

Biokatalytische Wege zur Darstellung
funktioneller Sesquiterpene

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

M. Sc. Steffen Hartwig
geboren am 29.04.1985
in Bad Hersfeld

2016

Referent:

Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent:

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Alves

weiterer Korreferent:

Prof. Dr. rer. nat. Uwe T. Bornscheuer

Tag der Promotion:

11.12.2015

Of all sad words of mouth or pen,
the saddest are these: it might have been.

— John Greenleaf Whittier (1807 - 1892)

Für meine Familie und Freunde

ABSTRACT

Enzymes belonging to the class of terpene synthases catalyze the formation of flavor and fragrance compounds, also known as terpenes. Longchained isoprenoid diphosphates with varying numbers of carbon atoms, are transformed to these complex natural compounds by cyclization- and rearrangement-reactions.

Three plant sesquiterpene synthases (an isoform of (-)-patchoulol synthase, an α -humulene synthase and a (+)-zizaene synthase) were successfully expressed in a soluble and active form in *E. coli*. To provide sufficient amounts of the enzyme substrate, farnesyl diphosphate, two established organic synthesis methods for the compound were evaluated. The most feasible protocol was optimized and scaled-up to a bigger lab-scale, which yielded substrate amounts in the gram-range.

By use of the fusion proteins thioredoxin and an ubiquitin-derivative (SUMO), soluble yields of the synthases were significantly improved. Active enzymes were purified via peptide tags and functionally characterized extensively. Important protein parameters e. g. the isoelectric point, as well as kinetic data of the reaction, were determined.

The products of each enzyme were evaluated via GC-MS and GC-FID analytical methods. Feeding the substrate to the respective purified enzymes, resulted in the formation of patchouli essential oil, α -humulene, or (+)-zizaene. All these terpenoids are valuable and complex fragrance compounds. In this context, an unknown isoform (cDNA variant) of the (-)-patchoulol synthase, with a slightly varying product spectrum, was successfully identified.

By coexpression of central pathway enzymes, the terpene α -humulene was produced *in vivo* by a modified *E. coli* strains. This concept was adapted for production of the complex fragrance precursor (+)-zizaene. With this strategy, (+)-zizaene yields of over 300 mg L⁻¹ were achieved in shake flask scale fermentations, using only glucose as a carbon source.

Besides the identification and characterization of two previously undescribed sesquiterpene synthases, this work also illustrates several aspects of sustainable production of fragrance compounds by use of metabolic engineering.

Keywords: sesquiterpenes, terpene synthases, synthetic biology

ZUSAMMENFASSUNG

Die Enzymklasse der Terpensynthesen katalysiert die Bildung von Duft- und Geschmacksstoffen, genannt Terpene. Langkettige Isoprenendiphosphate, mit unterschiedlicher Kohlenstoffanzahl, werden dabei durch Zyklisierungs- und Umlagerungsreaktionen in hochkomplexe Natur- und Wirkstoffe überführt.

Um ausreichende Mengen des Enzymsubstrats Farnesyldiphosphat bereitstellen zu können, wurden zwei Methoden zur organisch-chemischen Synthese miteinander verglichen. Die praktikabelste Synthesevorschrift wurde optimiert und in einen größeren Labormaßstab übertragen, um Substratmengen im Gramm-Bereich pro Reaktion produzieren zu können.

Es wurden drei pflanzliche Sesquiterpensynthesen (eine Isoform der (-)-Patchoulolsynthase, eine α -Humulensynthase und eine (+)-Zizaensynthase) löslich und aktiv in *E. coli* exprimiert. Durch Proteinfusion an Thioredoxin bzw. ein Ubiquitin-Derivat (SUMO), konnten die Enzymausbeuten signifikant verbessert werden. Die korrekt gefalteten Synthesen wurden über Peptid-Tags aufgereinigt und umfassend funktionell charakterisiert. Dabei wurden zentrale proteinchemische Parameter wie der isoelektrische Punkt und die Reaktionskinetik bestimmt.

Die flüchtigen Produkte wurden über GC-MS- und GC-FID-Analytik nachgewiesen. Durch Umsetzung des Substrats mithilfe der jeweiligen Synthase, konnten sowohl die Komponenten des Patchouli-Öls, als auch α -Humulen und (+)-Zizaen erfolgreich biokatalytisch hergestellt werden. Diese Terpenoide gelten als hochwertige und komplexe Duftkomponenten. In diesem Zusammenhang wurde eine bisher unbekannte Isoform (cDNA-Variante) der (-)-Patchoulolsynthase in der nativen Pflanze identifiziert, die ein leicht abweichendes Produktprofil aufwies.

Durch Coexpression von Enzymen des heterologen Isopren-Stoffwechsels, konnte das Terpen α -Humulen in entsprechend modifizierten *E. coli* Stämmen unmittelbar (*in vivo*) produziert werden. Das Konzept wurde anschließend erfolgreich auf den verbrückten Duftstoffvorläufer (+)-Zizaen übertragen. Über diese Strategie konnten, direkt aus der Kohlenstoffquelle Glukose, Produktausbeuten von über 300 mg L⁻¹ im Schüttelkolbenmaßstab erzielt werden.

Neben der Identifikation, aktiven Expression und Charakterisierung zweier zuvor unbeschriebener Sesquiterpensynthesen, zeigt diese Arbeit Ansätze zur ressourcenschonenden Naturstoffproduktion mithilfe der synthetischen Biotechnologie auf.

Stichwörter: Sesquiterpene, Terpensynthesen, Synthetische Biologie

PUBLIKATIONEN

FACHARTIKEL

- **Hartwig, S.**; Frister, T.; Alemdar, S.; Li, Z.; Scheper, T.; Beutel, S.: SUMO-fusion, purification, and characterization of a (+)-zizaene synthase from *Chrysopogon zizanioides*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458 (2015), S. 883–889
- **Hartwig, S.**; Frister, T.; Alemdar, S.; Li, Z.; Krings, U.; Berger, R.G.; Scheper, T.; Beutel, S.: Expression, purification and activity assay of a patchoulol synthase cDNA variant fused to thioredoxin in *Escherichia coli*. In: *Protein Expression and Purification*, 97 (2014), S. 61–71
- Jonczyk, P.; Takenberg, M.; **Hartwig, S.**; Beutel, S.; Berger, R.G.; Scheper, T.: Cultivation of shear stress sensitive microorganisms in disposable bag reactor systems. In: *Journal of Biotechnology*, 167 (2013), S. 370–376
- Frister, T.; **Hartwig, S.**; Alemdar, S.; Schnatz, K.; Thöns, L.; Scheper, T.; Beutel, S.: Characterisation of a Recombinant Patchoulol Synthase Variant for Biocatalytic Production of Terpenes. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 8 (2015), S. 2185–2201
- Alemdar, S.; **Hartwig, S.**; Frister, T.; König, J. C.; Scheper, T.; Beutel, S.: Heterologous Expression, Purification and Biochemical Characterization of α -Humulene Synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, Article in Press.

BUCHKAPITEL

- Berger, R.G.; Leonhardt, R.; Zelena, K.; Krings, U.; **Hartwig, S.**; Beutel, S.; Scheper, T.: Terpene hydroperoxides – Neglected precursors of flavors. In: *Current Topics in Flavor Chemistry & Biology. Proceedings of the 10th Wartburg Symposium, Eisenach, Ed. T. Hofmann, D. Krautwurst, P. Schieberle* (2014), S. 146–151, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Freising, ISBN 978-3-938896-79-2.

INTERNATIONALE VORTRÄGE

- **Hartwig, S.**: *Modern Downstream processing for protein isolation and fractionation*. Max Rubner Conference „Enzymes in food processing“, Karlsruhe, 06.–08. Oktober 2014.

POSTERPRÄSENTATIONEN (CHRONOLOGISCH RÜCKWÄRTS)

- **Hartwig, S.**; Frister, T.; Scheper, T.; Beutel, S.: *Increasing heterologous expression of plant sesquiterpene synthases in E. coli by use of fusion strategies*. biocat2014, Hamburg, 01.–04. September 2014.

- Frister, T.; **Hartwig, S.**; Alemdar, S.; Schnatz, K.; Thöns, L.; Scheper, T.; Beutel, S.: *Biocatalytic production of patchoulol and other high valuable sesquiterpenes*. biocat2014, Hamburg, 01.–04. September 2014.
- Frister, T.; **Hartwig, S.**; Schnatz, K.; Thöns, L.; Scheper, T.; Beutel, S.: *Characterization of a recombinant patchoulol synthase isoenzyme for the production of high-value sesquiterpenes*. 16th European Congress on Biotechnology, Edinburgh, Schottland, 13.–16. Juli 2014.
- **Hartwig, S.**; Frister, T.; Scheper, T.; Beutel, S.: *Fusion protein and solubility enhancing strategies for heterologous expression of novel plant sesquiterpene synthases*. 16th European Congress on Biotechnology, Edinburgh, Schottland, 13.–16. Juli 2014.
- Frister, T.; **Hartwig, S.**; Beutel, S.; Scheper, T.: *Biokatalytische Umsetzung von synthetischem Farnesylpyrophosphat zur Herstellung von Duftstoffen*. Biotechnika 2013, Hannover, 08.–10. Oktober 2013.
- Frister, T.; **Hartwig, S.**; Beutel, S.; Scheper, T.: *Production of sesquiterpenes by biocatalytic transformation of synthetic farnesyl diphosphate*. 1st European Conference on Natural Products, Frankfurt am Main, 22.–25. September 2013.
- **Hartwig, S.**; Frister, T.; Alemdar, S.; Beutel, S.; Scheper, T.: *Optimizing terpene synthase expression and bioconversion of FPP as a model system for production of high value sesquiterpenes*. 1st European Conference on Natural Products, Frankfurt am Main, 22.–25. September 2013.
- Beutel, S.; Frister, T.; **Hartwig, S.**; Scheper, T.: *Simple and efficient route for the production of terpenes by enzymatic means*. ECI 2013: Enzyme Engineering XXII, Toyama, Japan, 22.–26. September 2013.
- Frister, T.; **Hartwig, S.**; Beutel, S.; Scheper, T.: *Large-scale Synthesis of Farnesyl Diphosphate as Substrate for Recombinant Sesquiterpene Synthases*. TERPNET 2013: 11th International Meeting on Biosynthesis, Function and Biotechnology of Isoprenoids in Terrestrial and Marine Organisms, Kolymvari, Kreta, Griechenland, 01.–05. Juni 2013.
- **Hartwig, S.**; Frister, T.; Beutel, S.; Scheper, T.: *Optimizing recombinant expression of patchoulol synthase from *P. cablin* and enzymatic FPP bioconversion as a model system for high level sesquiterpene production*. TERPNET 2013: 11th International Meeting on Biosynthesis, Function and Biotechnology of Isoprenoids in Terrestrial and Marine Organisms, Kolymvari, Kreta, Griechenland, 01.–05. Juni 2013.
- **Hartwig, S.**; Frister, T.; Beutel, S.; Scheper, T.: *Production of terpene-based flavor compounds via bioconversion of synthesized terpene intermediates*. DECHEMA Frühjahrstagung der Biotechnologen, Frankfurt am Main, 04.–05. März 2013.

DANKSAGUNG

*Harte Zeiten gehen vorbei,
starke Menschen bleiben.*

— Ansgar Hirt

Damit größere Projekte wie eine Promotion erfolgreich gelingen, müssen viele Zahnräder ineinandergreifen. An dieser Stelle möchte ich einzelnen Personen danken, die unverzichtbare Beiträge zum Gelingen dieses Vorhabens geliefert haben!

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Scheper danke ich für die Bereitstellung eines interessanten und fordernden Forschungsthemas, sowie für sein Vertrauen und seine Unterstützung während der letzten Jahre! Prof. Dr. Alves und Prof. Dr. Bornscheuer danke ich recht herzlich für die Übernahme der weiteren Gutachten. Bei Prof. Dr. Rinas bedanke ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Sascha Beutel möchte ich mich für die kompetente Betreuung, die hilfreichen Ratschläge sowie sein absolutes Vertrauen in meine Arbeiten bedanken!

Friedbert Gellermann und Thorsten Stempel von der Feinmechaniker-Werkstatt sowie allen Mitarbeitern der E-Werkstatt, danke ich für professionelle Hilfe bei allen Konstruktions- und Technikfragen. Ivo Havlik und Michael Dors standen mir bei komplexeren IT-Problemen stets zur Seite. Ohne Martina Weiß und Martin Pähler wären viele Experimente und Analysen nicht so zügig über die Bühne gegangen! Vielen Dank für euer praktisches Fachwissen und eure Unterstützung in allen Belangen des Laboralltags! Cornelia Alic und Ulrike Dreschel danke ich für ihre Mithilfe bei allen organisatorischen Fragestellungen.

Danke an Thore, für seine Hilfsbereitschaft und Teilen seines umfassenden chemischen Fachwissens! Unsere Zusammenarbeit im EFRE-Projekt war stets äußerst effizient und auf höchstem wissenschaftlichen Niveau. Nach der Devise „Reaching the frontiers of science...and going beyond!“ wird demnächst bereits das 5. Paper veröffentlicht!

Bei meiner Masterandin Semra, sowie den Bacheloranden Pia und Vivian, bedanke ich mich für ihre kompetente Unterstützung bei Teilprojekten meiner Arbeit. Auch all den (nicht mehr zählbaren) Schwerpunktpraktikanten und GSlern danke ich für ihre tolle Mithilfe.

Irgendwann hört man auf die Jahre zu zählen, aber am Ende waren es über 8! Manche haben mich seit meinem ersten Tag in Hannover, irgendwann im Oktober 2006, begleitet. Manche kamen im Laufe des Studiums hinzu. Manche während der Masterarbeit. Manche erst während der Promotion am TCI. Ich möchte allen von Herzen danken, die mir auch privat stets zur Seite standen und mit denen ich viele fröhliche Stunden verbringen durfte!

Danke an Franzi für ihre mentale Unterstützung und Begleitung während meines gesamten Studiums.

Danke an Bernd, Fred, Alex, Maren, Bin, Philipp, Julia, Mariella, Clarissa und Sönke von der „alten“ Life Science Gang. Danke an Michi, Matze, Johannes, Patrick und Christopher (ohne die man mich gefressen hätte) aus der „neuen“ Life Science Gang. Auch den Brauern, allen voran Tim und Christoph, danke ich für gesellige Stunden!

Natürlich darf und soll hier niemand vergessen werden: Ich danke der gesamten Belegschaft des TCI für ihre Hilfsbereitschaft! Eine solche Arbeitsatmosphäre, Kollegialität und Zusammenhalt ist

nicht selbstverständlich in unserer Ego-Gesellschaft, und lässt sich durch nichts Materielles aufwiegen!

Mein besonderer Dank gilt auch den Hersfelder Jungs, allen voran Ben, die mich schon mittlerweile seit Jahrzehnten auf meinem Weg begleiten!

Patricia hatte sicherlich mit Abstand am meisten unter dieser Arbeit direkt zu „leiden“. Ich danke dir für die aufmunternden Worte in manch schweren Stunden, sowie deine Ruhe und Gelassenheit, wenn in mir der Sturm tobte!

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie: meiner Mutter Elvira, meinem Vater Thomas und meinem Bruder Till, für ihre Unterstützung und Rückhalt auf jedweder Ebene!

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	xiii
Tabellenverzeichnis	xv
Abkürzungsverzeichnis	xvii
1 EINLEITUNG	1
2 ZIELSETZUNG	3
3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	5
3.1 Terpene	5
3.1.1 Enzymklasse Terpensynthasen	9
3.2 Biochemie des Geruchssinns	14
3.2.1 Olfaktorische Wahrnehmung von Duftstoffen	14
3.3 Sesquiterpene: Beispiele wertvoller und funktioneller Naturstoffe	16
3.3.1 (-)-Patchoulol	16
3.3.2 α -Humulen	19
3.3.3 (+)-Zizaen	21
3.4 Synthetische Biotechnologie	22
3.4.1 Methoden und Techniken der synthetischen Biotechnologie	23
3.4.2 Darstellung von Terpenoiden mit synthetischer Biotechnologie	26
4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN	29
4.1 Organische Synthese des Enzymsubstrats	29
4.1.1 Vergleich der Syntheserouten für FDP	30
4.1.2 Entwicklung einer Analytik für Terpenintermediate	35
4.1.3 Scale-up der Synthesereaktion	37
4.1.4 Zusammenfassung Substratsynthese FDP	39
4.2 Molekularbiologische Arbeiten Patchouloolsynthese	39
4.2.1 Identifikation des Patchouloolsynthese-Isoenzym	39
4.2.2 Expressionsversuche T7-Tag-PTSi	45
4.2.3 Klonierung weiterer Konstrukte für das PTS-Isoenzym	47
4.3 Vergleich der Expressionssysteme für das PTS-Isoenzym	51
4.3.1 Variation der Expressionstemperatur	52
4.3.2 Variation der Induktorkonzentration bei Tuner-Stämmen	52
4.3.3 Vergleich der Expressionsstämme	54
4.3.4 Vergleich LB- und TB-Medium	55
4.3.5 Zusammenfassung Expressionssysteme PTS-Isoenzym	56
4.4 Aufreinigung der PTS-Isoform über IMAC	57
4.4.1 Einfluss von Peptidase-Inhibitoren	58
4.4.2 Testung von Metallspezies	59
4.4.3 Gekühlte Aufreinigung über Membranadsorber	61
4.4.4 Zusammenfassung Aufreinigung PTSi über IMAC	63
4.5 Enzymcharakterisierung PTS-Isoenzym	63
4.5.1 Identitätsnachweis PTSi über MALDI-TOF-MS	63
4.5.2 Bestimmung des isoelektrischen Punkts von PTSi	64
4.5.3 Aktivitätsnachweise über GC-FID	65
4.5.4 Produktspektrum PTSi über GC-MS Analytik	68
4.6 Modellierung der Enzymstruktur	69
4.6.1 Docking-Simulationen mit dem Substrat FDP	72
4.6.2 Strukturvergleiche mit PTS	74
4.6.3 Zusammenfassung Charakterisierung PTSi	76
4.7 Produktion der α -Humulensynthese	76

4.7.1	Plasmidkonstruktion α -Humulensynthese	76
4.7.2	Expressionsoptimierung im SK-Maßstab	79
4.7.3	Aktivitätsnachweis Humulensynthese	81
4.7.4	Zusammenfassung α -Humulensynthese	82
4.8	Produktion und Charakterisierung einer (+)-Zizaensynthese	82
4.8.1	Plasmidkonstruktion (+)-Zizaensynthese	82
4.8.2	Produktion und Aufreinigung von ZIZA	86
4.8.3	Identitätsnachweis ZIZA über MALDI-TOF-MS	89
4.8.4	Bestimmung des isoelektrischen Punkts von ZIZA	90
4.8.5	Produktnachweis (+)-Zizaen	90
4.8.6	Enzymkinetik	92
4.8.7	Upscale der (+)-Zizaensyntheseproduktion	93
4.8.8	Zusammenfassung Produktion und Charakterisierung weiterer STPS	95
4.9	Coexpression von Enzymen des Terpenstoffwechsels	96
4.9.1	Biotechnologische Darstellung von α -Humulen	100
4.9.2	Biotechnologische Darstellung von (+)-Zizaen	101
4.9.3	Testung eines polymeren Adsorbentmaterial zur Abreicherung	104
4.9.4	Zusammenfassung Coexpression des MEV-Stoffwechselwegs	105
5	FAZIT UND AUSBLICK	107
A	MATERIALIEN	I
A.1	Chemikalienliste	I
A.2	Laborwasser	III
A.3	Laborgeräte	III
A.4	Verbrauchsmaterialien	III
A.5	Enzyme	IV
A.6	Standard-Medien- und Pufferrezepte	IV
A.7	Definiertes Medium	VI
A.8	Vektoren und Zellen	VII
A.8.1	Vektoren	VII
A.8.2	kompetente Zellen	VII
A.9	Primer	IX
B	METHODEN	XI
B.1	Synthese von Farnesyldiphosphat	XI
B.1.1	Anwendung und Regeneration des Ionentauschers	XI
B.1.2	Synthesevorschrift TBAHP	XI
B.1.3	Synthesevorschrift nach Davisson et al.	XI
B.1.4	Synthesevorschrift nach Keller et al.	XII
B.1.5	Dünnschichtchromatographie	XII
B.1.6	Säulenchromatographie	XII
B.1.7	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	XII
B.1.8	HPLC-Methode für Isoprene	XIII
B.2	RNA-Extraktion aus Pflanzen	XIII
B.2.1	AGPC-Methode	XIII
B.2.2	CTAB-Methode	XIV
B.3	Reverse Transkription von mRNA	XV
B.4	PCR	XV
B.4.1	Standard-, Kolonie-, und Gradienten-PCR mit <i>Taq</i> Polymerase	XV
B.4.2	Proofreading-PCR mit Phusion- und Q5-Polymerase	XVI
B.4.3	DNA Agarosegele	XVII
B.4.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	XVIII
B.5	Klonierungsmethoden	XVIII
B.5.1	TA-Klonierung	XVIII
B.5.2	Restriktions-/Ligationsklonierung	XIX
B.5.3	Nahtlose Klonierung von PCR-Produkten, seamless cloning	XIX
B.6	Arbeiten mit Plasmid-DNA	XX
B.6.1	Präparation von Plasmid-DNA	XX

B.6.2	Restriktionsverdau	XXI
B.7	Herstellung chemisch-kompetenter Zellen	XXI
B.8	Transformation von <i>E. coli</i>	XXII
B.9	Stammhaltung	XXII
B.10	Proteinanalytik	XXII
B.10.1	Zellaufschluss	XXII
B.10.2	Bradford Protein-Assay	XXIII
B.10.3	Protein SDS-PAGE	XXIII
B.10.4	Kolloidale Coomassie-Färbung	XXIV
B.10.5	Silberfärbung	XXV
B.10.6	Densitometrische Quantifizierung von Proteinen	XXV
B.10.7	Western-Blot	XXV
B.10.8	2D-Gelelektrophorese	XXVI
B.10.9	Trypsin-Verdau für MALDI-MS	XXVII
B.10.10	Proteinmodellierung	XXVII
B.11	Offline-Analytik für Kultivierungen	XXVII
B.11.1	optische Dichte OD ₆₀₀	XXVII
B.11.2	Biotrockenmasse BTM	XXVIII
B.11.3	Glukosemessung	XXVIII
B.12	Enzymaufreinigung über IMAC	XXVIII
B.12.1	IDA 75 Membranadsorber	XXVIII
B.12.2	HiTrap™-Sepharosesäule	XXIX
B.12.3	Strep-Tactin/His-STREPPER System	XXIX
B.12.4	Dialyse/Ultrafiltration	XXIX
B.13	Aktivitätsassay Terpensynthese	XXX
B.14	GC-FID Analytik von Sesquiterpenen	XXX
B.14.1	Kalibrationsgeraden für Quantifizierung	XXX
B.15	GC-MS Analytik von Sesquiterpenen	XXXI
C	SEQUENZDATEN	XXXIII
D	WEITERE DATEN UND ERGEBNISSE	XXXIX
E	LITERATUR	XLI
F	KOOPERIERENDE ARBEITEN	LV
G	AKADEMISCHER WERDEGANG	LVII

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3.1	Terpentin und Isopren	5
Abbildung 3.2	Strukturklassen der Terpene	6
Abbildung 3.3	Strukturen Taxol und Artemisinin	7
Abbildung 3.4	MEV-Stoffwechselweg	8
Abbildung 3.5	DXP/MEP-Stoffwechselweg	9
Abbildung 3.6	Strukturmodelle der 5-epi-Aristolochensynthese	10
Abbildung 3.7	Ringschlussreaktionen bei STPS	12
Abbildung 3.8	Evolutorischer Baum aller bekannten STPS	13
Abbildung 3.9	Schematische Darstellung Riechapparat und -nerven	14
Abbildung 3.10	Signaltransduktion am olfaktorischen Rezeptor	15
Abbildung 3.11	Patchouli-Plantage und Pflanzen(<i>Pogostemon cablin</i>)	16
Abbildung 3.12	Glanduläre Trichome (Drüsenhaare)	17
Abbildung 3.13	Hauptkomponenten des Patchouli-Öls	18
Abbildung 3.14	Totalsynthese von (-)-Patchoulol	19

Abbildung 3.15	Natürliches Vorkommen von α -Humulen	19
Abbildung 3.16	Totalsynthese von α -Humulen	20
Abbildung 3.17	Vetiver-Gras und Komponenten des Vetiver-Öls	21
Abbildung 3.18	Totalsynthese von (\pm)-Zizaen	22
Abbildung 3.19	Zelle mit optimiertem Stoffwechsel	23
Abbildung 3.20	Schema Gibson assembly	25
Abbildung 4.1	Isomere des Farnesols	29
Abbildung 4.2	Syntheseroute von FDP nach Methode 1	30
Abbildung 4.3	NMR-Spektren von TBAHP	31
Abbildung 4.4	^1H -NMR Spektrum von FDP, Methode 1	32
Abbildung 4.5	Syntheseroute von FDP nach Methode 2	33
Abbildung 4.6	DC gesammelte Fraktionen nach Säulenchromatographie (Methode 2)	33
Abbildung 4.7	^1H -NMR Spektrum von FDP, Methode 2	34
Abbildung 4.8	^{31}P -NMR Spektrum von FDP, Methode 2	35
Abbildung 4.9	HPLC-Analytik von Farnesyldiphosphat und Kalibration	36
Abbildung 4.10	Anisaldehyd-Assay für FDP	37
Abbildung 4.11	Aufbau Chromatographiesäule zum scale-up der FDP-Synthese	38
Abbildung 4.12	Analyse der beim scale-up gesammelten Fraktionen mittels HPLC	38
Abbildung 4.13	Patchouli-Strauch mit Detailansicht der Blätter	40
Abbildung 4.14	PCR-Amplifikationen mit den cDNA-Bibliotheken	42
Abbildung 4.15	Sequenalignment PTS mit PTSi Isoenzym/Variante	43
Abbildung 4.16	Plasmidkarten Konstrukte Patchoulolsynthase (TA-kloniert)	44
Abbildung 4.17	Ligationsansatz und Testverdau pET-17b::PTSi	44
Abbildung 4.18	SDS-PAGE Gele Expression pET-17b::PTSi	45
Abbildung 4.19	Kultivierungsverlauf pET-17b::PTSi	46
Abbildung 4.20	SDS-PAGE Gele Expression pET-17b::PTSi, Variation IPTG-Konzentration	46
Abbildung 4.21	Zellaufschluss mit fünf verschiedenen Extraktionspuffern	47
Abbildung 4.22	Plasmidkarten Konstrukte Patchoulolsynthase (seamless cloning)	48
Abbildung 4.23	DNA-Gele zur Klonierung PTSi Expressionsvektoren	50
Abbildung 4.24	Kultivierung BL21(DE3) pET-16b::PTSi bei versch. Temperaturen	52
Abbildung 4.25	Kultivierungsverlauf Tuner pET-16b::PTSi	53
Abbildung 4.26	Induktion des Tuner-Stamms mit untersch. IPTG-Konzentrationen	53
Abbildung 4.27	Vergleich His-PTSi und TRX-PTSi Stämme	54
Abbildung 4.28	Vergleich PTSi (nativ) mit codon-optimierter PTSi(co)	55
Abbildung 4.29	Vergleich PTSi Expression in LB- und TB-Medium	56
Abbildung 4.30	Vergleich Ausbeuten PTSi-Konstrukte	57
Abbildung 4.31	Schema der IMAC-Affinitätschromatographie	58
Abbildung 4.32	Einfluss eines Peptidase-Inhibitors nach Zellaufschluss	58
Abbildung 4.33	Chromatogramm und SDS-PAGE Aufreinigung PTSi(co) (Ni^{2+} -IMAC)	60
Abbildung 4.34	Chromatogramm und SDS-PAGE Aufreinigung PTSi(co) (Co^{2+} -IMAC)	60
Abbildung 4.35	Chromatogramm und SDS-PAGE Aufreinigung TRX-PTSi (Co^{2+} -IMAC)	61
Abbildung 4.36	Gekühlte Aufreinigung PTSi(co) und TRX-PTSi, Western-Blots	62
Abbildung 4.37	2D-Gel zur Bestimmung des pI von PTSi	65
Abbildung 4.38	Ablauf des STPS-Aktivitätstests	66
Abbildung 4.39	GC-FID Chromatogramme von Umsetzungsversuchen mit PTSi(co)	66
Abbildung 4.40	GC-FID Chromatogramme von Umsetzungsversuchen mit TRX-PTSi	67
Abbildung 4.41	Analyse des Produktspektrums von TRX-PTSi über GC-MS	68
Abbildung 4.42	Patchoulolsynthase-Isoform ohne und mit TRX-Fusionsdomäne	71
Abbildung 4.43	PTSi-Strukturmodell mit Sequenzmotiven	72
Abbildung 4.44	Substrat FDP gedockt an PTSi	73
Abbildung 4.45	Strukturmodell mit allen veränderten Aminosäuren	75
Abbildung 4.46	Struktureller Vergleich des aktiven Zentrums von PTS mit PTSi	75
Abbildung 4.47	Shampoo-Ingwer mit Detailansicht der Pflanzenorgane	77
Abbildung 4.48	Sequenalignment α -Humulensynthase mit verwandten STPS	78
Abbildung 4.49	DNA-Gele Klonierung α -Humulensynthase Expressionsstamm	79
Abbildung 4.50	Plasmidkarte für Konstrukt α -Humulensynthase	79
Abbildung 4.51	Expressionsexperimente pET-16b::HUM(co) in LB-Medium	80
Abbildung 4.52	Expressionsexperimente pET-16b::HUM(co) in TB-Medium	81

Abbildung 4.53	GC-FID Chromatogramme Aktivitätstest α -Humulensynthese	81
Abbildung 4.54	Wurzelmaterial von Vetiver-Gras	83
Abbildung 4.55	Sequenzalignment (+)-Zizaensynthese mit verwandten STPS	84
Abbildung 4.56	DNA-Gele PCR und Screening von Klonen der ZIZA-Konstrukte	85
Abbildung 4.57	Plasmidkarten für Konstrukte (+)-Zizaensynthese	86
Abbildung 4.58	SDS-PAGE Expression (+)-Zizaensynthese	87
Abbildung 4.59	Aufreinigung und Western-Blots (+)-Zizaensynthese	88
Abbildung 4.60	2D-Gel zur Bestimmung des pI der (+)-Zizaensynthese	90
Abbildung 4.61	GC-FID Chromatogramme Aktivitätstest (+)-Zizaensynthese	91
Abbildung 4.62	GC-MS Chromatogramm des Enzymprodukts der (+)-Zizaensynthese	91
Abbildung 4.63	Geradensteigungen der (+)-Zizaen Produktbildung	92
Abbildung 4.64	Michaelis-Menten-Plot Produktbildung Zizaensynthese	93
Abbildung 4.65	Reaktorkultivierung von BL21(DE3) pET-SUMO::ZIZA(co) bei 37 °C	94
Abbildung 4.66	Reaktorkultivierung von BL21(DE3) pET-SUMO::ZIZA(co) bei 20 °C	95
Abbildung 4.67	Plasmidkarte und Testverdau pBbA5c-MevT(co)-T1-MBIS(co, ispA)	97
Abbildung 4.68	Schema Coexpression heterologer MEV-Weg mit STPS	99
Abbildung 4.69	Expression PW-optimierter HUM(co)-Stamm und Wachstumsverhalten	100
Abbildung 4.70	Nachweis α -Humulen Produktion über Pathway-Coexpression	101
Abbildung 4.71	Produktion von (+)-Zizaen mit und ohne MEV-Weg	102
Abbildung 4.72	Produktion von (+)-Zizaen in definiertem Medium	103
Abbildung 4.73	Einsatz von Adsorberharz zur Abreicherung von (+)-Zizaen	104
Abbildung 5.1	Flowchart biokatalytische Sesquiterpendarstellung	111
Abbildung A.1	Karten der Klonierungs- und Expressionsvektoren	VII
Abbildung B.1	DNA-Größenmarker 1 kB	XVII
Abbildung B.2	Verwendete Proteinmarker für SDS-PAGE und Western-Blots	XXIV
Abbildung B.3	Kühlmodul für IDA 75 Membranadsorber	XXVIII
Abbildung B.4	Kalibration (-)-Patchoulol	XXXI
Abbildung B.5	Kalibration α -Humulen	XXXI
Abbildung B.6	Kalibration α -Cedren	XXXI
Abbildung B.7	Alkanreihe C8–C25	XXXII
Abbildung D.1	PCR mit cDNA-Bibliotheken aus Shampoo Ingwer	XXXIX
Abbildung D.2	PCR von Vetiver-cDNA und Klonierung pET-16b::Vet1	XXXIX
Abbildung D.3	Verdau von his-SUMO-ZIZA(co) mit SUMO-Peptidase	XL

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1	Auflistung chirale Duftstoffe	16
Tabelle 3.2	Firmen syn. Biotechnologie Terpenoide	27
Tabelle 4.1	RNA-Ausbeuten und Reinheit	41
Tabelle 4.2	Proteinparameter T7-Tag-PTSi	45
Tabelle 4.3	Variation des Extraktionspuffers	47
Tabelle 4.4	Optimierte Ausbeuten von PCR für PTSi Konstrukte	49
Tabelle 4.5	Proteinparameter weitere Konstrukte PTSi	51
Tabelle 4.6	MALDI-MS Peptide der PTSi	64
Tabelle 4.7	Verfügbare Kristallstrukturen von Terpensynthasen	70
Tabelle 4.8	Gütebewertung der modellierten PTSi Strukturen	71
Tabelle 4.9	Proteinparameter α -Humulensynthese	80
Tabelle 4.10	Proteinparameter (+)-Zizaensynthese	86
Tabelle 4.11	MALDI-MS Peptide der SUMO-ZIZA	89
Tabelle 4.12	Kinetische Daten Zizaensynthese	93
Tabelle A.1	Chemikalienliste	I
Tabelle A.2	Laborgeräte	III
Tabelle A.3	verwendete Enzyme	IV
Tabelle A.4	Medienzusammensetzung	IV

Tabelle A.5	Pufferzusammensetzung	V
Tabelle A.6	Antibiotika-Stammlösungen	VI
Tabelle A.7	Definiertes Medium: Spurenelemente (1000×)	VI
Tabelle A.8	Definiertes Medium: Salzlösung	VII
Tabelle A.9	<i>E. coli</i> Genotypen	VIII
Tabelle A.10	Primerliste	IX
Tabelle B.1	Anisaldehyd-Färbereagenz für DC	XII
Tabelle B.2	Gradientprogramm HPLC	XIII
Tabelle B.3	CTAB-Extraktionspuffer	XIV
Tabelle B.4	<i>Taq</i> Polymerase PCR-Ansätze	XVI
Tabelle B.5	<i>Taq</i> Polymerase Thermocycler-Programm	XVI
Tabelle B.6	Phusion® DNA Polymerase PCR-Ansätze	XVI
Tabelle B.7	Q5™ DNA Polymerase PCR-Ansätze	XVII
Tabelle B.8	Korrekturlese-Polymerase Thermocycler-Programm	XVII
Tabelle B.9	3' A-Überhänge nach Proofreading-PCR	XIX
Tabelle B.10	Ansatz für TA-Klonierungsreaktion	XIX
Tabelle B.11	Ligationsansatz	XIX
Tabelle B.12	Seamless-cloning Reaktion	XX
Tabelle B.13	Restriktionsverdau von DNA	XXI
Tabelle B.14	Bradford-Reagenz	XXIII
Tabelle B.15	Trenngel SDS-PAGE	XXIII
Tabelle B.16	Sammelgel SDS-PAGE	XXIV
Tabelle B.17	Blue-silver Färbelösung	XXIV
Tabelle B.18	Coomassie-Fixierer	XXV
Tabelle B.19	Silber-Fixierer und -Entfärber	XXV
Tabelle B.20	Towbin-Transferpuffer	XXVI
Tabelle B.21	Block-Lösung für Western-Blot	XXVI
Tabelle B.22	IDA 75 Membranadsorber FPLC-Programm	XXIX
Tabelle B.23	HiTrap Sepharose IMAC FPLC-Programm	XXIX
Tabelle B.24	GC-Temperaturprogramm GC-14A	XXX
Tabelle B.25	GC-Temperaturprogramm GC-2010	XXX
Tabelle C.1	Farbschema Sequenzdaten	XXXIII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Beschreibung
Acc. No.	Eindeutige GenBank ID für Sequenzen (accession number)
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare (DNA, RNA)
BSA	bovines Serumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cas9	CRISPR associated protein 9
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (entspr. mRNA)
CHO	chinese hamster ovary Zellen
CoA	Coenzym A
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CspA	Cold shock protein A (Kälteschock-Promotor)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CV	Säulenvolumina, column volumes
CYP ₄₅₀	Cytochrom P ₄₅₀ Oxidoreduktase
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMS	Dimethylsulfid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleotidtriphosphate
DTPS	Diterpensynthasen (C ₂₀ -Grundgerüst)
DTT	Dithiothreitol
DXP/MEP-Weg	Desoxyxylulosephosphat-/Methylerythritolphosphatweg
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	electron ionization (GC-MS Technik)
FDP	Farnesyldiphosphat
FID	Flammenionisationsdetektor
FZM	Feuchtzellmasse
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatograph(ie)
GDP	Geranyldiphosphat
GDP	Guanidindiphosphat
GGDP	Geranylgeranyldiphosphat
GOI	gene-of-interest, proteincodierende Sequenz
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
gRNA	guide RNA
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanidintriphosphat
HMG	Hydroxymethylglutaryl
HPLC	high performance (pressure) liquid chromatography
HRP	Meerrettichperoxidase
HUM	α -Humulensynthase
IDV	integrated density values (Farbdichtewerte Densitometrie)
IEF	isoelektrische Fokussierung
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KPP	Kaliumphosphat-Puffer
LB	lysogeny broth Medium
Lsg.	Lösung
MBP	maltose-binding protein
MEV-Weg	Mevalonatweg
mRNA	messenger RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
MS	Massenspektrometrie
MSA	multiple Sequenzalignment

Abkürzung	Beschreibung
MTPS	Monoterpensynthase (C ₁₀ -Grundgerüst)
MW	Molekulargewicht
MWCO	Cut-off bei Ultrafiltration/Dialyse
n. b.	nicht bestimmt
NADPH/H ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, Hydridionen-Überträger
NCS	N-Chlorsuccinimid
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernresonanzspektroskopie)
NusA	N-Utilization substance
ORI	Replikationsursprung für Plasmide, origin-of-replication
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon)
PTSi	Patchoulolsynthase Isoenzyme/Variante
PW	Pathway (hier MEV-Stoffwechselweg)
R _f	Retentionsfaktor (DC)
RI	Kovats-Retentionsindex
RMSD	root-mean-square deviation (atomic positions)
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region-of-interest (codierende Region auf Plasmid)
rpm	Umdrehungen pro Minuten (Schüttelgeschwindigkeit)
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase (Enzym)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SK	Schüttelkolbenmaßstab
STPS	Sesquiterpensynthase (C ₁₅ -Grundgerüst)
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	terrific broth Medium
TBAHP	Tris(tetra-n-butylammonium)hydrogendiphosphat
TEAP	Triethylammoniumphosphat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEV	Tobacco Etch Virus (Peptidase)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TPS	Terpensynthase (Oberbegriff)
TRX	Thioredoxin
ÜN	über Nacht
WCP	Ganzzellprotein (whole cell protein)
ZIZA	(+)-Zizaensynthase (Khusimensynthase)

EINLEITUNG

„Sägespäne im Erdbeerjoghurt!“ oder „Gefährliche Chemikalie Piperonal in Schokolade!“: Diese und ähnlich reißerische Schlagzeilen verunsichern jeden Verbraucher. Was ist der Unterschied zwischen naturidentisch und natürlich? Sind künstliche Aromastoffe immer giftig für mein Familie? Was kann ich heutzutage überhaupt noch sorgenfrei essen? Fragen, die sich jeder schon einmal gestellt hat.

Die Aromastoffindustrie, die Presse und auch der Gesetzgeber haben es in der Vergangenheit versäumt, hier für seriöse Aufklärung zu sorgen. Mit der aktuellen EU-Aromaverordnung¹ sind die Kennzeichnungen „künstlich“ und „naturidentisch“ entfallen und dürfen nicht mehr auf Verpackungen gedruckt werden. Doch ein natürliches Vanillearoma kann, muss jedoch nicht zwingend, aus der Vanillestaude stammen. Das ist auch gut so, denn die weltweite Nachfrage könnte aus den natürlichen Quellen niemals bedient werden!

Natürliche Aromen dürfen und werden zunehmend biotechnologisch hergestellt. Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilze, können Rohstoffe aus der Natur zu Geschmacksaromen und Duftstoffen umsetzen. Sie nutzen dabei Enzyme, die als Biokatalysatoren sehr komplexe Umwandlungsreaktionen ermöglichen und stark beschleunigen. Ob beim Bierbrauen (Hefepilze) oder bei der Käseherstellung (Labenzym): Die Menschheit nutzt Techniken der Biotechnologie, ob bewußt oder unbewußt, schon seit Jahrtausenden. So wird z. B. das Vanillearoma nachhaltig aus einer nachwachsenden Quelle über Schimmelpilzkulturen produziert [1]. Diese Prozesse sind vollkommen natürlich, und werden heute wie damals gezielt industriell eingesetzt. Auch wenn dies beim Verbraucher manchmal für Unverständnis und Verwirrung sorgt.

Häufig wird ein wichtiger Fakt vergessen: Die eigentlich Struktur der Moleküle ist stets die Gleiche, egal ob aus dem Pflanzenmaterial oder biotechnologisch hergestellt durch Mikroorganismen! Unsere Geruchs- oder Geschmacksrezeptoren können sie nicht unterscheiden, sie sind absolut identisch aufgebaut. Ob aus Fruchtexttrakten oder Pilzkulturen, Aromen wie z. B. Vanille, Kokos oder Grapefruit sind genauso unschädlich und ungiftig für den Verbraucher, ganz egal woher sie stammen.

Seit kurzem ermöglicht die synthetische Biotechnologie ganz neue Herangehensweisen an Produktionsprozesse. In den Medien häufig als „Gentechnik“ abgestempelt, ist das Misstrauen und die Sorge der Bevölkerung durch Fehlinformationen oder mangelnde Aufklärung groß.

Synthetische Biotechnologie ermöglicht die Herstellung von Biokraftstoffen, neuen Medikamenten, Lebensmittelaromen oder auch Duftölen für Parfüme auf völlig neuen Wegen. Hierzu werden mit modernsten Methoden wichtige pflanzliche Enzyme identifiziert und kontrolliert in Produktionsorganismen eingebracht. Man sammelt Informationen in der Natur, verknüpft sie elegant zu neuen Werkzeugen und erzeugt so innovative Herstellungsverfahren. Der Begriff „synthetisch“ darf daher auf keinen Fall im Sinne von „künstlich, unecht, unnatürlich“ verstanden werden! Vielmehr bedeutet er, dass man einzelne Einheiten der Natur zu etwas Neuem und Sinnvollem zusammenfügt.

¹ Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates, 16. Dezember 2008, Konsolidierte Fassung vom 22.04.2013

Die Produktionsorganismen sind vielseitige Zellfabriken. Sie können einfachste Rohstoffe wie Zucker oder sogar Reststoffe der Agrarindustrie zu hochwertigen Produkten (Parfümöle, Krebsmedikamente, Impfstoffe etc.) veredeln.

Bekannte chemische Prozesse werden nun auf diese nachhaltigen Verfahren umgestellt. Häufig lassen sich die komplexen Naturstoffe, die uns die synthetische Biotechnologie ermöglicht, nur äußerst schwer chemisch herstellen. Auch die pflanzlichen Quellen sind sehr limitiert. Durch Missernten, Klimakatastrophen oder politische Unruhen schwanken das Angebot, und somit die Marktpreise, unkontrollierbar. Synthetische Biotechnologie trägt somit nicht nur zur Herstellung neuer Natur- und Wirkstoffe bei, sondern erzeugt auch eine bisher nicht gekannte Sicherheit im Bezug auf Produktqualität und Produktverfügbarkeit.

ZIELSETZUNG

Duftstoffe werden verbreitet in täglichen Hygieneartikeln wie Duschgel, Parfüm, Shampoo oder Seife eingesetzt. Sie gehören in den meisten Fällen zur Molekülklasse der Terpene.

Für diese Arbeit wurden die drei Modellterpene (-)-Patchoulol, α -Humulen und (+)-Zizaen aufgrund ihrer interessanten Eigenschaften und komplexen Struktur als Zielverbindungen ausgewählt. Für diese funktionellen Duftmoleküle, die in der Natur als essentielle Öle in exotischen Pflanzen produziert werden, sollen neue biokatalytische Produktionswege aufgezeigt werden. Hierzu muss zunächst ein breites Portfolio rekombinanter *E. coli* Produktionsstämme erzeugt werden. Die genetische Information für die jeweilige Terpensynthese (in Form der cDNA) wird dabei sowohl direkt aus den betreffenden Wirtspflanzen gewonnen, als auch durch Synthese von DNA-Abschnitten bereitgestellt.

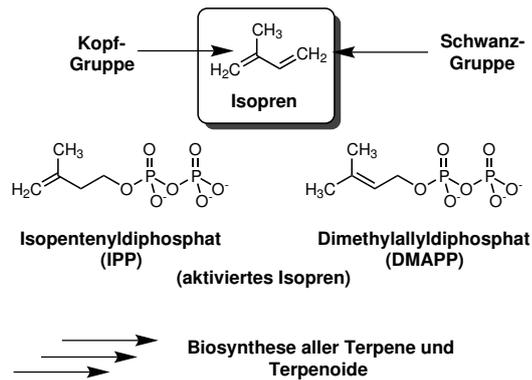
Pflanzlichen Terpensynthesen gelten als äußerst schwer exprimierbar in prokaryotischen Organismen. Deshalb müssen verschiedene Methoden zur Löslichkeits- und Expressionsoptimierung in *E. coli* evaluiert werden. Hierbei kommen Fusionsproteine und auch alternative Promotoren zum Einsatz. In einigen Fällen ermöglicht erst die Fusion an eine lösliche Proteindomäne eine aktive Expression der Enzyme.

Zum Aktivitätsnachweis wird das Substrat Farnesyldiphosphat (FDP) mit den Synthesen *in vitro* umgesetzt. Die dabei zyklisierten volatilen Produkte müssen in einer organischen Phase aufgefangen und gaschromatographisch nachgewiesen werden. FDP ist kommerziell schwer verfügbar und sehr teuer. Daher müssen zunächst Methoden zur organisch-chemischen Darstellung des Substrats hinsichtlich Ausbeuten und praktischer Durchführbarkeit miteinander verglichen werden. Die korrekte Synthese des Substrats muss über NMR bestätigt werden. Zudem soll eine geeignete Quantifizierungsmethode über Flüssigchromatographie etabliert werden. Um größere Mengen FDP bereitzustellen zu können, wird die praktikabelste Synthesevorschrift auf einen größeren (Labor-)Maßstab übertragen.

Die aktiven und löslichen Enzyme sind teilweise nicht in der Literatur beschrieben und werden daher umfassend charakterisiert (Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt, Produktprofil, Reaktionskinetik). Zum Identitätsnachweis werden die Peptidmassen der proteolytisch verdauten Enzyme bestimmt. Das vermutete Produktspektrum muss über geeignete Standards sowie GC-MS Analysen experimentell abgesichert werden. Es werden Methoden zur Aufreinigung mittels Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) getestet. Hierbei kommen funktionalisierte Sepharose und auch dekorierte Membranadsorber zum Einsatz. Die Reinheit der Enzymfraktion wird mittels SDS-PAGE und immunochemischer Methoden (Western-Blots) nachgewiesen.

Da keine Röntgenkristallstrukturen bekannt sind, werden fundierte bioinformatische Proteinmodelle anhand der Aminosäuresequenzen generiert. Dies ermöglicht die Durchführung von Docking-Simulationen, bei denen Metallliganden und das Substrat virtuell an das Enzym binden. Durch Coexpression eines heterologen Isopren-Stoffwechsels, werden darüber hinaus Produktionsstämme erzeugt, die direkt aus Glukose zwei der Modellterpene in größeren Mengen darstellen können. Die Produktion der wertvollen Naturstoffe über einen 2-Phasen-Bioprozess wird im Schüttelkolbenmaßstab evaluiert.

3.1 TERPENE

(a) Terpentin einer Kiefer²

(b) Isopren als zentrale Verbindung

Abbildung 3.1 (a) Terpentin, eine Mischung aus Harz und ätherischen Ölen, wird z. B. aus Kiefern gewonnen. (b) Alle Terpene sind formell von Isopren abgeleitet. In der Biosynthese dienen die aktivierten Isoprenoide IPP und DMAPP als zentrale Ausgangsverbindungen.

Die Naturstoffklasse der Terpene verdankt ihren Namen dem Terpentin (lat. *Balsamum Terebinthinae*), einem harzigen Ausfluss eingekerbter Kiefernrrinden (Abb. 3.1a). Diese Mischung aus ätherischen Ölen und Harz, auch Balsam genannt, verströmt einen frischen und sehr angenehmen Geruch. Die neben dem Baumharz enthaltenen, flüchtigen Kohlenwasserstoffe werden daher historisch bedingt als Terpene bezeichnet [2].

Aktuell sind fast 55.000 Terpenverbindungen in der Natur identifiziert, die Zahl steigt jedoch noch stetig weiter an [3, 4]. Obwohl alle mehrzelligen Organismen in begrenztem Umfang Terpenverbindungen synthetisieren, treten sie doch primär im Pflanzenreich in Erscheinung. Hier sind als Sekundärmetabolite Bestandteil von essentiellen Ölen, die sich in Wurzeln, Blüten, Früchten, Blättern oder auch Holz finden lassen. Grobe Schätzungen gehen von über 1 Mrd. Tonnen Terpenverbindungen aus, die pro Jahr allein durch die Nadelwälder in die Atmosphäre emittiert werden [5].

Alle Terpene basieren auf einem einheitlichen Bauprinzip: Der seit längerem bekannten Isopren-Regel [6]. Schon früh konnte die C_5 -Einheit 2-Methylbuta-1,3-dien (Trivialname Isopren) als der zentrale Baustein der Terpenbiosynthese identifiziert werden. Die Isopropyl-Gruppe bezeichnet man auch als den **Kopf** des Moleküls, während die Ethyl-Gruppe auch **Schwanz** genannt wird (Abb. 3.1b). Durch enzymatische Kopplung der Isopren-Einheiten, sowohl Kopf-an-Schwanz oder auch Schwanz-an-Schwanz, können die längeren Ketten der unterschiedlichen Terpenklassen, auch Isoprenoid-Klassen genannt, gebildet werden [7].

² Bildrechte: ©Maksim, Wikimedia commons, <http://commons.wikimedia.org>

Da sich alle Terpengerüste von der gleichen Untereinheit ableiten, ist ihre Kohlenstoffanzahl (ohne weitere Modifikationen) stets ein Vielfaches von 5. Die nicht-funktionalisierten Kohlenwasserstoffe bezeichnet man als Terpene. Deren abgeleitete Alkohole, Glycoside, Ether, Ester, Aldehyde, Ketone oder Carbonsäuren nennt man übergreifend Terpenoide (Isoprenoide) [2].

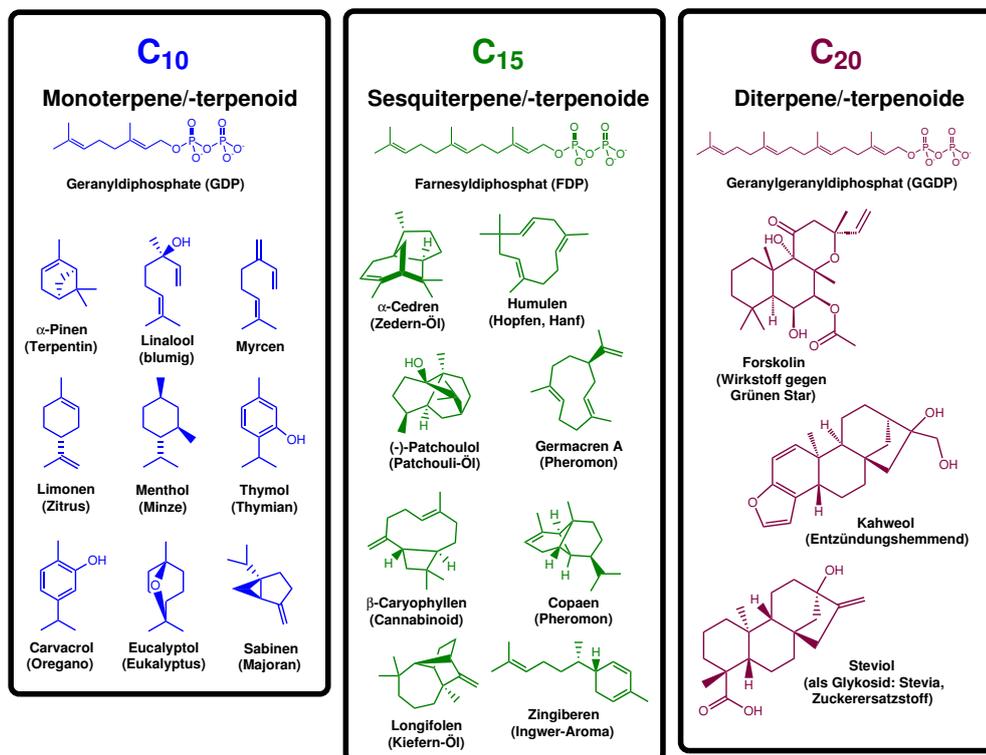


Abbildung 3.2 Einige Beispielverbindungen der in der Natur häufig vorkommenden Terpen-Strukturklassen: Mono-, Sesqui- und Diterpene.

Einige prominente Vertreter der Mono-(C₁₀), Sesqui-(C₁₅) und auch Diterpenoide (C₂₀) sind in Abb. 3.2 dargestellt. Desweiteren unterscheidet man Hemi-(C₅), Sester-(C₂₅), Tri-(C₃₀), Tetra-(C₄₀) sowie Polyterpene (ab C₄₅), auf die hier jedoch nicht weiter eingegangen wird.

Das Terpengrundgerüst wird in der Natur durch enzymatische Zyklisierung von aktivierten Diphosphatspezies aufgebaut. Zentrale Vorläuferverbindungen sind somit Geranyl- (Monoterpene), Farnesyl- (Sesquiterpene) und Geranylgeranyldiphosphat (Diterpene) (Abb. 3.2). Die gelegentlich noch anzutreffende Bezeichnung Pyrophosphat für Moleküle mit zwei Phosphaten ist veraltet; die Organisation IUPAC schreibt das einheitliche Suffix „-diphosphat“ vor [8].

Vor allem die flüchtigen Mono- und Sesquiterpenoide gelten als interessante Geschmacks- und Duftstoffe, insbesondere auch deren oxyfunktionalisierte Derivate [7]. Sie werden weltweit in sehr großen Mengen zum Aromatisieren von Speisen, in der Parfümerie und zur Körperpflege eingesetzt [9]. Als prominente Vertreter sind hier unter anderem die Strukturen von Limonen (Zitrusaroma), Eucalyptol (Eukalyptusaroma) oder das blumig-riechende Linalool (Parfümbestandteil) aufgeführt.

Dabei werden die Verbindungen in Form von Pflanzenbestandteilen und extrahierten essentiellen Ölen verwendet, insbesondere die Monoterpene lassen sich jedoch auch (relativ) einfach in größeren Mengen chemisch synthetisieren. Die organische Synthese ist notwendig, da die große Marktnachfrage durch die limitierte Verfügbarkeit des pflanzlichen Rohmaterials nicht mal ansatzweise gedeckt werden kann. Als bekanntes Beispiel sei hier das in Zahnpasta verwendete Menthol angeführt, von dem über 19.000 Tonnen pro Jahr benötigt werden [10].

Während Monoterpene häufig geschmacksaktiv sind, finden sich bei den Sesquiterpenen eher geruchsaktive Verbindungen wie z. B. α-Cedren aus dem Zedernholz-Öl, das antimikrobiell wirk-

same Humulen aus Hopfen oder auch das prominente (-)-Patchoulol aus dem Patchouli-Öl. Eine effiziente, und vor allem stereoselektive, chemische Synthese von Sesquiterpenen ist aufgrund der teilweise komplex verbrückten Strukturen häufig nicht mehr praktikabel. Diese Verbindungen werden ausschließlich über Wasserdampfdestillation direkt aus dem Pflanzenmaterial gewonnen [11].

Viele Terpenoide gelten bereits in ihrer Reinform als Phytopharmaka oder bilden das Grundgerüst für hoch-potente Medikamente [12]. Forskolin, ein Diterpen (Abb. 3.2), gilt z. B. als Wirkstoff zur Behandlung eines Glaukoms (grüner Star) [13].

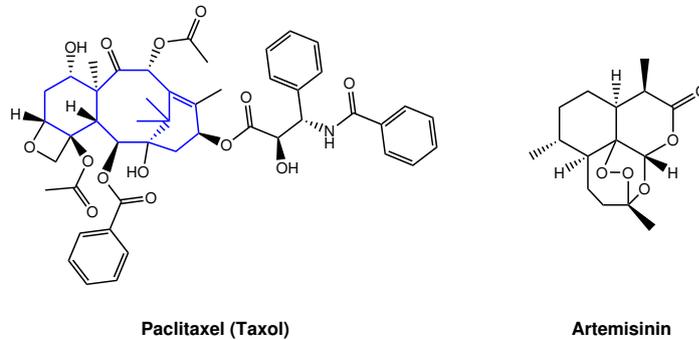


Abbildung 3.3 Strukturen von Taxol und Artemisinin. Insbesondere bei Taxol ist das ursprüngliche Terpengrundgerüst nur noch schwer identifizierbar (hier blau hervorgehoben).

Häufig muss das pflanzliche Terpengrundgerüst jedoch nachträglich chemisch oder auch enzymatisch modifiziert werden, um pharmakologische Aktivität zu erhalten. Als prominente Beispiele seien hier Paclitaxel (Taxol) [14], ein äußerst potentes Zytostatikum gegen Brustkrebs, sowie Artemisinin (Malariabehandlung) [15] genannt. Diese Verbindungen lassen sich aufgrund der vielen Modifikationen kaum noch als Terpenderivate identifizieren (Abb. 3.3).

Die Pflanzen als Primärproduzenten nutzen flüchtige Terpenoide für vielseitige Aufgaben. Zum einen locken sie Insekten zur Bestäubung an, vertreiben Fraßfeinde und sogar andere Pflanzen, oder nutzen sie als Wachstumsregulatoren (Phytohormone) [16]. Insekten nehmen Terpenverbindungen durch die Nahrung auf und metabolisieren sie weiter zu Signalstoffen z. B. zur Warnung von Artgenossen (Alarmpheromone), zur Paarung (Sexualpheromone), für Versammlungsplätze (Aggregationspheromone) oder auch zum Markieren von Wegen zu Nahrungsquellen (Spurpheromone) [2, 17].

Diese Eigenschaften können in der Landwirtschaft ausgenutzt werden, wo einige Terpenoide als biologisch verträgliche Pestizide eingesetzt werden [18].

Die Biosynthese von Isoprenoiden in Pflanzen und Eukaryoten verläuft im Cytosol über den Mevalonatweg (MEV-Weg) [19]. Der Ablauf mit allen beteiligten Enzymen und Stoffwechselintermediaten kann in Abb. 3.4 nachvollzogen werden. Zwei Moleküle Acetyl-CoA werden durch eine Acetyltransferase zu Acetoacetyl-CoA verknüpft. Nach Addition einer weiteren Einheit Acetyl-CoA entsteht Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA), welches zu Mevalonat (dem Namensgeber des Stoffwechselwegs) reduziert wird.

Über zwei Kinasen wird Mevalonat in das Diphosphat überführt. Eine Decarboxylase entfernt unter Ausbildung einer endständigen Doppelbindung CO_2 . Das entstandene Isopentenylidiphosphat wird nun durch die IPP-Isomerase zu DMAPP isomerisiert, wobei sich ein Gleichgewicht einstellt. Die Farnesylidiphosphat-Synthase (auch DMAPP-Transferase genannt) verknüpft IPP und DMAPP zunächst zu GDP und anschließend weiter zu FDP. Durch sukzessive Kopplungsreaktionen werden die längeren Isoprenoidketten ausgebildet [19].

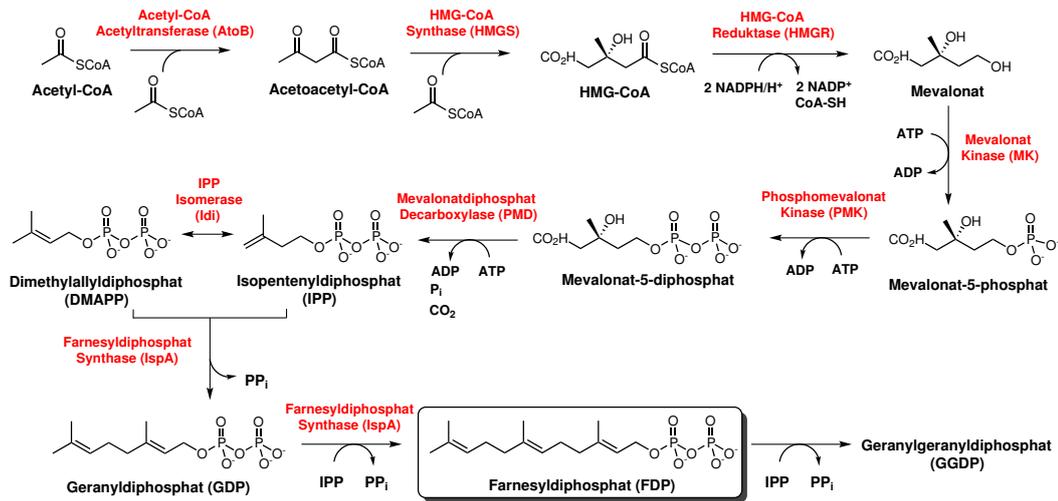


Abbildung 3.4 Biosynthese von GDP, FDP und GGDP ausgehend von Acetyl-CoA bzw. Mevalonat. Beteiligte Enzyme sind hervorgehoben. Übersicht modifiziert und erweitert nach [20].

Archaeobakterien nutzen zur Isoprenoid-Biosynthese eine Variante des MEV-Wegs, jedoch in einer etwas veränderten Reihenfolge. Abweichend wird Mevalonat-5-phosphat zunächst zu Isopentenylmonophosphat decarboxyliert und anschließend zu IPP weiter phosphoryliert [21].

Erst Ende der 90er Jahre konnte der Desoxyxylulosephosphat-/Methylerythritolphosphatweg (DXP/MEP-Weg) entdeckt und vollständig aufgeklärt werden [22]. Neben dem MEV-Weg nutzen Pflanzen in ihren Plastiden und sogar einige Protozoen (z. B. der Malaria-Erreger) den DXP/MEP-Weg, um zusätzliches IPP und DMAPP bereitstellen zu können [23].

Die allermeisten Prokaryonten (mit wenigen, exotischen Ausnahmen [24]), können nur auf den DXP/MEP-Weg zur Synthese der Isoprenoidphosphate zurückgreifen. Prokaryonten besitzen (in der Regel) keinen Mevalonat-Weg [22].

Ausgehend von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat, wird unter Abspaltung von CO₂ das Deoxyxylulosephosphat (DXP) gebildet, aus dem nach Isomerisierung und Reduktion (NADPH/H⁺ als Cofaktor) Methylerythritolphosphat (MEP) hervorgeht (Abb. 3.5). In einem Zwischenschritt wird Cytidindiphosphat addiert (CDP-ME entsteht) und das Produkt durch eine Kinase, unter Verbrauch von ATP, phosphoryliert. Die MECDP-Synthase katalysiert, nach Abspaltung von CDP, die Bildung eines zyklischen Diphosphats.

Zwei Äquivalente Ferredoxin dienen der HMBPP-Synthase als Reduktionsmittel. Nach Abspaltung von H₂O bildet sich so Hydroxymethylbutenyldiphosphat (HMBPP), welches durch weitere Reduktion zu IPP umgesetzt wird. Auch dabei wird erneut ein Äquivalent des Cofaktors NADPH/H⁺ benötigt. Die weiteren Schritte (Isomerisierung zu DMAPP; Kondensation zu GDP, FDP, usw.) erfolgen analog zum MEV-Weg.

Der DXP/MEP-Weg in Prokaryonten wird durch sehr strikte genetische Kontrollmechanismen gesteuert, die noch nicht komplett bekannt sind. Zudem sind die Effizienz und die Ausbeuten an Isoprenoiden im Vergleich zum MEV-Weg etwas geringer [20, 25]. Zusätzliche werden mehr Reduktionsäquivalente benötigt, die stetig durch gekoppelte Reaktionen aufwändig regeneriert werden müssen.

Der Grund für zwei unterschiedliche Stoffwechselwege in der Natur lässt sich evolutiv erklären. Prokaryonten benötigen Isoprenoid-Verbindungen primär zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität und -stabilität. Sie sind daher nicht auf sehr große Mengen angewiesen und der, weniger prozessive, DXP/MEP-Weg reicht zur Bereitstellung der Verbindungen aus.

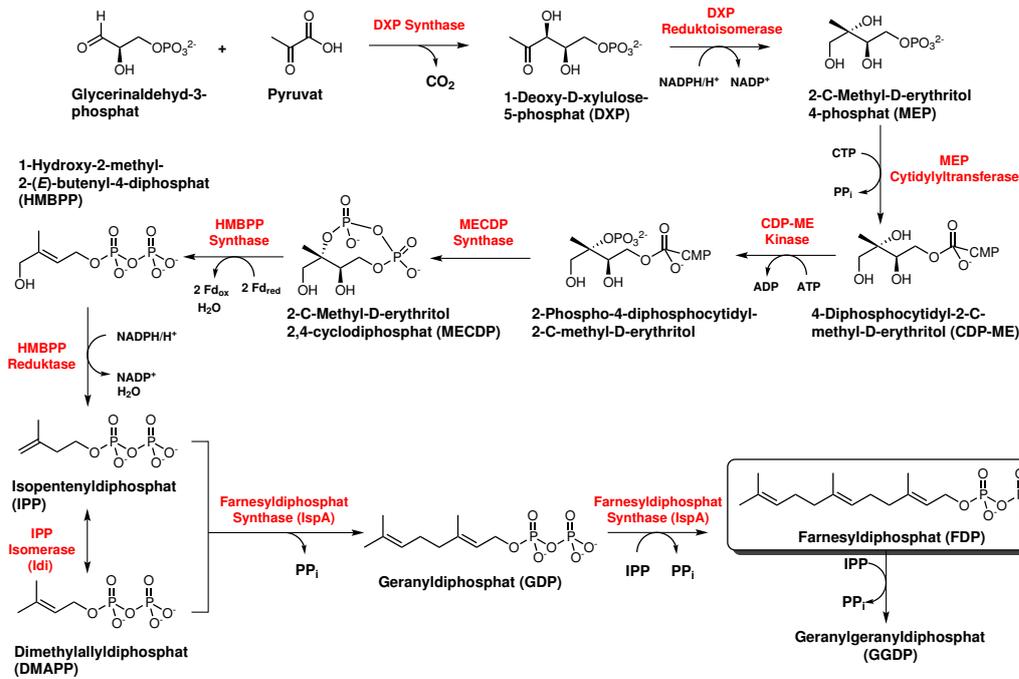


Abbildung 3.5 Biosynthese von GDP, FDP und GGDP ausgehend von Desoxyxylulosephosphat (DXP) bzw. Methylerythritolphosphat (MEP). Beteiligte Enzyme sind hervorgehoben. Übersicht modifiziert und ergänzt nach [20].

Tiere benötigen Isoprenoide zusätzlich für Hormon-Vorstufen (Steroide) sowie für Elektronen-Transport-Ketten (Ubiquinone), und nutzen den effizienteren MEV-Weg. Pflanzen hingegen sind, bedingt durch die Photosynthese-Mechanik und die Produktion großer Mengen an essentiellen Ölen/Harzen, auf beide Stoffwechselwege angewiesen [24].

3.1.1 Enzymklasse Terpensynthasen

Die Terpenvorläufer wie GDP oder FDP, sind für sich betrachtet keine wirklich funktionellen Terpenverbindungen. Erst die Umsetzung durch Terpensynthase (TPS, auch Terpenzyklasen genannt), ermöglicht die gigantische Strukturvielfalt von über 55.000 verschiedenen Molekülen. TPS katalysieren die komplexesten chemische Reaktionen, die in der Natur vorkommen. TPS steuern und beschleunigen die Zyklisierungsreaktionen, Verknüpfungen, Wagner-Meerwein Umlagerungen, Deprotonierungen, Methylshifts und Hydridshifts bis hin zu den funktionellen Terpenen. Dabei werden bis zu 2/3 der im Molekül vorhandenen Kohlenstoffe neu angeordnet, stets unter Beachtung der korrekten stereochemischen Konfiguration [26].

Die Zyklasen können die Reaktion äußerst produktspezifisch steuern. Als Paradebeispiel für eine extrem stereospezifische Katalyse sei hier die Lanosterol-Synthase angeführt. Sie ist ein wichtiges Enzym der Cholesterol-Biosynthese. Bei der Zyklisierung des Triterpens (C₃₀) bildet sie immer nur genau 1 der insgesamt 128 möglichen Stereoisomere des Lanosterols [27, 28].

Auf der anderen Seite ist auch eine ausgeprägte Produktpromiskuität bei TPS bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass eine γ -Humulensynthase aus der Kiefer (*Abies grandis*) insgesamt 52 Zyklisierungsprodukte, in unterschiedlichen Konzentrationen, aus FDP bildet [29].

Die Aminosäuresequenz liefert keinerlei Hinweise auf Art und Anzahl der möglichen Enzymprodukte. Es existieren TPS, die trotz Sequenzidentität von über 80% vollständig abweichende Produktspektren aufweisen. Im Kontrast dazu wurden z. B. zwei Sesquiterpensynthase aus der

Kiefer isoliert, die trotz Sequenzidentität von nur ca. 30 % zum Großteil identische Terpenprodukte zyklisierten [29].

Obwohl sie teilweise sehr variable Proteinsequenzen und Reaktionsprodukte aufweisen, zeigen Mono-, Sesqui- und Diterpensynthasen (MTPS, STPS, DTPS) eine gewisse genetische und auch strukturelle Ähnlichkeit. Sie können z. B. anhand ihrer Intron-Exon-Struktur (Anzahl der Introns in der genomischen Sequenz) in Klassen eingeordnet werden [30]. Allerdings wird häufig eine generelle Differenzierung durch Einordnung in zwei Klassen getroffen, die sich anhand der Proteinfaltung sowie dem generellen Reaktionsmechanismus unterscheiden.

Mono-, Sesqui- und Diterpensynthasen (MTPS, STPS, DTPS) gehören zur Klasse I der Terpenzyklen, während die restlichen Zyklen in Klasse II eingeordnet werden [31]. In Klasse I der TPS befinden sich auch die Enzyme, die Terpenvorläufer im Stoffwechsel bereitstellen (z. B. die FDP-Synthase). Diese strukturelle Ähnlichkeit untermauert die Hypothese, dass Enzyme, die sukzessive Schritte einer Biosynthese katalysieren, häufig einen gemeinsamen evolutorischen Vorgänger besitzen [32].

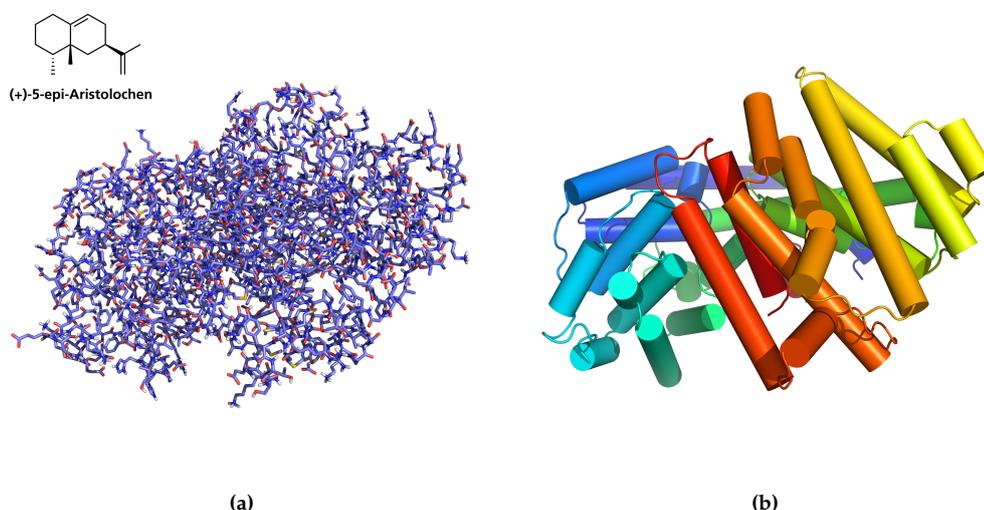


Abbildung 3.6 Strukturmodelle der 5-epi-Aristolochensynthase, basierend auf Datensatz PDB 5EAS. (a) Röntgenkristallstruktur in der Stick-Darstellung mit Position aller Kohlenstoffatome. (b) Hervorhebung der α -Helizes in der Zylinder-Darstellung. Strukturen generiert mit PyMol [33].

In Abb. 3.6 ist exemplarisch die Struktur einer 5-epi-Aristolochensynthase aus Tabak (*Nicotiana tabacum*) dargestellt (Klasse I). Sie ist eine von wenigen STPS, für die aktuell eine präzise Röntgenkristallstruktur vorliegt [34]. Sofort fällt auf, dass das Protein vollständig aus α -Helizes, mit nur einigen kurzen Loops und Schleifen, aufgebaut ist (Abb. 3.6b). β -Faltblätter sind bei Terpensynthasen nicht vorhanden. Zudem zeigt sich eine anti-parallele Ausrichtung der Helizes.

Häufig bilden 5 α -Helizes einen hydrophoben Tunnel um die aktive Tasche des Enzyms [31]. Dieser hydrophobe Tunnel könnte bei einigen Zyklen eine wichtige Rolle bei der Produktbildung einnehmen [26], indem er die Reaktion in eine definierte Richtung kanalisiert sowie Produkte von Wasser abschirmt [35]. Die exakten Reaktionsmechanismen und -kaskaden sind jedoch zur Zeit nur ansatzweise verstanden.

TPS besitzen in der Regel ein Molekulargewicht im Bereich von 50–100 kDa. Mit ungefähr 600–650 AS sind MTPS interessanterweise größer als STPS (550–580 AS), obwohl die katalysierten Reaktion weniger komplex sind [36]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass MTPS noch ein zusätzliches, N-terminales Signalpeptid aufweisen. Das Signalpeptid lenkt die Synthase während der Translation in die Plastiden der Pflanze, während STPS im Cytosol verbleiben [37]. Das pH-Optimum der meisten TPS liegt im physiologischen Bereich von pH 6,5–pH 8,5 [38].

Eine Möglichkeit, konservierte Bereiche in der DNA- oder AS-Sequenz von Proteinen zu identifizieren, besteht in der Durchführung eines multiplen Sequenzalignments (MSA). Dabei werden drei oder mehr Sequenzen über Algorithmen Position-für-Position (lokal) sowie in ihrer Gesamtheit (global) miteinander verglichen [39]. Wird dies mit sehr vielen Sequenzen durchgeführt, erhält man konservierte Sequenzmotive, die charakteristisch für eine Struktur, Funktion oder auch evolutionäre Abstammung des Proteins sind [40].

Sequenzmotive werden als Konsensussequenzen angegeben. So lautet z. B. das bekannte IQ-Motiv [41] (charakteristisch für Calmodulin-bindende Proteine) IQXXRXXXXR. Die Abfolge in den Sequenzen wäre daher: Isoleucin (I), Glutamin (Q), 3 beliebige AS (X), Arginin (R), 4 beliebige AS und nochmals Arginin. Die Schreibweise (I,Q) würde bedeuten, dass an dieser Position entweder Isoleucin oder Glutamin auftreten kann.

Das wichtigste, bis dato in fast allen pflanzlichen TPS Klasse I identifizierte Sequenzmotiv, ist die Aspartat-reiche Region DDXXD. Sie befindet sich meist am Eingang des katalytischen Zentrums und komplexiert zweiwertige Metallkationen (Mg^{2+} oder Mn^{2+}), an welche wiederum das Diphosphatende des Substrats bindet [42]. Das DDXXD-Motiv ist daher essentiell für die Orientierung des Substrats in der aktiven Tasche. Mutationen in diesem Bereich führen zu einer erheblich reduzierten katalytischen Aktivität, bis hin zur Inaktivierung [43].

Durch gelöste Röntgenkristallstruktur konnte ein weiteres, für TPS Klasse I spezifisches Sequenzmotiv, identifiziert werden. Es befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite der aktiven Tasche. Das sogenannte NSE/DTE-Motiv unterstützt die DDXXD-Region bei der Komplexbildung des trinuklearen Metallkationen-Clusters. Es besitzt die Konsensussequenz (L,V)(V,L,A)-(N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXE, (Metall-bindende AS fett hervorgehoben) [26, 36].

Das aktive Zentrum befindet sich in der Regel am C-terminalen Ende des Peptids und bildet eine, durch die angesprochenen α -Helizes abgeschirmte, hydrophobe Tasche aus [26, 36]. Cokristallisationsexperimente mit nicht hydrolysierbarem FDP (Farnesylhydroxyphosphonat), zeigten im Falle der 5-epi-Aristolochensynthase, dass der hydrophobe Teil von FDP in die Tasche des aktiven Zentrums ragt. Das Diphosphat interagiert mit dem angesprochenen Mg^{2+} -Ionencluster am Eingang des katalytischen Region [34].

Die Substratbindung induziert eine Konformationsänderung im Enzym, wobei sich die N-terminale Region als eine Art Kappe über das aktive Zentrum stülpt. Nach Abspaltung des Diphosphats bildet sich ein reaktives Carbokation als Intermediat. Das Kation greift eine der Doppelbindungen der Isoprenoidkette elektrophil an, sodass es zu einer ersten Ringschlussreaktion kommt [3, 26, 36]. Anschließend durchläuft das Molekül eine komplexe Reaktionskaskade, bevor es als stabilisiertes Terpen oder Terpenoid das Enzym verlässt [35]. Einige typische, primäre Ringschlussreaktionen sind beispielhaft für STPS in Abb. 3.7 zusammengestellt.

Ob TPS bei der Produktzyklisierung lediglich eine passive Rolle als stereochemische Vorlage für die Produkte einnehmen, oder ob sie aktiv die Zyklisierungs- und Umorientierungsreaktion steuern, ist noch nicht bekannt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass TPS nach der aktiven Abspaltung des Diphosphats eine lediglich unterstützende Funktion bei der Ausbildung gewisser Reaktionsintermediate haben, bedingt durch die Struktur der aktiven Tasche. Die eigentliche Reaktion läuft chemisch kontrolliert ab [3]. Es existieren auch experimentelle Hinweise, dass einige Synthesen durch Koordination einzelner Aminosäuren, aktiv in das Reaktionsgeschehen eingreifen und diese gezielt lenken können [35].

Da sowohl sehr produktspezifische Zyklasen als auch TPS mit sehr breitem Produktspektrum existieren, werden wahrscheinlich beide Mechanismen eine gewisse Rolle spielen [35, 36]. Der erste Fall würde für eine gezielte Lenkung der Reaktion sprechen, im zweiten Fall entstehen alle thermodynamisch möglichen und stabilen Terpenprodukte.

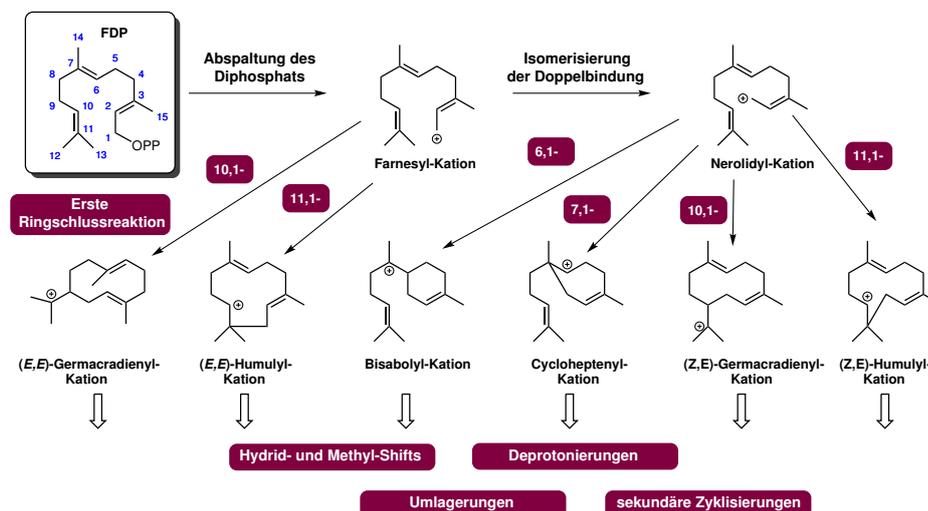


Abbildung 3.7 Mögliche erste Ringschlussreaktionen einer STPS nach enzymatischer Abspaltung des Diphosphats. Die Nummerierung der Kohlenstoffe erfolgt anhand der Ausgangsverbindung FDP. Die primären Kationen werden je nach Synthese durch mehrere Folgereaktionen weiter modifiziert. Darstellung erweitert und modifiziert nach [3, 36].

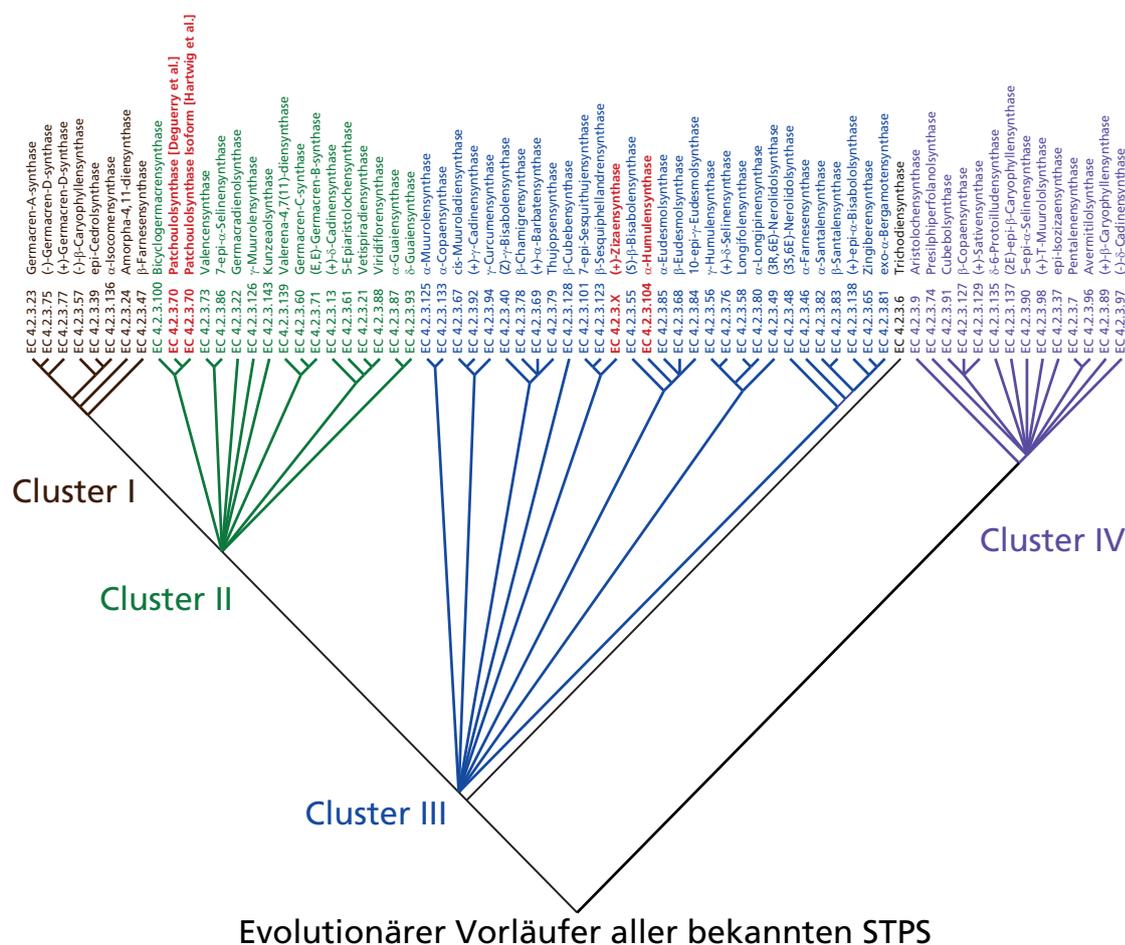
Die Expression von Terpensynthasen, primär die Menge mRNA die translatiert werden kann, unterliegt in Pflanzen häufig einer sehr strikten Regulierung. Es existieren komplexe Kontrollmechanismen mit Promoter-Systemen, die durch Elicitoren (Signalmoleküle) präzise induziert werden können. Dadurch ist die Konzentration der entsprechenden mRNA häufig niedrig oder sie wird sogar nur unter ganz speziellen Bedingungen transkribiert [44]. Zusätzlich erschwert die komplexe Matrix die Extraktion der Nucleinsäuren, weshalb, im Verhältnis zur vermuteten Anzahl in der Natur, bis heute nur sehr wenige TPS erfolgreich identifiziert werden konnten.

Eine umfassende Datenbankrecherche soll diesen Umstand kurz verdeutlichen. Proteinsequenzen können eine oder mehrere konservierte Domänen besitzen. Diese Domänen sind meist eine Kombination von Sequenz- und Strukturmotiven und helfen bei der Einsortierung in Proteinfamilien und -klassen. Die konservierte Domäne mit der Annotation CD00684³ ist in allen pflanzlichen Terpenzyklen Klasse I vorhanden, und schließt somit Mono-, Sesqui- und viele Diterpensynthasen mit ein. Die Domäne setzt sich aus den Aspartat-reichen Regionen (die Mg²⁺/Mn²⁺-Koordinationsstellen) und der N-terminalen Kappe des aktiven Zentrums zusammen. Aktuell existieren 3.552 pflanzliche Sequenzen mit dieser Domäne in den Datenbanken. Davon sind ein Großteil lediglich hypothetische Proteine aus Genomprojekten. Diese wurden noch nicht experimentell nachgewiesen oder gar charakterisiert.

Eine Recherche in der umfassenden und standardisierten Enzymdatenbank Brenda⁴ [48] zeigt, dass bei nur 286 der 3.552 bekannten Enzyme eine Lyase-Aktivität experimentell gezeigt werden konnte. Um das Suchfeld weiter einzuengen, wurden nun alle bekannten Enzyme im EC-Nummern Bereich 4.2.3.X (4. = Lyasen; 4.2. = Kohlenstoff-Sauerstoff Lyasen; 4.2.3.X = Kohlenstoff-Sauerstoff Lyasen, die Phosphate spalten) betrachtet, die FDP als Substrat akzeptieren. Somit werden alle bekannten Sesquiterpensynthasen berücksichtigt. Hierbei zeigte sich, dass lediglich 68 STPS identifiziert und näher experimentell charakterisiert wurden. Man kann daher davon ausgehen, dass die überwiegende Mehrheit der Synthasen in der Natur noch nicht identifiziert wurde.

³ NCBI Conserved Protein Domains, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

⁴ <http://www.brenda-enzymes.info/>



Evolutionärer Vorläufer aller bekannten STPS

Abbildung 3.8 Evolutorischer Baum aller aktuell bekannten STPS (Stand: Dezember 2014). Die evolutorischen Zusammenhänge wurden mithilfe der Neighbor-Joining Methode gefolgt [45], basierend auf einem Bootstrap-Konsensus Baum mit 100 Iterationen [46]. Äste mit mehr als 50% Homologie wurden in Clustern zusammengefasst. Die Analyse umfasste insgesamt 70 AS-Sequenzen. Alle Positionen mit Lücken und fehlenden Daten wurde eliminiert. Die Erstellung des evolutorischen Baums wurde mit MEGA6 durchgeführt [47]. Die in dieser Arbeit behandelten Synthesen sind rot markiert.

Alle 68 bekannten STPS⁵ wurden über ein globales MSA verglichen und ein evolutorischer Baum erstellt (Abb. 3.8). Da gelegentlich mehrere Sequenzen für die jeweilige Synthesen bekannt waren, wurden solche aus Pflanzen bzw. von Eukaryoten verwendet.

Ausgehend von einem unbekanntem Vorläufer, gruppieren sich die STPS in vier klar unterscheidbare Cluster (eigene Nomenklatur). **Cluster I** beinhaltet primär Synthesen vom Germacren-Typ. **Cluster II** umfasst Synthesen vom Patchouliol/Guaien-Typ. **Cluster III** ist eine sehr heterologe Gruppe, die einige Humulen-, Santalen-, Eudesmol-, aber auch die (+)-Zizaensynthase mit einschließt. Auch **Cluster IV** zeigt eine hohe Varianz und beinhaltet unter anderem die Copaensynthase sowie die Pentalenensynthase. Aufgrund der Sequenzvariabilität lässt sich trotz dieses fundierten Stammbaums keinerlei Aussage über Struktur oder Produkte der Enzyme eines Clusters treffen. So finden sich z. B. Germacrensynthesen auch in **Cluster II** wieder. Auch die (+)-Zizaensynthase und die epi-Isozizaensynthase sind, trotz der sehr ähnlichen Produkte, in verschiedene Äste eingeordnet worden.

⁵ Eigentlich 70 Sequenzen (68+2). Vorweggreifend wurden zwei in dieser Arbeit identifizierte und charakterisierte Synthesen mit aufgenommen.

3.2 BIOCHEMIE DES GERUCHSSINNS

Im Alltag treten wir mit Terpenverbindungen vor allem über den Geruchssinn, auch olfaktorische Wahrnehmung genannt, in Kontakt. Im Folgenden wird eine kurze Einführung in die biochemischen Mechanismen gegeben und auf Besonderheiten im Bezug auf Chiralität bei Terpenoiden eingegangen.

3.2.1 Olfaktorische Wahrnehmung von Duftstoffen

Alle riechbaren Moleküle müssen flüchtig sein und besitzen daher bereits im physiologischen Temperaturbereich einen entsprechend hohen Dampfdruck. Ihr Siedepunkt liegt jedoch meist über 100 °C. Sie werden so über einen längeren Zeitraum wahrgenommen, bevor sie vollständig in die Atmosphäre verdampfen. Düfte sind hydrophobe Moleküle mit relativ geringem Molekulargewicht, die jedoch häufig auch einen amphiphilen Charakter aufweisen [9].

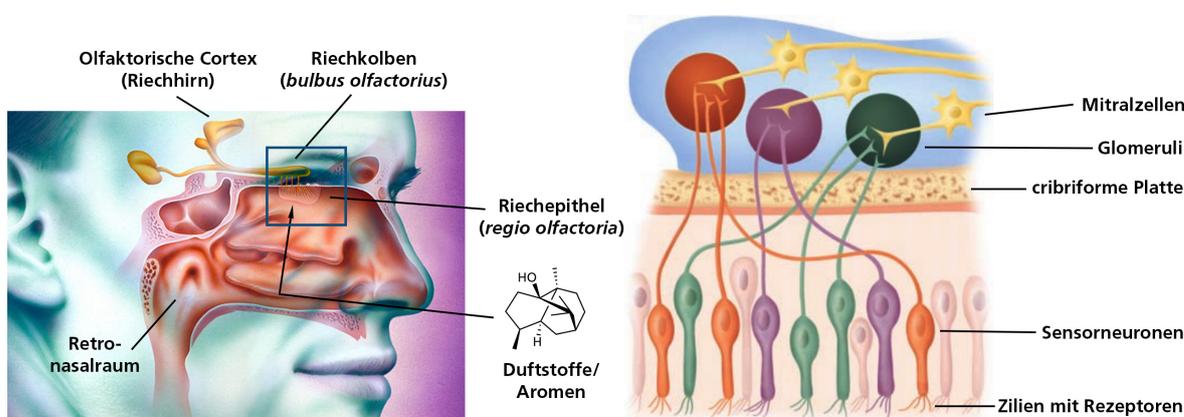


Abbildung 3.9 Links: Schematische Darstellung des Riechapparats mit beteiligten Organsystemen⁶. Beschriftung angepasst nach [9]. Rechts: Vergrößerter Detailausschnitt des beteiligten Nervensystems. Darstellung angepasst nach [49].

Menschen können lediglich fünf Geschmackseindrücke unterscheiden: sauer, süß, bitter, salzig und Umami (fleischig, herzhaft) [50]. Die Anzahl der unterscheidbaren Geruchseindrücke wird noch kontrovers diskutiert. Schätzungen liegen im Bereich zwischen 2.000 und 100.000 verschiedenen Duftnoten [51].

Durch die eingeatmete Luft oder durch zerkaute Nahrung (retronasale Aufnahme), gelangen die Verbindungen zu dem olfaktorischen Epithel (*regio olfactoria*) an der inneren Nasendecke (Abb. 3.9, links). Das Epithel ist von einer dicken Schutzschicht aus Polysacchariden und Lipiden umgeben. Es besteht aus bis zu 30 Millionen länglichen Sensorneuronen (*nervus olfactorius*), die zum Nasenraum hin in jeweils 20–30 feinen Härchen (Zilien) enden. Die eigentliche Duftstoffbindung und anschließende Signaltransduktion finden an der Oberfläche dieser Zilien statt [51].

Die sehr langen Axone der Sensorneuronen durchlaufen die knochige cribriforme Platte (trennt den Nasenraum vom Gehirn) und Enden im Riechkolben *bulbus olfactorius* (Abb. 3.9, rechts). Dort werden alle Neuronen, die einen speziellen Rezeptortyp ausbilden, gebündelt. Dabei spielt es keine Rolle, wo sie sich örtlich im Riechepithel befinden. Die knotigen Nervenbündel sind ungefähr 100 µm im Durchmesser und werden Glomeruli genannt [52].

An die Glomeruli sind wiederum Mitralzellen, Neuronen der zweiten Signalweiterleitungsebene, angeknüpft. Es kommt zu einer Konvergenz von Informationen, da viele Tausend Sensorneuro-

⁶ Bildrechte: ©WDR, Planet Wissen Artikel „Riechen“, <http://www.planet-wissen.de>

nen in einem Glomeruli enden können. An diesen sind wiederum nur noch an 5–25 Mitralzellen angeknüpft [9, 51].

Über den olfaktorischen Trakt gelangen die Signale in eine zentrale Region des Gehirns, den olfaktorischen Cortex. Über eine Neuronenkarte werden die Informationen aus mehreren Riechrezeptoren zu einem definierten Geruchseindruck zusammengefasst und interpretiert. Hierbei wird nicht nur die Menge, also Bindungshäufigkeit des Duftstoffs, sondern auch dessen jeweilige Bindungsaffinität gegenüber einzelnen Rezeptortypen mit einbezogen [53].

Die eigentlichen Geruchsrezeptoren auf der äußeren Zellmembran der Zilien gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) [54]. Obwohl GPCRs auch bei vielen anderen Sinneseindrücken eine zentrale Rolle einnehmen (der Sehrezeptor Rhodopsin ist ein GPCR), bilden die olfaktorischen Rezeptoren die möglicherweise größte Unterfamilie [51]. Es konnten schon bereits fast 400 funktionelle Gene für olfaktorische GPCRs im menschlichen Genom identifiziert werden [55, 56].

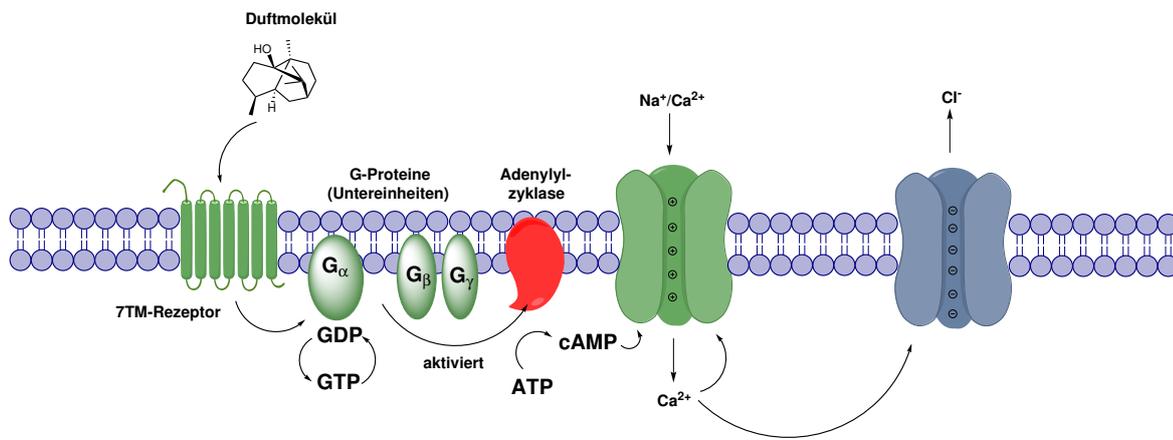


Abbildung 3.10 Signaltransduktion am olfaktorischen Rezeptor, einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit 7 transmembranen α -Helizes. Die Signalweiterleitung erfolgt durch zyklische AMP (cAMP), welches an die entsprechenden Ionenkanäle bindet. Darstellung angelehnt an [57].

Die Rezeptoren besitzen 7 transmembrane α -Helizes, die durch variable Schleifen miteinander verknüpft sind. Die Helizes bilden eine definierte Tunnelstruktur aus, in deren Zentrum ein Duftmolekül bindet [49]. Jeder Duftrezeptortyp bildet andere variable Domänen aus, so dass sich die Bindungstaschen chemisch und strukturell unterscheiden [54].

Sobald der Ligand gebunden hat, vollzieht das Protein eine Konformationsänderung, die den Startpunkt für die Signaltransduktion darstellt. Die α -Untereinheit des gebundenen G-Proteins aktiviert eine Adenylylzyklase (erster Messenger). Die Zyklyase katalysiert nun die Bildung von cAMP aus ATP (Abb. 3.10). Der zweite Messenger cAMP öffnet Na⁺/Ca⁺-Kanäle, so dass Natrium- und Calcium-Ionen einströmen [58].

Die Signalkaskade am Geruchsrezeptor verstärkt die Information bis zur Interpretation im olfaktorischen Cortex. Dies ermöglicht die Detektion auch geringster Spuren eines geruchsaktiven Stoffes. Im Falle des Pheromons Androstenon wurden Geruchsschwellen von $0,4 \text{ pg L}^{-1}$ Luft ermittelt [59].

Alle Rezeptoren können verschiedenste Verbindungen und funktionelle Gruppen erkennen. Auch einzelne Moleküle binden je nach Affinität an mehrere Rezeptortypen. Im Zusammenspiel mit den Signalkaskaden und einer kombinatorischen Verschaltung von Neuronen im Riechhirn, erklärt sich so die hohe Anzahl unterscheidbarer Gerüche [9, 51].

Wie viele weitere biochemische Vorgänge, ist Riechen ein enantioselektiver Prozess [60]. Die Bindungsdomänen der Rezeptoren selber sind chiral aufgebaut, und besitzen somit unterschiedliche

Bindungsaffinitäten gegenüber den Liganden, abhängig von deren Konfiguration. Somit können Enantiomere eines Terpenoids vollständig unterschiedliche Geruchseindrücke hervorrufen, oder verschiedene Geruchsschwellen aufweisen [61].

In Tab. 3.1 sind einige Beispiele bekannter Terpene aufgelistet. Das (+)- oder (-)-Enantiomer besitzt teilweise vollständig abweichende sensorische Eigenschaften. Es zeigt sich ein großer Vorteil biokatalytischer Herstellungsverfahren von Terpenoiden im Vergleich zur chemischen Synthese: Terpensynthasen katalysieren ihre Produkte strikt enantioselektiv [62].

Tabelle 3.1 Bekannte chirale Duftstoffe mit Geruchseindrücken. Zusammengefasst nach [61].

Verbindung	(+)-Enantiomer	(-)-Enantiomer
Linalool	süß, Bitterorange	holzig, Lavender
Patchoulol	nicht in Natur, schwach würzig	orientalisch, maskulin, holzig
Carvon	Kümmel	Pfefferminze
Nootkaton	Grapefruit	holzig, würzig
Androstenon	geruchlos	stark nach Schweiß und Urin
Menthol	nur schwach minzig	süß, frisch, minzig
Limonen	Orange	Terpentin

3.3 SESQUITERPENE: BEISPIELE WERTVOLLER UND FUNKTIONELLER NATURSTOFFE

In den praktischen Arbeiten wurden drei Sesquiterpenoide näher untersucht: (-)-Patchoulol (und weitere Komponenten des Patchouli-Öls), α -Humulen und (+)-Zizaen. Im Folgenden wird eine kurze Einführung in die Herkunft, Funktion und ökonomische Bedeutung dieser Zielverbindungen gegeben. Desweiteren werden die etablierten organischen Synthesen zur Darstellung dieser Verbindungen zusammenfassend dargestellt.

3.3.1 (-)-Patchoulol



(a) Plantage mit Patchouli-Sträuchern



(b) Patchouli-Pflanze mit Blüten⁷

Abbildung 3.11 (a) Patchouli-Sträucher werden auf großen Plantagen im asiatischen Raum angebaut (Foto aus [63]). (b) Aufnahme von *Pogostemon cablin* in voller Blüte.

Der Patchouli-Strauch, *Pogostemon cablin* (Abb. 3.11), gehört zur Familie der Lippenblütler (*Lamiaceae*). Charakteristisch für Lippenblütler sind ihre namensgebenden lippenartig verbogenen Blüten.

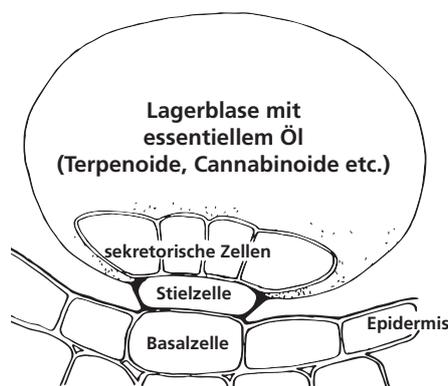
⁷ Bildrechte: ©Valérie75, Wikimedia commons, <http://commons.wikimedia.org>

Sie produzieren sehr aromatische essentielle Öle z. B. in ihren Blättern. Weitere bekannte Vertreter sind Pfefferminze, Oregano, Lavendel, Thymian oder auch Basilikum [64].

Der ca. 40–90 cm hohe Strauch ist heimisch auf den Philippinen, wird aber auch intensiv in Indonesien, Indien, China und Thailand angebaut. Er benötigt ein tropisch bis subtropisches Klima mit konstanten Temperaturen über 20 °C und einer sehr hohen Luftfeuchtigkeit [63]. Die Pflanze produziert ihr terpenhaltiges Öl in glandulären Trichomen (syn. Drüsenhaare) auf den Blättern und dem Stiel. Drüsenhaare besitzen metabolisch sehr aktive sekretorischen Zellen, die die Komponenten des Aroma-Öls in großen Mengen synthetisieren können. Die Öle werden, je nach Gattung, in einer oder mehreren rundlichen Zellen an der Spitze dieser Haare eingelagert. Von dort verdampfen die flüchtigen Verbindungen langsam, und entfalten ihre Wirkung als Insektenlock- oder Abwehrstoff [37, 65, 66]. Abb. 3.12 zeigt eine makrofotografische Aufnahme von typischen Drüsenhaaren und deren schematischer Aufbau.



(a) Makroaufnahme von Drüsenhaaren



(b) Schematischer Aufbau eines glandulären Trichoms

Abbildung 3.12 (a) Die sekretierenden Drüsenhaare (hier am Beispiel eines Tomatengewächses) sammeln die Metabolite an ihrer Spitze (Foto aus [66]), wo sie nach und nach in die Gasphase übergehen. (b) Der schematische Aufbau eines glandulären Trichoms zeigt die sekretierenden Zellen mit erhabener Lagerzelle für das essentielle Öl. Die exakte Haarlänge und Morphologie der Spitze variieren ja nach Pflanzenspezies. Schema angelehnt an [37].

Nach der Ernte der Blätter werden diese zunächst für bis zu 6 Monate im Schatten getrocknet. Ein langsamer und gleichmässiger Trocknungsprozess hat einen starken Einfluss auf die spätere Qualität des Extrakts. Erst durch die Trocknung tritt das charakteristische Patchouli-Aroma zutage, welches bei frischen Blättern nur sehr schwach ausgeprägt ist. Grund dafür sind Oxidationsprodukte, die wichtige Komponenten des Aromas darstellen [63].

Die anschließende Extraktion erfolgt in der Regel über Wasserdampfdestillation, wobei die Ausbeuten im Bereich von 1–3,5 % liegen [9]. Nach Destillation wird das bräunliche Öl von der wässrigen Phase getrennt und durch Zugabe von Natriumsulfat getrocknet [63].

Patchouli-Öl gilt als äußerst kraftvolle Basiskomponente in der Parfümerie und wird zudem als Fixateur eingesetzt. Fixateure helfen dabei, andere Duftbestandteile im Parfüm abzurunden und deren Haftdauer zu erhöhen [9]. Dem Öl werden die primären Dufteigenschaften erdig, hölzern, süßlich und campher-artig mit leicht blumiger Note, zugeschrieben [9, 63]. Wie ein guter Wein reift es mit dem Alter und verändert seine Zusammensetzung. Während es frisch noch sehr scharf und würzig riecht, wird mit der Zeit meist milder und süßlicher.

Weltweit wurden Anfang der 2000er in den Anbaugebieten über 1.000 Tonnen Patchouli-Öl pro Jahr produziert [67], aktuellere Schätzungen gehen von bis zu 1.500 Tonnen Jahresproduktion aus [68]. Der Marktpreis steigt aufgrund der Nachfrage und häufigen Ernteausfällen stetig an. Bei einem

Preis von ca. 60 € pro Kilo [9] kann von einem Marktvolumen im Bereich um 100 Millionen € ausgegangen werden. Patchouli-Öl ist somit das wichtigste natürliche essentielle Öl und hat einen doppelt so hohen Marktwert wie das zweitplatzierte Aromaöl (Rosenöl) [69].

Die Zusammensetzung des Patchouli-Öls ist sehr komplex, wie bei vielen anderen Aromaölen auch. Dennoch ist Patchouli-Öl speziell, da es aus 24 Sesquiterpenoide zusammengesetzt ist. Ähnliche Öle bestehen meist aus einer Mischung von Mono-, Sesqui- und Diterpenkomponenten [70].

Die Einsatzgebiete des Patchouli-Öls sind so zahlreich wie die enthaltenen Terpenkomponenten. Neben der klassischen Verwendung in orientalisch/maskulinen Parfüms (z. B. der bekannten Marken Prada, Davidoff, Dior oder Chanel [9]) wird es zur Aromatisierung von Seifen, Körperlotionen, Tabak, Papiertüchern, Weichspülern, Lufterfrischern und Duftstäbchen eingesetzt [63]. In sehr geringen Konzentrationen (mg kg^{-1}) findet es auch Verwendung in Süßigkeiten, Softdrinks, Backwaren und auch Suppen [67].

In der traditionellen asiatischen Medizin werden Patchouli-Öl viele positive pharmakologische Eigenschaften zugesprochen, die jedoch meist nicht durch Studien belegt werden können. So soll es bei Krankheitsbildern wie Akne, Schuppenflechte, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Erkältung oder auch Kopfschmerzen sehr schnell Linderung verschaffen [63]. Ein gewisser Einfluss auf das sympathische Nervensystem, mit einem antidepressiven und relaxierendem Effekt, konnte in einer klinischen Studie nachgewiesen werden [70, 71].

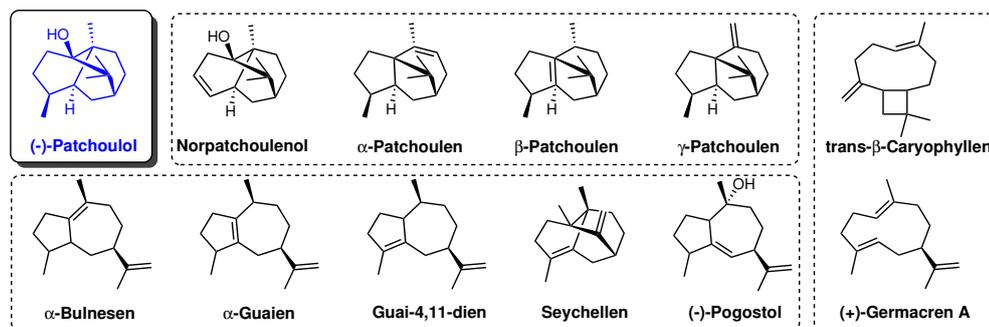


Abbildung 3.13 Die 12 Hauptkomponenten des Patchouli-Öls, extrahiert aus *P. cablin*. (-)-Patchoulol ist mit ca. 40% der mengenmäßig häufigste Bestandteil (blau hervorgehoben). Weitere Komponenten sind anhand ihrer Gerüststrukturen gruppiert. Das Öl enthält insgesamt über 24 per GC/MS identifizierbare Terpenoide, einige sind jedoch nur in absoluten Spuren. Abbildung zusammengestellt und angepasst nach [9, 72].

Der Terpenalkohol (-)-Patchoulol ist mit 40–50% der Hauptbestandteil [9, 72]. Olfaktorische Untersuchungen des reinen Alkohols zeigten, dass er auch in isolierter Form das charakteristische Patchouli-Aroma aufweist. Er ist somit zum Großteil für den Duftgesamteindruck verantwortlich [73]. Die Geruchsschwelle für (-)-Patchoulol liegt bei lediglich $0,93 \text{ ng L}^{-1}$ Luft [74]. Auch Norpatchoulenol (Methylgruppe entfernt) trägt zum Duftaroma bei, ist jedoch nur in sehr viel geringeren Konzentrationen vorhanden. Das in der Natur nicht anzutreffende Enantiomer (+)-Patchoulol riecht nur äußerst schwach und erinnert kaum an Patchouli [9]. Weitere Komponenten des Aromas wie α -Bulnesen, α -Guaien, Seychellen, β -Caryophyllen oder auch (+)-Germacren A (Abb. 3.13) tragen nur minimal zum charakteristischen Duftendeindruck bei.

Aktuell existiert keine Möglichkeit, die Hauptkomponenten des Patchouli-Öls oder das Aroma in seiner Gesamtheit industriell über chemische Synthese bereitzustellen [63]. Zur Darstellung eines authentischen Standards von (-)-Patchoulol existieren mehrere beschriebene Totalsynthesen im Labormaßstab [73, 75–80].

Ein sehr elegantes und prominentes Beispiel einer enantioselektiven Synthese ist in Abb. 3.14 zusammenfassend dargestellt [73]. Ausgehend von den sehr gut verfügbaren Monoterpenen α - und β -Pinen wird ein bromierter Vorläufer erzeugt. In weiteren Schritten wird dieser mit einem

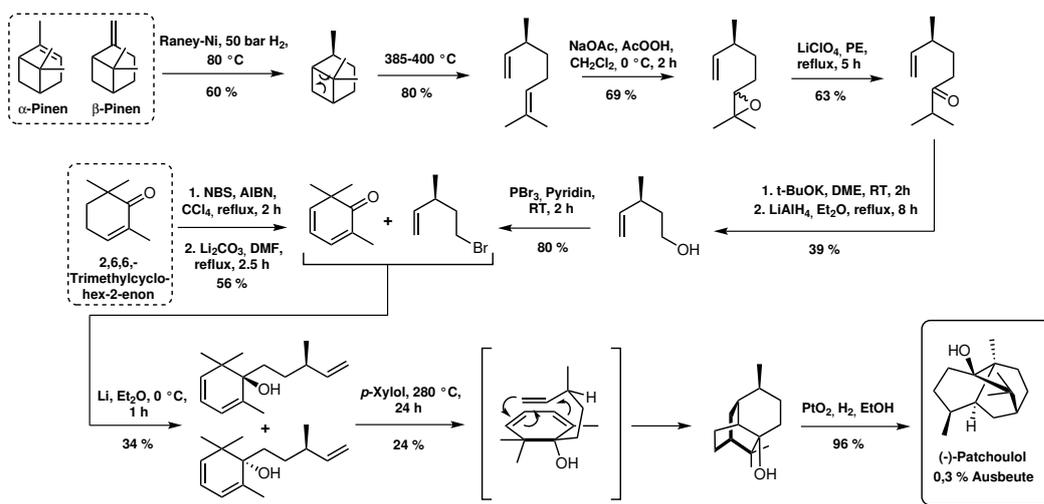


Abbildung 3.14 Totalsynthese (enantioselektiv) von (-)-Patchoulol. Zusammengestellt und modifiziert nach [73, 75, 76].

kommerziell verfügbaren Cyclohexan-Derivat (Trimethylcyclohexenon) verknüpft. Nach einer Verbrückungsreaktion zum Patchoulol-Grundgerüst wird in einem letzten Schritt der Terpenalkohol mit einer Gesamtausbeute von maximal 0,3 % erhalten.

3.3.2 α -Humulen

Hopfen gehört zur Familie der Hanfgewächse (*Cannabaceae*) und ist in Ländern der gemäßigten Klimazone beheimatet. Bekanntester Vertreter ist der Echte Hopfen (*Humulus lupulus*), der durch seine Verwendung im Bierbrauprozess großflächig angebaut wird (Abb. 3.15a). Hopfen wächst als Schlingpflanze und wird ungefähr 2–6 m hoch bzw. lang [64]. Das essentielle Öl aus den Hopfendolden ist für das charakteristische Bieraroma verantwortlich, und besteht zu einem großen Teil (nahezu 40 %) aus α -Humulen (syn. α -Caryophyllen) [4, 81].

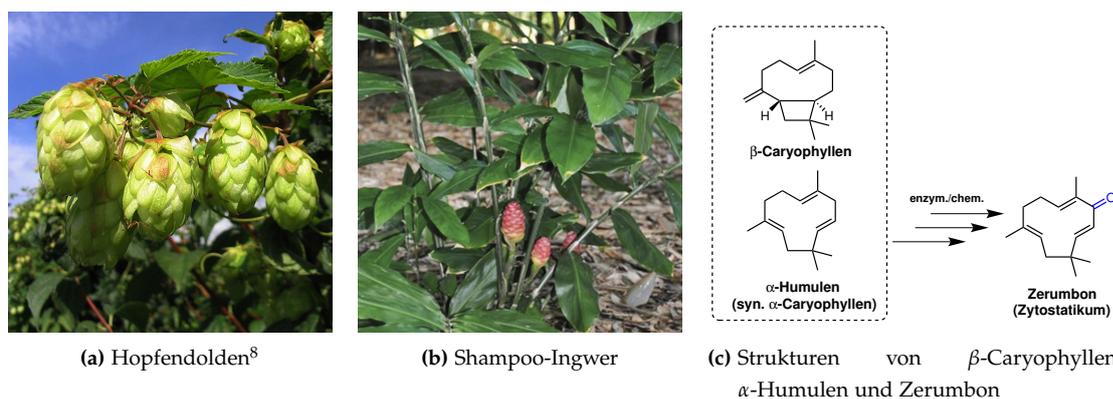


Abbildung 3.15 (a) Humulen findet sich als Hauptbestandteil im essentielles Öl von Hopfendolden (*Humulus lupulus*). (b) Auch in Ingwerspezies wie dem Shampoo-Ingwer (*Zingiber zerumbet*) wird der Sesquiterpen-Makrozyklus produziert (Darstellung von Blättern und Blüte der Pflanze aus [82]). (c) Durch enzymatische oder auch chemische Oxidation kann α -Humulen zu Zerumbon oxidiert werden, einem potenten Phytopharmaka.

α -Humulen tritt in der Natur häufig zusammen mit seinem Isomer β -Caryophyllen auf, welches daher auch zu ca. 15 % in Hopfenöl nachweisbar ist (Abb. 3.15c) [4]. β -Caryophyllen besitzt einen, in

der Natur äußerst seltenen Cyclobutanring, und ist als Bestandteil von schwarzem Pfeffer mitverantwortlich für dessen beißende Schärfe [83].

In seiner natürlichen, unfunktionalisierten Form besitzt α -Humulen kein markantes Duftaroma. Pharmakologisch konnte jedoch ein inhibitorischer Effekt auf Interleukine nachgewiesen werden, wodurch Humulen einen entzündungshemmenden Effekt auf den Organismus haben könnte [84]. Aufgrund der großen, 11-gliedrigen Ringstruktur und der drei Doppelbindungen, oxidiert Humulen sehr leicht. Während des Brauprozesses entstehen eine Vielzahl an Humulen-Epoxiden, die wiederum weiter hydrolysieren können. Diese Abbauprodukte, insbesondere von der Verbindung Humulen-Epoxid-II, sind verantwortliche für das hopfige Aroma des fertigen Bieres [85].

Ein potenter Naturstoff, der direkt von α -Humulen abgeleitet ist, nennt sich Zerumbon (Abb. 3.15c). Zerumbon unterscheidet sich lediglich durch Oxyfunktionalisierung an einem Kohlenstoff von α -Humulen. Nach heutigem Kenntnisstand wird Zerumbon in der Natur (zusammen mit α -Humulen) ausschließlich im exotischen Shampoo-Ingwer (*Zingiber zerumbet*) produziert (Abb. 3.15b) [86].

Shampoo-Ingwer wächst in tropischen Regionen, vor allem im südostasiatischen Raum aber auch auf Hawaii. Die blättrigen Stengel werden ungefähr 1,2 m hoch. Typisch für alle Ingwer-Gewächse ist ein ausgeprägtes Rhizom (Wurzelstock), das sehr häufig getrocknet als Gewürz und auch Heilmittel verwendet wird [64].

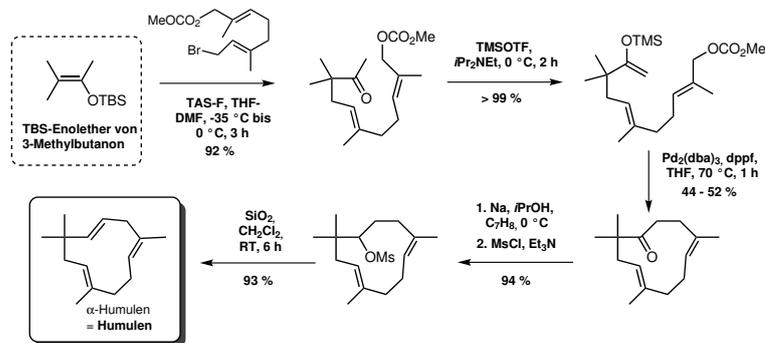


Abbildung 3.16 Totalsynthese von α -Humulen ausgehend von 3-Methylbutanon. Zur Zeit kürzeste Syntheseroute mit höchsten Ausbeuten. Zusammengestellt und modifiziert nach [87].

Die roten und reifen Blütenköpfe enthalten ein seifiges Sekret, das sehr gute reinigende Eigenschaften aufweist. Mit diesem „Shampoo“ waschen sich Ureinwohner seit jeher die Haare, wodurch diese Ingwerspezies ihren Namen erhielt. Aber auch das Rhizom und dessen Extrakte wurden und werden erfolgreich zur Behandlung von Zahnschmerzen, Übelkeit, Schmerzen und Entzündungen in der traditionellen Medizin eingesetzt [82].

Aktuell wird Zerumbon, der Hauptbestandteil des Rhizom-Öls, intensiv in klinischen und pharmakologischen Studien beforscht. Zerumbon induziert spezifisch die Apoptose von Krebszellen, und gilt damit als vielversprechendes, neues Zytostatikum gegen u. a. Darm-, Haut-, Leber- und Brustkrebs [88–90]. Da α -Humulen in verschiedensten Pflanzengattungen vorkommt, ist es ein vielversprechender Vorläufer, um chemisch oder enzymatisch das oxyfunktionalisierte Zerumbon in großen Mengen darstellen zu können (Abb. 3.15c). Es konnte vor kurzem eine NADH-abhängige Oxidoreduktase (Zerumbonsynthase, EC 1.1.1.326) identifiziert werden, die diese regioselektive Reaktion katalysiert [91].

Zur chemisch-synthetischen Darstellung von α -Humulen existieren einige bekannte Vorschriften in der Literatur [87, 92–94]. Problematisch ist hierbei immer der Aufbau des großen, unfunktionalisierten Makrozyklus mit korrekter Lage der Doppelbindungen. Eine elegante Synthesemethode im Labormaßstab ist in Abb. 3.16 zusammengestellt. Ausgehend von mit TBS geschütztem

3-Methylbutanon wird sukzessiv der Zyklus aufgebaut, wobei jeweils sehr hohe Ausbeuten von über 90 % je Schritt erzielt werden können. Nach einem finalen Entschützungsschritt, wird reines α -Humulen erhalten. Da keine komplexen Verbrückungen oder Stereozentren generiert werden müssen, ist die Synthese im Vergleich eher simpel.

3.3.3 (+)-Zizaen

Das Vetiver-Gras (*Chrysopogon zizanioides*, veraltet: *Vetiveria zizanioides*) gehört zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*) und wird in der tropischen Klimazone angebaut, bevorzugt auf Réunion, Madagaskar, Haiti und Indonesien (Java) [67, 95]. Vetiver wächst ca. 1,5 m hoch. Im Gegensatz zu anderen Süßgräsern, deren Wurzeln häufig horizontale Matten ausbilden, wachsen die Wurzeln von *C. zizanioides* vertikal in eine Tiefe von bis zu 4 m (Abb. 3.17a). Diese Eigenschaft macht das Gras extrem tolerant gegen Dürreperioden. Zudem hilft es in den Anbaugebieten dabei, Bodenerosion zu verhindern ⁹.

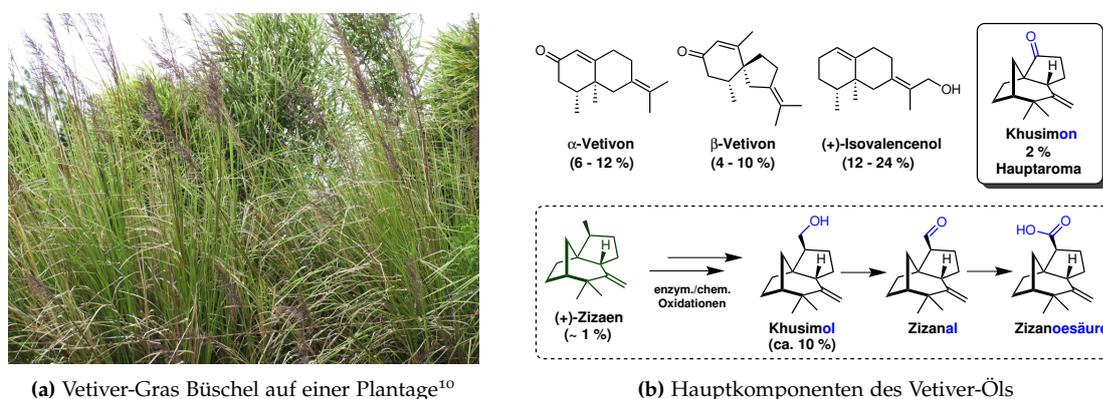


Abbildung 3.17 (a) Büschel von Vetiver-Gras (*C. zizanioides*) auf Madagaskar. (b) Die drei Hauptkomponenten des Vetiver-Öls: α -/ β -Vetivon und (+)-Isovalencenol. (+)-Zizaen wird in der Pflanze enzymatisch weiter zu Khusimol oxidiert. Durch weitere Oxidationen werden Zizanal und Zizanoesäure erhalten. Das Keton Khusimon gilt als hauptverantwortlich für den Geruchseindruck von Vetiver-Öl. Zusammenstellung angelehnt an [67, 96].

Nach der Ernte der langen, hölzernen Wurzelballen werden diese zunächst getrocknet und anschließend über Wasserdampfdestillation extrahiert. Das bräunlich-gelbe essentielle Öl enthält fast 150 identifizierte Sesquiterpene und -terpenoide, die meisten jedoch nur in Spuren [97]. Pro Jahr werden ca. 300 Tonnen des Öls in den Herkunftsländern produziert [95].

Vetiver-Öl wirkt antimikrobiell gegen viele Mikroorganismen und wird in der alternativen Medizin als Mittel gegen Akne und allgemeine Entzündungen eingesetzt [98]. Zudem konnte eine insektizide Wirkung nachgewiesen werden. Insbesondere gegen Termiten wirkt das essentielle Öl abschreckend [99]. Auch ein antioxidatives Potential wurde bei dem Terpenextrakt experimentell nachgewiesen [100].

Das Öl verströmt einen holzig-erdigen Duft, ist jedoch deutlich süßlicher als Patchouli-Öl. Zudem zeigt es Nuancen von Grapefruit und Rhabarber. Vetiver-Öl ist eine der bekanntesten, hölzernen Basisnoten in der Parfümerie und findet sich als zentrales Thema in vielen maskulinen wie auch femininen (z. B. Chanel N° 5) Duftkompositionen wieder. Bekannte Parfümmarken, die Vetiveröl in ihren Produkten verwenden sind z. B. L'Occitane (Vetiver), Armani, Yves Rocher, Dior (Eau Sauvage) oder Hermès, um nur einige zu nennen [9].

Das typische Vetiver-Aroma wird als sehr langanhaltend und angenehm beschrieben. Ähnlich wie Patchouli-Öl reift das Vetiver-Öl mit der Zeit und erhält so eine höhere Qualität [67]. Hauptkom-

⁹ Informationen des großen Plantagenbetreibers Agri Supply CO S.A., Haiti, <http://www.frager-vetiver.com>

¹⁰ Bildrechte: ©Forest und Kim Starr, Wikimedia commons, <http://commons.wikimedia.org>

ponenten sind die Sesquiterpenoide α -Vetivon, β -Vetivon und Khusimol, die zusammen bis zu 35 % des essentiellen Öls ausmachen können (Abb. 3.17b) [97]. Zudem sind größere Anteile (über 20 %) (+)-Isovalencenol enthalten. Die aufgeführten Verbindungen gelten als Fingerabdruck des Duftöls, tragen jedoch (abgesehen von dem kräftigen (+)-Isovalencenol) nur begrenzt zum Dufteindruck bei. Ähnlich wie bei Patchouli-Öl, sind zumeist die sekundären und tertiären Sesquiterpenalkohole, sowie deren Methylether, olfaktorisch aktiver [97]. Insbesondere Khusimon, ein Norsesquiterpenoid von Khusimol (Methylgruppe entfernt und oxyfunktionalisiert) gilt als die zentrale Verbindung des Vetiver-Dufts [9, 97].

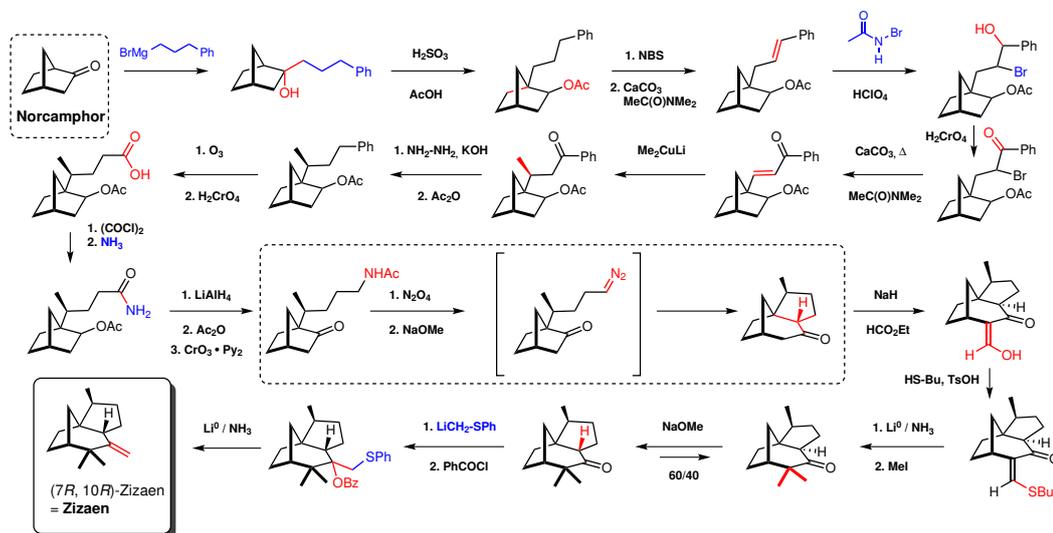


Abbildung 3.18 Totalsynthese (stereoselektiv) von (±)-Zizaen ausgehend von (±)-Norcamphor. Zusammengestellt und modifiziert nach [101].

Das geruchsaktive Sesquiterpenoid Khusimol leitet sich direkt von (+)-Zizaen ab (Abb. 3.17b). Auch das entsprechende Aldehyd (Zizanal) und die Säure (Zizanoesäure) weisen das Zizaengrundgerüst auf. (+)-Zizaen, welches nur zu ca. 1 % im natürlichen Aroma vorkommt, besitzt keine unmittelbaren olfaktorischen Eigenschaften. Es kann jedoch chemisch [102] in die angesprochenen, geruchsaktiven Derivate überführt werden. Vor kurzem wurde zudem eine Cytochrom-P450 (CYP450) Monooxygenase aus einem verwandten Süßgras identifiziert, die (+)-Zizaen spezifisch zum Alkohol Khusimol oxidieren kann [96].

Aufgrund der komplexen Verbrückungen und der vielen Stereozentren ist (+)-Zizaen chemisch nur über viele Schritte synthetisierbar. Dennoch sind einige Synthesevorschriften in der Literatur verfügbar [101, 103]. Zusammenfassend ist in Abb. 3.18 ein stereoselektiver Ansatz ausgehend von (±)-Norcamphor dargestellt. Über viele Umlagerungs-, Reduktions- und Oxidationsstufen wird das racemische Gemisch (±)-Zizaen erhalten.

3.4 SYNTHETISCHE BIOTECHNOLOGIE

Das Wissenschaftsgebiet synthetische Biologie (genauer Biotechnologie) ist noch relativ jung, so dass bereits eine eindeutige Begriffsdefinition schwer fällt. Die klassische Biologie betrachtet Lebewesen wie z. B. Mikroorganismen als natürlich gegebene Phänomene, die es zu beschreiben und zu verstehen gilt.

Die synthetische Biotechnologie definiert abweichend natürliche biochemische Prozesse und Moleküle als Werkzeuge/Rohmaterialien. Diese werden für neue und innovative Produktionssysteme auf geschickte Weise kombiniert und optimiert. Die Einsatzgebiete und Funktionen dieser (syntheti-

schen) biologischen Systeme können sich dabei von ihrer ursprünglichen (natürlichen) Funktionen sehr stark unterscheiden [104].

Alle Fortschritte auf dem Gebiet der synthetischen Biotechnologie fußen auf den Erkenntnissen der modernen Molekularbiologie und Genetik. Als zentrale Schlüsseltechnologien gelten die schnelle Sequenzierung ganzer Genome, sowie die chemische Synthese beliebiger DNA-Sequenzen [105]. Die synthetische Biotechnologie ist ein dynamisches und interdisziplinäres Fachgebiet, in das wissenschaftliche Erkenntnisse aus Biochemie, Molekularbiologie, Chemie, Analytik, (Bio-)Informatik und den Ingenieurwissenschaften mit einfließen [104].

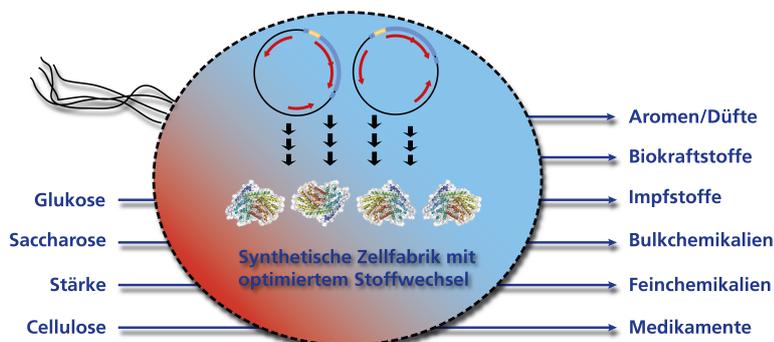


Abbildung 3.19 Anwendung von synthetischer Biotechnologie: Eine Zelle mit optimiertem Stoffwechsel (metabolic engineering) nimmt einfache Substrate auf und veredelt sie zu wertvollen Chemikalien wie Medikamenten oder Treibstoffen.

Ohne synthetische Biotechnologie wäre die Herstellung vieler moderner Medikamente oder Impfstoffe unbedenkbar. Sie ermöglicht zudem den nachhaltigen Zugang zu neuartigen Biokunststoffen und die Produktion von Treibstoffen sowie Spezialchemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen. Dafür werden künstliche Zellfabriken erzeugt und optimiert (Abb. 3.19), die Substrate wie Zucker aufnehmen und zu hochwertigen Produkten umsetzen können. Hierbei müssen ganze Stoffwechselwege gezielt optimiert oder sogar in andere Organismen übertragen werden. Dies bezeichnet man als metabolic/pathway engineering [106–108].

Die Beschreibung eines vollständigen, selbst-replizierenden Mikroorganismus im Jahr 2010, gilt als bahnbrechender Meilenstein in dem Fachgebiet [109]. Sie hat jedoch auch eine komplexe, ethische Fragestellung aufgeworfen, die zur Zeit kontrovers diskutiert wird [104].

Bezogen auf die Terpenproduktion über synthetische Biotechnologie existieren keine exakten Marktdaten. Der weltweite Gesamtumsatz für Produkte, hergestellt über synthetische Biotechnologie, wird für das Jahr 2018 auf 11,8 Mrd. US-Dollar geschätzt¹¹.

3.4.1 Methoden und Techniken der synthetischen Biotechnologie

Die erste Rekombination eines DNA Moleküls, das gezielte Ausschneiden und Neuverknüpfen zweier Sequenzen, markierte 1972 den Beginn der modernen Molekularbiologie [110]. Was jedoch die moderne synthetische Biotechnologie der letzten Jahre auszeichnet, ist die starke Automatisierung von Methoden (Next Generation Sequencing [111] und *de novo* Synthese von DNA [112]) sowie die Definition und Anwendung standardisierter, biologischer Bausteine wie BioBricks^{TM12} [113] oder der verwandten BglBricks [114, 115].

Die Standardisierung und Modularisierung von Genabschnitten, Promotoren, Proteindomänen oder regulierender Elemente ermöglicht den effizienten Austausch dieser Bauteile zwischen Wis-

¹¹ Market Report Synthetic Biology: Emerging Global Markets, bcc Research, Stand Juni 2014, <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/>

¹² The BioBricks Foundation, <http://bbf.openwetware.org>

senschaftlern [116, 117]. Zudem wird die Rekombination der einzelnen Elemente enorm vereinfacht und unterstützt [115]. Es wurde eine globale *Registry of Standard Biological Parts* ins Leben gerufen, die bereits fast 5.000 biologische Elemente beinhaltet¹³. Große DNA- und Protein-Datenbanken ermöglichen den Zugriff auf Millionen annotierte Sequenzen. Als größte und wichtigste Datenbank hat sich GenBank¹⁴ etabliert [118].

Moderne Assemblierungsmethoden ermöglichen die Sequenz-unabhängige und standardisierte Verknüpfung von DNA Sequenzen zu großen Plasmiden oder gar künstlichen Chromosomen. Dabei laufen die Klonierungsreaktionen meist in einem Schritt ab und benötigen keine Restriktionsendonukleasen zum Schneiden der DNA mehr. Somit entfallen auch die typischen Restriktionsschnittstellen, die teilweise unerwünschte und unnötige Sequenzüberhänge erzeugen [119].

Als zentrale Methoden haben sich je nach Anwendung SLIC [120], Gibson assembly [121], CPEC [122], SLiCE [123] sowie die proprietären Systeme GeneArt® Seamless cloning und In-Fusion® cloning etabliert. Das CRISPR/Cas9-System ermöglicht seit neuestem das hoch-spezifische Verändern von Organismen direkt auf Genomebene, in einer zuvor unerreichten Genauigkeit und Geschwindigkeit [124, 125].

SLIC

Beim *sequence and ligase independent cloning* [120] werden weder Restriktionsendonukleasen noch eine Ligase benötigt. Die DNA Fragmente werden über verlängerte PCR-Primer amplifiziert, so dass zu den benachbarten Sequenzen ein Überhang (Sequenzhomologie) von 25 Bp entsteht. Auch das Vektorrückgrat wird über die PCR-Methode linearisiert. Zu den einzelnen Fragmenten wird nun (in getrennten Ansätzen) die T₄-DNA-Polymerase ohne dNTPs gegeben. Da keine dNTPs zur Verfügung stehen, wirkt die Polymerase als 3'-Exonuklease und entfernt nun nach und nach Nukleotide von den Enden der Fragmente. Durch Zugabe von dCTP (ohne die anderen Nukleotide) wird der Verdau gestoppt, ohne dass die Lücken wieder aufgefüllt werden können. Die einzelnen Fragmente und der Vektor werden gemischt und lagern sich an den homologen, einzelsträngigen Überhängen an. Durch Transformation in *E. coli* werden durch die zellulären Reparaturmechanismen die Lücken gefüllt und die Stränge zu einem Konstrukt verbunden [120].

Gibson assembly

Eine, weiter entwickelte, auf SLIC basierende Methode ist das Gibson assembly [121]. Auch hier werden die Fragmente zunächst mit verlängerten PCR-Primern amplifiziert (mit Korrekturlese-Polymerase), um homologe Bereiche am Anfang und Ende der Sequenzen zu erzeugen. Der einzelsträngige Verdau erfolgt nun jedoch mit einer T₅-Exonuklease, bevor sich die überlappenden homologen Bereiche anlagern können. Eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion füllt kontinuierlich die Lücken auf, bis schließlich eine *Taq*-Ligase die Stränge endgültig verknüpft (Abb. 3.20) und das Konstrukt in kompetente Zellen transformiert werden kann.

Wichtig ist hierbei, dass die DNA-Polymerase eine höher Prozessivität besitzt als die Exonuklease. Die Exonuklease ist zudem thermolabil und denaturiert im Laufe der Zeit. Gegenüber SLIC besitzt Gibson assembly viele Vorteile. So wird die Reaktion bei konstanter Temperatur (50 °C) in einem einzigen Schritt durchgeführt. Zudem ist die Klonierungseffizienz durch die *Taq*-Ligase um einiges größer. Gibson assembly ermöglicht die Verknüpfung (Assemblierung) von mehr als 10 Fragmenten und erzeugt Konstrukte mit einer Länge von bis zu 300 kB [121]. Einzelne Fragmente müssen jedoch

¹³ <http://parts.igem.org/>, Massachusetts Institute of Technology

¹⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Seamless cloning und In-Fusion cloning

Auch die proprietären System GeneArt® Seamless cloning (Life Technologies, USA) und In-Fusion® cloning (Clontech, USA) ähneln SLIC/Gibson/CPEC/SLiCE, allerdings können hierbei kürzere homologe Bereiche für die Anlagerung verwendet werden (15 Bp anstatt 25+ Bp). Dies vereinfacht die PCR-Methode zur Erzeugung der Fragmente und erhöht deren molare Ausbeuten. Seamless cloning kann zudem, aufgrund der stark optimierten Enzyme, bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Bei In-Fusion cloning wird, exakt wie Gibson assembly, eine konstante Temperatur von 50 °C eingesetzt. Erwartet man keine stark ausgeprägten Sekundärstrukturen in den überlappenden Bereichen, so stellt insbesondere Seamless cloning eine effiziente Möglichkeit dar, in kurzer Zeit eine große Zahl korrekter Plasmidkonstrukte zu generieren¹⁵.

Genomeditierung mit CRISPR/Cas9

Moderne Techniken zur Genomeditierung (z. B. gene silencing) basieren auf variablen, DNA-bindenden Proteindomänen, die an eine spezifische Endonuklease geknüpft sind. Die Proteindomänen erkennen einen Sequenzabschnitt im Genom, während die gekoppelte Endonuklease gleichzeitig Doppelstrangbrüche in den Zielregionen einführt [124]. Etablierte Systeme basieren auf Zink-Finger Nukleasen (ZFNs) [126] und Transcription Activator-like Effector Nukleasen (TALENs) [127].

Das CRISPR-System (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) nutzt Cas9 (CRISPR associated protein 9) als Endonuklease. Die Erkennung der DNA erfolgt allerdings durch kleine RNAs über Watson-Crick Basenpaarung [125]. CRISPR/Cas9 ist den verwandten Techniken weit überlegen, da es einfacher anzupassen, schneller, spezifischer und effizienter ist. Es ermöglicht zudem die Editierung von mehreren Regionen im Genom in einem einzigen Schritt (multiplex) [124].

Eine guide RNA (gRNA) komplementär zu dem gewünschten Gen wird synthetisiert und in einen Vektor kloniert. Nach Transformation oder Transfektion in den Zielorganismus, bindet die gRNA die Abschnitte im Genom, wird von Cas9 erkannt und die Endonuklease zerschneidet die DNA. Durch zelluläre Reparaturmechanismen entstehen nun InDels (Insertionen/Deletionen), die das Gen ausschalten können. Wird jedoch gleichzeitig eine Reparaturvorlage mitgeliefert, so kann das Gen gezielt editiert oder sogar komplett gegen eine gewünschte Sequenz ausgetauscht werden [125].

CRISPR/Cas9 funktioniert in menschlichen Zellen, und kann zur gezielten Gentherapie eingesetzt werden [128, 129]. Auch die Expression therapeutischer Proteine in Säugetierzellen wie CHO (chinese hamster ovary) kann durch die Technik ermöglicht und optimiert werden [130]. Die benötigte Zeit zur Erzeugung transgener Tiere (z. B. Mäuse) wurde durch CRISPR von 2 Jahren auf aktuell wenige Wochen verkürzt [131].

3.4.2 Darstellung von Terpenoiden mit synthetischer Biotechnologie

Die meisten Monoterpene können, aufgrund ihrer eher einfachen Struktur, effizient und sehr kostengünstig chemisch produziert werden. Viele dieser Verfahren, wie z. B. zur Herstellung von (-)-Menthol [10] gelten schon länger als Produktionsmethode der Wahl¹⁶. Biotechnologische Verfahren

¹⁵ Informationen aus Handbüchern der Hersteller (GeneArt® Seamless cloning documentation und In-Fusion® Cloning Kit User Manual)

¹⁶ Menthol Background & Menthol Enantiomers - Organoleptic Properties. Leffingwell & Associates, <http://www.leffingwell.com>

werden sich in diesen Fällen nur durchsetzen können, wenn der Wunsch des Verbrauchers nach natürlichen Verbindungen weiter anhält.

Bei Sesqui- oder Diterpene liegt jedoch eine vollständig andere Ausgangssituation vor. Wie bereits an drei Beispielen gezeigt wurde (vgl. Abb. 3.14, Abb. 3.16, Abb. 3.18), lassen sich diese Terpenverbindungen nur äußerst schwer, und selbst dann nur in geringsten Mengen, organisch-chemisch synthetisieren.

Die pflanzlichen Extrakte sind primäre, wenn auch unzuverlässige, Quellen. Durch Klimakatastrophen, Ernteaufschläge, politische Unruhen in den Anbaugebieten oder schwierige Kultivierungsbedingungen schwanken das Angebot und damit die Marktpreise in letzter Zeit dramatisch [132]. Eine biotechnologische Herstellung dieser Aromaverbindungen, unter Anwendung der synthetischen Biotechnologie, ist daher ein erklärtes Ziel vieler produzierender Unternehmen und Forschungsinitiativen.

Tabelle 3.2 Firmenverzeichnis: biotechnologische Produktion von Sesquiterpenoiden

Name	Firmensitz	Patente	Produkte (patentiert, teilweise auf Markt)
Givaudan/Amyris	Schweiz/USA	85	Artemisinin, Isopren, Farnesen, Polyfarnesan, diverse Biokraftstoffe
Allylix	USA	10	Epi- β -Vetivon, Valencen (Zitrus), Nootkaton (Grapefruit), Ambroxan
Isobionics	Niederlande	5	Valencen, Nootkaton, β -Elemen
Evolva	Schweiz	70	Stevia, Agarwood-Aroma
Firmenich	Schweiz	16	(-)-Patchoulol (Clearwood), α -Selinen, Sclareol

Als große Vorreiter auf dem Gebiet der biotechnologischen Terpenproduktion gelten einige Start-Ups sowie der große Aromastoffkonzern Firmenich SA. Eine Übersicht der wichtigsten Produkte und Anzahl der Patente (nur auf Gebiet der Sesquiterpenoidherstellung) sind in Tab. 3.2 zusammenfassend dargestellt¹⁷.

Als Produktionsorganismen werden vor allem die etablierten Expressionssysteme *E. coli* [14, 133–136], *Saccharomyces cerevisiae* [15, 106, 137, 138] oder auch Pflanzenzellkulturen [4] herangezogen.

Zunächst müssen die entsprechenden Terpenzyklen (STPS oder DTPS) in der nativen Pflanze identifiziert und in dem gewünschten Wirtsorganismus löslich und vor allem aktiv exprimiert werden, was häufig bereits eine große Herausforderung darstellt [132, 139].

Die Konzentrationen der jeweiligen Isoprenoidvorläufer (FDP, GGDP) sind in den Wildtyp-Mirkoorganismen sehr niedrig, da diese meist nur eine Signalfunktion im Stoffwechsel ausüben. Es wurde und wird daher versucht, durch metabolic engineering den Isoprenoid-Stoffwechsel gezielt zu optimieren, um die Terpenprodukte in größeren Mengen biotechnologisch bereitstellen zu können [107, 132, 140, 141].

Eine vielversprechende und bisher sehr erfolgreiche Strategie ist die Expression eines heterologen Isoprenoidstoffwechsels in den jeweiligen Produktionsorganismus. In *S. cerevisiae* (besitzt nativ den MEV-Weg, vgl. 3.1) kann der DXP/MEP-Weg aus *E. coli* eingebracht werden [142]. Umgedreht ist es möglich, den MEV-Weg aus *S. cerevisiae* funktionell in *E. coli* (besitzt nur DXP/MEP-Weg) zu exprimieren [25]. Da die jeweiligen Produktionsorganismen dann beide Stoffwechselwege besitzen, ist der Pool an Isoprenoidvorläufern, der den Zyklen anschließend zur Verfügung steht, stark erhöht [141].

Für den MEV-Weg konnten die limitierenden Stoffflüsse (Flux) und weitere metabolische Engpässe teilweise identifiziert werden. Durch Variation der Promotoren und gezielte Codon-Optimierung der beteiligten Enzyme, wurden diese Flaschenhälse erfolgreich überwunden [134, 143]. Dies ermöglicht nun die Produktion z. B. von Amorpha-4,11-dien, einem direkten Vorläufer des Malaria-Wirkstoffs Artemisinin, in industriell relevanten Titern (über 20 g L⁻¹) [133, 143].

¹⁷ eigene Patentrecherche über Europäisches Patentamt, Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com/>), Stand: Ende 2014

Durch gezieltes protein engineering der Stoffwechsellzyme kann zudem der Flux präziser gesteuert und gelenkt werden. Das Diterpenoid Levopimaradien konnte so bereits in Konzentration von fast 1 g L^{-1} in *E. coli* produziert werden [144]. Auch die Herstellung von alternativen Treibstoffen wie dem Sesquiterpen Bisabolon (hydriertes Bisabolen) in *E. coli* ist seit kurzem in kommerziellen Maßstäben möglich, wobei jedoch noch hoher Optimierungsbedarf besteht [135].

Trotz der genannten Erfolge ist die effiziente Stoffwechselloptimierung, sowohl des MEV- als auch des DXP/MEP-Wegs noch immer sehr aufwändig und komplex. Viele Regulierungsmechanismen sind noch nicht vollständig verstanden. Zudem werden die angehäuften Intermediate häufig in andere Stoffflüsse eingeschleust. Verfahrenstechnische Herausforderungen sind zudem die Toxizität der Substrate und Produkte in höheren Konzentrationen. Außerdem treten gewisse Ausbeuteverluste durch die Flüchtigkeit der Terpene unter Kultivierungsbedingungen auf [20, 132, 145]. Eine ideale Downstream-Variante für Terpene ist noch nicht gefunden.

Zentrale Herausforderung wird jedoch in Zukunft die häufig benötigte Funktionalisierung des Terpenkohlenwasserstoffgerüsts, vor allem durch CYP450 Monooxygenasen, darstellen. CYP450 lassen sich nur sehr schwer löslich exprimieren. Zusätzlich müssen Hürden wie die effiziente Cofaktor-Regenerierung, überwunden werden.

Erste Lösungsansätze, die als Plattformtechnologien für weitere Verbindungen angesehen werden können, existieren bereits für Artemisininsäure und 8-Hydroxycadinen [146]. Auch die Terpenzyklen selber, die als Enzyme des sekundären Stoffwechsels häufig geringe Umsatzraten zeigen, können durch enzyme engineering und directed evolution [147] massiv in ihrer katalytischen Effizienz verbessert werden, um Produktausbeuten weiter zu maximieren [148, 149].

4.1 ORGANISCHE SYNTHESE DES ENZYMSUBSTRATS

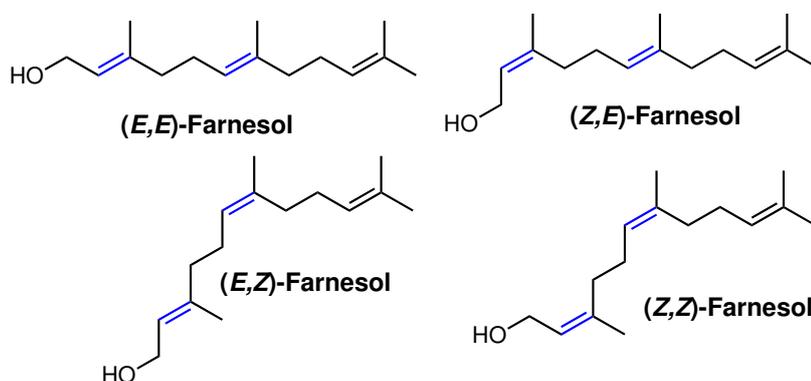


Abbildung 4.1 Die Ausgangsverbindung der untersuchten Syntheserouten für FDP: Der einfache Sesquiterpenalkohol Farnesol. Darstellung aller vier Doppelbindungsisomere. (*E,E*)-Farnesol in Natur und bei Synthese mit Abstand am häufigsten. (*Z,Z*)-Farnesol nur in Spuren vorhanden, da thermodynamisch eher ungünstig.

Zur biokatalytischen Darstellung der Sesquiterpene musste zunächst das universelle Substrat in größeren Mengen (g-Maßstab) bereitgestellt werden. Für einfache Enzymassays oder als analytischer Standard werden nur wenige mg FDP benötigt. Generell ist der Terpenvorläufer über diverse Feinchemikalienhersteller kommerziell verfügbar. Doch der hohe Preis im Bereich von 300–500 € pro mg, machte die Entwicklung einer effizienten und kostengünstigen Produktionsroute erforderlich. Dies galt insbesondere auch im Hinblick auf einen zukünftigen, biotechnologischen Prozess. Da der Anspruch bestand, eine nachhaltige und ressourcenschonende Herstellung der Zielverbindungen zu erreichen, wären nachwachsende Rohstoffe ideale Ausgangsverbindungen.

Für den Terpenvorläufer FDP wurden zuvor bereits organische Synthesen beschrieben, wobei die Syntheserouten nach Davisson [150] sowie nach Keller [151] die effizientesten Verfahren darstellen. Auch im Hinblick auf schnelle Umsetzbarkeit erschienen die genannten Routen als praktikabel.

Im Gegensatz zur Biosynthese der Terpene wird hierbei nicht ausgehend von Isoprenen das Kohlenstoffgrundgerüst sukzessive aufgebaut. Zwar ist die kontrollierte Kettenverlängerung vom C₅-Isopren hin zum C₁₅-Farnesyl chemisch z. B. durch Palladium-katalysierte Kreuzkupplungen (C-C Kupplungen) prinzipiell durchführbar, aber keineswegs praktikabel in größeren Maßstäben. Desweiteren gilt Isopren als hoch toxisch sowie karzinogen, und ist daher kompliziert in der Handhabung [152].

Die hier getesteten Verfahren gehen von Farnesol (Abb. 4.1), dem einfachsten Sesquiterpenalkohol, aus. Es existieren bereits einige Ansätze zur biotechnologischen Herstellung von Farnesol in verschiedenen Mikroorganismen [153]. Primäre Quelle sind jedoch die essentiellen Öle von Pflanzen. Vor allem in Rosenöl, Jasminöl, Zitronengras aber auch Orangenöl [154] ist der Terpenalkohol in höheren Konzentrationen enthalten.

Zusätzlich wird Farnesol synthetisch, über eine Isomerisierung des günstigeren und besser verfügbaren Nerolidols, gewonnen. Bei dieser Synthese wird jedoch ein Isomerengemisch aus allen vier möglichen Stereoisomeren des Farnesols erhalten ((*E,E*)-, (*E,Z*)-, (*Z,E*)-, und (*Z,Z*)-Farnesol),

wobei in der Natur die thermodynamisch stabilste (*E,E*)-Verbindung mit Abstand am häufigsten vorkommt. Farnesol selbst riecht blumig-frisch und wird häufig in Kosmetikprodukten wie z. B. in Seifen eingesetzt, da es eine gewisse antimikrobielle Wirkung zeigt [154].

Die Syntheserouten von (*E,E*)-FDP, ausgehend von natürlichem (*E,E*)-Farnesol werden im Folgenden verglichen.

4.1.1 Vergleich der Syntheserouten für FDP

Die Synthese nach Methode 1 [150] umfasst drei Stufen. Prinzipiell wird die Hydroxygruppe des Farnesols durch Diphosphat substituiert. Die allylische Position muss zunächst durch eine Chlorierung aktiviert werden, bevor sie durch das Diphosphat nukleophil angegriffen werden kann. Für die Bereitstellung einer ausreichenden Reaktivität, wird zunächst das Salz Tris(tetra-*n*-butylammonium)hydrogendiphosphat (TBAHP) benötigt. Eine detaillierte Synthesevorschrift kann im Anhang nachvollzogen werden (vgl. B.1.3).

Eine Lösung Dinatriumdihydrogendiphosphat wurde auf eine Säule mit dem Kationenaustauscher Dowex AG 50WX8 (H^+ -Form) aufgebracht und mit H_2O eluiert (Abb. 4.2, oben). Die Natriumionen wurden am Ionenaustauscher durch Protonen ersetzt, wobei für einen vollständigen Austausch eine niedrige Elutionsgeschwindigkeit wichtig war. Ein niedriger pH (pH 1) deutete auf einen vollständigen Austausch hin.

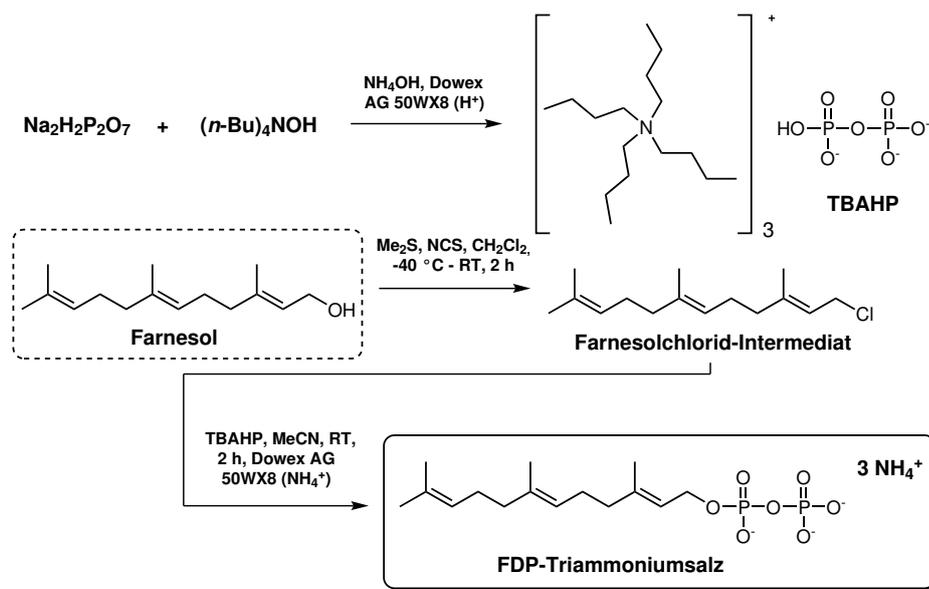


Abbildung 4.2 Syntheseroute von FDP nach Methode 1

Es entstand eine sehr instabile Diphosphorsäure. Das sehr saure Eluat (pH 1,29) wurde mit Tetrabutylammoniumhydroxid vollständig neutralisiert (pH 7,3). Nach Gefriertrocknung wurde eine farblose Feststoff erhalten. Die Identität und Reinheit des Salzes wurde durch 1H -NMR und ^{13}C -NMR Analysen erfolgreich nachgewiesen (Abb. 4.3).

Das 1H -Spektrum zeigt eindeutig die vier möglichen Protonenspezies am Tetrabutylammonium-Ion. Dabei sinkt der Wert der chemischen Verschiebung δ , je weiter sich die koppelnden Protonen vom zentralen Stickstoff entfernen (Gruppen 1–4, rot markiert). Auch im ^{13}C -Spektrum sind die vier koppelnden Kohlenstoffkerne eindeutig identifizierbar.

Nachdem das Salz in Reinform vorlag, wurde (*E,E*)-Farnesol zunächst mit *N*-Chlorsuccinimid (NCS) in das (allylische) Chlorid überführt. NCS wurde dazu in Dichlormethan gelöst und auf

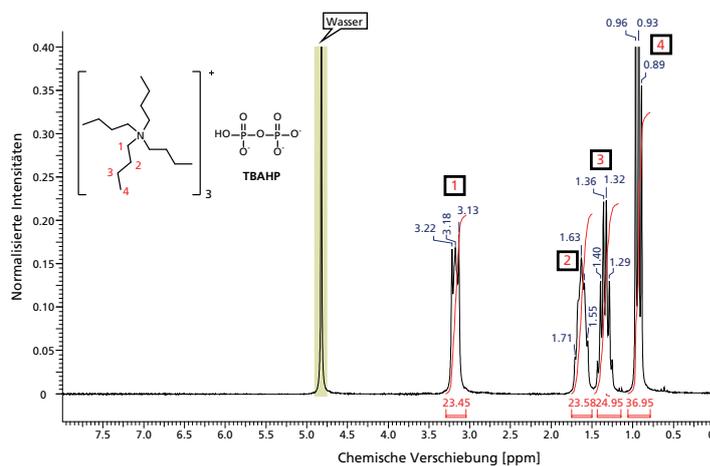
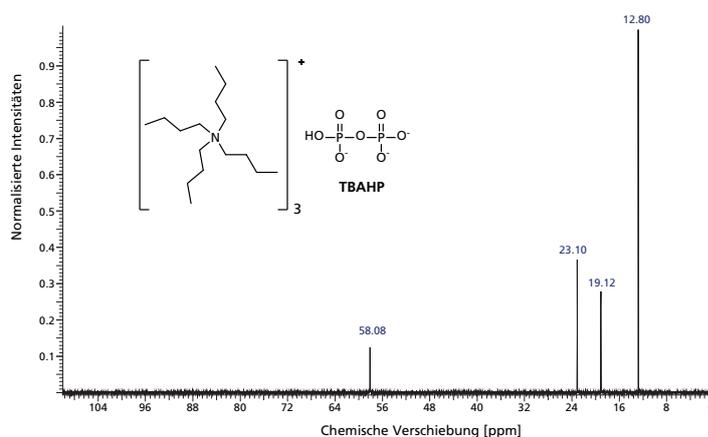
(a) ^1H -NMR Spektrum von TBAHP(b) ^{13}C -NMR Spektrum von TBAHP

Abbildung 4.3 (a) ^1H -NMR und (b) ^{13}C -NMR des Salzes TBAHP. Jeweils 10 mg Probe, gelöst in ND_4OD (25 %ig). Spektren stimmen mit der Struktur des erwarteten Moleküls und Literaturdaten überein.

-40°C abgekühlt. Nach Zugabe von Farnesol wurde langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt, die Lösung extrahiert, getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Als Rückstand verblieb Farnesylchlorid als gelbliches Öl. Da keine zusätzliche, säulenchromatographische Aufreinigung der Zwischenstufe erfolgte, lag Farnesylchlorid als Mischung mit noch nicht umgesetztem Farnesol vor (lt. ^1H -NMR, Spektrum nicht gezeigt).

Da die leichte Verunreinigung für die Folgereaktion als nicht störend erachtet wurde, konnte direkt im nächsten Schritt das Farnesylchlorid durch das, zuvor bereitgestellt, TBAHP aktiviert werden. Die Reaktion lief über 2 h bei Raumtemperatur ab. Nach Entfernen des Lösungsmittels Acetonitril bei niedrigen Temperaturen, verblieb ein farbloser Rückstand. Bei dem erhaltenen Produkt handelte es sich bereits um FDP, allerdings mit Tetrabutylammonium als Gegenion (von TBAHP). Dieses sperrige und große Gegenion erhöht während der Reaktion die Reaktivität des Diphosphats, was die nukleophile Substitution mit dem Chlorid erleichtert.

In einem folgenden Aufarbeitungsschritt wurde das Tetrabutylammonium-Ion nun durch das viel kleinere Ammonium-Ion ersetzt, um so FDP zu stabilisieren und in ein lagerfähiges Salz zu überführen. Dazu musste wiederum das Ionenaustarharz Dowex AG 50WX8 eingesetzt werden, diesmal jedoch nicht in seiner H^+ -, sondern in der NH_4^+ -Form (vgl. B.1.1).

FDP wurde auf eine gepackte Säule aufgebracht und mit Ammoniak langsam eluiert, um auch hier einen vollständigen Ionenaustausch zu gewährleisten. Nach Lyophilisation wurde ein farbloser,

hygroskopischer Feststoff erhalten, der abschließend aus Methanol umkristallisiert wurde. Das Salz konnte durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie eindeutig als FDP identifiziert werden (Abb. 4.4).

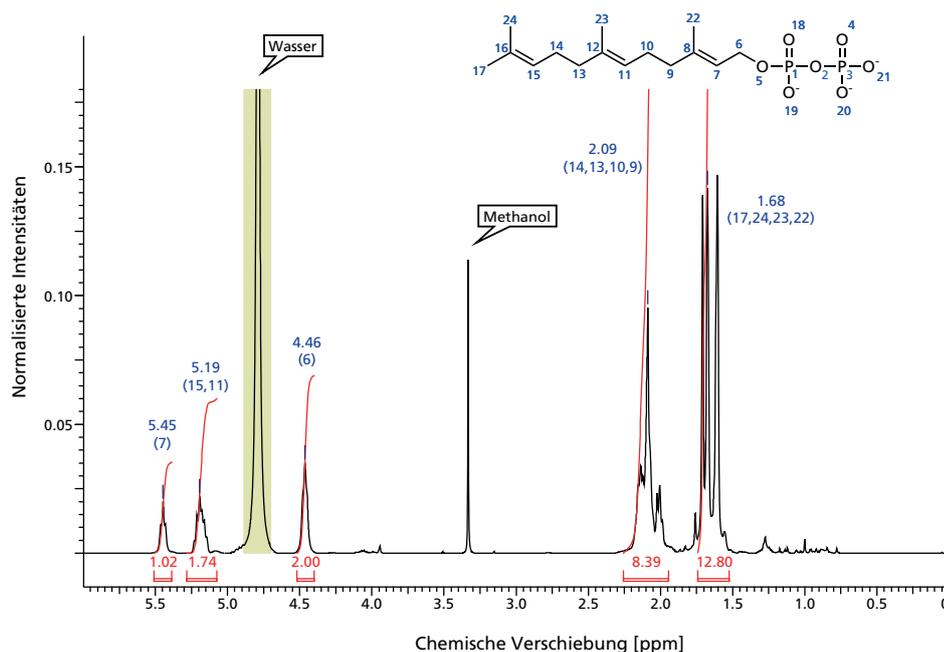


Abbildung 4.4 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 10 mg Probe, gelöst in ND_4OD (25%ig). Die Synthese erfolgte nach Methode 1 (Davisson et al.).

Zunächst fällt der große Wasserpeak (gelb markiert) auf. FDP ist ein sehr hygroskopisches Salz, wodurch der Eintrag von Wasser nur schwer vermeidbar ist. Zudem war das verwendete Lösungsmittel nicht absolut frei von H_2O . Ein deutliches Signal für Methanol ist erkennbar, bei dem es sich um Reste aus der vorhergehenden Umkristallisation handelte. Die Protonen teilen sich in 5 Peakgruppen auf, die anhand der chemischen Verschiebung, der Aufspaltung in Multipletts, sowie dem Peakintegral (Anzahl der koppelnden Protonen einer Spezies, rot markiert in Abb.4.4) eindeutig der erwarteten Struktur des Moleküls zugeordnet werden konnten.

Peakgruppe	Atom-Nr.	Spezies	Anzahl Protonen
1	7	CH	1
2	11,15	CH Nähe Doppelbindung	2
3	6	CH_2 Nähe Sauerstoff	2
4	9,10,13,14	CH_2	8
5	22,23,24,17	CH_3	12

Besonders hervorzuheben ist hierbei das einzelne Proton an Position 6, welches sich in direkter Nachbarschaft zu der stark negativ geladenen Kopfgruppe befindet. Es ermöglicht die direkte Unterscheidung von FDP und dem Monophosphat (FMP) sowie dem Farnesylchlorid. Je elektronegativer die benachbarte Kopfgruppe ist, desto höher ist die chemische Verschiebung. Die Verschiebung von $\delta = 4,46$ ppm bestätigte somit zusätzlich die Identität des FDP. FMP würde eine Verschiebung von $\delta \sim 4,35$ ppm aufweisen.

Da FDP in Lösung am stabilsten lagerfähig ist, wurde der Feststoff in wässrigem $25 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer gelöst und bei -80°C gelagert.

Die Synthese nach Methode 2 [151] wählt einen von Grund auf verschiedene Herangehensweise. Farnesol wird direkt phosphoryliert, wobei neben dem gewünschten Diphosphat auch im gleichen Verhältnis Mono- und Triphosphatester entstehen. Desweiteren werden noch instabilere Tetra- und

Polyphosphate in geringeren Mengen gebildet. Die theoretische Ausbeute an FDP ist somit niedriger als bei Methode 1. Laut Literatur wurden Ausbeuten von maximal 30 % erzielt [151].

Ein Vorteil von Methode 2 ist die sehr zügig durchführbare Ein-Gefäß-Synthese (30 min), an die jedoch im Anschluss eine Aufreinigung der Phosphatspezies über Silica-Säulen gekoppelt ist. Eine detaillierte Synthesevorschrift kann im Anhang nachvollzogen werden (vgl. B.1.4).

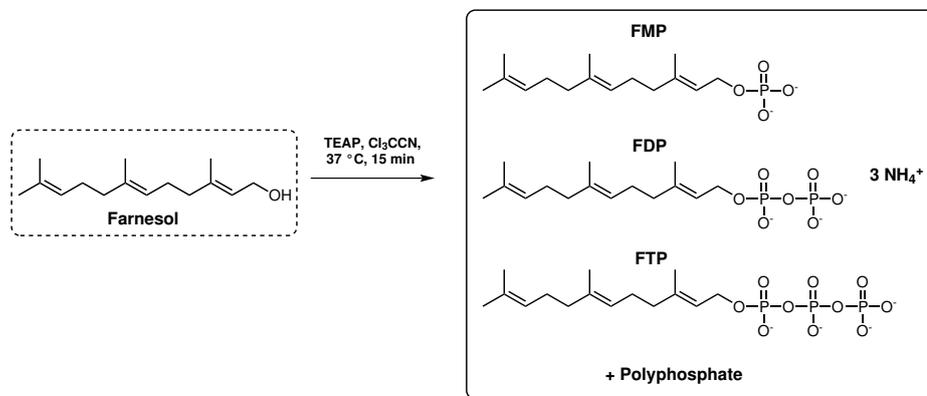


Abbildung 4.5 Syntheseroute von FDP nach Methode 2

Nachdem Farnesol in Trichloracetonitril gelöst war, wurde bei 37 °C unter starkem Rühren, portionsweise Triethylammoniumphosphat (TEAP) hinzugegeben (Abb. 4.5). Die Lösung war zunächst gelblich, wurde durch die Zugabe jedoch stetig bräunlicher. Die Reaktionslösung wurde nach 5 min auf eine zuvor gepackte Silica-Säule (Kieselgel 60, Korngröße 40–63 µm, mittlerer Porendurchmesser 6 nm) gleichmäßig aufgebracht. Die Auftrennung erfolgte mit einem Gemisch Isopropanol/30 % NH₄OH/H₂O 6:3:1 als mobile Phase.

Das im Laufmittel enthaltene Ammoniak erfüllte hier zwei Aufgaben. Zum einen wirkt Kieselgel als Säure und würde ohne Neutralisation die säurelabilen Isoprenoidphosphate zerstören. Zum anderen maskieren Ammonium-Kationen die negativen Ladungen an den endständigen Sauerstoffatomen. Ohne NH₄OH in der mobilen Phasen wären die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Phosphaten und der Silica-Matrix zu stark und es könnte keine Auftrennung der Phosphatspezies erfolgen.

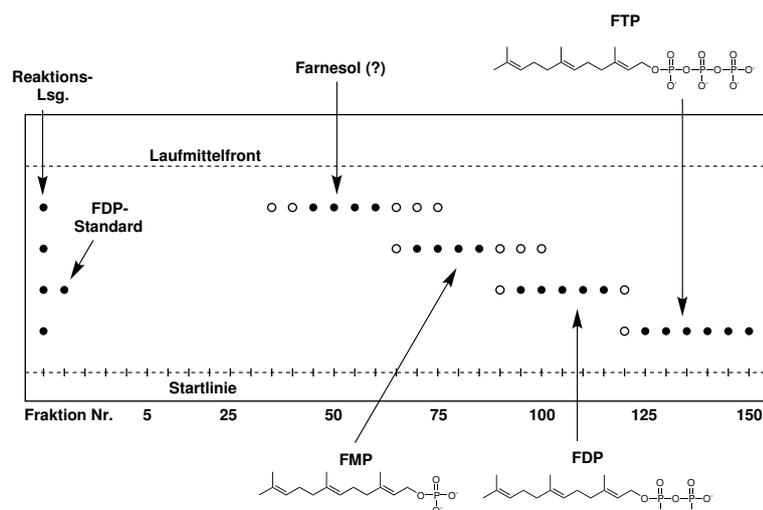


Abbildung 4.6 Dünnschichtchromatographie der gesammelten Fraktionen (nach Säulenchromatographie, Methode 2). Als Laufmittel wurde Isopropanol/30 % NH₄OH/H₂O 6:3:0,5 verwendet. DC-Platte mit Anisaldehyd-Färbereagenz entwickelt.

Nach Durchfluss der braun gefärbten Reaktionsschlacke wurden kontinuierlich Proben in 150 Einzelfraktionen aufgefangen.

Wenige mL von jeweils fünf Fraktionen wurden vereint, auf eine DC-Platte aufgetragen, in einer DC-Kammer aufgetrennt und nach einem Tauchbad in Anisaldehyd-Färbereagenz mit einem Heißluftfön entwickelt. Ein spezifisches Färbereagenz zur Detektion terpenoide Verbindungen über DC ist nicht bekannt. Anisaldehyd dient zum qualitativen Nachweis unterschiedlichster Naturstoffe wie z. B. Phenolen, Steroiden oder auch Terpenen in essentiellen Ölen. Das Aldehyd reagiert bevorzugt mit Doppelbindungen oder nukleophilen, funktionellen Gruppen unter Ausbildung von chromophoren Verbindungen. Der exakte Reaktionsmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt [155, 156].

Eine Skizze der entwickelten Platte ist in Abb. 4.6 dargestellt, da die schwach violette Färbung auf dem magentafarbenem Hintergrund schwer erkennbar war. In der Reaktionsrohrlösung vor chromatographischer Aufarbeitung sind insgesamt vier Komponenten erkennbar (ganz links). Ein authentischer FDP-Standard wies den gleichen Retentionsfaktor (R_f) wie die zweite Komponente (von unten) auf.

In den ersten 30 Fraktionen ist keine terpenoide Verbindung detektierbar. Ab Fraktion 35 sind zunächst schwache, später stärker angefärbte Spots erkennbar. Dies war möglicherweise nicht vollständig umgesetztes Farnesol. Aufgrund des R_f -Werts im Vergleich zum authentischen Standard kann FDP den Fraktionen 95–115 zugeordnet werden. Der Retentionsfaktor des Diphosphats liegt somit zwischen dem des Monophosphats und des Triphosphats, da die Auftrennung im Kieselgel auf Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Kopfgruppen beruht. Das am stärksten negativ geladene Farnesyltriphosphat legte somit die kürzeste Laufstrecke auf der Silica-Matrix zurück (Abb. 4.6).

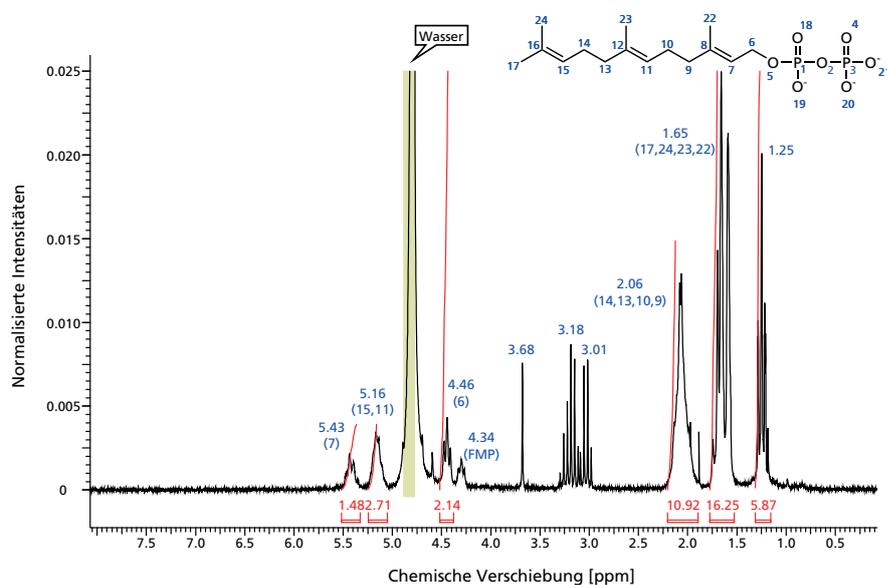


Abbildung 4.7 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 10 mg Probe, gelöst in ND_4OD (25%ig). Die Synthese erfolgte nach Methode 2 (Keller et al.).

Nach Vereinigung der (lt. DC) FDP-enthaltenden Fraktionen, wurden 20 mL Lösung in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und der Feststoff mittels $^1\text{H-NMR}$ vermessen (Abb. 4.7). Analog zum Spektrum bei Synthese nach Methode 1 (vgl. Abb. 4.4), konnte auch hier eindeutig die Bildung des Produkts FDP nachgewiesen werden. Die Kopplungssignale entsprechen in ihren chemischen Verschiebungen und den Peakintegralen (Anzahl der H-Atome), der erwarteten Struktur.

Auffällig sind hierbei jedoch die Signale bei einer Verschiebung von 4.34 ppm. Diese Signale entsprechen der CH₂ Gruppe an Position 6, allerdings von Farnesylmonophosphat. Durch die niedrigere Elektronegativität der Kopfgruppe ist auch die chemische Verschiebung an dieser Position geringer. Das Spektrum beweist so, dass das FDP in der Probe noch eine gewisse Verunreinigung mit FMP aufweist. Die Signale bei 3.18, 3.01 und 1.25 ppm konnten weder FMP noch FDP zugeordnet werden und waren somit weitere Verunreinigungen.

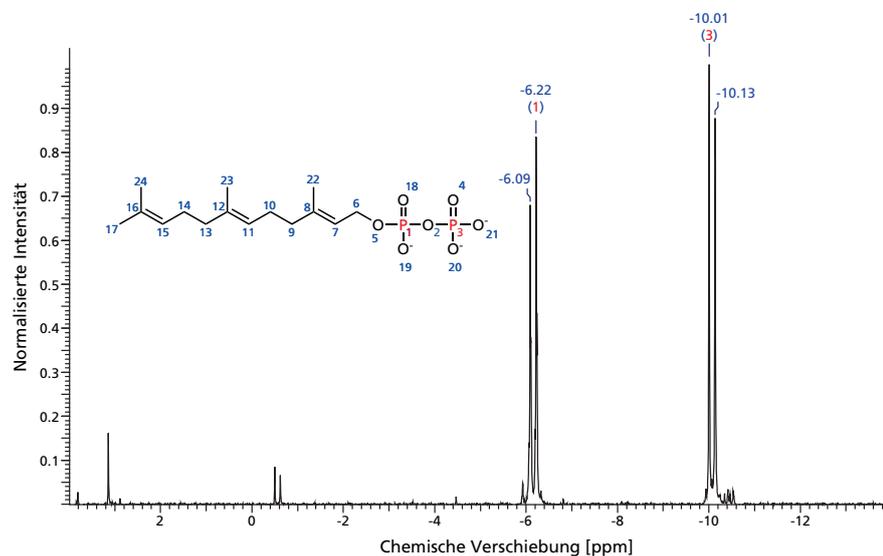


Abbildung 4.8 ³¹P-NMR Spektrum von 10 mg Probe, gelöst in ND₄OD (25 %ig). Die Synthese erfolgte nach Methode 2 (Keller et al.).

Zur weiteren Absicherung wurde durch eine modifizierte NMR-Methode ein ³¹P-NMR Spektrum vermessen (Abb. 4.8). Die Dupletts bei –6,22 ppm und –10,01 ppm belegen eindeutig das Vorhandensein von zwei Phosphoratomen im Molekül. Die Aufspaltung in Dupletts beweist die direkte chemische Nachbarschaft und chemische Kopplung der Phosphorkerne, womit es sich daher um das Diphosphat im Molekül handeln muss.

4.1.2 Entwicklung einer Analytik für Terpenintermediate

Zur Quantifizierung von FDP musste zunächst eine robuste HPLC-Analytik etabliert werden. Im Gegensatz zu seinen Zyklisierungsprodukten, ist das Edukt nicht GC-gängig, weshalb eine Auftrennung über Flüssigchromatographie in Frage kam. Es wurden bereits einige analytische Methoden für die Substanzklasse der Isoprenoide bzw. für Terpenvorläufer beschrieben, die auf HPLC oder HPLC-MS aufbauen [157–159].

Diese Verfahren dienen jedoch in den meisten Fällen dem Nachweis von Spurenkonzentrationen an FDP z. B. in Blutplasmaproben [158] oder im Cytosol einzelner Zellen [159]. Es werden sehr aufwändige und unverhältnismäßig teure Derivatisierungen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder radioaktiven Sonden eingesetzt [160]. Diese erlauben die Quantifizierung bis in den unteren pmol L⁻¹-Bereich, wurden hier jedoch als nicht zielführend erachtet.

Eine stufenlose RP-HPLC-Methode (reversed phase) bei Verwendung einer C₁₈-Säule und MeOH/25 mmol L⁻¹ NH₄HCO₃ 8:2 als mobilen Phase [161] konnte nicht erfolgreich reproduziert werden. Daher wurde eine ähnliche Trennmethode basierend auf [162] und [163] zusammengestellt und optimiert. Hierbei wurde abweichend keine C₈, sondern eine C₁₈-Säule XTerra MS (125 Å Porengröße; 3,5 µm Partikeldurchmesser; 3 mm × 50 mm) der Firma Waters (USA) eingesetzt.

Ein optimiertes Gradientenprogramm (vgl. Anhang B.1.8) mit Acetonitril/H₂O (80%/20%) und 20 mmol L⁻¹ NH₄HCO₃-Puffer als Eluenten lieferte bei einer Flussrate von 2 mL min⁻¹ dabei die besten Trennresultate. Die hohe Flussrate bei Verwendung einer extrem kurzen RP-HPLC Säule, ermöglichte sehr kurze Analysenzeiten von unter 20 min pro Lauf. Da die Phosphatspezies bereits bei Raumtemperatur leichte Zersetzung aufwies, wurde die Säulentemperatur minimiert. Eine Ofentemperatur von konstant 25 °C lieferte den besten Kompromiss aus Trennleistung und Probenstabilität.

Die Detektion erfolgte über einen Diodenarray-Detektor bei 214 nm, wobei hier relativ unspezifisch die π -Elektronensysteme (der Doppelbindungen) nachgewiesen werden. Dieses Detektionsverfahren machte eine aufwändige Derivatisierung unnötig.

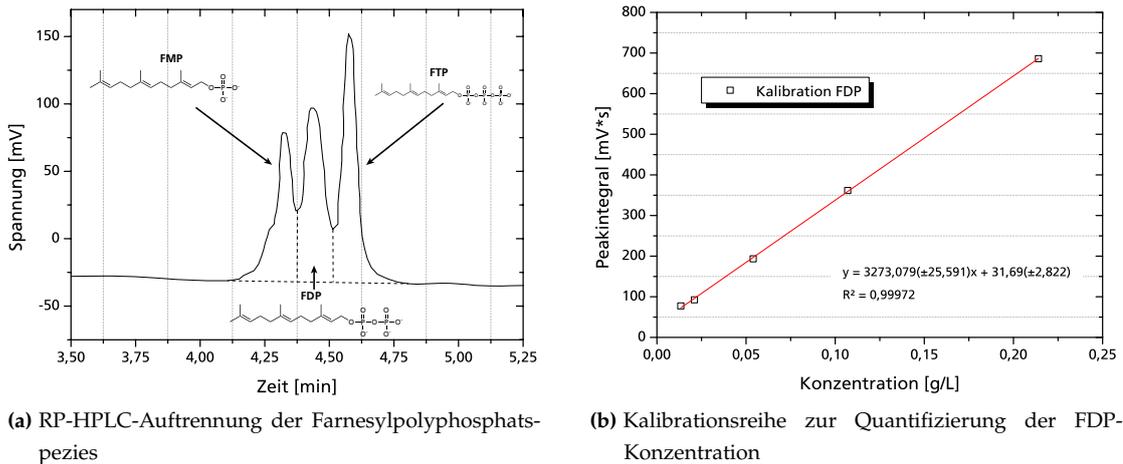


Abbildung 4.9 (a) HPLC-Analytik von Farnesylpolyphosphatspezies mit hier etablierter und optimierter Methode. Synthese erfolgte nach Methode 2. (b) Kalibrationsgerade von FDP über authentischen Standard (Stammlsg. 1 g L⁻¹).

Beispielhaft ist in Abb. 4.9 ein HPLC-Chromatogramm einer nach Methode 2 synthetisierten Produktmischung dargestellt. Deutlich sind die drei erwarteten Produktpeaks erkennbar. Die Retentionszeit von FDP (ca. 4,45 min) wurde durch Vergleich mit dem authentischen Standard bestätigt. Eine Basislinientrennung der drei Phosphatspezies konnte trotz Methodenoptimierung nicht erzielt werden. Die chemische Ähnlichkeit der Produkte erschwerte die Auftrennung. Selbst durch Variation und Verlängerung des Gradienten sowie Anpassung von Säulentemperatur und Flussrate, konnte keine nennenswert bessere Trennungen erzielt werden.

Für den Nachweis und eine näherungsweise Quantifizierung des Enzymsubstrats, wurde die hier optimierte Methode zunächst als ausreichend erachtet. Die Kalibration mit authentischem Standard von FDP (Stammlsg. 1 g L⁻¹) erfolgte im linearen Konzentrationsbereich von 0,013–0,214 g L⁻¹ (Abb. 4.9).

Als mögliche photometrische Quantifizierungsmethode sollte das Prinzip des Anisaldehyd-Sprühassays von der Dünnschichtchromatographie, auf in Lösung befindliche Terpenintermediate übertragen werden. Da zunächst FDP nur in limitierten Mengen verfügbar war, wurde das Edukt Farnesol als Modellanalyt verwendet. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit und übereinstimmenden Anzahl an Doppelbindungen (mit denen Anisaldehyd reagiert), wurde von einer Übertragbarkeit auf FDP ausgegangen.

Nach Zugabe des Anisaldehyd-Reagenzes zur Probe, wurden diese für 2 min bei 100 °C inkubiert. Eine Anfärbung entsprechend der Konzentration kann bereits mit bloßem Augen nachvollzogen werden (Abb. 4.10a). Ein linearer Bereich zwischen 0,11–22,2 g L⁻¹ (entspricht 0,5–100 mmol L⁻¹) konnte durch Vermessen der Adsorption bei 534 nm aufgezeigt werden (Abb. 4.10b).

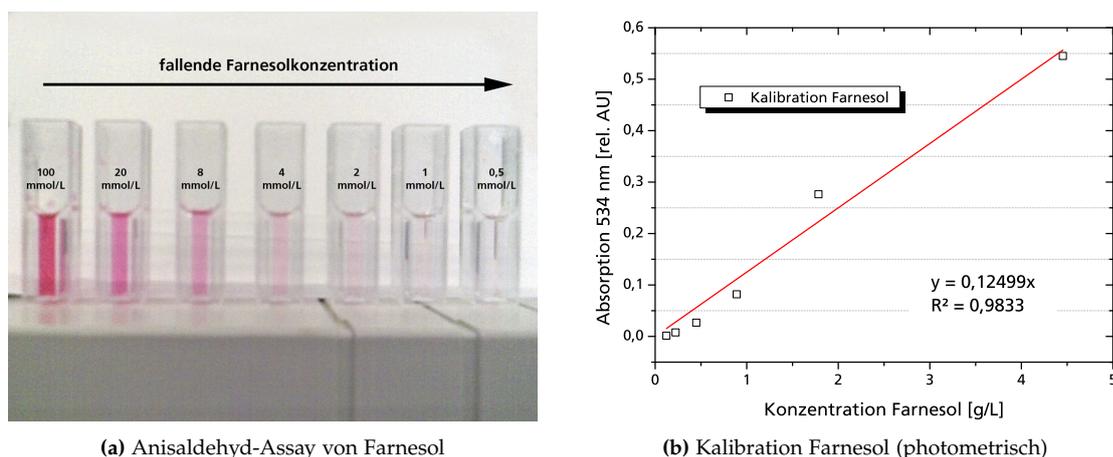


Abbildung 4.10 (a) Mit Anisaldehyd behandelte Farnesol-Verdünnungsreihe. Die farbliche Intensität der Magentafärbung nimmt mit steigenden Konzentrationen zu. (b) Die bei 534 nm im Photometer vermessene Kalibrationsgerade.

Diese photometrische Quantifizierungsmethode wurde für eine erste grobe Konzentrationsabschätzung herangezogen, da die Messung innerhalb weniger Sekunden Messergebnisse lieferte. Im Hinblick auf ein Scale-up von Synthesemethode 2 war das Assay jedoch zur Quantifizierung ungeeignet. Es ermöglichte keine Differenzierung der unterschiedlichen Phosphatspezies, so dass die Konzentration an FDP nicht präzise bestimmt werden konnte.

Für die weitere Isoprenoidanalytik wurde stets auf die hier etablierte HPLC-Methode zurückgegriffen.

4.1.3 Scale-up der Synthesereaktion

Nach Vergleich der Synthesemethoden für FDP (vgl. 4.1.1) erwies sich die Methode 2 (Keller et al.) als geeigneter für eine Maßstabsübertragung. Vor allem sollte die Ein-Gefäß-Synthese (one-pot synthesis) einfacher skalierbar sein, da die Bereitstellung der Vorstufe (Methode 1) entfällt. Als limitierende Faktor in der praktischen Umsetzung wurde allerdings die säulenchromatographische Auftrennung der Phosphatspezies angesehen.

Da in den meisten Fällen FDP nur in Spuren als Standardverbindung benötigt wird, sind in der Literatur lediglich Synthesen in kleinen Maßstäben beschrieben (ausgehend von Edukt im μL -Bereich). Die Ausgangsmengen wurden daher signifikant erhöht (mehrere mL) und die Volumina der Lösungsmittel und Reaktanden entsprechend aufskaliert.

Es musste beachtet werden, dass selbst bei einer kleinen Maßstabsvergrößerung chemischer Reaktionen, diese möglicherweise komplett anders ablaufen können. Aufgrund veränderter Wärmezufuhr und -abfuhr, veränderter Mischzeiten oder auch Verunreinigungen der Edukte können die Ausbeuten im Vergleich deutlich sinken [164]. Ausgehend von 2 mL Farnesol wurde die Synthese, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Abweichend verlief die Reaktion bei Zugabe von TEAP exotherm, und musste gekühlt werden, um einen Anstieg der Temperatur über $50\text{ }^\circ\text{C}$ zu vermeiden. Als Endprodukt vor Aufarbeitung verblieb eine tiefbraune Lösung.

Um die Trennleistung der Chromatographie zu erhöhen, wurde Kieselgel 60 mit einer noch feineren Korngröße (20–45 μm) verwendet. Als Säule wurde eine extra breite Spezialanfertigung (Dimension = 54 cm \times 8 cm) eingesetzt, die aufgrund der Höhe nicht mehr in einem Abzug betrieben werden konnte.

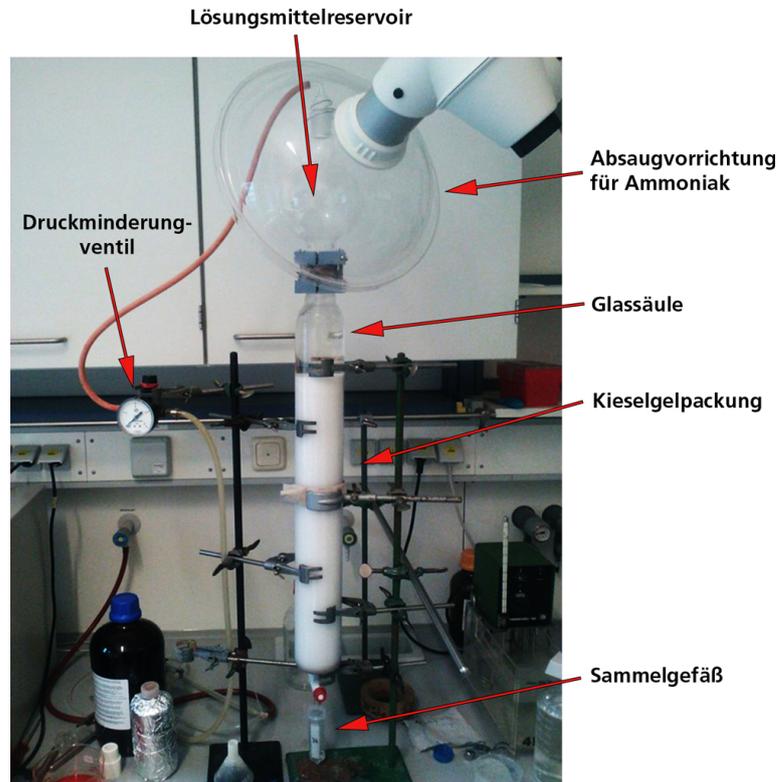


Abbildung 4.11 Aufbau der Chromatographiesäule zum scale-up der FDP-Synthese

Um eine konstante Flussrate ohne gefährliche Druckspitzen zu erhalten, wurde der Säulenkopf über ein Druckminderungsventil an die Gebäudeversorgung angeschlossen werden. Das 4 L fassende Lösungsmittelreservoir wurde mit einer eigens angefertigten Polymerklammer mit der Säule verbunden. Der gesamte Aufbau der Chromatographieapparatur kann in Abb. 4.11 nachvollzogen werden. Vor den Trennungsläufen wurde die Säule mit aufgeschwämmtem Kieselgel möglichst dicht gepackt.

Die Auftrennung erfolgte jeweils bei einem konstanten Fluss von 10 mL, es wurden 80 Fraktionen mit je 40 mL aufgefangen. Die ersten 1,5 L des Eluats wurden verworfen, da in den Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass sie kein nennenswerten Konzentrationen an FDP enthielten.

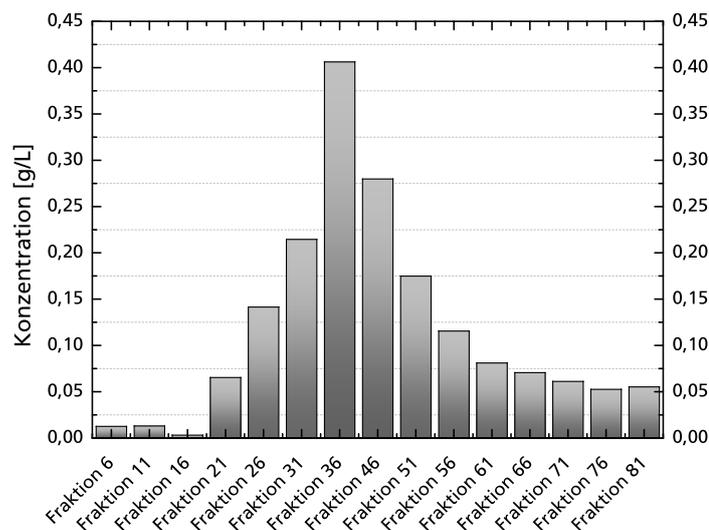


Abbildung 4.12 Analyse der beim scale-up gesammelten Fraktionen mittels HPLC

Die FDP-Konzentrationen in den Fraktionen wurden über HPLC quantifiziert. Die Ergebnisse (Abb. 4.12) zeigen deutlich eine Konzentrationsspitze von FDP in den Fraktionen 31–46. Auch die FMP und FTP Konzentration in diesen Fraktionen war minimal. Allerdings ist erkennbar, dass die FDP Konzentration selbst in den späteren Fraktionen nicht wieder auf 0 g L^{-1} abfällt. Es lag also eine gewisse Diffusion (und somit Peakverbreiterung), bedingt durch die manuell gepackte Säule sowie die relativ langsame Flussrate, vor.

Anhand der gemessenen Konzentrationen wurde eine Reaktionsausbeute von näherungsweise 460 mg FDP (entspricht einer Ausbeute von 15 % bezogen auf Farnesol als Edukt) bestimmt. Bei einem Verkaufspreis von 330 € netto pro mg (Sigma-Aldrich, USA; Preisanfrage Dezember 2014) entspricht dies einem Marktwert von (hypothetischen) 152.000 €.

4.1.4 Zusammenfassung Substratsynthese FDP

Die Synthesemethoden nach Davisson et al. [150] (hier Methode 1 genannt) wurde bezogen auf Durchführung, Produktreinheit und möglich Skalierbarkeit mit der Methode nach Keller et al. [151] (hier Methode 2) verglichen. Hierbei wurde deutlich, dass Methode 1 generell aufwändiger und komplexer in der praktischen Durchführung ist. Grund dafür ist der dreistufige Prozess mit langwierigen Gefriertrocknungsschritten der Reaktionsintermediate. Zudem zeigte das Produkt in HPLC-Analysen starke Verunreinigungen mit unbekanntem Nebenprodukten.

Methode 2 kann als einfache, polytrope Reaktion in einem Rührkesselreaktor (Rundkolben) verstanden werden. Obwohl die eigentliche Phosphorylierung sehr schnell abläuft, ist die anschließende säulenchromatographische Aufarbeitung zur Trennung der drei möglichen Phosphatspezies, zeitaufwändiger. Aufgrund der hohen Produktreinheit wurde diese Methode als Kandidat für eine Maßstabsübertragung ausgewählt.

Die erfolgreiche Darstellung des Zielprodukts FDP wurde anhand der Auswertung von ^1H - und ^{31}P -NMR Spektren gezeigt. Zur qualitativen Produktanalytik im Verlauf der Reaktion wurde Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Eine robuste HPLC-Methode zur Quantifizierung von FDP konnte erfolgreich etabliert werden.

Nach Maßstabsübertragung (mit vergrößerter Chromatographieapparatur) ermöglicht der hier etablierte Syntheseprozess die Bereitstellung größerer Mengen des Enzymsubstrats FDP, und zwar von $\sim 0,5\text{ g}$ pro Ansatz. Die kurze Synthese, ausgehend vom nachwachsenden Rohstoff Farnesol, war der erste Schritt auf dem Weg zur biokatalytischen Darstellung der Sesquiterpenverbindungen. Die weiteren Arbeiten setzten sich nun mit der Bereitstellung der einzelnen Biokatalysatoren auseinander.

4.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN PATCHOULOLSYNTHASE

4.2.1 Identifikation des Patchoulolsynthase-Isoenzym

Der Patchouli-Strauch (*Pogostemon cablin*) wurde für molekularbiologische Arbeiten als äußerst vielversprechender Modellorganismus angesehen. Zum einen produziert er ein terpenhaltiges essentielles Öl mit charakteristischen Duftigenschaften, zum anderen konnten bereits zuvor einige STPS der Pflanze identifiziert werden [165]. Die beschriebenen STPS aus *P. cablin* weisen ein, im Vergleich zu anderen beschriebenen Synthesen, extrem breites Produktspektrum auf.

Ziel war es, neue Enzyme oder Enzymvarianten mit Terpensynthaseaktivität aus dem Strauch isolieren zu können, die die Bildung von vielen Sesquiterpenen katalysieren (hohe Produktpromis-

kuität). Die Isolation der nativen (-)-Patchoulolsynthase direkt aus dem aufgeschlossenen Pflanzenmaterial wurde gezeigt [166, 167], doch aufgrund der limitierten Verfügbarkeit vor Ort und der extrem geringen Enzymausbeuten, ist dieser Ansatz nicht zielführend.

Um nahezu beliebige Mengen an aktivem Enzym für proteinchemische Versuche zu erhalten, sollte die pflanzliche STPS stattdessen direkt heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Obwohl alle in dieser Arbeit produzierten TPS pflanzliche (eukaryotische) Enzyme sind, wurde generell auf *E. coli* (Prokaryot) als Produktionsorganismus gesetzt. Ausschlaggebend für die Wahl des Wirtes waren die robusten und lange etablierten molekularbiologischen Techniken für diesen Organismus [168]. Im Vergleich zu Eukaryoten (Hefen), wie *P. pastoris* oder *S. cerevisiae*, lassen sich Produktionsstämme von *E. coli* zügig durch Transformation von Plasmidkonstrukten erzeugen. Eine genomische Integration entfällt [169]. Zudem gilt *E. coli* aufgrund der günstigen Wachstumsmedien, der kurzen Verdopplungszeit und der hohen Produktausbeuten als Standardorganismus, sowohl im biotechnologischen Labor als auch in der Industrie [168, 170–173]. Neben Bulkenzymen wird auch ein sehr großer Teil der pharmazeutischen Proteine über die *E. coli*-Produktionsplattform hergestellt [174, 175].

Eine Herausforderung bei heterologer Expression mit *E. coli*, ist die häufige Tendenz von eukaryotischen Proteinen, unlösliche Aggregate (inclusion bodies) auszubilden. Je nach Zielprotein kann es ein langwieriger Prozess sein, diese Aggregate wieder in löslicher und aktiver Form zu erhalten. Es existieren jedoch einige Methoden wie z. B. Fusionsstrategien, um diese Limitierung gezielt zu umgehen [176].

Viele Proteine werden nach der Translation noch stark modifiziert. Eine häufige posttranslationale Modifikation ist die Glykosylierung, bei der Zuckerreste auf des Polypeptid übertragen werden. *E. coli* kann eukaryotische Glykosylierungsmuster nicht nachbilden [168]. Da jedoch Pflanzen häufig nur zur Stabilisierung und zum Schutz vor Peptidaseverdau glykosylieren [177, 178], wurde diese Einschränkung der Produktionsplattform in Kauf genommen.

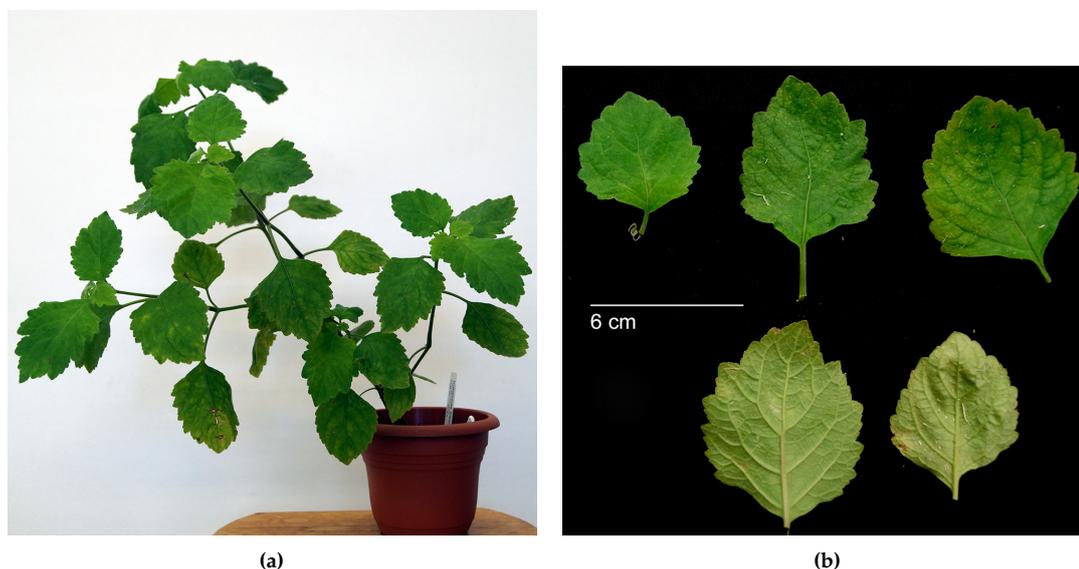


Abbildung 4.13 (a) Strauch des indischen Patchouli (*Pogostemon cablin*). (b) Vorder- und Rückansicht frisch geernteter Blätter verschiedenen Alters.

Um eine cDNA-Bibliothek anzulegen, die den gesamten, transkribierten mRNA-Pool eines *P. cablin* Kultivars abdeckte, wurden frische Pflanzen bezogen (Rühlemann's Kräuter und Duftpflanzen, Horstedt). Die Kultivierung der Sträucher erwies sich trotz Düngung und zusätzlicher Wärme-

und Lichtquellen als anspruchsvoll. Die subtropische Pflanze ist, außer im Hochsommer, auf ein entsprechendes Gewächshaus angewiesen.

Abbildung 4.13 zeigt Aufnahmen eines vitalen Strauchs mit Detailansichten einzelner Blätter. Die frische Pflanze verströmte nur eine schwache Duftnote nach dem holzigen Patchouli-Aroma, da viele flüchtige Aromakomponenten erst durch Oxidations- und Zerfallsprozesse während des Trocknungsprozesses der Blätter entstehen. Über zwei Tage im Trockenschrank bei 100 °C getrocknete Blätter, wiesen ein äußerst kräftiges, holzig-frisches Aroma auf.

Aus frisch geernteten Blätter wurde nach Homogenisierung zunächst die Gesamt-RNA isoliert. Sie besteht zum Großteil aus nicht-codierenden Ribonukleinsäuren und zu einem kleinen Anteil aus Protein-codierender mRNA [179]. Hierbei musste eine vollständige Trennung von pflanzlichen Proteinen und genomischer DNA erfolgen. Als Extraktionsmethode wurde die AGPC-Methode [180] angewandt, die auf dem Einsatz von saurem Guanidin-Thiocyanat, Phenol und Chloroform beruht (vgl. B.2.1). Durch den sauren pH wird eine Trennung von RNA und DNA realisiert. Nach Zentrifugation verbleibt die Gesamt-RNA im wässrigen Überstand, während sich DNA und Proteine in der organischen Chloroform-Phase anreichern. Etwaige Kontaminationen durch genomische DNA, die in späteren PCR-Amplifikationen störend wirken würden, werden durch DNase I Verdau entfernt. Nach Zugabe von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol erfolgte eine sehr langsame und selektive Fällung der RNA bei -80 °C, die zur weiteren Aufreinigung diente.

Als Maß für die Reinheit der RNA wird das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) angesehen, wobei ein Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 als sehr rein gilt. Ein Verhältnis kleiner als 1,8 weist auf eine Kontamination durch Protein oder Phenol hin [180].

Tabelle 4.1 RNA-Ausbeuten und Reinheit

Ansatz	Volumen	Konzentration	A_{260}/A_{280}
RNA I	50 µL	291,4 ng µL ⁻¹	2,09
RNA II	50 µL	280,4 ng µL ⁻¹	2,09
RNA III	50 µL	262,2 ng µL ⁻¹	2,08
RNA IV	50 µL	285,4 ng µL ⁻¹	2,13
RNA V	50 µL	295,5 ng µL ⁻¹	2,08

Die RNA Ausbeuten von 5 parallelen Ansätzen mit 100 mg zermörsertem Pflanzenpulver lagen im Bereich um 300 ng µL⁻¹, was somit ca. 14 µg Gesamt-RNA je Probe entspricht. Da aus jedem Ansatz lediglich 1 µg RNA für die cDNA-Synthese verwendet werden, sind die erhaltenen Konzentrationen ausreichend. Auch die photometrisch bestimmten Reinheiten über 2 (A_{260}/A_{280}) deuteten auf sehr reine RNA, mit geringer Kontamination durch genomische DNA, hin.

Lediglich die codierende mRNA (besitzt Poly(A)-Schwanz) wurde in einem zweiten Schritt durch eine reverse Transkriptase, nach Bindung eines oligo(dT)-Primers, in die komplementäre cDNA umgeschrieben (vgl. B.3). Hierfür wurde eine hoch-prozessive Transkriptase aus dem Maus-Leukämie-Virus eingesetzt. Mögliche Hybride aus RNA und cDNA wurden durch Verdau mit RNase H entfernt. Da die dNTPs im großen Überschuss zu der Transkriptionsreaktion gegeben werden, ist eine Konzentrationsbestimmung der erhaltenen cDNA photometrisch nicht möglich.

Für einen ersten Nachweis, ob eine STPS-codierende Sequenz in den erhaltenen cDNA-Bibliotheken vorhanden war, wurde die PCR-Methode mit *Taq*-Polymerase durchgeführt (vgl. B.4.1). Die Primer wurden dafür von einer zuvor beschriebenen Sequenz einer (-)-Patchoulolsynthase, GenBank AY508730 [72], abgeleitet (Primersequenzen in Tab. A.10 im Anhang). Nach Optimierung der Annealing-Temperatur (56 °C), konnte ein Sequenzabschnitt mit einer Größe von ~1.600 Bp erfolgreich amplifiziert werden (Abb. 4.14).

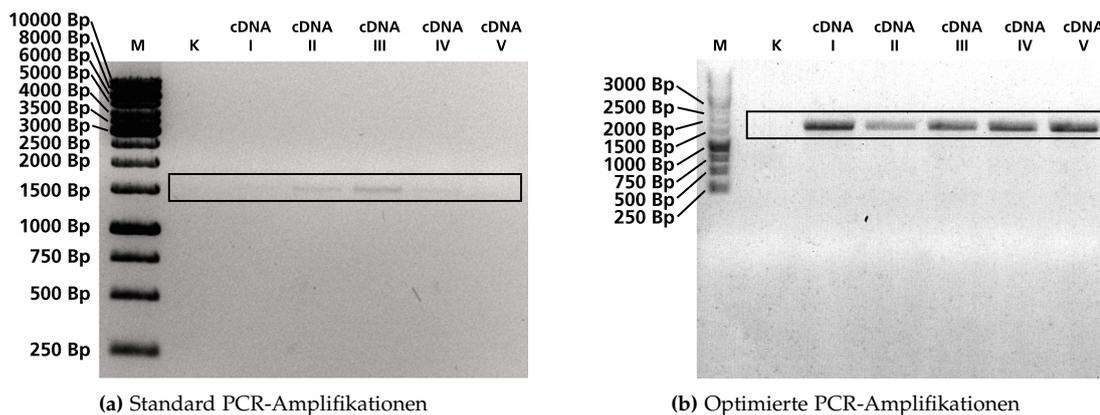


Abbildung 4.14 (a) DNA-Gel von PCR-Amplifikationen mit PTS-spezifischen Primern. Verwendung von 5 cDNA- Bibliotheken aus *P. cablin*. Oberhalb der 1.500 Bp Markerbande ist bei Ansatz cDNA II und cDNA III ein schwaches Amplifikat erkennbar. (b) Die Annealing-Temperaturen und Zyklenzahl wurde zur Ausbeutesteigerung erfolgreich optimiert. M = Marker, K = Kontrolle.

Der amplifizierte Sequenzabschnitt musste nun zum Sequenzieren stabil in einen Sequenzierungsvektor ligiert werden (Abb. 4.16a). Der linearisierte Vektor pCR4-TOPO (vgl. sec:vektoren) besitzt einzelne Thymidinnukleotide (T) an den 3'-Ende. *Taq*-Polymerase fügt an PCR-Produkte einzelne Adenosinnukleotide (A) an, so dass die Amplifikate direkt über die erzeugten Überhänge (sticky ends) in den Vektor kloniert werden konnten. Das als TA-Klonierung (vgl. B.5.1) bekannte Verfahren ist jedoch ungerichtet [181]. Das Produkt wird daher im Verhältnis 50/50 mit und gegen den Uhrzeigersinn einkloniert, was jedoch auf die Sequenzierreaktion keinen Einfluss hatte.

Da eine Standard *Taq*-Polymerase keine Korrekturlesefunktion besitzt, und fehlerhafte Nukleotide während der Amplifikation über PCR in die Sequenz einfügen würde, musste zwingend eine Korrekturlese-PCR mit Proofreading-Polymerase (vgl. B.4.2) eingesetzt werden. Bei einem Amplifikat von 1.600 Bp Länge und 35 PCR-Zyklen, beträgt der rechnerische Anteil von fehlerhaften PCR-Produkten bei Einsatz von *Taq* etwa 128 %. Somit besitzt jedes Amplifikat statistisch mindestens ein falsch eingebautes Nukleotid. Bezogen auf die verwendete Phusion-Polymerase (NEB, USA), werden bei gleichen Parametern maximal 2 % der Produkte eine einzelnen Basenfehler aufweisen¹⁸.

Proofreading-Polymerasen besitzen eine 3'-5' Exonukleaseaktivität und entfernen somit während der PCR sofort eingebaute Nukleotide, die nicht komplementär zum Mutterstrang sind [182]. Bei der Korrekturlese-PCR werden jedoch keine Adenosine zur TA-Klonierung an die Enden angefügt. In einem einfachen Protokoll wurde daher die terminale poly-Adenylierungsfunktion der *Taq*-Polymerase ausgenutzt (vgl. B.5.1). Nach Transformation der TA-klonierten Konstrukte in einen kompetenten *E. coli* Klonierungsstamm (TOP10), wurden über Kolonie-PCR (vgl. B.4.1) die korrekten Klonen ausgewählt und deren Plasmid-DNA aufgereinigt (vgl. B.6.1).

Die Sequenzierungen erfolgten über cycle-sequencing, einer Weiterentwicklung der traditionellen Didesoxy-Sequenziermethode (nach Sanger *et al.*) [185]. Es wurde Plasmid-DNA von 2 unterschiedlichen Klonen zwischen den Primersequenzen M13-FWD und M13-REV abgelesen (Tab. A.10).

Das sequenzierte Fragment beinhaltet ein offenes Leseraster (ORF) von 1.659 Bp, was einem translatierten Protein von 552 AS Länge entspricht (theor. MW von 64,2 kDa). Über die Datenbanksuche blastp [186] wurde die Proteinsequenz Acc. No. AAS86323 der ursprünglich beschriebenen (-)-Patchoulolsynthase (PTS) [72] mit einer Identität von 96,6 % als Protein mit höchster Ähnlichkeit identifiziert. Insgesamt unterschieden sich die Sequenzen bei 45 Nukleotiden. Dadurch ergaben sich 26 stille Mutationen (Aminosäure identisch, nur anderes Codon) und 19 Aminosäure-

¹⁸ Annahme: statistische Fehlerwahrscheinlichkeiten lt. Hersteller $Taq = 2,28 \cdot 10^{-5}$, Phusion = $4,4 \cdot 10^{-7}$. PCR Fidelity Calculator, Life Technologies.

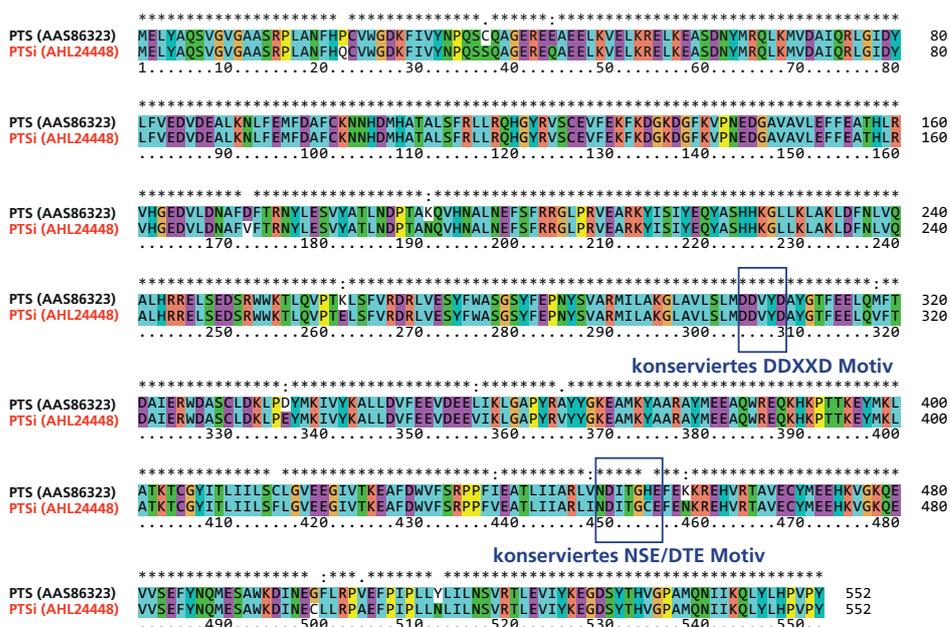


Abbildung 4.15 Aminosäure-Sequenzalignment der ursprünglich beschriebenen PTS [72] mit der in dieser Arbeit identifizierten PTS Isoform PTSi [183]. GenBank ID der Sequenzen in Klammern. Paarweises Sequenzalignment durchgeführt mit Clustal W [184] Algorithmus.

austausche. Ein paarweises Sequenzalignment (Abb. 4.15) zeigt die abweichenden Bereiche. Man erkennt, dass keinerlei Aminosäureaustausche in den hoch-konservierten Motiven (DDXXD-Motiv und NSE/DTE-Motiv, vgl. 3.1.1) stattgefunden haben.

Für die gezeigten Sequenzabweichungen gibt es einige mögliche Erklärungen. Es ist möglich, dass die in dieser Arbeit verwendete Pflanze zu einer anderen Subspezies von *P. cablin* zählte. Einzelne Terpensynthasen können Mitglieder größerer Gen-/Allelfamilien sein. Deshalb ist eine gewisse Abweichung in der Aminosäuresequenz zwischen einzelnen Kultivaren, oder auch individuellen Pflanzen, ein häufig beobachtetes Phänomen¹⁹.

Da wahrscheinlich ein zuvor unbekanntes Isoenzym/Variante der (-)-Patchoulolsynthese aus der cDNA-Bibliothek amplifiziert werden konnte, wurde die Sequenz zur Abgrenzung der ursprünglich PTS [72] als PTSi (i für Isoenzym/Isoform) deklariert. Zudem wurde die Nukleotid-Sequenz unter Acc. No. KF983531 (Proteinsequenz unter Acc. No. AHL24448) bei GenBank veröffentlicht [183].

Eine Fragestellung war nun, ob und gegebenenfalls auf welche Weise, die Variante in Bezug auf das Produktspektrum von der PTS abweicht. Insbesondere, da bei PTS die Katalyse verschiedenster terpenoider Verbindungen nachgewiesen werden konnte [26].

Der Sequenzierungsvektor pCR4 ist nicht zur Proteinexpression geeignet, da er keine Promotorelemente aufweist. Als Expressionsvektor wurde zunächst pET-17b eingesetzt. Alle Vektoren der pET-Familie nutzen zur robusten Proteinproduktion den sehr starken und stringenten T7-Promotor. Werden diese Vektoren in *E. coli* Expressionsstämme mit T7-Polymerase transformiert (sog. DE3-Stämme, zur Erläuterung von Genotypen vgl. Tab. A.8), so wird das entsprechende gene-of-interest (GOI) nach Zugabe eines Induktors (meist IPTG) stark überexprimiert [187]. Das pET-System ist aktuell die mit Abstand am meisten verwendete Expressionsplattform. Über 90% der in *E. coli* produzierten rekombinanten Proteine werden aktuell darüber hergestellt [170].

¹⁹ Persönliche Kommunikation Prof. Dr. Helge Küster vom 26.02.2013, Institut für Pflanzengenetik, Leibniz Universität Hannover.

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren weisen keine Signalpeptide zur Translokation in den periplasmatischen oder extrazellulären Raum auf. Die rekombinant produzierten Zielproteine akkumulierten daher alle im intrazellulären Raum (Cytosol) und werden nicht in das Medium sekretiert.

Zur klassischen Restriktions/Ligationsklonierung wurden passende Restriktionsschnittstellen an das 5'- sowie 3'-Ende der Sequenz angefügt. Als passende Restriktionseendonukleasen für den Verdau kamen KpnI und SpeI in Frage, da diese den Zielvektor jeweils einmal schneiden, allerdings nicht in der cDNA-Sequenz. Nach PCR-Amplifikation mit entsprechend verlängerten Primern (Tab. A.10), wurden der pET-17b Vektor und das Insertfragment mit den Endonukleasen geschnitten (vgl. B.6.2). Nach Aufreinigung durch Gelextraktion (vgl. B.4.4) und Dephosphorylierung des Vektors, wurden die Teilfragmente ligiert (vgl. B.5.2). Trotz Variation des Vektor:Insert-Verhältnisses wurden nach Transformation keine Kolonien erhalten.

Da Restriktionseendonukleasen nur innerhalb (endo) einer DNA-Sequenz schneiden, wurden an die verlängerten Primer zufällige Nukleotide angehängt. In einigen Fällen reicht dies aber nicht für einen effizienten Verdau aus und die Fragmente werden nur unvollständig geschnitten. Nach der PCR-Amplifikation mit einer Korrekturlese-Polymerase, wurden die Fragmente daher mit Adenosinüberhängen versehen und über TA-Klonierung erneut stabil in pCR4-TOPO kloniert (Abb. 4.16a). Dieser Zwischenschritt ermöglichte nun den Verdau und die anschließende Ligation.

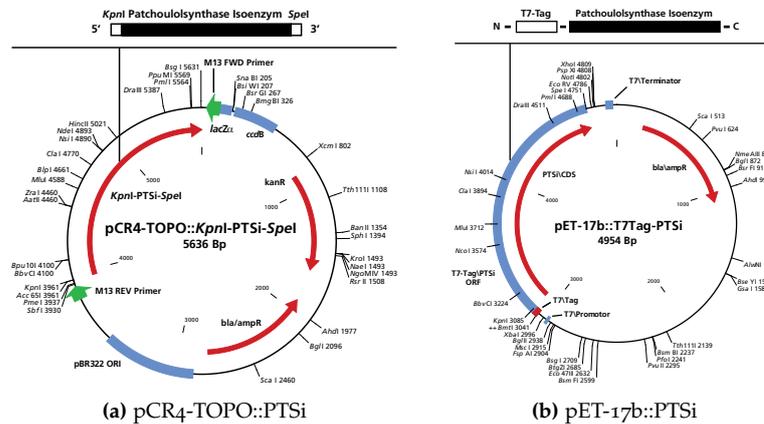


Abbildung 4.16 Plasmidkarten der durch TA-Klonierung und Restriktion/Ligation erzeugten Konstrukte zur Sequenzierung/Expression der Patchoulsynthese.

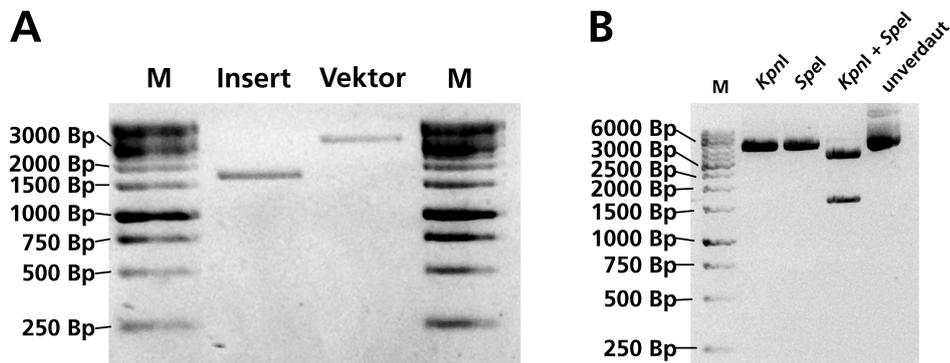


Abbildung 4.17 (A) Analytisches DNA-Gel zum Nachweis von Insert- und Vektorfragment nach Restriktionsverdau und Gelextraktion. (B) Testverdau der aufgereinigten Plasmid-DNA eines Klon, zur Bestätigung der korrekten Ligation. Erwartete Größe Insert = 1.662 Bp, Vektor = 3.292 Bp, linearisiert (einfach geschnitten) = 4.954 Bp.

Eine DNA-Gelanalyse der aufgereinigten Fragmente vor Ligation, sowie ein Testverdau der aufgereinigten Plasmid-DNA eines Klon, sind in Abb. 4.17 dargestellt. Nach Sequenzierung wurde der Expressionsvektor (Abb. 4.16b) in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

4.2.2 Expressionsversuche T7-Tag-PTSi

Erste Experimente zur Proteinexpression des rekombinanten Stammes wurden in LB-Medium bei einer Temperatur von 37 °C in 100 mL-Schüttelkolben durchgeführt. Eine Übernachtskultur wurde so in der Hauptkultur verdünnt, dass eine Startzelldichte von OD_{600} 0,05 erreicht wurde. Induktion erfolgte bei OD_{600} 0,8 mit 0,5 mM IPTG. Die Schüttelgeschwindigkeit betrug konstant 180 rpm. Das SDS-PAGE Gel des unlöslichen Proteinpellets (A) sowie des löslichen Überstands (B) sind in Abb. 4.18 abgebildet.

Tabelle 4.2 Berechnete Proteinparameter des Proteins T7-Tag-PTSi

Konstrukt/ORF	Bezeichnung	theor. MW [kDa]	theor. pI	Ext. Koeff. [$M^{-1} cm^{-1}$]
pET-17b::PTSi	T7-PTSi	65,946	5,34	89.200

Im Laufe der Kultivierung ist die Überexpression der PTSi unterhalb der 66,2 kDa Markerbande erkennbar. Das apparente Molekulargewicht (MW) im SDS-Gel (geschätzt 60 kDa) weicht von dem anhand der Aminosäuresequenz errechneten Gewicht (65,9 kDa; Tab. 4.2) etwas ab²⁰.

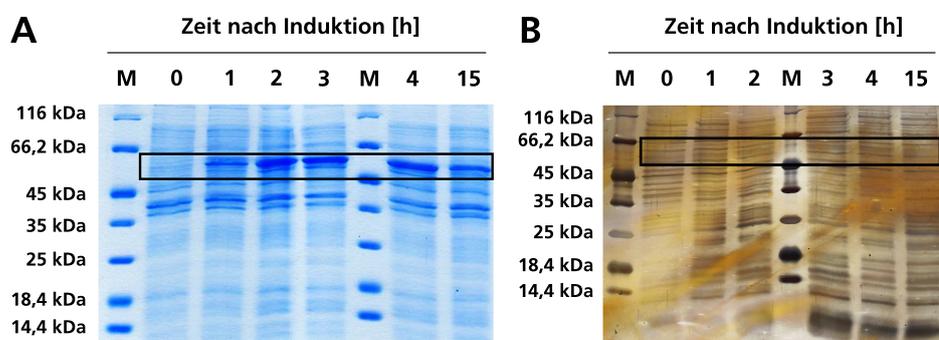


Abbildung 4.18 (A) Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel der unlöslichen Proteinfraction eines Expressionversuchs von pET17b::PTSi bei 37 °C. Proben anhand der Zelldichte normiert. (B) Silber-gefärbtes SDS-PAGE Gel des gleichen Experiments, Auftrennung der löslichen Proteinfraction (Überstand).

Die Abweichung lässt sich über die physikochemischen Eigenschaften des Proteins sowie dessen Bindung an SDS erklären. In vorhergehenden Arbeiten konnte ein ähnliches Laufverhalten bei elektrophoretischen Auftrennung beobachtet werden [72]. Die Größe der rekombinanten PTSi in Relation zu dem verwendeten Proteinmarker war reproduzierbar, die eindeutige Identifizierung erfolgte später über MALDI-TOF-MS (vgl. 4.5.1). Die ursprünglich aus *P. cablin* aufgereinigte PTS (natives Enzym) wies ein MW von 40 kDa [167] auf, möglicherweise aufgrund post-translationaler Modifikation (Glykosylierung) des Enzyms *in planta*. Diese Modifikation werden bei heterologer Expression in *E. coli* nicht durchgeführt.

Eine lösliche Überexpression der PTSi ist selbst nach sensitiver Silberfärbung nicht erkennbar (Abb. 4.18, B). Durch Variation der Induktor-Konzentration sowie Absenkung der Kultivierungstemperatur auf 20 °C, sollte nun lösliches Protein erhalten werden.

Eine 200 mL-Hauptkultur wurde bei einer OD_{600} 0,5 auf sechs 20 mL-Kolben aufgeteilt, mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen induziert und für 16 h kultiviert (20 °C, 180 rpm). Die Wachstumskurven anhand der Zelldichte sind in Abb. 4.19 geplottet.

Bei höheren IPTG-Konzentrationen sinkt die erreichbare Endzelldichte. Durch größere Mengen des Induktor wird die Transkription des rekombinanten Gens verstärkt, und der Stoffwechsel der Zellen wird primär auf Proteinproduktion umgestellt. Es verbleiben somit weniger Ressourcen für

²⁰ Proteinparameter bestimmt über ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)

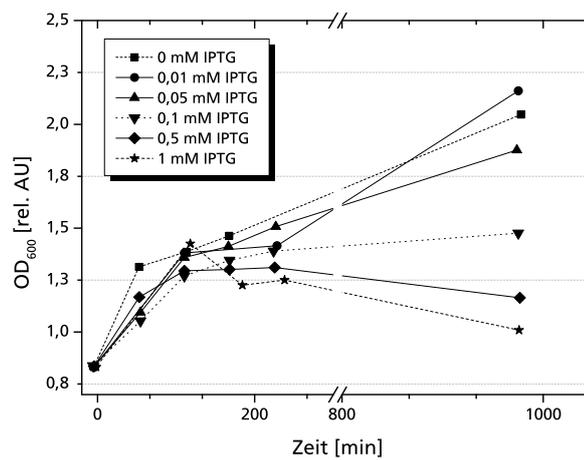


Abbildung 4.19 Zelldichte OD_{600} der mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen induzierten Kulturkolben.

die Zellteilung. Zudem übt möglicherweise das rekombinante Protein in höheren Konzentrationen einen toxischen oder wachstumsinhibierende Effekt auf die Zellen aus.

Die SDS-PAGE Analyse der Proben (Abb. 4.20, A) zeigt einen Anstieg der Konzentration an Zielprotein ab 0,1 mM IPTG. Auch in den löslichen Fraktionen (Abb. 4.20, B) ist eine zunehmende Proteinbande bei der erwarteten Molekülgröße sichtbar. Allerdings sind die Konzentrationen äußerst niedrig und entsprechen nicht den Ausbeuten, die man von einem pET-System erwarten würde.

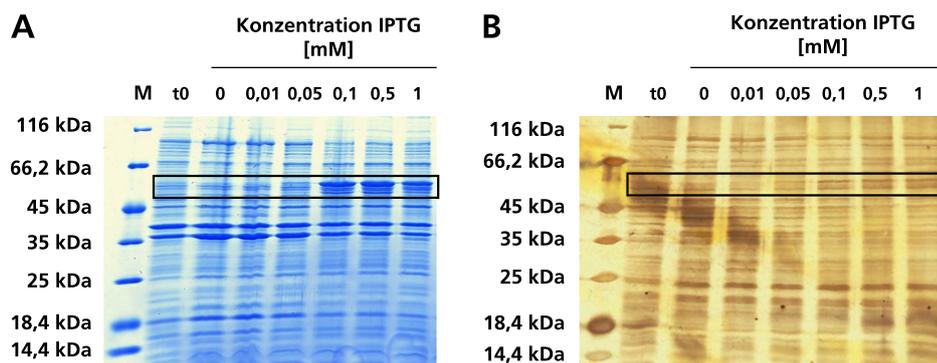


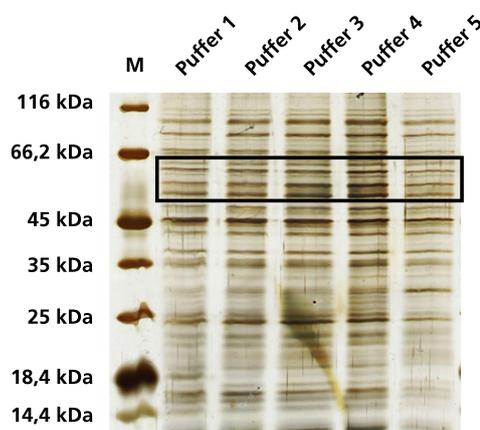
Abbildung 4.20 (A) Unlösliches Proteinpellet nach 16h Kultivierungsdauer bei unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen. (B) Löslicher Überstand der jeweiligen Proben. M = Proteinmarker.

Vor dem Zellaufschluss wurde die Feuchtzellmasse (FZM) in einem speziellen Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Zusammensetzung und Additive dieses Extraktionspuffers können einen großen Einfluss auf die Löslichkeit der Proteine, nach Freisetzung aus dem Cytosol, haben. Ungeeignete Pufferkomponenten oder pH-Werte können zum Ausfallen des Proteins führen. Die Zugabe von Detergenzien (z. B. Triton X-100), DTT, EDTA, Kohlenhydraten, Aminosäuren oder auch das exakte Steuern der Ionenstärke (über Salzkonzentration), kann einen positiven Einfluss auf Löslichkeit und Stabilität des Proteins ausüben [188]. Um eine Aggregation zu vermeiden, sollte der Puffer-pH zudem mindestens um zwei Einheiten vom isoelektrischen Punkt des heterologen Zielproteins abweichen (hier von pI 5,34).

Um den Einfluss des Puffers näher zu untersuchen, wurde der Zellaufschluss mit variiertem Zusammensetzung des Extraktionspuffer durchgeführt. Die Pufferkonzentration und der pH (50 mM MOPS; pH 7,5) wurden jeweils konstant beibehalten. Das reduzierende Agens DTT verhindert (in niedrigen Konzentrationen, hier 5 mM) die Ausbildung unerwünschter inter- und intramolekularer Disulfidbrücken zwischen Cysteinen [188].

Tabelle 4.3 Zusammensetzung der getesteten Extraktionspuffer. Puffer 1 wurde ursprünglich für den Zellaufschluss eingesetzt.

Nr. 1	50 mM MOPS (pH 7,5)	150 mM NaCl	5 mM DTT	10 % (v/v) Glycerol	–
Nr. 2	50 mM MOPS (pH 7,5)	300 mM NaCl	5 mM DTT	10 % (v/v) Glycerol	–
Nr. 3	50 mM MOPS (pH 7,5)	500 mM NaCl	5 mM DTT	10 % (v/v) Glycerol	–
Nr. 4	50 mM MOPS (pH 7,5)	150 mM NaCl	5 mM DTT	10 % (v/v) Glycerol	0,1 % (w/v) Triton X-100
Nr. 5	50 mM MOPS (pH 7,5)	500 mM NaCl	5 mM DTT	10 % (v/v) Glycerol	2 % (w/v) Triton X-100

**Abbildung 4.21** Zellaufschluss einer Probe mit fünf verschiedenen Extraktionspuffern. Jeweils lösliche Proteinfraction aufgetrennt (Überstand), SDS-PAGE Proteingel wurde silbergefärbt.

Glycerol trägt zur Stabilisierung bei, insbesondere wenn Enzymaliquots eingefroren werden (Frostschutz). Variiert wurde die Ionenstärke unter Einsatz von bis 500 mM NaCl. Auch die Zugabe des milden Detergenz Triton X-100 (nichtionisch, nichtdenaturierend) sollte die Löslichkeit steigern. Die jeweiligen Pufferkomponenten können in Tab. 4.3 nachvollzogen werden.

Die SDS-PAGE Analyse des löslichen Überstands nach Zellaufschluss (Abb. 4.21) zeigte keine ersichtliche Ausbeutesteigerung. Zusätze, wie Detergenzien oder sehr hohe Salzkonzentrationen, übten in diesem Fall keinen Effekt auf die Proteinlöslichkeit aus. In allen weiteren Versuchen wurde daher stets auf Puffer Nr. 1 als Standard STPS-Extraktionspuffer zurückgegriffen.

Obwohl das relativ kurze T7-Epitop-Tag (AS-Sequenz = **MASMTGGQMG**) aufgrund der geringen Größe eigentlich keinen Einfluss auf die Faltung des rekombinanten Enzyms ausüben müsste, zeigte sich hier, dass eine lösliche Überexpression des Zielproteins selbst bei Variation von Kultivierungsparametern nicht möglich war. Mit beiden Proteinfractionen von pET-17b::PTSi (Pellet und Überstand) wurden zudem Bioaktivitätstests durchgeführt. Es konnten keine GC-gängigen Produkte und somit keine Enzymaktivität nachgewiesen werden.

Es sollte im Folgenden durch Evaluation verschiedener Expressionskonstrukte eine lösliche und vor allem aktive Produktion von PTSi ermöglicht werden.

4.2.3 Klonierung weiterer Konstrukte für das PTS-Isoenzym

Es wurden nun drei Ansätze parallel verfolgt: N-terminale Fusion der PTSi Sequenz mit einem polyHis-Tag (10×Histidin), Codon-Optimierung der Sequenz (gleiches Vektorrückgrat mit polyHis-Tag) sowie N-terminale Fusion einer Thioredoxin-Domäne. Das polyHis-Epitop ist weit verbreitet und gilt als eines der bekanntesten Aufreinigungstags/Epitope für rekombinante Proteine. Mit dem Epitop fusionierte Zielmoleküle lassen sich effizient über eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie aufreinigen (IMAC) [189]. Es wurde eine N-terminale Fusion (Beginn

der Peptidkette) gewählt, da dies häufig eine robuste Expression unterstützt und die Stabilität des Zielproteins erhöht [173].

Das Tag ermöglicht zudem die immunochemische Detektion z. B. mittels Western-Blot (Anti-His-Antikörper), da monoklonale Antikörper gegen STPS kommerziell aktuell nicht verfügbar sind. Als Vektorsystem wurde pET-16b (vgl. A.8) gewählt, der zudem eine Schnittstelle (Sequenz IEGR/) zum Entfernen des Epitops über eine Factor Xa Peptidase [190] aufweist (Abb. 4.22a).

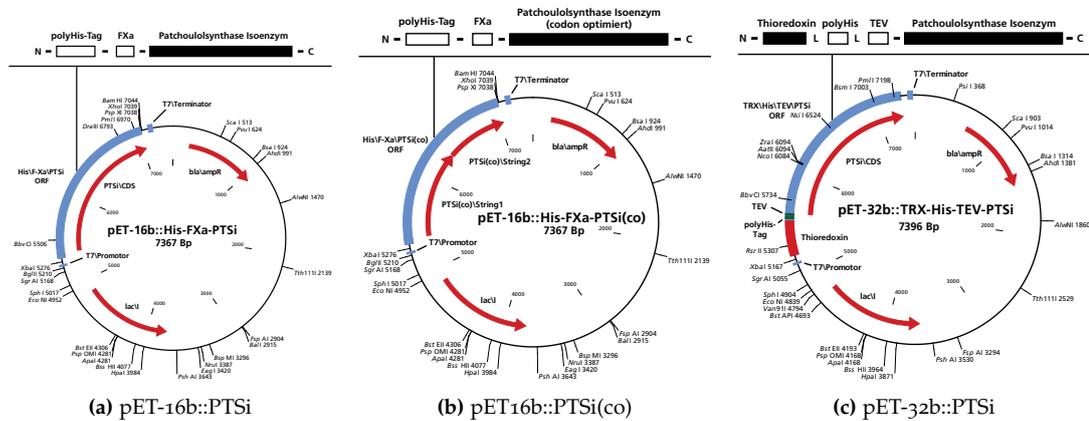


Abbildung 4.22 Weitere Plasmidkarten der erzeugten Konstrukte zur Expression von PTSi.

Um zu testen, ob die Codon-Verteilung der zuvor aufgeklärten PTSi Sequenz einen Einfluss auf Löslichkeit oder Expressionsverhalten ausübte, wurde die cDNA-Sequenz bezogen auf den Produktionswirt Codon-optimiert. Es wurde eine Codon-Nutzungstabelle für *E. coli* K12 zugrundegelegt, die sich auf hoch exprimierte Gene in diesem Organismen stützt (HEG-DB Datenbank, [191]). Es hat sich gezeigt, dass die Optimierungsstrategie „eine Aminosäure – jeweils ideales Codon“ häufig nicht zielführend ist. Diese Art der Sequenzoptimierung führt zu einem unnatürlichen Ungleichgewicht im tRNA-Pool der Zelle, was sich negativ auf die Translation auswirkt [192]. Daher wurde eine „guided random“ Strategie (gerichtete Wahrscheinlichkeiten) angewendet, wo generell jedes der vier möglichen Codons für die entsprechende Aminosäure ausgetauscht wird, jedoch die in *E. coli* jeweils bevorzugten Codons mit höherer Wahrscheinlichkeit verwendet werden.

Die Codon-Optimierung wurde über den OPTIMIZER Algorithmus durchgeführt [193], die finale, optimierte Sequenz ist in Kap. C aufgelistet. Insgesamt wurden 217 Transitionen (Purin gegen Purin bzw. Pyrimidin gegen Pyrimidin) und 183 Transversionen (Purin gegen Pyrimidin und umgekehrt) bei 1.659 Nukleotiden durchgeführt. Der Codon-Adaptionsindex (CAI) [194] wurde von 0,299 auf 0,746 erhöht (Skala von 0 = schlechte bis 1 = perfekte Codon-Zusammensetzung), was einer deutlich verbesserten Codon-Nutzung entspricht. Die Nukleotidsequenz wurde in Form von doppelsträngigen DNA-Fragmenten (Strings) mit den Längen 994 Bp und 710 Bp synthetisiert. Auch hier wurde zur Klonierung der bereits erwähnte pET-16b Vektor als Rückgrat verwendet (Abb. 4.22b).

Thioredoxine (TRX) sind Redox-Proteine (Oxidoreduktasen), die in allen Organismen vorkommen. Sie sind für Reduktionen verschiedener endogener Proteine verantwortlich. Zudem wirken sie als Regulatoren in vielen Bereichen der Signaltransduktion [195]. Bakteriellies Thioredoxin aus *E. coli* (*trxA*) ist ein relativ kleines Protein (109 AS; 11,7 kDa MW) mit charakteristischer Tertiärstruktur. Es ist hochlöslich und sehr stabil in *E. coli* [196]. Durch Proteinfusion kann TRX in vielen Fällen die lösliche Expression von eukaryotischen Zielproteinen in einem prokaryotischen Organismus verbessern [197], da es die korrekte Faltung des Fusionspartners unterstützt.

Es existieren bereits viele verschiedene Fusionsproteine zur Ausbeutesteigerung und Faltungsunterstützung in *E. coli* (u. a. Glutathion-S-Transferase (GST) [198], N-Utilization substance (NusaA) [199], Maltose-binding protein (MBP) [200]), die je nach Zielprotein besser oder schlechter wirken [201]. Zuvor konnten, bei mit PTSi nah verwandten STPS, Löslichkeitssteigerungen über TRX-Fusion erzielt werden [202, 203]. Die PTSi Sequenz wurde daher in einen pET-32b (vgl. A.8) kloniert. Dieses Vektorrückgrat wurde in vorhergehenden Arbeiten [197] leicht angepasst, so dass nun eine spezifische Schnittstelle (Sequenz ENLYFQ/X) für die TEV-Peptidase (Tobacco Etch Virus) verfügbar war [204]. Das polyHis-Epitop (6×Histidin) ist hierbei über kurze Linker-Sequenzen intramolekular (zwischen TRX-Domäne und der PTSi) lokalisiert (Abb. 4.22c).

Zur Klonierung wurde stets auf die mit Gibson assembly [121] verwandte Methode seamless cloning (vgl. B.5.3) zurückgegriffen. Sie ermöglicht es, nahtlos und ohne Restriktionsschnittstellen, in kurzer Zeit korrekte Plasmidkonstrukte zu erzeugen. Die Zielsequenzen, sowie die entsprechenden Vektoren, wurden mittels PCR amplifiziert und linearisiert. Die Primer wurden so gewählt, dass überlappende Bereiche von exakt 15 Bp an die Sequenzen angefügt wurden.

Alle Reaktionen wurden ausschließlich mit Korrekturlese-Polymerasen und unter Minimierung der PCR-Zyklenzahl (vgl. B.4.2) durchgeführt, um nur fehlerfreie Amplifikate zu erhalten. Die verwendeten Primer sind jeweils in Tab. A.10 aufgeführt.

Tabelle 4.4 Optimierte PCR-Ausbeuten der amplifizierten Fragmente vor Assemblierung

Amplifikatname	Produktlänge [Bp]	Ausbeute [μg]	Molare Ausbeute [pmol]
pET-16b Vektor	5.751 Bp	12,39	3,26
PTSi cDNA	1.616 Bp	8,9	8,34
PTSi(co) String 1	1.000 Bp	9,0	13,64
PTSi(co) String 2	716 Bp	8,05	17,03
pET-32b Vektor	5.780 Bp	6,46	1,69
PTSi cDNA	1.616 Bp	4,29	4,02

Aufgrund der teilweise relativ langen Fragmente (~ 6.000 Bp bei Vektoren), mussten die optimalen Annealing-Temperaturen zunächst über Gradienten-PCR bestimmt werden. Als eine sehr gute Methode um die Spezifität, Sensitivität und Ausbeuten der PCR-Amplifikationen weiter zu erhöhen, erwies sich die Touchdown-PCR [205]. Hierbei wird in den ersten 10 PCR-Zyklen eine sehr hohe Annealing-Temperatur (72°C) gewählt, sodass die Primer sehr spezifisch binden.

Die Temperatur wird anschließend schrittweise um $0,5^\circ\text{C}$ pro Zyklus abgesenkt. Die Idee basiert auf dem exponentiellen Verlauf der PCR: Falsch gebundene Primer in den ersten Zyklen (durch zu niedrige Annealingtemperatur) generieren Fehler, die sich in späteren Zyklen anreichern. Liegt nach den ersten Zyklen zunächst ein fehlerfreier Pool an Fragmenten vor, wird die Ausbeute je Schritt sukzessive durch Temperatursenkung erhöht. Diese Methode macht somit die Bestimmung einer idealen Annealing-Temperatur durch empirische Versuchsreihen überflüssig [205].

In Abb. 4.23 sind die jeweiligen Fragmente, Vektoren und Strings nach Amplifikation und Aufreinigung in analytischen DNA-Gelen aufgetrennt worden. Für das korrekte molare Insert-zu-Vektor Verhältnis von 2:1 wurden die Konzentrationen photometrisch bestimmt (Tab. 4.4). Die Transformation erfolgte zunächst in kompetente *E. coli* TOP10 Zellen.

Zur Identifikation der korrekt zusammengefügt Konstrukte wurden jeweils Kolonie-PCR Reaktionen (vgl. B.4.1) mit den Insert- und Vektor-spezifischen Primern durchgeführt. Klone mit korrektem Konstrukt wurden über Nacht angezogen (20 mL Kolben) und die Plasmid-DNA präpariert (vgl. B.6.1). Zum eindeutigen Nachweis der korrekten Assemblierung wurde die Plasmid-DNA, vor Transformation in den Expressionsstamm, jeweils zweifach sequenziert (zusammengesetzte Sequen-

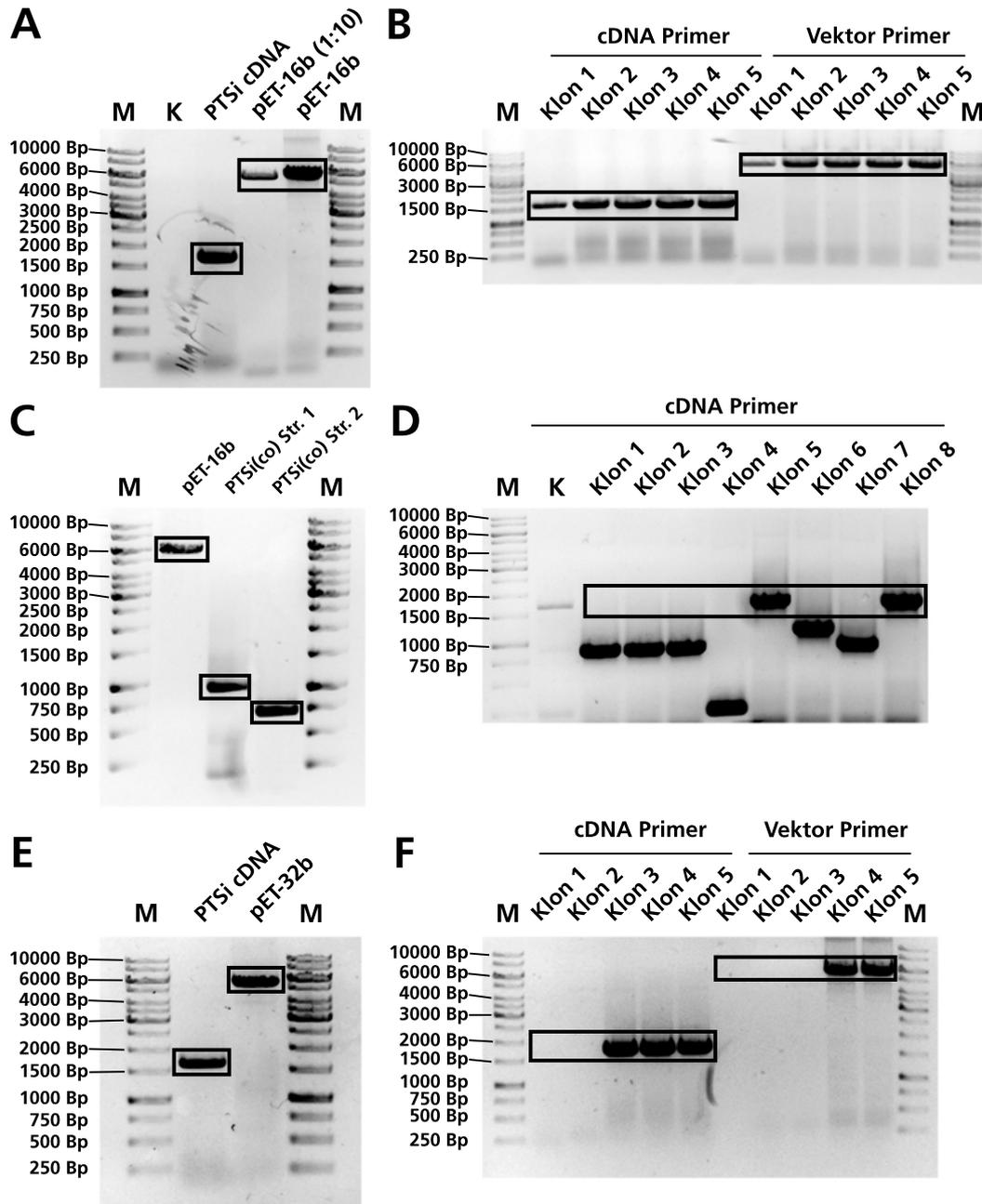


Abbildung 4.23 (A) DNA-Gel der aufgereinigten PCR-Produkte zur Klonierung von pET-16b::PTSi. Erwartete Amplifikatlänge pET-16b = 5.751 Bp, PTSi cDNA = 1.616 Bp. (B) Kolonie-PCR von 5 Klonen, positiver Nachweis des korrekten Konstrukts in allen Klonen. (C) DNA-Gel zur Klonierung von pET-16b::PTSi(co). Erwartete Amplifikatlänge pET-16b = 5.711 Bp, PTSi String 1 = 1.000 Bp, PTSi String 2 = 716 Bp. (D) Kolonie-PCR von 8 Klonen, korrektes Plasmid nur in Klonen 5 und 8 vorhanden. (E) DNA-Gel Klonierung von pET-32b::PTSi. Erwartete Amplifikatlängen pET-32b = 5.780 Bp, PTSi cDNA = 1.616 Bp. (F) Kolonie-PCR von 5 Klonen, positiver Nachweis des Konstrukts in Klonen 4 und 5.

zen in Kap. C). Aus den erhaltenen Sequenzdaten konnte die AS-Zusammensetzung des offenen Leserasters abgeleitet werden. Die daraus errechneten Proteinparameter sind in Tab. 4.5 aufgelistet²¹.

²¹ Proteinparameter bestimmt über ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)

Tabelle 4.5 Berechnete Proteinparameter der weiteren PTSi-Konstrukte

Konstrukt/ORF	Bezeichnung	theor. MW [kDa]	theor. pI	Ext. Koeff. [$M^{-1} cm^{-1}$]
pET-16b::PTSi	His-PTSi	66,363	5,17	89.200
pET-16b::PTSi(co)	His-PTSi(co)	66,363	5,17	89.200
pET-32b::PTSi	TRX-PTSi	78,288	5,41	104.795

4.3 VERGLEICH DER EXPRESSIONSSYSTEME FÜR DAS PTSI-ISOENZYM

Es wurden drei Expressionsstämme pro Plasmidkonstrukt transformiert. Verwendet wurden, über die TSS-Methode (vgl. B.7) erzeugte, kompetente Zellen von BL21(DE3), Tuner(DE3) und Rosetta 2(DE3)pLysS. Eine umfassende Zusammenstellung der jeweiligen Genotypen mit Erläuterungen findet sich im Anhang unter Abschn. A.8.

Als Basisstamm für T7-Promotorsysteme gilt der bereits zuvor verwendete BL21(DE3), der sich als Standard für viele Proteinexpressionen etabliert hat. Die Abkürzung (DE3) bezieht sich auf eine Infektion mit dem λ (DE3) Phagen, der die genetische Information seiner RNA-Polymerase in das Bakteriengenom integriert hat. Die nun genomisch codierte T7-RNA-Polymerase steht unter der Kontrolle des sehr starken *lacUV5*-Promotors, einer Mutante des *lac*-Promotors [187].

Der proprietäre Tuner(DE3) stellt eine Deletionsmutante von BL21(DE3) dar, bei der Genabschnitt *lacZY* aus dem Genom entfernt wurde. Durch eine weitere Mutation im *lac* Permease Gen, ermöglicht dieser Stamm eine konzentrationsabhängige Induktion des T7-Promotors. Zudem wird der Induktor homogen über die gesamte Kultur aufgenommen. Durch Titration mit unterschiedlichen Konzentrationen an IPTG, kann somit theoretisch das Expressionslevel präzise eingestellt werden. So wird ein für das Produkt ideales Verhältnis von löslicher zu unlöslicher Produktion ermöglicht. Häufig führen niedrigere Expressionslevel zu höheren löslichen Ausbeuten an Zielprotein, während eine extreme Überexpression zur Agglomeration führen kann. Stämme ohne diese Mutation (z. B. BL21) zeigen meist ein an/aus Verhalten: Geringe IPTG-Konzentrationen aktivieren die Transkription bereits zu 100 %, ohne eine proportionale Abstufung.

Rosetta 2(DE3)pLysS besitzt das zusätzliche Plasmid pRARE2, auf dem sieben für *E. coli* seltene tRNAs codiert liegen. Dies ermöglicht eine universelle Translation rekombinanter Proteinen, in Fällen, wo die Codon-Nutzung von *E. coli* aufgrund fehlender tRNAs limitiert wäre [206]. Dieser Stamm soll somit eine vollständige Codon-Optimierung (und damit eine DNA-Synthese) der Zielsequenz ersetzen [207].

Ein häufiges Problem bei (DE3)-Stämmen im Allgemeinen ist die Basalexpression (leaky expression). Selbst in nicht induzierten Kulturen werden geringe Mengen an T7-RNA-Polymerase in den Zellen produziert. Aufgrund ihrer starken Prozessivität führt selbst diese geringe Konzentration der Polymerase zu einer unerwünschten Proteinexpression in der ersten Wachstumsphase. Dies führt besonders bei toxischen Proteinen zu Problemen. Das Plasmid pLysS kodiert für T7-Lysozym, welches die T7-RNA-Polymerase inhibiert [208]. Erst durch aktive Zugabe des Induktors wird so viel RNA-Polymerase transkribiert, dass die Inhibierung überwunden werden kann und eine Genexpression erfolgt. Die Proteinexpression wird somit stringenter, d. h. strikter kontrollierbar.

Alle hier verwendeten Stämme verfügen zudem über die Deletionen Δlon und $\Delta ompT$ (codieren zwei Peptidasen), die zu größerer Stabilität und höheren Ausbeuten an heterolog exprimierten Proteinen führt.

Eine bioinformatische Analyse der PTSi-Sequenz prognostizierte die Ausbildung von drei möglichen Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position AS 101–AS 126, AS 454–AS 469 und AS 330–AS 405. Die errechneten Wahrscheinlichkeiten, dass diese Disulfidbindungen intramoleku-

lar entstehen, liegen aufgrund struktureller und energetischer Betrachtungen jedoch unterhalb des signifikanten Niveaus. Die zwei verglichenen Algorithmen Dinosolve [209] und DIpro [210] stufen daher die PTSi als ein Protein ohne Cysteinbrücken ein. Auf Basis dieser Berechnungen wurde daher auf Testung von sogenannten Δgor - und $\Delta trxB$ -Mutanten (z. B. Rosetta-gami Stämme) verzichtet, die die Ausbildung dieser Tertiärstrukturelemente im Cytosol ermöglichen.

4.3.1 Variation der Expressionstemperatur

Durch parallele Kultivierungen von BL21(DE3) pET-16b::PTSi (produziert His-PTSi) sollte das Expressionsverhalten des Stammes bei verschiedenen Temperaturen verglichen werden. Eine angeimpfte Hauptkultur in LB-Medium wurden bei OD_{600} 0,5 auf mehrere Schüttelkolben verteilt, die nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 20 °C, 30 °C und 37 °C (180 rpm) für 21 h weiter kultiviert wurden.

SDS-PAGE Analyse der löslichen und unlöslichen Proteinfractionen zeigte eine klar erkennbare Überexpression von His-PTSi nach 21 h bei 20 °C (Abb. 4.24). Bei den höheren Temperaturen kann eine starke Proteinproduktion festgestellt werden, jedoch fast ausschließlich in Form unlöslicher Aggregate. Für alle weiteren Versuche wurde daher die niedrige Temperatur von 20 °C nach Induktion als notwendiger Parameter angesehen.

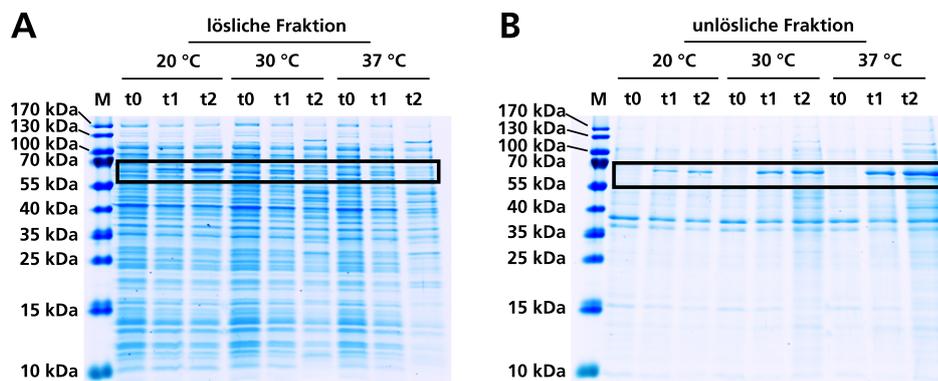


Abbildung 4.24 (A) SDS-Gel der löslichen Fraktionen nach Kultivierung bei 20 °C, 30 °C und 37 °C. (B) Gel des entsprechenden Proteinpellets (unlösliche Fraktion). t₀ = vor Induktion, t₁ = nach 2 h, t₂ = nach 21 h.

Niedrige Temperaturen verlangsamen die Translationsmaschinerie (Ribosomen) der Zelle, so dass genügend Zeit für eine korrekte Faltung des Enzyms verbleibt. Hohe Temperaturen (in diesem Fall über 30 °C) führen möglicherweise zu lokalen Konzentrationsmaxima im Cytosol und destabilisieren die Tertiärstruktur, was eine Aggregation begünstigen kann. Dieses Verhalten konnte zuvor bereits bei sehr vielen rekombinanten Proteinen beobachtet werden [211]. Einige Enzyme (z. B. Lipoxygenasen) konnten sogar nur bei Temperaturen um 15 °C löslich in *E. coli* produziert werden [212].

Aufgrund der niedrigen Kultivierungstemperatur unterhalb des Temperaturoptimums von *E. coli* (37 °C, da Darmbakterium) wird das Wachstum verlangsamt und die Verdopplungszeit stark verlängert. Dies spiegelt sich auch in den erhaltenen Endzellkonzentrationen wieder (20 °C = OD_{600} 2,51; 30 °C = OD_{600} 3,44; 37 °C = OD_{600} 4,57).

4.3.2 Variation der Induktorkonzentration bei Tuner-Stämmen

Die ideale IPTG-Konzentration zur Induktion der Tuner-Stämme musste empirisch ermittelt werden. Fraglich war hierbei, ob durch Zugabe einer definierten Menge an Induktor die löslichen

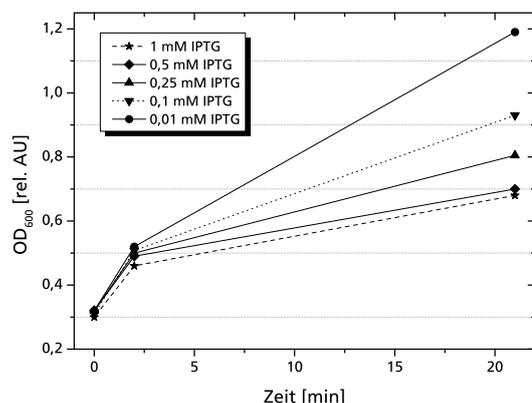


Abbildung 4.25 Zelldichte OD_{600} der mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen induzierten Kulturkolben.

Enzymausbeuten möglicherweise etwas gesteigert werden könnten. Zudem war unklar, ob eine Korrelation zwischen IPTG-Konzentration und produzierter Proteinmenge, bedingt durch die *lacZY*-Mutation, in *E. coli* Tuner vorliegt.

Eine Hauptkultur (LB-Medium) von Tuner pET16b::PTS_i wurde bei einer Zelldichte OD_{600} 0,3 auf fünf 1 L-Kolben aufgeteilt, mit IPTG-Konzentrationen zwischen 0,01–1 mM induziert und für 21 h kultiviert (20 °C, 180 rpm). Im Verlauf der Zelldichte (Abb. 4.25) zeigte sich eine Abhängigkeit der Induktor-Konzentration zur Zelldichte. Höhere IPTG-Konzentrationen veranlassen den Organismus dazu, mehr Ressourcen in die Proteinproduktion umzuleiten, da sehr viel mRNA transkribiert wird.

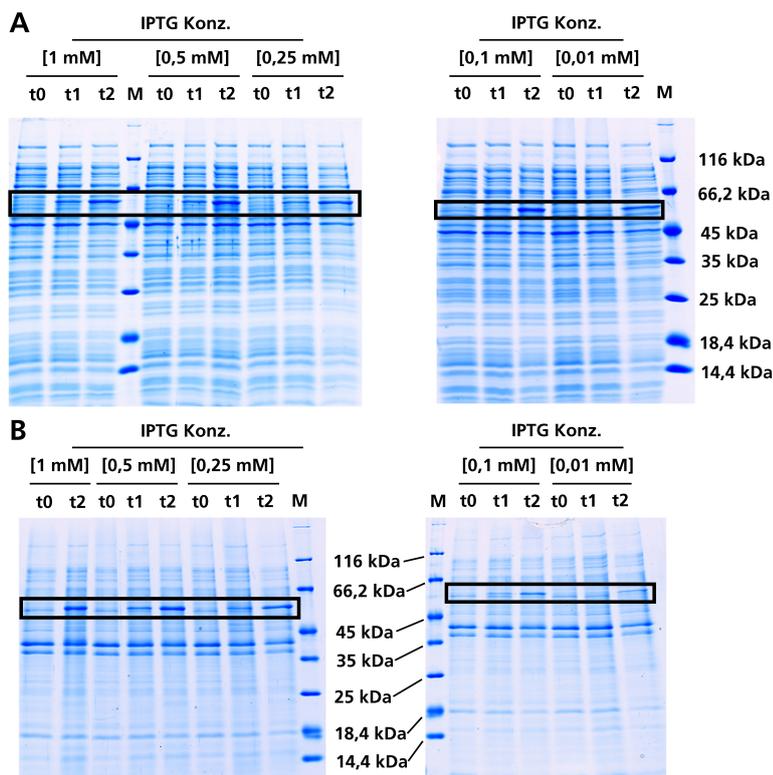


Abbildung 4.26 (A) SDS-PAGE Gel der löslichen Fraktionen induzierter Kulturen des Tuner pET16b::PTS_i. Verwendete IPTG Konzentrationen zwischen 0,01–1 mM. (B) Unlösliche Proteinfractionen. Alle Proben normiert anhand ihrer optischen Dichte OD_{600} .

Die SDS-PAGE Analyse des löslichen Überstands zeigte eine leichte Zunahme der Zielproteinkonzentration bei steigenden Induktormengen (Abb. 4.26). Eine nahezu lineare Korrelation zwischen

IPTG-Konzentration und löslicher Enzymausbeute ist nur im niedrigen Konzentrationsbereich zwischen 0,01 mM und 0,1 mM vorhanden. Bei höheren IPTG-Konzentrationen stagniert die lösliche Produktkonzentration auf einem konstanten Niveau.

Die Auftrennung des Proteinpellets bewies, dass eine stärker Induktion zur Bildung von mehr Aggregaten führte. Bei 0,01 mM IPTG liegt das Zielenzym PTSi nahezu vollständig in löslicher Form vor, es werden kaum inclusion bodies gebildet, während bei 1 mM IPTG eine große Menge Enzym in inclusion bodies ausfällt, der Anteil an löslichem Produkt jedoch nicht signifikant höher liegt.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die Ausbeuten an löslicher PTSi nicht unmittelbar mit der Stärke der Expression zusammenhängen. Ab einer gewissen Konzentration des Enzyms im Cytosol scheint ein starker Hang zur Agglomeration vorzuliegen (Löslichkeitsschwelle). Dies ist möglicherweise durch die inhärente Struktur von PTSi bedingt (große hydrophobe Bereiche) [211, 213].

Aufgrund der höchsten relativen Produktausbeute (densitometrisch bestimmt) und dem im Vergleich besten Wachstumsverhalten trotz niedriger Endzelldichte (OD_{600} 0,93), wurden bei weiteren Experimenten mit Tuner-Stämmen stets 0,1 mM IPTG zur Induktion eingesetzt.

4.3.3 Vergleich der Expressionsstämme

Da nun die grundlegenden Kultivierungsparameter festgelegt waren (0,1 mM IPTG für Tuner; 0,5 mM IPTG für alle weiteren Stämme; 20 °C; 180 rpm; 200 mL SK-Medienvolumen; LB-Medium) wurden zunächst die drei His-PTSi Stämme mit den drei TRX-PTSi Stämmen im Hinblick auf lösliche Expression direkt verglichen. Die Zellernte erfolgte nach 24 h. Nach Normalisierung der Proben anhand der Zellkonzentration wurde der Ultraschallaufschluss in STPS-Extraktionspuffer (Tab. A.5) durchgeführt.

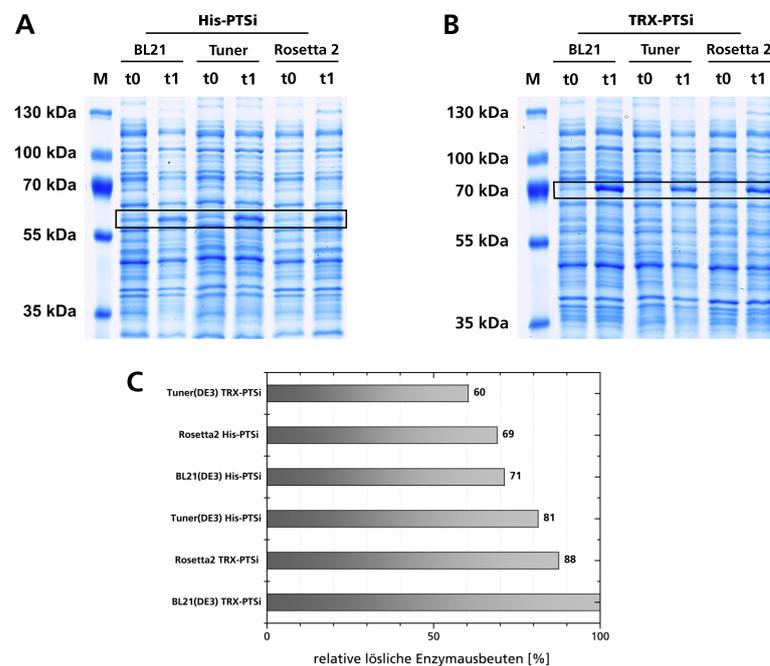


Abbildung 4.27 (A) SDS-PAGE Gel der löslichen Fraktion der His-PTSi Expressionsstämme. (B) Lösliche Fraktion der TRX-PTSi Expressionsstämme. t₀ = Probe vor Induktion, t₁ = Probe 6 h nach Induktion. Kultivierung bei 20 °C, Probe normalisiert anhand OD_{600} . (C) Relative Proteinausbeuten im Vergleich (densitometrisch bestimmt).

Proteingele des löslichen Überstands zeigen für alle 6 verglichenen Stämme eine deutliche Überexpression der PTSi bei den jeweils erwarteten Molekülgrößen (Abb. 4.27, A+B). Insgesamt lie-

gen die relativen Enzymausbeuten bei Thioredoxin-fusionierter Synthese höher als bei der nicht-fusionierten Variante (Abb. 4.27, C).

Die Ausbalanzierung des tRNA-Pools durch den pRARE2 Plasmiden (Rosetta2-Stämme), beeinflusste die lösliche Expression nur marginal. Im Vergleich zum Standard BL21(DE3) liegen die Produktausbeuten der Tuner- und Rosetta-Stämme nicht signifikant höher. Generell wurde jedoch bei diesen Stämmen in allen Kultivierungen ein deutlich schlechteres Wachstumsverhalten beobachtet. Dies lässt sich im Falle von Rosetta2 über den zusätzlich transformierten Plasmiden erklären. Dessen Replikation vor jedem Teilungszyklus bindet Ressourcen für die Zellteilung. Zudem muss die Kultivierung unter Verwendung eines zweiten Antibiotikums (Chloramphenicol) zur Selektion erfolgen, um das pRARE2-Plasmid stabil in der Kultur zu halten.

Im Falle der Tuner-Stämme beeinflussen möglicherweise die Mutationen der *lacZY*-Permease auch weitere metabolischen Vorgänge in den Zellen. Bei Vergleichskultivierungen in Schüttelkolben unter identischen Bedingungen wurde eine Wachstumslimitierung nach wenigen Stunden beobachtet. Während mit BL21(DE3) Endzellichten um OD_{600} 3,0 nach 20 h erzielt werden konnten, wurden optischen Dichten von maximal OD_{600} 1,5 für die Tuner-Stämme gemessen.

Aufgrund der im Vergleich guten löslichen Enzymkonzentrationen bezogen auf die FZM und der höchsten absoluten Biomasseausbeuten, wurde der BL21(DE3) als idealer Produktionsstamm zur Expression der Terpensynthase ausgewählt.

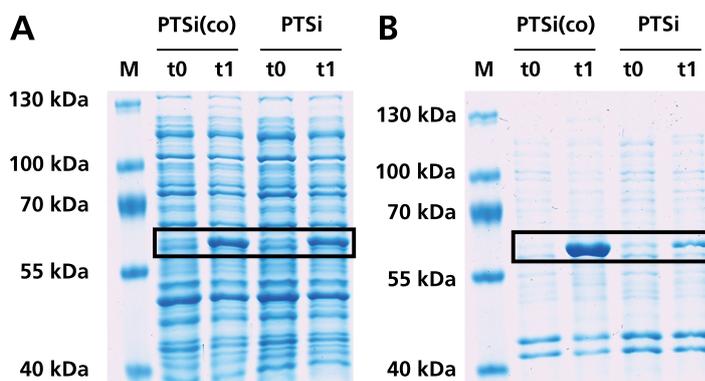


Abbildung 4.28 (A) SDS-PAGE Gele mit löslichen und (B) unlöslichen Proteinfractionen von BL21(DE3) pET-16b::PTSi(co) sowie pET-16b::PTSi. to = Probe vor Induktion, t1 = 16 h nach Induktion. Expression bei 20 °C in LB-Medium.

Direkte Vergleiche der codon-optimierten mit der unoptimierten PTSi-Variante zeigten einen leichten Anstieg der löslichen Enzymausbeuten (Abb. 4.28, A). Interessant ist hierbei die Gelanalyse der unlöslichen Fraktion: Die Gesamtproteinkonzentration wurde durch die Codon-Optimierung dramatisch gesteigert. Die Optimierung ermöglichte eine noch schnellere und effizientere Translation der Peptidketten. Es wurde mehr Enzym produziert, doch durch die hohe Konzentration im Cytosol kommt es auch hier zur bereits beobachteten Agglomeration; eine korrekte Faltung des Polypeptids kann nicht mehr erfolgen. Die Anpassung der codon usage der pflanzlichen Synthese auf den Wirtsorganismus *E. coli*, konnte also in diesem Fall nur begrenzt zu einer Ausbeutesteigerung beitragen.

4.3.4 Vergleich LB- und TB-Medium

LB-Medium (lysogeny broth) gilt als Standard-Komplexmedium für *E. coli* und liefert insbesondere bei molekularbiologischen Arbeiten (Plasmidpropagation, Stammselektion und -haltung, usw.) die ideale Nährstoffzusammensetzung für viele Prokaryoten.

Häufig kann jedoch die Biomasse- sowie Proteinausbeute durch Verwendung des reichhaltigeren TB-Mediums (terrific broth) noch weiter gesteigert werden. Im Gegensatz zu LB- ist TB-Medium gegen Schwankungen des pH-Werts gepuffert, besitzt Glycerol als weitere Kohlenstoffquelle sowie eine höhere Konzentration an Aminosäuren (Trypton/Hefeextrakt). Es werden meist höhere absolute Biomassekonzentrationen pro Volumen in TB-Medium erhalten (teilweise doppelt so hoch), da Wachstum in LB-Medium schnell durch die fehlende Kohlenstoffquelle limitiert wird [214].

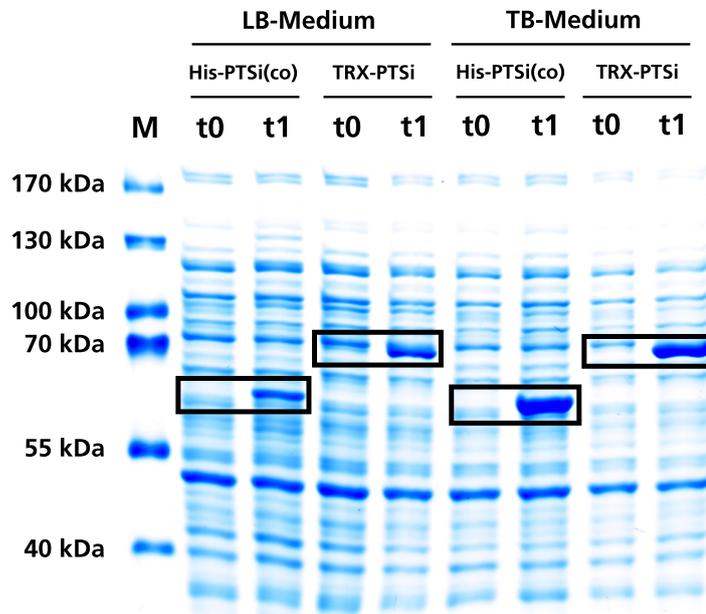


Abbildung 4.29 SDS-PAGE Analyse von Proben des BL₂₁(DE₃)::PTSi(co) und BL₂₁(DE₃)::TRX-PTSi kultiviert in LB- und TB-Medium bei 20 °C. t₀ = vor Induktion, t₁ = Probe nach 24 h. Proben normiert anhand ihrer optischen Dichte.

Abb. 4.29 zeigt die löslichen Fraktionen einer Kultivierung von BL₂₁(DE₃)::PTSi(co) und BL₂₁(DE₃)::TRX-PTSi in den beschriebenen Komplexmedien. Durch Verwendung von TB-Medium konnten die Biomasseausbeuten ($OD_{600} \sim 7$ anstatt $OD_{600} \sim 3$) sowie die Proteinausbeuten pro Biomasse weiter gesteigert werden. Durch densitometrische Analyse konnte das im Falle von His-PTSi(co) bis zu 113 % und im Falle von TRX-PTSi bis zu 57 % mehr Enzym pro g Biomasse produziert werden konnten.

Das reichhaltigere TB-Medium verlängert nicht nur die Wachstumsphase, sondern erhöht auch die lösliche Enzymausbeute pro Zelle. TB-Medium wurde daher als Standard-Komplexmedium für alle zukünftigen Kultivierungen eingesetzt.

4.3.5 Zusammenfassung Expressionssysteme PTS-Isoenzym

Im direkten Vergleich der Produktionsstämme zeigte der etablierte BL₂₁(DE₃) die höchsten PTSi Enzymausbeuten. Trotz Bestimmung der idealen IPTG-Konzentration für Tuner-Stämme, lag die lösliche Enzymproduktion nicht signifikant höher. Zwar konnte eine gewisse Abhängigkeit der Produkt- von der Induktorkonzentration gezeigt werden, dies galt jedoch nur bezogen auf das Ganzzellprotein.

Auch die zusätzlich kodierte tRNAs in Rosetta2-Stämmen konnten die löslichen Produktausbeuten nicht steigern. Zudem zeigten Vergleiche mit Proteinproben vor Induktion, dass Basalexpression in BL₂₁(DE₃) kein Problem darstellte. Vor Zugabe des Induktors konnte nur eine minimale Enzymexpression detektiert werden, was auf eine stringente Transkriptionskontrolle des Promoters

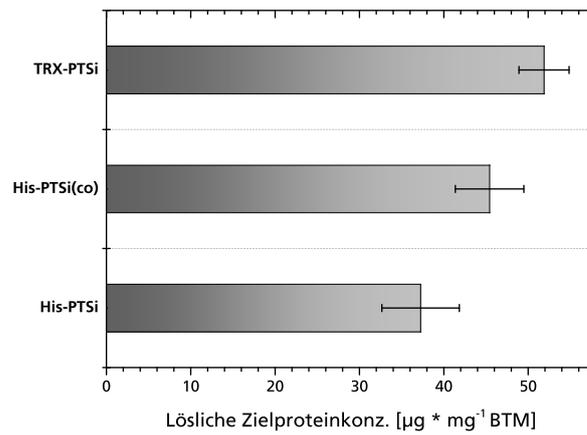


Abbildung 4.30 Vergleich der löslichen Proteinkonzentrationen bezogen auf die Biotrockenmasse aller hier erzeugten PTSi-Konstrukte. Konzentrationen densitometrisch über normierte SDS-PAGE Gele bei identischen Kultivierungsparametern bestimmt.

schließen lässt. Desweiteren lagen die bestimmten Endzellichten (OD_{600}) der Tuner- und Rosetta2-Stämme in allen Versuchen niedriger als bei BL21(DE3).

Durch Codon-Optimierung der PTSi-Sequenz konnte die Proteinausbeute um im Mittel 22 % (Abb. 4.30) verglichen zur unoptimierten cDNA-Sequenz gesteigert werden. Obwohl die Translation der PTSi durch die Optimierung stark gesteigert werden konnte, stieg der lösliche Anteil nicht im selben Maße. Die His-PTSi(co) lag zum größten Teil in Form unlöslicher Aggregate in der Zelle vor.

Im Vergleich mit den His-getaggten Enzymen ermöglichte das mit Thioredoxin fusionierte Konstrukt eine starke Steigerung des löslichen Produktanteils. Zielproteinkonzentrationen pro BTM (Biotrockenmasse) stiegen signifikant um bis zu 40 % im Mittel (Abb. 4.30). Die Ergebnisse zeigen, dass Thioredoxin ein geeigneter Löslichkeitsvermittler für die rekombinante Terpensynthese ist. Trotzdem kann die Fusion die Bildung von inclusion bodies nicht vollständig verhindern, wie in SDS-PAGE Analysen des Proteinpellets gezeigt werden konnte. Auch im Falle von TRX-PTSi wird eine niedrige Expressionstemperatur zwingend benötigt, da bereits bei Temperaturen über 30°C , selbst in Silber-gefärbten Proteingelen, kaum lösliches Enzyme detektiert werden konnte (Gelbilder nicht gezeigt).

Die erzeugten Produktionsstämme BL21(DE3) pET-16b::PTSi(co) und BL21(DE3) pET-32b::PTSi ermöglichten unter den optimierten Kultivierungsbedingungen (TB-Medium; 20°C ; 0,5 mM IPTG; 24 h) die Produktion der löslichen His-PTSi und TRX-PTSi in Konzentrationen von im Mittel $45 \mu\text{g mg}^{-1} \text{BTM}$ bzw. $52 \mu\text{g mg}^{-1} \text{BTM}$ (Abb. 4.30). Dies stellte eine fundamentale Verbesserung im Vergleich zum ursprünglich erzeugten Plasmidkonstrukt (pET-17b::PTSi) dar und ermöglichte nun die Aufreinigung und funktionelle Charakterisierung der rekombinanten PTS-Isoform.

4.4 AUFREINIGUNG DER PTS-ISOFORM ÜBER IMAC

Da alle Enzymkonstrukte mit einem polyHis-Tag ausgestattet wurden, sollte eine effiziente und selektive Aufreinigung der Zielenzyme über eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie erzielt werden (IMAC). Bei dieser etablierten Methode werden zweiwertige Metallkationen wie Nickel-, Kupfer-, Cobalt- oder Zink-Ionen auf einem Trägermaterial immobilisiert [215]. Bei der Trägermatrix handelt es sich zumeist um Sepharose oder Agarose, die zuvor mit einem Chelator wie z. B. Imidodiessigsäure (IDA) oder Nitrilotriessigsäure (NTA) funktionalisiert wurde. Nach Verdrängung von Wasser reagieren die Histidin-Reste unter Ausbildung eines stabilen Chelatkomplexes [216, 217] (Abb. 4.31a).

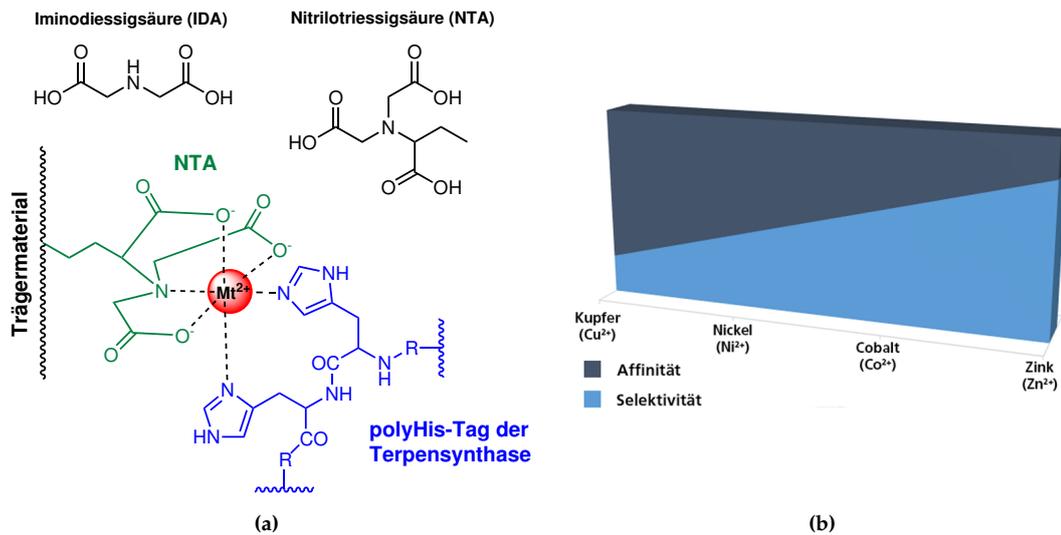


Abbildung 4.31 (a) Darstellung von IDA und NTA zur Funktionalisierung der Trägermatrix. Ablauf der Chelatierung von zwei Histidin-Resten an ein Metallkation. Darstellung angelehnt an [216]. (b) Verhältnis Affinität zu Spezifität von häufig verwendeten Metallkationspezies.

Die Affinität des Liganden zum Chelatbildner variiert je nach Metallkationspezies, die eingesetzt wird. Sie ist abhängig von der Stabilität der gebildeten Übergangsmetall-Komplexe [218] und folgt der Irving-Williams-Regel [219]. Somit steigt die Affinität des getaggten Zielproteins gegenüber dem Kation in der Reihenfolge $Co^{2+} < Zn^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+}$ an, während die Selektivität in gleicher Reihenfolge abnimmt.

Kobalt besitzt eine sehr niedrige Affinität, es bindet also den Liganden relativ schwach. Dafür ist die Bindung äußerst selektiv, d. h. neben dem Zielenzym bindet sonst kein weiteres endogenes *E. coli* Protein. In gleicher Weise ist die Bindungsaffinität von Kupfer äußerst hoch, allerdings können nach Elution möglicherweise auch viele *E. coli* Proteine mit hohem Histidin-Anteil in der Lösung wiedergefunden werden (Abb. 4.31b).

4.4.1 Einfluss von Peptidase-Inhibitoren

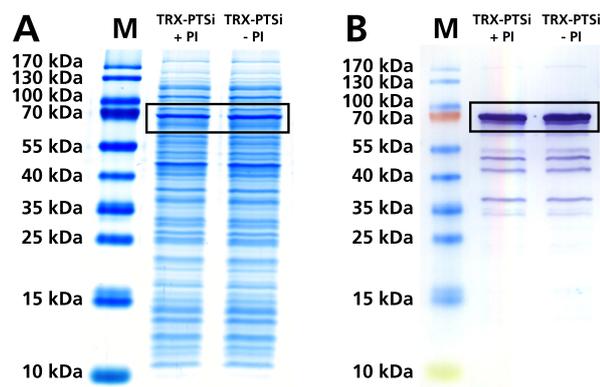


Abbildung 4.32 (A) SDS-PAGE des Rohlysats nach Zellaufschluss von BL21(DE3) pET32b::PTSi (TRX-PTSi) unter Zugabe mehrerer Peptidase-Inhibitoren (+PI). Kontrolle ohne Zugabe von Peptidase-Inhibitoren (-PI). (B) Western-Blot des Proteingels mit His-Epitop Antikörper.

In Vorversuchen wurden zunächst Western-Blots von aufgetrennten Rohextrakten der einzelnen Stämme angefertigt. Da keine spezifischen monoklonalen Antikörper für STPS kommerziell verfügbar sind, wurde ein polyHis-Epitop Antikörper aus der Maus eingesetzt. Als sekundärer Antikörper

per wurde ein Anti-Maus Meerrettich-Peroxidase-Konjugat verwendet. Die Entwicklung der Blots erfolgte durch Zugabe von Tetramethylbenzidin, das durch die Peroxidase in einen blau-violetten Farbstoff umgesetzt wird (vgl. B.10.7).

Hierbei zeigten sich im Falle der fusionierten TRX-PTSi neben dem eigentlichen Zielenzym einige unspezifische Bandensignale, während bei Rohlysaten der unfusionierten PTSi nur die erwartete Bande immunochemisch markiert wurde (Blots nicht gezeigt). Es wurde vermutet, dass TRX-PTSi zügig von verschiedenen Peptidasen im *E. coli* Lysat, trotz durchgehender Kühlung, proteolytisch verdaut wird. Eine Vergleichsprobe wurde daher mit 10 µL Peptidase-Inhibitor-Mix je 100 mg FZM versetzt. Der Inhibitor-Mix setzte sich aus 100 mM AEBSF (Serinproteaseinhibitor); 5 mM Bestatin (Aminopeptidaseinhibitor); 1,5 mM E-64 (Cysteinproteaseinhibitor); 0,2 mM Pepstatin A (Aspartatproteaseinhibitor) und 2 mM Phosphoramidon (hemmt Metalloendopeptidasen) zusammen²². Diese Inhibitor-Mischung deckte einen Großteil der wichtigsten Peptidasen ab, ohne dabei die Aufreinigung über IMAC zu stören. Auf die Zugabe von EDTA musste verzichtet werden, da STPS (sowie die IMAC-Aufreinigung) zwingend auf zweiwertige Kationen angewiesen sind, die durch das EDTA chelatisiert werden würden.

Das SDS-PAGE Proteingel sowie der anschließende Western-Blot (Abb. 4.32) zeigen keinerlei Unterschiede zwischen der mit Inhibitoren behandelten, und der unbehandelten Probe. In beiden Fällen sind Bandensignale mit niedrigerem Molekulargewicht erkennbar. Die Konzentration des primären Antikörpers wurde weiter heruntergesetzt, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Bandensignale der Western-Blots. Es wurde vermutet, dass die Thioredoxin-Domäne von TRX-PTSi eine gewisse inhärente Instabilität aufweist. Um jedoch einen möglichen zusätzlichen Verdau durch *E. coli* Proteasen im Zeitraum zwischen Zellaufschluss und Aufreinigung auszuschließen, wurden alle Proben vor Zellausschluss mit dem angegebenen Proteaseinhibitor-Mix versetzt.

4.4.2 Testung von Metallspezies

Zur Aufreinigung von PTSi(co) und TRX-PTSi, wurden ein eher unspezifisches Kation (Ni^{2+}) und ein hochspezifisch bindendes Kation (Co^{2+}) evaluiert. Ein mit IDA funktionalisierter Membranadsorber (Sartobind IDA 75, Sartorius Stedim) wurde dazu kurz vor der Beladung mit der jeweiligen Metallionenlösung (0,1 M) dekoriert. Die Cellulosemembran in dem Adsorbermodul besitzt eine Oberfläche von 75 cm² bei einer Porengröße im Bereich von ~ 3 µm. Die maximale Bindekapazität von His-getaggen Proteinen liegt bei ca. 7,5 mg²³.

Das in Bindungspuffer (vgl. A.5) vorliegende Rohlysate (aus jeweils 1 g FZM) wurde über eine FPLC-Anlage auf den Adsorber geladen, die nicht bindenden Proteine über einen Waschschrift entfernt, und anschließend mit erhöhter Imidazol-Konzentration das Zielenzym eluiert. Die minimale Proteinkonzentration im Rohlysate, die Dauer der Spülphase sowie die ideale Imidazol-Konzentration, wurden in Vorversuchen bestimmt. Bei Elution mit 0,25 M Imidazol konnte keine vollständige Trennung des gebundenen Proteins von der Adsorbermatrix erzielt werden, so dass die Konzentration auf 0,5 M erhöht werden musste.

In Abb. 4.33 ist das FPLC-Chromatogramm sowie die SDS-PAGE Analyse einer Aufreinigung von pET16b::PTSi(co) Rohlysate bei Raumtemperatur dargestellt (Ni^{2+} -Dekoration). Ein Durchbruch der Proteinfraction während der Beladungsphase ist erkennbar (maximale Absorption bei 20 min). Nach einem 40 min langen Spülschritt erfolgte die Elution, erkennbar an einem rapiden Anstieg der Leitfähigkeit (Imidazol). Im Vergleich zum Rohextrakt (RE) nach Zellaufschluss ist in der Durch-

²² Zusammensetzung adaptiert von Carl Roth GmbH - Manual: protease inhibitor cocktails. <http://www.carlroth.com/>.

²³ Herstellerangaben: Sartobind® IDA 75, application manual

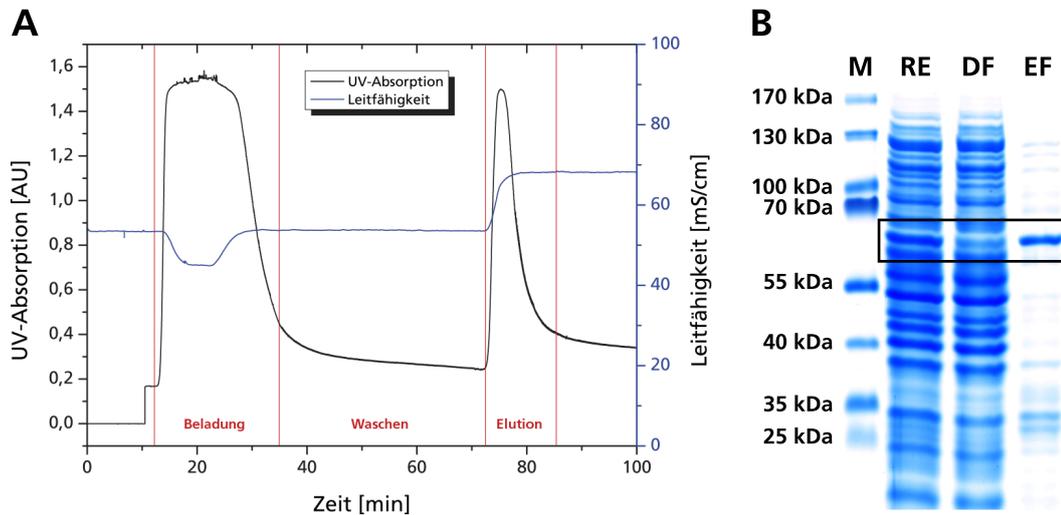


Abbildung 4.33 (A) Chromatogramm der Aufreinigung von PTSi(co) mit IDA 75 Membranadsorber (Dekoration = Ni²⁺ Kationen). (B) SDS-PAGE Analyse des Rohextrakts (RE), der Wasch-/Durchflussfraktion (DF) und der gepoolten Elutionsfraktion (EF).

flussfraktion (DF) nach Beladung kein Zielprotein im Gel erkennbar. Dies deutet auf eine vollständige Bindung des His-getaggten Enzyms hin, die maximale Bindungskapazität des Adsorbers wurde nicht erreicht. In der Elutionsfraktion (EF) ist die PTSi(co) bei dem erwarteten MW erkennbar. Allerdings haben einige endogene *E. coli*-Proteine an die Adsorbermatrix gebunden, so dass sich Verunreinigungen in der Probe befinden. Die Reinheit des Enzyms lt. Densitometrie lag bei 91 %.

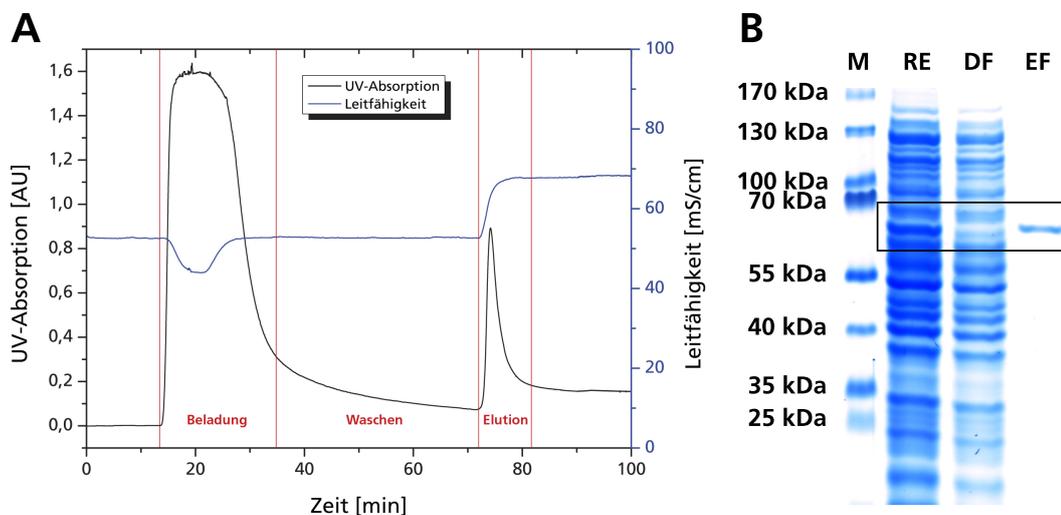


Abbildung 4.34 (A) Chromatogramm der Aufreinigung von PTSi(co) mit IDA 75 Membranadsorber (Dekoration = Co²⁺ Kationen). (B) SDS-PAGE Analyse des Rohextrakts (RE), der Wasch-/Durchflussfraktion (DF) und der gepoolten Elutionsfraktion (EF).

Die Proteinisolierung wurde mit einem Aliquot der gleichen Probe wiederholt, allerdings diesmal nach Co²⁺-Dekoration des Moduls. Zunächst fällt der flächenmäßig deutlich kleinere Produktpeak auf (Abb. 4.34). Aufgrund der niedrigeren Bindungsaffinität hat weniger Zielenzym an den Chelatkomplex binden können. Da auch in diesem Fall keine größere Bande bei dem erwarteten MW in der Durchflussfraktion (DF) erkennbar war, wurde möglicherweise ein großer Teil des Zielproteins während des Waschschriffs vom Adsorber gelöst (niedrigere Affinität). Allerdings war die Proteinkonzentration in der gepoolten Waschfraktion aufgrund des großen Volumens so gering, dass selbst im Silber-gefärbten SDS-Gel kein Protein nachweisbar war (Gelbild nicht gezeigt). Die Auftrennung

nach Elution (EF) zeigte auch hier das Zielenzym in niedrigerer Konzentration, allerdings ohne erkennbare Verunreinigungen (100 % Reinheit).

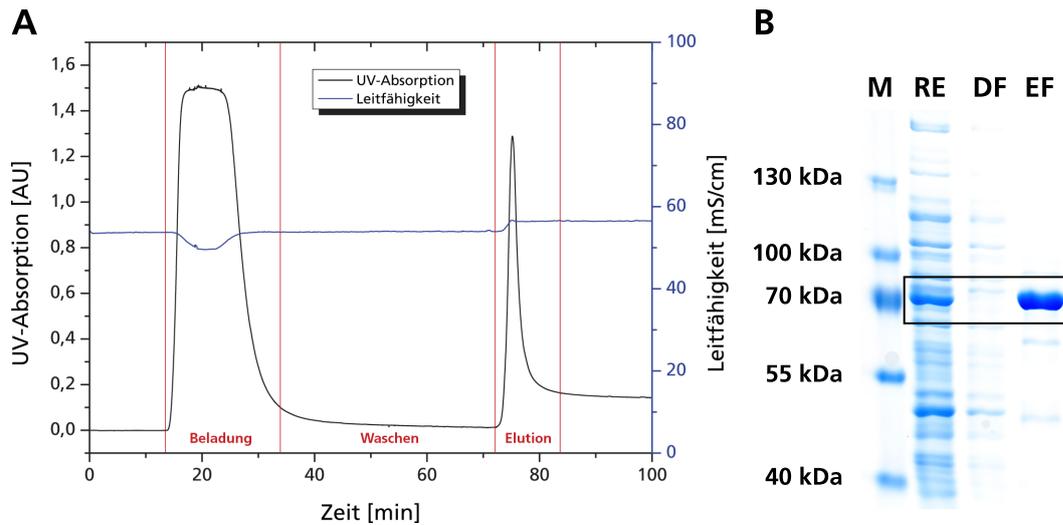


Abbildung 4.35 (A) Chromatogramm der Aufreinigung von TRX-PTS_i mit IDA 75 Membranadsorber (Dekoration = Co²⁺ Kationen). (B) SDS-PAGE Analyse des Rohextrakts (RE), der Wasch-/Durchflussfraktion (DF) und der gepoolten Elutionsfraktion (EF).

Da für spätere Experimente zur Charakterisierung von PTS_i eine hohe Reinheit von großer Bedeutung war, wurde auch die Aufreinigung der fusionierten TRX-PTS_i analog mit einem mit Co²⁺ dekorierten Adsorbermodul erprobt. Das polyHis-Tag von TRX-PTS_i befindet sich weder am C- noch am N-Terminus des Polypeptids, sondern laut Sequenzierung des codierenden Bereichs, intramolekular zwischen TRX und PTS_i. Allerdings war zunächst unklar, ob sich das Epitop nach korrekter Faltung versteckt innerhalb der Proteinstruktur, oder exponiert auf der Oberfläche, befinden würde. Im ersten Fall hätte dies eine stark verminderte Affinität zur Folge.

In Abb. 4.35 ist ein typisches FPLC-Chromatogramm mit korrespondierendem Proteingel dargestellt. Die TRX-PTS_i konnte sehr spezifisch gebunden und mit großer Reinheit (96 % laut Densitometrie) vom Adsorber eluiert werden. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass sich das polyHis-Tag bei TRX-PTS_i sehr wahrscheinlich auf einer Schleifenstruktur an der Oberfläche der Moleküls befand, und somit effizient an das Metallkation binden konnte.

Nach Dialyse mit 10 kDa MWCO gegen Aktivitätspuffer, wurden Biotransformationsversuche (vgl. 4.5.3) mit den aufgereinigten Synthasen durchgeführt. Dabei konnte in parallelen Ansätzen zunächst keine Produktbildung über GC-FID gezeigt werden. Da für die pflanzliche PTS bereits zuvor ein Aktivitätsverlust von über 80 % innerhalb weniger Stunden bei Raumtemperatur nachgewiesen werden konnte [167], wurde ein ähnlicher Verlust auch bei dem rekombinanten Isoform vermutet.

Insbesondere die lange Verweildauer der gebundenen Synthase auf dem Adsorber wurde hier als kritischer Schritt erachtet. Da die Flussraten bereits am Limit des Pumpsystems lagen, konnten die Waschschritte nicht weiter beschleunigt werden. Alle weiteren Aufreinigungsversuche sollten daher gekühlt durchgeführt werden.

4.4.3 Gekühlte Aufreinigung über Membranadsorber

Es wurde eine Kühlapparatur für die Membranadsorbermodule zusammen mit der Feinmechanikerwerkstatt des Institut entwickelt. Das Modul war dabei in einen Edelstahlzylinder eingefasst, dessen Doppelwand von gekühltem Wasser aus einem Thermostaten durchströmt wurde. Öffnun-

gen an der Ober- und Unterseite des Zylinders ermöglichten den einfachen Anschluss an die vorhandenen FPLC-Pumpen. Der Aufbau des Edelstahlgehäuses kann im Anhang unter B.12 nachvollzogen werden. Diese Lösung ermöglichte eine ununterbrochene Kühlung der Enzyme vom Zellaufschluss bis zum Einsatz bei der Biotransformation von FDP.

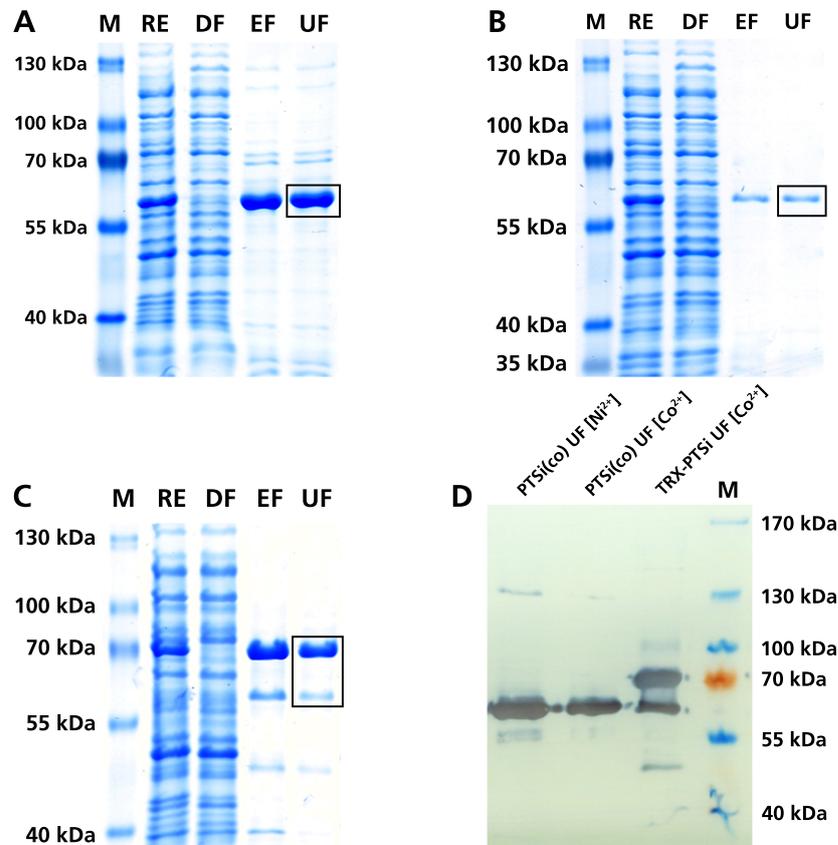


Abbildung 4.36 (A) Aufreinigung von PTsI(co) über Ni²⁺-IMAC. (B) Aufreinigung von PTsI(co) über Co²⁺-IMAC. (C) Aufreinigung von TRX-PTsI über Co²⁺-IMAC. (D) Western-Blot der aufgereinigten Enzyme nach Ultrafiltration mit His-Epitop Antikörper. IMAC-Chromatographie mit gekühltem Membranadsorber (8 °C durchgeführt). RE = Rohextrakt, DF = Durchfluss, EF = gepoolte Elutionsfraktionen, UF = nach Pufferwechsel durch Ultrafiltration mit 10 kDa MWCO.

Aufgrund der erhöhten Viskosität der Puffer, wurde bei einer Thermostattemperatur von 4 °C ein hoher Gegendruck der Anlage beobachtet, so dass die Flussraten stark verlangsamt werden mussten. Zusätzlich war aufgrund der niedrigeren Temperatur die Wechselwirkung der Polypeptide mit der Adsorbmatrix etwas schwächer, so dass im Durchfluss noch größere Konzentrationen an Zielenzym nachgewiesen werden konnten (Proteingele nicht gezeigt).

Eine Temperatur von 8 °C erwies sich als ideal zur zügigen Beladung und Elution durch hohe Flussraten. In Abb. 4.36 sind SDS-PAGE Analysen der jeweiligen Fraktionen sowie ein Western-Blot aller Zielmoleküle nach Ultrafiltration dargestellt. Vergleichbar mit den erzielten Ergebnissen bei Raumtemperatur, konnte auch hier in allen Fällen ein Reinheitsgrad von näherungsweise 90 % erzielt werden. In Vorversuchen wurden durch Pufferwechsel über Dialyseschläuche, große Ausbeuteverluste verzeichnet (Proteinpräzipitation über Nacht bei 4 °C).

Die Dialyse wurde daher auf Ultrafiltration mit Vivaspin 20 (10 kDa MWCO, 20 mL Volumen, Sartorius-Stedim, Deutschland) umgestellt, so dass der Pufferwechsel über drei 2-stündige Zentrifugationsschritte erfolgen konnte (jeweils 1:20 Verdünnung der Enzymlösung, insgesamt 1:8.000 Verdünnung). Der Produktverlust durch diesen Prozessschritt ist minimal, was ein direkter Vergleich der Proben vor und nach Ultrafiltration aufzeigt (Abb. 4.36, A–C).

Im Proteingel der TRX-PTSi Aufreinigung (Abb. 4.36, C) befindet sich unterhalb der erwarteten Bande ein Protein mit entsprechendem Molekulargewicht einer unfusionierten PTSi. Aufgrund der sehr spezifischen Erkennungssequenz der TEV-Peptidase ist es unwahrscheinlich, dass eine unspezifische Peptidase die Thioredoxin-Domäne abgespalten hat. Zudem muss die Spaltung noch vor der polyHis-Sequenz stattgefunden haben, da der His-Epitop Antikörper die verkürzte TRX-PTSi bindet (Abb. 4.36, D). Die TEV-Peptidaseschnittstelle befindet sich jedoch 8 AS **hinter** dem polyHis-Tag (vgl. Sequenzdaten C).

Möglicherweise führt Instabilität der Schleifenstruktur zwischen Thioredoxin und dem polyHis-Tag zur Bildung dieses Spaltprodukts. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die Translation des Enzyms aufgrund von Sekundärstrukturen der mRNA gelegentlich vorzeitig abbrach. Dies würde die Entstehung eines verkürzten Translationsprodukts erklären.

4.4.4 Zusammenfassung Aufreinigung PTSi über IMAC

Durch Aufreinigung von Rohlysaten über einen Co²⁺-dekorierten Membranadsorber konnte die fusionierte TRX-PTSi sowie PTSi(co) in Reinheiten von über 95 % erhalten werden. Das intramolekulare His-Epitop von TRX-PTSi war aufgrund der effizienten Bindungen sehr gut zugänglich. Nach Ultrafiltration wurden Proteinausbeuten von bis zu 1,93 mg g⁻¹ FZM (PTSi(co)) und 2,84 mg g⁻¹ FZM (TRX-PTSi) erhalten.

Wie im folgenden Kapitel dargestellt, blieb durch die gekühlte Aufreinigung bei 8 °C die Struktur und Aktivität der rekombinanten STPS erhalten. Dies ermöglichte die umfassende funktionelle Charakterisierung des Isoenzym in seiner nativen Form.

4.5 ENZYMCHARAKTERISIERUNG PTS-ISOENZYM

4.5.1 Identitätsnachweis PTSi über MALDI-TOF-MS

Zum Identitätsnachweis des rekombinant exprimierten und aufgereinigten Enzyms, wurde ein Peptidmassen-Fingerabdruck über MALDI-MS (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation) durchgeführt. Durch die validierten Sequenzdaten der Expressionsplasmide, konnten bereits die Proteinsequenzen abgeleitet, und die theoretischen MW berechnet werden. Diese unterschieden sich jedoch von den über SDS-PAGE abgeschätzten Molekülgrößen (apparentes MW lt. Proteingel geringer als errechnetes MW).

Fraglich war, ob die biochemischen Eigenschaften des Enzyms für diese Abweichung verantwortlich waren, oder ob die Translation möglicherweise vorzeitig abbrach und zu verkürzten Enzymprodukten führte. Da *E. coli* im Gegensatz zu eukaryotischen Organismen nicht in der Lage ist, posttranslationale Modifikation durchzuführen, wurde diese Möglichkeit ausgeschlossen.

```

1 MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR ELYAQSVGVG AASRPLANFH QCVWGDKFIV YNPQSSQAGE REQAEELKVE LKRELKEASD NYMRQLKMVD
91 AIQRLGIDYL FVEDVDEALK NLFEMFDAFC KNNHDMHATA LSFLLRQHG YRVSCVFEEK FKDGKDGFK V PNEDGAVAVI EFFEATHLRV
181 HGEDVLDNAF VFTRNYLESV YATLNDPTAN QVHNALNEFS FRRGLPRVEA RKYISTIEQY ASHHKGLLKL AKLDFNLVQA LHRRELSDDS
271 RwwkTLQVPT ELSEVRDRLV ESYFWASGSY FEPNYSVARM ILAKGLAVLS LMDDVYDAYG TFEELQVFTD AIERWDASCL DKLPYMKIV
361 YKALLDVFEV VDEEVIKLGA PYRVYVGKEA MKYAARAYME EAQWREQKHK PTTKEYMKLA TKTCGYITLI ILSFLGVEEG IVTKEAFDWW
451 FSRPPFVEAT LIARLINDI TGCEFENKRE HVRTAVECYM EEHKVKGQEV VSEFYNQMES AWKDINECLL RPAEFPPIPL NLIILNSVRTL
541 EVIYKEGDSY THVGPAMQNI IKQLYLHPVF V-

```

Tabelle 4.6 Über MALDI-MS nachgewiesene Peptidmassen einer Probe von PTSi

Nr.	Start–Ende [Position]	Peptidsequenz	Bestimmte Masse [M+H] ⁺	Theoretische Masse [M+H] ⁺
1	48–61	FIVYNPQSSQAGER	1.595,7817	1.595,7812
2	122–134	NNHDMHATALSFR	1.513,6686	1.513,6964
3	160–179	VPNEDGAVAVLEFFEATHLR	2.214,1231	2.214,1189
4	180–194	VHGEDVLDNAFVFTR	1.718,8513	1.718,8496
5	233–245	YISIQYASHHK	1.638,8092	1.638,7911
6	253–263	LDFNLVQALHR	1.325,7234	1.325,7324
7	275–286	TLQVPTLSFVR	1.389,7652	1.389,7736
8	289–309	LVESYFWASGSYFEPNYSVAR	2.472,1557	2.472,1506
9	397–405	AYMEEAQWR	1.183,4858	1.183,4900
10	563–571	QLYLHPVPY	1.129,5903	1.129,6040

Eine aufgereinigte Probe von PTSi(co) wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und die einzelne Proteinbande aus der Gelmatrix ausgeschnitten. Das Proteingel musste zuvor mit Coomassie angefärbt werden, da eine Silberfärbung die nachfolgende Messung stören würde.

Das Zielprotein wurde zunächst mit DTT behandelt, um mögliche inter- oder intramolekulare Cysteinbrücken zu reduzieren. Das linearisierte Peptid war so besser für den Peptidaseverdau zugänglich. Eine weitere Behandlung mit Iodacetamid (Protokoll siehe B.10.9) führte zur Alkylierung der Cysteine. Diese Abschirmung verhindert Nebenreaktionen, die die spätere Messung stören würden. Hierbei musste beachtet werden, dass Cystein in den Peptidfragmenten nun in Form des Carbamidomethyl-Cysteins vorlag. Je Cysteinrest erhöhte sich somit die Fragmentmasse um 57 Da.

Nach der Vorbehandlung wurde ein Verdau des Zielenzym mit der Endopeptidase Trypsin durchgeführt. Trypsin schneidet Proteine sehr spezifisch am Carboxy-Ende von Lysin- und Arginin-Resten (außer die nächste Aminosäure in der Kette ist ein Prolin). Durch die statistische Verteilung von Lysin und Arginin in Proteinen, wird somit ein charakteristische Fragmentmuster erhalten. Nach tryptischen Verdau über Nacht wurden die Peptide extrahiert und massenspektrometrisch vermessen²⁴.

Durch einen bioinformatischen Verdau der erwarteten Aminosäuresequenz über PeptideMass²⁵ [220], wurden theoretische Peptidmassen erhalten, die den vermessenen Massen zugeordnet werden konnten (Tab. 4.6). Insgesamt wurden 10 Peptide mit Massen über 500 Dalton direkt zugeordnet. Geringe Abweichungen von bis zu 0,1 Da sind dabei Messungenauigkeiten geschuldet. Es wurde eine Sequenzabdeckung von 24 % erzielt.

Die bestimmten Peptidsequenzen wurden zusätzlich über Mascot²⁶ [221] mit den gängigen Proteindatenbanken verglichen. Hierbei wurde die ursprünglich beschriebene Patchoulolsynthase [72] mit einem score von 95 (größer 70 gilt als signifikant, mit $p < 0,05$) und einem E-Wert (Erwartungswert) von 0,00018 als bester Treffer identifiziert. Es konnten allerdings nicht alle manuell identifizierten Peptide der Datenbanksequenz zugeordnet werden, da sich (wie erwartet) die Massen aufgrund der AS-Mutationen zwischen PTS und PTSi unterschieden. Mittels der Methode wurde somit die Identität des hier untersuchten Isoform zusätzlich bestätigt.

4.5.2 Bestimmung des isoelektrischen Punkts von PTSi

Am isoelektrischen Punkt (pI) gleichen sich alle Ladungen der Aminosäuren (Zwitterionen) vollständig aus, so dass das Protein im Ganzen keinerlei Ladung trägt. Der pI ist eine weiterer, wichtiger

²⁴ Analysen durchgeführt am HZI Braunschweig, siehe Kooperierende Arbeiten.

²⁵ http://web.expasy.org/peptide_mass/

²⁶ Matrix Science, <http://www.matrixscience.com/>

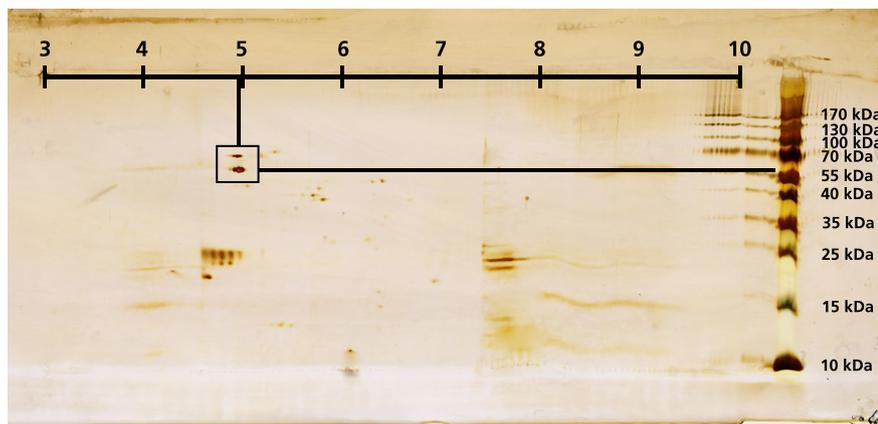


Abbildung 4.37 Eine Probe der aufgereinigten PTSi(co) wurde zunächst über einen pH-Gradienten isoelektrisch fokussiert und anschließend anhand der Molekülgröße elektrophoretisch im 2D-Gel aufgetrennt.

biochemischer Proteinparameter und dient u. a. als weiteres Identitätsmerkmal. Falls das Protein durch eine Ionenaustauscherchromatographie (IEX) aufgereinigt werden soll, spielt der pI und die verwendeten Puffer eine zentrale Rolle. Liegt der pH-Wert über dem pI, besitzt das Protein eine negative Ladung, während bei $\text{pH} < \text{pI}$ das Protein positiv geladen ist.

Allgemein sollten sich Extraktionspuffer bzw. Aktivitätspuffer immer um mindestens 2 pH-Werte vom pI unterscheiden, da es ansonsten zu einer Agglomeration bzw. Fällung des jeweiligen Proteins kommen kann (wenn $\text{pH} = \text{pI}$). Über die Säurekonstanten (pK_S) der Aminosäuren wurde ein theoretischer pI von 5,17 für die PTSi AS-Sequenz errechnet (vgl. Tabelle auf Seite 51). Diesen galt es nun experimentell abzusichern, da noch kein pI Wert für das Isoenzym zuvor bestimmt wurde. Bei der ursprünglich beschriebenen PTS wurde ein $\text{pI} \sim 5$ ermittelt [72].

Eine Probe der aufgereinigten PTSi wurde zunächst mit einem pH-Gradientengel von pH 3–10 über isoelektrisches Fokussierung anhand des pI aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Auftrennung anhand des Molekulargewichts in der zweiten Dimension (vgl. B.10.8). In Abb. 4.37 ist das silbergefärbte 2D-Gel abgebildet. Dem Proteinspot bei dem erwarteten MW kann ein angenäherter pI-Wert von $\sim 5,0$ zugeordnet werden. Der pI liegt somit im Bereich des zuvor theoretisch ermittelten Wertes und deckt sich mit dem der ursprünglich beschriebenen PTS. Für alle Puffersysteme sollte stets ein pH-Wert über 7 gewählt werden ($\text{pH} 7,5$ wurde verwendet), um ein Ausfällen (mit Aktivitätsverlust) zu vermeiden.

4.5.3 Aktivitätsnachweise über GC-FID

Zunächst wurde eine reproduzierbare und sensitive GC-Methode entwickelt, um die Sesquiterpenprodukte effizient auftrennen und präzise quantifizieren zu können. Dazu wurden Testreihen mit dem komplexen Patchouli-Öl (kommerzieller Standard) durchgeführt, welches aus über 24 Sesquiterpenoiden zusammengesetzt ist. Als Säule wurde eine unpolare Silica-Kapillarsäule (5% Diphenyl-, 95% Dimethyl-Siloxan) verwendet. Ein zweistufiges Temperaturprogramm (vgl. B.14) lieferte für das Aromaöl ein ideales Trennergebnis. Die Fraktion der Sesquiterpene besaßen bei dieser Methode eine Retentionszeit im Bereich zwischen 8–16 min. Ein Flammenionisationsdetektor (FID) wurde zum Nachweis der Terpenverbindungen eingesetzt, da sich dieser besonders zur Detektion von Kohlenwasserstoffen über einen sehr weiten Konzentrationsbereich eignet. Zudem liegt die Nachweisgrenze bei einem FID sehr niedrig.

Für Biotransformationsversuche im mL-Maßstab wurde eine Einzelgefäß-Assaymethode für Terpensynthasen adaptiert [222]. In 5 mL-Glasröhrchen wurde, mit Mg^{2+} supplementierter, STPS-

Aktivitätspuffer vorgelegt (Tab. A.5). Die Gefäße waren durch PTFE/Butylgummi-Septen luftdicht verschließbar, um Entweichen der flüchtigen Produkte zu minimieren. Durch Einsatz der PTFE-Beschichtung wurde ein Herauslösen von Kontaminanten (leachables) aus dem Gummi vermieden, die die empfindliche Messmethode stören würden. Die Zugabe von zweiwertigen Kationen war für die Aktivität der Synthase essentiell. In Ansätzen ohne Magnesiumchlorid konnte zuvor keine Aktivität nachgewiesen werden.

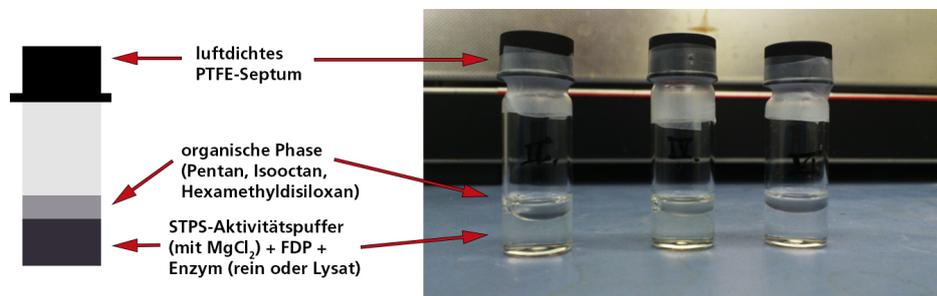


Abbildung 4.38 Zu dem STPS-Aktivitätspuffer mit $MgCl_2$ wird die Enzymlösung und das Substrat FDP hinzupipettiert. Durch Überschichtung mit einem organischen Lösungsmittel (Pentan, Isooctan und Hexamethyldisiloxan) werden die zyklisierten Sesquiterpene eingefangen. Aufgrund der Volatilität der Verbindungen, muss ein luftdichter Abschluss des Reaktionsgefäßes durch ein Teflon (PTFE)/Butylgummi-Septum erfolgen.

Das aufgereinigte Enzym wurde in einer Konzentration von $25 \mu g mL^{-1}$ eingesetzt. Bei Testung von Rohextrakten wurden direkt $100 \mu L$ des Zellysats nach Aufschluss hinzugegeben. Das zuvor synthetisierte FDP besaß eine Endkonzentration von $150 \mu M$ im Puffersystem. Der Reaktionsansatz wurde mit Aktivitätspuffer auf ein konstantes Endvolumen von $1 mL$ aufgefüllt, und sofort mit organischem Lösungsmittel überschichtet. Die organische Phase diente dazu, die hydrophoben Terpenkohlenwasserstoffe direkt nach ihrer Zyklisierung aufzufangen (Abb. 4.38).

In vorhergehenden Arbeiten wurde ein Temperaturoptimum für eine ursprünglich beschriebene PTS von $40^\circ C$ ermittelt [72], so dass diese Temperatur auch für das Isoenzym PTSi als optimal angesehen wurde. Nach Inkubation der Proben für 30 min , wurden diese extrahiert und die Phasen mittels Zentrifugation getrennt. Die obere organische Phase wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und unter Stickstoff aufkonzentriert.

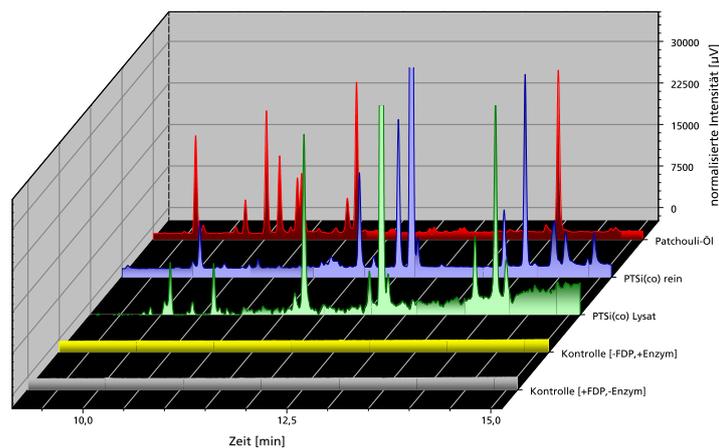


Abbildung 4.39 GC-FID Chromatogramme von Umsetzungsversuchen mit Lysat und aufgereinigtem PTSi(co) Enzym.

Hierbei zeigte sich ein Nachteil von Pentan als eingesetztes Lösungsmittel. Aufgrund seines sehr niedrigen Siedepunkts von $36^\circ C$ weist Pentan bereits bei Raumtemperatur einen hohen Dampfdruck auf. Dies erschwerte die Handhabung da die Aufkonzentration auf ein konstantes Volumen von $50 \mu L$ nicht reproduzierbar durchgeführt werden konnte. Es wurden daher Hexamethyldisiloxan

sowie Isooctan als Alternativen eingesetzt. Beide Lösungsmittel sind durch ihren hohen Siedepunkt (ca. 100 °C) einfacher handhabbar, allerdings verlängerte sich die Zeitspanne zur vollständigen Aufkonzentration der Produktlösungen. Im Gegensatz zu Isooctan ist Hexamethyldisiloxan gesundheitlich unbedenklich und für die Applikation auf der Haut zugelassen (Verwendung in Pflastern um Hautirritation zu vermeiden) [223]. Dies würde somit zukünftig die direkte Verwendung der gelösten Enzymprodukte z. B. als Parfüm ermöglichen.

Als Negativkontrollen wurden Ansätze von Enzym/Rohlysat ohne die Zugabe des Substrats verwendet. Zusätzlich wurden Umsetzungsversuche mit Rohextrakt aus einem nicht transformierten BL21(DE3)-Stamm durchgeführt, um die Zyklisierung der Terpenoide durch endogen vorhandene *E. coli* Enzyme auszuschließen.

Im Wasserfalldiagramm 4.39 sind die Chromatogramme von Umsetzungsversuchen mit PTSi(co) (aufgereinigt und Zelllysat des Expressionsstammes) dargestellt. Es wurde aufgrund der bekannten Zusammensetzung [70] angenommen, dass es sich bei dem Peak mit größter Fläche im Patchouli-Öl Standard (Ret. Zeit ca. 14 min) um (-)-Patchoulol handeln muss. Auch die Ansätze mit PTSi(co) zeigten die Zyklisierung des Terpenalkohols (-)-Patchoulol. Zudem wurden weitere Bestandteile des Patchouli-Öls gebildet, allerdings in niedrigeren Konzentrationen. Auffällig ist ein Produktpeak bei ca. 12,5 min, der sich nicht im Standard wiederfinden lässt. Die Konzentration dieser unbekannt Substanz schwankte, lag jedoch höher als die des erwarteten Hauptprodukts (-)-Patchoulol. Die Retentionszeit ließ auf ein mögliches Sesquiterpenoid schließen.

In den Ansätzen ohne FDP (nur Rohlysat) lassen sich keine Terpenprodukte nachweisen. *E. coli* synthetisiert für eigene intrazelluläre Stoffwechselprozesse FDP. Allerdings sind die Konzentrationen wie erwartet zu niedrig, um sie nach Zyklisierung durch die heterologe Synthese mit der verwendeten Methode nachweisen zu können. Auch die Umsetzung mit Rohlysat eines nicht-transformierten Stammes zeigte keine Biokatalyse von Sesquiterpenoiden bei den betrachteten Retentionszeiten. Es ist daher davon auszugehen, dass alle Terpenprodukte ausschließlich durch die exprimierte PTSi zyklisiert wurden.

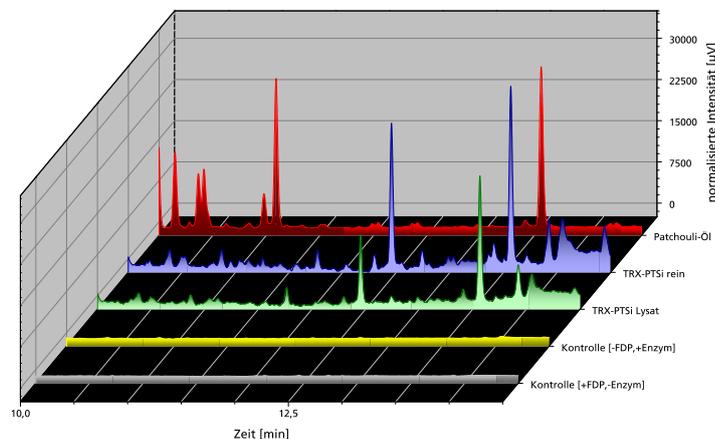


Abbildung 4.40 GC-FID Chromatogramme von Umsetzungsversuchen mit Lysat und aufgereinigtem TRX-PTSi Enzym.

Auch das mit Thioredoxin fusionierte Isoenzym katalysierte die Bildung von (-)-Patchoulol (Abb. 4.40). Auch in diesem Fall wurde ein in der Intensität stark schwankender zweiter Produktpeak identifiziert, der nicht im Standard wiederzufinden war. Obwohl die TRX-Domäne nach Aufreinigung nicht abgespalten wurde, konnte in allen Fällen eine Aktivität der Synthese nachgewiesen werden. Eine aufwändiger Peptidaseverdau mit angeschlossenen Aufreinigungsschritten, die unweigerlich zu Ausbeuteverlusten führen würden, sind daher für das TRX-PTSi Konstrukt nicht

notwendig. Auch die Ansätze mit TRX-PTSi katalysierten die Bildung von weiteren, zunächst noch unbekanntem, Komponenten des Patchouli-Öls.

Umsetzungsversuche mit unlöslichen Proteinpellets (inclusion bodies) zeigten keinerlei Ausbildung von Sesquiterpenoiden (Chromatogramme nicht gezeigt). Die korrekte Faltung und Löslichkeit des rekombinanten Enzyms scheint somit essentiell für dessen Aktivität zu sein. Da keine Standards einzelner Patchouli-Öl Komponenten als Reinstoffe verfügbar waren, musste die Produktidentifizierung massenspektrometrisch (GC-MS) erfolgen.

4.5.4 Produktspektrum PTSi über GC-MS Analytik

Für die MS-Analytik wurden alle Proben kalt (ohne beheizten Probenport), direkt auf die Säule injiziert (cold on-column injection). Dadurch wurden Zersetzungsreaktionen verhindert, die das native Produktspektrum verfälschen würden. Die aufgetrennten Substanzen wurden durch Ionenbeschuss aus einer Ionenquelle (EI, electron ionization) in Molekülfragmente zerlegt und diese entsprechend ihres m/z -Verhältnisses (Masse-zu-Ladung) aufgetrennt (Parameter im Anhang unter B.15). Dadurch wurde für jeden einzelnen Produktpeak ein charakteristisches Fragmentationsspektrum erhalten. Durch Vergleich mit Literaturdaten und einer Datenbankrecherche²⁷ konnte den einzelnen Spektren eine wahrscheinliche Molekülstruktur zugeordnet werden.

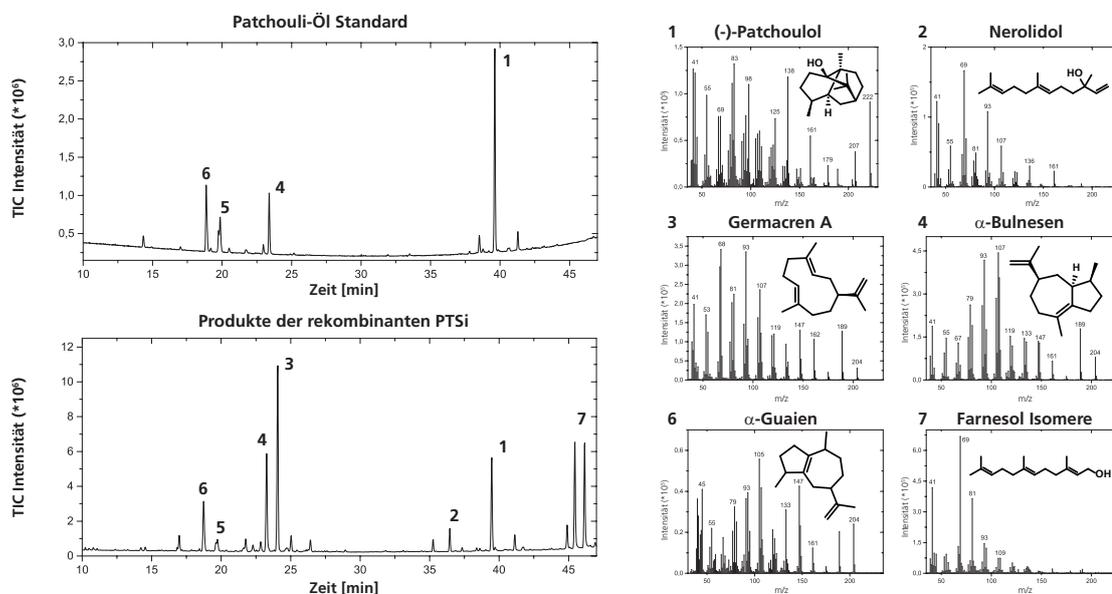


Abbildung 4.41 Vergleich der GC-MS Spektren von Patchouli-Öl Standard (kommerziell) und dem Enzymprodukt von TRX-PTSi (Rohextrakt verwendet). Die sechs häufigsten Sesquiterpenkomponenten sind in beiden Proben vorhanden und wurden ihren jeweiligen Fragmentspektren zugeordnet.

Durch Auftrennung von Patchouli-Öl, sowie der Umsetzungsprodukte von TRX-PTSi bei identischen Parametern, konnten die einzelnen Verbindungen anhand ihrer übereinstimmenden Retentionszeiten und Fragmentspektren eindeutig zugeordnet werden. Die häufigsten Komponenten des Patchouli-Öls sind auch im Enzymprodukt enthalten. Es finden sich sowohl der Terpenalkohol (-)-Patchoulol (1), als auch Mitglieder der Guaianyl- (4, 6) und der Patchoulen-Familie (5) in beiden Proben wieder (Abb. 4.41). Die Produktmischung des Rohlysats enthielt zudem die Farnesol-Isomere, die in Proben des aufgereinigten Enzyms nicht wiedergefunden werden konnten. Die Bildung von Farnesol kann über endogene Phosphatasen erklärt werden, die die Phosphate des Substrats FDP hydrolysieren, so dass wieder die Ausgangsverbindung Farnesol (Isomerengemisch) erhalten wird.

Aufgrund der angewandten Methode war es es nicht möglich, einzelne Enantiomere der Sesquiterpenverbindungen eindeutig zu identifizieren. Da jedoch bei den Produktmischungen der charakteristische Patchouli-Duft olfaktorisch wahrgenommen wurde, kann von der Bildung des (-)-Patchoulols ausgegangen werden. Das Enantiomer (+)-Patchoulol riecht nur äußerst schwach oder ist teilweise gar nicht wahrnehmbar [73].

Abweichend zum kommerziellen Aromaöl war (-)-Patchoulol nicht die Hauptkomponente in den Enzymprodukten von TRX-PTSi bzw. PTSi(co), wie bereits die zuvor durchgeführten GC-FID Messungen darlegten. Interessanterweise konnte Germacren A, ein direkter Vorläufer des Guaianyl-Kations, als häufigstes Sesquiterpen identifiziert werden (4). Germacren A kann nur durch kalte Injektion gaschromatographisch detektiert werden, da es bei höheren Temperaturen eine Cope-Umlagerung zu β -Elemen vollzieht [224]. Bei den unbekanntem Produktpeaks der GC-FID Messungen scheint es sich daher um zu β -Elemen umgelagertes Germacren A zu handeln, da über einen 240 °C heißen Probenport injiziert werden musste.

Weder Germacren A noch β -Elemen lassen sich im nativen Patchouli-Öl wiederfinden. Dies beruht möglicherweise auf der Instabilität der Verbindung, da die Blätter einige Wochen in der Sonne trocknen, bevor sie über Wasserdampfdestillation extrahiert werden. Viele thermolabile Sesquiterpenverbindungen werden unter diesen Bedingungen zersetzt, oxidiert oder umgelagert. Die Zusammensetzung des Aromaöls unterscheidet sich also zwangsläufig etwas von dem biokatalytisch erzeugten Terpengemisch. Umsetzungen mit nativer, pflanzlicher PTS bestätigten bereits zuvor diese Vermutung [167].

Vielleicht sind in *P. cablin* noch nicht identifizierte Synthasen vorhanden, die das Germacren A als Substrat weiter derivatisieren oder zu komplexeren Terpenprodukten umlagern. Für die ursprünglich rekombinant produzierte PTS konnte die Bildung von Germacren A/ β -Elemen nur in absoluten Spurenkonzentrationen (unter 1 %) nachgewiesen werden [72].

Durch Modellierung der Enzymstruktur, Docking des Substratmoleküls und Vergleich der aktiven Zentren, sollte nun ein möglicher Erklärungsansatz für das abweichende Produktspektrum postuliert werden. Die dreidimensionalen Strukturen der Patchoulolsynthase oder des Isoenzym wurden noch nie zuvor näher untersucht. Es existieren keine Röntgenkristallstrukturdaten.

4.6 MODELLIERUNG DER ENZYMSTRUKTUR

Die Ableitung einer (möglichst realitätsnahen) Tertiärstruktur für ein neuartiges Protein, gilt trotz moderner Algorithmen als äußerst komplexe Aufgabe. Bei einem kritischen Vergleich von Röntgenkristallstrukturen mit den zuvor errechneten bioinformatischen Modellen, konnte innerhalb der letzten Jahre eine stetige Verbesserung der Strukturvorhersagen gezeigt werden (CASP, Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction) [225].

Als anspruchsvoll und fehlerbehaftet gilt die *ab initio* bzw. *de novo* Modellierung. Dabei wird ohne jegliche Strukturvorlage das Modell ausgehend von physikalischen und molekularen Gesetzmäßigkeiten errechnet. Dieser Vorgang ist äußerst zeitintensiv und Bedarf enormer Rechenkapazitäten. Zudem sind noch nicht alle energetischen Wechselwirkungen auf atomarer oder subatomarer Ebene aufgeklärt, so dass in vielen Fällen Vereinfachungen und Modelle angewendet werden müssen.

Aufgrund der unzähligen möglichen Konformationen, die ein gefaltetes Polypeptid einnehmen könnte, kann durch die *ab initio* Modellierung nur eine sehr grobe Struktur des realen Proteins abgeleitet werden. Es konnten zwar bereits einzelne Faltungsstufen von Peptiden ansatzweise dynamisch simuliert werden [226], zur Zeit gilt diese Methode jedoch nur bei sehr kleinen Proteinen (unter 10 kDa) als aussagekräftig [227]. Aufgrund der Größe von PTSi wurde dieser Ansatz als nicht zielführend erachtet.

Tabelle 4.7 Alle aktuell (Stand: Ende 2014) bekannten Röntgenkristallstrukturen von Terpensynthasen

Nr.	PDB ID	Name	Klasse	Organismus	Jahr	Quelle
1	5EAS	5-Epi-Aristolochensynthase	STPS	Tabak	1997	[34]
2	1N1B	(+)-Bornyldiphosphatsynthase	MTPS	Salbei	2002	[228]
3	2J5C	Cineolsynthase	MTPS	Salbei	2007	[229]
4	2ONG	Limonensynthase	MTPS	Minze	2007	[230]
5	3G4D	(+)- δ -Cadinensynthase	STPS	Baumwolle	2009	[231]
6	3NoG	Isoprensynthase	Pathway	Pappel	2010	[232]
7	3SAE	α -Bisabolensynthase	STPS	Küsten-Tanne	2011	[233]
8	3P5P	Taxadiensynthase	DTPS	Pazifische Eibe	2011	[234]
9	3S9V	Abietadiensynthase	DTPS	Küsten-Tanne	2012	[235]
10	4FJQ	Amorphadiensynthase	STPS	Beifuß	2013	[236]

Bei homology modelling wird von einer homologen Röntgenkristallstruktur eines nahe verwandten Proteins ausgegangen. Mittels Sequenzdatenbanken werden zunächst ähnliche Proteinsequenzen identifiziert (z. B. PSI-BLAST [186]). Über die PDB-Strukturdatenbank (Protein Data Bank²⁸ [237]) können die experimentell ermittelten Röntgenkristall- oder NMR-Strukturen abgerufen werden. Die Auswahl einer möglichst präzisen und ähnlichen Struktur als Vorlage gilt als zentraler Schritt in jedem Modellierungsprozess.

Im Falle der PTSi waren die Auswahlmöglichkeiten äußerst begrenzt, da aktuell lediglich 4 STPS Kristallstrukturen und 10 TPS Strukturen insgesamt bekannt sind (Tab. 4.7). Durch einen systematischen Sequenzvergleich konnten jedoch sowohl die Isoprensynthase (PDB 3NoG [232], möglicher evolutorischer Vorläufer aller TPS) als auch die Limonensynthase (PDB 2ONG [230]) als geeignete Strukturvorlagen ausgewählt werden. Als nächste (strukturverwandte) STPS wurde die 5-Epi-Aristolochensynthase (PDB 5EAS [34]) ermittelt.

Zunächst erfolgte der Aufbau des α -C-Proteinrückgrats anhand der festgelegten homologen Kristallstrukturen. Dabei werden Konflikte wie sterische Hinderungen beachtet. Die Modellierung einzelner Aminosäure-Seitenketten ist häufig problematisch, da hierbei zusätzlich unterschiedliche Atomradien, Bindungswinkel und Drehwinkel mit einbezogen werden müssen.

Kombiniert wurde dieser Prozess mit einem als threading/fold recognition bezeichneten Verfahren. Trotz der häufig großen Sequenzdiversität zwischen Proteinen wird vermutet, dass nur eine begrenzte Zahl an charakteristischen Faltungsmustern in der Natur existiert [238]. Neue Proteine werden daher manuell anhand ihrer Funktion, Struktur und Sequenz in Klassen, Folds, Superfamilien, Familien und Domänen eingeteilt. Die Datenbanken SCOP [239], CATH [240] und PFAM [241] haben sich als Standard für die Proteinklassifizierungen durchgesetzt.

Somit konnten auch Strukturvorlagen aus entfernten Proteinfamilien mit in den Prozess integriert werden (z. B. α -helicale Strukturen mit Metallbindungsdomäne, charakteristisch für STPS). Durch threading konnte die räumliche Struktur, insbesondere die Lage der Seitenketten, weiter verfeinert werden. Als lokale Software für den iterativen Modellierungsvorgang wurde I-TASSER²⁹ [242] eingesetzt. Wie zuvor in großen Vergleichsstudie gezeigt werden konnte [225], liefert I-TASSER insbesondere dann sehr realitätsnahe Strukturmodelle, wenn nur wenige homologe Vorlagen verfügbar sind.

Die hochvariablen Schleifen-Regionen zwischen einzelnen α -Helizes wurden dabei über eine komplexe Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion, unter Einbeziehung von geometrischen Kriterien (Sterik, Ladung, etc.), angenähert [243]. Allerdings muss man in diesen Bereichen des Modells, insbe-

²⁸ Bekannteste Datenbank mit über 100.000 Proteinstrukturen, verfügbar unter <http://www.rcsb.org/>

²⁹ <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

sondere am C- und N-Terminus, von der größten Abweichung zur (unbekannten) realen Kristallstruktur ausgehen.

Tabelle 4.8 Gütebewertung der besten PTSi-Strukturmodelle

Name	C-score	Erw. RMSD [Å]	Erw. TM-score
PTSi	1,04	$5,3 \pm 3,4$	$0,86 \pm 0,07$
TRX-PTSi	0,43	$7,0 \pm 4,1$	$0,77 \pm 0,1$

Nach Energieminimierung des gesamten Moleküls wurde das beste Modell anhand seines errechneten C-scores [242]. ausgewählt. Eine endgültige Qualitätsüberprüfung und Energieminimierung erfolgte über Anolea³⁰ (atomic non-local assessment) [244].

In Tab. 4.8 sind die erhaltenen Gütebewertungen der besten erzielten Proteinmodelle von PTSi und TRX-PTSi aufgelistet. Als kombiniertes Maß der Modellqualität gilt der C-score. Er trifft eine Aussage darüber, wie gut sich das jeweilige Modell mit der (wahrscheinlichen) realen Struktur des Enzyms deckt. Er bezieht mehrere Modellparameter mit ein, und liegt im Wertebereich zwischen -5 und 2 , wobei ein höherer Wert auf eine höhere Modellgüte hinweist. Generell können Modelle mit einem C-score über 0 bereits als aussagekräftige Annäherungen an die Röntgenkristallstruktur angesehen werden.

Durch den RMSD-Wert (root-mean-square deviation of atomic positions) wird der durchschnittliche Abstand aller einzelnen Atome zwischen zwei verglichenen Strukturen quantifiziert. Es werden die räumlichen Entfernungen über das gesamte Molekül (global) herangezogen. Die Einheit des RMSD-Werts ist Ångström (Å) [245]. Aufgrund der globalen Betrachtung der Atomabstände, können lokale Abweichungen (z. B. am Anfang und Ende der Polypeptidkette) den RMSD stark erhöhen, obwohl die generelle Topologie des Modells korrekt ist.

Um diese Übergewichtung etwas abzumildern, wurde der TM-score [246] eingeführt. Bei diesem Gütekriterium werden kleine Atomabstände stärker gewichtet als sehr große Abstände. Lokal begrenzte Modellfehler gehen so nicht mehr überproportional in die Bewertung ein. Ein TM-score über $0,5$ (ein Wert von 1 wäre eine exakte Übereinstimmung) deutet auf ein solides Strukturmodell hin. Da keine Kristallstrukturen zur Verfügung stehen, sind die RMSD-Werte und TM-scores in diesem Fall als abgeschätzte Werte zu verstehen, die sich auf eine hypothetische Struktur mit C-score 2 beziehen.

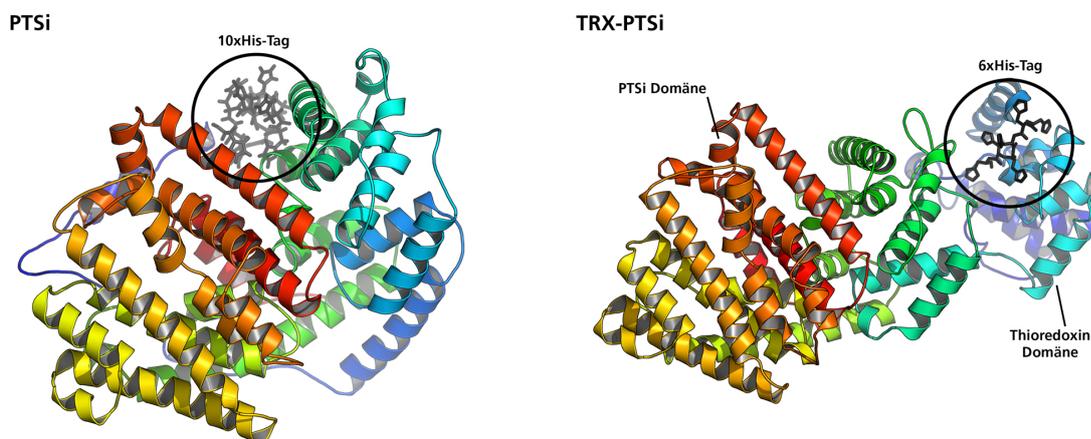


Abbildung 4.42 Cartoon-Darstellung von PTSi mit Thioredoxin-Fusionsdomäne. Das His-Tag befindet sich an der Oberfläche des Proteins.

³⁰ über SWISS-MODEL Structure & Model Assessment Tools, <http://swissmodel.expasy.org/>

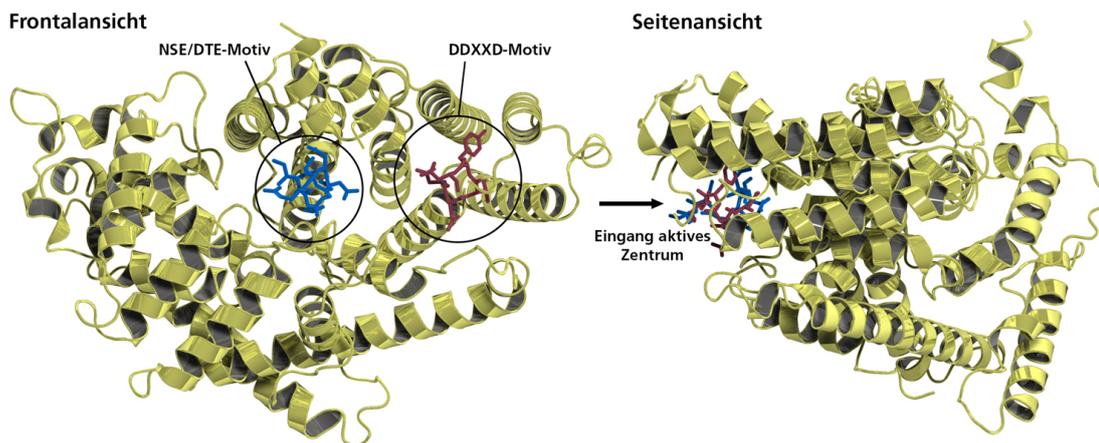


Abbildung 4.43 Front- und Seitenansicht eines errechneten PTSi-Strukturmodells. Die beiden Sequenzmotive am Eingang des (postulierten) aktiven Zentrums sind hervorgehoben.

Durch die hier angewandte Modellierungsstrategie, eine Kombination aus homology modelling und threading, konnten somit realitätsnahe Strukturen von PTSi und TRX-PTSi erzeugt werden. Alle typischen Qualitätskriterien für Proteinmodelle konnten erfolgreich erfüllt werden (Tab. 4.8). Dies ermöglicht nun fundierte Aussagen über strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Enzyms. PTSi ist ausschließlich aus parallelen und antiparallelen α -Helizes, verbunden über kurze Schleifen, aufgebaut (Abb. 4.42). Diese Zusammensetzung entspricht dem charakteristischen Aufbau von bereits kristallisierten STPS [26].

Da TRX-PTSi mit Thioredoxin über Linkersequenzen verknüpft ist, die längere Schleifenstrukturen ausbilden, befindet sich das intramolekulare His-Tag exponiert an der Oberfläche und nicht versteckt im Inneren der Struktur. Dies ermöglichte die (experimentell bestätigte) effiziente Bindung an den IMAC-Chelatkomplex. Anhand der reinen AS-Sequenz kann keine Aussage über den räumlichen Abstand der einzelnen Domänen getroffen werden. Die Struktur verdeutlicht allerdings auf den ersten Blick die große Entfernung der Thioredoxin-Domäne vom eigentlichen Enzym. Dies erklärt den geringen Einfluss des Fusionsproteins auf die Enzymaktivität (Abb. 4.42).

In Abb. 4.43 sind die beiden zentralen Sequenzmotive farblich hervorgehoben. Die Motive binden Metallkationen (Mg^{2+}) und gelten somit auch als primäre Bindungsstelle für das Substrat, wie bereits in Cokristallisationsstudien mit einer verwandten STPS gezeigt werden konnte [34]. Sie flankieren das aktive Zentrum, das im Falle der PTSi aus einer tunnelartigen Struktur mit 6 parallelen und anti-parallel α -Helizes aufgebaut ist.

Die mögliche Bindung des Substrats FDP an die Strukturmotive über Mg^{2+} -Kationen, sowie dessen Orientierung am Eingang der aufgezeigten Tunnelstruktur, sollte nun anhand von Docking-Simulationen analysiert werden.

4.6.1 Docking-Simulationen mit dem Substrat FDP

Die Simulationen wurden aufgrund des elektrochemisch komplexen Bindungssystems (Aminosäurerest–Metallkation–Phosphatrest) und des hohen Rechenaufwands in Zusammenarbeit mit einem externen Dienstleister durchgeführt (Cam-D Technologies GmbH, Essen)³¹. Bei einem Protein-Docking wird die Bindung eines Liganden (hier: Substratmolekül) an einen Rezeptor (das Enzym) anhand von Kraftfeldern und energetischen Wechselwirkungen berechnet.

³¹ Beschreibung des Vorgehens zusammengestellt nach persönlicher Kommunikation mit Frau Dr. Annamarie Fiethen, Mitarbeiterin Cam-D. Auswertung der Daten erfolgte durch den Autor.

Dadurch können Aussagen getroffen werden, wo das Substrat am Enzym bindet (wahrscheinliches aktives Zentrum) und welche Orientierung/Lage es dort nach Energieminimierung einnehmen wird.

Hierbei ist jedoch zu beachten, dass über Docking keine dynamischen, biokatalytischen Reaktionen (Bindungsbrüche, Umlagerungen, usw.) simuliert werden. Die Produktbildung ist ein mehrstufiger Prozess, der teilweise im Inneren des Enzyms stattfindet. Auch der Bildungsmechanismus von Zwischenprodukten kann nicht nachvollzogen werden. Dies bedarf weitaus komplexerer molekulardynamischer Simulationen, die aufgrund mangelnder Kenntnisse über den exakten Reaktionsmechanismus nicht durchgeführt werden konnten.

Zunächst wurden alle Wasserstoffatome an das Modell angefügt. Um den korrekten Protonierungsgrad der Aminosäurereste abbilden zu können, wurde der experimentell bestimmte isoelektrische Punkt als eine von vielen Randbedingungen mit einbezogen. Auch der optimale pH-Wert (Aktivitätsoptimum) musste hierbei beachtet werden. Das Enzym wird (virtuell) in ein Lösungsmittel (H_2O) überführt und ein für Proteine standardisiertes Kraftfeld angelegt. Die gesamte Struktur relaxiert und ein absolutes Energieminimum wird erreicht.

Das so vorbereitete Proteinmodell der PTSi wurde anschließend in eine starre Struktur (grid = dreidimensionales Gitter) eingebunden. Einzelne Aminosäuren waren nun nicht mehr beweglich. Alle Atome wurden fest in Raum fixiert, wodurch das Modell jegliche Dynamik verlor. Nur das Substratmolekül war während der Simulation beweglich. Diese Vereinfachung ist notwendig um die Simulationen in endlicher Rechenzeit durchführen zu können. Das erhaltene Grid bildete alle Eigenschaften der PTSi (Partiellladungen, inter- und intramolekulare Kräfte, komplexierte Mg^{2+} -Ionen, Schleifen, Schichtstrukturen) exakt ab. Obwohl die Lage bekannt war, wurde die Position des aktiven Zentrums (DDXXD- und NSE/DTE-Motive) explizit **nicht** als Randbedingung definiert.

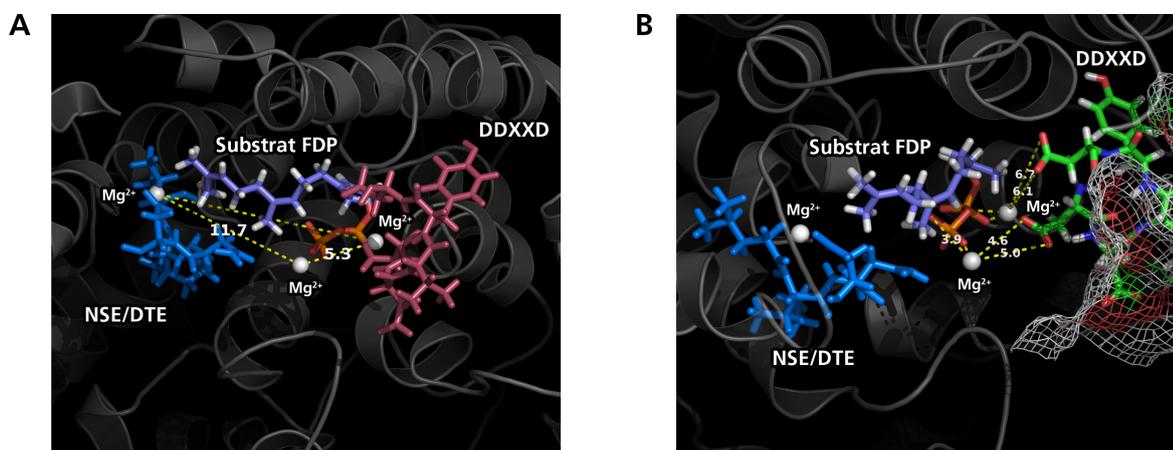


Abbildung 4.44 (A) Ideale Lage und Orientierung des Substrats FDP nach den Simulationsläufen. DDXXD-Motiv an Komplexierung von 2 Mg^{2+} beteiligt. (B) Abstände der Phosphatreste und beteiligten Aminosäuren von den komplexierten Mg^{2+} -Ionen. Alle Entfernungen in Ångström.

Das Substratmolekül wurde nun wahllos im dreidimensionalen Raum ausgesetzt und wanderte aufgrund molekularer Wechselwirkungen entlang des Gitters. Am Ende der iterativen Simulation wurden jeweils mehrere mögliche Konformationen für das Substrat erhalten, bei denen ein Energieminimum erreicht wurde. Diese gedockten Strukturen, auch Posen genannt, zeigen mit hoher Wahrscheinlichkeit die Region der ersten Substratbindung an.

In Abb. 4.44 ist eine ideale Konformation des Substrats am Eingang des aktiven Zentrums dargestellt. Das DDXXD-Motiv ist laut Berechnungen an der Bindung von zwei Magnesium-Ionen beteiligt, während das dritte Kation im Bereich des NSE/DTE-Motivs komplexiert. Die drei Ionen

spannen ein Dreieck mit den Kantenlängen 5,3 Å, 11,7 Å und 15,2 Å in der Ebene auf. Das Substrat FDP orientiert sich an den Eingang des hydrophoben Tunnels. Das weiter entfernt liegende Magnesium-Ion ist an der initialen Bindung zunächst scheinbar nicht direkt beteiligt (Abb. 4.44, A). Man kann vermuten, dass die an DDXXD komplexierten Kationen die Abspaltung des Pyrophosphats initiieren, während das NSE/DTE-Magnesium im Falle der PTSi zunächst einen stabilisierenden Effekt auf das entstehende Carbokation ausübt.

In Abb. 4.44 (B) sind die Abstände des Substrat–Enzym Komplexes dargestellt. Während die Entfernungen der Metallkationen von den Sauerstoffatomen (der Phosphate am FDP) im Mittel zwischen 2–4 Å liegen, befinden sich die Carboxyfunktionen der beteiligten AS-Reste durchschnittlich 4–7 Å entfernt. Die eher großen molekularen Abstände lassen auf eine schwache Wechselwirkung schließen, dennoch konnten bei einer verwandten Röntgenkristallstruktur zuvor ähnliche Entfernungen vermessen werden [34].

Es muss beachtet werden, dass die gedockte Struktur nur einen einzelnen statischen Zeitpunkt während der Komplexbildung abbildet und sich die Bindungslängen durch dynamische Verschiebungen noch verkürzen werden. Der Ionenradius des Mg^{2+} ist maßstabsgetreu dargestellt und beträgt bei der hier dargestellten Koordinationszahl von IV 0,57 Å [247].

Um die Bindungsaffinität des Liganden quantifizieren zu können, wurden empirische Scoring-Werte für die einzelnen Konformationen anhand einer komplexen Scoring-Funktion errechnet. Diese Funktion bezieht lipophile Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen sowie polare Wechselwirkungen zwischen Substrats und Enzym mit ein [248]. Die Scoring-Werte spiegeln die Gibbs-Energie (ΔG) der Ligand–Rezeptor/Substrat–Enzym Bindung wieder und werden in kJ mol^{-1} angegeben. Für die besten Posen/Konformationen wurde für das Substrat ein ΔG von $-3,406 \text{ kJ mol}^{-1} (\pm 0,053)$ erhalten. Negative Werte deuten auf eine exergone Reaktion hin, die freiwillig abläuft.

4.6.2 Strukturvergleiche mit PTS

Durch einen strukturellen Vergleich mit einem Proteinmodell der ursprünglich beschriebenen PTS [72] sollten nun AS identifiziert werden, die möglicherweise für das veränderte Produktspektrum verantwortlich sind. In Abb. 4.45 sind alle über das zuvor durchgeführte Alignment (Abb. 4.15 auf S. 43) bestimmten Aminosäureaustausche grün hervorgehoben. Viele Austausche fanden in Bereichen weit entfernt von der initialen Binderegion bzw. dem aktiven Zentrum statt. Ein Einfluss dieser Variationen auf das Produktspektrum kann als sehr unwahrscheinlich angesehen werden. Das DDXXD-Motiv ist auch in der PTS-Isoform konserviert. Durch umfassende Mutationsstudien konnte zuvor gezeigt werden, dass insbesondere das NSE/DTE-Motiv als zweite Binderegion einen großen Einfluss auf das Produktspektrum ausübt. Mutationen in diesem Sequenzbereich führen häufig zu einer erhöhten Produktanzahl oder verschieben das Produktspektrum. Weitere Zyklisierungsreaktionen werden so ermöglicht bzw. finden bevorzugt statt [26, 43]. Auch PTSi weist einige Aminosäureaustausche in dieser wichtigen Region auf.

Zum direkten Strukturvergleich wurde ein Proteinmodell der PTS analog zur PTSi mit übereinstimmenden Strukturvorlagen und Parametern berechnet. Anschließend wurden beide Modelle strukturell mit dem SALIGN Algorithmus überlagert [249]. Übereinstimmende Helizes werden dabei Atom-für-Atom auf der jeweils anderen Struktur abgebildet. In Bereichen mit veränderter Aminosäurezusammensetzung werden strukturelle Variationen sichtbar. Abb. 4.46 (A) zeigt die Veränderungen in der Binderegion am Eingang des aktiven Zentrums (Lysin nach Asparagin Pos. 458, Histidin nach Cystein Pos. 454 und Valin nach Isoleucin Pos. 448). Sechs weitere Austausche fan-

(schwach basisch vs. neutral) und LYS-ASN₄₅₈ (basisch vs. neutral) den größten Einfluss auf die Reaktion aus. Es kann postuliert werden, dass durch diese AS-Substitutionen die Deprotonierung des Germacradienyl-Kations nun bevorzugt abläuft (D). Dies würde den Anteil von Germacren A im Produktgemisch erhöhen. Zudem könnte Germacren A durch die veränderte Struktur möglicherweise das Enzym vorzeitig verlassen, bevor weitere Zyklisierungsreaktionen (z. B. Bildung von Pogostol, α -Bulnesen, · · ·) stattfinden können.

Da weder der genaue Reaktionsmechanismus der PTSi noch die exakte Struktur-Aktivitäts-Beziehung von STPS bekannt sind, müssten diese bioinformatisch abgeleiteten Hypothesen durch zukünftige Punktmutationsstudien bewiesen werden.

4.6.3 Zusammenfassung Charakterisierung PTSi

Über MALDI-MS Analysen konnte die Identität des aufgereinigten Isoenzym eindeutig nachgewiesen werden. Durch 2D-Gelelektrophorese wurde der noch unbekannte isoelektrische Punkt des Enzyms experimentell angenähert. Wie GC-FID Messungen von Sesquiterpenprodukten zeigten, blieb die Aktivität des fusionierten Enzyms erhalten. Eine proteolytische Abspaltung der Thioredoxin-Domäne nach Aufreinigung war daher überflüssig. Interessanterweise wich das Produktspektrum der Isoform von der beschriebenen PTS [72] ab. Während (-)-Patchoulol, als Hauptkomponente des ätherischen Patchouli-Öls, auch von PTSi gebildet wird, ist nun Germacren A (bzw. das Umlagerungsprodukt β -Elemen) die Hauptkomponente der hier identifizierten Isoform.

Durch fundierte Proteinmodelle und Docking-Simulationen konnten erste Hinweise, zu den wahrscheinlich an der Produktbildung beteiligten Aminosäureresten erhalten werden. Es wurden sinnvolle Ziele für zukünftige Punktmutationsstudien ausgewählt, die weiter Informationen zum exakten Katalysemechanismus von PTSi liefern könnten.

4.7 PRODUKTION DER α -HUMULENSYNTHESE

Die zuvor anhand von PTSi gewonnenen Erkenntnisse über STPS, sollten nun als Basis für Untersuchungen an weiteren rekombinanten Synthesen dienen. Ziel war es, ein breites Portfolio an STPS-exprimierenden Stämmen zu erzeugen, die später als Modellorganismen für die Stoffwechsel-Coexpression dienen sollten. Ein Auswahlkriterium war dabei, dass die Zyklisierungsprodukte hochwertige und funktionelle Sesquiterpene seien mussten.

Häufig weisen STPS eine hohe Produktpromiskuität auf, was jedoch die Produktanalytik und -quantifizierung sehr erschwert. Daher wurden solche Zyklasen ausgewählt, von denen bekannt oder vermutet wurde, dass sie nur ein begrenztes Produktspektrum mit möglichst einem Hauptprodukt aufweisen.

Analog zu PTSi sollten mögliche Isoformen oder cDNA-Varianten in den cDNA-Bibliotheken der exotischen Pflanzen identifiziert und umfassend charakterisiert werden. Da bereits Literaturdaten zur α -Humulensynthase verfügbar waren [86], sollte im Fall dieser STPS lediglich die rekombinante Produktion ermöglicht und die Produktbildung nachgewiesen werden.

4.7.1 Plasmidkonstruktion α -Humulensynthase

Bereits zuvor konnte eine α -Humulensynthase (kurz HUM) aus Shampoo Ingwer (*Zingiber zerumbet*) in einer cDNA-Bibliothek der Pflanze nachgewiesen und ansatzweise beschrieben werden [86]. Die

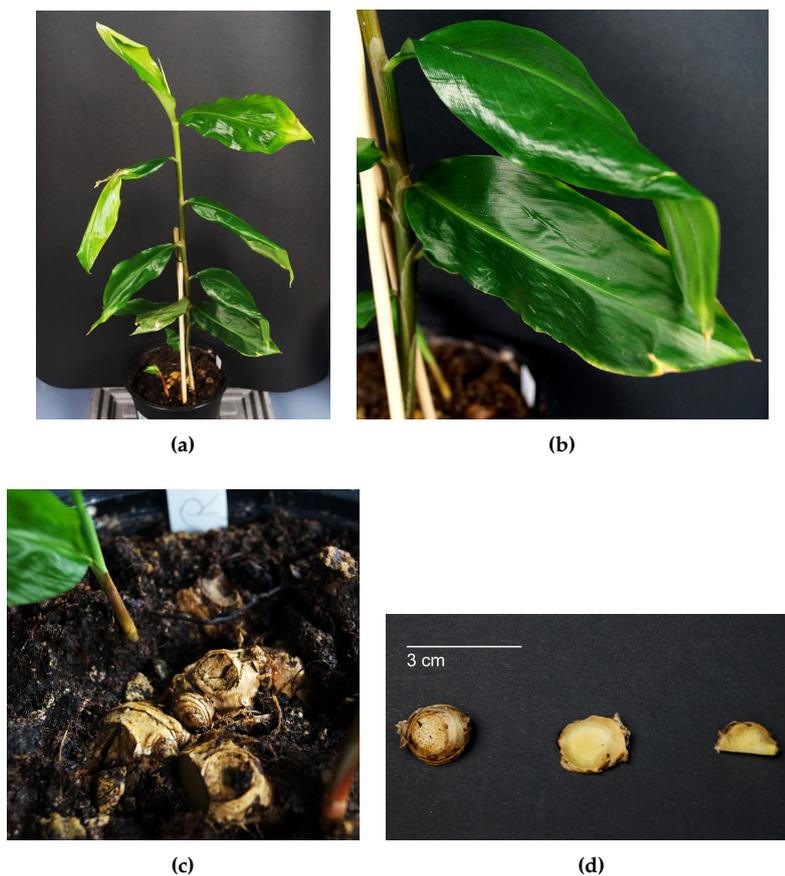


Abbildung 4.47 (a) Stängel und Laubblätter des Shampoo-Ingwer (*Zingiber zerumbet*). (b) Detailansicht der glatten Blätter. (c) Aus der Erde ragender Teil des Ingwer-Rhizoms. (d) Skalpelli-Anschnitte des Rhizoms vor RNA-Extraktion.

Synthase HUM katalysiert, mit einem Anteil von über 95 %, fast ausschließlich die Bildung des Sesquiterpens α -Humulen.

Das strukturverwandte β -Caryophyllen ist mit 5 % der einzige Minorbestandteil im Produktgemisch [86]. Die STPS ist somit eine Ausnahme von der Regel, dass Mitglieder der Enzymklasse häufig eine hohe Produktpromiskuität aufweisen. Mit einer Sequenzlänge von 1.647 Bp (548 AS) liegt HUM im für STPS charakteristischen Größenbereich um 1.500 Bp.

Durch ein multiples Sequenzalignment konnten die β -Eudesmolsynthase und Germacren-D-synthase (Abb. 4.48), anhand der Sequenzhomologie, als am nächsten verwandte Zyklasen identifiziert werden. β -Eudesmol und Germacren D ähneln α -Humulen in ihren Terpengrundkörpern (zwei Sechsringe, bei Humulen zu 11-Ring erweitert), was in diesem Fall durch die vergleichbare Enzymstruktur bedingt sein könnte (Struktur-Aktivitäts-Beziehung).

α -Humulen, als direkter Vorläufer des potenten Zytostatikums Zerumbon [89], ist eine äußerst wertvolle und funktionell interessante Terpenverbindung. Aufgrund der wenigen charakteristischen Gruppen am Molekül gestaltet sich eine chemische Synthese des Humulen-Grundkörpers als schwierig (vgl. Schema Abb. 3.16 auf S. 20), was einen biokatalytischen Ansatz auch hier äußerst attraktiv macht und sinnvoll erscheinen lässt.

Durch Amplifikation mit, von der veröffentlichten Sequenz (Acc. No. AB247331) abgeleiteten, Primern (Tab. A.10), sollte die codierende Sequenz für eine α -Humulensynthase aus der pflanzlichen Genbibliothek isoliert werden. Frische Exemplare der Gattung *Zingiber zerumbet* (Abb. 4.47) wurden bezogen (Exotische Nutz- und Zierpflanzen, Seeheim-Jugenheim) und eine cDNA-Bibliothek, analog zu Patchouli, durch Extraktion und reverse Transkription der mRNA angelegt. Die Expression

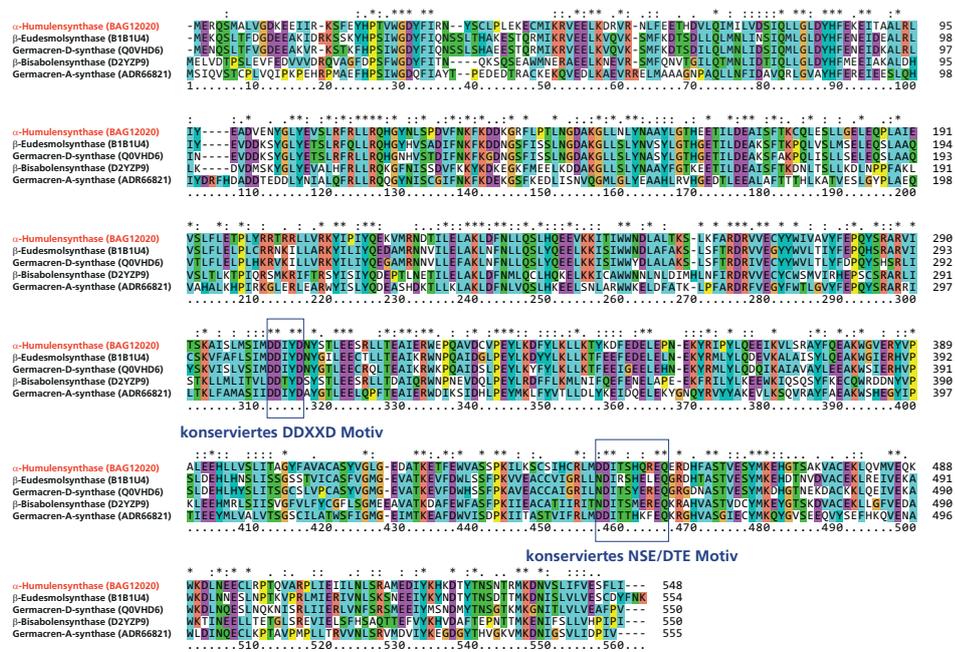


Abbildung 4.48 Aminosäure-Sequenzalignment der in dieser Arbeit verwendeten *α*-Humulensynthase [86] mit anderen bekannten STPS, welche die höchste Sequenzidentität aufwiesen (identifiziert über PSI-Blast [186]). Gen-Bank ID der Sequenzen jeweils in Klammern. Multiples Sequenzalignment durchgeführt mit Clustal W [184] Algorithmus.

der STPS ist *in planta* stark gewebeabhängig und findet fast ausschließlich in dem Rhizom/Erd-spross statt, was durch Analyse der Genexpression in den verschiedenen Organellen gezeigt werden konnte [86].

Durch die auch zuvor bei Patchouli angewandte AGPC-Extraktionsmethode (vgl. B.2.1), konnte aus dem polysaccharidreichen und verholztem Pflanzenmaterial keine nachweisbare Menge an RNA extrahiert werden. Es wurde daher ein Protokoll für eine auf CTAB basierende Extraktionsmethode (vgl. B.2.2) angepasst und erweitert, welche sich insbesondere zur RNA-Gewinnung aus schwierigen Matrices eignet. Das Verfahren findet z. B. in der Gerichtsmedizin (Fingernägel oder Knochenmaterial) Anwendung. Durch mehrstufige Abtrennung der Polysaccharide und langsames Ausfällen über Lithiumchlorid konnten bis zu 18,35 µg Gesamt-RNA aus ursprünglich 2 g Rhizom erhalten werden.

Allerdings wurde auch nach Optimierung des PCR-Programms, Verlängerung/Verkürzung der Primern und nach mehrmaliger Wiederholung der Extraktion unter variierten Bedingungen, kein spezifisches PCR-Amplifikat im Größenbereich um 1.500 Bp erhalten (Beispiel DNA-Gel im Anhang D.1).

Dies deutete auf eine qualitativ zu schlechte Genbibliothek hin, wodurch eine Amplifikation der STPS-cDNA nicht durchführbar war. Neben der schwierigen Probenmatrix könnte hier auch die transiente Expression der STPS eine Rolle gespielt haben. Wahrscheinlich befanden sich die verwendeten Ingwer-Pflanzen alle in einem Wachstumsstadium, in dem (temporär) nur sehr wenig *α*-Humulen durch die Pflanze produziert wurde. Somit lag womöglich die allgemein schon sehr geringe Konzentration an STPS-codierender mRNA nochmals niedriger.

Aufgrund der schwierigen Verfügbarkeit des exotischen Ingwers war es nicht möglich, Pflanzenmaterial in unterschiedlichen Wachstumsstadien zu beziehen. Um eine funktionale heterologe Expression der *α*-Humulensynthase in *E. coli* trotz dieser Limitierungen dennoch realisieren zu können, wurde als Alternativstrategie die codierende Sequenz in Form doppelsträngiger DNA Strings synthetisiert.

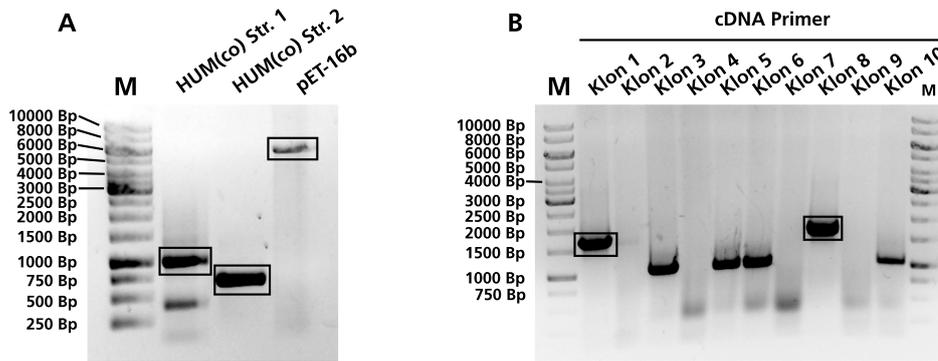


Abbildung 4.49 (A) Analytisches DNA-Gel der PCR-Amplifikate vor Klonierung des Konstrukts. Erwartete Fragmentlängen: 5.711 Bp pET-16b (Vektor), 1.010 Bp String 1 und 694 Bp String 2. Klon 1 und Klon 8 positiv. (B) Kolonie-PCR transformierter Klone mit genspezifischen Primern. Erwartete Länge = 1.704 Bp.

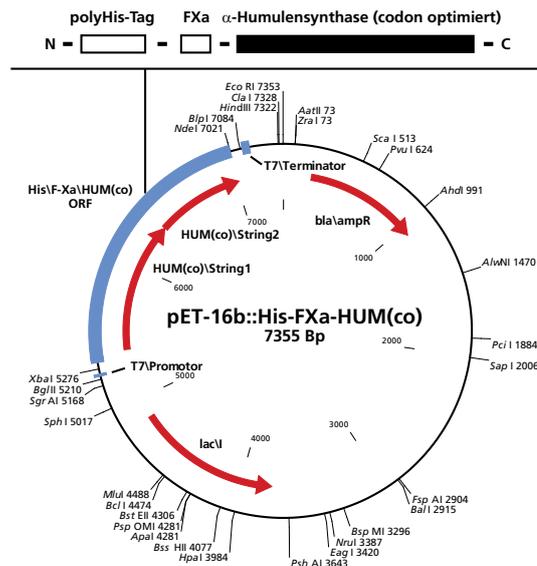


Abbildung 4.50 Plasmidkarte des Konstrukts zur Expression der α -Humulensynthase

Um eine erwartete Expressionslimitierungen in *E. coli* von Beginn an auszuschließen, wurde die ursprünglich publizierte native cDNA-Sequenz zuvor Codon-optimiert. Der Adaptionsindex CAI [194] konnte durch 211 Transitionen und 198 Transversionen von 0,488 auf 0,708 erhöht werden.

Seamless cloning in das Vektorrückgrat pET-16b wurde nach PCR-Amplifikation durch spezifische überlappende Primer durchgeführt (Abb. 4.49, A). Durch Kolonie-PCR konnten zwei korrekte Klone identifiziert werden, deren Plasmidkonstrukte zur Absicherung des korrekten ORFs jeweils doppelt sequenziert wurden (vgl. C). Die schematische Plasmidkarte des Codon-optimierten α -Humulensynthasekonstrukts kann in Abb. 4.50 nachvollzogen werden.

4.7.2 Expressionsoptimierung im SK-Maßstab

Das sequenzierte Plasmid pET-16b::HUM(co) wurde in einen BL21(DE3) Expressionsstamm transformiert. Bevor dieser als Modellstamm für Stoffwechsel-Coexpression eingesetzt werden konnte, musste zunächst die lösliche Enzymexpression nachgewiesen, und grundlegende Kultivierungsparameter bestimmt werden. Die biochemischen (theoretischen) Proteinparameter von HUM(co) laut Sequenz des ORF sind in Tab. 4.9 aufgelistet³².

³² Proteinparameter bestimmt über ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)

Tabelle 4.9 Berechnete Proteinparameter der α -Humulensynthese

Konstrukt/ORF	theor. MW	theor. pI	Ext. Koeff.
pET-16b::HUM(co)	66,770 kDa	5,65	$90.815 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Parallele Kultivierungen in LB- (Abb. 4.51) und TB-Medium (Abb. 4.52) bei Temperaturen zwischen 18–37 °C nach Induktion wurden durchgeführt. Die IPTG-Konzentrationen wurden im Bereich zwischen 0,01–1 mM variiert.

Bereits nach 4 h konnte eine Überexpression des Enzyms in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden, allerdings nur bei einer niedrigen Kultivierungstemperatur von 18 °C. Höhere Temperaturen führten zur vollständigen Agglomeration des Zielproteins in inclusion bodies (Gele des unlöslichen Zellpellets nicht gezeigt). Nach 22 h wurde eine maximale Zielproteinkonzentration von 61 mg g^{-1} BTM bei einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} 4,2$ erzielt (18 °C). Die Induktorkonzentration hatte hier keinen nachweisbaren Einfluss auf die Produktausbeuten (Abb. 4.51).

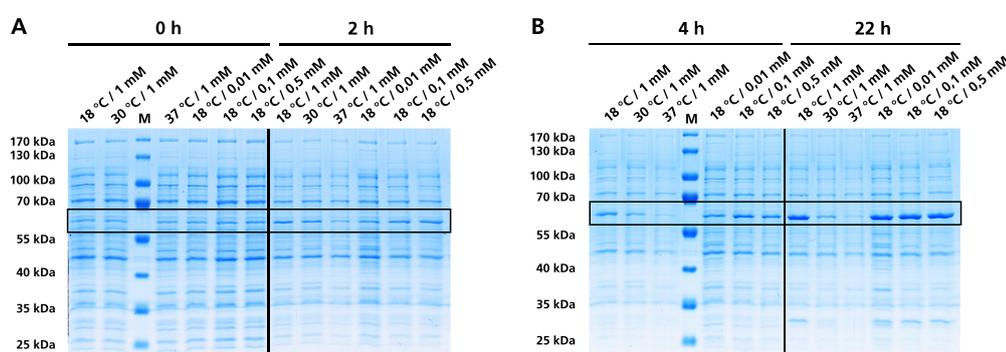


Abbildung 4.51 Expressionsexperimente pET-16b::HUM(co) in LB-Medium bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen und Induktorkonzentrationen. Schüttelgeschwindigkeit 150 rpm. Gele des löslichen Rohextrakts nach Zellaufschluss. Proben normiert anhand der Zelldichte.

Durch Kultivierung in reichhaltigerem TB-Medium, konnten die Enzymausbeuten weiter gesteigert werden. Auch hier zeigte sich bei 30 °C und 37 °C eine starke Agglomeration bei der erwarteten Proteinbande im Gel (Gelbild nicht gezeigt), so dass selbst nach 22 h keine Überexpression von HUM erkennbar war (Abb. 4.52). Die Produktausbeuten bezogen auf die Biomasse wurden um 39 % auf $66,7 \text{ mg g}^{-1}$ BTM bei 18 °C erhöht (optische Dichte bei Zellernte $\text{OD}_{600} 9,1$). Auch hier konnte keine Korrelation zwischen IPTG-Konzentration und löslichen Enzymausbeuten festgestellt werden.

Zur Produktion der rekombinanten α -Humulensynthese in BL21(DE3) wurde daher in nachfolgenden Versuchen stets TB-Medium und eine niedrige Kultivierungstemperatur unterhalb von 20 °C eingesetzt. Um eine vollständige Induktion zu gewährleisten, wurden 0,5 mM IPTG verwendet.

Da die Enzymausbeuten bereits höher lagen als bei der Thiothionin-fusionierten PTSi ($66,7 \text{ mg g}^{-1}$ vs. 53 mg g^{-1} BTM), wurde auf Einsatz von Fusionsstrategien bei HUM verzichtet. Die Expressionsergebnisse lassen vermuten, dass HUM eine etwas einfachere Struktur als PTSi aufweist, wodurch wahrscheinlich eine effizientere Faltung in *E. coli* Expressionsstämmen ermöglicht wird.

Auch die Verteilung von hydrophoben Bereichen an der Oberfläche könnte hier eine Rolle spielen. Röntgenkristallstrukturen von HUM sind noch nicht verfügbar. Die hohe Tendenz von STPS zur Bildung von inclusion bodies bei normalen Kultivierungstemperaturen, konnte jedoch auch bei HUM nachgewiesen werden.

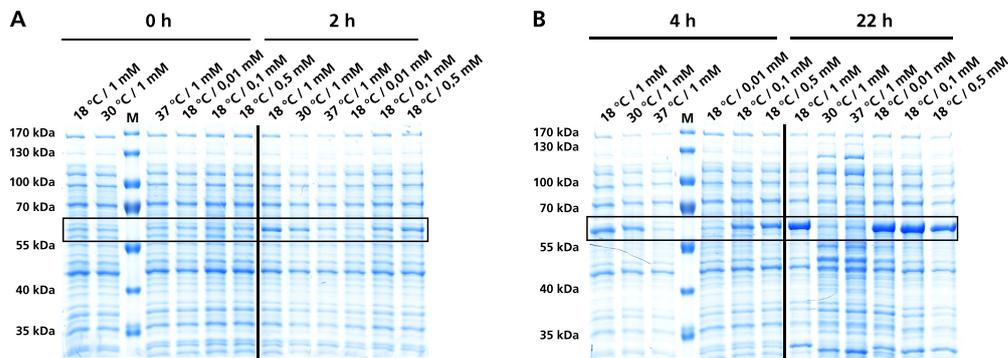


Abbildung 4.52 Expressionsexperimente pET-16b::HUM(co) in TB-Medium bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen und Induktorkonzentrationen. Schüttelgeschwindigkeit 150 rpm. Gele des löslichen Rohextrakts nach Zellaufschluss. Proben normiert anhand der Zelldichte.

4.7.3 Aktivitätsnachweis Humulensynthase

Zum Nachweis der Produktbildung wurde lösliches Zelllysat (Gesamtproteingehalt 10 mg mL^{-1}) von induzierter Biomasse des BL21(DE3) pET-16b::HUM(co) Expressionsstammes verwendet. Der Zellaufschluss wurde gekühlt in mit 5 mM MgCl_2 supplementiertem STPS-Aktivitätspuffer durchgeführt (Tab. A.5).

Verschiedene Konzentrationen zwischen $100\text{--}400 \mu\text{M}$ des Substrats FDP wurden für die Umsetzungsversuche eingesetzt. Nach Überschichtung mit Isooctan wurde für 90 min beim bekannten Temperaturoptimum von 30°C [86] inkubiert. Die Produktanalytik erfolgte über GC-FID mit der zuvor etablierten Chromatographiemethode. Der kommerziell verfügbare, authentische α -Humulen Standard (Sigma-Aldrich, USA) wies eine Retentionszeit von 8,84 min auf (Abb. 4.53, B).

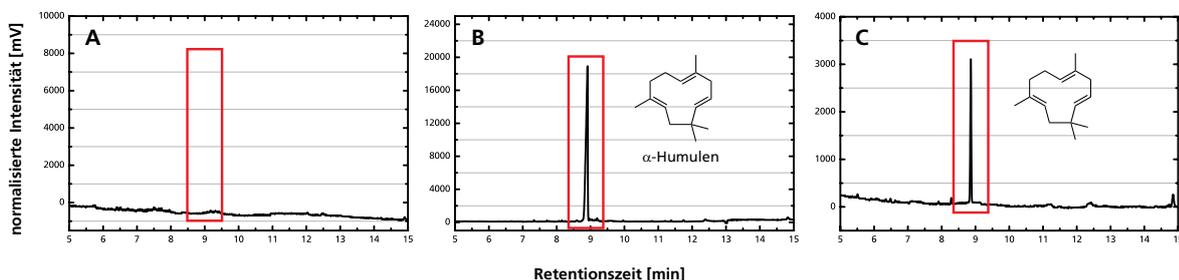


Abbildung 4.53 (A) Umsetzung von FDP mit Rohextrakt eines BL21(DE3)-Wildtyps als Negativkontrolle. (B) Authentischer α -Humulenstandard in 1:1000 Verdünnung. (C) Aktivitätstest mit Rohextrakt nach Kultivierung von BL21(DE3) pET-16b::HUM(co). Es wurden $100 \mu\text{M}$ FDP eingesetzt.

In organischen Phasen von Proben des inkubierten Enzyms, konnte bei identischer Retentionszeit ein einzelner Terpenpeak identifiziert werden, bei dem es sich um α -Humulen handelte (Abb. 4.53, C). Die Zyklisierungsreaktion hin zum Minorbestandteil β -Caryophyllen konnte nicht direkt bestätigt werden, da ein authentischer Standard dieser Verbindung nicht verfügbar war. Möglicherweise entspricht der Peak bei 8,21 min diesem Nebenprodukt, da man für β -Caryophyllen aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu α -Humulen eine ähnliche Retentionszeit erwarten kann (Strukturen in Abb. 3.15c auf S. 19). Das Peakintegral des undefinierten Minorbestandteils lag jedoch unterhalb von 2%, bezogen auf das Integral über das gesamte Chromatogramm. Zuvor wurde ein Produktanteil des β -Caryophyllens von 5% ermittelt [86].

In umgesetzten Proben eines nicht-transformierten BL21(DE3)-Stammes (Abb. 4.53, A), sowie in Proben mit Rohextrakt ohne Zugabe des Substrats (Chromatogramme nicht gezeigt), konnte keine Produktbildung gezeigt werden. Die spontane Zyklisierung des Substrats zum Produkt kann durch die Negativkontrollen ausgeschlossen werden.

4.7.4 Zusammenfassung α -Humulensynthase

Die Amplifikation der codierenden Sequenz einer Humulensynthase, ausgehend cDNA-Bibliothek von Shampoo Ingwer, war aufgrund der Probenbeschaffenheit nicht direkt möglich. Durch Assemblierung von synthetischen DNA Strings konnte ein Expressionsstamm erzeugt werden, der diese Synthase mit vergleichsweise hohen Ausbeuten löslich sowie aktiv überexprimiert. Die produzierte Synthase ermöglichte die biokatalytische Darstellung des wertvollen Zerumbon-Vorläufers α -Humulen aus chemisch-synthetisierten FDP.

Im späteren Abschnitt 4.9 wird dieser Modellstamm, nach Cotransformation mit Stoffwechsellzymen, zur erstmaligen Darstellung dieses funktionellen Sesquiterpens durch synthetische Biotechnologie eingesetzt.

4.8 PRODUKTION UND CHARAKTERISIERUNG EINER (+)-ZIZAENSYNTASE

Die Nukleotidsequenz einer postulierte (+)-Zizaensynthase wurde zuvor patentiert [250], allerdings waren keine näheren experimentellen Daten über dieses Enzym verfügbar. Daher wurde die Zyklase auf mehreren Ebenen charakterisiert. Im Fokus stand dabei unter anderem die Expressionsoptimierung, Aufreinigung und Bestimmung der Reaktionskinetik, die im Falle von STPS aus Mangel an einfachen Enzymassays in der Durchführung sehr aufwändig ist.

4.8.1 Plasmidkonstruktion (+)-Zizaensynthase

Die cDNA-Sequenz einer STPS mit möglicher Zizaensynthase-Aktivität wurde zuvor patentiert [250], allerdings nicht näher beschrieben und charakterisiert. Da (+)-Zizaen ein unmittelbarer Vorläufer der wertvollen Duftkomponenten Khusimol und Khusimon ist (vgl. 3.17b auf S. 21), wurde die Verbindung als hoch interessantes Modellterpen erachtet.

Über eine Datenbankrecherche der translatierten Nukleotidsequenz (KP231534) konnten die β -Sesquiphellandrensynthase (C5YHI2) sowie eine β -Caryophyllensynthase (ABY79211) als STPS mit höchster Sequenzähnlichkeit ermittelt werden, wobei die Identität allerdings unterhalb von 52 % lag. Durch ein Alignment auf AS-Ebene, konnten sowohl das konservierte DDXXD-, als auch das NSE/DTE-Motiv zugeordnet werden (Abb. 4.55). Das Polypeptid ist daher zweifelsohne ein Mitglied der Terpenzyklasen Protein-Superfamilie.

Zunächst sollte auch bei dieser Zyklase eine direkte Amplifikation der nativen Sequenz durch abgeleitete Primer erfolgen, um mögliche Isoformen erfolgreich isolieren zu können. Hierzu konnte getrocknetes Wurzelmaterial von *Chrysopogon zizanooides* aus Madagaskar über die Symrise AG (Holzminden) bezogen werden (Abb. 4.54a und 4.54b). Da die Wurzeln mehrere Wochen nach Ernte getrocknet wurden, konnte selbst durch die zuvor optimierte CTAB-Extraktionsmethode keine quantifizierbare Menge an RNA isoliert werden.

Es wurde daher nochmals frisches Pflanzenmaterial von der Symrise AG zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um zwei Kultivare von unterschiedlichen Plantagen, die nur wenige Tage zuvor geerntet und vor Transport Vakuum-versiegelt wurden, um so ein Austrocknen zu verhindern (Abb. 4.54c und 4.54d). Dennoch wurde mit einer erheblichen Degradation der RNA durch RNAsen gerechnet, da ein gekühlter Transport nicht möglich war.

Aus jeweils 2,5 g Wurzelmaterial konnten bis zu 3,475 μ g (Kultivar 1) bzw. 1,22 μ g (Kultivar 2) Gesamt-RNA erfolgreich extrahiert werden. Nach reverser Transkription der mRNA, konnte durch PCR mit abgeleiteten Primern ein spezifisches Amplifikat im Längenbereich um 1.600 Bp in einer



Abbildung 4.54 (a) Stark getrockneter Wurzelballen von Vetiver-Gras (*Chrysopogon zizanioides*). (b) Detailansicht der Wurzelstränge. (c) Vetiver-Gras mit frischen Wurzeln und Erdanhaftungen (Kultivar 1, direkt aus Madagaskar). (d) Vetiver-Gras mit frischen Wurzeln und Erdanhaftungen (Kultivar 2, Madagaskar).

Probe des Kultivars 1 nachgewiesen werden. Nach Optimierung der Ausbeute durch Erhöhung der PCR-Zyklenzahl, wurde das erhaltene Fragment in das pET-16b Vektorrückgrat kloniert, transformiert und sequenziert (DNA-Gele im Anhang D.2).

Die Auswertung der Sequenzierdaten ergab, dass keine STPS, sondern eine ATP-bindende Domäne, konjugiert an einen Transkriptionsregulator, aus dem ubiquitär vorhandenen Bodenbakterium *Comamonas testosteroni* (WP_043376045) amplifiziert wurde. Die Gesamtlänge der klonierten Nukleotidsequenz betrug 1.557 Bp. Möglicherweise waren, trotz einem Waschschrift in Wasser und Ethanol, noch kleine Erdanhaftungen mit Kolonien des Bakteriums am rauhen Wurzelmaterial vorhanden, wodurch die cDNA-Bibliothek kontaminiert wurde. Die für die gesuchte STPS codierende mRNA war höchstwahrscheinlich in dem verfügbaren Material bereits ganz oder teilweise degradiert, und konnte daher nicht in voller Länge isoliert werden. Eine direkte Nukleinsäureisolation nach Ernte des Pflanzenmaterials ist aufgrund der prozessiven RNAsen sehr wichtig, war jedoch im Falle von Vetiver-Gras nicht umsetzbar.

Um dennoch eine rekombinante Produktion mit anschließender Charakterisierung des Enzyms zu ermöglichen, wurde wie zuvor bei der α -Humulensynthase vorgegangen. Die Nukleotidsequenz aus dem Patent (HI931360) wurde Codon-optimiert, und der CAI somit von 0,551 auf 0,707 erhöht. Die Sequenz konnte in Form von mehreren doppelsträngigen DNA-Strings synthetisiert werden,

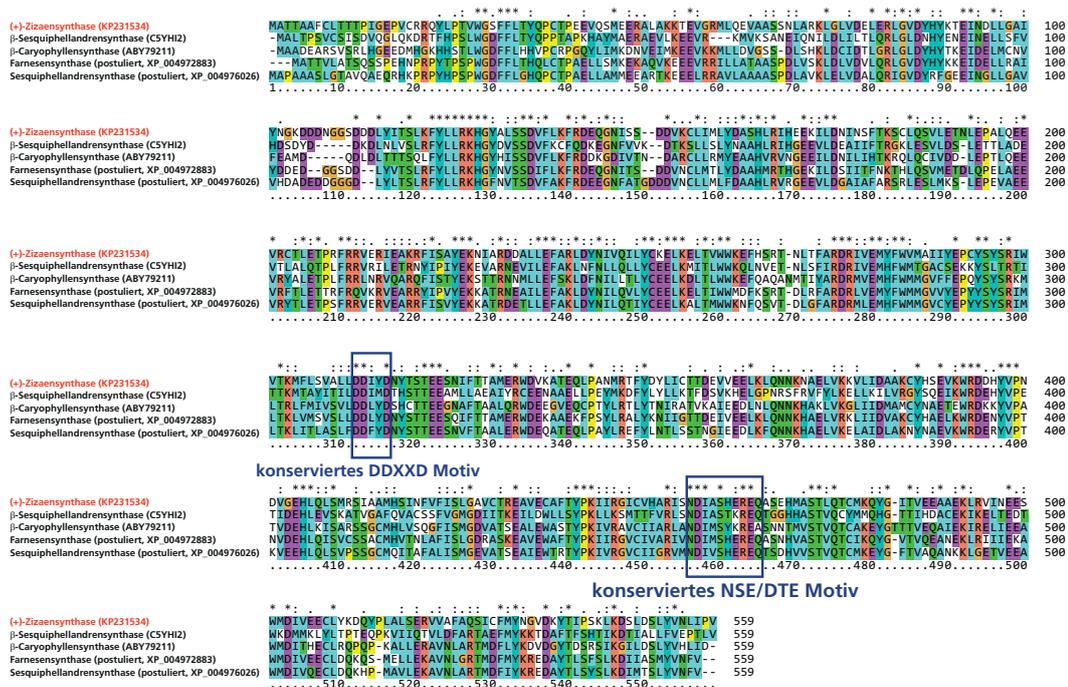


Abbildung 4.55 Aminosäure-Sequenzalignment der in dieser Arbeit charakterisierten (+)-Zizaensynthase ([250], [251]) mit anderen bekannten oder postulierten STPS, welche die höchste Sequenzidentität aufwiesen (identifiziert über PSI-Blast [186]). GenBank ID der Sequenzen jeweils in Klammern. Multiples Sequenzalignment durchgeführt mit Clustal W [184] Algorithmus.

und wurde über seamless cloning in das etablierte Vektorrückgrat pET-16b einkloniert (Abb. 4.56, A+B).

Hierbei zeigte sich erneut die anscheinend starke Abhängigkeit der STPS-Expression vom jeweils gewählten Produktionssystem. Obwohl sowohl PTSi als auch HUM sehr erfolgreich löslich in pET-16b exprimiert werden konnten, war dies mit der Codon-optimierten (+)-Zizaensynthase (kurz ZIZA) nicht mal ansatzweise möglich. In Schüttelkolbenversuchen war eine aktive Produktion selbst bei niedrigen Temperaturen unter 20 °C sowie nach Variation der IPTG-Konzentrationen, nicht möglich (Beispiel folgt in Abschn. 4.8.2).

Die lösliche und aktive Produktion von ZIZA stellte zunächst eine große Herausforderung dar, die durch zwei Lösungsansätze angegangen werden sollte. Zum einen sollte die Expression durch Verknüpfung mit einem Ubiquitin-ähnlichen Fusionsprotein gesteigert bzw. erst ermöglicht werden. Das SUMO-Protein (small Ubiquitin-like modifier) bindet als posttranslationale Modifikation kovalent an Polypeptide in der Zelle. Im Gegensatz zur Bindung an Ubiquitin, wird jedoch nicht anschließend die Degradation des Proteins initiiert. Vielmehr dient es der Stabilisierung der Proteinstruktur, sowie als transkriptionaler Regulator *in vivo*. Die Mitglieder der SUMO-Familie sind meist ~100 AS lang und haben somit ein MW im Bereich um 12 kDa, abhängig vom Organismus [252, 253].

Durch N-terminale Fusion an die Zielsequenz konnte bereits zuvor eine erhebliche Steigerung des löslichen Expressionslevels bei einigen rekombinant produzierten Proteinen gezeigt werden [254, 255]. Es wird angenommen, dass in *E. coli* die schnelle Faltung der kompakten SUMO-Domäne die Ausbildung der korrekten Tertiärstruktur eines C-terminal angefügten Polypeptids unterstützt. Durch proteolytischen Verdau mit der hochspezifischen SUMO-Protease (ULP-1) [256], besteht zudem die Option, dass Fusionsprotein effizient vom Zielprotein zu entfernen. Dabei wird, im Unterschied zu anderen häufig verwendeten Peptidasen, nicht eine AS-Sequenz als Schnittstelle benötigt. Vielmehr wird die gesamte Struktur von SUMO durch ULP-1 erkannt und geschnitten [255].

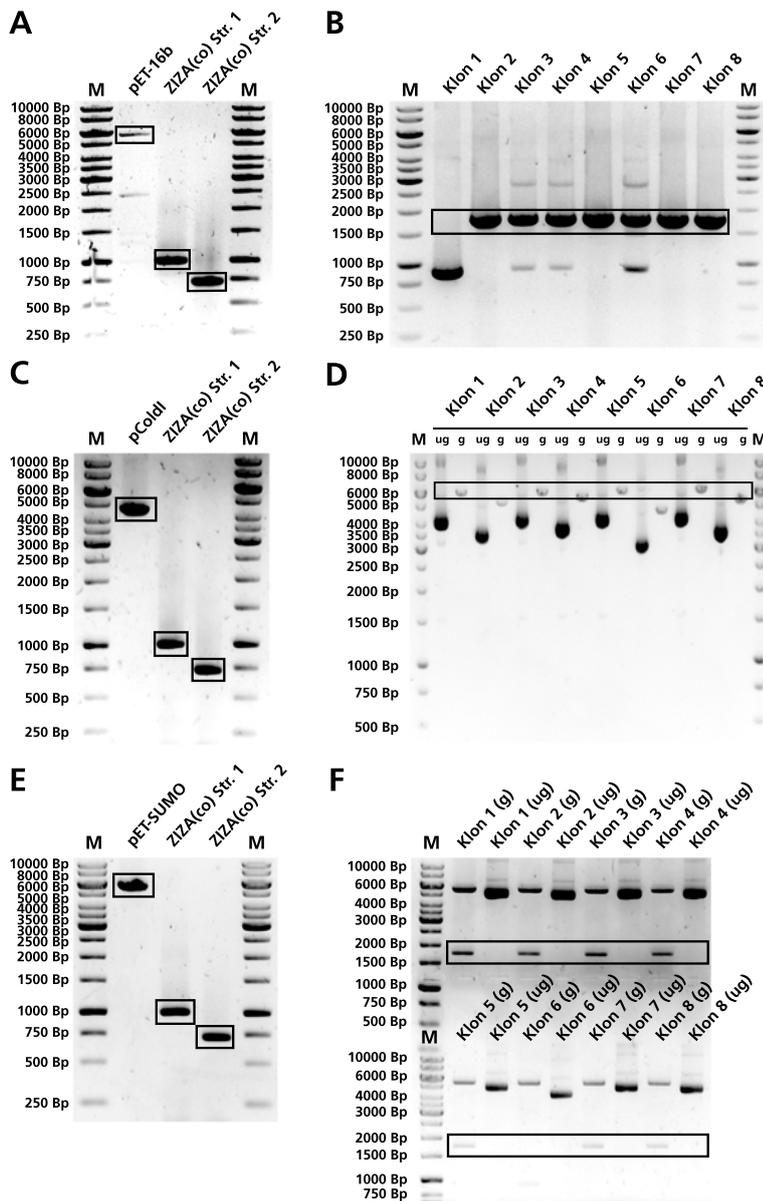


Abbildung 4.56 (A) Aufgereinigte PCR-Amplifikate vor seamless cloning für Konstrukt pET-16b::ZIZA(co). Erwartete Fragmentlängen: 5.711 Bp pET-16b (Vektor), 994 Bp String 1 und 719 Bp String 2. (B) Kolonie-PCR mit 8 ausgewählten Klone nach Transformation zum Nachweis der korrekten Insert-Sequenz. Erwartete Amplifikatlänge: 1.697 Bp. (C) PCR-Amplifikate zur Assemblierung von Konstrukt pColdI::ZIZA(co). Erwartete Fragmentlängen: 4.407 Bp pColdI (Vektor), 1.000 Bp String 1 und 725 Bp String 2. (D) Analytischer Restriktionsverdau der aufgereinigten Plasmid-DNA ausgewählter Klone mit KpnI. ug = ungeschnitten, g = geschnitten. Erwartete Größe des linearen Plasmids: 6.072 Bp. (E) PCR-Amplifikate zur Assemblierung von Konstrukt pET-SUMO::ZIZA(co). Erwartete Fragmentlängen: 5.643 Bp pET-SUMO (Vektor), 1.000 Bp String 1 und 725 Bp String 2. (F) Doppelter Restriktionsverdau von Plasmid-DNA ausgewählter Klone mit EcoRI und HindIII. Erwartete Länge der Fragmente: 1.752 und 5.556 Bp.

Als zweite Strategie sollte eine Plasmidkonstrukt erstellt werden, dass diesmal nicht auf dem T7-Promotor, sondern auf einem Kälteschock-Promotor aufbaute. Dieser *cspA*-Promotor (abgeleitet von *E. coli* cold shock protein A) ermöglicht die Induktion der Proteinproduktion über niedrige Temperaturen von $\sim 15^\circ\text{C}$ [257].

Dieser Effekt fußt auf zwei bekannten Mechanismen. Zwar findet auch bei diesen Stämmen bei 37°C eine Transkription über den *cspA*-Promotor statt. Allerdings ist die Region unterhalb des Promotors bei dieser hohen Temperatur extrem labil, so dass nur eine ineffiziente Transkription der Zielsequenz erfolgen kann. Erst bei 15°C wird dieser Sequenzbereich sehr stabil und eine effiziente Transkription wird ermöglicht [258].

Zudem führt die Transkription des N-Terminus von CspA zu einem „ribosome trapping“ genannten Phänomen. Nahezu alle Ribosomen im Cytosol binden an diesen Bereich und ermöglichen die starke Translation des rekombinanten Proteins. Da sie für die Translation zentraler Proteine des Zellstoffwechsels nun nicht mehr zur Verfügung stehen, führt dies jedoch zu einer Limitierung des Zellwachstums sowie der Zellteilung [259].

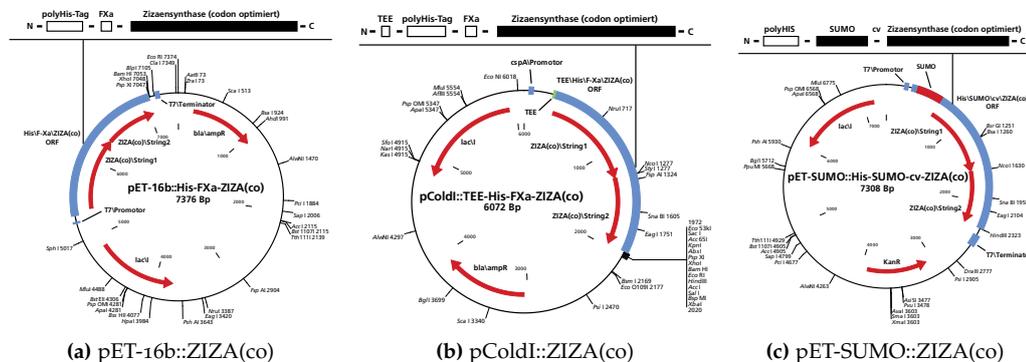


Abbildung 4.57 Plasmidkarten der Konstrukte zur Expression der (+)-Zizaensynthese

In vielen Fällen konnte durch die Kultivierung bzw. Proteintranslation bei niedriger Temperatur eine starke Erhöhung der löslichen Produktausbeuten verzeichnet werden. Durch Induktion bei 15 °C wird die Translationsmaschinerie der Zelle verlangsamt, so dass der sich bildenden Polypeptidkette mehr Zeit zur korrekten Faltung bleibt [257].

Die synthetischen DNA-Strings der (+)-Zizaensynthese wurden in das pET-SUMO- bzw. das pColdI-Vektorrückgrat eingefügt. Alle erhaltenen PCR-Fragmente für die Assembly-Reaktionen sind in Abb. 4.56 zusammen mit den Screening-Ergebnissen (Kolonie-PCR und analytischer Restriktionsverdau) dargestellt. Alle positiven Plasmidkonstrukte für ZIZA(co) wurden zur Kontrolle auf Sequenzfehler doppelt sequenziert. Die daraus abgeleiteten Plasmidkarten sind in Abb. 4.57 mit dem schematischen Aufbau der translatierten Region (ROI) dargestellt. Vollständige Sequenzdaten sind in Kapitel C verfügbar.

Alle Proteinvarianten besitzen zur Aufreinigung und zum immunochemischen Nachweis einen N-terminalen poly-His Tag. Die Proteinparameter der verschiedenen Zizaensynthese-Konstrukte sind in Tab. 4.10 zusammengestellt³³.

Tabelle 4.10 Berechnete Proteinparameter der (+)-Zizaensynthese

Konstrukt/ORF	theor. MW	theor. pI	Ext. Koeff.
pET-16b::ZIZA(co)	66,471 kDa	5,48	88.210 M ⁻¹ cm ⁻¹
pColdI::ZIZA(co)	65,976 kDa	5,38	88.210 M ⁻¹ cm ⁻¹
pET-SUMO::ZIZA(co)	77,486 kDa	5,25	89.700 M ⁻¹ cm ⁻¹

4.8.2 Produktion und Aufreinigung von ZIZA

In Schüttelkolbenversuchen mit TB-Medium unter identischen Bedingungen sollte die Produktion von ZIZA über die drei erzeugten Plasmidkonstrukte gezeigt werden. Die Schüttelgeschwindigkeit wurde bei 180 rpm konstant gehalten. Nach Induktion mit IPTG, wurde die Temperatur auf 20 °C bzw. 15 °C abgesenkt. Um die Kälteschockinduktion bei pColdI::ZIZA(co) möglichst schlagartig

33 Proteinparameter bestimmt über ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)

starten zu können, wurden die entsprechenden Kolben zunächst für 30 min in Eiswasser auf knapp unter 15 °C abgekühlt.

Bereits nach 2 h ist eine zunehmende Überexpression bei der erwarteten Proteingröße im SDS-PAGE Proteingel erkennbar (Abb. 4.58, A). Ein Einfluss der Induktorkonzentration konnte auch hier nicht festgestellt werden. Auch bei der SUMO-fusionierten Variante von ZIZA ist eine deutliche überexprimierte Proteinbande nach 18 h im Gelbild erkennbar. Aufgrund des Fusionsproteins liegt die Molekülgröße hier um ca. 13 kDa über dem unfusionierten Protein (Abb. 4.58, B). Eine niedrige IPTG-Konzentration von 0,1 mM war für eine vollständige Induktion ausreichend.

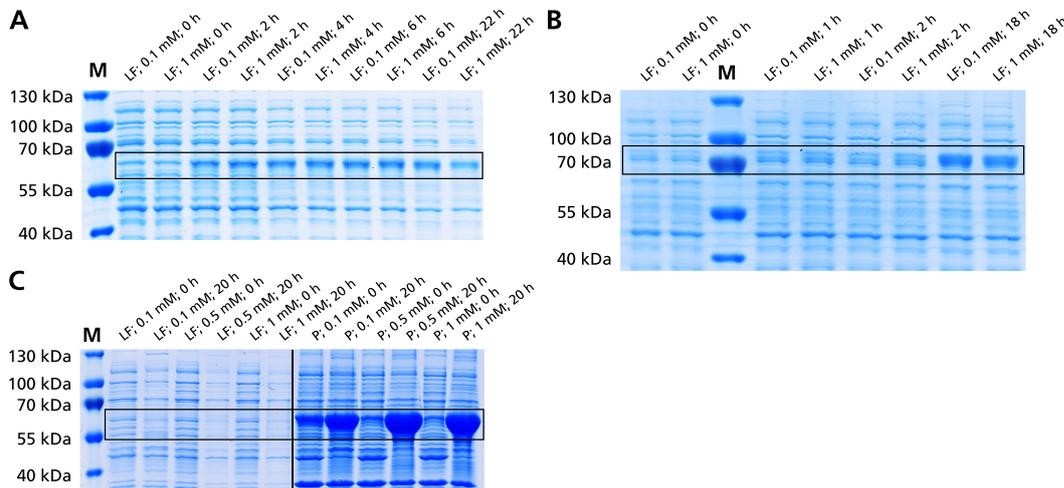


Abbildung 4.58 SDS-PAGE Proteingele von Expressionsexperimenten in komplexem TB-Medium mit den Konstrukten (A) pColdI::ZIZA(co), (B) pET-SUMO::ZIZA(co) und (C) pET-16b::ZIZA(co). Verschiedene IPTG-Konzentrationen (in mM) wurden zur Induktion verwendet. Kultivierungstemperatur 20 °C nach Induktion (15 °C bei pColdI-Stamm). LF = lösliche Fraktion (Überstand), P = unlösliches Pellet.

Im Vergleich dazu konnte für das zuvor erfolgreich eingesetzte pET-16b Vektorkonstrukt bei der Zizaensynthese keine lösliche Proteinproduktion, selbst nach 20 h, detektiert werden. Eine elektrophoretische Auftrennung der unlöslichen Pelletfraktion zeigte deutlich die Akkumulation des Zielproteins in Aggregaten (Abb. 4.58, C). Auch mehrfache Reproduktion der Kultivierung bei weiter abgesenkten Temperaturen bestätigten die Beobachtungen. Der pET-16b Vektor war zur Expression von ZIZA ungeeignet. Alle weiteren Produktionsansätze für ZIZA wurden daher mit den Stämmen BL21(DE3) pColdI::ZIZA(co) und pET-SUMO::ZIZA(co) durchgeführt.

Aufgrund der starken Verlangsamung des Zellstoffwechsels, stagnierte das Wachstum der durch Kälteschock-induzierten Kulturen bereits bei einer OD_{600} von $1,9 \pm 0,2$; während bei der SUMO-fusionierten ZIZA Zelldichten von OD_{600} $5,8 \pm 0,3$ erzielt werden konnten. Die löslichen Enzymausbeuten pro Zelle (bezogen auf Biotrockenmasse) war bei pET-SUMO::ZIZA(co) bei bis zu $\sim 48 \text{ mg g}^{-1}$ BTM und somit etwas höher als bei pColdI::ZIZA(co) mit bis zu $\sim 42 \text{ mg g}^{-1}$ BTM (100 mL-SK-Maßstab, TB-Medium). Aufgrund der zusätzlich signifikant höheren Biomasseausbeute, wurde die Enzymproduktion mit SUMO-Fusion als Methode der Wahl angesehen. Beide hier gezeigten Ansätze erwiesen sich dennoch als geeignete Möglichkeiten zur Umgehung Aggregatbildung, wobei jedoch auch hier ein gewisser Anteil in Form unlöslicher inclusion bodies vorlag (Gelbilder nicht gezeigt).

Zur Aufreinigung der Synthase wurde zunächst die zuvor für STPS optimierte IMAC-Affinitätschromatographie eingesetzt. Über eine mit Ni^{2+} dekorierte Sepharosesäule konnte die unfusionierte Enzymvariante sehr erfolgreich aufgereinigt werden (Abb. 4.59, A). Auch hier wurde ein Pufferwechsel zum STPS-Aktivitätspuffer sowie eine Aufkonzentration mittels Ultrafiltration durchgeführt (10 kDa MWCO). Ein typisches Chromatogramm der FPLC-Aufreinigung ist in

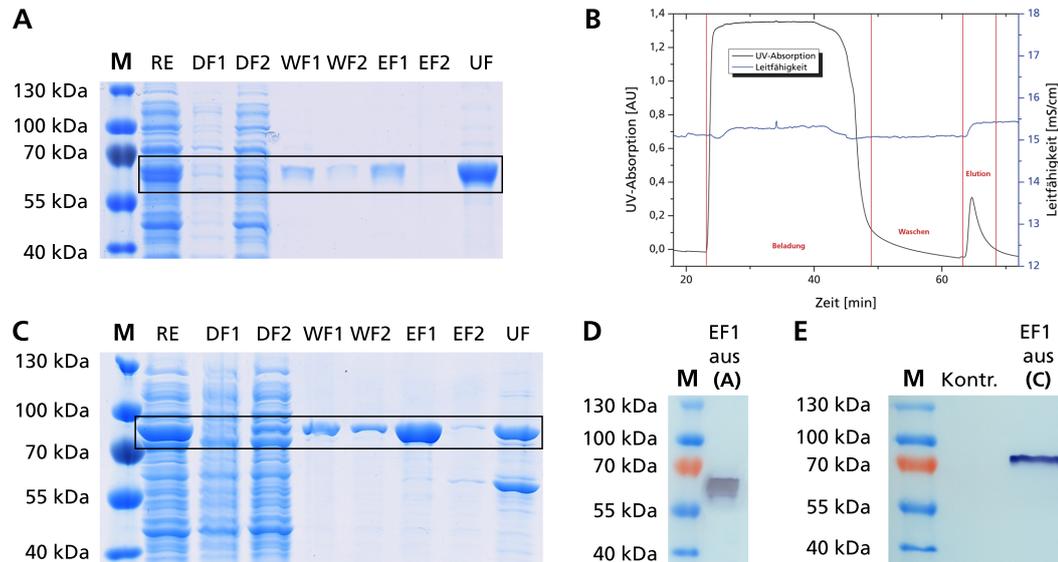


Abbildung 4.59 (A) Aufreinigung der unfusionierten (pColdI-Konstrukt) sowie (B) ein Chromatogramm eines typischen IMAC-Chromatographielaufs. (C) Aufreinigung der mit SUMO-fusionierten (+)-Zizaensynthase (pET-SUMO-Konstrukt) über Streptavidin-Säule (His-STREPPER System). (D, E) Western-Blots mit His-Epitop Antikörper der eluierten Fraktionen. LF = lösliche Fraktion; RE = Rohextrakt; DF = Durchfluss; WF = Waschfraktionen; EF = Elutionsfraktionen; UF = nach Ultrafiltration mit 10 kDa MWCO.

Abb. 4.59 (B) dargestellt. Die Affinität des His-Epitops gegenüber der Säulenmatrix war geringer im Vergleich zur PTSi, da sowohl im Durchfluss als auch in der Waschfraktion noch Zielprotein vorhanden war. Möglicherweise ist dies auf die geringere Anzahl an Histidinen in der Tag-Sequenz zurückzuführen (pET-16b = 10 His vs. pColdI = 6 His). Die erzielte Reinheit lag bei ~94 % nach Ultrafiltration.

Bei pET-SUMO::ZIZA(co) wurde eine zusätzliche Aufreinigungsstrategie evaluiert. Der lösliche Überstand von aufgeschlossener Biomasse wurde mit einem Überschuss des Adaptermoleküls His-STREPPER (IBA GmbH, Deutschland) inkubiert. Dieser bivalente Adapter besteht aus Nickel-beladenem Tris-NTA auf der einen, und einem Strep®-Tag II (AS-Sequenz WSHPQFEK) auf der anderen Seite. Er bindet an das His-Epitop und konvertiert es somit in ein Strep®-Tag II. Dadurch wird eine Aufreinigung über Bindung an Strep-Tactin (Streptavidin) Säulenmatrizes ermöglicht. Im Gegensatz zur IMAC kann somit eine noch effizientere und spezifischere Aufreinigungsstrategie realisiert werden.

Die Durchführung erfolgte nach Anpassung eines Herstellerprotokolls (vgl. B.12.3), unter Verwendung einer Strep-Tactin gravity flow Säule. Nach Bindung von SUMO-ZIZA(co), wurde mit PBS-Puffer gewaschen und mit einer niedrigen Konzentration an Desthiobiotin eluiert. Mehrere Elutionsfraktionen wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.59, C). In EF III war bereits der größte Teil der gebundenen Synthase enthalten.

Nach Ultrafiltration wurde eine sehr hohe Reinheit von 98 % densitometrisch bestimmt. Die Bindung über die Strep-Tag Sequenz erfolgte spezifischer als durch das polyHis-Tag. Über Western-Blots mit His-Epitop Antikörper konnte die Reinheit und Identität der eluierten Proteinfractionen nachgewiesen werden (Abb. 4.59, D+E). Dabei zeigte jedoch das Produkt von pColdI::ZIZA(co) eine breiteres Bandensignal (D), was möglicherweise auf eine leichte Degradation zurückzuführen sein könnte. Bei der SUMOylierten ZIZA war keine Degradation im Western-Blot erkennbar (E).

Um die Effizienz der Kopplung des Adaptermoleküls His-STREPPER an das Protein zu ermitteln, wurden die eluierten Proteinfractionen quantifiziert und aufsummiert. Es konnten insgesamt 1,02 mg reiner ZIZA erhalten werden, dies entspricht 13,18 nmol bei einem MW von 77,5 kDa. Da

der Rohextrakt mit 20 nmol His-STREPPER inkubiert wurde, konnten nur 65,9% der theoretisch möglichen Ausbeute erzielt werden.

Durch Verdau mit SUMO-Protease konnte das aufgereinigte Fusionsprotein in seine native Konformation überführt werden. Es wurden in Vorversuchen Aliquots des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen (4–30 °C) und für unterschiedliche lange Zeitspannen (0,5–6 h) zusammen mit der spezifischen Peptidase inkubiert. Es wurden jeweils 10 units (10 µL) pro 20 µg Fusionsprotein verwendet. Die nachfolgende SDS-PAGE Analyse (Abb. D.3 im Anhang) zeigte eine hohe Effizienz von ULP-1, selbst bei niedrigen Temperaturen von lediglich 4 °C. Die Peptidase hatte SUMO bereits nach 0,5 h bei allen getesteten Temperaturen nahezu vollständig von der Synthese abgetrennt. Um die Stabilität des aufgereinigten Enzyms zu gewährleisten, wurden alle weiteren Spaltungsansätze für 1 h bei 12 °C inkubiert.

4.8.3 Identitätsnachweis ZIZA über MALDI-TOF-MS

1 MGSSHHHHH GGLVPRGSA SMSDSEVNQE AKPEVKPEVK PETHINLK**MS** **DGSSEIFF**I KKTTPLRRLM EFAKRQGKE MSLRFLYDG
 91 IR**IQADQTP**E **DLDMEDNDI**I **EAH**EQIGGA TTAAFCLTTT PIGEPVCRQ YLPTVWGSFF LTYQPCTPEE VQSMEERALA KKTEVGR**MLQ**
 181 **EVAASSNLAR** KLGLVDELER **LGVDYHYK**TE INDLGAIYN GKDDNGGSD DDLYITSLKF YLLRK**HGYAL** **SSDVFLK**FRD EQGNISDDV
 271 **KLIMLYDAS** **HLR**IHEEKIL DNINSFTKSC LQSVLETNLE PALQEEVRCV LETPRFRRVE RIEAKRFISA YEKNIAR**DDA** **LLEFAR**LDYN
 361 IVQILYCKEL KELTVWVKEF HSRNTLTFAR DRIVEMYFW MAIIYPCYS YSRIWTKMF LSVALLDDIY DNYTSTEESN IFTTAMERWD
 451 VK**ATEQLPAN** **MRT**FYDYLIC TTDEVVEELK LQNNKNAELV KKVLDAAKC YHSEVKWR**D** **HYVPNDVGEH** **LQLSMR**SIAA MHSINVFVVIS
 541 LGAVCTR**EAV** **ECAFTYPK**II RGICVHARIS NDIASHEREQ ASEHMASLTQ TCMKQYGITV EEAAEKLRVI NEESWMDIVE ECLYK**DQYPL**
 631 **ALSER**VVAFA QSICFMYNGV DKYTIPTSKLK DSLDSLVLN IPV**■**

Tabelle 4.11 Über MALDI-TOF-MS nachgewiesene Peptidmassen einer Probe von SUMO-ZIZA

Nr.	Start-Ende [Position]	Peptidsequenz	Bestimmte Masse [M+H] ⁺	Theoretische Masse [M+H] ⁺
1	49–59	VSDGSSEIFFK	1.215,5652	1.215,5892
2	93–114	IQADQTPEDLDMEDNDIIEAHR	2.568,1294	2.568,1518
3	178–190	MLQEVAASSNLAR	1.389,6930	1.389,7154
4	201–208	LGVDYHYK	994,4658	994,4992
5	246–257	HGYALSSDVFLK	1.336,6452	1.336,6895
6	272–283	CLIMLYDASHLR	1.491,7093	1.491,7446
7	348–356	DDALLEFAR	1.049,5045	1.049,5262
8	453–462	ATEQLPANMR	1.130,5341	1.130,5622
9	509–526	DDHYVPNDVGEHLQLSMR	2.124,9081	2.124,9769
10	548–558	EAVECAFTYPK	1.314,5814	1.314,6034
11	626–635	DQYPLALSER	1.191,5849	1.191,6004

Um die Identität des aufgereinigten Proteins vor Aktivitätsnachweis und den kinetischen Studien bestätigen zu können, wurde auch bei ZIZA ein MALDI-TOF-MS Peptidmassenfingerabdruck angefertigt. Die erhaltene Proteinfraktion nach Affinitätschromatographie und Ultrafiltration von Biomasse des pET-SUMO::ZIZA(co) wurde aus dem Proteingel sauber ausgeschnitten und das Polypeptid direkt in der Gelmatrix über einen Verdau mit Trypsin (vgl. B.10.9) in die charakteristischen Fragmente gespalten. Die gemessenen Peptidmassen konnte nicht automatisiert über Mascot [221] ausgewertet werden, da die entsprechende Proteinsequenz noch nicht in Datenbanken verfügbar war.

Die Berechnung der theoretischen Peptidmassen anhand der DNA-Sequenzierung erfolgte auch hier mittels PeptideMass [220]. Einzelne Massenpeaks wurden manuell den theoretisch abgeleiteten Peptiden zugeordnet. Insgesamt konnten 11 Fragmente eindeutig anhand ihrer Masse zugeordnet

werden (Tab. 4.11). Insgesamt betrug die Sequenzabdeckung der identifizierten Peptide 18,6% (rot in Sequenz hervorgehoben). Bei der aufgereinigten Proteinfraction handelte es sich somit mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um die klonierte Synthase.

4.8.4 Bestimmung des isoelektrischen Punkts von ZIZA

Um den pI der Synthase zu bestimmen, wurde nach Strep-Tactin-Aufreinigung von pET-SUMO::ZIZA(co) Biomasse ein spezifischer Verdau mit SUMO-Protease durchgeführt (1 h bei 12 °C) und die Probe anschließend über Ultrafiltration mit einem MWCO von 30 kDa aufkonzentriert. Der größere cut-off sollte sowohl die SUMO-Protease (ca. 26 kDa) als auch die abgeschnittene SUMO-Domäne (13 kDa) aus der Proteinlösung entfernen. Da der MWCO bei einer Ultrafiltration ca. 1/3 des Molekulargewichts des Zielproteins betragen sollte (hier also 20 kDa), wurde mit einem gewissen Produktverlust gerechnet.

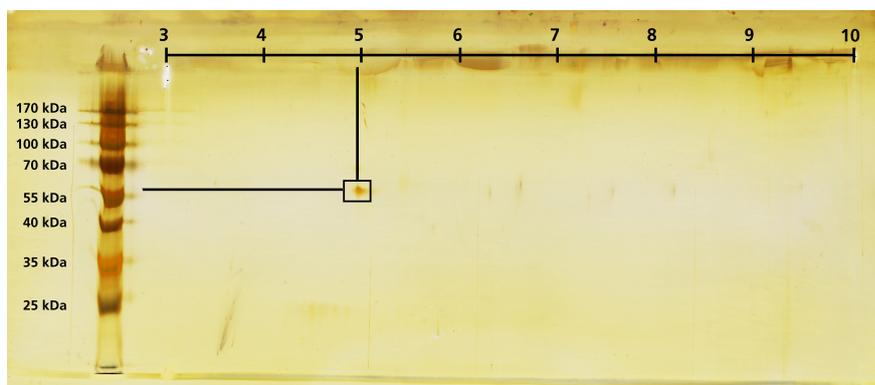


Abbildung 4.60 Eine Probe der aufgereinigten (+)-Zizaensynthase wurde zunächst über einen pH-Gradienten isoelektrisch fokussiert und anschließend anhand der Größe aufgetrennt.

Die so behandelte Proteinprobe wurde zunächst in der ersten Dimension isoelektrisch im pH-Bereich von pH 3–10 fokussiert, bevor anschließend eine Auftrennung anhand des Molekulargewichts erfolgte. Das silbergefärbte 2D-Proteingel ist in Abb. 4.60 dargestellt. Für die (+)-Zizaensynthase wurde somit ein pI von $\sim 4,95$ bestimmt, der relativ Nahe am berechneten pI von 5,09 liegt. Genau wie zuvor bei PTSi liegt somit der experimentell nachgewiesene isoelektrische Punkt der Synthase im leicht sauren pH-Bereich. Im routinemäßig eingesetztem STPS-Extraktionspuffer (pH 7,5) besitzt das Enzym somit eine negative Gesamtladung, was theoretisch eine Aufreinigung über Anionenaustauscher-Matrizes ermöglichen würde.

4.8.5 Produktnachweis (+)-Zizaen

Nach Umpufferung und Aufkonzentration in STPS-Aktivitätspuffer wurden Proben der aufgereinigten Enzyme mit synthetisiertem FDP-Salz supplementiert und, analog zu PTSi und HUM, Bioaktivitätstests nach bekanntem Schema durchgeführt. Die Ansätze wurden bei 40 °C inkubiert und über GC-FID vermessen. Bei Proben von beiden Expressionsstämme wurde ein einzelnes flüchtiges Produkt mit einer Retentionszeit im typischen Bereich für STPS nachgewiesen. Sowohl bei pColDI::ZIZA(co) (Abb. 4.61, B), als auch bei pET-SUMO::ZIZA(co) (Abb. 4.61, C) wies der Produktpeak eine Retentionszeit von 7,95 min auf. Keine Produktbildung konnte bei Kontrollansätzen ohne Zugabe von FDP (Abb. 4.61, A) detektiert werden.

Proben mit dem Produktpeak wurden anschließend über GC-MS weiter analysiert (Abb. 4.62, A). Das abgeleitete Fragmentationsspektrum (Abb. 4.62, B+C) stimmte mit dem zuvor veröffentlichten

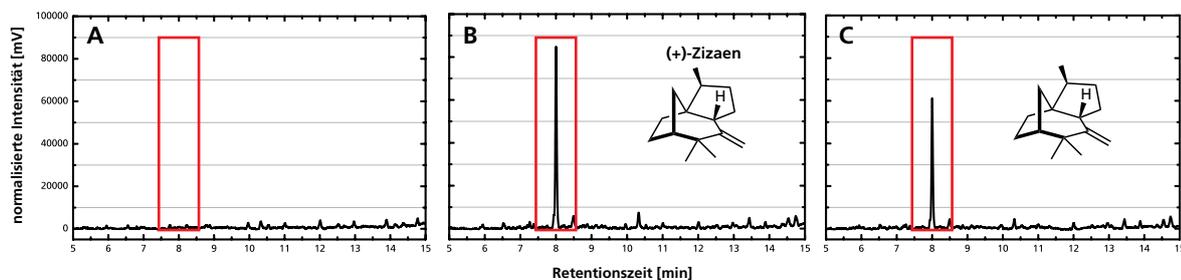


Abbildung 4.61 (A) Kontrollansatz von aufgereinigter ZIZA ohne Supplementierung von FDP. (B) Aktivitätstest aufgereinigter (+)-Zizaensynthase aus Stamm BL21(DE3) pColdI::ZIZA(co). (C) Aktivitätstest des aufgereinigten SUMO-Fusionsproteins produziert mit BL21(DE3) pET-SUMO::ZIZA(co).

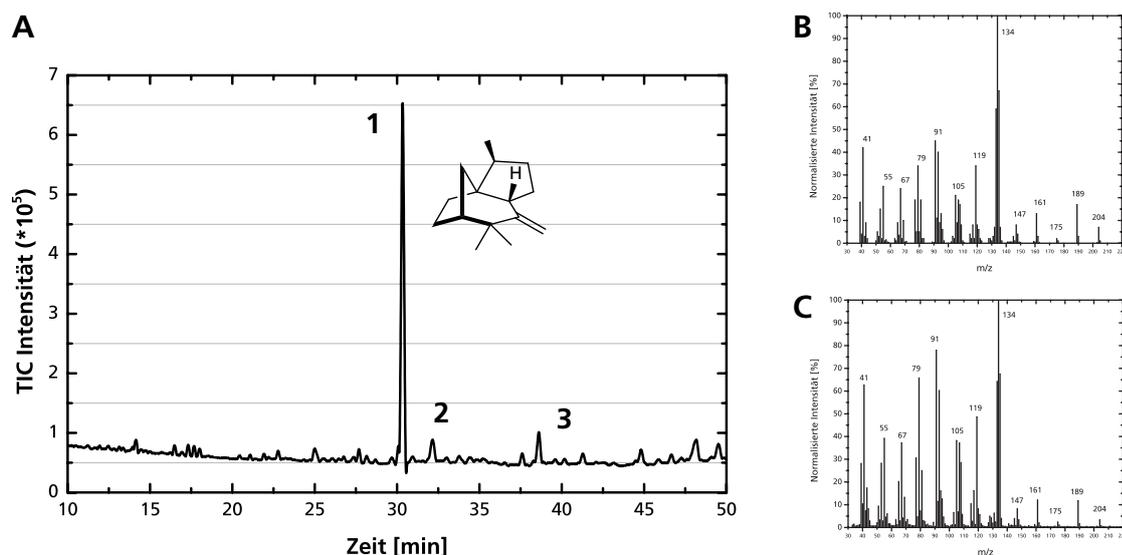


Abbildung 4.62 (A) GC-MS-Chromatogramm einer mit Umsetzungsprodukt der (+)-Zizaensynthase angereicherten organischen Phase. (B) Literaturspektrum von authentischem (+)-Zizaen Standard [260]. (C) Fragmentspektrum von Peak 1.

Spektrum eines authentischen (+)-Zizaenstandards [260] überein. Alle 5 Hauptmassen (m/z 134, 91, 41, 79 und 119) waren identisch. Auch das für alle STPS charakteristische Mutter-Ion M^+ m/z 204 war vorhanden.

Nach Vermessung einer n-Alkan-Reihe (C8–C25) bei übereinstimmenden Trennungsparemtern (Abb. B.7) wurde der geräteunabhängige Kovats-Retentionsindex [261] nach folgender Gleichung abgeleitet:

$$RI = 100 \cdot (y - x) \frac{\log\left(\frac{t_{Probe}}{t_x}\right)}{\log\left(\frac{t_y}{t_x}\right)} + 100 \cdot x$$

mit:

- x = Anzahl C-Atome des Alkans vor Probenpeak,
- y = Anzahl C-Atome des Alkans nach Probenpeak,
- t_i = Retentionszeiten in Minuten.

Der für den Hauptpeak 1 errechnete Retentionsindex (RI) von 1613 lag sehr nahe an dem für die Reinsubstanz (+)-Zizaen bestimmten RI von 1597 [262]. Die Erhöhung des Indizes im Vergleich zum Literaturwert lässt sich auf die leicht polarere, stationäre Phase der verwendeten Kapillarsäule zurückführen. Sowohl über das Fragmentspektrum als auch durch Vergleich des Retentionsindex, konnte Peak 1 somit dem Khusimol-Vorläufer (+)-Zizaen eindeutig zugeordnet werden. Die weite-

ren Peaksignale 2 und 3 konnten aufgrund der niedrigen Konzentration nicht eindeutig identifiziert werden, selbst nachdem die Proben weiter aufkonzentriert wurden. Lediglich das Mutter-Ion $M^+ m/z 204$ konnte nachgewiesen werden, womit es sich bei den beiden unbekannt Nebenprodukten höchstwahrscheinlich um Sesquiterpenverbindungen handelte.

Kommerziell war kein authentischer Standard von (+)-Zizaen verfügbar und die hochkomplexe, chemische Totalsynthese [101, 103] konnte mit den vorhandenen Ressourcen nicht durchgeführt werden. Daher wurden die Produktkonzentrationen über α -Cedren Äquivalente bestimmt, in dem eine Kalibrationsgerade mit der verfügbaren Reinsubstanz aufgezeichnet wurde (Abb. B.6). Das Sesquiterpen α -Cedren ist strukturell sehr nahe mit (+)-Zizaen verwandt und weist zudem die exakte Elementarzusammensetzung ($C_{15}H_{24}$) auf. Somit wurde von einem identischen Peakintegral bei dem verwendeten FID-Detektor ausgegangen, da diese Detektionsmethode lediglich vom Kohlenstoffgehalt des Analyten abhängt.

4.8.6 Enzymkinetik

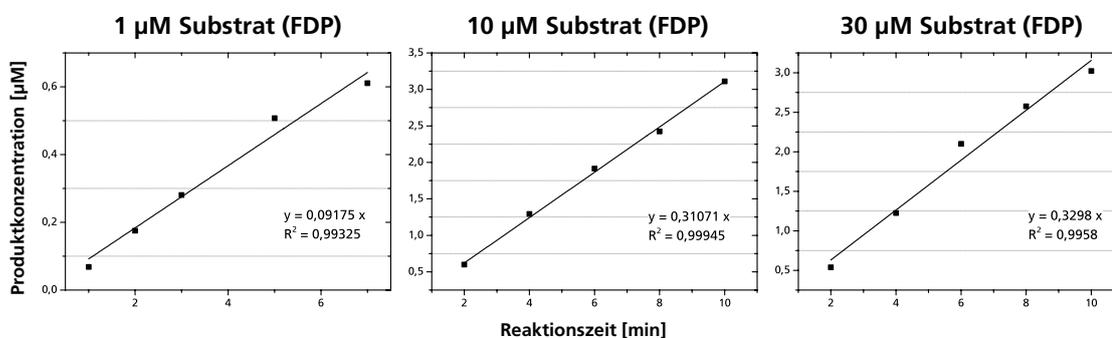


Abbildung 4.63 Einige Beispiele von enzymatischen Umsetzungen von FDP mit der (+)-Zizaensynthase (verschiedene Substratkonzentrationen). Durch mehrfache Bestimmung der Reaktionsrate über einen weiten Konzentrationsbereich kann somit ein Michaelis-Menten-Plot generiert werden.

Die Enzymkinetik der aufgereinigten und umgepufferten Synthase (pET-SUMO::ZIZA(co)-Konstrukt) wurde durch Bestimmung der Reaktionsraten (Anfangssteigung) nach Inkubation mit steigenden Substratkonzentrationen abgeleitet. Die Produktkonzentrationen wurden nach GC-FID Messungen direkt durch Peakintegration, basierend auf der zuvor erstellten α -Cedren Kalibrationsgeraden, berechnet. Die optimale Reaktionstemperatur (Temperaturoptimum von ZIZA) von 30°C wurde in Vorversuchen mit niedriger FDP-Konzentration grob ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Desweiteren musste eine ideale Menge Enzym gewählt werden, bei der sich die Bildungsraten des Produkts zu Beginn der Reaktion in einem linearen Bereich befanden. Eine konstante Enzymkonzentration von $0,11\ \mu\text{M}$ wurde nach Voruntersuchungen als zielführend ermittelt und daher in allen Ansätzen verwendet. Das zyklisierte, flüchtige Produkt wurde durch Überschichtung mit Isooctan eingefangen. Sesquiterpene in der wässrigen Pufferphase wurde zusätzlich durch kräftiges Schütteln für 30 s extrahiert. Dieser Extraktionsschritt stoppte zusätzlich die Enzymreaktion, da die Synthase aufgrund des organischen Lösungsmittels an der Grenzfläche ausfiel. Die Probenahme aus einem auf 30°C aufgeheizten Wasserbad erfolgte im 2 min-Takt im Bereich zwischen 0–10 min. Einige Anfangssteigungen sind in Abb. 4.63 exemplarisch abgebildet.

Es wurden Substratkonzentrationen im Bereich zwischen 0– $40\ \mu\text{M}$ verwendet. Geradensteigungen wurden vierfach für alle eingesetzten FDP-Konzentrationen bestimmt. Basierend auf dem Michaelis-Menten Modell [263], wurden die Datenpunkte durch nicht-lineare Regression über den Levenberg-Marquardt Algorithmus (kleinste Fehlerquadrate) [264] an die Funktion angepasst. Der resultierende Michaelis-Menten-Plot kann in Abb. 4.64 nachvollzogen werden.

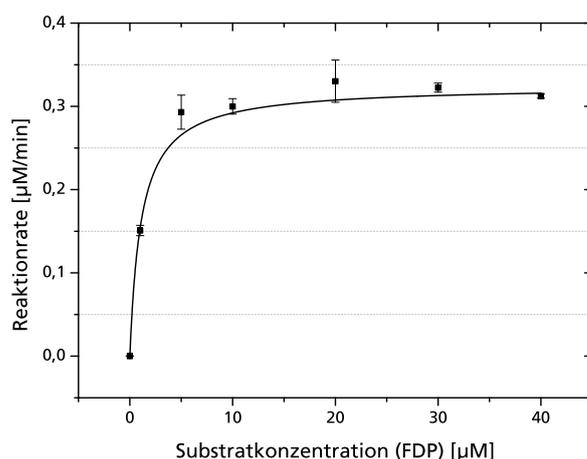


Abbildung 4.64 Michaelis-Menten-Plot, bei dem die Reaktionsraten (Anfangssteigungen) gegen Substratkonzentrationen aufgetragen wurden. Jeder Datenpunkt setzt sich aus 4 individuellen Umsetzungsexperimenten zusammen, bei denen die Produktkonzentration an 5 Zeitpunkten bestimmt wurde (140 Ansätze). Jede Probe zweifach vermessen über GC-FID.

Somit ergibt sich rechnerisch ein K_m von $1,111 \mu\text{M}$ ($\pm 0,113$). Dieser relativ niedrige Wert beweist eine hohe Bindungsaffinität der rekombinanten Synthase gegenüber ihrem Substrat. Geringe K_m -Werte sind typisch für Substrate mit mittlerem Molekulargewicht wie FDP, insbesondere wenn große Funktionalisierungen wie Phosphat am Molekül vorhanden sind [148]. Die maximale Reaktionsrate $V_{\max} = 0,3245 \mu\text{M min}^{-1}$ ($\pm 0,0035$) und die davon abgeleitete Wechselzahl $K_{\text{cat}} = 2,95 \text{ min}^{-1}$ liegen sehr niedrig im Vergleich zu anderen Enzymklassen. Berücksichtigen muss man hierbei jedoch die vergleichsweise komplexe Reaktion, die durch die STPS katalysiert wird. Die Wechselzahl ist vergleichbar mit denen anderer, verwandter STPS (Tab. 4.12).

Desweiteren gehört ZIZA dem pflanzlichen Sekundärmetabolismus an. Enzyme des sekundären Stoffwechsels katalysieren in den meisten Fällen die Produktbildung um mehrere Größenordnungen langsamer, als Enzyme des zentralen (primären) Stoffwechsels. Ein Grund dafür könnte der niedrige Selektionsdruck auf eine optimale katalysierte Reaktion sein, da die Produkte meist nicht essentiell für den Organismus sind [148].

Tabelle 4.12 Zusammenstellung von kinetischen Daten der Zizaensynthase im direkten Vergleich mit verwandten STPS. n. b. = nicht bestimmt in Literaturquelle. ZIZA = (+)-Zizaensynthase, EPIA = 5-Epi-Aristolochensynthase, BISA = (S)- β -Bisabolensynthase, VETI = Vetspiradiensynthase.

	Organismus	T_{opt} [°C]	K_m [μM]	V_{\max} [$\mu\text{M min}^{-1}$]	K_{cat} [min^{-1}]	K_{cat} [s^{-1}]	K_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]	Enzymkonz. [μM]	spez. Akt. [Umg^{-1}]
ZIZA [251]	<i>C. zizanoioides</i>	30	$1,1108 \pm 0,1134$	$0,3246 \pm 0,0035$	2,95	0,049	$4,43 \cdot 10^4$	0,11	0,0454
EPIA [265]	<i>N. tabacum</i>	30	$2,3 \pm 0,4$	n. b.	2,9	0,048	$2,10 \cdot 10^4$	n. b.	n. b.
BISA [266]	<i>Z. mays</i>	30	$2,1 \pm \text{n. b.}$	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
VETI [267]	<i>H. muticus</i>	30	$0,7 \pm 0,4$	n. b.	2,4	0,04	n. b.	0,05	n. b.

4.8.7 Upscale der (+)-Zizaensynthaseproduktion

Um die charakterisierte STPS in größeren Mengen bereitstellen zu können, sollte eine erste Aufskalierung der Kultivierung vom 100–500 mL SK-Maßstab auf den 2 L-Bioreaktor erfolgen. Fragestellung war, welche Zell- und Enzymkonzentrationen bei geregelter Temperatur, pH-Wert und optimaler Begasungsrate maximal in diesem Maßstab erzielt werden können.

Für die Reaktorkultivierungen wurde auch hier das komplexe TB-Medium eingesetzt. In den Versuchen sollte die SUMO-fusionierte Variante produziert werden (Expressionsstamm BL21(DE3))

pET-SUMO::ZIZA(co)). Durch Kultivierung bei für *E. coli* idealen Wachstumsbedingungen (37 °C) wurde zunächst die maximal erzielbare Zellkonzentration ermittelt. Basierend auf den Vorversuchen wurde dabei jedoch, trotz des Löslichkeitsoptimierung durch SUMO, mit einer intrazellulären Präzipitation des Zielproduktes gerechnet.

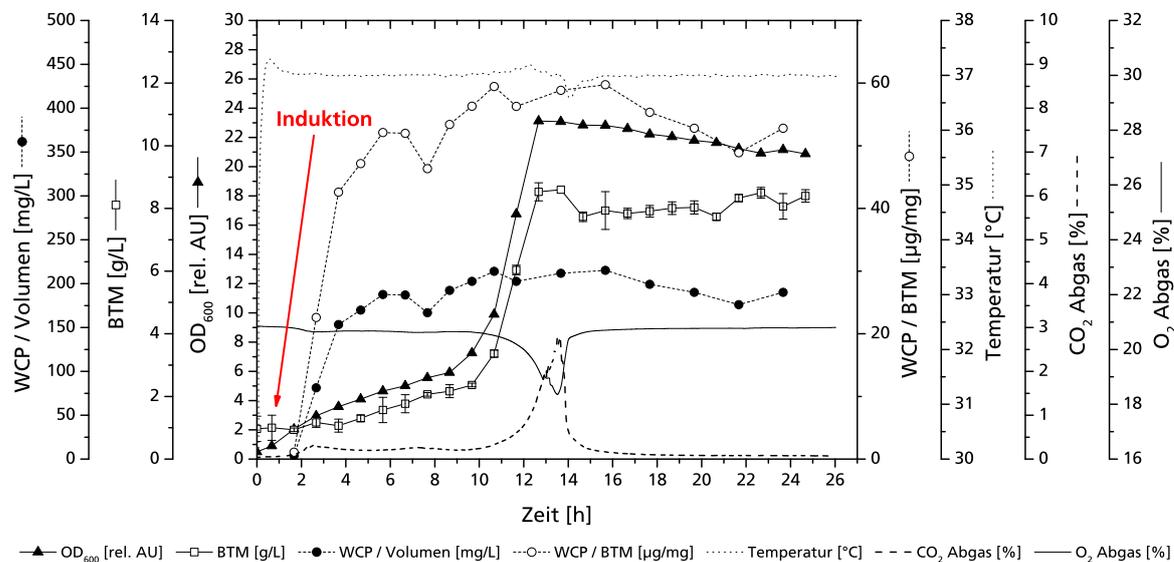


Abbildung 4.65 Reaktorkultivierung (2 L-Maßstab) von BL21(DE3) pET-SUMO::ZIZA(co) bei 37 °C in komplexem TB-Medium.

Der pH Wert wurde bei pH 7,0 eingeregelt (Titration mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH). Das Medium wurde zur Aufrechterhaltung der Plasmidstabilität mit 50 mg L⁻¹ Kanamycin versetzt. Die Begasungsrate betrug konstant 2 vvm, wobei durch Steuerung der Rührerdrehzahl, beginnend bei 200 rpm, ein Sauerstoffpartialdruck von pO₂ = 30 % im Medium gehalten wurde. Eine 25 mL-Vorkultur (VK) wurde direkt im Verhältnis 1:1.000 von einem Cryostock angeimpft und nach 10 h zur Inokulation einer 100 mL-VK im Verhältnis 1:2.000 verwendet. Der Reaktor wurde mit einer Startzelldichte von OD₆₀₀ 0,1 beimpft (VK hatte OD₆₀₀ 6,5 nach 10 h). Die Induktion mit 0,1 mM IPTG erfolgte anschließend bei OD₆₀₀ 0,9.

Nach 12,5 h ging die Kultur, im Anschluss an ein exponentielles Wachstum, in die stationäre Phase über. Die CO₂-Konzentration (Abb. 4.65) stieg rapide an. Die maximale Wachstumsrate μ_{\max} betrug 5,4 h⁻¹. Es wurde eine Zelldichte von OD₆₀₀ 23,5 erreicht, was einer BTM von 8,2 g L⁻¹ entsprach. Durch SDS-PAGE Analyse der Proteinproben konnte keine lösliche Enzymproduktion gezeigt werden. In der Pelletfraktion war eine starke Überexpression bei der erwarteten Molekülgröße erkennbar (Gelbilder nicht gezeigt). Die Konzentration des Ganzzellprotein (WCP) betrug bei Erreichen der stationären Phase 214,1 mg L⁻¹ Medium bzw. 59,5 µg mg⁻¹ BTM (densitometrische Betrachtung des Zielproteinbande). Aufgeschlossene Biomasse zeigte keinerlei Enzymaktivität bei anschließend durchgeführten Umsetzungsversuchen.

Im direkten Vergleich wurde eine Reaktorkultivierung mit identischen Parametern durchgeführt, diesmal jedoch die Temperatur des Mediums nach Induktion auf 20 °C abgesenkt. Die zur Inokulation verwendete Vorkultur wies eine Zelldichte von OD₆₀₀ 6,8 auf. Nach einer ersten Wachstumsphase bei 37 °C wurde bei OD₆₀₀ 0,85 die Temperatur heruntergeregelt und mit 0,1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Nach einer 6 h langen Lag-Phase (Abb. 4.66) ging die Kultur in ein nahezu lineares Wachstum über. Dies war bedingt durch die nicht ideale Temperatur und die Beeinflussung des Zellstoffwechsels durch heterologe Proteinproduktion. Nach 31 h wurde die maximale Zelldichte von OD₆₀₀ 23,1 erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine mittlere Biomasseausbeute von BTM 7,9 g L⁻¹ gemessen. Die beobachtete Wachstumsrate betrug $\mu_{\max} = 0,82 \text{ h}^{-1}$. Die Kultur

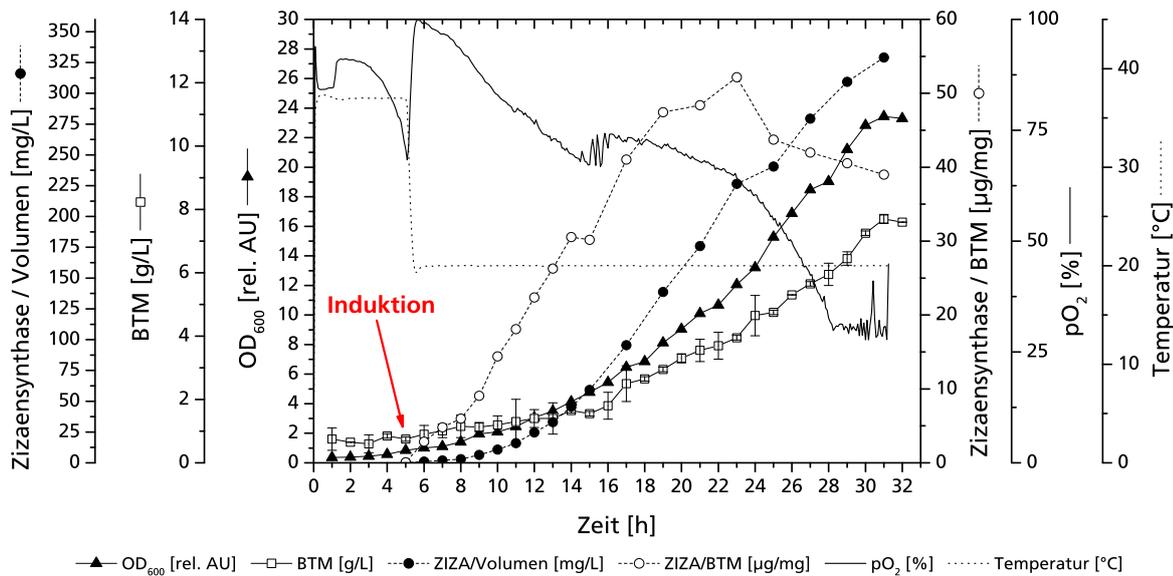


Abbildung 4.66 Reaktorkultivierung (2-L-Maßstab) von BL21(DE3) pET-SUMO::ZIZA(co) bei 20 °C nach Induktion in komplexem TB-Medium.

wies bei einer Rührergeschwindigkeit von 200 rpm stets eine Sauerstoffsättigung über 30% im Medium auf. Erst nach 28 h musste die Rührerdrehzahl stufenartig angehoben werden, um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden.

Obwohl auch hier in der unlöslichen Proteinfraction eine gewisse Ausbildung von Aggregaten erkennbar war (Gelbild nicht gezeigt), war der Großteil des exprimierten Enzyms löslich und aktiv. Nach 23 h war die Konzentration der (+)-Zizaensynthese pro Zelle maximal ($52,2 \mu\text{g mg}^{-1}$ BTM) und nahm danach, möglicherweise durch intrazelluläre Degradation, kontinuierlich ab. Da die Zellkonzentration noch weiter anstieg, wurde erst nach 31 h die maximale Enzymausbeute von 325 mg L^{-1} Reaktorvolumen erreicht.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass selbst die fusionierte ZIZA-Variante nur bei einer abgesenkten Kultivierungstemperatur löslich produziert werden kann. Auch bei 20 °C wird eine zur Kultivierung unter optimalen Bedingungen vergleichbare Zelldichte im Bereich von OD_{600} 23 erzielt. Aufgrund der bedeutend niedrigeren Wachstumsrate des BL21(DE3)-Expressionsstamms war die Zeitspanne bis zum Erreichen der stationären Phase, sowie der maximalen Enzymausbeute, mehr als doppelt so lange (13 h vs. 31 h). Da keine lösliches Zielprotein bei höheren Temperaturen nachweisbar war, ist eine Verlängerung des Prozesses bei erniedrigter Kultivierungstemperatur die einzige Möglichkeit, mit dem hier bereitgestellten Expressionsstamm eine funktionelle Enzymproduktion zu realisieren.

4.8.8 Zusammenfassung Produktion und Charakterisierung weiterer STPS

Eine α -Humulensynthese sowie eine (+)-Zizaensynthese sollten, analog zu PTSi, rekombinant exprimiert und anschließend umfassend charakterisiert werden. Eine direkte Amplifikation der codierenden Sequenzen aus eigens angelegten cDNA-Bibliotheken war aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von frischem Pflanzenmaterial mit großen Herausforderungen verbunden. Obwohl mehrere Strategien zur RNA-Extraktion aus schwierigen Probenmatrizes erprobt wurden, war eine Isolation der vollständigen Sequenzen nicht möglich.

Eine Codon-optimierte Variante von HUM wurde daher in das etablierte Vektorrückgrat mit N-terminalem His-Tag kloniert und konnte erfolgreich, ohne Anwendung von Fusionsstrategien,

löslich produziert werden. Die katalytische Aktivität des Enzyms konnte durch Nachweis des einzigen Zyklisierungsprodukts α -Humulen gezeigt werden. Der so etablierte Expressionsstamm gilt als idealer Modellorganismus für Coexpressionsversuche mit mehreren Enzymen des Terpenstoffwechsels.

Auch die patentierte Sequenz einer (+)-Zizaensynthese wurde über die etablierte Genassemblierung zu Plasmidkonstrukten zusammengefügt. Im Gegensatz zu PTSi und HUM war hier eine lösliche und aktive Expression mit N-terminal verbundenem HIS-Tag nicht erfolgreich. Daher wurde die Proteinfusion mit SUMO sowie die Kälteschock-Expression über den *cspA*-Promotor als weitere Produktionsstrategien erprobt. Beide Varianten ermöglichten die funktionelle Expression des Enzyms, wobei der SUMO-Stamm im SK-Maßstab höhere Biomasseausbeuten bei nahezu gleicher Proteinkonzentration pro Zelle (pro BTM) ermöglichte.

Die rekombinante Synthese konnte erfolgreich über die bereits für STPS optimierte IMAC-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Eine zweite Isolationsstrategie über ein Strep-Tag-Adaptermolekül ermöglichte eine noch spezifischere Bindung und Elution von ZIZA. Durch Verdau mit SUMO-Protease konnte das Fusionsprotein vom Zielprotein abgespalten werden. Ein MALDI-TOF-MS Peptidmassenfingerabdruck bestätigte die Sequenzzusammensetzung des Polypeptids. Durch 2D-Gelelektrophorese nach isoelektrischer Fokussierung, konnte der pI von ZIZA präzise ermittelt werden. Über Vergleich von Retentionsindizes und GC-MS Fragmentspektren, wurde der Khusimol-Vorläufer (+)-Zizaen eindeutig als Hauptprodukt der STPS identifiziert.

Mittels Variation der Substratkonzentration wurden Anfangsreaktionsraten bestimmt, die erfolgreich an ein Michealis-Menten-Modell angepasst werden konnten. Die so errechneten Enzymparameter waren vergleichbar mit Literaturwerten verwandter Zyklasten, verdeutlichten jedoch nochmals die geringe Wechselzahl und die somit eher niedrige katalytische Effizienz dieser Enzymklasse.

Durch eine erste Maßstabsvergrößerung im 2 L-Bioreaktor konnten bis zu 325 mg L^{-1} aktive Synthese nach 31 h über den BL21(DE3) pET-SUMO::ZIZA(co) Produktionsstamm erhalten werden.

4.9 COEXPRESSION VON ENZYMEN DES TERPENSTOFFWECHSELS

Der Begriff „metabolic engineering“ beschreibt die gezielte Beschleunigung oder auch Hemmung von endogenen Stoffwechsellzymen. Ziel ist es, Engpässe im Metabolismus zu überwinden und Reaktionskaskaden in Richtung eines gewünschten Intermediates zu lenken. Meist stößt das Optimierungspotential schnell an Grenzen, da sich Engpässe im Stofffluss an anderen Stellen auftun oder toxische Zwischenprodukte akkumulieren können [141].

Der in *E. coli* endogen vorhandene DXP/MEP-Weg wurde bereits zur Überexpression von Lycopin durch gezielte genomische Veränderung optimiert, um das Tetraterpen in industriell relevanten Konzentration bereitstellen zu können [268]. Doch erst die parallele Expression von Enzymen des MEV-Wegs aus der umfassend charakterisierten Bäckerhefe *S. cerevisiae* [25], ermöglichte Terpentiner z. B. des Malariawirkstoffs Amorphadien jenseits von 500 mg L^{-1} in Schüttelkolben [134] bzw. 27 g L^{-1} in Bioreaktoren [143].

Zur nachhaltigen Produktion des als Biotreibstoff einsetzbaren Bisabolans (nach chemischer Hydrierung des Terpens Bisabolen), wurden basierend auf den bereits angesprochenen Vorarbeiten, weitere Optimierungen an dem eukaryotischen MEV-Weg vorgenommen [135]. Zur Ausbalanzierung des Pathways und Maximierung der Produktausbeute ist es wichtig, dass die zentralen Enzyme in den korrekten Konzentrationen vorliegen. Dadurch werden Unterschiede in den Umsetzungsraten ausgeglichen und eine extreme Akkumulation eines Intermediats in der Zelle vermieden.

Daher wurde durch gezielte Codon-Optimierung sowie durch Entfernen überflüssiger Proteindomänen, dass Expressionsverhalten einzelner Stoffwechselenzyme verbessert.

Die drei Enzyme des oberen MEV-Wegs zur Transformation von Acetyl-CoA zu Mevalonat wurden unter Kontrolle eines lacUV5-Promotors gestellt (dies betraf die Acetoacetyl-CoA-Synthase (AtoB), die HMG-CoA-Synthase (HMGS) sowie die verkürzte HMG-CoA-Reduktase (tHMGR)). Die Transkription der fünf benötigten Enzyme zur Bildung von FDP aus Mevalonat wurde durch den synthetischen trc-Promotor kontrolliert (betrifft Mevalonatkinase (MK), Phosphomevalonatkinase (PMK), Phosphomevalonat-Decarboxylase (PMD), IPP-Isomerase (Idi) sowie die *E. coli* eigene FDP-Synthase (IspA)).

Über die BglBrick Klonierungsstrategie [114], konnten alle 8 Komponenten in dem Vektorrückgrat von pBbA5c in der Reihenfolge des MEV-Wegs zusammengefügt werden. Der Einsatz eines weiteren Promotors (trc) und Terminators für den zweiten Teil des MEV-Wegs, erhöhte die Transkriptionsraten der entsprechenden Enzyme signifikant. Im Zusammenspiel mit den für *E. coli* Codon-optimierten Sequenzen wurden die Produktausbeuten so nahezu verdoppelt. Durch Coexpression mit einer optimierten Bisabolensynthase aus der Küsten-Tanne, wurden über diesen Ansatz bereits Bisabolentiter im g L^{-1} -Bereich realisiert [135].

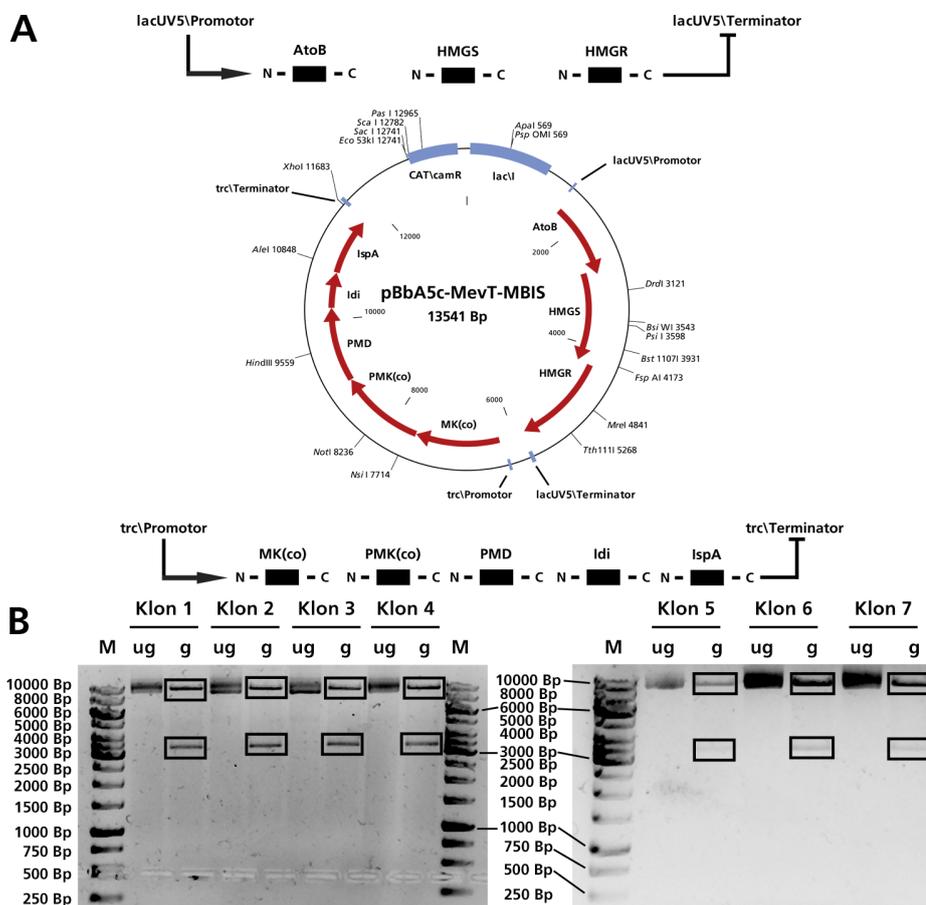


Abbildung 4.67 (A) Plasmidkarte und einzelne ORFs von pBbA5c-MevT(co)-T₁-MBIS(co, ispA). AtoB, HMGS und tHMGR (oberer MEV-Weg) unter Kontrolle des lacUV5-Promotors. MK, PMK, PMD, Idi und IspA (unterer MEV-Weg) unter Kontrolle des synthetischen trc-Promotors. (B) Testverdau der aufgereinigten Plasmid-DNA mit XhoI und NotI zum Nachweis des korrekten Konstrukts. ug = ungeschnitten, g = doppelter Verdau mit Restriktionsenzymen.

Über einen heterologen, coexprimierten MEV-Weg wurden maximale Terpenausbeuten über die hier charakterisierten STPS-Stämme erwartet. Eine rein biotechnologische Darstellung von α -Humulen sowie (+)-Zizaen ist noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Ein Klonierungs-

stamm mit dem Plasmid pBbA5c-MevT(co)-T1-MBIS(co, ispA) wurde freundlicherweise von Jay Keasling und Taek Soon Lee (Addgene Plasmid Nr. 35152) für diese Arbeiten zur Verfügung gestellt. Eine annotierte Plasmidkarte ist in Abb. 4.67 (A) dargestellt.

Zunächst wurden Plasmidisolierungen von einzelnen Kolonien des lyophilisierten, plasmidtragenden Klonierungsstamms *E. coli* DH10B durchgeführt. Durch einen analytischen Restriktionsverdau mit XhoI und NotI, wurden zwei Fragmente mit den erwarteten Längen erzeugt (10.095 Bp und 3.446 Bp) (Abb. 4.67, B).

Somit konnte die Identität des insgesamt 13.541 Bp großen Plasmidkonstrukts nachgewiesen werden. Auf eine zusätzliche Sequenzierung einzelner Bereiche wurde daher zunächst verzichtet. Von Klon 1 wurden parallele Plasmidpräparationen im 100 mL SK-Maßstab durchgeführt, so dass insgesamt 850 µg Plasmid-DNA in mehreren Aliquots für zukünftige Cotransformationen zur Verfügung standen.

Zuvor erzeugte chemisch-kompetente Zellen von *E. coli* BL21(DE3) wurden gleichzeitig mit jeweils 10 ng des jeweiligen STPS-Konstrukts und pBbA5c-MevT-MBIS über Hitzeschock transformiert. Generell ist eine Cotransformation zweier verschiedener Plasmide in *E. coli* möglich [269]. Dabei müssen jedoch einige Kriterien zwingend erfüllt sein. Zum einen wird ein unterschiedlicher Selektionsmarker benötigt, um nach korrekt transformierten Klonen zu screenen, und beide Plasmide stabil in der Kultur halten zu können. Alle STPS-Konstrukte wiesen entweder eine Ampicillin/Carbenicillin- oder eine Kanamycin-Resistenz auf, während das Pathway-Plasmid über eine Chloramphenicol-Resistenz verfügte.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Plasmidkompatibilität bzw. die Klasse des jeweiligen Replikationsursprungs [270]. In einer Zelle kann sich nur ein Plasmid einer Plasmidkompatibilitätsgruppe (Replikationsursprung, ORI) zur gleichen Zeit vermehren. Gehören zwei Plasmide der gleichen Gruppe an, so erfolgt keine Replikation der DNA, bis nicht beide auf unterschiedliche Tochterzellen aufgeteilt wurden [179]. Die in der Arbeit verwendeten pET-Vektoren sind alles Derivate von pBR322 und besitzen den Replikationsursprung pMB1 [271]. Der Vektor pBbA5c, als Derivat von pACYC, besitzt den ORI p15A [115]. Aufgrund der abweichenden Kompatibilitätsgruppen können beide Plasmidtypen in einer Zelle coexistieren und zudem parallel repliziert werden.

Ob das Wachstumsverhalten der cotransformierten Stämme durch die höhere DNA-Last beeinträchtigt wird, ist von der Kopienzahl der Plasmide abhängig. Bei pMB1 und p15A handelt es sich um low-copy Replikationsursprünge, so dass niedrige Plasmidkopienzahlen von 15–20 der pET-Konstrukte bzw. 18–22 Kopien von pBbA5c pro Zelle vorhanden sein werden. Trotz der höheren DNA-Menge wird daher keine starke Beeinträchtigung der Teilungsgeschwindigkeit erwartet. Allerdings könnte die heterologe Expression von nun insgesamt 9 Enzymen einen gewissen Einfluss auf den Zellmetabolismus ausüben. Allerdings wurde nur bei der jeweiligen STPS (unter Kontrolle des sehr starken T7-Promotors) eine nachweisbare Überexpression im Proteingel erwartet.

Im Vergleich zu lacUV5- und dem synthetischen trc-Promotor, erzeugt T7 eine bis zu 200fach höhere Transkriptmenge [272]. Aufgrund der präzisen Ausbalanzierung des MEV-Wegs, wäre eine Akkumulation der Pathway-Enzyme kontraproduktiv, und würde nicht zu höheren Produktausbeuten führen.

In Abb. 4.68 ist schematisch eine in dieser Arbeit erzeugte, cotransformierte Zelle dargestellt. Eine Kohlenstoffquelle wie Glukose (definiertes Medium) oder Glycerol (TB-Komplexmedium) wird von dem Organismus aufgenommen und dem primären Katabolismus bzw. der Glykolyse zugeführt. Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat bilden den Ausgangspunkt des endogenen DXP/MEP-Wegs, der schließlich in den essentiellen Prenylphosphaten (GDP, FDP, etc.) mündet. Diese werden daraufhin (hier nicht gezeigt) z. B. zu Carotenoiden, Steroiden oder Quinonen verknüpft und weiter funktionalisiert [273]. Dabei ist FDP lediglich ein Intermediat, das nicht in größeren Konzentrationen

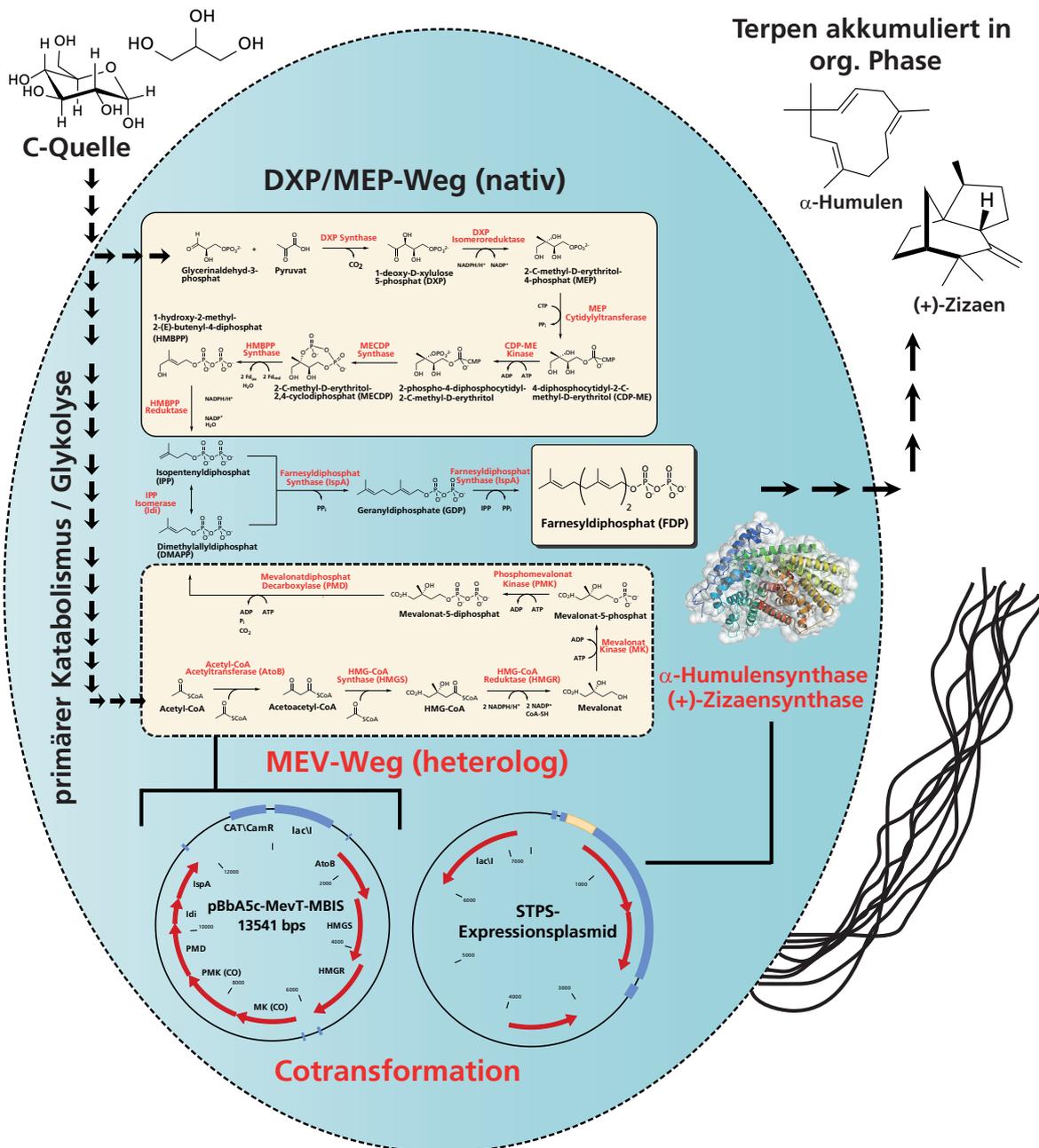


Abbildung 4.68 Schematische Darstellung einer Zelle eines in dieser Arbeit erzeugten Pathway-optimierten *E. coli* Stammes. Coexpression des MEV-Wegs mit 8 Stoffwechsellenzymen (kodiert auf Plasmid pBbA5c-MevT-MBIS) mit einem STPS-Expressionsplasmid (z. B. HUM(co) oder ZIZA(co)). Der nativ im Bakterium vorhandene DXP/MEP-Weg stellt FDP lediglich in nicht detektierbaren Spurenkonzentrationen zur Verfügung.

nen intrazellulär akkumuliert, sondern sofort in angeschlossenen Biotransformationen umgesetzt wird. Der Pool an Isoprenoiden zur Umsetzung durch die heterologen Terpenzyklasen ist daher äußerst begrenzt.

Parallel gelangt der Acylgruppenüberträger Acetyl-CoA (aktivierte Essigsäure) aus dem primären Katabolismus in den hier heterolog eingebrachten Mevalonat-Weg (codiert auf pBbA5c-MevT-MBIS). Die optimierten Schlüsselenzyme füllen den intrazellulären Isoprenoid-Pool kontinuierlich auf. Die im Überschuss vorhandene, über Fusionsstrategien aktiv exprimierte STPS, nutzt die Isoprenoidphosphate als Substrat und zyklisiert sie zu den Zielprodukten (α -Humulen bzw. (+)-Zizaen). Eine Akkumulation von Isoprenoid-Vorläufern wird verhindert, so dass diese nicht

wachstumshemmend oder gar cytotoxisch wirken können, was bereits zuvor beobachtet wurde [25, 274].

Die Extraktion der Sesquiterpenprodukte erfolgte *in situ* über einen 2-Phasen-Kultivierungsprozess. Das Kulturmedium ist dabei mit 20 % (v/v) organischem Lösungsmittel überschichtet, so dass die hydrophoben Terpene an der Phasengrenze in die organische Phase übergehen. Sie können somit das Kulturgefäß nicht über den Gasraum verlassen. Die Auswahl des Lösungsmittels ist kritisch für diesen Prozessschritt.

Aromatische Kohlenwasserstoffe mit einem Verteilungskoeffizienten n-Oktanol/Wasser $\log P_{O/W}$ unter 3 lagern sich in die Zellmembran ein und besitzen eine extreme Cytotoxizität gegenüber gramnegativen Organismen [275]. Isooctan wurde aufgrund seines hohen Siedepunktes von 99 °C (minimaler Produktverlust während Kultivierung bei 20 °C), der hohen Hydrophobizität (effiziente Extraktion der Sesquiterpene), geringer Wasserlöslichkeit (0,56 mg L⁻¹ bei 25 °C) sowie der niedrigen Toxizität gegenüber *E. coli* (nicht aromatisch, $\log P_{O/W} = 4,09$)³⁴ als geeigneter Kandidat angesehen.

4.9.1 Biotechnologische Darstellung von α -Humulen

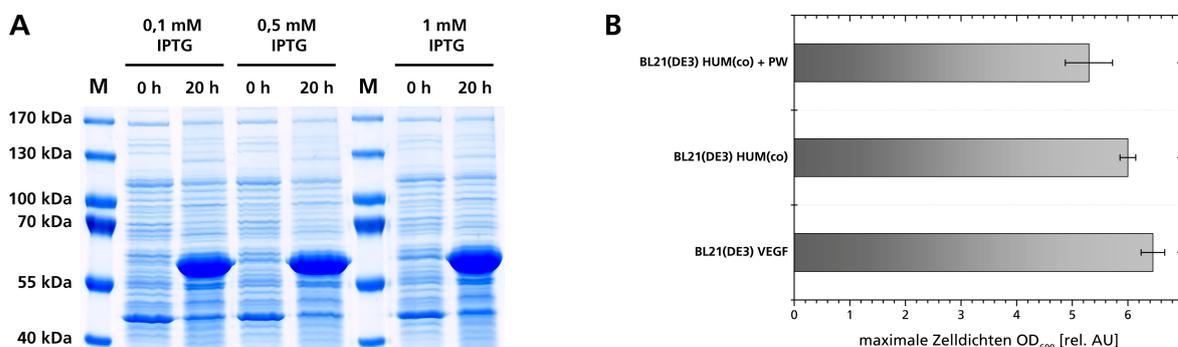


Abbildung 4.69 (A) SDS-PAGE Analyse von normierten Proben des Ganzzellproteins vom PW-optimierten HUM(co)-Stamme bei Verwendung unterschiedlicher IPTG-Konzentrationen. (B) Maximal erzielte Zelldichten von parallelen Kultivierungen von BL21(DE3) pET-16b::HUM(co) mit/ohne Pathway sowie BL21(DE3) VEGF, 18 h nach Induktion bei 20 °C.

Zunächst wurde das Expressionsverhalten des PW-optimierten HUM(co)-Stammes überprüft, um die Produktion der STPS sowie der weiteren 8 Enzyme nachweisen zu können. Ein Einfluss von IPTG auf die Expression von HUM(co) wurde nicht beobachtet, in allen induzierten Proben ist nach 20 h bei 20 °C eine starke Überexpression im Ganzzellprotein erkennbar (Abb. 4.69, A). Wie bereits vermutet, ist die Expression der 8 Stoffwechsellenzyme im SDS-PAGE Proteingel nicht nachweisbar. Die Enzyme befinden sich zwar verteilt über einen breiten Größenbereich, sind jedoch alle kleiner als HUM(co) (66,7 kDa). Idi ist mit 33 kDa das kleinste, während die (verkürzte) tHMGR mit 60 kDa das höchste MW aller Pathwayenzyme aufweist. In diesem Bereich ist keine Überexpression erkennbar. Ein Nachweis der erfolgreichen Cotransformation musste durch Bestätigung der Produktbildung erfolgen.

In parallelen SK-Kultivierungen mit TB-Medium (100 mL, 20 mL Isooctan, 20 °C, 150 rpm, 0,1 mM IPTG) wurde das Wachstumsverhalten des PW-optimierten, sowohl mit dem ursprünglichen HUM(co)-Stamm, als auch mit einer entsprechenden Negativkontrolle (VEGF-produzierender BL21(DE3)) von Maren Lönne, laufende Dissertation, Leibniz Universität Hannover) verglichen. Nachdem die Kulturen die stationäre Phase erreicht hatten, wurden die oberen organischen Phasen beprobt und direkt über GC-FID analysiert.

³⁴ Stoffparameter aus GESTIS-Stoffdatenbank, <http://www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank>.

Aufgrund der höheren DNA-Last (ungefähr vierfache DNA-Menge) und der zusätzlichen Expressionsprodukte, wies der cotransformierte Stamm ein geringfügig schlechteres Wachstumsverhalten im Vergleich zum ursprünglichen BL21(DE3) HUM(co) auf. Es wurde eine etwas geringere, maximale Zelldichte von OD_{600} 5,3 (im Vergleich zu OD_{600} 6) nach 18 h erzielt (Abb. 4.69, B). Der Einfluss auf den Zellmetabolismus war somit weitaus geringer, als zunächst erwartet wurde.

Zudem konnte keine signifikante Toxizität des Isooctans nachgewiesen werden, obwohl die Kulturen kontinuierlich mit dem organischen Lösungsmittel in Kontakt standen. Im Verlauf der Kultivierung löste sich das 2-Phasen-System (wässrig unten, organisch oben) auf und es bildete sich, aufgrund der Schüttelbewegung, eine Emulsion mit eingeschlossenen Luftblasen aus. Der Sauerstoffeintrag sorgte so für eine stetige Extraktion der flüchtigen Produkte. Ohne Schüttelbewegung trennten sich die Phasen innerhalb weniger Minuten wieder vollständig.

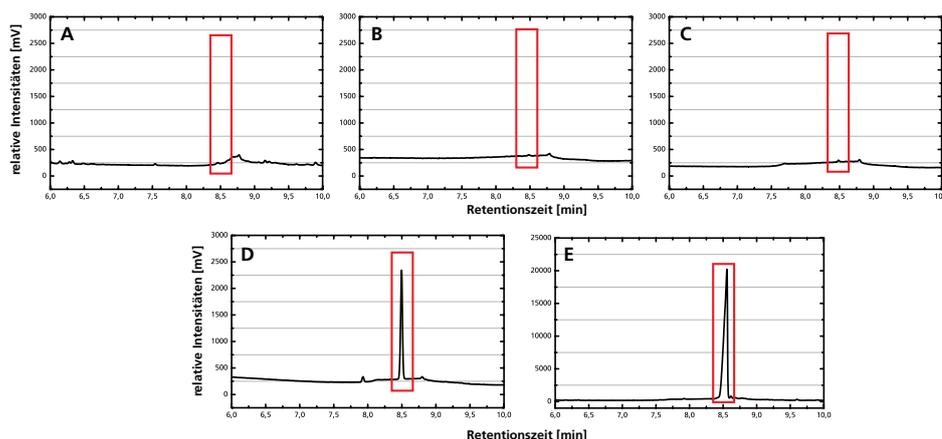


Abbildung 4.70 GC-Analyse von Proben der organischen Phase (Isooctan) überschichteter Kulturen, 20 h nach Induktion. (A) Nicht angeimpftes TB-Medium. (B) Ein VEGF produzierender *E. coli* Stamm als Negativkontrolle. (C) BL21(DE3) pET-16b::HUM(co), ohne MEV-Weg. (D) BL21(DE3) pET-16b::HUM(co) und pBbA5c-MevT-MBIS. (E) α -Humulene, authentischer Standard, 1:1000 verdünnt.

Abb. 4.70 zeigt GC-FID Analysen der organischen Phasen sowie eines authentischen Humulensstandards im Vergleich. Um eine Kontamination von Medienbestandteilen und dem Lösungsmittel auszuschließen, wurde ein nicht angeimpfter Schüttelkolben mit Isooctan überschichtet (A). Weder durch den VEGF-produzierenden Stamm (B), noch durch HUM(co) ohne MEV-Weg, wurden Sesquiterpene in quantifizierbaren Konzentrationen produziert. Dies beweist, dass der endogene FDP-Pool aus dem DXP-Weg das Substrat nicht in signifikanten Mengen bereitstellen kann. Ein sehr kleiner (möglicher) Terpenpeak bei einer Retentionszeit von 8,5 min (C) deutete jedoch auf mögliche Spurenkonzentrationen von α -Humulene hin.

Im Gegensatz dazu konnte in Kulturen des PW-optimierten BL21(DE3) (D) die Bildung von α -Humulene in höheren Konzentrationen gezeigt werden. Die Retentionszeit des Sesquiterpenpeaks stimmte exakt mit der des authentischen Standards überein. Über eine Kalibration (vgl. B.5) konnte eine durchschnittliche Produktbildung von $9,85 \text{ mg L}^{-1} (\pm 0,43)$ in den SK-Versuchen nachgewiesen werden.

4.9.2 Biotechnologische Darstellung von (+)-Zizaen

Nachdem die erfolgreiche Produktion von α -Humulene durch die MEV-Weg-Coexpression gezeigt werden konnte, sollte diese Strategie zur Darstellung der Zielverbindung (+)-Zizaen weiter optimiert werden. Es galt zunächst zu klären, ob eine erhöhte Temperatur nach Induktion einen positiven Einfluss auf die Produkttiter haben würde. Bei einer Kultivierungstemperatur von 30°C

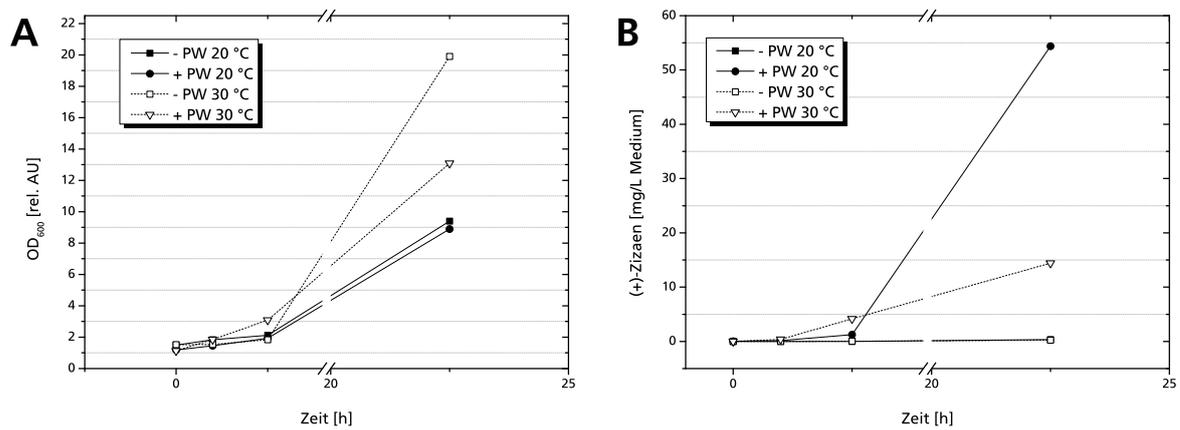


Abbildung 4.71 Produktion von (+)-Zizaen mit und ohne Coexpression des heterologen MEV-Wegs (+PW = mit Pathway) bei verschiedenen Temperaturen. (A) Verlauf der Zelldichten (OD_{600}) bei den unterschiedlichen Schüttelkolbenkulturen. (B) Akkumulierte Menge an (+)-Zizaen in Isooctan-Phase, bezogen auf Medienvolumen.

wurden höhere Endzelldichten erwartet. Da das Temperaturoptimum von *S. cerevisiae* bei ca. 28 °C liegt, wurde zudem mit einer erhöhten Aktivität der MEV-Enzyme gerechnet. Auch die (+)-Zizaensynthese zeigte während *in vitro* Umsetzungsversuchen bei 30 °C die höchsten Umsatzraten (vgl. 4.8.6).

Um einen ausreichenden Sauerstoffeintrag in die sich ausbildenden Emulsion aus Isooctan und Kulturmedium zu gewährleisten, wurde die Schüttelgeschwindigkeit von 150 rpm auf 200 rpm erhöht. Um eine Limitierung des Terpenstoffwechsels durch die Kohlenstoffquelle zu vermeiden, wurde zudem die Glycerolkonzentration im Komplexmedium von 0,4 % auf 1,2 % verdreifacht.

Nach 22,5 h konnten bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C eine Konzentration von $\sim 14,4 \text{ mg L}^{-1}$ gemessen werden. Bei 20 °C stieg die Terpenkonzentration um das fünffache ($\sim 54,4 \text{ mg L}^{-1}$). Für die Stämme ohne Coexpression (-PW) wurde keine Produktbildung detektiert (Abb. 4.71, A). Trotz der höheren Endzelldichten (OD_{600} 8,9 bei 20 °C vs. OD_{600} 13,1 bei 30 °C) und der wahrscheinlich höheren Prozessivität des MEV-Wegs, war eine Erhöhung der Prozess Temperatur kontraproduktiv. Limitierend wird hier die verminderte Menge an korrekt gefalteter und somit aktiver ZIZA gewirkt haben, da die Synthese trotz der SUMO-Fusion bei höheren Temperaturen fast ausschließlich in Form von inclusion bodies vorlag (vgl. 4.8.2).

Um in Zukunft eine bessere Prozesscharakterisierung durchführen zu können, sollte der PW-optimierte ZIZA-Stamm nun an ein definiertes Salzmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle adaptiert werden. Als Medium wurde eine angepasste Variante des ursprünglichen M9-Minimalmediums [276, 277] eingesetzt, das neben Puffersalzen lediglich chemisch-definierte Spurenelementlösungen enthielt (vgl. A.7).

Das Wachstumsverhalten und die maximal erzielbaren (+)-Zizaentiter in der organischen Phase sollten bei variierten Glukosekonzentrationen (0,5 %–2 %) in Schüttelkolbenversuchen untersucht werden. Eine direkte Inokulation der Vorkulturen durch Cryostocks führte, aufgrund der minimalen Nährstoffversorgung, zu keinem Wachstum der Kulturen. Die Vorkulturen mit Minimalmedium wurden daher stets durch eine, im exponentiellen Wachstum befindlichen, Kultur in TB-Komplexmedium angeimpft.

Hauptkulturen wurden mit einer Startzelldichte von OD_{600} 0,1 angeimpft. Nach Erreichen von OD_{600} 0,8 (ca. 3 h bei 37 °C) wurde mit 0,1 mM IPTG induziert und, analog zu den vorhergehenden Versuchen, die Kulturbrühe mit 20 % (v/v) Isooctan überschichtet. In Abb. 4.72 ist der Verlauf der Zelldichte, Produktkonzentration und Substratkonzentration über 120 h dargestellt (Dreifachbestimmung je Experiment).

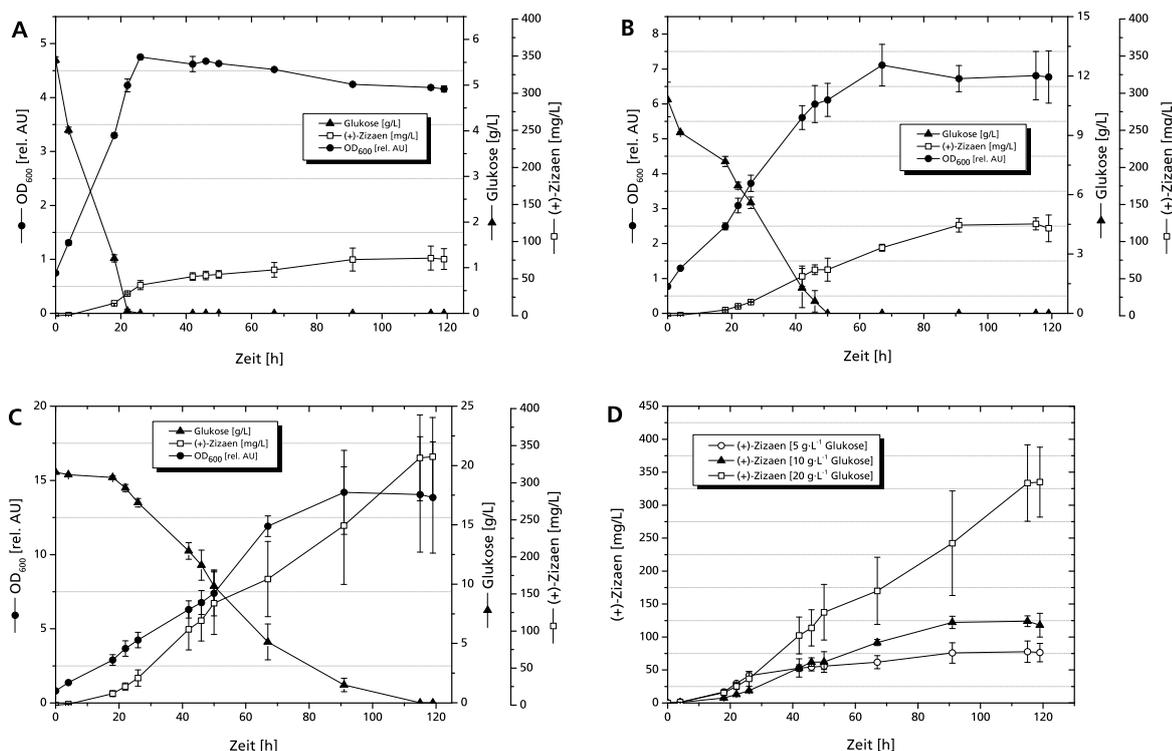


Abbildung 4.72 Produktion von (+)-Zizaen in definiertem Medium bei verschiedenen Glukosekonzentrationen (als einzige Kohlenstoffquelle). (A) 0,5 % (5 g L^{-1}) Glukose. (B) 1 % (10 g L^{-1}) Glukose. (C) 2 % (20 g L^{-1}) Glukose. (D) Direkter Vergleich der erzielten (+)-Zizaenkonzentrationen in mg L^{-1} Medium.

Die stationäre Wachstumsphase wurde bei 0,5 % Glukose bereits nach 28 h erreicht (A), während bei 1 % (67 h, B) und 2 % (90 h, C) eine deutlich längeres (lineares) Wachstum beobachtet werden konnte. Entsprechend der höheren Substratkonzentration wurde bei 2 % Glukose die höchste maximale Zelldichte von $\text{OD}_{600} 14$ gemessen ($0,5\% = \text{OD}_{600} 4,8$; $1\% = \text{OD}_{600} 7,1$).

Nach vollständigem Verbrauch der Kohlenstoffquelle (Erreichen der stationären Phase) stieg die Terpenkonzentration noch weiter an. Dies könnte über die Aufnahme von Nährstoffen aus lysierten Zellen erklärt werden, die anschließend durch die noch aktiven Enzyme umgesetzt werden (ähnlich resting cells). Möglicherweise ist der Anstieg des Produkttiters auch auf die längere Dauer der Extraktion zurückzuführen. Ein signifikanter Verlust an organischer Phase, und somit eine Aufkonzentrierung des Produkts, konnte hierbei jedoch nicht beobachtet werden.

Bei der erhöhten Glukosekonzentration von 2 % im Medium, wurde bereits vor dem vollständigem Verbrauch des Substrats ein Stagnieren des Zellwachstums beobachtet (C). Dies kann auf die Bildung von Acetat aus Glukose zurückzuführen sein, die bereits in niedrigen Konzentrationen wachstumshemmend auf *E. coli* wirkt [278].

Durch Einsatz eines chemisch-definierten, glukosehaltigen Mediums, wurde unter den zuvor ermittelten idealen Kultivierungsparametern (20°C ; 200 rpm; $0,1 \text{ mM IPTG}$) (+)-Zizaenkonzentrationen von maximal 340 mg L^{-1} (D) erzielt. Betrachtet man die Stoffbilanz des Mevalonat-Weges, so ergibt sich eine theoretisch mögliche Ausbeute an Sesquiterpenen von $0,25 \text{ g pro g Glukose}$ (metabolische Massenausbeute 25 %) [279]. Die erzielte Ausbeute der (+)-Zizaenproduktion beträgt $0,017 \text{ g g}^{-1}$ Substrat (340 mg L^{-1} nach 115 h mit 20 g L^{-1} Glukose). Geht man davon aus, dass lediglich die Glukose in den Terpenstoffwechsel einfließt, wurden in dieser Arbeit bereits 6,8 % der rechnerischen Maximalausbeute erzielt.

4.9.3 Testung eines polymeren Adsorbermaterial zur Abreicherung

Als Alternative zum bisher verwendeten 2-Phasen-System mit org. Lösungsmittel, sollte im direkten Vergleich ein polymerer Adsorber zur *in situ* Extraktion der Terpenverbindungen getestet werden. Das Adsorberharz Amberlite™ XAD4 wurde für die Abreicherung der kleinen, hydrophoben Ziel-moleküle aus der Kulturbrühe als geeignet erachtet. Die farblosen Kugeln (Durchmesser 0,5 mm im Mittel) besitzen durch ihre makroporöse Struktur eine äußerst hohe Oberfläche von über $750 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ bei einem Porendurchmesser von 150 \AA .

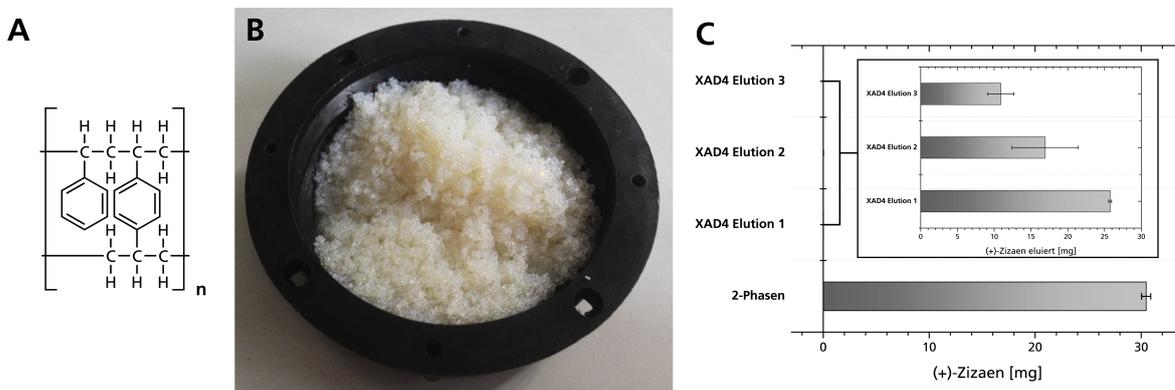


Abbildung 4.73 (A) Chemische Struktur von Amberlite™ XAD4. (B) Partikel/Kugeln des Polymerharzes mit einem Durchmesser von 0,5 mm. (C) Erzielte (+)-Zisaenmengen im Vergleich. Eingesetzter Graph: Eluierte Produktmenge nach 1., 2. und 3. Extraktionsschritt.

Die chemische Struktur und einzelne Partikel des Polymers sind in Abb. 4.73 (A, B) dargestellt. Das Harz ist über das gesamte pH-Spektrum stabil und widersteht Temperaturen bis $135 \text{ }^\circ\text{C}$ sowie hohen Drücken, so dass es problemlos über Autoklavieren sterilisiert werden kann. Industriell wird es primär zur Abreicherung volatiler Komponenten aus Gasströmen oder hydrophober Moleküle aus polaren Lösungsmittel (z. B. Wasser) eingesetzt, was exakt der hier geplanten Verwendung entspricht.

Vor Verwendung wurden die Adsorberpartikel gründlich gespült (H_2O), mit Isopropanol konditioniert, erneut gespült und autoklaviert. Nach Induktion wurde der Adsorber in einer Konzentration von 100 g L^{-1} Medium (entsprechend 10 % (w/v)) steril zu den Kulturen gegeben (definiertes Medium; 2 % Glukose; 100 mL Schüttelkolben; $20 \text{ }^\circ\text{C}$; 200 rpm). GC-FID Analytik der organischen Phasen nach 100 h Kultivierungszeit ergab eine (+)-Zisaenmenge von $30,47 \text{ mg} (\pm 0,43)$ gelöst in jeweils 20 mL Isooctan (Abb. 4.73, C). Bezogen auf das Medienvolumen, wurden somit durch das Lösungsmittel durchschnittlich $304,7 \text{ mg L}^{-1}$ angereichert. Die Konzentrationen waren vergleichbar zu den zuvor erzielten Ausbeuten unter identischen Bedingungen.

Aufgrund der rauen Struktur hatte sich nach 100 h ein dichter Biofilm um die einzelnen Harzpartikel gelegt, der vor Elution durch Spülen mit H_2O entfernt wurde. Zur Elution der hydrophoben Produkte und Regeneration des Adsorber eignen sich prinzipiell alle hydrophoben Lösungsmittel. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden die Adsorber jeweils in 20 mL Isooctan resuspendiert und für 5 min intensiv extrahiert. Die organische Phase wurde abfiltriert und die Elution zweimal mit konstantem Volumen wiederholt, um eine vollständige Abreicherung vom Adsorbermaterial zu gewährleisten.

Im ersten Regenerationsschritt wurde lediglich eine Menge von $25,8 \text{ } \mu\text{g} (\pm 0,2)$ des (+)-Zisaen vom Adsorber gelöst. Zudem war die Extraktion durch Isooctan nicht vollständig, da im 2. und 3. Elutionsdurchlauf noch 65 % bzw. 42 % des Produktes, bezogen auf den 1. Durchlauf, vom Harz abgereichert werden konnte. Mit dem verwendeten Lösungsmittel wurde selbst nach mehreren Zyklen

keine vollständige Elution realisiert, was auf eine starke Bindung des Produkts bzw. eine hierfür nicht ausreichende Hydrophobizität ($\log P_{O/W}$ zu niedrig) von Isooctan schließen lässt.

Die um den Faktor 1.000 geringeren Konzentrationen könnte auch auf dem sich ausbildenden Biofilm um die Harzpartikel beruhen. Möglicherweise besaß der Adsorber bereits nach kurzer Zeit keine Kontaktfläche zur Kulturbrühe, so dass die volatilen Terpenprodukte nicht adsorbieren konnten und über den Kopfraum die Kulturgefäße verließen.

4.9.4 Zusammenfassung Coexpression des MEV-Stoffwechselwegs

Die STPS-Expressionsplasmide für die α -Humulensynthese sowie die (+)-Zizaensynthese wurden erfolgreich zusammen mit einem heterologen Mevalonat-Stoffwechselweg cotransformiert. Obwohl keine Überexpression der Pathway-Enzyme stattfand, konnte durch Coexpression erstmalig die vollständig biotechnologische Darstellung der beiden komplexen Sesquiterpenverbindungen im mg L^{-1} Bereich gezeigt werden.

In Batch-Schüttelkolbenkultivierungen mit chemisch-definierten Medium, wurde unter optimierten Kultivierungsparametern die Produktion von (+)-Zizaen aus der Kohlenstoffquelle Glukose realisiert. Dies ermöglichte Produktausbeuten von über 300 mg L^{-1} . Da die, auf den Metabolismus bezogene Gesamtausbeute des Prozesses, noch unter 10 % lag, besteht noch ein großes Optimierungspotential. Ein zur Vereinfachung des Downstreaming getesteter Polymeradsorber, zeigte eine ungenügende Affinität gegenüber dem hydrophoben Terpenprodukt. Die eluierten Produktkonzentrationen waren um den Faktor 1.000 niedriger, so dass zur Zeit das hier etablierte 2-Phasen-Kultivierungssystem mit Isooctan als ideale Abreicherungsstrategie anzusehen ist.

Die Forschungsarbeiten im Rahmen dieser Dissertation verfolgten das Ziel, die Grundlagen zu schaffen, um in Zukunft einen vollständig nachhaltigen und ressourcenschonenden Prozess zur Herstellung wertvoller Duftstoffe realisieren zu können. Ein zentrales Ziel war die Bereitstellung, Charakterisierung und Optimierung von Expressionssystemen für ein breites Portfolio an teilweise noch nicht beschriebenen Biokatalysatoren. Ausgehend von einem einfachen Terpenalkohol aus nachwachsenden, pflanzlichen Quellen sollte das universelle Enzymsubstrat FDP für biokatalytische Umsetzungen hergestellt werden. Die Synthese des Terpenvorläufers sollte möglichst praktikabel sein und hohe Ausbeuten an Substrat erzielen.

Auch die Möglichkeit eines vollständig biotechnologischen Prozessansatzes, basierend auf langjährigen Vorarbeiten im Bereich synthetischer Biotechnologie, sollte hier aufgezeigt werden. Nachfolgend sind alle bedeutenden Schlüsselergebnisse der Forschungsarbeit nochmals übersichtlich zusammengestellt. Es wird zusätzlich auf weiterführende Arbeiten sowie auf potentielle Herausforderungen eingegangen.

Synthese des Substrats Farnesyldiphosphat (FDP)

Nach einem direkten Vergleich von Routen zur Synthese von Farnesol \rightarrow Farnesyldiphosphat, wurde das Verfahren nach Keller et al. [151] aufgrund der praktikablen und schnellen Reaktionsführung ausgewählt. Die gute Auftrennung der gebildeten Phosphatspezies durch Säulenchromatographie konnte anhand von DC-Analysen nachvollzogen werden. Eine HPLC-Trennmethode (reversed phase) wurde etabliert, die eine Quantifizierung der Reaktionsprodukte ermöglichte. Die Identität von FDP konnte anhand von $^1\text{H-NMR}$ und, zur Unterscheidung von weiteren Phosphatspezies, über $^{31}\text{P-NMR}$ Spektren bestätigt werden.

Durch Aufbau einer vergrößerten Chromatographieapparatur und ersten Aufskalierung der Reaktion, wurde die Synthese erfolgreich auf einen größeren Maßstab übertragen. Dies ermöglichte die Herstellung von bis zu 0,5 g pro Batch, bei einer molaren Ausbeute von 15 % bezogen auf das Edukt. Bei der etablierten Methode erwies sich nicht die Phosphorylierungsreaktion, sondern die nachfolgende chromatographische Produktaufarbeitung ein limitierender Faktor. Die Auftrennung, sowohl zur Produktreinigung, als auch bei Analytik via RP-HPLC, war ausreichend aber noch nicht ideal. Hier besteht durch die Verwendung verbesserter chromatographischer Parameter (längere Säule, höhere Flussraten bzw. Drücke, optimierte Zusammensetzung des Eluenten, kleinere Partikelgrößen) weiteres Optimierungspotential. Betrachtet man einen möglichen industriellen Einsatz des Prozesses, so erscheint eine weitere Aufskalierung in relevante Maßstäbe als realistisch. Hierbei muss jedoch der zur Zeit noch hohe Preis des natürlichen Farnesols in Betracht gezogen werden. Obwohl das Edukt am Markt um Größenordnungen günstiger ist als das Produkt FDP, so handelt es sich um eine Feinchemikalie und kein Bulk-Rohstoff wie z. B. Glukose.

Expression, Aufreinigung und Charakterisierung des PTS-Isoenzym

Aus einer cDNA-Bibliothek von *P. cablin* konnte die Sequenz einer Patchoulolsynthase-Isoform erfolgreich isoliert werden. Über Sequenzierung wurden 19 Aminosäureaustausche im Vergleich zu einer beschriebenen PTS identifiziert. Das Isoenzym besaß eine starke Tendenz zur Aggregatbildung in *E. coli*. Durch Assemblierung unterschiedlicher Plasmidkonstrukte, Codon-Optimierung

sowie Variation des Expressionsstammes konnte ein optimaler Produktionsorganismus erzeugt werden. Unter idealen Kultivierungsbedingungen (TB-Medium; 20 °C; 0,5 mM IPTG), war es möglich, die mit Thioedoxin fusionierte Synthase in Konzentrationen von 52 mg g⁻¹ BTM löslich und aktiv zu produzieren.

Ein intramolekularer His-Tag ermöglichte die effiziente Aufreinigung der Synthase über mit Metall²⁺-dekorierte Membranadsorber. Eine Kühlung des Adsorbers war zur Aufrechterhaltung der Stabilität und Aktivität erforderlich. Eine Beladung der Membran mit Co²⁺-Kationen, im direkten Vergleich zu Ni²⁺, resultierte in einer höheren Spezifität. In mehreren Aufreinigungsläufen wurden Enzymreinheiten von über 95 % erzielt. Nach Umpufferung durch Ultrafiltration konnten Proteinausbeuten von bis zu 2,84 mg g⁻¹ FZM im Falle von TRX-PTSi realisiert werden. Die Identität des reinen Enzyms wurde durch einen Peptidmassenfingerringdruck (MALDI-TOF-MS) gezeigt. Die Sequenzabdeckung betrug 24 %. Durch 2D-Gelelektrophorese nach IEF wurde ein pI von 5,0 experimentell bestimmt. Es besteht somit die Möglichkeit, in Zukunft eine ungetaggte Variante von PTSi über Anionenaustauscherchromatographie aus Zellrohextrakt aufzureinigen.

Es wurde ein Zwei-Phasen-Assay adaptiert, bei dem durch Übersichten der wässrigen Reaktionslösung (Enzym, Substrat, Metallion) durch ein organisches Lösungsmittel wie z. B. Isooctan, die flüchtigen Terpenkomponenten eingefangen und über GC analysiert werden konnten. Durch Vergleich mit authentischen Standards sowie Bestimmung der Masse von Fragmentationen über GC-MS, konnten viele Hauptkomponenten des nativen Patchouli-Öls im Produktgemisch wiedergefunden werden. Interessanterweise war jedoch nicht das charakteristische (-)-Patchoulol die Hauptkomponente im Enzymprodukt, sondern Germacren A (bzw. das Umlagerungsprodukt β -Elemen). Es ist somit möglich, dass mehrere Isoformen der PTS in der Pflanze vorhanden sind, die alle die Bildung von Komponenten des Öls katalysieren, allerdings in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Expression der Isoformen *in planta* könnte vielleicht aufgrund von äußeren Umwelteinflüssen gesteuert werden. Germacren A gilt als ein potentes Alarmpheromon bei Insekten [280] und wird möglicherweise als natürliches Pestizid von der Pflanze eingesetzt.

Da keine Röntgenkristallstrukturen vom Isoenzym verfügbar waren, wurden fundierte Proteinmodelle *in silico* errechnet und strukturell analysiert. Docking-Simulationen bestätigten die Lage des aktiven Zentrums, dass sich aus zwei Regionen am Eingang einer Tunnelstruktur zusammensetzt. Durch eine Überlagerung der katalytischen Regionen des Isoenzym mit einem Proteinmodell der PTS, konnten einzelne Aminosäuren identifiziert werden, die möglicherweise für die Verschiebung des Produktspektrums verantwortlich sein könnten. Dies sind die Austausch HIS-CYS₄₅₄ sowie LYS-ASN₄₅₈, die mögliche Kandidaten für zukünftige, gezielte Mutationsstudien mit der PTS-Isoform darstellen.

Zur weitergehenden Charakterisierung und Anwendung von PTSi (Kinetik, Aufklärung des Reaktionsmechanismus, Enzymimmobilisierung) wurden die Produktionsstämme nach Abschluss der beschriebenen Arbeiten an übergeben (Thore Frister, laufende Dissertation, Leibniz Universität Hannover).

Produktion und Charakterisierung weitere Terpensynthase

Zur Erweiterung des Produktportfolios sollte zunächst eine α -Humulensynthase aus Shampoo Ingwer, mit bekannter Sequenz [86], rekombinant in *E. coli* produziert werden. Eine direkte Isolation aus einer Genbibliothek der nativen Pflanze war, trotz intensiver Optimierung der RNA-Extraktionsstrategie, nicht erfolgreich. Nach Codon-Optimierung wurde ein vollständiger ORF durch Assemblierung synthetischer DNA-Fragmente erzeugt. Diese Synthase zeigte ein im Vergleich zur PTSi deutlich besseres Expressionsverhalten in *E. coli* BL21(DE3). Nach Optimierung der Kultivierungsbedingungen, wurden Proteinkonzentrationen in Schüttelkolbenversuchen von

bis zu $66,7 \text{ mg g}^{-1}$ BTM erzielt. Eine Proteinfusion zur Löslichkeitssteigerung wurde daher nicht in Erwägung gezogen. Nach Analyse von Aktivitätsassays und Vergleich mit authentischem Standard, wurde α -Humulen als das Hauptprodukt der enzymatischen Umsetzung identifiziert. Ein nur zu 2 % im Produktgemisch vorhandenes Nebenprodukt konnte nicht eindeutig zugeordnet werden. Somit war nun ein Modellstamm verfügbar, der für erste Versuche zur Coexpression von Stoffwechsellzymen eingesetzt werden konnte, und zudem mit α -Humulen die Bildung eines direkten Vorläufers des Zytostatikums Zerumbon katalysierte.

Nach Abschluss der Versuche wurde der erzeugte Stamm zur näheren Charakterisierung (Kinetik, Aufreinigungsstrategie) weiter gereicht (Semra Alemdar, laufende Dissertation, Leibniz Universität Hannover). Durch parallele Expression einer spezifischen Cytochrom-P450 Oxidoreduktase könnte in Zukunft eine direkte Biotransformation von FDP zum oxidierten Sesquiterpenoid Zerumbon realisiert werden. Auch eine gezielte chemische Oxidation des Terpenrückgrats ist denkbar, wobei hier jedoch ein äußerst regioselektiver Katalysator zur gezielten Funktionalisierung eingesetzt werden müsste.

Als weitere Zielverbindung wurde (+)-Zizaen, als Vorläufer mehrerer funktioneller Terpenverbindungen, ausgewählt. Die patentierte Sequenz einer (+)-Zizaensynthase [250] wurde zuvor nicht umfassend biochemisch charakterisiert. Obwohl frisches Vetiver-Gras für molekularbiologische Untersuchungen bezogen werden konnte, war eine direkte Isolation aus der komplexen Probenmatrix auch hier nicht möglich. Ein über Codon-optimierte DNA-Strings zusammengefügtes Plasmidkonstrukt ermöglichte zunächst keine lösliche/aktive Produktion des Zielenzyms. Über eine Expressionsstrategie durch einen über Kälteschock induzierbaren Promotor, sowie eine Proteinfusion an eine hochlösliche SUMO-Domäne, konnte die aktive Proteinausbeute dieser schwer exprimierbaren STPS signifikant gesteigert werden. Es wurden Proteinkonzentrationen von maximal 48 mg g^{-1} BTM (SUMO-Fusion) bzw. 42 mg g^{-1} BTM (Kälteschock-Induktion) in TB-Medium erzielt. Aufgrund der extrem niedrigen Kultivierungstemperatur von 15°C stagnierte das Wachstum des Kälteschock-Stammes bereits bei einer Zelldichte von $\text{OD}_{600} 1,9 \pm 0,2$; während für den SUMO-Stamm ein $\text{OD}_{600} 4,8 \pm 0,3$ in SK-Kultivierungen erzielt werden konnte.

Eine Aufreinigung von SUMO-ZIZA erfolgte zunächst über das für STPS adaptierte IMAC-Protokoll. Um die Reinheit weiter zu steigern, wurde zudem die Abreicherung der Synthase aus Zellextrakt über eine Strep-Tag Adaptermolekül realisiert. Die hohe Spezifität der Strep-Tag-Sequenz ermöglichte Reinheiten von über 98 %, wobei die Bindeeffizienz des Adapters jedoch nur bei 65,9 % lag. Pro Durchlauf konnten so $1,02 \text{ mg g}^{-1}$ FZM reine (+)-Zizaensynthase eluiert werden.

Ein Verdau mit der hochspezifischen SUMO-Protease ULP-1 ermöglichte die Entfernung des Fusionsproteins vom Zielpeptid, nach Inkubation für 1 h bei 12°C . Auch für ZIZA wurde die Sequenzidentität eindeutig mittels MALDI-TOF-MS bestätigt. Die Sequenzabdeckung der gemessenen Peptidfragmente betrug 18,6 %. Über 2D-Gelelektrophorese wurde ein pI von 4,9 für die unfusionierte/gespaltene Synthase ermittelt.

Da kein authentischer Standard von (+)-Zizaen verfügbar war, wurde der Nachweis des Enzymprodukts durch Vergleich mit publizierten Fragmentspektren (GC-MS) sowie durch Berechnung von Retentionsindizes durchgeführt. Durch Quantifizierung der Produktbildung über die Zeit bei Variation der Substratkonzentration, wurde die Enzymkinetik der rekombinanten ZIZA erstmalig bestimmt. Ein K_m von $1,111 \mu\text{M}$ ($\pm 0,113$) deutete auf eine hohe Substrataffinität hin, die von der maximalen Reaktionsrate abgeleitete Wechselzahl $K_{cat} = 2,95 \text{ min}^{-1}$ bewies eine außerordentlich langsame Produktbildung, die jedoch vergleichbar mit ähnlichen Synthesen ist. Hier könnte durch gezielte Enzymoptimierungsverfahren wie directed evolution [147] die katalytische Effizienz noch stark gesteigert werden, was bereits anhand ähnlicher Enzyme des Sekundärstoffwechsels gezeigt werden konnte [149].

Bei einer ersten Maßstabsübertragung in den 2 L-Bioreaktor, unter Steuerung des pH- und pO_2 -Werts, konnte die Produktion der löslichen (+)-Zizaensynthese auf 325 mg L^{-1} in TB-Medium gesteigert werden. Auch hier besteht durch Etablierung einer Strategie zur Hochzelldichtekultivierung in chemisch-definiertem Medium, noch ein großes Optimierungspotential, um die Synthese zukünftig in industriell relevanten Konzentrationen bereitstellen zu können.

Aufgrund der erzielten Enzymausbeuten und Reinheiten wurden Proben von ZIZA dem Institut für Bioanalytische Chemie der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt, wo zur Zeit an einer Kristallisation mit anschließender Röntgenstrukturanalyse der neuartigen STPS geforscht wird. Eine exakte Struktur der Synthese könnte in Zukunft zur Aufklärung des Zyklisierungsmechanismus von (+)-Zizaen beitragen, über den aktuell noch nichts näher bekannt ist.

Coexpression von Enzymen des Terpenstoffwechsels

Ein Expressionsplasmid mit 8 Enzymen eines heterologen Mevalonatwegs konnte zur erstmaligen, rein biotechnologischen Darstellung der in dieser Arbeit diskutierten Sesquiterpene bezogen werden [135]. Die unterschiedlichen Replikationsursprünge und eine zusätzlicher Selektionsmarker, ermöglichten die erfolgreiche Cotransformation und anschließende Coexpression mit zwei von drei der betrachteten STPS. Über geeignete Negativkontrollen konnte zunächst gezeigt werden, dass über den nativen *E. coli*-Isoprenoidstoffwechsel den jeweiligen Synthesen zu wenig Substrat zur Zyklisierung zu Sesquiterpenen zur Verfügung stand. Terpenprodukte wurde nur in nicht quantifizierbaren Spuren gebildet.

In den erzeugten Pathway-optimierten Expressionsstämmen war der intrazelluläre Pool an FDP signifikant erhöht, so dass eine nachweisbare Zyklisierung zu α -Humulen bzw. (+)-Zizaen ermöglicht wurde. In ersten Schüttelkolbenversuchen mit TB-Komplexmedium (Glycerol als C-Quelle), wurden über diese Strategie Produkttiter von $\sim 10 \text{ mg L}^{-1}$ (α -Humulen) sowie bis zu 54 mg L^{-1} ((+)-Zizaen) realisiert. Dabei wurde ein 2-Phasen-System mit Isooctan als organisches Lösungsmittel zur Produktanreicherung eingesetzt. Die zuvor angenommene geringe Toxizität des Isooctans konnte bestätigt werden, da vergleichbare Zelldichten in Vorversuchen ohne organische Phase erzielt werden konnten.

Durch Adaption an ein chemisch-definiertes Minimalmedium mit Glukose als C-Quelle, konnte der Einfluss unterschiedlicher Substratkonzentrationen auf das Wachstum und die Produktbildung überprüft werden. Höhere Glukosekonzentrationen ermöglichten größere Zelldichten und höhere Produkttiter. Unter den zuvor optimierten allgemeinen Kultivierungsparametern, wurden so maximale Zelldichten von $OD_{600} 14$ und (+)-Zizaenkonzentrationen von bis zu 340 mg L^{-1} nach 120 h erreicht. Bezogen auf den gesamten Prozess wurde somit bereits eine Gesamtausbeute von 6,8 % der metabolisch möglichen Ausbeute erzielt. Durch eine Optimierung der Substratkonzentration über statistische Versuchsplanung sowie Etablierung einer geeigneten Fütterungsstrategie für das Substrat (Fed-Batch), besteht hier noch ein immenses Optimierungspotential. Aufgrund der gesteigerten Acetatbildung ist eine Überfütterung der Kultur mit Substrat jedoch nicht zielführend.

Als eine alternative Downstream-Variante wurde in ersten Versuchen ein polymeres Adsorberharz zur Produktanreicherung aus der Kulturbrühe evaluiert. Im Vergleich mit der etablierten 2-Phasen-Kultivierung erwies sich jedoch dieser Ansatz als noch unausgereift. Eine nennenswerte Adsorption der hydrophoben Zielverbindungen und effiziente Elution waren nicht möglich. Zur Zeit existiert noch keine optimale Downstream-Variante von Sesquiterpenverbindungen aus wässrigen Lösungen. Neben der hier adaptierten 2-Phasen-Kultivierung, müssten in Zukunft weitere, möglichst ressourcenschonende Abreicherungsstrategien evaluiert werden. Hier könnte die Extraktion mittels ionischer Flüssigkeiten/überkritischem CO_2 , das Strippen aus der Gasphase oder der Einsatz eines spezifischen Adsorbermaterials mit hoher Produktaffinität in Frage kommen.

Im Folgenden sind noch einige weitere Herausforderungen aufgelistet, um zukünftig industriell relevante Ausbeuten der Sesquiterpene über die eingesetzte Coexpressionsstrategie erzielen zu können:

1. Ideal ausbalanzierte und hochprozessive Stoffwechselwege im Organismus (Optimierung der einzelnen Schlüsselreaktionen)
2. Umfassendes Verständnis der teilweise unbekanntenen Reaktionsmechanismen
3. Gezielte Optimierung/Steuerung der biokatalytischen Reaktion (Steigerung der Wechselzahlen durch directed-evolution, Enzymoptimierung)
4. Ermittlung einer idealen Prozessstrategie/Prozessparameter durch statistische Versuchsplanung (design of experiments)
5. Etablierung eines effizienten und ressourcenschonenden Downstreamings

Abschließender Ausblick

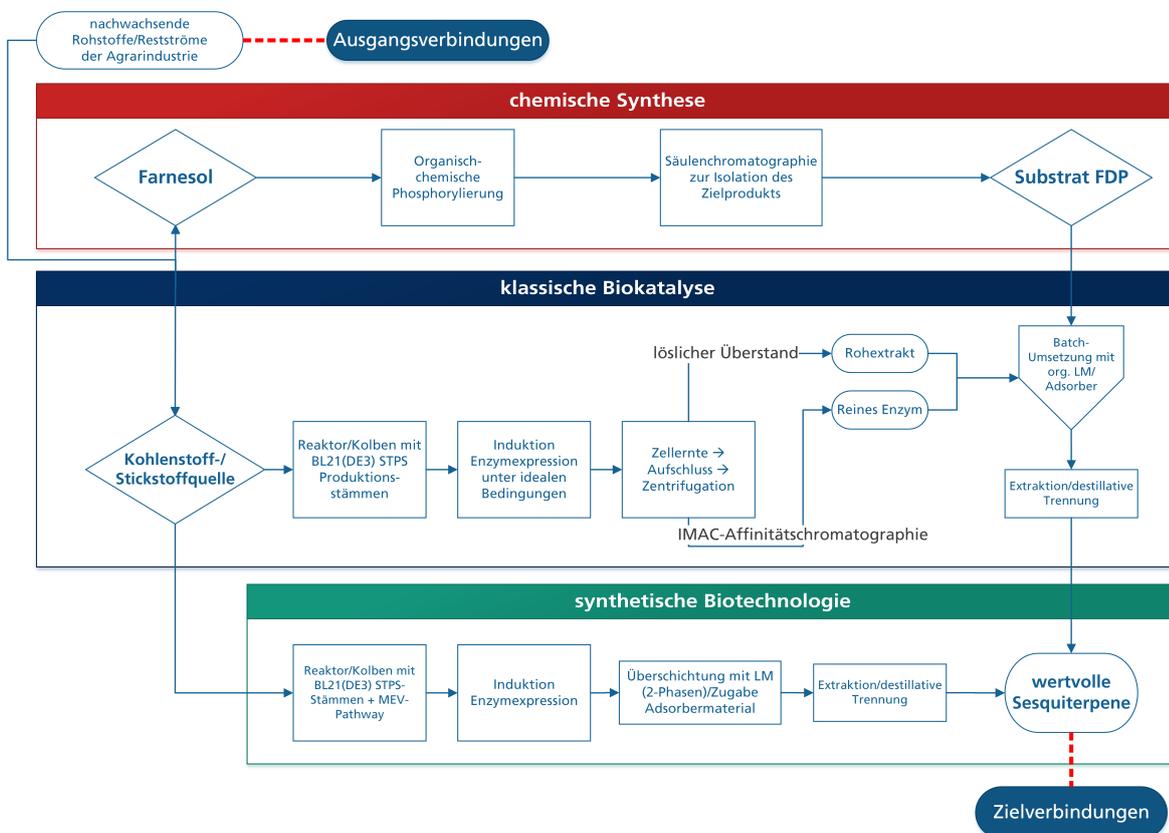


Abbildung 5.1 Flowchart der möglichen Prozessführung zur biokatalytischen Gewinnung von Sesquiterpenen aus Restströmen der Agrarindustrie. Synthetische Biologie ermöglicht es, die Zielverbindungen in weniger Prozessschritten zu erreichen, so dass Zeit und Ressourcen eingespart werden können.

Die biokatalytische Darstellung von funktionellen Naturstoffen ist im Falle von Sesquiterpenen eine sowohl ökologisch, als auch ökonomisch sinnvolle und umsetzbare Produktionsmöglichkeit. Im Flowchart Abb. 5.1 sind die hier etablierten und teilweise charakterisierten Prozessschritte zusammenfassend dargestellt. Auch im Falle der semi-synthetischen Darstellung kam ein nachwachsender Rohstoff (Farnesol) zum Einsatz. Sowohl die aufwändige chemischen Phosphorylierung, als auch der (vergleichsweise) geringe Marktwert der hergestellten Duftstoffe, lässt eine industrielle Produktion über diesen biokatalytischen Ansatz aktuell als eher schwer umsetzbar erscheinen

(roter+blauer Kasten). Allerdings besteht durch weitere Maßstabsvergrößerung und Vereinfachung der Substratsynthese, sowie Etablierung einer kontinuierlichen Reaktionsführung mit effizienter Produktanreicherung (Enzymimmobilisierung, Katalyse im Flow-Reaktor/Membranreaktor, Strippen der Komponenten aus Gasphase, etc.) durchaus eine Möglichkeit der Umsetzung.

Aufgrund des sehr hohen Wertschöpfungspotentials (einfache Kohlenstoffquelle aus Restströmen als einziges Substrat), wird die Darstellung über synthetische Biotechnologie (türkiser Kasten) sicherlich einige etablierte Quellen in Kürze überflüssig machen. Ein großer Vorteil ist die Modularisierung der Produktionsorganismen: Durch Austausch der Enzyme/Stoffwechselwege können vollständig andere Moleküle realisiert werden, wie hier am Beispiel von α -Humulen/(+)-Zizaen erfolgreich gezeigt werden konnte. Insbesondere bei komplexen Zielverbindungen, zu denen kein geeigneter organisch-synthetischer Zugang besteht, wird die synthetische Biotechnologie in naher Zukunft mit hoher Wahrscheinlichkeit nachhaltige Produktionswege ermöglichen und Herstellungskosten senken. Die Identifikation, Charakterisierung und Expressionsoptimierung neuartiger und interessanter Biokatalysatoren, wie in dieser Arbeit geschehen, wird dabei eine zentrale Rolle einnehmen.

MATERIALIEN

A.1 CHEMIKALIENLISTE

Tabelle A.1 Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits

Chemikalie	Hersteller
α -Cedren	Sigma-Aldrich, USA
α -Humulen	Sigma-Aldrich, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich, USA
Aceton	Merck KGaA, Deutschland
Acetonitril	Merck KGaA, Deutschland
Agar-Agar	BD Biosciences, USA
Agarose	Carl Roth, Deutschland
Amberlite™ XAD ₄ Adsorber	Dow/Rhom and Haas, USA
Aminoethylbenzensulfonylfluorid (AEBSF)	Carl Roth, Deutschland
Ammoniumdeuteroxid-Lsg. (25 %ig in D ₂ O)	Sigma-Aldrich, USA
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth, Deutschland
Ammoniumhydroxid (30 %ig)	Carl Roth, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Deutschland
Ammoniumsulfat	Carl Roth, Deutschland
Ampicillin	Applichem, Deutschland
Anisaldehyd	Sigma-Aldrich, USA
Ascorbinsäure	Applichem, Deutschland
Aurintricarboxysäure	Carl Roth, Deutschland
Bestatin	Carl Roth, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, USA
BSA (bovines Serumalbumin)	Merck KGaA, Deutschland
Carbenicillin	Applichem, Deutschland
Cetyltrimethylammoniumbromid	Sigma-Aldrich, USA
CHAPS	Carl Roth, Deutschland
Chloramphenicol	Applichem, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Deutschland
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Invitrogen, USA
Chlorsuccinimid	Merck KGaA, Deutschland
Cobaltchlorid	Sigma-Aldrich, USA
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck KGaA, Deutschland
Desthiobiotin	Applichem, Deutschland
Dichlormethan (DCM)	Merck KGaA, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Applichem, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Deutschland
Dimethylsulfid (DMS)	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Deutschland
Dinatrium-EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, USA
Dithiothreitol	Thermo Scientific, USA
DNA Loading Dye	Thermo Scientific, USA
DNA Marker: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, USA
dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Carl Roth, Deutschland
Dowex® 50WX8 (H ⁺ -Form), 100–200 mesh	Dow Chemicals, USA
E-64	Carl Roth, Deutschland
Eisen(III)-chlorid	Sigma-Aldrich, USA
Eisensulfat	Sigma-Aldrich, USA
Essigsäure (konzentriert)	Merck KGaA, Deutschland
Ethanol (verschiedene Reinheiten)	Merck KGaA, Deutschland
Farnesol	Sigma-Aldrich, USA
Farnesyldiphosphat	Mobitec, Deutschland
Formaldehyd	Merck KGaA, Deutschland
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, USA
Glukose	Carl Roth, Deutschland
Glycerol	Carl Roth, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Deutschland
Goat anti-mouse HRP conjugate AB No. 401215	Calbiochem, USA

Tabelle A.1 Fortsetzung: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits

Chemikalie	Hersteller
Guanidiniumhydrochlorid	Sigma-Aldrich, USA
Guanidiniumthiocyanat	Sigma-Aldrich, USA
Hefeextrakt	BD Biosciences, USA
Hexamethyldisiloxan	Sigma-Aldrich, USA
His epitope tag mouse AB No. MA1-21315	Thermo Scientific, USA
His-STREPPER (Strep-tag®II Adapter)	IBA, Deutschland
Hydroxyphenylazobenzoessäure (HABA)	Sigma-Aldrich, USA
Imidazol	Carl Roth, Deutschland
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, USA
IPG-Puffer	GE Healthcare, England
Isooctan	Merck KGaA, Deutschland
Isopropanol (verschiedene Reinheiten)	Merck KGaA, Deutschland
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, USA
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, USA
Kaliumhexacyanidoferrat(III)	Sigma-Aldrich, USA
Kanamycinsulfat	Applichem, Deutschland
Kieselgel 60	Carl Roth, Deutschland
Kit: GENEART® Seamless Cloning and Assembly	Life Technologies, USA
Kit: QIAGEN Plasmid Midi	QIAGEN, Deutschland
Kit: QIAprep® Spin Miniprep	QIAGEN, Deutschland
Kit: QIAquick® Gel Extraction	QIAGEN, Deutschland
Kit: QIAquick® PCR Purification	QIAGEN, Deutschland
Kit: TOPO® TA Cloning	Life Technologies, USA
Kupfersulfat	Carl Roth, Deutschland
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, USA
Magermilchpulver	Saliter, Deutschland
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Deutschland
Magnesiumsulfat	Carl Roth, Deutschland
Manganchlorid	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	Merck KGaA, Deutschland
MOPS	Carl Roth, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, USA
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Carl Roth, Deutschland
Natriumdihydrogendiphosphat	Carl Roth, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Deutschland
Natriummetabisulfit	Sigma-Aldrich, USA
Natriummolybdat	Sigma-Aldrich, USA
Natriumsulfit	Sigma-Aldrich, USA
Nickelsulfat	Sigma-Aldrich, USA
Patchouli-Öl (authentischer Standard)	Sigma-Aldrich, USA
Pentan	Merck KGaA, Deutschland
Pepstatin A	Carl Roth, Deutschland
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth, Deutschland
Phosphoramidon	Carl Roth, Deutschland
Phosphorsäure (<i>ortho</i>)	Merck KGaA, Deutschland
Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 40 %ig	Carl Roth, Deutschland
Polyethylenglycol (PEG 8000)	Sigma-Aldrich, USA
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Carl Roth, Deutschland
Proteinmarker: PageRuler™ Prestained Ladder	Thermo Scientific, USA
Proteinmarker: Pierce Unstained MW Marker	Thermo Scientific, USA
rATP (Ribonukleotidtriphosphat)	New England Biolabs, USA
RNaseZAP™	Sigma-Aldrich, USA
Roti®-Safe GelStain	Carl Roth, Deutschland
Salzsäure (konzentriert)	Sigma-Aldrich, USA
Schwefelsäure (konzentriert)	Sigma-Aldrich, USA
Silbernitrat	Sigma-Aldrich, USA
Tetrabutylammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich, USA
Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	Carl Roth, Deutschland
Thioharnstoff	Carl Roth, Deutschland
Trichloroacetonitril	Merck KGaA, Deutschland
Triethylamin	Merck KGaA, Deutschland
Triethylammoniumphosphat (TEAP)	Sigma-Aldrich, USA
TRIS-Base	Carl Roth, Deutschland
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Deutschland
Trypton	BD Biosciences, USA
Tween-20	Carl Roth, Deutschland

Tabelle A.1 Fortsetzung: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits

Chemikalie	Hersteller
Urea	Carl Roth, Deutschland
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich, USA

A.2 LABORWASSER

Das Laborwasser für alle Lösungen wurde aus einer Reinstwasseranlage bezogen. Das Reinstwasser wies stets eine Leitfähigkeit von unter $0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$ (entspricht $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) auf. Aus Gründen der Lesbarkeit wurde stets die Abkürzung H_2O für Reinstwasser verwendet.

A.3 LABORGERÄTE

Tabelle A.2 verwendete Labor- und Analysengeräte

Geräteart	Bezeichnung	Hersteller
2D-Gelsystem	Multiphor™ II Electrophoresis System	GE Healthcare
Analysenwaage	Analytik AC 210S	Sartorius Stedim Biotech
Autoklav	System V-150	System
Bioreaktor	Biostat® A Plus	Sartorius Stedim Biotech
DNA-Agarosegel-System	Agagel Midi-Wide	Biometra
DNA-Geldokumentation	Gel IX Imager	Intas Science Imaging
FPLC-Anlage	BioLogic DuoFlow	Bio-Rad
Gaschromatograph	GC-14A (manuelle Injektion)	Shimadzu
Gaschromatograph	GC-2010 plus (mit Autosampler)	Shimadzu
Gaschromatograph (MS)	GC 8000	Fisons
GC-FID Trennsäule	Supelco SPB®-5 Silica-Kapillarsäule	Sigma-Aldrich
GC-FID Trennsäule	Zebtron ZB-WAXplus Silica-Kapillarsäule	Phenomenex
GC-MS Trennsäule	Zebtron ZB-WAX Silica-Kapillarsäule	Phenomenex
Gelscanner	Perfection V 750 Pro	Epson
Gewebehomogenisator	ULTRA-TURRAX®	IKA
Glukoseprozessanalytik	YSI 2700 SELECT™ Biochemistry Analyzer	YSI Incorporated
HPLC	HPLC System LaChrom	Merck-Hitachi
HPLC Trennsäule	C ₁₈ -XTerra MS	Waters
IMAC Membranadsorbermodul	Sartobind IDA 75	Sartorius Stedim Biotech
IMAC Sepharose-Säule	HiTrap™ IMAC FF 5 mL	Bio-Rad
IPG-Streifen	Immobiline™ DryStrip Kit	GE Healthcare
Kolbenhubpipetten (versch. Größen)	Eppendorf® Research	Eppendorf
Kugelmühle	MM 200	Retsch
Lyophilie	ALPHA 1-4 LSC	Martin Christ
Massendetektor (GC-MS)	MD 800	Fisons
NMR	DPX 200/400 MHz	Bruker
pH-Meter	HI 221 Calibration Check	Hanna Instruments
Photometer	UVIKON 922	Kontron Instruments
Photometer	Multiskan Spectrum	Thermo Fisher Scientific
Photometer	Nano-Drop 1000 UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Reinstwasseranlage	arium® pro VF-B	Sartorius Stedim Biotech
Rotationsverdampfer	RV 10 control	IKA
Schüttelschrank	Certomat BS1	Sartorius Stedim Biotech
SDS-PAGE Gelsystem	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad
Strep-Tag-Säule	Strep-Tactin® gravity flow column	IBA
Thermocycler (PCR)	Px2 Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultraschallsonde	LABSonic®	Sartorius Stedim Biotech
Vakuumentrifuge	RVC 2-18	Martin Christ
Vortexer	Vortex Mixer VM-300	Gemmy Industrial
Western-Blot Transfer Zelle	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Zentrifuge	Heraeus® Fresco 17	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Heraeus® Megafuge® 1.0 RS	Thermo Fisher Scientific

A.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Nitril-Handschuhe, Reaktionsgefäße, Zentrifugenröhrchen (Falcon-Typ), Kanülen, Spritzen, GC-Vials, Cryoröhrchen, Sterilfilter und diverse weitere

Single-Use Materialien entsprachen den allgemeinen Labor Spezifikationen und werden daher nicht einzeln gelistet. Die Verbrauchsmaterialien wurden exklusiv von den Firmen Sarstedt, Eppendorf, B. Braun, VWR oder Omnilab (alle Deutschland) bezogen.

A.5 ENZYME

Tabelle A.3 verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Calf-Intestinal-Alkaline-Phosphatase	Thermo Scientific, USA
DNase I	New England Biolabs, USA
DpnI	New England Biolabs, USA
EcoRI (FastDigest)	Thermo Scientific, USA
GoTaq® DNA Polymerase	Promega, USA
HindIII (FastDigest)	Thermo Scientific, USA
KpnI (FastDigest)	Thermo Scientific, USA
NotI (FastDigest)	Thermo Scientific, USA
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, USA
Q5™ High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, USA
RNase A	QIAGEN, Deutschland
RNase H	New England Biolabs, USA
RNaseOUT™	Life Technologies, USA
SpeI (FastDigest)	Thermo Scientific, USA
SuperScript™ III Reverse Transkriptase	Life Technologies, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, USA
Trypsin Gold	Promega, USA
XbaI (FastDigest)	Thermo Scientific, USA
XhoI (FastDigest)	Thermo Scientific, USA

A.6 STANDARD-MEDIEN- UND PUFFERREZEPTE

Tabelle A.4 Zusammensetzung der Standard-Kultivierungsmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) NaCl. Für Platten +1,5 % (w/v) Agar
TB-Medium	2,4 % (w/v) Hefeextrakt 1,2 % (w/v) Trypton 0,4 % (v/v) Glycerol Nach Autoklavieren 10 % (v/v) 10x TB-Salze steril
SOC-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Trypton 10 mmol L ⁻¹ NaCl 2,5 mmol L ⁻¹ KCl 10 mmol L ⁻¹ MgCl ₂ 10 mmol L ⁻¹ MgSO ₄ 20 mmol L ⁻¹ Glukose

Tabelle A.5 Zusammensetzung der Standard-Puffer

Name	Beschreibung	Zusammensetzung
1 M KPP	Kaliumphosphat-Puffer	0,7737 mol L ⁻¹ K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O 0,2262 mol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ pH 7,5 einstellen
10× PBS	Phosphat-gepufferte Saline	18 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 100 mmol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O (w/v) 27 mmol L ⁻¹ KCl 1,37 mol L ⁻¹ NaCl pH 7,4 einstellen
50× TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer	2 mol L ⁻¹ TRIS-Base 1 mol L ⁻¹ Essigsäure (konz.) 0,05 mol L ⁻¹ EDTA · Na ₂ · 2 H ₂ O pH 8,5 einstellen
1× TE	EDTA-haltiger TRIS-Puffer für DNA/RNA	10 mmol L ⁻¹ TRIS-HCl 1 mmol L ⁻¹ EDTA · Na ₂ · 2 H ₂ O pH 8,0 einstellen
TSS-Puffer	Für chemisch- kompetente Zellen	100 g L ⁻¹ PEG 8000 30 mL L ⁻¹ 1 M MgCl ₂ 50 mL L ⁻¹ DMSO sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern
10× TB-Salze	Für TB-Medium	0,72 mol L ⁻¹ K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O 0,17 mol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄
10× TGS	SDS-Laufpuffer	0,3 % (w/v) TRIS-Base 14 % (w/v) Glycin 1 % (w/v) SDS
2×SDS-Probenpuffer	Probenpuffer für Laemmli-Puffer	0,315 % (w/v) TRIS-HCl 0,058 % (w/v) EDTA · Na ₂ · 2 H ₂ O 5 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
STPS-Extraktionspuffer	Zellausschlusspuffer für Sesquiterpensynthasen	50 mmol L ⁻¹ MOPS 150 mmol L ⁻¹ NaCl 5 mmol L ⁻¹ DTT 10 % (v/v) Glycerol pH 7,5 einstellen
STPS-Aktivitätspuffer	Biotransformationen und Enzymaktivitätsassay von STPS	50 mmol L ⁻¹ MOPS 150 mmol L ⁻¹ NaCl 5 mmol L ⁻¹ DTT 10 % (v/v) Glycerol 15 mmol L ⁻¹ MgCl ₂ pH 7,5 einstellen
IDA 75 IMAC-Equilibrierpuffer	Equilibrierung für Membranadsorber	100 mmol L ⁻¹ NaAc 0,5 mol L ⁻¹ NaCl pH 4,5 einstellen
IDA 75 IMAC-Bindungspuffer	Bindungspuffer für Membranadsorber	50 mmol L ⁻¹ Na ₂ H ₂ PO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ NaCl pH 7,5 einstellen
IDA 75 IMAC-Elutionspuffer	Elutionspuffer für Membranadsorber	100 mmol L ⁻¹ NaAc 0,5 mol L ⁻¹ Imidazol 0,5 mol L ⁻¹ NaCl pH 8 einstellen
HiTrap IMAC-Bindungspuffer	Bindungspuffer für Sephärose-Säule	50 mmol L ⁻¹ MOPS 150 mmol L ⁻¹ NaCl 5 mmol L ⁻¹ MgCl ₂ 10 mmol L ⁻¹ Imidazol pH 7,5 einstellen
HiTrap IMAC-Elutionspuffer	Elutionspuffer für Sephärose-Säule	50 mmol L ⁻¹ MOPS 150 mmol L ⁻¹ NaCl 5 mmol L ⁻¹ MgCl ₂ 500 mmol L ⁻¹ Imidazol pH 7,5 einstellen

Tabelle A.5 Fortsetzung: Zusammensetzung der Standard-Puffer

Name	Beschreibung	Zusammensetzung
HIS-STREPPER Elutionspuffer	Elutionspuffer für Strep-Tactin/ HIS-STREPPER	1×PBS 2,5 mmol L ⁻¹ Desthiobiotin pH 8 einstellen
HIS-STREPPER Regenerationspuffer	Regenerationspuffer für Strep-Tactin gravity flow Säule	1×PBS 1 mmol L ⁻¹ HABA pH 8 einstellen

Tabelle A.6 Antibiotika-Stammlösungen (1000×)

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentration
Ampicillin	H ₂ O	100 mg mL ⁻¹
Carbenicillin	H ₂ O	100 mg mL ⁻¹
Chloramphenicol	70 % Ethanol	34 mg mL ⁻¹
Kanamycin	H ₂ O	50 mg mL ⁻¹

Antibiotika-Lösungen wurden sterilfiltriert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Zugabe zum Medium erfolgte steril und unmittelbar vor Inokulation im Verhältnis 1:1000.

A.7 DEFINIERTES MEDIUM

Als chemisch definiertes Medium wurde eine Kombination des ZYP5052-Autoinduktionsmediums [277] und des M9-Minimalmediums [276] verwendet. Die Zusammensetzung der Spurenelemente wurde angepasst für *E. coli* und weiter optimiert (laufende Disseration, Philipp Grünert, Leibniz Universität Hannover). Durch Verwendung von Laktose als zusätzliche Kohlenstoffquelle, kann das Medium zur Autoinduktion verwendet werden. Hier wurde allerdings lediglich Glukose als C-Quelle eingesetzt (standardmäßig 2 % Glukose Endkonz.).

Als Stammlösungen werden benötigt:

- **100× MgSO₄**: 0,4 mol L⁻¹ MgSO₄ · 7 H₂O (sterilfiltrieren)
- **2000× FeCl₃**: 0,2 mol L⁻¹ FeCl₃ (sterilfiltrieren)
- **1000× Na₂MoO₄**: 10 mmol L⁻¹ Na₂MoO₄ (sterilfiltrieren)
- **20× C-Quelle**: 400 g L⁻¹ Glukose (autoklavieren)

Desweiteren wird eine Spurenelementlösung (100 mL) angesetzt und sterilfiltriert:

Tabelle A.7 Spurenelementlösung (1000×) für definiertes Medium

Komponente	Menge
ZnCl ₂	6,54 mg
H ₃ BO ₃	2 mg
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	8,9 mg
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	400 mg
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	5 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	10 mg
NiSO ₄ · 6 H ₂ O	10 mg
H ₂ O	ad 100 mL

Pro Liter Salzlösung werden folgende Komponenten eingewogen, gelöst und autoklaviert:

Tabelle A.8 Salzlösung für 1 L definiertes Medium

Komponente	Menge
KH_2PO_4	6,8 g (=50 mmol L ⁻¹)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	17,9 g (=50 mmol L ⁻¹)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,3 g (=25 mmol L ⁻¹)
H_2O	ad 937,5 mL

Zu der autoklavierten Salzlösung werden (je Liter) steril hinzugegeben:

- 50 mL 20× C-Quelle
- 10 mL 100× MgSO_4
- 0,5 mL 2000× FeCl_3
- 1 mL 1000× Na_2MoO_4
- 1 mL 1000× Spurenelemente

A.8 VEKTOREN UND ZELLEN

A.8.1 Vektoren

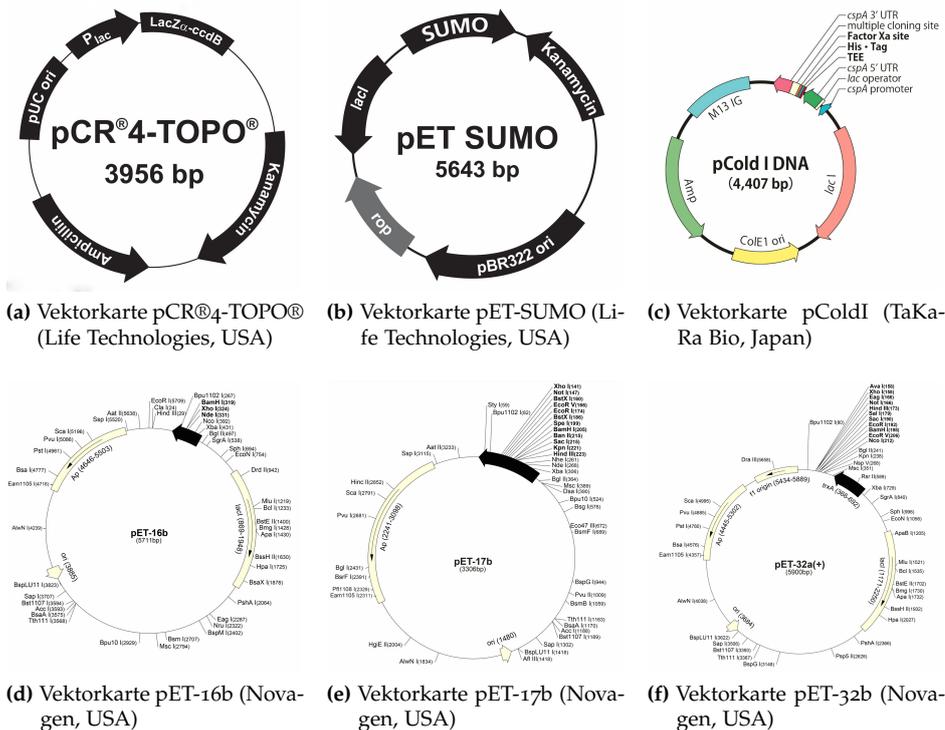


Abbildung A.1 Karten der in dieser Arbeit verwendeten Klonierungs- und Expressionsvektoren. Bildrechte: Handbücher der jeweiligen Hersteller.

A.8.2 kompetente Zellen

Als Mikroorganismen wurden in dieser Arbeit Derivate des Laborstamms *E. coli* K12 verwendet.

- *E. coli* TOP10 (Klonierungsstamm); Life Technologies, USA
 Genotyp: F⁻ *mcrA* δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 8*lacZ* δ M15 δ *lacX74* *recA1* *araD139* δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

- ***E. coli* DH10B** (Klonierungsstamm); Life Technologies, USA
Genotyp: F⁻ *mcrA* δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 δ *lacX74* *recA1* *araD139* δ (*ara-leu*)7697 *galE15* *galK16* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*
- ***E. coli* BL21(DE3)** (Expressionsstamm); Merck KGaA, Deutschland
Genotyp: F⁻ *ompT* *hsdS_B*(*r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm Ion* λ (DE3)*
- ***E. coli* TunerTM (DE3)** (Expressionsstamm); Merck KGaA, Deutschland
Genotyp: F⁻ *ompT* *hsdS_B*(*r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm Ion lacY1* λ (DE3)*
- ***E. coli* RosettaTM 2(DE3)pLysS** (Expressionsstamm); Merck KGaA, Deutschland
Genotyp: F⁻ *ompT* *hsdS_B*(*r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm Ion* λ (DE3) pLysS pRARE2 (Cam^R)*

Tabelle A.9 Auflistung der Genotypen von *E. coli* mit Beschreibung

Abkürzung	Beschreibung
F ⁻	Besitzt kein F-Plasmid zur Konjugation, keine Fähigkeit zum horizontalen Gentransfer oder Rekombination.
<i>mcrA</i>	Methylierte DNA wird nicht als fremd erkannt und nicht abgebaut. Wichtig zur Klonierung von genomischer DNA und methylierter cDNA.
Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)	Deletion einer Methylase und Restriktionsendonuklease, die fremde DNA an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden würde. Wichtig zur Klonierung.
Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15	Infiziert mit Prophage Φ 80. <i>lacZ</i> Δ M15 kodiert für omega-Fragment der β -Galaktosidase. Benötigt für Blau/Weiß-Screening.
Δ <i>lacX74</i>	Vollständige Deletion der β -Galaktosidase auf dem Chromosom.
<i>recA1</i>	Weniger ungewollte Rekombinationen der DNA. Zellen werden allerdings UV-sensitiv und DNA-Reparaturmechanismen sind ausgeschaltet.
<i>araD139</i>	Mutation der L-Ribulose-phosphat-4-epimerase blockiert den Arabinose-Stoffwechsel.
Δ (<i>ara-leu</i>)7697	Deletion des <i>leu</i> LABCD Operons. Leucin-auxotroph.
<i>galU</i>	Mutation in Glucose-1-phosphat-uridylyltransferase blockiert Galaktose-Stoffwechsel.
<i>galK</i>	Mutation in Galactokinase blockiert Katabolismus von Galaktose. Zellen können nicht auf einem Medium mit Galaktose als einzige C-Quelle wachsen.
<i>gal</i>	Mehrere Mutationen in Enzymen des Galaktose-Katabolismus. Keine Verstoffwechslung von Galaktose möglich.
<i>rpsL</i> (Str ^R)	Mutation in einem ribosomalen Protein. Wird für Streptomycin-Resistenz benötigt.
<i>endA1</i>	Stämme resistent gegen Streptomycin.
<i>nupG</i>	Endonuklease I wird nicht mehr kodiert. Dadurch weniger Verdau von Plasmid-DNA und höhere Ausbeuten bei Plasmid-Präparationen. Gute Eigenschaft für Klonierungsstämmen.
<i>ompT</i>	Regulatorisches Gen, erlaubt Expression von Deoxyribosynthese-Genen. Ermöglicht Aufnahme von großen Plasmiden.
<i>ompT</i>	Deletion einer Peptidase auf der äußeren Zellmembran. Dadurch größere Ausbeuten an heterolog exprimierten Proteinen.
<i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻)</i>	Bestimmte DNA-Sequenzen werden nicht mehr methyliert und verdaut. Dadurch größere Stabilität von Plasmid-DNA.
<i>dcm</i>	Keine Methylierung von Cytosin bei der Sequenz CCWGG.
<i>Ion</i>	Stamm besitzt keine ATP-abhängige Peptidase. Dadurch erhöhte Stabilität von heterolog exprimierten Proteinen.
λ (DE3)	Infiziert mit dem λ (DE3) Phagen, Sequenz in Genom integriert. T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des <i>lacUV5</i> -Promotors. Der <i>lacUV5</i> -Promotor ist eine stärkere Mutante des <i>lac</i> -Promotors. Wird zur Expression von Genen unter Kontrolle des T7-Promotors zwingend benötigt (z. B. pET-Vektoren).
<i>lacY1</i>	Keine <i>lac</i> -Permease vorhanden. Titration von IPTG zur Steuerung des Expressionslevels. Zentrale Eigenschaft der Tuner TM -Stämme.
pLysS	Plasmid pACYC184 vorhanden. Kodiert für T7-Lysozym. Stringenter Kontrolle der Expression von Genen unter Kontrolle des T7-Promotors. T7-RNA-Polymerase wird unter nicht induzierten Bedingungen abgebaut. Chloramphenicol-Resistenz.
pRARE2	Plasmid kodiert für 7 tRNAs, die in <i>E. coli</i> selten sind und unter Umständen die Expressionseffizienz limitieren könnten. Die tRNAs sind AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA und CCG.
(Cam ^R)	Resistenz gegen Chloramphenicol. Ist auf Plasmiden pLysS und pRARE2 vorhanden.

Die Beschreibungen der einzelnen Genotypen wurden zusammengestellt anhand von Informationen in den Handbüchern der Hersteller (Merck KGaA, Life Technologies, Sigma) sowie OpenWare³⁵.

A.9 PRIMER

Tabelle A.10 Auflistung aller verwendeten Primer für die PCR-Methode

Nr.	Kurzname	Verwendung	Sequenz (5'-3')	Länge
1	oligo(dT)	Erststrang cDNA Synthese	TTTTTTTTTTTTTTTT	18
2	PTS_cDNA_FWD	Nachweis der PTS Sequenz (in cDNA Bibliothek)	ATGGAGTTGTATGCCCAAAG	20
3	PTS_cDNA_REV	Nachweis der PTS Sequenz (in cDNA Bibliothek)	TAAATATGGAAACAGGGTGAA	20
4	T7Promotor_FWD	T7 Promotor Primer (Sequenzierung, Nachweis)	TAATACGACTCACTATAGGG	20
5	T7Terminator_REV	T7 Terminator Primer (Sequenzierung, Nachweis)	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	19
6	M13_FWD	Sequenzierung pCR4-TOPO	GTAAACACGAGCGCCAG	16
7	M13_REV	Sequenzierung pCR4-TOPO	CAGGAAACAGCTATGAC	17
8	PTS1_FWD_SpeI	Restriktion/Ligationsklonierung PTSi	CTGCGGTACCTTATGGAGTTGTATGCCCAAAGT	32
9	PTS1_REV_SpeI	Restriktion/Ligationsklonierung PTSi	CTGCACTAGTTTAAATATGGAAACAGGGTGAAGG	32
10	pET-16b_PTSi_VEC_FWD	pET-16b::PTSi (Vektor)	TTACCCCTGTTCCATATTAACATATGCTCGAGGATCCGGC	40
11	pET-16b_PTSi_VEC_REV	pET-16b::PTSi (Vektor)	ACACTTTGGGCATACAACCTCAGCACTTCGATATGGCCGC	40
12	pET-16b_PTSi_INS_FWD	pET-16b::PTSi (Insert)	GCGGCCATATCGAAGGTCGTGAGTTGTATGCCCAAAGTGT	40
13	pET-16b_PTSi_INS_REV	pET-16b::PTSi (Insert)	GCGGGATCCTCGAGCATATGTTAATATGGAAACAGGGTGAAGGT	43
14	pET-32b_PTSi_VEC_FWD	pET-32b::PTSi (Vektor)	TTACCCCTGTTCCATATTAAGATCCGGCTGCTAACAAAGC	41
15	pET-32b_PTSi_VEC_REV	pET-32b::PTSi (Vektor)	ACACTTTGGGCATACAACCTCCTCGAAATAAAGATTCTCACC	44
16	pET-32b_PTSi_INS_FWD	pET-32b::PTSi (Insert)	AGAATCTTATTTTCAGGGAGAGTTGTATGCCCAAAGTGT	40
17	pET-32b_PTSi_INS_REV	pET-32b::PTSi (Insert)	GCTTTGTAGCAGCCGATCTTAATATGGAAACAGGGTGAAGGT	43
18	pET-16b_VEC_FWD	pET-16b (nur Vektor)	CATATGCTCGAGGATCCG	18
19	pET-16b_VEC_REV	pET-16b (nur Vektor)	ACCACCTTCGATATGCC	18
20	PTSi(co)_String1_FWD	Amplifikation PTSi(co) String 1 (pET-16b::PTSi(co))	CATATCGAAGGTCGTGAACTGTATGCCGAGTCTG	34
21	PTSi(co)_String1_REV	Amplifikation PTSi(co) String 1 (pET-16b::PTSi(co))	AGCTCCGCTCCCAAGCTTCGATTCGGTCGGTAA	33
22	PTSi(co)_String2_FWD	Amplifikation PTSi(co) String 2 (pET-16b::PTSi(co))	CCGACGCAATCGAACCTTGGGACCGGAGCT	30
23	PTSi(co)_String2_REV	Amplifikation PTSi(co) String 2 (pET-16b::PTSi(co))	ATCCTCGAGCATATGTTAATACGGCACTGGGTGC	34
24	pET-16b_HUM_INS_FWD	Amplifikation <i>Z. zerumbet</i> cDNA Bibliothek	CATATCGAAGGTCGTGAGAGCCAGTCGATGCC	32
25	pET-16b_HUM_INS_REV	Amplifikation <i>Z. zerumbet</i> cDNA Bibliothek	ATCCTCGAGCATATGTTAATAAGAAAGGATCAACAAAT	40
26	pET-SUMO_HUM_INS_FWD	Amplifikation <i>Z. zerumbet</i> cDNA Bibliothek	GAACAGATTGGTGGTCAGAGGCACTCGATGGC	32
27	pET-SUMO_HUM_INS_REV	Amplifikation <i>Z. zerumbet</i> cDNA Bibliothek	TACCTAAGCTTGTCTTAAATAAGAAAGGATCAACAAATATGAG	45
28	pET-SUMO_VEC_FWD	pET-SUMO (nur Vektor)	AGACAAGCTTAGGTATTATTCG	23
29	pET-SUMO_VEC_REV	pET-SUMO (nur Vektor)	ACCACCAATCTGTTCTCTG	19
30	HUM(co)_String1_FWD	Amplifikation Hum(co) String 1 (pET-16b::HUM(co))	CATATCGAAGGTCGTGAGCCACAATCGATGGCCGT	35
31	HUM(co)_String1_REV	Amplifikation Hum(co) String 1 (pET-16b::HUM(co))	GGAACACAGTCGACCCGCTGGCTTCCACCCGCTC	35
32	HUM(co)_String2_FWD	Amplifikation Hum(co) String 2 (pET-16b::HUM(co))	GTGGAAACCCGAGCCGCTGACGTCTTCCCGAAT	35
33	HUM(co)_String2_REV	Amplifikation Hum(co) String 2 (pET-16b::HUM(co))	ATCCTCGAGCATATGTTAGATCAAGAAAGATTCCA	35
34	ZIZA_cDNA_FWD	Nachweis der ZIZA Sequenz (in cDNA Bibliothek)	ATGGCGCAGCACTGCCCTT	20
35	ZIZA_cDNA_FWD	Nachweis der ZIZA Sequenz (in cDNA Bibliothek)	TCAAACCTGGAATCAAATTGACGT	23
36	pET-SUMO_ZIZA_INS_FWD	Amplifikation <i>C. zizanioides</i> cDNA Bibliothek	GAACAGATTGGTGGCGGAGGACTGCCGCC	30
37	pET-SUMO_ZIZA_INS_REV	Amplifikation <i>C. zizanioides</i> cDNA Bibliothek	TACCTAAGCTTGTCTTCAAACCTGGAATCAAATTGACGT	38
38	ZIZA(co)_String1_FWD	Amplifikation ZIZA(co) String 1 (pET-16b::ZIZA(co))	CCATATCGAAGGTCGTGCAACCACTGCTGGGTTTCTTGA	40
39	ZIZA(co)_String1_REV	Amplifikation ZIZA(co) String 1 (pET-16b::ZIZA(co))	GGCAGTCGTGAAGATATAGACTTCCTGGTGC	32
40	ZIZA(co)_String2_FWD	Amplifikation ZIZA(co) String 2 (pET-16b::ZIZA(co))	TATCTTCCAGCACTGCCATGGAGCCGTGGGACG	32
41	ZIZA(co)_String2_REV	Amplifikation ZIZA(co) String 2 (pET-16b::ZIZA(co))	GATCTCGAGCATATGTCACACCCGAATCAGATTTACATA	40
42	pCold_VEC_FWD	pColdI (nur Vektor)	CATATGGAGCTCGGTACCTC	20
43	pCold_VEC_REV	pColdI (nur Vektor)	CCTACTTCGATATGATGATG	24
44	ZIZA(co)_String1_FWD	Amplifikation ZIZA(co) String 1 (pColdI::ZIZA(co))	CATATCGAAGGTFAGGGCAACCACCTGCTGG	30
45	ZIZA(co)_String1_REV	Amplifikation ZIZA(co) String 1 (pColdI::ZIZA(co))	GCTCCATGGCAGTCGTGAAGATATAGACTTCCTGGGTG	38
46	ZIZA(co)_String2_FWD	Amplifikation ZIZA(co) String 2 (pColdI::ZIZA(co))	AGTCTAATATCTTCCAGCACTGCCATGGAGCG	31
47	ZIZA(co)_String2_REV	Amplifikation ZIZA(co) String 2 (pColdI::ZIZA(co))	ACCGAGCTCCATATGTCACACCCGAATCAGATTACA	37
48	ZIZA(co)_String1_FWD	Amplifikation ZIZA(co) String 1 (pET-SUMO::ZIZA(co))	GAACAGATTGGTGGTCGAACCCTGCTGG	30
49	ZIZA(co)_String1_REV	Amplifikation ZIZA(co) String 1 (pET-SUMO::ZIZA(co))	GCTCCATGGCAGTCGTGAAGATATAGACTTCCTGGGTG	38
50	ZIZA(co)_String2_FWD	Amplifikation ZIZA(co) String 2 (pET-SUMO::ZIZA(co))	AGTCTAATATCTTCCAGCACTGCCATGGAGCG	31
51	ZIZA(co)_String2_REV	Amplifikation ZIZA(co) String 2 (pET-SUMO::ZIZA(co))	TACCTAAGCTTGTCTTCAACCCGAATCAGATTACA	37

METHODEN

B.1 SYNTHESE VON FARNESYLDIPHOSPHAT

B.1.1 Anwendung und Regeneration des Ionentauschers

Das Ionenaustauscherharz Dowex® 50WX8 (H⁺-Form) muss vor Verwendung in seine Ammonium-Form überführt werden. Dazu wird das Harz im Becherglas mit H₂O aufgeschwemmt und in eine Chromatographiesäule gepackt. Es wird mit 3 CV 1 mol L⁻¹ NH₄OH bei einer Flussrate von 1 mL min⁻¹ gespült. Anschließend wird die Säule mit 2 CV H₂O bei einer Flussrate von 2 mL min⁻¹ gewaschen. Das Harz kann nun direkt als Ionenaustauscher eingesetzt, oder feucht in der verschlossenen Säule im Dunkeln gelagert werden.

Nach Anwendung wird das Harz durch Spülen mit 2 CV Methanol und 2 CV H₂O bei einer Flussrate von 2 mL min⁻¹ gereinigt. Weitere Reinigungsschritte mit 2 CV 1 mol L⁻¹ HCl und 2 CV H₂O (gleiche Flussrate) regenerieren das Harz, so dass es bis zu 3 × wiederverwendet werden kann.

B.1.2 Synthesevorschrift TBAHP

Das Salz Tris(tetra-n-butylammonium)hydrogendiphosphat (TBAHP) wird für die Synthese von FDP nach Davisson et al. [150] als Vorläufer benötigt und wird in einer ersten Stufe synthetisiert. Dazu wird di-Natriumdihydrogendiphosphat (0,44 g; 2 mmol; 1 eq) in wässriger, 10 %iger Ammoniumhydroxid-Lsg. (4,5 mL; 7,5 eq) gelöst und auf eine 2 cm × 4,3 cm Säule (9,35 meq) mit Dowex® 50WX8 (NH₄⁺-Form) aufgebracht. Nach Elution mit 16 mL H₂O wird das saure Eluat (pH 1,29) mit 1,5 mol L⁻¹ (nBu)₄NOH auf pH 7,3 titriert. Die erhaltene Lsg. wird aliquotiert und für 48 h lyophilisiert.

Das erhaltene TBAHP (1,66 g; 1,84 mmol; 92 %) ist ein farbloser Feststoff, der unter Argon-Atmosphäre bei -80 °C gelagert wird.

¹H-NMR (400 Mhz, D₂O/ND₄OD, H₂O = 4.79 ppm): δ 3.17 (t, 24H, CH₂), 1.63 (m, 24H, CH₂), 1.34 (m, 24H, CH₂), 0.92 (t, 24H, CH₃)

¹³C-NMR (100 Mhz, D₂O/ND₄OD): δ 58.1 (t, 12C, N-CH₂), 23.1 (t, 12C, CH₂), 19.1 (t, 12C, CH₂), 12.8 (q, 12C, CH₃)

B.1.3 Synthesevorschrift nach Davisson et al.

Die Syntheseroute ist angepasst nach Davisson et al. [150]. N-Chlorsuccinimid (133 mg; 1 mmol; 1,1 eq) werden in 10 mL Dichlormethan (DCM) vollständig gelöst und auf -30 °C mit Acetonitril/-Trockeneis gekühlt. Dimethylsulfid (DMS) (81 µL; 1,1 mmol; 1,2 eq) werden langsam und schrittweise hinzupipettiert und die Lösung kurz auf RT erwärmt. Anschließend Reaktionsgemisch wieder auf -40 °C kühlen und Farnesol (225 µL; 0,9 mmol; 1 eq, gelöst in 1 mL DCM) über 3 min kontinuierlich hinzugeben. Die Reaktionslösung wird langsam über 1 h auf 0 °C erwärmt, anschließend für 1 h bei 0 °C und für 15 min bei RT gerührt.

Das Gemisch wird in einen Schütteltrichter mit 5 mL kalter Saline überführt, und die wässrige Phase mit Pentan (2 × 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 5 mL Pentan versetzt, 2 × mit 5 mL Saline ausgeschüttelt und mit MgSO₄ getrocknet.

Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 2 mL Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von TBAHP (1,408 mg; 1,8 mmol; 2 eq) wird die Lsg. 2 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend nochmals entfernt (Rotationsverdampfer). Eine Ionenaustauschersäule (12 cm × 2 cm, Dowex® 50WX8 NH₄⁺-Form) wird mit einer Gemisch 1:50 Isopropanol/25 mmol L⁻¹ Ammoniumhydrogencarbonat equilibriert. Der Rückstand wird in diesem Gemisch aufgenommen und auf die Säule aufgebracht. Zur Elution werden 80 mL des gleichen Isopropanol/Ammoniumhydrogencarbonat-Puffers bei einem Fluss von 1 mL min⁻¹ eingesetzt.

Das Eluat wird aliquotiert (6×50 mL) und für 72 h lyophilisiert. Der Rückstand wird aus Methanol umkristallisiert. Das Produkt (35 mg) ist ein gelblicher Feststoff, der bei -80 °C unter Argon-Atmosphäre gelagert wird.

B.1.4 Synthesevorschrift nach Keller et al.

Die Syntheseroute ist angepasst nach Keller et al. [151]. Zunächst wird *bis*-Triethylammoniumphosphat-Lsg. (TEAP) hergestellt. Hierzu 54 mL Triethylamin und 50 mL Acetonitril in einem 250 mL Rundkolben vorlegen und ein Gemisch aus 25 mL *ortho*-Phosphorsäure und 100 mL Acetonitril unter starkem Rühren langsam hinzupipettieren.

Eine Lösung mit Farnesol (35 μ L; 0,2 mmol; 1 eq) in Trichloracetonitril (800 μ L; 8 mmol; 40 eq) wird mit der zuvor hergestellten *bis*-Triethylammoniumphosphat Lsg. (TEAP; 2,4 mL; 9 mmol; 45 eq) versetzt. Das Gemisch wird auf 37 °C erwärmt, für 5 min gerührt und nochmals TEAP (2,4 mL) hinzupipettiert. Nach weiteren 5 min bei 37 °C erfolgt die Zugabe der letzten Charge TEAP (2,4 mL).

Die Reaktionslösung wird mit 2 mL Isopropanol auf eine Kieselgelsäule (36 cm \times 2,5 cm) geladen. Die Säule wird mit 6:2:0,5 Isopropanol/Ammoniumhydroxid/H₂O als mobiler Phase bei einer Flussrate von 2 mL eluiert. Die Fraktionen werden gesammelt, über Dünnschichtchromatographie analysiert, und die FDP-enhaltenden Fraktionen vereinigt. Die FDP-Lösung wird bei -80 °C gelagert.

¹H-NMR (400 Mhz, D₂O/ND₄OD, H₂O = 4.79 ppm): δ 5.45 (m, 1H, CH), 5.19 (m, 2H, CH), 4.46 (m, 2H, CH₂), 2.09 (m, 8H, CH₂), 1.71 (s, 3H, CH₃), 1.68 (s, 3H, CH₃), 1.60 (s, 3H, CH₃)

³¹P-NMR (400 Mhz, D₂O/ND₄OD): δ -6.15 (d, J = 22.30 Hz, 1P, OPO₃₂₋), -10.07 (d, J = 22.30 Hz, 1P, CH₂OPO₂O⁻)

B.1.5 Dünnschichtchromatographie

Zum Nachweis der FDP-Synthese und Identifizierung der FDP-Fraktionen wird eine klassische Dünnschichtchromatographie mit DC-Aluminiumplatten (Kieselgel 60, Merck KGaA, Deutschland) durchgeführt. Als Laufmittel kommen unterschiedliche Lösungsmittelgemische zum Einsatz (siehe jeweilige Abb.). Die Analyse erfolgt durch Anisaldehyd-Färbereagenz. Die Platte wird nach dem Lauf kurz in den Färbereagenz getaucht und mit einem Heißluftfön entwickelt.

Tabelle B.1 Ansatz für Anisaldehyd-Färbereagenz für DC

Komponente	Volumen
Ethanol (96 %ig)	135 mL
Schwefelsäure (konz.)	5 mL
Essigsäure (konz.)	1,5 mL
<i>p</i> -Anisaldehyd	3,7 mL

Schwefelsäure sowie Essigsäure unter Rühren in Ethanol lösen. Nach dem Abkühlen *p*-Anisaldehyd hinzufügen. Die Lösung bei 4 °C im Dunkeln lagern.

B.1.6 Säulenchromatographie

Für die säulenchromatographische Aufreinigung wird Kieselgel 60 mit Korngrößen von 20–45 μ m in Lösungsmittel aufgeschwämmt und in mit leichtem Überdruck in die Glassäule überführt. Die fertig gepackte Säule wird feucht gelagert.

B.1.7 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zum Nachweis der synthetisierten Substanzen wurden ¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR-Spektren bei 200 MHz und 400 MHz vermessen. Mehrere mg des Feststoffs wurden in ein NMR-Röhrchen überführt, in dem entsprechend deuterierten Lösungsmittel gelöst und zur Messung in den Autosampler gestellt.

In der Darstellung der NMR-Spektren ist die chemische Verschiebung δ in ppm angegeben. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz aufgeführt. Die Multiplizitäten wurden nach dem folgenden Schema abgekürzt (in Klammern: ^{13}C -NMR-Spektren):

- s = Singulett (quartäres Kohlenstoffatom)
- d = Dublett (tertiäres Kohlenstoffatom)
- t = Triplett (sekundäres Kohlenstoffatom)
- q = Quartett (primäres Kohlenstoffatom)
- m = Multiplett
- br. = breit

B.1.8 HPLC-Methode für Isoprene

Zur analytischen Auftrennung der unterschiedlichen Farnesylphosphat-Spezies mittels HPLC wurde die C_{18} -Säule XTerra MS (125 Å Porengröße; 3,5 μm Partikeldurchmesser; 3 mm \times 50 mm) verwendet. Als mobile Phasen wurde ein Gemisch Acetonitril/ H_2O (80%/20%) sowie ein 20 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 -Puffer eingesetzt. Ein Fluss von 2 mL min^{-1} und eine Säulenofentemperatur von 25 °C wird konstant gehalten.

Pro Lauf werden 10 μL Probe injiziert und die Phosphate über einen Diodenarray-Detektor bei 214 nm detektiert. Ein zuvor beschriebenes Gradientenprogramm zur Trennung von Polyphosphaten [162] wurde modifiziert und für eine bessere Trennleistung angepasst.

Tabelle B.2 Gradientenprogramm HPLC zur Trennung von Farnesylphosphat-Spezies

Zeit [min]	20 mmol L^{-1} NH_4HCO_3	Acetonitril/ H_2O (80/20)	Flussrate [mL min^{-1}]
Start	100	0	2
2	80	20	2
10	0	100	2
12	0	100	2
13	100	0	2
20	100	0	2

B.2 RNA-EXTRAKTION AUS PFLANZEN

B.2.1 AGPC-Methode

Alle Verbrauchsmaterialien und Glasgeräte müssen zuvor, um Abbau durch RNAsen zu vermeiden, mit einem universellen RNase-Inhibitor behandelt werden (z. B. RNaseZapTM). Alle Lösungen werden mit DEPC versetzt und vor Verwendung autoklaviert.

Das geerntete Blatt- oder Wurzelmaterial wird gründlich mit Ethanol desinfiziert und mit H_2O gewaschen. Eine definierte Menge wird eingewogen und nach Zugabe von Flüssigstickstoff mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Das zermörserte Pflanzengewebe wird kalt mit 1 mL Phenol/Guanidiniumthiocyanat Lsg. (RNAidty GTM) pro 100 mg Pulver versetzt und in durch einen Ultra-Turrax weiter aufgeschlossen.

- **Phasentrennung:** Die homogenisierte Probe wird 5 min inkubiert, damit sich der Nukleoprotein-Komplex vollständig trennen kann. Es werden 0,2 mL Chloroform pro mL hinzugegeben und für 15 s per Hand kräftig geschüttelt. Die Lsg. wird 3 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (12.000 \times g, 4 °C, 5 min) trennt sich das Gemisch in eine rote Phenol-Chloroform Phase (unten), eine Interphase und eine klare wässrige Phase (oben), wobei die gesamte RNA in der wässrigen Phase gelöst bleibt.
- **RNA-Fällung:** Nachdem die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde, werden 0,5 mL Isopropanol (100 %ig) hinzugegeben, für 10 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (12.000 \times g, 4 °C, 10 min).
- **RNA-Waschschritt:** Der Überstand wird vorsichtig verworfen, wobei das durchsichtige und gelartige RNA-Pellet im Gefäß verbleibt. Das Pellet wird mit 1 mL Ethanol (75 %ig) pro 1 mL Phenol/Guanidiniumthiocyanat Lsg. (im ersten Schritt) gewaschen. Nach Zentrifuga-

tion ($7.500\times g$, $4^\circ C$, 5 min) wird der Überstand verworfen, das Pellet kurz für 5 min an der Luft getrocknet.

- **RNA-Resuspension:** Das angetrocknete RNA-Pellet wird in $50\ \mu L$ DEPC- H_2O vorsichtig durch pipettieren resuspendiert und bei $60^\circ C$ für 15 min inkubiert.
- **DNase I Verdau:** Um die DNA-Kontamination weiter zu minimieren, wird sowohl einzeln als auch doppelsträngige DNA durch das Enzym DNase I verdaut. Hierzu werden zu den $50\ \mu L$ resuspendierter RNA $12,5\ \mu L$ $25\ mmol\ L^{-1}$ $MgCl_2$, $25\ \mu L$ $200\ mmol\ L^{-1}$ TRIS-HCl (pH 8,0) sowie $2\ \mu L$ (20 units) DNase I gegeben. Die Lsg. wird 1 h bei $37^\circ C$ inkubiert.
- **PCI-Aufreinigung:** 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wird zum DNase I Verdau gegeben, 30 s gemischt und zentrifugiert ($13.000\times g$, RT, 1 min). Obere wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß, 1 Volumen Chloroform hinzugeben, erneute 30 s mischen und zentrifugieren ($13.000\times g$, RT, 1 min). Obere wässrige Phase für Ethanol fällung in neues Reaktionsgefäß.
- **Ethanol fällung:** $1/10$ Volumen $5\ mol\ L^{-1}$ NaCl und 2 Volumen Ethanol (96 %ig) werden zur wässrigen Phase gegeben und die RNA bei $-80^\circ C$ ÜN ausgefällt. Nach Zentrifugation ($13.000\times g$, RT, 10 min) wird das resultierende Pellet mit $500\ \mu L$ Ethanol (75 %ig) überschichtet, erneut zentrifugiert ($13.000\times g$, RT, 10 min) und nach Verwerfen des Überstandes für 5 min getrocknet. Nun wird die RNA erneut in $50\ \mu L$ DEPC- H_2O resuspendiert, Reinheit und Konzentration photometrisch bestimmt und die Probe in Aliquots bei $-80^\circ C$ gelagert.

B.2.2 CTAB-Methode

Die CTAB-Methode eignet sich insbesondere für die Extraktion aus schweren Matrices (reich an Phenolen und Polysacchariden, verholzte Proben) und wird auch in der Gerichtsmedizin z. B. für Fingernägel eingesetzt. Das durchgeführte Protokoll ist angepasst nach [281] und [282]. Alle Lösungen werden vor dem Autoklavieren mit 0,1 % DEPC versetzt. TRIS-haltige Lösungen werden direkt mit DEPC- H_2O angemischt.

Der Probenaufschluss und Extraktion erfolgen mit CTAB-Extraktionspuffer.

Tabelle B.3 Ansatz für CTAB-Extraktionspuffer

Komponente	Konzentration/ Anteil
TRIS-HCl (pH 8,5)	$200\ mmol\ L^{-1}$
SDS	1,5 % (w/v)
LiCl	$300\ mmol\ L^{-1}$
EDTA · Na_2 · $2\ H_2O$	$10\ mmol\ L^{-1}$
Natriumdesoxycholat	1 % (w/v)
Triton X-100	1 % (w/v)
ad H_2O	
nach Autoklavieren hinzugeben:	
Thioharnstoff	$5\ mmol\ L^{-1}$
Aurintricarboxysäure	$1\ mmol\ L^{-1}$
DTT	$10\ mmol\ L^{-1}$
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	2 % (w/v)

- In mehreren Ansätzen 2 g zerkleinertes Pflanzenmaterial (verholzte Wurzeln etc.) abwiegen und mit Stickstoff schockgefrieren. Mit gekühlter Kugelmühle für 5 min auf höchster Frequenz aufschließen und Pulver in frisches Zentrifugengefäß überführen.
- 20 mL Extraktionspuffer zu den 2 g Pulver geben, kräftig vermischen und mit ULTRA-TURRAX weiter homogenisieren. Die Suspension nochmals schockfrosten in Stickstoff und langsam auftauen lassen.
- Zentrifugieren ($6.000\times g$, $4^\circ C$, 20 min), wässrigen Überstand mit Pipette abnehmen und durch ein feines Papiertuch in ein neues Zentrifugengefäß filtrieren. Zu dieser Lösung $1/30$ Volumen $3,3\ mol\ L^{-1}$ Natriumacetat (pH 6,1) und $1/10$ Volumen 100 % Ethanol geben, 10 min auf Eis kühlen damit Polysaccharide präzipitieren können.
- Nach Zentrifugation ($6.000\times g$, $4^\circ C$, 30 min), Überstand vorsichtig in neues Gefäß und $1/9$ Volumen $3,3\ mol\ L^{-1}$ Natriumacetat sowie $2/3$ Volumen eiskaltes Isopropanol hinzugeben. Die

Lsg. wird für 30 min bei -80°C gelagert. Restliche Polysaccharide und sonstigen Makrobestandteile fallen aus.

- Durch erneute Zentrifugation ($6.000\times g$, 4°C , 45 min) bildet sich ein Pellet, welches in 2 mL TE-Puffer (Tab. A.5) und 2 mL 5 mol L^{-1} NaCl resuspendiert wird. Hierzu wird die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert und gelegentlich kräftig geschüttelt.
- Sobald das Pellet gelöst ist, wird 1 mL 10 % (w/v) CTAB-Lösung hinzugefügt, gemischt und für 5 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert, um die restlichen Polysaccharide zu fällen.
- Die Mischung wird $2\times$ mit gleichem Volumen (5 mL) Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Der wässrige Überstand enthält die RNA, welche in einem neuen Zentrifugengefäß mit $1/4$ Volumen 10 mol L^{-1} LiCl versetzt wird. Zur Präzipitation wird die Lsg. ÜN bei 4°C gelagert.
- Nach erneutem Zentrifugieren ($6.000\times g$, 4°C , 30 min) wird das Pellet an der Luft getrocknet und in 500 μL TE-Puffer aufgenommen. Die RNA löst sich über den Zeitraum von 1 h auf Eis. Die Lsg. wird in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und 450 μL eiskaltes Isopropanol sowie 50 μL $3,3\text{ mol L}^{-1}$ Natriumacetat hinzugegeben. RNA präzipitiert erneut bei -80°C für 30 min.
- Nach Zentrifugation ($16.000\times g$, 4°C , 45 min) bildet sich ein RNA-Pellet, das kurz an der Luft getrocknet und in 50 μL DEPC H_2O resuspendiert wird. Reinheit und Konzentration der RNA werden photometrisch bestimmt. Anschließend wird mit cDNA-Synthese (vgl. B.3) fortgefahren.

B.3 REVERSE TRANSKRIPTION VON MRNA

Zur Erstrang-cDNA Synthese ausgehend von mRNA, wurde die SuperScript™ III Reverse Transkriptase verwendet, eine verbesserte Mutante der M-MLV RT [283] (Moloney murines Leukämievirus Reverse Transkriptase). Das Enzym eignet sich zur Synthese von cDNA bis zu einer Länge von 12 kb.

- Zu 1 μg RNA werden im Reaktionsgefäß 500 ng oligo(dT)-Primer sowie 1 μL 10 mmol L^{-1} dNTP-Mix (jeweils 10 mmol L^{-1} von dATP, dGTP, dCTP und dTTP) gegeben. Auf 13 μL mit H_2O auffüllen.
- Lsg. bei 65°C für 5 min inkubieren, im Anschluss 1 min auf Eis
- Anzentrifugieren und 4 μL $5\times$ First-Strand Puffer (250 mmol L^{-1} TRIS-HCl, pH 8,3; 375 mmol L^{-1} KCl; 15 mmol L^{-1} MgCl_2), 1 μL 100 mmol L^{-1} DTT, 1 μL RNaseOUT™ (rekombinanter RNase Inhibitor) sowie 1 μL SuperScript™ III RT (200 units/ μL) hinzugeben.
- Durch Pipettieren vorsichtig mischen. Für 60 min bei 50°C inkubieren. Im Anschluss Reaktion für 15 min bei 70°C inaktivieren.
- RNA komplementär zur cDNA durch Verdau mit RNase H (aus *E. coli*) entfernen. Dazu 1 μL RNase H in Reaktionsgefäß geben und bei 37°C für 20 min inkubieren. Die cDNA-Bibliothek kann direkt für die PCR-Methode eingesetzt werden.

B.4 PCR

B.4.1 Standard-, Kolonie-, und Gradienten-PCR mit Taq Polymerase

Für Nachweisreaktionen von DNA-Sequenzen in gereinigter Plasmid-DNA oder cDNA-Bibliotheken, sowie direkter Kontrolle von Kolonien, wurde eine Taq Polymerase ohne Korrekturlesefunktionalität eingesetzt. Zur Minimierung von Pipettierfehlern wurde für mehrere Ansätze zunächst ein Master-Mix angesetzt.

Tabelle B.4 Taq Polymerase PCR-Ansätze

Komponente	Volumen
5× GoTaq® Puffer	10 µL
dNTP Nukleotid-Mix (je 10 mmol L ⁻¹)	4 µL
FWD-Primer (10 µmol L ⁻¹)	1 µL
REV-Primer (10 µmol L ⁻¹)	1 µL
GoTaq® DNA Polymerase (5 u/µL)	0,25 µL
Template-DNA	x µL
H ₂ O	ad 50 µL

Die Menge an Template-DNA muss jeweils an die PCR-Methode angepasst werden. Für cDNA-Amplifikationen, bei denen keine Konzentrationen bestimmt werden können, wird jeweils 1 µL eingesetzt. Für Amplifikationen mit Plasmid-DNA als Vorlage, werden nur Mengen im Bereich von 1 pg–10 ng benötigt.

Für Kolonie-PCR wird ein Master-Mix aliquotiert, mit einem sterilen Zahnstocher in die Kolonie auf der Agar-Platte gestochen und dieser kurz in das PCR-Gefäß getaucht. Die DNA-Menge aus wenigen aufgeschlossenen Mikroorganismen reicht für eine erfolgreiche Amplifikation aus.

Tabelle B.5 Taq Polymerase Thermocycler-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Erste Denaturierung	95 °C	2–10 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	0,5 min	
Anlagerung	42–65 °C	1 min	25–35 Zyklen
Verlängerung	72 °C	1 min/kb	
Finale Verlängerung	72 °C	5 min	1 Zyklus
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

Da die idealen Anlagerungs-Temperaturen (Annealing) nicht immer berechnet werden können, wurde jeweils eine Gradienten-PCR in Vorversuchen durchgeführt, bei der die Annealing-Temperaturen von 10 Ansätzen über einen weiten Temperaturbereich variiert wurden. Die so bestimmten idealen Temperaturen wurden dann für das jeweilige Primerpaar in weiteren Amplifikationen verwendet.

B.4.2 Proofreading-PCR mit Phusion- und Q5-Polymerase

Um Amplifikationsfehler wie Basenaustausche oder Deletionen bei der PCR-Methode zu verhindern bzw. zu minimieren, kamen für die kritischen Klonierungsarbeiten (cDNA-Amplifikation, nahtlose Klonierung ohne Restriktionsenzyme) Polymerasen mit Korrekturlesefunktion zum Einsatz.

Tabelle B.6 Phusion® DNA Polymerase PCR-Ansätze

Komponente	Volumen
5× Phusion® HF Puffer	10 µL
dNTP Nukleotid-Mix (je 10 mmol L ⁻¹)	4 µL
FWD-Primer (10 µmol L ⁻¹)	2,5 µL
REV-Primer (10 µmol L ⁻¹)	2,5 µL
Phusion® DNA Polymerase (2 u/µL)	0,5 µL
Template-DNA	x µL
H ₂ O	ad 50 µL

Tabelle B.7 Q5™ DNA Polymerase PCR-Ansätze

Komponente	Volumen
5 × Q5™ Puffer	10 µL
dNTP Nukleotid-Mix (je 10 mmol L ⁻¹)	4 µL
FWD-Primer (10 µmol L ⁻¹)	1 µL
REV-Primer (10 µmol L ⁻¹)	1 µL
Q5™ DNA Polymerase (2 u/µL)	0,5 µL
Template-DNA	x µL
H ₂ O	ad 50 µL

Die Polymerasen werden als letzte Komponente pipettiert und der Ansatz auf Eis gelagert, um einen Verdau der Primer zu verhindern. Ansätze werden in den bereits auf 98 °C vorgeheizten Thermocycler überführt. Ein standardmäßiges PCR-Programm läuft wie folgt ab:

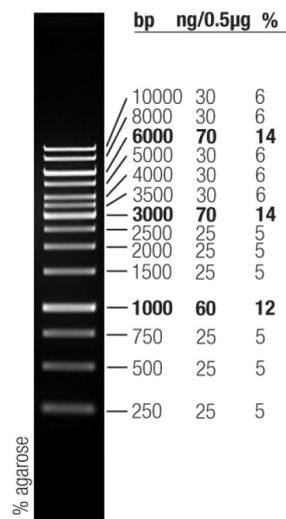
Tabelle B.8 Korrekturlese-Polymerase Thermocycler-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Erste Denaturierung	98 °C	30 s	1 Zyklus
Denaturierung	98 °C	5–10 s	
Anlagerung	50–72 °C	10–30 s	25–35 Zyklen
Verlängerung	72 °C	30 s/kb	
Finale Verlängerung	72 °C	2 min	1 Zyklus
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

Zur Bestimmung der optimalen Anlagerungs-Temperatur wurde als erste Näherung der NEB T_m Rechner³⁶ eingesetzt und die Reaktion mittels Gradienten-PCR weiter optimiert, bis eine ausreichend selektive Amplifikation gewährleistet werden konnte.

B.4.3 DNA Agarosegele

Zur Kontrolle von PCR-Amplifikationen werden 1–1,5 g Agarose in 100 mL 1 × TAE-Puffer gelöst. Die Lsg. wird 120 s bei 800 W Leistung in der Mikrowelle erhitzt, auf Handwärme (45 °C) abgekühlt, und 5 µL Roti®-Safe GelStain (ungiftige Alternative zu Ethidiumbromid) hinzugegeben. Nach Gießen des Gels wird ein Kamm zur Ausformung der Probenaschen eingesetzt. PCR-Proben werden mit 6 × DNA Loading Dye versetzt (enthält Glycerol) und jede Probenasche komplett gefüllt.

Abbildung B.1 DNA-Größenmarker 1 kb³⁷

Als Größenmarker wird der GeneRuler™ 1 kB DNA Ladder (Abb. B.1) eingesetzt. Die Kammer wird mit $1 \times$ TAE-Puffer befüllt und die Proben bei einer Spannung von 100 V für 45 min aufgetrennt. Nach dem Lauf können die DNA-Banden direkt über eine UV-Geldokumentationsanlage visualisiert und ausgewertet werden.

B.4.4 *Aufreinigung von PCR-Produkten*

Nach erfolgter PCR-Amplifikation wurden die Produkte mit dem QIAquick® PCR Purification Kit aufgereinigt, um Primer, überschüssige dNTPs und die Polymerasen zu entfernen, da diese in nachfolgenden Reaktionen störend wirken würden. Das Kit eignet sich für die Aufreinigung von Produktlängen zwischen 100 Bp und 10 kB.

- Zu 1 Volumen PCR-Probe werden 5 Volumen Puffer PB (5 mol L^{-1} Guanidiniumhydrochlorid; 30 % (v/v) Isopropanol) gegeben. Durch den pH-Indikator wird die Lsg. gelb.
- DNA wird durch Zentrifugation ($16.000 \times g$, RT, 1 min) an eine 2 mL Silika-Säule gebunden.
- Permeat verwerfen. Silika-Säule mit 0,75 mL Puffer PE (Ethanol) waschen ($16.000 \times g$, RT, 1 min).
- Permeat verwerfen. Nochmals Zentrifugieren, um Säule zu trocknen ($16.000 \times g$, RT, 1 min).
- Säule in neues Reaktionsgefäß überführen, 50 μL Puffer EB (10 mmol L^{-1} TRIS-HCl, pH 8,5) hinzugeben und 1 min inkubieren. Durch Zentrifugation ($16.000 \times g$, RT, 1 min) eluieren und photometrisch Konzentration bestimmen.

Falls trotz Optimierung der Amplifikationspezifität mehrere Produktbanden in dem Agarose-Gel erkennbar sind, wird eine einzelne Bande mit QIAquick® Gel Extraction Kit aus der Gelmatrix extrahiert.

- Produktbande über Größenmarker identifizieren und mit einem sauberen Skalpell zügig unter dem UV-Tisch ausschneiden. Überschüssiges Gel entfernen. Gelstück wiegen und 100 μL Puffer QG ($5,5 \text{ mol L}^{-1}$ Guanidiniumthiocyanat; 20 mmol L^{-1} TRIS-HCl, pH 6,6) je 100 mg Gelstück in das Reaktionsgefäß pipettieren.
- Bei 40°C im Thermomixer einige Minuten inkubieren, bis Gelstück vollständig geschmolzen ist. Mehrmals 10 μL 3 mol L^{-1} Natriumacetat (pH 5) hinzugeben, bis Lsg. gelblich erscheint. 1 Volumen Isopropanol hinzugeben.
- PCR-Produkt durch Zentrifugation ($16.000 \times g$, RT, 1 min) an Silica-Säule binden. Permeat verwerfen.
- 0,5 mL Puffer QG auf Säule geben, Zentrifugation wiederholen ($16.000 \times g$, RT, 1 min). Permeat verwerfen.
- 0,75 mL Puffer PE (10 mmol L^{-1} TRIS-HCl (pH 7,5); 80 % (v/v) Ethanol) auf Säule geben, Zentrifugation wiederholen ($16.000 \times g$, RT, 1 min). Permeat verwerfen.
- Zum Trocknen der Säule erneut zentrifugieren ($16.000 \times g$, RT, 1 min).
- Säule in neues Reaktionsgefäß überführen, 50 μL Puffer EB hinzugeben und 1 min inkubieren. Durch Zentrifugation ($16.000 \times g$, RT, 1 min) eluieren und photometrisch Konzentration bestimmen.

Kritische Schritte sind hierbei das zügige und schonende Schmelzen des Gelstücks (niedrige Agarose-Konzentration verwenden) sowie der pH-Wert bei der Bindung an die Säule. Die Lsg. muss zwingend auf einen pH unterhalb von pH 7,5 angesäuert werden (gelber Indikator), da sonst DNA nicht an die Säulenmatrix binden kann.

B.5 KLONIERUNGSMETHODEN

B.5.1 *TA-Klonierung*

TA-Klonierung ermöglicht das schnelle Klonieren eines über *Taq* Polymerase amplifizierten DNA-Abschnitts. In dieser Arbeit wurde das TOPO® TA Cloning Kit zusammen mit dem Vektor pCR®4-TOPO® eingesetzt, welches sich speziell zur Sequenzierung von PCR-Produkten eignet. Das betreffende Insert wurde durch PCR mit einer Korrekturlese-Polymerase hergestellt.

Für TA-Klonierung müssen noch 3'-Überhänge aus einem einzelnen Adenin-Nukleotid an beide Enden des linearen Fragments angefügt werden. Hierzu wurde das betreffende Amplifikat zunächst aufgereinigt, um anschließend die poly-Adenylierungsfunktionalität der *Taq* Polymerase auszunutzen:

Tabelle B.9 3' A-Überhänge nach Proofreading-PCR

Komponente	Volumen
5× GoTaq® Puffer	10 µL
dATP (10 mmol L ⁻¹)	1 µL
GoTaq® DNA Polymerase (5 u/µL)	0,25 µL
Aufgereinigtes PCR-Fragment	x µL
H ₂ O	ad 50 µL

Der Ansatz wurde anschließend bei 72 °C für 15 min inkubiert und wurde dann direkt für die TOPO® Klonierung eingesetzt.

Tabelle B.10 Ansatz für TA-Klonierungsreaktion

Komponente	Volumen
PCR-Produkt mit 3' A-Überhängen	4 µL
Salzlösung (1,2 mol L ⁻¹ NaCl / 0,06 mol L ⁻¹ MgCl ₂)	1 µL
pCR®4-TOPO® Vektor (10 ng µL ⁻¹)	1 µL
Endvolumen	6 µL

Den Ansatz durch vorsichtiges Pipettieren mischen und für 30 min bei RT inkubieren. Anschließend auf Eis und mit Transformationsprotokoll für chemisch-kompetente Zellen fortfahren (vgl. B.8). Für Transformation 2 µL einsetzen.

B.5.2 Restriktions-/Ligationsklonierung

Der mit geschnittene und mit CIAP-verdaute Vektor wird zusammen mit dem geschnittenen PCR-Fragment (vgl. B.6.2) in der Ligationsreaktion eingesetzt. Das ideale Insert:Vektor Verhältnis (molar) beträgt 3:1 (Insert im dreifachen Überschuss). Dieses Verhältnis muss jedoch meistens durch empirische Tests angepasst werden. Die T₄ DNA Ligase ist ATP abhängig (rATP), welches im Puffer vorhanden ist. Da rATP sehr instabil ist, wird es zu jeder Reaktion noch frisch hinzugegeben (25 mmol L⁻¹ Stamm-Lsg.). Nicht mit dATP (für PCR Ansätze) verwechseln.

Tabelle B.11 Ligationsansatz mit T₄ DNA Ligase

Komponente	Volumen
Insert Fragmente (Konzentration variabel)	x µL
linearisierte Vektorfragmente (Gesamtmenge ca. 50 ng)	x µL
10× Ligationspuffer	2 µL
rATP	1 µL
H ₂ O	ad 19,5 µL
T ₄ DNA Ligase (5 units/µL)	0,5 µL

Die Ligation erfolgt 16 h über Nacht. Anschließend werden unterschiedliche Volumina des Ansatzes chemisch in kompetente Zellen transformiert.

B.5.3 Nahtlose Klonierung von PCR-Produkten, seamless cloning

Um eine schnelle und präzise Klonierung der codierenden Sequenzen in unterschiedliche Expressionsvektoren zu gewährleisten, wurde eine Methode mit dem beschriebenen Gibson assembly ver-

wandte [121] (vgl. 3.4.1) eingesetzt. Es wurden die Chemikalien und Enzyme aus dem GENEART® Seamless Cloning and Assembly Kits verwendet.

- **PCR-Amplifikation:** Die jeweiligen Zielsequenzen (cDNA, synthetische Strings) sowie das Vektorrückgrat mit Gibson-Primern amplifizieren. Primer generieren überlappende Bereiche von exakt 15 Bp Länge. Aufgrund der Länge der Primer und erwarteten Amplifikate, müssen die Anlagerungstemperaturen in Vorversuchen empirisch ermittelt werden. Alle PCR-Läufe werden mit Korrekturlese-Polymerase durchgeführt (vgl. B.4.2), um fehlerfreie Amplifikate zu gewährleisten. Zur Linearisierung der Vektoren, werden maximal 20 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Ansätze mit Plasmid-DNA werden nach der PCR-Amplifikation mit 1 μL DpnI versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Aufreinigung aller Fragmente (vgl. B.4.4) wird über einen analytischen Gellauf die Reinheit bestimmt und photometrisch (Nano-Drop) die Konzentration abgeschätzt.
- **Assembly-Reaktion:** Anhand der Fragment-Länge und Konzentration wird die molare Konzentration sowohl der Inserts als auch des Vektors berechnet. Bei der Assembly-Reaktion gilt ein Insert:Vektor Verhältnis (molar) von 2:1 als ideal, wobei eine konstante Masse von 100 ng Vektorfragment eingesetzt wird.

Tabelle B.12 Ansatz für Seamless-cloning Reaktion

Komponente	Volumen
Insert Fragmente (jeweils ca. 20–200 ng)	x μL
linearisierte Vektorfragmente (100 ng)	x μL
5× Reaktionspuffer	4 μL
H ₂ O	ad 18 μL
10× Enzymmix	2 μL

Der Enzymmix wird als letztes in den Reaktionsansatz gegeben und das Gemisch bei RT für 30 min inkubiert.

- **Transformation und Analyse:** Jeweils 8 μL des Seamless-cloning Ansatzes werden in kompetente *E. coli* TOP10 transformiert (vgl. B.8). Mindestens 20 Kolonien werden mittels Kolonie-PCR auf das korrekte Insert überprüft und anschließend die Plasmid-DNA zur Sequenzierung und Transformation in Expressionsstämme aufgereinigt (vgl. B.6.1).

B.6 ARBEITEN MIT PLASMID-DNA

B.6.1 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Plasmidisolierung im kleinen Maßstab, z. B. für Sequenzierungen, werden 5 mL LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie transformierter *E. coli* TOP10 (von Agar-Platte) angeimpft und ÜN bei 37 °C sowie einer Schüttelgeschwindigkeit von 180 min^{-1} kultiviert (im 50 mL Falcon-Gefäß). Zur Plasmidpropagation ist die Verwendung des jeweiligen Selektionsmarkers essentiell.

Zur Aufreinigung wird das QIAprep® Spin Miniprep Kit angewendet. Durch einen stark alkalischen pH-Wert lysieren die Zellen und die Plasmid-DNA geht in Lösung. Das Lysat wird in einem Schritt neutralisiert und für die Bindung an Silica-Säulen mit einem hoch-salzhaltigen Puffer versetzt [284]. Nach Zentrifugation zum Klären des Lysats, bindet die Plasmid-DNA an die Silica-Membran, wird gewaschen und abschließend mit Puffer eluiert.

- Bakterienkultur zentrifugieren (6.000×g, RT, 15 min), Überstand verwerfen und Zellpellet in 250 μL Resuspensionspuffer P1 lösen (50 mmol L^{-1} TRIS-HCl (pH 8,0); 10 mmol L^{-1} EDTA · Na₂ · 2 H₂O; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ RNaseA).
- Nun 250 μL Lysispuffer P2 (200 mmol L^{-1} NaOH; 1 % (w/v) SDS) hinzugeben und kräftig vermischen. 5 min bei RT inkubieren lassen. Die Lsg. wird milchig und viskos.
- Durch Zugabe von 350 μL Neutralisationspuffer N3 (4,2 mol L^{-1} Guanidiniumhydrochlorid; 0,9 mol L^{-1} Kaliumacetat, pH 4,8) wird die alkalische Lsg. neutralisiert und es bildet sich ein trüb-flockiges Präzipitat. Durch Zentrifugation wird die Suspension geklärt (13.000×g, RT, 10 min).

- Überstand wird auf Silica-Säule gegeben ($13.000\times g$, RT, 1 min), mit 0,5 mL Puffer PB gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 0,75 mL Waschpuffer PE ($13.000\times g$, RT, 1 min) wird die Säule durch erneute Zentrifugation getrocknet.
- Es werden 50 μL angewärmter Puffer EB auf die Säule pipettiert. Nach einer kurzen Inkubation von 1 min wird die gereinigte Plasmid-DNA durch Zentrifugieren in ein neues Reaktionsgefäß eluiert und kann direkt für weitere Reaktionen (Sequenzierung, Transformation, etc.) eingesetzt werden.

Durch dieses Verfahren können bis zu 20 μg Plasmid-DNA aus 5 mL Kultur aufgereinigt werden. Um größere Plasmid-Ausbeuten (über 100 μg) für Restriktionsansätze oder zur Lagerung bereitstellen zu können, werden 100 mL Kulturvolumen über das QIAGEN Plasmid Midi Kit aufgereinigt.

Die Durchführung erfolgt analog zum Protokoll des Spin Miniprep Kits (oben). Es werden 4 mL Puffer P1 sowie 4 mL Puffer P2 zur alkalischen Lyse eingesetzt. Puffer N3 (oben) wird durch 4 mL eiskalten Puffer P3 ersetzt (3 mol L^{-1} Kaliumacetat pH 5,5) und dieser zur vollständigen Neutralisation für 15 min inkubiert. Als Säulen werden zuvor mit 4 mL Puffer QBT (750 mmol L^{-1} NaCl; 50 mmol L^{-1} MOPS (pH 7,0); 15 % (v/v) Isopropanol; 0,15 % Triton X-100) equilibrierte QIAGEN-tip 100 eingesetzt.

Nach Durchfluss des klaren Überstands (durch Schwerkraft), wird $2\times$ mit 10 mL Puffer QC (1 mol L^{-1} NaCl; 50 mmol L^{-1} MOPS (pH 7,0); 15 % (v/v) Isopropanol) gewaschen und mit 5 mL Puffer QF eluiert ($1,25\text{ mol L}^{-1}$ NaCl; 50 mmol L^{-1} TRIS-HCl (pH 8,5); 15 % (v/v) Isopropanol).

Die Plasmid-DNA muss abschließend gefällt werden. Hierzu werden 0,7 Volumen Isopropanol zur der eluierten DNA gegeben, gemischt und zentrifugiert ($16.000\times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min). Das DNA-Pellet wird mit 2 mL Ethanol (70 %ig) gewaschen und erneute zentrifugiert ($16.000\times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 20 min). Nach Trocknung des Pellets an der Luft für 10 min, wird dieses in einer entsprechenden Menge TRIS-Puffer (10 mmol L^{-1} TRIS-HCl (pH 8,5)) resuspendiert.

B.6.2 Restriktionsverdau

Zur sticky-end Klonierung von Vektor und PCR-Fragment sowie zum analytischen Verdau von Plasmid-DNA, wurden FastDigest Enzyme eingesetzt. Besonderheit ist hierbei, das selbst ein gleichzeitiger Verdau mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen möglich ist, da alle Enzyme an ein identisches Puffersystem angepasst wurden und alle zu 100 % in diesem aktiv sind.

Tabelle B.13 Restriktionsverdau von DNA

Komponente	Volumen
H ₂ O	17 μL
10 \times FastDigest Puffer	2 μL
DNA (PCR oder Plasmid)	10 μL
FastDigest Enzym (jeweils)	1 μL
Endvolumen	30 μL

Zum Plasmid-Verdau werden maximal 1 μg eingesetzt, zum PCR-Fragment-Verdau bis zu 0,2 μg . Der Ansatz wird bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Thermocycler für 1 h inkubiert. Die Endonukleasen werden (falls denaturierbar durch Hitze) bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ für 5 min inaktiviert.

Um eine Religation von linearisierter Vektor-DNA zu verhindern, müssen die 5'-Enden vor der eigentlichen Ligation zwingend dephosphoryliert werden. Hierzu wird 1 μL Calf-Intestinal-Alkaline-Phosphatase (CIAP, 1 u/ μL) direkt nach Verdau in die Lsg. gegeben und diese bei $50\text{ }^\circ\text{C}$ für 5 min inkubiert. CIAP kann durch Hitze inaktiviert werden (15 min bei $65\text{ }^\circ\text{C}$).

B.7 HERSTELLUNG CHEMISCH-KOMPETENTER ZELLEN

Die Fähigkeit zur Aufnahme fremder (Plasmid-)DNA bezeichnet man als Kompetenz. Die Zellwände der plasmidfreien Stämme (kommerziell bezogen) werden durch TSS-Puffer porös gemacht [285, 286]. Über Hitzeschock-Transformation (vgl. B.8) kann anschließend die aufgereinigte Plasmid-DNA in die Zellen transformiert werden.

Bei diesem Protokoll ist es wichtig, dass die Zellen nach Ernte stets gekühlt werden (auf Eis).

- Verdünnungsausstrich des jeweiligen *E. coli*-Stammes auf einer LB-Agarplatte anziehen.
- Einzelne Kolonie in 5 mL LB-Medium überimpfen (Vorkultur) und bei 37 °C über Nacht inkubieren. Eine 50 mL-Kultur animpfen (1:1000) und bei einer OD₆₀₀ von 0,5 auf zwei 50 mL Reaktionsgefäße verteilen. Für 10 min auf Eis inkubieren.
- Die Zellen pelletieren durch kurze Zentrifugation (1.000×g, 4 °C, 15 min).
- Überstand vorsichtig verwerfen und das Pellet in gekühlten TSS-Puffer (Tab. A.5) resuspendieren (10 % des ursprünglichen Kulturvolumens).
- 100 µL Aliquots in vorgekühlte 2 mL Reaktionsgefäße pipettieren, in flüssigem Stickstoff schockfrieren und bei –80 °C bis zu Transformation lagern.

B.8 TRANSFORMATION VON *E. COLI*

Das folgende Protokoll wurde zur Transformation und Cotransformation aller chemisch-kompetenten *E. coli* (Klonierungsstämme sowie Expressionsstämme) mit Plasmid-DNA durch Hitzeschock eingesetzt. Die Plasmid-DNA kann dabei aus einer Ligationsreaktion oder einem Assembly-Ansatz (Seamless cloning) stammen.

- Auf Eis ein 50 µL Aliquot der jeweiligen kompetenten Zellen (gelagert bei –80 °C) wenige Minuten auf Eis auftauen.
- Je nach erwarteter Plasmid-Menge und Ligationseffizienz 1–5 µL Plasmid-DNA in die Zellsuspension pipettieren und vorsichtig durch Klopfen mit dem Finger vermischen.
- Zellsuspension für 30 min auf Eis inkubieren lassen. Die Plasmide lagern sich an der Zellwand an.
- Hitzeschock für exakt 30 s bei 42 °C im vortemperierten Wasserbad. Anschließend für 2 min auf Eis.
- 250 µL SOC-Medium hinzugeben (RT) und für 1 h bei 37 °C im Thermomixer bei 350 rpm schütteln.
- Je nach erwarteter Transformationseffizienz wird die Zellsuspension mit SOC-Medium weiter verdünnt und verschiedene Volumina (20–200 µL) auf einer vorgewärmten LB-Agar Platte (mit Antibiotika als Selektionsmarker) verteilt.
- Platten werden kopfüber im Inkubator bei 37 °C ÜN gelagert und Kolonien für Plasmidisolation, Kolonie-PCR oder Sequenzierung selektiert.

B.9 STAMMHALTUNG

Um die Reproduzierbarkeit von Expressionsexperimenten zu gewährleisten, wird von jedem transformiertem Stamm nach erfolgreicher Sequenzierung eine Master-Cell-Bank aus Cryokulturen angelegt. Hierzu wird eine Vorkultur ÜN direkt von der Agar-Platte mit einer einzelnen Kolonie beimpft und bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Die Hauptkultur wird mit einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und die Kultur für ca. 3 h bis zur exponentiellen Wachstumsphase geschüttelt.

Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1,2 werden 700 µL Kultur in vorbereitete 2 mL Cryokulturgefäße pipettiert, mit sterilem 300 µL Glycerol (80 %ig) versetzt und sofort durch Kippen der Gefäße vermischt. Die Glycerol-Endkonzentration beträgt 24 %. Die Cryokulturen werden sofort bei –80 °C weggefroren.

B.10 PROTEINANALYTIK

B.10.1 Zellaufschluss

Zur Normierung der Proben für die Gelelektrophorese erfolgt eine Normierung der Proben anhand der OD₆₀₀ unter Verwendung der Formel

$$\text{Kulturvolumen [mL]} = \frac{2}{\text{OD}_{600}}$$

Die entsprechende Menge Kulturvolumen wird bis zur vollständigen Klärung des Mediums zentrifugiert. Die Biofeuchtmasse wird 300 µL Puffer (z. B. STPS-Extraktionspuffer Tab. A.5 oder PBS) resuspendiert.

Der Zellaufschluss erfolgt mittels Ultraschallsonde (Amplitude = 100 %, Zyklus = 0,6 s). Während des Aufschlusses müssen die Proben ständig mit Eis gekühlt werden. Für bakterielle Proben wird die Zellsuspension $10\times$ für 20 s, mit einer Abkühlphase von mindestens 30 s, beschallt. Nach Zentrifugation ($16.000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 min) kann der wässrige Überstand (lösliche Proteinfraction) direkt für Aktivitätsassays oder SDS-PAGE Analytik eingesetzt werden. Das unlösliche Proteinpellet wird in denaturierendem Resuspensionspuffer (100 mmol L^{-1} KPP pH 7,0; 10 mmol L^{-1} Natriummetabisulfid; 10 mmol L^{-1} β -Mercaptoethanol; 10 mmol L^{-1} Ascorbinsäure; 6 mol L^{-1} Urea) angelöst und für 1 h bei RT und 800 rpm im Thermomixer geschüttelt.

B.10.2 Bradford Protein-Assay

Für die Bestimmung der Proteingesamtkonzentration wird eine BSA-Kalibrationsreihe durch Verdünnung einer BSA-Stammlösung (1 g BSA gelöst in 5 mL H_2O , Konzentration $2.000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) angesetzt.

Es werden Verdünnungen mit folgenden Konzentrationen angesetzt: 2000, 1000, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 25 und $0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. In eine Mikrotiterplatte mit 96 Wells werden dreimal je $10\text{ }\mu\text{L}$ der Proben und der Kalibrationsreihe pipettiert. Mit einer Mehrkanalpipette werden $300\text{ }\mu\text{L}$ des Bradford-Reagenz in alle Vertiefungen gegeben, die Platte für 30 s geschüttelt und im Anschluss für 10 min bei RT inkubiert. Die Vermessung erfolgt im Photometer bei 595 nm.

Tabelle B.14 Ansatz für Bradford-Reagenzlösung zur Proteinquantifizierung

Komponente	Menge
Coomassie Brilliant Blau G250	10 mg
Ethanol (96 %ig)	5 mL
<i>ortho</i> -Phosphorsäure	10 mL
H_2O	<i>ad</i> 100 mL

B.10.3 Protein SDS-PAGE

Die denaturierende Protein-Polyacrylamidgelelektrophorese unter Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS), wurde mit dem Mini-PROTEAN® Tetra Cell System (Bio-Rad, USA) durchgeführt.

Die Rezepte zum Gießen der Trenn- und Sammelgele können den Tabellen B.15 und B.16 entnommen werden. Nach vollständigem Auspolymerisieren des Polyacrylamidgels werden die Proben im Verhältnis 1:1 mit frisch angemischtem Laemmli-Puffer [287] (80% $2\times$ SDS-Probenpuffer; 10% β -Mercaptoethanol; 10% Glycerol 55% ig) versetzt und für 10 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgeköcht. Die Proben werden in die Geltaschen pipettiert ($7\text{--}10\text{ }\mu\text{L}$ Probe und $3\text{--}5\text{ }\mu\text{L}$ des jeweiligen Proteinmarkers) und das Gel in die mit $1\times$ TGS-Puffer (Tab. A.5) gefüllte Probenkammer eingesetzt.

Der gelelektrophoretische Lauf erfolgt bei 80 V für 20 min im Sammelgel. Anschließend wird die Spannung für die Auftrennung im Trenngel auf 160 V erhöht. Der Gellauf wird gestoppt, sobald die Bromphenolblau-Bande die untere Begrenzung des Gels erreicht hat.

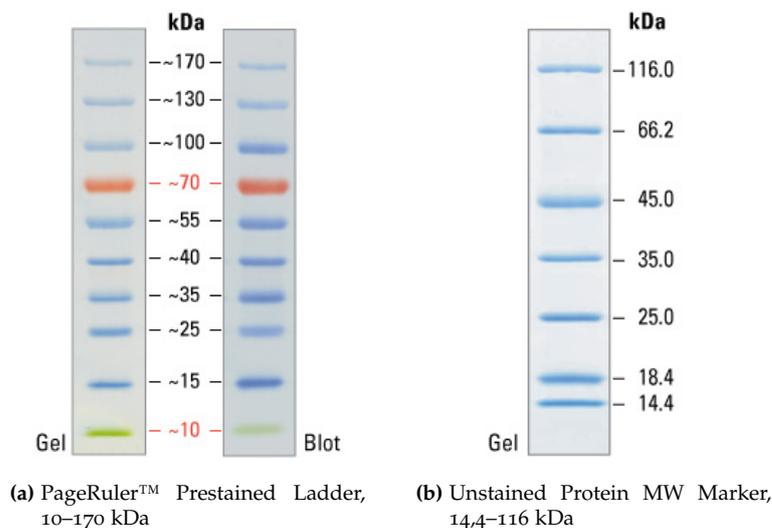
Tabelle B.15 Rezept zum Gießen eines 12% igen Trenngels für SDS-PAGE

Komponente	Volumen
Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 40% ig	3 ml
TRIS-HCl ($1,5\text{ mol L}^{-1}$; pH 8,8)	2,8 ml
SDS-Lösung (1% ig)	1 ml
H_2O	3,2 ml
Radikalstarter	
TEMED	$20\text{ }\mu\text{L}$
APS (25% ig)	$20\text{ }\mu\text{L}$

Tabelle B.16 Rezept zum Gießen eines 6%igen Sammelgels für die SDS-PAGE

Komponente	Volumen
Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 40 %ig	750 µL
TRIS-HCl (1,5 mol L ⁻¹ ; pH 6,8)	630 µL
SDS-Lösung (1 %ig)	300 µL
H ₂ O	3,77 ml
Radikalstarter	
TEMED	10 µL
APS (25 %ig)	10 µL

Als Proteinmarker wurde, insbesondere bei anschließenden Western-Blots, die vorgefärbte **PageRuler™ Prestained Ladder** (10–170 kDa, #26616, Thermo Scientific, USA) verwendet. Als ungefärbter Proteinmarker kam der **Unstained Protein MW Marker** (14,4–116 kDa, #26610, Thermo Scientific, USA) zum Einsatz (Abb. B.2).

**Abbildung B.2** Verwendete Proteinmarker für SDS-PAGE und Western-Blots (gefärbt und ungefärbt)³⁸

B.10.4 Kolloidale Coomassie-Färbung

Hinweise zur Herstellung der Lösung: Etwas H₂O vorlegen, vorsichtig Phosphorsäure hinzugeben; anschließend Ammoniumsulfat unter Rühren lösen. Wenn Ammoniumsulfat vollständig gelöst ist, Coomassie G-250 hinzufügen. Auf 80 % des finalen Volumen mit H₂O auffüllen. Stufenweise und langsam Methanol hinzugeben (unter kräftigem Rühren), damit sich Kolloid ausbilden kann. Die Färbelösung ist 6 Monate bei RT in einer braunen Flasche haltbar.

Tabelle B.17 Rezept für die kolloidale Coomassie-Färbelösung (Blue-silver)

Komponente	Volumenanteil
Coomassie Brilliant Blau G250	0,12 % (w/v)
Ammoniumsulfat	10 % (w/v)
<i>ortho</i> -Phosphorsäure 85 %ig	10 % (v/v)
Methanol (wasserfrei)	20 % (v/v)
H ₂ O	60 % (v/v)

Die Coomassie-Färbung der Proteingele erfolgt nach dem Protokoll für die sensitivere, kolloidale Coomassie-Färbung (Blue-silver) [288]. Hiermit können Proteinmengen ab 50 ng detektiert werden. Das Gel wird nach dem Lauf $2\times$ für 1 min mit H_2O gewaschen, um Pufferreste auszuspülen. Anschließend wird die Gelmatrix für 10 min in Coomassie-Fixierer fixiert (Tab. B.18). Die Blue-silver Färbelösung (Tab. B.17) wird hinzugefügt und das Gel für mindestens 2 h (besser ÜN) gefärbt. Die Entfärbung erfolgt durch mehrere Waschschrte mit H_2O , bis der Hintergrund des Gels wieder vollständig farblos ist.

Tabelle B.18 Rezept für die Fixierlösung für Coomassie-gefärbte Gele

Komponente	Volumenanteil
Ethanol 96 %ig	50 % (v/v)
<i>ortho</i> -Phosphorsäure 85 %ig	20 % (v/v)
H_2O	30 % (v/v)

B.10.5 Silberfärbung

Das Gel wird für mindestens 30 min oder über Nacht in Silber-Fixierer (Tab. B.19) eingelegt. Anschließend wird zweimal kurz für 5 min mit H_2O gewaschen. Das Gel wird für exakt 2,5 min in Farmers-Reducer-Lösung (1 Spatelspitze $K_3[Fe(CN)_6]$, 1 Spatelspitze Na_2SO_3 , ad 100 mL H_2O) inkubiert.

Die Lösung wird verworfen und mehrere Male bis zur vollständigen Entfärbung mit H_2O gewaschen. Darauf folgt ein Inkubationsschritt für 30 min in Silbernitrat-Lösung (1 Spatelspitze $AgNO_3$ auf 100 mL H_2O). Die Lösung wird im Anschluss entsorgt und zweimal für 30 s mit H_2O gewaschen. Nun das Gel mit Natriumcarbonat-Lösung (2,5 % (w/v) Na_2CO_3 in H_2O) kurz equilibrieren. Zu 100 ml Natriumcarbonat-Lösung werden 500 μ L Formaldehyd pipettiert.

Diese Lösung wird gleichmäßig über das Gel gegossen. Sobald die Entwicklung beginnt und schwarze Proteinbanden erkennbar werden, wird die Lösung zügig verworfen und die Reaktion mit 5 %iger Essigsäure für 10 min abgestoppt. Durch Silberfärbung können Proteinmengen bis in den unteren ng-Bereich detektiert werden.

Tabelle B.19 Rezept für die Fixier-/Entfärbelösung zur Silberfärbung

Komponente	Volumenanteil
Ethanol 96 %ig	45 % (v/v)
Essigsäure 100 %ig	45 % (v/v)
H_2O	10 % (v/v)

B.10.6 Densitometrische Quantifizierung von Proteinen

Zur näherungsweisen Quantifizierung des Zielproteins über dessen Proteinbande im SDS-Gel, wurde eine densitometrische Analyse durchgeführt [289]. Die Proben werden zusammen mit BSA-Kalibrationslösungen (vgl. B.10.2) in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (vgl. B.10.4). Silberfärbung ist für die Quantifizierung ungeeignet. Die Gele werden mit 24-bit Farben am Gelscanner digitalisiert und als TIFF-Dateien gespeichert, damit keine Bildinformationen durch Kompression verloren gehen.

Zur Bestimmung der relativen Farbdichte einzelner Proteinbanden wird die Bildanalysesoftware ImageJ [290] verwendet. Die einzelnen Lanes und Banden werden markiert. Die Größe des Markierungsrahmens (in Pixeln) um die jeweilige Banden muss für eine Auswertung konstant bleiben. Es werden integrierte Farbdichtewerte erhalten (integrated density values = IDV), die eine Abschätzung der Proteinausbeute ermöglichen. Von den Werten muss der Hintergrund des jeweiligen Geles abgezogen werden (durch Festlegen einer proteinfreien Stelle im Gelbild).

B.10.7 Western-Blot

Western-Blots werden als Semi-Dry Blots mit PVDF-Membran durchgeführt.

- **Blotting:** Zunächst werden zwei Gele mit identischen Proben aufgetrennt. Zur spätere Zuordnung der Banden wird eines der Gele angefärbt, das andere wird auf die Membran geblottet. Dazu das Gel kurz in H₂O waschen. Die PVDF-Membran (Bio-Rad, USA) wird passend zugeschnitten und für 5 min in Methanol aktiviert, da diese eine stark hydrophobe Oberfläche besitzt. Anschließend für 15 min in Towbin-Transferpuffer [291] equilibrieren.

Tabelle B.20 Ansatz für Towbin-Transferpuffer

Komponente	Volumenanteil
TRIS-Base	0,3 % (w/v)
Glycin	1,5 % (w/v)
Methanol	20 % (v/v)
<i>ad</i> H ₂ O	

Nun Blot als Sandwich auf der Transfer-Apparatur aufbauen. Reihenfolge (von unten betrachtet): in Towbin-Puffer getränktes Blotpapier, PVDF-Membran, Acrylamid-Gel und getränktes Blotpapier als Deckel. Apparatur fest verschließen und bei 15 V für 50 min (oder bis vorgefärbter Marker auf Membran erkennbar ist) blotten.

- **Blocken der Membran:** Nach erfolgreichem Blot die Membran 3× für 10 min in H₂O waschen. Über Nacht bei 4 °C in Block-Lösung inkubieren, um nicht besetzte Bindungsmöglichkeiten für den Antikörper abzusättigen.

Tabelle B.21 Ansatz für Block-Lösung

Komponente	Volumenanteil
Magermilchpulver	5 % (w/v)
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	2 % (w/v)
Tween-20	1 % (v/v)
10× PBS	10 % (v/v)
<i>ad</i> H ₂ O	

- **Immunmarkierung:** Nach dem Block-Schritt Membran für 30 min schüttelnd auf RT aufwärmen. 3× für 5 min mit Waschlösung waschen (1× PBS mit 1 % (v/v) Tween-20). Antikörper-Diluent frisch ansetzen (Block-Lösung und Waschlösung im Verhältnis 1:1). Primären Antikörper (6×-His epitope tag mouse-AB #MA1-21315 von Thermo Scientific, USA) 1:1000 in Antikörper-Diluent verdünnen und für 1 h schüttelnd inkubieren. 3× für 5 min mit Waschlösung waschen. Sekundären Antikörper (Goat anti-mouse HRP conjugate #401215 von Calbiochem, USA) 1:5000 in Antikörper-Diluent verdünnen und für 1 h schüttelnd inkubieren. Abschließend nochmals 3× für 5 min mit Waschlösung waschen und durch Zugabe von 1 mL TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) der Blot angefärbt. Bereiche mit gebundenem Antikörper werden blau-violett angefärbt.

B.10.8 2D-Gelelektrophorese

Für die 1. Dimension, der Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt, werden vorgefertigte IEF-Gelstreifen (Immobiline™ DryStrip Kit) mit einem pH-Gradienten von pH 3 bis pH 10 verwendet.

1 ml des Rehydrierungspuffers (8 mol L⁻¹ Urea; 2 % CHAPS; 0,5 % IPG-Puffer; 0,002 % Bromphenolblau) wird mit 2,8 mg DTT versetzt und 375 µL dieser Lösung mit 25 µL der Zelllysate- / oder Proteinprobe gemischt. 340 µL dieses Gemisches werden auf einen IEF-Streifen gegeben. Durch die Rehydrierung des getrockneten Streifens diffundiert die Probe automatisch über 12 h direkt in die Gelmatrix. Zur isoelektrischen Fokussierung wird folgendes Gradientenprogramm angewendet:

1. 500 V Startspannung
2. von 500 V auf 3.500 V in 90 min
3. 3.500 V für mindestens 5 h (meist ÜN)

Die fokussierten Gelstreifen können bei -20 °C für 12 h gelagert werden.

Vor dem Gellauf der 2. Dimension müssen die IEF-Streifen equilibriert werden. Hierfür werden 5 ml des Equilibrierungspuffers (75 mmol L⁻¹ TRIS-HCl (pH 8,8); 6 mol L⁻¹ Urea; 29,3 % (v/v) Glycerol; 2 % (w/v) SDS; 0,002 % Bromphenolblau) mit 50 mg DTT versetzt und der Streifen für 15 min in der Lösung inkubiert.

Im Anschluss erfolgt ein zweiter Equilibrierungsschritt für 15 min in Iodacetamid-Lösung (125 mg Iodacetamid in 5 ml des Equilibrierungspuffer). Für die zweite Dimension werden fertig gegossene, homogene Polyacrylamid-Gele verwendet (ExcelGel™ 2D-Gel Homogeneous; 12,5%ig; von GE Healthcare, Großbritannien). Der Gellauf erfolgt über 1,5 h bei 150 V. Das Gel wird nach der elektrophoretischen Auftrennung silbergefärbt (vgl. B.10.5).

B.10.9 Trypsin-Verdau für MALDI-MS

Der Trypsin-Verdau dient der Probenvorbereitung vor Analyse im MALDI-MS. Es sollten nur spezielle (proteinfreie) Reaktionsgefäße verwendet werden und äußerst sauber gearbeitet werden, um eine Kontamination durch Fremdproteine zu vermeiden.

1. Probenvorbereitung

- SDS-PAGE der Probe, anfärben mit kolloidalem Coomassie (keine Silberfärbung). Probenbande vorsichtig mit einer Skalpell ausschneiden und in Reaktionsgefäß überführen.
- Mindestens 5 × jeweils 5 min mit H₂O waschen. Gelbande mit Pipettenspitze zerkleinern. Waschwasser vorsichtig entfernen.
- Durch Zugabe von 200 µL Acetonitril das Gelstück trocknen (kurz inkubieren). Acetonitril wieder gründlich entfernen.

2. Carbamidomethylierung

- Zu jeder Probe 50 µL DTT-Lösung geben (20 mmol L⁻¹ DTT in 0,1 mol L⁻¹ Ammoniumcarbonat-Lsg.).
- Für 30 min bei 56 °C ohne Schütteln im Thermomixer inkubieren.
- DTT-Lösung vorsichtig entfernen. Nochmals mit Acetonitril dehydrieren (wie oben). 50 µL Iodacetamid-Lösung (55 mmol L⁻¹ Iodacetamid in 0,1 mol L⁻¹ Ammoniumcarbonat-Lsg.) hinzugeben.
- Für 30 min bei RT im Dunkeln inkubieren. Iodacetamid-Lsg. entfernen und erneut dehydrieren (wie zuvor).
- Anschließend für 15 min in 200 µL 0,1 mol L⁻¹ Ammoniumcarbonat-Lsg. quellen lassen, Lösung entfernen, dehydrieren (Acetonitril) und über eine Vakuumzentrifuge vollständig trocknen (ca. 20 min).

3. Trypsin-Verdau

- Trypsin-Arbeitslösung nach Herstellerangaben ansetzen (Promega, USA). 30 µL Trypsin-Lösung zu der getrockneten Gelbande geben. Über Nacht bei 37 °C zum Verdau inkubieren.
- Peptid-Fragmente über ZipTips® (Millipore, USA) extrahieren und im MALDI-MS vermessen.

B.10.10 Proteinmodellierung

Zum strukturellen Vergleich der Enzyme, wurde ein homology modelling und threading mit dem I-Tasser Algorithmus [242] durchgeführt. Modelle mit den besten C-Scores wurden strukturell mit SALIGN [249] überlagert. Die Strukturalignments wurden mit MODELLER [292] verfeinert. Alle Modelle wurden evaluiert und gendert mit der Software PyMOL [33] und QuteMol [293].

B.11 OFFLINE-ANALYTIK FÜR KULTIVIERUNGEN

B.11.1 optische Dichte OD₆₀₀

Die Messung der mit Saline (0,9 % Natriumchlorid-Lösung) verdünnten Proben erfolgt bei 600 nm im Photometer. Ab einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 muss die Probe verdünnt werden, da die Messung nicht mehr im linearen Bereich liegt.

B.11.2 *Biotrockenmasse BTM*

Jeweils 1 ml der Kulturbrühe werden in vorgetrocknete Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei $13.000 \times g$ abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wird das erhaltene Zellpellet bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ausgewogen.

Als Näherung der BTM ausgehend von der optischen Dichte, kann zudem ein Korrelationskoeffizient von $0,36 \text{ g pro OD}_{600}$ pro Liter angenommen werden, der für *E. coli* BL21(DE3) empirisch ermittelt wurde [294].

B.11.3 *Glukosemessung*

Der Medienüberstand (zellfrei) jeder Probe wird 1:10 mit H_2O verdünnt und im YSI 2700 SELECT™ Biochemistry Analyzer (YSI Incorporated, USA) vermessen.

B.12 ENZYMAUFREINIGUNG ÜBER IMAC

Die Aufreinigung der His-getaggen STPS erfolgte über immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (FPLC) sowie über ein Streptavidin-Tag Adaptermolekül. Eine BioLogic DuoFlow FPLC Anlage (Bio-Rad, USA) wurde zur Automatisierung des Aufreinigungsprozesses eingesetzt, und mit den jeweiligen Modulen/Säulen sowie entgasten Puffern bestückt. Nach der Zellernte durch Zentrifugation wird das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen Bindungspuffer (Zusammensetzung vgl. A.5) resuspendiert (100 mg mL^{-1} Puffer) und nach Aufschluss über Ultraschall das Rohlysat sterilfiltriert ($0,2 \mu\text{m}$ Spritzenfilter). Das Rohlysat und die Produktfraktionen wurden vor und nach Aufreinigung auf Eis gekühlt. Zudem wurde der IDA 75 Membranadsorber durch ein eigens angefertigtes Kühlmodul (umgesetzt durch Feinmechanikerwerkstatt des Instituts) gekühlt (Abb. B.3).

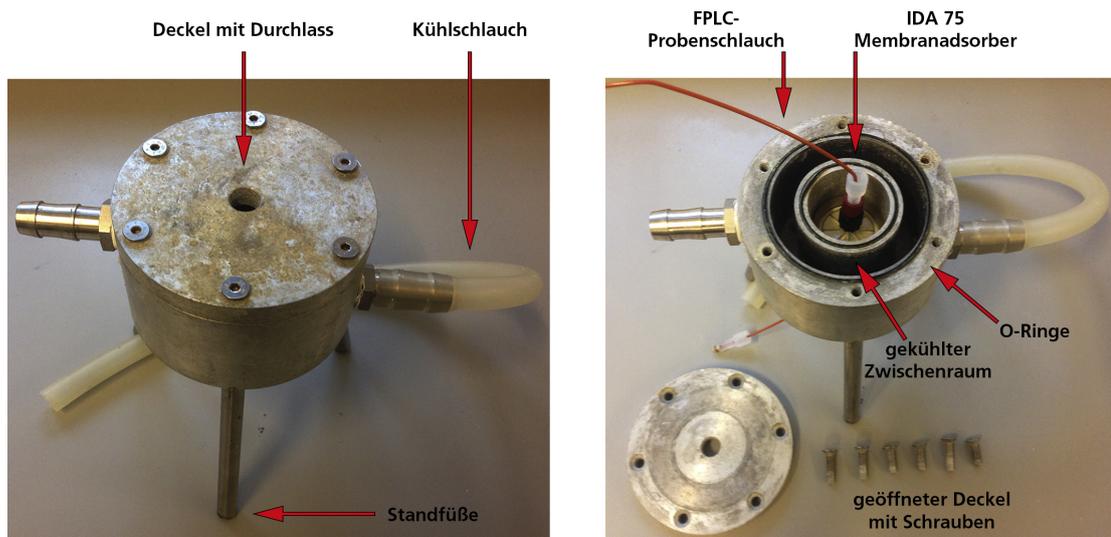


Abbildung B.3 Kühlmodul für IDA 75 Membranadsorber. Nach Anschluss an ein Kühlthermostat wird der doppelwandige Zwischenraum mit Kühlflüssigkeit durchströmt. Löcher im Deckel und Boden ermöglichen den Anschluss des Adsorbers an die Probenschläuche der FPLC-Anlage. Das Kühlmodul ermöglicht die Aufreinigung der Terpensynthasen ohne Unterbrechung der Kühlkette.

B.12.1 *IDA 75 Membranadsorber*

Membranadsorbermodule vom Typ Sartobind IDA 75 (Sartorius-Stedim, Deutschland) werden mit Ni^{2+} oder Co^{2+} Kationen ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NiSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ / $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ CoCl}_2 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ in $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaAc}$, $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$) dekoriert und anschließend gründlich mit Equilibrierpuffer und Bindungspuffer gespült. Nach Beladung des Adsorbers mit dem Rohextrakt werden ungebundene Proteinfractionen durch Spülen mit Bindungspuffer entfernt. Die Elution des Zielproteins erfolgt durch einen ansteigenden Imidazol-Gradienten (Elutionspuffer).

Tabelle B.22 IDA 75 Membranadsorber FPLC-Programm

Komponente	Fluss [mL min^{-1}]	Dauer [min]
Bindungspuffer (Vorspülen)	1	50
Beladung	0,5	20
Bindungspuffer (Spülen)	1	40
Elutionspuffer (Elution)	1	10
Gesamtdauer		120

B.12.2 HiTrap™-Sepharosesäule

Die HiTrap IMAC FF 5 mL Säule (GE Healthcare, USA) wird zur Aufreinigung größerer Enzymmengen eingesetzt. Der Bindungspuffer und Elutionspuffer sind auf die Terpensynthesen angepasst worden (vgl. A.5). Der Bindungspuffer enthält bereits eine niedrige Konzentration an Imidazol, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nach gründlichem Equilibrieren der Säule mit Bindungspuffer wurde das Rohlysat gekühlt auf die Säule geladen, nicht gebundene Proteine durch Spülen entfernt und die Zielfraktion durch kompetitive Verdrängung mit Imidazol vom Säulenmaterial eluiert. Dabei wurde eine Konzentrationsstufe eingeführt, bei der zunächst von 50 mM Imidazol auf 500 mM Imidazol umgespült wurde. Diese verbesserte FPLC-Methode zur Aufreinigung von Sesquiterpensynthesen wurde entwickelt von Thore Frister (laufende Dissertation, Leibniz Universität Hannover).

Tabelle B.23 HiTrap Sepharose IMAC FPLC-Programm

Komponente	Fluss [$^{\circ}\text{C min}^{-1}$]	Dauer [min]
Vorspülen (H_2O)	3	20
Equilibrieren	3	10
Beladung	1,5	15
Spülen (Bindungspuffer)	3	20
Elution 1. Stufe	3	20
Elution 2. Stufe	3	20
Regeneration (H_2O)	3	20
Gesamtdauer		125

B.12.3 Strep-Tactin/His-STREPPER System

Aufschluss der Feuchtzellmasse erfolgt in PBS-Puffer. Es wird das Adaptermolekül His-STREPPER (2,8 kDa MW, gelöst in PBS) in stöchiometrischen Mengen zu dem Rohlysat gegeben. Dafür muss die erwartete Konzentration an His-getagtem Zielenzym abgeschätzt werden. Nach Zugabe des His-STREPPERs wird die Lösung für 15 min inkubiert, damit der Adapter fest an das His-Epitop binden kann.

Die gravity flow Säule (Strep-Tactin Superflow, 1 mL Säulenvolumen) wird mit 2×1 CV equilibriert. Nach Bindung des Rohextrakts wird mit 5×1 CV PBS pH 8,0 gewaschen. Die Elution erfolgt in 4 Stufen: 0,8 CV (E1); 1,4 CV (E2); 1 CV (E3) und 1 CV (E4). Der Großteil (über 80 %) des Zielproteins befindet sich in Fraktion E2.

Die Säule wird durch Spülen mit 3×4 CV Regenerationspuffer (enthält Hydroxyphenylazoben-zoesäure) regeneriert.

B.12.4 Dialyse/Ultrafiltration

Die Produktfraktionen aus den jeweiligen Aufreinigungsprozessen werden gepoolt und über Vivaspin 20 Ultrafiltrationsmodule (Sartorius-Stedim, Deutschland) mit 10 kDa MWCO (molecular weight cut-off) bis zum Endpunktvolumen von 1 mL aufkonzentriert ($4.000 \times g$, 4°C , Zeit variabel). Anschließend wird das Ultrafiltrationsmodul $3 \times$ auf 20 mL mit STPS-Aktivitätspuffer (vgl. A.5) aufgefüllt und die Zentrifugation wiederholt. Aliquots der aufgerinigten Enzymlösungen werden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert.

B.13 AKTIVITÄTSASSAY TERPENSYNTHASE

Für Biotransformationen und Enzymaktivitätsnachweise im mL-Maßstab wurde ein zuvor beschriebenes Assay für Terpensynthasen [222] adaptiert. Die enzymatische Reaktion wird in 5 mL Glasgefäßen durchgeführt, die mit PTFE/Butylgummi Septen luftdicht verschlossen werden. Es werden 100 µL Enzymlösung (Rohextrakt nach Zellaufschluss oder aufgereinigte STPS) mit 150 µmol L⁻¹ FDP supplementiert und STPS-Aktivitätspuffer (Tab. A.5, enthält MgCl₂) bis zu einem finalen Volumen von 1 mL aufgefüllt.

Die Pufferlösung wird zügig mit 1 mL organischem Lösungsmittel (Pentan, Hexamethyldisiloxan oder Isooctan) überschichtet, um die flüchtigen Produkte aufzufangen. Die verschlossenen Glasgefäße werden je nach Enzymoptimum bei 30–40 °C für 10 min bis 16 h inkubiert. Die untere Pufferphase wird durch mehrmaliges, kräftiges Schütteln extrahiert, die Phasen durch kurze Zentrifugation separiert (1.000×g, RT, 10 min) und die obere organische Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die organische Produktmischung wird unter Stickstoff eingengt und mittels Gaschromatographie analysiert.

B.14 GC-FID ANALYTIK VON SESQUITERPENEN

Die Analytik der Sesquiterpenproben erfolgte an zwei unterschiedlichen Gaschromatographen. Trägergas war in allen Fällen Wasserstoff. Die Injektortemperatur/Splitttemperatur betrug 240 °C. Der Flammenionisationsdetektor (FID) zur Detektion der Moleküle wurde auf 300 °C beheizt.

Der Gaschromatograph Shimadzu GC-14A wurde mit einer Sigma-Aldrich Supelco SPB®-5 Silica-Kapillarsäule (Länge 30 m, Innendurchmesser 0,32 mm, Filmdicke 0,25 µm) ausgestattet. Es wird 1 µL Probe manuell injiziert (Split 1:40).

Tabelle B.24 GC-Temperaturprogramm GC-14A

Schritt	Temperatur [°C]	Rate [°C min ⁻¹]	Dauer [min]
Start	80	0	0
1. Stufe	80–210	7,5	17
2. Stufe	210–280	20	3,5
Halten	280	0	2
Gesamtdauer			22,5

Der Gaschromatograph Shimadzu GC-2010 mit Autosampler (150 Proben) wurde mit einer Phenomenex Zebron ZB-WAXplus Silica-Kapillarsäule (Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm) bestückt. Diese Säule eignet sich aufgrund der Filmeigenschaften insbesondere für Terpenanalytik und ist zudem äußerst wasserstabil. Es werden 2 µL Probe über den Autosampler injiziert (splitlos).

Das Temperaturprogramm musste an das Gerät und die veränderte Säule adaptiert werden (Zusammenarbeit mit Thore Frister, laufende Dissertation, Leibniz Universität Hannover).

Tabelle B.25 GC-Temperaturprogramm GC-2010

Schritt	Temperatur [°C]	Rate [°C min ⁻¹]	Dauer [min]
Start	40	0	0,3
1. Stufe	40–210	10	17
Halten	210	0	1
2. Stufe	210–230	30	0,6
Halten	230	0	3
Gesamtdauer			22

B.14.1 Kalibrationsgeraden für Quantifizierung

Zur quantitativen Bestimmung der drei Zielverbindungen wurden logarithmische Verdünnungsreihen von authentischen Standards dreifach vermessen. (-)-Patchoulol ist nicht als Reinstoff verfügbar.

bar, es wurde daher reines Patchouli-Öl als Standard eingesetzt. α -Humulen ist als authentischer Standard kommerziell verfügbar. Da eine Synthese von (+)-Zizaen im Rahmen dieser Arbeit als nicht praktikabel erachtet wurde und keine Standardverbindung kommerziell erhältlich ist, wurde α -Cedren als Standardverbindung zur Quantifizierung von (+)-Zizaen eingesetzt. α -Cedren weist eine identische Elementarzusammensetzung und ein vergleichbares Kohlenstoffgerüst auf, so dass die Detektorantwort des FID mit der von (+)-Zizaen nahezu übereinstimmt.

Die Kalibrationsgeraden wurden am Gaschromatographen GC-2010 plus mit der entsprechenden Methode vermessen (vgl. B.14).

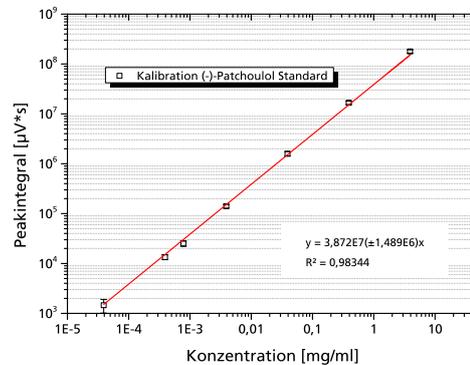


Abbildung B.4 Lineare Regression einer logarithmischen Verdünnungsreihe von Patchouli-Öl. Quantifizierung des (-)-Patchouliol-Signals.

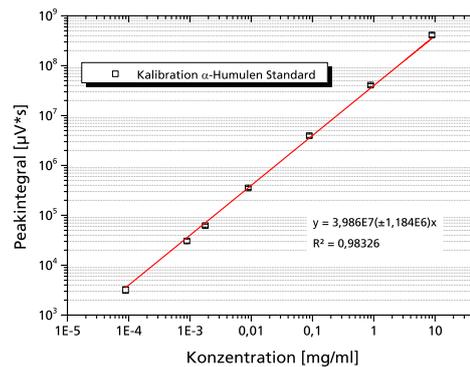


Abbildung B.5 Lineare Regression einer logarithmischen Verdünnungsreihe von α -Humulen (auth. Standard).

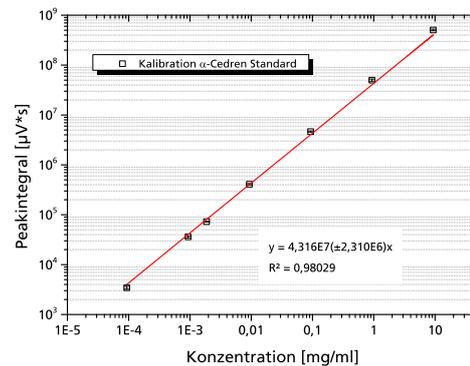


Abbildung B.6 Lineare Regression einer logarithmischen Verdünnungsreihe von α -Cedren (auth. Standard).

B.15 GC-MS ANALYTIK VON SESQUITERPENEN

Für die eindeutige Identifikation der Sesquiterpenverbindungen wurden GC-MS Messungen an einem Fisons GC 8000 Gaschromatographen, verbunden mit einem Fisons MD 800 massenselektiven

Detektor, durchgeführt. Zentrale Geräteparameter: Interfacetemperatur 230 °C, Ionenquelle 200 °C, Quadropol 100 °C, EI Ionisation 70 eV, Scanbereich 33–300 amu. Die Probe wurde kalt direkt on-column injiziert.

Das Trägergas war Helium mit einer Fließgeschwindigkeit von 38 cm s⁻¹. Als Säule für die isothermale Auftrennung wurde eine Phenomenex Zebron ZB-WAX Silica-Kapillarsäule (Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm) eingesetzt. Massenspektren wurde mit einer digitalen Bibliothek (Wiley08/NIST08, 2008) oder manuell mit Spektren von authentischen Standards abgeglichen.

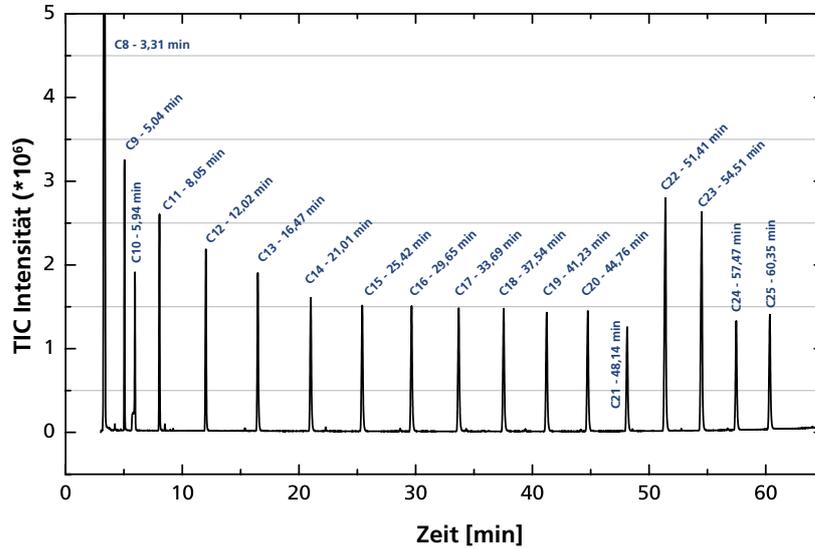


Abbildung B.7 Alkan-Standardreihe C8–C25 vermessen mit isothermaler GC-MS Trennmethode. Retentionszeiten wurden zur Berechnung von Retentionsindizes (RI) verwendet.

SEQUENZDATEN

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen und Sequenzierungsergebnisse aufgeführt. Sofern die Daten bereits in der Datenbank GenBank des NCBI³⁹ (National Center for Biotechnology Information) hinterlegt wurden, ist die entsprechende *accession number* mit angegeben. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden markante Bereiche farblich markiert (Tab. C.1).

Tabelle C.1 Farbschema Sequenzdaten

Art	Farbcodierung
Startcodon/Methionin	gelb
Stoppcodon/Translationsende	rot
His-Tag / T7-Tag	cyan
DDXXD und NSE/DTE Motive	grün
Peptidase-Schnittstellen	braun
Fusionsproteine	magenta

(1) Patchoulolsynthase cDNA, GenBank AY508730 [72], Länge = 1659 Bp

```

1 ATGGAGTTGT ATGCCAAAG TGTGGAGTG GGTGCTGCTT CTCGCTCTCT TGCGAATTTT CATCCATGTG TGTGGGGAGA CAAATTCATT GTCTACAACC
101 CACAATCATG CCAGGCTGGA GAGAGAGAAG AGGCTGAGGA GCTGAAAGTG GAGCTGAAAA GAGAGCTGAA GGAAGCATCA GACAACCTACA TCGCGCAACT
201 GAAAATGGTG GATGCAATAC AACGATTAGG CATTGACTAT CTTTTTGTGG AAGATGTTGA TGAAGCTTTG AAGAATCTGT TTGAAATGTT TGATGCTTTT
301 TGCAAGAATA ATCATGACAT GCACGCCACT GCTCTCAGCT TTCGCCTTCT CAGACAACAT GGATACAGAG TTTCATGTGA AGTTTTTGAA AAGTTTAAGG
401 ATGGCAAAGA TGGATTTAAG GTTCCAATG AGGATGGAGC GGTGTCAGTC CTTGAATTCT TCGAAGCCAC GCATCTCAGA GTCCATGGAG AAGACGCTCT
501 TGATAATGCT TTTGACTTCA CTAGGAACCTA CTTGGAATCA GTCTATGCAA CTTTGAACGA TCCAACCGCG AAACAAGTCC ACAACGCATT GAATGAGTTT
601 TCTTTTCGAA GAGGATTGCG ACGCGTGGAA GCAAGGAAGT ACATATCAAT CTACGAGCAA TACGCATCTC ATCACAAGG CTTGCTCAAA CTTGCTAAGC
701 TGGATTTCAA CTTGGTACAA GCTTTGCACA GAAGGGAGCT GAGTGAAGAT TCTAGGTGGT GGAAGACTTT ACAAGTGCCC ACAAGCTAT CATTGTTAG
801 AGATCGATTG GTGGAGTCTC ACTTCTGGGC TTCGGGATCT TATTTTGAAC CGAATTATTC GGTAGCTAGG ATGATTTTAG CAAAAGGGCT GGCTGTATTA
901 TCTCTTATGG ATGATGTGTA TGATGCATAT GGTACTTTTG AGGAATTACA AATGTTTACA GATGCAATCG AAAGTGGGA TGCTTCATGT TTAGATAAAC
1001 TTCCAGATTA CATGAAATA GTATACAAGG CCCTTTTGGG TGTGTTTGG GAAGTTGAGC AGGAGTTGAT CAAGCTAGGT GCACCATATC GAGCTACTA
1101 TGGAAAAGAA GCCATGAAAT ACGCCGCGAG AGCTTACATG GAAGAGGCCV AATGGAGGGA GCAAAAAGCAC AAACCCACAA CCAAGGAGTA TATGAAGCTG
1201 GCAACCAAGA CATGTGGCTA CATAACTCTA ATAATATTAT CATGCTTTGG AGTGGAAAGG GGCATTGTGA CCAAGAAGC CTTGCTGTTG GTGTTCTCC
1301 GACCTCCTTT CATCGAGGCT ACATTAATCA TTGCCAGGCT CGTCAATGAT ATTACAGGAC ACGAGTTTGA GAAAAACGA GAGCAGGTTT GCACCTGAGT
1401 AGAATGCTAC ATGGAAAGAG ACAAAAGTGGG GAAGCAAGAG GTGGTGCTGT AATTCTACAA CCAAAATGGAG TCAGCATGGA AGGACATTA TGAAGGGTTT
1501 CTCAGACCAG TTGAATTTCC AATCCCTCTA CTTTATCTTA TTCTCAATTC AGTCCGAACA CTTGAGGTTA TTTACAAAGA GGGCGATTCC TATACACACG
1601 TGGGCTCTGC AATGCAAAAC ATCATCAAGC AGTTGTACCT TCACCTGTTC CCATATTA

```

(2) Patchoulolsynthase Protein, GenBank AAS86323 [72], Länge = 552 AS

```

1 MELYAQSVGV GAASRPLANF HPCVWGDKFI VYNPQSQAG EREEAEELKV ELKRELKEAS DNYMRQLKMW DAIQRLGIDY LFVEDVDEAL KNLFEMFDFAF
101 KNNHDMHAT ALSFRLLRQH GYRVSCEVFE KFKDGDGDFK VPNEGAVAV LEFFFEATHLR VHGEDVLDNA FVFTRNYLES VYATLNDPTA QVHNLNEF
201 SFRRGLPRVE ARKYISIEYQ YASHHKGLLK LAKLDFNLVQ ALHRRLESED SRWVKTLQVP TKLSFVRDRL VESYFWASGS YFEPNYSVAR MILAKGLAVL
301 SLMDDVYDAY GTFEEQLMFT DAIERWDASC LDKLPDYMKI VYKALLDVFE EVDEELIKLG APYRAYYKGE AMKYAARAYM EEAQWREKQH KPPTKEYMKL
401 ATKTCGYITL IILSCLGVEE GIVTKEAFDW VFSRPPFIEA TLIARLVND LIIGHHEFKKR EHVRTAVECY MEEHKVKGQE VSEFYNQME SAWKDINEGF
501 LRPVEFPIPL LYLILNSVRT LEVIYKEGDS YTHVGPAMQN IIKQLYLHPV PY

```

(3) Patchoulolsynthase cDNA Variante (Sequenzierung pCR4-TOPO::PTS1), GenBank KF983531 [183], Länge = 1659 Bp

```

1 ATGGAGTTGT ATGCCAAAG TGTGGAGTG GGTGCTGCTT CTCGCTCTCT TGCGAATTTT CATCAATGTG TGTGGGGAGA CAAATTCATT GTGTACAACC
101 CACAATCAAG CCAGGCTGGA GAGAGAGAAG AGGCTGAGGA GCTGAAAGTG GAGCTGAAAA GAGAGCTGAA GGAAGCATCA GACAACCTACA TCGCGCAACT
201 GAAAATGGTG GATGCAATAC AACGATTAGG CATTGACTAT CTTTTTGTGG AAGATGTTGA TGAAGCTTTG AAGAATCTGT TTGAAATGTT TGATGCTTTT
301 TGCAAGAATA ATCATGACAT GCACGCCACT GCTCTCAGCT TTCGCCTTCT AAGACAACAT GGCTATAGAG TTTCATGTGA AGTTTTTGAA AAGTTTAAGG
401 ATGGCAAAGA TGGATTTAAG GTTCCAATG AGGATGGAGC GGTGTCAGTC CTTGAATTCT TCGAAGCCAC GCATCTCAGA GTCCATGGAG AAGACGCTCT
501 TGATAATGCT TTTGACTTCA CTAGGAACCTA CTTGGAATCA GTCTATGCAA CTTTGAACGA TCCAACCGCG AATCAAGTCC ACAACGCATT GAATGAGTTT
601 TCTTTTCGAA GAGGATTGCG ACGCGTGGAA GCAAGGAAGT ACATATCAAT CTACGAGCAA TACGCATCTC ATCACAAGG CTTGCTCAAA CTTGCTAAGC
701 TGGATTTCAA CTTGGTACAA GCTTTGCACA GAAGGGAGCT GAGTGAAGAT TCTAGGTGGT GGAAGACTTT ACAAGTGCCC ACAGAGCTAT CATTGTTAG
801 AGATCGATTG GTGGAGTCTC ACTTTTGGGC TTCGGGATCT TATTTTGAAC CGAATTATTC GGTAGCTAGG ATGATTTTAG CAAAAGGGCT GGCTGTATTA
901 TCTCTTATGG ACGATGTGTA TGATGCATAT GGTACTTTTG AGGAATTACA AGTGTTCACA GATGCAATCG AAAGTGGGA TGCTTCGTGT TTAGATAAAC
1001 TTCCAGAGTA CATGAAATA GTATACAAGG CCCTTTTGGG TGTGTTTGG GAAGTTGAGC AGGAGTTGAT CAAGCTAGGT GCACCATATC GAGCTACTA
1101 TGGAAAAGAA GCCATGAAAT ATGCCGCTAG AGCTTACATG GAAGAGGCCV AATGGAGGGA GCAAAAAGCAC AAACCCACAA CTAAGGAGTA TATGAAGCTG
1201 GCAACCAAGA CCTGTGGCTA TATAACTCTA ATAATATTAT CATGCTTTGG AGTGGAAAGG GGCATTGTGA CTAAGAAGC CTTGCTGTTG GTTCTCTCC
1301 GACCTCCTTT CGTCGAGGCT ACGTTAATCA TTGCTAGGCT CATCAATGAT ATTACAGGAT GCGAGTTTGA GAACAAACGA GAGCAGGTTT GCACCTGAGT
1401 AGAATGCTAC ATGGAAAGAG ACAAAAGTGGG AAAGCAAGAG GTGGTGCTGT AATTCTACAA CCAAAATGGAG TCAGCATGGA AGGACATTA TGAAGGGCTT
1501 CTCAGACCAG TTGAATTTCC AATCCCTCTA CTTTATCTTA TTCTCAATTC AGTCCGAACA CTTGAGGTTA TTTACAAAGA GGGCGATTCC TATACACACG
1601 TGGGCTCTGC AATGCAAAAC ATCATCAAGC AGTTGTACCT TCACCTGTTC CCATATTA

```

(4) Patchoulolsynthase Protein (Isoenzym), GenBank AHL24448 [183], Länge = 552 AS

```

1 MELYAQSVGV GAASRPLANF HQCVWGDKFI VYNPQSSQAG EREQAEELKV ELKRELKEAS DNYMRQLKMW DAIQRLGIDY LFVEDVDEAL KNLFEMFDFAF
101 KNNHDMHAT ALSFRLLRQH GYRVSCEVFE KFKDGDGDFK VPNEGAVAV LEFFFEATHLR VHGEDVLDNA FVFTRNYLES VYATLNDPTA NQVHNLNEF
201 SFRRGLPRVE ARKYISIEYQ YASHHKGLLK LAKLDFNLVQ ALHRRLESED SRWVKTLQVP TELSFVRDRL VESYFWASGS YFEPNYSVAR MILAKGLAVL

```

301 SLMDVYDAY GTFEELQVFT DAIERWDASC LDKLPEYMKI VYKALLDVFE EVDEEVIKLG APYRVVYKGE AMKYAARAYM EEAQWREQKH KPTTKEYMKL
 401 ATKTCGYITL ILSFLGVEE GIVTKEAFDW VFSRPPFVEA TLIARLINDITGCFENKR EHVRTAVECY MEEHKVKGQE VVESEFYNQME SAWKDINECL
 501 LRPAEFPIPL LNLILNSVRT LEVIYKEGDS YTHVGPAMQN IIKQLYHPV PY

(5) Sequenzierung ROI pET-16b::PTSi, Länge = 1792 Bp

1 TAGAATAATT TTGTTTAACT TTAAGAAGGA GATATAACCATGGGCATCATCATCATCATCA TCACAGCAGC GGCCATATCG AAGGTCGTGA
 101 GTTGTATGCC CAAAGTGTGG GAGTGGGTGC TGCCTCTCGT CCTCTTCCGA ATTTTCATCA ATGTGTGTGG GGAGACAAAT TCATTGTGTA CAACCCACAA
 201 TCAAGCCAGG CTGGAGAGAG AGAACAGGCT GAGGAGCTGA AAGTGGAGCT GAAAAGAGAG CTGAAGGAGG CATCAGACAA CTACATGCGG CAACTGAAAA
 301 TGGTGGATGC AATAACAACGA TTAGGCATTG ACTATCTTTT TGTGGAAGAT GTTGATGAAG CTTTGAAGAA TCTGTTTGAA ATGTTTGTATG CTTTCTGCAA
 401 GAATAATCAT GACATGCACG CCACGTCTCT CAGCTTTCGC CTCTTAAGAC AACATGGCTA TAGAGTTTCA TGTGAAGTTT TTGAAAAGTT TAAGATGGC
 501 AAAGATGGAT TTAAGGTTC AATAGGAGAT GGAGCGGTG CAGTCTTGA ATTCCTCGAA GCCACGCATC TCAGAGTCCA TGGAGAAGAC GTCCTTGATA
 601 ATGCTTTTGA CTTCACTAGG AACTACTTGG AATCAGTCTA TGCAACTTTG AACGATCCAA CCGGAATCA AGTCCACAAC GCATTGAATG AGTCTCTTT
 701 TCGAAGAGGA TTGCCACGCG TGAAGCAAG GAAGTACATA TCAATCTACG AGCAATACGC ATCTCATCAC AAAGGCTTGC TCAAACTTGC TAAGCTGGAT
 801 TTAACTTGG TACAAGCTTT GCACAGAAGG GAGCTGAGTG AAGATTCTAG GTGGTGGAG ACTTTTACAAG TGCCACAGA GCTATCATTG GTTAGAGATC
 901 GATTGGTGGG GTCCTACTTT TGCGCTTCGG GATCTTATTT CGAACCGAAT TATTCGGTAG CTAGGATGAT TTTAGCAAAA GGGCTGGCTG TATTATCTCT
 1001 TATGGACGAT GTGTATGATG CATATGTGATC TTTTGAGGAA TTACAAGTGT TCACAGATGC AATCGAAAGG TGGATGCTT CGTGTTTAGA TAACTTCCA
 1101 GAGTACATGA AAATAGTATA CAAGGCCCTT TTGGATGTGT TTGGAAGGAT TGACGAGGAG GTGATCAAGC TAGGTGCACC ATATCGAGTC TACTATGGAA
 1201 AAGAAGCCAT GAAATGATCC GCTAGAGCTT ACATGGAAGA GGCCCAATGG AGGAGCAAAA AGCACAACAA CACAATAAG GAGTATATGA AGCTGGCAAC
 1301 AAAGACCTGT GGCTATATAA CTCTAATAAT ATTATCATT TTGAGGATGG AAGAGGGCAT TGTACTAAA GAAGCCTTCG ATTTGGTTTT CTCCGACCT
 1401 CCTTTCGTGC AGGCTACGTT AATCATTGCT AGGCTCATCA ATGATATTAC AGGATGCGAG TTTGAGAACA AACGAGAGCA CGTTCGCACT CGAGTAGAAT
 1501 GATTGAGTGA AGAGCACAAA GTGGGAAGAC AAGAGGTTGT GTCGAATTAC ATCAACCAAAA TGGAGTCAGC ATAAATGAGT ATAACTGATG AGCTCCTCAG
 1601 ACCAGCTGAA TTTCACATCC CTCTACTTAA TCTTATTCTC AATTCGTGCC GAACACTTGA GGTATTATAC AAAGAGGGCG ATTCCTATAC ACACGTGGGT
 1701 CCTGCAATGC AAAACATCAT CAAGCAGTTG TACCTTACC CTGTCCATA TAAACATATG CTCGAGGATC CGGCTGCTAA CAAAGCCCGA AA

(6) Sequenzierung ROI pET-16b::PTSi (codon-optimiert), Länge = 1774 Bp

1 AATTTTGTGT AACTTTAAGA AGGAGATATA CCATGGCCATCATCATCATCATCATCATCACAG CAGCGGCCAT ATCGAAGGCTG GAACCTGTA
 101 TGCGCAGTCT GTTGGTGTGG GTGCTGCATC GCGTCCGCTG GCGAATTTTC ACCAGTGTGT GTGGGGAGAC AAGTTTTATCG TCTATAACCC CGAGCTGTCT
 201 CAGCGGGGAG ACCTGAACGA AGCGGAAGAG CTGAAAGTTG AACTGAAACG CAAAGCTGAG GAAGCTAGCG ATAACATATG CCGCTCAGCTG AAAATGGTGG
 301 ACGCCATTCA GCGTCTGGGC ATCGATTACC TGTTTGTGGA AGATGTTGAT GAGGCGCTGA AGAACCTGTT CGAAATGTTT GATGCTTTTT GCAAAAACAA
 401 CCATGACATG CACGCCACC GCGTGCAGCT CCGTCTGCTG CGTCAAGCAG GCTACCCTGT ATCCTGCGAA GTATTGAAA AGTTCAAAGA TGGTAAAGAT
 501 GCGTGTAAAG TCCCAACCGA AGACGGCGCC GTTGTCTGTT TGGAGTCTT TGGAGCTACT CATCTGCGTG TGCACGDTGA AGATGTACTG GATAACGCTT
 601 TCGTGTTCAC CCGTAACTAC CTGAGAGTCG TATACGCAAC CCTGAACGAC CCGACCGCGA ACCAGGTCGA CAACGCACTG AACGAATCA GCTTCCGTGC
 701 CCGTCTGCCG CCGCTCGAAG CCCGTAAGTA CATCTCCATT TATGAACAGT ACGCCAGTCA CCACAAAGGC CTCTCAAAC TGCTAAACT GGACTTAAAT
 801 CTGCTGCACG CACTGCACCG TCGTGAAGCT TCTGAAGACA GTCTGGTGGT GAAAACTCTA CAGGTTTCTA CCGAGCTCTC TTTTGTGCTG GATCGCTGG
 901 TGGAAAGCTA CTTCTGGGCA TCAGGTTCTT ACTTCGAACC GAACTATAGC GTTGGCGCGA TGATTCGCGC AAAAGGCTCG GCGGCTCTGT CCTGATGGA
 1001 TGACGTTTAT GATGCGTACG GTACTTTCGA AGAGCTGCAG GTATTTACC GCGCAATCGA ACCTTGGGAC GCGAGCTGTC TGGATAAAT GCGGGAATAC
 1101 ATGAAAATCG TGTATAAAG TCTGCTGGAT GTGTTTGAAG AAGTGGACGA GAAAGTTTAT AACTTGGGCG CCCCATATCG CCGTCACTG GGTAAAGAGG
 1201 CGATGAAATA CCGTCCGCGC GCTTACATGG AAGAAGCGCA GTGGCGTGAA CAGAAACACA AACCCAGCAC CAAAGAATAC ATGAAACTGG CACCACAAAC
 1301 CTGCGGCTAT ATCACGCTTA TCATCTGTCT TTTCTGGGT GTTGAAGGAG GTATCTGTAC AAAAGAGGCT TTTGATTGGG TTTTCTCCCG CCCGCGTTC
 1401 GTTGAGGCTCA ACCCTATTAT CCGCGCCCTC ATTAACGACA TCACTGGCTG TGAATTTGAA AACAAACGTTG AACACGTTTC TACCTGCTGA TGAACGTACA
 1501 TGGAGGAACA TAAAGTTGGC AAACAGGAAG TAGTGTGAGA ATTTTACAAC CAGATGGAA CTGCGTGAA AGATATCAAC GAATGCTGCG TCGCCCGGC
 1601 GGAGTTTCTC ATCCCGCTG TGAACCTAAT CCTGAACCTC GTACGCACTC TGGAAAGTTT CTATAAGAA GCGCACTCTT ACACATATGT TGGTCCGGCA
 1701 ATGCAGAAACA TCATCAAAACA CACCCAGTGC GTATTAACA TATGCTCGAG GATCCGGCTG CTA

(7) Translation ORF pET-16b::PTSi / pET-16b::PTSi (codon-optimiert), Länge = 571 AS

1 MCHHHHHHHH HSSGHLEGR ELYAQSIVGVA AASRPLANFH QCVWGDKFIV YNPQSSQAGER REQAELKVEL LKRELKEASD NYMRQLKMDV AIQRLGIDYL
 101 FVEDVDEALK NLFEMDFAFK KNNHDMHATA LSFRLRQHG YRVSCEVFEK FKDGKDFKVP PNEDGAVAVL EFFEATHLRV HGEDVLDNAF VFRNRYLESV
 201 YATLNDPTAN QVHNALNEFS FRRGLPRVEA RKYISIEYEQ ASHKGLLKL AKLDFNLVQA LHRRELESDS RWWKTLQVPT ELSFVRDLRV ESYFWSGSYF
 301 FEPNYSVARM ILAKGLAVLS LMDVYDAYG TFEELQVFTD AIERWDASLDF LDKLPEYMKIV IYKALLDVFEV VDEEVIKGLA PYRVVYKGEA MKYAARAYME
 401 EAQWREQKHK PTTKEYMKLA TKTCGYITLI ILSFLGVEEG IVTKEAFDWV FSRPPFVEAT LTIARLINDITGCFENKRE HVRTAVECYM EEHKVKGQEV
 501 VSEFYNQMES AWKDINECLL RPAEFPIPLL NLIILNSVRTL EVIYKEGDSY THVGPAMQNI IKQLYHPV Y

(8) Sequenzierung ROI pET-17b::PTSi, Länge = 1747 Bp

1 AAGGAGATAT ACATATGGCT AGCATGACTG GTGGACAGCA AATGGGTCGG GATTCAAGCT TGGTACCTAT GGAGTTGTAT GCCCAAAGTG TTTGAGTGGG
 101 TGCTGCCTCT CGTCCTCTTG CGAATTTTCA TCAATGTGTG TGGGGAGACA AATTCATTGT GTACAAACCA CAATCAAGCG AGCTGAGAGA GAGGAACAG
 201 CAGTGGGAGG TGAAGTGGGA GCTGAAAGA GAGCTGAAGG AAGCATCAGA ACCATACATG CCGCAACTGA AAATGGTGGG AACATACAAA CATATAGGCA
 301 TTGACTATCT TTTTGTGGAA GATGTTGATG AAGCTTTGAA GAATCTGTTT GAAATGTTTG ATGCTTTCTG CAAGAATAAT CATGACATGC ACGCCACTGC
 401 TCTCAGCTTT CGCTTCTTAA GACAACATGG CTATAGAGTT TCATGTGAAG TTTTGAAGAA GTTTAAGGAT GGCAAGAGTG GATTTAAGGT TCCAAATGAG
 501 GATGGAGCGG TTGCAGTCTT TGAATCTTCT GAAGCCACGC ATCTCAGAGT ACCATATCGA GACGTCTTGT ATAATGCTTT TGTCTCACT AGCAACTACT
 601 TGGAAATCAGT CTATGCAACT TTGAACGATC CAACCCGAA TCAAGTCCAC AACGCATTGA ATGAGTTTCT TTTTCAAGA GGATTTGCCAC GCGTGGAAAG
 701 AAGGAAGTCA ATATCAATCT ACGAGCAATA CGCATCTCAT CACAAGGCTG TGCTCAAAC TGCTAAGCTG GATTTCAACT TGGTACAAGC TTTGACAGAA
 801 AGGAGACTGA GTGAAGATTC TAGGTGTTGG AAGACTTTAC AAGTGGCCAC AGAGCTATCA TTCGTTAGAG ATCAGTTGGT ATCGATTGGT TTTGGGCTCT
 901 CGGGATCTTA TTTGCAACCG AATTATTCCG TAGCTAGGAT GATTTTAGCA AAAGGGCTGG CTGTATTATC TCTTATGGAC GATGTGTATG ATGCATATGG
 1001 TACTTTTGGG GAATTACAAG GTTTCACAGA TGAATTCGAA AGGTGGGATG CTTCGTGTTT AGATAAACTT CCAGAGTACA TGAATAAGT ATACAAGGCC
 1101 CTTTTGGATG TGTTTGGAGG AGTTGACGAG GAGGTGATCA AGCTAGGTGC ACCATATCGA GTCTACTATG GAAAAGAAGC CATGAAATAT GCCCTAGAG
 1201 CTTACATGGA AGAGGCCCAA TGGAGGGAGC AAAAGCACAA ACCCAACT AAGGAGTATA TGAAGCTGGC AACAAAGACC TGTGGCTATA TAACCTAAT
 1301 AATATTATCA TTTCTTGGAG TGAAGAGGGC CATTGTGACT AAAGAAGCCT TCGATTGGGT TTTCTCCGCA CCTCCTTTCG TCGAGGCTAC GTTAATCATT
 1401 GCTAGGCTCA TCAATGATAT TACAGGATGC GAGTTTGAAGA ACAAAAGAGA GCACGTTTCG ACCTGAGTAG AATGCTACAT GGAAGAGCAC AAAGTGGGAA
 1501 AGCAAGAGGT GGTGTCTGAA TTCTACAACC AAATGGAGTC AGCATGGAAG GACATAAATG AGTGCTCTCT CAGACCAGCT GAATTTCCAA TCCCTTACT
 1601 TAATCTTATT CCAATTTCTG TCCGAACTCT TGAGGTTATT TACAAAGAGG GCGATTCTTA TACACACGTC GGTCTGCAA TGCAAAACAT CATCAAGCAC
 1701 TTGACTCTTC ACCTGTCTCC ATATTAACACT AGTAAACGCC GCCAGTG

(9) Translation ORF pET-17b::PTSi, Länge = 570 AS

1 MASHTGGQQM GRDSSLVPMPE LYAQSIVGVA ASRPLANFHQ CVWGDKFIV YNPQSSQAGER EQAELKVEL KRELKEASDN YMRQLKMDVA IQRLGIDYLF
 101 VEDVDEALKN LFEMDFAFCK NNNHDMHATAL SFRLLRQHG YRVSCEVFEK FKDGKDFKVP NEDGAVAVLE FFEATHLRVH GEDVLDNAFV FTRNRYLESVY
 201 ATLNDPTANQ VHNALNEFSF RRRGLPRVEAR KYISIEYQYA SHHKGLLKL KLFDFNLVQAL HRRELESDSR WWTALQVPT ELSFVRDLRV SYFWSGSYF
 301 EPNYSVARM I LAKGLAVLS LMDVYDAYG TFEELQVFTD IERWDASLDF LDKLPEYMKIV KALLDVFEV DEEVIKGLAP YRVVYKGEAM KYAARAYME
 401 AQWREQKHK PTTKEYMKLA TKTCGYITLI ILSFLGVEEG IVTKEAFDWV FSRPPFVEAT LTIARLINDITGCFENKRE HVRTAVECYM EEHKVKGQEV
 501 SEFYNQMSA WKDINECLL RPAEFPIPLL NLIILNSVRTL VIYKEGDSY THVGPAMQNI KQLYHPV Y

(10) Sequenzierung ROI pET-32b::PTSi, Länge = 2064 Bp

1 GATACATTA TAGGCGATAA AATATTCAAC CTGACTGACG ACAGTTTGA CACGGATGTA CTCAAAGCGG ACGGGCGCAT CCTCGTCAT TTTGGGCGC
 101 AGTGGTGGCG TCCGTGCAAA ATGATCGCCG CGATTCTGGA TGAATCGCT GACGAAATATC AGGGCAAACT GACCGTTGCA AAATCGAACA TCGATCAAAA
 201 CCTGGCAGT CCGCCGAAA ATGGCATCCG TGGTATCCCG ACTCTGCTGT TGTTCAAAAA CGGTGAAAGT GCGGCAACCA AAGTGGGTGC ACTGTCTAAA
 301 GGTCAAGTGA AAGAGTTCTT CGACGCTAAC CTGGCCGGTT CTGTTTCTGG CACTATGCAC CATCATCATC ATCATTTCTT TGGTGAAGAT CTTTATTTTC

401 **AGGGA**GAGTT GTATGCCCAA AGTGTGGAG TGGGTGCTGC CTCTCGCTCT CTTGCGAATT TTCATCAATG TGTGTGGGGA GACAAATTC TGTGTACAA
 501 CCCACAATCA AGCCAGGCTG GAGAGAGAGA ACAGGCTGAG GAGCTGAAG TGGAGCTGAA AAGAGAGCTG AAGGAAGCAT CAGCAACTA CATGCGGCAA
 601 CTGAAAATGG TGGATGCAAT ACAACGATTA GGCATTGACT ATCTTTTTGT GGAAGATGTT GATGAAGCTT TGAAGAATCT GTTTGAAATG TTTGATGCTT
 701 TCTGCAAGAA TAATCATGAC ATGCACGCCA CTGCTCTCAG CTTTTCGCTT CTAAGACAAC ATGGCTATAG AGTTTTCATGT GAAGTTTTTG AAAAGTTTAA
 801 GGATGGCAA AGTTGGATTA AGGTTCCAAA TGAGGATGGA GCGGTTGAGC CTCTTGAATT CTTGCAAGCC ACGCATCTCA GAGTCCATGG AGAAGACGTC
 901 CTTGATAATG CTTTGTCTT CACTAGGAAC TACTTGGAA CAGTCTATGC AACTTTGAAC GATCCAACCG CGAATCAAGT CCACAACGCA TTGAATGAGT
 1001 TCTCTTTTTG AAGAGGATTG CCACCGCTGG AAGCAAGGAA GTACATATCA ATCTACGAGC AATACGCATC TCATCACAAA GGCTTGCTCA AACTTGCTAA
 1101 GCTGGATTTT AACTTTGGTA AGCTTTGCA CAGAAGGGAG CTGAGTGAAG ATTTTAGGTTG GTGGGAAGCT TTACAAGTGC CCACAGAGCT ATCATCTGTT
 1201 AGAGATCGAT TGGTGGAGTC CTACTTTTGG GCTTCGGGAT CTTATTTTGA ACCGAATTAT TCGGTAGCTA GGATGATTTT AGCAAAAGGG CTGGCTGTAT
 1301 TATCTCTTAT GGACGATGTG TATGATGCAAT ATGGTACTTT TGAGGAATTA CAAGTGTTC CAGATGCAAT CGAAAGGTTG GATGCTTCTG GTTTAGATAA
 1401 ACTTCCAGAG TACATGAAAA TAGATACAAA GGCCCTTTTG GATTGTGTTG AGGAAGTTGA CAGAGGAGTG ATCAAGCTAG GTGCAACGAT TCGAGCTTAC
 1501 TATGAAAAG AAGCCATGAA ATATGCCCTG AGAGCTTACA TGGAAAGGCG CCAATGGAGG GAGCAAAAGC ACAAACCCAC AACTAAGGAG TATATGAAGC
 1601 TGGCAACAAA GACCTGTGGC TATAAATCT TAATAATATT ATCATTTCTT GGAGTGGAA GGGCATTTG GACTAAAGAA GCCTTCGATT GGGTTTTCTC
 1701 CCGAGCTCTT TTCGTGAGG CTACGTTAAT CTACCTAAGT ATATTACAGG ATGCGAGTTT GAGAACAAC GAGAGCACGT TCGCACTGCA
 1801 GTAGAATGCT ACATGGAAGA GCACAAAGT GGAAGCAAG AGGTGGTGTG TGAATTCTAC AACCAATGG AGTCAGCATG GAAGGCATA AATGAGTGCC
 1901 TCTCAGACC AGCTGAATTT CCAATCCCTC TACTTAATCT TATTCTCAAT TCTGTCGAA CACTTGAGGT TATTACAAA GAGGCGGATT CCTATACAA
 2001 CGTGGTCTT GCAATGCAAA ACATCATCAA GCAAGTTGAT CTTCAACCTG TTCCATAT **TA** **AG**AT

(11) Translation ORF pET-32b::PTSi, Länge = 683 AS

1 **MSDKIIHLT** **DSFD****DTVLKA** **DGAILVDFWA** **ENCGPCKMIA** **PILDEIADEY** **QKLTVAKLN** **IDQNPGTAPK** **YGIRGPTPL** **LFKNGEVAAT** **KVGALSKGQL**
 101 **KEFLDANLAG** **SGSGHMHHHH** **HHSSGENLYF** **QGLYAQSVG** **VGAASRPLAN** **FHQCVWGDKF** **IVYNPQSSQA** **GEREQAEELK** **VELKRELKEA** **SDNYMRQLKM**
 201 **VDAIQRLGID** **YLFVEDVDEA** **LKLN****FEMFDA** **FKNNHDMHA** **TALSRLLRQ** **HGYRVSCFV** **EKFKDKDGF** **KVPNEDGAVA** **VLEFFEATHL** **RVHGEDVDLN**
 301 **AFVFRNRYLE** **SVYATLNDPT** **ANQVHNALNE** **FSFRRGLPRV** **EARKYISIYE** **QYASHHKGLL** **KLAKLDFNLV** **QALHRRLESE** **DSRWKTLQV** **PTELSFVRDR**
 401 **LYESYFWASG** **SYFEPNYSVA** **RMLLAKLAV** **LSLMDDVYDA** **YGFTEIYSL** **TDAIERWDAS** **CLDKLPEYMK** **IVYKALLDFV** **EEVDEEVIK** **GAPYRVYYGK**
 501 **EAMKYAARAY** **MEEAQWREQK** **HKPTTKKEYMK** **LATKTCGYIT** **LILSLFLGVE** **EGIVTKEAFD** **WVFSRPPFVE** **ATLIARL** **DLTGC** **FENK** **REHVRTAVEC**
 601 **YMEEHKVGKQ** **EVVSEFYNQM** **ESAWKDINEC** **LLRPAEFPPI** **LLNLILNSVR** **TLEVIYKEGD** **SYTHVGPAMQ** **NIKQLYLHP** **VPY**

Fusionsprotein = **Thioredoxin**(12) α -Humulonsynthase cDNA, GenBank AB247331 [86], Länge = 1647 Bp

1 **ATGGAGAGGC** **AGTCGATGCG** **CCTTGTGGT** **GATAAGGAAG** **AGATAATCCG** **TAAGTCATT** **GAATATCACC** **CTACTGTTTG** **GGGTGACTAT** **TTCATCCGGGA**
 101 **ACTACTCTTG** **TTTGCCCTC** **GAAAAGGAGT** **GCATGATAAA** **GAGGGTGGAA** **GAGTAAAAG** **ATCGAGTGAG** **AAACCTATTC** **GAGGAAACAC** **ATGACGTATT**
 201 **GCAAATATG** **ATTTTGGTTG** **ATTCGATTTA** **ACTCTTTGGA** **TGGGATTATC** **ATTTTGGAGA** **AGAAAATACT** **CGGCCACTAA** **GATTGATTTA** **CGAGGCTGAT**
 301 **GTTGAGAAAT** **ATGGGCTTTA** **TGAAGTTTCC** **TGAAGTATTA** **AGCAACATGGA** **TATAATTTGT** **CTCCAGATGT** **TTTCAACAAG** **TTCAAGATG**
 401 **ATAAGGGCAG** **ATTTTTGCCG** **ACCTTGAATG** **GAGATGCAAA** **GGGACTACTA** **AACTTATACA** **ATGCGGCTTA** **TCTTGAACA** **CATGAAGAGA** **CTATACTCGA**
 501 **CGAAGCTATT** **TCTTTTACAA** **AGTGCCAAC** **TGAATCTTTG** **TTGGGTGAAC** **TTGAGCAGCC** **TTTAGCAATA** **GAGGTGCTC** **TTTTCTTGA** **AACACCACTA**
 601 **TATCGAAGAA** **CTCGAAGATA** **AAATATATAC** **CTATTTTATG** **AGAGAAGAGT** **ATAGCAAGT** **ATAGCAAGT** **ATACTATATT** **AGAAGCTTGA** **AACTTGGATT**
 701 **TCAATCTACT** **ACAATCTCTC** **CATCAAGAGG** **AAGTGAAGAA** **AATTACAATA** **TGGTGAATG** **ATTTAGCACT** **GACTAAATCT** **TAAAAATTTG** **CTCGTGACCG**
 801 **AGTAGTGGAA** **TGTTATTTAT** **GGATAGTTGC** **GGTGTATTTT** **GAACCTCAAT** **ATTTCTGAGC** **ACGAGTAAT** **ACTTCCAAGG** **CCATTTCTCT** **TATGTCGATT**
 901 **ATGGATGACA** **CTCATGATAA** **CTACAGCACA** **TTAGAAAGAA** **TCTAGCACTA** **ATCTGAGGCA** **TATCGAAAGT** **GGGAACCCCA** **AGCAGTTGAT** **TGTGTACCAG**
 1001 **AATACTTAAA** **AGACTTTTAT** **CTCAAGCTAT** **TAAAGACTTA** **CAAAGATTTT** **GAAGATGAAC** **TAGAACCACA** **TGAAAAGTAT** **CGCATAACAT** **ATCTTCAAGA**
 1101 **GGAAATAAAA** **GTTCATACAA** **GAGCTTATTT** **CAAAGAAGCT** **AAATGGGGTG** **TGAAAAGATA** **TGTACCAGCA** **CTCGAGGAGC** **ATCTTCTTGT** **TTCAATGATA**
 1201 **ACAGCCGGGT** **ATTTTTGCGT** **TGATGATGCA** **TCTTACGTAG** **TCTTACGTAG** **ATAGCAACA** **AAAGAGACAT** **TTGAATGGGT** **TGCTAGTTCC** **CCTAAGATCC**
 1301 **TAAATCCTG** **CAGTATACAT** **TGTAGACTTA** **TGGATGATAT** **AACTTCACAC** **CAGCGGGAAC** **AAGAAAGAGA** **CCATTTGCGT** **TCAACAGTTG** **AGAGTTACAT**
 1401 **GAAAGAGCAT** **GGTACAAGTG** **CAAAAGTGGC** **TTGCGAAGAG** **TTGCAAGTGA** **TGGTGGAGCA** **AAAATGGAAG** **GATTTGAACG** **AGGAATGCC** **ACGTCCAACA**
 1501 **CAAGTAGCTC** **GGCCTTTAAT** **TGAAATAATA** **TTGAACCTCT** **CAAGGCTACA** **GGAAGACATA** **TACAAGCACA** **AAGATACTTA** **TACTAATTTCT** **AACACTAGGA**
 1601 **TGAAAGACAA** **TGCTCTCTC** **ATATTTGTTG** **AATCCTTCT** **TATT** **TA**

(13) Sequenzierung ROI pET-16b::HUM (codon-optimiert), Länge = 1748 Bp

1 **ACTTTAAGAA** **GGAGATATAC** **CATGGGCAT** **CATCATCATG** **ATCATCATCA** **TCATCAAC** **AGC** **AGCGGCCATA** **TCGAAGGTGC** **TGAGCGACAA** **TCGATGGCGC**
 101 **TGGTGGGAGA** **TAAAGAGGAA** **ATCATCCGCA** **AATCCTTTGA** **GTACCACCCG** **ACCGTGTGGG** **GTGATTATT** **CATCCGTAAT** **TACAGTTGCC** **TGCCGCTCGA**
 201 **AAAGGAGTGT** **ATGATTAAGC** **GGTGGGAAGA** **ACTGAAGGAC** **CGTGTCCGCA** **ATCTGTTTCA** **GGAAACCCAC** **GAGCTTCTGC** **AGATCATGAT** **TTTGGTTGAC**
 301 **TCCATTCAAT** **TATTAGGGTT** **AGATTATCAC** **TTTGAGAAAG** **AAATTACCGC** **AGCGCTTCTG** **CTGATTTATG** **AGGCGGATGT** **GGAGAATTAT** **GGACTGTATG**
 401 **AGGTGTGCT** **CGCATCCCG** **CTGCTGCGCC** **AACATGGCTA** **CAACTGTCTC** **CCTGATGAT** **TAAATAAAT** **TAAAGATGAC** **AAAGGTGCT** **TTCTGCCAC**
 501 **GCTGAACGGC** **GATGCGAAG** **GGCTGCTGAA** **TCTGTACAAT** **GCGGCGTACC** **TCGGTACGCA** **CGAGGAAAT** **ATCCTTGATG** **AAGCGATTTC** **GTTACAGAAA**
 601 **TGCCAGTTAG** **AATCCCTGCT** **GGGGAACTG** **GAACAGCCGC** **TGGCGATCGA** **GGTGTCTGCT** **TTCTTGGAAA** **CGCCATTGTA** **CGCACGTACG** **CGTGGTTGT**
 701 **TGGTGGCCAA** **ATACATTCGG** **ATTTATCAAG** **AGAAAGTTAT** **GAGGAACGAT** **ACGATTTTGG** **AACTTGCAAA** **ATTGATTTTC** **AATCTCTAC** **AGAGTCTTCA**
 801 **CCAGGAAGAA** **GTCAAAAAA** **TCACCATCTG** **GTGGAACGAT** **CTGGCGCTGA** **CGAAGTCTCT** **CAAATTTGCG** **CGTGATCGTG** **TGGTGGAGTG** **TTATTATTGG**
 901 **ATCGTTGCA** **TGTATTTTCA** **ACCTCAGTAT** **TCACGCGCTC** **GTGCTATTAC** **TAGCAAAAGC** **ATCAGTCTGA** **TGTCATTAT** **GGATGACATT** **TATGACAAAT**
 1001 **ACTCGACTCT** **GGAAAGATCA** **CGCTGCTGA** **CCGAGGCTAT** **CGAGCGGTGG** **GAACCGCAGG** **CGGTGACTG** **TGTTCCCGAA** **TATCTGAAAG** **ATTTTTATTT**
 1101 **AAAACCTGCT** **AAAACGTACA** **AAGATTTTGA** **AGACGAATTG** **GAGCCGAACG** **AAAAATATCG** **CATCCATAT** **CTGCAAGGAA** **AGATAAAAGT** **ATTATCTCGT**
 1201 **GCATATTTTC** **AGGAGGCAAA** **GTGGGGCGTC** **GAACGCTACG** **TCCCGGCCCT** **GGAAGAGCAC** **CTGCTAGTGT** **CTCTTATCAC** **GGCGGGTAC** **TTCGCACTCG**
 1301 **CTTGGCCTC** **GTACGTGGGT** **TTGGGTGAAG** **ATGCAACCAA** **AGAAACCTTT** **GAATGGGTGG** **CTTGGAGCCC** **GAAAATCTTA** **AAAAGCTGCT** **CGATCCATTG**
 1401 **CCGCTTGATG** **GATGATATCA** **CTGCGCATCA** **ACGGGAACAG** **GAGCGCGATC** **ATTTTGCATC** **GACCGTGGAA** **TCGTACATGA** **AGGAACACGG** **TACCTCAGCA**
 1501 **AAAGTGGCTT** **GTGAGAACT** **TCAGGTCATG** **GTGAGAACAA** **AATGGAAAGA** **TCTCAACGAA** **GAGTGTTTAA** **GACCACCCCA** **GGTAGCACGT** **CCTTTGATTT**
 1601 **AAATTATCCT** **GAACCTGTCT** **CGTGCTATGG** **AAGACATTTA** **CAACACAAAA** **GATACCTACA** **CCAATTCTAA** **CACCCGCATG** **AAAGATAATG** **TGTCGCTGAT**
 1701 **CTTTGTGGAA** **TCTTTCTTGA** **TC** **TA** **CATAT** **GCTCGAGGAT** **CCGGCTGC**

(14) Translation ORF pET-16b::HUM (codon-optimiert), Länge = 567 AS

1 **MGHHHHHHH** **HHSSGHTEGR** **ERQSMALVGD** **KEEIIRKSF** **YHPTVWGDYF** **IRNYSCLPLE** **KECMIKRVEE** **LKDRVRNLF** **ETHDVLQIMI** **LVDSIQLLGL**
 101 **DYHFEKEITA** **ALRLIYADV** **ENYGLYEVSL** **RFRLRLRHGY** **NLSPDVFNFK** **KDDKGRFLPT** **LNGDAKGLLN** **LYNAAYLGT** **EETILDEAIS** **FTKQLESLL**
 201 **GELEQPLAIE** **VSLFLETPLY** **RRTRRLVRK** **YIPIYQEKVM** **RNDTILELAK** **LDFNLLQSLH** **QEEVKITIW** **WDLALTKSL** **KFARDRVVEE** **YYIVAVVFE**
 301 **PQYSRARVIT** **SKAISLSMSI** **DDIYN** **NYSTL** **EESRLLTEAI** **ERWEPQAVDC** **VPEYLKDFYL** **KLLKTYKDFE** **DELEPNEKYR** **IPYLQEEIKV** **LSRAYFQEA**
 401 **WVERYVPAL** **EEHLLVSLIT** **AGYFAVACAS** **YVGLGEDATK** **ETFEWVASSP** **KILKSCSIHC** **RLMDDITSHQ** **RE** **QERDHFAS** **TVESYMKHEG** **TSKAVACEKL**
 501 **QVMVEQKWKD** **NLEERLNRPTQ** **VARPLIEIIL** **NLSRAMEDIY** **KHKDPTYNNS** **TRMKDNVSLI** **FVESFLI**

(15) Zizaensynthese cDNA, GenBank HI931360, Sequenz 2 aus Patent WO2010134004 [250], Länge = 1668 Bp

1 ATGGCGACCA CTGCGCGCTT CTGCCTCACC ACCACTCCGA TCGGGGAGCC AGTCTGTGCG CGCAGTACC TCCCAACCGT CTGGGGCAGC TTCTTCCTCA
 101 CCTACCAGCC ATGCACGCCG GAAGAGGTCC AGTCCATGGA GGAGAGGGCT CTGGCCAAGA AGACGGAGGT GGGGCGCATG TTGCAGGAGG TCGCCGCCCTC
 201 CAGTAACCTC GCACGGGAAG TGGGCCCTTT CGATGAGCTA GAGCGGGCTCG GCGGTGGACTA TCATACAAAG ACGGAGATCA ACGACTTGCT GGGTGGCATT
 301 TAATAATGGCA AGGACGACGA TAATGGAGGT TCTGATGACG ACCTCTATAT CATATCGCTT AAGTTCCTAT TGCTCAGGAA AGCACGGTAC GCTTTTACTCT
 401 CAGATGTGTT TCTGAAGTTC AGAGATGAGC AAGAAATAT TCAAGTGTAT GATGTGAAAT GCCTGATCAT GTTGTATGAT GCCTCACATT TGAGGATTCA
 501 TGAGGAGAAA ATTTCTTGACA ACATCAACAG TTTCCACCAAG AGCTGCCTCC AATCAGTTTT AGAAAACAAAT TTGGAACCCGG CTCTCCAGA GGGAGTGGCG
 601 TGACACATTGG AGACACTCTCG ATTCAGAAGG GTTGAGAGAAA TCGAAGCGAA ACCTTTTATC TCAGCGTACG AAAAGAACAT AGCACGGTAC GACGCCCTAC
 701 TAGAGTTTGC AAGGCTGGAC TACAATATCG TGCAAAATCT CTAAGTCAAG GAGCTGAAAG AACCTACAGT ATGGTGAAG GAGTTCATT CACGGACAAA
 801 TCTGACATTT GCACGAGATA GAATTTGTGA GATGATATTC TGGGTCTATG CAATTTATTA CGAGCCCTGT TACTCGTATT CACGGATATG GGTTCACAAA
 901 ATGTTTTCTAT CCGTGGCATT GTTGGATGAC ATCTATGACA ATTATACGAG CACAGAGGAG AGCAATATCT TTACTACGGC GATGGAAGG TGGGATGTGA
 1001 AGGCCACCGA ACAACTGCCA GCAAACTAGA GGACATTCTA CGATTACTTA ATTTGTACAA CAGATGAGGT CGTAGAAGAA TTGAAACTTC AGAATAATAA
 1101 GAATGCTGAA TTAGTCAAGA AAGTGTCTGAT TGACGCCGCT AAATGCTACC ATTCGGAGGT CAAATGGCGT GATGACCATT ACTGCTCTAA TGATGTTGGA
 1201 GAGCACTGC AGCTTTCAAT GCGAAGCATT GCGAGTATCG ACTCCATCAA TTTGTCTTCT ATTTCACTGG GAGCTGTGTG TACTACGGG GCGGTTGAGT
 1301 GTGCTTTTAC TTATCCAAAA ATTATTAGAG GTATATGTGT TCACGCCAGT ATTAGTAAAG ATATCGCGTC ACATGAGCGA GAACAAGCTT CCGAGCATAT
 1401 GGCATCAAGC TTGCAAACTT GCATGAAGCA GTATGGGATT ACAGTAGAAG AAGCTGCTGA AAAGCTCAGA GTAATAAAGC AGGAGTCTAT GATGGACATC
 1501 GTTGAGGAAT GCCTTTATTA GGACCAAGTAT CCCCCTGGCG TTTCCGAGAG GGTGGTGGCT TTTGCACAAAT CAATATGTTT CATGTACAAT GGTGTAGATA
 1601 AATACACCAT ACCATCAAAA CTCAAGGACA GTCTAGACTC ATTTGACGTC AATTGATTCC CAGTTTGA

(16) Zizaensynthese cDNA (codon-optimiert), GenBank KP21534 [251], Länge = 1668 Bp

1 ATGGCAACCA CTGCTGCGTT TTGCTTAACA ACTACGCCAA TTGGGGAGCC GGTGTGCAGA CGTCAATATC TGCCGACCGT GTGGGGCAGC TTCTTCCTGA
 101 CGTACCAGCC GTGTACCCCG GAGGAAGTGC AATCGATGGA GGAACGCGCG TTGGCGAAGA AAACCGAAGT TGCCCGCATG CTTCAGGAAG TGGCCGCCAG
 201 TTCTAATTTA GCGCGCAAAC TGGGCTTGGT TGATGAACTG GAACGACTTG GTGTAGATTA CCCTACTAAA ACCGAAATCA ACGATTGTTT AGGAGCCATT
 301 TACAATGGGA AAGACGATGA CAATGGGGGC AGTGTGATG ACCTTTATAT CACTTCACTG AAATTTCTACC TCCTGCGTAA ACACGGATAC GCTCTGTCCA
 401 GCGATGTTTT TTTAAATTTT CCGACACGAC AGGGAAACAT TTCGAGCGAT GATGTCAAAT GCCTGATCAT GCTCTATGAC GCATCGCATC TCGCATCCA
 501 CGAGGAAAAA ATTTTAGACA ATATCAACTC ATTCATAAAA TCCTGTCTGC AGTCTGTACT TGAGACGAAAC CTAGAACCAG CGTTACAGGA AGAGGTGCGT
 601 TGACATTTAG AGACCCGCGC CTTCCGCGCC GTGGAGCGGA ACCTTTATAT CACTTCACTG AAATTTCTACC TCCTGCGTAA ACACGGATAC GCTCTGTCCA
 701 TGGAATTTGC CCGTCTGGAC TACAACATTG TGCAAACTCT CTATTGTAAA GAACTCAAAG AGTTAACAGT ATGGTGGAAA GAGTTCCTACT CCGCACCCAA
 801 TTTAACCTTT GCGCGTGACC GTATCGTGA GATGATATTT TGGGTCTATG CAATTTATAT CACTTCACTG AAATTTCTACC TCCTGCGTAA ACACGGATAC
 901 ATGTTTTTAA GTGTGGCGCT CCTGGATGAT ATCTATGACA ATTATACGAG CACGAGGAG TCCTAATATCT TCACGACTGC CACGAGCGG TGGGAGTGA
 1001 AAGCAACCGA ACAGTGCCTG GCAAACTATG GCACGTTCTA TGAAGTCTTG ATCTGCACCA CCGATGAAAT GGTGGAGGAA CTGAAACTTC AAACAACAA
 1101 AAATGCGGAA CTCGTTAAGA AAGTGTCTGAT TGATGCAGCG AAATGTTACC ACAGCGAAGT TAAATGGCGG GACGATCATT ATGTTCCGAA TGATGTGGGA
 1201 GAGCATCTAG AGCTGTGATG GAGGAGTATC GCGCGGATGC ACAGTATCAA TTTCTGCTCT ATCTCACTGG GAGCAGTTTG CACACGGCAA GCCGTTGAAT
 1301 GTGCATTTAC GTACCCAAAA ATCATTGCGC GGATTTGTGT GCATGCGCGT ATAAAGTAAAG ACATGCTAG CCACGAGCGC GAACAAGCAA GTGAACATAT
 1401 GGCCTCTACC CTGCAGACTC GTATGAAACA ATATGGGATT ACCGTGGAGG AGGCGGCCGA GAAATGGCGC GTGATTAACG AAGAAAGCTG GATGGATATC
 1501 GTGAGGAGT GCCTGTATAA AGATCAAGTAT CCGTGGGCCC TCTCCGAGCG GGTGTGATGT TTTGCACAGT TTTGACAGT TATGTATAAT GCGGTGGATA
 1601 AATACACTAT CCGATCAAAA CTGAAGGACA GCCTTGATG CTTGTATGTA AATCTGATTCC CGGTGGA

(17) (+)-Zizaensynthese Protein, GenBank AJQ30127 [251], Länge = 555 AS

1 MATTAFAFLT TPIGEPVCR RQYLPTVWGS FFLTYQPCTP EEVQSMEEA LAKKTEVGRM LQVEAASNL ARKLGVLDEL ERLGVDYHYK TEINDLLGAI
 101 YNGKDDNNGG SDDLLYITSL KFYLLRKHGY ALSDDVFLK RDEQGNISSD DVKCLIMLYD ASHLRIHEEK ILDNINSFTK SCLQSVLETN LEPALQEEVR
 201 CTLETPRFRV VERIEAKRFI SAYEKNIARD DALLEFARLD YNIVQILYCK ELKELTVWVK EHFHRTNLTFR ARDRIVEMFY WMMAIYEPY YSRSYIIVWTK
 301 MFLSVALLDD IYDNYTSTEE SNIFTTAMER WDVKATEQLP ANMRTFYDYL ICTTDEVVEE LKLQNNKNAE LVKVLIDAA KCYHSEVKWR DDHYVPNDVG
 401 EHLQLSMRSI AMHNSINFV ILSGAVCTRE AVECAFTYPK IIRGICVHAR ISNDIASHERE EQASEHMAST LQTCMKQYGI TVEEAEEKLR VINEESWMDI
 501 VEECLYKDYQ PLALSERVVA FAQISCFMYN GVDKYTIIPSK LKDSLDSLYV NILIPV

(18) Sequenzierung ROI pET-16b::ZIZA (codon-optimiert), Länge = 1776 Bp

1 TTGTTTAACT TTAAGAAGGA GATATACCAT GGGCCATCAT CATCATCATC ATCATCATCA TCACAGCAGC GGCCATATCG AAGTCTGTC AACCACTGCT
 101 GCGTTTGTCT TAAACAATC GCCAATTGGG GAGCCGGTGT CGACAGCTCA ATATCTGCCG ACCGTGTGGG GCAGCTTCTT CCTGACGTAC CACCGCTGTA
 201 CCCCGGAGGA AGTGCAACTC ATGGAGAACG GCGCGTTGGC GAAGAAAACC GCGATGCTTCA GGAAGTGGCC GCCAGTTCTA ATTTAGAGCGA
 301 CAAAGTGGCG TTGGTTGATG AACTGGAAAC ACTTGGTGTA GATTACCACT ACAAAACCGA AATCAACGAT TTGTTAGGAG CCATTTACAA TGGGAAGACG
 401 GATGACAATG GGGGACGTTG TGATGACCTT TATATCACTT CACTGAAATC CTACTCTCCG CTGTAACACG CGTAACACG CTGACGCTCT GTTTTTTAA
 501 AATTTCTCGCA CGAAACAGGA AACATTTCTA GCGATGATGT CAAATGCTGT ATCATGCTCT ATGACGCGATC GCATCTGCGC ATCCAGCAGG AAAAAATTTT
 601 AGACAATATC AACTCATTTA CTAATCCTG TCTGACGTCT GTACTTGAGA CGAACTTAGA ACCAGCGTTA CAGGAAGGAG TGCCTGTGAC ATTAGAGACC
 701 CCGCGCTTCC CCGCGTGGGA GCGGATCGAA GCGAAACGCT TCATTTGAGC CTATGAGAAA AACATTGCAC GCGATGACGC ACTGCTGAAA TTTCCCGCTC
 801 TGGACTACAA CATTGTGCAA ATCTCTTATT GTAAGAACT CAAAGAGTAA ACAGTATGTT GGAAGAGATT CCATCGCGC ACCAATTTAA CCTTTGCGCG
 901 TGACCGTATG GTGAGAGTGT ATTTTTGGGT CATGGCGATT ATCTATGAAC CCGCTACAG CTAAGTGGGT ATTTGGGTGA CCAAGATGTT TTTAAGATG
 1001 GCGCTCTGCT ATGATACCTA TGACAATTAT ACTAGCACCG AGGATGCTAA TATCTTCCAG ACTGCGCATG AGCGGTGGGA CCGCAAAGCA ATCCAGTACG
 1101 TGCCGGCAAA CATGCGCACT TCTATGACT ACTTGATCTG CACCACCGAT GAAAGTGGTG AGGAACTGAA ACTTCAAAAC AAAAAAATG CCGAACTCGT
 1201 TAAGAAAGTG CTGATTTGATG CAGCGAAATG TTACACACAG GAAGTTAAAT GGGGGAGCA TCATTATGTT CCGAATGATG TGGGAGAGCA TTTGACGCTG
 1301 TCGATGAGGA GTATCGGGCG GATGACAGT ATCAATTTCC TCTTATCTC ACTGGGAGCA CTGTTGCACG GCGAAGCGCT TGAATGTGCA CTTGACTACC
 1401 CAAAAATCAT TCGCGGGATT TGTGTGATG CGCGTATAAG TAATGACATT CTAGGCGAGC AGCGCGAACA AGCAAGTGAA CATATGGCCT CTACCTGCA
 1501 GACCTGTATG AAACAATATG GGATTAACCT GGAGGAGGCG CCGCAGAAAT TGCCTGCTGAT TAACGAAGAA AGCTGATGAG ATATCGTGA GGAGTGGCTG
 1601 TATAAAGATC AGTATCCCTG GGCCCTCTCC GAGCGGGTTG TAGCTTTTTG ACAGTCCATT TGCTTTATGT ATAATGGCGT GGATAAATAC ACTATCCCAT
 1701 CAAAACCTGAA GGACAGCCTT GATAGCTTGT ATGTAATCT GATTCCGGTG TGCATATGC TCGAGGATCC GGCTGC

(19) Translation ORF pET-16b::ZIZA (codon-optimiert), Länge = 574 AS

1 MCHHHHHHHH HSSGHIEGR ATTAFLCLTT TPIGEPVCR RQYLPTVWGS FFLTYQPCTP EEVQSMEEA LAKKTEVGRM LQVEAASNL ARKLGVLDEL ERLGVDYHYK TEINDLLGAI
 101 RLGVYHYHYK EINDLLGAIY NGKDDNNGS DDDLYITSLK FLYLLRKHGY LSSDVFLKFR DEQGNISSDD VKCLIMLYDA SHLRIHEEKI LDNINSFTKS
 201 CLQSVLETNL EPALQEEVRC TLETPRFRV ERIEAKRFIS AYEKNIARD ALLEFARLDY NIVQILYCKE LKELTVWVKE FHSRNLTF A RDRIVEMFYW
 301 VMAIYEPYCY SYSRIWVTKM FLSVALLDDI IYDNYTSTEE SNIFTTAMER WDVKATEQLP ANMRTFYDYL ICTTDEVVEE LKLQNNKNAE LVKVLIDAA KCYHSEVKWR
 401 CYHSEVKWRD DHYVPNDVGE HLQLSMRISA AMHNSINFVI ILSGAVCTRE AVECAFTYPK IIRGICVHARI ISNDIASHERE EQASEHMAST LQTCMKQYGI
 501 VEEAAEKLRV INEESWMDIV EELYKDYQY LALSERVVAF AQSICFMYN GVDKYTIIPSK LKDSLDSLYV NILIPV

(20) Sequenzierung ROI pColdI::ZIZA (codon-optimiert), Länge = 1797 Bp

1 AATTATTAAG AGGTAATACA CCAATGAATCA CAAAGTGCAT CATCATCATC ATCATATCGA AGGTAGGCA ACCACTGCTG CGTTTTGCTT ACAAATACG
 101 CCAATTGGGG AGCCGGTGTG CAGACGTCAA TATCTGCCGA CCGTGTGGGG CAGCTTCTTC CTGACGTACC AGCCGTGTAC CCCGGAGGAA GTGCAATCGA
 201 TGGAGGAGAC CGCGTTGGCG AAGAAAACCG AAGTTGGCCG CATGCTTCCAG GAAAGTGGCCG CAAGTTCTAA TTTAGCGGC ACCTGGGCT GTGTTGATGA
 301 ACTGGAACGA CTTGGTGTAG ATTACACTA CAAAACCGAA ATCAACGATT TGTTAGGAGC CATTTACAAT GGGAAAGACG ATGACAATGG GGGCAGTGAT
 401 GATGACCTTT ATATCACTTC ACTGAAATTC TACCTCTGCG GTAAACACGG ATACGCTCTG TCCAGCGATG TTTTTTAAAT ATTTGCGGAC GAACAGGGAA
 501 ACATTTCTGAG CGATGATGTC AAATGCGCTGA CTATGCTCTA TGACGATCTG TGACGATCTG TCCACGAGGA AAAAAATTTA CACAAATATCA ACTCAATTC
 601 TAAATCCTGT CTGACGCTG TACTTGAGAC GAACCTAGAA CCAGCGTTAC AGGAAGAGGT GCGTTGTACA TTAGAGACCC CGCGCTTCCG CCGGTGGAG
 701 CCGATCGAAG CGAAACGCTT CATTTCAGCC TATGAGAAAA ACATTTGACG CAGTGCAGCA CTGCTGGAAT TTGCCGCTG GGACTCAAC ATTTGTGCAA
 801 TCTCTTATG TAAGAACTC AAAGAGTTAA CAGTATGGTG GAAAGAGTTC CATCTCGCGA CCAATTTAAC CTTTGGCGCT GACCGTATG TGAGGATGTA
 901 TTTTTGGGTC ATGGCGATTA TCTATGAACC CTGCTACAGC TACTCGCTA TTTGGGTGAC CAAGATGTTT TAAAGTGTG CGCTCTGGA TGATATCTAT

1001 GACAATTATA CTAGCACCGA GGAGTCTAAT ATCTTCCACGA CTGCCATGGA GCGGTGGGAC GTCAAAGCAA CCGAACAGCT GCCGGCAAC ATGCGCACGT
 1101 TCATGACTA CTGATCTCG ACCACCGATG AAGTGGTGGG GGAAGTGAAC CTTCAAAACA ACAAAAATGC AAGAAAGTGC TGATTGATGC
 1201 AGCGAAATGT TACCACAGCG AAGTAAATG GCGGGACGAT CATTATGTTC CGAATGATGT GGGAGAGCAT CTGCAGCTGT CGATGAGGAG TATCGCGCGG
 1301 ATGCACAGTA TCAATTTCTG CTTCATCTCA CTGGGAGCAG TTTGCACACG CGAAGCCGTT GAATGTGCAT TTACGTACCC AAAAATCATT CGCGGGATTT
 1401 GTGTGCATGC GCGTAAAGT AATGACATGT CTAGCCACGA GCGCGAACAA GCAAGTGAAC ATATGGCCCTC TACCCTGCAG ACCTGTATGA AACAAATGAG
 1501 GATTACCGTG GAGGAGGCGG CCGAGAAAT GCGCGTATT AACGAAGAAA GCTGGATGGA TATCGTCGAG GAGTGCCTGT ATAAAGATCA GTATCCGTTG
 1601 GCCTCTCCG AGCGGGTTGT AGCTTTTGCA CAGTCCATTT GCTTTATGTA TAATGGCGTG GATAAATACA CTATCCCATC AAAACTGAAG GACAGCCTTG
 1701 ATAGCTTGTA TGTAATCTCG ATTCCGGTGG **GA**CATATGGA GCTCGGTACC CTGCAAGGAT CCGAATTCAA GCTTGTGCAC CTGCAGTCTA GATAGGT

(21) Translation ORF pColdI::ZIZA (codon-optimiert), Länge = 569 AS

1 **M**NHKV**HHHHH** **H**TEGRATTA FCLTTTPIGE PVCRRQYLPV VWGFFLYTQ PCTPEEVQSM EERALAKKTE VGRMLQEVAA SSNLARKLGL VDELERLVGD
 101 YHYKTEINDL LGAIYNGKDD DNGGSDDDLY ITSCLKFYLLR KHGYALSSDV FLKFRDEQGN ISSDDVKCLI MLYDASHLRI HE EKILDNIN SFTKSLQSQV
 201 LETNLEPALQ EEVRCLETLP RFRRVERIEA KRFISAYEKN IARDALLEF ARLDYNIVQI LYCKELKELT VWWKEFHSRT NLTFAARDRIV EMYFWVMIAI
 301 YEPYYSYRI WTKMFLSWA LL**DDIY**NYT STEESNIFTT AMERWVVKAT EQLPANMRTF YDYLICTTDE VVEELKLQNN KNAELVKKVL IDAAKCYHSE
 401 VKWRDDHYVP NDVGEHLQLS MRSIAAMHSI NFFVISLGA VCTREAVECAF TYPKIIRGIC VHARIS**NDIA** **SH**REQASEH MASTLQTCMK QYGITVEEAA
 501 EKLRVINEES WMDIVEECLY KDQYPLALSE RVVAFQASIC FMYNGVDKYT IPSKLDKSLD SLYVNLIPV**W**

(22) Sequenzierung ROI pET-SUMO::ZIZA (codon-optimiert), Länge = 2063 Bp

1 TAAGAAGGAG ATATACATAT **G**GGCAGCAGC **CATCATCATG** **ATCATCAC**GG CAGCGCCGCG GTGCCGCTAG **CATGTCGGAC** **TCAGAAGTCA**
 101 **ATCAAGAAGC** **TAAGCCAGAG** **GTCAAGCCAG** **AAGTCAAGCG** **TGAGACTCAC** **ATCAATTTAA** **AGGTGTCGGA** **TGGATCTTCA** **GAGATCTTCT** **TCAGAATCAA**
 201 **AAAGACCACC** **CTTTAAGAA** **GGCTGATGGA** **AGCGTTCGCT** **AAAAGACAGG** **GTAAGGAAAT** **GGACTCCTTA** **AGATTCTTGT** **ACGACGGTAT** **TAGAATCAA**
 301 **GCTGATCAGA** **CCCCTGAAGA** **TTTGGACATG** **GAGGATAAAG** **ATATTATTGA** **GGCTCACAGA** **GAACAGATTG** **GTGGT**GCAAC CACTGCTGCG TTTTGCTTAA
 401 CAACTACGCC AATTGGGGAG CCGGTGTCGA GACGTCAATA TCTGCCGACC GTGTGGGGCA GCTTCTTCTC GACGTACCAG CCGTGTACCC CGGAGGAAGT
 501 GCAATCGATG GAGGAACCGC CGTTGGCGAA GAAAACCGAA GTTGGCCGCA TGCTTCAGGA AGTGGCCGCC AGTTCATAAT TAGCCGCGAA ACTGGGCTTG
 601 GTTGATGAAC TGGAACGACT TGGTGTAGAT TACCACATAA AAACCGAAT CAACGATTTG TTAGGAGCCA TTTACAATGG GAAAGACGAT GCAAGGAGGG
 701 GCAGTGATGA TGACCTTTAT ATCACTTCCAC TGAAATCTA CCTCCTGCGT AAACACGGAT ACGCTCTGTC CAGCGATGTT TTTTAAAT TTCGCGACGA
 801 ACAGGGAAAC ATTTTCGAGC ATGATGTCAA ATGCTGATG ATGCTCTATG ACGCATCGCA TCTGCGCATC CACGAGGAAA AAATTTTAGA CAATATCAAC
 901 TCATTACTA AATCCTGTCT GCAGTCTGTA CTTGAGACGA ACCTAGAACC AGCGTTACAG GAAGAGGTGC GTTGACATT AGAGACCCCG CGCTCCGCC
 1001 GCGTGGAGCG GATCGAAGCG AAACGCTTCA TTTGAGCCTA TGAGAAAAAC ATTGCACGCG ATGACGCACT GCTGGAATTT GCCGCTCGG ACTACAACAT
 1101 TGTGCAATC CTCTATTGTA AAGAACTCAA AGAGTTAAAC GATGTGGTGA AAGAGTTCCA CTCGCGCACC AATTTAACCT TTGCGCGTGA CCGTATCGTG
 1201 GAGATGTATT TTTGGGTCAT GCGGATTTAT ATGAACCCCT GCTACAGCTA CTCGCGTATT TGGGTGACCA AGATGTTTTT AAGTGTGGCG CTCTGGATG
 1301 ATATCTATGA CAATTATACT AGCACCAGGG AGTCTAATAT CTTCAGCAGT GCCATGGAGC GGTGGGACGT CAAAGCAACC GAACAGCTGC CGGCAAACAT
 1401 GCGCACGTTT TATGACTACT TGATCTGCAC CACCGATGAA GTGGTGGAGG AACTGAAACT TCAAAAACAC AAAAATGCGG AACTCGTTAA GAAAGTGTCT
 1501 ATTGATCGAG CGAAATGTGA CCACAGCGAA GTTAAATGGC GTTAATGTCG ATATGTTCCG AATGATGTGG GAGAGCATCT GCAGCTGTGC ATCAGGAGTA
 1601 TCGCGGCGAT GCACAGTATC AATTTCTGCT TCATCTCACT GGGAGCAGTT TGACACACGG AAGCCGTTGA ATGTCATTT ACGTACCCAA AAATCATTCT
 1701 CGGGATTTGT GTGCATGGC GTATAAGTAA TGACATTTG ATGCCAGCAG CGGAACAAGC AAGTGAACAT ATGGCCTCTA CCCTGCAGAC CTGTATGAAA
 1801 CAATATGGGA TTACCGTGGT GAGGCGCGCC GAGAAATTTG GAGAAATTTG CCGTGTGATTA TGGATGGATA TCGTGCAGGA GTGCTGTGAT GTCAGTCAGT
 1901 ATCCGTTGGC CCTCTCCGAG CCGGTTGTAG CTTTTGCACA GTCCATTTGC TTTATGTATA ATGGCGTGA TAAATACACT ATCCCATCAA AACTGAAGGA
 2001 CAGCCTTGAT AGCTTGATG TAAATCTGAT TCCGGT**GA** AGACAAGCTT AGGTATTTAT TCG

(23) Translation ORF pET-SUMO::ZIZA (codon-optimiert), Länge = 673 AS

1 **M**GSS**HHHHH** **G**SLVPRGSA **S**MSDEVNQE **A**KPEVKPEVK **P**ETHINLKVY **D**SSEI**F**EFKI **K**KTTPLRRIL **E**FAFAKRQ**G**KE **M**DSL**R**FLYD**G** **I**RIQAD**D**IT**P**E
 101 **D**LD**M**ED**N**DI **E**AH**R**EQ**I**GA TAAAFCLTTT PIGEVPCRRQ YLPTVWGSFF LTYQPCPTFE VQSMERALA KKTEVGRMLQ EVAASSNLAR KGLVDELER
 201 LGVDVHYKTE INDLGAIYN GKKDDNGGSD DDLYITSLKF YLLRKHGYAL SDDVFLKFRD EGNISSDDV KCLIMLYDAS HLRIHEEKIL DLNINSGFTKSC
 301 LQSVLETNLE PALQEVRCT LETPRFRIVE RIEAKRFISA YEKNIARDDA LLEFARLDYN IVQILYCKEL KELTVWKEF HSRTNLTFFAR DRIVENYFWV
 401 MAIIEPCYS YSRIWTKMF LSVALL**DDIY** **D**NYTSTEESN IFTTAMERWD VKATEQLPAN MRTFYDYLIC TTDEVVEELK LQNNKNAELV KKVLAIDAAK
 501 YHSEVKWRDD HYVNDVGFIS LQLSMRSTAG LGSAMRTEAV ECATYFPKII LGAVICVHARIS **NDTAS**HREQ ASEHMASTLQ TCMQYGITV
 601 EEA**E**KLRV**I** NEESWMDIVE ECLYKDQYPL ALSERVVAFV QSICFMYNGV DKYITPSKLL D**S**L**D**SLYVNL **I**PV**W**

Fusionsprotein = **SUMO**

(24) DNA Fragment 1 Patchouloisynthase-Isoenzyme (codon-optimiert), Länge = 994 Bp

1 GTTTACACGC CGGAAGTGTG TGCGCAGCTT GTTGGTGTGG GTGCTGCATC GCGTCCGCTG GCGAATTTTC ACCAGTGTGT GTGGGGAGAC AAGTTTATCG
 101 TCTATAACCC GCAGTGCCTC CAGGCGGGTG AACGTGAACA AGCGGAAGAG CTGAAAAGTTG AACTGAAACG CCGAAGTGAAG AAGACTATAT ATAACTATAT
 201 GCGTCAGCTG AAAATGGTGG ACGCCATTTA GCGTCTGGGC ATCGATTACC TGTTTGTGTA AGATGTTGAT GAGGCGCTGA AGAAGCTGTT CGAAATGTTT
 301 GATGCTTTTT GCAAAAACAA CCATGACATG CACGCCACCG CCCTGAGTCT CCGTCTGCTG CGTCAGCAGC GCTACCGTGT ATCTGCGGAA GTATTGCAAA
 401 AGTTCAAAGT TGTTAAAGAT GGCTTTAAAG TCCGAAACGA AGACGGCCCT GTTGCTGTTT TGAAGCTACT CATCTGCGTG CATCTGGGTGA
 501 AGATGACTG GATAACGCTT TCGTGTTCAC CCGTAACATC CTGGAGTCGG TATACGCAAC CCTGAACGAC CCGACCGCGA ACCAGGTCCA CAACGCACTG
 601 AACGAATTTA GCTTCCGCTG CCGTCTGCGC CCGTCTGAAG CCGCTAAGTA CATCTCCATT TATGAACAGT ACGCCAGTCA CCACAAAGGC CTCTCAAAC
 701 TGGCTAAACT GGCATTTAAT CTCTGCAAGC CACTGCAACCG TCTGAAAGTCT TCTGAAAGTCT GTCGTTGGTG GAAAACCTCG CAGGTTCTCTA CCGAGCTCTC
 801 TTTTGTGCGT GATCGTCTGG TGGAAAGCTA CTTCTGGGCA TCAGGTTCTT ACTTCGAACC GAACTATAGC GTTGCAGGCA TGATTCTGCG AAAAGTCTG
 901 GCGGCTCTGT CCCTGATGGA TGACGTTTAT GATGCGTACG GACTTTTCGA AGAGCTGCAG GTATTTACC GCGAATCGA ACCCTGTGCG GAAG

(25) DNA Fragment 2 Patchouloisynthase-Isoenzyme (codon-optimiert), Länge = 710 Bp

1 GACGTATTAC TTGTTGGGAC GCGAGCTGTC TGGATAAACT GCCGGAATAC ATGAAAATCG TGTATAAAGC TCTGCTGGAT GTGTTTGAAG AAGTGGACGA
 101 AGAAGTTATT AAAGTGGGCG CCCCATATCG CGTGTACTAT GGTAAGAGAG CGATGAAATA CGTGCAGCGC GCTTACATGG AAGAAGCGCA GTGGCGTGAA
 201 CAGAAAACACA AACCGACAC CAAAGAATAC ATGAAACTGG CCACCAAACAT CSDVFLKFRD ATCACGCTTA TCTACCTGTC TTTCTGGGTG GTTGAGGAAAG
 301 GTATCGTGAC AAAAGAGGCT TTTGATTGGG TTTCTCCCG CCGCGCCTTC GTTGAGGCGA CCCTGATTAT CCGCGCCTC ATTAACGACA TCACTGGCTG
 401 TGAATTTGAA AACAACCGTG AACACGCTTC TACCGCTGTA GAATGCTACA TGGAGGAACA TAAAGTTGGC AAACAGGAAG TAGTGTCAAG ATTTTACAAC
 501 CAGATGGAAAT CTGCGTGAAE AGATATCAAC GAATGCTGCG TGCGCCCTGC TGCAGTTTCT ATCCCGCTCG TGAACCTCTA CCTGAACCTC ATCAGCACTC
 601 TGGAAAGTTAT CTATAAGAA GGCAGCTCTT ACACCTCATG TGGTCCGGCA ATGCAGAACA TCATCAAACA GTTGACTATT CACCCAGTGC CGTATTAATA
 701 GGCGAGTCTT

(26) DNA Fragment 1 α-Humulensynthase (codon-optimiert), Länge = 1000 Bp

1 ATTTCCCTTG GAGCGACAAT CGATGGCGCT GGTGGGAGAT AAAGAGGAAA TCATCCGCAA ATCCTTTGAG TACCACCCGA CCGTGTGGGG TGATTATTT
 101 ATCCGTAATT ACAGTTGCCT GCCGCTCGAA AAGGAGTGTG TGATTAAGCG CGTGAAGAAC CTGAAGGACC GTGTCGCGAA TCTGTTGCGG GAAACCCAGC
 201 ACGTCTGCA GATCATGATT TGGTTGATG CATTCAATTT ATTAGGGTTA GATTATCACT TTGAGAAAGA AATTACGGCA CCGCTTCGTT TGATTTATGA
 301 GCGGATGTTG GAGAATATG GACTGTATGA GGTGTCGCTG CGATTCCGCTG TGTGCGGCA ACATGGCTAC AACCTGTCCC CTGATGTATT TAATAAATTT
 401 AAAGATGACA AAGTGCCTT TCTGCCACG CTGAACGGCG ATGCGAAAGG GCTGCTGAAT CTGTACAATG CCGCTACCT CGGTACGCA GAGGAAACTA
 501 TCTCTGATGA AGCCATTTCTG TCCACGAAAT GCCACTTAGA ATCCCTGCTG GCGGAACTGG AACAGCCGCT GCGCATCGAG GTGCTGGAACT
 601 GCCATTGTAC CGACGTACCG GTCGGTTGTT GGTGCGCAAA TACATTTGCA TTTATCAAGA GAAAGTTATG AGGAACGATA CGATTTTGA ACTTGCAAAA
 701 TTGGATTTCA ATCTCTACA GAGTCTTCC CAGGAAGAAG TCAAAAAAT CACCATCTGG TGGAACGATC TGGCGCTGAC GAAGTCTCTA AAATTTGGCC
 801 GTGATCTGTT GCGGGATGTA TATTATGGA TCGTTGCAAG GTATTTGCAA CACTCAGTATT CACGCGCTCG GTCTTACTAT AGCAAAGCCA TCAAGTCTGAT
 901 GTCCATTATG GATGACATTT ATGACAATTA CTGACTCTG GAAGAATCAC GCCTGCTGAC CAGGCTATC GAGCGGTGGG AACCGAGGC TCAAGTCTG

(27) DNA Fragment 2 α -Humulensynthase (codon-optimiert), Länge = 684 Bp

1 CCGCACCCCTT GGTGACTGT GTTCCCGAAT ATCTGAAAGA TTTTATTTA AACTGCTTA AAACGTACAA AGATTTTGAA GACGAATTGG AGCCGAACGA
 101 AAAATATCGC ATCCCATATC TGCAGGAAGA GATAAAAGTA TTATCTCGTG CATATTTTCA GGAGGCAAAG TGGGGCGTCG AACGCTACGT CCCGGCCCTG
 201 GAAGAGCACC TGCTAGTGC TCTTATCAGC GCGGGTTACT TCGCAGTCGC TTGCGCCTCG TACGTGGGTT TGGGTGAAGA TGCAACCCAAA GAAACCTTTG
 301 AATGGGTGGC TTCGAGCCCG AAAATCTTAA AAAGCTGCTC GATCCATTGC CGCTTGATGG ATGATATCAC GTCGCATCAA CGGGAACAGG AGCGCGATCA
 401 TTTTGATCGC ACCGTGGAAT CGTACATGAA GGAACACGGT ACCTCAGCAA AAGTGGCTTG TGAGAACTT CAGGTCATGG TAGAACAAA ATGGAAGAT
 501 CTC AACGAAG AGTGTTTAAG ACCCACCAG GTAGCACGTC CTTTGATTGA AATTATCCTG AACCTGTCTC GTGCTATGGA AGACATTTAC AAACACAAAG
 601 ATACCTACAC CAATTCTAAC ACCCGCATGA AAGATAATGT GTCGCTGATC TTTGTGGAAT CTTTCTTGAT CTAATTGCT AAAC

(28) DNA Fragment 1 (+)-Zizaensynthase (codon-optimiert), Länge = 1000 Bp

1 GCCTGGACTC AGCTGGCAAC CACTGCTGCG TTTTGCTTAA CAACTACGCC AATTGGGGAG CCGGTGTGCA GACGTCAATA TCTGCCGACC GTGTGGGGCA
 101 GCTTCTTCT GACGTACCAG CCGTGTACCC CGGAGGAAGT GCAATCGATG GAGGAACGCG CGTTGGCGAA GAAAACCGAA GTTGGCCGCA TGCTTCAGGA
 201 AGTGGCCGCC AGTTCTAATT TAGCGCGCAA ACTGGGCTTG GTTGATGAAC TGGAACGACT TGGTGTAGAT TACCACTACA AAACCGAAAT CAACGATTTG
 301 TTAGGAGCCA TTACAATGG GAAAGACGAT GACAATGGGG GCAGTGATGA TGACCTTTAT ATCACTTAC TGAAATTTCT CCTCTCGCT AAACACGGAT
 401 ACGCTCTGTC CAGCGATGTT TTTTAAAAAT TTCGCGACGA ACAGGGAAAC ATTTTCGAGCG ATGATGTCAA ATGCTGATC ATGCTCTATG ACGCATCGCA
 501 TCTGCGCATC CACGAGGAAA AAATTTTAGA CAATATCAAC TCATTCACTA AATCCTGTCT GCAGTCTGTA CTTGAGACGA ACCTAGAACCC AGCGTTACAG
 601 GAAGAGGTGC GTTGATACATT AGAGACCCCG CGTTTCCGCC GCGTGGAGCG GATCGAAGCG AAACGCTTCA TTTGAGCCTA TGAGAAAAAC ATTGACCGCG
 701 ATGACGCACT GCTGGAATTT GCCCGTCTGG ACTACAACAT TGTGCAAATC CTCTATTGTA AAGAACTCAA AGAGTTAACA GTATGGTGGG AAGAGTTCCA
 801 CTCGCGCACC AATTTAACCT TTGCGCGTGA CCGTATCGTG GAGATGTATT TTTGGTTCAT GGCATTATC TATGAACCTT GCTACAGCTA CTCGCGTATT
 901 TGGGTGACCA AGATGTTTTT AAGTGTGGCG CTCCTGGATG ATATCTATGA CAATTATACT AGCACCGAGG AGTCTAATAT CTTACAGCT CTTACATACAT

(29) DNA Fragment 2 (+)-Zizaensynthase (codon-optimiert), Länge = 725 Bp

1 ACCAACTTAC TGAGGCGACT GCCATGGAGC GGTGGGACGT CAAAGCAACC GAACAGCTGC CGGCAAACAT GCGCACGTTT TATGACTACT TGATCTGCAC
 101 CACCGATGAA GTGGTGGAGG AACTGAAACT TCAAAAACAC AAAATGCGG AACTCGTTAA GAAAGTGCTG ATTGATGCAG CGAAATGTTA CCACAGCGAA
 201 GTTAAATGCG GGGACGATCA TTATGTTCCG AATGATGTGG GAGAGCATCT GCAGTGTCG ATGAGGAGTA TCGCGCGGAT GCACAGTATC AATTTCTGCT
 301 TCATCTCACT GGGAGCAGTT TGCACACGCG AAGCCGTTGA ATGTGCATTT ACGTACCCTAA AATCATTCCG CGGGATTGTT GTGCATGCGC GTATAAGTAA
 401 TGACATTGCT AGCCACGAGC GCGAACAAAG AAGTGAACAT ATGGCCTCTA CCCTGCAGAC CTGTATGAAA CAATATGGGA TTACCGTGGG GGAGGCGGGC
 501 GAGAAATTGC GCGTATTAA CGAAGAAAGC TGATGGATA TCGTCGAGGA GTGCCTGTAT AAAGATCAGT ATCCGTTGGC CCTCTCCGAG CCGGTTGTAG
 601 CTTTGCACA GTCCATTGCG TTTATGTATA ATGGCGTGGG TAAATACACT ATCCCATCAA AACTGAAGGA CAGCCTTGAT AGCTTGTATG TAAATCTGAT
 701 TCCGGTGTGA TCGTGATGTC GGTTC

WEITERE DATEN UND ERGEBNISSE

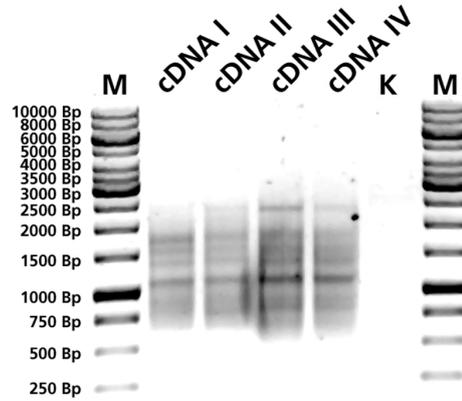


Abbildung D.1 PCR-Amplifikationen mit HUM-spezifischen Primern. Verschiedene cDNA-Bibliotheken aus Shampoo Ingwer wurden als Vorlage verwendet. Keine spezifische Amplifikation eines Genabschnitts nachweisbar. K = Kontrolle ohne Vorlage.

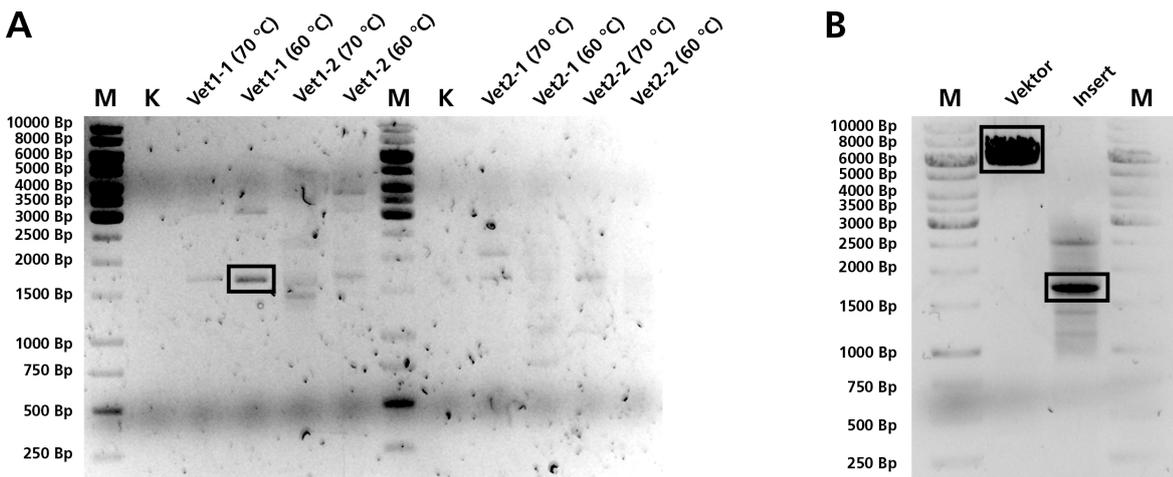


Abbildung D.2 (A) PCR-Ansätze von Proben der beiden Vetiver-Gras Kultivare (Vet₁, Vet₂) bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen von 60 °C und 70 °C. Anhand der Nukleotidlänge wurde das amplifizierte Fragment in Probe 1 von Kultivar 1 als Kandidat für die Sequenzierung ausgewählt (Bande schwarz markiert). (B) Vektor und Insert nach PCR-Lauf und Aufreinigung von Vektor und Vet₁-Insert zum seamless cloning von pET-16b::Vet₁. Durch Sequenzierung konnte später gezeigt werden, dass es sich bei dem inklonierten Fragment nicht um die cDNA einer STPS handelt.

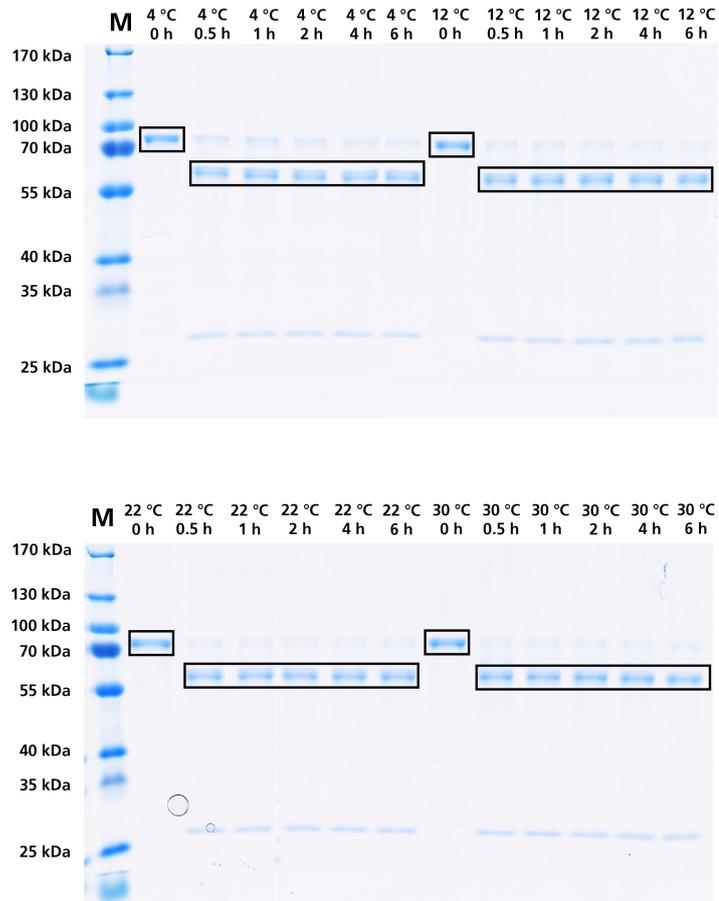


Abbildung D.3 Proteolytischer Verdau des his-SUMO-ZIZA(co) Proteins mit rekombinanter SUMO-Peptidase bei unterschiedlichen Temperaturen und über verschieden lange Zeiträume. 0 h = vor Zugabe der Peptidase. Die SUMO-Peptidase (26 kDa) ist als schwach sichtbare Bande oberhalb der 25 kD Markerbande erkennbar. Die (+)-Zizaensynthase mit Fusionsprotein besitzt ein MW von 77,5 kDa, während das geschnittene Enzym ein MW von 64 kDa aufweist. Die 13 kDa schwere SUMO-Domäne hat das Gel vor Beendigung des elektrophoretischen Laufs bereits passiert und ist nicht mehr erkennbar.

LITERATUR

-
- [1] H. PRIEFERT et al. „Biotechnological production of vanillin“. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001), S. 296–314.
- [2] E. BREITMAIER. *Terpene. Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone*. 1. Wiley-VCH Verlag, 2012. 219 S.
- [3] D. W. CHRISTIANSON. „Unearthing the roots of the terpenome“. eng. In: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2008), S. 141–150.
- [4] S. C. ROBERTS. „Production and engineering of terpenoids in plant cell culture“. In: *Nat. Chem. Biol.* 3 (2007), S. 387–395.
- [5] S. GARMS und G. KRAMMER. *Terpene*. Thieme Römpp. 2009. URL: <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-20-00737>.
- [6] L. RUZICKA. „History of the isoprene rule: Faraday lecture“. In: *Proc. Chem. Soc. (London)* 11 (1959), S. 341–360.
- [7] S. KOUL. *A comprehensive treatise on terpenes*. Saarbrücken: Lap Lambert Academic Publishing, 2011.
- [8] IUPAC-IUB. „Nomenclature of phosphorus-containing compounds of biochemical importance (Recommendations 1976)“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977), S. 2222–2230.
- [9] G. OHLOFF et al. *Scent and chemistry. The molecular world of odors*. Zürich: Wiley-VCH Verlag, 2012. 418 S.
- [10] B. SCHÄFER. „Mint versus Tagasako process: Menthol“. In: *Chemie in unserer Zeit* 47 (2013), S. 174–182.
- [11] S. BURT. „Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review“. eng. In: *J. Food Microbiol.* 94 (2004), S. 223–253.
- [12] J. D. NEWMAN und G. M. CRAGG. „Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010“. In: *J. Nat. Prod.* 75 (2012), S. 311–335.
- [13] V. D. WAGH et al. „Forskolin: Upcoming antiglaucoma molecule“. In: *J. Postgrad. Med.* 58 (2012), S. 199–202.
- [14] Q. L. HUANG et al. „Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol“. In: *Bioorg. Med. Chem.* 9 (2001), S. 2237–2242.
- [15] D.-K. RO et al. „Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast“. In: *Nature* 440 (2006), S. 940–943.
- [16] M. F. BALANDRIN et al. „Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials“. In: *Science* 228 (1985), S. 1154–1160.
- [17] F. E. REGNIER und J. H. LAW. „Insect pheromones“. eng. In: *J. Lipid Res.* 9 (1968), S. 541–551.
- [18] O. SPARAGANO et al. „Comparing terpenes from plant essential oils as pesticides for the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*)“. In: *Transb. Emerg. Dis.* 60 (2013), S. 150–153.
- [19] D. J. MCGARVEY und R. B. CROTEAU. „Terpenoid metabolism“. eng. In: *Plant Cell* 7 (1995), S. 1015–1026.
- [20] S. S. CHANDRAN et al. „Microbial production of isoprenoids“. In: *Process Biochem.* 46 (2011), S. 1703–1710.
- [21] A. F. SMIT und A. R. MUSHEGIAN. „Biosynthesis of isoprenoids via mevalonate in archaea: The lost pathway“. In: *Genome Res.* 10 (2000), S. 1468–1484.
- [22] M. ROHMER. „The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants“. In: *Nat. Prod. Rep.* 16 (1999), S. 565–574.
- [23] H. K. LICHTENTHALER. „The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants“. In: *Annu. Rev. Plant Bio.* 50 (1999), S. 47–65.

- [24] Y. BOUCHER und W. F. DOOLITTLE. „The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways“. eng. In: *Mol. Microbiol.* 37 (2000), S. 703–716.
- [25] V. J. J. MARTIN et al. „Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids“. In: *Nat. Biotechnol.* 21 (2003), S. 796–802.
- [26] D. W. CHRISTIANSON. „Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases“. In: *Chem. Rev.* 106 (2006), S. 3412–3442.
- [27] P. D. DEAN et al. „A soluble 2,3-oxidosqualene sterol cyclase“. eng. In: *J. Biol. Chem.* 242 (1967), S. 3014–3015.
- [28] M. W. HUFF und D. E. TELFORD. „Lord of the rings - the mechanism for oxidosqualene:lanosterol cyclase becomes crystal clear“. eng. In: *Trends Pharmacol. Sci.* 26 (2005), S. 335–340.
- [29] C. L. STEELE et al. „Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase“. eng. In: *J. Biol. Chem.* 273 (1998), S. 2078–2089.
- [30] S. C. TRAPP und R. B. CROTEAU. „Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications“. In: *Genetics* 158 (2001), S. 811–832.
- [31] K. U. WENDT und G. E. SCHULZ. „Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes“. eng. In: *Structure* 6 (1998), S. 127–133.
- [32] D. REARDON und G. K. FARBER. „The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins“. eng. In: *FASEB J.* 9 (1995), S. 497–503.
- [33] L. C. SCHRÖDINGER. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6.0.0.*
- [34] C. M. STARKS et al. „Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase“. In: *Science* 277 (1997), S. 1815–1820.
- [35] D. J. MILLER und R. K. ALLEMANN. „Sesquiterpene synthases: passive catalysts or active players?“ In: *Nat. Prod. Rep.* 29 (2012), S. 60–71.
- [36] J. DEGENHARDT et al. „Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants“. In: *Phytochemistry* 70 (2009), S. 1621–1637.
- [37] G. W. TURNER et al. „Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells“. In: *Plant Physiol.* 120 (1999), S. 879–886.
- [38] P. MERCKE et al. „Molecular cloning, expression, and characterization of amorpho-4,11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L.“ In: *Arch. Biochem. Biophys.* 381 (2000), S. 173–180.
- [39] C. NOTREDAME. „Recent evolutions of multiple sequence alignment algorithms“. In: *PLoS Comput. Biol.* 3 (2007), S. 1405–1408.
- [40] J. XIONG. *Essential bioinformatics.* eng. New York: Cambridge Univ. Press, 2006. 339 S.
- [41] M. BÄHLER und A. R. RHOADS. „Calmodulin signaling via the IQ motif“. In: *FEBS Lett.* 513 (2002), S. 107–113.
- [42] C. A. LESBURG et al. „Crystal structure of pentalenene synthase: Mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology“. In: *Science* 277 (1997), S. 1820–1824.
- [43] D. B. LITTLE und R. B. CROTEAU. „Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase“. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 402 (2002), S. 120–135.
- [44] J. BOHLMANN et al. „Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998), S. 4126–4133.
- [45] N. SAITOU und M. NEI. „The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees“. eng. In: *Mol. Biol. Evol.* 4 (1987), S. 406–425.
- [46] J. FELSENSTEIN. „Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap“. In: *Evolution* 39 (1985), S. 783–791.
- [47] K. TAMURA et al. „MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0“. In: *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013), S. 2725–2729.

- [48] M. SCHEER et al. „BRENDA, the enzyme information system in 2011“. In: *Nucleic Acids Res.* 39 (2011), S. 670–676.
- [49] P. MOMBAERTS. „Seven transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors“. In: *Science* 286 (1999), S. 707–711.
- [50] A. A. BACHMANOV und G. K. BEAUCHAMP. „Taste receptor genes“. In: *Annu. Rev. Nutr.* 27 (2007), S. 389–414.
- [51] S. FIRESTEIN. „How the olfactory system makes sense of scents“. eng. In: *Nature* 413 (2001), S. 211–218.
- [52] P. MOMBAERTS et al. „Visualizing an olfactory sensory map“. In: *Cell* 87 (1996), S. 675–686.
- [53] Z. ZOU et al. „Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex“. eng. In: *Nature* 414 (2001), S. 173–179.
- [54] L. B. BUCK und R. A. AXEL. „A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition“. eng. In: *Cell* 65 (1991), S. 175–187.
- [55] Y. GILAD und D. LANCET. „Population differences in the human functional olfactory repertoire“. eng. In: *Mol. Biol. Evol.* 20 (2003), S. 307–314.
- [56] A. GOTTLIEB et al. „Common peptides shed light on evolution of Olfactory Receptors“. In: *BMC Evol. Biol.* 9 (2009), S. 91–104.
- [57] A. MENINI. „Calcium signalling and regulation in olfactory neurons“. In: *Curr. Opin. Neuro.* 9 (1999), S. 419–426.
- [58] T. NAKAMURA und G. H. GOLD. „A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia“. In: *Nature* 325 (1987), S. 442–444.
- [59] P. KRAFT und K. POPAJ. „Total synthesis and olfactory evaluation of 5b,10-dimethyl-des-A-18-/nor-androstan-13b-ol: A potential human pheromone?“ In: *Eur. J. Org. Chem.* (2004), S. 4995–5002.
- [60] E. J. ARIENS. „Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology“. In: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26 (1984), S. 663–668.
- [61] E. BRENNA et al. „Enantioselective perception of chiral odorants“. In: *Tetrahedron Asym.* 14 (2003), S. 1–42.
- [62] B. T. GREENHAGEN et al. „Identifying and manipulating structural determinates linking catalytic specificities in terpene synthases“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006), S. 9826–9831.
- [63] H. G. RAMYA et al. „An introduction to patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) - A medicinal and aromatic plant: It's importance to mankind“. In: *Agric. Eng. Int.* 15 (2013), S. 243–250.
- [64] E. STRASBURGER et al. *Lehrbuch der Botanik*. ger. 36. Heidelberg: Elsevier Spektrum Akad. Verlag, 2008. 1175 S.
- [65] G. J. WAGNER. „Secreting glandular trichomes: more than just hairs“. eng. In: *Plant Physiol.* 96 (1991), S. 675–679.
- [66] J. J. GLAS et al. „Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores“. In: *J. Mol. Sci.* 13 (2012), S. 17077–17103.
- [67] H. SURBURG und J. PANTEN. *Common fragrance and flavor materials. Preparation, properties and uses*. 5. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2006. 318 S.
- [68] S. A. PATIL et al. „Impact of biofield treatment on growth and anatomical characteristics of *Pogostemon cablin* (Benth.)“ In: *Biotechnology* 11 (2012), S. 154–162.
- [69] B. DE PREVILLE. „Exclusive report: Natural Products in Fragrance“. In: *P&F Magazine* 2 (2006), S. 36–39.
- [70] C. M. BURE und N. M. SELLIER. „Analysis of the essential oil of Indonesian patchouli (*Pogostemon cablin* benth.) using GC/MS (EI/CI)“. In: *J. Essent. Oil Res.* 16 (2004), S. 17–19.
- [71] S. HAZE et al. „Effects of fragrance inhalation on sympathetic activity in normal adults“. In: *Jpn. J. Pharmacol.* 90 (2002), S. 247–253.
- [72] F. DEGUERRY et al. „The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases“. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 454 (2006), S. 123–136.

- [73] F. NÄF et al. „A Stereocontrolled Access to (\pm)-, (-)-, and (+)-Patchouli Alcohol“. In: *HCA* 64 (1981), S. 1387–1397.
- [74] P. KRAFT et al. „From vetiver to patchouli: Discovery of a new high-impact spirocyclic patchouli odorant“. In: *Eur. J. Org. Chem.* (2005), S. 3233–3245.
- [75] F. NÄF und G. OHLOFF. „A short stereoselective total synthesis of racemic patchouli alcohol: preliminary communication“. In: *HCA* 57 (1974), S. 1868–1870.
- [76] F. NÄF und B. OHLOFF. „Process for the preparation of sesquiterpenic derivatives“. US4011269A (USA). FIRMENICH. 1977.
- [77] A. SRIKRISHNA und G. V. SATYANARAYANA. „An enantiospecific total synthesis of (-)-patchouli alcohol“. In: *Tetrahedron Asym.* 16 (2005), S. 3992–3997.
- [78] K. YAMADA et al. „Total synthesis of (\pm)-patchouli alcohol and (\pm)-seychellene via a common homoisotwistane intermediate“. In: *Tetrahedron* 35 (1979), S. 293–298.
- [79] R. N. MIRRORINGTON und K. J. SCHMALZL. „Studies with bicyclo[2.2.2]octenes. V. The total synthesis of (\pm)-patchouli alcohol“. In: *J. Org. Chem.* 37 (1972), S. 2871–2877.
- [80] G. BUCHI et al. „Synthesis of Patchouli Alcohol“. In: *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962), S. 3205–3206.
- [81] J. E. PAGE und J. NAGEL. „Biosynthesis of terpenophenolic metabolites in hop and cannabis“. In: *Rec. Adv. Phytochem.* 40 (2006), S. 179–210.
- [82] N. J. YOB et al. „Zingiber zerumbet (L.) Smith: A Review of Its Ethnomedicinal, Chemical, and Pharmacological Uses“. eng. In: *Evid. Based Compl. Altern. Med.* 2011 (2011), S. 543216.
- [83] L. JIROVETZ et al. „Aroma compound analysis of Piper nigrum and Piper guineense essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction-gas chromatography, solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and olfactometry“. eng. In: *J. Chromatogr. A* 976 (2002), S. 265–275.
- [84] E. S. FERNANDES et al. „Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of Cordia verbenacea“. In: *Eur. J. Pharmacol.* 569 (2007), S. 228–236.
- [85] X. YANG et al. „Chemical analysis and sensory evaluation of hydrolysis products of humulene epoxides II and III“. In: *J. Agr. Food Chem.* 41 (1993), S. 1300–1304.
- [86] F. YU et al. „Molecular cloning and functional characterization of alpha-humulene synthase, a possible key enzyme of zerumbone biosynthesis in shampoo ginger (Zingiber zerumbet Smith)“. In: *Planta* 227 (2008), S. 1291–1299.
- [87] T. HU und E. J. COREY. „Short syntheses of (\pm)-delta-araneosene and humulene utilizing a combination of four-component assembly and palladium-mediated cyclization“. In: *Org. Lett.* 4 (2002), S. 2441–2443.
- [88] C. KIRANA et al. „Antitumor activity of extract of Zingiber aromaticum and its bioactive sesquiterpenoid zerumbone“. In: *Nutr. Cancer* 45 (2003), S. 218–225.
- [89] M. XIAN et al. „Zerumbone, a bioactive sesquiterpene, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells via a Fas- and mitochondria-mediated pathway“. In: *Cancer Sci.* 98 (2007), S. 118–126.
- [90] S. A. SAKINAH et al. „Zerumbone induced apoptosis in liver cancer cells via modulation of Bax/Bcl-2 ratio“. In: *Cancer Cell Int.* 7 (2007), S. 4–15.
- [91] S. OKAMOTO et al. „A short-chain dehydrogenase involved in terpene metabolism from Zingiber zerumbet“. eng. In: *FEBS J.* 278 (2011), S. 2892–2900.
- [92] J. E. McMURRY und J. R. MATZ. „Stereospecific synthesis of humulene by titanium-induced dicarbonyl coupling“. In: *Tetrahedron Lett.* 23 (1982), S. 2723–2724.
- [93] J. E. McMURRY et al. „Synthesis of macrocyclic terpenoids by intramolecular carbonyl coupling: flexibilene and humulene“. In: *Tetrahedron* 43 (1987), S. 5489–5498.
- [94] E. J. COREY et al. „A biomimetic chemical synthesis of humulene from farnesol“. In: *Tetrahedron Lett.* 34 (1993), S. 3675–3678.
- [95] K.-G. FAHLBUSCH et al. „Flavors and Fragrances“. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Hrsg. von B. GIUSEPPE. Wiley-VCH Verlag, 2000.

- [96] M. SCHALK und F. DEGUERRY. „Cytochrome P450 and use thereof for the enzymatic oxidation of terpenes“. WO2013064411A1 (World). FIRMENICH. 2013.
- [97] P. WEYERSTAHL et al. „Constituents of Haitian vetiver oil“. In: *Flavour Fragr. J.* 15 (2000), S. 395–412.
- [98] K. A. HAMMER et al. „Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts“. eng. In: *J. Appl. Microbiol.* 86 (1999), S. 985–990.
- [99] B. C. ZHU et al. „Evaluation of vetiver oil and seven insect-active essential oils against the Formosan subterranean termite“. eng. In: *J. Chem. Ecol.* 27 (2001), S. 1617–1625.
- [100] H. J. KIM et al. „Evaluation of antioxidant activity of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents“. In: *J. Agr. Food Chem.* 53 (2005), S. 7691–7695.
- [101] R. M. COATES und R. L. SOWERBY. „Stereoselective Total Synthesis of (±)-zizaene“. In: *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972), S. 5386–5388.
- [102] J. MARTINEZ et al. „Valorization of Brazilian vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex Small) oil“. In: *J. Agr. Food Chem.* 52 (2004), S. 6578–6584.
- [103] L. C. PATI et al. „A stereocontrolled total synthesis of (±)-zizaene“. In: *Tetrahedron* 58 (2002), S. 1773–1778.
- [104] PRESIDENTIAL COMMISSION FOR THE STUDY OF BIOETHICAL ISSUES. *New directions: The ethics of synthetic biology and emerging technologies*. Washington und D.C: Presidential Commission for the Study of Bioethical Issues, 2010.
- [105] S. PANKE. „Synthetische Biologie: Organismen aus dem Baukasten“. In: *Spektrum der Wissenschaft* (2013), S. 22–27.
- [106] P. BRANDUARDI et al. „Metabolically engineered yeasts: ‘potential’ industrial applications“. In: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15 (2008), S. 31–40.
- [107] J. D. KEASLING. „Manufacturing Molecules Through Metabolic Engineering“. In: *Science* 330 (2010), S. 1355–1358.
- [108] W. MITCHELL. „Natural products from synthetic biology“. In: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15 (2011), S. 505–515.
- [109] D. G. GIBSON et al. „Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome“. In: *Science* 329 (2010), S. 52–56.
- [110] D. A. JACKSON et al. „Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*“. eng. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972), S. 2904–2909.
- [111] E. MARDIS. „Next-generation sequencing platforms“. In: *Annu. Rev. Anal. Chem.* 6 (2013), S. 287–303.
- [112] S. KOSURI und G. M. CHURCH. „Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications“. eng. In: *Nat. Methods* 11 (2014), S. 499–507.
- [113] R. P. SHETTY et al. „Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts“. eng. In: *J. Biol. Eng.* 2 (2008), S. 5–17.
- [114] J. C. ANDERSON et al. „BglBricks: A flexible standard for biological part assembly“. In: *J. Biol. Eng.* 4 (2010), S. 1–12.
- [115] T. S. LEE et al. „BglBrick vectors and datasheets: A synthetic biology platform for gene expression“. In: *J. Biol. Eng.* 5 (2011), S. 12–26.
- [116] D. ENDY. „Foundations for engineering biology“. eng. In: *Nature* 438 (2005), S. 449–453.
- [117] A. S. KHALIL und J. J. COLLINS. „Synthetic biology: applications come of age“. In: *Nat. Rev. Genetics* 11 (2010), S. 367–379.
- [118] D. A. BENSON et al. „GenBank“. In: *Nucleic Acids Res.* 43 (2015), S. 30–35.
- [119] S. VALLA und R. LALE, Hrsg. *DNA cloning and assembly methods*. Bd. 1116. Springer Protocols. New York: Humana Press, 2014. 303 S.
- [120] M. Z. LI und S. J. ELLEDGE. „Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC“. In: *Nat. Methods* 4 (2007), S. 251–256.

- [121] D. G. GIBSON et al. „Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases“. In: *Nat. Methods* 6 (2009), S. 343–345.
- [122] J. QUAN und J. TIAN. „Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways“. In: *PLoS ONE* 4 (2009), S. 6441–6447.
- [123] Y. ZHANG et al. „SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method“. In: *Nucleic Acids Res.* 40 (2012), S. 55–65.
- [124] F. A. RAN et al. „Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system“. eng. In: *Nat. Protoc.* 8 (2013), S. 2281–2308.
- [125] L. CONG et al. „Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems“. In: *Science* 339 (2013), S. 819–823.
- [126] J. C. MILLER et al. „An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing“. In: *Nat. Biotechnol.* 25 (2007), S. 778–785.
- [127] N. E. SANJANA et al. „A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering“. eng. In: *Nat. Protoc.* 7 (2012), S. 171–192.
- [128] P. MALI et al. „RNA-guided human genome engineering via Cas9“. In: *Science* 339 (2013), S. 823–826.
- [129] O. SHALEM et al. „Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells“. In: *Science* 343 (2014), S. 84–87.
- [130] C. RONDA et al. „Accelerating genome editing in CHO cells using CRISPR Cas9 and CRISPy, a web-based target finding tool“. In: *Biotechnol. Bioeng.* 111 (2014), S. 1604–1616.
- [131] H. WANG et al. „One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering“. eng. In: *Cell* 153 (2013), S. 910–918.
- [132] L. DAVIET und M. SCHALK. „Biotechnology in plant essential oil production: progress and perspective in metabolic engineering of the terpene pathway“. In: *Flavour Fragr. J.* 25 (2010), S. 123–127.
- [133] J. D. NEWMAN et al. „High-level production of amorpho-4,11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *Escherichia coli*“. In: *Biotechnol. Bioeng.* 95 (2006), S. 684–691.
- [134] A. M. REDDING-JOHANSON et al. „Targeted proteomics for metabolic pathway optimization: application to terpene production“. In: *Metab. Eng.* 13 (2011), S. 194–203.
- [135] P. P. PERALTA-YAHYA et al. „Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel“. In: *Nat. Commun.* 2 (2011), S. 483.
- [136] H. M. WOO et al. „Application of targeted proteomics and biological parts assembly in *E. coli* to optimize the biosynthesis of an anti-malarial drug precursor, amorpho-4,11-diene“. In: *Chem. Eng. Sci.* 103 (2013), S. 21–28.
- [137] D.-K. RO et al. „Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid“. In: *BMC Biotechnol.* 8 (2008), S. 83–97.
- [138] M. A. ASADOLLAHI et al. „Production of plant sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ERG9 repression on sesquiterpene biosynthesis“. In: *Biotechnol. Bioeng.* 99 (2008), S. 666–677.
- [139] B. E. JACKSON et al. „Metabolic Engineering to Produce Sesquiterpenes in Yeast“. In: *Org. Lett.* 5 (2003), S. 1629–1632.
- [140] J. KIRBY und J. D. KEASLING. „Metabolic engineering of microorganisms for isoprenoid production“. In: *Nat. Prod. Rep.* 25 (2008), S. 656–661.
- [141] J. D. KEASLING. „Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering“. In: *Metab. Eng.* 14 (2012), S. 189–195.
- [142] J. MAURY et al. „Reconstruction of a bacterial isoprenoid biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*“. eng. In: *FEBS Lett.* 582 (2008), S. 4032–4038.
- [143] H. TSURUTA et al. „High-level production of amorpho-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*“. In: *PLoS ONE* 4 (2009), S. 4489–4501.

- [144] E. LEONARD et al. „Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010), S. 13654–13659.
- [145] R. MUNTENDAM et al. „Perspectives and limits of engineering the isoprenoid metabolism in heterologous hosts“. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (2009), S. 1003–1019.
- [146] M. C. CHANG et al. „Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s“. In: *Nat. Chem. Biol.* 3 (2007), S. 274–277.
- [147] E. T. FARINAS et al. „Directed enzyme evolution“. In: *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001), S. 545–551.
- [148] A. BAR-EVEN et al. „The moderately efficient enzyme: evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters“. In: *Biochem.* 50 (2011), S. 4402–4410.
- [149] A. BAR-EVEN und D. S. TAWFIK. „Engineering specialized metabolic pathways-is there a room for enzyme improvements?“ In: *Curr. Opin. Biotechnol.* 24 (2013), S. 310–319.
- [150] V. J. DAVISSON et al. „Phosphorylation of Isoprenoid Alcohols“. In: *J. Org. Chem.* 51 (1986), S. 4768–4779.
- [151] R. K. KELLER und R. THOMPSON. „Rapid synthesis of isoprenoid diphosphates and their isolation in one step using either thin layer of flash chromatography“. In: *J. Chromatogr.* 645 (1993), S. 161–167.
- [152] R. D. TAALMAN. „Isoprene: Background and issues“. In: *Toxicology* 113 (1996), S. 242–246.
- [153] C. WANG et al. „Microbial production of farnesol (FOH): Current states and beyond“. In: *Process Biochem.* 46 (2011), S. 1221–1229.
- [154] F. BAKKALI et al. „Biological effects of essential oils - a review“. In: *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008), S. 446–475.
- [155] E. STAHL und A. GLATZ. „Zur Farbreaktion der Anisaldehyd-Schwefelsäure als Reagenz in der Dünnschicht-Chromatographie“. In: *J. Chromatogr. A* 240 (1982), S. 518–521.
- [156] E. STAHL und A. GLATZ. „Optimizing the aldehyde sulphuric acid reagents used for detection in thin layer chromatography“. In: *J. Chromatogr. A* 243 (1982), S. 139–143.
- [157] R. K. KELLER et al. „Analysis of isoprenoid phosphates and oligophosphates by capillary zone electrophoresis“. In: *J. Chromatogr. A* 737 (1996), S. 325–331.
- [158] S. HYEON et al. „Electrospray-mass spectrometric analysis of plasma pyrophosphates separated on a multi-modal liquid chromatographic column“. In: *Mass Spect. Lett.* 2 (2011), S. 92–96.
- [159] L. HENNEMAN et al. „Detection of nonsterol isoprenoids by HPLC-MS/MS“. In: *Anal. Biochem.* 383 (2008), S. 18–24.
- [160] G. NÜRENBERG und D. A. VOLMER. „The analytical determination of isoprenoid intermediates from the mevalonate pathway“. In: *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012), S. 671–685.
- [161] C. NAKANO et al. „*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv3377c encodes the diterpene cyclase for producing the halimane skeleton“. In: *Chem. Commun.* (2005), S. 1016–1018.
- [162] B. S. GIBBS et al. „Novel farnesol and geranylgeraniol analogues: A potential new class of anticancer agents directed against protein prenylation“. In: *J. Med. Chem.* 42 (1999), S. 3800–3808.
- [163] D. ZHANG und C. D. POULTER. „Analysis and purification of phosphorylated isoprenoids by reversed-phase HPLC“. In: *Anal. Biochem.* 213 (1993), S. 356–361.
- [164] M. BAERNS. *Technische Chemie*. ger. 2. Hoboken: Wiley-VCH Verlag, 2013. 780 S.
- [165] M. SCHALK und F. DEGUERRY. „Sesquiterpene synthases from patchouli“. WO2005052163A2 (World). FIRMENICH. 2005.
- [166] R. B. CROTEAU et al. „Biosynthesis of the sesquiterpene patchoulol from farnesyl pyrophosphate in leaf extracts of *Pogostemon cablin* (patchouli): mechanistic considerations“. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 256 (1987), S. 56–68.
- [167] S. L. MUNCK und R. B. CROTEAU. „Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase patchoulol synthase from *Pogostemon cablin*“. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 282 (1990), S. 58–64.

- [168] F. BANEYX. „Recombinant protein expression in *Escherichia coli*“. In: *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999), S. 411–421.
- [169] N. FERRER-MIRALLES et al. „Microbial factories for recombinant pharmaceuticals“. In: *Microb. Cell Fact.* 8 (2009), S. 17–25.
- [170] H. P. SÖRENSEN und K. K. MORTENSEN. „Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*“. In: *J. Biotechnol.* 115 (2005), S. 113–128.
- [171] K. TERPE. „Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems“. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006), S. 211–222.
- [172] S. SAHDEV et al. „Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies“. In: *Mol. Cell. Biochem.* 307 (2008), S. 249–264.
- [173] S. GRÄSLUND et al. „Protein production and purification“. In: *Nat. Methods* 5 (2008), S. 135–146.
- [174] C. HUANG et al. „Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements“. eng. In: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (2012), S. 383–399.
- [175] G. WALSH. „Biopharmaceutical benchmarks 2014“. In: *Nat. Biotechnol.* 32 (2014), S. 992–1000.
- [176] M. LEBENDIKER und T. DANIELI. „Production of prone-to-aggregate proteins“. In: *FEBS Lett.* 588 (2014), S. 236–246.
- [177] A. KOBATA. „Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins“. In: *Eur. J. Biochem.* 209 (1992), S. 483–501.
- [178] C. RAYON et al. „The protein N-glycosylation in plants“. In: *J. Exp. Bot.* 49 (1998), S. 1463–1472.
- [179] D. P. CLARK et al. *Molecular Biology*. 1. München: Elsevier Spektrum Akad. Verlag, 2006. XVIII, 783 S.
- [180] P. CHOMCZYNSKI und N. SACCHI. „The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on“. In: *Nat. Protoc.* 1 (2006), S. 581–585.
- [181] Y. ICHIHARA und Y. KUROSAWA. „Construction of new T vectors for direct cloning of PCR products“. In: *Gene* 130 (1993), S. 153–154.
- [182] J. CLINE et al. „PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases“. eng. In: *Nucleic Acids Res.* 24 (1996), S. 3546–3551.
- [183] S. HARTWIG et al. „Expression, purification and activity assay of a patchoulol synthase cDNA variant fused to thioredoxin in *Escherichia coli*“. In: *Protein Expr. Purif.* 97 (2014), S. 61–71.
- [184] M. A. LARKIN et al. „Clustal W and Clustal X version 2.0“. In: *Bioinform.* 23 (2007), S. 2947–2948.
- [185] F. SANGER und A. R. COULSON. „A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase“. In: *J. Mol. Biol.* 94 (1975), S. 441–448.
- [186] S. F. ALTSCHUL et al. „Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs“. In: *Nucleic Acids Res.* 25 (1997), S. 3389–3402.
- [187] F. W. STUDIER und B. A. MOFFATT. „Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes“. In: *J. Mol. Biol.* 189 (1986), S. 113–130.
- [188] S. E. BONDOS und A. A. BICKNELL. „Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification“. In: *Anal. Biochem.* 316 (2003), S. 223–231.
- [189] E. HOCHULI et al. „Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent“. In: *Nat. Biotechnol.* 6 (1988), S. 1321–1325.
- [190] K. NAGAI et al. „Oxygen binding properties of human mutant hemoglobins synthesized by *Escherichia coli*“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985), S. 7252–7255.
- [191] P. PUIGBO et al. „HEG-DB: a database of predicted highly expressed genes in prokaryotic complete genomes under translational selection“. In: *Nucleic Acids Res.* 36 (2008), S. 524–527.

- [192] C. GUSTAFSSON et al. „Codon bias and heterologous protein expression“. In: *Trends Biotechnol.* 22 (2004), S. 346–353.
- [193] P. PUIGBO et al. „OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences“. In: *Nucleic Acids Res.* 35 (2007), S. 126–131.
- [194] P. M. SHARP und W. H. LI. „The codon Adaptation Index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications“. In: *Nucleic Acids Res.* 15 (1987), S. 1281–1295.
- [195] A. HOLMGREN. „Thioredoxin“. In: *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985), S. 237–271.
- [196] E. R. LAVALLIE et al. „A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm“. In: *Nat. Biotechnol.* 11 (1993), S. 187–193.
- [197] M. TOMALA et al. „Preparation of bioactive soluble human leukemia inhibitory factor from recombinant Escherichia coli using thioredoxin as fusion partner“. In: *Protein Expr. Purif.* 73 (2010), S. 51–57.
- [198] D. B. SMITH und K. S. JOHNSON. „Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase“. eng. In: *Gene* 67 (1988), S. 31–40.
- [199] G. D. DAVIS et al. „New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli“. In: *Biotechnol. Bioeng.* 65 (1999), S. 382–388.
- [200] J. D. FOX und D. S. WAUGH. „Maltose-binding protein as a solubility enhancer“. eng. In: *Meth. Mol. Biol.* 205 (2003), S. 99–117.
- [201] D. ESPOSITO und D. K. CHATTERJEE. „Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags“. eng. In: *Curr. Opin. Biotechnol.* 17 (2006), S. 353–358.
- [202] I. PROSSER et al. „(+)-(10R)-Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation, bacterial expression and functional analysis“. In: *Phytochemistry* 60 (2002), S. 691–702.
- [203] M. BRODELIUS et al. „Fusion of farnesyl diphosphate synthase and epi-aristolochene synthase, a sesquiterpene cyclase involved in capsidiol biosynthesis in *Nicotiana tabacum*“. In: *Eur. J. Biochem.* 269 (2002), S. 3570–3577.
- [204] R. B. KAPUST und D. S. WAUGH. „Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease“. eng. In: *Protein Expr. Purif.* 19 (2000), S. 312–318.
- [205] D. J. KORBIE und J. S. MATTICK. „Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification“. In: *Nat. Protoc.* 3 (2008), S. 1452–1456.
- [206] R. NOVY et al. „Overcoming the codon bias of E. coli for enhanced protein expression“. In: *inNovations* 1 (2001), S. 1–3.
- [207] H. TEGEL et al. „Increased levels of recombinant human proteins with the Escherichia coli strain Rosetta(DE3)“. In: *Protein Expr. Purif.* 69 (2010), S. 159–167.
- [208] J. HUANG et al. „Mechanisms by which T7 lysozyme specifically regulates T7 RNA polymerase during different phases of transcription“. eng. In: *J. Mol. Biol.* 293 (1999), S. 457–475.
- [209] A. YASEEN und Y. LI. „Dinosolve: A protein disulfide bonding prediction server using context-based features to enhance prediction accuracy“. In: *BMC Bioinformatics* 14 (2013), S9–S22.
- [210] J. CHENG et al. „Large-scale prediction of disulphide bridges using kernel methods, two-dimensional recursive neural networks, and weighted graph matching“. In: *Prot. Struc. Func. Gen.* 62 (2006), S. 617–629.
- [211] C. H. SCHEIN. „Production of soluble recombinant proteins in bacteria“. In: *Nat. Biotechnol.* 7 (1989), S. 1141–1149.
- [212] Y. SHIRANO und D. SHIBATA. „Low temperature cultivation of Escherichia coli carrying a rice lipoxygenase L-2 cDNA produces a soluble and active enzyme at a high level“. In: *FEBS Lett.* 271 (1990), S. 128–130.
- [213] S. VENTURA. „Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility“. In: *Microb. Cell Fact.* 4 (2005), S. 11–19.
- [214] G. SEZONOV et al. „Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth“. eng. In: *J. Bacteriol.* 189 (2007), S. 8746–8749.

- [215] J. O. PORATH et al. „Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation“. In: *Nature* 258 (1975), S. 598–599.
- [216] J. A. BORNHORST und J. J. FALKE. „Purification of proteins using polyhistidine affinity tags“. eng. In: *Meth. Enzymol.* 326 (2000), S. 245–254.
- [217] E. HOCHULI et al. „New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues“. eng. In: *J. Chromatogr.* 411 (1987), S. 177–184.
- [218] J. O. PORATH. „IMAC-Immobilized metal ion affinity based chromatography“. In: *Trends Anal. Chem.* 7 (1988), S. 254–259.
- [219] H. IRVING und R. J. WILLIAMS. „The Stability of Transition-Metal Complexes“. In: *J. Chem. Soc.* 27 (1953), S. 3192–3210.
- [220] M. R. WILKINS et al. „Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS - A World-Wide-Web-accessible tool“. In: *Electrophoresis* 18 (1997), S. 403–408.
- [221] D. N. PERKINS et al. „Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data“. In: *Electrophoresis* 20 (1999), S. 3551–3567.
- [222] P. E. O'MAILLE et al. „A single-vial analytical and quantitative gas chromatography-mass spectrometry assay for terpene synthases“. In: *Anal. Biochem.* 335 (2004), S. 210–217.
- [223] A. B. KUMMER und B. HEUER. „Wound care preparation with reduced skin irritations“. EP2165719A2 (Europe). Beiersdorf AG. 2010.
- [224] J.-W. DE KRAKER et al. „(+)-Germacrene A biosynthesis . The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory“. In: *Plant Physiol.* 117 (1998), S. 1381–1392.
- [225] A. KRYSHTAFOVYCH et al. „CASP10 results compared to those of previous CASP experiments“. In: *Proteins* 82 (2014), S. 164–174.
- [226] C. D. SNOW et al. „Trp zipper folding kinetics by molecular dynamics and temperature-jump spectroscopy“. eng. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004), S. 4077–4082.
- [227] Y. ZHANG. „Progress and challenges in protein structure prediction“. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18 (2008), S. 342–348.
- [228] D. A. WHITTINGTON et al. „Bornyl diphosphate synthase: Structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002), S. 15375–15380.
- [229] S. C. KAMPRANIS et al. „Rational conversion of substrate and product specificity in a Salvia monoterpene synthase: Structural insights into the evolution of terpene synthase function“. In: *Plant Cell* 19 (2007), S. 1994–2005.
- [230] D. C. HYATT et al. „Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007), S. 5360–5365.
- [231] H. A. GENNADIOS et al. „Crystal structure of (+)-delta-cadinene synthase from *Gossypium arboreum* and evolutionary divergence of metal binding motifs for catalysis“. In: *Biochem.* 48 (2009), S. 6175–6183.
- [232] M. KÖKSAL et al. „Structure of isoprene synthase illuminates the chemical mechanism of teragram atmospheric carbon emission“. In: *J. Mol. Biol.* 402 (2010), S. 363–373.
- [233] R. P. MCANDREW et al. „Structure of a three-domain sesquiterpene synthase: A prospective target for advanced biofuels production“. In: *Structure* 19 (2011), S. 1876–1884.
- [234] M. KÖKSAL et al. „Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis“. eng. In: *Nature* 469 (2011), S. 116–120.
- [235] K. ZHOU et al. „Insights into diterpene cyclization from structure of bifunctional abietadiene synthase from *Abies grandis*“. In: *J. Biol. Chem.* 287 (2012), S. 6840–6850.
- [236] J. LI et al. „Rational engineering of plasticity residues of sesquiterpene synthases from *Artemisia annua*: Product specificity and catalytic efficiency“. In: *Biochem. J.* 451 (2013), S. 417–426.
- [237] H. M. BERMAN et al. „The Protein Data Bank“. eng. In: *Nucleic Acids Res.* 28 (2000), S. 235–242.
- [238] D. T. JONES et al. „A new approach to protein fold recognition“. In: *Nature* 358 (1992), S. 86–89.

- [239] A. G. MURZIN et al. „SCOP: A structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures“. In: *J. Mol. Biol.* 247 (1995), S. 536–540.
- [240] C. A. ORENKO et al. „CATH - A hierarchic classification of protein domain structures“. In: *Structure* 5 (1997), S. 1093–1108.
- [241] R. D. FINN et al. „Pfam: the protein families database“. eng. In: *Nucleic Acids Res.* 42 (2014), S. 222–230.
- [242] A. ROY et al. „I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction“. In: *Nat. Protoc.* 5 (2010), S. 725–738.
- [243] A. SALI und T. L. BLUNDELL. „Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints“. eng. In: *J. Mol. Biol.* 234 (1993), S. 779–815.
- [244] F. MELO und E. FEYTMANS. „Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy“. eng. In: *J. Mol. Biol.* 277 (1998), S. 1141–1152.
- [245] V. N. MAIOROV und G. M. CRIPPEN. „Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins“. eng. In: *J. Mol. Biol.* 235 (1994), S. 625–634.
- [246] Y. ZHANG und J. SKOLNICK. „Scoring function for automated assessment of protein structure template quality“. eng. In: *Proteins* 57 (2004), S. 702–710.
- [247] R. D. SHANNON. „Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides“. In: *Acta Cryst. Sec. A* 32 (1976), S. 751–767.
- [248] M. D. ELDRIDGE et al. „Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes“. In: *J. Comp. Mol. Design* 11 (1997), S. 425–445.
- [249] H. BRABERG et al. „SALIGN: a web server for alignment of multiple protein sequences and structures“. In: *Bioinform.* 28 (2012), S. 2072–2073.
- [250] M. SCHALK und F. DEGUERRY. „Method for producing (+)-zizaene“. WO2010134004A1 (World). FIRMENICH. 2012.
- [251] S. HARTWIG et al. „SUMO-fusion, purification, and characterization of a (+)-zizaene synthase from *Chrysopogon zizanioides*“. In: *BBRC* 458 (2015), S. 883–889.
- [252] A. VERGER et al. „Modification with SUMO - A role in transcriptional regulation“. In: *EMBO Rep.* 4 (2003), S. 137–142.
- [253] R. T. HAY. „SUMO: A history of modification“. In: *Mol. Cell* 18 (2005), S. 1–12.
- [254] M. P. MALAKHOV et al. „SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins“. In: *J. Struct. Funct. Genomics* 5 (2004), S. 75–86.
- [255] J. G. MARBLESTONE et al. „Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO“. In: *Protein Sci.* 15 (2006), S. 182–189.
- [256] D. MUKHOPADHYAY und M. C. DASSO. „Modification in reverse: the SUMO proteases“. In: *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007), S. 286–295.
- [257] G. QING et al. „Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*“. In: *Nat. Biotechnol.* 22 (2004), S. 877–882.
- [258] M. MITTA et al. „Deletion analysis of *cspA* of *Escherichia coli*: Requirement of the AT-rich UP element for *cspA* transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction“. In: *Mol. Microbiol.* 26 (1997), S. 321–335.
- [259] B. XIA et al. „The Cold Box stem-loop proximal to the 5'-end of the *Escherichia coli* *cspA* gene stabilizes its mRNA at low temperature“. In: *J. Biol. Chem.* 277 (2002), S. 6005–6011.
- [260] D. JOULAIN und W. A. KÖNIG. „Zizaene“. In: *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*. Hrsg. von D. JOULAIN und W. A. KÖNIG. Hamburg: E.B.-Verlag, 1998, S. 653–654.
- [261] E. KOVATS. „Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone“. In: *HCA* 41 (1958), S. 1915–1932.
- [262] J. B. ARZE et al. „Essential oils from Bolivia. III. Asteraceae: *Artemisia copa* Philippi“. In: *J. Essent. Oil Res.* 16 (2004), S. 554–557.

- [263] K. A. JOHNSON und R. S. GOODY. „The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper“. In: *Biochem.* 50 (2011), S. 8264–8269.
- [264] D. W. MARQUARDT. „An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters“. In: *J. Soc. Indust. Appl. Math.* 11 (1963), S. 431–441.
- [265] K. A. RISING et al. „Demonstration of germacrene A as an intermediate in 5-epi-aristolochene synthase catalysis“. In: *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000), S. 1861–1866.
- [266] T. G. KÖLLNER et al. „Protonation of a neutral (S)-beta-bisabolene intermediate is involved in (S)-beta-macrocarpene formation by the maize sesquiterpene synthases TPS6 and TPS11“. In: *J. Biol. Chem.* 283 (2008), S. 20779–20788.
- [267] J. R. MATHIS et al. „Pre-steady-state study of recombinant sesquiterpene cyclases“. In: *Biochem.* 36 (1997), S. 8340–8348.
- [268] H. WANG et al. „Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution“. In: *Nature* 460 (2009), S. 894–898.
- [269] N. H. TOLIA und L. JOSHUA-TOR. „Strategies for protein coexpression in Escherichia coli“. In: *Nat. Methods* 3 (2006), S. 55–64.
- [270] G. DEL SOLAR et al. „Replication and control of circular bacterial plasmids“. eng. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998), S. 434–464.
- [271] F. BOLIVAR et al. „Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system“. In: *Gene* 2 (1977), S. 95–113.
- [272] S. BALZER et al. „A comparative analysis of the properties of regulated promoter systems commonly used for recombinant gene expression in Escherichia coli“. In: *Microb. Cell Fact.* 12 (2013), S. 26–40.
- [273] P.-H. LIANG et al. „Structure, mechanism and function of prenyltransferases“. In: *Eur. J. Biochem.* 269 (2002), S. 3339–3354.
- [274] T. L. SIVY et al. „Evidence of isoprenoid precursor toxicity in Bacillus subtilis“. In: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75 (2011), S. 2376–2383.
- [275] J. L. RAMOS et al. „Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria“. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 56 (2002), S. 743–768.
- [276] J. SAMBROOK und D. W. RUSSELL. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 3. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 S.
- [277] F. W. STUDIER. „Protein production by auto-induction in high density shaking cultures“. In: *Protein Expr. Purif.* 41 (2005), S. 207–234.
- [278] G. LULI und W. R. STROHL. „Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of Escherichia coli strains in batch and fed-batch fermentations“. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990), S. 1004–1011.
- [279] M. A. RUDE und A. SCHIRMER. „New microbial fuels: a biotech perspective“. In: *Curr. Opin. Microbiol.* 12 (2009), S. 274–281.
- [280] W. S. BOWERS et al. „Sesquiterpene progenitor, germacrene A: an alarm pheromone in aphids“. In: *Science* 196 (1977), S. 680–681.
- [281] N. KOLOSOVA et al. „Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and angiosperm trees“. In: *BioTechniques* 36 (2004), S. 821–824.
- [282] E. MACRAE. „Extraction of plant RNA“. In: *Meth. Mol. Biol.* 353 (2007), S. 15–24.
- [283] M. L. KOTEWICZ et al. „Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity“. In: *Nucleic Acids Res.* 16 (1988), S. 265–277.
- [284] H. C. BIRNBOIM und J. DOLY. „A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA“. In: *Nucleic Acids Res.* 7 (1979), S. 1513–1523.
- [285] C. T. CHUNG et al. „One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution“. eng. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), S. 2172–2175.
- [286] C. T. CHUNG und R. H. MILLER. „Preparation and storage of competent Escherichia coli cells“. In: *Meth. Enzymol.* 218 (1993), S. 621–627.

- [287] U. K. LAEMMLI. „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4“. eng. In: *Nature* 227 (1970), S. 680–685.
- [288] G. CANDIANO et al. „Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis“. In: *Electrophoresis* 25 (2004), S. 1327–1333.
- [289] W. N. FISHBEIN. „Quantitative densitometry of 1-50 µg protein in acrylamide gel slabs with Coomassie blue“. In: *Anal. Biochem.* 46 (1972), S. 388–401.
- [290] C. A. SCHNEIDER et al. „NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis“. In: *Nat. Methods* 9 (2012), S. 671–675.
- [291] H. TOWBIN et al. „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979), S. 4350–4354.
- [292] N. ESWAR et al. „Comparative protein structure modeling using MODELLER“. In: *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 2 (2007), S. 2.9.1–2.9.31.
- [293] M. TARINI et al. „Ambient Occlusion and Edge Cueing for Enhancing Real Time Molecular Visualization“. In: *IEEE Trans. Visual. Comp. Graph.* 12 (2006), S. 1237–1244.
- [294] Z. LI et al. „Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based Escherichia coli expression systems“. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91 (2011), S. 1203–1213.

KOOPERIERENDE ARBEITEN

Ein Teil der praktischen Experimente im Verlauf dieser Dissertation wurden für studentische Abschlussarbeiten zur Verfügung gestellt. Die Versuche und Versuchsergebnisse hierzu entstanden nach Vorgabe von und in Zusammenarbeit mit dem Autor der vorliegenden Dissertation.

- Alemdar, S.: *Expression, Aufreinigung und Einsatz rekombinanter Patchoulolsynthase in der Terpensynthese. (Masterarbeit)* Mai–November 2013.
→ Teilergebnisse Aufreinigung PTS-Isoenzym, Testung von Metallspezies (vgl. 4.4).
- Neubauer, P.: *Optimierung der Expression einer Terpensynthase zur Biotransformation von Terpenoiden. (Bachelorarbeit)* März–April 2013.
→ Teilergebnisse Expression und Nachweis PTS-Isoenzym (vgl. 4.3).
- Frister, T.: *Synthese von Terpenintermediaten zur Herstellung von Aromastoffen mit rekombinanten Terpensynthasen. (Masterarbeit)* Mai–November 2012.
→ Teilergebnisse Synthese und Aufreinigung von Farnesyldiphosphat (vgl. 4.1).

Einige Fragestellungen konnten durch freundliche Unterstützung externer Dienstleister und Institutionen aufgeklärt werden.

- Krings, U. & Berger, R. G., Institut für Lebensmittelchemie, Leibniz Universität Hannover
→ Bereitstellung von Ressourcen zur GC-MS Analytik der Sesquiterpenprodukte.
- Institut für Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover
→ Bereitstellung von Mess- und Analysenzeit am NMR-Spektrometer.
- Nimtz, M. & Rinas, U., Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig
→ Möglichkeit zur Durchführung von MALDI-TOF-MS Analysen der rekombinanten Enzyme.
- Fiethen, A. und Kuhn, H., CAM-D Technologies GmbH, Essen
→ Docking-Simulation des Substrats an ein bereitgestelltes Strukturmodell von PTSi.

Die Arbeiten wurden finanziert durch Mittel des EFRE-Innovationsverbunds (Europäischer Fond für regionale Entwicklung) „Veredelung pflanzlicher Rohstoffe“ (ZW 8-80130940).



STEFFEN HARTWIG**PERSÖNLICHE DATEN**

Geburtsort: Bad Hersfeld
Geburtsdatum: 29. April 1985
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

STUDIUM

11/2011 - 12/2015 Promotionsstudium zum Dr. rer. nat.
Leibniz Universität Hannover

10/2009 - 10/2011 Masterstudiengang Life Science
Leibniz Universität Hannover
Abschluss: M. Sc.

10/2006 - 10/2009 Bachelorstudiengang Life Science
Leibniz Universität Hannover
Abschluss: B. Sc.

SCHULBILDUNG

2005 - 2006 Zivildienst als Pflegehelfer
Klinikum
Kreis Hersfeld-Rotenburg

2002 - 2005 Modellschule Obersberg
Bad Hersfeld
Abschluss: Abitur

2001 - 2002 Godby High School
Tallahassee, FL (USA)

1996 - 2001 Gesamtschule Obersberg
Bad Hersfeld

1992 - 1996 Wilhelm Neuhaus Grundschule
Bad Hersfeld