikationsursprünge. Wird dem Kulturmedium 0,2% Glucose (w/v) hinzugefügt, liegt der Vektor nur in einfacher Kopie in der *E. coli*-Zelle vor, was unter anderem vorteilhaft für die Expression von toxischen Proteinen sein kann.<sup>[166b]</sup> Bei Zugabe von 0,01% L-Arabinose (w/v) kommen bis zu 40 Kopien des Vektors in einer Zelle vor, dies wird beispielsweise bei der Propargierung des Vektors zur Plasmidpräparation ausgenutzt.<sup>[166b]</sup>

Für die Koexpression der AbFS mit den Chaperonen aus *S. coelicolor* wurden BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, BL21-CodonPlus(DE3)-RP, BL21-Gold(DE3) und Rosetta-gami<sup>TM</sup> 2(DE3) schrittweise mit pL1SL2 und pETM30-*abfs* nach Kapitel V6.1.1 transformiert und analog zu Kapitel V6.2.2 a kultiviert. Die jeweiligen Expressionsmedien enthielten zusätzlich zum Vergleich jeweils 0,2% Glucose (w/v) und 0,01% L-(+)Arabinose (w/v).

### 6.2.3 $\beta$ -Galactosidase-Komplementationsassay und Expression der AbFS-Varianten und Varianten der FCyc-Domäne in *E. coli*

Das Screening potentiell löslicher Varianten der AbFS und der FCyc-Domäne der AbFS erfolgte über einen agarplattenbasierten Blau-Weiß-Assay. Dieser beruhte auf der Komplementierung der  $\beta$ -Galactosidase im Falle eines löslichen Zielproteins innerhalb des Cytosols der Zelle und somit auf einer Blaufärbung von Kolonien durch den Abbau des  $\beta$ -Galactosidasederivats X-Gal.<sup>[174c]</sup> Um dies zu ermöglichen, wurden die mit den Plasmiden pJA\* und pJAAK\*/pJAHE\* (Kapitel V5.7.4) transformierten *E. coli* OmniMAX™ 2T1<sup>R</sup> (Kapitel V6.1.1) auf LB-Agarplatten, die zur Selektion Carbenicillin (100  $\mu$ g/mL) und Doxycyclin (25  $\mu$ g/mL) und für das Screening L-(+)-Arabinose (12 mM), IPTG (0,1 mM) und X-Gal (40  $\mu$ g/mL) enthielten, ausgestrichen.<sup>[177]</sup> Das X-Gal wurde erst nach dem Gießen der Agarplatten auf das abgekühlte Medium mit einem Einwegspatel gleichmäßig verteilt und durch aufrechte Inkubation für mindestens 30 min bei Raumtemperatur in das Medium eindiffundiert. Nach Inkubation der Agarplatten für etwa 2,5 Tage bei Raumtemperatur wurden blaue Kolonien gepickt und die Plasmide für einen Testrestriktionsverdau mit *EcoRV* (Kapitel V5.4.1) durch alkalische Lyse (Kapitel V5.2.1) isoliert. Um die optimale Inkubationszeit zu bestimmen, wurden in jedem Experiment zwei Kontrollen ausplattiert. Als Positivkontrolle für die Blaufärbung der Kolonien wurden transformierte *E. coli* OmniMAX™ 2T1<sup>R</sup> mit pBADM11-*lacZ $\alpha$*  verwendet und als Negativkontrolle wurden OmniMAX™ 2T1<sup>R</sup> mit den jeweiligen Reporterkonstrukten transformiert, die für die unmutierten Wildtypgene codierten.

Nur Plasmide die laut dem Restriktionsverdau tatsächlich ein Fragment in der Größe des erwarteten Gens beinhaltenen wurden für weitere Analysen aufbewahrt. Testexpressionen der potentiellen Proteinvarianten erfolgten entweder in OmniMAX™ 2T1<sup>R</sup> oder in Top10 in 2,5 mL in 25 mL-Erlenmeyerkolben analog zu Kapitel V6.2.2. Nach Analyse der Expressionen (Kapitel V7.1), wurden Konstrukte, die zu Expressionsprodukten führten, sequenziert (Kapitel V5.8). Bei *abfs\** wurden dafür die pBAD-spezifischen Oligonukleotide 846 und 879 und die genspezifischen Oligonukleotide *abfsseq\_fw* und *abfsseq\_re* verwendet. Für *fcyc\** wurden aufgrund der geringeren Fragmentlänge lediglich die pBAD-spezifischen Oligonukleotide verwendet.

### 6.2.4 Fermentation des FCdiens durch *E. coli*

Zum Nachweis der Aktivität der AbFS, einzelner Domänen der AbFS oder einzelner Varianten der AbFS wurden die gleichen Kultivierungsbedingungen wie in Kapitel V6.2.2 verwendet. Allerdings betrug die Kultivierungsdauer 48 h und das Hauptkulturmedium enthielt zur direkten Produktadsorption separat sterilisiertes Lewatit® VP OC 1064MD PH (Lanxess). Dieses

unfunktionalisierte Polystyrolharz wurde vor der Verwendung zunächst gründlich mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und nach dem Dekantieren mit 70%-igem Ethanol gemischt. Zur Sterilisation wurde das Harz mindestens eine halbe Stunde mit 70%-igem Ethanol inkubiert und vor der Zugabe zu dem Medium noch einmal gründlich mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Fermentationen wurden in der Regel in einem Kulturvolumen von 500 mL in 5 L-Erlenmeyerkolben durchgeführt.

## 6.2.5 Expression von BM3 aus *B. megaterium* und BM3-Varianten in *E. coli*

### a) Expression in Erlenmeyerkolben

Für die Expression der Monooxygenase Cytochrom P450 BM3 und Varianten dieses Enzyms wurden optimierte Protokolle von Prof. Dr. Frank Schulz verwendet.<sup>[220]</sup> Für die Vorkultur wurden 5 mL LB-Medium in einem 50 mL-Erlenmeyerkolben mit Kanamycin (50 µg/mL) und Doxycyclin (25 µg/mL) mit einer Kolonie *E. coli* BL21-Gold(DE3) [pETM11-*bm3*\*] (siehe Tabelle 23) angeimpft und bei 37°C und unter kräftigem Schütteln über Nacht kultiviert. Für die Hauptkultur wurden 200 mL TB-Medium mit Kanamycin (100 µg/mL) mit 200 µL 1000 x BM3 SE-Mix vermischt und in einem 2 L-Erlenmeyerkolben mit 2 mL der Vorkultur (1% Inokulum) angeimpft. Die Kultur wurde weiter bei 37°C geschüttelt bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 1 erreicht war und die Proteinexpression mit 25 µM IPTG induziert. Anschließend wurden 2 mL des 100 x BM3 Power-Mix hinzugefügt und die Kultivierung bei 20°C für 48 h bei kräftigem Schütteln fortgeführt.

### b) Expression in Reagenzgläsern für die biokatalysierte Oxidation von FCdien

Im Hinblick auf die biokatalysierten Reaktionen von FCdien durch Cytochrom P450 BM3, musste ein Verfahren zur Expression vieler Varianten gleichzeitig entwickelt werden. Daher wurde die Expression in 13 mL-Röhren (Sarstedt) etabliert.

2 mL LB-Medium mit Kanamycin (50 µg/mL) und Doxycyclin (25 µg/mL) wurden mit einer Kolonie *E. coli* BL21-Gold(DE3) [pETM11-*bm3*\*] in einer 13 mL-Röhre (Sarstedt) angeimpft und über Nacht bei 30°C und 150 – 180 rpm (5 cm Auslenkung) kultiviert. Für die Hauptkultur wurden 2 mL BM3-Expressionsmedium mit Kanamycin (100 µg/mL) und 100 µM IPTG in einer 13 mL-Röhre (Sarstedt) mit 200 µL der Vorkultur inokuliert und für 16 h bei 30°C kultiviert.<sup>[206a,216]</sup>

## 6.2.6 Expression der GDH aus *B. megaterium* in *E. coli*

Für die Vorkultur wurden 5 mL LB-Medium mit 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Glucose, Chloramphenicol (25 µg/mL) und Doxycyclin (25 µg/mL) in einem 50 mL-Erlenmeyerkolben mit einer Kolonie

*E. coli* BL21-Gold(DE3) [pACYC-*gdhB.m.*] angeimpft und bei 37°C und unter kräftigem Schütteln über Nacht kultiviert. Als Expressionsmedium wurden 200 mL TB-Medium mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> und Chloramphenicol (25 µg/mL) in einem 2 L-Erlenmeyerkolben verwendet. Die Hauptkultur wurde mit 2 mL der Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,6 bei 37°C kultiviert. Nach Induktion der Expression durch 1 mM IPTG wurde die Temperatur auf 30°C reduziert und die Kultivierung für 6 h unter kräftigem Schütteln fortgeführt. Nach Lyse der Zellen wurde die Aktivität des Enzyms nach Kapitel V7.6.1 bestimmt.

### 6.2.7 Koexpression der BM3-F87A-Variante mit der ADHL.b. in *E. coli*

Für die Koexpression der F87A-Variante von BM3 mit der ADH aus *L. brevis* wurden chemisch kompetente BL21-Gold(DE3) gleichzeitig mit jeweils 1 µL pET27mod-*f87a* und pET21b-*adhL.b.* transformiert (Kapitel V6.1.1) und auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/mL), Carbenicillin (100 µg/mL) und Doxycyclin (25 µg/mL) selektiert. Eine Kolonie wurde für die Inokulation von LB-Medium mit Kanamycin (50 µg/mL) und Carbenicillin (100 µg/mL) verwendet. Die Kultivierung der Vorkultur erfolgte über Nacht bei 150 rpm (5 cm Auslenkung) und bei 30°C. Für die Hauptkultur wurde BM3-Expressionsmedium mit Kanamycin (100 µg/mL) und Carbenicillin (100 µg/mL) und 1% (v/v) Inokulum verwendet. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wurde die Expression durch 0,5 mM IPTG induziert. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen bei 19°C und 160 rpm (2,5 cm Auslenkung) für 36 – 48 h. Die Expressionen erfolgten in Kulturvolumina von 2 mL in 13 mL-Röhren (Sarstedt) bis zu 1 L in 5 L-Erlenmeyerkolben. Diese Zellen wurden anschließend für die Biokatalyse in organischen Lösungsmitteln (Kapitel V8.2) verwendet.

### 6.2.8 Expression der MVA-Enzyme aus *S. solfataricus* in *E. coli*<sup>[244]</sup>

Für die Expression der MVA-Enzyme wurden im Rahmen der Masterarbeit von Michael Dirkmann unterschiedliche Bedingungen getestet.<sup>[244]</sup> Die hier beschriebenen Kultivierungsbedingungen führten zur erfolgreichen Expression der Proteine, allerdings konnten nur für die HMGS und die HMGR reproduzierbar lösliche Expressionen nachgewiesen werden.

#### a) Expression der AACT, MDC und IDI2

Für die erfolgreiche Expression der AACT, MDC und der IDI2 wurden *E. coli* BL21-Gold(DE3) [pETM11-*aact*], BL21-Gold(DE3) [pETM11-*mdc*] und BL21-CodonPlus(DE3)-RIL [pETM11-*idi2*] verwendet.

Für die Vorkulturen wurden jeweils 2 mL LB-Medium mit 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% (w/v) Glucose und den zur Selektion benötigten Antibiotika (Tabelle 17) in einer 13 mL-Röhre (Sarstedt) mit einer

Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C und 150 – 180 rpm (5 cm Auslenkung) kultiviert. Für das Hauptkulturmedium wurden jeweils 2 mL LB-Medium mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> und Carbenicilin (100 µg/mL, nur für pBAD-Vektoren) bzw. Kanamycin (50 µg/mL, nur für pET-basierte Vektoren) in 13 mL-Röhren (Sarstedt) gemischt und mit jeweils 200 µL der Vorkultur angeimpft (1% Inokulum). Es wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,7 bei 30°C kultiviert und die Expression der transformierten Zellen mit 0,5 – 1 mM IPTG induziert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 30°C und 150 – 180 rpm (5 cm Auslenkung).

### **b) Expression der HMGS**

Für die lösliche Expression der HMGS wurden die Chaperone GroES, GroEL1 und GroEL2 aus *S. coelicolor* aus dem Plasmid pL1SL2 in *E. coli* koexprimiert. Einige Details zur Handhabung dieses Plasmids sind Kapitel V6.2.2 b zu entnehmen.

*E. coli* BL21-Gold(DE3) wurden sequentiell nach Kapitel V6.1.1 erst mit pL1SL2 und anschließend mit pETM11-*hmgs* transformiert. Die Vorkultur und die Hauptkultur erfolgten in großen Teilen analog zu Kapitel V6.2.8 a. Entscheidend für eine effektive lösliche Expression der HMGS war das Vorliegen nur einer Kopienzahl des pL1SL2-Vektors pro Zelle und damit die Zugabe von 0,2% Glucose (w/v) in das Expressionsmedium. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Eine Skalierung der Expression erfolgte bislang ohne Probleme auf einen 200 mL Kulturmaßstab in 2 L-Erlenmeyerkolben. Nach der Lyse der Zellen erfolgte eine Reinigung der HMGS durch Affinitätschromatographie und Thermobehandlung (Kapitel V7.4). Es wurden verschiedene Assays zur Enzymaktivitätsbestimmung (Kapitel V7.6.2) etabliert.

### **c) Expression der HMGR, MVK und PMK**

Die Expressionen der HMGR, MVK und PMK erfolgten in *E. coli* Rosetta-gami<sup>TM</sup> 2(DE3) aus den jeweiligen pBAD-Vektoren. Dabei wurden die Kultivierungsbedingungen aus Kapitel V6.2.8 a verwendet. Allerdings wurden anstatt IPTG 12 mM L-(+)-Arabinose zur Induktion der Proteinexpression verwendet. Die lösliche Expression der HMGR konnte ohne Probleme auf einen Maßstab von 200 mL in 2 L-Erlenmeyerkolben skaliert werden. Die Reinigung der HMGR erfolgte über Affinitätschromatographie und Thermobehandlung (Kapitel V7.4).

## **6.3 Kultivierung und Lagerung von Hefen**

Die Zusammensetzungen der in diesem Abschnitt verwendeten Medien sind in Tabelle 34 beschrieben. Falls nicht anders angegeben wurden die Zellen nach einer Expression lysiert (Kapitel V7.2.1) und die Proteine über SDS-PAGE (Kapitel V7.1) analysiert.

Fermentationskulturen hingegen wurden extrahiert (Kapitel V9.1) und über Massenspektrometrie analysiert (Kapitel V10.2).

### 6.3.1 Lagerung der Hefekulturen

Hefekulturen wurden bis zu zwei Wochen ohne Verlust der Wachstumsaktivität im Kühlschrank wenn möglich auf Selektivagarplatten aufbewahrt. Bei *S. cerevisiae* handelte es sich dabei je nach Stamm um SD-His-Leu- oder um SD-His-Leu-Ura-Agar. Für transformierte *PichiaPink*<sup>TM</sup> wurde PT-Agar verwendet und transformierte *P. pastoris* SMD1168H wurden auf gepufferten YPD-Agarmedien mit Zeocin (50 µg/mL) plattiert. Nicht transformierte *P. pastoris* Stämme hingegen wurden auf YPD-Agar ohne Antibiotika kultiviert.

Für längere Lagerzeiten der Kulturen wurden Glycerolstammlösungen hergestellt. Dafür wurden einzelne Kolonien von den jeweiligen Agarplatten in das jeweilige Flüssigmedium überführt und bei 30°C unter kräftigem Schütteln etwa 1 – 2 Tage kultiviert. 500 µL der stark bewachsenen Kulturen wurden im Anschluss mit 500 µL einer autoklavierten 30%-igen Glycerollösung (v/v) vermischt und bei -80°C gelagert.<sup>[296]</sup>

### 6.3.2 Fermentation des FCdiens und Kultivierung von *S. cerevisiae* im Schüttelkolben

Zur präparativen Fermentation des FCdiens wurde *S. cerevisiae* CEN.PK2-1c [pRS313-*upc2.1* + pRS315-*thmgrS.c.*] nach Kapitel V6.1.2 mit pVV214-*abfs* transformiert. Zunächst wurden 600 mL SD-His-Leu-Ura-Medium in einem 5 L-Erlenmeyerkolben mit einer Kolonie des transformierten Hefestammes inokuliert und bei 30°C und kräftigem Schütteln für ca. 24 h bis zu einer OD<sub>600</sub> ~ 1 kultiviert. Anschließend wurde die Vorkultur in sterile Zentrifugengefäße überführt und bei 3000 x g für 3 min zentrifugiert. Zur Inokulation der Hauptkultur wurden die Zellen zunächst in wenig SD-His-Leu-Ura-Medium mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> aufgenommen und gleichmäßig auf sechs 5 L-Erlenmeyerkolben in insgesamt 6 L Medium verteilt. Zur direkten Produktadsorption wurde dem Hauptkulturmedium separat sterilisiertes 10 g/L Lewatit<sup>®</sup> VP OC 1064MD PH (Lanxess) hinzugefügt. Eine Anleitung zur Sterilisation des Adsorberharzes ist in Kapitel V6.2.4 beschrieben. Die Fermentation erfolgte für 48 h bei 30°C und 110 rpm (5 cm Auslenkung). Präparative Fermentationen wurden nach Kapitel V9.1.1 b extrahiert und nach Kapitel V9.2 gereinigt.

Zur Optimierung von Fermentationsparametern oder zur Testung neu klonierter *S. cerevisiae*-Konstrukte (Tabelle 20) wurden allgemein die gleichen Kultivierungsbedingungen verwendet, aber das Hauptkulturvolumen auf 50 – 100 mL skaliert. Im Zuge der Fermentationsoptimierung wurden Abgasanalysen in dem Arbeitskreis Wichmann (TU Dortmund) durchgeführt. Dafür

wurden die Kolben mit Gassensoren (Blue Sens, Gas Sensor GmbH) für CO<sub>2</sub> und Ethanol ausgestattet. Die Kulturen wurden im Anschluss nach Kapitel V9.1.1 a extrahiert und quantifiziert.

### 6.3.3 Fütterungen von Glucose zur Optimierung der Fermentation des FCdiens durch *S. cerevisiae*

Für die Fütterungsexperimente wurde ein kleiner durch einen Magnetrührer bei 800 rpm (RCT classic, IKA) angetriebener Glasrührkessel mit einem maximalen Fassungsvermögen von 2 L verwendet. Die Sauerstoffzufuhr erfolgte über eine Aquariumpumpe (precision air 550r plus, Sera®) mit maximal 9,2 L/min. Für die Temperierung wurde ein Wasserbad mit einem elektronischen Kontaktthermometer verwendet.

Für die Fermentation wurden 500 mL SD-His-Leu-Ura mit 20 mM Succinat mit den sedimentierten *S. cerevisiae* CEN.PK2-1c [pRS313-*upc2.1* + pRS315-*thmgrS.c.* + pVV214-*abfs*]-Zellen einer 50 mL-Vorkultur inokuliert (OD<sub>600</sub> ~ 1, siehe Kapitel V6.3.2) und für insgesamt 72 h bei 28°C kultiviert. Nach 22 h (entspricht der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen unter den gewählten Kultivierungsbedingungen) wurden 1,5% (w/v) Glucose hinzugefüttert. Zur Kontrolle des pH-Werts und der OD<sub>600</sub> wurde mehrfach 1 mL der Kultur entnommen. Die Quantifizierung (Kapitel V9.1) des FCdiens erfolgte über GC-FID (Kapitel V10.2.1).

### 6.3.4 Fermentation des FCdiens durch *S. cerevisiae* in Bioreaktoren

Um die Fermentation des FCdiens auf einen größeren Maßstab zu skalieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Bioreaktoren, zum Teil in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen, verwendet. Für alle Experimente wurden *S. cerevisiae* CEN.PK2-1c [pRS313-*upc2.1* + pRS315-*thmgrS.c.* + pVV214-*abfs*] verwendet. Die Vorkultur erfolgte jeweils in SD-His-Leu-Ura-Medium mit einem auf die Hauptkultur angepasstem Volumen (jeweils 1/10 der Hauptkultur) mit den in Kapitel V6.3.2 angegebenen Kultivierungsbedingungen. Vor der Inokulation wurden die Zellen jeweils bei 3000 x g sedimentiert und in wenig Hauptkulturmedium aufgenommen.

#### a) Fermentation im „Biostat C“

Die FCdien-Fermentation mit dem Steuermodul „Biostat C“ der Firma B. Braun Biotech erfolgte in einem Rührkessel aus Stahl mit einem maximalen Fassungsvermögen von 30 L in der Medienküche des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie. Die Fermentation erfolgte in 25 L gep. YPD-Medium mit 5 g/L separat sterilisiertem C18-Silicagel (97727-U Supelco, Sigma-Aldrich) zur *in situ* Produktadsorption. pH und Temperatur wurden konstant bei pH 7,8



und 30°C gehalten. Die Kultur wurde für 48 h bei 600 rpm kultiviert. In den ersten 24 h wurde eine Belüftungsrate von etwa 0,5 vvm verwendet und am zweiten Tag eine Belüftungsrate von 1 vvm. Insgesamt wurden 18 mL 10%iges Antifoam 204 (Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Die Aufarbeitung der Kultur erfolgte nach Kapitel V9.1.1 b und Kapitel Kapitel V9.2.

#### **b) Fermentationen im „KLF2000“**

Die Fermentationen im „KLF2000“ der Firma Bioengineering mit einem maximalen Fassungsvermögen von 3,1 L wurden zusammen mit der Arbeitsgruppe Wichmann (TU Dortmund) in einem Kulturvolumen von 1,6 - 1,8 L durchgeführt. Die Fermentationen erfolgten in gep. YPD-Medium. Es wurden unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen und pH-Werte des Mediums getestet. Durch entsprechende Sensoren waren die Überprüfungen von O<sub>2</sub>, Ethanol und CO<sub>2</sub> im Abgas sowie die Bestimmung des O<sub>2</sub>-Partialdrucks im Medium möglich. In der Regel wurden alle vier Stunden Proben für die *offline*-Bestimmung der Glucose-, Essigsäure- und Ethanolkonzentration im Medium entnommen. Außerdem wurde der zeitliche Verlauf der OD<sub>600</sub> überwacht und die FCdien-Konzentration an verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert (Kapitel V9.1.1 a).

#### **c) Fermentationen im „BIOFLO® 415“**

Die Fermentationen des FCdiens durch *S. cerevisiae* im „BIOFLO® 415 Fermentor“ der Firma New Brunswick/Eppendorf mit einem maximalen Fassungsvermögen von 5 L wurden jeweils in einem Kulturvolumen von 3 L durchgeführt. Die Kalibrierung der pH-Sonde erfolgte vor der Sterilisation des Bioreaktors, die Kalibrierung der Sauerstoffsonde erst danach. Um das Verdampfen von Wasser während des Sterilisationsprozesses auszugleichen, wurden die Bestandteile für 3 L SD-His-Leu-Ura (ohne Glucose und MgCl<sub>2</sub>) abgewogen und in insgesamt 3,5 L im Bioreaktor sterilisiert. 150 mL separat autoklavierte 40%-ige Glucoselösung und 3 mL separat autoklavierte 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung wurden nach dem Abkühlen des Mediums über eine der Pumpen zu dem Medium hinzugegeben. Anschließend wurde die Sauerstoffsonde kalibriert. Vor der Inokulation des Mediums wurden separat autoklavierte Vorräte für 3%-ige Antifoam A-Lösung (Sigma-Aldrich), sowie 1 M KOH- und H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung an die Pumpen des Fermenters angeschlossen. Der gewünschte pH-Wert des Mediums wurde über die Zugabe kleiner Mengen dieser KOH- oder H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Lösungen eingestellt. Anschließend wurden die Pumpen aktiviert, so dass Schwankungen des pH-Werts während der Fermentation durch die automatisierte Zugabe von Base und Säure ausgeglichen werden konnten. Außerdem wurde ein Schaumsensor (Lvl2) unterhalb des Deckels des Bioreaktors aktiviert (Pump → Assignment: Lvl2 wet), der bei Kontakt mit einer Flüssigkeit zur automatisierten Abgabe kleiner Mengen Antifoam in das Fermentationsmedium führte.

Die bei 3000 x g für 3 min zentrifugierten Zellen der Vorkultur wurden in 100 mL SD-Ura-His-Leu-Medium resuspendiert, zum Inokulieren der Hauptkultur in den Bioreaktor gepumpt und für zwei Tage bei 30°C kultiviert.

In unterschiedlichen Fermentationen wurden Parameter wie die Sauerstoffsättigung (DO-1) und der pH-Wert variiert. Die Rührerfrequenz (Agitation) und die Gaszufuhr (GasFlo) waren dabei über zwei Kaskaden über die Sauerstoffsättigung gekoppelt. Eine Übersicht über die eingestellten Parameter ist Tabelle 93 zu entnehmen.

**Tabelle 93: Eingestellte Parameter und Kaskaden während den FCdien-Fermentationen im „BIOFLO® 415 Fermentor“ der Firma New Brunswick/Eppendorf.** Die Bezeichnungen der einzelnen Parameter sind dem Menü des Bioreaktors entnommen. DO-1: Sauerstoffsättigung, Agitation: Rührerfrequenz, GasFlo: Gaszufuhr.

Nr.	pH	DO-1	Agitation		GasFlo	
1	3,6	60%	Cascade DO-1		Cascade DO-1	
			Setpoint	150 – 800 rpm	Setpoint	1/0,5 – 10 L/min
			Output DO-1	0 – 70%	Output DO-1	20 – 60%
2	3,6	50%	Cascade DO-1		Cascade DO-1	
			Setpoint	150 – 800 rpm	Setpoint	0,5 – 10 L/min
			Output DO-1	0 – 70%	Output DO-1	20 – 60%
3	4,1	40%	Kaskade DO-1		Kaskade DO-1	
			Setpoint	150 – 500 rpm	Setpoint	0,5 – 20 L/min
			Output DO-1	-50 – 70%	Output DO-1	20 – 60%
4	4,1	40%	Kaskade DO-1		Kaskade DO-1	
			Setpoint	150 – 500 rpm	Setpoint	0,5/0,1 – 20 L/min
			Output DO-1	-50 – 70%	Output DO-1	10 – 100%
5	6,1	40%	Kaskade DO-1		Kaskade DO-1	
			Setpoint	150 – 500 rpm	Setpoint	0,1 – 5 L/min
			Output DO-1	-50 – 70%	Output DO-1	20 – 100%
6	3,6	30%	Kaskade DO-1		Kaskade DO-1	
			Setpoint	50 – 400 rpm	Setpoint	0,1 – 10 L/min
			Output DO-1	-100 – 40%	Output DO-1	35 – 100%
7	6,0	40%	Kaskade DO-1		Kaskade DO-1	
			Setpoint	200 – 650 rpm	Setpoint	1 – 10 L/min
			Output DO-1	-100 – 70%	Output DO-1	20 – 100%
8	4,0	40%	Kaskade DO-1		Kaskade DO-1	
			Setpoint	200 – 650 rpm	Setpoint	2,5 – 10 L/min
			Output DO-1	-100 – 70%	Output DO-1	20 – 100%

Zur Kontrolle unter dem Lichtmikroskop auf Kontaminationen, des pH-Werts, der OD<sub>600</sub> und zur Quantifizierung des FCdiens (Kapitel V9.1.1 a) wurden jeweils zweimal am Tag ca. 5 mL der Kultur entnommen. 10 g/L des Polystyrolharzes Lewatit® VP OC 1064MD PH (Lanxess) wurden erst nach Abschluss der Fermentation zur Produktadsorption über Nacht unter ständigem Rühren mit der Fermentationsbrühe inkubiert. Nur Fermentationen die nach abgeschlossener Quantifizierung (Kapitel V9.1.1 a) hinreichende Mengen FCdien lieferten, wurden über Säulenchromatographie (Kapitel V9.2) gereinigt.

### 6.3.5 Expressionen der AbFS in *Pichia pastoris*

#### a) Konstitutive Expression der AbFS in *P. pastoris* SMD1168H [pGAPZ( $\alpha$ )A-*abfs*]<sup>[191b]</sup>

Zur konstitutiven, intrazellulären bzw. sekretorischen Expression der AbFS in *P. pastoris* wurde *P. pastoris* SMD1168H mit pGAPZA-*abfs* bzw. pGAPZ $\alpha$ A-*abfs* transformiert (Kapitel V6.1.3). Anschließend wurden jeweils vier Klone für die Expression in gep. YPD Tabelle 34 ausgewählt. Zunächst wurden jeweils 2 mL gep. YPD-Medium mit 50  $\mu$ g/ml Zeocin als Selektionsmittel und mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> in 13 mL-Reagenzgläsern mit einer Kolonie angeimpft und ca. für 24 h bei 30°C und 180 rpm (5 cm Auslenkung) kultiviert. Im Anschluss wurden für die Hauptkultur 5 mL gep. YPD-Medium mit 50  $\mu$ g/mL Zeocin und mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,1 mit der Vorkultur angeimpft und für 48 h bei 30°C und 180 rpm (5 cm Auslenkung) kultiviert.

#### b) Induzierbare Expression der AbFS in *Pichia Pink*<sup>TM</sup> [pPinkH( $\alpha$ )-*abfs*]

Für die Expression der AbFS durch *PichiaPink*<sup>TM</sup> wurden die Vektoren pPinkHC-*abfsa* zur intrazellulären Expression und pPinkHC-*abfsb* zur sekretorischen Proteinexpression konstruiert (Kapitel V5.6). Nach erfolgreicher Transformation von *PichiaPink*<sup>TM</sup> nach Kapitel V6.1.3 wurden pro Konstrukt acht verschiedene Klone auf ihre Fähigkeit zur Proteinexpression getestet. Dafür wurden jeweils 20 mL BMGY-Medium in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit je einer Kolonie angeimpft und für 24 – 36 h bei 30°C und 180 rpm (5 cm Auslenkung) inkubiert. Im Anschluss wurden die Vorkulturen bei 1500 x g für fünf Minuten zentrifugiert und die Zellen in etwa 1/7 (ca. 3 mL) des Vorkulturvolumens in MM- (Selektiv-) oder BM-(Komplex-) Medium aufgenommen und für drei Tage bei 30°C und 180 rpm (5 cm Auslenkung) in 13 mL-Röhren (Sarstedt) inkubiert. In beiden Medien sind 0,5% Methanol (v/v) zur Induktion der Expression enthalten. Es wurden jeweils in einem Abstand von 24 h 100  $\mu$ L-Proben für eine SDS-PAGE-Analyse entnommen (Kapitel V7.1) und jeweils 1/10 des Gesamtvolumens 5%-iges Methanol hinzugefügt. Jeweils einer in den Testexpressionen und nach Kapitel V5.3.7 b positiv getesteter Klon wurde für Kultivierungen im größeren Maßstab (7 mL Hauptkulturvolumen) ausgewählt. Dabei wurden 100 mL-Erlenmeyerkolben mit Stahlspirale verwendet, da die

Stahlschrauben zu Verwirbelungen im Medium und so zu einer Erhöhung der Sauerstofftransfertrate führen.

## 6.4 Kultivierung und Lagerung von Actinomyceten

Das Wachstum von Actinomyceten ist durch die Ausbildung eines Mycels und durch hohe Sauerstoffanforderungen geprägt. Deswegen wurden bei ihrer Kultivierung im Erlenmeyerkolben Stahlschrauben verwendet, die zum einen für eine höhere Sauerstofftransfertrate sorgten und zum anderen das Verklumpen des Mycels verhinderten. Während ihrer Kultivierung in 24-Lochplatten (vertrieben durch Dunn Labortechnik GmbH, Katalog-Nr.: 360013) beugten Glasperlen der Verklumpung des Mycels vor. Außerdem erfolgte die Kultivierung der Actinomyceten ausschließlich in dem Schüttler „InforsHT Multitron Standard“ (Tabelle 16), der mit 5 cm eine größere Auslenkung besitzt. Die Zusammensetzungen der in diesem Abschnitt genannten Medien sind in Tabelle 35 beschrieben. Zu den Medien wurde häufig Phosphomycin (100 µg/mL) zum Schutz vor Kontaminationen mit anderen Bakterien hinzugegeben, da Actinomyceten, nicht aber Gram-negative Bakterien wie *E. coli*, eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum aufweisen. Kontaminierte Stämme können durch mehrmaliges vereinzeln auf Actinomyceten-Isolationsagar und durch die Verwendung eines Antibiotikacocktails bestehend aus Erythromycin (50 µg/mL), Polymixin B (50 µg/mL), Phosphomycin (100 µg/mL) und Nistatin (50 µg/mL) gereinigt werden. Falls nicht anders angegeben wurden die Fermentationskulturen extrahiert (Kapitel V9.1) und über Massenspektrometrie analysiert (Kapitel V10.2). Im Allgemeinen stammen die in dieser Arbeit verwendeten Protokolle zur Handhabung von Actinomyceten der Dissertation von Uschi Sundermann.<sup>[258f]</sup>

### 6.4.1 Lagerung von Actinomyceten

#### a) Lagerung auf Agar

Nach Abschluss der Kultivierung bei 30°C wurden mit Actinomyceten bewachsene Agarplatten bis zu vier Wochen bei Raumtemperatur in Plastiktüten im Dunklen gelagert.

#### b) Präparation von Glycerolstammlösungen

In TSB-Medium für 1 - 2 Tage kultivierte Actinomyceten wurden mit 80%-igem Glycerol als Gefrierschutzmittel gemischt, so dass eine Endkonzentration von 20% (v/v) Glycerol erhalten wurde und in 1,2 - 1,6 mL Aliquoten bei -80°C gelagert.

### c) Präparation von Sorbitolstammlösungen

Der für die Konjugation benötigte Rezipient *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> wurde in Sorbitol gelagert. Auf diese Weise gelagerte Mikroorganismen können in der Regel im Gegensatz zu Glycerolstammlösungen ohne erneute Kultivierung, nach dem Auftauen und Entfernen des Sorbitols, für weiterführende Anwendungen direkt verwendet werden. 15 mL TSB-Medium mit Hygromycin (25 µg/mL) wurden dafür mit 1,2 mL einer Glycerolstammlösung in einem 250 mL-Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 30°C und 180 rpm (5 cm Auslenkung) für 1 – 2 Tage kultiviert. Anschließend wurden 7,5 mL der Kultur mit 7,5 mL 2 M Sorbitol in einem 15 mL Zentrifugengefäß gemischt und bei -80°C gelagert.

### 6.4.2 Fermentation von Erythromycin und Erythromycinderivaten durch *S. erythraea*

Zur Durchmusterung der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten AT6-Mutanten (siehe Kapitel V5.3.6 und Kapitel V5.7.7) wurden routinemäßig je vier Klone der konjugierten *S. erythraea*-Varianten (siehe Kapitel V6.1.4) in 24-Lochplatten (vertrieben durch Dunn Labortechnik GmbH, Katalog-Nr.: 360013), die pro Kavität 3 – 4 Glasperlen (2,85 – 3,45 mm Durchmesser, Carl Roth) enthielten, kultiviert. Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Fermentation wurden außerdem jeweils in vier separaten Kavitäten der Wildtyp *S. erythraea* NRRL-B-24071 oder der, durch Konjugation der *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup>-Variante mit pKSSU89, wiederhergestellte Wildtyp kultiviert. 3 mL TSB-Medium mit Apramycin (25 µg/mL, Konjuganten) bzw. Phosphomycin (100 µg/mL, nur Wildtyp) wurden für die Vorkultur jeweils mit einem 1 cm x 1 cm großen bewachsenen Agarstück angeimpft und für zwei Tage bei 30°C und 180 rpm (5 cm Auslenkung) im Duetz-System (Kuhner) kultiviert. Die 24-Lochplatten wurden dafür mit einem selbstklebenden und gasdurchlässigen Film auf Polyurethanbasis (T093.1 von Carl Roth) steril verschlossen. Für die Hauptkultur wurden anschließend jeweils 3 mL SM3-Medium mit je 150 µL der Vorkultur angeimpft und für fünf Tage bei 30°C und 180 rpm (5 cm Auslenkung) im Duetz-System (Kuhner) kultiviert. Zur gleichmäßigen Durchlüftung aller Kavitäten wurden im Falle der Hauptkultur mit Silikonmoosgummi ausgestattete Deckel (Kuhner) verwendet. Sollte der Einbau durch die PKS-Maschinerie von artifiziell PropargylM-SNAC getestet werden, wurden je 2,7 mL SM3-Medium mit je 300 µL PropargylM-SNAC (100 mM, gelöst in den löslichen Bestandteilen des SM3-Mediums) vorgemischt, mit 150 µL Vorkultur angeimpft und ebenfalls für fünf Tage bei 30°C kultiviert.

### 6.4.3 Fermentationen von Monensin und Monensinderivaten durch *S. cinnamonensis* im Schüttelkolben

Die Fermentationen von Monensin und Monensinderivaten erfolgten vergleichend durch *S. cinnamonensis* PFL A519 und *S. cinnamonensis* PFL A001 jeweils in BM- und SM16-Medium. Für die Vorkulturen wurden jeweils 15 mL TSB-Medium in 250 mL-Erlenmeyerkolben mit 1,2 – 1,5 mL Glycerolstammlösungen angeimpft und für ca. 24 h bei 30°C und 180 rpm (5 cm Auslenkung) kultiviert. Auch die Hauptkulturen erfolgten in 15 mL in 250 mL-Erlenmeyerkolben bei 30°C und 180 rpm mit einem Inokulum von 5% (v/v). Fütterungsexperimente zur Überprüfung der Substratpromiskuität der AT5-Domäne der Mon- PKS erfolgten jeweils mit 10 mM der Malonsäure-SNAC-Derivate. Dafür wurden zu den Hauptkulturmedien jeweils 1,5 mL 100 mM AllylM-, ButylM-, HexylM-, PhenylM-, PropargylM- oder PropylM-SNAC hinzugegeben. Die Kulturen im BM-Medium wurden für insgesamt acht Tage inkubiert, wobei am siebten Tag zusätzlich 3% (v/v) Sojaöl hinzugegeben wurden. Die Kultivierung im SM16-Medium wurde nach fünf Tagen abgebrochen, wobei am vierten Tag jeweils ca. 20 g/L steriles XAD16N Amberlite® (Sigma-Aldrich) zur Produktadsorption hinzugefügt wurden. Die Sterilisation des Polyesterharzes erfolgte dabei auf die gleiche Weise wie in Kapitel V6.2.4 beschrieben.

## 7 Proteinchemische Arbeitstechniken

### 7.1 SDS-PAGE

Zur Analyse von Expressionen rekombinanter Enzyme (Kapitel V6.2 und Kapitel V6.3) und zur Auswertung des Erfolgs von Proteinreinigungen (Kapitel V7.4) wurde die SDS-PAGE verwendet.<sup>[297]</sup> Zusammensetzungen der Puffer für die SDS-PAGE sind Tabelle 47 zu entnehmen.

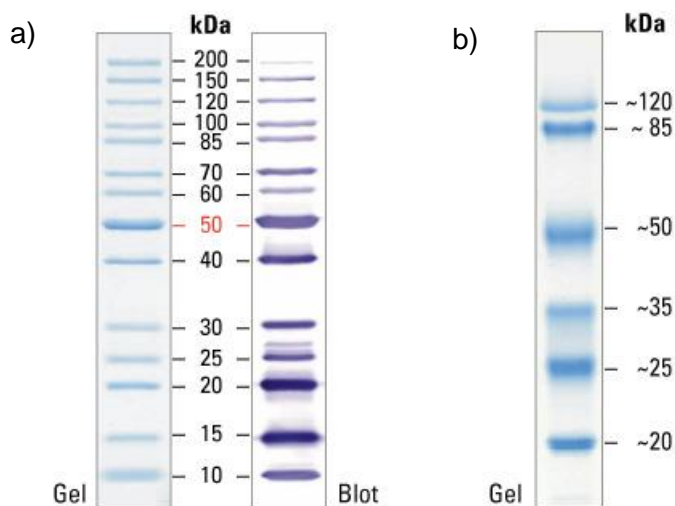
Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte im „Mini-PROTEAN® 3 Cell-System“ mit Hilfe der Spannungsquellen „PowerPac™ HC“ oder „PowerPac™ basic“ (Tabelle 16). Je nach Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins wurden 10%-ige oder 15%-ige diskontinuierliche Gele nach Tabelle 94 hergestellt.

**Tabelle 94: Zusammensetzungen der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten SDS-Gele.** Die hier angegebenen Volumina reichten für jeweils vier Gele mit 0,75 mm Dicke.

Komponente	Trenngel (10%)	Trenngel (15%)	Sammelgel (5%)
ddH <sub>2</sub> O	9,9 mL	5,7 mL	3,6 mL
Sammelgelpuffer	6,3 mL	6,3 mL	-
Trenngelpuffer	-	-	0,7 mL

Komponente	Trenngel (10%)	Trenngel (15%)	Sammelgel (5%)
SDS 10%	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	53 $\mu$ L
Acrylamid 30% (37,5:1)	8,3 mL	12,5 mL	0,9 mL
10% APS	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	57 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	5 $\mu$ L

Die zu analysierenden Proben wurden jeweils mit SDS-Ladepuffer gemischt und bei 98°C für 5 min denaturiert. Anschließend wurden pro Geltasche maximal 12,5  $\mu$ L der Proben und der Proteingrößenstandards „PageRuler Unstained Protein Ladder“ und/oder „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ der Firma Thermo Scientific (Abbildung 108) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer bei 160 – 180 V für ca. 40 min. Anschließend wurde das Gel mit etwa 50 mL Coomassielösung überschichtet und für ca. 60 s bis zum Sieden der Coomassielösung bei höchster Leistung in der Mikrowelle erhitzt und für weitere 15 min in der Coomassielösung bei Raumtemperatur und bei leichtem Schwenken (Mini Gyro Rocker SSM3, Tabelle 16) inkubiert. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung inkubiert bis nur noch die Proteinbanden auf dem Gel sichtbar waren und das Gel dokumentiert (Geldokumentation, Tabelle 16). Die Entfärbelösung wurde dabei mehrmals durch frische ersetzt und durch Reinigung über einen Aktivkohlefilter recycelt.



**Abbildung 108: Verwendete Proteingrößenstandards der Firma Thermo Scientific für die Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen durch SDS-PAGE.** a) PageRuler Unstained Protein Ladder b) Prestained Protein Molecular Weight Marker.

## 7.2 Aufarbeitung von Expressionskulturen zur Analyse oder Isolation von Proteinen

### 7.2.1 Zellaufschluss von *E. coli*

Für die SDS-PAGE-Analyse (Kapitel V7.1) des Expressionsprofils, die Proteinreinigung (Kapitel V7.4) oder die Proteinaktivitätsbestimmung (Kapitel V7.6) wurden die Expressionskulturen aus Kapitel V6.2 bei 3200 – 10.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und die Zellsedimente bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und pro 0,1 g Nassgewicht der Zellen in je 1 mL Puffer resuspendiert (Tabelle 48). Je nach Anwendung wurden unterschiedliche Puffer verwendet. Zellen, die durch mechanische Behandlung mittels Ultraschall lysiert werden sollten, wurden in Lysepuffer I, Lysepuffer III (für Zellen zur Expression von BM3 und BM3-Varianten) oder GDH-Puffer (für Zellen zur Expression der GDH) resuspendiert. Nach Inkubation der Zellen für 30 min auf Eis wurden die Zellen je nach Probevolumen bei einer Amplitude von 10 – 30% in drei Cyclen von 30 – 60 s Länge durch kurze Ultraschallpulse (Tabelle 16) aufgeschlossen. Um einer Überhitzung der Proben und damit einer Denaturierung der Proteine vorzubeugen, wurde der Ultraschallaufschluss auf Eis durchgeführt und zwischen jedem Cyclen eine Pause von mindestens 30 s eingehalten. Zellen aus Testexpressionen, deren Volumina zu klein für eine Lyse durch Ultraschall waren, wurden in Lysepuffer II aufgenommen und durch Inkubation für 30 – 60 min auf Eis chemisch lysiert. Nach abgeschlossener mechanischer oder chemischer Lyse wurde für 10 min bei 16.000 – 20.000 x g und 4°C zentrifugiert und zur Trennung von löslichen und unlöslichen Zellbestandteilen der Überstand in ein neues Zentrifugengefäß überführt. Zur Analyse der Ausbildung von *Inclusion Bodies* bei Expressionen wurden die sedimentierten unlöslichen Zellbestandteile in dem gleichen Anfangsvolumen Resuspensionspuffer aufgenommen. Sowohl 50 µL der löslichen, als auch 50 µL der unlöslichen Bestandteile wurden jeweils mit 50 µL 2 x SDS-Puffer gemischt und nach Kapitel V7.1 einer SDS-PAGE unterzogen.

### 7.2.2 Zellaufschluss von *S. cerevisiae*

Für eine Analyse des Expressionsprofils von *S. cerevisiae* wurden bis zu 10 mL einer Kultur aus Kapitel V6.3.2 für 5 min bei 4°C und 1500 x g zentrifugiert und das Zellsediment in insgesamt drei Volumenäquivalenten Glasperlenpuffer (Tabelle 49) resuspendiert. Zur mechanischen Lyse der Zellen wurden vier Volumenäquivalente des anfänglichen Zellsediments vorgekühlte und in Säure gewaschene Glasperlen (Tabelle 37) hinzugefügt und fünf Mal für 30 s kräftig durchmischt (höchste Stufe Vortex, Tabelle 16). Zwischendurch wurde



jeweils für 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Zentrifugengefäß überführt und für 60 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. 50 µL des Zentrifugats wurden mit 50 µL 2 x SDS-Ladepuffer gemischt und über SDS-PAGE nach Kapitel V7.1 analysiert.

### **7.2.3 Zellaufschluss von *P. pastoris***

Zur Analyse der *P. pastoris*-Expressionen wurden bis zu 3 mL der Kulturen aus Kapitel V6.3.5 bei 1500 x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert und die Medienüberstände und Zellsedimente separat in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Nach dem Auftauen der Proben auf Eis wurden die Zellsedimente in 1/4 – 1 Anfangsvolumenäquivalent Lysepuffer III (Tabelle 48) resuspendiert und etwa ein Volumenäquivalent in Säure gewaschene Glasperlen (0,25 – 0,5 mm Glasperlen, Carl Roth) hinzugefügt. Anschließend wurden die Suspensionen acht Mal für 30 s kräftig durchmischt (höchste Stufe, Vortex-Genie 2, Scientific Industries) und jeweils zwischendurch für 30 s auf Eis inkubiert. Zur Trennung der unlöslichen und festen Bestandteile wurde für 10 min bei 4°C und 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Zentrifugengefäß überführt. 100 µL dieser Überstände wurden zur Analyse der intrazellulären Expression mit jeweils 11 µL 10 x SDS-Ladepuffer vermischt und nach Kapitel V7.1 analysiert. Die zu Anfang abgetrennten Medienüberstände zur Analyse sekretorischer Expression wurden entweder ebenfalls direkt mit SDS-Puffer gemischt und per SDS-PAGE untersucht oder zunächst nach Kapitel V7.2.4 aufkonzentriert.

### **7.2.4 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen**

Proteinlösungen wurden in einzelnen Fällen je nach Probevolumen mit „Amicon Ultra-0.5 mL“- bzw. „Amicon Ultra-15 mL“-Zentrifugalfiltereinheiten mit 10.000 MWCO (Molecular weight cut off) der Firma Millipore nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert.

## **7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Bradford**

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung von Gesamtzellextrakten wurde die Methode nach Bradford verwendet.<sup>[298]</sup> Dabei wurden die Proteine mit einer Lösung vermischt, die den Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 enthielt. Dieses Triarylmethansulfonsäurederivat bildet ionische Farbsalze über die kationischen und unpolaren Aminosäureseitenketten der Proteine, wodurch das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 474 nm zu 595 nm verschoben wird. Diese Eigenschaft kann zur Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet werden, falls für die Lösung eine Kalibriergerade eines isolierten Proteins mit bekannten Konzentrationen vorliegt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das „Bradford reagent (ready-to-use) #R1271“ der Firma Fermentas verwendet. 20 µL Proteinlösung wurden jeweils mit 1 mL der bei Raumtemperatur vorgewärmten Bradfordlösung durch Invertieren gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption  $A_{595}$  bei 595 nm ermittelt (Biophotometer, Eppendorf). Die Konzentration  $c$  der zu analysierenden Proteine wurde schließlich über die Kalibrierung mit BSA über einen Konzentrationsbereich von 0 – 2 mg/mL mit der Regression  $A_{595} = 1,088 \cdot c$  [mg/mL] bestimmt.

## 7.4 Reinigung der MVA-Enzyme HMGS und HMGR

### 7.4.1 Affinitätsreinigung über Ni-NTA

Tragen Proteine N- oder C-terminal einen His<sub>6</sub>-Tag, ist eine Reinigung über die Koordination an Trägermaterialien, die mit zweiwertigen Nickel- oder Cobaltionen funktionalisiert sind, über die Affinitätschromatographie möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür eine Ni-NTA-Agarosematrix verwendet, die direkt als freie Beads mit der Proteinlösung inkubiert wurde oder in Säulen gepackt mittels Chromatographie zur Reinigung von Proteinen eingesetzt wurde. Die Zusammensetzungen der Puffer, die für die Proteinreinigung verwendet wurden, sind Tabelle 50 zu entnehmen.

#### a) Reinigung in Lösung mit Hilfe von Ni-NTA-Beads<sup>[244]</sup>

Für die Affinitätsreinigung von Proteinen aus Zelllysaten (Kapitel V7.2.1) in Lösung wurde das in der Masterarbeit von Michael Dirkmann etablierte Protokoll mit „Ni-NTA Agarose“ der Firma Quiagen verwendet.<sup>[244]</sup> Pro mL Lysat wurden ca. 330 µL Beads verwendet. Vor Beginn der Reinigung wurden die Beads zum Entfernen des, zur Lagerung verwendeten Ethanol, mit zwei Volumenäquivalenten Resuspensionspuffer I (Tabelle 48) gewaschen. Anschließend wurde das Lysat mit den Beads gemischt und für 1 h in dem „IntelliMixer“ der Firma NeoLab® bei 20 rpm des Programms C1 im Kühlschrank rotiert. Nach Zentrifugation bei 3200 x g und 4°C für 2 min wurde der Überstand entfernt und die Beads in zwei Anfangsvolumenäquivalenten Waschpuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Proteine für 1 h durch Rotation in dem „IntelliMixer“ im Kühlschrank eluiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die so gereinigten Proteinpräparate entweder für die SDS-PAGE (Kapitel V7.1) verwendet oder durch Thermobehandlung (Kapitel V7.4.2) weiter angereichert.

#### b) Reinigung mit Hilfe von Ni-NTA-Säulen

Zum Vergleich wurden die HMGS und die HMGR auch durch Ni-NTA-Chromatographie mit „HisTrap HP“ Säulen der Firma GEHealthcare mit einem Säulenvolumen von 5 mL gereinigt.

Die Lösungen wurden jeweils mit Hilfe einer Spritze durch die Säule gedrückt, um dies zu bewerkstelligen muss die Säule am oberen Eingang mit einem speziellen Luer-Konnektor (1/16“, GEHealthcare) versehen werden. Vor Beginn der Reinigung wurden die Säulen jeweils mit drei Säulenvolumen Resuspensionspuffer I (Tabelle 48) äquilibriert. Anschließend wurde mindestens ein Säulenvolumen Lysat (Kapitel V7.2.1) auf die Säule gegeben und für ca. 1 h im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit zwei Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen und die Proteine mit insgesamt fünf Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert und jeweils Fraktionen in der Größe eines Säulenvolumens gesammelt. Die Konzentrationen der Fraktionen wurden mittels Bradford (Kapitel V7.3) bestimmt und einzelne Fraktionen konzentriert (Kapitel V7.2.4). Anschließend wurden die Enzyme über eine Thermobehandlung (Kapitel V7.4.2) weiter in der Lösung angereichert und eine SDS-PAGE (Kapitel V7.1) zur Analyse aller Fraktionen durchgeführt.

#### **7.4.2 Anreicherung thermostabiler Proteine durch Thermobehandlung<sup>[244]</sup>**

Bei der heterologen Expression thermostabiler Enzyme in mesophilen Organismen kann die Denaturierung der wirtseigenen Proteine durch Hitze zur Reinigung verwendet werden. Die MVA-Enzyme HMGS und HMGR aus *S. solfataricus* wurden im Rahmen dieser Arbeit durch die Inkubation bei 70°C für 15 min im Wasserbad aus ihren jeweiligen Gesamtzellextrakten (Kapitel V7.2.1) oder aus durch Affinitätschromatographie (Kapitel V7.4.1) vorgereinigten Lösungen angereichert.<sup>[244]</sup> Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben bei 16.000 x g für 10 min zentrifugiert und die Überstände über SDS-PAGE (Kapitel V7.1) analysiert oder nach Kapitel V7.6 die Aktivität der Enzympräparationen bestimmt.

#### **7.5 Proteinrückfaltung aus *Inclusion Bodies*<sup>[244]</sup>**

Das in diesem Kapitel beschriebene Protokoll wurde in der Masterarbeit von Michael Dirkmann entwickelt.<sup>[244]</sup> Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer finden sich in Tabelle 51. Bei der Proteinrückfaltung aus *Inclusion Bodies* werden die Proteinaggregate häufig zunächst bei Anwesenheit hoher Konzentration chaotroper Salze wie z.B. Guanidinhydrochlorid denaturiert, was zu einer Resolvatisierung der Polypeptidstränge führt.<sup>[299]</sup> Wird die Denurantienkonzentration je nach Verfahren entweder langsam oder schnell verringert, nehmen die Proteine im Idealfall ihre native Form an.<sup>[300]</sup>

Für die Rückfaltung der HMGS aus *Inclusion Bodies* wurde die HMGS aus BL21-Gold(DE3) [pETM11-*hmgs*] nach Kapitel V6.2.8 exprimiert, bei 3200 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Nach dem Auftauen auf Eis wurden 0,15 g des Zellnassgewichts in 1 mL Denaturierungspuffer resuspendiert und im „IntelliMixer“ der Firma

Neolab® für 1 h im Programm C1 bei 6 rpm rotiert. Im Anschluss erfolgte die Lyse der Zellen mit Ultraschall nach Kapitel V7.2.1. Die Proteinreinigung erfolgte mit Ni-NTA-Beads (Kapitel V7.4.1) unter denaturierenden Bedingungen mit 6 M Guanidinchlorid im Wasch- und Elutionspuffer (siehe Tabelle 51). Zur langsamen Entfernung des Guanidinhydrochlorids wurde der Elutionspuffer gegen Rückfaltepuffer über Nacht bei Raumtemperatur dialysiert. Vor der Dialyse wurde der Dialyseschlauch mehrmals in Rückfaltepuffer aufgekocht und durch Inkubation für 4 h bei Raumtemperatur in dem Rückfaltepuffer äquilibriert. Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung für 20 min bei 4°C und 3200 x g zentrifugiert und der Überstand via SDS-PAGE (Kapitel V7.1) analysiert.

## 7.6 Bestimmung der Aktivität von Enzymen

Die Zusammensetzungen der in diesem Kapitel verwendeten Puffer und Lösungen sind Tabelle 52 zu entnehmen.

### 7.6.1 NADPH-Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität der GDH

Die Experimente zur Aktivitätsbestimmung der GDH wurden in dem Plattenlesegerät „Safire2™“ (Tabelle 16) in transparenten 96-Lochplatten mit flachem Boden der Firma Nunc™ (vertrieben durch Thermo Scientific, Katalognummer: 167008) bei einer Temperatur von 34,5°C durchgeführt.

Zur Bestimmung der Aktivität der GDH wurde die Zunahme von NADPH bei der Umsetzung von Glucose zu Glucono- $\delta$ -lacton ausgenutzt.<sup>[291]</sup> Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 30 min, wobei jeweils in einem Intervall von 13 s die Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch bestimmt wurde. Die Triplikatmessungen und Kontrollmessungen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ L pro Kavität. Die Zusammensetzungen der verschiedenen Messungen sind Tabelle 95 zu entnehmen. Die Konzentration der GDH entsprach in etwa 20  $\mu$ g/mL.

**Tabelle 95: Zusammensetzung der Assays zur Bestimmung der Enzymaktivität der GDH.**

Bestandteil	M 1 - 3	K 1	K 2	K 3
GDH-Aktivitätspuffer	89 $\mu$ L	99 $\mu$ L	91 $\mu$ L	188 $\mu$ L
Lysat (Kapitel V7.2.1)	10 $\mu$ L	-	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
NADP <sup>+</sup> (100 mM)	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	-	2 $\mu$ L
Glucose (220 mM)	99 $\mu$ L	99 $\mu$ L	99 $\mu$ L	-

Mit dem molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  von NADPH bei 340 nm von 6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\Delta E$  = Änderung der Extinktion pro Zeiteinheit,  $V_c$  = Volumen pro Kavität,  $V_s$  = Probevolumen,

$d$  = Schichtdicke und  $\Delta t$  = Zeitdifferenz konnte die Volumenaktivität (U/mL) folgendermaßen berechnet werden:<sup>[301]</sup>

$$U [\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}] = \frac{\Delta E \cdot V_c}{V_s \cdot \varepsilon \cdot d \cdot \Delta t}$$

### 7.6.2 Bestimmung der Enzymaktivität der HMGS

Messungen zur Enzymaktivität der HMGS wurden im Plattenlesegerät „Multiscan™ GO“ (Tabelle 16) Scientific in transparenten 96-Lochplatten mit flachem Boden der Firma Falcon™ (vertrieben durch Fisher Scientific, Katalognummer: 08-772-2C) bei 45°C in einem Gesamtvolumen von 120  $\mu\text{L}$  pro Kavität durchgeführt. Alle Komponenten und Lösungen wurden bei 45°C vorgewärmt. Es wurden zwei unterschiedliche Chromophore zum Nachweis der Aktivität der HMGS genutzt.

#### a) Nachweis durch Ellmans-Reagenz<sup>[246b]</sup>

Bei der durch die HMGS katalysierten Reaktion von Ac-CoA (Acetyl-CoA) und AcAc-CoA (Acetoacetyl-CoA) zu HMG-CoA, wird CoA frei. Wird die Thiolgruppe des CoAs mit Ellmans-Reagenz (DTNB, 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure) zur Reaktion gebracht, entsteht das gelbe TNB<sup>2-</sup>-Anion (2-Nitro-5-thiobenzoat).<sup>[246a]</sup> Zur indirekten Bestimmung der Aktivität der HMGS kann die Zunahme des TNB<sup>2-</sup>-Anions über einen Zeitraum von 10 min durch die Messung bei einer Absorption von 412 nm genutzt werden. Es wurden unterschiedliche pH-Werte, Ac-CoA- und Enzymkonzentrationen getestet. Zum Start der Reaktion wurden jeweils Lösungen I und II folgender Zusammensetzungen miteinander vermischt:

##### Lösung I

44  $\mu\text{L}$  HMGS-Aktivitätspuffer I (pH 5,5 – 11)  
 4  $\mu\text{L}$  3,9 mM Ellmans-Reagenz  
 1 - 10 mM Ac-CoA ( $c_{\text{end}} = 10 - 1000 \mu\text{M}$ )  
 mit ddH<sub>2</sub>O auf 60  $\mu\text{L}$  auffüllen

##### Lösung II

47  $\mu\text{L}$  HMGS-Aktivitätspuffer I (pH 5,5 – 11)  
 10  $\mu\text{L}$  0,11 – 110  $\mu\text{g/mL}$  HMGS  
 3  $\mu\text{L}$  0,4 mM AcAc-CoA ( $c_{\text{end}} = 10 \mu\text{M}$ )

Außerdem wurden Kontrollen ohne Ac-CoA und ohne Enzym durchgeführt. Analoge Messungen wurden für die Stabilitätsbestimmungen von Ac-CoA und AcAc-CoA bei unterschiedlichen pH-Werten mit Hilfe des Ellmans-Reagenz verwendet.

#### b) Nachweis der Magnesium-Enolatform des AcAc-CoAs<sup>[245a]</sup>

Die Abnahme des durch die HMGS umgesetzten AcAc-CoAs kann durch photometrische Messungen bei 303 nm ebenfalls in einem Zeitraum von 10 min verfolgt werden. Es wurden unterschiedliche AcAc-CoA Konzentrationen getestet. Analog zu V7.6.2 a wurde die Reaktion

durch das Zusammenmischen der beiden Lösungen folgender Zusammensetzungen gestartet:

Lösung I

50  $\mu\text{L}$  HMGS-Aktivitätspuffer II  
10  $\mu\text{L}$  11  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HMGS  
0,4 mM AcAc-CoA ( $C_{\text{end}} = 10 - 100 \mu\text{M}$ )  
mit HMGS-Aktivitätspuffer II auf 90  $\mu\text{L}$

Lösung II

28,44  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O  
1,56  $\mu\text{L}$  10 mM Ac- CoA ( $C_{\text{end}} = 13 \mu\text{M}$ )

## 8 Biotransformationen für die Oxidation von Terpenen

Die Zusammensetzung der Puffer und Lösungen aus diesem Kapitel finden sich in Tabelle 53.

### 8.1 Biotransformationen in wässrigen Lösungen

Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Optimierungen zur Terpenoxidation in wässrigen Lösungen waren die Protokolle nach Kille *et al.*<sup>[206a]</sup> Für die biokatalysierten Oxidationen von Terpenen wurden die Cytochrom P450 BM3 und die BM3-Varianten nach Kapitel V6.2.5 b exprimiert und jeweils 1 mL der Kulturen bei 1100 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Medienüberstandes wurden die Zellen in jeweils 1,5 mL BM3-Waschpuffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Nach dem Auftauen auf Eis wurde das Zellsediment in 632,5  $\mu\text{L}$  BM3-Reaktionspuffer aufgenommen, die Lösung in GC-Glasgefäße überführt und folgende Reagenzien und Kosolventien hinzugegeben:

- 2  $\mu\text{L}$  100 mM NADP<sup>+</sup>
- 7,5  $\mu\text{L}$  10 mg/mL BSA
- 37,5  $\mu\text{L}$  4 M EMIM-Cl
- 30  $\mu\text{L}$  134,5 mg/mL Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin
- 30  $\mu\text{L}$  222 mg/mL Hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin
- 3  $\mu\text{L}$  aktives GDH-Lysat (ca. 2 U)
- 7,5  $\mu\text{L}$  100 mM Terpenstammlösung

Anschließend wurden die Reaktionen für 24 h bei Raumtemperatur und 600 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert. Zur besseren Belüftung wurden die Deckel der GC-Probegläser mit Kanülen durchstoßen.

Zweiphasige Biotransformationen wurden zusätzlich mit 20% (v/v) eines organischen Lösungsmittels überschichtet und es wurde Druckluft für die Belüftung verwendet.

Zum Abstoppen der Reaktionen und für die Extraktionen wurden die Proben schließlich in 15 mL-Glasreagenzgläser überführt und mit jeweils 750  $\mu$ L Ethylacetat für 1 min gemischt (Vortex, Tabelle 16). Dann wurden die Lösungen für 10 min bei 4°C und 3200 x g zentrifugiert und die obere Lösungsmittelschicht mittels GC/FID/MS analysiert (Kapitel V10.2.1).

## 8.2 Biotransformationen in organischen Lösungsmitteln

Für die Biotransformationen in organischen Lösungsmitteln wurde ein abgewandeltes Protokoll nach Jakoblinnert *et al.* verwendet.<sup>[231]</sup>

Cytochrom P450 BM3-F87A wurde mit der *lbADH* nach Kapitel V6.2.7 koexprimiert und die Kultur bei 3200 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Medienüberstands wurden die Zellen in BM3-Waschpuffer resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation, die Zellen für mindestens 16 h bei -80°C in einem Rundkolben eingefroren. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von flüssigem N<sub>2</sub> noch weiter heruntergekühlt und die Zellen für etwa 24 h lyophilisiert. Pro 100 mL Expressionskultur wurden somit ungefähr 350 mg Lyophilisat erhalten. Für die Reaktionen im organischen Lösungsmittel wurden 50 mg der lyophilisierten Zellen in 10  $\mu$ L Isopropanol, 7,5  $\mu$ L 100 mM Valencen und 700  $\mu$ L MTBE gelöst und die Reaktion durch die Zugabe von 100  $\mu$ L BM3-Reaktionspuffer, 2  $\mu$ L 100 mM NADP<sup>+</sup> und 10  $\mu$ L 10 mg/mL BSA gestartet und für 24 h bei Raumtemperatur und 750 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert. Auch hier wurde die Belüftung durch eine Kanüle durch den GC-Probeglasdeckel gefördert. Für die Analyse der Proben wurde das MTBE nach erfolgter Reaktion in ein Zentrifugengefäß überführt und für 10 min bei 4°C und 21.000 x g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde schließlich nach Kapitel V10.2.1 mittels GC/FID/MS analysiert.

Ein Kontrollversuch zur Bestimmung der Enzymaktivität aus lyophilisierten Zellen erfolgte in einem Reaktionsansatz analog zu Kapitel V8.1 in wässrigem Millieu. Für die Kofaktorregeneration durch die *lbADH* wurden zusätzlich 1% Isopropanol (v/v) als Substrat hinzugefügt.

## 9 Methoden zur Isolation von Naturstoffen und Kleinmolekülen

### 9.1 Extraktion von Naturstoffen

#### 9.1.1 Extraktionen von FCdien

##### a) Extraktion aus analytischen Ansätzen

Zur zeitabhängigen Analyse von FCdien-Fermentationen durch *S. cerevisiae* (Kapitel V6.3.2 - V6.3.3) wurden jeweils pro Zeitpunkt dreimal 2 mL der Hefekultur mit jeweils 2 mL *n*-Pentan

(HPLC-grade) in einem 15 mL-Reagenzglas mit Hilfe des „Vortex-Genie 2“ (Stufe 6-7, Scientific Industries) für 1 min extrahiert und anschließend für 10 min bei 3200 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere Lösungsmittelphase wurde in ein GC-Probegläschen überführt und das *n*-Pentan an Raumtemperatur oder unter einem leichten Argonstrom verdampft. Durch dreimaliges Waschen mit wenig *n*-Pentan (HPLC-grade) wurde der Extraktionsrückstand in ein GC-Probeglas mit Einsatz überführt. Anschließend wurde an Raumtemperatur wieder etwas *n*-Pentan verdampft, sodass der Flüssigkeitsstand ein Volumen von 180 µL aufwies und zur Quantifizierung 20 µL Cycloundecan (1 mg/mL) hinzugefügt. Die Analyse der Proben erfolgte über GC-FID/MS (Kapitel V10.2.1). Durch eine zuvor angelegte Kalibrierkurve unterschiedlicher Konzentrationen des Cycloundecans mit bekannter Konzentration des gereinigten FCdiens (Kapitel V9.2) in der GC-FID/MS, konnte durch den Vergleich der Integrale der entsprechenden Produktpeaks die unbekannte FCdien-Konzentration in der zu analysierenden Lösung ermittelt werden.

#### **b) Extraktionen von FCdien aus präparativen Ansätzen**

Nach erfolgter präparativer FCdien-Fermentation durch *S. cerevisiae* (Kapitel V6.3.2 und V6.3.4) oder zur Bestimmung der Aktivität der AbFS in *E. coli* (Kapitel V6.2.4) wurden die Adsorberpartikel und die Zellen durch Filtration (Machery-Nagel, MN 615) und Zentrifugation des trüben Durchflusses bei 3200 x g für 10 min bei 4°C von den flüssigen Bestandteilen der Kultur abgetrennt. Die festen Bestandteile wurden in verschiedene 50 mL Zentrifugengefäße für Beschleunigungen bis zu 20.000 x g (VWR, Katalognummer: 525-0303) überführt, wobei der Füllstand der Zentrifugengefäße 20 mL nicht übersteigen sollte. Nachdem die Zellen bei -80°C eingefroren wurden, wurden sie im Wasserbad bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Anschließend wurden pro Zentrifugengefäß wenige Glasperlen (1,7 – 2,1 mm Durchmesser, Carl-Roth) und 25 mL *n*-Pentan (*research grade*) hinzugefügt und solange durch die Verwendung des Vortex (Tabelle 16) kräftig gemischt sowie zwischendurch belüftet, bis sich eine Suspension ergab. Dann wurde für eine Stunde durch Rotation im „IntelliMixer“ (Tabelle 16) mit dem Programm C1 bei 99 rpm extrahiert. Nach Zentrifugation bei 16.000 x g und 4°C für 10 min wurde die Lösungsmittelphase in einen Rundkolben überführt und die Extraktion des Zell-Adsorbens-Gemischs auf die gleiche Weise dreimal wiederholt. Die vierte Extraktion in dem „IntelliMixer“ verlief wahlweise über Nacht. Das *n*-Pentan aus den Extraktionen wurde am Rotationsverdampfer bei minimal 300 mbar und 30°C evaporiert. Der zurückbleibende Extrakt wurde im Falle der FCdien-Fermentationen aus *S. cerevisiae* über Säulenchromatographie gereinigt (Kapitel V9.2). Die FCdien-Extrakte aus *E. coli* wurden in wenig *n*-Pentan gelöst, in ein GC-Probeglas mit Einsatz überführt und via GC-FID/MS (Kapitel V10.2.1) analysiert.



### 9.1.2 Extraktion von Erythromycin und Erythromycinderivaten<sup>[258f]</sup>

Für die Extraktion der *S. erythraea*-Kulturen wurde sich an den Protokollen von Uschi Sundermann orientiert.<sup>[258f]</sup> Für die Extraktionen wurden die 24-Lochplatten mit den Fermentationskulturen (Kapitel V6.4.2) über Nacht oder über das Wochenende bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Fermentationskulturen jeweils in 15 mL Zentrifugengefäße überführt und mit jeweils 7 mL Ethylacetat (*research grade*) überschichtet. Die Zentrifugengefäße wurden in einer speziell für diese Anwendung angefertigten Halterung im 45°-Winkel im Inkubationsschüttler befestigt und die Kulturen bei 19°C und 150 – 180 rpm (5 cm Auslenkung) über Nacht extrahiert. Nach Zentrifugation der Extraktionsproben bei 3200 x g für 10 min und 4°C wurden zur schnellen Analyse einer Vielzahl von Proben die Ethylacetatphasen von bis zu 100 Proben parallel im Vakuumkonzentrator (Tabelle 16) bei 30°C evaporiert. Die Analyse erfolgte mit HPLC-ESI/MS (Kapitel V10.2.2).

### 9.1.3 Extraktion von Monensin und Monensinderivaten

#### a) Extraktionen der Kulturen aus BM-Medium

Für die Extraktion der *S. cinnamonensis*-Fermentationen aus dem ölhaltigen BM-Medium wurden die Kulturen jeweils auf zwei 15 mL-Zentrifugengefäße aufgeteilt und mit jeweils 7 mL Ethylacetat überschichtet. Die Extraktion verlief analog zu Kapitel V9.1.2. Nach Zentrifugation bei 3200 x g für 10 min und 4°C wurden die Ethylacetatphasen einer Fermentationskultur in einem 25 mL-Rundkolben vereinigt und das Ethylacetat bei 30°C am Rotationsverdampfer verdampft bis ein öliger Rückstand verblieb. Vor der Analyse der Proben durch HPLC-ESI/MS (V10.2.2 b) wurde der Extrakt zur Entfernung des Sojaöls in 4 mL *iso*-Hexan aufgenommen und zweimal mit 2 mL Methanol/H<sub>2</sub>O (4:1) extrahiert.<sup>[288]</sup> Aufgrund der unterschiedlichen Polaritäten der Substanzen sammelte sich der Großteil des Sojaöls in der *iso*-Hexanphase, wohingegen das Monensin oder die Monensinderivate in der Methanolphase gefunden wurden. Die Methanolphasen wurden schließlich jeweils für die Analyse (Kapitel V10.2.2) in HPLC-Probegläser überführt.

#### b) Extraktionen der Kulturen aus SM16-Medium

Für die Extraktionen von Monensin und Monensinderivaten aus SM16-Medium wurden die Zellen und die Adsorberpartikel durch Zentrifugation bei 3200 x g für 10 min bei 4°C von den flüssigen Bestandteilen abgetrennt und bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen im Wasserbad bei Raumtemperatur erfolgte die Extraktion in jeweils 7 mL Ethylacetat analog zu Kapitel V9.1.2. Nach Zentrifugation bei 3200 x g für 10 min bei 4°C wurden die

Ethylacetatphasen am Rotationsverdampfer bei 30°C bis zur Trockene eingedampft und die Extrakte schließlich in 600 µL Methanol aufgenommen. Schwebeteilchen wurden durch Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C für 30 min entfernt und der Überstand wurde in einem HPLC-Probegläschen durch HPLC-ESI/MS (Kapitel V10.2.2) analysiert.

## 9.2 Säulenchromatographie des FCdiens

Das hier beschriebene Protokoll wurde bereits in meiner Masterarbeit entwickelt.<sup>[80]</sup> Bei der Säulenchromatographie wurde Silicagel der Firma Acros mit Partikelgrößen zwischen 35 und 75 µm verwendet. Die Lösungsmittel besaßen in der Regel Analysenreinheit. Für die Reinigung des FCdiens fanden Glassäulen mit einem Außendurchmesser von 1,5 – 2 cm mit Schaumstoffritze Einsatz, die mit etwa 50 g in *n*-Pentan dispergiertem Silicagel gefüllt wurden. Anschließend wurden die Extraktionsrückstände aus Fermentationen (Kapitel V6.3.2 und V6.3.4) von bis zu 5 L Kulturvolumen in möglichst wenig *n*-Pentan aufgenommen, auf die Säule gegeben und mit insgesamt 200 mL *n*-Pentan als Laufmittel eluiert. Die gesammelten Fraktionen umfassten ein Volumen von etwa 15 mL. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen auf die Anwesenheit von FCdien mittels DC (*n*-Pentan, Iodkammer/KMnO<sub>4</sub>) (Kapitel V10.1) und GC-FID/MS (Kapitel V10.2.1) untersucht. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden daraufhin vereinigt und das *n*-Pentan am Rotationsverdampfer bei 30°C und minimal 300 mbar vollständig evaporiert. Zur Reinheitsanalyse wurden GC-FID/MS (Kapitel V10.2.1) und im Einzelfall NMR-Spektroskopie (Kapitel V10.3) verwendet.

# 10 Methoden zur Analyse von Naturstoffen und Kleinmolekülen

## 10.1 DC des FCdiens

Die DC wurde auf „TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>“-Platten der Firma Merck durchgeführt. Zur Färbung des FCdiens wurden Kaliumpermanganatlösung (Tabelle 54) oder Iod verwendet.

Der spezifische R<sub>F</sub>-Wert für FCdien wurde zu

$$R_F = \frac{\text{Wegdistanz der Substanz}}{\text{Wegdistanz der Lösungsmittelfront}} = 0,9$$

ermittelt.

## 10.2 Massenspektrometrie

### 10.2.1 GC-FID/MS

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche GC-Systeme verwendet.

Für das erste Jahr erfolgten die GC-MS-Messungen in einem GC-System der Firma Hewlett Packard der Serie 6890 mit „5973 Mass Selective Detector“ und einer „Agilent HP-5/19091M-102 Trace Analysis“ – Säule (325°C max.) mit 5% Phenylmethylpolysiloxan. Die verwendete Methode hieß DB\_50\_S mit folgenden Eigenschaften:

1 µL der Probe wurden injiziert und bei 250°C evaporiert; Druck: 2,1 bar; Flussrate: 2,5 mL/min; Temperaturprofil: 50°C für 2 min, Temperaturgradient für das Aufheizen auf 300°C in Schritten von 40°C/min, Verweilzeit bei 300°C für 6,25 min.

Danach erfolgten GC-FID/MS-Messungen in einem GC-System der Firma Agilent Technologies der Serie 7890A mit einem Flammenionisationsdetektor, einem „5975C inert XL MSD Triple-Axis“ – Massendetektor und einer „Agilent HP-5MS/19091S-433 Trace Analysis“ – Säule (325°C max.) mit 5% Phenylmethylpolysiloxan.

Die verwendete Methode hieß: DB\_50\_MST und hatte folgende Eigenschaften:

1 µL der Probe wurde injiziert und bei 250°C evaporiert. Druck: 1,8 bar, Flussrate: 2,5 mL/min; Split: 20:1; Temperaturprofil: 50°C für 1 min, Temperaturgradient für das Aufheizen auf 300°C in Schritten von 40°C/min, Verweilzeit bei 300°C für 5,25 min.

Zur Quantifizierung wurden die Integrale der Produktpeaks des FIDs mit dem Programm „ChemStation Integrator“ durch Anpassung der *Secondary Integration Parameters* ausgewertet.

Folgende Fragmente und Retentionszeiten  $t_r$  wurden gefunden:

**FCdien:**  $t_r = 7,48$  min (altes GC-System),  $t_r = 6,40$  min (neues GC-System),  $m/z = 55, 67, 79, 95, 107, 122, 135, 148, 159, 177, 188, 201, 215, 229, 257$  und  $272 [M]^+$

**FCdien-Isomer 1:**  $t_r = 7,52$  min (altes GC-System),  $t_r = 6,46$  min (neues GC-System),  $m/z = 55, 67, 77, 91, 105, 122, 135, 171, 199, 227, 255$  und  $270 [M]^+$

**FCdien-Isomer 2:**  $t_r = 7,56$  min (altes GC-System),  $t_r = 6,51$  min (neues GC-System),  $m/z = 55, 67, 79, 93, 105, 121, 135, 147, 161, 175, 189, 229, 257$  und  $272 [M]^+$

**FCdien-Isomer 3:**  $t_r = 8,04$  min (altes GC-System),  $t_r = 7,01$  min (neues GC-System),  $m/z = 55, 65, 77, 93, 107, 121, 137, 229, 272 [M]^+$

**(+)-Valencen:**  $t_r = 6,42$  min (altes GC-System),  $t_r = 5,40$  min (neues GC-System),  $m/z = 55, 67, 79, 91, 105, 119, 133, 147, 161, 175, 189, 204 [M]^+$

**cis/trans-Nootkatol, Isomer a:**  $t_r = 7,06$  min (altes GC-System),  $t_r = 6,02$  min (neues GC-System),  $m/z = 55, 61, 67, 77, 91, 105, 121, 135, 145, 159, 169, 177, 187, 205, 220 [M]^+$

**Nootkaton, Isomer b:**  $t_r = 7,39$  min (altes GC-System),  $t_r = 6,35$  min (neues GC-System),  $m/z = 55, 61, 67, 79, 91, 105, 121, 133, 147, 161, 175, 190, 203, 218$  [M]<sup>+</sup>

**Dioxidiertes Valencen, Isomer c:**  $t_r = 7,55$  min (altes GC-System),  $t_r = 6,50$  min (neues GC-System),  $m/z = 55, 69, 79, 91, 107, 123, 135, 150, 166, 177, 185, 193, 203, 219, 235$  [M]<sup>+</sup>

**Dioxidiertes Valencen, Isomer d:**  $t_r = 7,59$  min (altes GC-System),  $t_r = 6,56$  min (neues GC-System),  $m/z = 55, 67, 79, 91, 105, 121, 135, 145, 161, 177, 187, 203, 218, 236$  [M]<sup>+</sup>

**Monoxidiertes Valencen, Isomer e:**  $t_r = 7,89$  min (altes GC-System),  $t_r = 6,84$  min (neues GC-System),  $m/z = 55, 65, 79, 91, 105, 119, 133, 147, 161, 176, 191, 206, 216, 218$  [M]<sup>+</sup>

### 10.2.2 HPLC-ESI/MS

Die HPLC-Messungen erfolgten mit einem Agilent HPLC-System der Serie 1100 bestehend aus Pumpe, Autosampler (gekühlt auf 10°C), Säulenofen und einem Photodiodenarraydetektor zur Detektion von UV-aktiven Substanzen bei Wellenlängen von 210 und 254 nm. Das HPLC-System war an ein Ionenfallenmassenspektrometer „LTQ XL linear ion trap“ der Firma Thermo Electron Corporation gekoppelt. Für die massenspektrometrische Detektion der Proben wurde die Elektronensprayionisation im Positivmodus bei einer Spannung von 4 kV verwendet. Die Spannung und Temperatur der Kapillare betrug 18 V und 275°C, die Spannung der Tubuslinse 115 V. Spektren wurden in einem  $m/z$ -Bereich von 200 – 2000 aufgenommen. Alle im Rahmen dieser Arbeit analysierten Substanzen wurden mit der „CC12514 Nucleodur C18 Gravity“ – Säule (Macherey-Nagel) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min separiert. Die Lösungsmittelgradienten und Eluenten unterschieden sich je nach analysierter Substanz. Für alle Eluenten wurden HPLC-reine Lösungsmittel (Chromasolv®, Sigma-Aldrich) eingesetzt. Es wurden jeweils 5 µL der Probe injiziert.

#### a) Analyse von Erythromycin A und den erzeugten Erythromycinderivaten

Für die Elution des Erythromycins und des 2-Propargylerythromycins wurde folgender Lösungsmittelgradient verwendet:<sup>[258f]</sup>

Für 1 min 80% Eluent A / 20% Eluent B mit linearem Anstieg des Eluenten B innerhalb der nächsten 9 min zu 0% Eluent A / 100% Eluent B. Danach wurde die Säule für 5 min mit 0% Eluent A / 100% Eluent B gewaschen und für weitere 5 min an den Ausgangsgradienten reäquilibriert. Mit Eluent A = ddH<sub>2</sub>O (0,1% HCOOH) und Eluent B = Acetonitril (0,1% HCOOH).

Folgende Retentionszeiten  $t_r$  und Massen wurden detektiert:

**Erythromycin A:**  $t_r = 7,35$  min,  $m/z = 734$  (C<sub>37</sub>H<sub>68</sub>NO<sub>13</sub><sup>+</sup>)

**2-Propargylerythromycin A:**  $t_r = 7,38$  min,  $m/z = 758$  (C<sub>39</sub>H<sub>68</sub>NO<sub>13</sub><sup>+</sup>)

**2-Allylerythromycin A:**  $t_r = 7,21$  min,  $m/z = 760$  (C<sub>39</sub>H<sub>70</sub>NO<sub>13</sub><sup>+</sup>)

**2-Ethylerythromycin A:**  $r_t = 6,96$  min,  $m/z = 748$  ( $C_{38}H_{70}NO_{13}^+$ )

### MS/MS

Die MS/MS-Fragmentierungen wurden mittels CID (*collision induced dissociation*) bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 35 erzeugt. Die Scanevents wurden dafür auf die Zahl 2 hoch gesetzt. Zunächst ging ein normaler Scan, der den Bereich zwischen  $m/z = 200 - 2000$  abdeckte voraus. In der folgenden MS/MS wurden die definierten  $m/z$  der zu analysierenden Substanzen fragmentiert.

Für **2-Allylerythromycin A** ( $m/z = 760$ ;  $C_{39}H_{70}NO_{13}^+$ ):  $m/z = 742$  ( $C_{39}H_{68}NO_{12}^+$ ),  $m/z = 724$  ( $C_{39}H_{66}NO_{11}^+$ ),  $m/z = 602$  ( $C_{31}H_{56}NO_{10}^+$ ),  $m/z = 584$  ( $C_{31}H_{54}NO_9^+$ ),  $m/z = 566$  ( $C_{31}H_{52}NO_8^+$ ),  $m/z = 548$  ( $C_{31}H_{50}NO_7^+$ ),  $m/z = 490$  ( $C_{28}H_{44}NO_6^+$ )

Für **2-Ethylerythromycin A** ( $m/z = 748$ ;  $C_{38}H_{70}NO_{13}^+$ ):  $m/z = 730$  ( $C_{38}H_{68}NO_{12}^+$ ),  $m/z = 712$  ( $C_{38}H_{66}NO_{11}^+$ ),  $m/z = 590$  ( $C_{30}H_{56}NO_{10}^+$ ),  $m/z = 572$  ( $C_{30}H_{54}NO_9^+$ ),  $m/z = 554$  ( $C_{30}H_{52}NO_8^+$ ),  $m/z = 536$  ( $C_{30}H_{50}NO_7^+$ ),  $m/z = 478$  ( $C_{27}H_{44}NO_6^+$ )

### b) HPLC-Analyse von Monensin und Monensinderivaten

Für die Elution des Monensins und der Monensinderivate wurde folgender Lösungsmittelgradient verwendet:<sup>[68]</sup>

Für 1 min 20% Eluent A / 80% Eluent B mit linearem Anstieg des Gradienten innerhalb der nächsten 9 min zu 5% Eluent A / 95% Eluent B. Danach wurde die Säule für 7 min mit 5% Eluent A / 95% Eluent B gewaschen und für weitere 3 min an den Ausgangsgradienten reäquilibriert.

Mit Eluent A = ddH<sub>2</sub>O (0,1% HCOOH) und Eluent B = Methanol (0,1% HCOOH).

Folgende Retentionszeiten  $r_t$  und Massen wurden detektiert:

**Monensin A:**  $r_t = 12,09$  min,  $m/z = 688$  ( $C_{36}H_{62}NH_4O_{11}^+$ ) und 693 ( $C_{36}H_{62}NaO_{11}^+$ )

**Monensin B:**  $r_t = 10,44$  min,  $m/z = 674$  ( $C_{35}H_{60}NH_4O_{11}^+$ ) und 679 ( $C_{35}H_{60}NaO_{11}^+$ )

**16-Propargylmonensin:**  $r_t = 9,74$  min,  $m/z = 698$  ( $C_{37}H_{60}NH_4O_{11}^+$ ) und 703 ( $C_{37}H_{60}NaO_{11}^+$ )

**16-Allylmonensin:**  $r_t = 12,16$  min,  $m/z = 700$  ( $C_{37}H_{62}NH_4O_{11}^+$ ) und 705 ( $C_{37}H_{62}NaO_{11}^+$ )

**16-Propylmonensin:**  $r_t = 12,84$  min,  $m/z = 702$  ( $C_{37}H_{64}NH_4O_{11}^+$ ) und 707 ( $C_{37}H_{64}NaO_{11}^+$ )

### MS/MS/MS

Die MS/MS/MS-Fragmentierungen der Monensinderivate wurden analog zu den MS/MS-Fragmentierungen der Erythromycinderivate vermessen (siehe Kapitel V10.2.2 a). Allerdings wurden die Scanevents auf die Zahl 3 hoch gesetzt. In der MS/MS/MS wurde das bei der MS/MS entstandene Fragment mit der höchsten Intensität noch einmal fragmentiert.

Folgende m/z der Monensinderivatfragmente konnten mit Hilfe der m/z bekannter Monensin A-Fragmente zugeordnet werden:<sup>[302]</sup>

Für **16-Propargylmonensin** ( $m/z = 703$ ,  $C_{37}H_{60}NaO_{11}^+$ ):  $m/z = 685$  ( $C_{37}H_{58}NaO_{10}^+$ ), 667 ( $C_{37}H_{56}NaO_9^+$ ), 493 ( $C_{29}H_{42}NaO_5^+$ ), 471 ( $C_{26}H_{40}NaO_6^+$ ), 453 ( $C_{26}H_{38}NaO_5^+$ ):

Für **16-Allylmonensin** ( $m/z = 705$ ,  $C_{37}H_{62}NaO_{11}^+$ ):  $m/z = 687$  ( $C_{37}H_{60}NaO_{10}^+$ ), 669 ( $C_{37}H_{58}NaO_9^+$ ), 495 ( $C_{29}H_{44}NaO_5^+$ ), 473 ( $C_{26}H_{42}NaO_6^+$ ), 455 ( $C_{26}H_{40}NaO_5^+$ )

Für **16-Propylmonensin** ( $m/z = 707$ ,  $C_{37}H_{64}NaO_{11}^+$ ):  $m/z = 689$  ( $C_{37}H_{62}NaO_{10}^+$ ), 671 ( $C_{37}H_{60}NaO_9^+$ ), 497 ( $C_{29}H_{46}NaO_5^+$ ), 475 ( $C_{26}H_{44}NaO_6^+$ ), 457 ( $C_{26}H_{42}NaO_5^+$ )

### 10.2.3 HRMS

Die HRMS erfolgte je nach Substanz mittels eines Accela HPLC-Systems oder eines GC-Systems gekoppelt an eine LTQ Orbitrap. Die Ionisierung der Analyten erfolgte über die Elektronenspraymethode (HPLC-ESI) oder die Elektronenstoßmethode (GC-EI). Zur Trennung der Moleküle wurde die Säule „Hypersil Gold“ der Firma Thermo Scientific mit einer Länge von 50 mm, einem Innendurchmesser von 1 mm und einer Partikelgröße von 1,9  $\mu\text{m}$  verwendet. Dabei wurden Wellenlängen im Bereich von 200-600 nm gemessen und Massen im m/z-Bereich zwischen 150 und 2000 detektiert.

#### a) HRMS des FCdiens

**FCdien** ( $C_{20}H_{32}^+$ ):  $m/z_{\text{theoret.}} = 272,25040$ ,  $m/z_{\text{exp.}} = 272,25058$

#### b) HRMS der neuen Erythromycinderivate

**2-Allylerythromycin A** ( $C_{39}H_{70}NO_{13}^+$ ):  $m/z_{\text{theoret.}} = 760,4842$ ,  $m/z_{\text{exp.}} = 760,4828$

**2-Ethylerythromycin A** ( $C_{38}H_{70}NO_{13}^+$ ):  $m/z_{\text{theoret.}} = 748,4842$ ,  $m/z_{\text{exp.}} = 748,4845$

#### c) HRMS der Monensinderivate

**16-Propargylmonensin** ( $C_{37}H_{60}NaO_{11}^+$ ):  $m/z_{\text{theoret.}} = 703,40278$ ,  $m/z_{\text{exp.}} = 703,40331$

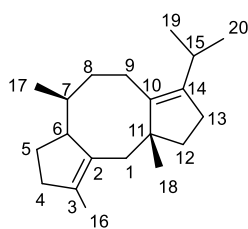
**16-Allylmonensin** ( $C_{37}H_{62}NaO_{11}^+$ ):  $m/z_{\text{theoret.}} = 705,41843$ ,  $m/z_{\text{exp.}} = 705,41930$

**16-Propylmonensin** ( $C_{37}H_{64}NaO_{11}^+$ ):  $m/z_{\text{theoret.}} = 707,43408$ ,  $m/z_{\text{exp.}} = 707,43492$

## 10.3 NMR-Spektroskopie des FCdiens

Für die NMR-Spektroskopie des FCdiens wurden etwa 10 mg der Substanz in 400  $\mu\text{L}$  Dichlormethan-D<sub>2</sub> (99,5 Atom%D, Carl Roth) gelöst. <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden bei 400 MHz und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren bei 101 MHz an einem Varian Mercury 400 Spektrometer aufgenommen. Die Zuordnungen der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Signale erfolgten mittels gCOSY und gHSQC-Spektren (siehe Anhang, Abbildungen A2 und A3).<sup>[80]</sup>

Folgende chemische Verschiebungen wurden für FCdien ermittelt:



**Tabelle 96: Zuordnungen der  $^1\text{H-NMR}$ -Signale (400 MHz) und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Signale (101 MHz) für FCdien.** Lösungsmittel: Dichlormethan- $d_2$ . ppm: *parts per million*, J: Kopplungskonstante, s: Singulett, d: Duplett, q: Quartett, spt: Septett, br.: breit, AB: A-B-System. Die Berechnungen der Integrale und Kopplungskonstanten erfolgten mit dem Programm ACD/NMR Processor.

$^1\text{H-NMR}$ -Signale					$^{13}\text{C-NMR}$ -Signale		
$\delta$ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Position	Anzahl H	$\delta$ [ppm]	Position	Typ
0,87	d	7	H17	3	15,83	C16	$\text{CH}_3$
0,93	d	6,8	H19/20	3	21,32	C19/20	$\text{CH}_3$
0,94	s	-	H18	3	21,54	C17	$\text{CH}_3$
0,99	d	6,8	H19/20	3	21,59	C19/20	$\text{CH}_3$
1,46	m	-	H5/H8	3	21,86	C9	$\text{CH}_2$
1,64	br. s	-	H16	3	23,11	C5	$\text{CH}_2$
1,67	m	-	H5/H12	3	27,03	C18	$\text{CH}_3$
1,95	ABq	13,2	H1	1	27,27	C13	$\text{CH}_2$
2,04	m	-	H7/H9	3	27,67	C15	CH
2,20	m	-	H4/H13	4	30,31	C7	CH
2,31	ABq	13,2	H1	1	32,89	C8	$\text{CH}_2$
2,50	m	-	H6	1	37,26	C4	$\text{CH}_2$
2,64	spt	6,8	H15	1	39,17	C12	$\text{CH}_2$
					39,81	C1	$\text{CH}_2$
					52,23	C11	C
					55,33	C6	CH
					132,75	C3	C
					137,75	C14	C
					140,31	C2	C
					141,14	C10	C

## VI Abkürzungsverzeichnis

### A

A	Adenin oder Alanin
AACT	Acetoacetyl-CoA-thiolase
AADH	Acetaldehyddehydrogenase
AbFS	FS aus <i>Alternaria brassicicola</i>
<i>abfs</i>	Gen für AbFS
ACP	Acylcarrierprotein
ACS	Acetyl-CoA Synthetase
<i>ADE2</i>	auxotropher Marker für Adenin
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADS	Amorphadiensynthese
amp	Ampicillin
ara	Arabinose
AOX	Alkoholoxidase
AP	Alkalische Phosphatase
AT	Acyltransferase
ATP	Adenintriphosphat
att	<i>engl. attachment site</i>
aurA	Aureobasidin A

### B

bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLAST	<i>engl. Basic Local Alignment Search Tool</i>
BM	<i>engl. Bulgarian Medium</i>
BM3	Cytochrom P450 BM-3
BMGY	<i>engl. Buffered Medium with Glycin</i>
BMM	<i>engl. Buffered Medium with Methanol</i>
BSA	<i>engl. Bovine Serum Albumin</i>
Bu	Butyl

### C

C	Cytosin oder Cystein
CAST	<i>engl. Combinatorial Active Site-Saturation Test</i>
cDNA	<i>engl. complementary DNA</i>
CDP-ME	4-Diphosphocitidyl-2-C-methylerythriol

CMK	CDP-ME-Kinase
CMP	Citidylmonophosphat
CMS	CDP-ME-Synthase
CoA	Coenzym A
CS	Carnitin-Shuttle
CT52	52 Aminosäuren langer C-Terminus der PMA2
CYC1	Cytochrom C 1

### D

$\delta$	chemische Verschiebung
D	Aspartat
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DEBS	6-Desoxyerythronolid B Synthase
DH	Dehydratase
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNTB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DPF	Dortmund Protein Facility
DXP	1-Deoxyxylulose-5-Phosphat
DXR	DXP-Reduktase
DXS	DXP-Synthase

### E

E	Glutamat
EI	<i>engl. Electron Impact</i>
<i>epPCR</i>	<i>engl. error-prone PCR</i>
ER	Enoylreduktase
ESI	<i>engl. Electrospray Ionisation</i>



EtM-CoA	2S-Ethylmalonyl-CoA	HDR	HMBDP-Reduktase
ET-SSB	<i>engl. Enhanced Temperature-SSB</i>	HDS	HMBDP-Synthase
<b>F</b>		Hex	Hexyl
F	Phenylalanin	His	Histidin
FAS	<i>engl. fatty acid synthase</i>	His <sub>6</sub>	Hexahistidin
FCdien	Fusicocca-2,10(14)-dien	HMBDP	1-Hydroxy-2-Methyl-2-(E)- Butenyl-4-Diphosphat
FCyc	FS-Cyclasedomäne	HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA
FPP	Farnesylpyrophosphat	HMGR	HMG-CoA-Reduktase
FPPS	FPP-Synthase	HMGS	HMG-CoA-Synthase
FS	Fusicoccadiensynthase	HPLC	<i>engl. High Performance Liquid Chromatography</i>
fw	<i>engl. forward</i>	HRMS	hochauflösende MS
<b>G</b>		hyg	Hygromycin
G	Guanin oder Glycin	<b>I</b>	
g	Gravitationsgeschwindigkeit	I	Isoleucin
GAP	Glyceraldehyd-3-dehydroxygenase	IDI	IPP-Isomerase
GC-FID/MS	Gaschromatographie- Flammenionisationsdetektor/Massen- spektrometrie-Kupplung	IP	Isopentenylphosphat
gCOSY	<i>engl. gradient COrrrelation Spectroscopy</i>	IPK	IP-Kinase
GDH	Glucose-1-Dehydrogenase	iProp	iso-Propyl
gDNA	genomische DNA	IPTG	Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid
gHSQC	<i>engl. gradient enhanced Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>	<b>J</b>	
Gly	Glycin	J	Kopplungskonstante
GFPP	Geranylarnesylpyrophosphat	<b>K</b>	
GFPPS	GFPP-Synthase	kan	Kanamycin
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat	kb	Kilobasenpaare
GGPPS	GGPP-Synthase oder GGPP- Synthasedomäne der FS	KR	Ketoreduktase
gpdA	Glyceraldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase A	KS	Ketosynthase
GPP	Geranylpyrophosphat	<b>L</b>	
GPPS	GPP-Synthase	L	Leucin
GST	Glutathion-S-Transferase	lacO	Lactoseoperon
<b>H</b>		LB	<i>engl. Lysogeny Broth</i>
h	<i>engl. hour</i>	Leu	Leucin
H	Histidin	LS	Limonensynthase
		Lys	Lysin
		<b>M</b>	
		M	Molarität/Molare Masse/Marker

M-CoA	Malonyl-CoA	PC	Pyruvatcarboxylase
MCS	MECDP-Synthase	P/C/I	Phenol/Chloroform/Isoamyl- alkohol
MD	Molekulardynamik	PCR	Polymerasekettenreaktion
MDC	MVPP-Decarboxylase	PDC	Pyruvatdecarboxylase
MECDP	ME-2,4-cyclodiphosphat	PDH	Pyruvatdehydrogenase
MEP	2-Methyl-D-erythritol-4-phosphat	PGK1	Phosphoglyceratkinase 1
Met	Methionin	Ph	Phenyl
min	Minute	PKS	Polyketidsynthase
MM	<i>engl. Minimal Medium with Methanol</i>	PMD	Phosphomevalonat- decarboxylase
MM-CoA	2S-Methylmalonyl-CoA	PMK	Phosphomevalonatkinase
Mon	Monensin	Prom	Promoter
mRNA	<i>engl. messenger RNA</i>	PSY	Phytoensynthase
MS	Massenspektrometrie	PTA	<i>Pichia</i> -Transformationsagar
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether	<b>Q</b>	
MVA	Mevalonat	q	Quartett
MVK	Mevalonatkinase	Q	Glutamin
MVP	MVA-5-Phosphat	<b>R</b>	
MVPP	MVA-5-Pyrophosphat	rec	Rekombinase
m/z	Masse:Ladung	rev	<i>engl. reverse</i>
<b>N</b>		R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor-Wert
N	Asparagin	RNA	Ribonukleinsäure
n	Stoffmenge	RNase	Ribonuklease
NADPH	reduzierte Form des Nikotinamiddinukleotidphosphats	RP	<i>engl. Random Primers</i>
NCBI	National Centre for Biotechnology Information	rpm	<i>engl. rounds per minute</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure	rt	<i>engl. retention time</i>
NMR	<i>engl. Nuclear Magnetic Resonance</i>	RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	<b>S</b>	
<b>O</b>		S	Serin
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm	s	Sekunde oder Singulett
oePCR	<i>engl. overlap extension PCR</i>	SD	<i>engl. Synthetic Dropout</i>
orf	<i>engl. open reading frame</i>	SDS-	Sodiumdodecylsulfat
ori	<i>engl. origin of replication</i>	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
<b>P</b>		Ser	Serin
P	Prolin	SLIC	<i>engl. Sequence and Ligation Independent Cloning</i>
P450	Pigment 450	SNAC	N-Acetylcysteamin
PaFS	FS aus <i>Phomopsis amygdali</i>		
<i>pafs</i>	Gen für PaFS		

SP	<i>engl. Specific Primers</i>	<b>Y</b>	
sp.	Spezies	YPD	<i>engl. Yeastextract, Peptone, Dextrose</i>
spt	Septett		
SSB	<i>engl. Single Stranded Binding</i>	YNB	<i>engl. Yeast Nitrogen Base</i>
SSF	<i>engl. Solid State Fermentation</i>	2xYT	<i>engl. 2x Yeastextract and Tryptone</i>
SQS	Squalensynthese		
<b>T</b>		<b>Z</b>	
T	Thymin oder Threonin	zeo	Zeocin
T <sub>A</sub>	<i>Annealingtemperatur</i>		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TB	<i>engl. Terrific Broth</i>		
TE	Thioesterase		
Term	Terminator		
tet	Tetracyclin		
TEV	<i>engl. Tobacco Etch Virus</i>		
THF	Tetrahydrofuran		
tHMGR	<i>engl. truncated HMGR</i>		
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur		
TRICINE	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin		
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan		
tRNA	Transport-RNA		
<i>trpC</i>	Gen aus der Tryptophanbiosynthese		
<b>U</b>			
Ura	Uracil		
<i>URA3</i>	Auxotropher Marker für Uracil		
UPC	<i>engl. Uptake Control</i>		
UV	Ultraviolett		
<b>V</b>			
V	Valin		
v. Chr.	vor Christi Geburt		
<b>W</b>			
W	Tryptophan		
wt	Wildtyp		
<b>X</b>			
X	beliebige Aminosäure		
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galactopyranoside		

## VII Literaturverzeichnis

- [1] Cragg GM *et al.*, *Biochim Biophys Acta* (2013) **1830**, 3670-3695.
- [2] Newman DJ *et al.*, *J Nat Prod* (2012) **75**, 311-335.
- [3] a) Schäfer B (Hrsg.), *Naturstoffe der chemischen Industrie*, (2006) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. b) Jeschke P *et al.*, in *Natural products for pest management*, (Hrsg.: Rimando A), (2006) Am Chem Soc, Washington DC, pp. 128-148.
- [4] Meinwald J, *J Nat Prod* (2011) **74**, 305-309.
- [5] Conolly JD, Hill RA (Hrsg.), *Dictionary of Terpenoids*, (1991) Chapman & Hall, London.
- [6] Dewick PM (Hrsg.), *Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach*, (2009) John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- [7] a) Ruzicka L *et al.*, *Helv Chim Acta* (1921) **4**, 505-510. b) Ruzicka L, *Experientia* (1953) **9**, 357-367.
- [8] a) Ferguson JJ *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1959) **45**, 499-504. b) Rohmer M *et al.*, *Biochem J* (1993) **295 ( Pt 2)**, 517-524. c) Lange BM *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) **97**, 13172-13177. d) Kaneda K *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) **98**, 932-937. e) Boucher Y *et al.*, *Mol Microbiol* (2004) **52**, 515-527. f) Grochowski LL *et al.*, *J Bacteriol* (2006) **188**, 3192-3198. g) Lombard J *et al.*, *Mol Biol Evol* (2011) **28**, 87-99. h) Dellas N *et al.*, *eLIFE* (2013) **2**, e00672 00671-00618. i) VanNice JC *et al.*, *J Bacteriol* (2014) **196**, 1055-1063.
- [9] a) Basson ME *et al.*, *Genetics* (1987) **117**, 645-655. b) Donald KA *et al.*, *Appl Environ Microbiol* (1997) **63**, 3341-3344.
- [10] a) Perez-Gil J *et al.*, *J Biol Chem* (2012) **287**, 15803-15809. b) Sangari FJ *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) **107**, 14081-14086.
- [11] Takahashi S *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) **95**, 9879-9884.
- [12] a) Rohdich F *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) **96**, 11758-11763. b) Luttgen H *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) **97**, 1062-1067. c) Herz S *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) **97**, 2486-2490.
- [13] a) Hecht S *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) **98**, 14837-14842. b) Kollas AK *et al.*, *FEBS Lett* (2002) **532**, 432-436. c) Seemann M *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl* (2002) **41**, 4337-4339. d) Rohdich F *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) **99**, 1158-1163. e) Wolff M *et al.*, *FEBS Lett* (2003) **541**, 115-120. f) Altincicek B *et al.*, *FEBS Lett* (2002) **532**, 437-440.
- [14] Kuzuyama T, *Biosci Biotechnol Biochem* (2002) **66**, 1619-1627.
- [15] Lichtenthaler HK *et al.*, *FEBS Lett* (1997) **400**, 271-274.
- [16] a) Liang PH *et al.*, *Eur J Biochem* (2002) **269**, 3339-3354. b) Thulasiram HV *et al.*, *Science* (2007) **316**, 73-76.
- [17] Poulter CD, *Acc Chem Res* (1990) **23**, 70-77.
- [18] a) Poulter CD *et al.*, *Biochemistry* (1976) **15**, 1079-1083. b) Poulter CD *et al.*, *J Biol Chem* (1978) **253**, 7227-7233. c) Poulter CD *et al.*, *Acc Chem Res* (1978) **11**, 307-313. d) Pandit J *et al.*, *J Biol Chem* (2000) **275**, 30610-30617.
- [19] Oldfield E *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl* (2012) **51**, 1124-1137.
- [20] Takahashi S *et al.*, *Chem Rec* (2006) **6**, 194-205.
- [21] a) Tarshis LC *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) **93**, 15018-15023. b) Ohnuma S *et al.*, *J Biol Chem* (1996) **271**, 30748-30754. c) Ohnuma S *et al.*, *J Biol Chem* (1996) **271**, 10087-10095. d) Ohnuma S *et al.*, *J Biol Chem* (1996) **271**, 18831-18837. e) Ohnuma S *et al.*, *J Biol Chem* (1998) **273**, 26705-26713.
- [22] a) Wendt KU *et al.*, *Structure* (1998) **6**, 127-133. b) Wendt KU *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl* (2000) **39**, 2812-2833. c) Christianson DW, *Chem Rev* (2006) **106**, 3412-3442. d) Christianson DW, *Curr Opin Chem Biol* (2008) **12**, 141-150. e) Gao Y *et al.*, *Nat Prod Rep* (2012) **29**, 1153-1175.
- [23] Geu-Flores F *et al.*, *Nature* (2012) **492**, 138-142.
- [24] Tarshis LC *et al.*, *Biochemistry* (1994) **33**, 10871-10877.
- [25] a) Starks CM *et al.*, *Science* (1997) **277**, 1815-1820. b) Cane DE *et al.*, *Arch Biochem Biophys* (2000) **376**, 354-364. c) Rynkiewicz MJ *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) **98**, 13543-13548. d) Whittington DA *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) **99**, 15375-15380. e) Seemann M *et al.*, *J Am Chem Soc* (2002) **124**, 7681-7689. f) Hyatt DC *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) **104**, 5360-5365. g) Gennadios HA *et al.*, *Biochemistry* (2009) **48**, 6175-6183.
- [26] Thoma R *et al.*, *Nature* (2004) **432**, 118-122.
- [27] Tantillo DJ, *Nat Prod Rep* (2011) **28**, 1035-1053.

- [28] a) Lesburg CA *et al.*, *Science* (1997) **277**, 1820-1824. b) Wendt KU *et al.*, *Science* (1997) **277**, 1811-1815. c) Caruthers JM *et al.*, *J Biol Chem* (2000) **275**, 25533-25539. d) Kampranis SC *et al.*, *Plant Cell* (2007) **19**, 1994-2005. e) Zhao B *et al.*, *J Biol Chem* (2009) **284**, 36711-36719. f) Koksai M *et al.*, *Nat Chem Biol* (2011) **7**, 431-433. g) Koksai M *et al.*, *Nature* (2011) **469**, 116-120. h) Zhou K *et al.*, *J Biol Chem* (2012) **287**, 6840-6850. i) Li JX *et al.*, *Biochem J* (2013) **451**, 417-426. j) Zhang X *et al.*, *Acta Crystallographica Section F* (2014) **F70**, 366-369. k) Liu W *et al.*, *Sci Rep* (2014) **4**, 6214-6223. l) Baer P *et al.*, *ChemBioChem* (2014) **15**, 213-216. m) McAndrew RP *et al.*, *Structure* (2011) **19**, 1876-1884.
- [29] a) Vedula LS *et al.*, *Arch Biochem Biophys* (2007) **466**, 260-266. b) Vedula LS *et al.*, *Arch Biochem Biophys* (2008) **469**, 184-194.
- [30] Reinert DJ *et al.*, *Chem Biol* (2004) **11**, 121-126.
- [31] a) Wise ML *et al.*, *J Biol Chem* (1998) **273**, 14891-14899. b) Felicetti B *et al.*, *J Amn Chem Soc* (2004) **126**, 7212-7221. c) Lin X *et al.*, *Biochemistry* (1996) **35**, 2968-2977. d) Williams DC *et al.*, *Chemistry & Biology* (2000) **7**, 969-977.
- [32] a) Bohlmann J *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) **95**, 4126-4133. b) Trapp SC *et al.*, *Genetics* (2001) **158**, 811-832.
- [33] a) Fraga BM, *Nat Prod Rep* (2011) **28**, 1580-1610. b) Quin MB *et al.*, *Nat Prod Rep* (2014) **31**, 1449-1473. c) Hanson JR, *Nat Prod Rep* (2015) **32**, 76-87.
- [34] a) Dembitsky VM *et al.*, *Chem Sust Dev* (2002) **10**, 253-264. b) Gross H *et al.*, *Phytochem Rev* (2006) **5**, 115-141. c) Elissawy AM *et al.*, *Mar Drugs* (2015) **13**, 1966-1992.
- [35] a) Kawamura A *et al.*, *J Nat Prod* (2011) **74**, 492-495. b) Ballio A *et al.*, *Nature* (1964) **203**, 297. c) Nozoe S *et al.*, *J Am Chem Soc* (1965) **87**, 4968-4970. d) litaka Y *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* (1968) **90**, 1092-1093. e) Sassa T *et al.*, *Nature* (1970) **227**, 379. f) Muromtsev GS *et al.*, *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* (1989) **185**, 261-268. g) Liu HJ *et al.*, *Phytochemistry* (2000) **53**, 845-849. h) Enoki N *et al.*, *Tetrahedron Lett* (1983) **24**, 4341-4342.
- [36] Muromtsev G *et al.*, *J Plant Growth Regul* (1994) **13**, 39-49.
- [37] a) Ballio A *et al.*, *Experientia* (1972) **28**, 126-127. b) Ballio A *et al.*, *Experientia* (1972) **28**, 1150-1151. c) Ballio A *et al.*, *Experientia* (1974) **30**, 1108-1109. d) Takahama A *et al.*, *Agricultural and Biological Chemistry* (1979) **43**, 647-650. e) Ballio A *et al.*, *Experientia* (1970) **26**, 349-351. f) Kato N *et al.*, *J Chem Soc Perkin Trans 1* (1998) 2473-2474. g) Sassa T *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem* (2002) **66**, 2356-2361. h) Sassa T *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem* (2004) **68**, 1608-1610. i) Sassa T *et al.*, *Agricultural and Biological Chemistry* (1975) **39**, 1729-1734. j) Sassa T *et al.*, *Agricultural and Biological Chemistry* (1975) **39**, 1735-1744. k) Sassa T *et al.*, *Agricultural and Biological Chemistry* (1975) **39**, 2213-2215. l) MacKinnon SL *et al.*, *Phytochem* (1999) **51**, 215-221. m) Pedras MS *et al.*, *Phytochemistry* (2009) **70**, 394-402.
- [38] a) Marre E, *Annual Review of Plant Physiology* (1979) **30**, 273-288. b) Aducci P *et al.*, *J Exp Bot* (1995) **46**, 1463-1478.
- [39] a) Kurkdjian A *et al.*, *Plant Physiol* (1979) **64**, 1053-1057. b) Ballio A, in *Advances in pesticide sciences*, Vol. 2, (Hrsg.: Geissbühler H), (1979) Pergamon Press, New York, pp. 336-372. c) Ballio A *et al.*, *Physiol Plant* (1981) **52**, 471-475. d) Brummell DA *et al.*, *Physiologia Plantarum* (1983) **59**, 627-634. e) Dembný H *et al.*, *Plant Cell Physiol* (1988) **29**, 237-242. f) Yoneyama K *et al.*, *J Agric Food Chem* (1998) **45**, 1583-1586. g) Evidente A *et al.*, *Phytochem* (2006) **67**, 19-26.
- [40] a) Bunney TD *et al.*, *Development* (2003) **130**, 4847-4858. b) de Vries-van Leeuwen IJ *et al.*, *Cancer Lett* (2010) **293**, 198-206.
- [41] a) Honma Y *et al.*, *Cancer Res* (2003) **63**, 3659-3666. b) Yamamoto-Yamaguchi Y *et al.*, *Anticancer Res* (2003) **23**, 2537-2547. c) Honma Y *et al.*, *Gynecol Oncol* (2005) **99**, 680-688. d) Kasukabe T *et al.*, *Breast Canc Res* (2005) **7**, R1097-1110. e) Kasukabe T *et al.*, *Cancer Sci* (2008) **99**, 1693-1698. f) Kashiwagi Y *et al.*, *Molecular Vision* (2010) **16**, 970-982.
- [42] a) Asahi K *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* (1997) **238**, 758-763. b) Yamada K *et al.*, *Br J Haematol* (2001) **114**, 814-821. c) Yamamoto-Yamaguchi Y *et al.*, *Br J Haematol* (2001) **112**, 697-705. d) Honma Y, *Leuk Lymphoma* (2002) **43**, 1169-1178. e) Matsunawa M *et al.*, *Leuk Lymphoma* (2006) **47**, 733-740.
- [43] Honma Y *et al.*, *Leukemia Res* (2003) **27**, 1019-1025.
- [44] a) Marra M *et al.*, *Plant Physiology* (1994) **106**, 1497-1501. b) Oecking C *et al.*, *FEBS Lett* (1994) **352**, 163-166. c) Korthout HA *et al.*, *Plant Cell* (1994) **6**, 1681-1692. d) de Boer B, *Tren Plant Sci* (1997) **2**, 61-66. e) Würtele M *et al.*, *EMBO J* (2003) **22**, 987-994. f) Ottmann

- C *et al.*, *J Mol Biol* (2009) **386**, 913-919. g) Camoni L *et al.*, *Biochem J* (2011) **436**, 429-436. h) De Vries-van Leeuwen IJ *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2013) **110**, 8894-8899. i) Molzan M *et al.*, *J Am Chem Soc Chem Biol* (2013) **8**, 1869-1875.
- [45] a) Kleppe R *et al.*, *Sem Cell Develop Biol* (2011) **22**, 713-719. b) Gardinoa AK *et al.*, *Sem Cell Dev Biol* (2011) **22**, 688-695.
- [46] Obsil T *et al.*, *Sem Cell Develop Biol* (2011) **22**, 663-672.
- [47] a) Steinacker P *et al.*, *Sem Cell Develop Biol* (2011) **22**, 696-704. b) Freeman AK *et al.*, *Sem Cell Dev Biol* (2011) **22**, 681-687.
- [48] a) Yaffe MB *et al.*, *Cell* **91**, 961-971. b) Rittinger K *et al.*, *Molecular Cell* **4**, 153-166. c) Ganguly S *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) **102**, 1222-1227. d) Coblitz B *et al.*, *J Biol Chem* (2005) **280**, 36263-36272. e) Coblitz B *et al.*, *FEBS Letters* (2006) **580**, 1531-1535.
- [49] Johansson F *et al.*, *Plant Cell* (1993) **5**, 321-327.
- [50] a) Turner NC *et al.*, *Nature* (1969) **223**, 1070-1071. b) Squire GR *et al.*, *New Phytologist* (1974) **73**, 433-440.
- [51] a) Ono Y *et al.*, *J Am Chem Soc* (2011) **133**, 2548-2555. b) Noike M *et al.*, *PLoS One* (2012) **7**, e42090 42091-42010.
- [52] a) Au TK *et al.*, *Plant Physiol* (1998) **118**, 965-973. b) Leung PC *et al.*, *Int J Biochem* (1988) **20**, 1351-1359.
- [53] a) Toyomasu T *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) **104**, 3084-3088. b) Minami A *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett* (2009) **19**, 870-874.
- [54] a) Hashimoto M *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett* (2009) **19**, 5640-5643. b) Noike M *et al.*, *ChemBioChem* (2012) **13**, 566-573.
- [55] Weissman KJ *et al.*, *Nature Rev Microbiol* (2005) **3**, 925-936.
- [56] a) Clardy J *et al.*, *Nature* (2004) **432**, 829-837. b) Lorente A *et al.*, *Ann Mar Biol Res* (2014) **1**, 1003-1013.
- [57] Hopwood DA *et al.*, *Annu Rev Genet* (1990) **24**, 37-66.
- [58] Hopwood DA, *Chem Rev* (1997) **97**, 2465-2497.
- [59] Birch AJ, *Science* (1967) **156**, 202-206.
- [60] Shen B, *Curr Opin Chem Biol* (2003) **7**, 285-295.
- [61] a) Beck J *et al.*, *Eur J Biochem* (1990) **192**, 487-498. b) Cortes J *et al.*, *Nature* (1990) **348**, 176-178. c) Donadio S *et al.*, *Science* (1991) **252**, 675-679. d) Donadio S *et al.*, *Gene* (1992) **111**, 51-60.
- [62] Bibb MJ *et al.*, *EMBO J* (1989) **8**, 2727-2736.
- [63] Hashimoto M *et al.*, *Nat Prod Rep* (2014) **31**, 1306-1317.
- [64] a) Katz L *et al.*, *J Am Chem Soc* (1992) **203**, 22-Btec. b) Hertweck C, *Angew Chem Int Ed Engl* (2009) **48**, 4688-4716.
- [65] Fischbach MA *et al.*, *Chem Rev* (2006) **106**, 3468-3496.
- [66] a) Moore BS *et al.*, *Nat Prod Rep* (2002) **19**, 70-99. b) Chan YA *et al.*, *Nat Prod Rep* (2009) **26**, 90-114. c) Wilson MC *et al.*, *Nat Prod Rep* (2012) **29**, 72-86.
- [67] Mo S *et al.*, *J Am Chem Soc* (2011) **133**, 976-985.
- [68] Klopries S, *Neue Methoden zur synthetischen und mikrobiellen Naturstoffderivatisierung*, 2014, Technische Universität Dortmund.
- [69] Sundermann U *et al.*, *Nachrichten aus der Chemie* (2011) **59**, 29-35.
- [70] a) Kohli RM *et al.*, *Chem Commun* (2003) 297-307. b) Kopp F *et al.*, *Nat Prod Rep* (2007) **24**, 735-749.
- [71] Harvey BM *et al.*, *ChemBioChem* (2006) **7**, 1435-1442.
- [72] Rix U *et al.*, *Nat Prod Rep* (2002) **19**, 542-580.
- [73] Cardellina JH *et al.*, *Can J Chem* (1982) **60**, 2675-2677.
- [74] Kingston DGI, *Trends Biotechnol* (1994) **12**, 222-227.
- [75] Horwitz SB, *Nature* (1994) **367**, 593-594.
- [76] Nicolaou KC *et al.*, *Nature* (1994) **367**, 630-634.
- [77] a) <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>. b) World Economic Forum, *Global risks 2014*, 2014. c) Barouch-Bentov R *et al.*, *Expert Opin Invest Drugs* (2011) **20**, 153-208.
- [78] <http://www.phytonbiotech.com>
- [79] Feling R *et al.*, *Chemie Ingenieur Technik* (2012) **84**, 1325-1332.
- [80] Arens J, *Heterologe Fermentation eines 5-8-5 tricyclischen Diterpens*, 2011, Technische Universität Dortmund.
- [81] a) de Boer AH *et al.*, *Tren Plant Sci* (2012) **17**, 360-368. b) Milroy LG *et al.*, *Chem Rev* (2014) **114**, 4695-4748. c) Giordanetto F *et al.*, *Drug Discovery Today* (2014) **19**, 1812-1821.

- [82] a) Kato N *et al.*, *Tetrahedron* (1996) **52**, 3921-3932. b) Grayson DH *et al.*, *J Chem Soc Chem Commun* (1984) 1695-1696. c) Jenny L *et al.*, *Helv Chim Acta* (1995) **78**, 715-731. d) Williams DR *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl* (2007) **46**, 915-918. e) Richter A *et al.*, *J Org Chem* (2011) **76**, 6694-6702. f) Michalak M *et al.*, *J Org Chem* (2011) **76**, 7497-7509.
- [83] Mendoza A *et al.*, *Nat Chem* (2012) **4**, 21-25.
- [84] Zhang H *et al.*, *Nat Prod Rep* (2011) **28**, 125-151.
- [85] a) Bestor TH *et al.*, *Dev Gen* (1994) **15**, 458-462. b) Selker EU, *Trends Genet* (1997) **13**, 296-301. c) Yu JH *et al.*, *Annual Review of Phytopathology* (2005) **43**, 437-458. d) Brück T *et al.*, *ChemCatChem* (2014) **6**, 1142-1165. e) Demain AL *et al.*, *Biotechnol Adv* (2009) **27**, 297-306.
- [86] Keasling JD, *Metab Eng* (2012) **14**, 189-195.
- [87] Arens J *et al.*, *Chem Commun* (2013) **49**, 4337-4339.
- [88] a) Makrides SC, *Microbiol Rev* (1996) **60**, 512-538. b) Terpe K, *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) **72**, 211-222.
- [89] a) Grossman TH *et al.*, *Gene* (1998) **209**, 95-103. b) Studier FW, *Protein Expr Purif* (2005) **41**, 207-234.
- [90] <http://web.expasy.org/protparam/>
- [91] a) Kajiwara S *et al.*, *Biochem J* (1997) **324**, 421-426. b) Farmer WR *et al.*, *Nat Biotechnol* (2000) **18**, 533-537. c) Kim SW *et al.*, *Biotechnol Bioeng* (2001) **72**, 408-415. d) Maury J *et al.*, *FEBS Lett* (2008) **582**, 4032-4038. e) Rodriguez-Villalon A *et al.*, *J Biotechnol* (2008) **135**, 78-84. f) Morrone D *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* (2010) **85**, 1893-1906.
- [92] a) Huang Q *et al.*, *Bioorg Med Chem* (2001) **9**, 2237-2242. b) Martin VJ *et al.*, *Nat Biotechnol* (2003) **21**, 796-802. c) Anthony JR *et al.*, *Metab Eng* (2009) **11**, 13-19. d) Tsuruta H *et al.*, *PLoS One* (2009) **4**, e4489. e) Boghigian BA *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* (2011) 1651-1661. f) Dayem LC *et al.*, *Biochemistry* (2002) **41**, 5193-5201. g) Menzella HG *et al.*, *Appl Environ Microbiol* (2010) **76**, 5221-5227. h) Ajikumar PK *et al.*, *Science* (2010) **330**, 70-74.
- [93] a) Shapiro BE *et al.*, *J Gen Microbiol* (1982) **128**, 1053-1056. b) Bromann K *et al.*, *PLoS One* (2012) **7**, e35450 35451-35414.
- [94] a) Lubertozzi D *et al.*, *J Ind Microbiol Biotechnol* (2008) **35**, 1191-1198. b) Engels B, *Untersuchungen zur Biosynthese sesquiterpenoider Naturstoffe, der Melleolide, in Armillaria gallica*, 2013, RWTH Aachen University.
- [95] a) Pandey A *et al.*, *Current Science* (1999) **77**, 149-162. b) Couto SR *et al.*, *J Food Eng* (2006) **76**, 291-302. c) Toke ER *et al.*, *Journal of the American Oil Chemists Society* (2007) **84**, 907-915. d) Machado I *et al.*, *J Biotechnol* (2013) **165**, 195-200.
- [96] Hölker U *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* (2004) **64**, 175-186.
- [97] Pandey A *et al.*, *Process Biochem* (2000) **35**, 1153-1169.
- [98] a) Aleksenko A *et al.*, *Mol Microbiol* (1996) **19**, 565-574. b) Aleksenko A *et al.*, *Fungal Genet Biol* (1997) **21**, 373-387.
- [99] a) Punt PJ *et al.*, *Gene* (1990) **93**, 101-109. b) <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11801016>. c) Yelton MM *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1984) **81**, 1470-1474.
- [100] Hashida-Okado T *et al.*, *Mol Gen Genet* (1996) **251**, 236-244.
- [101] Kelly DE *et al.*, *Fungal Genet Biol* (2009) **46 Suppl 1**, S53-61.
- [102] a) Crock J *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) **94**, 12833-12838. b) Colby SM *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) **95**, 2216-2221. c) Steele CL *et al.*, *J Biol Chem* (1998) **273**, 2078-2089. d) Mercke P *et al.*, *Arch Biochem Biophys* (1999) **369**, 213-222. e) Benedict CR *et al.*, *Plant Physiol* (2001) **125**, 1754-1765. f) Köllner TG *et al.*, *Plant Cell* (2004) **16**, 1115-1131. g) Tholl D *et al.*, *Plant J* (2005) **42**, 757-771. h) Picaud S *et al.*, *Arch Biochem Biophys* (2005) **436**, 215-226. i) Deguerry F *et al.*, *Arch Biochem Biophys* (2006) **454**, 123-136. j) Agger S *et al.*, *Mol Microbiol* (2009) **72**, 1181-1195.
- [103] a) Withers ST *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* (2007) **73**, 980-990. b) Misawa N, *Curr Opin Biotechnol* (2011) **22**, 627-633.
- [104] a) Ro DK *et al.*, *Nature* (2006) **440**, 940-943. b) Shiba Y *et al.*, *Metab Eng* (2007) **9**, 160-168. c) Ro DK *et al.*, *BMC Biotechnol* (2008) **8**, 83-96. d) Dietrich JA *et al.*, *J Am Chem Soc Chem Biol* (2009) **4**, 261-267. e) Westfall PJ *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2012) **109**, E111-E118. f) Paddon CJ *et al.*, *Nature* (2013) **496**, 528-532.
- [105] Van Mullem V *et al.*, *Yeast* (2003) **20**, 739-746.
- [106] Engels B *et al.*, *Metab Eng* (2008) **10**, 201-206.
- [107] Jackson BE *et al.*, *Org Lett* (2003) **5**, 1629-1632.

- [108] a) Lewis TL *et al.*, *Yeast* (1988) **4**, 93-106. b) Crowley JH *et al.*, *J Bacteriol* (1998) **180**, 4177-4183. c) Vik Å *et al.*, *Mol Cell Biol* (2001) **21**, 6395-6405.
- [109] a) Trocha PJ *et al.*, *Arch Biochem Biophys* (1976) **174**, 45-51. b) Lorenz RT *et al.*, *Lipids* (1991) **26**, 598-603.
- [110] Rosenfeld E *et al.*, *Yeast* (2003) **20**, 1115-1144.
- [111] a) Wilcox LJ *et al.*, *J Biol Chem* (2002) **277**, 32466-32472. b) Davies BS *et al.*, *Mol Cell Biol* (2005) **25**, 7375-7385. c) Davies BSJ *et al.*, *Genetics* (2006) **174**, 191-201.
- [112] Newman JD *et al.*, *Biotechnol Bioeng* (2006) **95**, 684-691.
- [113] a) Pesnelle P *et al.*, *J Org Chem* (1965) **30**, 1744-1747. b) Vonach B *et al.*, *J Chromatogr* (1978) **149**, 417-430. c) Williams CM *et al.*, *Tetrahedron* (2001) **57**, 425-447.
- [114] Ohnuma S *et al.*, *J Biol Chem* (1994) **269**, 14792-14797.
- [115] Hefner J *et al.*, *Arch Biochem Biophys* (1998) **360**, 62-74.
- [116] Labbe-Bois R *et al.*, *Arch Biochem Biophys* (1977) **179**, 565-577.
- [117] Chieml H, in *Bioprozesstechnik, Vol. 3. Auflage*, (Hrsg.: Chieml H), (2011) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp. 197-236.
- [118] Arens J *et al.*, *Mycology* (2014) **5**, 207-219.
- [119] a) Kurland CG, *FEBS Lett* (1991) **285**, 165-169. b) Zhang SP *et al.*, *Gene* (1991) **105**, 61-72. c) Wada KN *et al.*, *Nucleic Acids Res* (1992) **20**, 2111-2118.
- [120] a) Ikemura T, *Journal of Molecular Biology* (1981) **146**, 1-21. b) Kanaya S *et al.*, *Gene* (1999) **238**, 143-155.
- [121] a) Kane JF, *Curr Opin Biotechnol* (1995) **6**, 494-500. b) Kurland C *et al.*, *Curr Opin Biotechnol* (1996) **7**, 489-493. c) Kramer G *et al.*, *Nature Structural & Molecular Biology* (2009) **16**, 589-597.
- [122] Elena C *et al.*, *Front Microbiol* (2014) **5**, 1-8.
- [123] <http://www.gcu.de>
- [124] <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/gene-synthesis-molecular-biology/geneius.aspx>
- [125] Toyomasu T *et al.*, *Org Lett* (2009) **11**, 3044-3047.
- [126] Kresnowati MTAP *et al.*, *Metab Eng* (2010) **10**, 39-54.
- [127] a) Shiloach J *et al.*, *Biotechnol Adv* (2005) **23**, 345-357. b) Pereira AP *et al.*, *Food Microbiology* (2013) **33**, 114-123.
- [128] Weusthuis RA *et al.*, *Microbiology (UK)* (1994) **140**, 703-715.
- [129] Pronk JT *et al.*, *Yeast* (1996) **12**, 1607-1633.
- [130] van den Berg MA *et al.*, *J Biol Chem* (1996) **271**, 28953-28959.
- [131] a) Chen F *et al.*, *Acta Microbiol Sinica* (2010) **50**, 1172-1179. b) Chen Y *et al.*, *Metab Eng* (2013) **15**, 48-54.
- [132] a) Rieger M *et al.*, *J Gen Microbiol* (1983) **129**, 653-661. b) van Urk H *et al.*, *J Gen Microbiol* (1989) **135**, 2399-2406. c) Postma E *et al.*, *Appl Environ Microbiol* (1989) **55**, 468-477.
- [133] Causton HC *et al.*, *Mol Biol Cell* (2001) **12**, 323-337.
- [134] a) DeRisi JL *et al.*, *Science* (1997) **278**, 680-686. b) Gasch AP *et al.*, *Mol Biol Cell* (2000) **11**, 4241-4257.
- [135] Asadollahi MA *et al.*, *Biotechnol Bioeng* (2010) **106**, 86-96.
- [136] Cha HJ *et al.*, *Process Biochem* (1998) **33**, 257-261.
- [137] a) Brennan TC *et al.*, *Biotechnol Bioeng* (2012) **109**, 2513-2522. b) Malinowski JJ, *Biotechnol Adv* (2001) **19**, 525-538.
- [138] Oyugi DA *et al.*, *J Biosci Tech* (2011) **2**, 287-304.
- [139] Bard M *et al.*, *Lipids* (1988) **23**, 534-538.
- [140] Parveen M *et al.*, *J Antimicrob Chemother* (2004) **54**, 46-55.
- [141] a) Asadollahi MA *et al.*, *Biotechnol Bioeng* (2008) **99**, 666-677. b) Albertsen L *et al.*, *Appl Environ Microbiol* (2011) **77**, 1033-1040. c) Scalcinati G *et al.*, *Metab Eng* (2012) **14**, 91-103.
- [142] Laane C *et al.*, *Biotechnol Bioeng* (1987) **30**, 81-87.
- [143] Orij R *et al.*, *Microbiology* (2009) **155**, 268-278.
- [144] Bergs D, *A contribution to chromatographic purification of natural products*, 2013, Technische Universität Dortmund.
- [145] Faust U, Präve P, Sittig W, Sukatsch DA (Hrsg.), *Handbuch der Biotechnologie*, (1994) R. Oldenbourg Verlag, München.
- [146] Chang HN *et al.*, *Biotechnol Adv* (2014) **32**, 514-525.
- [147] Davis RH, *Bioprocess Technol* (1995) **20**, 135-185.
- [148] Sanofi *et al.*, *Sanofi und PATH geben Start der Großproduktion von halbsynthetischem Artemisinin gegen Malaria bekannt*, 2013.
- [149] Halka LM, *laufende Dissertation*, Technische Universität Dortmund.



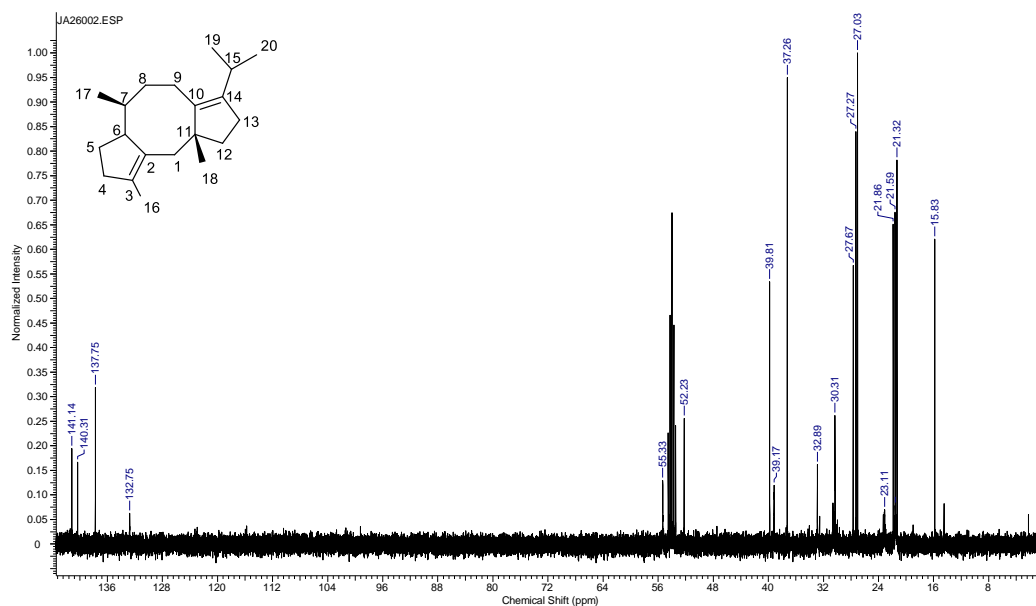
- [150] Scalcinati G *et al.*, *Microb Cell Fact* (2012) **11**, 117-133.
- [151] Ignea C *et al.*, *Microb Cell Fact* (2011) **10**, 1-18.
- [152] Leonard E *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) **107**, 13654-13659.
- [153] a) Alper H *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) **102**, 12678-12683. b) Lauchli R *et al.*, *Angew Chem Int Ed* (2013) **52**, 5571-5574.
- [154] a) Cane DE *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) **100**, 1547-1551. b) Agger SA *et al.*, *J Bacteriol* (2008) **190**, 6084-6096. c) Yamada Y *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2015) **112**, 857-862. d) Hartwig S *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* (2015) **458**, 883-889.
- [155] Dyson MR, *Biochem Soc Trans* (2010) **38**, 908-913.
- [156] Illanes A *et al.*, *Bioresour Technol* (2012) **115**, 48-57.
- [157] Dubendorff JW *et al.*, *J Mol Biol* (1991) **219**, 45-59.
- [158] Smith DB *et al.*, *Gene* (1988) **67**, 31-40.
- [159] Dyson M *et al.*, *BMC Biotechnology* (2004) **4**, 32-49.
- [160] Studier FW *et al.*, *J Mol Biol* (1986) **189**, 113-130.
- [161] a) Gronenborn B, *Mol Gen Genet* (1976) **148**, 243-250. b) Nöbel N, *Aufbau eines Screeningverfahrens zur Durchmusterung von Variantenbibliotheken der T7-RNA-Polymerase hinsichtlich des Einbaus 2'-Methoxy-modifizierter Nucleotide*, 2011, Universität Leipzig.
- [162] Guzman LM *et al.*, *J Bacteriol* (1995) **177**, 4121-4130.
- [163] Lin-Chao S *et al.*, *Mol Microbiol* (1992) **6**, 3385-3393.
- [164] Bachmann BJ, *Microbiol Rev* (1990) **54**, 130-197.
- [165] Buchner J *et al.*, *Nature* (1990) **343**, 601-602.
- [166] a) Betancor L *et al.*, *ChemBioChem* (2008) **9**, 2962-2966. b) [http://www.merckmillipore.com/DE/en/product/pETcoco%E2%84%A2-2-System---Novagen,EMD\\_BIO-71149](http://www.merckmillipore.com/DE/en/product/pETcoco%E2%84%A2-2-System---Novagen,EMD_BIO-71149)
- [167] Eijsink VG *et al.*, *J Biotechnol* (2004) **113**, 105-120.
- [168] a) <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>. b) Zhang Y, *BMC Bioinformatics* (2008) **9**, 40. c) Roy A *et al.*, *Nature Protocols* (2010) **5**, 725-738. d) Yang J *et al.*, *Nat Methods* (2015) **12**, 7-8.
- [169] a) Eigen M *et al.*, *Pure Appl Chem* (1984) **56**, 967-978. b) Cobb RE *et al.*, *AIChE J* (2013) **59**, 1432-1440.
- [170] Arnold FH, *FASEB J* (1993) **7**, 744-749.
- [171] Waldo GS, *Curr Opin Chem Biol* (2003) **7**, 33-38.
- [172] a) Knaust RK *et al.*, *Anal Biochem* (2001) **297**, 79-85. b) Peabody DS *et al.*, *Nucleic Acids Res* (2001) **29**, E113.
- [173] a) Cha HJ *et al.*, *Appl Environ Microbiol* (1999) **65**, 409-414. b) Lesley SA *et al.*, *Protein Eng* (2002) **15**, 153-160. c) Kraft M *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* (2007) **75**, 397-406.
- [174] a) Waldo GS *et al.*, *Nat Biotechnol* (1999) **17**, 691-695. b) Maxwell KL *et al.*, *Protein Science* (1999) **8**, 1908-1911. c) Wigley WC *et al.*, *Nat Biotechnol* (2001) **19**, 131-136.
- [175] Reetz MT *et al.*, *ChemBioChem* (2011) **12**, 1529-1535.
- [176] Cabantous S *et al.*, *Nat Biotechnol* (2005) **23**, 102-107.
- [177] Mewes M, *Herstellung eines Reporterkonstruktes zur gerichteten Proteinevolution zur Erhöhung der Löslichkeit von Terpensynthasen*, 2012, Technische Universität.
- [178] Kaur J *et al.*, *Crit Rev Biotechnol* (2006) **26**, 165-199.
- [179] a) Stemmer WP, *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) **91**, 10747-10751. b) Hill DE *et al.*, *Methods Enzymol* (1987) **155**, 558-568.
- [180] a) Leung DW *et al.*, *Technique* (1989) **1**, 11-15. b) Cadwell RC *et al.*, *PCR Methods Appl* (1992) **2**, 28-33.
- [181] Keohavong P *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) **86**, 9253-9257.
- [182] a) Beckman RA *et al.*, *Biochemistry* (1985) **24**, 5810-5817. b) Spee JH *et al.*, *Nucleic Acids Res* (1993) **21**, 777-778. c) Lin-Goerke JL *et al.*, *Biotechniques* (1997) **23**, 409-412.
- [183] Cirino PC *et al.*, in *Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols*, Vol. **231**, (Hrsg.: Arnold FH, Georgiou G), (2004) Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 3-9.
- [184] Sliatly SN *et al.*, *Gene* (1998) **213**, 83-91.
- [185] Sieber V, in *Directed enzyme evolution: screening and selection methods*, Vol. **230**, (Hrsg.: Arnold FH, Georgiou G), (2004) Humana Press Inc., pp. 45-55.
- [186] Shine J *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1974) **71**, 1342-1346.
- [187] Vallon T *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* (2008) **81**, 175-182.
- [188] Kokorin A, *Experimente zur gerichteten Evolution mit unlöslich exprimierenden Terpensynthasen*, 2014, Ruhr-Universität Bochum.

- [189] Ebke H, *Gerichtete Evolution der Fusicoccadiensynthese zur Erhöhung der Löslichkeit des Proteins*, 2014, Ruhr-Universität Bochum.
- [190] Eichert P, *Untersuchungen zur präparativen Fermentation des Diterpens Fusicoccadien*, 2014, Ruhr-Universität Bochum.
- [191] a) Miyazaki K, in *Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols*, **Vol. 231**, (Hrsg.: Arnold FH, Georgiou G), (2003) Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 23-28. b) Ebke H, *laufende Masterarbeit*, voraussichtliche Abgabe 2015, Ruhr-Universität Bochum.
- [192] Darby RA *et al.*, *Methods Mol Biol* (2012) **866**, 11-23.
- [193] Waterham HR *et al.*, *Gene* (1997) **186**, 37-44.
- [194] Brooks SA, *Expert Rev Proteomics* (2006) **3**, 345-359.
- [195] Barr KA *et al.*, *Pharm Eng* (1992) **12**, 48-51.
- [196] Invitrogen, *Manual* (2010) **MAN0000717**, 1-78.
- [197] Cregg JM *et al.*, in *Pichia protocols*, **Vol. 103**, (Hrsg.: Higgins DR, Cregg JM), (1998) Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 27-40.
- [198] Ogata K *et al.*, *Agric Biol Chem* (1969) **33**, 1519-1520.
- [199] Couderc R *et al.*, *Agric Biol Chem* (1980) **44**, 2279-2289.
- [200] Cregg JM *et al.*, *Mol Cell Biol* (1989) **9**, 1316-1323.
- [201] Tschopp JF *et al.*, *Nucleic Acids Res* (1987) **15**, 3859-3876.
- [202] Jones EW *et al.*, in *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and gene expression*, (Hrsg.: Strathern JN, Jones EW, Broach JR), (1982) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp.
- [203] Zonneveld BJ *et al.*, *Yeast* (1995) **11**, 823-827.
- [204] a) Ballio A *et al.*, *Phytopathologia Mediterranea* (1971) **10**, 26-32. b) Ballio A *et al.*, *Physiol. Plant.* (1981) **52**, 476-481.
- [205] Newhouse T *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl* (2011) **50**, 3362-3374.
- [206] a) Kille S *et al.*, *Nat Chem* (2011) **3**, 738-743. b) Caswell JM *et al.*, *Curr Opin Chem Biol* (2013) **17**, 271-275.
- [207] Isin EM *et al.*, *Biochim Biophys Acta* (2007) **1770**, 314-329.
- [208] Denisov IG *et al.*, *Chem Rev* (2005) **105**, 2253-2277.
- [209] Narhi LO *et al.*, *J Biol Chem* (1986) **261**, 7160-7169.
- [210] a) Chowdhary PK *et al.*, *Arch Biochem Biophys* (2007) **468**, 32-43. b) Munro AW *et al.*, *Biochim Biophys Acta* (2007) **1770**, 345-359.
- [211] Schwaneberg U *et al.*, *J Chromatogr A* (1999) **848**, 149-159.
- [212] a) Ravichandran KG *et al.*, *Science* (1993) **261**, 731-736. b) Haines DC *et al.*, *Biochemistry* (2001) **40**, 13456-13465.
- [213] Rowlatt B *et al.*, *Protein Cell* (2011) **2**, 656-671.
- [214] a) Chen MM *et al.*, *Protein Eng Des Sel* (2012) **25**, 171-178. b) Li QS *et al.*, *Chemistry* (2000) **6**, 1531-1536. c) Appel D *et al.*, *J Biotechnol* (2001) **88**, 167-171. d) Sowden RJ *et al.*, *Org Biomol Chem* (2005) **3**, 57-64. e) Seifert A *et al.*, *ChemBioChem* (2009) **10**, 853-861.
- [215] a) Oliver CF *et al.*, *Biochemistry* (1997) **36**, 1567-1572. b) Li QS *et al.*, *FEBS Lett* (2001) **508**, 249-252. c) Li QS *et al.*, *Appl Environ Microbiol* (2001) **67**, 5735-5739. d) Vottero E *et al.*, *J Biol Inorg Chem* (2011) **16**, 899-912.
- [216] Kille S, *Flavoproteins in directed evolution: Iterative CASTing to evolve YgjM and P450<sub>BM3</sub>*, 2010, Ruhr-Universität Bochum.
- [217] Reetz MT *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl* (2005) **44**, 4192-4196.
- [218] a) Zhao H *et al.*, *Curr Opin Biotechnol* (2003) **14**, 583-589. b) van der Donk WA *et al.*, *Curr Opin Biotechnol* (2003) **14**, 421-426.
- [219] Xu Z *et al.*, *J Ind Microbiol Biotechnol* (2007) **34**, 83-90.
- [220] Schulz F, *Monoxygenases: Experiments to turn a class of enzymes into a toolbox for biocatalysis*, 2007, Ruhr-Universität Bochum.
- [221] Takahashi S *et al.*, *J Biol Chem* (2007) **282**, 31744-31754.
- [222] Vemula VR *et al.*, *Int J Pharm Sci Rev Res* (2010) **5**, 41-51.
- [223] Wong TS *et al.*, *Biotechnol Bioeng* (2004) **85**, 351-358.
- [224] Kuper J *et al.*, *J Am Chem Soc* (2007) **129**, 5786-5787.
- [225] Park S *et al.*, *Curr Opin Biotechnol* (2003) **14**, 432-437.
- [226] Loftsson T *et al.*, *J Pharm Sci* (1996) **85**, 1017-1025.
- [227] Tee KL *et al.*, *Green Chem* (2008) **10**, 117-123.
- [228] Hofstetter K *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl* (2004) **43**, 2163-2166.
- [229] a) Maurer SC *et al.*, *Adv Synth Catal* (2005) **347**, 1090-1098. b) Hilker I *et al.*, *Org Lett* (2004) **6**, 1955-1958.

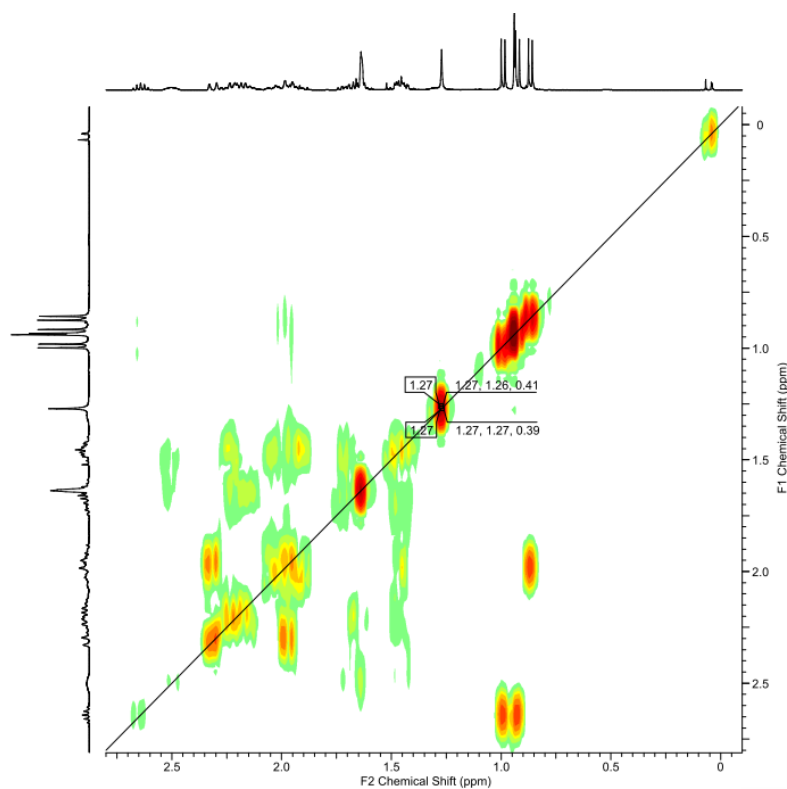
- [230] Klibanov KM, *Acc Chem Res* (1990) **23**, 114-120.
- [231] Jakoblinnert A *et al.*, *Chem Commun* (2011) **47**, 12230-12232.
- [232] Stepankova V *et al.*, *J Am Chem Soc Catal* (2013) **3**, 3823-3836.
- [233] Faber K (Hrsg.), *Bitransformations in organic chemistry: A Textbook*, (2011) Springer-Verlag GmbH, Berlin.
- [234] Zhang YH, *Biotechnol Bioeng* (2010) **105**, 663-677.
- [235] a) Daines AM *et al.*, *Curr Opin Chem Biol* (2004) **8**, 106-113. b) Chi Y *et al.*, *J Am Chem Soc* (2008) **130**, 6322-6323.
- [236] Mateo C *et al.*, *Enzym Microb Tech* (2007) **40**, 1451-1463.
- [237] a) Maurer SC *et al.*, *Adv Synth Catal* (2003) **345**, 802-810. b) Rocha-Martin J *et al.*, *Chem Cat Chem* (2012) **4**, 1279-1288. c) Luo J *et al.*, *New Biotechnol* (2015) **32**, 319-327.
- [238] a) Zamost BL *et al.*, *J Indust Microbiol* (1991) **8**, 71-82. b) Haki GD *et al.*, *Biosource Technology* (2003) **89**, 17-34.
- [239] a) Bochar DA *et al.*, *J Bacteriol* (1997) **179**, 3632-3638. b) Huang KX *et al.*, *Protein Expr Purif* (1999) **17**, 33-40. c) Yamashita S *et al.*, *Eur J Biochem* (2004) **271**, 1087-1093.
- [240] a) <http://www.genome.jp/kegg/>. b) <http://metacyc.org/>
- [241] a) Liu T *et al.*, *Extremophiles* (2002) **6**, 97-102. b) Bischoff KM *et al.*, *J Bacteriol* (1996) **178**, 19-23.
- [242] Boronat A *et al.*, *Adv Biochem Eng Biotechnol* (2014) [epub ahead of print].
- [243] <http://dpf.mpi-dortmund.mpg.de/>
- [244] Dirkmann M, *Untersuchungen zur ex vivo Rekonstitution des Mevalonatwegs*, 2013, Technische Universität.
- [245] a) Middleton B *et al.*, *Biochem J* (1972) **126**, 27-34. b) Stern JR, *J Biol Chem* (1956) **221**, 33-44.
- [246] a) Ellman GL, *Arch Biochem Biophys* (1958) **74**, 443-450. b) Skaff DA *et al.*, *Anal Biochem* (2010) **396**, 96-102.
- [247] Nagegowda DA *et al.*, *Biochem J* (2004) **383**, 517-527.
- [248] Dirkmann M, *laufende Dissertation*, voraussichtliche Abgabe 2017, Ruhr-Universität Bochum.
- [249] Korman TP *et al.*, *Protein Sci* (2014) **23**, 576-585.
- [250] Chew W *et al.*, Corp W, 2005, WO2005016935 A2.
- [251] Mutak S, *J Antibiot (Tokyo)* (2007) **60**, 85-122.
- [252] a) McDaniel R *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) **96**, 1846-1851. b) Gaisser S *et al.*, *Org Biomol Chem* (2003) **1**, 2840-2847. c) Kushnir S *et al.*, *Angew Chem Int Ed* (2012) **51**, 10664-10669.
- [253] a) Khosla C *et al.*, *Annu Rev Biochem* (1999) **68**, 219-253. b) Xu Z *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl* (2011) **50**, 4667-4670. c) Hughes AJ *et al.*, *Chem Biol* (2011) **18**, 165-176. d) Koryakina I *et al.*, *Org Biomol Chem* (2013) **11**, 4449-4458. e) Sundermann U *et al.*, *J Am Chem Soc Chem Biol* (2013) **8**, 443-450. f) Bravo-Rodriguez K *et al.*, *ChemBioChem* (2014) **15**, 1991-1997.
- [254] Haydock SF *et al.*, *FEBS Lett* (1995) **374**, 246-248.
- [255] a) Koryakina I *et al.*, *J Am Chem Soc Chem Biol* (2013) **8**, 200-208. b) Klopries S *et al.*, *Beilstein J Org Chem* (2013) **9**, 664-674.
- [256] Dunn BJ *et al.*, *Biochemistry* (2014) **53**, 3796-3806.
- [257] Wong FT *et al.*, *Curr Opin Chem Biol* (2012) **16**, 117-123.
- [258] a) Ruan X *et al.*, *J Bacteriol* (1997) **179**, 6416-6425. b) Reeves CD *et al.*, *Biochemistry* (2001) **40**, 15464-15470. c) Hans M *et al.*, *J Am Chem Soc* (2003) **125**, 5366-5374. d) Nguyen KT *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) **103**, 17462-17467. e) Ridley CP *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) **105**, 4595-4600. f) Sundermann U, *Reduzierte Polyketide: Beiträge zur Erforschung und Manipulation der Substratspezifität von Polyketidsynthasen*, 2012, Technische Universität Dortmund.
- [259] a) Kao CM *et al.*, *Science* (1994) **265**, 509-512. b) Kwan DH *et al.*, *Org Biomol Chem* (2011) **9**, 2053-2056.
- [260] a) Tang Y *et al.*, *Chem Biol* (2007) **14**, 931-943. b) Tang Y *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) **103**, 11124-11129.
- [261] Bravo-Rodriguez K, *Regulation of protein properties by small molecules and computational mutagenesis*, 2015, Ruhr-Universität Bochum.
- [262] a) Rinehart KLJ, *Pure Appl Chem* (1977) **49**, 1361-1384. b) Weissman KJ, *Trends Biotechnol* (2007) **25**, 139-142.

- [263] a) Bravo-Rodriguez K *et al.*, *Chemistry & Biology* (2015) **akzeptiert**. b) Klopries S *et al.*, *Data in Brief* (2015) **akzeptiert**.
- [264] Koopmans KRM, *laufende Dissertation*, voraussichtliche Abgabe 2016, Ruhr-Universität Bochum.
- [265] Rowe CJ *et al.*, *Gene* (1998) **216**, 215-223.
- [266] Pryk N, *laufende Dissertation*, voraussichtliche Abgabe 2016, Ruhr-Universität Bochum.
- [267] Keatinge-Clay AT *et al.*, *Structure* (2003) **11**, 147-154.
- [268] Engel C *et al.*, *Curr Opin Struct Biol* (1996) **6**, 790-797.
- [269] Oliynyk M *et al.*, *Mol Microbiol* (2003) **49**, 1179-1190.
- [270] a) Huczynski A *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett* (2008) **18**, 2585-2589. b) Gumila C *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* (1997) **41**, 523-529. c) Nakamura M *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* (1992) **36**, 492-494. d) Gupta PB *et al.*, *Cell* (2009) **138**, 645-659.
- [271] a) Pinkerton M *et al.*, *J Mol Biol* (1970) **49**, 533-546. b) Mollenhauer HH *et al.*, *Biochim Biophys Acta* (1990) **1031**, 225-246. c) Huczynski A *et al.*, *Biochim Biophys Acta* (2012) **1818**, 2108-2119.
- [272] a) Tohda K *et al.*, *Anal Sci* (1990) **6**, 227-232. b) Toko K, *Actuators B* (2000) **64**, 205-215. c) Kim N *et al.*, *Biosens Bioelectron* (2005) **20**, 2283-2291.
- [273] a) Beran M *et al.*, *Chromatographia* (1993) **35**, 206-208. b) Liu H *et al.*, *J Bacteriol* (1999) **181**, 6806-6813.
- [274] Bhatt A *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl* (2005) **44**, 7075-7078.
- [275] Ismail-Ali AF, voraussichtliche Abgabe 2016, Ruhr-Universität Bochum.
- [276] Hüttel W *et al.*, *Beilstein J Org Chem* (2014) **10**, 361-368.
- [277] Reynolds KA *et al.*, *J Chem Soc Perkin Trans 1* (1988) 3195-3207.
- [278] Li C *et al.*, *Microbiology* (2004) **150**, 3463-3472.
- [279] [http://openwetware.org/wiki/E.\\_coli\\_genotypes](http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes)
- [280] Bierman M *et al.*, *Gene* (1992) **116**, 43-49.
- [281] <http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/DNA-Club.shtml>
- [282] Chieml H (Hrsg.), *Bioprozesstechnik*, **Vol. 3. Auflage**, (2011) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [283] *Invitrogen*, (2010).
- [284] Smith JL *et al.*, *J Food Prot* (1990) **53**, 141-144.
- [285] Hopwood DA (Hrsg.), *Practical Streptomyces Genetics*, (2000) John Innes Centre, Norwich, England.
- [286] Fitzgerald NB *et al.*, *Appl Environ Microbiol* (1998) **64**, 1580-1583.
- [287] Ranganathan A *et al.*, *Chem Biol* (1999) **6**, 731-741.
- [288] Hüttel W, University of Cambridge, Cambridge, 2007, p. 23.
- [289] Inglis J (Hrsg.), *Methods in yeast genetics*, (2005) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [290] Inoue H *et al.*, *Gene* (1990) **96**, 23-28.
- [291] Pauly HE *et al.*, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* (1975) **356**, 1613-1623.
- [292] Li MZ *et al.*, *Nat Methods* (2007) **4**, 251-256.
- [293] Oliner JD *et al.*, *Nucleic Acids Res* (1993) **21**, 5192-5197.
- [294] <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cloning/gateway-cloning.html>
- [295] Kawai S *et al.*, *Bioeng Bugs* (2010) **1**, 395-403.
- [296] Treco A *et al.*, in *Current protocols in Molecular Biology*, (1993) John Wiley & Sons, Inc., New York, pp.
- [297] Laemmli UK, *Nature* (1970) **227**, 680-685.
- [298] Bradford MM, *Anal Biochem* (1976) **72**, 248-254.
- [299] Maxwell KL *et al.*, *Protein Sci* (2003) **12**, 2073-2080.
- [300] Prasad S *et al.*, *Appl Environ Microbiol* (2011) **77**, 4603-4609.
- [301] Bergmeyer HU (Hrsg.), *Methods of enzymatic analysis - Fundamentals I*, **Vol. 3**, (1983) Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel.
- [302] Lopes NP *et al.*, *Rapid Commun Mass Spectrom* (2002) **16**, 414-420.
- [303] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

## VIII Anhang



**Abbildung A1:** <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum des FCdiens.  $\delta$  [ppm] 15,83 (C16, CH<sub>3</sub>), 21,32 (C19/20, CH<sub>3</sub>), 21,54 (C17, CH<sub>3</sub>), 21,59 (C19/20, CH<sub>3</sub>), 21,86 (C9, CH<sub>2</sub>), 23,11 (C5, CH<sub>2</sub>), 27,03 (C18, CH<sub>3</sub>), 27,27 (C13, CH<sub>2</sub>), 27,67 (C15, CH), 30,31 (C7, CH), 32,89 (C8, CH<sub>2</sub>), 37,26 (C4, CH<sub>2</sub>), 39,81 (C1, CH<sub>2</sub>), 52,23 (C11, C), 55,33 (C6, CH), 132,75 (C3, C), 137,75 (C14, C), 140,31 (C2, C), 141,14 (C10, C).



**Abbildung A2:** gCOSY-Spektrum des FCdiens.

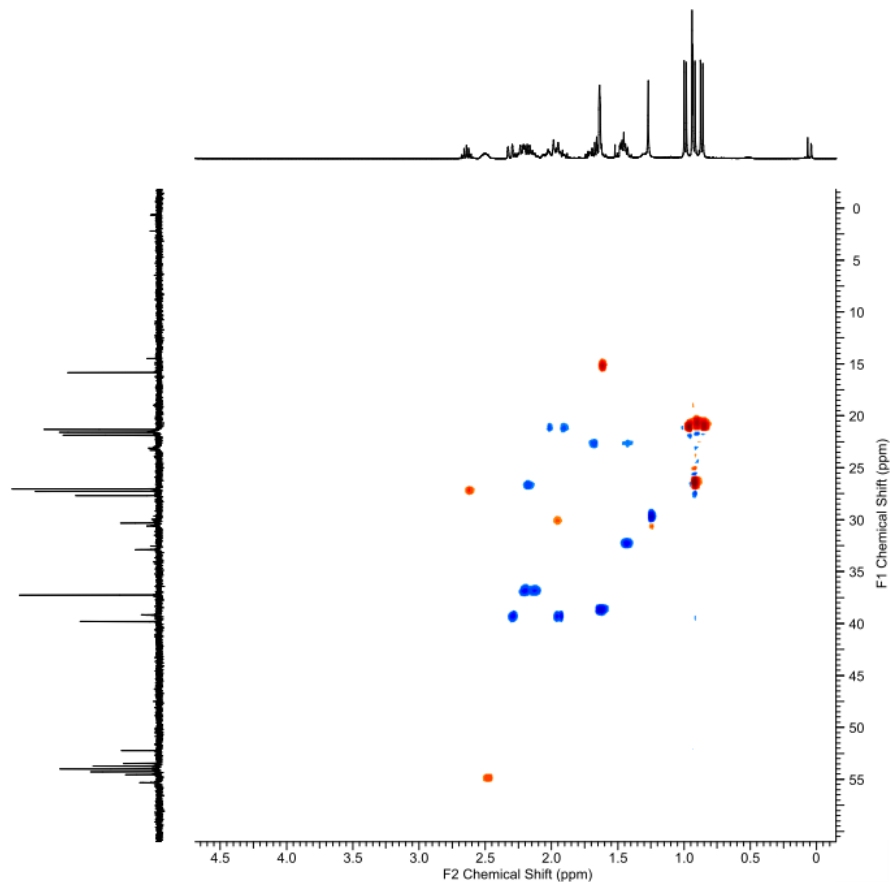
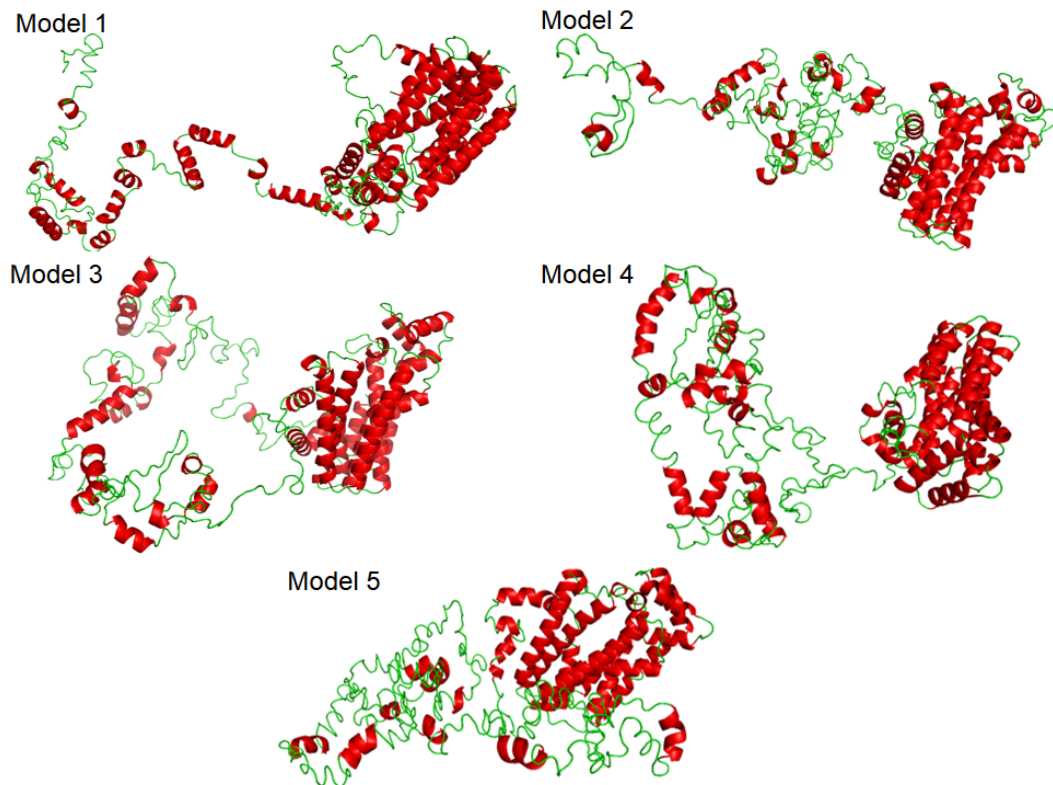


Abbildung A3: gHSQC-Spektrum des FCdiens.

ATGAAGTACCAGTTCTCCATCATTGTGGATCCAGCTACCTACGATAATGAGGGATTGAGCAATGGTATTGATTACGTAAG  
 AATAATTTTACGCACTTAGAGGATAGAGGTGCCATTAGAGCTCAGCAAGATTGGGCGACGCATATTGCGCCAATTAAGCAA  
 TTCAAGGGCACTTTAGGTCACGACTACTCCTTTATGACCGTTTGTGTCCAGAGTGTATCCCCATTAGGTTAGAGATAATC  
 AGCTATGCCAACGAATTTGCCTTTATGTATGACGATGACACAGAACTTGACACAGAGAATAATACGTCAGCTGAAAACGAC  
 AAATTGATGGGGACTTTTCTGGCAGGGACCCAAGGTTGGTCAACCACCACAAGATCAATCATCATCTGGCAAAACGAGAATT  
 TTGAAAACAGCTGTTTTAGAAAATGATGGAGATAGACAAAAGAATGTGCAATAGCCACTATGAAAGCCTGGGCAGAATTCCTA  
 CGTGTGGGTTTCGTAGACAACATGGAACAGTGTTTACACGTTTAAAAGACTATTTGCCGTATAGGATAAAGGATGTGGGA  
 GAGATGTTCTGGTTTGGCGTTGTGACTTTCGGCATGGCACTTCATATCCAGATCACGAAATGGATGCTTGTACAAAATG  
 ATGGAACCCGCATGGATTGCCGTAGGTTGGCCAATGACGCTTTTAGTTGGCCGAAAGAAAGAGATGCCTCGCAAAGATTG  
 GGTAGAACACATGTTGTCAATGCAGTTTGGGTTGTATGCAGGAACATGGCTTTTCTCAAGAACAAGCTAGACAATATTGC  
 AGGGAATTGGCCGCTCAATTTGTTGCTCAGTACTTAGACAACATTAGGAACATCAAGAACGAAGAATCGATATCACCCGAC  
 TTAAGAACGTACGTAGAGGCAATGCAGTATTCAATAAGCGGAAATGTTATCTGGTCTAAAATTTGCCCCGAGGTATAATCCA  
 GAAAAGAGATTTAACCAGACACAACCTTGATTGGATGCAAAAATGGTTTACCAAGTACTGTTGAACTAGATGGCGCAAGCAAT  
 ACCTCTTCGTCTTTTCTATCGACTTCAACACATGGTTCCCTGCTTCCGGTTCTCAAACGACTATAGAATCTAAGGATGGT  
 TGGACTGCTGATTCTCTGGGATTGTATCCTTATTACTTAATTGCTCTCTACCTCCATTAAGTCACAAAGTAATTAGTGCT  
 CCATTGACCTATGTAGATTCAATGGCCCTCAAAGGGTACTAGAGATATGTTTCTGGATGCGTTGAACCATTGGCTTCATGTC  
 GATGAACAGAGAGCATCTCAGGTCAAATGGCTATTAGAATGCTACACAATGCGTCCTTAATGTTGGACGATGTTCCAGGAT  
 GGTTCACGTCTTAGAAGGAGTAAACCTTCAGCTCATAGAGTGTTCGGAGTTGCACAAACTACCAATAGTCTGCTTTCTTG  
 GTCATGAGTGCATCAAACCTGATAAGAGAAGTACGAGGAGATCAAGGTGTAGCTGCTGTTCTGGAGAAGCTTACTTCTTTG  
 TTTGTGCGACAAGCCCAAGACTTGCATTCATCTAGAAAACCTAAGTCCCTAGTTTGACAGAATATATCCAACCATCGAT  
 CAGAAAACATCTGCTCTTTTTCGAATTGGCAAGCAGATTAATGTGTTTGTGTTCTACAGCTACAGTTGTGCTAACTCAAGT  
 CTGTCCAGATTCTGCATATTACTAGGCAGATTCTTTCAAATAGAGATGACTACCAGAACCTAACTAGCCCTGAATACACA  
 AACAAAAGGGTTCGTGACGATTTGGATTCTGGTACATATACCTTACCATTGGTATACGCCATTAGTCAACAATCTGAA  
 AATTTCTACTACAAAACCTTACTGAGCACCAGATTAGCTGAAGGTACTCTAGACGATGATCAAAAAGAGATTAGCATTGGAC  
 CAAATGCAACTTGTAAAGACTAACGAATTCCTTAGGAAAATTTTGGATTCTTTGTATGATGAATTACGTGCAGAGTTGCAG  
 TGTATTTCTCTCTCTTTCGAGTGAAGATCCTCAAATGGAATTAATGTGATGATGTTGAAATTGTAA

Abbildung A4: Sequenz des für *S. cerevisiae* codonoptimierten *abfsSC*-Gens.



**Abbildung A5: Die für AbFS mit dem I-Tasser Server berechneten Strukturmodelle.** Für die C-terminale Prenyltransferasedomäne ergibt sich jeweils die erwartete  $\alpha$ -Bündelstruktur, während die N-terminale Terpenyclasedomäne größtenteils eine nicht glaubwürdige, ungeordnete Knäuelstruktur mit einzelnen  $\alpha$ -Helixstrukturelementen ausbildet.<sup>[168]</sup>

```
>gb|AE006641.1|:463667-462588, locus-tag: SS00534, protein ID: AAK40853.1:
ATGGTAGAGGTTTACTTAAATTCATCAATGATTCCAATAGATAGATATTACGAGTATGATATTTATGATTTGGTAATA
GAGGCTATAAGAACTTTGAAGGAGAATACGATGTAAATAGTATTGACCTAATTGTTGTTGCGAATGCCTATTTCCCAAAAA
CTGAATAACGCGTCTTTAATTGCACCAAAGATTGCTGAAAAGATAGGGAAACCTAACGTACCTTCTATTAAAGTGGATAAC
GCTGACGCCAGTGGAGGTGCTGCTTTACTTACAGCTTATTCAGTATTAAGAGTAATATGGTAAATTCGGTTTTAATAGTA
GGAGTTGAGAAGCAGTCGGATTATCCTTCTAAGTATCTTTATGATGCCATATCCACCAATTTAGATGATTACATGTTTTAT
AATGGCATCTCTTCTCATTCAGTAGCTGCACTATTAATGAGACAGTATATGAAAAGGTATGGCGTTGATAGAAATATTTTT
GCGAATTTGGGCTATCAAAATGCACAAGAACGCCACGGAAAATCCTTTTGGCGTATTTAAGGTTTCAGGTTGACTTAAATACC
GTAATTAATTCGCAGATTATCTCAGATCCTGTAAGATTATTTGACGTCGGTGCAGAGCTGACGGGGCTGCAATACTCTTA
CTTTCAAATAAATAAGACTGAGTCAGCGGTAAGATTAATAAAATCCTTTCCGCACAAGCCAGATATGACTTTTCTCCATCT
TTACCTTCTGTAAGAATGTTAAGGGATAAGTTAGAATTGAAATTCAGTGAAGAACCAGGATTGATATTCACGACTCCTAT
AGTATTATGGCTGCTTTAATGTTAGAAGAAGCGGGAATATTTGAAAGCGGTAAATCCTTGCATAATTTAGATAGTGTGAAT
GTAAATTTAGGCGGAGGATTAAGCCCGAGGACATGTAGGTGGGGCTTCCGCCATATACCAATTAGCTGAGGCTCACATG
CAATTAATTGGTTCGTTTAAAGGCAAAAAGGCTAGTGTGATAATTATATAGTAATTTCTCAGATGATTTAGGTATGGTG
AGTTATGGTATTAATTTATCGAGGTGA
```

**Abbildung A6: Mittels NCBI-Blast ermittelte *aact*-Sequenz aus *S. solfataricus* P2.**<sup>[303]</sup>

```
>gb|AE006641.1|:464719-463667, locus-tag: SSO0535, proteinID: AAK40854.1:
ATGCTCTCTGGTATTCTTGGATGGGGTGCTTATATTCCAAGATATAGAATAAAAAGTAGAGGATATAGCTAAGATGTGGGGT
TATGATGAGGCAGTTGTGAAAAGCCTCGGACTGACCGAGAAGTCTGTTCCTGGTCACGATGAGGATTCTACAACCTATAGCT
TGGGAATCATCGATAAATGCAATTAAGAGAGCTCAAGTTGATACTTCTAAGATAAGGCTAGTCCTTTTTTGGTTCAGAATCT
AAAGTTTACGCTGTAAAACCCACTTCTACCATTTTAAATAGACGCCTAGGCATTAACAATTATTCAGCAACTGCGGATATG
GAATTTGCATGTAGGGCTGCATCGGTAGGATTAAGTTAGCATCAAGTTTCGTTTTACATAATAACGATAGTTACGCGTTA
GTAATAGGTGCAGATACTGCACAATCTAATCCGGGGGATGTTTTAGAACTAAGTTCGGCAGCGGGCTGGTGTGCTTTTTGTT
GTTGGCAAACTGATGAGAAACACTCGGCTGCCGTGATAGAATATTTCTCATCTTATACCTCTGATACTCCAGACTTTTTGG
CGAAGGATGGAACCTCTTATCCAGTCCATGGTGAGGTTTTACTGGAGAACCAGCTTATTTCCATCATATAAATTTCCGCT
GTTAACGATCTACTACAGAATAGTGGTTAAAGATTTCTGATTTGACTATTTTTGTATTTACCAGCCCAATGGTAAGTTC
CCGATCCAAGTTGCTAAAAGCTGGGTGTCCCATTAGAGAAAGTTAAACAAGGGTTAGTTTCTCCATATATGGTAATCCC
TATAATGCTTCTGCCCTATTAGGTTTGTAGCTAAAGTTTTGGACATTGCGAAACCTGGTGAAGGATCTTGGTTGCTCCATTT
GGTAGTGGTGTGTTAGTGTGACGCTTTTAGTATTTTTAGTTTCTGAAGGCATATTGGCGAAGCAAAAATTTGCTAAAACCGTA
GAATATATATAAATAAATAAAAAACTCGTATCTTATGCTGAATATGCTAAAATATACTAATAAGATAAAGGTGTATGAGTAA
```

**Abbildung A7: Mittels NCBI-Blast ermittelte *hmgs*-Sequenz aus *S. solfataricus* P2.<sup>[303]</sup>**

```
>gb|AE006641.1|:460955-462184, locus-tag: SSO0531, proteinID: AAK40851.1:
ATGAAAATTGATGAAGTGGTTGAAAAGTTAGTAAAGGGAGAAATTTCTTTTCATGAAGTTGACAATTTATAGAAGCAAAT
GCTGCAATGGTTGCGAGGAGGCTTGCATTAGAGAAGATTGTAGGAGTCGGTCTTCCCTCAATTGGTTCTACAGTTATTGAT
TATAGTGAGATAAAAAATAAAAAATGCCGAAAATGTGATTGGAGCAATACAAATACCATTAGGTATAGTGGGGCCAATTAGA
GTCAATGGTGATTACGCAAAGGGCGATTTCTATGTACCTATGGCGACGACAGAAGGAGCGCTAATAGCCAGTGTAAATAGG
GGTATCAAGGCTGTTACACTAAGTGGGGGAGTTAGGGTTAAGTTTTAAAGGATGAAATGACGAGAGCCCCCGTTTTTAAAG
TTTTGATTCAATAGAACAGATAACCGAATTTTCTAAAGTTCATAGAGGAGAATCTTGAGAAGATAAGGAATATAGCCAATTTCT
ACCTCTCATCATGGTAAATTAATAATCCATTACACCTTTCTGACTAGGCAATAATGTTTGGCTTAGATTTTCTTTGAAACT
GGTGATGCTATGGGGATGAACATGGTTACGATAGCAGTTGAAAAGTATGTGAGTTTTATAGAGGAAAACCTCCCATCAGCT
GATTGTTTAGCTGTAAAGCGGAAATATGTGTAGTGATAAGAAAACAGACCAATGTCAATAGCCTCTTCGGTAGAGGTAACCT
GTAGTGGCTGAGGCTCTCATCAAGAAGGATGTTATAAGGAATATATTACACTCTAATGCTCAACTAATTCATGATATAAAT
CTACGGAAGAATTGGCTCGGGACAGCAAGAGCAGGATCCTTATCTCAATTTAATGCTCATTTCGCAACATAGTCACAGCA
ATCTTTATAGCTACTGGCCAAGATGTAGCTCAAATAGTTGAGAGTAGTTCTGGATATACATGGACTGAAGTAAGAGGAGAG
GACTTATATATATCAGTTACACTGCCCTCGTTAGAAGTAGGAAGTGTAGGAGGAGGTACAAGGTTACCTACCCAGAAAGAA
GCCCTATCCATTATGGGAGTTTACGGCAGTGGAATCCACCTGGCTCTAATGCTAAGAAAATTAGCTGAGATCATAGCTTCT
ACTGTACTATCTGGGAACCTTAATCTCCTAGCTGCTTTATCCAACAAGGAGTTAGGTAAGGCTCACGCTAAACTTGAAGA
GCTATGAAAGTCTAA
```

**Abbildung A8: Mittels NCBI-Blast ermittelte *hmgr*-Sequenz aus *S. solfataricus* P2.<sup>[303]</sup>**

```
>gb|AE006641.1|:327829-326885, locus-tag: SSO0383, proteinID: AAK40711.1:
ATGATGGTTGAAGCTAAGGTTCCGTTGAAGCTGACATTATTTGGGGAACATGCTGTAGTTTACGATAGACCAGCAATCGCA
ATGACTATTTTCAGAAAAGTTTAAAGGTAAGGTAAGTAAAACGACAAGTTTCCTAATTAATCTCCATCCCTTAATATAAAA
GGGGTTAAGTTAGATTTAAATGAGATGAAAATTTGAGAGCGATGAGGCTAAGAAAAGTACTTAGATATGTATTTGAGGTGTG
AACTATTTTGAATGAAGAAGCCAGTTAAAATAGAAAATAAATTCACAGTCGAACCTTCTGTTGGATTAGGTACTAGTGTCT
GCAGTTATTGTTGGCACTGTTGCTGCTTACTCTAAATATTTGGGTATTGATTTAAGCAGAGATGAAATAGCCAAAATCTCG
CACAATATAGAGTTAAAGGTTCAAGGAATAGCCAGTAGGATGGATACTTATACTGAAAATTTATGGTGGGCTAATTTACTTT
CCAGCTGGTGGAAAGGATTTGAAAAAATAGATAACCAATTTTGAAGTACTGCAGGATACATAAGGAGGAGTATGAGTACT
GCTGATGTTTTATGGCGTGTTAGAACGCTTAAGGAGTCAAACAAGGAAGTCTTTGAGAACATATTAGATGTGATAGGCGAG
ATAACTAATAGGGCTAAATCTTTAATAGTCGAACAAAATTTTCAGGAATTAGGACTCTTAATGTACGTAATCATGGATTA
TTGTTTTTCATTAGGAATAACTTCACCAGAAGCTGATGAGATTGTTTTCTAGAGCTAAACAATTTGGGAATAAAGGTTGTAG
ATCAGTGGGGGAGGGGCTGGGGTTCCATAATATGTATAAAGTCCGTTGAGGCTGAAGTCTTCTGAGGAGTTACAACGCT
AGAATAGTTAATTTACACTAACTAAAGATGGTGTCAATTTTTTCGATACTATAA
```

**Abbildung A9: Mittels NCBI-Blast ermittelte *mvk*-Sequenz aus *S. solfataricus* P2.<sup>[303]</sup>**



```
>gb|AE006641.1|:2730848-2731819, locus-tag: SSO2988, proteinID: AAK43093.1:
ATGATAAAGGTTAGCGCACCTGGCAAATACTTTGGATAGGAAGTTACAGCGTAGTTTTTGGAGGCATATCACATGTAATA
GCAGTTAATAAGAGAGTGAGTTGTAGTTTGGAGAGAAATTAAGAGAAAGGATAGTTAATTTTCCATACTAGTTATGGGCAC
TTCAAAAATTTCTGGTAATGAGTTAATTAATTCAGTCCTAGATACTTTTAGAGAAAAGGCTTTCACAACCTCCTCAAGGTTAT
GAAATAGATCTATATAACGATAAGGAGTTTATAATAGATGGTAAAAAACGGGACTAGGTAGTTCTTCGGCTGCTACAGTT
TCCCTTACCCTGTGCTGTATTACGCTATCCACGGCAAACGGATTTGTTTGGATACATAAATGGCACAAAATGGCCAAC
TATAAGAGACAAAAGGGAATTTGGTAGTGGGTTTGCATAGCTTCAGCTGTTTTTGGTAGCATAGTTTACAAGAGATTTACT
GATTTAGATAAGATGGACTTCTATTTTCAAAAACTCAATTTGGGAAATTACGATATGATGCTTGGATTTACGGGAAAGAGT
TCTGAAACCGTGGGTTTGGTTAGGAAATTTGTAGAGAAGAGTAATTTGGATGATTTTAAGGAAATAATGAGGCTTATAGAT
GAGGAGAAATATATGGCAATCAAACTCATAAAATTGAATAAGCTTGACGAGGCTGTGGAGCACATAAAGTTAGGAAGGAAG
TATTTGAATATATAGCTGAGCGTATTGTTGGTGTAACTGGTAAAGTAAATGGAGGAGGAGTTGATAAAAAATAGCAGAA
GAGGAAGGTGCGTTAGTAGCCTTATCTCCTGGGGCAGGTGGGGGAGATTCAATTTTTGCATTAGGCAATGATTTAAATAGG
GTAAGGGAGCGGTGGAGTAAAAGAGGTATTTTCATAATTGATGTGAAAGAAGACGAGGGATTAAGGCTCGAATCTAACTAA
```

**Abbildung A10: Mittels NCBI-Blast ermittelte *pvk*-Sequenz aus *S. solfataricus* P2.<sup>[303]</sup>**

```
>gb|AE006641.1|:2732801-2731824, locus-tag: SSO2989, proteinID: AAK43094.1:
ATGTTAAAGTCTGTAACAGTTTCTGCACCGTCAAATATAGCCGTTGTAAAGTACTGGGGAAAAAGGGGAGATGAAAGACTA
AATTTACCGCTCAACAACCTATTATCGATTACTTTAGATGATCAGTTATCAGTGATTACCAAAGTAACCTTAAACGATAAG
AATATTGTAATAGTTAACGATAGGATCTTATCAGAAGATGAAATGAAAGAGTATGCTGGAAGGGTCTTGGATACCTTTAAG
AAAATCGTTGGCAAGGAATTTACAGTTAAAGTTGAGTCAAAGTCAAATTTTCTATTAATGCGGGATTAGCGTCTTCTGCA
GCAGGGATTGCAGCGTTAGCCTTTAGTCTAAATGAGTTACTGGAGTTAAACCTCAAATCCGAAGAGCTTTCAAAAATAGCT
AGACTGGGATCTGGAAGTGCATGTAGAAGTATGTTTGGAGGATTTGTAGTATGGAATAAGGGGAGAGAGAAGATGGAGAG
GATTTCTTATGTTATCAAACTTCCGGCATGACTATTGGAGTGAATTAGTGGATATTATTCCTATATTAAGTGAAGAAAGAA
AAGAAAATCTCTTCTAGAAAAGGTATGATAAGATCAGCTGAAACTTCAGAATAATGGAATGTAGGCTTAAATACATTGAG
AAGACATTTAATGAAGTTATTGAGGCTATAAGGAATAGGGATGAGAAGAAATCTACTATCTTATGATGAGACATAGTAAT
AGTATGCACGCAGTAATATTGGATAGTTGGCCATCCTTCTTTACTTAAACGATACTTCCATAAGGATTATGGAATGGATA
CATGATTATGGGAAGGCTGGTTATACATTTGATGCTGGACCAAATCCTCACATTTTTACTACAGAAAAGAAATATAGGAGAT
ATTTTAGAATCTTAAATCTCTAGAAAATAAGAGAATAATAGTATCTAAAGTAGGAGATGGACCAAAGTATTAAGTAGA
GAATGA
```

**Abbildung A11: Mittels NCBI-Blast ermittelte *mdc*-Sequenz aus *S. solfataricus* P2.<sup>[303]</sup>**

```
>gb|AE006641.1|:53313-52207, locus-tag: SSO0063, proteinID: AAK40424.1:
ATGCCTGATATAGTAAATAGGAAAGTTGAACATGTAGAAATTCAGCTTTTGAAAACGTTGACGGTCTATCTTCGTCAACG
TTCTTAAATGATGTAATTTTAGTTTCATCAAGGATTTCCCGGTATATCGTTCAGTGAGATAAAATACCAAGACAAAGTTTTTT
AGAAAAGAGATAAAGTGCGCCAATAATGGTAACTGGGATGACGGGTGGAAGGAACGAACCTAGGAAGAATAAATAGGATTATA
GCAGAGGTTGCTGAGAAATTCGGAATACCCATGGGGGTAGGCAGTCAAAGAGTTGCAATAGAAAAGGCAGAGGCTAGGGAA
AGTTTTACAATAGTCAGAAAAGTTGCTCCTACGATACCTATTATTGCTAACCTGGGGATGCCACAATTAGTTAAGGGATAT
GGATTAAGGAATTTCAAGATGCTATACAAATGATAGAGGCTGATGCAATAGCCGTTCACTTGAATCCAGCTCAAGAAGTA
TTTCAACCAGAAGGCCAACCAGAGTATCAGATTTATGCTTTAGAGAGACTGAGGGATATATCTAAGGAGCTATCTGTACCA
ATTATAGTAAAAGAAAGTGGAAATGGTATTTCCATGGAACCTGCAAAGCTTCTTTATAGTTATGGTATAAAGAATTTTGAT
ACTTCTGGGCAAGCGGTTACTAATTTGGATAGCGATAGAGATGATAAGGGATAATTAGAAGGGGAAATTTGGAAGGCAGAAAGC
GCAAAAAACTTCTTACTGGGGTGTGCCGACGCGGCTTCGATAAATTGAGGTAAGATATTTCAATTCCTGATGCTTTCCCTA
GTGGGTAGTGGTGGTATTAGGAGTGGGTTAGATGCAGCTAAGGCTATAGCGCTAGGGGCTGATATTGCTGGTATGGCTTTA
CCGGTACTTAAAAGTGCATAGAAGGTAAAGAAAGTTTAGAACAGTTCTTTAGGAAGATAATATTTGAATTTGAAGGCAACC
ATGATGCTTACTGGTTCTAAAACGTTGAGGCACTAAAGAGGAGTAGTATTGTAATTTTGGGTAACCTTAAAGAGTGGGCT
GAATATAGGGGATAAATTTATCTATATACGAGAAAAGTTAGAAAAGAGAGAATAA
```

**Abbildung A12: Mittels NCBI-Blast ermittelte *idi2*-Sequenz aus *S. solfataricus* P2.<sup>[303]</sup>**

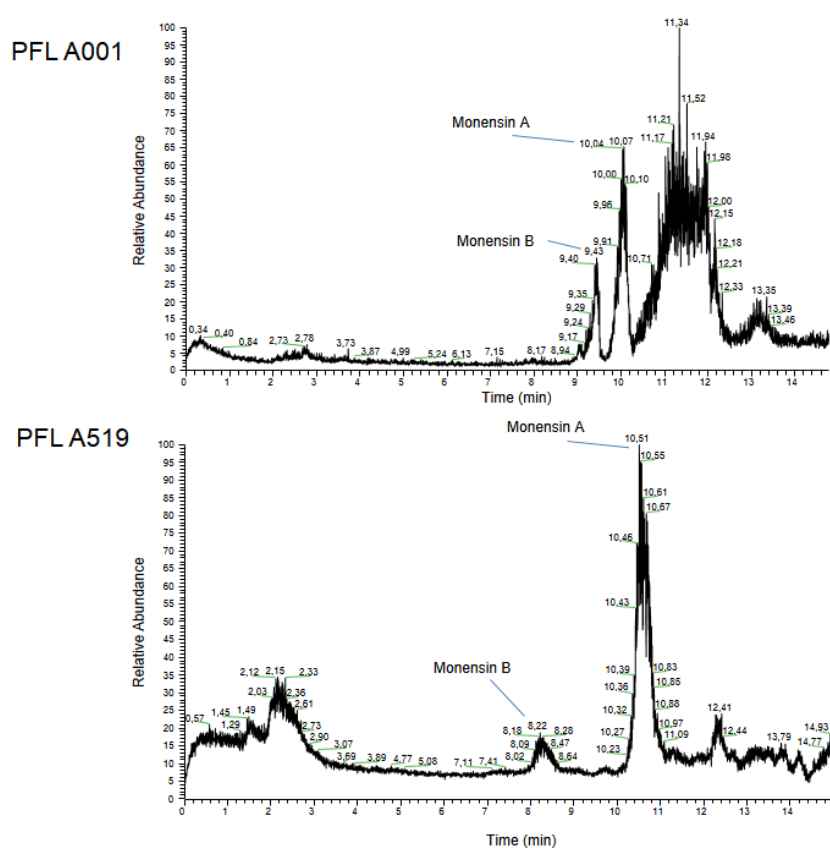


Abbildung A13: Vergleich der Fermentationen des *S. cinnamonensis*-Wildtypstammes PFL A001 und des industriellen Stammes PFL A519 in dem Öl-haltigen BM-Medium.

## IX Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Julia Arens  
Geburtsdatum: 25.05.1987  
Geburtsort: Warstein  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1993-1997: Besuch der Gutenberg-Grundschule in Warstein  
1997-2006: Besuch des Gymnasiums der Stadt Warstein  
Abschluss: Abitur (Note: 1,0)

### Universitäre Ausbildung:

10/2006-09/2009: Bachelorstudium in Chemischer Biologie an der Technischen Universität Dortmund (Abschlussnote: 2,3)  
Abschlussarbeit: „Assemblierung, Ligation und chemische Modifizierung von DNA-Tetraederstrukturen“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christof Niemeyer (Note: 1,3)

10/2009-09/2011 Masterstudium in Chemischer Biologie an der Technischen Universität Dortmund (Abschlussnote: 1,3)  
Abschlussarbeit: „Heterologe Fermentation eines 5-8-5-tricyclischen Diterpens“ in den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Frank Schulz und Prof. Dr. Christian Ottmann (Note: 1,0)

11/2011-10/2015 Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Schulz am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, der Technischen Universität Dortmund und der Ruhr-Universität Bochum