

Institut für Biologie I (Botanik und Molekulargenetik)

RHEINISCH-WESTFÄLISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE AACHEN

# Rekombinante Biosynthese amino-substituierter Phenylpropanoide in *E. coli*

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe

**Bernhard Gilleßen**

aus Würselen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Fritz M. Kreuzaler  
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Christoph Peterhänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 09. April 2009

*Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.*

---

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 Die chemische Industrie im Wandel der Zeit	3
1.2 Die Biosynthese von Phenylpropanoiden	7
1.3 Die Ligninbiosynthese	9
1.4 Aromatische Alkohole als Monomere	12
1.5 Die rekombinante Biosynthese eines Monolignols	15
1.6 Die Synthese von <i>p</i> -Aminocinnamylalkohol	15
1.7 Ziel der Arbeit	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	21
2.1.2 Gelelektrophorese Größenstandards	21
2.1.3 Gerätschaften, Zubehör und EDV	22
2.1.4 Oligonukleotide	24
2.1.5 Stämme und Selektionsmedien	26
2.1.6 Plasmide	29
2.1.7 Open Reading Frames	32
2.2 Methoden	35
2.2.1 Isolation von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	35
2.2.2 Isolation genomischer DNA	35
2.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)	36
2.2.4 Nukleinsäuregelelektrophorese	38
2.2.5 Kompetente Zellen und Transformation	39
2.2.6 Restriktion und Ligation von DNA	41
2.2.7 Sequenzierung von Plasmid DNA	41
2.2.8 Synthese von Nukleinsäuren	42
2.2.9 Mutagenesen	42
2.2.10 Genomische Deletionen in <i>E. coli</i>	44
2.2.11 Expressionsversuche	49
2.2.12 Proteinextraktion und Aufreinigung	50

---

2.2.13	Protein Gelelektrophorese und Western Blot . . . . .	52
2.2.14	Aktivitätstests . . . . .	53
2.2.15	High Performance Liquid Chromatography . . . . .	54
2.2.16	Festphasenextraktion und Dünnschichtchromatographie . . . . .	55
2.2.17	Bestimmung von pKa- und pI-Werten . . . . .	56
2.2.18	Auftragsanalytik: NMR, LC-MS und FT/ESI-MS . . . . .	57
3	Ergebnisse . . . . .	59
3.1	Deletion der Gene <i>pheA</i> und <i>tyrA</i> . . . . .	59
3.2	Biosynthese von pAPA . . . . .	60
3.2.1	Klonierung der ADCS . . . . .	60
3.2.2	Klonierung von ADCM und ADPDH . . . . .	61
3.2.3	Expression der Enzyme ADCS, ADCM und ADPH . . . . .	64
3.2.4	Produktion von pAPA in <i>E. coli</i> . . . . .	65
3.2.5	Titrationanalyse von pAPA . . . . .	68
3.3	Desaminierung von pAPA . . . . .	70
3.3.1	Klonierung der Ammoniak Lyasen . . . . .	70
3.3.2	Expression und Aufreinigung der Ammoniak Lyasen . . . . .	72
3.3.3	<i>In vitro</i> Aktivität der Ammoniak Lyasen . . . . .	74
3.3.4	Identifikation des pAPA-Desaminierungsproduktes . . . . .	77
3.3.5	<i>In vivo</i> Aktivität der Ammoniak Lyasen . . . . .	77
3.3.6	Änderung der Substratdetermination für <i>RsTAL</i> . . . . .	80
3.3.7	Desaminierung rekombinant synthetisierten pAPAs . . . . .	82
3.4	Biosynthese von pACiAlk . . . . .	83
3.4.1	Doppelkonstrukte mit <i>RsTAL</i> , <i>ZmPAL</i> , <i>Pc4CL</i> , <i>ZmCCR</i> und <i>ZmCAD</i> . . . . .	83
3.4.2	<i>In vitro</i> Aktivierung und Reduktion von pACiA . . . . .	84
3.4.3	Biotransformation von pACiA durch 4CL und CCR . . . . .	85
3.4.4	Aufbau eines kompletten Reaktionswegs . . . . .	89
4	Diskussion . . . . .	93
4.1	Biosynthese von pAPA . . . . .	93
4.1.1	Substitution der <i>SvADCS</i> durch <i>CgADCS</i> . . . . .	94
4.1.2	Analyse von ADCM und ADPDH aus <i>S. venezuelae</i> . . . . .	95
4.1.3	Expression von ADCS, ADCM und ADPDH erzeugt pAPA . . . . .	96
4.1.4	pAPA wird bidirektional über die Membran transloziert . . . . .	97
4.1.5	Auxotrophie beeinflusst die Fermentation . . . . .	98

---

4.2	Desaminierung von pAPA . . . . .	101
4.2.1	Proteinkonzentration der TAL ist temperaturabhängig . . . . .	101
4.2.2	Funktionelle Expression der synthetischen TAL . . . . .	103
4.2.3	Expression des PAL-Klons erzeugt ein aktives Protein . . . . .	104
4.2.4	TAL und PAL desaminieren pAPA <i>in vitro</i> zu pACiA . . . . .	105
4.2.5	Auxotrophe Zellen mit PAL akkumulieren pACiA im Medium . . . . .	107
4.2.6	Phenylpropanoide unterliegen einem bidirektionalen Membrantransport . . . . .	108
4.2.7	Mutationen and Histidin 89 determinieren das Substrat der TAL . . . . .	110
4.2.8	Biosynthese und Desaminierung von pAPA lassen sich verknüpfen . . . . .	112
4.3	Biosynthese von pACiAlk . . . . .	114
4.3.1	pACiA ist Substrat für 4CL und CCR . . . . .	114
4.3.2	pACiAld wird CAD-unabhängig zu pACiAlk reduziert . . . . .	115
4.3.3	Desaminierung limitiert den vollständigen Reaktionsweg . . . . .	117
4.3.4	Prototrophe Zellen eignen sich zum Aufbau des Reaktionswegs . . . . .	119
5	Fazit und Ausblick . . . . .	121
5.1	Fazit . . . . .	121
5.2	Ausblick . . . . .	122
6	Anhang . . . . .	125
6.1	Sequenz der synthetisierten TAL . . . . .	125
6.2	Sequenz der synthetisierten ADPDH . . . . .	126
6.3	Sequenzvergleiche verschiedener PAL ORFs . . . . .	127
6.4	NMR . . . . .	128
	Abbildungsverzeichnis . . . . .	129
	Tabellenverzeichnis . . . . .	131
	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	132
	Literatur . . . . .	136
	Danksagung . . . . .	141
	Lebenslauf . . . . .	142

---

## Zusammenfassung

Aromatische Verbindungen und Olefine sind wichtige Ausgangsstoffe für chemische Synthesen und werden maßgeblich durch Raffinierung und Prozessierung aus Erdöl erzeugt. Aus politischen, ökonomischen und ökologischen Gründen hat die Erforschung von Alternativen zu Erdöl und hierbei die Nutzung nachwachsender Rohstoffe eine besondere Bedeutung erlangt. Ziel ist es, durch biotechnologische und chemische Methoden adäquate Substitute, aber auch bislang nur schwer oder ineffizient synthetisierbare Verbindungen, zu erzeugen.

Das Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten rekombinanten Biosynthese aminosubstituierter Phenylpropanoide in *E. coli* war die Herstellung von *p*-Aminocinnamylalkohol. Dieser aromatische Alkohol ist eine neuartige, mehrfach funktionelle Verbindung mit einer hohen Ähnlichkeit zum natürlich vorkommenden Monolignol *p*-Cumarylalkohol. Im Gegensatz zu diesem Stoff gibt es für das Derivat *in natura* keinen bekannten Biosyntheseweg. Der gewählte Ansatz basiert daher auf der Kombination von Abschnitten der Chloramphenicol-, Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese.

Es konnte gezeigt werden, dass genetisch veränderte *E. coli* Zellen in der Lage sind, durch 4-Amino-4-Desoxychorismat Synthase aus *Corynebacterium glutamicum* sowie 4-Amino-4-Desoxychorismat Mutase und 4-Amino-4-Desoxyprephenat Dehydrogenase aus *Streptomyces venezuelae* *p*-Aminophenylalanin aus endogen vorhandenem Chorismat zu erzeugen. Diese seltene, nicht-proteinogene Aminosäure kann, ähnlich dem natürlichen Substrat Tyrosin, die Reaktionen der Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese durchlaufen. Der Desaminierung durch eine *Rhodobacter sphaeroides* Tyrosin Ammoniak Lyase oder einer *Zea mays* Phenylalanin Ammoniak Lyase zu *p*-Aminozimtsäure folgt die Aktivierung mit CoenzymA durch 4-Cumarat:CoA Ligase (*Petroselinum crispum*). *p*-Aminocinnamyl-CoA dient als Substrat für eine *Zea mays* Cinnamyl-CoA Reduktase, der entstehende Aldehyd wird durch eine *Zea mays* Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase zum gewünschten Produkt umgesetzt und in das Kulturmedium ausgeschleust. Ebenso wurde ein verkürzter Syntheseweg gefunden, bei dem nur durch die Aktivität von CoA Ligase und Reduktase *p*-Aminozimtsäure effektiv in den Alkohol überführt wird.

Es gelang, alle sieben Transgene funktionell in *E. coli* zu exprimieren. Die parallele Anwesenheit aller Proteine führt ohne Zugabe direkter Vorstufen zur Biosynthese von *p*-Aminocinnamylalkohol. Dies zeigt, dass es durch biotechnologische Methoden gelingen kann, komplexe artifizielle Synthesen zu etablieren. Die Bereitstellung des Aromaten ermöglicht unter anderem die Polymerisation zu neuartigen Thermoplasten mit bislang unbekanntem Eigenschaften.

## Abstract

Aromatic compounds and olefins are important precursors for chemical syntheses. The main source for these substances are the refining processes of crude oil. Driven by political, economical and ecological reasons the research in crude oil alternatives and therefore the utilisation of renewable resources gained particular importance. The objective is the biotechnological and chemical generation of adequate substitutes for important compounds but also of other substances that are currently only inefficiently synthesised.

The recombinant biosynthesis of amino-substituted phenylpropanoids in *E. coli* aims at the production of *p*-aminocinnamyl alcohol. This aromatic alcohol is a novel compound with several functional groups and it has significant similarity to the naturally occurring monolignol *p*-coumaryl alcohol. Unlike this substance there is no existing pathway known for the biosynthesis of the derivate *in natura*. The approach to design an artificial pathway for *p*-aminocinnamyl alcohol is based on the combination of different reactions from the biosynthetic pathways for chloramphenicol, phenylpropanoids and lignin.

It was shown that genetically modified *E. coli* cells can synthesise *p*-aminophenylalanine from endogenously available chorismate by using 4-amino-4-deoxychorismate synthase from *Corynebacterium glutamicum* and *Streptomyces venezuelae* 4-amino-4-deoxychorismate mutase and 4-amino-4-deoxyprephenate dehydrogenase. The uncommon, non-proteinogenic amino acid can undergo reactions of phenylpropanoid and lignin biosynthesis alike the natural substrate tyrosine. The deamination by *Rhodobacter sphaeroides* tyrosine ammonia-lyase or *Zea mays* phenylalanine ammonia-lyase to *p*-aminocinnamic acid is followed by the coenzyme A mediated activation by 4-coumarate:CoA ligase (*Petroselinum crispum*). *p*-Aminocinnamyl-CoA is a substrate for *Zea mays* cinnamyl-CoA reductase and the resulting aldehyde is converted by *Zea mays* cinnamyl alcohol dehydrogenase to the target product. Subsequently it is exported into the culture medium. Additionally, a short cut was identified that - simply by the activity of CoA ligase and reductase - efficiently converts the acid into the alcohol.

All seven transgenes were functionally expressed in *E. coli*. It is the simultaneous abundance of all proteins that allows for the biosynthesis of *p*-aminocinnamyl alcohol without feeding any direct precursors. This demonstrates that complex artificial syntheses can be established by the way of biotechnological methods. The availability of this novel aromate permits new processing such as the polymerisation to novel thermoplasts with so far unknown functions.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die chemische Industrie im Wandel der Zeit

150 Jahre nach Beginn der Kohlechemie und 50 Jahre nach Beginn der Erdölchemie tritt die industrielle Chemie in ein neues Zeitalter. Im 21. Jahrhundert wird die Nutzung nachwachsender Rohstoffe [...] an Bedeutung gewinnen (31).

Die wirtschaftliche Entwicklung der großen Volksökonomien ab Mitte des 19. Jahrhunderts basierte, neben der Industrialisierung, auf der Nutzbarmachung von Kohle. Dies bezieht sich nicht nur auf deren Verwendung als Brennstoff, sondern auf den stoffwirtschaftlichen Zugang, der den Anfang der chemischen Industrie begründete (31). Zu dieser Zeit entstand die sogenannte Kohlechemie, die vor allem mit der Entwicklung der darauf basierenden Fischer-Tropsch-Synthese (1925, ab 1934 Ruhrchemie AG) und Methanolgewinnung (1923, BASF) eine enorme Bedeutung erlangen konnte [(52, 77), (<http://www.steinkohleportal.de/>)]. Durch die Kohlevergasung war es zum ersten Mal möglich, einen großtechnischen Zugang zu Synthesegas zu gewährleisten, welches wiederum die Grundlage für die Fischer-Tropsch-Synthese der Alkane und die Methanolsynthese darstellt. Neben Kohlenstoffmonoxid, Wasserstoff, Methan und Methanol konnten so Flüssigstoffe wie Leicht- (Benzin) und Mittelöl (Diesel), Phenole, Pyridin-Verbindungen und fester Koks hergestellt werden. Lag vor den großen Weltkriegen von 1914 und 1939 ein Schwerpunkt der Kohlechemie auf der Gewinnung von organischen Basischemikalien, war während dieser Auseinandersetzungen die Deckung des Treibstoffbedarfs im damals kohlereichen Deutschland sehr wichtig.

Mit Ende des Zweiten Weltkriegs verlor auch die Kohlechemie an Bedeutung. Erdöl, damals aus den USA importiert, war ein günstiger und vollwertiger Ersatz, aus dem ebenso Basischemikalien und Treibstoffe gewonnen werden konnten. Zusätzlich entwickelte die Erdölindustrie eine beeindruckende Effizienz in ihren Produktionsprozessen und baute ihren Vorsprung weiter aus (52).

Die Symbiose aus Raffinerien der Erdölgesellschaften und der Petrochemie prägt bis heute das Gesicht der Energie- und Basischemikaliengewinnung. Liefern die Raffinerien zumeist Treib- und Schmierstoffe, bietet die Petrochemie durch Prozesse wie Steamreforming und Steamcracken Zugang zu einer Reihe bedeutender Basischemikalien. Verbindungen wie Ethylen und Propylen, aber auch andere Gase und einige Aromaten (Benzol, Toluol, und Xylole), werden für die Synthese vieler uns heute bekannter Stoffe genutzt: Polymere wie Polyethylen (PE), Polypropylen (PP), Polyvinylchlorid (PVC)

und Polystyrol (PS) sowie die Alkohole Ethanol und 2-Isopropanol sind nur ein sehr kleiner Ausschnitt der möglichen Verbindungen (APPE, Association of Petrochemical Producers in Europe, <http://www.petrochemistry.net/>).

Ein stetig wachsender weltweiter Bedarf an Erdöl und dessen prognostizierte Verknappung in den nächsten Dekaden führen seit Jahren zu regelmäßig steigenden Rohölpreisen (<http://www.opec.org/home/>). Eine direkte Folge ist die Verteuerung von Mobilität und Energie (Wärme und Elektrizität). Indirekt ist aber auch ein Großteil der chemischen Industrie betroffen, da Basischemikalien ebenfalls in Preis und Verfügbarkeit verändert werden. Dies ist Beleg für eine Abhängigkeit von Erdöl, deren Einfluss auf die Weltwirtschaft und die globale Politik nicht zu unterschätzen ist.

Ein nicht weniger bedeutendes Problem ist die klimatische Veränderung unseres Planeten, deren Ursache nicht zuletzt in der massiven CO<sub>2</sub>-Freisetzung durch die Verbrennung von Erdölprodukten gesehen wird (73). Die Verbrennung von Kohlenwasserstoffen zur Energiegewinnung führt immer auch zur Entstehung von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O. Das Kohlendioxid, für das heute noch keine ausreichende Refixierung betrieben wird, fungiert hierbei als Treibhausgas und trägt zur Erwärmung der Erdatmosphäre bei.

Beide Probleme - die Endlichkeit und Verteuerung des Erdöls, aber auch die ökologischen Folgen dessen Verbrennung - sind Faktoren, die das Ende des „Erdölzeitalters“ mit Beginn des 21. Jahrhunderts einleiteten (31). Heutzutage erfolgt eine weltweite Neuorientierung, die sich vor allem den nachwachsenden Rohstoffen widmet. Dabei kommen Nachhaltigkeit und Umweltverträglichkeit eine bedeutende Rolle zu. Geht es um die Produktion von Energie und Chemikalien, geraten zunehmend Lösungen aus der Grünen und Weißen Biotechnologie in den Fokus der Industrie (52, 74).

Die Umstellung von Öl auf nachwachsende Rohstoffe wurde öffentlichkeitswirksam erstmals für die Gewinnung von Treibstoffen begonnen. Obwohl schon seit 1937 durch den Belgier G. Chavanne in Brüssel als Patent angemeldet (33), wird Biodiesel allerdings erst heute in größerem Umfang genutzt. Hergestellt durch meist methanolische Umesterung von Ölen aus Raps (Europa), Mais (Amerika) oder anderen Pflanzen, ist dies der Vorreiter der „Biofuels“, d.h. auf der Basis von Biomasse gewonnener Treibstoffe. Seit einigen Jahren wird mit „Bioethanol“, entstanden durch die mikrobielle Umsetzung pflanzlicher Biomasse, ein weiterer biologischer Kraftstoff zur Marktreife entwickelt. Zum Einsatz kommt dieser Treibstoff bereits großflächig in Brasilien, wo er aus Zuckerrohr gewonnen wird. Sowohl Biodiesel als auch Bioethanol sind geeignet, um auf dem heutigen Stand der Motorentechnik verwendet zu werden. Dies bedeutet für Automobilkonzerne, dass nur geringe Investitionen und Änderungen bestehender Produktionsverfahren zu einem ökologisch positiveren Image führen. Bei der Verbrennung



von Biotreibstoffen wird nur jener Kohlenstoff freigesetzt, der vorher auch durch die betreffende Pflanze fixiert worden ist. Es bildet sich somit ein Kreislauf (21).

Beide Treibstoffe sind allerdings mit etlichen Nachteilen ökologischer, ökonomischer, technischer und ethischer Natur behaftet. Biodiesel und Bioethanol werden auf Basis von Pflanzenmaterial - und damit weitestgehend unter Nutzung von Agrarflächen - gewonnen. Der Konflikt zwischen Produktion von Lebensmitteln und Herstellung von Kraftstoffen ist somit absehbar (70). Werden große Anbauflächen für wenige Biomasselieferanten wie Raps, Mais (Biodiesel) oder Zuckerrohr (Bioethanol) genutzt, drohen die bekannten Gefahren bei Monokultuivierung: einseitiger Nährstoffentzug des Bodens und das Auftreten resistenter Schädlinge infolge des nötigen Einsatzes von Pflanzenschutzmitteln (44). Der Düngemittel- und Pestizideintrag wird oft nicht mit in die ökologische Argumentation einbezogen. Der Bedarf an Treibstoffen kann zudem nicht annähernd durch den Anbau von Biomasse, vor allem in Flächenkonkurrenz zur Lebensmittelproduktion, gedeckt werden (27). Überdies ist die geringe Effizienz der bisherigen Prozesse - nur die Samen des Raps werden verwendet, Lignozellulose aus Mais und Zuckerrohr sind derzeit noch nicht zugänglich - ein ökonomisches Problem. Es entsteht zu viel pflanzlicher Abfall. Beide Kraftstoffe besitzen ausserdem einen geringeren Energiegehalt als raffiniertes Erdöl (60 % Ethanol bzw. 84 % Biodiesel im Vergleich zu Benzin). Eine zusätzlich negative Eigenschaft des Ethanols ist sein azeotropes Verhalten. Ein Restgehalt von 4 % Wasser führt auf Dauer zu Korrosionserscheinungen in Motoren (21).

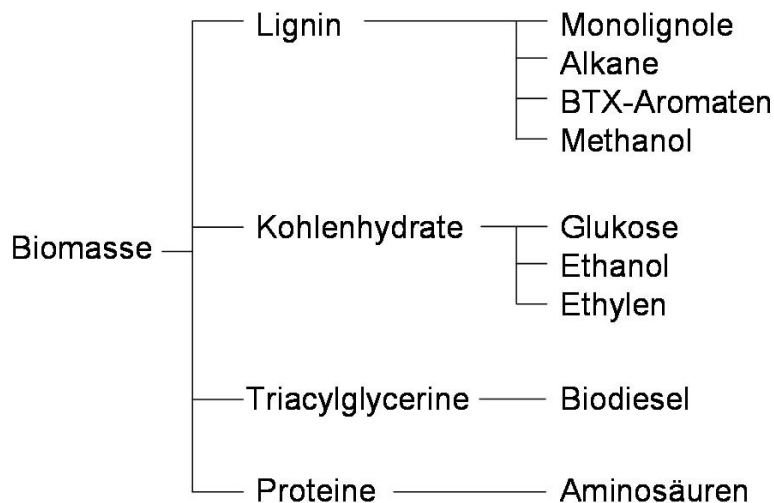
Trotz dieser schwerwiegenden Nachteile kann konstatiert werden, dass nachwachsende Rohstoffe die Energieträger der Zukunft stellen werden. Im Vergleich zur hocheffizienten Erdölindustrie steckt die Erforschung von Biofuels noch in den Anfängen, und ihr gesamtes Potential wird noch lange nicht abgerufen.

Der steigende Bedarf und die drohende Verknappung von Erdöl hat, wie oben beschrieben, aber nicht nur Auswirkungen auf Mobilität und Energieerzeugung. Deshalb steht heute die Gewinnung von Basischemikalien und Biopolymeren gleichermaßen im Fokus der Forschung (52). Das Ziel ist auch hier, Großteile des Bedarfs nachhaltig bereitzustellen.

Von der Öffentlichkeit im Allgemeinen nur unzureichend wahrgenommen, werden mit gen- und biotechnologischen Mitteln eine Reihe interessanter Verbindungen in verschiedenen Organismen hergestellt - auch wenn eine ausreichende Marktreife oft noch nicht gegeben ist. Insbesondere im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit sind hier Biopolymere zu nennen, die derzeit ein Marktvolumen von 50.000 t/a haben. Angestrebt werden 4.000.000 t/a, was etwa einem Zehntel der derzeit aus Erdöl gewonnen Polymere

entspricht. Erforscht werden hierfür beispielsweise die fibriläre Spinnenseide mit ihren außergewöhnlichen Materialeigenschaften, Polyaminosäuren wie Cyanophycin, Polyhydroxyalkanoate wie Polyhydroxybuttersäure, aber auch 1,3-Butadienpolymere zum Ersatz von Latex aus *Hevea brasiliensis*. In Hinblick auf Basischemikalien sind Verbindungen wie *p*-Hydroxybenzoesäure, Sorbitol, Fruktose, Methylacrylsäure und Itaconsäure von Interesse (74).

Da sowohl die Produktion von Biotreibstoffen als auch die Biosynthese von Biopolymeren und Basischemikalien jeweils ökologisch und/oder ökonomisch bis heute nicht optimal sind, wurde das Konzept der Bioraffinerie entwickelt. Ähnlich dem Raffinierungsprozess der Erdölindustrie sollen Organismen, vor allem Pflanzen, maximal zur Stoffgewinnung genutzt werden können. Die Biomasse soll dabei als Lieferant für Energie, anorganische Verbindungen, Lignin, Zucker, Fette, Proteine und spezielle Stoffe wie z.B. Chicoreesäure (Dicaffeoyl-Tartrat) dienen. Die gemeinsame Nutzung all dieser Komponenten zielt auf eine Erhöhung der Wirtschaftlichkeit aller Einzelprozesse ab. Mögliche Stoffflüsse in einer solchen Bioraffinerie sind in Abbildung 1.1 wiedergegeben (28, 31).



**Abb. 1.1: Konzept einer Bioraffinerie.** Schematisch vereinfachte Darstellung der möglichen Stoffflüsse organischer Komponenten in einer Bioraffinerie.

Die stetigen Fortschritte in der Entwicklung von Biofuels und Basischemikalien in Verbindung mit dem Konzept der Bioraffinerie scheinen den Weg für die optimale Nutzung nachwachsender Rohstoffe zu bereiten. In vielen Bereichen, die bislang nur durch Erdölraffinerie oder Petrochemie bedient werden konnten, sind - wie beschrieben - biotechnologische Alternativen verfügbar. Aber trotz einer immer engeren Verknüpfung pflanzlicher Biomasse- und Stoffproduktion, industrieller (weißer) Biotechnologie

und chemischer Umsetzungen bleibt das Feld der Olefine und Aromaten, der wichtigsten Ausgangsstoffe für Synthesen in der chemischen Industrie (76), nur unzureichend durch biotechnologische Ansätze abgedeckt. Gerade bei den aromatischen Verbindungen existiert derzeit keine biobasierte Strategie zur Deckung der Nachfrage (6). Allerdings wurde das Potential von Lignin als Lieferant aromatischer Säuren, Aldehyde und Alkohole erkannt und erste Ansätze zu einer möglichen Wertschöpfung erarbeitet (28). Eine erfolgreiche Entwicklung von Modellen oder gar Prozessen, die auf der Nutzung nachwachsender Rohstoffe zur Herstellung von aromatischen Komponenten basieren, könnte einen großen Markt erschließen.

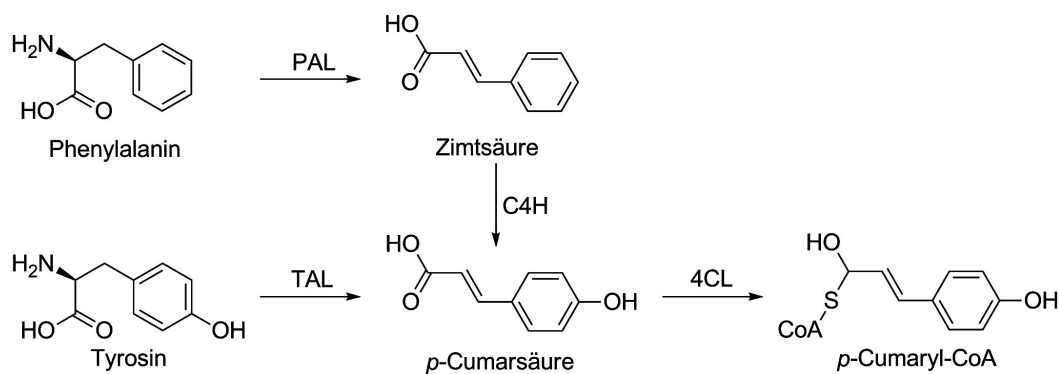
## 1.2 Die Biosynthese von Phenylpropanoiden

Obwohl in der Natur eine große Vielfalt aromatischer Verbindungen vorhanden ist - z.B. Anthocyane als Farbpigmente (28) oder Aromastoffe wie Vanillin, Zimtaldehyd und Menthol (65) - finden die meisten dieser Stoffe ihren Ursprung in lediglich zwei individuellen Reaktionswegen (13). Ein Teil entsteht während der Synthese von Isoprenoiden. Isopentenylidiphosphat (IPP) wird hierfür zu langkettigen Terpenen verknüpft, die durch intramolekulare Umlagerung in Aromaten wie (-)-Menthol überführt werden. Der Großteil der aromatischen Verbindungen wird in der Natur allerdings über den Shikimat-/Phenylpropanoidreaktionsweg synthetisiert (86).

Der Shikimatreaktionsweg ist unter anderem Ursprung von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (68). Dieser komplexe Syntheseweg beginnt mit der Umsetzung von Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat zu 3-Desoxy-D-Arabinose-7-Phosphat (DAHP). Ein mögliches Produkt dieses Reaktionswegs ist das zentrale Intermediat Chorisminsäure (Abschnitt 1.6), von dem sich beispielsweise die aromatischen Aminosäuren ableiten. Diese stellen zum Teil wiederum die Basis für den Phenylpropanoidsyntheseweg dar, dessen wichtigste Reaktionen in Abbildung 1.2 dargestellt sind. Obwohl einzelne Gene des Phenylpropanoidwegs in den Datenbanken auch für verschiedene Insekten, Bakterien und Moose annotiert sind, finden sich ausführliche Beschreibungen stets im Zusammenhang mit Pflanzen und der Biosynthese sekundärer Metabolite wie Flavonoiden und Lignin (86).

In dicotyledonen Pflanzen wird Phenylalanin durch eine Phenylalanin Ammoniak Lyase (PAL, EC 4.3.1.24) zu Zimtsäure (CiA) desaminiert. Die daran anschließende Hydroxylierung der para-Position erfolgt durch die Aktivität einer P450-Reduktase-abhängigen trans-Zimtsäure 4-Monooxygenase (C4H, EC 1.14.13.11). Die Reaktion erzeugt *p*-Cumarsäure (pCA). Ein alternativer Weg ist in monocotyledonen Pflan-

zen zu finden. Die Phenylpropanoidbiosynthese kann hier auch bei Tyrosin beginnen. Eine Phenylalanin/Tyrosin Ammoniak Lyase, ebenfalls als PAL gekennzeichnet (EC 4.3.1.25), desaminiert die aromatische Aminosäure direkt zu pCA (58). Allerdings ist zu erwähnen, dass monocotyledone PAL Enzyme zwingend bifunktionell sind und daher immer auch zu einem gewissen Grad Phenylalanin umsetzen. Aus einigen Bakterien (z.B. *Rhodobacter spec.*) sind ebenfalls TAL und PAL Enzyme bekannt (75). Allerdings dienen die beiden Enzyme hierbei nicht zum Aufbau eines Phenylpropanoidwegs, sondern stellen pCA und CiA für die Synthese eines photoaktiven gelben Proteins (37), Kaffeesäure (7) oder Enterocin (82) bereit. Obwohl die bakterielle TAL auch beide Aminosäuren verwendet, ist das Verhältnis deutlich in Richtung der Desaminierung von Tyrosin verschoben. Daher werden diese Enzyme in der Literatur als reine TAL bezeichnet und sind mit einer eigenen EC Nummer (4.3.1.23) versehen. Für die angeschlossenen Reaktionswege in Pflanzen, mit Ausnahme der Cumarin-, der Stilben- und der Styrolpyron-Biosynthese, ist eine Aktivierung der Säure notwendig. Eine 4-Cumarat:CoA Ligase (4CL, EC 6.2.1.12) überträgt dazu Coenzym A (CoA) auf pCA. *p*-Cumaryl-CoA (pC-CoA) steht den Reaktionen der Polyketidbiosynthese in Richtung der Flavonoide ebenso zur Verfügung wie der Synthese des Lignins (19).



**Abb. 1.2: Der Phenylpropanoid Reaktionsweg.** Die Abbildung zeigt die zentralen Reaktionen des Phenylpropanoid Reaktionswegs von Di- (über PAL und C4H) und Monocotyledonen (TAL) Pflanzen.

Da die Phenylpropanoide eine Grundlage für das Lignin darstellen, ist dieses Biopolymer ein großer Speicher für Aromaten. Ein möglicher Zugang zu diesen Verbindungen erfordert ein detailliertes Verständnis der Synthese der Monomere. Ausführliche Erläuterungen zu den Reaktionen der Ligninbiosynthese erfolgen im nächsten Abschnitt (1.3). Die Biosynthese der Flavonoide, beginnend mit der Reaktion einer Chalkon Synthase (CHS), repräsentiert ebenfalls ein sehr interessantes Feld des Sekundärmetabolismus von Pflanzen. Auch Flavonoide bestehen aus aromatischen Komponenten, können aber in ihrer Menge nicht mit Lignin konkurrieren.

Da keins der Enzyme zur Synthese von Flavonoiden für die vorliegende Arbeit ver-

wendet wurde, entfallen nähere Angaben hierzu.

### 1.3 Die Ligninbiosynthese

Unter den terrestrischen Biopolymeren ist Lignin das zweithäufigste, ca. 30 % des organisch gebundenen Kohlenstoffs ist darin fixiert. Übertroffen wird dies nur von Zellulose. Zusammen mit Hemizellulosen, Wachsen, Harzen, Fetten und Mineralien bilden diese beiden Verbindungen das Holz.

Alle höheren Pflanzen zeigen zu einem gewissen Grad Verholzung, mehrjährige Pflanzen wie Bäume und Sträucher stärker als einjährige. Bei niederen Pflanzen, Bakterien, Pilzen oder Tieren ist dagegen weder Holz noch Lignin nachweisbar. Im Holz bildet die Zellulose das Skelett, die Hemizellulosen stellen eine Matrix für die Zellwand dar und das Lignin verhält sich wie Beton (5). Dabei erfüllt dieses hydrophobe phenolische Polymer verschiedene wichtige Aufgaben in einer Pflanze (10).

Die Stabilisierung pflanzlicher Gewebe, also Schutz gegenüber mechanischer Beanspruchung, ist eine Hauptaufgabe von Lignin. Auch wenn die Vorstellung einer dreidimensionalen Vernetzung mittlerweile nicht mehr unumstritten ist (17), bleibt in der Fachliteratur anerkannt, dass dem Lignin eine wichtige Rolle in Bezug auf Stabilität zukommt.

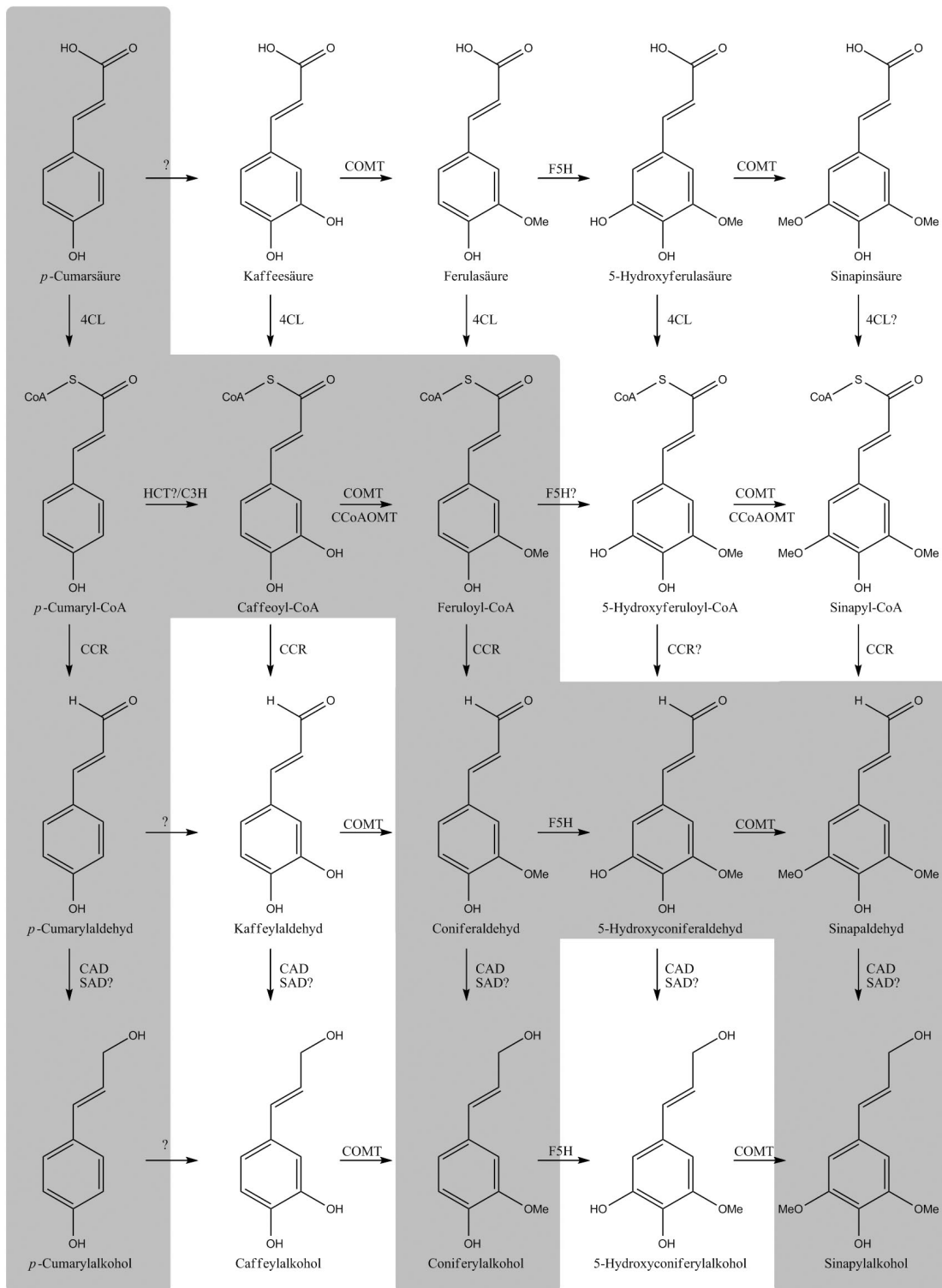
Eine weitere Funktion von Lignin zeigt sich beim Transport von Wasser durch die Pflanze. In größeren Bäumen müssen an heißen, sonnigen Tagen bis zu 150 l Wasser von der Wurzel in die Krone transportiert werden. Lignin bietet, ähnlich dem allgemeinen mechanischen Schutz, auch den Leitgefäßen Stabilität, um größere Mengen Flüssigkeit transportieren zu können. Wichtiger ist aber noch, dass der hydrophobe Charakter dieser phenolischen Verbindung die Leitfähigkeit deutlich erhöht (48).

Die dritte Hauptaufgabe von Lignin ist die Abwehr von Pathogenen und der Schutz gegen Biodegradation. Das Polymer ist für die meisten Organismen nicht angreifbar, da eine komplexe Maschinerie von Enzymen zu dessen Abbau benötigt wird. Zu den wenigen Mikroorganismen mit der Fähigkeit Lignin zu verdauen, zählen Weißfäulepilze. Zudem bietet es auch der Zellulose Schutz vor Abbau, indem es diese umgibt (3, 24, 45).

Die Vorgänge bei der Synthese der als Monolignole bezeichneten monomeren Vorstufen des Lignins sind sehr komplex. Dies ist bedingt durch die Variabilität der Regulation dieser Prozesse in Bezug auf Spezies, Gewebe, Lebensalter und physiologischen Zustand (56). Vor allem die Arbeiten mit verschiedensten Mutanten für zentrale Enzyme der Phenylpropanoid-/und Ligninbiosynthese haben in den letzten Jahren das Verständnis hierüber deutlich verbessert. Ein grundsätzlicher Konsens herrscht in der Literatur

über die zentralen Schritte der Monolignolbiosynthese. Dies ermöglicht die Wiedergabe eines allgemein akzeptierten Modelles (Abbildung 1.3), das weiter unten detailliert beschrieben wird. Eine Reihe beteiligter Prozesse ist aber weitaus weniger gut verstanden und wird mitunter kontrovers diskutiert. Weder konnte abschließend geklärt werden, wie die Monolignole die Zelle verlassen, um im Apoplasten das Polymer zu bilden - ein Transport über Vesikel (47) wird favorisiert - noch bestehen einheitliche Aussagen über die Lokalisation der einzelnen Intermediate während ihrer Synthese. Anhand von Studien in *Arabidopsis thaliana* konnte in diesem Zusammenhang lediglich geklärt werden, dass vermutlich einige der beteiligten Enzyme miteinander am endoplasmatischen Reticulum assoziiert sind und eine Art „metabolic channeling“ durchführen. So sind ER-Ankerdomänen bei Formen der P450-Monooxygenasen (*p*-Cumarat 3-Hydroxylase, Ferulasäure 5-Hydroxylase, C4H, Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase) zu finden (56). Auch konnte gezeigt werden, dass sich Glykoside der Monolignole in Vesikeln befinden. Es wird angenommen, dass die Monomere vor der Ausschleusung in den Apoplasten dort gelagert und damit stabilisiert und detoxifiziert werden (38). Unklar bleibt jedoch, wie die eigentliche Polymerisation im Apoplasten stattfindet. Allgemein wird ein dehydrogenativer Mechanismus angenommen, der eine radikalische Verknüpfung ermöglicht. Involviert sind dabei anscheinend Peroxidasen und Laccasen, wobei derzeit eine klare Zuweisung einzelner Aktivitäten kaum möglich ist (9, 10, 57). Auch unterliegt die lokale Zusammensetzung des Polymers einer Regulation, da häufig bestimmte Muster der Monomere im Polymer zu finden sind. Ob dies allerdings lediglich durch die Biosynthese und den Transport der Monolignole oder sogar durch „Lignin-dirigierende Proteine“ gesteuert wird, unterliegt heftigsten Diskussionen (17, 56). Da diese Arbeit sich nicht direkt mit den Vorgängen der Ligninbiosynthese in Pflanzen beschäftigt, können obige Fragen hier nicht geklärt werden, und es erfolgt nur eine Darstellung der hierfür wichtigsten Reaktionen.

Obwohl die Übergänge nicht klar definiert sind, kann die Reduktion von *p*C-CoA zu *p*-Cumarylaldehyd (*p*CAlD) als die erste Reaktion der Biosynthese von Lignin bezeichnet werden. Katalysiert wird diese Umsetzung durch eine Cinnamyl CoA Reduktase (CCR, EC 1.2.1.44). Allerdings stellt *p*C-CoA nicht das einzige Substrat für dieses Enzym dar, ebenso können die Thioester von Kaffeesäure, Ferulasäure, 5-Hydroxyferulasäure und Sinapinsäure reduziert werden. Zur Synthese dieser Verbindungen kann CoA vorher in anderen Reaktionen durch eine Hydroxycinnamyl-CoA Shikimat/Chinat O-Methoxycinnamyltransferase (HCT, EC 2.3.1.133/99) abgespalten, und durch Shikimi- oder Chinasäure ersetzt werden. Derart aktiviert kann durch eine *p*-Cumarat 3-Hydroxylase (C3H, EC 1.14.14.1) in meta-Stellung eine Hydroxylgruppe angefügt werden.



**Abb. 1.3: Die Biosynthese der Monolignole.** Dargestellt sind die Reaktionen zur Biosynthese der aromatischen Alkohole. Grau unterlegt sind die Syntheserouten der drei wichtigsten Monolignole *p*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol. Fragezeichen markieren wahrscheinliche, aber nicht ausreichend bewiesene Reaktionen. Die Abkürzungen sind dem Text in Abschnitt 1.3 zu entnehmen.

Die HCT tauscht danach Shikimi- oder Chinasäure wieder gegen CoA aus. Das Produkt, die aktivierte Kaffeesäure, kann durch eine Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase (CCoAOMT, EC 2.1.1.104) oder eine Kaffeesäure O-Methyltransferase (COMT, EC 2.1.1.104) umgesetzt werden. Eine Ferulasäure 5-Hydroxylase (F5H, EC 1.14.14.x) führt in der zweiten meta-Position eine weitere Hydroxylgruppe ein und bildet dadurch 5-Hydroxyferulasäure. Diese kann entsprechend der ersten Hydroxylgruppe methyliert werden. Dabei entsteht Sinapyl-CoA. Die Hydroxylierungs- und Methylierungsreaktionen von C3H, Methyltransferase und F5H sind dabei zwingend sequentiell angeordnet. Der Aktivität von C3H folgt die Methylierung, erst dann überträgt die F5H eine Hydroxylgruppe, die dann wiederum methyliert werden kann. Die durch CoA aktivierten Säuren stellen nach der CCR-vermittelten Reduktion das Substrat für eine Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase (CAD, EC 1.1.1.195) dar. Hierdurch werden die Aldehyde zu den jeweiligen Alkoholen reduziert. Hauptsächlich werden p-Cumarylalkohol (pCAlk), Coniferylalkohol und Sinapylalkohol gebildet, also die reduzierten Formen von pCA, Ferulasäure und Sinapinsäure. Die beschriebenen Reaktionen sind graphisch in Abbildung 1.3 dargestellt. Fragezeichen markieren wahrscheinliche, aber noch nicht ausreichend bewiesene Reaktionen. Grau unterlegt sind die Haupttrouten der Biosynthese.

#### 1.4 Aromatische Alkohole als Monomere

Basierend auf den in Abschnitt 1.3 dargestellten Monolignolen wird das einzigartige Polymer Lignin gebildet. Dessen Eigenschaften nutzt der Mensch seit langer Zeit, indem er Holz als einen seiner wichtigsten Werkstoffe verwendet. Eine große Stabilität gepaart mit einer hohen Biegefestigkeit sind wertvolle Eigenschaften dieses Materials und auf die Monomere und deren komplexe Verknüpfungen zurückzuführen (48). Obwohl Holz ein sehr guter Werkstoff ist, gibt es bestimmte Nachteile bei der Verarbeitung. Gewünschte Teile müssen zwingend durch Zuschnitt oder Biegung in Form gebracht werden. Komplexe Strukturen können nur aus mehreren Einzelteilen gefertigt werden. Größere Krümmungen sind gar nicht möglich, da damit die Belastbarkeit sinkt und es zum Bruch kommen kann.

Eine mögliche Technik, diesen Limitationen beizukommen, liegt dem Werkstoff Arboform zu Grunde, einer Entwicklung des Fraunhofer Instituts für Chemische Technologie (ICT, Karlsruhe). Es handelt sich hierbei um eine Art verflüssigbares Lignin. Nach Angaben des Herstellers Tecnar GmbH (<http://www.tecnaro.de/index.htm>) basiert Arboform auf einer Mischung aus Lignin und Zellulose. Ligninabfälle aus der Papierindustrie und Naturfasern aus Flachs und Hanf werden bei rund 1000 Bar und



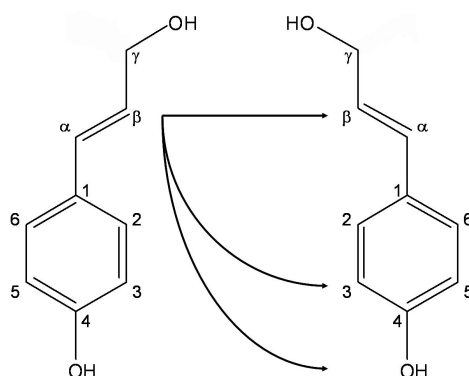
Temperaturen von 110 - 170 °C verflüssigt. Ähnlich dem Spritzguss, der für Kunststoffe Verwendung findet, erfolgt die Formgebung bei Arboform. Hergestellt wurden bislang Uhrengehäuse, Brettspiele, Souvenirs und ein Messadapter.

Die auf der Homepage des Herstellers aufgeführten Materialeigenschaften zeigen, dass durch dieses Verfahren ein höheres Zugmodul (E-Modul, Widerstand gegen Verformung), als es die meisten Kunststoffe und Holz besitzen, erreicht wird. Der lineare Wärmeausdehnungskoeffizient (Ausdehnungsmaß pro Kelvin Temperaturzunahme) ist dabei geringer als der aller dort verglichenen Materialien. Trotz der guten Materialeigenschaften und der erleichterten Formgebung durch Spritzguß ist von Nachteil, dass es sich um einen heterogenen Werkstoff handelt. Die verschiedenen Arten von Holz zeigen starke Variabilität in ihren mechanischen Eigenschaften. Die Zusammensetzung des verwendeten Lignins basiert weiterhin auf dem zu Grunde liegenden Holz und bei diesem gibt es große Unterschiede. Dies zeigt sich beispielsweise an der spezifischen Verwendung einzelner Baumarten in der klassischen Holzverarbeitung, die oft nur für bestimmte Produkte benutzt werden. Arboform ist zwar durch Anpassung des Mischungsverhältnisses und der Zugabe von Additiven (wie bei den Kompositwerkstoffen Arbofill und Arboblend) variabler, die Zusammensetzung des Lignins hat aber weiterhin Einfluss auf das Produkt.

Völlige Unabhängigkeit von der sehr heterogenen Zusammensetzung des Lignins würde die Entwicklung künstlich hergestellter Polymere auf Monolignolbasis bieten. Deren Materialeigenschaften könnten durch gezielte Auswahl einzelner Bausteine wesentlich stärker variiert werden, als dies bei Arboform derzeit möglich ist. Dabei sollte die Polymerisierung der Monomere nicht auf der Aktivität einzelner Enzyme basieren, wie dies *in natura* geschieht. Das unzureichende Verständnis über die Vorgänge und Regulationen des Lignifizierungsprozesses sind nicht geeignet für definierte Synthesen (Abschnitt 1.3). Auch ohne die Aktivität der Peroxidasen und Laccasen stehen grundsätzlich alle Reaktionen der natürlichen Dimerisierungs- oder Lignifizierungsprozesse, wie sie im folgenden Absatz erläutert werden, für eine chemische Verknüpfung zur Verfügung. Durch Reduktion der Doppelbindung oder Variationen der Substituenten kann dabei gezielt weiterer Einfluss auf die Polymersierung genommen werden.

In Abbildung 1.4 sind die prominentesten Typen der Dimerisierung von Monolignolen anhand von pCAlk dargestellt. An den meisten Bindungen innerhalb des Polymers ist die reaktive Doppelbindung, vertreten durch das  $\beta$ -C-Atom, beteiligt. Die Verknüpfung zweier  $\beta$ -C-Atome führt zu einem  $\beta$ - $\beta$ -Dimer, das als Pinoresinol bekannt ist. Reagiert das  $\pi$ -Elektron mit der Hydroxylgruppe in para-Position, entsteht ein  $\beta$ -O-4-Dimer, auch  $\beta$ -Ether genannt. Ist die Bindung zwischen  $\beta$ -C-Atom und einer der

meta-Positionen ausgebildet, handelt es sich um Phenylcumaran ( $\beta$ -3/5-Dimer). Die Dimerisierung ist trotz großer Ähnlichkeiten klar von der Lignifizierung zu unterscheiden. Hier steht einer Verknüpfung von zwei Monomeren die Addition von Monolignolen an ein bereits bestehendes Oligo- oder Polymer gegenüber. Wie oben beschrieben, ist an nahezu allen bekannten Reaktionen das  $\beta$ -C-Atom beteiligt. Ein bereits inkorporierter Bindungspartner kann also kein  $\beta$ - $\beta$ -Dimer mit einem Monomer ausbilden. Es stehen nur noch meta- und para-Position für eine Bindung zur Verfügung. Zwischen zwei Oligomeren kann allerdings die Ausbildung von 4-O-5 und 5-5 Einheiten beobachtet werden. Die Hydroxylgruppe des  $\gamma$ -C-Atoms scheint nicht in größerem Ausmaß an den Reaktionen beteiligt zu sein (57).



**Abb. 1.4: Dimerisierung von Monolignolen.** Zwei Monolignole, hier pCAlk, können bei der Dimerisierung an verschiedenen Positionen verknüpft werden. Möglich sind ein  $\beta$ - $\beta$ -Dimer (Pinoresinol), das  $\beta$ -O-4-Dimer ( $\beta$ -Ether) sowie eine Verknüpfung von  $\beta$  und Position 3 oder 5 des Aromaten.

Zur Bereitstellung aromatischer Verbindungen als Basischemikalien oder Monomere sind Monolignole geeignet und haben damit das Interesse der chemischen Industrie geweckt [T. Hirth, IGB, persönliche Mitteilung,(28)]. Problematisch für einen großtechnischen Zugang zu diesen Stoffen ist allerdings zum einen die feste Verknüpfung des Lignins mit Zellulose, Hemizellulose und anderen Bestandteilen. Zum anderen stellt die sehr komplexe und stabile Inkorporation der Monomere in das Polymer eine Hürde dar. Lassen sich die ausgebildeten Etherbindungen noch relativ einfach auflösen, zum Beispiel durch alkalische Hydrolyse, stellen die C-C Brücken das eigentliche Problem bei der Degradation dar. Eine Spaltung dieses komplexen Bindungsmusters unter Erhalt der Monomere ist auf dem jetzigen Stand der Technik nicht möglich und theoretisch schwer realisierbar. Unter Beteiligung großer Verbände wie der Dechema und der chemischen Industrie (z.B. der Bayer AG) werden in aktuellen Projekten Lösungsmöglichkeiten angestrebt (vgl. Pressearchiv der FNR vom 05.07.07. Bioraffinerie: Rohstoffe aus Holz für die chemische Industrie). Auch international findet dieses Thema Beachtung, so in den USA durch das Ministerium für Energie (28).

Eine interessante Alternative bietet dagegen ein umgekehrter Ansatz - die rekombinante Biosynthese einzelner Monolignole. Organismen, denen die Fähigkeiten zu Polymerisation oder Degradation dieser Verbindungen fehlen, könnten gezielt durch Aufbau bestimmter Reaktionswege Monolignole produzieren. Dies würde einen neuen Zugang zu Aromaten für die chemische Industrie erzeugen.

## 1.5 Die rekombinante Biosynthese eines Monolignols

Lignin ist, wie bereits in Abschnitt 1.3 ausgeführt, ein pflanzliches Merkmal - in keinem anderen Reich kommt dieses Biopolymer vor. Sollen also Monolignole hergestellt werden, bietet es sich an, ein möglichst einfaches und geeignetes System aus einem der anderen Reiche (Monera, Protista, Fungi und Animalia) in Betracht zu ziehen.

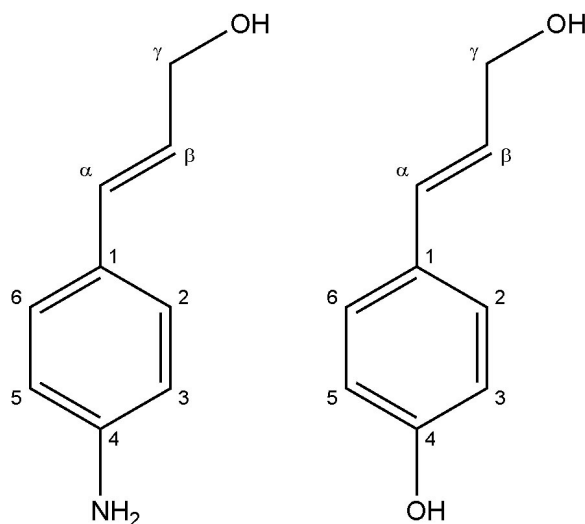
Bei vergleichbaren Arbeiten mit dem Ziel, andere Phenylpropanoidderivate, z.B. Chalkone und *p*-Hydroxystyrol (30, 55, 63, 78, 79, 84) herzustellen, ist auffällig, dass häufig auf *Escherichia coli* zurückgegriffen wird. Als vorteilhaft an *E. coli* wird dabei neben dem einfachen mikrobiologischen und gentechnischen Arbeiten das Fehlen jeglicher interferierender Reaktionswege genannt. Zudem sind die *E. coli* K12 Laborderivate teilweise nicht mehr in der Lage, verschiedene Aromaten abzubauen (18).

Die rekombinante Biosynthese von Monolignolen findet im Rahmen des nationalen Verbundprojektes „BioSysPro“ statt und gliedert sich in zwei Bereiche. Zum einen wird durch die Übertragung eines Reaktionsweges, der zum pCAlk führt, überprüft, ob und wie gut Monolignole in Bakterien synthetisiert werden können. Durchgeführt werden diese Arbeiten von F. Jansen (Institut für Biologie I, RWTH Aachen). Zum anderen wird versucht, basierend auf der grundlegenden Monolignolbiosynthese, ein bislang unbekanntes Monolignolderivat herzustellen - *p*-Aminocinnamylalkohol (pACiAlk). Die Versuche zur Biosynthese von pACiAlk werden in dieser Arbeit beschrieben.

## 1.6 Die Synthese von *p*-Aminocinnamylalkohol

Allen für Lignin verwendeten Monomeren (mit Ausnahme von seltenen Komponenten wie z.B. Cinnamylalkohol) ist gemeinsam, dass der in para-Position befindliche Substituent eine Hydroxylgruppe ist. Diese funktionelle Gruppe beteiligt sich maßgeblich am Aufbau des Polymers (Abschnitt 1.4). Auch in chemisch hergestellten Polymeren, z.B. mit pCAlk, wird diese als  $\beta$ -O-4 oder evtl.  $\gamma$ -O-4 einen bedeutenden Bindungspartner darstellen. Die grundsätzliche Veränderung der Eigenschaften eines künstlichen Lignins

wäre über die Substitution dieser Hydroxylgruppe gegeben. Anhand von Monolignolderivaten, die in *para*-Position aminiert sind, können die Materialeigenschaften eines neuartigen Polymers getestet werden. Eine *p*-aminierte Form des pCAlk wird als pACiAlk bezeichnet. Ein vergleichende Darstellung mit pCAlk findet sich in Abbildung 1.5.



**Abb. 1.5: pACiAlk und pCAlk.** Das Monolignolderivat pACiAlk (links) unterscheidet sich nur durch die Aminsubstitution am aromatischen Ring vom natürlichen pCAlk (rechts).

Die rekombinante Biosynthese von pACiAlk beginnt nicht, wie für Phenylpropanoidreaktionsweg und Ligninbiosynthese der Pflanzen üblich, auf der Stufe von Phenylalanin oder Tyrosin. Anstelle dieser aromatischen Aminosäuren wird *p*-Aminophenylalanin (pAPA) genutzt. pAPA ist dem Tyrosin - mit Ausnahme der Aminsubstitution in *para*-Position - sehr ähnlich. Natürlicherweise ist es ein Intermediat der Chloramphenicolbiosynthese (46) und sein Vorkommen in Pflanzen, und damit als potentielles Monolignol, nicht beschrieben. Für die Synthese von pACiAlk ist es eine zentrale Komponente, da über diesen Stoff eine aminierte Verbindung in die Phenylpropanoidbiosynthese eingeschleust wird. Die Einbindung der Biosynthese von pAPA in den zellulären Metabolismus und dessen Umsetzung im Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthesereaktionsweg stellen die wissenschaftliche Herausforderung dieser Arbeit dar.

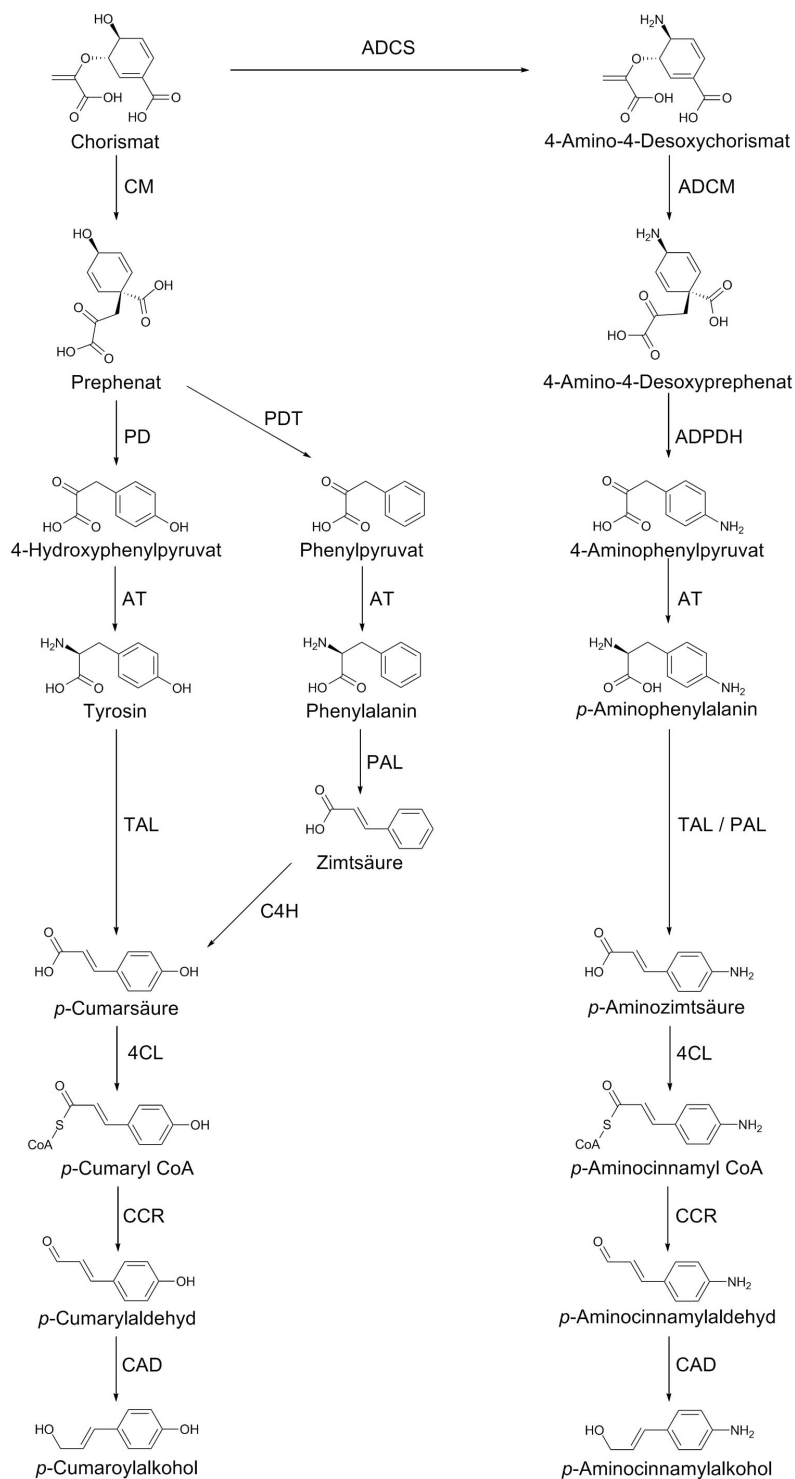
Ein möglicher Reaktionsweg zur Biosynthese von pACiAlk beginnt mit der Umsetzung von Chorismat. Diese Verbindung ist in ein zentrales Intermediat (68), von dem sich unter anderem die Synthese aromatischer Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan) ableitet. Durch die Aktivitäten einer Chorismat Mutase (CM) und Prephenat Dehydratase (PDT) oder Dehydrogenase (PDH) werden Phenylalanin beziehungsweise Tyrosin gebildet. Chorismat stellt aber auch den Eintritt in die Folat-

synthese dar. Hierbei wandelt ein Enzymkomplex aus einer Amidotransferase (*pabA*) und einer 4-Amino-4-Desoxychorismat Synthase (*pabB*) zusammen mit einer 4-Amino-4-Desoxychorismat Lyase (*pabC*, ADCL) Chorismat unter Einführung einer Aminogruppe in para-Position in *p*-Aminobenzoessäure (pABA) um. Die Amidotransferase überträgt dabei eine Aminogruppe von Glutamin auf die Synthase. Diese wiederum substituiert die Hydroxylgruppe durch die Aminogruppe. Durch die Lyase wird eine Pyruvatgruppe des entstandenen 4-Amino-4-Desoxychorismat (ADC) abgespalten und es entsteht *p*-Aminobenzoat. Tetrahydrofolat, abgeleitet von der Folsäure, ist ein wichtiger Methylgruppdonor. Pflanzen und Bakterien sind zur eigenständigen Synthese befähigt, der Mensch muss Folat als Vitamin B<sub>9</sub> (bzw. B<sub>11</sub>) aufnehmen (59).

Die Reaktionen von *pabA* und *pabB* substituieren - wie oben erwähnt - eine *p*-Hydroxylgruppe des Chorismat durch eine Aminogruppe. Damit sind diese Aktivitäten geeignet, die Biosynthese von pAPA einzuleiten. Einige Bakterien besitzen hierzu neben den üblichen Dimeren aus Amidotransferase und ADC-Synthase eine bifunktionelle ADC-Synthase, also ein Enzym, das beide Aktivitäten vereint. Zu diesen Bakterien zählen unter anderem *Corynebacterium glutamicum* (*pabAB*, *p*-Aminobenzoat Synthase Komponenten I und II) und *Streptomyces venezuelae* (*papA*). Im weiteren Verlauf der Arbeit wird der Begriff 4-Amino-4-Desoxychorismat Synthase (ADCS, EC 2.6.1.85) nur für diese bifunktionellen Enzyme verwendet (54, 59).

Während in den meisten Organismen ADC nur ein Intermediat auf dem Weg der Folatsynthese ist, findet diese Verbindung in *S. venezuelae* noch eine weitere Verwendung. Hier stellt die ADCS den ersten Schritt bei der Synthese von Chloramphenicol dar. Nachdem Chorismat zu ADC umgesetzt worden ist, überträgt eine ADC-Mutase (ADCM, EC 5.4.99.5) intramolekular eine Pyruvatgruppe, so dass 4-Amino-4-Desoxyprephenat (ADP) entsteht. Durch die Aktivität einer 4-Amino-4-Desoxyprephenat Dehydrogenase (ADPDH, EC 1.3.1.x) wird ADP unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> zu 4-Aminophenylpyruvat (4AP) umgesetzt. Eine Aminotransferase überführt 4AP dann in pAPA (25, 85). Die Reaktionen von ADCS, ADCM, ADPDH und einer Aminotransferase sind also geeignet, pAPA zu erzeugen. Ein Beweis der Funktionalität dieser Reaktionskette wurde bereits in *E. coli* geführt (46).

Der Ansatz zur rekombinanten Produktion von pACiAlk basiert auf einer Verknüpfung der Biosynthese von pAPA aus Chorismat und der Umsetzung der aromatischen Aminosäure durch die Reaktionen des Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthesewegs mit den in den Abschnitten 1.2 und 1.3 vorgestellten Enzymen TAL/PAL, 4CL, CCR und CAD. Der dabei entstehende Reaktionsweg ist in Abbildung 1.6 dargestellt. Zur Einordnung der geplanten Route ist als Vergleich die Biosynthese von pCAlk in Mo-



**Abb. 1.6: Rekombinante Biosynthese von *p*-Aminocinnamylalkohol.** Das Flusschema zeigt die Abfolge der Reaktionen zur Biosynthese von *p*ACiAlk im Vergleich zum *p*CAIk-Reaktionsweg. AD-  
CS, 4-Amino-4-Desoxychorismat Synthase; ADCM, 4-Amino-4-Desoxychorismat Mutase; AT, Amino-  
transferase; TAL / PAL, Tyrosin / Phenylalanin Ammoniak Lyase; 4CL, 4-Cumarat:CoA Li-  
gase; CCR, Cinnamyl CoA Reduktase; CAD, Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase; CM, Chorismat  
Mutase; PD, Prephenat Dehydrogenase; PDT, Prephenat Dehydratase; C4H, trans-Zimtsäure 4-  
Monooxygenase.

nokotyledonen abgebildet, wobei aus Gründen der besseren Anschaulichkeit beide basierend auf Chorismat dargestellt sind. Die einzelnen Reaktionsabschnitte auf dem Weg zu pACiAlk - Chloramphenicol- bzw. Phenylpropanoid-/Ligninbiosynthese - sind durch das Intermediat pAPA miteinander verknüpft. Den Überlegungen zur Herstellung von *p*-Aminozimtsäure (pACiA) in *E. coli* liegt neben den Arbeiten von R. Mehl (46) die Annahme zu Grunde, dass die Aminosubstitution kein Ausschlusskriterium für die Katalyse der Ammoniak Lyasen, der 4CL, der CCR oder der CAD ist. Die starke Analogie zwischen den para-aminosubstituierten Verbindungen *p*-Aminocinnamyl-CoA (pACi-CoA), *p*-Aminocinnamylaldehyd (pACiAld) und ihren natürlich vorkommenden Verwandten soll eine Umsetzung zu pACiAlk ermöglichen. Insgesamt geht die Planung von der Nutzung sieben verschiedener Transgene in *E. coli* aus. In Anlehnung an Arbeiten von K. Watts (78) wird angenommen, dass der Alkohol aus den Zellen ausgeschleust wird.

Obwohl TAL oder PAL-Enzyme in allen höheren Pflanzen, einigen Pilzen und wenigen Bakterien vorkommen, ist für *E. coli* eine solche Aktivität bislang unbekannt (39). Bei der transgenen Expression einer Ammoniak Lyase in diesem Bakterium wird diese Tyrosin oder Tyrosin und Phenylalanin desaminieren. Da für den geplanten Reaktionsweg allerdings pAPA das Substrat des Enzyms sein soll, ist eine Kompetition zu befürchten. Dazu wurden zwei möglich Lösungsmodelle entwickelt.

Vorteilhaft könnte hierzu die Alternierung der Substratspezifität des Enzyms sein. Durch eine Änderung der Aminosäuresequenz wäre es möglich, pAPA als einziges Substrat zuzulassen. Alternativ wäre eine Möglichkeit, die zelluläre Konzentration von Tyrosin durch die Deletion wichtiger spezifischer Biosynthesegene zu reduzieren und damit die Aminosäure der Reaktion vorzuenthalten. Angesichts der Tatsache, dass auch Phenylalanin als Substrat (PAL) auftreten kann, ist ein entsprechender Eingriff in die Phenylalaninbiosynthese ebenfalls interessant.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Biosynthese des aromatischen Alkohols pACiAlk in *E. coli*. Dieses bislang nicht beschriebene Monolignolderivat soll durch die Verknüpfung von Reaktionen aus Chloramphenicol- und Phenylpropanoid-/Ligninbiosynthese über das Intermediat pAPA gebildet werden. Hierzu ist die simultane Verwendung von sieben verschiedenen Transgenen - ADCS, ADCM, ADPDH, TAL/PAL, 4CL, CCR, CAD - vorgesehen, deren Aufgabe es ist, das endogen vorhandene Chorismat in den neuen Reaktionsweg abzuleiten und schrittweise zu pACiAlk umzusetzen.

Die neuartige Verbindung soll nach ihrer Synthese aufgereinigt und für die spätere Polymerisierung durch chemische Methoden vorbereitet werden. Der Charakter dieser Arbeit als Machbarkeitsstudie ist hervorzuheben, da keine vergleichbaren Arbeiten in der aktuellen Literatur beschrieben sind. Weder gibt es Studien zur Biosynthese von Monolignolen in Mikroorganismen, noch ist jemals versucht worden, mit Aminogruppen substituierte Monolignolderivate herzustellen.

Der erfolgreiche Nachweis eines - mit sieben Transgenen und dem Aufbau eines artifizialen sekundären Metabolismus - derart komplexen Reaktionsweges kann die Grundlage für anschließende Studien darstellen, in denen Optimierungen oder eine Produktion im technischen Maßstab vorgenommen werden können.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Für die vorliegende Arbeit wurden Chemikalien verschiedener Reinheitsstufen der Anbieter AppliChem (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Invitex (Berlin), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Metabion (Planegg-Martensried) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) verwendet.

Verbrauchsmaterialien wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Solingen), Sarstedt (Nümbrecht), Schott AG (Mainz), VWR (Darmstadt) und Whatman (Maidstone, England) bezogen.

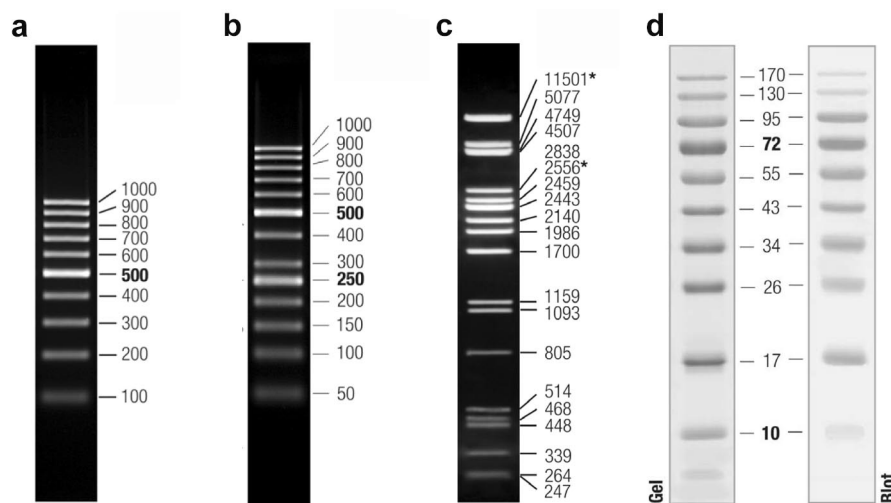
Die verwendeten Enzyme und Antikörper wurden von den Firmen Dianova (Hamburg), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt) und Promega (Mannheim) bestellt.

Zur Isolation, Aufreinigung und Mutagenese von Nukleinsäuren wurden Reaktionskits der Firmen Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Macherey-Nagel (Düren) und Qiagen (Hilden) benutzt.

Die Materialien zur Durchführung von High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), Dünnschichtchromatographie (DC) und Festphasenextraktion (SPE) wurden von den Firmen Macherey-Nagel (Düren), Merck KGaA (Darmstadt) und Phenomenex (Aschaffenburg) bestellt.

#### 2.1.2 Gelelektrophorese Größenstandards

Bei der Elektrophorese von Nukleinsäuren und Proteinen wurden Produkte der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Größenabschätzung von DNA erfolgte nach deren elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel (Abschnitt 2.2.4) durch die Marker  $\lambda$ /*Pst*I, GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder und 100 bp DNA Ladder.  $\lambda$ /*Pst*I eignet sich dabei vor allem für größere Fragmente (500 - 11.000 bp), während die beiden anderen Marker besser zur Abschätzung kürzerer Nukleinsäuren (> 1000 bp) sind. Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.13) und den Western Blot von Proteinen wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder eingesetzt. Dieser Marker umfasst den gesamten relevanten Größenbereich (in kDa) der hier genutzten Enzyme. Da dies ein „Prestained“ Marker ist, kann er ohne besonderen Nachweis direkt auf Polyacrylamidgel und Blotting Membran abgelesen werden (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1: DNA und Proteinmarker.** Dargestellt sind die verschiedenen Marker der Firma Fermentas (St. Leon-Rot), die in dieser Arbeit Verwendung fanden. Zur Größenabschätzung bei Agarosegelelektrophoresen wurden (a) GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder und (b) 100 bp DNA Ladder, sowie (c)  $\lambda/PstI$  genutzt. Für SDS-Polyacrylamid Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurde (d) PageRuler™ Prestained Protein Ladder verwendet. Zu sehen sind die resultierenden Signale des 50 bp Markers in 2,5 % Agarose, des 100 bp Markers in 1,7 % Agarose und des  $\lambda/PstI$  Markers in 1,5 % Agarose nach Elektrophorese. Die zum Proteinmarker angegebenen Molekulargewichte in kDa für SDS-PAGE und Western Blot gelten in einem Bereich von 4 - 20 % Polyacrylamid.

### 2.1.3 Gerätschaften, Zubehör und EDV

Im Folgenden findet sich eine Liste verwendeter Geräte und deren Zubehör. Für kleinere Gerätschaften (Tischzentrifugen, Elektrophoresezubehör) wird in dieser Aufstellung kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben. Dagegen sind alle eigenständig genutzten Großgerätschaften aufgeführt.

#### EDV

Basic Local Alignment Search Tool (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

BRENDA (TU Braunschweig, <http://www.brenda-enzymes.info/>)

ChemOffice 2006 (CambridgeSoft, Cambridge, UK)

Chromas Lite 2.0 (Technelysium Pty Ltd, Holland Park, QLD, Australia)

Clone Manager Professional Suite 8 (SciEd Software, Cary, NC, USA)

EndNote 8.0.2 (Thomson Reuters, Carlsbad, CA, USA)

Oligonucleotide Calculator (North Western University Medical School, Chicago, IL, USA, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>)

OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA)

#### Elektrophoresen

Agarose-Gelelektrophoresekammern (wiss.-tech. Werkstatt der Biologie, Aachen)

Mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratories, München)

- Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories, München)
- Sub-Cell Gelelektrophoresesysteme (Bio-Rad Laboratories, München)
- Sämtliches Zubehör (Bio-Rad Laboratories, München)
- HPLC System Agilent HP 1100 (Agilent, Böblingen)
  - G1311A Quaternary Pump
  - G1313A Autosampler
  - G1315A Diode Array Detector
  - G1322A Vacuum Degasser
  - Solvent Module
- HPLC System Gold (Beckman Coulter, Krefeld)
  - Autosampler 507
  - Programmable Solvent Module 126
  - Scanning Detector Module 167
- HPLC System Gold (Beckman Coulter, Krefeld)
  - Autosampler 507
  - Detector 166
  - Solvent Module 125
- Photometer und ELISA Reader
  - Biophotometer (Eppendorf, Hamburg)
  - SpectraMax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
  - Spectrophotometer Uvikon 930 (Kontron, München)
- Rotationsverdampfer und Zubehör
  - Laborata 4000-efficient (Heidolph, Schwabach)
  - Labor-Vakuum-System LVS 301 Zp (Ilmvac, Ilmenau)
- Zentrifugen
  - Avanti J-30I Centrifuge (Beckman Coulter, Krefeld)
  - Biofuge pico (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
  - Microfuge<sup>®</sup> R Centrifuge (Beckman Coulter, Krefeld)
  - Sorvall<sup>®</sup> RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- Sonstige Geräte
  - Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)
  - HI 9321 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Kehl am Rhein)
  - Innova 4430 incubator shaker (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
  - Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg)
  - Multiporator (Eppendorf, Hamburg)
  - Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)

### 2.1.4 Oligonukleotide

Für die vorliegende Arbeit wurde eine größere Anzahl von Oligonukleotiden (auch Primer genannt) genutzt. Neben Primern zum Nachweis einzelner Sequenzen eignen sich Oligonukleotide zur Klonierung, Mutagenese und für die homologe Rekombination. Dabei können sie Anhänge enthalten, die a) Restriktionsschnittstellen aufweisen (Klonierung), b) die homologe Bereiche zu einer Zielsequenz besitzen (homologe Rekombination) oder c) die Sequenz kann gezielt kleinere Fehler enthalten (Mutagenese). Die Sequenzen der benutzten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Auf eine Angabe der jeweiligen Systeme und ihrer Bedingungen wird verzichtet, da mehrheitlich standardisierte Protokolle für die Amplifikationen angewendet wurden. Sollten die Reaktionsbedingungen in Bezug auf die Primer von Bedeutung sein, werden sie in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

**Tab. 2.1: Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz
<i>SvADCS</i>	
<i>papA-fw-03</i>	ACT GAA TTC CAT GCG CAC GCT TCT GAT CGA
<i>papA-rev-03</i>	TGC ACT TGC GGC CGC TCG GGC GCC CGC CAC
<i>CgADCS</i>	
<i>CgADCS-fw-02</i>	GAA TTC CAT GCG CGT TTT AAT TAT TGA TAA TTA TGA
<i>CgADCS-rev-02</i>	GCG GCC GCT CAT GGG AAC TCA ATC CCA AA
<i>SvADCM</i>	
<i>papB-fw-03</i>	ACT GAA TTC CAT GAC CGA GCA GAA CGA GCT
<i>papB-rev-03</i>	TGC ACT CTC GAG TCA CCG CCG GTC CTC GGC CGTC
<i>EcADCL</i>	
<i>pabC-fw-01</i>	TAT AAG CTT ATG TTC TTA ATT AAC GGT CAT AAG CA
<i>pabC-rev-01</i>	TGC ACT TGC GGC CGC ATT CGG GCG CTC ACA AAG TG

## Oligonukleotide (Forts.)

Bezeichnung	Sequenz
<i>ZmPAL</i>	
<i>ZmPAL-fw-01</i>	AGA ATT CCA TGG CGG GCA ACG GCG
<i>ZmPAL-rev-01</i>	ATA CTG CAG ATC TTG ATG TTG ATG GGC AGC
homologe Rekombination/ <i>pheLAtyrA</i> Deletion	
pKD13-k <sub>t</sub>	CGG CCA CAG TCG ATG AAT CC
pKD13-k <sub>1</sub>	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT
pKD13-k <sub>2</sub>	TTG TCA AGA CCG ACC TGT CC
pKD13-P1- <i>pheLA</i>	AGC GTG AAA ACA GTA CGG GTA CTG TAC TAA AGT CAC TTA AGG AAA CAA ACG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C
pKD13-P4- <i>tyrA</i>	TCA GGA TCT GAA CGG GCA GCT GAC GGC TCG CGT GGC TTA AGA GGT TTA TTC TGT CAA ACA TGA GAA TTA A
<i>aroF-rev-01</i>	CAG CCA CGG TAA TTC CAA TAA AG
<i>raiA-fw-01</i>	CTG GAA AAA TGG CAA ACA CAT CT
<i>tyrA-aroF-rev-01</i>	GCA AAC TCA CCG TGA AAT GG
Duet-Vektor Systeme	
Duet-up1	ATG CGT CCG GCG TAG A
Duet-up2	TTG TAC ACG GCC GCA TAA TC
Duet-down1	GAT TAT GCG GCC GTG TAC AA
ACYCDuet-up1	GGA TCT CGA CGC TCT CCC T
T7-reverse	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
Nachweis fertiger Konstrukte	
pCDF- <i>CgADCS-fw</i>	GAC AAA ATT CGC AGA GCC CAG GA
pCDF- <i>CgADCS-rev</i>	CAT ACC CTG CCG AAT CAA TGG TGA
pACYC- <i>SvADPDH-SvADCM-fw</i>	TGG AGG TTG TGA TGG AGC TGG TA
pACYC- <i>SvADPDH-SvADCM-rev</i>	CAG CTC GTT CTG CTC GGT CA
pRSF- <i>ZmCCR-ZmCAD-fw</i>	GTC AGC CAG TCG CTT TAC GAC A
pRSF- <i>ZmCCR-ZmCAD-rev</i>	CAA CGA TCA CCC CGA CGC CTA
pET- <i>ZmPAL-Pc4CL-fw</i>	CTC CGT GTT CTC CAA GAT CAC CA
pET- <i>ZmPAL-Pc4CL-rev</i>	GCC ATA GTA GAA ATT GCA CCA CGA

<b>Oligonukleotide (Forts.)</b>	
Bezeichnung	Sequenz
TAL Mutagenese	
TALmut01-rev	GTG TAC AAG ATT AGC CTG GAG GGT TCG AAC
TALmut01Ser-fw	TCC AGG CTA ATC TTG TAC ACT CTC TAG CCT CCG
TALmut01Thr-fw	TCC AGG CTA ATC TTG TAC ACA CTC TAG CCT CCG
TALmut01Tyr-fw	TCC AGG CTA ATC TTG TAC ACT ATC TAG CCT CCG
TALmut01Pro-fw	TCC AGG CTA ATC TTG TAC ACC CTC TAG CCT CCG
TALmut01Asn-fw	TCC AGG CTA ATC TTG TAC ACA ATC TAG CCT CCG
TALmut01Asp-fw	TCC AGG CTA ATC TTG TAC ACG ATC TAG CCT CCG
TALmut01Gln-fw	TCC AGG CTA ATC TTG TAC ACC AAC TAG CCT CCG
TALmut01Glu-fw	TCC AGG CTA ATC TTG TAC ACG AAC TAG CCT CCG
TALmut01Met-fw	TCC AGG CTA ATC TTG TAC ACA TGC TAG CCT CCG
pCR2.1-TOPO und pCR4-TOPO Sequenzierung	
M13-forward	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13-reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC

### 2.1.5 Stämme und Selektionsmedien

#### *Escherichia coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Laborstämme des Bakteriums *E. coli* genutzt. Für Klonierungen, Plasmidamplifikationen und weitere molekularbiologische Arbeiten eignet sich DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>. Dieser Stamm hat den Genotyp  $\phi 80lacZ\Delta M15$ , *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* ( $r_K^-$ ,  $m_K^+$ ), *supE44*, *relA1*, *deoR*,  $\Delta(lacZYA-argF)$  U169, *phoA*. Expressionsversuche wurden je nach Angabe in den Zellen BL21-

CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, CA, USA), ER2566 (NEB, Frankfurt) und dessen Deletionsmutante ER2566  $\Delta pheLAtyrA$  durchgeführt. Der Genotyp der BL21 Zellen ist F-, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub>*, *m<sub>B</sub>*), *dcm*, *gal*,  $\lambda$ DE3. Zusätzlich ist ein pACYC Derivat mit den Genen *argU* (AGA, AGG), *ileY* (AUA), *leuW* (CUA) vorhanden. Die Codons in den Klammern geben die kodierten und in *E. coli* natürlicherweise unterrepräsentierten tRNAs an. Der Genotyp des Stamms ER2566 lautet F-,  $\lambda$ -, *fhuA2* [*lon*], *ompT*, *lacZ::T7 gene1*, *gal*, *sulA11*,  $\Delta(mcrC-mrr)114::IS10$ , *R(mcr-73::miniTn10-TetS)2*, *R(zgb-210::Tn10)(TetS)*, *endA1*, [*dcm*]. Im Fall des selbst hergestellten Derivates von ER2566 ist eine genomische Deletion von *pheLA* und *tyrA* durchgeführt worden (Abschnitt 2.2.10).

Zusätzlich zu den bereits erwähnten wurden zwei weitere *E. coli* Stämme in dieser Arbeit genutzt. Die sogenannten BW (Barry L. Wanner) Stämme wurden im Zusammenhang mit Deletionen in *E. coli* verwendet. Vorhanden sind BW25113 und BW25141. Der genetische Hintergrund von BW25113 lautet F-,  $\Delta(araD-araB)567$ ,  $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$ ,  $\lambda$ -, *rph-1*,  $\Delta(rhaD-rhaB)568$  und *hsdR514*. Für BW25141 lautet er F-,  $\Delta(araD-araB)567$ ,  $\Delta lacZ4787(::rrnB)-3$ ,  $\Delta(phoB-phoR)580$ ,  $\lambda$ -, *galU95*,  $\Delta uidA3::pir^+$ , *recA1*, *enA9(del-ins)::FRT*, *rph-1*,  $\Delta(rhaD-rhaB)568$ , *rrnB-3* und *hsdR514*. Zusätzlich wurden diese Stämme auch als Träger der Plasmide des Rekombinationssystems genutzt. Der Stamm BW25141 liegt mit den Plasmiden pKD3, pKD4, pKD13, pKD32, der Stamm BW25113 mit pKD46 vor.

Alle Angaben zu den Genotypen wurden den Dokumenten des jeweiligen Herstellers entnommen. Primer und Gene, die *E. coli* betreffen erhalten den Präfix *Ec*.

## Weitere Stämme

Neben den beschriebenen *E. coli* Derivaten wurden weitere Bakterien als Spender bestimmter offener Leserahmen (ORFs) genutzt (Abschnitt 2.1.7). Diese Stämme wurden von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig als vakuum-getrocknete Kulturen *Streptomyces venezuelae* DSM 40230 und *Corynebacterium glutamicum* DSM 20300 bestellt. Sequenzen (Primer und ORFs), die mit *S. venezuelae* in Zusammenhang stehen, erhalten den Präfix *Sv*, entsprechend gilt für *C. glutamicum* die Abkürzung *Cg*.

## Medien

Die Anzucht der aufgeführten Bakterien geschieht unter Verwendung diverser Medien. *E. coli* Stämme können in reichhaltigen Medien wie LB oder SOC angezogen werden. Bei Bedarf besteht aber auch die Möglichkeit, Minimalmedien, wie das hier beschriebene M9-Medium, zu benutzen. Für *C. glutamicum* und *S. venezuelae* sind entsprechend den Angaben der DSMZ spezielle Medien zu verwenden.

Die Zusammensetzung aller verwendeter Kulturmedien ist in Tabelle 2.2 wiedergegeben. Alle hier aufgeführten flüssigen Medien können optional mit 15 g/l Agar versetzt, und somit zur Herstellung von Wachstumsplatten genutzt werden.

**Tab. 2.2: Wachstumsmedien**

Komponente	Menge
LB-Medium	
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Trypton	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l
SOC-Medium	
Hefeextrakt	5 g
Trypton	20 g
1 M NaCl	10 ml
1 M KCl	2,5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l
Autoklavieren und abkühlen lassen	
1 M Mg <sup>2+</sup> -Lsg. (MgSO <sub>4</sub> + MgCl <sub>2</sub> )	10 ml
2 M Glukose, steril	10 ml
M9-Medium	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 960 ml
Autoklavieren und abkühlen lassen	
1 M MgSO <sub>4</sub>	2,0 ml
1 M CaCl <sub>2</sub>	0,1 ml
50 % Glycerin, steril	40 ml (2 % v/v)
<i>Corynebacterium</i> Medium (DSM Medium 53)	
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Glukose	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l



**Wachstumsmedien (Forts.)**

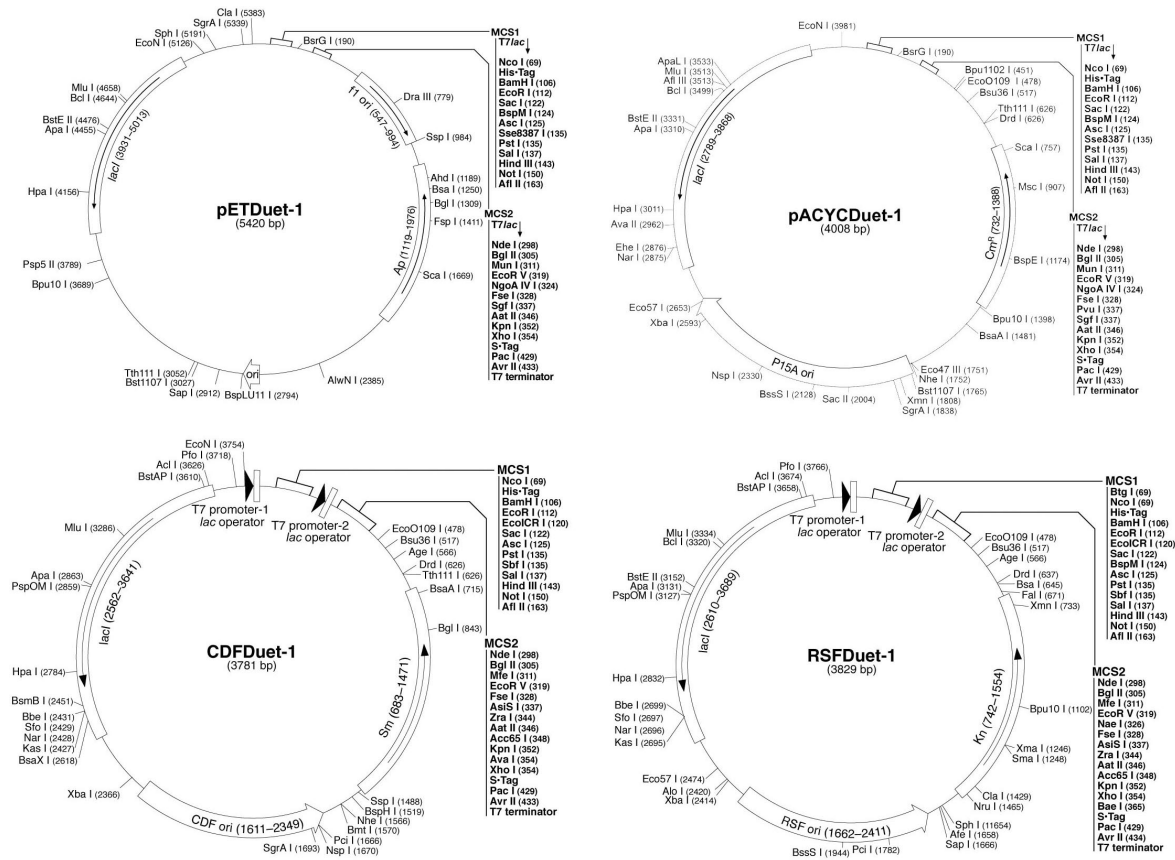
Komponente	Menge
GYM <i>Streptomyces</i> Medium (DSM Medium 65)	
Malzextrakt	10 g
NaCl	4 g
Glukose	4 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l
nur bei Agarplatten:	
CaCO <sub>3</sub>	2 g

## 2.1.6 Plasmide

Molekularbiologisches Arbeiten in Bakterien, wie dem hier maßgeblich genutztem *E. coli*, erfordert die Verwendung zirkulärer genetischer Elemente. Diese sogenannten Plasmide (auch: Vektoren) können vielfältig aufgebaut sein, besitzen aber generell einen Replikationsursprung, der die Vervielfachung im Bakterium und damit auch das „Überleben“ des Elementes sichert. Meistens sind zusätzlich Selektionsmarker - Enzyme zum Abbau verschiedener biozider oder biostatistischer Antibiotika - kodiert. Eine weitere Region ist die in allen moderneren Plasmiden enthaltene multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS). Abgesehen von zusätzlichen Eigenschaften im Fall von TA-Klonierungsplasmiden oder Gateway-Systemen, sind hier eine Reihe gängiger Restriktionsschnittstellen auf engem Raum konzentriert. Weitere vorhandene Elemente auf Plasmiden können je nach Anwendungsbereich und Hersteller deutlich variieren und sind der allgemeinen Literatur zu entnehmen.

In der vorliegenden Arbeit wurden vor allem zwei Arten von Plasmiden genutzt. Vektoren zur Klonierung/Amplifikation von DNA und Expressionsvektoren. Erstere zeichnen sich meist durch eine hohe Kopienzahl von >100 pro Zelle aus und eignen sich deshalb gut für die Isolation größerer Mengen von Plasmid-DNA. Expressionsvektoren besitzen häufig Replikationsursprünge, die nur eine geringe Kopienzahl (10 - 100) pro Zelle zulassen. Dies mindert ihre Eignung für Klonierungsarbeiten deutlich. Allerdings sind diese Plasmide häufig auf eine gute Expression der eingebauten Transgene ausgelegt.

Die Arbeiten zu den Expressionsversuchen (Abschnitt 2.2.11) wurden mit dem Duet-System der Firma Novagen (Darmstadt) durchgeführt. In Erweiterung zu normalen Expressionsvektoren besitzen diese Plasmide die Möglichkeit, zwei MCS mit Transge-



**Abb. 2.2: Das Duet-System.** Die schematischen Plasmidkarten aller vier verwendeten Duet-Vektoren (pET, pACYC, pCDF und pRSF) sind in dieser Abbildung dargestellt. Die Grafiken sind dabei den Produktinformationen des Herstellers entnommen. Exemplarisch sind die wichtigsten Restriktionsschnittstellen, vor allem der multiplen Klonierungsstellen, und genetischen Elemente angegeben.

nen zu versehen und diese durch einen His-Tag oder einen S-Tag zu markieren. Zudem sind die vier Vektoren dieser Serie (pETDuet-1, pACYCDuet-1, pRSFDuet-1 und pCDFDuet-1) so aufgebaut, dass bei der Nutzung entsprechender Stämme die gleichzeitige Aufrechterhaltung aller vier Elemente und damit die IPTG induzierte Expression von bis zu acht Proteinen möglich ist. In Abbildung 2.2 sind alle vier Plasmidkarten, basierend auf den Produktinformationen des Herstellers, zusammengefasst. Ebenso ist die Sequenz der Umgebung der beiden multiplen Klonierungsstellen in pETDuet-1 angegeben (Abbildung 2.3). Aufgrund der starken Ähnlichkeit dieses Bereichs in allen verwendeten Vektoren ist nur diese exemplarisch dargestellt. Die aus den Plasmiden des Duet-Systems hervorgehenden Konstrukte sind in den entsprechenden Abschnitten des Ergebnisteils wiedergegeben.

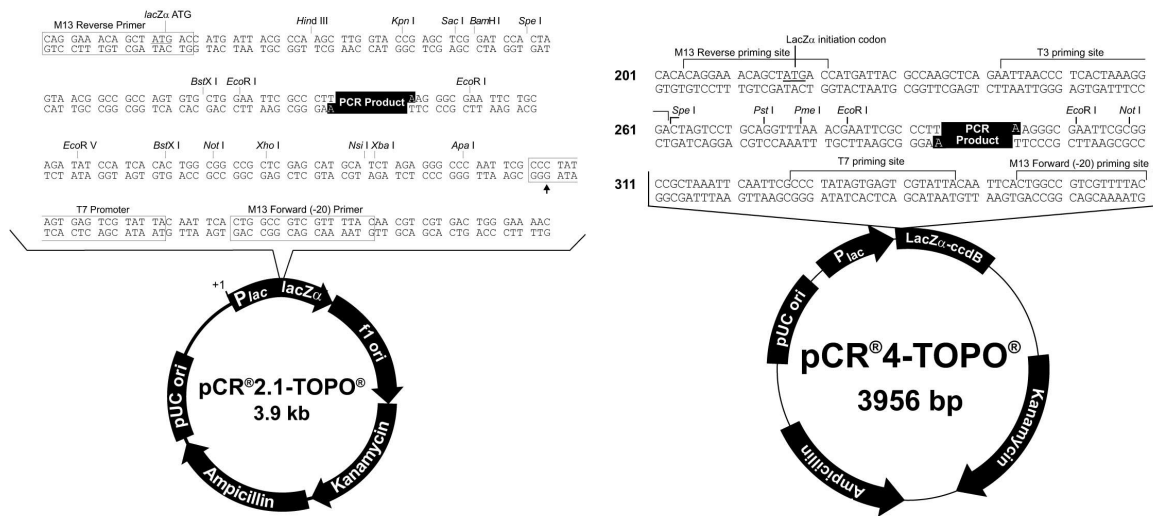
Die Klonierung der meisten ORFs, die in dieser Arbeit Erwähnung finden, wurde - vor Integration in einen Expressionsvektor - mit high-copy Plasmiden wie pCR2.1-TOPO und pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Beide Plas-



**Abb. 2.3: Die pETDuet-1 MCS Umgebung.** In der Abbildung ist - aufgrund der starken Ähnlichkeit bei allen vier verwendeten Duet-System Vektoren - exemplarisch die Umgebung der multiplen Klonierungsstellen 1 und 2 von pETDuet-1 wiedergegeben. Die Grafik ist den Produktinformationen des Herstellers entnommen und zeigt die wichtigsten Restriktionsschnittstellen und Elemente dieses Bereichs.

mide eignen sich ebenso für die TA Klonierung entsprechender PCR-Produkte wie für die spätere Amplifikation und Aufreinigung der Elemente. Für die TA Klonierung wird eine Aktivität der *Taq*-Polymerase genutzt, die bei der Synthese des komplementären Stranges einen 3' Überhang hinterlässt. Obwohl in Abhängigkeit vom 5' Nukleotid des gegenüberliegenden Primers auch G und C eingebaut werden können, ist A der wahrscheinlichste Überhang (29). pCR2.1-TOPO und pCR4-TOPO können nur als lineare Sequenzen erworben werden und besitzen in der geöffneten MCS auf beiden Seiten einen 5' T Überhang mit kovalent gebundener Topoisomerase. PCR Fragmente mit entsprechendem A Überhang können sich an den T Überhang anlagern und werden von den Topoisomerasen eingebaut.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Deletion genomischer Bereiche des Bakteriums *E. coli* durchgeführt. Diese sind in Abschnitt 2.2.10 ausgeführt. Dort befindet sich auch eine detaillierte Beschreibung der wichtigsten Elemente dieser Plasmide. Insgesamt wurden drei Vektoren für die homologe Rekombination verwendet: pKD13, pKD46 und pCP20. Die Sequenzen der ersten beiden Plasmide sind in der NCBI Datenbank hinterlegt (pKD13, AY048744; pKD46, AY048746) und können deshalb hier schematisch wiedergegeben werden. Für pCP20 sind keine Sequenzinformationen be-



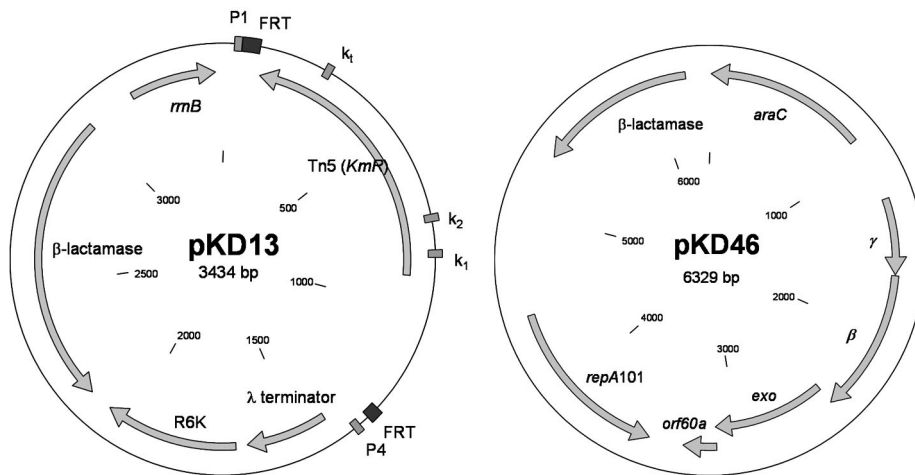
**Abb. 2.4: pCR2.1-TOPO und pCR4-TOPO.** In der Abbildung sind die beiden Vektoren pCR2.1-TOPO und pCR4-TOPO schematisch dargestellt. Die Grafiken wurden den Produktinformationen des Herstellers entnommen. Für beide Plasmide sind die wichtigsten genetischen Elemente sowie die MCS dargestellt. Zusätzlich ist durch „PCR Product“ die Integrationsstelle für ein PCR Fragment bei TA Klonierung angegeben.

kannt, weshalb auf eine Widergabe verzichtet werden muss. Insgesamt sind weitere Plasmide dieses Systems vorhanden (pKD3, pKD4 und pKD32). Da diese aber nicht genutzt werden, erfolgt keine Darstellung entsprechender Vektorkarten.

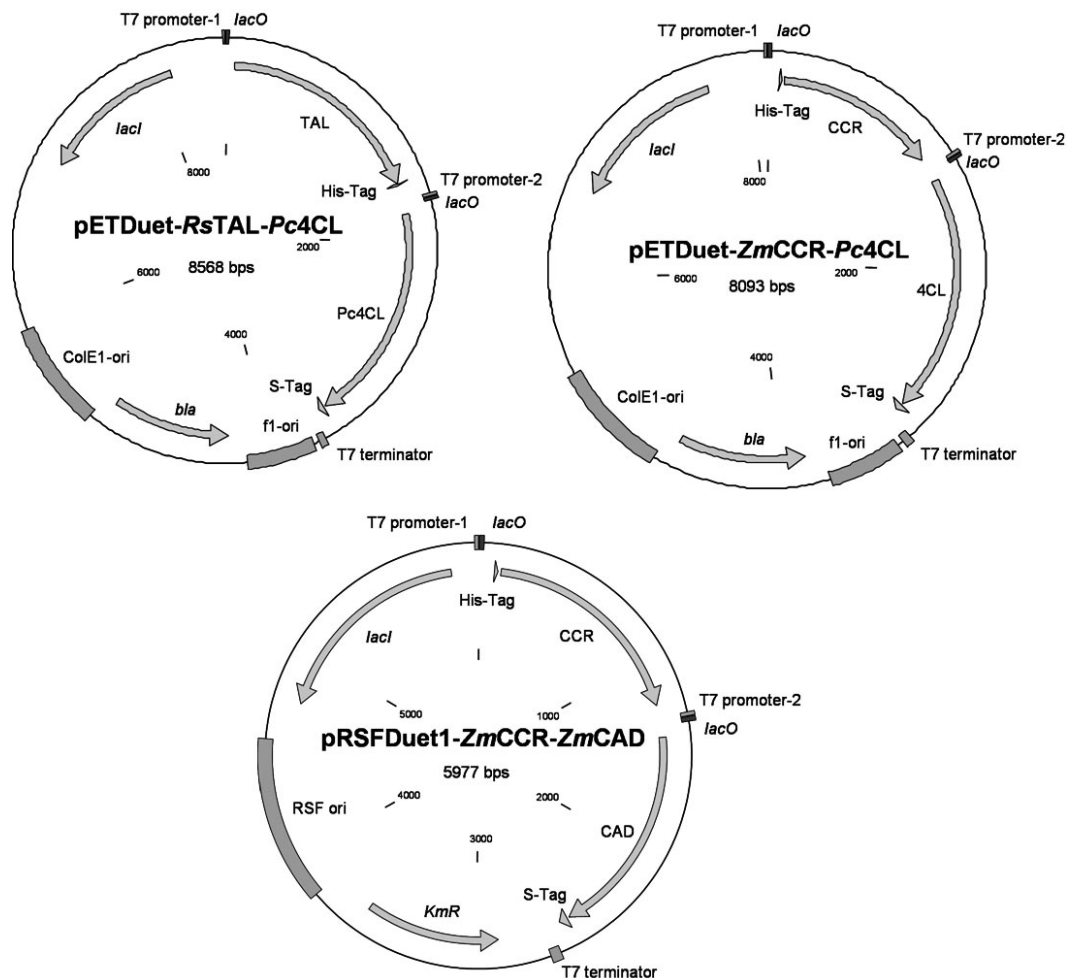
Drei weitere Vektoren, die in dieser Arbeit Anwendung finden, wurden von F. Jansen freundlicherweise zur Verfügung gestellt (siehe auch Abschnitt 2.1.7). Die Vektoren pETDuet-*RsTAL-Pc4CL*, pETDuet-*ZmCCR-Pc4CL* und pRSFDuet-*ZmCCR-ZmCAD* tragen die in Tabelle 2.3 aufgelisteten Enzyme aus *Rhodobacter sphaeroides*, *Zea mays* und *Petroselinum crispum*. In Abbildung 2.6 sind die schematischen Plasmidkarten aller Konstrukte dargestellt. Zusätzlich zu den Genen sind weitere wichtige Elemente der Vektoren, wie die Promotoren, Terminatoren, Operatoren, Replikationsursprünge (für Bakterien: ColE1-ori und RSF-ori; für Phage P1: f1-ori), Resistenzgene (*bla*,  $\beta$ -Lactamase; *KmR*, Kanamycinresistenz), der Inhibitor des *lac*-Operons (*lacI*) sowie die Gene und deren Tags vermerkt.

### 2.1.7 Open Reading Frames

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme zum Aufbau des rekombinanten Reaktionswegs entstammen verschiedenen Wirten. Die Proteine - mit dem Präfix für ihre jeweilige Herkunft versehen (Abschnitt 2.1.5) - die „Accession Number“ der Sequenz und die Quelle des verwendeten Klons sind in Tabelle 2.3 wiedergegeben.



**Abb. 2.5: pKD13 und pKD14.** In der Abbildung sind schematische Karten der Vektoren pKD13 und pKD46 mit den wichtigsten Elementen (s. Text) zu sehen. Beide Plasmide sind verwendbar für die homologe Rekombination in *E. coli*. Ein weiteres hierzu nötiges Plasmid (pCP20) ist aufgrund fehlender Sequenzinformationen nicht dargestellt.



**Abb. 2.6: pETDuet-RsTAL-Pc4CL, pETDuet-ZmCCR-Pc4CL und pRSFDuet1-ZmCCR-ZmCAD.** Die Abbildung zeigt die schematischen Karten der von F. Jansen zur Verfügung gestellten Vektoren.

Insgesamt liegen zehn verschiedene ORFs vor: 4-Amino-4-Desoxychorismat Synthase (ADCS), 4-Amino-4-Desoxychorismat Lyase (ADCL), 4-Cumarat:CoA Ligase (4CL), Tyrosin Ammoniak-Lyase (TAL), 4-Amino-4-Desoxychorismat Mutase (ADCM), 4-Amino-4-Desoxyprephenat Dehydrogenase (ADPDH), Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase (CAD), Cinnamyl CoA Reduktase (CCR) und Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL). Bei Mehrfachnennungen im Feld „Accession Number“ ist eine Zuordnung des vorhandenen Klons zu einem Eintrag der Datenbank nicht einwandfrei möglich. Hier wird auf die entsprechenden Kapitel des Ergebnis- und Diskussionsteils der Arbeit verwiesen. Die Bezeichnung des jeweiligen Gens ist in der dritten Spalte wiedergegeben. Für *RsTAL* und *ZmPAL* sind keine Genbezeichnungen in der Literatur hinterlegt. Die verwendeten ORFs wurden entweder nach Auftrag synthetisiert, entsprechende Plasmide standen zur Verfügung oder es erfolgte eine selbständige Isolation der DNA. Bei der ersten Möglichkeit (Gensynthese) sind die Sequenzen nach den Vorgaben des Datenbankeintrags durch Gensynthese (GenScript Corp., Piscataway, NJ, USA) hergestellt worden. Hierbei diente die translatierte Sequenz als Vorlage, während die Nukleinsäure der codon usage von *E. coli* angepasst und mit einem His-Tag erweitert wurde. Die Sequenz wurde als pUC57 Integrat geliefert, eine Angabe der jeweiligen Sequenzen erfolgt im Anhang (Abschnitte 6.1 und 6.2). Die *ZmPAL* wurde freundlicherweise von N. Amrhein (ETH Zürich) zur Verfügung gestellt. Die ORFs für 4CL, CCR und CAD wurden im Rahmen der Arbeiten von F. Jansen in die entsprechenden Vektoren kloniert (Abbildung 2.6) und für diese Studie bereitgestellt. Alle übrigen Klone basieren auf Eigenisolaten.

**Tab. 2.3: Enzyme, „accession numbers“, Genbezeichnungen und Bezugsquellen**

Enzyme	Acc.-Nr.	Gen	Quelle
<i>CgADCS</i>	NC_006958	<i>pabAB</i>	Eigenisolat
<i>EcADCL</i>	NC_000913	<i>pabC</i>	Eigenisolat
<i>Pc4CL</i>	X13324	<i>pc4cl1</i>	F. Jansen, RWTH Aachen
<i>RsTAL</i>	ZP 00005404	–	Gensynthese
<i>SvADCM</i>	AB116234	<i>papB</i>	Eigenisolat
<i>SvADCS</i>	AB116234 / AF262220	<i>papA</i> / <i>pabAB</i>	Eigenisolat
<i>SvADPDH</i>	AF262220	<i>cmlC</i>	Gensynthese
<i>ZmCAD</i>	Y13733	<i>cad</i>	F. Jansen, RWTH Aachen
<i>ZmCCR</i>	Y13734	<i>cnr1</i>	F. Jansen, RWTH Aachen
<i>ZmPAL</i>	AY103647 / L77912.1	–	N. Amrhein, ETH Zürich

## 2.2 Methoden

Die im Folgenden aufgeführten molekularbiologischen Arbeiten basieren grundsätzlich auf den in „Molecular Cloning“ (61) und ähnlichen Büchern beschriebenen Methoden oder den Angaben der Hersteller verwendeter Produkte.

### 2.2.1 Isolation von Plasmiden aus *E. coli*

Der Bakterienstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  dient, wie bereits oben beschrieben wurde (Abschnitt 2.1.5), als Mittel zur Amplifikation von Plasmiden. Für die Durchführung von Folgearbeiten wie Klonierungen, aber auch zur reinen Präparation der Elemente für eine Lagerung, muss die Plasmid-DNA aus *E. coli* isoliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden derartige Präparationen mit kommerziell erhältlichen Reaktionskits verschiedener Anbieter, z.B. dem NucleoSpin<sup>®</sup> Kit von Macherey-Nagel (Düren), durchgeführt. Diesen Produkten liegt die Standardtechnik der alkalischen Lyse in Verbindung mit der Aufreinigung über eine stationäre Phase (Anionenaustauscher) zu Grunde. Die Arbeiten wurden nach den Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt, daher wird auf eine Wiedergabe der Protokolle in diesem Rahmen verzichtet.

### 2.2.2 Isolation genomischer DNA

Die PCR basierte Amplifikation und spätere Klonierung verschiedener ORFs aus den Genomen von *E. coli*, *S. venezuelae* und *C. glutamicum* erfordert einen ausreichenden Zugang der DNA-Polymerase zu den jeweiligen genetischen Elementen. Eine Möglichkeit hierfür ist die Isolation genomischer DNA. Eine derartige Aufreinigung bakterieller DNA erfolgte für den gram-positiven Stamm *S. venezuelae* unter Modifikation der Angaben von A. Kutchma (36).

Die *S. venezuelae* Zellen werden in Flüssigkultur (GYM Medium, Tabelle 2.2) über zwei Tage angezogen. Durch eine Zentrifugation (20.000 x g, 20 min, 4 °C) erfolgt die Trennung der Zellen vom Medium. 50 mg des Zellpellets werden in 1 ml TE-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 20 mM EDTA) resuspendiert und für 20 sec auf hoher Stufe gevortext. Durch eine weitere Zentrifugation (16.000 x g, 4 min, RT) werden die Bakterien erneut pelletiert und der Überstand abgenommen. 1 ml eiskaltes Aceton wird zugegeben und zur Resuspendierung der Zellen durch vortexen genutzt (nur unvollständig). Die Zellen werden abermals zentrifugiert (16.000 x g, 4 min, 4 °C) und dann für 5 min auf Eis inkubiert. Das Aceton wird möglichst vollständig abgenommen und Reste für 5 min in einem Eppendorf Concentrator bei 42 °C unter Vakuum verdampft. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l TE-Puffer und 1 mg/ml Lysozym lysieren die Zellen

für 2 h bei 37 °C. Nach Ablauf der Zeit werden 75 µl 10 % SDS und 125 µl 5 M NaCl zugegeben und die Lösung durch invertieren gemischt. Ein weiterer Lyseschritt erfolgt nun durch die „freeze and thaw“ Methode. In -80 °C kaltem 96 %igem Ethanol wird das Reaktionsgefäß mit den Bakterien 3 min eingefroren und direkt darauf im Wasserbad für 3 min bei 65 °C aufgetaut. Nach kurzem Invertieren erfolgt der nächste von insgesamt drei Zyklen. Dieser Lyse schließt sich eine Inkubation für 10 min auf Eis und eine erneute Zentrifugation (16.000 x g, 5 min, RT) an. Der Überstand wird in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 15 min bei 37 °C mit 200 µg/ml RNaseA behandelt. Dem RNA Verdau folgt die Zugabe von 50 µg/ml Proteinase K und eine erneute Inkubation bei 37 °C (30 min). Nach dem Verdau von Proteinen wird die genomische DNA von *S. venezuelae* isoliert. Der Lösung werden 1 Vol. Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) zugegeben. Durch Invertieren vermischen sich die Phasen kurzzeitig. Es folgt eine Zentrifugation bei 16.000 x g für 4 min bei Raumtemperatur. Die obere, wässrige Phase kann abgenommen werden, allerdings sollte - zur Vermeidung von Verunreinigungen - nur das halbe Volumen dieser Phase überführt werden. Solange zwischen organischer und wässriger Phase noch eine sichtbare Interphase ist, muss diese Extraktion wiederholt werden (meist reichen zwei Wiederholungen). Die vereinigten wässrigen Phasen sollten in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, und dieses mit wassergesättigtem Diethylether maximal aufgefüllt und invertiert werden. Die folgende Phasentrennung wird durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (16.000 x g, 2 min) durchgeführt. Die organische Phase (oben) wird abgenommen, und durch 5 min Lagerung des offenen Gefäßes bei 60 °C erfolgt die Entfernung von Resten des Diethylether. Die Fällung der im wässrigen Rückstand enthaltenen DNA geschieht durch Zugabe von 100 % eiskaltem Ethanol (Reaktionsgefäß maximal auffüllen) für 1 h bei -20 °C. Durch Zentrifugation (16.000 x g, 4 °C, 10 min) wird die DNA pelletiert. Das Ethanol muss entfernt und neues, 70 %iges zum waschen des Pellets hinzugefügt werden. Die Zentrifugation wird wiederholt, das Ethanol vollständig abgenommen und die DNA für 5 min bei 42 °C getrocknet. In 300 µl Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 1 mM EDTA) kann die DNA gelöst, und später in die PCR eingesetzt werden.

### 2.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation definierter Nukleinsäuresequenzen und zählt zu den Standardtechniken molekularbiologischen Arbeitens (60). Auf eine grundlegende Erläuterung der Funktionsweise wird daher in diesem Rahmen verzichtet. Die Polymerase-Kettenreaktion führt zu einer Amplifikation spezifischer Fragmente definierter Länge. Lage und Größe der zu amplifizierenden Nukleinsäuresequenzen sind dabei durch



die verwendeten Oligonukleotide, die den entsprechenden Bereich einrahmen, bedingt. Ein durch diese Reaktion angereichertes Fragment kann z.B. durch Ethidiumbromid-vermittelte Fluoreszenz nach einer Agarosegelelektrophorese und UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die Oligonukleotide können einzelsträngige DNA mit komplementären Basen binden und ihr 3' Ende damit der DNA-Polymerase als Startpunkt zur Synthese eines neuen Strangs bereitstellen. Die Syntheserichtung bei der Strangsynthese ist immer  $5' \rightarrow 3'$ , bei der DNA Synthese benötigt die Polymerase immer das 3' Ende einer bereits an das „Template“ gebundenen Sequenz. Den Oligonukleotiden kann aber mehr als nur die Aufgabe des Startpunktes für die Synthese eines neuen DNA-Strangs zukommen. Durch entsprechende Variationen der Sequenz können Restriktionsstellen für Enzyme geschaffen werden, die eine spätere Ligation in Vektoren ermöglichen. Ebenso ist es dadurch möglich, „Fehler“ einzubauen und somit gezielt Mutationen im Amplifikat zu verursachen. Beide Möglichkeiten wurden für die vorliegende Arbeit genutzt und werden, insofern dies von Bedeutung ist, in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

Die typische Zusammensetzung für eine PCR Reaktion besteht aus Puffer, Magnesiumionen (oft im Puffer enthalten), dNTPs (Desoxyadenosintriphosphat, Desoxyguanosintriphosphat, Desoxycytidintriphosphat, Desoxythymidintriphosphat), zwei flankierenden Oligonukleotiden, einer DNA-Polymerase und der zu amplifizierenden Matrize. Der Reaktion können auch Additive wie Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben werden, deren Einfluss häufig eine positive Wirkung auf die Effizienz hat.

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt drei Arten von DNA-Polymerasen eingesetzt. Hauptsächlich wurde hierbei auf eine *Taq*-Enzympräparation des Institutes für Molekulare Biotechnologie zurückgegriffen. Für spezielle Anwendungen wurden GoTaq<sup>®</sup> Flexi oder *Pfu*-Polymerase (beide Promega, Mannheim) eingesetzt. Während die eigene *Taq*-Polymerase für die meisten Amplifikationen ausreichend aktiv und prozessiv ist, verlangen Matrizen mit einem hohen GC-Gehalt oder größeren Längen nach der „amplifikationsstabilen“ GoTaq. Beide *Taq*-Polymerasen besitzen allerdings eine Fehlerquote von ca.  $10^{-5}$  beim Einbau von Nukleotiden. Statistisch gesehen wird demnach pro Amplifikationszyklus alle 100.000 Basen ein falsches Nukleotid eingebaut. Während sich diese relativ geringe Fehlerquote im Normalfall, grade bei analytischen Amplifikationen, nicht negativ auswirkt, gibt es Matrizen, die aufgrund ihrer Sequenz oder Länge anfälliger für den Einbau falscher Basen sind. Hier eignet sich der Einsatz einer *Pfu*-Polymerase, bei der die Fehlerhäufigkeit nur  $10^{-6}$  beträgt. Können die beiden *Taq*-Polymerasen allerdings ca. 1 - 2 kbp/min synthetisieren, erreicht die *Pfu*-Polymerase hierbei höchstens die Hälfte. Ausserdem werden nicht die für eine TA Klonierung benötigten 3' A Überhänge (Abschnitt 2.1.6) geschaffen, da die *Pfu*-Polymerase

eine solche Aktivität nicht besitzt. Dieser eventuelle Nachteil kann aber durch eine 20 min Inkubation des Reaktionsansatzes mit einer *Taq*-Polymerase nach der eigentlichen PCR ausgeglichen werden, da somit die benötigten Überhänge angefügt werden.

**Tab. 2.4: Zusammensetzung und Temperaturprofil für PCR Ansätze mit verschiedenen Polymerasen**

Komponente	Konzentration		
	<i>Taq</i>	GoTaq	<i>Pfu</i>
PCR-Puffer	1x	1x	1x
MgCl <sub>2</sub>	s. PCR-Puffer	–	s. PCR-Puffer
MgSO <sub>4</sub>	–	1 - 4 mM	–
dNTP-Mix	0,25 - 0,5 mM	0,2 mM	0,2 mM
Primer 1	5 μM	1 μM	1 μM
Primer 2	5 μM	1 μM	1 μM
Polymerase	ca. 20 mU/μl	25 mU/μl	25 mU/μl
DMSO	0 - 10 %	0 - 10 %	–
Matrize	< 10 ng/μl	< 10 ng/μl	< 10 ng/μl
H <sub>2</sub> O	ad 20 μl	ad 25 μl	ad 50 μl
Temperatur	Verweilzeit		
	<i>Taq</i>	GoTaq	<i>Pfu</i>
94 °C	2 - 10 min	2 min	2 min
	Start eines Zyklus (25 - 35 x)		
94 °C	0,5 - 1 min	0,5 - 1 min	0,5 - 1 min
42 - 60 °C	0,5 - 1 min	0,5 - 1 min	0,5 - 1 min
72 °C	1 min/kb	1 min/kb	2 min/kb
	Ende eines Zyklus		
72 °C	5 min	5 min	5 min

In Tabelle 2.4 sind exemplarisch die Reaktionsansätze für alle drei Arten von Polymerasen angegeben. Entsprechend diesen Werten wurden die PCR Reaktionen durchgeführt. Ebenso sind hier die zu verwendenden Temperaturprofile für den Thermocycler dargestellt. Im Falle der Nutzung von *Taq*-Polymerase in Colony PCR Ansätzen wurden die initiale Denaturierungstemperatur auf 10 min verlängert, um den Aufschluss der Zellen zu gewährleisten.

## 2.2.4 Nukleinsäuregelelektrophorese

Die Analyse von Nukleinsäuren, als PCR-Produkte oder DNA-Isolate, erfordert häufig eine Abschätzung der Fragmentgrößen und Konzentrationen. Hierzu eignet sich die elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel. Vermittelt durch die Phosphatgruppen wandert die negativ geladene DNA in einem entsprechenden Puffer im

elektrischen Feld zur Anode. Diese Migration verläuft dabei gemäß der Länge einzelner Fragmente in Abhängigkeit von der Porengröße des Gels. Kurze Nukleinsäuren wandern schneller als längere, hochprozentige Gele mit 2-3 % Agarose verlangsamen längere Fragmente stärker, niedrigprozentige mit 0,8 % halten kurze Stücke weniger auf.

Die Agarose, flüssig lagerbar bei  $>60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ist in dem Puffer zu lösen, der später auch als Laufpuffer dem Elektrophoreseansatz beigefügt wird. Weitestgehend wurde mit TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) gearbeitet. Dessen Zusammensetzung als 50x Vorratslösung in Tabelle 2.5 angegeben ist.

**Tab. 2.5: 50x TAE-Puffer**

Komponente	Konzentration
Tris-Base	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	100 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Als Spannung für das angelegte elektrische Feld wurden 10 - 15 kV/cm Gellänge gewählt. Die Dauer der Elektrophorese richtet sich nach der gewünschten Laufweite der Fragmente. Bei längeren Laufzeiten empfiehlt sich die Zugabe von geringen Mengen Ethidiumbromid Lösung in den Bereich der Anode. Ähnlich der Nukleinsäure bewegt sich Ethidiumbromid im Agarosegel, allerdings in Richtung Kathode. Somit kann der noch flüssigen Agarose zugegebenes Ethidiumbromid aus dem später festen Gel „herauswandern“. Dies verhindert die Nachweismöglichkeit von Nukleinsäuren in den Bereichen des Gels, die der Anode näher sind. Die nachträgliche Zugabe von Ethidiumbromid unterbindet diesen Effekt. Die Lauffront kann dabei optisch während des Prozesses verfolgt werden, Marker und Proben sind mit Farbstoffen versehen. Der Marker enthält Bromphenolblau. Im Probenpuffer, der jedem Ansatz einzeln zugefügt wird, dient Orange G als Farbstoff. Der zur GoTaq gehörige grüne Puffer besteht aus einem Gemisch beider Farbstoffe.

### 2.2.5 Kompetente Zellen und Transformation

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich *E. coli* Zellen für Transformationen verwendet. Hierzu wurden, mit Ausnahme käuflich erworbener chemisch kompetenter Zellen (Abschnitt 2.2.9), nur elektrokompente Bakterien verwendet. Diese zeichnen sich durch eine - meist um einen Faktor 10 - höhere Kompetenz im Gegensatz zu chemisch kompetenten Zellen aus. Mit allen hierzu genutzten Stämmen (Abschnitt 2.1.5) wurde methodisch gleich verfahren.

Der jeweilige Stamm wird über Nacht bei 37 °C in 5 - 10 ml LB-Medium als Vorkultur mit den entsprechenden Antibiotika angezogen. Die Hauptkultur wird 1:10 aus der Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,0 auf einem Kulturschüttler anwachsen gelassen. Bei 4 °C und 7.000 x g für 10 min erfolgt die erste Zentrifugation. Das Pellet wird in 0,5 Vol. 10 % eiskaltem Glycerin zum Waschen resuspendiert. Die Zellen werden zwei weitere Male entsprechend abzentrifugiert und resuspendiert um abschließend, nach erneuter Zentrifugation, in 1/250 Vol. 10 % Glycerin - gemessen am Volumen der Hauptkultur - aufgenommen zu werden. Neben einer direkten Transformation können die kompetenten Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert werden. Diese Methode ist vor allem für die Herstellung größerer Mengen kompetenter Zellen geeignet (0,5 - 1 l Hauptkultur).

Transformationen von speziellen Stämmen, die z.B. schon einzelne Plasmide tragen und ergänzend ein weiteres erhalten sollen, können in kleineren Ansätzen durchgeführt werden. Hierzu wird die oben beschriebene Vorkultur 1:50 in 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und für 4 h bei 37 °C in einem Reagenzglas rotierend inkubiert. Die Kultur wird bei 4 °C schrittweise in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (11.000 rpm, 1 min). Das Pellet wird dreimal mit 1 ml 10 % eiskaltem Glycerin gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 100 µl 10% Glycerin aufgenommen. Die Zellen sind zur sofortigen Transformation bereit. Dieses Kurzprotokoll ist besonders für die Herstellung von 1 - 5 Aliquots eines Stammes oder aber der parallelen Vorbereitung weniger Aliquots mehrerer Stämme geeignet.

Zur Transformation elektrokompeter Zellen werden die Aliquots eingefrorener Präparationen für ca. 5 min auf Eis aufgetaut. Frisch präparierte Zellen sollten ebenfalls auf Eis gehalten werden, stehen aber auch für eine direkte Verwendung zur Verfügung. Den Aliquots werden 10 - 100 ng Plasmid-DNA zugegeben, mit der sie dann für 5 min auf Eis inkubieren. Währenddessen können auch schon geeignete Elektroporationsküvetten auf Eis gekühlt und 1 ml SOC-Medium bereitgestellt werden. Nach diesen 5 min können die Zellen in die Küvette überführt werden. Alle Elektrotransformationen in dieser Arbeit, sofern nicht anders angegeben, wurden in einem Eppendorf Multiporator durchgeführt. Für dieses Gerät werden die Einstellungen 2500 V und 5 ms gewählt. Nach dem Schock wird den Zellen zügig das SOC-Medium zugeführt, die Suspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 37 °C im Kulturreoler inkubiert. Aliquots der Zellen, meist zwischen 20 und 100 µl, können dann auf entsprechenden LB-Platten ausgestrichen, und über Nacht angezogen werden.

Die kommerziell erhältlichen Zellen des Mutagenese Systems (Abschnitt 2.2.9) werden durch Hitzeschock transformiert. Dabei wird ein 50 µl Aliquot der Zellen für ca. 5 min aufgetaut, mit 2 µl PCR Produkt vorsichtig gemischt und für 10 min auf Eis in-

kubiert. In einem auf 42 °C vorgeheizten Wasserbad, alternativ auch einem Heizblock, werden die Zellen für 30 sec einem Hitzeschock unterzogen und direkt danach für 1 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l warmem SOC-Medium werden die Zellen für 1 h bei 37 °C im Kulturreoller inkubiert. Auf vorgewärmten LB-Platten können dann 125  $\mu$ l eines Ansatzes ausplattiert werden.

### 2.2.6 Restriktion und Ligation von DNA

Die endonukleolytische Restriktion von PCR Amplifikaten und Plasmid-DNA wird im Rahmen dieser Arbeit immer mit Enzymen der Firmen Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt) nach deren Angaben durchgeführt. Restriktionsenzyme erkennen spezifische Bindestellen in Nukleinsäuren und spalten diese dort. Ist die verdaute Sequenz bekannt, kann dies zu diagnostischen Zwecken verwendet werden - ein meist klar zuzuordnendes Bandenmuster entsteht in der Agarosegelelektrophorese. Die Spaltung der Nukleinsäure hinterlässt entweder glatte oder überhängende Enden, von denen sich besonders letztere gut für die rekombinante Verknüpfung genetischer Elemente durch eine DNA-Ligase nutzen lässt.

Verdaute Nukleinsäuren können durch Agarosegelelektrophorese, Anionenaustauscherchromatographie oder andere Verfahren aufgereinigt sowie von unerwünschten Fragmenten abgetrennt und isoliert werden. Die Aktivität einer DNA-Ligase verknüpft zwei Fragmente, meist ein „Insert“ und ein Rückgrat mit passenden Enden, insofern diese im entsprechenden Puffer als Substrat zur Verfügung stehen. Dieser Ligationsansatz wird in kompetente Zellen transformiert, die später analysiert werden können.

Die Klonierung genetischer Elemente ist ein weitläufiges Feld, in dem viele verschiedene Techniken und Tricks angewendet werden können. Interessante Methoden und Anwendungen sind in den Ratgebern aller bekannten Hersteller von Restriktionsenzymen zu finden.

### 2.2.7 Sequenzierung von Plasmid DNA

Zur Verifizierung von Nukleinsäuresequenzen, zum Beispiel nach einer Klonierung, kann eine Sequenzierung vorgenommen werden. Hierzu wurde ein entsprechender Service des Fraunhofer Instituts für Molekulare Biotechnologie und Angewandte Ökologie (IME, Aachen) genutzt. Basierend auf dem Konzept der Kettenabbruch-Methode von F. Sanger (62) werden die Proben in einem Applied Biosystems 3700 DNA Analyser untersucht. Die Proben sind nach den allgemeinen Angaben des Sequenzierdienstes vorbereitet worden.

Die Analyse der Ergebnisse erfolgt durch die Programme Chromas Lite 2.0 (Technelysium Pty Ltd, Holland Park, QLD, Australia) und Clone Manager Professional Suite 8 (SciEd Software, Cary, NC, USA).

### 2.2.8 Synthese von Nukleinsäuren

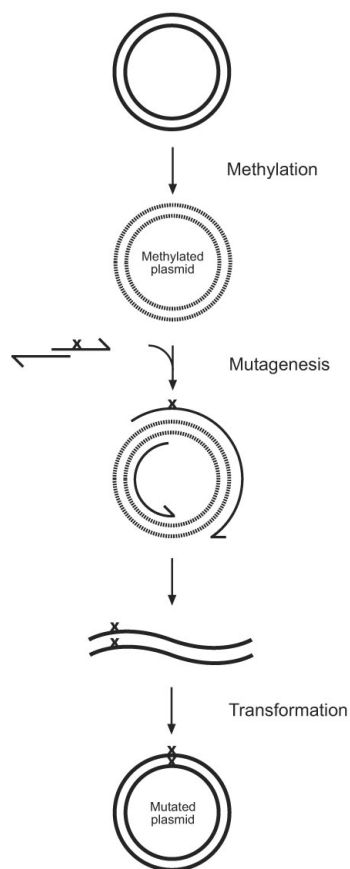
Unter den in Tabelle 2.3 angegebenen ORFs stammen die Sequenzen von TAL und ADPDH weder aus vorhandenen Klonen, noch aus eigener Isolation. Beide Nukleinsäuren wurden durch die Firma GenScript (Piscataway, NJ, USA) synthetisch hergestellt. In diesem, meist als Gensynthese bezeichneten, Verfahren werden chemisch viele Oligonukleotide in der Art der Primersynthese hergestellt und dann miteinander verknüpft. Die genaue Technik, die hier Anwendung gefunden hat, wird von GenScript nicht angegeben.

Die Vorteile einer Gensynthese liegen in der Veränderbarkeit einer DNA-Matrize. Sollen für Proteine kodierende Nukleinsäure synthetisiert werden, kann die zu Grunde liegende Sequenz durch „wobbeln“ der codon usage dem späteren Trägerorganismus angepasst werden. Desweiteren lassen sich auf diese Weise Erweiterungen wie ein His-Tag und Restriktionsschnittstellen einfach anfügen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die DNA Sequenzen von TAL und ADPDH der codon usage von *E. coli* angepasst. Beide Gene besitzen eine recht hohen GC Gehalt von über 68 % und sind damit nicht optimal auf die Expression in *E. coli* ausgerichtet (ca. 52 %). Zudem ist das molekularbiologische Arbeiten mit derart GC reichen Elementen aufgrund zunehmender Mutationsraten bei der Amplifikation in PCR und als Plasmid in *E. coli* erschwert.

### 2.2.9 Mutagenesen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die TAL (Abschnitte 2.1.7, 2.2.8 und 6.1) mehrfach gezielten Mutagenesen an der Aminosäure Histidin (Rest 89) unterzogen. Eine Möglichkeit, gerichtet Sequenzen zu verändern, ist durch geringfügige Abweichungen der Oligonukleotidsequenzen gegenüber der Matrize bei einer PCR gegeben. Insofern nur kleine Bereiche nicht komplementär zur Matrize sind und sich nicht nahe am 3' Ende befinden oder dieses sogar betreffen, stellen Sequenzveränderungen kein Problem für eine DNA-Polymerase in der PCR dar. Eine grobe Darstellung der Abläufe für das hier verwendete „GeneTailor™ Site-directed Mutagenesis System“ ist der Skizze des Herstellers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) zu entnehmen (Abbildung 2.7).



**Abb. 2.7: GeneTailor™ Mutagenesis System.** Skizze des Ablaufs der gerichteten Mutagenese durch das GeneTailor™ Mutagenesis System nach den Produktinformationen des Herstellers. Die Methode besteht aus drei Schritten: der Methylierung des Ursprungsplasmids, einer Mutagenese PCR und der Transformation in *E. coli*

Zu Beginn der Arbeiten muss das zu mutagenisierende Element, integriert in einen Vektor, durch eine DNA-Methylase unter Zugabe von S-Adenosylmethionin (SAM) für 1 h bei 37 °C methyliert werden (Tabelle 2.6). Die so behandelte DNA stellt die Matrize für eine PCR dar. Hierbei wird keine der oben beschriebenen, sondern die mitgelieferte Platinum® *Pfx* DNA Polymerase verwendet. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 2.7 zusammen mit dem Temperaturprofil aufgelistet. Nach Beendigung der PCR wird 20 - 30 % des Reaktionsansatzes durch Gelelektrophorese aufgetrennt und der Erfolg der Amplifikation getestet. Da, entsprechend der Darstellung in Abbildung 2.7, das gesamte Plasmid amplifiziert wird, entsteht meist ein recht großes Fragment. Die Ausbeute der PCR, ablesbar an der Helligkeit der Ethidiumbromid-vermittelten Fluoreszenz unter UV-Licht, ist von geringerer Bedeutung, da die Effizienz der Mutagenese nicht mit dieser korreliert.

Das mutagenisierte, lineare Plasmid, das als Reaktionsprodukt aus der PCR hervorgegangen ist, wird in einem nächsten Schritt in One-Shot® MAX Efficiency® DH5α™ -

**Tab. 2.6: Methylierung von DNA**

Komponente	Konzentration
Plasmid	100 ng
Puffer	1 x
10 x SAM	1 x
DNA-Methylase	0,25 U
H <sub>2</sub> O	ad 16 $\mu$ l

T1<sup>®</sup> chemisch transformiert (Abschnitt 2.2.5). Die verwendeten Zellen besitzen eine *McrBC* Endonuklease, die entsprechend methylierte DNA erkennt und verdaut, während die Amplifikate, denen eine Methylierung fehlt, diesem System entgehen. Transformanden enthalten damit nahezu ausschließlich mutagenisierte Plasmide. Der Ringschluss der linearen Plasmide wird durch das DNA-Reparatursystem der Bakterien durchgeführt, das einen vermeintlichen Strangbruch beheben will.

**Tab. 2.7: Mutagenese PCR: Ansatz und Temperaturprofil**

Komponente	Konzentration	Temperatur	Verweilzeit
10 x <i>Pfx</i> Amplification Puffer	1 x	94 °C	2 min
dNTP	0,3 mM	Start eines Zyklus (20 x)	
MgSO <sub>4</sub>	1 mM	94 °C	0,5 min
Oligonukleotide 1	0,3 $\mu$ M	55 °C	0,5 min
Oligonukleotide 2	0,3 $\mu$ M	68 °C	1 min/kb
Methylierte DNA	0,25 - 0,6 ng/ $\mu$ l	Ende eines Zyklus	
Platinum <sup>®</sup> <i>Pfx</i> DNA-Polymerase	1,0 - 2,5 U/ $\mu$ l	68 °C	10 min
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l		

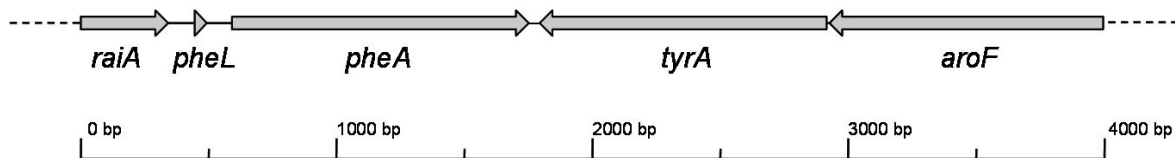
In der vorliegenden Arbeit wurden die Oligonukleotide der Kategorie TAL Mutagenese aus Tabelle 2.1 verwendet. Die Primer binden gemäß Abbildung 2.7, wobei die ersten drei Basen im sense (forward) Primer die Mutation von CAT (His) zu TCT (Ser), ACT (Thr), TAT (Tyr), CCT (Pro), AAT (Asn), GAT (Asp), CAA (Gln), GAA (Glu) und ATG (Met) verursachen sollen. Die resultierenden Klone der *E. coli* Zellen müssen isoliert und durch Sequenzierung kontrolliert werden, um die Mutation zu verifizieren.

### 2.2.10 Genomische Deletionen in *E. coli*

Ein wichtiger Schritt in der Biosynthese von pACiAlk ist die Umsetzung von pAPA zu pACiA, um Chloramphenicol- und Phenylpropanoidbiosynthese zu verknüpfen. Diese Reaktion soll durch die Enzyme TAL oder PAL *in vivo* durchgeführt werden. Um den Zugang dieser Enzyme zu ihren natürlichen Substraten Tyrosin bzw. Phenylalanin und Tyrosin einzuschränken, ist es nötig, die Zellen auxotroph für die Biosynthese



dieser beiden Aminosäuren zu machen. Hierzu bietet sich in *E. coli* die homologe Rekombination mit der damit verbundenen Deletion an. Basierend auf den Angaben von K.A. Datsenko (16) sowie den in Stuttgart am Institut für Mikrobiologie bei Herrn Prof. Sprenger durchgeführten Arbeiten, stellt folgendes Protokoll eine Anleitung zur gezielten Deletion genomischer Sequenzen dar. Die Umgebung der Gene *pheLA* und *tyrA* ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Die benachbarte Lage der Gene ermöglicht die gemeinsame Deletion.



**Abb. 2.8:** Die genomische Umgebung von *pheLA* und *tyrA*. In der Abbildung sind die Gene *pheA* (mit Attenuator *pheL*) und *tyrA* dargestellt. Zusätzlich sind die flankierenden Gene *raiA* und *aroF* angegeben.

Das System beruht auf der Verwendung drei verschiedener Plasmide. Zu Beginn des Vorgangs ist es notwendig, ein Fragment herzustellen, das einen geeigneten Selektionsmarker trägt und an beiden Enden 50 bp homologe Regionen zu den die Zielsequenz flankierenden Bereichen (hier *raiA* und *aroF*) hat. Zur Amplifikation eines solchen Fragmentes durch PCR sieht die Methode die Plasmide pKD3 (Chloramphenicolresistenz), pKD4 (Kanamycinresistenz) und pKD13 (Kanamycinresistenz) als Matrizen vor. Während pKD3 und 4 für Deletionen und Integrationen neuer Elemente dienen können, ist die Sequenz von pKD13 so ausgelegt, dass nach Integration und folgender Excision des Markers keine für eine Expression benötigte Ribosomenbindungsstelle (RBS) übrig bleibt. Somit eignet sich pKD13 vor allem für Deletionen. Zusätzlich trägt pKD13 noch die Sequenz tL3, eigentlich eine Terminationsregion, die aber auch für einen kleinen ORF kodiert. Obwohl dessen Rolle als unklar gilt, zeigt der ORF positive Effekte auf die Integration. In Abbildung 2.9 sind die drei zu amplifizierenden Bereiche dargestellt. Es wurde in diesem Rahmen ausschließlich mit pKD13 gearbeitet. Die Primer P1 und P4 der Grafik sind die Basis für pKD13-P1-*pheLA* und pKD13-P4-*tyrA* (s. Tabelle 2.1). Ebenso finden sich die Oligonukleotide  $k_t$ ,  $k_2$  und  $k_1$  aus der Primertabelle wieder. Weitere wichtige Regionen sind die FRT-sites (FLP-recombinase target), die im späteren Verlauf von einer FLP-Rekombinase erkannt und unter Excision des Integrates verknüpft werden.

Die Kanamycin Kasette von pKD13 wird mit den Primern pKD13-P1-*pheLA* und pKD13-P4-*tyrA* unter den in Tabelle 2.8 angegebenen Bedingungen amplifiziert. Das Produkt der PCR - 1423 bp sind es in diesem Fall - wird durch eine Agarosegelelektrophorese vereinzelt und durch ein Gelextraktionskit aufgereinigt.

Tab. 2.8: Amplifikation der pKD13 Kanamycin Kasette

Komponente	Konzentration	Temperatur	Verweilzeit
Puffer	1 x	95 °C	6 min
dNTP	0,5 mM	Start eines Zyklus (30 x)	
DMSO	6 %	95 °C	0,75 min
Oligonukleotide 1	2 $\mu$ M	45 °C	0,3 min
Oligonukleotide 2	2 $\mu$ M	72 °C	1 min
DNA	0,5 ng/ $\mu$ l	Ende eines Zyklus	
DNA-Polymerase	0,06 U/ $\mu$ l	72 °C	3 min
H <sub>2</sub> O	ad 100 $\mu$ l		

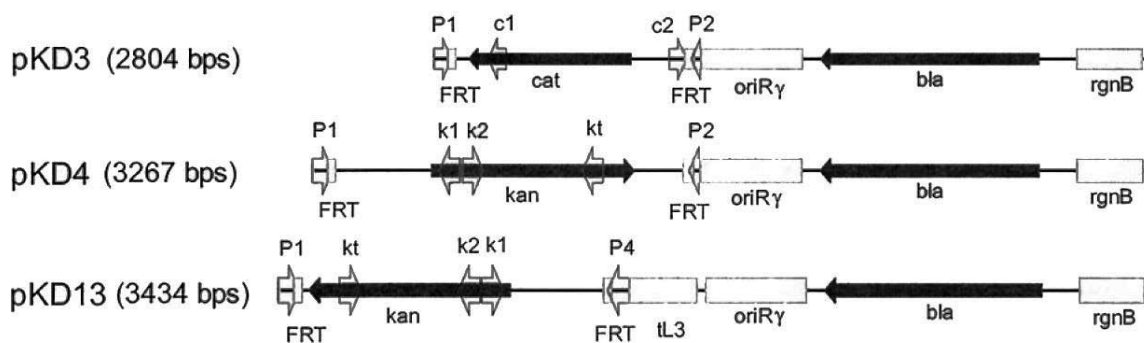


Abb. 2.9: Selektionsmarker der Plasmide pKD3, 4 und 13. Dargestellt sind die Bereiche der Plasmide pKD3, 4 und 13 die durch die Primersequenzen P1, P2 und P4 amplifiziert werden können sowie weitere Elemente und Primerbindungsstellen der Vektoren.

Nach der PCR erfolgt ein *DpnI* Verdau, bei dem eventuell übertragene Reste des Ursprungsplasmides abgebaut werden. *DpnI* schneidet die Sequenz GA<sup>m</sup>TC. Zu 30  $\mu$ l Eluat werden 1  $\mu$ l Enzym (10 U/ $\mu$ l), 5  $\mu$ l 10 x Puffer und 14  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gegeben. Die Reaktion erfolgt für 1 h bei 37 °C.

Dem Verdau durch *DpnI* folgt das Entsalzen durch eine Phenol-Chloroform Extraktion mit ethanolischer Fällung. Der Restriktionsansatz wird dazu auf 200  $\mu$ l aufgefüllt. 200  $\mu$ l Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) Gemisch werden zugegeben, die Lösung kurz geschüttelt und dann 3 min bei RT und 13.000 x g zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wird vollständig abgenommen und mit 3 Vol. 96 % eiskaltem Ethanol und 0,1 Vol. Kaliumacetat (3 M, pH 5,3) vermischt. Es folgt eine erneute Zentrifugation bei RT und 13.000 x g für 15 min. Das entstandene Pellet wird in 70 % Ethanol gewaschen (13.000 x g, 15 min, RT) und später in einem Eppendorf Concentrator für 3 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wird in 30  $\mu$ l Wasser resuspendiert.

In den vorigen Absätzen wurde die Präparation des Integrates - einem PCR Produkt aus Selektionsmarker und dem Ziel homologen Enden - beschrieben. Dieses Konstrukt

(dsDNA, linear) muss in den Stamm der später die Deletion tragen soll transformiert werden. Im vorliegenden Fall ist dies *E. coli* ER2566. Allerdings müssen die verwendeten Zellen zu diesem Zeitpunkt ein Plasmid enthalten, das Teile des  $\lambda$ -Phagen Rekombinationssystems beinhaltet. Hierfür eignet sich pKD46 (Abbildung 2.5). Das Plasmid trägt die durch einen Arabinose-induzierten Promotor ( $P_{araB}$ ) regulierten Gene des „Red“ Systems:  $\gamma$ ,  $\beta$  und *exo*. Deren Genprodukte übernehmen verschiedene Aufgaben beim Rekombinationsprozess. Gam inhibiert das *E. coli* Protein RecBCD (auch Exonuclease V genannt) und ermöglicht damit linearer DNA, dem normalen Verdau im Cytoplasma zu entgehen. Bet and Exo interagieren mit den Enden der linearen DNA und vermitteln die Rekombination. Das *araC* Genprodukt ist ein Repressor, der aber bei Vorhandensein von Arabinose zum Aktivator wird und so die zeitlich definierte Expression von  $\gamma$ ,  $\beta$  und *exo* ermöglicht. Das Plasmid pKD46 ist, vermittelt durch *repA101*, temperatursensitiv.

Zur Transformation von *E. coli* ER2566 pKD46 werden die Zellen über Nacht in 5 ml LB mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin bei 28 °C angezogen. Die Hauptkultur wird hieraus 1:50 in LB mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin und 15 mM Arabinose angeimpft. Stämme, die defizient für den Abbau dieses Zuckers sind, können mit 10 mM Arabinose inkubiert werden. Die Arabinose führt zur Expression des „Red“ Systems. Nach einer 4 h Kultivierung bei 28 °C auf einem Kulturröllern erfolgt gemäß der Beschreibung in Abschnitt 2.2.5 die Herstellung eines kompetenten Zustandes. Allerdings musste in diesem Fall auf eine Lagerung bei -80 °C verzichtet werden. Neben der eigentlichen Transformation war es wichtig, dass die Proteine des „Red“ Systems aktiv bleiben. Da diese bei -80 °C (G. Sprenger, persönliche Mitteilung) inaktiviert werden, war eine direkte Verwendung der Zellen angebracht.

Die Transformation wird mit 3  $\mu\text{l}$  des aufgereinigten PCR Produktes durchgeführt. Bei den in Stuttgart durchgeführten Arbeiten wurde eine 2 mm Elektroporationskuvette verwendet und als Feldstärke 25  $\mu\text{F}$  und 1,8 kV angelegt. Die Zellen wurden hier in 1 ml LB Medium für 2 h bei 28 °C schüttelnd regeneriert. Ein Teil der Zellen wird direkt auf LB Platten mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin ausgestrichen (500  $\mu\text{l}$ ) und bei 37 °C über Nacht angezogen. Das Integrat vermittelt die notwendige Kanamycinresistenz. Der Rest des Ansatzes wird über Nacht bei 28 °C weiter schüttelnd inkubiert und kann bei Bedarf später noch ausplattiert werden.

Eine Kontrolle auf Integration wird mit den entstandenen Klonen durchgeführt. Diese soll falsch-positive Ergebnisse aufdecken, die eventuell durch verbleibende pKD13 DNA entstanden sein könnten. Hierzu wird eine Kolonie PCR durchgeführt (Abschnitt 2.2.3). Eine geeignete Negativkontrolle, z.B. *E. coli* ER2566 pKD46, sollte parallel überprüft werden. Die PCR kann nach den Bedingungen in Tabelle 2.9 durchgeführt

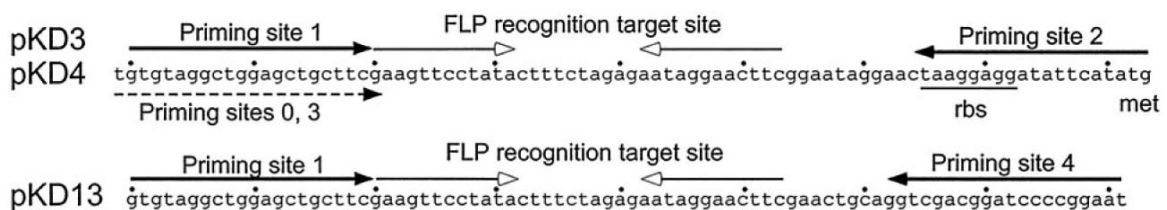
werden. Bei bestehender Integration sollte ein 800 bp Fragment entstehen, während die Negativkontrolle keine Bindungsstelle für pKD13-k<sub>1</sub> besitzt.

**Tab. 2.9: Kontrolle auf Integration der Kanamycinresistenz**

Komponente	Konzentration	Temperatur	Verweilzeit
Puffer	1 x	95 °C	6 min
dNTP	0,5 mM	Start eines Zyklus (30 x)	
DMSO	6 %	95 °C	0,75 min
pKD13-k <sub>1</sub>	2 μM	53 °C	0,25 min
<i>aroF</i> -rev	2 μM	72 °C	0,83 min
DNA-Polymerase	0,06 U/μl	Ende eines Zyklus	
H <sub>2</sub> O	ad 25 μl	72 °C	3 min

Der Nachweis der Integration der Kanamycin-Kassette und der damit verbundenen Excision der Gene *pheLA* und *tyrA* muss durch physiologische Tests ergänzt werden. Erst ein fehlendes Wachstum bei Mangel an Tyrosin und Phenylalanin kann als ausreichendes Indiz für die homologe Rekombination - und damit für Auxotrophie - gelten. Diese Versuche können beispielsweise auf M9 Medium (Abschnitt 2.1.5) mit 0,2 % Glukose und wahlweise 20 μg/ml Phenylalanin und Tyrosin durchgeführt werden. Zusätzlich sollten die Zellen auf LB Medium mit Kanamycin oder Ampicillin ausgestrichen werden. Findet Wachstum auf Ampicillin statt, ist pKD46 noch in den Zellen vorhanden und durch eine Inkubation bei 42 °C endgültig zu entfernen.

Klone mit Kanamycin-Kassette und ohne pKD46 werden für eine Elektrotransformation (Abschnitt 2.2.5) mit ca. 100 ng pCP20 vorbereitet. Die zweistündige Regenerationsphase und das Wachstum auf LB-Amp Platten findet bei 30 °C statt. Die entstandenen Klone werden erneut auf einer LB Ampicillin Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Plasmid pCP20 (wie pKD46 ist dieses temperatursensitiv) kodiert unter anderem eine FLP Rekombinase die konstitutiv exprimiert wird. Diese erkennt die FRT Stellen (Abbildung 2.9) und rekombiniert dort das Integrat heraus. Zurück bleibt ein entsprechender „Fußabdruck“ (Abbildung 2.10).



**Abb. 2.10: Excisionsprodukte nach FLP-Rekombination.** Dargestellt ist der verbleibende Rest des Integrates nach FLP vermittelter Excision.

Nach der erfolgten Excision wird das Plasmid durch Inkubation auf LB Platten oh-

ne Antibiotika bei 42 °C aus den Zellen entfernt. Im Gegensatz zu pKD46 ist pCP20 weniger empfindlich gegen die Erhöhung der Wachstumstemperatur. Der Plasmidverlust dauert dementsprechend länger. Die Zellen sollten öfter auf LB und von dort auf LB-Kan und LB-Amp überimpft werden. Zeigt sich kein Wachstum bei Anwesenheit der Antibiotika, ist der gesamte Prozess abgeschlossen. Zur Sicherheit kann mit einem Primersystem wie *raiA-fw-01* und *tyrA-aroF-rev-01* eine PCR durchgeführt werden. In diesem Fall können drei mögliche Produkte entstehen: ohne Deletion, 3410 bp; Deletion und Integrat, 2262; Vollständige Deletion, 1040 bp.

**Tab. 2.10: Kolonie PCR auf Deletion der Gene *pheLA* und *tyrA***

Komponente	Konzentration	Temperatur	Verweilzeit
Puffer	1 x	95 °C	10 min
dNTP	0,5 mM	Start eines Zyklus (30 x)	
DMSO	6 %	95 °C	0,5 min
<i>raiA-fw-01</i>	2 $\mu$ M	53 °C	0,5 min
<i>tyrA-aroF-rev-01</i>	2 $\mu$ M	72 °C	0,75 min
DNA-Polymerase	0,06 U/ $\mu$ l	Ende eines Zyklus	
H <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l	72 °C	5 min

### 2.2.11 Expressionsversuche

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine größere Anzahl von ORFs kloniert. Das Ziel hierbei ist deren funktionelle Expression als vollständiger Reaktionsweg. Hierzu ist es sinnvoll, für einzelne Konstrukte sowohl die reine Expression als auch ihre *in vitro* und *in vivo* Aktivität zu testen. Im Fall von Mehrfachkonstrukten handelt es sich vor allem um Untersuchungen der *in vivo* Funktionalität einzelner Reaktionssequenzen.

Die jeweiligen Stämme werden als Vorkultur mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht in LB Medium angezogen. Aus dieser Vorkultur wird eine Hauptkultur im gewünschten Medium inokuliert, wobei sich LB oder M9 eignen. Für das Minimalmedium empfiehlt sich neben der C-Quelle Glycerin in der ersten Wachstumsphase 1 % Glukose zuzugeben. Desweiteren können die entsprechenden Antibiotika und Aminosäuren (20  $\mu$ g/ml Phenylalanin und Tyrosin für *E. coli* ER2566  $\Delta$ *pheLATyrA*) eingesetzt werden. Die Hauptkultur kann je nach Bedarf zwischen 1:20 und 1:100 angeimpft werden und sollte bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,6 - 1,0 bei 37 °C schüttelnd anwachsen.

Der Wachstumsphase folgt die Induktion der Proteinexpression durch 1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Die Proteininduktion kann zwischen 2 und 3 h dauern. Mit Ausnahme der Expression von TAL zur späteren Aufreinigung (16 °C) wird

eine Temperatur von 37 °C beibehalten. Die mit Glukose supplementierten Zellen in M9 Medium müssen vor der Induktion in ein Medium ohne diesen Zucker überführt werden, da ansonsten keine Proteinexpression der Transgene bei den gewählten Promotoren stattfinden kann.

Findet die Expression zur *in vitro* Analyse des jeweiligen Proteins statt, also der Messung einer Aktivität, wird gemäß Abschnitt 2.2.12 weiter verfahren. Ist es Ziel, die Expression des Konstruktes über einen längeren Zeitraum zu verfolgen, oder soll die Funktionalität einzelner Enzyme und kombinierter Reaktionen bestimmt werden, beginnt der eigentliche Teil des Versuchs mit der Probennahme  $t_0$ . Es kann dabei mit Medium und/oder Zellen analytisch gearbeitet werden. Entsprechend den Beschreibungen im Ergebnis- und Diskussionsteil kann je nach Versuchsaufbau die Zugabe eines Substrates erfolgen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten werden weitere Proben gezogen, bei denen das Medium zur Analyse ausgewählter Produkte und die Zellen zur Proteinextraktion genutzt werden können. Medium und Zellen werden durch eine ausreichend starke Zentrifugation bei 4 °C voneinander getrennt (z.B. 17.000 x g, 10 min).

### 2.2.12 Proteinextraktion und Aufreinigung

Die in Abschnitt 2.2.11 geernteten Zellen können auf mehrere Arten aufgearbeitet werden. Ist das Ziel, alle Proteine - inklusive der in inclusion bodies befindlichen - nachzuweisen, wird das Zellpellet in 1x Lämmli-Puffer (SDS-PAGE-Probenpuffer, Tabelle 2.11) resuspendiert und für 10 min in Heizblock oder Wasserbad bei 100 °C lysiert. Die Kombination aus Hitze,  $\beta$ -Mercaptoethanol und SDS denaturiert alle Proteine und löst deren Aggregate. Das SDS lagert sich dann in einem konstanten Masse/Ladungsverhältniss an die Struktur an, wobei die negativ geladenen Sulfatgruppen nach aussen gerichtet sind. Dadurch wird in einer späteren Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.13) die Eigenladung der Proteine effektiv überdeckt.

**Tab. 2.11: Lämmli- / SDS-PAGE-Probenpuffer**

Komponente	Konzentration
Tris-HCl, pH 6,8	62,5 mM
Glycerin	30 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	10 % (v/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)

Zur Extraktion löslicher Proteine und der Vorbereitung einer Aufreinigung werden die Zellpellets in einem nicht reduzierenden Probenpuffer resuspendiert. Generell wurde

in der vorliegenden Arbeit dazu der in Tabelle 2.12 angegebene Puffer verwendet. Sollen die löslichen Proteine durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert werden, wurde gemäß den obigen Beschreibungen verfahren. Den Proteinen wird 1 x Lämmli-puffer zugesetzt und dann 10 min gekocht.

**Tab. 2.12: Proteinextraktions- und Aufreinigungspuffer**

Komponente	Konzentration		
	Extraktionspuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
Tris-HCl, pH 8,5	10 mM	10 mM	10 mM
Glycerin	10 % (v/v)	–	–
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM
Imidazol	10 mM	30 mM	300 mM

Die Aufreinigung der Proteine in dieser Arbeit erfolgte ausschließlich durch immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC). Hierbei wird die Interaktion eines 6xHis-Tags mit einer Ni<sup>2+</sup>-NTA Matrix genutzt. Unter gegebenen Bedingungen bindet der Tag an die Matrix; somit lässt sich ein Zielprotein aus einer Lösung isolieren. Durch gezielte Veränderung der Bedingungen (pH Absenkung) oder die kompetitive Verdrängung der Aminosäurereste durch Imidazol lässt sich das Protein eluieren. Auf die Details einer solchen Aufreinigung und die möglichen Veränderungen soll hier nicht weiter eingegangen werden.

Bei einer Aufarbeitung von 1 l Kultur empfiehlt sich, ca. 2 ml Matrix (meist 4 ml Matrixlösung) in eine entsprechende Säule zu packen und diese sedimentieren zu lassen. Das Zellpellet wird in 20 ml Extraktionspuffer resuspendiert und danach auf Eis lysiert. Die Zellen können entweder durch 1 mg/ml Lysozym unter Zugabe von ca. 10 - 20 U/ml Benzonase Reinheitsgrad II (Merck, Darmstadt) für 30 min bei Raumtemperatur oder aber durch Ultraschall aufgeschlossen werden. Bei der Ultraschallbehandlung wird die Bakteriensuspension in ein kleines Becherglas gegeben und auf Eis gelagert. Ein Ultraschallgenerator mit Sonde (Labsonic U, 5 mm Sonde, Biotech Braun GmbH, Melsungen) wird tief in die Lösung eingetaucht und es werden 15 Zyklen auf Stufe Low bei 100 V mit einem Impuls von 0,5 sec<sup>-1</sup> ausgeführt. Jede Impulsphase dauert 30 sec und wird von einer 15 sec Ruhephase gefolgt. Nach der Lyse werden die Zelltrümmer bei 17.000 x g und 4 °C für 10 min von den Proteinen abgetrennt und die Proteinlösung in ein neues Gefäß überführt. Die vorbereitete Säule (mit Matrix) wird durch Zugabe von 5 - 10 Vol. Extraktionspuffer äquilibriert und mit der Proteinlösung beladen. Es folgt ein Waschschrift mit 3 x 2 ml Waschpuffer (Tabelle 2.12). Die Elution erfolgt in 4 x 2 ml Schritten mit Elutionspuffer. Nach einer Bestimmung der Proteinkonzentration durch Bradfordreagenz (12) kann eine 50 %-ige Glycerinkonzentration eingestellt

werden. Dadurch sind die meisten Proteine bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  längere Zeit haltbar. Eine Präparation von Proben für SDS-PAGE und Western Blot ist anhand obiger Angaben möglich. Die Matrix kann mit 20 % Ethanol gespült und gelagert werden.

### 2.2.13 Protein Gelelektrophorese und Western Blot

Die Analyse einer Expressionsstudie oder der Reinheit einer Affinitätschromatographie verlangt eine elektrophoretische Auftrennung. Proteine werden im Allgemeinen in SDS-Polyacrylamidgelen (PAGE) in einem elektrischen Feld, recht ähnlich zu Nukleinsäuren im Agarosegel, aufgetrennt. Die SDS-PAGE ist eine reduzierende Gelelektrophorese. Wie oben bereits beschrieben (Abschnitt 2.2.12) sind die denaturierten Proteine durch die Behandlung mit Lämmli-Puffer in einem konstanten Verhältnis von SDS abgeschirmt, mit negativen Ladungen versehen und wandern daher in einem elektrischen Feld zur Anode.

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgt meistens diskontinuierlich. In einer ersten Phase, meist bei rund 80 V, durchlaufen die Proben ein Sammelgel. Durch das Laufverhalten der Ionen des Sammelgels bildet sich eine scharfe Proteinbande. Das Trenngel kann schneller durchlaufen werden (100 - 120 V). Hierbei sind die Bedingungen im Gel so gewählt, dass sich die Proteine der Größe nach auftrennen. Die Zusammensetzungen von Trenn- und Sammelgel sind in Tabelle 2.13 aufgelistet. Hier ist exemplarisch ein 12 % Trenngel dargestellt, prinzipiell sind aber Konzentrationen von 8 - 15 % möglich. Die angegebenen Mengen reichen für zwei Gele. Der nötige Laufpuffer (Tris-Glycin-Puffer) ist in Tabelle 2.14 angegeben. Als Referenz wird bei der SDS-PAGE Prestained Marker verwendet (Abschnitt 2.1.2).

**Tab. 2.13: SDS-PAGE: Trenn- und Sammelgel**

12 % Trenngel		Sammelgel	
H <sub>2</sub> O	3 ml	H <sub>2</sub> O	1,4 ml
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30*	4 ml	Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30*	300 $\mu\text{l}$
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	1 M Tris-HCl, pH 6,8	250 $\mu\text{l}$
10 % SDS	100 $\mu\text{l}$	10 % SDS	20 $\mu\text{l}$
10 % APS	100 $\mu\text{l}$	10 % APS	20 $\mu\text{l}$
TEMED	4 $\mu\text{l}$	TEMED	2 $\mu\text{l}$
*Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30: 37,5:1 Acrylamid : Bisacrylamidstammlösung			

Hat die Lauffront der Elektrophorese das untere Ende des Gels erreicht, kann entweder eine Anfärbung aller Proteine durch eine Coomassie Färbelösung, gefolgt von einer späteren Entfärbung aller nicht-protein Bestandteile, oder ein spezifischer Nachweis bestimmter Epitope durch Western Blot erfolgen. Im ersten Fall wird das gesamte



Gel bis zu einer ausreichenden Färbung (20 min) in geeigneter Coomassie Lösung inkubiert und danach kurz unter Leitungswasser von überschüssiger Lösung befreit. Das Gel kann dann entfärbt werden, die blaue Färbung der Proteine bleibt dabei erhalten.

**Tab. 2.14: Tris-Glycin-SDS-PAGE- und Blottingpuffer**

Tris-Glycin-Puffer		Blottingpuffer		PBS-T	
Tris-Base	12,5 mM	Tris-HCl, pH 8,3	25 mM	NaCl	8 g/l
Glycin	96 mM	Glycin	192 mM	KCl	0,2 g/l
SDS	0,5 %	Methanol	20 %	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g/l
				KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g/l
				Tween 20	2 % (v/v)

Beim Western Blot wird das Gel in Kontakt mit einer Nitrocellulose Membran gebracht. In einem „Sandwich“ werden beide von Whatmanpapier und Schwämmen eingerahmt und in einem gekühlten Tank bei 100 V für 1 h die Proteine in Blottingpuffer aus dem Gel auf die Membran übertragen. Hierbei wird erneut die SDS-vermittelte Ladung der Proteine ausgenutzt. Der sogenannte Western Blot wird dann für 30 min mit einer 3 - 4 %igen Milchpulverlösung in PBS-T (2.14) schüttelnd geblockt. Hierdurch werden unspezifische Bindungen der später eingesetzten Antikörper mit der Membran verhindert. Nach gründlichem Waschen mit PBS-T wird ein primärer Antikörper (Maus Anti-His oder Anti-S Antikörper) zugegeben. Es folgt eine 1,5 h Inkubation. Nach erneutem waschen mit PBS-T wird ein sekundärer Antikörper (Ziege-anti-Maus Antikörper mit alkalischer Phosphatase) entsprechend zugegeben. Eine gleichzeitige Inkubation von bis zu zwei primären und einem sekundären Antikörper ist möglich. Nach der Inkubation wird mit AP-Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH9,6; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen. 100 µl NBT/BCIP Mix werden in 10 ml AP-Puffer gelöst und im Dunklen auf die Membran gegeben. Diese wird solange inkubiert, bis eine ausreichende starke Färbung der Banden vorliegt.

### 2.2.14 Aktivitätstests

Von den Proteinen, die entsprechend Abschnitt 2.2.12 aufgereinigt wurden, erfolgten Aktivitätstest für TAL, PAL und CCR. Alle Versuche wurden dabei in einem Photometer durchgeführt.

Die Bestimmung der TAL Aktivität erfolgte durch Messung der Desaminierung von Tyrosin zu pCA oder pAPA zu pACiA . Hierbei wird als Reaktionsprodukt die Säure photometrisch bei 35 °C und 310 nm in Quartzküvetten erfasst. Als Puffer wird 150 mM Bis-Tris-Propan (pH 8,5) eingesetzt. pCA wird in einem Bereich von 5 µM bis 1,5

mM eingesetzt, pAPA von 1 mM bis 10 mM. 20 - 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TAL Enzym werden für die Messung verwendet (37). Die Reaktion wird maximal 30 min erfasst. Anhand des linearen Bereichs lässt sich eine spezifische Aktivität ermitteln. Um diese zu berechnen, muss die Absorptionsänderung, das Reaktionsvolumen, die Proteinkonzentration, die Schichtdicke der Küvette und der jeweilige molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) verrechnet werden. Die Koeffizienten für pCA und pACiA sind  $16.300 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und  $11.800 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Die Berechnung spezifischer Aktivitäten erfolgt nach der unten angegebenen Formel. Abs steht hierbei für Absorption, t für einen Zeitpunkt, Prot für Proteinmenge. Werden solche Werte über mehrere Substratkonzentrationen ermittelt, lassen sich nach gängigen Methoden (Lineweaver-Burk, Woolf, Eddie-Hoffstee) zum Beispiel  $K_m$ ,  $v_{\text{max}}$  und  $k_{\text{cat}}$  Werte ermitteln.

$$\text{nmol Produkt min}^{-1} \text{ mg}^{-1} = \frac{(\text{Abs}_{t_2} - \text{Abs}_{t_1}) \cdot \epsilon \cdot \text{Vol (l)} \cdot 1.000}{t_{2-1} \cdot \text{Prot } (\mu\text{g})}$$

Die Messung der PAL Aktivität erfolgt ebenfalls für die photometrische Detektion der entstehenden Säuren. Es wird allerdings ein 0,2 mM Natrium-Borat Puffer bei pH 8,7 und 40 °C verwendet (58). Die Substrate werden bis zu 1 mM Tyrosin und Phenylalanin oder 10 mM pAPA eingesetzt und 20 - 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PAL Enzym inkubiert. Zur besseren Erfassung von CiA, dem Produkt der Phenylalanin Desaminierung, erfolgt die Messung der PAL Aktivität bei 275 nm. Der molare Extinktionskoeffizient von CiA ist  $224.000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Eine Umsetzung von pCA und pACiA zu den entsprechenden Thioester sowie deren Aufreinigung wurde im Rahmen der Arbeiten von F. Jansen durchgeführt. Die folgenden, nach K. Knobloch (32) modifizierten, Reaktionsbedingungen für das Enzym 4CL wurden dabei angewendet: 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8), 350  $\mu\text{M}$  CoA, 100  $\mu\text{M}$  pACiA, 30 °C, 2,5 - 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Enzym. Die Reaktion wurde bei 360 nm im ELISA Reader erfasst.

Die Aktivität der CCR für pACi-CoA wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit gemessen. Hierzu wurden 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CCR mit 0,1 mM NADPH und verschiedenen Konzentrationen pACi-CoA bei 30 °C in Na/K-Phosphatpuffer (pH 6,25) inkubiert. Die Bildung des Aldehyds ist photometrisch bei 260 nm messbar (40, 41).

### 2.2.15 High Performance Liquid Chromatography

Die Analyse der Kulturüberstände aus Abschnitt 2.2.11 erfordert eine sensitive Methode. Diese Voraussetzung wird von der „high performance liquid chromatography“ (HPLC) erfüllt. Für die vorliegende Arbeit wurden mehrere Geräte (Abschnitt 2.1.3)

genutzt. Dabei fand stets derselbe Typ von Säule und Matrix Verwendung, eine Li-Chrospher<sup>®</sup> RP-18 Säule mit einer Porengröße von 100 Å, 5 µm Partikelgröße und 250 x 4 mm Dimension von Merck (Darmstadt). Alle verwendeten Geräte wiesen identische Retentionszeiten für die gemessenen Referenzsubstanzen auf. Unterschiedlich ist nur die Detektion. Während die Beckman HPLCs mit UV/Vis-Detektoren ausgerüstet sind, misst das Agilent System mit einem Diodenarray Detektor.

Die verwendete Methode basiert auf einem Gradienten aus (A) 0,1 M Natrium-Acetat (pH 4,75) und (B) Methanol. Der Gradient besteht aus folgenden Stufen: 0 - 5 min, 0 % B; 5 - 15 min, 50 % B; 15 - 20 min, 100 % B; 20 - 22 min, 100 % B; 22 - 30 min, 0 % B; 30 - 32 min, 0 % B. Insofern nicht anders angegeben, werden 50 µl Probe injiziert. Gemessen wird bei Raumtemperatur. Die Proben werden durch Zentrifugation von Zellen und Schwebstoffen befreit und bei Bedarf mit Wasser verdünnt.

Eine Quantifizierung der Signale ist durch Integration der Peakflächen anhand einer Standardreihe möglich.

### 2.2.16 Festphasenextraktion und Dünnschichtchromatographie

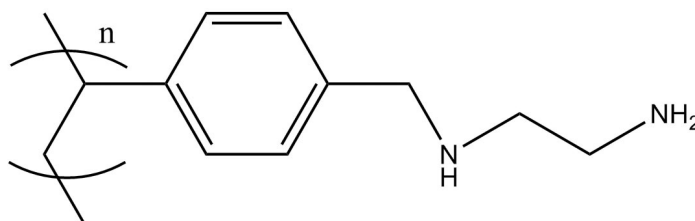
Die SPE stellt eine schnelle und effiziente Methode dar, Analyten aus einer Lösung aufzureinigen. Die meisten Hersteller von Chromatographie-Artikeln bieten eine Vielzahl unterschiedlicher Säulenmaterialien und Aufreinigungsprotokollen an. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Typen von Säulen verwendet. Die Aufreinigung von Aminosäuren, insbesondere pAPA, wurde anhand von CHROMABOND<sup>®</sup> SA (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen Kationenaustauscher auf Silika-Basis. Die Matrix ist mit Benzolsulfonsäure modifiziert, hat eine Porengröße von 60 Å, eine Partikelgröße von 45 µm und eine spezifische Oberfläche von 500 m<sup>2</sup>/g. Es werden 1 ml / 100 mg Säulen verwendet.

Die Aufreinigung von Aminosäuren aus Kulturüberständen erfolgt nach einem modifizierten Protokoll (Macherey-Nagel Applikationsdatenbank Nr. 300230, „Amino Acids from Urine“). Die zu analysierende Lösung wird mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH von 1,1 eingestellt und die Säule mit 5 ml Methanol, 5 ml Methanol : 0,1 M HCl (1 : 1 v/v) und 5 ml 0,1 M HCl äquilibriert. Der Überstand wird auf die Säule aufgetragen und unter leichtem Druck durch die Matrix gepresst. Nach der Bindung des Analyten erfolgt das Waschen der Säule mit 700 µl Wasser. Zur Elution eignet sich eine 1 M wässrige Ammoniaklösung.

Die Eluate können durch HPLC, aber auch durch DC analysiert werden. Bei letzterem findet die Auftrennung auf einer ALUGRAM<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub> statt (Macherey-Nagel Applikationsdatenbank Nr. 402110, „Separation of amino acids“). Als Laufmittel

dient ein Gemisch aus n-Butanol : Eisessig : Wasser (3 : 1 : 1). Alle Proben werden wässrig aufgetragen, da pAPA nicht organisch löslich ist. Relative Laufweiten ( $R_f$ ) ausgewählter Standards sind: Phenylalanin, 0,52; Tyrosin, 0,48; pAPA, 0,23. Nachdem die DC-Platten gut getrocknet sind, erfolgt der Nachweis von Aminosäuren durch das Aufsprühen einer 2 %-igen (w/v) methanolischen Ninhydrinlösung (35). Nach 5 min bei 60 °C sind vorhandene Aminosäuren, je nach Konzentration, rosa bis violett gefärbt.

Die Aufreinigung des pACiAlk aus Kulturüberstand erfolgt ebenfalls anhand von SPE. Hierzu wird ein schwacher Anionenaustauscher der Firma Phenomenex (Aschaffenburg) eingesetzt. Diese Säulen, strata™-X-AW, besitzen eine komplexe Modifikation, die in Abbildung 2.11 dargestellt ist.



**Abb. 2.11:** strata™-X-AW. Dargestellt ist ein Ausschnitt des schwachen Anionenaustauschers in strata™-X-AW Säulen nach Angaben des Herstellers.

Bei der Aufreinigung des pACiAlk werden 1 g / 12 ml Säulen verwendet. Die Äquilibrierung erfolgt mit 5 ml Methanol und 5 ml Wasser. Danach können bis zu 300 ml zellfreier Kulturüberstand (pH 6-7 mit 0,1 % Essigsäure) auf die Säule aufgetragen werden. Gewaschen wird die Säule mit 30 ml Wasser, die Elution erfolgt mit Methanol. Die Eluate werden über HPLC, NMR und LC-MS analysiert.

### 2.2.17 Bestimmung von pKa- und pI-Werten

Die Analyse von Säurekonstanten (angegeben in ihrem negativen dekadischen Logarithmus als pKa) und isoelektrischen Punkt (pI) geben Aufschluss über den Dissoziationszustand von zum Beispiel Carboxyl- und Aminogruppen. Die Säurekonstante spiegelt wieder, wie stark ein Stoff mit Wasser unter Proteolyse reagiert und damit auch wie stark die resultierende Säure/Base ist. Bei  $\text{pH} = \text{pKa}$  sind 50 % des Stoffes protoniert/dissoziiert. Der pI-Wert definiert die Konzentration an  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen (ebenfalls als negativ dekadischen Logarithmus), bei der sich die Ladungen aller vorhandenen Gruppen ausgleichen und das Molekül scheinbar ungeladen ist.

Eine 0,1 M Lösung des Analyten wird durch 0,1 M HCl auf einen pH von mindestens einer Einheit unterhalb des niedrigsten zu erwartenden pKa-Wertes gebracht. Als Vo-

lumen eignen sich 3 ml. In Schritten von 50  $\mu$ l wird eine 0,1 M NaOH-Titrosol Lösung zugegeben und der resultierende pH-Wert bestimmt.

Die Bestimmung der pKa-Werte erfolgt graphisch aus einer Auftragung des pH-Wertes (Abszisse) gegen die eingesetzten OH-Äquivalente oder des zugegebenen Volumens NaOH (Ordinate). Zwei parallele Tangenten, angelegt an der unteren und oberen Grenze des Pufferbereichs einer funktionellen Gruppe, werden eingezeichnet. Der Punkt, an dem eine Tangente die Kurve berührt, wird mit dem entsprechenden Punkt der anderen Tangente verbunden. Dies ergibt einen Schnittpunkt im Bereich der Kurve, der den Wendepunkt im Pufferbereich und damit den pKa darstellt.

Die Bestimmung des pI-Wertes erfolgt rein mathematisch. Bei zwei protonierbaren/dissoziierbaren Gruppen (z.B.  $-\text{COO}^-$  und  $-\text{NH}_3^+$ ) wird dazu der Mittelwert der jeweiligen pKa-Werte bestimmt. Bei einer Trifunktionalität muss vorher überlegt werden welcher Ladungszustand eine scheinbare Neutralität hervorrufen kann. Die beiden pKa Werte dieser Zustände werden ebenfalls für eine Mittelwertberechnung genutzt.

### 2.2.18 Auftragsanalytik: NMR, LC-MS und FT/ESI-MS

Nicht alle der notwendigen Analysen zur Identifikation neuer Produkte können eigenständig durchgeführt werden, da HPLC und DC nur eine Zuordnung anhand bereits vorhandener Referenzen erlauben. Techniken, die eine Bestimmung unbekannter Substanzen erlauben, sind in dieser Arbeit vor allem die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), eine HPLC mit gekoppelter Massenspektroskopie und hochauflösende Massenspektroskopie.

Das Institut für Organische Chemie der RWTH Aachen bietet NMR als Auftragsarbeit an. Eine  $^1\text{H}$ -NMR Analyse des pACiAlk wurde hier durchgeführt. Die Messungen findet unter anderem mit einem Varian Unity Inova 400 NMR System statt. Zu analysierende Proben wurden bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingengt und in  $\text{D}_2\text{O}$  (deutertem Wasser) aufgenommen. Da bei der  $^1\text{H}$ -NMR die Verschiebungen von Wasserstoffmolekülen gemessen werden, würden nicht deuterte Lösungsmittel die Analyse stören. Die Auswertung der resultierenden Chromatogramme wurde maßgeblich von Herrn V. Gego (Lehrstuhl für Technische Chemie und Petrolchemie) durchgeführt.

Eine Analyse des Alkohols durch Massenspektroskopie in Verbindung mit HPLC wurde am Fraunhofer ICT in Karlsruhe-Pfinztal von Herrn D. Schmiedl durchgeführt und ausgewertet. Verwendet wurden dazu folgende Instrumente: HPLC Säule (Synergi  $4\mu$  Hydro RP 80 Å, security guard cartridge/ 2.0x150mm, Phenomenex, MS-certified), HPLC System (HPLC Series 1200, Rapid Resolution, Agilent Technologies, degasser,

binary pump SL, HiP-ALS SL, TCC SL, DAD SL; series 1200; Agilent Technologies), MS (LC MS Ion Trap XCT plus, series 6330, Agilent Technologies), Ionenquelle (MM APESI / APCI Agilent Technologies), Software (ChemStation for LC 3D systems, Rev: B. 01.03 SR 1, Agilent Technologies; 6300 Series Ion Trap LC/MS Software, Version 6.1, Agilent Technologies/ Bruker Daltonik GmbH; 6300 Series TrapControl, Version 6.1, Agilent Technologies/ Bruker Daltonik GmbH). Alle Angaben basieren auf dem zugesandten Prüfbericht.

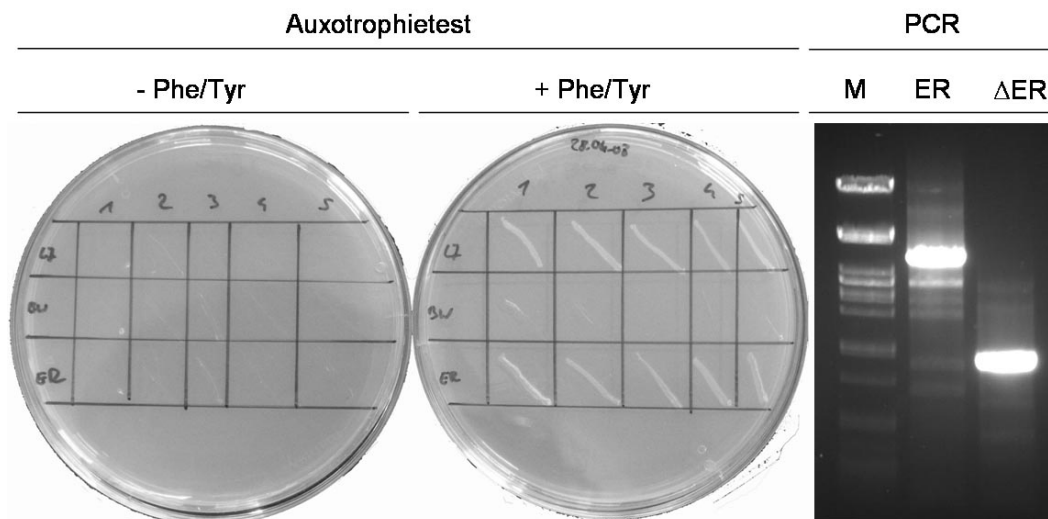
Die verwendete Methode sieht ein isokratisches System aus (A) 0,1 % Essigsäure und (B) Acetonitril bei einem Fluss von 0,5 ml/min und 50 °C vor. Festes Probenmaterial (2,7 mg) wird in 5 ml 0,1 % Essigsäure gelöst und steril filtriert. 1, 4, 8 und 12  $\mu$ l Probenvolumen werden analysiert.

Eine hochauflösende Massenspektroskopie wurde am Institut für Siedlungswasserwirtschaft (ISA, RWTH Aachen) durch Herrn W. Gebhardt durchgeführt. Methanolische Verdünnungen von pACi-CoA wurden analysiert und ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Versuche und eine detaillierte Beschreibung sind im Rahmen der Dissertation von F. Jansen zu finden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Deletion der Gene *pheA* und *tyrA*

Die Deletion der Gene für CM/PDT (*pheA*) und CM/PDH (*tyrA*) wurde als Möglichkeit zur Reduktion der zellulären Konzentrationen aromatischer Aminosäuren identifiziert. Gemäß der Beschreibung in Abschnitt 2.2.10 wurde eine homologe Rekombination zur Entfernung des Attenuators *pheL* und der Gene zu Phenylalanin- (*pheA*) und Tyrosinbiosynthese (*tyrA*) durchgeführt. Aufgrund ihrer räumlichen Nähe auf dem *E. coli* Genom war eine gemeinsame Deletion der Elemente in einem Ansatz möglich. Die Enzyme produzieren auf der Basis von Chorismat Phenylalanin (*pheA*) oder Tyrosin (*tyrA*). Eine Deletion beider Gene sollte zur Auxotrophie für die Aminosäure führen (69).



**Abb. 3.1: Physiologischer und molekularbiologischer Auxotrophietest.** Auxotrophietest, Wachstum durch homologe Rekombination erzeugter LJ110, BW25113 und ER2566 Mutanten auf Minimalmedium mit 1 % Glukose  $\pm$  20  $\mu$ g/ml Phenylalanin/Tyrosin. PCR, Amplifikation der Umgebung von *pheLATyrA* durch *raiA-fw-01* und *tyrA-aroF-rev-01* in einer Kolonie-PCR mit ER2566 (ER) und ER2566  $\Delta$ *pheLATyrA* ( $\Delta$ ER) Zellen. Zur Größenabschätzung wurde  $\lambda$ /*PstI* Marker verwendet.

Die Arbeiten hierzu wurden mit den *E. coli* Stämmen ER2566, LJ110 und BW25113 durchgeführt. Da Deletionen in ER2566 bislang nicht beschrieben sind, stellten LJ110 und BW25113 Positivkontrollen dar, wurden aber für weitere Versuche nicht verwendet. Ergebnisse der Deletion sind in Abbildung 3.1 zu sehen. Ohne Supplementation von Tyrosin und Phenylalanin kam es zu keinem Wachstum auf Minimalmediumsplatten mit 1 % Glukose. Wurden beide Aminosäuren zugegeben (20  $\mu$ g/ml), konnte ein deutliches Wachstum der ER2566 und der LJ110 Zellen festgestellt werden. Aufgrund einer

suboptimalen Versorgung mit Pyrimidin wuchs der BW25113 Stamm nicht auf dem gewählten Medium an. Der abgebildete Auxotrophietest zeigt deutlich, dass die Deletion der *pheLATyrA*-Umgebung in ER2566 erfolgreich war und somit *E. coli* ER2566  $\Delta$ *pheLATyrA* entstanden ist. Zusätzlich zu dem physiologischen Test wurde auch eine Kolonie-PCR mit den Primern *raiA-fw-01* und *tyrA-aroF-rev-01* durchgeführt. Die beiden stärksten Amplifikate entsprachen den berechneten Fragmentgrößen für die Amplifikation der *pheLATyrA*-Umgebung in ER2566 (3410 bp) und ER2566  $\Delta$ *pheLATyrA* (1040 bp). Das Ergebnis des Deletionsversuchs war ein für Tyrosin und Phenylalanin auxotropher ER2566 Stamm.

## 3.2 Biosynthese von pAPA

### 3.2.1 Klonierung der ADCS

In der Literatur und entsprechenden Datenbanken sind für die Chloramphenicolbiosynthese in *S. venezuelae* DSM 40230 zwei verschiedene Cluster annotiert, das *pap*-Cluster [AB116234, (85)] und das *cml*-Cluster [AF262220, (25)]. Beide Cluster enthalten sowohl eine ADCS als auch eine ADCM und eine ADPDH. Vor der Klonierung der ORFs wurden alle relevanten Gene *in silico* untersucht, um deren Eignung zur Expression in *E. coli* zu klären. Die entsprechenden Analysen wurden auch für den Spender (*S. venezuelae*) und den Empfänger (*E. coli*) durchgeführt.

Die Genome beider Organismen unterscheiden sich deutlich in ihrem GC-Gehalt. Während für *E. coli* ein Wert von ca. 52,4 % ermittelt werden konnte, besitzt *S. venezuelae* 73,1 % GC. Die Angaben wurden durch eine Analyse von 14 bzw. 69 kodierenden Sequenzen mit 5122 bzw. 34715 Codons ermittelt. Dieser Unterschied setzt sich auch in der eigentlichen codon usage fort (Tabelle 3.1, <http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Verglichen wurden acht Codons, deren geringe Konzentration für die Expression von Transgenen in *E. coli* häufig limitierend ist (67). Während die meisten dieser Codons in dem Aktinobakterium gleich häufig oder weniger vorkommen, fällt auf, dass die beiden GC-reichsten Triplets CGG und CCC angereichert sind.

Dies gilt auch bei einer Betrachtung beider ADCS ORFs *papA* und *cmlB*. *papA* besteht zu 72,3 %, *cmlB* zu 73,1 % aus G und C. Bei diesen ORFs liegt der relative Anteil an CCC und CGG sogar höher als allgemein bei *S. venezuelae* und erreicht über 8 %. In *E. coli* sind CCC und CGG zu 1 % vertreten. Aufgrund dieser deutlichen Abweichung



**Tab. 3.1: Codon usage der Chloramphenicolbiosynthesegene**

Codon		Stämme		ADCS		ADCM		ADPDH	
tRNA	Codon	<i>E.c.</i> K12	<i>S.v.</i>	<i>papA</i>	<i>cmlB</i>	<i>papB</i>	<i>cmlD</i>	<i>papC</i>	<i>cmlC</i>
argU	AGA	1,4	0,5	0,0	0,0	0,0	–	0,0	0,0
	AGG	1,6	2,5	0,0	3,0	9,6	–	6,2	6,1
argX	CGG	4,1	31,7	39,3	37,3	76,9	–	43,4	45,6
argW	CGA	4,3	2,2	2,9	3,0	0,0	–	6,2	6,1
ileX	AUA	3,7	0,4	0,0	0,0	0,0	–	0,0	0,0
glyT	GGA	9,2	6,9	5,8	4,5	0,0	–	9,3	12,2
leuW	CUA	5,3	0,2	0,0	0,0	0,0	–	0,0	0,0
proL	CCC	6,4	25,8	46,6	47,8	9,6	–	40,2	39,5
lys	AAG	12,1	16,5	16,0	13,4	19,2	–	6,2	6,2

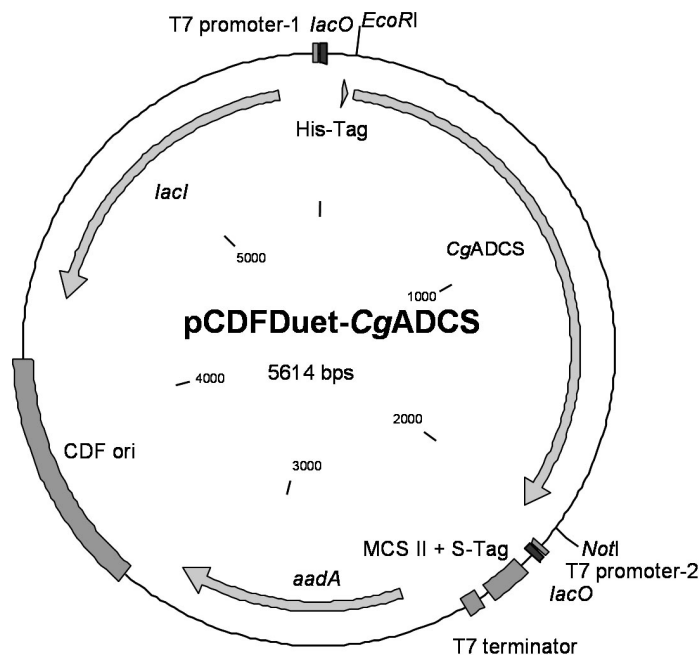
Angaben in %; CGG wird von argX und argW kodierten tRNAs erkannt.

und daraus möglicherweise resultierender Probleme, wurde auf eine Klonierung dieser beiden ADCS verzichtet.

Als mögliche Alternative zu diesen Enzymen konnte die ADCS (*pabAB*) aus *Corynebacterium glutamicum* (71), deren codon usage relativ ähnlich zu der von *E. coli* ist, identifiziert werden. Zur Isolation des ORF wurden die Zellen bei 30 °C in Medium 53 über Nacht angezogen und 1 ml der Bakteriensuspension für 10 min bei 100 °C lysiert. Die Amplifikation erfolgte durch PCR aus der im Überstand befindlichen DNA. Das Produkt (1878 bp) wurde durch Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt und in pCR4-TOPO integriert. Das Konstrukt wurde sequenziert und ein korrekter Klon des ORF über die Schnittstellen *EcoRI* und *NotI* in pCDFDuet-1 übertragen (Abbildung 3.2).

### 3.2.2 Klonierung von ADCM und ADPDH

Die Sequenz von Reaktionen aus der Chloramphenicolbiosynthese, die zur Herstellung von pACiAlk verwendet werden sollte, umfasst neben der ADCS (Abschnitt 3.2.1) auch die Proteine ADCM und ADPDH. Die Klonierung des ORF *papB* (ADCM) basierte auf der Isolation genomischer DNA aus *S. venezuelae* DSM 40230. Dazu wurde gemäß dem Protokoll aus Abschnitt 2.2.2 eine erfolgreiche Präparation des Genoms vorgenommen. Zu bemerken ist, dass die Technik aufgrund der vielen Arbeitsschritte äußerst stör anfällig ist, und nur eine einzige Isolation positive Ergebnisse gezeigt hat. Die dabei isolierte DNA war allerdings sehr rein und in ausreichender Menge (18 µg aus sechs Ansätzen) vorhanden.



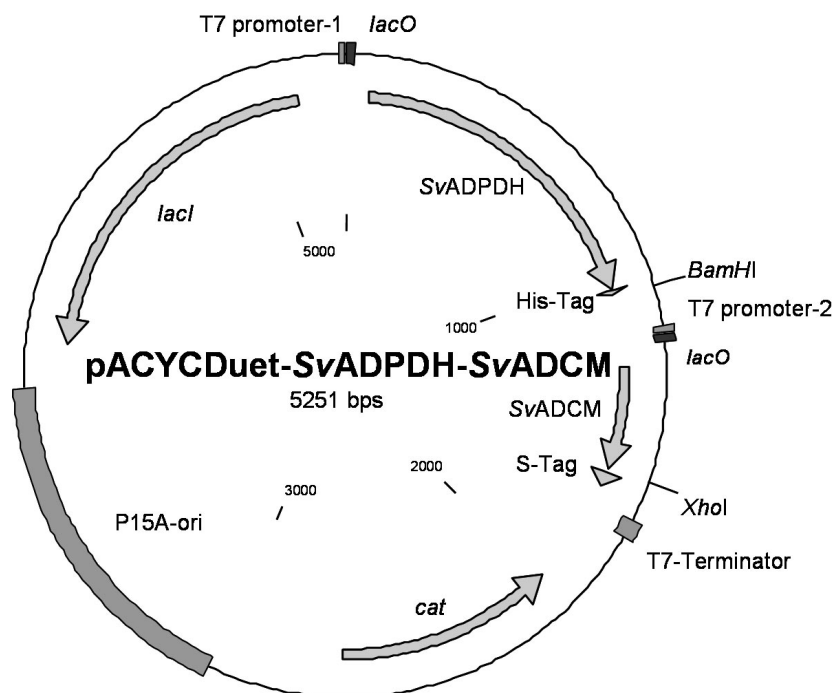
**Abb. 3.2: pCDFDuet-*CgADCS*.** Die Abbildung zeigt eine schematische Plasmidkarte des Expressionsvektors pCDFDuet-*CgADCS* mit den wichtigsten Elementen. *CgADCS* bezeichnet den ORF des Enzyms, *aadA* kodiert für eine Streptomycin 3'-Adenylyltransferase. Die Sequenz ist als N-terminale His-Tag Fusion integriert.

Für die Klonierung von *papB* wurden 30 ng genomischer DNA mit GoTaq Polymerase und den Primern *papB*-fw/rev-03 amplifiziert. Neben einem Fragment von ca. 800 bp Länge entstand das gewünschte 328 bp Amplifikat. Dieses wurde durch Gelelektrophorese vereinzelt und anhand einer Gelextraktion aufgereinigt. Nach der TOPO-Klonierung in den Vektor pCR4 erfolgte die Sequenzierung zur Überprüfung der erhaltenen Klone. Zur Subklonierung des ORF in den Vektor pACYCDuet-1 wurde ein Klon verwendet, der eine Mutation an Base 63 hat (C zu T), die aber ohne Auswirkung auf die Sequenz des Proteins ist. Über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* wurde das Insert in den durch *MfeI* und *XhoI* geöffneten Duet-Vektor integriert. *EcoRI* (G'AATTC) und *MfeI* bzw. *MunI* (C'AATTG) bilden kompatible Überhänge, deren Ligation allerdings keine neue Schnittstelle hinterlässt.

Ähnlich der ADCS ist auch der GC-Gehalt des *papB*-ORF sehr hoch (70 %). Die *in silico* Analyse (Tabelle 3.1) zeigte, dass vor allem CGG mit fast 7,7 % aller Codons sehr stark überrepräsentiert ist, während CCC hier kein Problem darstellt. Ein Vergleich mit *cmlD* ist nicht möglich, da die annotierte Sequenz einen frame-shift besitzt und weder ausgewertet, noch genutzt werden kann. Aufgrund der geringen Größe des *papB*-ORF von 309 bp wurde der hohe GC-Gehalt toleriert.

Den höchsten GC-Gehalt unter den bisher vorkommenden Genen der Chlorampheni-

colbiosynthese haben die für ADPDH kodierenden ORFs. *papC* besteht zu 77,9 % aus GC, *cmlC* enthält 77,3 % GC. Ähnlich der ADCS stellen hier die Codons CCC und CGG das größte Problem dar. Eine Klonierung dieser Sequenzen wurde daher unterlassen. Anstelle dessen fand auf Basis der translatierten Sequenz von *cmlC* die individuelle Synthese eines eigenen ORF für die ADPDH statt (Anhang, Abschnitt 6.2). Um eine eventuelle spätere rekombinante Expression in Pflanzen zu ermöglichen, wurde bei der Optimierung der Sequenz die codon usage von *Arabidopsis* genutzt. Das Ergebnis der *in silico* modellierten ADPDH ist ein ORF mit einem GC-Gehalt von 53,1 %. Zusätzlich zur eigentlichen Sequenz wurde C-terminal ein His-Tag angehängt. Als Restriktionschnittstellen zur Klonierung in den Vektor pACYCDuet-1 sind *BspHI* und *BamHI* für das pUC57-ADPDH Konstrukt gewählt worden. Der Expressionsvektor wurde für die Ligation mit *NcoI* und *BamHI* linearisiert. Ähnlich dem Beispiel von *papB* bilden *NcoI* und *BspHI* kompatible Überhänge. Nach der Ligation befindet sich dort keine Schnittstelle mehr.



**Abb. 3.3:** pACYCDuet-SvADPDH-SvADCM. Dargestellt ist das Doppelkonstrukt mit SvADPDH und SvADCM, entstanden aus den entsprechenden pACYCDuet-Einfachkonstrukten. ADPDH befindet sich in der ersten, ADCM in der zweiten MCS.

Für die Klonierung des Expressionsvektors pACYCDuet-SvADPDH-SvADCM wurde der Vektor pACYCDuet-SvADCM mit *NcoI* und *BamHI* linearisiert. Die Integration der ADPDH fand entsprechend der Klonierung von pACYCDuet-SvADPDH statt. Eine Karte des fertigen Konstrukts ist in Abbildung 3.3 zu sehen. In der ersten MCS

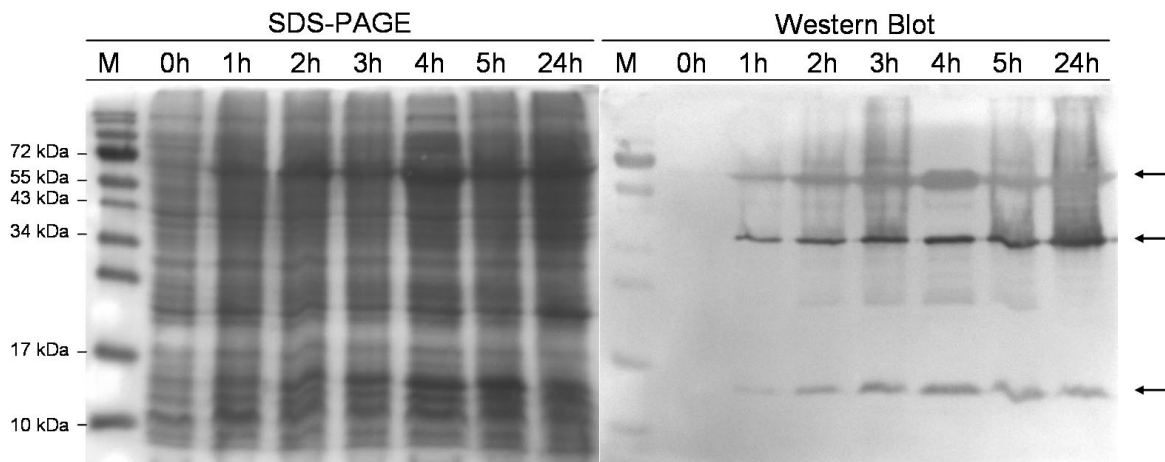
befindet sich die ADPDH, während ADCM in der zweiten MCS, mit S-Tag fusioniert, integriert ist. Auf graphische Wiedergabe der Ursprungsvektoren wird hier verzichtet, da nur das Doppelkonstrukt für die zu Grunde liegenden Arbeiten verwendet wurde.

### 3.2.3 Expression der Enzyme ADCS, ADCM und ADPH

Nach der erfolgreichen Klonierung der Expressionsvektoren pCDFDuet-*Cg*ADCS und pACYCDuet-*Sv*ADPDH-*Sv*ADCM wurden diese in den *E. coli* Stamm ER2566 transformiert und exprimiert. Auf die Nutzung des BL21-CodonPlus(DE3)-RIL Stammes, bei dem einige der limitierenden tRNAs auf einem pACYC-Derivat kodiert sind, musste verzichtet werden, da die Überschneidung von Replikationsursprung und Resistenzmarker mit pACYCDuet-*Sv*ADPDH-*Sv*ADCM dies nicht zuließ.

Für die Expressionsstudien zu den drei Proteinen wurden diese zuerst einzeln exprimiert (ohne Darstellung). Dem erfolgreichen Nachweis folgte die Koexpression und der kombinierte Nachweis aller drei Transgene aus einem einzigen Stamm. Dazu wurde *E. coli* ER2566 pCDFDuet-*Cg*ADCS pACYCDuet-*Sv*ADPDH-*Sv*ADCM entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 2.2.11 angezogen sowie Proben zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 24 h nach Induktion genommen und durch Ultraschall lysiert. Die elektrophoretische Auftrennung in SDS-PAGE und der spezifische Nachweis im Western Blot sind in Abbildung 3.4 dargestellt. ADCS und ADPDH wurden über einen primären Anti-His, ADCM über einen Anti-S Antikörper gebunden. Für den späteren AP-basierten Nachweis wurde ein sekundärer Maus-anti-Ziege Antikörper genutzt.

Die aus dem pCDF-Vektor exprimierte ADCS hat eine Länge von 636 aa und eine berechnete Masse von 69 kDa (für alle Proteine werden die Massen inklusive der Überhänge und Tags angegeben). Im Bereich zwischen den Markerbanden für 55 und 72 kDa befand sich ein entsprechendes Signal bei SDS-PAGE und Western Blot. Das Molekulargewicht der ADPDH beträgt bei 334 aa ca. 34,7 kDa. Im Western Blot war über der 34 kDa Bande des Markers ein deutliches Signal zu erkennen, während bei der Gelfärbung dieses Protein nur schwach nachweisbar war. Die ADCM ist das kleinste der drei Proteine und besitzt bei 133 aa eine Masse von 15 kDa. Im entsprechenden Bereich des Gels und des Blots war ein Signal erkennbar. Der Western Blot zeigte noch eine weitere Bande bei ca. 24 kDa, deren Herkunft unklar ist. Alle drei Proteine der Biosynthese von pAPA konnten in ER2566 exprimiert sowie durch SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen werden. Die Konzentration der Proteine nahm dabei zeitabhängig zu. Bereits nach 1 h konnten Signale detektiert werden, die bis 3 h stärker wurden, dann aber konstant blieben.



**Abb. 3.4: Expression der ADCS, ADCM und ADPDH.** Die Darstellung zeigt eine SDS-PAGE mit dem dazugehörigen Western Blot für einen Expressionsversuch in *E. coli* ER2566 Zellen. M, Prestained Proteinmarker; 0h, Probe nach 0 h Induktion; 1h, entsprechend 1 h nach Induktion usw.; ←, spezifischer Proteinnachweis. Primäre Antikörper, Anti-His u. Anti-S; Sekundäre Antikörper, Ziege-anti-Maus (AP-markiert).

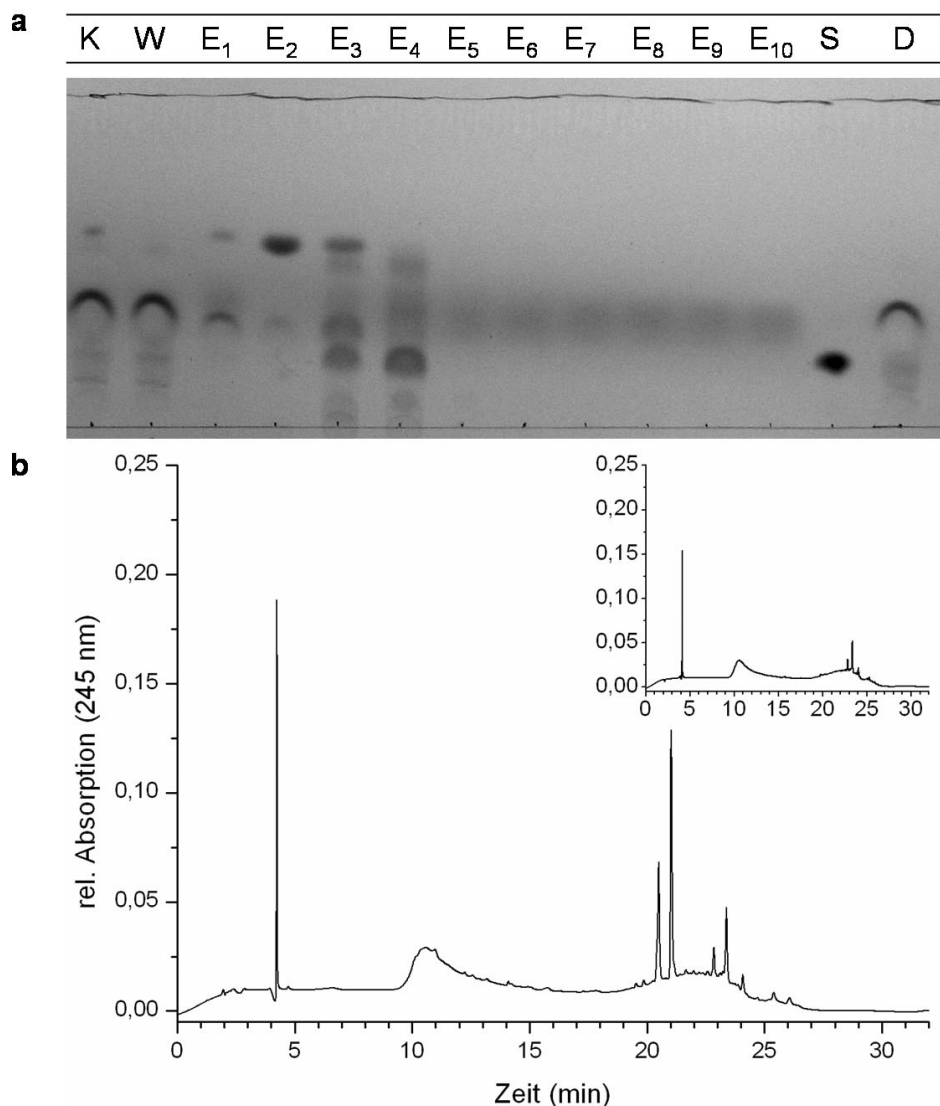
### 3.2.4 Produktion von pAPA in *E. coli*

Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass es auf Basis des Duet-System möglich ist, in *E. coli* ER2566 drei Proteine gleichzeitig zu exprimieren, wurde die Funktionalität der Reaktionskette von ADCS, ADCM und ADPDH getestet. Hierzu wurde der gleiche Stamm genutzt und unter entsprechenden Bedingungen angezogen.

Vor der ausführlichen Messung von Biomassezuwachs und Produktbildung einer solchen Kultur erfolgte die Durchführung verschiedener Vorversuche. Dabei wurden der Einfluss des verwendeten Mediums und die exkretierten Metabolite analysiert. Für den Vergleich verschiedener Medien fand die Kultivierung der Zellen in LB, LB + 2 % Glycerin und M9 + 2 % Glycerin statt.

Die Ergebnisse der Analyse der entstandenen Produkte - eine HPLC-basierte Detektion bei 245 nm (Abschnitt 2.2.15) und die DC einer Aminosäureaufreinigung (Abschnitt 2.2.16) - sind in Abbildung 3.5 exemplarisch dargestellt.

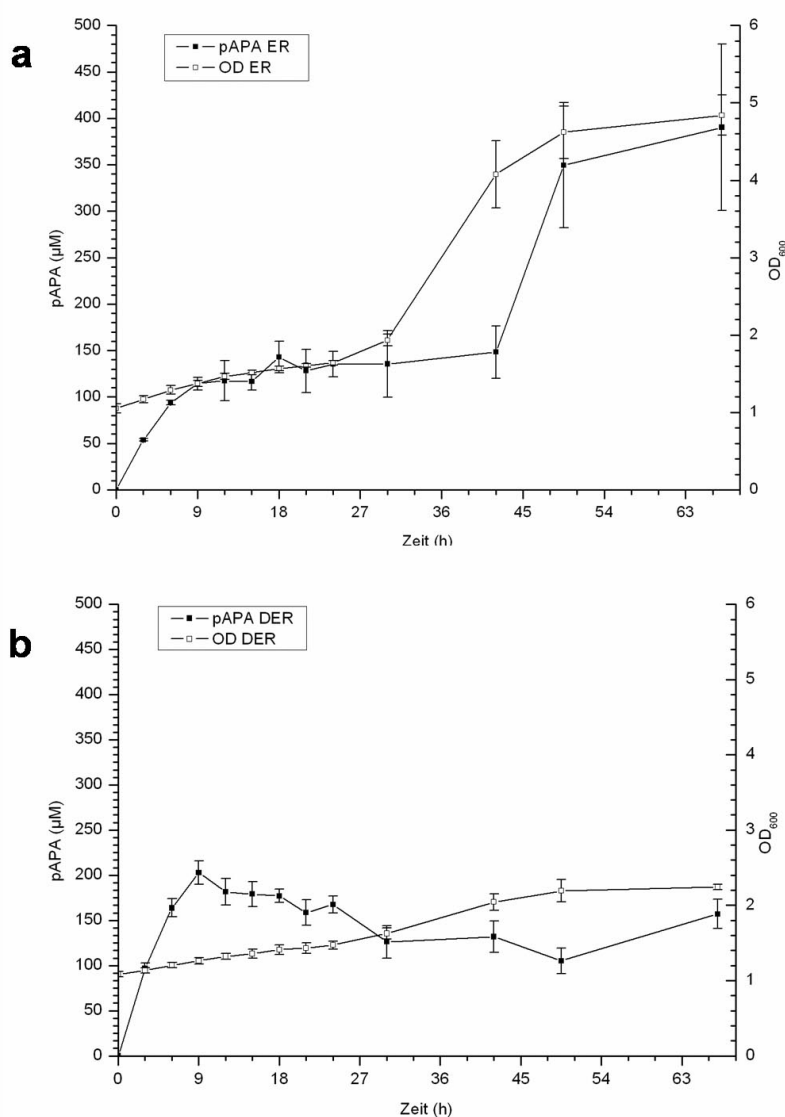
Die DC-Analyse der Aminosäureaufreinigung zeigte, dass relativ viele durch Ninhydrin anfärbbare Stoffe aufgereinigt wurden. Die Identität der meisten Verbindungen konnte allerdings nicht geklärt werden. Von Bedeutung ist vor allem der Nachweis einer Substanz in den Eluat 3 und 4, die ein entsprechendes Laufverhalten wie der Standard zeigte. Durch die HPLC-Analyse des Überstandes konnte - unter anderem - ein Signal bei 4,2 min detektiert werden, das dem Standard entsprach. Beide Ergebnisse wurden als Beweis der pAPA-Biosynthese in *E. coli* ER2566 Zellen bei Expression von ADCS, ADCM und ADPDH gewertet.



**Abb. 3.5: Chromatographische Analysen von pAPA.** a) DC der Aminosäureaufreinigung eines *E. coli* ER2566 Kulturüberstandes bei ADCS, ADCM und ADPDH Expression. K, Kulturüberstand; D, Durchfluss; W, Waschfraktion; E<sub>1-10</sub>, Eluate; S, 1  $\mu$ g pAPA Standard. b) Darstellung der HPLC Auftrennung eines pAPA-Produktionsansatzes. Der Einsatz zeigt eine identischen Lauf mit 2,5 ng pAPA-Standard. Gemessen wurde bei 245 nm.

Der Vergleich der Medien untereinander (nicht dargestellt) zeigte, dass bezogen auf M9 in LB nur geringe Mengen pAPA produziert wurden, auch wenn die Zugabe von Glycerin die Biosynthese im Vollmedium leicht steigern konnte. Obwohl die Versuche nicht quantitativ ausgerichtet waren, ließ sich abschätzen, dass im Vergleich zum Minimalmedium M9 nur ca. 10 % pAPA ohne, und 15 % pAPA bei Glycerinzugabe entstehen. Dementsprechend wurden folgende Versuche nur in M9-Medium mit Glycerin durchgeführt.

Zur Quantifizierung der rekombinanten Biosynthese von pAPA wurden je drei unabhängige Kulturen von *E. coli* ER2566 und ER2566  $\Delta pheLATyrA$  mit den entsprechenden Vektoren in M9-Medium angezogen. Nach 3 h Induktion wurden über einen Zeitraum von 67 h Proben gezogen und die extrazelluläre pAPA Konzentration sowie die OD<sub>600</sub> bestimmt. Abbildung 3.6a zeigt die Ergebnisse für ER2566, Abbildung 3.6b die Resultate bei der Verwendung von  $\Delta pheLATyrA$ . Eine Messung der intrazellulären Konzentration wurde exemplarisch durchgeführt und zeigte, dass im Kulturüberstand ca. die 12fache Menge an pAPA zu finden war.



**Abb. 3.6: Quantifizierung der Biosynthese von pAPA.** Konzentration von pAPA (μM) und Biomasse (OD<sub>600</sub>) über 67 h für (a) ER2566 (ER) und (b) ER2566  $\Delta pheLATyrA$  ( $\Delta ER$ ) Zellen die ADCS, ADCM und ADPDH exprimieren. Jeder Ansatz wurde als Triplikat durchgeführt, die Standardabweichungen sind durch vertikale Linien markiert.

Aus der Abbildung ist für beide Stämme zu entnehmen, dass pAPA gebildet wurde. Die prototrophen Bakterien (a) erreichten die höchste gemessene Konzentration der aromatischen Aminosäure nach 67 h. Es ist nicht auszuschließen, dass die Biosynthese zu noch größeren Mengen von pAPA im Medium geführt hätte. Aufgrund technischer Bedingungen wurde der Versuch aber abgebrochen. Auffällig war die zeitversetzte Korrelation von Biomassezuwachs - die exponentielle Phase begann nach ca. 27 h - und höchster Produktbildungsrate (ab ca. 45 h). Die Menge der verfügbaren Biokatalysatoren schien einen direkten Einfluss auf die Produktkonzentration zu haben. Die Biomasse war zum Zeitpunkt des Abbruchs der Reaktion bei  $OD_{600}$  4,8, die Konzentration von pAPA bei  $390 \mu\text{M}$  (ca. 70 mg/l). Es war ebenfalls zu erkennen, dass mit fortschreitendem Fermentationsverlauf das Verhalten der Replikate uneinheitlich wurde. Nach 67 h variierten insbesondere die Produktkonzentrationen deutlich, zu erkennen an den Standardabweichungen.

Im Gegensatz zum prototrophen Stamm erreichten die auxotrophen Zellen (ER2566  $\Delta pheLATyrA$ ) die maximale Konzentration an pAPA bereits nach kurzer Zeit. 9 h nach Beginn der Produktionsphase waren  $200 \mu\text{M}$  (36 mg) pAPA gebildet, die Konzentration nahm aber im weiteren Verlauf der Fermentation deutlich ab. Ein Zuwachs der Biomasse, wie für die prototrophen Zellen zu bemerken war, konnte hier nicht gemessen werden. Im Vergleich zum Beginn der Produktionsphase verdoppelte sich die  $OD_{600}$  und erreichte einen Wert von 2,2.

Trotz der nur halb so hohen maximalen pAPA Konzentration der auxotrophen im Vergleich zu den prototrophen Stämmen sind beide für die Produktion der Aminosäure in *E. coli* geeignet und konnten für nachfolgende Versuche eingesetzt werden.

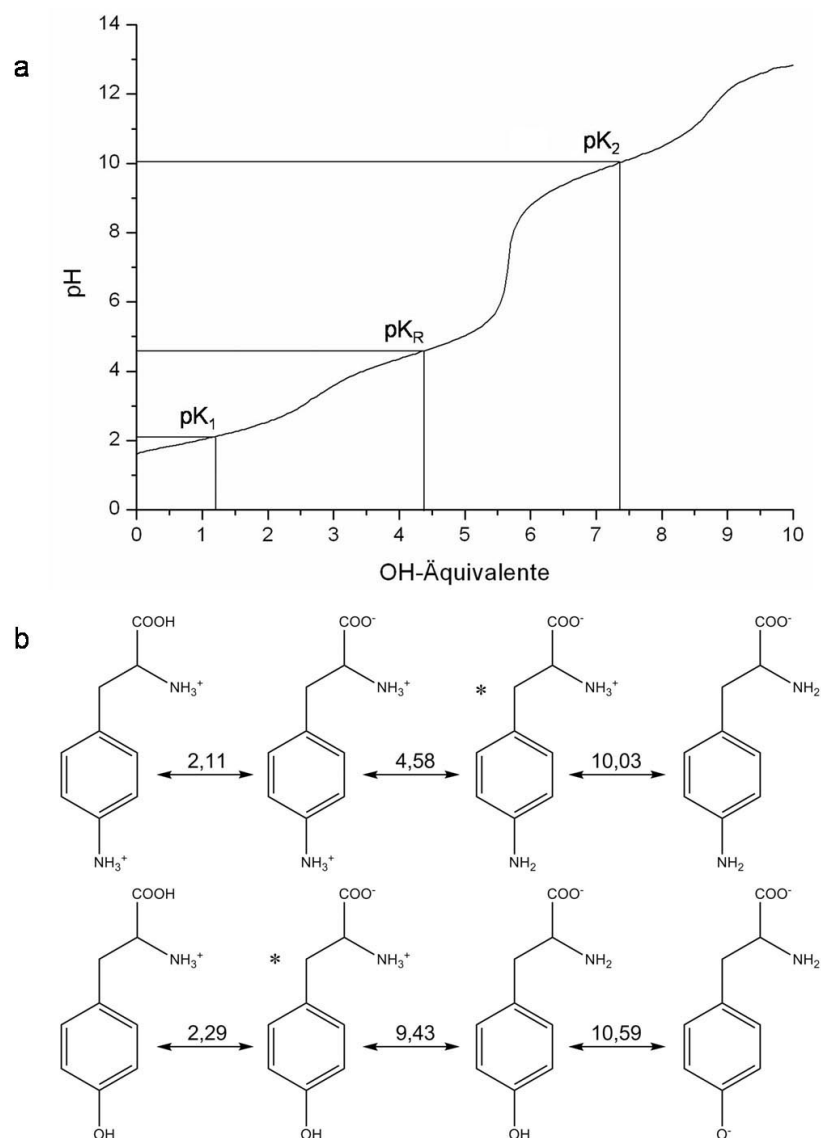
### 3.2.5 Titrationsanalyse von pAPA

Die Verbindungen pAPA, Tyrosin und Phenylalanin wurden in Hinblick auf ihre pKa- und pI-Werte miteinander verglichen. Dazu erfolgte eine *in silico* Simulation für alle drei Substanzen und eine Titration von pAPA und Phenylalanin. Als Referenz hierzu dienten die Angaben aus dem Lehrbuch „Lehninger Biochemie“ (51).

Für die Titrationsanalyse aus Abbildung 3.7a wurde eine angesäuerte pAPA-Lösung mit NaOH titriert und dabei der pH-Wert gemessen. Gemäß der vergleichenden Darstellung 3.7b ist zu erkennen, dass Tyrosin und pAPA jeweils vier verschiedene Ionisierungszustände besitzen können. Bei Tyrosin ist zusätzlich ein fünfter Zustand vorhanden, der durch Mesomerie aus dem dritten Zustand entstehen kann. Dabei ist die Aminogruppe protoniert und das Proton der Hydroxylgruppe am Ring dissoziiert. Die vier Zustän-



de lassen sich in der Darstellung der Titration von pAPA ablesen. Der pKa-Wert der Carboxylgruppe beträgt 2,11 ( $pK_1$ ). Die  $\alpha$ -Aminogruppe ist zu 50 % bei einem pH von 10,03 ( $pK_2$ ) protoniert. Die am aromatischen Ring befindliche Aminogruppe hat wiederum ihren pKa bei 4,58 ( $pK_R$ ). In einem Bereich um  $\pm 1$  pH-Einheit vom pKa-Wert ist eine Pufferung durch die Dissoziation der jeweiligen funktionellen Gruppe festzustellen, wie sie sich auch theoretisch aus der Henderson-Hasselbalch-Gleichung für solche Systeme ableiten lässt. Zwischen zwei Pufferbereichen gibt es dementsprechend starke pH-Veränderungen bei OH-Äquivalentzugabe.



**Abb. 3.7: Titrationskurve von pAPA.** a) Jede der drei funktionellen Gruppen von pAPA ( $pK_1$ ,  $-\text{COOH}$ ;  $pK_2$ ,  $-\text{NH}_2$ ;  $pK_R$ ,  $-\text{NH}_2$ ) erzeugt einen charakteristischen Wendepunkt im jeweiligen Pufferbereich, der eingezeichnet ist. b) pAPA und Tyrosin können in vier Ladungszuständen vorliegen, von denen der unter Assay- (pH 8,5 - 9,0) und cytosolischen Bedingungen (pH 7,6 - 7,8) durch ein Sternchen markiert ist. Für pAPA ermittelte und Tyrosin simulierte pKa-Werte sind eingetragen.

In 3.7b sind die Ladungszustände, die bei Assaybedingungen (pH 8,5 - 9,0) und intrazellulär (pH 7,6 - 7,8) vorliegen, durch Sternchen markiert. Diese Ionen liegen bei den im Folgenden beschriebenen Aktivitätsmessungen für die Desaminierung von Tyrosin und pAPA durch Ammoniak Lyasen vor. Bei beiden Substraten sind die funktionellen Gruppen an  $\alpha$ -C geladen, während die am Rest befindliche Gruppe nicht geladen ist. Damit ist gewährleistet, dass keine Ladungen die Akzeptanz im aktiven Zentrum behindern.

Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit von experimentell bestimmten, simulierten und aus der Literatur übernommenen Werten sind alle Angaben in Tabelle 3.2 wiedergegeben.  $pK_1$  und  $pK_2$  stehen für die am  $\alpha$ -C befindlichen Carboxyl- bzw. Amino- gruppen.  $pK_R$  markiert die am Rest befindliche funktionelle Gruppe. Der pI-Wert gibt den pH-Wert wieder, bei dem sich alle Ladungen des Moleküls ausgleichen und dieses scheinbar neutral geladen ist.

Phenylalanin stellt eine Kontrolle für die Werte aus Literatur und Experiment dar, da durch das Vorhandensein von nur zwei funktionellen Gruppen eine einfach auswertbare Titrationskurve entsteht. Im Allgemeinen liegen die experimentell ermittelten, berechneten und beschriebenen Werte eng beieinander. Somit ist die Vorhersage über den vergleichbaren Ladungszustand von pAPA und Tyrosin im Messbereich der Aktivitätstests verlässlich.

**Tab. 3.2: Dissoziationskonstanten für pAPA, Tyrosin und Phenylalanin**

Konstante	pAPA			Tyrosin			Phenylalanin		
	Exp	Sim	Lit	Exp	Sim	Lit	Exp	Sim	Lit
$pK_1$	2,11	2,20	–	–	2,29	2,20	2,29	2,20	1,83
$pK_2$	10,03	9,87	–	–	9,43	9,11	9,69	9,38	9,13
$pK_R$	4,58	4,55	–	–	10,59	10,07	–	–	–
pI	6,07	6,04	–	–	5,86	5,66	5,99	5,79	5,48

Exp, Experiment; Sim, Simulation; Lit, (51); –, keine Angabe.

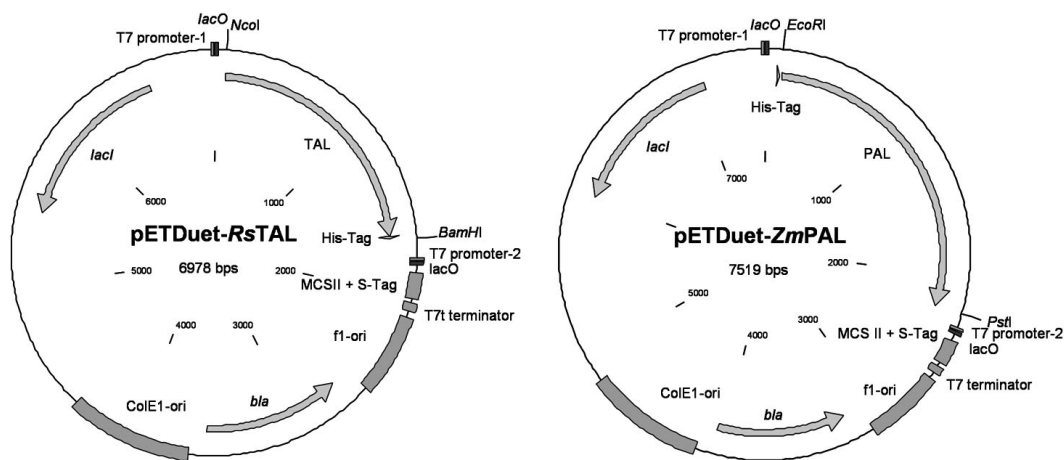
Experimente und Simulation bei 20 °C, Literaturwerte bei 25 °C.

### 3.3 Desaminierung von pAPA

#### 3.3.1 Klonierung der Ammoniak Lyasen

Die Analyse der kodierenden Sequenz der TAL aus *Rhodobacter sphaeroides* (78) zeigte trotz anderer Herkunft einen ähnlich hohen GC-Gehalt wie die der weiter oben beschriebenen Gene der Streptomyceten (68,9 %). Wie auch schon für die ADPDH

angegeben, wurde daher auf die eigenständige Klonierung des ORF verzichtet. Anstelle dessen entstammt der für die Arbeit verwendete ORF einer Gensynthese (Anhang, Abschnitt 6.1). Die Sequenz wurde dabei an die codon usage von *E. coli* angepasst und ein zusätzlicher C-terminaler His-Tag eingebracht. Für Subklonierungen flankieren die Schnittstellen *Nco*I (5') und *Eco*RI (3') die Sequenz. Der als pUC57-TAL synthetisierte ORF wurde über diese Schnittstellen in die erste MCS des Vektors pETDuet-1 kloniert. Der entsprechende Vektor heisst pETDuet-*Rs*TAL. Eine schematische Plasmidkarte ist in Abbildung 3.8 zu sehen.



**Abb. 3.8:** pETDuet-*Rs*TAL und pETDuet-*Zm*PAL. Die Abbildung zeigt die Konstrukte zur Expression von *Rs*TAL und *Zm*PAL mit den wichtigsten Elementen.

Als mögliche Alternative zu einer reinen TAL fand die PAL aus Mais Verwendung. Ein Konstrukt mit dem zugehörigen ORF wurde von N. Amrhein (ETH Zürich) zur Verfügung gestellt. Zu Beginn der Klonierungsarbeiten fand eine Sequenzierung dieses Konstruktes mit dem Primerpaar M13-forward/reverse statt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die vorliegende PAL nicht mit der Sequenz des von J. Rösler (58) beschriebenen ORF (L77912) bzw. des annotierten Proteins (AAL40137) oder dem vergleichbaren Datenbankeintrag von J.R. Andersen [(2), NM\_001111864] identisch war. Neben einem Aminosäureaustausch - nur die Proteinsequenz wurde in Betracht gezogen - von Glutamat zu Aspartat an Position 471 bestand der größte Unterschied im Bereich von Aminosäure 593 bis 626. Durch eine Verschiebung des Leserahmens im ORF gab es in diesem Abschnitt nur drei Übereinstimmungen zu den beiden Datenbankeinträgen (Positionen 601, 613 und 624). Auch zu einer weiteren, aus einem EST-Projekt stammenden, Sequenz bestand ein Unterschied. Verglichen mit dem vorliegenden Klon besaß der Datenbankeintrag AY103647 an Position 572 einen Austausch von Alanin zu Glycin. Der einzige vollständig übereinstimmende Eintrag war ACG44219 (1). Die

entsprechenden Sequenzvergleiche befinden sich im Anhang (Abbildung 6.1). Der Datenbankeintrag ACG44219 ist, im Gegensatz zu den funktionellen Untersuchungen von J. Rösler (58), das Ergebnis einer Transkriptomanalyse von Mais.

Basierend auf dem sequenzierten Konstrukt wurde ein Amplifikat mit den Primern *ZmPAL-fw/rev-01* unter Verwendung der GoTaq-Polymerase hergestellt. Das resultierende Produkt mit einer Länge von 2129 bp konnte nach einer Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und in den Vektor pCR4-TOPO subkloniert werden. Durch die Oligonukotide wurden bei der PCR die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *PstI* an das Amplifikat angefügt. Über die entsprechenden Überhänge wurde das Fragment aus pCR4-*ZmPAL* in pETDuet-*ZmPAL* überführt. Eine schematische Plasmidkarte ist in Abbildung 3.8 wiedergegeben. Mit Ausnahme des ORF und des aus dem Vektor stammenden N-terminalen His-Tags entspricht das Plasmid pETDuet-*RsTAL*.

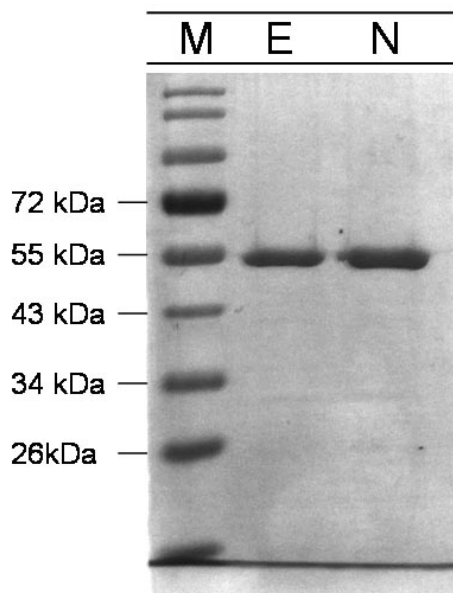
### 3.3.2 Expression und Aufreinigung der Ammoniak Lyasen

Die pETDuet-Konstrukte mit *RsTAL* und *ZmPAL* wurden zur Expression in den Stamm ER2566 transformiert. Diese Zellen wurden entweder als Zellreaktoren (Abschnitt 3.3.5) oder das Enzym in aufgereinigter Form (Abschnitt 3.3.3) verwendet. Gemäß den Angaben in Abschnitt 2.2.11 wurden die Expressionsversuche durchgeführt. Für die Aufreinigung des Enzyms erfolgte die Anzucht in LB-Medium, während sich für Biotransformationen nur M9-Medium eignet - Proteinhydrolysate enthalten u.a. Tyrosin und Phenylalanin, die mit den Messungen interferieren würden.

Bei der Expression der TAL und der Aufreinigung ist auffällig, dass die zelluläre Konzentration des Enzyms bei höheren Temperaturen (37 °C) deutlich niedriger war als bei 16 °C. Proteinaufreinigungen bei 37 °C enthielten zu wenig TAL um Aktivitätstests durchzuführen. Der Versuch einer Biotransformation bei 16 °C erwies sich allerdings ebenfalls als ineffektiv, da die Aktivität bei 19 °C unter dem Temperaturoptimum der TAL nur minimal war (Daten nicht dargestellt).

Der Versuch zum Nachweis der Proteinexpression durch Western Blot wurde parallel für proto- und auxotrophe ER2566 pETDuet-*RsTAL* Zellen durchgeführt. Dazu erfolgte der Aufschluss jeweils durch Lysozym oder Erhitzen von Proben der Zeitpunkte 0, 2, 4 und 20 h nach Induktion. Zwar konnten in beiden Stämmen Proteine, die der molekularen Masse der TAL entsprechen (530 aa, 55,8 kDa), nachgewiesen werden, die Menge an Protein im Vergleich zu *ZmPAL*, die im selben Ansatz überprüft worden ist, war aber gering (s.u.). Die Expression in ER2566  $\Delta$ *pheLAtyrA* war dabei nur geringfügig schlechter als die in prototrophen Zellen. Der Vergleich beider Lysearten zeigte

keinen Unterschied. Dies deutet darauf hin, dass sich die TAL nicht in inclusion bodies befand, wodurch diese als Ursache für die geringen Konzentrationen des Proteins nicht in Frage kamen.



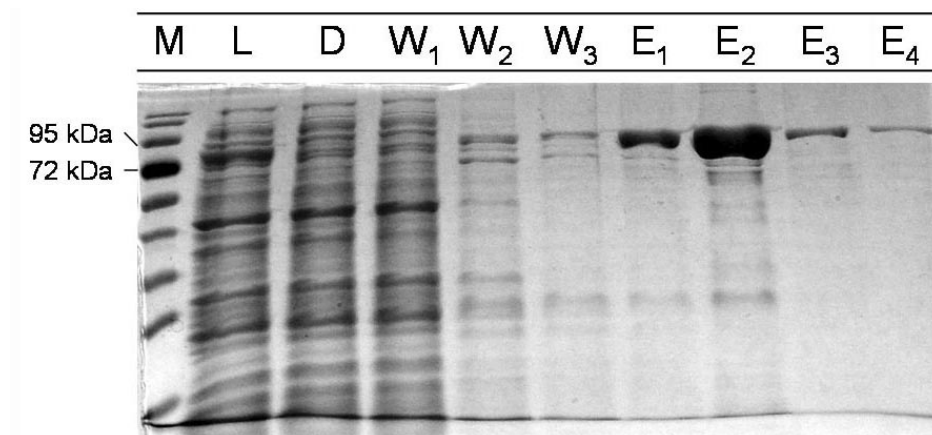
**Abb. 3.9: TAL-Proteinisolate aus *E. coli* und *N. tabacum*.** Die Abbildung zeigt jeweils Eluatfraktionen # 2 der TAL-Isolation aus *E. coli* (E) und *N. tabacum* (N) im Vergleich zu Prestained Proteinmarker (M).

Zwei Eluatfraktionen von TAL Aufreinigungen sind in Abbildung 3.9 dargestellt. Jeweils ca. 2,5  $\mu\text{g}$  der Eluate 2 einer Expression in *E. coli* und *N. tabacum* (8) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Bradfordreagenz nachgewiesen. Das Protein konnte jeweils sehr sauber aufgereinigt werden, eine deutliche Bande bei ca. 55 kDa und sehr schwache Signale bei ca. 32 kDa sind zu erkennen. Die Proteinexpression in *E. coli* (E) wurde bei 16 °C durchgeführt. Die Isolation unter solchen Kulturbedingungen führte nach Aufreinigung zu Proteinkonzentrationen bis über 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Verglichen dazu konnten bei 37 °C nur maximale Konzentrationen von  $\leq 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  erreicht werden.

Die Expression der *ZmPAL* erfolgte nur bei 37 °C, da hierbei gute Resultate für die Proteinexpression in BL21 und ER2566 zu beobachten waren. Vergleichende Versuche zwischen Zellaufschluss durch Lysozym oder kochen, wie sie bei der TAL für prototrophe und auxotrophe Zellen durchgeführt wurden, erfolgten auch für die PAL. Die gesamte Menge vorhandenen Proteins befand sich in diesen Analysen in Lösung, war also nicht als inclusion body präzipitiert. Ausserdem konnte kein Unterschied zwischen der Stärke der Expression bezüglich der Stämme festgestellt werden. Vergleichend mit der TAL ist auf das deutlich höhere Niveau der PAL-Expression hinzuweisen.

Die Abbildung 3.10 zeigt das Ergebnis einer Aufreinigung der PAL durch SDS-PAGE.

Das Protein hat eine Länge von 731 aa und eine berechnete Masse von 78 kDa. Neben anderen zellulären Proteinen konnte ein Signal knapp oberhalb der 75 kDa Bande des Markers im Zelllysate erkannt werden. Dieses Signal war im Durchfluss nicht erkennbar. Obwohl es anscheinend zur Ablösung während der Waschphasen kam, wurde das meiste Protein in den Eluatfraktionen gefunden. Die Qualität der Aufreinigung war dabei nicht so hoch wie für die TAL, restliche *E. coli* Proteine und PAL-Degradationsprodukte konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Diese stellten aber im Vergleich zur PAL nur einen kleinen Teil des Gesamtproteins in den Eluaten 1 und 2.



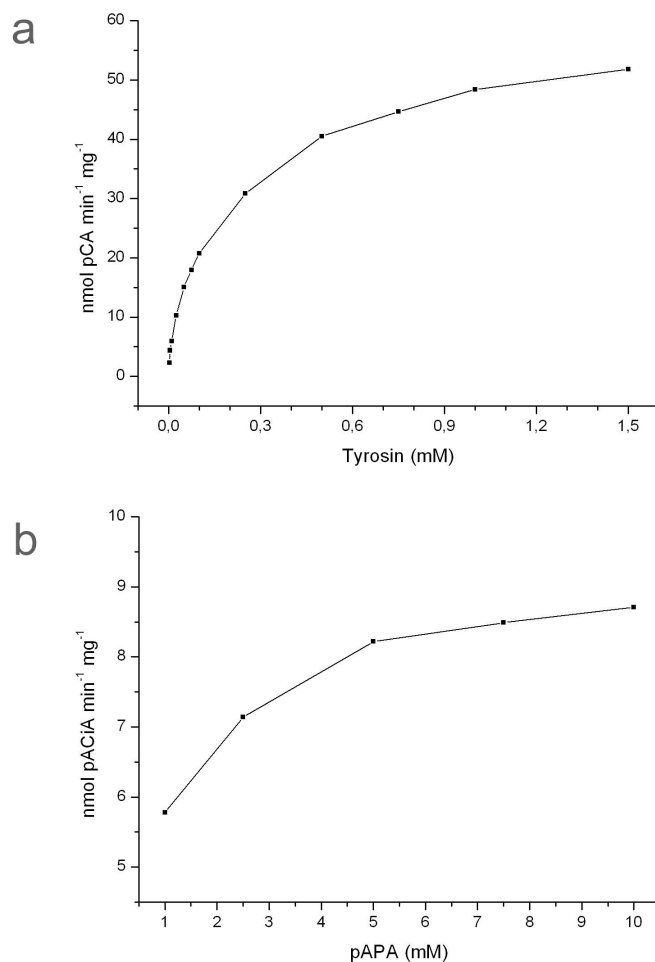
**Abb. 3.10: PAL-Proteinisolate aus *E. coli*.** Verschiedene Fraktionen einer PAL-Aufreinigung aus *E. coli* BL21 Zellen. M, Prestained Proteinmarker; L, Lysat; D, Durchfluss; W<sub>1-3</sub>, Waschfraktionen 1-3; E<sub>1-4</sub>, Eluatfraktionen 1-4.

### 3.3.3 *In vitro* Aktivität der Ammoniak Lyasen

Aus Aufreinigungen der TAL und der PAL wurden die *in vitro* Aktivitäten für Tyrosin, Phenylalanin und pAPA bestimmt. Die ausführlichsten Studien hierzu erfolgten mit der *Rs*TAL. In Vorversuchen (nicht dargestellt) fand die Bestimmung des proteinlinearen Bereichs der Umsetzung statt. Zwischen 10 und 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  standen Proteinkonzentration und Substratumsatz in einem linearen Verhältnis. Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten für Tyrosin (a) und pAPA (b) sind in Abbildung 3.11 aufgeführt. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert von drei Replikaten dar. Aus drei solcher Messungen der spezifischen Aktivitäten für Tyrosin konnte ein  $K_m$  von  $120 \pm 11 \mu\text{M}$  und ein  $k_{\text{cat}}$  von  $5,2 \cdot 10^{-2} \pm 5,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ermittelt werden.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität für pAPA (b) stellte sich aufgrund der hohen Ungenauigkeit und den damit einhergehenden Problemen bei der Reproduzierbarkeit als schwierig dar. Insgesamt konnten drei unabhängige Messungen mit Triplikaten durchgeführt werden. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine dieser Messungen. Aus

diesen Versuchen konnten die kinetischen Parameter der TAL für das Substrat ermittelt werden. Der  $K_m$  beträgt ca.  $747,3 \pm 141,8 \mu\text{M}$ , der  $k_{\text{cat}}$   $\text{s}^{-1}$   $7,5 \cdot 10^{-4} \pm 1,5 \cdot 10^{-4}$ . Die hohen Abweichungen deuten auf den großen Messfehler bei der photometrischen Detektion der Aktivität hin. Um sicherzustellen, dass pACiA entstanden ist, wurden Proben der Umsetzung von pAPA durch HPLC analysiert (Abschnitt 3.3.4).

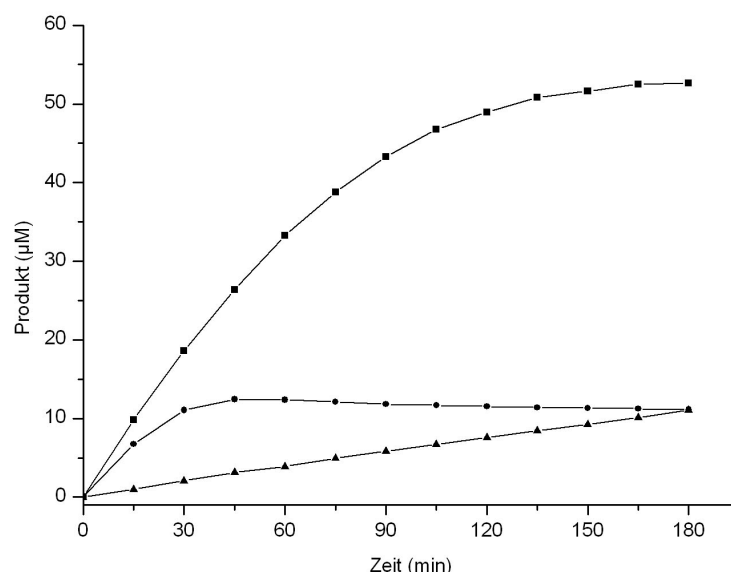


**Abb. 3.11: Spezifische Aktivitäten der TAL für Tyrosin und pAPA.** Bestimmung der spezifischen Aktivität in  $\text{nmol Produkt min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  gegen die jeweilige Substratkonzentration von Tyrosin (a) und pAPA (b).

Ein Vergleich der kinetischen Daten für beide Substrate zeigte, dass Tyrosin bevorzugt umgesetzt wird. Die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde bereits bei ca. 15 % der Konzentration an Tyrosin im Vergleich zu pAPA erreicht, und der maximale Umsatz beträgt ein 7.000faches. Trotzdem konnte durch diese Versuche gezeigt werden, dass pAPA als Substrat für die TAL verwendet werden kann.

Neben der TAL wurde auch die Aktivität der *ZmPAL* für ihre beiden Substrate Tyrosin und Phenylalanin sowie für pAPA bestimmt. Hierzu erfolgte eine photometrische

Erfassung der Reaktionsprodukte bei 275 nm. Die Abbildung 3.12 zeigt die Ergebnisse eines solchen Versuchs. Zu beachten ist, dass CiA einen 15fach höheren molaren Extinktionskoeffizienten als pCA und pACiA besitzt (Abschnitt 2.2.14). Bei gleichen Bedingungen, also gleicher Enzymmenge und gleicher Substratkonzentration - nur auf diese Weise sind die Ergebnisse vergleichbar - wird das obere, technisch bedingte, Limit des Photometers schneller erreicht. Diese Tatsache spiegelt sich auch in der Abbildung wieder. Bei 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Enzym und je 1 mM Substrat wurde eine Sättigung der Reaktion für pCA bei 52  $\mu\text{M}$  nach 3 h erreicht. Die Konzentration an pACiA stieg dagegen kontinuierlich an. Nach 3 h wurde eine Konzentration von 11  $\mu\text{M}$  erreicht, eine Einzelmessung nach 6 h wies sogar 20  $\mu\text{M}$  pACiA auf. Über die Konzentration von CiA kann hier aufgrund der genannten Probleme keine Aussage gemacht werden. Dieser und weitere (nicht dargestellte) Versuche zeigten, dass die klonierte PAL aktiv war und beide Substrate sowie pAPA erfolgreich umsetzen konnte.



**Abb. 3.12: Desaminierung von Tyrosin, Phenylalanin und pAPA durch PAL.** Die  $\mu\text{M}$  Konzentrationen der Reaktionsprodukte pCA (■), CiA (●) und pACiA (▲) wurden aus der photometrischen Detektion einer Katalyse der PAL berechnet. Bei 45 min überschreitet CiA den linearen Messbereich.

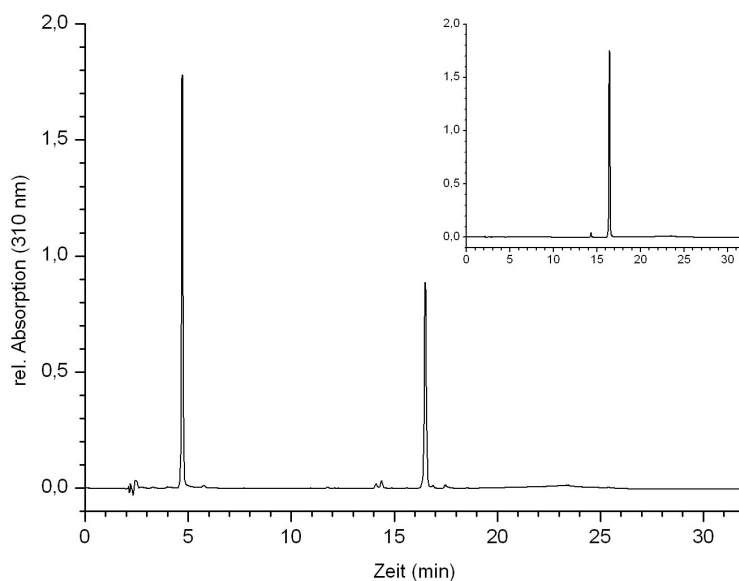
Neben den Nachweisen der Aktivität der PAL wurde versucht, kinetische Daten für pAPA aufzunehmen. Es konnten hierbei allerdings keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden. Die verschiedenen Messungen zeigten keinen erkennbaren Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Umsatz. Daher konnten keine der TAL vergleichbaren Werte für die PAL erzeugt werden. Aus der Abbildung 3.12 ist aber ersichtlich, dass bereits Konzentrationen von 1 mM pAPA ausreichen, um eine vernünftige Detektion des Produktes zu ermöglichen. Zur Erzeugung verwertbarer Daten für die TAL war diese Konzentration die unterste Grenze in solchen Messungen.



### 3.3.4 Identifikation des pAPA-Desaminierungsproduktes

Versuche zum Nachweis des Reaktionsproduktes der pAPA Desaminierung durch TAL und PAL wurden über DC und HPLC durchgeführt. Auf Basis der DC konnten allerdings keine Ergebnisse erzielt werden. Hier zeigten tiefergehende Studien, dass die aminierte Säure bei der organischen Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln, aber auch bei der DC mit beiden vorhandenen Laufmitteln instabil war. Proben organischer Phasen mit pACiA-Standard wurden durch HPLC analysiert und zeigten mit fortschreitender Extraktion deutlich erkennbar Degradationsprodukte.

Als Analytik für Reaktionsansätze kam daher nur der HPLC-basierte Vergleich zu käuflichem pACiA-Standard in Frage. Hierdurch konnte das Produkt der *in vitro* Katalyse klar als die gesuchte Säure identifiziert werden. Die HPLC-Auftrennung einer pAPA Umsetzung durch die TAL ist exemplarisch in Abbildung 3.13 dargestellt. Substrat und Produkt sind deutlich zu erkennen. Die Retentionszeit von Standard (Einsatz) und Reaktionsprodukt waren identisch.



**Abb. 3.13:** HPLC-Analyse einer *in vitro* Katalyse der TAL mit pAPA. Die Abbildung zeigt das Chromatogramm einer Desaminierung von pAPA mit TAL *in vitro*. Der Einsatz gibt ein entsprechendes Chromatogramm für pACiA-Standard an.

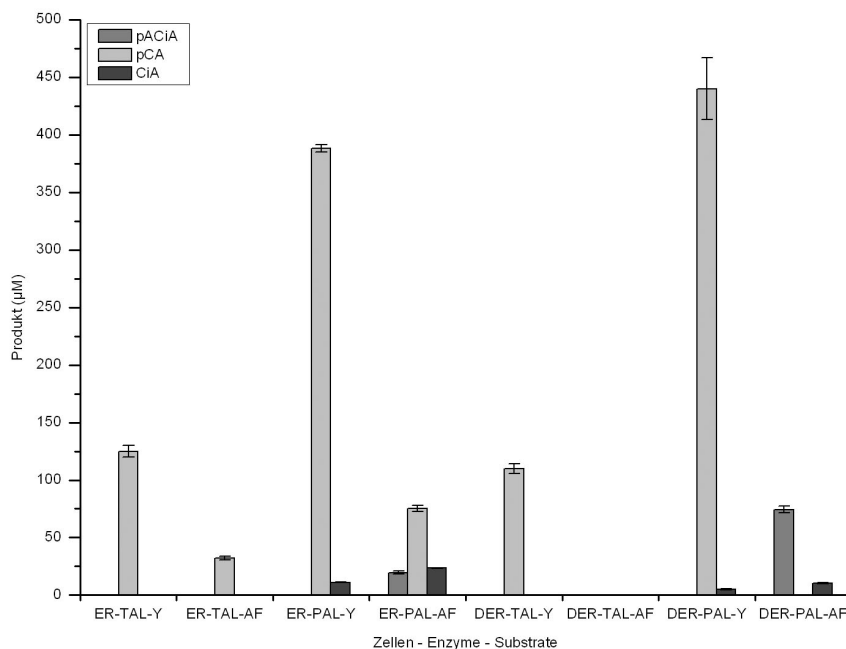
### 3.3.5 *In vivo* Aktivität der Ammoniak Lyasen

In den vorhergehenden Abschnitten lag der Fokus auf der Bestimmung einer Desaminierung von pAPA durch TAL und PAL. Es konnte gezeigt werden, dass dieses

ungewöhnliche Substrat von beiden aufgereinigten Enzymen zu einem gewissen Grad umgesetzt werden kann.

Wichtiger als der Nachweis im Reagenzglas war aber die Funktionalität der Reaktion in den Zellen. Dazu wurde ein vergleichender Versuch mit Tyrosin und pAPA in beiden Stämmen (*E. coli* ER2566 und ER2566  $\Delta pheLATyrA$ ) durchgeführt. Mit je 1 mM Substrat wurden die Zellen für 24 h inkubiert und der Überstand durch HPLC analysiert. Die gemessenen Konzentrationen beider Substrate und der des Nebenproduktes durch die Umsetzung endogen vorhandenen Phenylalanins sind in Abbildung 3.14 dargestellt.

Bei einem Vergleich der TAL-Reaktion mit Tyrosin in proto- und auxotrophen Stämmen fiel auf, dass ähnliche Konzentrationen an pCA entstanden sind (125 bzw 110  $\mu\text{M}$ ). Ähnliches galt für die Reaktion mit der PAL (388 bzw. 440  $\mu\text{M}$ ), auch wenn der Unterschied zwischen beiden Stämmen hier absolut gesehen deutlich größer ist. Auffällig war die bedeutend höhere Produktkonzentration der PAL-Reaktion im Vergleich zu TAL. Als Nebenprodukt der PAL-Reaktion entstand zudem eine geringe Menge CiA (11  $\mu\text{M}$ ) in prototrophen, und eine etwa halb so große Menge (5  $\mu\text{M}$ ) in auxotrophen Zellen. Die Reaktion der TAL erzeugte hingegen keine CiA.



**Abb. 3.14: Aktivität von TAL und PAL *in vivo*.** Die Umsetzung von je 1 mM pAPA oder Tyrosin durch *E. coli* ER2566 und ER2566  $\Delta pheLATyrA$  mit TAL oder PAL in 24 h. Dargestellt ist auch das Produkt der Desaminierung endogenen Phenylalanins, CiA. ER, ER2566; DER, ER2566  $\Delta pheLATyrA$ ; Y, Tyrosin; AF, pAPA. Jeder Ansatz wurde als Triplikat durchgeführt, vertikale Linien markieren die Standardabweichung.

Wurde den Reaktionen pAPA als Substrat zugegeben, zeigte sich, dass prototrophe

Stämme mit TAL nicht in der Lage waren, dieses *in vivo* umzusetzen. Ausserdem reichte die Menge endogen vorhandenen Tyrosins aus, um 32  $\mu\text{M}$  pCA herzustellen. Ohne die Verfügbarkeit dieser Aminosäure, also in auxotrophen Zellen, fand das Enzym kein Substrat. Weder pCA noch pACiA waren detektierbar. Allerdings konnte gezeigt werden, dass unter anderen Kulturbedingungen zumindest geringe Mengen pACiA gebildet werden konnten.

Der vergleichbare Versuch mit PAL zeigte, dass bei einem Fehlen gefütterten Tyrosins und der Zugabe von pAPA die Reaktion weniger pCA erzeugte, obwohl dies immer noch das dominierende Produkt war (75  $\mu\text{M}$ ). pACiA und CiA erreichten ungefähr gleiche Konzentrationen (20 bzw. 23  $\mu\text{M}$ ). Im auxotrophen Stamm wurde die höchste Konzentration von pACiA der Messreihe bestimmt (74  $\mu\text{M}$ ). Kein pCA und nur wenig CiA konnten entstehen (10  $\mu\text{M}$ ).

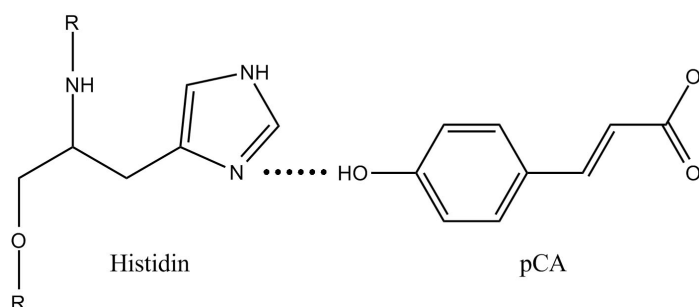
Der ausgedehnte Vergleich von Enzymen, Stämmen und Substraten zeigte, dass die Reaktivität von PAL der TAL deutlich überlegen ist, z.B. setzte die PAL - trotz der Konkurrenz zu endogenen Prozessen wie der Proteinbiosynthese - bis zu 44 % Tyrosin um, während nur maximal 12,5 % durch die TAL erreicht wurden. Wichtiger für die weiteren Versuche waren allerdings die Ergebnisse zur pAPA-Desaminierung. Die TAL konnte in diesen Ansätzen in keinem Fall pACiA erzeugen, während die PAL sowohl in prototrophen, aber vor allem in den auxotrophen Zellen mit 7,5 % Umsatz für dieses Substrat aktiv war. Die Daten spiegeln die in Abschnitt 3.1 geäußerten Effekte der Verwendung proto- und auxotropher Stämme gut wider. Auch wenn die PAL bereits in ER2566 Zellen pACiA aus pAPA erzeugen konnte, erst beim Fehlen der anderen Substrate wurde diese Säure das dominierende Produkt. In allen Versuchen mit PAL wurde nur wenig CiA erzeugt, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass nicht zuviel „Kapazität“ an diese unerwünschte Reaktion vergeben wird. Die Angaben aus der Literatur (80), die bezüglich Tyrosin eine höhere Aktivität der TAL als der PAL ausweisen, konnten hier nicht bestätigt werden. Dies mag durch die Ausführungen zur suboptimalen Exprimierbarkeit der TAL (Abschnitt 3.3.2) oder der zu geringen Aktivität dieses Enzyms (Abschnitt 3.3.3) begründet werden.

Herauszustellen ist, dass die Versuche zur *in vitro* und *in vivo* Aktivität der Ammoniak Lyasen gezeigt haben, dass vor allem die PAL in auxotrophen ER2566 Zellen zur Umsetzung von pAPA in pACiA geeignet ist. Daher fand diese Konstellation auch im weiteren Vorgehen Berücksichtigung. Die TAL wurde wegen der unzureichenden *in vivo* Aktivität nicht für den Aufbau eines gesamten pACiAlk-Biosynthesewegs berücksichtigt. Im folgenden Abschnitt wird zudem eine Alternative zur Verwendung auxotropher Zellen dargestellt, bei der vor allem der komplexe Umgang bei Anzucht, Induktion und

in der Produktionsphase mit diesen Bakterien erleichtert werden könnte.

### 3.3.6 Änderung der Substratdetermination für *Rs*TAL

Die Bindung des Substrates Tyrosin in das aktive Zentrum der *Rs*TAL wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem Histidin an Position 89 und der *p*-Hydroxylgruppe der Aminosäure vermittelt (39, 80).



**Abb. 3.15: Substratdetermination der *Rs*TAL.** Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Histidinrest 89 der TAL und der Hydroxylgruppe des pCA determiniert Tyrosin als das vorrangige Substrat. Abbildung gemäß der publizierten Kristallstruktur (39).

Eine Analyse der Angaben von K. Watts und G. Louie (39, 80) unter Zuhilfenahme der publizierten Kristallstruktur des Enzyms mit dem Reaktionsprodukt pCA (<http://www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=2O7B>) erlaubte eine vereinfachte Modellierung der Substratdetermination. Abbildung 3.15 deutet schematisch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen beiden Molekülen an.

Eine Auswertung dieses Modells zeigt, dass Histidin als Protonenakzeptor und Tyrosin bzw. pCA als Protonendonator fungiert. Für die Reaktion mit pAPA, das ein potentieller Protonendonator ist, wurde eine Umkehrung des Modells vorgenommen und eine Auswahl möglicher Protonenakzeptoren ausgesucht.

Eine Analyse von funktionellen Gruppen in Frage kommender Bindungspartner führte zu folgenden Ergebnissen:

- Carboxylgruppen (-COOH) - Aspartat (D), Glutamat (E)
- Säureamide (-CONH<sub>2</sub>) - Asparagin (N), Glutamin (Q)
- Hydroxylgruppen (-OH) - Serin (S), Threonin (T), Tyrosin (Y)
- Methylsulfidgruppe (-SCH<sub>3</sub>) - Methionin (M)

Besonders an der Auswahl sind vor allem Methionin und Prolin. Deren Verwendung begründet sich zum einen in der Fähigkeit der Methylsulfidgruppe Wasserstoffbrückenbindungen ausbauen zu können (81), und zum anderen durch die destabilisierende Eigenschaft von Prolin auf  $\alpha$ -Helices (51). Durch die Lage von Position 89 in einer solchen Region dient diese Aminosäure als Negativkontrolle.

Die Mutagenese der *RsTAL* wurde entsprechend den Angaben in Abschnitt 2.2.9 mit dem von GenScript gelieferten Konstrukt pUC57-TAL durchgeführt. Die dazu verwendeten Primer sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Nach der Mutagenese angewachsene Klone wurden durch Sequenzierung überprüft. Zeigten Klone die gewünschte Mutation, wurde die TAL in den Expressionsvektor pETDuet-1 übertragen.

Der Einfluss der Mutation an Position 89 wurde für alle zehn Klone durch *in vivo* und *in vitro* Versuche bestimmt. Obwohl beide Testreihen nicht vollständig gleiche Ergebnisse lieferten, gab es große Ähnlichkeiten (Abbildung 3.3).

Zuerst erfolgte ein Test auf den Umsatz von Tyrosin zu pCA. Dabei wurde in beiden Versuchsreihen festgestellt, dass nur His89 das TAL Enzym zu dieser Reaktion befähigt. Alle anderen Substituenten zeigten nur sehr geringe Aktivitäten in den *in vivo* Versuchen und keine Aktivität *in vitro*.

Durch die Mutationen Asp89, Asn89, Gln89, Met89 und Thr89 entwickelte die TAL Aktivität für Phenylalanin. Vor allem der Einbau von Glutamin erzeugte eine sehr gute PAL Aktivität, *in vivo* entstand bei den Versuchen das 40fache an CiA im Vergleich zu His89. Hier zeigte auch Asparagin eine ebenso hohe Aktivität, die aber durch die *in vitro* Versuche nicht widerspiegelt wurde. Methionin führte in beiden Fällen zu PAL-Aktivität, wenn diese auch mit aufgereinigtem Enzym deutlich höher war als bei den „Ganz-Zellkatalysatoren“. Aspartat konnte nur *in vivo* als aktiv für Phenylalanin nachgewiesen werden, wohingegen Threonin *in vitro* einen dem His89 ähnlichen Umsatz zeigte. Glutamat, Serin, Tyrosin und Prolin zeigten in keinem Ansatz eine Aktivität.

**Tab. 3.3: Aktivitäten der *RsTAL*-Mutanten**

Pos. 89	pAPA	<i>in vivo</i>		<i>in vitro</i>	
		Tyr	Phe	Tyr	Phe
Asp	0	-	+	-	-
Asn	0	-	++	-	-
Glu	k.A.	-	-	-	-
Gln	0	-	++	-	+
Met	-	-	+	-	+
Ser	0	-	-	-	-
Thr	-	-	-	-	0
Tyr	-	-	-	-	-
Pro	+	-	-	-	-

Änderung der Aktivität in Bezug auf His89:

-, schlechter; 0, vergleichbar; +, verbessert; ++, deutlich verbessert.

Das Hauptaugenmerk dieses Versuchs lag allerdings auf der Umsetzung von pAPA durch die TAL und ihre Mutanten. Aufgrund der mangelnden Messbarkeit bei *in*

*in vitro* Versuchen wurde nur der Umsatz von Zellen betrachtet. Insgesamt konnte bei allen Proben nur ein sehr geringer Umsatz gemessen werden. Dies stand in Einklang mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.3.5. Einer groben Abschätzung der entstandenen pACiA-Konzentrationen zu Folge gab es bei Asp89, Asn89, Gln89 und Ser89 einen vergleichbaren Umsatz. Die Substituenten Met89, Thr89, aber vor allem Tyr89 zeigten eine deutlich verringerte Aktivität. Nur Pro89 führte zu einer merklich erhöhten pACiA-Konzentration. Glu89 konnte wegen technischer Probleme nicht ausgewertet werden.

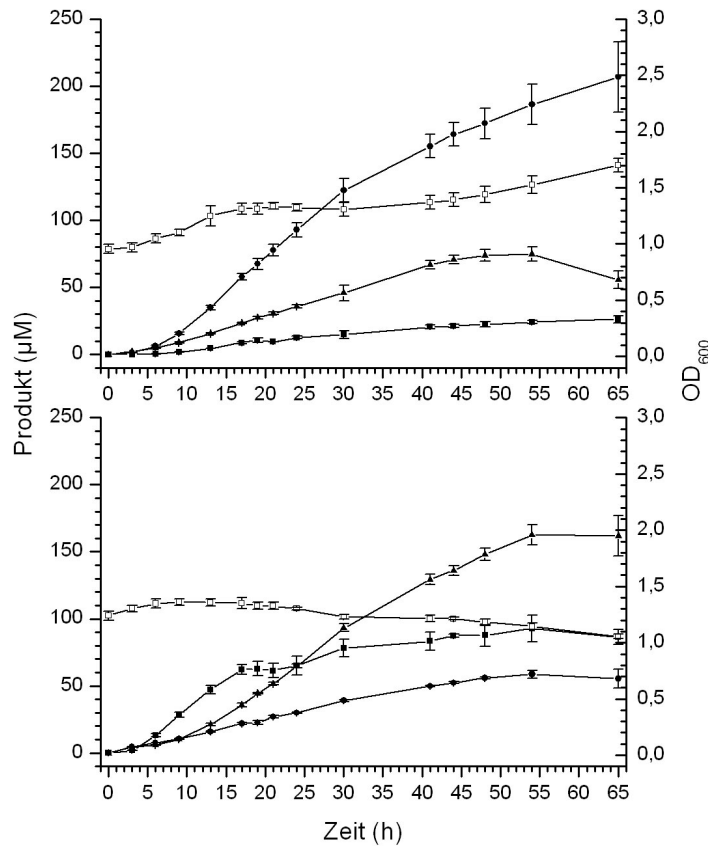
Diese Ergebnisse zeigten, dass die Mutation von His89 deutliche Folgen auf den Umsatz von Tyrosin oder Phenylalanin haben kann. Interessanterweise hat Pro89 für pAPA nicht den erwarteten Effekt einer Negativkontrolle. Die daraus zu ziehenden Schlüsse werden in der Diskussion erläutert.

### 3.3.7 Desaminierung rekombinant synthetisierten pAPAs

Nach den - separat geführten - erfolgreichen Beweisen für die Möglichkeit, pAPA in proto- und auxotrophen *E. coli* Zellen ohne Präkursor synthetisieren, und gefüttertes pAPA ebenso zu pACiA umsetzen zu können, musste die Kopplung beider Reaktionswege durchgeführt werden. Hierzu wurden beide Stämme mit den Plasmiden pCDF-Duet-*CgADCS*, pACYCDuet-*SvADPDH-SvADCM* und pETDuet-*ZmPAL* sukzessive transformiert.

Bei der Biosynthese von pACiA (Abbildung 3.16) fand sowohl bei den prototrophen (a), als auch bei den auxotrophen (b) Zellen kein deutliches Wachstum statt. Während die ER2566 Zellen zumindest zwei kleinere Wachstumsphasen hatten, und die OD<sub>600</sub> immerhin von 1,0 auf 1,7 im Verlauf der 65 h Fermentation stieg, konnte für die ER2566  $\Delta$ *pheLATyrA* Zellen sogar eine Abnahme der optischen Dichte von 1,2 auf 1,0 vermerkt werden. Die prototrophen Zellen reicherten bis zum Abbruch der Kultivierung über 200  $\mu$ M pCA an. Die maximale Konzentration von CiA betrug 75  $\mu$ M, bevor ein Abbau stattfand. Am geringsten wurde pACiA angereichert. Die Konzentration dieser Säure - ohne Zugabe von Präkursoren - betrug am Ende der Fermentation 26  $\mu$ M und zeigte eine aufsteigende Tendenz.

Stellte für die prototrophen Zellen pCA das Hauptprodukt dar, dominierte CiA das Spektrum der Produkte bei auxotrophen Zellen. Obwohl zwischen 54 und 65 h keine weitere Anreicherung stattfand, erreichte das Desaminierungsprodukt von Phenylalanin eine Konzentration von 160  $\mu$ M im Überstand. pCA konnte eine maximale Konzentration von 60  $\mu$ M nicht übersteigen. Die für diese Arbeit interessante Säure pACiA



**Abb. 3.16: Biosynthese von pACiA.** Die durch ADCS, ADCM, ADPDH und PAL-Expression vermittelte Biosynthese von pACiA in (a) ER2566 und (b) ER2566  $\Delta pheLATyrA$  Zellen. ■, pACiA; ●, pCA; ▲, CiA; □, OD<sub>600</sub>. Jeder Versuch wurde als Triplikat durchgeführt, Standardabweichungen sind durch vertikale Linien markiert.

erreichte 93  $\mu\text{M}$  und war damit höher konzentriert als das ebenfalls endogen zur Verfügung stehende Tyrosin.

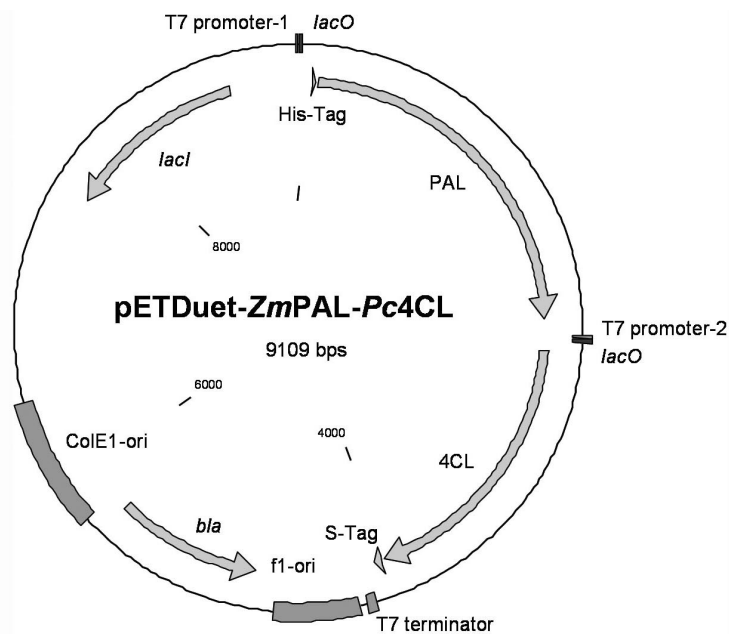
Der Versuch belegte, dass die artifizielle Verknüpfung von pAPA-Biosynthese und -Desaminierung in *E. coli* vor allem in Phenylalanin- und Tyrosinauxotrophen funktionell ist.

### 3.4 Biosynthese von pACiAlk

#### 3.4.1 Doppelkonstrukte mit *RsTAL*, *ZmPAL*, *Pc4CL*, *ZmCCR* und *ZmCAD*

Das Ziel der bisher beschriebenen Versuche war die Biosynthese von pACiA. Die Vervollständigung des Reaktionswegs in Richtung von pACiAlk erforderte die Konstruktion weiterer Expressionsvektoren. Dazu wurde die 4CL jeweils mit PAL oder TAL auf

einem Plasmid zusammengebracht. Das Konstrukt pETDuet-ZmPAL-Pc4CL entstand durch die Übertragung der Ammoniak Lyase über die Schnittstellen *EcoRI* und *NotI* in die erste MCS von pETDuet-Pc4CL (Abbildung 3.17). pETDuet-RsTAL-Pc4CL wurde von F. Jansen (Abschnitt 2.1.6) zur Verfügung gestellt. Auch die Doppelkonstrukte pRSFDuet-ZmCCR-ZmCAD und pETDuet-ZmCCR-Pc4CL entstammen der Biosynthese von pCalk.



**Abb. 3.17: pETDuet-ZmPAL-Pc4CL.** Dargestellt ist das Doppelkonstrukt mit PAL und 4CL. Eingezeichnet sind die ORFs und die dazugehörigen Tags sowie die wichtigsten genetischen Elemente des Vektors.

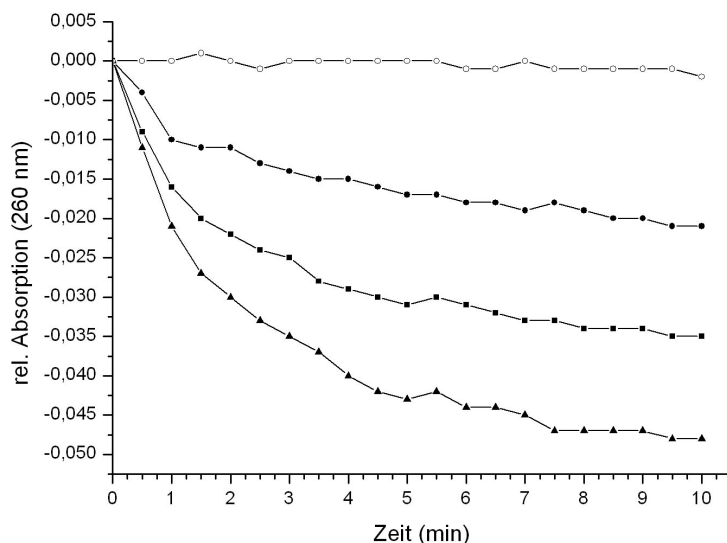
### 3.4.2 *In vitro* Aktivierung und Reduktion von pACiA

Die Aktivierung kommerziell erhältlicher pACiA durch 4CL Enzympräparationen wurde durch F. Jansen durchgeführt. Aus Reaktionsansätzen dieser Versuche konnte pACi-CoA aufgereinigt und durch verschiedene Verfahren verifiziert werden. Für weitere Versuche wurde der Thioester freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Reduktion des Thioesters pACi-CoA wurde *in vitro* mit aufgereinigtem CCR-Protein durchgeführt. Da keine Konzentration des Substrates bekannt war, wurden verschiedene Volumina zwischen 0 und 15  $\mu\text{l}$  eingesetzt und die Reaktion am Photometer verfolgt. Die hierbei aufgenommenen Daten sind in Abbildung 3.18 dargestellt.

Abhängig von der eingesetzten Menge an pACi-CoA fand die Reduktion zu pACi-Ald statt. Je höher die Konzentration des Substrates war, desto schneller verlief die





**Abb. 3.18: Reduktion von pACi-CoA durch CCR.** Durch die Aktivität der CCR werden verschiedene Konzentrationen einer pACi-CoA Lösung unbekannter Konzentration zu pACiAld reduziert. ○, 0 µl; ●, 5 µl; ■, 10 µl; ▲, 15 µl; Reaktionsvolumen, 300 µl.

Reaktion. Nach circa 10 min konnte bei keinem der Ansätze eine weitere Abnahme der Absorption gemessen werden. Ohne Zugabe des Thioesters wurde kein Aldehyd gebildet. In parallelen Versuchen (nicht dargestellt) konnte gezeigt werden, dass nur aktivierte Säuren Substrate für die CCR sein können.

### 3.4.3 Biotransformation von pACiA durch 4CL und CCR

Bevor eine Vervollständigung des bisher aufgebauten Reaktionsweges mit 4CL, CCR und CAD erfolgen konnte, musste der Umsatz von pACiA durch die 4CL *in vivo* nachgewiesen werden. Anhand von aufgereinigtem Enzym wurde dieser Beweis bereits durch F. Jansen erbracht (s.o.). Ein direkter Nachweis *in vivo* erfolgte nicht, da eine Ausschleusung des relativ großen und für die Zelle wertvollen CoA (als Derivat) nicht zu erwarten war.

Der Aktivitätsnachweis für die 4CL wurde daher in Verbindung mit CCR durchgeführt. Beide Enzyme, integriert in pETDuet-1, wurden in *E. coli* BL21 exprimiert. Dazu konnte LB-Medium verwendet werden, da ohne Ammoniak Lyase eine Interaktion von Medienbestandteilen mit 4CL und CCR unwahrscheinlich war. Bei einer  $OD_{600}$  von 1,0 fand die Induktion für 2 h statt. Im Anschluss daran wurde 1 mM pACiA dem Medium zugegeben und für 3 h inkubiert. Nach dieser Zeit war eine deutliche Verfärbung des Überstandes vom typischen braun-gelb des LB-Mediums hin zu einem gelb-grünen Farbton zu bemerken.

300 ml des Reaktionsansatzes wurden steril filtriert und bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Im gefrorenen Zustand trat ein Farbumschwung ins rot-bräunliche ein, der beim Auftauen größtenteils verschwand. Allerdings bildete sich durch das Einfrieren ein brauner Niederschlag, der abzentrifugiert wurde. Eine Aufreinigung des Überstandes erfolgte entsprechend Abschnitt 2.2.16 über eine strata-X-AW Säule. Die Elution fand mit Methanol statt. Das Eluat war von tieferer Farbe und zunächst klar. Nach wenigen Minuten bildete sich ein brauner Niederschlag, der durch Zentrifugation abgetrennt wurde, dann aber erneut erschien. Zur  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse wurde ein Aliquot des Eluates eingedampft und in  $\text{D}_2\text{O}$  überführt. In diesem Lösungsmittel konnte kein weiteres Entstehen des braunen Niederschlags beobachtet werden.

Die Analyse der, durch den NMR-Service des Instituts für Organische Chemie (RWTH Aachen) erzeugten, Daten zeigte ein komplexes Spektrum an Verschiebungen. Auf eine ausführliche Beschreibung der  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse wird in diesem Rahmen verzichtet. Die Auswertung wurde freundlicherweise von V. Gego (Lehrstuhl für Technische Chemie und Petrolchemie) durchgeführt. Aus dem resultierenden Spektrum (Anhang, Abbildung 6.4) konnten mit Ausnahme der Hydroxyl- und der Aminogruppe alle relevanten Wasserstoffatome einwandfrei identifiziert werden. In der Abbildung sind die entsprechenden C-Atome den Signalen durch Angabe der Nummer bzw. des Präfix zugeordnet.

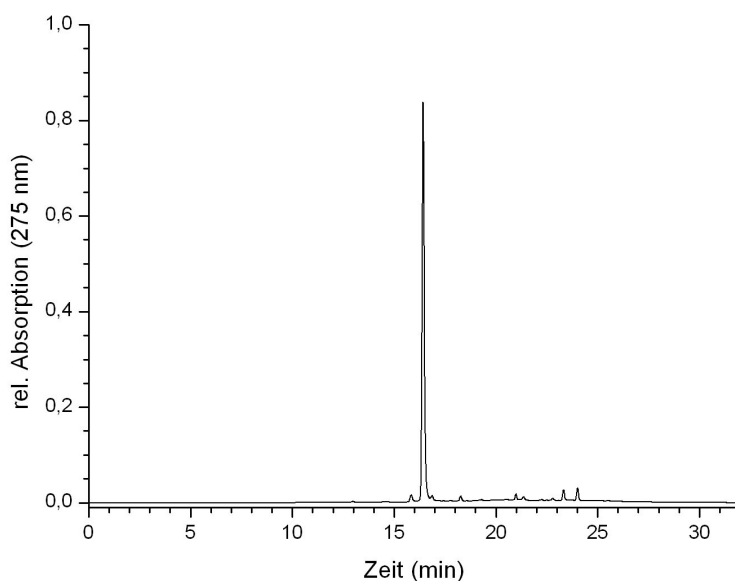
Aus den Daten ist erkennbar, dass die Wasserstoffatome der Positionen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , sowie die der ungesättigten C-Atome am aromatischen Ring bestimmten Verschiebungen entsprechen. Allerdings zeigt das Spektrum viele weitere Verschiebungen, deren Ursprung unklar war. Neben nicht abgetrennten Kulturrückständen (Medium, exkretierte Komponenten) wurden auch Lösungsmittel wie Wasser und Methanol gefunden. Anscheinend war die Probe nicht bis zur völligen Trockene vor Resuspendierung in  $\text{D}_2\text{O}$  eingeengt worden. Obwohl nicht mit Methanol ( $\text{MeOH}$ ) während der Extraktion gearbeitet wurde, konnte dieses interessanterweise trotzdem identifiziert werden. Auch (nicht eingezeichnet) besteht die Möglichkeit, dass andere Signale den Gerätschaften anhaftende Stoffe repräsentieren, so zum Beispiel Schliff fett. Trotz großer räumlicher Trennung konnte es folglich zu Kontaminationen kommen. Aufgrund der vielen unbekannt Signale war eine Identifikation der Wasserstoffatome der Hydroxyl- und Aminogruppe nicht möglich. O und N schirmen diese ausreichend gut ab, um eine genaue Prognose über deren Verschiebung nicht zuzulassen. Eine Zuordnung innerhalb des Hintergrundes übriger Signale war somit nicht möglich.

Erwartet wurden für die NMR-Analyse: Dublett für  $\gamma$  (identische Kopplung beider H mit H von  $\beta$ ), Dublett-Triplett für  $\beta$  (Dublett wg. Kopplung mit H von  $\alpha$ , Triplett

wg. Kopplung mit 2H von  $\gamma$ ), Dublett für  $\alpha$  (koppelt mit H von  $\beta$ , keine Kopplung mit aromatischem Ring), Dublett für 2,6 (koppelt jeweils identisch mit H von 3 bzw. 5, keine Kopplung zu  $\alpha$ ), Dublett für 3,5 (koppelt jeweils identisch mit H von 2,6, N schirmt dessen 2H ab). Aus der Abbildung ist zu entnehmen, dass Erwartungen und Ergebnisse übereinstimmen. Dies gilt auch für die entsprechenden Kopplungskonstanten von  $\alpha$  und  $\beta$  bzw.  $\gamma$  sowie der Triplettaufspaltung von  $\beta$ .

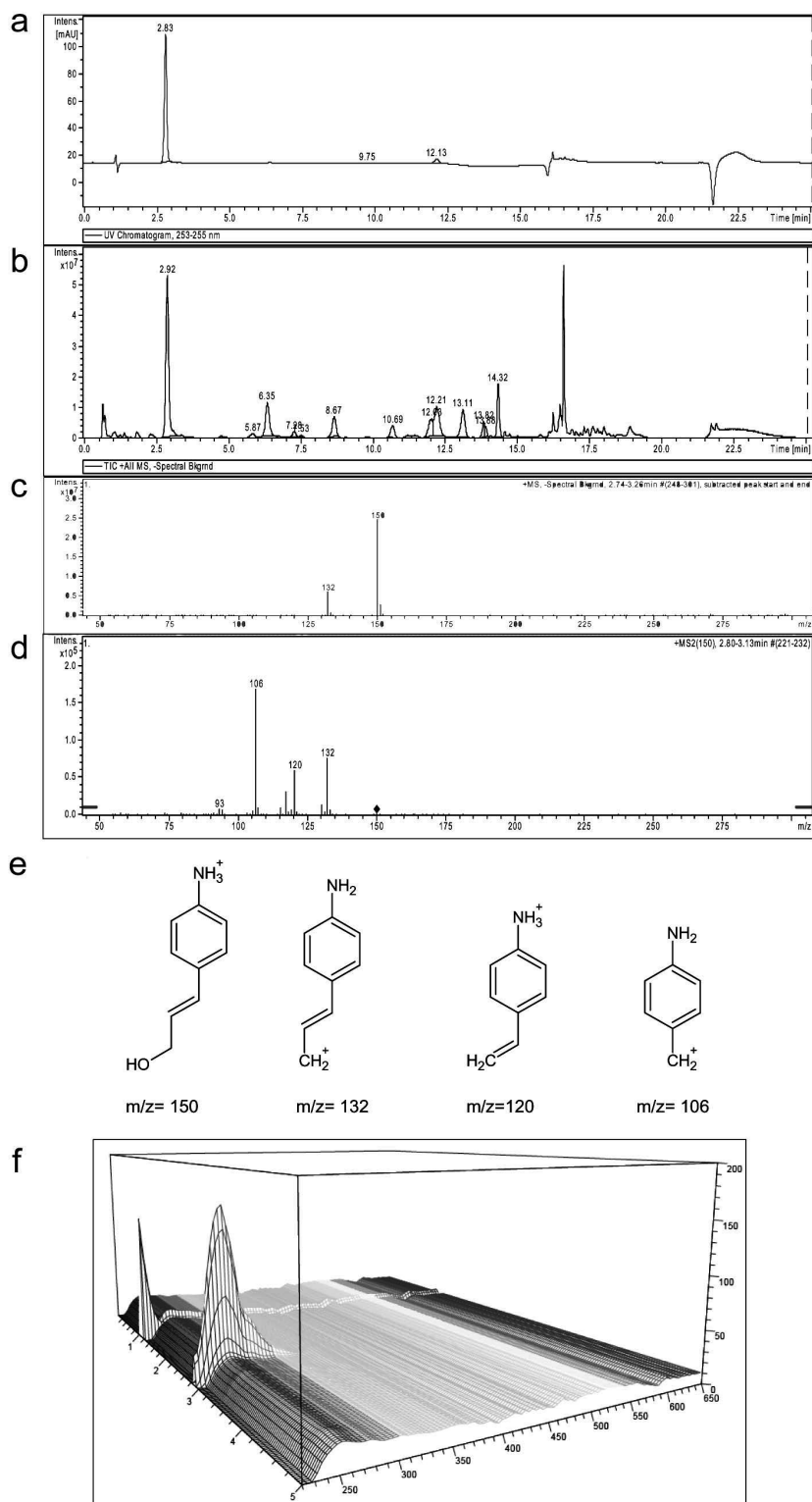
Die NMR konnte damit zeigen, dass ein Aromat mit Prop-1-en Substituent vorlag. Das Bestehen der potentiell instabilen Doppelbindung im Substituenten war damit gesichert. Die funktionellen Gruppen konnten, wie oben erklärt, nicht bestätigt werden.

Die zur NMR-Analyse verwendete Probe wurde in einer 1:100 Verdünnung durch HPLC aufgetrennt. Das entstandene Chromatogramm ist in Abbildung 3.19 dargestellt. Ein Signal bei 16,43 min stellte 90 % der gesamten Peakflächen bei 275 nm und war damit das Hauptprodukt. Trotz der hohen Verdünnung wurde immer noch eine starke Absorption erzeugt (0,83 AU).



**Abb. 3.19: HPLC-Analytik der NMR-Probe.** Die chromatographische Auftrennung durch HPLC des  $^1\text{H}$ -NMR-Analyseansatzes.

Das Eluat einer identischen Extraktion wurde zur Analyse an das Fraunhofer ICT zu D. Schmiedl geschickt. Hier wurde durch LC-MS eine Bestimmung der Bestandteile des Eluates durchgeführt. In Abbildung 3.20 sind exemplarisch die wichtigsten Ergebnisse des Prüfberichtes aufgeführt. Die HPLC Auftrennung (a) bei 254 nm zeigte ein sehr deutliches Signal bei 2,92 min. Weitere vergleichbar hohe Peaks konnten hier nicht detektiert werden. Die folgende Analyse durch MSD Ion Trap (b) dagegen



**Abb. 3.20: Ausgewählte Daten der LC-MS Analyse.** a) HPLC-DAD Chromatogramm (245 nm); b) MSD Ion Trap Analyse der HPLC Auftrennung; c) MS-Spektrum des Signals der HPLC bei 2,92 min; d) MS<sup>2</sup> des Ions mit  $m/z=150$  aus c; e) mögliche Fragmentierungszustände von pACiAlk durch MS<sup>2</sup>; f) Ausschnitt des zu a) gehörigen DAD Spektrums von 0-5 min (Quelle: Analysebericht D. Schmiidl, 10.10.2008).

fürhte zu einer Vielzahl verschiedener Signale mit unterschiedlichsten Massen ( $m/z = 148 - 298$ , nicht dargestellt). Dem Signal bei 2,92 min konnte so eine Masse von 150 g/mol  $[M+H]^+$  zugeordnet werden. Eine MS-Analyse dieses Signals (c) wies ebenfalls diese Masse aus, zusätzlich wurde noch ein weiteres Ion mit einer Masse von 132 g/mol detektiert (s.u.). Das darauf folgende MS<sup>2</sup> Experiment mit der Verbindung der Masse 150 g/mol (d) führte zu Fragmenten mit den Massen 106, 120 und 132 g/mol, für die Strukturvorschläge in (e) angegeben sind. Das Fragmentmuster deutet, wie auch die Analysen der vollständigen Verbindung, auf das Vorhandensein von pACiAlk hin. Das in Abbildung 3.19 gezeigte Chromatogramm weist somit den aromatischen Alkohol aus. Zusätzlich wurde durch den Diodenarraydetektor (DAD) ein Spektrum der ersten 5 min der HPLC-Auftrennung aufgezeichnet. Diese wies dem pACiAlk ein Absorptionsmaximum von 275 nm zu. Unter den weiteren Signalen (b) wurde auch eine Verbindung ausfindig gemacht (12,21 min), die pACiAlD sein könnte. Dies konnte durch MS bestätigt werden, eine MS<sup>2</sup>-Messung erfolgte allerdings nicht.

Die Ergebnisse der Analyse von D. Schmiedl, auch in Verbindung mit den NMR-Daten, zeigten deutlich, dass die gesuchte Verbindung, pACiAlk, durch die Aktivität von 4CL und CCR aus pACiA erzeugt werden konnte. Der Aldehyd wurde zwar ebenfalls nachgewiesen, das Hauptprodukt wurde aber durch den Alkohol gestellt. Die Reduktion von Aldehyd zu Alkohol wurde somit ohne CAD Aktivität durchgeführt. Bereits in vorangehenden Analysen wurde gezeigt (Daten nicht aufgeführt), dass es während der Fermentation anscheinend nicht zu einer Anreicherung des Aldehyds kommt.

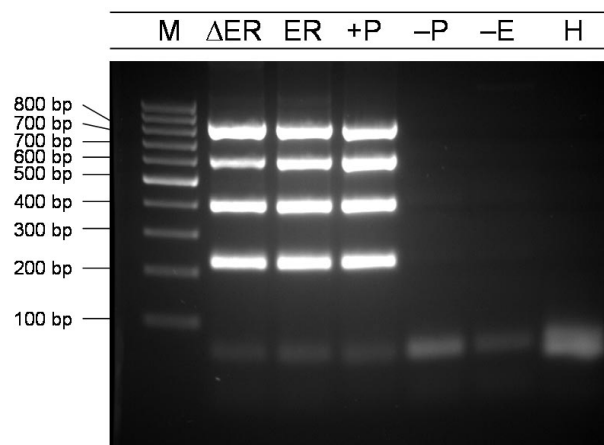
#### 3.4.4 Aufbau eines kompletten Reaktionswegs

In den vorangegangenen Abschnitten ist ausführlich die Funktionalität aller Einzelschritte zur Biosynthese von pACiAlk belegt worden. Einzige Ausnahme ist die CAD. Aufgrund mangelnder Verfügbarkeit des Aldehyds konnten weder *in vitro* noch *in vivo* Analysen durchgeführt werden. Nicht dargestellt wurden Ergebnisse zur Verknüpfung von TAL und 4CL *in vitro*, die in Zusammenarbeit mit F. Jansen durchgeführt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass durch diese beiden Enzyme pAPA in pACi-CoA umgewandelt wird.

Als Resultat dieser Vorversuche erfolgte die Zusammensetzung eines kompletten Reaktionswegs mit allen vier Plasmiden (pCDFDuet-*CgADCS*, pACYCDuet-*SvADPDH-SvADCM*, pETDuet-*ZmPAL-PcPAL* und pRSFDuet-*ZmCCR-ZmCAD*) in ER2566 und ER2566  $\Delta$ *pheLATyrA* Zellen. Die Anzucht auf OD<sub>600</sub> 1,0 wurde in M9-Medium

mit 2 % Glycerin, 1 % Glukose, 20  $\mu\text{g/ml}$  Phenylalanin/Tyrosin und allen vier Antibiotika durchgeführt. Bei der Induktion wurde das Medium ohne Glukose aber mit 1 mM IPTG eingesetzt. Nach 3 h Induktion wurden die Zellen in ein Medium ohne Glukose und Aminosäuren, aber mit IPTG überführt.

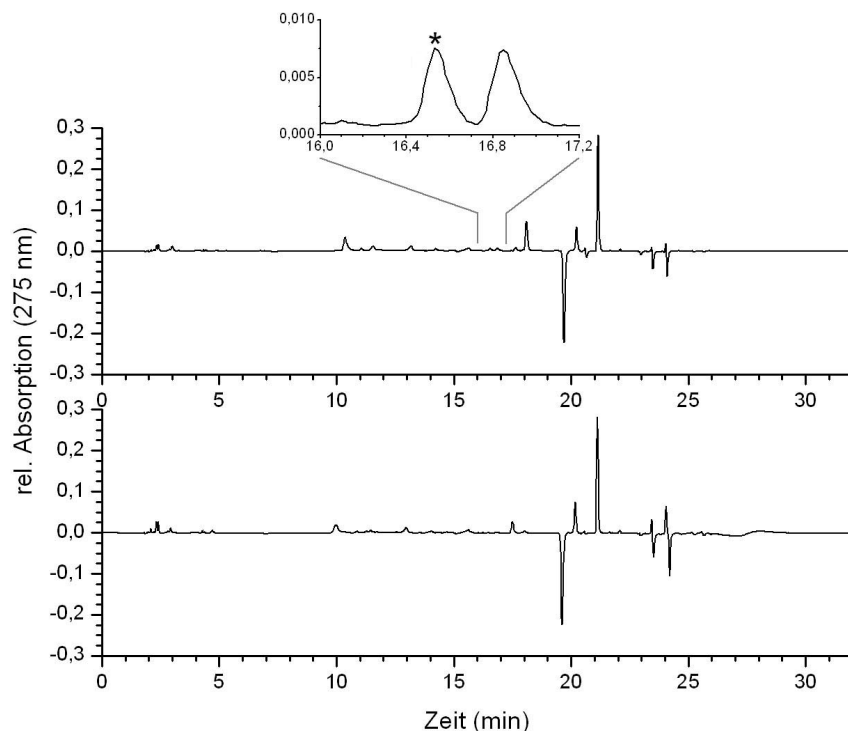
Als Kontrolle auf den Erhalt aller Plasmide und damit der Expression aller Proteine wurde mit den Primern zum Nachweis fertiger Konstrukte je eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die Oligonukleotide flankieren dabei ein Fragment, das von dem Integrat aus MCS I in das aus MCS II reicht. Produkte sollten also nur entstehen können, wenn die richtigen Konstrukte als Matrize vorliegen. Der Nachweis konnte für auxo- und prototrophe Zellen erbracht werden (Abbildung 3.21). Nur bei Vorhandensein transgener Zellen oder bei Zugabe aller Plasmide entstanden die gewünschten Fragmente von 223 bp (pCDFDuet-*CgADCS*), 402 bp (pACYCDuet-*SvADPDH-SvADCM*), 605 bp (pRSFDuet-*ZmCCR-ZmCAD*) und 821 bp (pETDuet-*ZmPAL-Pc4CL*). Reaktionsgemische ohne Plasmide, ohne Zellen oder mit  $\text{H}_2\text{O}$  führten nicht zu einem Amplifikat.



**Abb. 3.21: Kolonie-PCR aller Plasmide.** Fragmente der vier einzelnen Expressionsvektoren separat durch Kolonie-PCR nachgewiesen. Gemische aller vier Reaktionen von je *E. coli* ER2566  $\Delta\text{pheLATyrA}$  ( $\Delta\text{ER}$ ), ER2566 (ER), allen Plasmiden (+P), ER2566 ohne Plasmide (-P), ohne Bakterien (-E) und mit Wasser (H). M, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder.

Der Überstand beider Kulturen wurde zu den Zeitpunkten 0 und 24 h nach Induktion durch HPLC analysiert. Eine Darstellung der Subtraktionschromatogramme beider Zeitpunkte für proto- (a) und auxotrophe (b) Zellen findet sich in Abbildung 3.22. Die ER2566 Zellen synthetisierten innerhalb der 24 h eine Reihe von Produkten, die nicht identifizierbar waren. Vier Stoffe, die zum Zeitpunkt der Induktion vorlagen, konnten nicht mehr detektiert werden (negative Signale). Definitiv wurde in beiden Ansätzen, wenn auch sehr viel schwächer in den auxotrophen Zellen, pCAlk (18,1 min) gebildet. Ein Signal bei 20,2 min deutete auf CiA hin. Wichtig war aber, dass in den prototrophen Zellen bei 16,5 min pACiAlk detektiert werden konnte. Das Signal war äußerst

gering, aufgrund der Subtraktion aber signifikant als diese Substanz zu identifizieren. In den auxotrophen Zellen trat bei 16,5 min kein Signal auf.



**Abb. 3.22: pACiAlk-Biosynthese in ER2566.** Subtraktionschromatogramme der HPLC Detektion der Zeitpunkte 24 und 0 h nach Induktion für ER2566 (a) und ER2566  $\Delta pheLATyrA$ . Der Einsatz zeigt eine Vergrößerung des Bereichs von 16,0 bis 17,2 min. pACiAlk ist durch ein Sternchen markiert.

Zur Überprüfung der Funktionalität der einzelnen Reaktionsfragmente - pAPA-Biosynthese, pAPA-Desaminierung und pACiA-Reduktion - in auxotrophen Zellen wurden pAPA und pACiA zugeführt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Ohne Zugabe von Präkursoren entstanden geringe Mengen pAPA. Bei Zugabe von 1 mM pAPA konnten geringe Mengen von pACiA und pACiAlk beobachtet werden. Mit 1 mM pACiA entstand nur sehr wenig pAPA und ein starkes Signal, das sich über die Retentionszeiten von pACiA und pACiAlk erstreckt. Ohne Fütterung und mit pAPA wurden zudem erhöhte Konzentrationen von pCAlk gemessen.

**Tab. 3.4: Fütterung auxotropher Zellen**

Substrat	pAPA	pACiA	pACiAlk	pCAlk
ohne S.	+	-	-	+
pAPA	?	+	+	+
pACiA	+	?	+	-

+ / (-), (nicht) nachweisbar; ?, deckt sich mit Präkursor.

---

Die Verknüpfung aller Reaktionen zu einem gemeinsamen Biosyntheseweg führte in den ER2566 Zellen zur Produktion und Exkretion von pACiAlk. Die auxotrophen Zellen, bislang geeigneter für die Umsetzungen der aminierten Produkte durch Reaktionen der Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese, schienen dagegen ohne Zugabe von Vorstufen kein pACiAlk zu synthetisieren.



---

## 4 Diskussion

### 4.1 Biosynthese von pAPA

pAPA ist eine dem Tyrosin analoge Aminosäure, die in der Natur aber scheinbar nur bei der Biosynthese von Chloramphenicol in *Streptomyces* vorkommt (15). In den Planungen zur rekombinanten Produktion von pACiAlk in *E. coli* durch Reaktionen der Chloramphenicol-, Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese ist diese Verbindung ein zentrales Intermediat. Durch die Einschleusung von pAPA als unnatürliches Substrat für TAL/PAL, 4CL, CCR und CAD kann erst die Verknüpfung aller Reaktionswege in Hinblick auf die Biosynthese des aminierten aromatischen Alkohols funktionieren.

Die Idee, eine durch ADCS, ADCM und ADPDH katalysierte Umsetzung von Chorismat zu pAPA in *E. coli* zu etablieren, wurde bereits von R. Mehl (46) realisiert. Das Ziel der dort beschriebenen Arbeiten war die Erweiterung des genetischen Codes um diese ungewöhnliche Aminosäure und deren Einbau in ein Protein.

Ein orthogonales tRNA-Synthetase-Paar mit Tyrosinspezifität aus *Methanococcus jannaschii* wurde für die Suppression eines Amber-Stopcodons mit pAPA verändert. Durch Mutagenese fünf verschiedener Aminosäurereste der Tyrosyl-tRNA-Synthetase konnte ein Klon erzeugt werden, der spezifisch pAPA auf die entsprechende tRNA überträgt. Durch Veränderung des Anticodons der tRNA wurde eine Erkennung des Amber-Stopcodons (UAG) ermöglicht. Das Gen für Walmyoglobin, mit TAG anstelle des vierten Codons, konnte nur unter Koexpression des mutagenisierten orthogonalen tRNA-Synthetase-Paares bei Vorhandensein von pAPA in *E. coli* transkribiert und anschließend translatiert werden. Die Aminosäure wurde dabei sowohl durch Fütterung als auch durch rekombinante Biosynthese bereitgestellt. Die Gene ADCS, ADCM und ADPDH aus *S. venezuelae* dienten hierbei zur endogenen Produktion von pAPA.

Für die vorliegende Studie sind diese Ergebnisse bedeutsam, da bereits gezeigt werden konnte, dass pAPA in *E. coli* synthetisiert werden kann, und dass dazu nur die oben genannten Enzyme benötigt werden. Die Aktivität der in *Streptomyces* ebenfalls beteiligten Aminotransferase kann anscheinend durch *E. coli*-eigene Enzyme wie *tyrB*, *aspS* und *ilvE* kompensiert werden. Diese können verschiedene Ketosäuren als Substrate verwenden (50) und demnach auch eine Aminogruppe auf 4AP übertragen.

### 4.1.1 Substitution der *Sv*ADCS durch *Cg*ADCS

Die ADCS ist, im Gegensatz zu ADCM und ADPDH, ein Enzym, das neben der Chloramphenicolbiosynthese der Streptomyceten auch in der Folatbiosynthese zu finden ist. In Bezug auf die Arbeiten von R. Mehl (46), aber auch anhand einer Durchsicht der Literatur und Sequenzdatenbanken, konnten in *S. venezuelae* DSM 40230 zwei Cluster identifiziert werden, die beide in Hinsicht auf die Chloramphenicolbiosynthese beschrieben sind. Während im „*pap*“-Cluster (AB116234) das ADCS-Gen *papA* enthalten ist, welches bei R. Mehl Verwendung findet, ist im „*cml*“-Cluster (AF262220) *cmlB* (auch als „*pabAB*“ bezeichnet) zu finden. Beide Gene wurden auf ihre Eignung für die Biosynthese von pACiAlk *in silico* untersucht. Durch eine Analyse der offenen Leseraster konnte festgestellt werden, dass GC-Gehalt und codon usage deutliche Abweichungen zum geplanten Wirt *E. coli* aufweisen.

Während das Enterobakterium laut dieser Analyse (Abschnitt 3.2) einen GC-Gehalt von 52,4 % besitzt, einem der Literatur von 51 % entsprechenden Wert (66), erreichen die ADCS-Gene bis zu 73,1 % und damit einen GC-Gehalt, der dem genomischen von *S. venezuelae* entspricht [73,1 %, vgl. auch *S. coelicolor*: 72 %, (11)]. Hohe GC-Gehalte beeinflussen oft die Verteilung der Triplets, da statistisch AT-reiche Codons als Folge unterrepräsentiert sein müssen. Bei einer transgenen Nutzung von Sequenzen aus einem Organismus wie *S. venezuelae* können sich aus dem hohen GC-Gehalt und der veränderten codon usage Probleme ergeben (34). Eine mögliche Schwierigkeit könnte eine Störung der Replikation sein, die Mutationen verursacht (23). Der Unterschied der codon usage von *E. coli* und *S. venezuelae* (Tabelle 3.1) in Bezug auf die Proteinbiosynthese stellt aber wahrscheinlich das größere Problem dar.

H.P. Sørensen (67) listet dazu insgesamt acht verschiedene limitierende tRNA-Gene mit den erkannten Codons auf. Die zellulären Konzentrationen dieser tRNAs sind in Folge der geringen Nutzung in der codon usage von *E. coli* häufig unzureichend für die Expression von Transgenen. Es handelt sich hierbei ausdrücklich nicht um Variationen im eigentlichen genetischen Code, wie diese zum Beispiel von Mitochondrien oder Hefen bekannt sind (53), sondern beschränkt sich nur auf die Abundanz der einzelnen tRNAs. Zu diesen gehören *argU* (AGA, AGG), *argX* (CGG), *argW* (CGA, CGG), *ileX* (AUA), *glyT* (GGA), *leuW* (CUA), *proL* (CCC) und *lys* (AAG). Da diese speziellen Limitationen vor allem *E. coli* betreffen, ist die Translation von ORFs aus anderen Stämmen oder Organismen nicht selten beeinträchtigt.

Wie aus Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, kommen die meisten der betroffenen Codons in beiden ORFs der ADCS aus *S. venezuelae* allerdings nicht oder nur selten vor und stellen damit kein Problem dar. Allerdings sind CCC und CGG zusammen 59 bzw. 57 mal

vorhanden und stellen in beiden Sequenzen circa 8 % der gesamten Triplets. Negative Einflüsse auf die Expression wären bei der Nutzung dieser ORFs nicht auszuschließen (43), weswegen auf die Klonierung beider Gene verzichtet wurde.

Die aus der Chloramphenicolbiosynthese stammenden Gene für ADCS aus Streptomyceten besitzen einen großen Vorteil gegenüber ihren Isomeren aus der Folatbiosynthese. Die Aktivitäten einer Amidotransferase und der eigentlichen Synthase sind auf einem Polypeptid vereint. Nahezu alle anderen bakteriellen ADCS - generell mit der Folatsynthese in Verbindung stehend - sind dagegen Heterodimere aus meist als *pabA* und *pabB* (*pabAB*) gekennzeichneten Proteinen. In Pflanzen und niederen Eukaryoten ist die ADCS zwar ein bifunktionelles Enzym, besitzt aber ein plastidäres Transitpeptid (59). Beides, das Auftreten als Heterodimer und die plastidäre Lokalisation, führen dazu, dass diese Gruppen von ADCS für den vorliegenden Ansatz nicht geeignet waren.

Eine Alternative bietet die ADCS aus *C. glutamicum*. Trotz des prokaryotischen Ursprungs sind beide Aktivitäten in einer Sequenz vereint. Der entsprechende ORF des ebenfalls als *pabAB* bezeichneten Gens wurde bereits für die rekombinante Biosynthese von ADC aus Chorismat genutzt (34). Der ORF konnte aus dem Bakterium kloniert und in *E. coli* exprimiert werden (S. 60ff). Auf eine Bestimmung von Aktivitäten oder der Funktionalität wurde allerdings verzichtet, da der einzig bekannte Aktivitätstest nach Z. He (26) nicht nur große Mengen Enzym ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), sondern auch die instabile Verbindung Chorismat erfordert. Zudem waren weder ein Standard noch ein Aufreinigungsprotokoll für das Produkt ADC vorhanden, was die Analytik deutlich erschwert hätte. Zu Gunsten des direkten Aufbaus des kompletten pAPA-Biosynthesewegs wurden hier keine Versuche durchgeführt.

#### 4.1.2 Analyse von ADCM und ADPDH aus *S. venezuelae*

Zur Umsetzung von ADC in ADP eignet sich nur eine ADCM. Dieses Gen ist ebenfalls ein Teil der Chloramphenicolbiosynthese von *S. venezuelae*. Ein dementsprechend hoher GC-Gehalt (Abschnitt 3.2.2) kann aber vernachlässigt werden, da der ORF nur eine Länge von 309 bp (AB116234) hat. Es wurde dabei der von R. Mehl (46) genutzte ORF verwendet und nicht *cmlD* (AF262220). Die Sequenz von *cmlD* ist, bei einer vergleichenden Analyse mit *papB*, in der Literatur nur mit einem frame-shift annotiert und enthält kein Stopcodon. Von den oben erwähnten kritischen Codons ist CGG bei *papB* mit acht Stück das häufigste und einzig problematische. Die Sequenz wurde aus genomischer DNA des Streptomyceten durch PCR isoliert. Keiner der erhaltenen Klone war ohne Mutation, der Basenaustausch bei dem letztlich verwendeten Klon führt aber

nicht zu einer Veränderung der Proteinsequenz. Auch die ADCM konnte in *E. coli* erfolgreich exprimiert werden. Eine Bestimmung der Aktivität war jedoch auch hier nicht möglich, da weder ein Assay bekannt, noch das Substrat ADC verfügbar ist.

Der Reaktionsweg zu pAPA sieht als letztes Transgen für *E. coli* eine ADPDH vor. Wie auch bei ADCS und ADCM ist hierfür eine ungünstige codon usage zu vermerken (Tabelle 3.1). Die in den beiden bekannten Clustern annotierten Gene *papC* (AB116234) und *cmlC* (AF262220) besitzen mit fast 80 % die höchste GC-Quote aller für diese Studie in Frage kommender ORFs. Wie oben beschrieben, sind auch hier CCC und CGG die häufigsten unter den kritischen Codons. Allerdings ist der Anteil von CCC und CGG, trotz ca. 7 % mehr GC-Gehalt als bei den ORFs der ADCS, gleich. Dies beruht auf der deutlich größeren Häufigkeit von GCC (ca. + 23 %), CUC (ca. + 45 %) und GCG (ca. + 100 %). Im Gegensatz zu ADCS gibt es allerdings kein bekanntes Enzym, das *papC* oder *cmlC* ersetzen könnte, da es keine direkt verwandten Reaktionswege für die Umsetzung aminierten Intermediate gibt.

Ein „Protein-BLAST“ von ADCS, ADCM und ADPDH zeigte zwar sehr ausgeprägte Homologien zu Enzymen, die Chorismat und Folgeprodukte nutzen (z.B. Anthranilat-synthase, CM und PDT), trotzdem gibt es unerklärliche Unterschiede zu den Reaktionen der Enzyme aus der eigentlichen Chloramphenicolbiosynthese (54). Nur ADCM und ADPDH sind in der Lage, Reaktionen mit den „aminierten“ Chorismatderivaten zu katalysieren. Sie konnten somit im vorliegenden Ansatz nicht wie bei der ADCS durch Isomere aus anderen Stoffwechselwegen ersetzt werden.

Zur Vermeidung absehbarer Probleme bei der Expression einer transgenen ADPDH in *E. coli* wurde eine optimierte Sequenz synthetisiert. Der durch Anpassung der codon usage an *A. thaliana* und *E. coli* moderate GC-Gehalt ermöglichte Expression und Nachweis im Bakterium. Im Gegensatz zu den Veränderungen auf Nukleotidebene entspricht die Aminosäuresequenz weitestgehend CmlD. Die Addition eines C-terminalen His-Tags für Aufreinigung und Nachweis der Expression war der einzige Eingriff.

### 4.1.3 Expression von ADCS, ADCM und ADPDH erzeugt pAPA

Die Verwendung der Konstrukte pCDFDuet-*Cg*ADCS und pACYCDuet-*Sv*ADPDH-*Sv*ADCM führte bei Induktion der Proteinexpression in allen verwendeten Stämmen (ER2566 und ER2566  $\Delta$ *pheLATyrA*) zur nachweisbaren Produktion von Proteinen, die mit den vorausgerechneten Molekulargewichten der drei Enzyme (Abbildung 3.4) übereinstimmten. Der Verwendung der auxotrophen ER2566  $\Delta$ *pheLATyrA* ging dabei der physiologische und molekularbiologische Nachweis der Deletion des Attenuators

und beider Gene voraus (Abschnitt 3.1). Entsprechende Signale konnten nicht nur durch die spezifische Detektion von His- und S-Tag im Western Blot, sondern bereits vor dem Hintergrund des *E. coli* Proteoms in einer SDS-PAGE beobachtet werden. In Hinblick auf die technische Schwierigkeit der Expression von mehreren Proteinen durch Doppeltransformanden wurde damit der Beweis erbracht, dass drei Enzyme durch das Duet-System exprimiert, und bei paralleler Nutzung zweier primärer Antikörper, Anti-His und Anti-S, parallel detektiert werden können.

Die kombinierte Expression aller drei Proteine führte, wie auch schon bei dem vergleichbaren Ansatz von R. Mehl (46) beschrieben, zur Biosynthese von pAPA (Abschnitt 3.2.4). Die Analyse durch DC nach einer Aminosäureaufreinigung, aber auch die HPLC basierte Auftrennung, zeigten - verglichen mit dem kommerziell erhältlichen Standard - übereinstimmende Ergebnisse (Abbildung 3.5). Durch die DC konnten zwei Eluatfraktionen bestimmt werden, die ein Produkt mit einem dem Standard entsprechende  $R_f$ -Wert beinhalteten. Die Retentionszeit einer bei 245 nm durch HPLC detektierten Substanz entsprach ebenfalls dem Standard. Die Verifizierung über zwei unterschiedliche Verfahren lässt die Aussage zu, dass es sich um pAPA handelt. Insbesondere vor dem Hintergrund der vorliegenden Beschreibung von R. Mehl über die Funktionalität dieses rekombinanten Reaktionswegs, erfolgte keine weitere Analyse des Produktes.

In den vorliegenden Versuchen konnte bei einer Fermentation mit prototrophen Zellen eine maximale Konzentration von fast 400  $\mu\text{M}$  pAPA durch Expression von ADCS, ADCM und ADPDH erreicht werden (Abbildung 3.6). Dabei wurden keine direkten Präkursoren eingesetzt, sondern nur die C-Quelle Glycerin durch endogene Reaktionswege in das Substrat Chorismat umgesetzt. Verglichen mit den bei R. Mehl erreichten intrazellulären Konzentrationen von 100 - 700  $\mu\text{M}$  ist der hier erzielte Wert für extrazelluläres pAPA als zufriedenstellend einzustufen. Eine Bestimmung der intrazellulären Konzentration fand in dieser Arbeit nur exemplarisch statt und deutete darauf hin, dass der Großteil der Substanz in das Medium sekretiert wurde. Auf eine detaillierte Bestimmung der cytosolischen Konzentrationen wurde verzichtet.

#### 4.1.4 pAPA wird bidirektional über die Membran transloziert

In Anlehnung an R. Mehl (46) kann auch hier festgestellt werden, dass es ein System zum Transmembrantransport von pAPA in *E. coli* geben muss. Während dieser nur eine Aufnahme exogen gefütterten pAPAs misst und keine näheren Aussagen über

den möglichen Transport macht, konnte in der vorliegenden Arbeit darüber hinaus bestimmt werden, dass eine Exkretion stattfindet. Somit kann behauptet werden, dass pAPA bidirektional über die Plasmamembran transportiert werden kann. In der vorliegenden Studie führte dies zu einer 12fach größeren Stoffmenge an pAPA im Medium, verglichen mit den Zellen. Bislang sind keine Arbeiten bekannt, die Aufnahme oder Exkretion dieser Aminosäure in *E. coli* oder anderen Organismen detailliert beschreiben. Es kann daher lediglich vermutet werden, dass z.B. Transportsysteme für Tyrosin, zu dem pAPA strukturell eine hohe Ähnlichkeit besitzt, hier eine Rolle spielen.

Ein Vergleich verschiedener Aufnahme- und Exkretionssysteme (14, 18) zeigte, dass für Tyrosin bislang nur ein tyrosin-spezifischer Transporter (*tyrP*) und ein aromaten-spezifischer Transporter (*aroP*), der auch Tryptophan und Phenylalanin als Substrat hat, beschrieben wurden. Insgesamt sind kaum Systeme für die Abgabe von Aminosäuren ins Medium bekannt. Bei *E. coli* ist hierzu ein Hilfsprotein für die Abgabe von Cystein (*ydeD*) und die Möglichkeit des Glutamatexportes aufgeführt. Es werden allerdings Modelle vorgeschlagen, die einen Export von Aminosäuren unterstützen könnten. A. Burkovski (14) nennt z.B. „overflow“ Metabolismus, einen limitierten Katabolismus und, am ehesten hier zutreffend, den deregulierten Anabolismus. Eventuell im Rahmen einer fehlenden Verwendbarkeit von pAPA oder zu hohen intrazellulären Konzentrationen erfolgt eine Abgabe ins Medium. Ob dieser Transport aktiv oder passiv ist, bleibt unklar, da sich beide Modelle mit den Ergebnissen decken. Ein aktiver Transport würde die Theorie des deregulierten Anabolismus stützen, bei dem die Zelle das Cytosol vor zu hohen Produktkonzentrationen schützt. Eine Diffusion ist ebenso denkbar, da sich intra- und extrazelluläre Konzentrationen ausgleichen würden. Allerdings wäre eine Bedingung hierfür, dass wichtige Verbindungen, wie das dem pAPA strukturell sehr ähnliche Tyrosin, nicht unkontrolliert ins Medium gelangen können.

#### 4.1.5 Auxotrophie beeinflusst die Fermentation

Bei der Betrachtung der Produkt-/Zelldichtegraphen in Abbildung 3.6 ist festzustellen, dass bei prototrophen Zellen die Produktbildungsrate nur direkt zu Beginn der Fermentation und nach circa 45 h hoch ist. Zwischen 9 h und 45 h fand dagegen kaum Produktbildung statt. Vor allem die letzte Produktbildungsphase korreliert gut mit der zeitversetzt eintretenden exponentiellen Wachstumsphase. Auch wenn ein Unterschied von 8 - 15 h zwischen den starken Anstiegen beider Kurven lag, fällt doch auf, dass hohe Produktkonzentrationen erst nach Erreichen größerer Biomasse entstehen.

Hierzu gibt es zwei mögliche Erklärungen. Ist die Produktbildung durch die Verfügbarkeit von Chorismat limitiert, muss davon ausgegangen werden, dass dieses nur für die Bildung aromatischer Aminosäuren bei starkem Zellwachstum, wie es nach 45 h beobachtet wurde, in höheren Konzentrationen auftritt. Der starke initiale Anstieg der pAPA Konzentration könnte durch eine erhöhte Chorismatkonzentration in Folge der vorher stattfindenden Wachstumsphase erklärt werden.

Ebenso könnten die Enzyme ADCS, ADCM und ADPDH nicht ausreichend vorhanden sein, um schnell größere Mengen pAPA zu produzieren. Dies kann vor allem den starken Anstieg der Produktkonzentration nach 45 h erklären. Die offensichtlich größere Menge an Katalysatoren, bedingt durch höhere Zelldichten, ermöglichte einen starken Umsatz von Chorismat. Substrat und Enzyme reicherten sich also erst durch das Zellwachstum genügend an.

Bezogen auf die Endkonzentration bei ER2566 betragen die extrazellulären Konzentrationen von pAPA für den auxotrophen Stamm nur maximal 50 %. Der gesamte Verlauf von Biomasse- und Produktzuwachs war während der Fermentation sehr unterschiedlich zu den prototrophen Zellen. Hierfür können mehrere Ursachen angenommen werden, wobei das wichtigste Merkmal, das prototrophe von auxotrophen Zellen unterscheidet, das Fehlen von CM/PDT und CM/PDH, augenfällig ist.

Dieser Mangel kann, im Vergleich zu prototrophen Zellen, bei ausreichender Supplementierung von Tyrosin und Phenylalanin, wie es in der Wachstumsphase stattfindet, zwar ausgeglichen werden. In der eigentlichen Produktionsphase, in der die Zellen nicht mehr mit den Aminosäuren versorgt werden, treten dann aber die deutlichen Unterschiede auf.

Am Auffälligsten hierbei war, dass nach einer ausgeprägteren initialen Produktbildungsphase die Anreicherung von pAPA nicht nur stoppt, wie dies auch bei den ER2566 Zellen beobachtet werden konnte, sondern dass die Konzentration abnimmt. Auch das Ausbleiben einer vergleichbaren exponentiellen Wachstumsphase unterscheidet beide Stämme. Während letztere vor allem durch die mangelnde Verfügbarkeit von Phenylalanin und Tyrosin erklärt werden kann, ist die abnehmende pAPA Konzentration nur schwer nachvollziehbar. Das anfänglich stärkere Aufkommen von pAPA - im Vergleich zu den prototrophen Zellen - kann eventuell durch den erhöhten Chorismatpool infolge eines teilweise blockierten Absatzes in die Synthese der aromatischen Aminosäuren erklärt werden. Dies würde zu einer ausbleibenden Hemmung der Chorismatbiosynthese (42) führen. Allerdings gibt es kaum Gründe, wieso das Produkt im späteren Fermentationsverlauf abnimmt.

Toxische Effekte von pAPA schließt bereits R. Mehl in seiner Arbeit aus (46). Die-

se hätten das ausbleibende Zellwachstum und eventuell den abrupten Abbruch der Produktion erklärt. Ein Abbau der aromatischen Aminosäure in *E. coli* ist eher unwahrscheinlich, da aus dieser Gruppe nur Tryptophan durch eine L-Tryptophanase (*tnaA*) abgebaut werden kann. Tyrosin und Phenylalanin sind nicht als Kohlenstoff- oder Energiequelle für das Enterobakterium verfügbar (18, 50). Somit kann angenommen werden, dass auch pAPA nicht degradiert wird. Eine mögliche Erklärung wäre eine verstärkte cytosolische Anreicherung von pAPA im Vergleich zur Exkretion, was aber in dieser Studie nicht nachgewiesen wurde. Eine Verwendung als proteinogene Aminosäure kann dagegen ebenfalls durch die Versuche von R. Mehl ausgeschlossen werden. Dieser weist nach, dass pAPA nur durch entsprechende Modifikationen an einer bestimmten Position rekombinant exprimierten Walmyoglobins eingebaut wird.

Eine Kompensation der negativen Effekte in den auxotrophen Zellen durch Zugabe von Phenylalanin und Tyrosin während der Produktionsphase wäre nachteilig für die Biosynthese von pAPA. Hemmungen auf verschiedenen Stufen des Reaktionsweges in Bezug auf Protein-, Transkriptions- und Translationsebene durch die Aminosäuren sind bekannt. Die DAHP Synthase-Isomere AroF und AroG werden zum Beispiel durch Tyrosin bzw. Phenylalanin gehemmt (69). Bei den prototrophen Zellen sind beide Aminosäuren zwar durch endogene Biosynthese vorhanden, werden sich aber bei Kultivierung in M9-Medium nicht ausreichend anreichern, um deutliche Effekte hervorzurufen und ihre eigene Biosynthese vollständig zu unterbinden. Eine solche Hemmung lässt sich dagegen bei Anzucht auf LB-Medium gut beobachten. Die aus den verwendeten Proteinhydrolysaten stammenden und in ausreichenden Mengen vorhandenen aromatischen Aminosäuren greifen hierbei, durch die Inhibition der Enzyme AroF und AroG, in die Biosynthese von Chorismat ein und verhindern eine Anreicherung von pAPA.  $K_I$ -Werte von 13 bzw. 83  $\mu\text{M}$  Phenylalanin und Tyrosin deuten eine sensitive Regulation der beiden Enzyme AroF und AroG an. Entsprechende Inhibitionen von PheA und TyrA durch ihre jeweiligen Produkte sind ebenfalls bekannt. Zusätzlich gibt es eine Regulation durch die Repressorproteine TyrR und TrpR auf die DAHP Synthasen. Bei ausreichenden Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren wird die Transkription beider Enzyme reduziert. Eine weitere Regulation ist durch den Attenuator *pheL* für die Phenylalaninbiosynthese gegeben. Durch die Verwendung des Minimalmediums können, zusätzlich zu der mangelnden Biosyntheseleistung für Phenylalanin und Tyrosin bei auxotrophen Zellen, hohe Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren und damit die Hemmung der Chorismat- und der darauf basierenden pAPA-Biosynthese unterbunden werden. Während dies bei diesem Schritt des artifiziellen Reaktionsweges eher negative Folgen auf Zellwachstum und Produktkonzentration hat, ist die Verwendung von ER2566  $\Delta\textit{pheLATyrA}$  für den nächsten Umsatz, die Desaminierung von



pAPA, nahezu unerlässlich.

Es könnte angenommen werden, dass die niedrigen Produktkonzentrationen der autotrophen Zellen bei Fermentation durch das Fehlen von Tyrosin und Phenylalanin negative Effekte auf die Proteinbiosynthese hervorrufen. Aus mehreren Versuchen und insbesondere ausgedehnten Analysen beider Stämme mit TAL und PAL ist allerdings bekannt, dass die Auswirkung der Deletion auf die Expression der Transgene nur geringfügige bis gar keine Folgen für die messbare Abundanz der Proteine hat. Eine Hypothese ist, dass aus der Proteolyse frei werdende Aminosäuren ständig recycelt werden und somit auch in die sehr starke Biosynthese der rekombinanten Proteine einfließen. Dies könnte auf Kosten endogener Proteine gehen, die dann nur suboptimal mit diesen Aminosäuren zum Aufbau versorgt sind. Der damit für endogene Proteine bestehende Aminosäuremangel der Deletionsmutanten würde sich dann sehr stark auf das Wachstum der Zellen auswirken - ein Effekt, der sich mit den Beobachtungen deckt.

## 4.2 Desaminierung von pAPA

Der wohl wichtigste Schritt in der Biosynthese von pACiAlk basierend auf Chorismat ist die Verknüpfung der Reaktionen der Chloramphenicolbiosynthese mit denen der Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese. An dieser Stelle des Reaktionswegs desaminiert eine Ammoniak Lyase pAPA zu pACiA. Bedeutend an dieser Reaktion ist, dass diese Katalyse noch nie beschrieben wurde und somit natürlicherweise nicht vorzukommen scheint.

Insgesamt wurden zwei verschiedene Proteine mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften getestet. Zum einen fand eine bakterielle TAL Verwendung, zum anderen eine pflanzliche PAL.

### 4.2.1 Proteinkonzentration der TAL ist temperaturabhängig

Die hier beschriebene TAL aus *R. sphaeroides* ist eins der wenigen „reinen“ TAL Enzyme. Die beschriebene Aktivität für das Substrat Tyrosin beträgt ( $k_{\text{cat}}/K_m$ )  $1,1 \cdot 10^5$ , für Phenylalanin lediglich  $403 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Pflanzliche Enzyme akzeptieren entweder nahezu ausschließlich Phenylalanin (Dicotyledonen) oder sind bifunktionell und setzen *in vitro* beide Aminosäuren gleich gut um (80).

Der für die TAL verwendete ORF stammt nicht wie bei den Studien von K. Watts (80), Z. Xue (83) oder A. Schroeder (64) aus dem Bakterium selber, sondern wurde durch Gensynthese hergestellt. Unter Verwendung der codon usage von *E. coli* entstand

dabei eine neue Sequenz mit einem C-terminalen His-Tag. Dies geschah aus ähnlichen Gründen wie für den ORF der ADPDH. Die aus *R. sphaeroides* stammende TAL besitzt einen GC-Gehalt von 68,9 % und damit 17,9 % mehr Guanosin und Cytidin als bei *E. coli* üblich. Auch hier sind die Codons CCC und CGG überrepräsentiert. Vor der Verwendung des synthetisch hergestellten ORF wurden einige Vorversuche mit der originalen Sequenz durchgeführt. Auffällig hierbei war, dass regelmäßig Mutationen auftraten. Dies könnte ein Effekt des hohen GC-Gehaltes sein (23).

Weder die anfänglich genutzte Originalsequenz, noch der hauptsächlich verwendete, synthetisch hergestellte ORF ließen sich gut exprimieren. Bei 37 °C konnten nach verschiedenen Zeitpunkten der Expression nur geringe Mengen des Proteins nachgewiesen oder aufgereinigt werden. Daher wurden die Konzentration des Induktors IPTG und die Expressionstemperatur variiert. IPTG-Konzentrationen in einem Bereich von 0,1 - 1,0 mM hatten keinen erkennbar variierenden Effekt auf die Expression (Daten nicht aufgeführt). Ohne IPTG konnte keine Expression nachgewiesen werden. Bei niedrigeren Temperaturen, in diesem Fall bei 16 °C, war dagegen eine deutlich gesteigerte Exprimierbarkeit zu beobachten. Aufreinigungen von Protein, das bei 16 °C exprimiert wurde, zeigten eine hohe Reinheit (Abbildung 3.9).

Interessanterweise konnten bei 37 °C kaum inclusion bodies gefunden werden. Die Lyse durch aufkochen der Probe in Lämmli-Probenpuffer enthielt zwar tendenziell mehr nachweisbares Protein als durch Ultraschall oder Lysozym behandelte Proben, größere Mengen inclusion bodies weist der Vergleich dieser Analysen allerdings nicht auf. Insgesamt auffällig war die sehr niedrige Proteinkonzentration. Inclusion bodies entstehen häufig bei Proteinkonzentrationen von 200 - 300 mg/ml oder durch eine unkorrekte Faltung, wobei der eigentliche Mechanismus ungeklärt ist (67). Häufig reduzieren diese die Menge löslichen Proteins deutlich und führen zu suboptimaler Verfügbarkeit des Katalyten.

Die verbesserte Expression bei niedrigen Temperaturen könnte mehrere Ursachen haben. Zum einen ist dies ein Hinweis auf die Toxizität der katalysierten Reaktion. Es ist bekannt, dass pCA - als TAL Reaktionsprodukt - ab 6 mM biostatistisch und bei 60 mM biozid wirkt (80, 83). Somit ist die TAL, aber auch jede andere Tyrosin-spezifische Ammoniak Lyase, potentiell in der Lage, ihren Wirt zu vergiften. Allerdings sind die durch die TAL entstehenden pCA Konzentrationen im Verlauf einer Fermentation meist sehr gering - selbst bei Zugabe von 1 mM Tyrosin entstehen nur < 0,15 mM pCA. Führen toxische Reaktionsprodukte durch Selektion häufig zur Anreicherung von spontan mutagenisierten Transgenen, die entweder nicht mehr oder nicht korrekt exprimiert werden, ist es unwahrscheinlich, dass derart geringe Konzentrationen bereits

eine Auswirkung auf die Proteinkonzentration haben. Im Gegensatz zu der originalen Sequenz der TAL, die anfällig für spontane Mutationen war, treten bei dem synthetischen ORF keine Veränderungen auf. Auch ein Vergleich mit der PAL, die in der Lage war, wesentlich höhere Konzentrationen zu erzeugen - in diesen Versuchen bis zu 450  $\mu\text{M}$  - und dabei wesentlich besser exprimiert wurde, kann diese Annahme nicht belegen. Eventuell hat die niedrigere Temperatur bei der TAL Expression einen positiven Effekt auf die Faltung des Proteins, so dass größere Mengen entstehen können und nicht direkt abgebaut werden. Möglicherweise wird das Enzym von der Zelle aber auch aufgrund unbekannter Signale direkt für eine Degradation markiert und kann sich so nicht anreichern.

#### 4.2.2 Funktionelle Expression der synthetischen TAL

Die Messung der Aktivität der TAL mit Tyrosin zeigte im Vergleich zu den Daten von K. Watts (80) und G. Louie (39) nur geringe Aktivitäten. Da diese Arbeitsgruppe die TAL aus *R. sphaeroides* zuerst beschrieben und ausführliche Daten inklusive einer Kristallisation mit pCA publiziert hat, dienten diese Ergebnisse als Orientierung. Der  $K_m$  der vorliegenden Messungen war um den Faktor vier höher als der dort beschriebene. Der  $k_{\text{cat}}$  weicht um den Faktor 65 ab.

Nach den Veröffentlichungen von K. Watts und G. Louie wurden auch von anderen Arbeitsgruppen kinetische Studien mit der *Rs*TAL durchgeführt. Studien von Z. Xue (83) und A. Schroeder (64) zeigen deutlich niedrigere Aktivitäten. Das von Z. Xue getestete Gen, ohne His-Tag, erreicht nur Aktivitäten von ( $k_{\text{cat}}$ )  $0,2 \text{ s}^{-1}$  innerhalb der ersten Minute und danach  $0,03 \text{ s}^{-1}$  bei einem  $K_m$  von  $60 \mu\text{M}$ . A. Schroeder berichtet von einem  $k_{\text{cat}}$  von  $0,08 \text{ s}^{-1}$  bei  $310 \mu\text{M}$  ( $k_m$ ). Diese Daten passen deutlich besser zu den hier ermittelten Werten von  $0,052 \text{ s}^{-1}$  und  $120 \mu\text{M}$  (Abbildung 3.11). Eine mögliche Ursache für die deutlichen Unterschiede sind die verwendeten Testbedingungen.

Für die ermittelten Werte der TAL in dieser Studie wurden verschiedene Puffersysteme getestet. Bei der Optimierung stand vor allem die Auswahl guter Testbedingungen für die Messung des pAPA Umsatzes im Vordergrund. In Vorversuchen wurde der hierzu am besten geeignete Puffer (150 mM Bis-Tris-Propan, pH 8,5) als geringfügig besser verglichen mit entsprechenden Tris-HCl, Tricin, Bicin und Glycin-Glycin Puffersystemen bewertet. Nachteilig hieran ist die hohe Pufferkonzentration, die nachweisbar bei allen verwendeten Puffersystemen einen negativen Effekt auf die Tyrosindesaminierung hatte. Eine niedrigere Konzentration führte bei der Messung von pAPA zu enormen Schwankungen während der photometrischen Detektion und verhinderte die Bestim-

mung kinetischer Daten. Der Aktivitätstest von K. Watts (80) wurde in einem 100 mM Bis-Tris-Propan Puffer bei pH 9,0 durchgeführt. Es konnte bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass die TAL eine höhere Aktivität bei höheren pH-Werten hat, dann aber zu Instabilität neigt (72). Eine höhere Basizität fördert nach den Messungen von A. Schroeder (64) die Substratbindung durch eine Änderung des Protonierungszustandes im Enzym. Besonders bei hohen Substratkonzentrationen verbessert eine alkalische Umgebung aber auch die Löslichkeit von Tyrosin (in H<sub>2</sub>O: 0,2 mM bei 20 °C). Die kinetischen Daten dieser Aktivitätsassays wurden unter anderem in 50 mM Tris-HCl bei pH 8,0 aufgenommen. Ähnlich der vorliegenden Studie und den Arbeiten von K. Watts verwendet A. Schroeder in ihrer Arbeit ebenfalls einen His-Tag. Z. Xue erreicht im selben Puffersystem bei pH 8,5 eine vergleichbaren  $k_{cat}$  wie A. Schroeder, misst aber einen deutlich niedrigeren  $K_m$  Wert. In seiner Arbeit wurde kein His-Tag verwendet, sondern das Protein durch Ammoniumsulfatfällung und Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigt. Die Ergebnisse dieser drei Arbeiten und die Resultate der hier vorliegenden Studie zeigen, dass die für die TAL bestimmten Werte nur bedingt einheitlich und vergleichbar sind. Die Verwendung anderer Puffer, Pufferkonzentrationen und pH-Werte führte dabei zu einer gewissen Variation. Eine Einordnung der Aktivität des hier verwendeten Enzyms in die Ergebnisse aus der aktuellen Literatur ist nur unzureichend möglich. Es kann daher konstatiert werden, dass die Aktivität im ungefähren Rahmen publizierter Vergleichswerte liegt, und das Protein funktionell exprimiert werden konnte.

#### 4.2.3 Expression des PAL-Klons erzeugt ein aktives Protein

Als Vergleich zur TAL wurde auch eine PAL aus Mais getestet. Wie bereits oben beschrieben, sind die PAL Enzyme von Monokotyledonen immer mischfunktionell und verwenden sowohl Phenylalanin als auch Tyrosin (58). Das Enzym aus Mais ist dabei eines der am besten charakterisierten Proteine und seit längerer Zeit bekannt.

Bei der Subklonierung der DNA aus dem von N. Amrhein überlassenen Konstrukt (Abschnitt 3.3.1) wurde festgestellt, dass nicht - wie erwartet - die Sequenz des Datenbankeintrags L77912 (58), sondern ein anderer, nicht näher charakterisierter Klon (ACG44219) erhalten wurde. Trotz einiger Abweichungen zu dem in der Literatur gut beschriebenen ORF wurde mit dem Klon weitergearbeitet. In welcher Beziehung ACG44219 zu LL77912 steht, ob es sich um eine Duplikation, ein Pseudogen oder ein alternativ reguliertes Isomer handelt, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht beurteilt werden.

Die von J. Rösler beschriebene PAL hat bei pH 8,7 in einem 200 mM Na-Borat Puffer (40 °C)  $K_m$  Werte von (Tyr/Phe)  $19\pm 1/270\pm 20 \mu\text{M}$  und  $k_{\text{cat}}$  von  $0,92\pm 0,22/10,6\pm 3,2$ . Ähnlich der TAL ist auch für die PAL eine höhere Aktivität bei größerer Basizität beschrieben. Eine ausführliche Bestimmung der kinetischen Daten für dieses Enzym wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, lediglich eine Bestimmung der Funktionalität erfolgte. Mit aufgereinigtem Protein konnte festgestellt werden, dass Tyrosin vor Phenylalanin bevorzugt wird (Abbildung 3.12). Allerdings ist zu bemerken, dass die vergleichende Messung mit CiA durch den linearen Bereich der Absorption im Photometer begrenzt ist. Im Vergleich zu pCA ( $16.300 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ist  $\epsilon$  von CiA ( $224.000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bei 275 nm fast 14fach höher. Werden also gleiche Mengen Enzym und Substrat eingesetzt, findet zwar biochemisch eine direkt vergleichbare Reaktion statt, am Photometer kann diese aber nicht detektiert werden. Es ist darauf hinzuweisen, dass, obwohl die Messungen zur Bestimmung von  $\epsilon$  für CiA mehrfach wiederholt wurden, diese deutlich von den Werten bei Z. Xue (290 nm,  $9.000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), K. Watts (175 nm,  $15.560 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und A. Schroeder (290 nm,  $10.000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) abweichen, während die Daten für pCA weitestgehend übereinstimmen. Als Beleg der Richtigkeit der hier vorgenommenen Messung für CiA kann Abbildung 3.12 herangezogen werden. Bei gleichen Konzentrationen erreicht CiA bereits nach wenigen Minuten das Absorptionsmaximum, obwohl das Produkt langsamer akkumuliert als pCA. Dessen Konzentration ist bis zum Endpunkt im linearen Absorptionsbereich. Insgesamt kann für die PAL, ähnlich der TAL, festgestellt werden, dass Aktivität vorliegt und das Enzym funktional ist.

#### 4.2.4 TAL und PAL desaminieren pAPA *in vitro* zu pACiA

Wichtiger als die Aktivitätsmessungen für Tyrosin und Phenylalanin bei TAL und PAL, die lediglich als Anhaltspunkt bezüglich der Funktionalität der Enzyme dienen, ist deren Fähigkeit, auch pAPA als Substrat zu akzeptieren und umzusetzen. Berichte über „unspezifische“ Substrate der TAL sind auf die Arbeit von A. Schroeder (64) beschränkt. Diese erwähnt, dass von einer Auswahl aus Phenylalanin, Histidin, 3-Iodotyrosin und Nitrophenylalanin [(*S*)-2-(Nitroamino)-3-Phenylpropansäure] nur Phenylalanin umgesetzt werden kann. In para-Position substituierte Verbindungen wurden interessanterweise nicht überprüft, obwohl die Bedeutung der Hydroxylgruppe für die Substratdetermination bekannt ist. Die Desaminierung von pAPA findet daher erstmalig in der hier vorliegenden Arbeit Erwähnung.

Bevor der Umsatz von pAPA durch eine TAL oder PAL gemessen wurde, erfolg-

te eine Bestimmung des Ladungszustandes unter Assaybedingungen (Abschnitt 3.2.5). Nur wenn sich pAPA vergleichbar zu Tyrosin verhält, ist gewährleistet, dass ein Umsatz stattfinden kann. Der Vergleich von Titrationsanalysen, *in silico* Simulationen und Literaturwerten zeigt, dass diese Bedingung eingehalten wird. Sowohl unter Assaybedingungen in einem Rahmen von pH 8,5 - 9,0, als auch bei den intrazellulären Werten von pH 7,6 - 7,8 (87) liegt bei beiden Verbindungen ein identischer Ladungszustand vor (Abbildung 3.7). Die funktionellen Gruppen an  $\alpha$ -C sind geladen, während der Substituent am aromatischen Ring jeweils neutral ist. Der auffälligste Unterschied, wenn auch ohne Bedeutung für die vorliegende Studie, zeigt sich für den  $pK_R$ -Wert. Dieser befindet sich erwartungsgemäß für die Aminogruppe im sauren und für die Hydroxylgruppe im basischen Bereich (Tabelle 3.2).

Durch die Aktivität jedes der beide Enzyme, *RsTAL* und *ZmPAL*, wird die Desaminierung als ungewöhnliches Substrat ermöglicht. Mit aufgereinigtem Enzym konnte in Aktivitätstests jeweils pACiA detektiert werden (Abbildungen 3.11 und 3.12). Die Bestimmung kinetischer Daten war allerdings sehr schwierig. Während bei der TAL nur Messungen bei hohen Substratkonzentrationen (1- 10 mM) auswertbare Änderungen in der Absorption zeigten, war dieser Bereich für die PAL niedriger anzusiedeln. Bereits bei 1 mM konnte am Photometer ein Umsatz gemessen werden. Allerdings gab es bei beiden Enzymen Probleme während der Messung, die im Fall der PAL die Ermittlung von  $K_m$  und  $k_{cat}$  sogar völlig verhinderten. Ohne experimentell bestimmbare Gründe traten bei der TAL-Messung mit pAPA starke Schwankungen in der Absorption auf, die z.B. bei Tyrosin nicht zu beobachten waren. Die Verwendung stärker gepufferter Systeme wie des 150 mM Bis-Tris-Propan Puffers, milderten diese Effekte ab, konnten aber die Schwankungen nicht ganz verhindern. Nur insgesamt drei Ansätze konnten für diese Studie ausgewertet werden. Als Ergebnis wurde ein  $K_m$  von  $747 \pm 141,8 \mu\text{M}$  und ein  $k_{cat}$  von  $7,5 \cdot 10^{-4} \pm 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Das Enzym ist um den Faktor sechs weniger affin für pAPA und setzt dieses 70fach langsamer um als Tyrosin. Zwar kann pAPA als Substrat der TAL dienen, ist aber demnach nicht als hauptsächliches Substrat bei Anwesenheit von Tyrosin geeignet. Für die PAL war eine Messung der kinetischen Daten gar nicht möglich, da, obwohl die einzelnen Reaktionen gut messbar waren, kein Bezug von Substratkonzentration und spezifischer Aktivität feststellbar war. Ohne erkennbare Gründe scheinen spezifische Aktivitäten nicht in direktem Zusammenhang mit der Substratkonzentration zu stehen, weshalb die Ergebnisse eher zufälligen Charakter haben.

Die Identität des Reaktionsproduktes konnte durch eine HPLC basierte Auftrennung eines TAL-Reaktionsansatzes bestimmt werden. Im Vergleich zu kommerziell erhältli-

cher pACiA besaß das Reaktionsprodukt dieser Umsetzung (Abbildung 3.13) die gleiche Retentionszeit. Selbiges gilt auch für hier nicht dargestellte Versuche mit der PAL. Andere eventuell mögliche Desaminierungsprodukte von pAPA wären, je nach möglichem Reaktionsmechanismus, CiA, Phenylalanin, pCA oder Tyrosin. Keine dieser Verbindungen eluiert aber zeitgleich mit pACiA, so dass davon ausgegangen werden kann, dass pAPA analog zu Tyrosin desaminiert wird.

#### 4.2.5 Auxotrophe Zellen mit PAL akkumulieren pACiA im Medium

Die Entscheidung, welches der beiden Enzyme, *RsTAL* oder *ZmPAL*, am ehesten für den Aufbau eines kompletten Reaktionswegs geeignet ist, wurde aufgrund der *in vivo* Fähigkeit zur pAPA Desaminierung getroffen (Abbildung 3.14). Der komplexe Versuch hierzu zeigte, dass in prototrophen Zellen das unnatürliche Substrat von der Reaktion effizient durch Tyrosin verdrängt wird. Während pAPA zumindest geringfügig in die PAL-Katalyse einfließt, kann die TAL im Beisein von Tyrosin pAPA gar nicht desaminieren. In diesem Ergebnis spiegeln sich die kinetischen Daten für die TAL wider, bei denen das Enzym nicht nur eine höhere Affinität für Tyrosin hat, sondern auch einen deutlichen schnelleren Umsatz zeigt. In Kombination mit dem geringen Expressionsniveau der TAL, also einer nur geringen Menge Katalyt, ist ein Umsatz von pAPA nicht zwingend zu erwarten gewesen.

Auch wenn keine kinetischen Daten für die PAL ermittelt werden konnten, ist wahrscheinlich, dass in der Gegenwart von Tyrosin und Phenylalanin diese beiden pAPA als Substrat vorgezogen werden. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen wider. Auch wenn prototrophe Zellen mit der PAL in der Lage waren, 1 mM pAPA und endogenes Phenylalanin ungefähr gleichmäßig zu desaminieren, bildete pCA das dominierende Produkt.

Für TAL und PAL gilt, dass - bedingt durch den geringeren  $K_m$  und einen höheren  $k_{cat}$  für Tyrosin bzw. zusätzlich Phenylalanin - die natürlich vorkommende(n) Aminosäure(n) das aktive Zentrum der Ammoniak Lyasen relativ gesehen häufiger besetzen. Dies führt zu einer kompetitiven Verdrängung von pAPA. Da die PAL im Vergleich zur TAL im Allgemeinen eine deutlich höhere *in vivo* Aktivität besitzt - wahrscheinlich aufgrund einer Kombination kinetischer Eigenschaften und der Menge an Enzym - wurde hierbei zumindest eine geringe Menge pAPA desaminiert.

Durch den effizienten Umsatz der eigentlichen Substrate von TAL, aber vor allem PAL - auch bei Zugabe von pAPA - wird die Endprodukthemmung der Tyrosin- und, im

Fall der PAL, auch der Phenylalaninbiosynthese aufgehoben (69). Durch das Absinken der cytosolischen Konzentration von Tyrosin und Phenylalanin entfällt die Inhibition von TyrA, PheA sowie AroG und AroF. Auch die Repressoren TrpR und TyrR hemmen nicht länger die Translation der DAHP Synthasen. Dies bedeutet, dass mehr aromatische Aminosäuren durch *E. coli* synthetisiert werden und damit auch wieder den Ammoniak Lyasen zur Verfügung stehen. TAL und PAL enthemmen folglich die Synthese der aromatischen Aminosäuren durch den Verbrauch von Tyrosin und Phenylalanin und erhalten damit noch mehr von diesen Substraten zur Katalyse. Durch diesen permanenten Flux und die damit scheinbar höhere Konzentration der normalen Substrate wird pAPA zusätzlich bei der Katalyse benachteiligt.

Interessanterweise reicherte sich im Fall der PAL bei Zugabe von pAPA zu prototrophen Zellen CiA wesentlich geringer als pCA an. Dies deckt sich mit den cytosolischen Konzentrationen freien Tyrosins und Phenylalanins (46). In *E. coli* liegt ungefähr 2,5fach so viel Tyrosin wie Phenylalanin vor. Das hier für die PAL gemessene Verhältnis von drei spiegelt diesen Unterschied gut wider. Die Aktivität der PAL ist für beide Substrate gleich. Der  $K_m$  für Phenylalanin ist zwar bedeutend höher, dafür wird Tyrosin entsprechend langsamer umgesetzt (80).

Im Gegensatz zu den prototrophen Zellen konnte pAPA in dem  $\Delta pheLATyrA$  Stamm von der PAL gut desaminiert werden. Während die TAL keine Aktivität für das Substrat *in vivo* zu besitzen scheint - abhängig vom Versuchsaufbau konnten in anderen Ansätzen zumindest geringe Umsätze nachgewiesen werden - setzte die PAL in der Abwesenheit von Tyrosin- und Phenylalaninbiosynthese eine relativ große Menge pAPA (74  $\mu\text{M}$ ) um. Die auxotrophen Zellen scheinen überdies kein freies Tyrosin mehr zu enthalten, das von der PAL verstoffwechselt werden könnte. Geringe Mengen CiA entstanden allerdings trotzdem. Die Ergebnisse bestätigen die oben genannte Theorie, dass die bessere Kinetik und die Derepression der Biosynthese aromatischer Aminosäuren in prototrophen Zellen maßgeblich den Umsatz von pAPA verhindert. Während die TAL auch *in vivo* insgesamt nur geringe Aktivitäten hatte, konnte die PAL bei 1 mM Fütterung die fast dreifache Konzentration an pACiA in auxotrophen Zellen herstellen.

#### 4.2.6 Phenylpropanoide unterliegen einem bidirektionalen Membrantransport

Wie auch schon bei der Biosynthese von pAPA, konnten die Produkte der Biotransformationen von pAPA, Tyrosin und Phenylalanin im Zellüberstand wiedergefunden



werden. Bereits aus den Arbeiten von K. Watts (78) ist bekannt, dass diese Metabolite quantitativ ins Medium ausgeschleust werden. 95 % aller synthetisierten Phenylpropanoide befinden sich bei seiner Analyse im Zellüberstand. Allerdings scheint auch ein Transport der Verbindungen in die Zelle möglich. In Fütterungsversuchen für einen 4CL/CHS-exprimierenden Stamm wird bei den Arbeiten von K. Watts beispielsweise pCA in die Zellen aufgenommen und fast vollständig umgesetzt.

In *E. coli* sind nur wenige Systeme zur Aufnahme organischer Verbindungen bekannt. Diese gehören weitestgehend zur „Major Facilitator Superfamily“ (MFS), die verschiedenste Substrate in Uniport, Symport oder Antiport häufig mit oder gegen  $H^+/Na^+$  über die Plasmamembran transportiert (<http://www.tcdb.org/>). Hier sind vor allem Proteine der „Aromatic Acid: $H^+$  Symporter“ (AAHS), der „Phenyl Propionate Permease“ (PPP) und der „Anion:Cation Symporter“ (ACS) Familie interessant.

Zu der ACS Familie gehört zum Beispiel das Protein HpaX, das in verschiedenen Bakterien im Phenylacetat-Katabolismus Cluster *hpa* organisiert ist. Allerdings kommt dieses System nicht für den vorliegenden Fall in Frage, da der Transport aktiv und in die Zelle gerichtet ist. Zudem besitzen *E. coli* K12 Stämme wie ER2566 das *hpa* Cluster, auf dem *hpaX* kodiert ist, nicht.

In der AAHS Familie ist MhpT als Permease ein möglicher Kandidat. Durch Symport kann 3-Hydroxyphenylpropionat in die Zelle transportiert werden. Auch wenn für 2-Hydroxyphenylpropionat bereits ein anderer Transporter (OhpA aus *Rhodococcus* sp. V49) benötigt wird, wäre es möglich, dass dieses System für die Abgabe und Aufnahme der Phenylpropanoide pCA und pACiA, aber auch der späteren Intermediate (pACiAld, pACiAlk), genutzt wird.

Aus der PPP Familie käme zusätzlich HcaT in Frage, ein Transportprotein, das Phenylpropionat transloziert. Aus einer nicht zu MFS Superfamilie gehörenden Familie (SSS, „Solute:Sodium Symporter“) könnte ebenso eine putative Phenylacetat Permease (YjcG) involviert sein (18).

Unabhängig davon, welches Transportsystem für die beobachteten und in der Literatur beschriebenen Effekte sorgt, ist deutlich, dass darüber hinaus eine Translokation in beide Richtungen stattfindet, immer eine geringe Menge des Metaboliten in der Zelle ist und dort der jeweiligen Katalyse unterliegt. Die Abgabe der nicht durch *E. coli* verstoffwechselbaren Produkte wird wahrscheinlich zur Detoxifizierung erfolgen. Hydroxizimtsäuren, Hydroxizimtaldehyde und Hydroxizimtalkohole besitzen nachweislich verschiedenste biologische Wirkungen. Neben antimittotischer, östrogenener, antiasthmatischer und antimalarischer Wirkung werden Mikroorganismen auch direkt durch antimikrobielle und antifungale Aktivitäten geschädigt (4, 20). Die große Ähnlichkeit der

Hydroxycimtsäurederivate (pCA-Derivate) und der pACiA-Derivate - nur die Hydroxylgruppe ist gegen eine andere Gruppe ausgetauscht - deutet darauf hin, dass auch diese Verbindungen antimikrobiell sein könnten. Belege hierfür gibt es aber in der Literatur nicht, da eine derartige Verwendung nicht weiter beschrieben ist.

#### 4.2.7 Mutationen and Histidin 89 determinieren das Substrat der TAL

Beide verwendeten Ammoniak Lyasen, TAL und PAL, sind in der Lage, pAPA zu pACiA zu desaminieren. Vor allem das pflanzliche Enzym zeigte diese Aktivität *in vivo* deutlich, wenn auxotrophe Zellen verwendet wurden. Allerdings sind diese Zellen verfahrenstechnisch gesehen ungünstig. Die variierende Supplementation mit den Aminosäuren oder anderen Verbindungen (Glukose, IPTG) während Wachstums-, Induktions- und Produktionsphase machen häufige Medienwechsel erforderlich. Dies stellt einen hohen technischen und zeitlichen Aufwand dar. Die erfolgreiche Übertragung der Reaktionen in prototrophe Zellen wäre dementsprechend wünschenswert. Hierzu kann es aber nur kommen, wenn ein Enzym gefunden wird, das weder Tyrosin noch Phenylalanin, sondern nur pAPA desaminiert. In der Literatur finden sich keine Beschreibungen für derartige Reaktionen. Die einzig bekannte Reaktion, die pAPA natürlicherweise als Substrat hat, ist die Adenylierung durch CmlK (25).

Aus den Arbeiten von K. Watts (80) und G. Louie (39) ist bekannt, dass die *Rs*TAL durch einen einzigen Aminosäureaustausch in eine *Rs*PAL umgewandelt werden kann. Diese Position, Histidin 89, muss dazu durch ein Phenylalanin ersetzt werden. Dieses Prinzip konnte auch bereits ansatzweise in Gegenrichtung für eine PAL aus *Arabidopsis thaliana* bewiesen werden. Entsprechend diesen Arbeiten wurde das Konzept entwickelt, durch einen analogen Austausch über gerichtete Mutagenese die TAL in ein pAPA-spezifisches Enzym umwandeln zu können.

Die Auswahl der hierzu verwendbaren Aminosäure basiert auf Überlegungen zur „Umkehrung“ der Substratbindung hinsichtlich der beteiligten funktionellen Gruppen (Abbildung 3.15). Ist bei der Tyrosindesaminierung eine OH-Gruppe der Protonendonator und His89 der Akzeptor, soll nach Umgestaltung des aktiven Zentrums für pAPA NH<sub>2</sub> der Protonendonator und im Enzym der entsprechende Akzeptor sein.

Als mögliche Bindungspartner für pAPA wurden Aminosäurereste mit Carboxylgruppe (Asp, Glu), Säureamidgruppe (Asn, Gln), Hydroxylgruppe (Ser, Thr, Tyr) und Methylsulfidgruppe (Met) ausgesucht. Die Auswahl dieser Reste basierte auf den verschiedensten Berichten und Überlegungen zur Möglichkeit der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen.

Interessant sind dabei vor allem die Reste Met89 und Pro89. Während Methionin als Bindungspartner für H-H-Brückenbindungen erst seit kurzem bekannt ist (81), wird Pro89 gerne genutzt, um  $\alpha$ -Helices durch einen destabilisierenden Knick zu zerstören (51).

Von den neun ausgewählten Resten Glutamin, Glutamat, Aspartat, Asparagin, Methionin, Serin, Threonin, Tyrosin und Prolin zeigte keiner die gewünschte Veränderung in der Reaktivität für pAPA (Tabelle 3.3). Eine deutliche Steigerung der Aktivität blieb aus. Lediglich die Substitution durch Pro89 führte zu einer leichten Verbesserung, die aber durchaus im Bereich eines Messfehlers liegt. Trotzdem ist dieser Effekt hervorzuheben, da Pro89 als Negativkontrolle eigentlich die Substratbindung und damit auch die Desaminierung völlig unterbinden sollte. Interessanterweise erfüllt Pro89 in den anderen Ansätzen durchaus diese Rolle, da weder Tyrosin noch Phenylalanin durch die jeweilige TAL umgesetzt wurden. Allerdings muss konstatiert werden, dass auch die Reste Tyr89 und Thr89 vergleichbare Effekte für Tyrosin und Phenylalanin zeigten.

Aus den Ergebnissen für Pro89 könnte geschlossen werden, dass pAPA nicht mit Position 89, sondern einem anderen Rest im aktiven Zentrum interagieren muss, um als Substrat verwendet werden zu können. Pro89 führt damit, wie auch das etwas weniger reaktive Enzym mit Ser89, zu einer TAL mit alleiniger pAPA-Aktivität. Durch die ausgebliebene deutliche Steigerung der Reaktivität eignet sich das Enzym allerdings nicht wesentlich besser als bei Verwendung von His89 in auxotrophen Zellen. Eine starke Anreicherung von pAPA wird hierbei ebensowenig stattfinden.

Problematisch an den rationalen Überlegungen zur Änderung der Substratdetermination ist, dass nur abgeschätzt werden kann, wie das chemische Verhalten verschiedener Aminosäurereste und des Substrates *in vivo* ist. Faktoren wie der pH in der Mikroumgebung des Enzyms - und damit die unterschiedlichen Ladungszustände - sind nicht ausreichend bekannt.

Im Literaturkontext bedeutender, wenn auch für die hier erwünschte Reaktion nebensächlich, ist die Tatsache, dass weitere Aminosäurereste gefunden wurden, die eine Umwandlung von TAL in PAL zulassen. Gln89 wurde bereits durch K. Watts (80) charakterisiert und zeigte ähnlich der vorliegenden Studie, dass Phenylalanin das bevorzugte Substrat ist. K. Watts kann aber nachweisen, dass diese Änderung nicht den  $k_{cat}$  für Tyrosin betrifft. Der Einbau von Asn89, der hier für die *in vivo* Studie eine gute Aktivität für Phenylalanin zeigt, führte bei K. Watts zu einer Verschlechterung der Reaktivität für Tyrosin und nur einer vergleichbaren Aktivität zu His89 für Phenylalanin. Neben diesen beiden Resten wurden in der vorliegenden Studie auch Met89

und Asp89 als aktiv nachgewiesen. Vor allem die Methioninsubstitution, die *in vivo* und *in vitro* nur Phenylalanin akzeptiert, ist hervorzuheben. Die Studien von K. Watts haben gezeigt, dass für die Umsetzung beider Substrate nicht nur der mögliche Bindungspartner, sondern auch die Hydrophobizität im aktiven Zentrum und die Größe des Substituenten an Position 89 entscheidend sind. Methionin scheint diesen Ansprüchen in Hinsicht auf Phenylalanin-Desaminierung am ehesten gerecht zu werden.

#### 4.2.8 Biosynthese und Desaminierung von pAPA lassen sich verknüpfen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die PAL in auxotrophen Zellen pAPA desaminieren, und pAPA durch ADCS, ADCM und ADPDH in selbigen synthetisiert werden kann, erfolgte die Verknüpfung beider Reaktionswege (Abbildung 3.16). Beide Stämme, der prototrophe ER2566 und der auxotrophe ER2566  $\Delta pheLATyrA$ , waren in der Lage, durch die Aktivität aller vier Enzyme pACiA biosynthetisch herzustellen. Ähnlich der Fütterung von pAPA entstanden auch bei der rekombinanten Bereitstellung in prototrophen Zellen alle drei Säuren: pACiA, pCA und CiA. pCA reicherte sich ebenso am stärksten an, gefolgt von CiA und, mit der niedrigsten Konzentration, pACiA. Nach 67 h war pCA 3,7fach höher konzentriert als CiA, was ungefähr den 2,5fachen Unterschied in der cytosolischen Konzentration beider Substrate widerspiegelt (46). Im Vergleich zu pACiA war pCA sogar 8fach höher konzentriert. Die Ergebnisse sind relativ gut vergleichbar zu denen der pAPA-Desaminierung bei 1 mM Fütterung, bei denen die ungewöhnliche Aminosäure auch das am schlechtesten umgesetzte Substrat war, aber in einer ähnlichen Größenordnung wie Phenylalanin (endogen synthetisiert) desaminiert wurde.

In den auxotrophen Zellen war das Verhältnis der Produkte gegenüber ER2566 deutlich verändert. Nach 67 h war CiA mit Abstand das höchstkonzentrierte Produkt. Es lag 3 x so viel CiA wie pCA und 2 x so viel wie pACiA vor. Die Endkonzentrationen spiegeln dabei nicht das Bild wider, das die Fütterungsversuche gezeigt haben. Zwar entstand 50 % mehr pACiA als pCA, bei den Versuchen mit 1 mM pAPA-Fütterung wurde allerdings gar kein Tyrosin umgesetzt. Auch die Konzentration der CiA ist hierbei deutlich niedriger als bei der rekombinanten Biosynthese. Allerdings fand während der Fermentation eine deutliche Veränderung der Verhältnisse statt. Ist pCA immer das niedrigst konzentrierte Produkt, dominiert pACiA das Produktspektrum für 25 h. Danach kippte das Verhältnis zu Gunsten der CiA. Es ist anzunehmen, dass durch die hohe Konzentration gefütterter pAPAs die Reaktionen der PAL für Tyrosin und CiA, die nur durch Proteolyse verfügbar sind, unterdrückt werden. Die anfänglich durch rekombinante Biosynthese entstandene hohe Konzentration von pAPA in auxotrophen Zellen

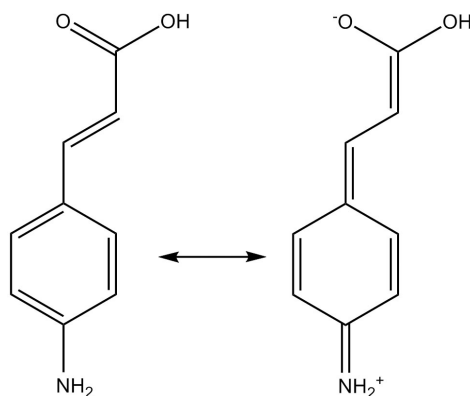
(Abbildung 3.6) hatte wahrscheinlich einen ähnlichen, wenn auch nicht so ausgeprägten Effekt. pAPA verdrängt die geringen Mengen Tyrosin und Phenylalanin kompetitiv von der Katalyse. Dies führte zu vergleichbar großen Mengen pACiA, aber auch messbaren Anteilen von pCA und CiA. In dem Bereich, in dem das CiA/pACiA Verhältnis kippt, war auch eine deutliche Abnahme der pAPA Produktion (ohne PAL Expression) zu beobachten. Ist dieser Effekt übertragbar, und die pAPA Biosynthese klingt auch bei gleichzeitiger PAL-Expression ab - was technisch nur schwer zu erfassen sein dürfte - könnte dies die geringere Produktzunahme gut erklären. Dies hieße aber auch, dass ein Versorgungsproblem mit pAPA die Desaminierung limitiert. Da eine gemeinsame Messung beider Metabolite (pAPA und pACiA) technisch nicht möglich war, und eine zeitverzögerte Messung eventuell zu verfälschten Daten wegen Stoffabbaus geführt hätte, kann der eigentliche Grund hier nicht bestimmt werden.

pACiA reagiert auf Temperaturen unter 0 °C sensibel. Bereits einfaches Einfrieren kann bis zu 30 % Produktverlust bedeuten. pAPA scheint zwar in dieser Hinsicht stabiler zu sein, ist aber im Allgemeinen nicht lange in wässriger Lösung stabil. Die in para-Position befindliche Aminogruppe ist aufgrund der Lage an einem konjugierten aromatischen System sehr reaktiv. Eine Modellierung des pACiA-Moleküls nach den allgemeinen Vorgaben zeigt, dass, während die  $\gamma$ -Carboxylgruppe einen stark deaktivierenden mesomeren (Resonanz-)Effekt auf das Aren ausübt, der  $\text{NH}_2$ -Rest mit seinem, dem induktiven Effekt überwiegenden mesomeren (Resonanz-)Effekt, eine stark aktivierende Wirkung auf das Aren ausübt (77). Es entsteht damit theoretisch eine Verbindung gemäß Abbildung 4.1. Das Modell entspricht dem Verhalten von Tyrosin bei pH-Werten zwischen 9,4 und 10,6, wenn ein Teil der Aminosäure eine mesomere Struktur ausbildet und sowohl  $-\text{NH}_3^+$  ( $\text{pK}_2$ ) und  $-\text{O}^-$  ( $\text{pK}_R$ ) besitzt. Die positiv geladene Aminogruppe von pACiA ist sehr reaktiv und dementsprechend das gesamte Molekül relativ instabil (G. Unkelbach, ICT, persönliche Mitteilung). Belegt wird dies durch die bei organischer Extraktion stattfindende Degradation der Säure.

In beiden Fällen, der Verwendung prototropher wie auxotropher Zellen, war bei der Biosynthese von pACiA nur ein geringer Biomassezuwachs bzw. sogar eine Abnahme der Zelldichte zu beobachten. Da dieser Effekt bei der Herstellung von pAPA nicht zu beobachten war - selbst die auxotrophen Zellen konnten hierbei ihre Zellzahl noch verdoppeln - ist davon auszugehen, dass ein direkter Zusammenhang mit der Anbindung der Desaminierung besteht.

Ob allerdings der verstärkte Entzug von Aminosäuren für die Expression der Transgene, der Entzug von Chorismat, die Biosynthese von pACiA oder eine Kombination aller Effekte hierfür verantwortlich ist, konnte im Rahmen dieser Machbarkeitsstudie nicht geklärt werden. Festzuhalten bleibt, dass pACiA durch die rekombinante Biosyn-

these von pAPA und die Desaminierung durch *ZmPAL* in prototrophen, vor allem aber in auxotrophen Zellen hergestellt wird. Dies ist somit die erste Dokumentation der *in vivo* Desaminierung rekombinant synthetisierten pAPAs.



**Abb. 4.1: Mesomerie für pACiA.** Der stark aktivierende Effekt der Aminogruppe und der stark deaktivierende Effekt der Carboxylgruppe gleichen sich aus.

### 4.3 Biosynthese von pACiAlk

Nachdem erfolgreich bewiesen werden konnte, dass pAPA in ER2566 und ER2566  $\Delta$ *pheLATyrA* Zellen durch die Aktivität von ADCS, ADCM und ADPDH synthetisiert werden kann und zusätzlich durch eine Ammoniak Lyase, präferentiell der PAL aus Mais, zu pACiA desaminiert wird, war die weitere Anbindung von Reaktionen aus Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese der nächste Schritt.

#### 4.3.1 pACiA ist Substrat für 4CL und CCR

Erste Vorversuche hierzu zeigten, dass die Aktivitäten einer Ammoniak Lyase und der 4CL aus Petersilie koppelbar sind. Bei Fütterung von pAPA entstand detektierbar der Thioester pACi-CoA. Die Arbeiten wurden im Rahmen der Synthese von pC-CoA und pACi-CoA durchgeführt (F. Jansen, persönliche Mitteilung). Auf eine ausführliche Schilderung in diesem Rahmen wird daher verzichtet.

Die Versuche, den neuartigen Thioester durch aufgereinigte *ZmCCR* zu reduzieren, sind in Abbildung 3.18 dargestellt. Die Daten belegen, dass pACi-CoA konzentrationsabhängig mit verschiedenen spezifischen Aktivitäten umgesetzt wird. Genauere Angaben können aufgrund der unbekanntenen Konzentration des Thioesters nicht gemacht werden. Nach circa 10 min war die Reaktion für alle gemessenen Ansätze beendet.

Ob dies allerdings durch das Versiegen des Substrates oder andere Effekte, wie eine Produkthemmung, bedingt ist, kann aufgrund der nicht bestimmbareren Substratkonzentration nicht angegeben werden. Dies ist der erste Beleg für die Aktivität einer CCR mit dem ungewöhnlichen Aldehyd der pACiA.

Nach den erfolgreichen Nachweisen zu Aktivierung und Reduktion der pACiA durch 4CL und CCR konnte auch deren Interaktion auf zellulärer Ebene bestimmt werden. Die *E. coli* BL21 Zellen mit pETDuet-ZmCCR-Pc4CL setzen innerhalb von 3 h 1 mM gefüttertes pACiA soweit um, dass sich das Medium deutlich gelb-grünlich färbt.

Die dabei entstandene Substanz ließ sich durch Verwendung einer strata-X-AW Säule von den meisten Medienkomponenten abtrennen und aufkonzentrieren. Das Eluat dieser Aufreinigung wurde für <sup>1</sup>H-NMR, HPLC und LC-MS Analysen verwendet. Alle drei Methoden zeigten eindeutig, dass zumindest ein Phenylpropanoid oder sogar der pACiAlk in den Zellen entstanden war. Die Analyse durch die NMR konnte aufgrund der nicht hochreinen Präparation nur das Vorhandensein eines Phenylpropanoids nachweisen. Weder die Protonen einer Carboxyl-, Carbonyl oder Hydroxylgruppe an  $\alpha$ -C, noch die Aminogruppe in para-Position ließen sich so bestimmen. Wichtig ist aber, dass dieses Verfahren klar das Vorhandensein der Doppelbindung zeigte. Aufgrund der Reaktivität eines solchen Bindungstyps in Kombination mit den anderen funktionellen Gruppen des Moleküls konnte nicht davon ausgegangen werden, dass diese Doppelbindung stabil erhalten bleibt. Durch die HPLC konnte nicht die Identität des pACiAld oder pACiAlk geklärt werden, dafür aber eine grobe Abschätzung über die Reinheit der Aufreinigung und damit die Verwendbarkeit als Standard getätigt werden. Eine Fläche von über 90 % des gesamten Wertes bei 275 nm zeigte, dass die Präparation als Standard gut geeignet ist und eventuelle Verunreinigungen in diesem Wellenlängenbereich nicht störend sind (Abbildung 3.19). Die genaueste Analyse lieferte die LC-MS (Abbildung 3.20). Diese Methode identifizierte nicht nur den pACiAlk, sondern auch eine andere Substanz, die vermutlich pACiAld ist. Somit ist anzunehmen, dass die Methode zur Aufreinigung den Aldehyd nicht zu Gunsten des Alkohols diskriminiert und so die Messergebnisse nicht verfälscht hat.

#### 4.3.2 pACiAld wird CAD-unabhängig zu pACiAlk reduziert

Das Vorhandensein des Alkohols deutet auf einen unspezifischen Umsatz des Aldehyds hin. Entweder ist der Aldehyd chemisch instabil und es findet eine spontane Reduktion statt oder *E. coli* besitzt Enzyme, die zu einer Reduktion des aromatischen Aldehyds in der Lage sind.

Eine spontane Reduktion ist nicht unwahrscheinlich, da Aldehyde im Allgemeinen als reaktiv gelten. Die C-O Bindung der Carbonylgruppe ist stark polar und erzeugt eine positive Partialladung am C-Atom, wodurch dieses nukleophil angegriffen werden kann. Die Keto-Enol-Tautomerie der Carbonylgruppe mit dem benachbarten Kohlenstoff und die geringe Elektronendichte des Carbonyl-Kohlenstoffatoms führen zu einer höheren Azidität des benachbarten C-Atoms und erhöhen ebenfalls die Reaktivität (49). Eine Überprüfung für diese Theorie kann aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit kommerziell erhältlichen pACiAld nicht erfolgen.

Die Enzym-vermittelte Reduktion zu einem Alkohol ist allerdings auch denkbar. Die Suche nach konservierten Domänen in der CAD zeigte, dass unter anderem Ähnlichkeiten zu den Domänen pfam08240 (ADH\_N), pfam00107 (ADH\_zinc\_N), AdhP, PRK09422, Tdh, PRK13771, Qor und AdhC vorhanden sind. Auch wenn es keinen expliziten Hinweis auf Enzyme zur Reduktion aromatischer Alkohole in *E. coli* gibt, sind einige der Domänen in Proteinen des Bakteriums enthalten. Neben zahlreichen (Alkohol) Dehydrogenasen finden sich hier auch Shikimatdehydrogenasen, Quinon-Oxidoreduktasen und eine Reihe weiterer, nicht genau charakterisierter Enzyme (zum Beispiel *yjgB* und *yjgN*). Es ist unklar, ob eines dieser Enzyme auch eine Aktivität zur Reduktion von pACiAld besitzt. Aufgrund der Vielzahl von möglichen Treffern im Bereich der Alkoholdehydrogenasen ist dies allerdings wahrscheinlich.

Die Fütterungsversuche mit pACiA sowie den Enzymen 4CL und CCR zeigten deutlich, dass es möglich ist, durch diesen „abgekürzten“ Reaktionsweg bereits zum gewünschten Produkt zu kommen. Auch wenn aufgrund fehlenden Standards keine Quantifizierung des Produktes vorgenommen werden konnte, scheint der Umsatz effizient zu verlaufen. Bereits nach wenigen Stunden zeigte das Medium eine intensiv gelb-grünliche Färbung - ein deutlicher Hinweis auf die Bildung des Alkohols. Die Analysen deuteten aber auch darauf hin, dass eine längere Fermentation nicht zu höheren Produktkonzentrationen führt, sondern diese sogar wieder abnehmen (Daten nicht dargestellt). Dies geht einher mit dem Auftreten eines rötlich-braunen Niederschlags, der sich vor allem durch einfrieren bildet. Eine Analyse dieser Verbindung konnte im Rahmen der Arbeit nicht mehr erfolgen, daher ist unklar, ob es sich hierbei um das Produkt einer spontanen Kondensation oder anderer Reaktionen des pACiAlk handelt.

Die Beobachtungen zur Instabilität in der Kultur gehen einher mit identischen Vorgängen während der Aufreinigung. Es war zwar möglich, eine klare, tiefrote Fraktion des Alkohols aus dem Medium zu isolieren, bereits nach wenigen Minuten entstand aber deutlich sichtbar eine Trübung, die dem rötlich-braunen Niederschlag bei einfrieren sehr ähnlich sieht. Dieser Rückstand konnte durch keines der verwendeten Lösungsmit-



tel (Wasser, Ethanol, Methanol, Chloroform, Diethylether, Acetaldehyd oder Butanol) wieder in Lösung gebracht werden. Es wäre hierbei interessant, in weiteren Arbeiten die Natur der „Degradationsprodukte“ von pACiAlk aufzuklären, um so Methoden zur Stabilisierung zu entwickeln. Dazu wäre es aber unerlässlich, einen besseren direkten Zugriff auf weiterführende analytische Methoden zu haben. Interessant ist, dass die in D<sub>2</sub>O für die NMR-Analyse gelagerte Probe keinen Niederschlag zeigte. Es kann daher unter anderem angenommen werden, dass, ähnlich den Vorgängen bei pACiA, organische Lösungsmittel, Kälte oder das Vorhandensein von Wasserstoffatomen nicht deuterierter Lösungsmittel negative Effekte auf die Stabilität haben. Eventuell werden H-Atome durch pACiAlk aktiviert und auf das Molekül übertragen. Da eine Analyse aber aus zeitlichen und technischen Gründen nicht mehr durchgeführt werden konnte, müssen hier weiterführende Arbeiten zur Klärung beitragen.

### 4.3.3 Desaminierung limitiert den vollständigen Reaktionsweg

Nachdem durch die verschiedenen Techniken (HPLC, NMR, LC-MS) die Identität des Alkohols als Reaktionsprodukt einwandfrei geklärt werden konnte, erfolgte der Aufbau eines kompletten Reaktionswegs (Abschnitt 3.4.4). Dazu wurden jeweils ER2566 und ER2566  $\Delta$ *pheLATyrA* Zellen mit pCDFDuet-*CgADCS*, pACYCDuet-*SvADPDH-SvADCM*, pETDuet-*ZmPAL-Pc4CL* und pRSFDuet-*ZmCCR-ZmCAD* transformiert. Die transgenen Zellen ließen sich selektiv auf den Antibiotika Streptomycin, Chloramphenicol, Ampicilin und Kanamycin anziehen. Im Vergleich zu Einfach- oder Doppelttransformatanten war das Wachstum allerdings deutlich retardiert. Sowohl der starke Selektionsdruck als auch die Aufrechterhaltung von fast 26 kbp zusätzlichen genetischen Materials scheint deutliche Auswirkungen auf die Wachstumsrate zu haben.

Vor Versuchen zur Produktion des Alkohols durch die Kombination aller sieben Transgene in prototrophen und auxotrophen Zellen war es nötig, die Expression der Enzyme oder zumindest die Aufrechterhaltung der einzelnen Konstrukte zu testen. Die höhere Aussagekraft würde durch einen Nachweis der Koexpression von ADCS, AD-CM, ADPDH, PAL, 4CL, CCR und CAD erbracht werden. Dies ist aber technisch nicht zu realisieren. Wie Voruntersuchungen zeigten, ist der Nachweis von mehr als drei Proteinen durch SDS-PAGE und Western Blot bei einer Koexpression kaum möglich, da eine große Anzahl unspezifischer Signale und Abbauprodukte die Auswertung erschwert. Auch die Überlagerung einzelner Signale stellt ein Problem dar. So können CCR und CAD nicht unterschieden werden, beide haben Massen um 42 kDa. Obwohl die ADCS (69,4 kDa) fast 9 kDa kleiner ist als die PAL (78,1 kDa), ist in einem Bereich

von über 70 kDa eine unterscheidbare Auftrennung solcher Abstände ebenfalls nicht gut möglich.

Da ein Proteinnachweis über SDS-PAGE oder Western Blot hier nicht geeignet ist, um die Expression aller Proteine zu bestätigen, können nur physiologische Tests und PCR-basierte Nachweise der Konstrukte aushelfen. Bei letzterem wird jedes Konstrukt jeweils spezifisch nachgewiesen. Die verwendeten Primersysteme erlauben nur eine Amplifikation ausgehend von beiden Integraten und schließen dabei den intergenen Bereich zwischen MCS I und MCS II ein. Ausnahme hier ist allerdings pCDFDuet-*CgADCS*, da nur ein Integrat vorliegt. Dieses wird durch Kombination eines intragenen und eines intergenen Primers nachgewiesen. Wie in Abbildung 3.21 zu sehen ist, konnten in beiden verwendeten Stämmen alle vier Konstrukte nachgewiesen werden, der Vergleich der Kolonie-PCR Ansätze mit aufgereinigten Plasmiden belegt dies eindeutig. Kontaminationen oder unspezifische Signale sind durch die Negativkontrollen ausgeschlossen.

Der PCR-basierte Nachweis der Konstrukte und der physiologische Nachweis durch das Wachstum auf einer Kombination aller vier Antibiotika sollte mit der Expression aller sieben Transgene korrelieren. Zusätzlich wurden Fütterungsversuche auf verschiedenen Stufen des Reaktionswegs durchgeführt, aus denen Rückschlüsse auf die Aktivität einzelner Abschnitte gezogen werden können (Tabelle 3.4). Die Ergebnisse dieser Tests belegen für die auxotrophen Zellen deutlich, dass die Desaminierung von pAPA für den Reaktionsweg limitierend ist. Ähnlich den Versuchen zur Biotransformation von pACiA durch 4CL und CCR wird die Säure auch in diesen Zellen schnell zu pACiAlk umgesetzt. Zwar kann dieser aufgrund des starken Signals nicht von der Säure durch HPLC unterschieden werden, die gelb-grünliche Färbung der Kultur deutet allerdings klar auf pACiAlk hin. Werden höhere Konzentrationen pAPA gefüttert, entstehen Säure und Alkohol. Allerdings sind beide nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden. Ohne eine Fütterung entsteht nur pAPA als aminiertes Produkt. Interessant ist, dass, mit Ausnahme des pACiA-Fütterungsansatzes, immer auch pCAlk entsteht. Wird aber pACiA zugegeben, findet sich dieser Alkohol kaum wieder. Dies bedeutet, dass ohne ausreichende Konkurrenz aus der Proteolyse frei werdendes Tyrosin durch PAL, 4CL, CCR und CAD zu pCAlk umgesetzt wird. Ist die Konzentration von pACiA aber hoch, reicht dies aus, um Tyrosin/pCA von der Katalyse zu verdrängen. Größere Mengen pAPA können das nicht leisten, was belegt, dass die Desaminierung durch PAL nicht ausreichend stark ist.

#### 4.3.4 Prototrophe Zellen eignen sich zum Aufbau des Reaktionswegs

Nach den Versuchen zum Nachweis der Konstrukte und der Funktionalität einzelner Fragmente des Reaktionswegs wurden vergleichende Tests mit proto- und auxotrophen Zellen durchgeführt (Abbildung 3.22). Dabei konnte eindeutig festgestellt werden, dass ER2566  $\Delta_{pheLAtyrA}$  Zellen nicht in der Lage sind, pACiAlk anzureichern. Bei dem prototrophen Stamm hingegen wurden geringe Mengen des Alkohols nachgewiesen.

Fragwürdig ist, wieso die auxotrophen Zellen, die zwar alle Produkte synthetisieren können und vor allem bei der Desaminierung von pAPA gute Eigenschaften aufweisen, nicht in der Lage sind, den Alkohol herzustellen. Es ist anzunehmen, dass die Expression einer so großen Anzahl an Proteinen in diesem Stamm, vor allem in der Produktionsphase, in der Tyrosin und Phenylalanin nicht länger supplementiert werden, weitaus weniger optimal ist als für die prototrophen Zellen. Diese können mit der PAL zwar nur geringe Mengen pACiA bilden, scheinen aber im Allgemeinen vitaler und zum Aufbau des gesamten Reaktionswegs befähigt zu sein. Der Nachteil bei der Nutzung dieses Stammes ist, dass sich pCAlk ( $R_t \approx 18$  min) stärker anreichert als der aminierte Alkohol. An der geringen Menge des natürlichen Monolignols kann aber im Vergleich zu anderen Studien (F. Jansen, persönliche Mitteilung) abgelesen werden, dass es mehrere mögliche limitierende Faktoren gibt. Zum einen ist das Minimalmedium, das hier verwendet wird, zwar ausreichend um *E. coli* anzuziehen, es deckt aber nur die nötigsten Bedürfnisse des Bakteriums. Somit müssen die Zellen alle notwendigen Metabolite für ihren Stoffwechsel selbständig herstellen. Bei Verwendung komplexer Medien wie LB ist die Produktivität für das natürliche Monolignol deutlich erhöht. Aufgrund der Interferenz von Tyrosin und Phenylalanin aus LB-Medium mit der PAL-Reaktion ist die Verwendung des eigentlich geeigneteren Mediums hier allerdings nicht möglich. Stattdessen wäre eine alternative Fermentation auf modifizierten Minimalmedien denkbar. Dazu könnte dem M9 Medium ein erweiterter Satz an Aminosäuren supplementiert werden, darunter auch solche, die keine negativen Einflüsse auf einzelne Reaktionen während der Produktionsphase besitzen.

Ein weiterer limitierender Faktor ist die verfügbare Kohlenstoffquelle. Häufig wird in Fermentationen Glukose als Kohlenstoff- und Energiequelle eingesetzt. Dieser Zucker hat den Vorteil, nicht nur direkt über Glykolyse, Zitratzyklus und Endatmung in Energie umgewandelt werden zu können. Er steht auch für die Synthese aller Bausteine, die Glukose, Ribose, Desoxyribose und andere Zuckerderivate enthalten, zur Verfügung. Ebenso kann sie von der Ebene Glukose-6-Phosphat in den Pentosephosphat- und Entner-Doudoroff-Weg einfließen. Aufgrund der Verwendung des *lac*-Operator/T7-

Promotor Systems in Verbindung mit DE3 Zellen führt Glukose allerdings zur Hemmung der Expression. Daher kann dieser, von den Zellen üblicherweise bevorzugte, Zucker hier nicht verwendet werden. Ein möglicher Ersatz ist Glycerin. Dieses kann zwar auch in die Glykolyse eingeschleust werden, für die weiteren Reaktionen, die der Hexose direkt möglich sind, ist für Glycerin allerdings eine vorherige Glukoneogenese notwendig. Für diese benötigt der Organismus, bezogen auf 2 mol Glycerin, entsprechend dem C<sub>6</sub>-Körper der Glukose, aber 2 mol ATP zur Phosphorylierung durch die Aktivität einer Glycerinkinase. Bevor Dihydroxyacetonphosphat als direktes Intermediat von Glykolyse und Glukoneogenese entstehen kann, ist erst noch die Aktivität einer Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase notwendig. Diese bringt der Zelle allerdings zusätzliche Reduktionsäquivalente. Die Limitation der Kohlenstoff- und Energiequelle kann nur durch Verwendung anderer Promotorsysteme umgangen werden.

## 5 Fazit und Ausblick

### 5.1 Fazit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die rekombinante Biosynthese des ungewöhnlichen Monolignolderivates pACiAlk in *E. coli*. Weder diese, dem *p*-Cumarylalkohol analoge Verbindung, noch der artifizielle Reaktionsweg zu deren Synthese sind bislang bekannt oder beschrieben.

In dieser Studie wurde aus teilweise völlig unabhängigen Biosynthesewegen von Pflanzen und Bakterien eine Möglichkeit zur Herstellung von pACiAlk in *E. coli* entworfen. Durch einen mehrstufigen Prozess kann, ohne die Zugabe besonderer Vorstufen, ein entsprechender Expressionsstamm den aromatischen Alkohol pACiAlk synthetisieren und ins Medium sekretieren. Die Arbeiten wurden in einem prototrophen ER2566 und einem - für die Tyrosin- und Phenylalaninsynthese defizienten - auxotrophen ER2566  $\Delta$ *pheLATyrA* Stamm durchgeführt.

Die theoretische Ableitung des Biosynthesewegs begründete sich auf Reaktionen aus der Chloramphenicolbiosynthese von *S. venezuelae* DSM 40230 und der Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese der Monokotyledonen. Eine Verknüpfung von Fragmenten beider Reaktionswege wurde zuvor noch nie beschrieben.

Es konnte gezeigt werden, dass *E. coli* ER2566 und ER2566  $\Delta$ *pheLATyrA* Stämme durch die Aktivitäten der Enzyme ADCS, ADCM und ADPDH in der Lage sind, die Aminosäure pAPA herzustellen. Im Gegensatz zu der natürlichen Biosynthese in Streptomyceten oder bisherigen transgenen Ansätzen ist die hier verwendete Kombination der Enzyme neu. Zur Vermeidung von Problemen, die aus dem hohen GC-Gehalt und der veränderten codon usage des Aktinobakteriums gegenüber dem Enterobakterium entstehen könnten, wurde eine ADCS aus der Folatbiosynthese von *C. glutamicum* und eine synthetisch hergestellte ADPDH verwendet. Im Zusammenspiel mit endogenen Tyrosinaminotransferasen konnte pAPA produziert und in das Medium exkretiert werden. Dort lag der Metabolit in Konzentrationen bis zu 400  $\mu$ M vor. Die Identität der Aminosäure wurde durch Aufreinigung, DC und HPLC verifiziert.

Die Annahme, pAPA in die Reaktionen der Phenylpropanoidbiosynthese einfließen zu lassen, konnte ebenfalls bestätigt werden. Zwei verwendete Enzyme, eine TAL aus *R. sphaeroides* und eine PAL aus *Z. mays*, desaminieren das ungewöhnliche Substrat *in vitro*. Das pflanzliche Enzym zeigte *in vivo* in der Kombination mit auxotrophen Zellen die größte Effizienz bei der Biotransformation der Aminosäure zu pACiA. Die PAL desaminiert nicht nur gefüttertes, sondern auch durch die Reaktionen von ADCS,

ADCM und ADPDH entstandenes pAPA. Ohne eine Zugabe der Vorstufe konnten auxotrophe Zellen bis zu 74  $\mu\text{M}$  pACiA im Medium anreichern. Diese Verknüpfung von Chloramphenicol- und Phenylpropanoidbiosynthese ist einmalig und belegt die Kompatibilität der eigentlich unabhängigen Reaktionswege.

Die aromatische Säure pACiA wurde in dieser Arbeit nicht nur biosynthetisch hergestellt, es konnte auch gezeigt werden, dass die weiteren Reaktionen der Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese hierin ein Substrat erkennen. Obwohl weder die 4CL aus *P. crispum*, noch die Enzyme CCR und CAD aus *Z. mays* natürlicherweise in Kontakt mit pACiA und Folgeprodukten kommen, setzen sie die Säure zu pACiAlk um. Der Alkohol, aber auch pACi-CoA, konnten aufgereinigt, und ihre Identität verifiziert werden.

Besonders zu erwähnen ist, dass bereits die Reaktionen von 4CL und CCR ausreichen, um gefüttertes pACiA, wahrscheinlich unter Beteiligung endogener Alkoholdehydrogenasen, in pACiAlk zu überführen. Dieser verkürzte Reaktionsweg stellt damit eine Alternative zum eigentlichen Ansatz dar.

Durch die gemeinsame Expression aller sieben Transgene - *CgADCS*, *SvADCM*, *SvADPDH*, *ZmPAL*, *Pc4CL*, *ZmCCR* und *ZmCAD* - konnte in prototrophen Zellen ohne Zugabe von Vorstufen eine geringe Menge pACiAlk biosynthetisch hergestellt werden. Damit wurde bewiesen, dass ein vielstufiger und rekombinanter Reaktionsweg *E. coli* dazu befähigt, eine bislang unbekannte aromatische Verbindung herzustellen und ins Medium auszuschleusen.

## 5.2 Ausblick

Die Arbeiten zur Biosynthese von pACiAlk waren aufgrund ihres innovativen Charakters nur auf den grundsätzlichen Nachweis der Machbarkeit ausgelegt. Wegen des enormen Umfangs der verbundenen Vorarbeiten konnte keine grundlegende Optimierung des Reaktionswegs vorgenommen werden. Allerdings weisen die erzielten Ergebnisse auf einige Limitationen hin, deren Beseitigung die Effizienz steigern dürfte.

Den stärksten Engpass stellt die Desaminierung von pAPA durch eine Ammoniak Lyase dar. Zum einen sind Spezifität, Affinität und Reaktionsgeschwindigkeit beider Enzyme - TAL und PAL - noch nicht ausreichend hoch. In prototrophen Zellen verdrängen die natürlichen Substrate Tyrosin und Phenylalanin pAPA teilweise vollständig von der Reaktion. Zum anderen ist in auxotrophen Zellen - ohne Möglichkeit diese

beiden aromatischen Aminosäuren zu synthetisieren - zwar ein deutlich höherer Umsatz mit pAPA zu beobachten, die Anzucht der Zellen ist allerdings verfahrenstechnisch deutlich aufwendiger, und die Deletion begrenzt die metabolischen Fähigkeiten von *E. coli*.

Eine denkbare Lösung dieses kombinierten Problems wäre die Änderung der Substratdetermination der Enzyme. Wie bereits in dieser Studie begonnen, müsste durch Variationen im aktiven Zentrum ein Enzym hergestellt werden, das pAPA möglichst als alleiniges, mindestens aber als dominierendes Substrat erkennt. Durch die modernen Möglichkeiten der *in silico* Modellierung von Substrat-Enzym-Komplexen muss der Aminosäurerest, der für die Bindung von pAPA verantwortlich ist, ausfindig gemacht und ausgetauscht werden. Bereits die hier durchgeführten Mutationen der TAL zeigen, dass dieses Substrat wahrscheinlich nicht mit dem für Tyrosin und Phenylalanin beschriebenen Aminosäurerest an Position 89 interagiert.

Sollte es nicht möglich sein, auf diesem Wege ein geeigneteres Enzym selber herzustellen, besteht die Möglichkeit, durch ein Screening weiterer TAL-Enzyme geeignetere Kandidaten zu finden.

Die Nutzung des Duet-Systems, durch das alle sieben Transgene auf vier Vektoren verteilt modular exprimiert werden können, eignete sich besonders für den sequentiellen Aufbau des artifiziellen Reaktionsweges. Der permanente Selektionsdruck von bis zu vier Antibiotika und die genetische Last von fast 26 kbp zusätzlicher Plasmid-DNA haben aber negative Auswirkungen auf die erreichbaren Wachstumsraten.

Durch eine Integration aller relevanten ORFs unter Verbleib eines Selektionsmarkers in das Wirtsgenom, wäre es möglich, die Wachstumsraten von *E. coli* zu steigern und die Kosten für Antibiotika zu senken. Einhergehend sollte dabei auch die Wahl des Promotorsystems überdacht werden. Die hier verwendeten IPTG-induzierbaren Elemente eignen sich besonders für anfängliche Studien, in denen erst die Exprimierbarkeit des Proteins und die Reaktion der Zelle beobachtet werden muss, sehr gut. Allerdings ist der Induktor teuer und dieses Verfahren bei weitergehenden Fermentationen daher nicht wünschenswert. Deshalb sollten konstitutive Promotoren bei einer genomischen Integration in das System eingebaut werden.

Wie bereits beschrieben, wird *E. coli* häufig für Studien zu Reaktionen der Chloramphenicol-, aber auch der Phenylpropanoidbiosynthese verwendet. Obwohl aus dieser Studie nicht entnommen werden kann, ob das Bakterium oder der Stamm ER2566 die Produktion von pACiAlk auf irgendeine Weise hemmt, sollten alternative Wirte ausprobiert werden. Dabei wäre es ratsam, weiterhin auf möglichst einfache, mikrobielle Systeme, zum Beispiel Hefen, zu setzen. Zu beachten ist, dass keine interferierenden

---

Reaktionswege zu Abbau oder andersweitiger Verwendung einzelner Metabolite vorhanden sind.

Das größte Problem, vor allem in Hinblick auf eine mögliche Produktion im industriellen Maßstab, ist die augenscheinliche Instabilität des Produktes. Es muss geklärt werden, wie und mit welchem Partner pACiAlk reagiert. Nur anhand dieser Faktoren ist es möglich, gezielt Strategien zur Stabilisierung der Verbindung zu entwerfen. Sollte es dabei nicht möglich sein, durch bestimmte Agenzien pACiAlk in der Kultur aufrecht zu erhalten, muss zumindest eine verbesserte Aufreinigungsmethode entworfen werden, deren Bedingungen das Entstehen des beobachteten rot-bräunlichen Niederschlags verhindert.



## 6 Anhang

### 6.1 Sequenz der synthetisierten TAL

TAL ORF: 3 - 1574

His-Tag: 1575 - 1592

```
CCA TGG CTC TGG CTA TGA GTC CTC CTA AGC CAG CCG TGG AAC TGG ACC GTA
CAT AGA CCT GGA TCA AGC TCA TGC TGT TGC CAG CGG AGG GGC TCG TAT CGT
TCT GGC TCC TCC TGC ACG TGA TCG TTG TCG TGC ATC AGA GGC CCG TCT GGG
TGC TGT TAT TCG TGA GGC CCG TCA TGT TTA CGG GCT GAC AAC AGG CTT TGG
ACC ACT GGC TAA TCG TCT GAT TAG TGG TGA AAA TGT TCG AAC CCT CCA GGC
TAA TCT TGT ACA CCA TCT AGC CTC CGG AGT CGG TCC TGT GCT GGA CTG GAC
TAC CGC CCG TGC AAT GGT TCT GGC CCG TCT GGT GTC TAT TGC TCA GGG GGC
ATC CGG TGC TTC TGA GGG AAC AAT CGC TCG TCT GAT TGA CCT GCT GAA CAG
CGA GCT GGC ACC AGC AGT TCC TTC TCG TGG AAC TGT GGG TGC ATC AGG AGA
CCT GAC CCC ACT GGC TCA CAT GGT TCT GTG CCT GCA AGG CCG TGG TGA CTT
TCT GGA TCG TGA TGG AAC GCG TCT GGA TGG GGC TGA GGG TCT GCG TCG TGG
GCG TCT CCA GCC ACT GGA TCT GTC ACA TCG GGA TGC ACT GGC ACT GGT TAA
TGG AAC TTC AGC TAT GAC TGG TAT TGC TCT GGT CAA TGC TCA TGC TTG TCG
TCA CCT GGG CAA CTG GGC CGT CGC CCT GAC TGC TCT GCT GGC TGA GTG CCT
GCG TGG ACG TAC TGA GGC ATG GGC TGC TGC ACT GTC TGA TCT GCG TCC TCA
TCC AGG TCA AAA GGA TGC TGC TGC TCG TCT GCG TGC TCG TGT TGA TGG ATC
AGC TCG TGT TGT GCG TCA CGT TAT TGC CGA ACG TCG TCT GGA CGC CGG AGA
TAT TGG CAC AGA ACC AGA AGC TGG ACA GGA CGC ATA TTC CCT GCG TTG TGC
CCC TCA GGT TCT GGG AGC TGG ATT TGA TAC ACT GGC ATG GCA CGA CCG TGT
TCT GAC AAT CGA ACT GAA CGC TGT GAC TGA TAA TCC TGT TTT CCC TCC TGA
TGG ATC AGT GCC TGC TCT GCA TGG TGG GAA CTT CAT GGG TCA GCA CGT GGC
ACT GAC TAG TGA CGC ACT GGC TAC TGC TGT TAC TGT CCT GGC TGG TCT GGC
AGA GCG TCA GAT TGC TCG TCT GAC AGA TGA ACG TCT GAA TCG TGG ACT GCC
TCC TTT CCT GCA TCG TGG GCC TGC TGG TCT GAA CTC TGG TTT TAT GGG GGC
TCA GGT TAC AGC AAC TGC TCT GCT GGC AGA GAT GCG TGC TAC TGG ACC TGC
CAG TAT TCA TTC AAT TAG TAC CAA TGC AGC AAA TCA GGA CGT AGT TTC ACT
GGG AAC AAT CGC AGC ACG TCT GTG TCG TGA AAA GAT TGA TCG TTG GGC TGA
AAT ACT GGC TAT TCT GGC ACT GTG TCT GGC TCA GGC AGC CGA GCT GCG TTG
TGG ATC TGG TCT GGA TGG CGT TTC TCC AGC AGG AAA GAA GCT GGT TCA AGC
ACT GCG GGA GCA ATT TCC TCC ACT GGA GAC TGA TCG TCC TCT GGG TCA AGA
GAT TGC CGC TCT GGC TAC TCA TCT GCT GCA ACA GAG TCC AGT TCA CCA TCA
CCA TCA CCA TTA AGG ATC C
```

## 6.2 Sequenz der synthetisierten ADPDH

ADPDH ORF: 3 - 986

His-Tag: 987 - 1004

```
TCA TGA GCG GAT TTC CAC GTT CAG TGG TAG TTG GGG GTT CCG GAG CTG TCG
GTG GGA TGT TCG CCG GTC TTC TAA GAG AGG CTG GCT CAA GAA CGC TCG TTG
TCG ACC TTG TTC CAC CTC CAG GAC GTC CTG ATG CTT GTT TAG TTG GTG ACG
TTA CTG CAC CTG GAC CTG AGT TGG CGG CCG CCT TAA GGG ACG CCG ATC TCG
TTC TAT TGG CTG TCC ATG AAG ATG TCG CAC TCA AAG CAG TCG CTC CGG TGA
CTA GAC TTA TGA GGC CTG GGG CAC TAT TGG CTG ATA CCT TGT CAG TTA GAA
CTG GAA TGG CAG CTG AGC TCG CGG CTC ATG CCC CAG GAG TGC AGC ATG TGG
GAC TTA ATC CTA TGT TCG CTC CTG CTG CAG GAA TGA CGG GAC GAC CTG TCG
CAG CCG TTG TTA CCA GAG ATG GAC CTG GTG TTA CCG CTC TCT TGC GTC TGG
TTG AAG GGG GTG GTG GAA GAC CAG TCA GAC TTA CTG CAG AGG AAC ACG ATA
GAA CAA CAG CTG CTA CTC AAG CTC TCA CCC ATG CGG TTA TTC TCT CGT TTG
GTC TTG CAT TAG CCA GAT TGG GTG TGG ATG TTA GGG CTT TGG CCG CAA CTG
CCC CAC CGC CAC ACC AGG TGC TTC TTG CTC TAC TGG CTA GGG TGC TAG GTG
GTA GCC CGG AAG TAT ATG GAG ATA TTC AAA GAT CCA ATC CAA GAG CTG CTT
CTG CAA GAA GAG CCC TTG CAG AGG CTT TAC GAA GCT TCG CGG CTC TTA TAG
GTG ACG ATC CGG ATC GTG CTG AAG ATC CAG ATA GAG CTG ACG ATC CAG ATA
GGA CGG ATA ATC CTG GTC ATC CTG GAG GTT GTG ATG GAG CTG GTA ATC TTG
ATG GTG TCT TTG AGG AAT TAA GAC GAT TGA TGG GCC CAG AAC TTG CAG CCG
GTC AGG ATC ATT GCC AAG AGC TTT TTA GAA CAC TGC ATC GTA CGG ACG ACG
AGG GTG AAA AGG ATA GAC ATC ATC ACC ATC ATC ACT GAG GAT CC
```

## 6.3 Sequenzvergleiche verschiedener PAL ORFs

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
PAL-Klon : MAGNGAIVESDPLNWGAAAEAGSHLDEYKRWVAQAPVVKIEGSTRVGVAAVASAKDASGVAVLEDEARFVKASSEWILLDCIAHGGDIYGVTTGFGGTSRRTKDGPPALQVELLRLNAGIFGTGSD : 134
ACG44219 : ..... : 134
AY103647 : ..... : 134
AAL40137 : ..... : 134
L77912 : ..... : 134
NM_0011118 : ..... : 134

140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
PAL-Klon : GHTLPSEVTRAAMLVRINTLLQGYSGIRPEILEATTKLLNTGVSPCLPLRGTTITAGDLVPLSYIAGLITGRNQAQAVTVDRKVADEAEAFKTAGIEGGFFKLNPKKGLAIVNGTSVGSALAAATVMYDANVLAV : 268
ACG44219 : ..... : 268
AY103647 : ..... : 268
AAL40137 : ..... : 268
L77912 : ..... : 268
NM_0011118 : ..... : 268

270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
PAL-Klon : LSEVLGAVFCEVMNGKPEYTDHLTHLKHHPGSI EAAAI MEHLDGSSFMKQAKVNELDPLLPKPKQRYALRTSPQMLGPQIEVIRAATKSI BREVNSVNDNFVIDVHRGKALHGGNFQGTPIGVSMNARLA : 402
ACG44219 : ..... : 402
AY103647 : ..... : 402
AAL40137 : ..... : 402
L77912 : ..... : 402
NM_0011118 : ..... : 402

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520     530
PAL-Klon : IANIGKLMFAQFSELVNEFYNNGLTSLNAGSRNPGLDYGFKGTEIAMAASYCSELOQLGNPITNHWQSAEQHNQDQVNSLGLVSARKTAEAI DILLKMSYIIVALCOAVDLRHLLEENIKASVKNVTVOAKKVLIT : 536
ACG44219 : ..... : 536
AY103647 : ..... : 536
AAL40137 : ..... : 536
L77912 : ..... : 536
NM_0011118 : ..... : 536

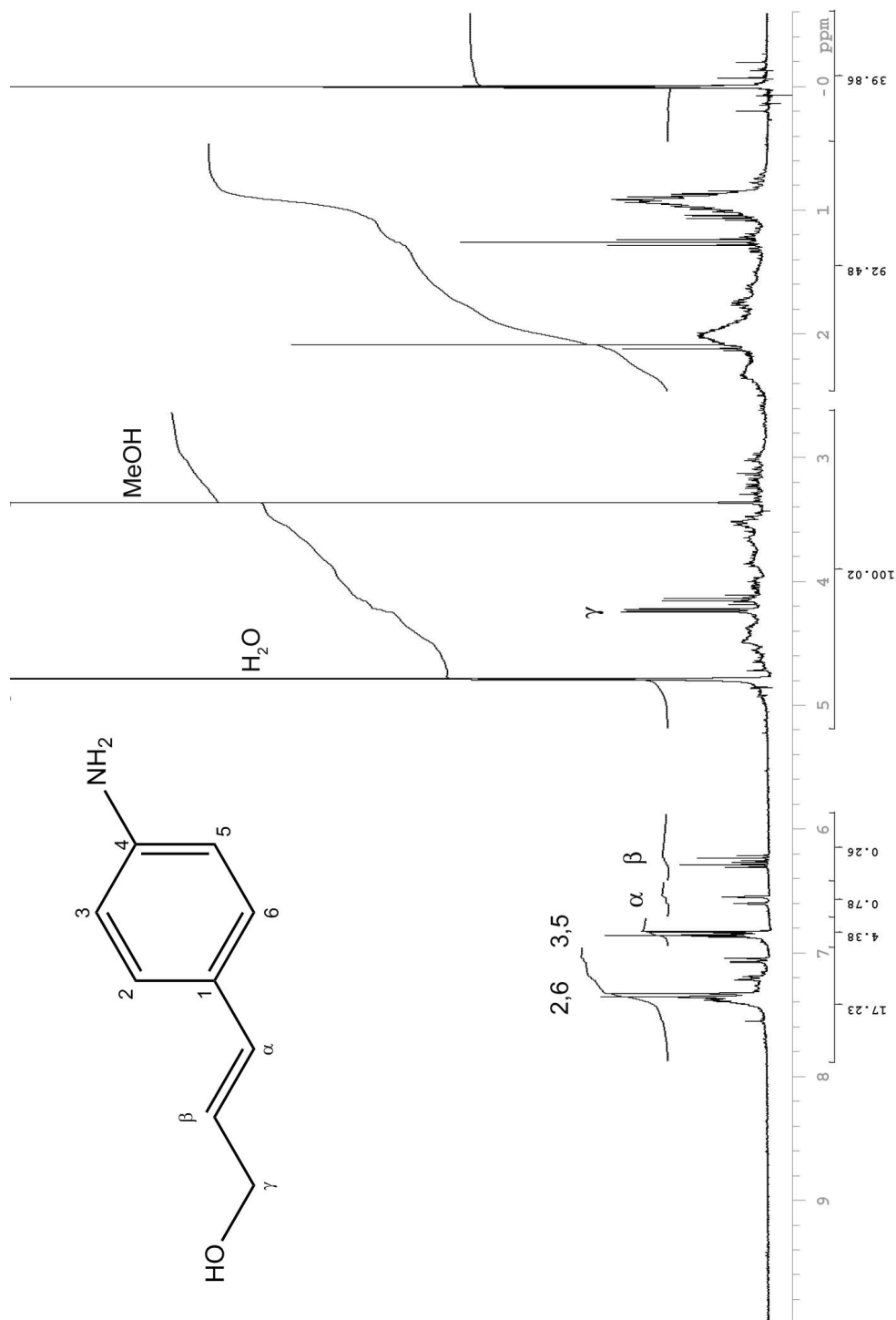
540     550     560     570     580     590     600     610     620     630     640     650     660     670
PAL-Klon : MNPSEGLSARFSEKELI SAIDREAVFTYAEDAASLPLMQLKRAVLVDHALSSGD -AREEFSVFSKITTFFEEELRAVLVFOEVAARVAEQTAEVAVNR LADSREFFLYRFPVREELGCVFUTGERLKSPGEE : 669
ACG44219 : ..... : 669
AY103647 : ..... : 669
AAL40137 : ..... : 669
L77912 : ..... : 669
NM_0011118 : ..... : 669

680     690     700
PAL-Klon : CNKVFVIGISQKIVDPMLECKLEWDRKPLPNIK : 703
ACG44219 : ..... : 703
AY103647 : ..... : 703
AAL40137 : ..... : 703
L77912 : ..... : 703
NM_0011118 : ..... : 703

```

**Abb. 6.1: Sequenzhomologie verschiedener *Zm*PAL Sequenzen.** Das „Alignment“ zeigt den Vergleich drei annotierter *Zm*PAL Proteinsequenzen [L77912/AAL40137, (58) und NM\_001111864, (2)] mit zwei Angaben aus der Genomsequenzierung [AY103647, (22) und ACG44219, (1)].

## 6.4 NMR



**Abb. 6.2:**  $^1\text{H-NMR}$  einer pACiAlk-Aufreinigung. Die Verschiebungen sind bezogen auf 2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonsäure (DSS). Das Eluat der pACiAlk Aufreinigung ist in Deuteriumoxid ( $\text{D}_2\text{O}$ ) gelöst. Identifizierbare Signale sind mit der jeweiligen Position des zugehörigen C-Atoms im Molekül markiert.  $\text{H}_2\text{O}$  und MeOH bezeichnen messbare Rückstände von Wasser und Methanol. Zusätzlich sind die Integrale der Ausgabe des NMR-Service dargestellt.

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Konzept einer Bio Raffinerie . . . . .	6
1.2	Der Phenylpropanoid Reaktionsweg . . . . .	8
1.3	Die Biosynthese der Monolignole . . . . .	11
1.4	Dimerisierung von Monolignolen . . . . .	14
1.5	pACiAlk und pCAlk . . . . .	16
1.6	Rekombinante Biosynthese von <i>p</i> -Aminocinnamylalkohol . . . . .	18
2.1	DNA und Proteinmarker . . . . .	22
2.2	Das Duet-System . . . . .	30
2.3	Die pETDuet-1 MCS Umgebung . . . . .	31
2.4	pCR2.1-TOPO und pCR4-TOPO . . . . .	32
2.5	pKD13 und pKD14 . . . . .	33
2.6	pETDuet-TAL-4CL, pETDuet-CCR-4CL und pRSFDuet-CCR-CAD . . . . .	33
2.7	GeneTailor™ Mutagenesis System . . . . .	43
2.8	Die genomische Umgebung von <i>pheLA</i> und <i>tyrA</i> . . . . .	45
2.9	Selektionsmarker der Plasmide pKD3, 4 und 13 . . . . .	46
2.10	Excisionsprodukte nach FLP-Rekombination . . . . .	48
2.11	strata™ -X-AW . . . . .	56
3.1	Physiologischer und molekularbiologischer Auxotrophietest . . . . .	59
3.2	pCDFDuet- <i>CgADCS</i> . . . . .	62
3.3	pACYCDuet- <i>SvADPDH-SvADCM</i> . . . . .	63
3.4	Expression der ADCS, ADCM und ADPDH . . . . .	65
3.5	Chromatographische Analysen von pAPA . . . . .	66
3.6	Quantifizierung der Biosynthese von pAPA . . . . .	67
3.7	Titrationkurve von pAPA . . . . .	69
3.8	pETDuet- <i>RsTAL</i> und pETDuet- <i>ZmPAL</i> . . . . .	71
3.9	TAL-Proteinisolate aus <i>E. coli</i> und <i>N. tabacum</i> . . . . .	73
3.10	PAL-Proteinisolate aus <i>E. coli</i> . . . . .	74
3.11	Spezifische Aktivitäten der TAL für Tyrosin und pAPA . . . . .	75
3.12	Desaminierung von Tyrosin, Phenylalanin und pAPA durch PAL . . . . .	76
3.13	HPLC-Analyse einer <i>in vitro</i> Katalyse der TAL mit pAPA . . . . .	77
3.14	Aktivität von TAL und PAL <i>in vivo</i> . . . . .	78
3.15	Substratdetermination der <i>RsTAL</i> . . . . .	80
3.16	Biosynthese von pACiA . . . . .	83
3.17	pETDuet- <i>ZmPAL-Pc4CL</i> . . . . .	84
3.18	Reduktion von pACi-CoA durch CCR . . . . .	85

---

3.19	HPLC-Analytik der NMR-Probe . . . . .	87
3.20	Ausgewählte Daten der LC-MS Analyse . . . . .	88
3.21	Kolonie-PCR aller Plasmide . . . . .	90
3.22	pACiAlk-Biosynthese in ER2566 . . . . .	91
4.1	Mesomerie für pACiA . . . . .	114
6.1	Sequenzhomologie verschiedener <i>Zm</i> PAL Sequenzen . . . . .	127
6.2	<sup>1</sup> H-NMR einer pACiAlk-Aufreinigung . . . . .	128

---

## Tabellenverzeichnis

2.1	Oligonukleotide . . . . .	24
2.2	Wachstumsmedien . . . . .	28
2.3	Enzyme, „accession numbers“, Genbezeichnungen und Bezugsquellen . . . . .	34
2.4	Zusammensetzung und Temperaturprofil für PCR Ansätze mit verschiedenen Polymerasen . . . . .	38
2.5	50x TAE-Puffer . . . . .	39
2.6	Methylierung von DNA . . . . .	44
2.7	Mutagenese PCR: Ansatz und Temperaturprofil . . . . .	44
2.8	Amplifikation der pKD13 Kanamycin Kasette . . . . .	46
2.9	Kontrolle auf Integration der Kanamycinresistenz . . . . .	48
2.10	Kolonie PCR auf Deletion der Gene <i>pheLA</i> und <i>tyrA</i> . . . . .	49
2.11	Lämmli- / SDS-PAGE-Probenpuffer . . . . .	50
2.12	Proteinextraktions- und Aufreinigungspuffer . . . . .	51
2.13	SDS-PAGE: Trenn- und Sammelgel . . . . .	52
2.14	Tris-Glycin-SDS-PAGE- und Blottingpuffer . . . . .	53
3.1	Codon usage der Chloramphenicolbiosynthesegene . . . . .	61
3.2	Säurekonstanten für pAPA, Tyrosin und Phenylalanin . . . . .	70
3.3	Aktivitäten der <i>RsTAL</i> -Mutanten . . . . .	81
3.4	Fütterung auxotropher Zellen . . . . .	91

## Abkürzungsverzeichnis

$\Delta$ ER	<i>E. coli</i> ER2566 $\Delta$ <i>pheLATyrA</i>
4AP	4-Aminophenylpyruvat
4CL	4-Cumarat:CoA Ligase
<i>bla</i>	<i>b</i> -Lactamase
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. crispum</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
<i>R. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
<i>S. venezuelae</i>	<i>Streptomyces venezuelae</i>
<i>Z. mays</i>	<i>Zea mays</i>
AAHS	Aromatic Acid:H <sup>+</sup> Symporter
Abs	Absorption
ACS	Anion:Cation Symporter
ADC	4-Amino-4-Desoxychorismat
ADCL	ADC-Lyase
ADCM	ADC-Mutase
ADCS	ADCS-Synthase
ADP	4-Amino-4-Desoxyprephenat
ADPDH	ADP-Dehydrogenase
AF	<i>p</i> -Aminophenylalanin, s. auch pAPA
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT	Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorption Unit
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
C-terminal	Carboxy-terminal
C3H	<i>p</i> -Cumarat 3-Hydroxylase
C4H	<i>t</i> -Zimtsäure 4-Monooxygenase
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CaCO <sub>3</sub>	Calciumcarbonat
CAD	Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase
CCoOAMT	Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase
CCR	Cinnamyl-CoA Reduktase



---

CHS	Chalkon Synthase
CiA	<i>t</i> -Zimtsäure
CM	Chorismat Mutase
CoA	Coenzym A
COMT	Kaffeesäure O-Methyltransferase
DAD	Diodenarraydetektor
DAHP	3-Desoxy-D-Arabinoseheptulosonat-7-Phosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
ds	Double Stranded
DSM	<i>Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
E-Modul	Elastizitätsmodul
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	<i>E. coli</i> ER2566
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule
EtOH	Ethanol
F5H	Ferulasäure 5-Hydroxylase
FLP	Flippase
FNR	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe
FRT	FLP-Recombinase Target
FT-ESI/MS	Fouriertransformation - Elektronensprayionisation/MS
H <sup>+</sup>	Proton
HCl	Salzsäure
HCT	Hydroxycinnamyl-CoA Shikimat/Chinat O-Methyltransferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICT	Fraunhofer Institut für Chemische Technologie
IGB	Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik
IME	Fraunhofer Institut für Molekulare Biotechnologie und Angewandte Ökologie
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
ISA	Institut für Siedlungswasserwirtschaft
k <sub>cat</sub>	Wechselzahl
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante

---

Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LC-MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
MCS	Multiple Cloning Site
MeOH	Methanol
MFS	Major Facilitator Superfamily
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MS	Massenspektrometrie
N-terminal	Amino-terminal
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P) <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)-Hydrogen
NaOH	Natriumhydroxyd
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NH <sub>4</sub> OH	Ammoniumhydroxyd
Ni <sup>2+</sup> -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ORF	Open Reading Frame
pACi-CoA	<i>p</i> -Aminocinnamyl-CoA
pACiA	<i>p</i> -Aminozimtsäure
pACiAld	<i>p</i> -Aminocinnamylaldehyd
pACiAlk	<i>p</i> -Aminocinnamylalkohol
PAL	Phenylalanin Ammoniak Lyase
pAPA	<i>p</i> -Aminophenylalanin, s. auch AF
PBS-T	Phosphate Buffered Saline - Tween
pC-CoA	<i>p</i> -Cumaryl-CoA
pCA	<i>p</i> -Cumarsäure
pCAld	<i>p</i> -Cumarylaldehyd
pCAlk	<i>p</i> -Cumarylalkohol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD(H)	Prephenat Dehydrogenase

---

PDT	Prephenat Dehydratase
PE	Polyethylen
pI	Isoelektrischer Punkt (negativ dekadischer Logarithmus)
pKa	Säurekonstante (negativ dekadischer Logarithmus)
PP	Polypropylen
PPP	Phenyl Propionat Permease
PVC	Polyvinylchlorid
R <sub>f</sub>	Relative Laufweite
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RWTH	<i>Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule</i>
SDS	Sodium Dodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SPE	Solid Phase Extraction
ss	Single Stranded
SSS	Solute Sodium Symporter
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL	Tyrosin Ammoniak Lyase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
UV	Ultraviolett
v <sub>max</sub>	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Vol	Volumen

Allgemein übliche Abkürzungen (bsp. l für Liter, ca. für circa) werden als bekannt vorausgesetzt und nicht gesondert aufgeführt.

---

## Literatur

- [1] Alexandrov N *et al.* (2009) *Plant Mol Biol* 69(1):179.
- [2] Andersen JR *et al.* (2007) *Theor Appl Genet* 114(2):307–19.
- [3] Ball P (2007) *Nat Mater* 6(8):553.
- [4] Barber MS, McConnell VS & DeCaux BS (2000) *Phytochemistry* 54(1):53–6.
- [5] Baucher M, Halpin C, Petit-Conil M & Boerjan W (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38(4):305–50.
- [6] Bayer (2008) *Research: das Bayer-Forschungsmagazin* 20:16–20.
- [7] Berner M *et al.* (2006) *J Bacteriol* 188(7):2666–73.
- [8] Bitter K (2007) Expression in Tabak und Aufreinigung biologisch aktiver Proteine des Phenylpropanoidstoffwechsels (Bachelorarbeit) RWTH Aachen.
- [9] Blee KA *et al.* (2003) *Phytochemistry* 64(1):163–76.
- [10] Boerjan W, Ralph J & Baucher M (2003) *Annu Rev Plant Biol* 54:519–46.
- [11] Borodina I, Krabben P & Nielsen J (2005) *Genome Res* 15(6):820–9.
- [12] Bradford MM (1976) *Anal Biochem* 72:248–54.
- [13] Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL, Ed. (2006) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (ASPP, Rockville, Maryland).
- [14] Burkovski A & Krämer R (2002) *Appl Microbiol Biotechnol* 58(3):265.
- [15] Chang Z, Sun Y, He J & Vining LC (2001) *Microbiology* 147(8):2113–2126.
- [16] Datsenko KA & Wanner BL (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6640–5.
- [17] Davin LB & Lewis NG (2005) *Curr Opin Biotechnol* 16(4):407.
- [18] Diaz E, Ferrandez A, Prieto MA & Garcia JL (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65(4):523–69.
- [19] Ehrling J, Shin JJ & Douglas CJ (2001) *Plant J* 27(5):455–65.
- [20] Ferrer JL, Austin MB, Stewart J C & Noel JP (2008) *Plant Physiol Biochem* 46(3):356–70.

- 
- [21] Fortman JL *et al.* (2008) *Trends Biotechnol* 26(7):375–81.
- [22] Gardiner J *et al.* (2004) *Plant Physiol* 134(4):1317–26.
- [23] Gu X & Li WH (1994) *J Mol Evol* 38(5):468–75.
- [24] Hatakka A (2001) in Hofrichter M & A S, Ed., *Lignin, Humic Substances and Coal* (Wiley-VCH) Bd. 1 aus *Biopolymers* Kap. 5 S. 129–180.
- [25] He J, Magarvey N, Pirae M & Vining LC (2001) *Microbiology* 147(10):2817–2829.
- [26] He Z & Toney MD (2006) *Biochemistry* 45(15):5019–28.
- [27] Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S & Tiffany D (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(30):11206–11210.
- [28] Holladay J, Bozell J, White J & Johnson D (2007) *Top Value-Added Chemicals from Biomass. Volume II. Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin* (Techn Ber) US Department of Energy.
- [29] Hu G (1993) *DNA Cell Biol* 12(8):763–70.
- [30] Hwang EI, Kaneko M, Ohnishi Y & Horinouchi S (2003) *Appl Environ Microbiol* 69(5):2699–706.
- [31] Kamm B & Kamm M (2007) *Chemie Ingenieur Technik* 79(5):592–603.
- [32] Knobloch KH & Hahlbrock K (1977) *Arch Biochem Biophys* 184(1):237–48.
- [33] Knothe G (2001) *Inform* 12(11):1103–1107.
- [34] Kozak S (2006) Mikrobielle Biosynthese von (3S,4R)-4-Amino-3-hydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure mit rekombinanten *Escherichia coli*-Zellen: Molekulargenetische und biochemische Untersuchungen (Dissertation) Universität Stuttgart.
- [35] Krishnaswamy PR, Rajagopal Rao D & Ananthaswamy HN (1965) *Anal Biochem* 11(3):582–4.
- [36] Kutchma AJ, Roberts MA, Knaebel DB & Crawford DL (1998) *Biotechniques* 24(3):452–6.
- [37] Kyndt JA, Meyer TE, Cusanovich MA & Van Beeumen JJ (2002) *FEBS Lett* 512(1-3):240–4.

- 
- [38] Lim EK, Jackson RG & Bowles DJ (2005) *FEBS Lett* 579(13):2802–6.
- [39] Louie GV *et al.* (2006) *Chem Biol* 13(12):1327–38.
- [40] Luderitz T & Grisebach H (1981) *Eur J Biochem* 119(1):115–24.
- [41] Luderitz T, Schatz G & Grisebach H (1982) *Eur J Biochem* 123(3):583–6.
- [42] Lutke-Eversloh T & Stephanopoulos G (2007) *Appl Microbiol Biotechnol* 75(1):103–10.
- [43] Makrides SC (1996) *Microbiol Rev* 60(3):512–38.
- [44] Martinelli LA & Filoso S (2008) *Ecol Appl* 18(4):885–98.
- [45] Martinez AT *et al.* (2005) *Int Microbiol* 8(3):195–204.
- [46] Mehl RA *et al.* (2003) *J Am Chem Soc* 125(4):935–9.
- [47] Meyer K, Kohler A & Kauss H (1991) *FEBS Lett* 290(1-2):209–12.
- [48] Monties B & Fukushima K (2001) in Hofrichter M & Steinbüchel A, Ed., *Lignin, Humic Substances and Coal* (Wiley-VCH) Bd. 1 aus *Biopolymers* Kap. 1 S. 1–64.
- [49] Mortimer C (1996) *Chemie: Das Basiswissen der Chemie* (Georg Thieme Verlag) 6. Aufl.
- [50] Neidhardt F, Ed. (1996) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* Bd. 1 (ASM Press, Washington, DC) 2. Aufl.
- [51] Nelson D & Cox M (2001) *Lehninger Biochemie* (Springer-Verlag, Berlin) 3. Aufl.
- [52] Nikolau BJ, Perera MA, Brachova L & Shanks B (2008) *Plant J* 54(4):536–45.
- [53] Ohama T, Inagaki Y, Bessho Y & Osawa S (2008) *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 84(2):58–74.
- [54] Parsons JF *et al.* (2002) *Biochemistry* 41(7):2198–208.
- [55] Qi WW *et al.* (2007) *Metab Eng* 9(3):268–76.
- [56] Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y & Boerjan W (2003) *Plant Physiol* 133(3):1051–71.
- [57] Ralph J *et al.* (2004) *Phytochem Rev* 3(1):29.

- [58] Rosler J, Krekel F, Amrhein N & Schmid J (1997) *Plant Physiol* 113(1):175–9.
- [59] Sahr T *et al.* (2006) *Biochem J* 396(1):157–62.
- [60] Saiki RK *et al.* (1988) *Science* 239(4839):487–91.
- [61] Sambrook J & David WR (2001) *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) 3. Aufl.
- [62] Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12):5463–7.
- [63] Sariaslani FS (2007) *Annu Rev Microbiol* 61:51–69.
- [64] Schroeder AC *et al.* (2008) *Phytochemistry* 69(7):1496–506.
- [65] Schwab W, Davidovich-Rikanati R & Lewinsohn E (2008) *Plant J* 54(4):712–32.
- [66] Shimizu T, Yamasaki S, Tsukamoto T & Takeda Y (1999) *Microb Pathog* 26:235.
- [67] Sorensen HP & Mortensen KK (2005) *J Biotechnol* 115(2):113–28.
- [68] Sprenger G (2007) in *Amino Acid Biosynthesis Pathways, Regulation and Metabolic Engineering* (Springer-Verlag) S. 93.
- [69] Sprenger GA (2007b) *Appl Microbiol Biotechnol* 75(4):739–49.
- [70] Stein K (2007) *J Am Diet Assoc* 107(11):1870, 1872–6, 1878.
- [71] Stolz M *et al.* (2007) *Appl Environ Microbiol* 73(3):750–5.
- [72] Trotman RJ *et al.* (2007) *Biotechnol Prog* 23(3):638–644.
- [73] UNFCCC (2006) *GHG data 2006. Highlights from Greenhouse Gas (GHG) Emissions Data for 1990-2004* (Techn Ber) UNFCC.
- [74] van Beilen JB & Poirier Y (2008) *Plant J* 54(4):684–701.
- [75] Vannelli T, Xue Z, Breinig S, Qi WW & Sariaslani FS (2007) *Enzyme Microb Technol* 41(4):413.
- [76] VCI (2008) *Chemiewirtschaft in Zahlen* (Techn Ber) VCI.
- [77] Vollhardt K & Schore N (2000) *Organische Chemie* (Wiley-VCH, Weinheim) 3. Aufl.
- [78] Watts KT, Lee PC & Schmidt-Dannert C (2004) *Chembiochem* 5(4):500–7.

- 
- [79] Watts KT, Lee PC & Schmidt-Dannert C (2006) *BMC Biotechnol* 6:22.
- [80] Watts KT, Mijts BN, Lee PC, Manning AJ & Schmidt-Dannert C (2006b) *Chem Biol* 13(12):1317–26.
- [81] Wennohms F (2003) Theoretische Untersuchungen schwacher Wasserstoffbrückenbindungen zu Schwefel (Dissertation) Ruhr-Universität Bochum.
- [82] Xiang L & Moore BS (2005) *J Bacteriol* 187(12):4286–9.
- [83] Xue Z, McCluskey M, Cantera K, Sariaslani FS & Huang L (2007) *J Ind Microbiol Biotechnol* 34(9):599–604.
- [84] Yan Y, Huang L & Koffas MA (2007) *Biotechnol J* 2(10):1250–62.
- [85] Yanai K *et al.* (2004) *Nat Biotech* 22(7):848.
- [86] Yu O & Jez JM (2008) *Plant J* 54(4):750–62.
- [87] Zilberstein D, Agmon V, Schuldiner S & Padan E (1984) *J Bacteriol* 158(1):246–52.



## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Fritz Kreuzaler danke ich für die gute wissenschaftliche Betreuung während dieser Zeit. Vor allem aber auch für die Möglichkeit, dieses interessante und innovative Thema in dem gegebenen Rahmen bearbeiten zu dürfen.

Herrn Dr. Ulrich Commandeur gebührt Dank für die gelungene Zusammenarbeit der beteiligten Institute, der Unterbringung in den Laboren der Molekularen Biotechnologie sowie den weitreichenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Christoph Peterhänsel danke ich für die Übernahme des Korreferates, vielzähligen wissenschaftlichen Ratschlägen sowie der verwaltungstechnischen Hilfe bei der Durchführung des Projektes.

Allen Personen, die im Rahmen der Analytik hilfreich waren - Volker Gego, Dr. Detlef Schmiedl, Dr. Wilhelm Gebhardt und Dr. Martin Zimmermann - gebührt Dank für deren Unterstützung. Besonders die gute Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Martin Zimmermann ist hierbei hervorzuheben.

Den gesamten Kollegen der beiden beteiligten Institute danke ich für die sehr gute, produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit in diesen drei Jahren.

Bei all denen, die an diesem Projekt direkt mitgearbeitet haben - Dr. Frank Müller, Georg Schendzielorz, Christina Plum, Katrin Bitter und Kim Ohl - bedanke ich mich für das gute Teamwork und die schöne Zeit.

Allen Kollegen des „BioSysPro“-Verbundvorhabens unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Hirth danke ich für das sehr angenehme und produktive wissenschaftliche Klima, das während des Projektes geherrscht hat.

Frank Jansen gilt nicht nur ein Dank für die gelungene wissenschaftliche Zusammenarbeit, sondern auch für das besonders gute und freundschaftliche Klima, das in unserer Arbeitsgruppe vorgeherrscht hat. Teamwork ist immer die Basis für gute Wissenschaft.

Meinen Eltern danke ich besonders für die Unterstützung und das Vertrauen, das sie mir auf meinem Weg fortwährend entgegenbringen.

Besonders die vielseitige und herausragende Unterstützung durch Sarah hat während dieser Zeit die Schwierigkeiten einer solchen Arbeit vergessen und die Erfolge einzigartig gemacht - daher gebührt ihr größter Dank!

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name Bernhard Gilleßen  
 Staatsangehörigkeit deutsch  
 Geburtsdatum 04.12.1979  
 Geburtsort Würselen

### Promotion

Datum Seit 04/2006  
 Arbeitgeber RWTH Aachen, Institut für Biologie I  
 Thema Rekombinante Biosynthese amino-substituierter Phenylpropanoide in *E. coli*

### Studium

Datum 10/2000 - 03/2006  
 Bildungseinrichtung RWTH Aachen  
 Studienfach Biologie  
 Erworbene Qualifikation Diplom  
 Note Sehr gut  
 Thema der Abschlussarbeit Reduktion der Photorespiration durch Gentransfer: Effekte der Überexpression C<sub>4</sub>-spezifischer Gene in der C<sub>3</sub>-Pflanze Tabak

### Wehrdienst

Datum 07/1999 - 04/2000  
 Tätigkeit Fernmeldeaufklärung

### Schulausbildung

Datum 08/1990 - 07/1999  
 Bildungseinrichtung Gymnasium der Stadt Alsdorf  
 Erworbene Qualifikation Abitur

Datum 08/1986 - 07/1990  
 Bildungseinrichtung Gemeinschaftsgrundschule Alsdorf-Broicher Siedlung