

Entwicklung einer biotechnologischen Produktionsstrategie für das Sesquiterpenoid Zerumbon

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Semra Alemdar, M. Sc.

geboren am 07.08.1988 in Hannover

2018

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: PD Dr. rer. nat. Ulrich Krings

Tag der Promotion: 19.01.2018

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seinem Arbeitskreis meine Dissertation anzufertigen und dieses spannende und vielseitige Thema zu bearbeiten.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich Herrn PD Dr. Ulrich Krings.

Bei Frau Prof. Dr. Ursula Rinas bedanke ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Vielen Dank an Herrn Dr. Sascha Beutel für die Tipps und Anregungen und sein entgegengebrachtes Vertrauen in meine Arbeiten.

Ich danke Daniel Sandner vom Institut für Lebensmittelchemie für die Durchführung der GC/MS-Analytik.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Martina Weiß und Martin Pähler für die Hilfe und Unterstützung in allen Aspekten des Laboralltags. Vielen Dank an Cornelia Alic und Ulrike Dreschel für die Hilfe bei bürokratischen Problemen. Dr. Michael Dors und Dr. Ivo Havlik danke ich für die Hilfestellung bei IT-Problemen.

Für ihre tatkräftige Mitarbeit an meinem Promotionsthema während ihrer Bachelor- und Masterarbeiten danke ich Jana Schellenberg und Jan König. Ebenso ein großer Dank an alle Praktikanten für ihre Mithilfe.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen des TCI für die große Hilfsbereitschaft und freundliche Arbeitsatmosphäre und auch die schönen Zeiten außerhalb des Labors! Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Kollegen in Raum 163, die mich über die Jahre begleitet haben. Mit euch war es immer lustig und schön im Büro! Ganz besonders möchte ich mich bei Sabrina, Lena, Jana, Alina, Jan und Christoph bedanken, die immer zum Schnacken, für tiefgründige Gespräche oder einfach nur zum Kaffee trinken und Süßigkeiten knabbern da waren.

Ganz herzlich möchte ich mich hier bei meiner Familie bedanken. Danke, dass ihr mich in dieser aufregenden Zeit begleitet und in jeder Hinsicht unterstützt habt!

KURZFASSUNG

Zerumbon ist ein Sesquiterpenketon mit potenten antikanzerogenen Eigenschaften, das in verschiedenen Pflanzen der Zingiberacea-Familie produziert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde ein zweistufiges semisynthetisches Verfahren entwickelt, in dem das biosynthetische Vorläufermolekül α -Humulen in *pathway*-optimierten *Escherichia coli* produziert und anschließend Übergangsmetall-katalysiert in allylischer Stellung oxidiert wurde.

Als Schlüsselenzym der Zerumbonbiosynthese wurde die α -Humulensynthase (HUM) aus *Zingiber zerumbet* Smith rekombinant in *E. coli* produziert und aufgereinigt. Die Expression der His10-getaggten HUM wurde durch Screening verschiedener Induktorkonzentrationen und Induktionszeitpunkte optimiert. Das Enzym wurde erfolgreich aus dem Proteinrohextrakt über Co^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und die Aktivität durch Umsetzung des natürlichen Substrats (2*E*,6*E*)-Farnesylpyrophosphat bestätigt. Als Produkte wurden α -Humulen (~94,5 %) und β -Caryophyllen (~5,5 %) massenspektrometrisch identifiziert. Die HUM wurde umfassend charakterisiert und wichtige enzymatische Eigenschaften wie kinetische Daten, pH- und Temperaturoptimum und Substratspezifität untersucht. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde ein photometrischer Assay zur Bestimmung der Terpensynthaseaktivität entwickelt, der auf dem Malachitgrün-Assay basiert.

Durch Coexpression eines heterologen, synthetischen Mevalonat-Stoffwechselweges zur Isoprenoidsynthese, konnte α -Humulen erfolgreich in *pathway*-optimierten *E. coli* produziert werden. Adsorptive und extraktive Verfahren wurden zur Isolierung des Sesquiterpens untersucht und ein integrierter Bioprozess im Rührkessel-Bioreaktor entwickelt, der einen Produkttiter von $60,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ermöglicht. Die allylische Oxidation von α -Humulen an C8-Position wurde mit Mangan(II)chlorid als Katalysator und *tert.*-Butylhydroperoxid als Oxidationsmittel durchgeführt. Als Hauptprodukt der Reaktion konnte Zerumbon mit einer Ausbeute von 46,6 % isoliert werden.

Schlagwörter: Sesquiterpene, Semisynthese, Integrierter Bioprozess, Allylische Oxidation, Zerumbon

ABSTRACT

Zerumbone is a sesquiterpene ketone with potent anti-cancerogenic activities, produced in several ginger species of the Zingiberaceae family. In this work, a two-step semi-synthetic process was developed by producing the biosynthetic precursor α -humulene in pathway-optimized *Escherichia coli* following transition metal catalyzed allylic oxidation.

As the key enzyme of zerumbone biosynthesis α -humulene synthase (HUM) from *Zingiber zerumbet* Smith was recombinantly produced in *E. coli* and purified. The expression of the his10-tagged HUM was optimized by screening several inducer concentrations and induction time points. The enzyme could successfully be purified by Co^{2+} -NTA affinity chromatography and activity was proved by conversion of the natural substrate (2*E*,6*E*)-farnesyl pyrophosphate. α -Humulene (~94.5 %) and β -caryophyllene (~5.5 %) were identified as products by mass spectrometry. The HUM was extensively characterized and important enzymatic properties as kinetic data, pH and temperature optimum and substrate specificity were analyzed. Within the scope of these works, a photometric assay based on the malachite green assay was developed to measure terpene synthase activity.

By coexpression of a heterologous synthetic mevalonate pathway for isoprenoid synthesis, α -humulene was successfully produced in pathway optimized *E. coli*. Adsorptive and extractive methods were analyzed to isolate the sesquiterpene and an integrated bioprocess in a stirred-tank bioreactor with a product titer of $60.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was established. The allylic oxidation of α -humulene in C8 position was performed with manganese(II) chloride as catalyst and *tert*-butyl hydroperoxide as oxidizing agent. Main product of the reaction was zerumbone with 46.6 % yield.

Key words: sesquiterpenes, semi-synthesis, integrated bioprocess, allylic oxidation, zerumbone

PUBLIKATIONSLISTE

Fachartikel

- S. Hartwig, T. Frister, **S. Alemdar**, Z. Li, U. Krings, R.-G. Berger, T. Scheper, S. Beutel: Expression, purification and activity assay of a patchoulol synthase cDNA variant fused to thioredoxin in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif 2014, 97:61-71.
- S. Hartwig, T. Frister, **S. Alemdar**, Z. Li, T. Scheper, S. Beutel: SUMO-fusion, purification, and characterization of a (+)-zizaene synthase from *Chrysopogon zizanioides*. BBRC 2015, 458(4):883-889.
- T. Frister, S. Hartwig, **S. Alemdar**, K. Schnatz, L. Thöns, T. Scheper, S. Beutel: Characterisation of a Recombinant Patchoulol Synthase Variant for Biocatalytic Production of Terpenes. ABAB 2015, 176(8):2185-201.
- **S. Alemdar**, S. Hartwig, T. Frister, J. C. König, T. Scheper, S. Beutel: Heterologous expression, purification and biochemical characterization of α -humulene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. ABAB 2016, 178(3):474-89.
- **S. Alemdar**, J. C. König, S. Hartwig, T. Frister, T. Scheper, S. Beutel: Bioproduction of α -humulene in metabolically engineered *Escherichia coli* and application in zerumbone synthesis. Eng Life Sci 2017, 17(8):900-907.
- **S. Alemdar**, J. C. König, K. Seidel, A. Kirschning, T. Scheper, S. Beutel: Substrate specificity of α -humulene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith and determination of kinetic constants by a spectrophotometric assay. Eng Life Sci, submitted.

Vorträge

- T. Frister, S. Hartwig, **S. Alemdar**, S. Irmischer, T. Scheper, S. Beutel: production and characterization of a recombinant patchoulol synthase isoenzyme. Bioflavour, Frankfurt am Main 2015.
- **S. Alemdar**, S. Hartwig, T. Frister, J. C. König, T. Scheper, S. Beutel: A semi-synthetic route for zerumbone production using metabolically engineered *Escherichia coli* and

transition metal catalysis. 8th International Congress on Biocatalysis, Hamburg-Harburg, 28.08.2016-01.09.2016, 29.08.2016.

- **S. Alemdar**, S. Hartwig, T. Frister, J. C. König, T. Scheper, S. Beutel: Biotechnological production of the sesquiterpene α -humulene. ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2016, Aachen, 12.09.2016-15.09.2016, 14.09.2016.

Posterbeiträge

- S. Hartwig, T. Frister, **S. Alemdar**, S. Beutel, T. Scheper: 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 2013.
- T. Frister, S. Hartwig, **S. Alemdar**, K. Schnatz, L. Thöns, T. Scheper, S. Beutel: Biocatalytic production of patchoulol and other high valuable sesquiterpenes. 7th International Congress on Biocatalysis, Hamburg-Harburg 2014.
- T. Frister, S. Hartwig, P. Grünert, **S. Alemdar**, S. Irmscher, T. Scheper, S. Beutel: Recombinant production of a patchoulol synthase and its application for the synthesis of sesquiterpenes. 2nd Conference of Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel, Hannover 2015.
- **S. Alemdar**, S. Hartwig, T. Frister, J. C. König, T. Scheper, S. Beutel: Towards the biocatalytic production of α -humulene: Recombinant expression and characterization of α -humulene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. Bioflavour, Frankfurt am Main 2015.
- F. Aguilar Cascante, S. Hartwig, **S. Alemdar**, T. Frister, T. Scheper, S. Beutel: Scale up of the production and purification of the novel recombinant zizaene synthase for the biotransformation of the khusimol precursor (+)-zizaene. 8th International Congress on Biocatalysis, Hamburg-Harburg 2016.

UNTERSTÜTZENDE ARBEITEN

Mitarbeit an Experimenten

An einigen praktischen Experimenten waren neben der Autorin der vorliegenden Arbeit auch folgende Personen beteiligt:

- Kapitel 4.3.2: Gemeinsame experimentelle Durchführung der Bioreaktorkultivierung mit Jan Christoph König, M. Sc., Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.
- Kapitel 4.1.2.1: Gemeinsame experimentelle Durchführung der dynamischen Differenzfluorometrie mit Dr. Christian Kleusch, NanoTemper Technologies GmbH.
- Kapitel 4.1.4.4 und Kapitel 4.4.4: Experimentelle Durchführung der GC/MS-Analytik durch Daniel Sandner, Staatl. gepr. Dipl.-Lebensmittelchemiker, Institut für Lebensmittelchemie, Leibniz Universität Hannover.

Betreute Arbeiten

Im Rahmen der Promotion wurden folgende Abschlussarbeiten betreut:

- Jan Christoph König: Produktion und Charakterisierung einer α -Humulensynthase zur biotechnologischen Herstellung von Terpenen. Masterarbeit im Fach Biochemie, Oktober 2014 - März 2015. Teilergebnisse in Kapitel 4.1.
- Jana Schellenberg: Produktion und Isolierung von α -Humulen aus *E. coli*-Kulturen. Bachelorarbeit im Fach Life Science, März 2016 - Mai 2016. Teilergebnisse in Kapitel 4.3.3.
- Ephraim Neumann: Studien zur Übergangsmetall-katalysierten Oxyfunktionalisierung von α -Humulen zu Zerumbon. Bachelorarbeit im Fach Chemie, April 2016 - Juli 2016.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	ZIELSETZUNG	3
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	4
3.1	Terpene und Terpenoide	4
3.2	Naturstoffe: ein neues goldenes Zeitalter in der Wirkstoffforschung?	9
3.3	Biotechnologische Produktion von pharmazeutisch wertvollen Terpenen	11
3.4	Zerumbon: ein bioaktives Sesquiterpenoid	14
3.4.1	Biosynthese und alternative Synthesestrategien	15
3.4.2	Pharmakologische Eigenschaften	19
4	EXPERIMENTELLE ARBEITEN	23
4.1	Rekombinante Produktion der α -Humulensynthase aus <i>Zingiber zerumbet</i> Smith in <i>Escherichia coli</i>	23
4.1.1	Optimierung der Expressionsbedingungen	23
4.1.2	<i>Scale-up</i> und Kultivierung im Rührkessel-Bioreaktor	28
4.1.3	Chromatographische Strategien zur Isolierung der α -Humulensynthase	30
4.1.3.1	Metallchelataffinitätschromatographie	30
4.1.3.1.1	Optimierung der Proteinisolierung durch Variation der immobilisierten Metallspezies	31
4.1.3.1.2	Optimierung der Proteinisolierung durch Variation des Elutionsverfahrens	34
4.1.3.2	Ionenaustauschchromatographie	36
4.1.4	Charakterisierung der α -Humulensynthase	39
4.1.4.1	Produktspektrum	39
4.1.4.2	Enzymstabilität und -aktivität	40
4.1.4.3	Bestimmung der kinetischen Daten	45
4.1.4.4	Untersuchungen zum Substratspektrum	47
4.2	Entwicklung eines photometrischen Assays zur Bestimmung der Terpensynthase- Aktivität	54
4.2.1	Messprinzip und Validierung	55
4.2.2	Photometrische Bestimmung der α -Humulensynthase-Aktivität	61
4.3	Heterologe Produktion von α -Humulen in <i>pathway</i> -optimierter <i>Escherichia coli</i>	64
4.3.1	Optimierung der α -Humulenproduktion	65

4.3.2	<i>Scale-up</i> und Kultivierung im Rührkessel-Bioreaktor	69
4.3.3	<i>In situ</i> Produktabtrennung	71
4.3.4	Integrierter Bioprozess zur α -Humulenproduktion	75
4.4	Übergangsmetall-katalysierte Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon	78
4.4.1	Vorversuche	78
4.4.2	Bestimmung der optimalen Reaktionsparameter mittels statistischer Versuchsplanung	80
4.4.3	Katalysatorscreening	83
4.4.4	Semisynthese von Zerumbon	85
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	89
6	MATERIALIEN	96
6.1	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	96
6.2	Verbrauchsmaterialien	98
6.3	Geräte und Software	99
6.4	Kulturmedien, Puffer und Reagenzlösungen	100
6.4.1	Kultivierung	100
6.4.2	Zellaufschluss	103
6.4.3	SDS-PAGE	104
6.4.4	Western-Blot	106
6.4.5	2D-Gelelektrophorese	107
6.4.6	FPLC und Ultrafiltration	108
6.4.7	Bradford-Assay	112
6.4.8	Umsetzungsversuche	113
6.4.9	Malachitgrün-Assay	115
6.5	Stämme	117
6.6	Plasmidkarten	117
7	METHODEN	119
7.1	Stammerhalt	119
7.2	Kultivierung im Schüttelkolben	119
7.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) HUM1810 in TB- oder SB-Medium	119
7.2.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) HUM1810 in ZYP-31-Medium	119
7.2.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) HUM_Mev1510 in ZYP-31(mod)-Medium	120
7.3	Kultivierung im Rührkessel-Bioreaktor	121

7.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) HUM1810 in SB-Medium	121
7.3.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) HUM_Mev1510 in ZYP-31(mod)-Medium	121
7.4	Optische Dichte	122
7.5	Zellaufschluss	122
7.6	SDS-PAGE	123
7.6.1	Probenvorbereitung und Durchführung	123
7.6.2	Kolloidale Coomassie-Färbung	123
7.7	Western Blot	123
7.8	2D-Gelelektrophorese	124
7.8.1	Probenvorbereitung und Durchführung	124
7.8.2	Silberfärbung	125
7.9	Densitometrie	125
7.10	Extraktion und Adsorption von Terpenen aus wässriger Lösung	125
7.11	Gaschromatographie	126
7.12	FPLC	127
7.12.1	Affinitätschromatographie mit IDA-Membranadsorbentien	127
7.12.2	Affinitätschromatographie mit NTA-Chromatographiesäule	128
7.12.3	Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Chromatographiesäule	129
7.13	Bradford-Assay	130
7.14	Umsetzungsversuche	130
7.15	Malachitgrün-Phosphomolybdat-Assay	130
7.16	Übergangsmetall-katalysierte Oxidation von α -Humulen	130
7.17	MnCl ₂ -katalysierte Oxidation von α -Humulen	131
8	ZUSÄTZLICHE EXPERIMENTELLE DATEN	132
8.1	Affinitätschromatographische Isolierung der α -Humulensynthase mit Membranadsorbentien	132
8.2	Affinitätschromatographische Isolierung der α -Humulensynthase mit NTA-Chromatographiesäule	133
8.3	Ionenaustauschchromatographische Isolierung der α -Humulensynthase mit DEAE-Chromatographiesäule	133
8.4	Umsetzungsversuche mit der α -Humulensynthase	135
8.5	Heterologe Produktion von α -Humulen in <i>Escherichia coli</i>	139
8.6	Box-Behnken-Design zur Oxidation von α -Humulen	140
8.7	Oxidation von Humulen mit verschiedenen Katalysatoren	142

LITERATURVERZEICHNIS	145
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	161
TABELLENVERZEICHNIS	165
LEBENS LAUF	168

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung	FS	Farnesensynthase
ADS	Amorphadiensynthase	GC	Gaschromatographie
APP	Anorganische Pyrophosphatase	GE	General Electric
ATP	Adenosintriphosphat	GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
Äq.	Äquivalent	GPP	Geranylpyrophosphat
BFM	Biofeuchtzellmasse	GST	Glutathion-S-transferase
BMGF	Bill and Melinda Gates Foundation	His	Histidin
BSA	Bovine serum albumine	HMBPP	4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enylpyrophosphat
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure	HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A
CDP	Cytidindiphosphat	HMGS	3-Hydroxy-3-methylglutarylsynthase
CDP-ME	4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol	HTS	High throughput screening
CMP	Cytidinmonophosphat	<i>hum</i>	α -Humulensynthase-Gen
CXCR	C-X-C Chemokinrezeptor	HUM	α -Humulensynthase
DC	Dünnschichtchromatographie	IDA	Iminodiessigsäure
DCM	Dichlormethan	IEX	Ionenaustauschchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl	IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
DF	Durchfluss	IPG	Immobilisierte pH-Gradienten
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat	IPM	Isopropylmyristat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ISPR	<i>in situ product recovery</i>
DOXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat	iOWH	Institute for One World Health
DSF	Dynamic scattering fluorometry	IPP	Isopentenylpyrophosphat
E	Eluat	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	LDA	Lithiumdiisopropylamid
F&T	freeze & thaw	MECPPP	2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat
FF	Fast flow	MEP	Methylerythritolphosphat
FID	Flammenionisationsdetektor	MK	Mevalonat-Kinase
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>	mod	modifiziert
FPP	Farnesylpyrophosphat	MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

MS	Massenspektrometrie	Strep	Streptavidin
Mrd.	Milliarde	Tab.	Tabelle
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure	TB	<i>terrific broth</i>
MVA	Mevalonat	tHMGR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase
NTA	Nitrilotriessigsäure	TNF	Tumor Nekrosefaktor
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm	TBHP	<i>tert.</i> -Butylhydroperoxid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	u.a.	unter anderem
PCC	Pyridiniumchlorochromat	UF	Ultrafiltrat
PMD	Phosphomevalonat-Decarboxylase	UV	ultraviolett
PMK	Phosphomevalonat-Kinase	VK	Vorkultur
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	VVK	Vorvorkultur
RT	Raumtemperatur	vvm	<i>vessel volumes per minute</i>
s.	siehe	WHO	World Health Organization
SB	<i>super broth</i>	ZL	Zellysat
SDS	Natriumlaurylsulfat		

1 EINLEITUNG

„König der Gewürze“, „Wurzel des Lebens“, „Kraftknolle“ und „Allheilmittel“ - erst kürzlich zur Heilpflanze des Jahres 2018 gekürt, blickt der Ingwer auf eine lange Geschichte als Gewürz und Heilpflanze in den Ländern Ostasiens zurück. Nicht nur im Ingwer, die Natur bietet uns in vielen Pflanzen eine Vielzahl von Inhaltsstoffen an, die sich durch eine besondere medizinische Wirkung auszeichnen. Die Vielfalt der pflanzlichen Naturstoffe stellt nicht nur ein großes Reservoir für neue, hochpotente Medikamente dar, Naturstoffe aus Pflanzen bilden bereits die Grundlage vieler Arzneimittel. Die sogenannten ätherischen Öle sind chemisch sehr heterogene Gemische und bestehen zum Großteil aus Terpenen, der größten Gruppe an Naturstoffen. Bioaktive Terpene stellen als Wirkstoffe für die Pharmaindustrie interessante Produkte dar. Einige dieser Wirkstoffe haben eine feste Position in der Behandlung von Krankheiten, wie Artemisinin aus dem Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*) gegen Malaria und Paclitaxel aus der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) gegen Krebs.

Traditionell werden Terpene aus ihrer pflanzlichen Quelle natürlich durch Wasserdampfdestillation gewonnen. Doch dieser Weg der Gewinnung bringt viele Probleme: Klimabedingungen, Umweltkatastrophen, Krankheiten und Schädlinge bei den Pflanzen und Missernten wirken sich direkt auf Qualität, Produktionsvolumen und Preis der pflanzlichen Rohstoffe aus. Hinzu kommt, dass durch begrenzte Anbauflächen und hohem Arbeitsaufwand bei Anbau und Ernte der Pflanzen, die Preise für industriell interessante ätherische Öle sehr hoch sind.

Um die hohe Nachfrage an Terpenen zu decken, wird zunehmend nach alternativen, von natürlichen Ressourcen unabhängigen, Produktionsstrategien gesucht. Durch organisch-chemische Methoden konnten eine Vielzahl von Terpenen naturidentisch synthetisiert werden. Allerdings ist meistens eine effiziente und kostengünstige Synthese für diese strukturell sehr komplexen Verbindungen nicht möglich.

In den letzten Jahrzehnten fand besonders in der Biotechnologie ein großer Fortschritt in Richtung der Terpenproduktion statt. Pflanzliche Biosynthesewege können in Mikroorganismen nachgebildet und Terpene *in vivo* produziert werden. So können aus einfachen Verbindungen, wie Glucose, durch Verstoffwechslung im Mikroorganismus hochkomplexe, wertvolle Wirkstoffe bzw. Wirkstoffvorläufer hergestellt werden. Eine anschließende chemische oder enzymatische Modifizierung öffnet nicht nur den Zugang zu

1 EINLEITUNG

bereits bekannten Wirkstoffen. Durch gezielte funktionelle Veränderungen können Verbindungen mit besseren pharmakologischen Eigenschaften produziert werden. Biotechnologische Prozesse erleichtern nicht nur den Zugang zu strukturell anspruchsvollen Terpenen, sie bieten auch eine konstante und nachhaltige Versorgung mit pharmazeutisch verwertbaren Naturstoffen.

2 ZIELSETZUNG

In der vorliegenden Arbeit soll eine biotechnologische Produktionsstrategie für das Sesquiterpenoid Zerumbon entwickelt werden. Hierzu wird eine heterologe Produktion des Vorläufermoleküls α -Humulen in *Escherichia coli* und eine anschließende chemische Modifizierung zum Zerumbon verfolgt.

Die α -Humulensynthase (HUM) aus *Zingiber zerumbet* Smith ist das Schlüsselenzym in der Biosynthese des Zerumbons. Da die Sesquiterpensynthase in der Literatur nur unzureichend beschrieben wurde, soll zunächst eine ausführliche Charakterisierung des Enzyms durchgeführt werden. Um ausreichend Enzymmaterial zur Verfügung zu stellen, wird die HUM rekombinant in einem *E. coli* BL21(DE3)-Stamm produziert und ein flüssigchromatographisches Aufreinigungsverfahren etabliert. Hierfür werden affinitäts- und ionenaustauschchromatographische Verfahren auf ihre Eignung untersucht.

Die durchgeführten Studien zur Enzymcharakterisierung sollen neben der Bestimmung des Produktspektrums, der Substratspezifität und der kinetischen Daten, auch weitere Informationen zur Enzymstabilität und -aktivität liefern. Im Rahmen dieser Arbeiten soll auch ein photometrischer Aktivitätsassay entwickelt werden, der schnell und einfach die Detektion von Terpensynthaseaktivität ermöglichen und eine Alternative zu bisherigen Assays darstellen soll.

Für die heterologe Produktion von α -Humulen steht aus vorangegangenen Arbeiten ein metabolisch optimierter *E. coli* BL21(DE3)-Stamm zur Verfügung. Durch Coexpression eines heterologen, synthetischen Stoffwechselweges zur Isoprenoid-Produktion wird das Sesquiterpen direkt im Mikroorganismus hergestellt. Nach Optimierung der Produktionsbedingungen, sollen für die Isolierung des Terpens aus der Kulturbrühe extraktive Verfahren mit organischen Lösungsmitteln und adsorptive Verfahren mit polyaromatischen Adsorbentien erprobt und verglichen werden.

Im Anschluss soll die chemische Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon erfolgen. Anhand von Literaturstudien soll ein geeignetes Oxidationsverfahren identifiziert und auf die Oxidation von α -Humulen angewandt werden. Durch Ausführen eines statistischen Versuchsdesigns sollen die optimalen Reaktionsbedingungen bestimmt werden, um eine maximale Zerumbonausbeute zu ermöglichen.

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1 Terpene und Terpene

Mit über 30.000 bekannten Vertretern stellen die Terpene die größte und strukturell vielfältigste Klasse der Naturstoffe dar (Degenhardt et al. 2009). Als Kohlenwasserstoffe oder funktionalisiert als sogenannte Terpene, mit Alkohol-, Keto- und Esterfunktionen, sind diese Naturstoffe in der Natur weit verbreitet. Obwohl die Mehrzahl der bisher isolierten Verbindungen pflanzlichen Ursprungs ist, sind Terpene auch in Bakterien, Pilzen und wirbellosen marinen Organismen vertreten (Fraga 2001, 2010; Schulz und Dickschat 2007). Zu ihnen gehören u.a. Steroide, Ubichinone, Carotinoide und das Phytol in den Seitenketten des Chlorophylls. Als Primärmetaboliten sind Terpene für das Überleben der Pflanze essentiell (Trapp und Croteau 2001; Chen et al. 2011) und übernehmen diverse Aufgaben in der Atmungskette, der Photosynthese, dem Aufbau der Zellmembran und der Regulation des Zellwachstums (McGarvey und Croteau 1995; Bach und Rohmer 2013; Bennett 1983; Bohlmann et al. 1998). In ihrer Hauptrolle als Sekundärmetaboliten sind Terpene in pflanzlichen Abwehr- und Schutzmechanismen beteiligt (Unsicker et al. 2009) und dienen als Lockstoffe für Bestäuber (Raguso und Pichersky 1995; Pichersky und Gershenzon 2002) und als Signalstoffe zur Kommunikation zwischen Pflanzen (Arimura et al. 2002). Für den Menschen spielen Terpene als Duft- und Aromastoffe (z. B. Limonen, Menthol, Patchouli) eine große Rolle, sowie als Wirkstoffe zur Behandlung von Krankheiten (z.B. Artemisinin).

Isopren findet sich als einfacher C5-Grundbaustein in der chemischen Struktur aller Terpene wieder. Die biosynthetische Grundlage stellen die aktive Form Isopentenylpyrophosphat (IPP, **1**) und das entsprechende Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, **2**) dar. Die enzymatische Kondensation beider Verbindungen stellt den ersten Schritt zur Bildung der Terpene dar. Diese Reaktion erfolgt ubiquitär in allen Organismen, allerdings kann die Biosynthese des IPP über zwei völlig unterschiedliche Stoffwechselwege erfolgen: dem Methylerythritolphosphat- (MEP) und dem Mevalonat-Stoffwechselweg (MVA) (Abb. 1).

Ausgangsverbindung für die Synthese von IPP über den MVA-Weg ist Acetyl-CoA (**3**), das in einer Kondensationsreaktion über Acetoacetyl-CoA (**4**) zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA, **5**) reagiert. Das HMG-CoA wird durch die HMG-CoA-Reduktase zur namensgebenden Mevalonsäure (MVA, **6**) umgesetzt.

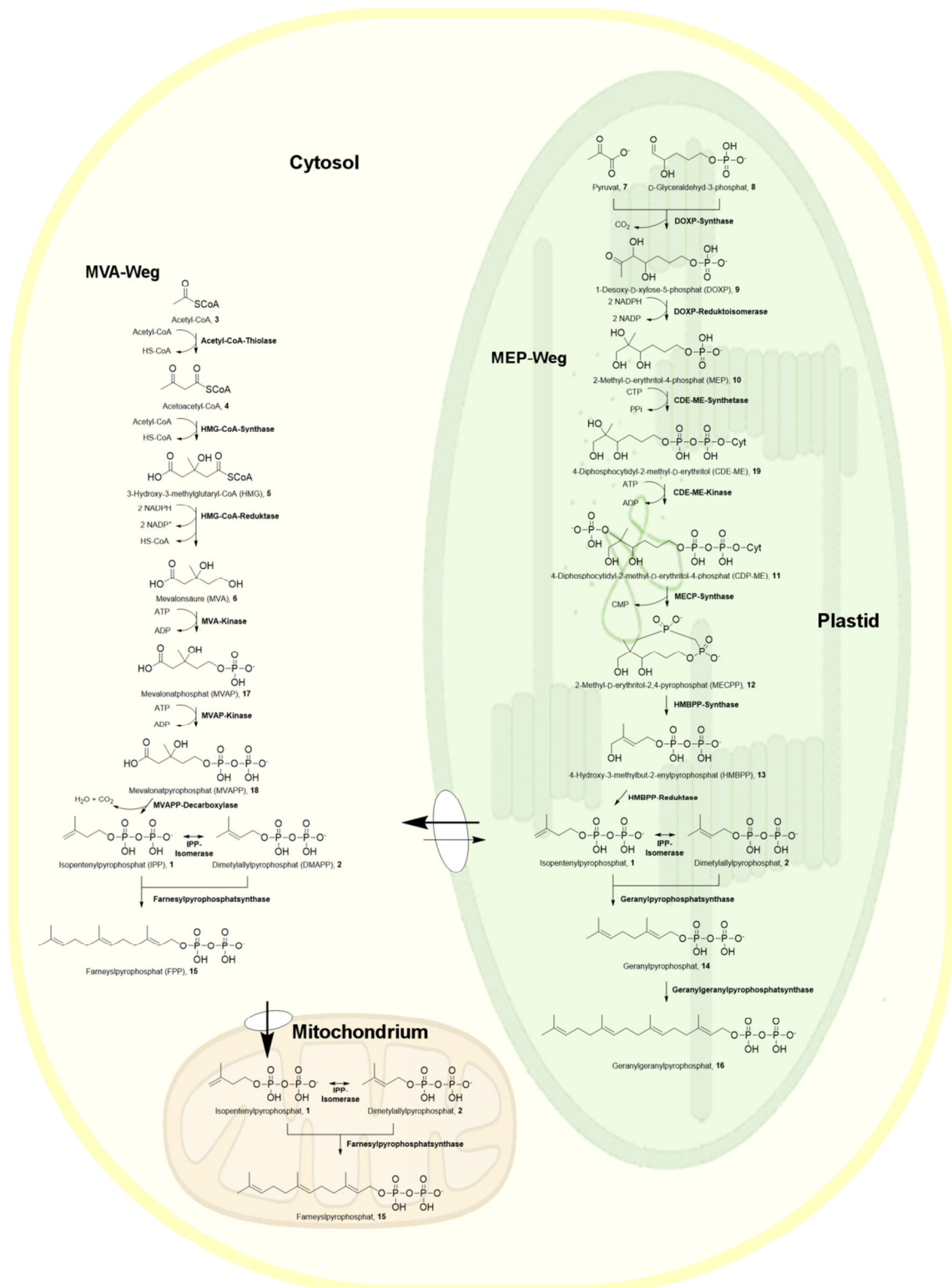


Abbildung 1: Kompartiment-spezifische Isoprenoidbiosynthese in Pflanzenzellen.

Zwischen dem cytosolischen MVA-Weg und dem plastidischen MEP-Weg findet ein sogenannter *cross talk* statt.

Die finalen Schritte zum IPP im MVA-Weg beinhalten zwei Phosphorylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen, die durch die MVA-Kinase, Mevalonatphosphat(MVAP)-Kinase und Mevalonatpyrophosphat(MVAPP)-Decarboxylase katalysiert werden.

Der MEP-Weg unterscheidet sich grundlegend vom MVA-Weg in den verwendeten Ausgangsverbindungen und den gebildeten Intermediaten. Im MEP-Weg sind sieben Enzyme an der Bildung des IPP aus Pyruvat (**7**) und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (**8**) beteiligt. Die initiale Verknüpfung beider Verbindungen führt zum 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat (DOXP, **9**), welches durch die DOXP-Reduktase zu 2-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (**10**) reduziert wird. In den nächsten Schritten wird zunächst Cytidindiphosphat (CDP) an MEP angeknüpft und das entstandene Produkt durch die CDP-ME-Kinase unter ATP-Verbrauch zu 4-Diphosphocytidyl-2-methyl-D-erythritol-4-phosphat (CDP-ME, **11**) umgesetzt. Unter Abspaltung von Cytidinmonophosphat (CMP) findet eine Cyclisierung zu 2-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat (MECPP, **12**) statt, das anschließend über 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enylpyrophosphat (HMBPP, **13**) zu IPP (**1**) reagiert.

Die Verbreitung beider Stoffwechselwege ist innerhalb der Organismengruppen unterschiedlich (Lange et al. 2000). Gram-negative Eubakterien und Cyanobakterien nutzen zur Isoprenoidsynthese den MEP-Weg, während gram-positive Eubakterien und Archaea dafür den MVA-Weg besitzen. In höheren Pflanzen sind beide Stoffwechselwege vorhanden, allerdings zeigen sie ein höchst Kompartiment-spezifisches Vorkommen auf. Während sich im Cytosol der MVA-Weg befindet, wird IPP in den Plastiden über den MEP-Weg gebildet. Das in den verschiedenen Kompartimenten gebildete IPP fließt auch in andere Kompartiment-spezifische Isoprenoidsynthesen ein (Eisenreich et al. 1998; Lange und Ghassemian 2003). So wird das über den MVA-Weg gebildete IPP auch in der mitochondrialen Terpensynthese verwendet (Gutensohn et al. 2013).

Die Synthese der Prenylpyrophosphate aus IPP und DMAPP erfolgt in pflanzlichen Organismen auf Basis einer Kaskade von Kondensationsreaktionen. Durch enzymatische Verknüpfung der nucleophilen Methylen-Gruppe des IPP mit der elektrophilen Allyl-Gruppe des DMAPP entsteht das Geranylpyrophosphat (GPP, C10, **14**), welches die direkte Vorstufe von Monoterpenen ist. Der Einbau eines weiteren IPP-Moleküls führt zum Sesquiterpen-Vorläufer Farnesylpyrophosphat (FPP, C15, **15**), welches wiederum in einer analogen Reaktion mit IPP zu Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, C20, **16**), dem Diterpen-Vorläufer, reagiert. Höhermolekulare Terpenvorläufer werden durch die Verknüpfung von Prenylpyrophosphaten gebildet. So entstehen durch Dimerisierung zweier FPP- bzw. GGPP-Moleküle

Presqualenpyrophosphat (C30) bzw. Prephytoenpyrophosphat (C40). (Chappell 1995; McGarvey und Croteau 1995)

Die Bildung der strukturell komplexen Ringsysteme der Terpene aus einfachen acyclischen Prenylpyrophosphaten wird durch Terpensynthasen katalysiert. Die Biosynthese der Terpene erfolgt nicht nach einem universellen Mechanismus. Ein gemeinsames Merkmal aller Terpensynthasen ist die Bildung von hochreaktiven Carbokationen. Diese Intermediate durchlaufen ähnliche Reaktionsschritte wie Cyclisierungen, Umlagerungen, Methyl- oder Hydridshifts, die allerdings je nach katalysierender Terpensynthase unterschiedlich ablaufen. (McGarvey und Croteau 1995)

Da die Terpensynthasen als einzige Enzyme an dem Aufbau des Kohlenstoffgrundgerüsts aus Prenylpyrophosphaten beteiligt sind, werden sie auch als Schlüsselenzyme der Terpenbiosynthese bezeichnet. Die Gruppe der Terpensynthasen ist eine große, strukturell und funktionell heterologe Enzymklasse. Über 100 Terpensynthasen konnten direkt aus Pflanzen als Protein oder in Form der mRNA isoliert werden, mithilfe derer cDNA-Datenbanken generiert werden konnten (McGarvey und Croteau 1995). Biochemische Untersuchungen zeigten, dass Terpensynthasen aus einer Kette von 550-850 Aminosäuren bestehen und Molekulargewichte im Bereich von 50-100 kDa besitzen (Bohlmann et al. 1998). Sesquiterpensynthasen sind im Allgemeinen um 50-70 Aminosäuren kürzer. Im Vergleich zu anderen Terpensynthasen fehlt ihnen eine N-terminale Signalsequenz zur plastidären Lokalisation. Das pH-Optimum der Terpensynthasen liegt meist im Bereich von pH 6,0-7,5 (Mercke et al. 2000). Nur in wenigen Ausnahmen, wie beispielsweise an der Sesquiterpensynthase epi-Cedrolsynthase aus dem Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*), ist das pH-Optimum mit pH 9,0 ins Basische verschoben (Mercke et al. 1999). Als Cofaktoren werden divalente Ionen wie Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen benötigt (Bohlmann et al. 1998). Ein gemeinsames Merkmal aller Terpensynthasen ist, dass sie mehrere Verbindungen mit zum Teil unterschiedlichen Kohlenstoffgrundgerüsten bilden. So wurden in dem Produktspektrum der γ -Humulensynthase aus der Küsten-Tanne (*Abies grandis*) insgesamt 52 verschiedene Sesquiterpene identifiziert (Steele et al. 1998).

Ein Rückschluss auf die katalytische Funktionalität der Terpensynthasen anhand ihrer Aminosäuresequenz ist nach heutigem Forschungsstand nicht möglich. Es sind in der Natur Beispiele vorhanden, in denen Terpensynthasen zwar in ihrer Aminosäuresequenz eine Homologie von 70-95 % aufweisen, aber ein sehr unterschiedliches Produktspektrum besitzen. Ebenso sind Terpensynthasen bekannt, die mit einer Homologie von weniger als 30 % die gleichen Produkte bilden (Dudareva et al. 2003).

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Mehr als 300 Sesquiterpen-Kohlenstoffgrundgerüste konnten bisher identifiziert werden, von denen durch funktionelle Modifikation mehr als 8.000 natürlich vorkommende Derivate isoliert werden konnten (Breitmaier 2006). Alle Sesquiterpene werden aus dem gleichen acyclischen Terpenvorläufer, dem Farnesylpyrophosphat, gebildet. Die Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, werden als Sesquiterpensynthasen bezeichnet.

Die Bildung von Sesquiterpen-Grundgerüsten ist in Abbildung 2 wiedergegeben. Das lineare Farnesylpyrophosphat (**15**) wird zunächst in einem ionisierenden Schritt zu einem Carbenium-Ion **20** umgewandelt. Dieses hochreaktive Intermediat kann durch einen nucleophilen Angriff einer der beiden C-C-Doppelbindungen bereits zu cyclischen Gerüsten wie **21** und **22** weiterreagieren. Alternativ werden durch die Isomerisierung zum Nerolidylpyrophosphat (**24**) weitere Cyclisierungen ermöglicht. Anschließende Hydridverschiebungen, Deprotonierungen oder Funktionalisierungen von Seitenketten führen zur Bildung der verschiedenen Sesquiterpene. (Degenhardt et al. 2009; Breitmaier 2006)

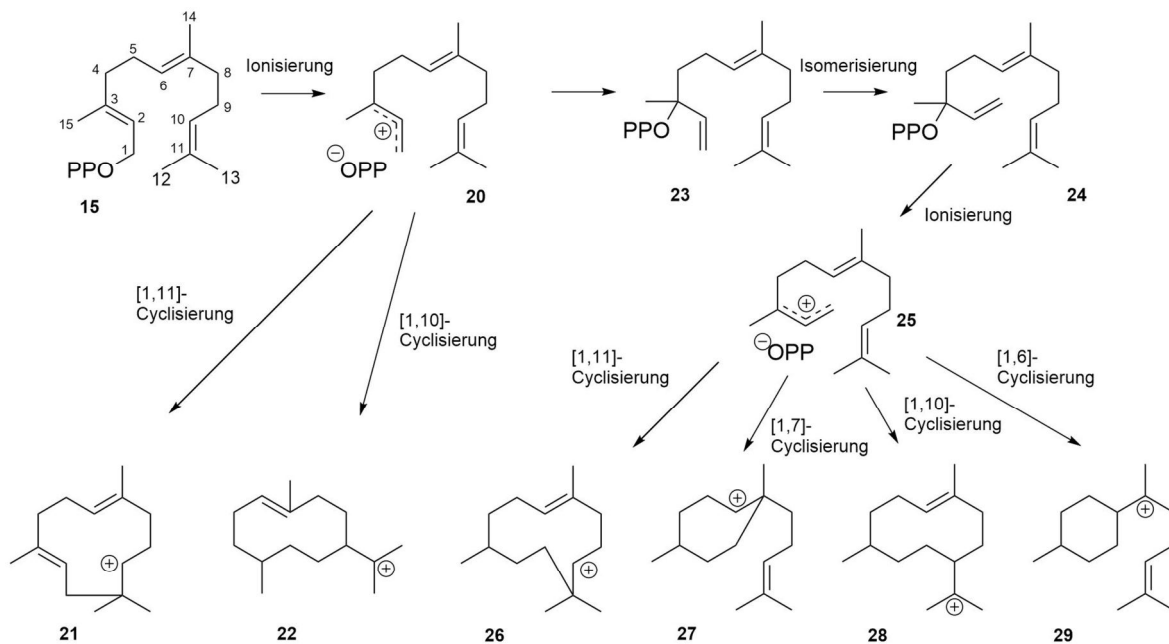


Abbildung 2: Bildung verschiedener Sesquiterpengrundgerüste aus FPP (15).

Es sind nur einige der möglichen Cyclisierungsvarianten dargestellt. (Nach Breitmaier 2006)

Obwohl aus den Carbenium-Ionen **20** und **25** eine Vielzahl von Produkten entstehen kann, wird die Reaktion durch die Sesquiterpensynthasen in Richtung eines bestimmten Endprodukts dirigiert. Die räumliche Struktur des aktiven Zentrums bestimmt die Struktur

der Produkte. Wenige Änderungen in der Aminosäuresequenz und damit in der Struktur des Enzyms können somit große Veränderungen in der Produktspezifität verursachen.

3.2 Naturstoffe: ein neues goldenes Zeitalter in der Wirkstoffforschung?

Die Verleihung der Nobelpreise im Jahre 1945 für die Entdeckung von Penicillin und 1952 für die Entdeckung von Streptomycin waren entscheidende Vorreiter für die goldene Ära der Naturstoffe in den 1950er bis 1960er Jahre. Naturstoffe besitzen eine enorme strukturelle und chemische Diversität und ein breites Spektrum an Wirkeigenschaften, die bisher durch keine Datenbank synthetischer Verbindungen überboten werden konnte. Nach Daten der Weltgesundheitsbehörde (WHO) stellen Heilpflanzen für ca. 80 % der Weltbevölkerung die Grundlage der Gesundheitsversorgung dar (Ekor 2014). Obwohl pflanzliche Präparate weitgehend aus der Schulmedizin verschwunden sind, besitzen natürliche Wirkstoffe auch in Industrienationen eine wichtige Rolle in der Behandlung von Krankheiten. Die Quellen von bioaktiven Naturstoffen beschränken sich dabei nicht nur auf Pflanzen. Auch aus Mikro- bzw. marinen Organismen und Tieren werden Wirkstoffe gewonnen.

Von den 1.562 neuen Arzneimitteln, die zwischen 1981 und 2014 weltweit entwickelt wurden, sind 41 % „natürlichen“ Ursprungs (Naturstoffe, semisynthetische Naturstoffderivate, vollsynthetische Naturstoffmimetika und vollsynthetische Wirkstoffe mit natürlichem Pharmakophor) (Newman und Cragg 2016) (Abb. 3). Allein in der Krebstherapie lassen sich 62 % der zugelassenen Medikamente auf Strukturen aus der Natur zurückführen (Cragg et al. 1997). Ein prominentes Beispiel darunter ist Paclitaxel, ein Diterpen aus der Rinde der Pazifischen Eibe, das unter den Handelsnamen Taxol[®] und Genexol[®] vertrieben wird. Bei den Antinfektiva sind 63 % der Arzneien natürlichen Ursprungs (Cragg et al. 1997), u.a. das Sesquiterpen Artemisinin aus dem Einjährigen Beifuß, das bereits vor 2.000 Jahren von den Chinesen gegen Malaria eingesetzt wurde. Morphin und Codein, beides Opiate aus dem Schlafmohn, werden als Schmerzmittel bzw. Sedativum seit langem in der Medizin verwendet. Ebenso wie Digitalis aus dem Fingerhut, das seit der Zeit der Pharaonen gegen Herzinsuffizienz eingesetzt wird. Als größte Gruppe an Naturstoffen stellen Terpene und Terpenoide einen großen Pool an potentiellen Wirkstoffkandidaten dar. Im Jahr 2002 betrug der weltweite Umsatz allein an terpen-basierten Wirkstoffen 12 Mrd. US-Dollar (Zhang und Demain 2005).

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

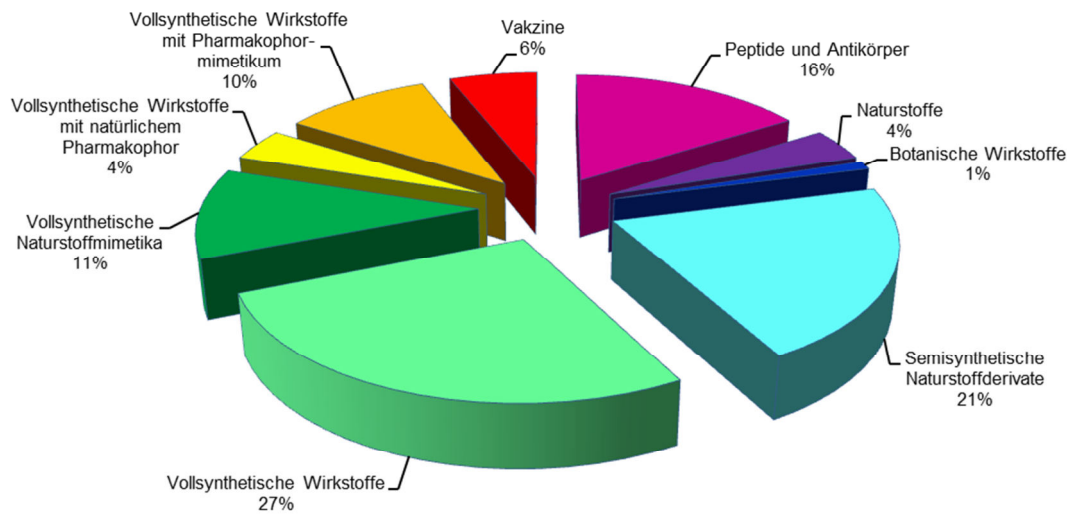


Abbildung 3: Durch die U. S. Food and Drug Administration zugelassene Wirkstoffe von 1981-2014. Darstellung der Herkunft von 1562 neu zugelassenen Medikamenten. (Nach Newman und Cragg 2016)

Die Vorteile des Hochdurchsatz-Screenings (*high throughput screening*, HTS) und der kombinatorischen Synthesen in der Produktion großer Bibliotheken von synthetischen niedermolekularen Stoffen verdrängten zunächst gegen Ende des 20. Jahrhunderts die Suche nach neuen Wirkstoffen in der Natur. Trotzdem stellen Naturstoffe bis dato die größte Quelle von Leitstrukturen für das Wirkstoffdesign dar.

Die Entwicklung auf dem Arzneimittelmarkt zeigt, dass in den letzten 30 Jahren kein synthetischer Wirkstoff einen bereits etablierten Naturstoff verdrängen konnte (Shen 2015). Die Fortschritte in der mikrobiellen Genomforschung, der synthetischen Biologie und die umfassende Aufklärung von Biosynthesewegen sowie neue bioinformatische und analytische Methoden ermöglichen es schnell und gezielt Naturstoffe zu isolieren, identifizieren und charakterisieren. Anders als bei Duft- und Aromastoffen in Lebensmitteln, wo die Deklaration „natürlich“ einen sehr hohen Stellenwert in der Gesellschaft besitzt, ist bei einem Arzneimittel der wissenschaftliche Beweis der gewünschten Wirkung und Sicherheit entscheidend. Dadurch werden in der Wirkstoffdarstellung alle möglichen Produktionsmethoden von der Isolierung aus natürlichen Quellen über chemische Synthese bis zur biotechnologischen Herstellung bereitgestellt.

3.3 Biotechnologische Produktion von pharmazeutisch wertvollen Terpenen

Die Herstellung und Isolierung von Terpenen basiert seit Jahrhunderten auf der Extraktion aus pflanzlichem Material. Erst der technische Fortschritt ermöglichte die Strukturaufklärung vieler terpenoider Substanzen und die Entwicklung von synthetischen Verfahren. So gibt es heute beispielsweise ein fest etabliertes Verfahren für die synthetische Produktion des Monoterpenoids Menthol (Bergner et al. 2010). Trotz der fortgeschrittenen organisch-synthetischen Methoden sind derzeit viele Terpene synthetisch schlecht zugänglich. In solchen Fällen bieten biotechnologische Verfahren eine interessante Alternative dar. Es muss jedoch beachtet werden, dass die industrielle Umsetzung biotechnologischer Prozesse aus verfahrenstechnischen Gründen meist erschwert ist. Dazu zählen

- die Toxizität der Substrate und Produkte auf den produzierenden Organismus,
- geringe Produktausbeuten,
- die Flüchtigkeit der Produkte und damit verbundener Ausbeuteverlust,
- die Instabilität der Terpensynthasen und
- die schwierige Kultivierung des Produktionsorganismus, z.B. Pflanzenzellen.

Von der Vielzahl an biotechnologischen Strategien zur Produktion terpenoider Wirkstoffe wurden bislang nur wenige Verfahren industriell realisiert: die semisynthetische Produktion des Malariamittels Artemisinin und die Produktion des Krebswirkstoffs Paclitaxel in Pflanzenzellkulturen.

Artemisinin-Kombinationspräparate stellen bis dato die effektivste Behandlungsmöglichkeit gegen Malariaerkrankungen dar (World Health Organization 2013). Im Rahmen eines Non-Profit-Projekts der one-World-Health (iOWH) und der Gates Foundation (BMGF) arbeitete Sanofi seit 2008 an der Industrialisierung eines semisynthetischen Zugangs für Artemisinin. Da die Extraktion des Wirkstoffs aus der natürlichen Quelle nicht die hohe Nachfrage stillen konnte, wurde ein nachhaltiges semisynthetisches Produktionsverfahren in Kooperation von Keasling et al. und Amyris, Inc. entwickelt. Durch die Anwendung moderner Methoden des *metabolic engineering* wird das Precursormolekül Artemisininsäure (**30**) in genetisch modifizierter *Saccharomyces cerevisiae* gebildet und anschließend chemisch zu Artemisinin (**31**) umgesetzt (Abb. 4).

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

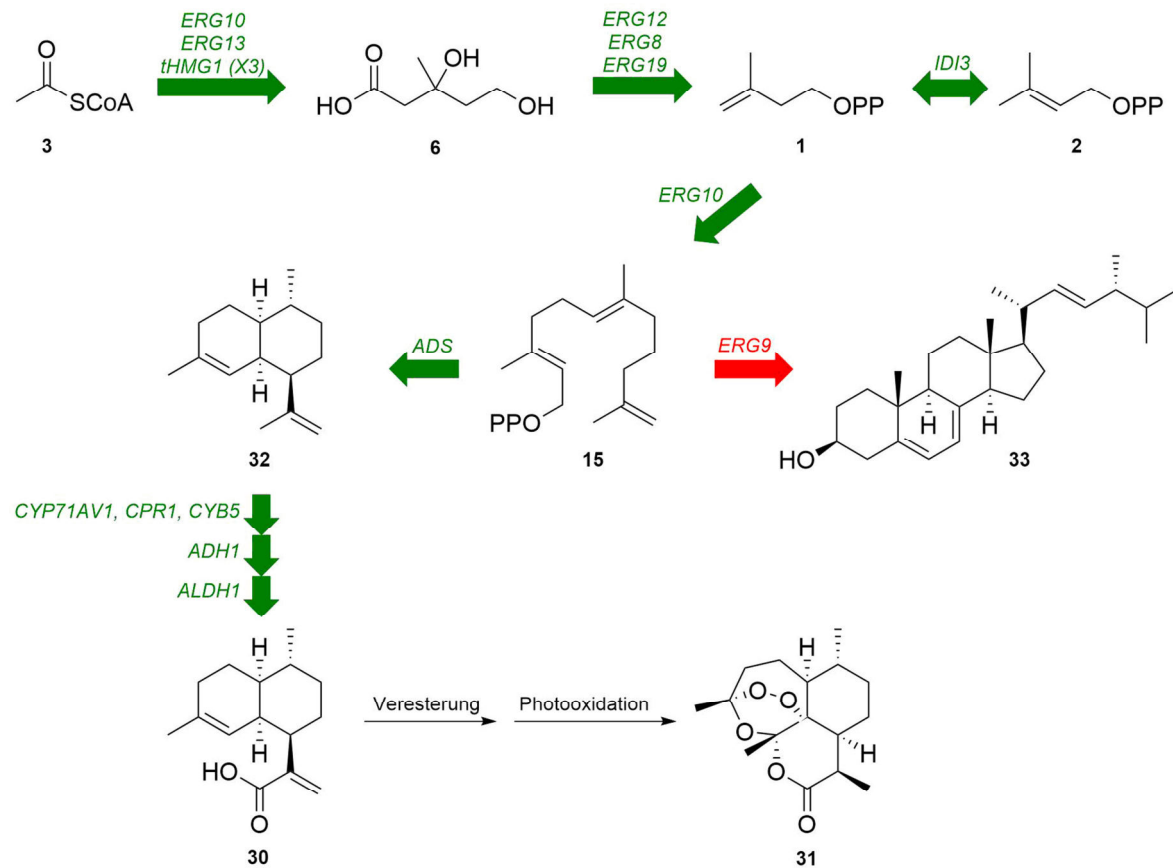


Abbildung 4: Semisynthese von Artemisinin (31).

Produktion von Artemisininsäure (30) durch metabolisch optimierte Bäckerhefe *S. cerevisiae* und anschließende Photooxidation zu Artemisinin (31). Grüne Pfeile = hochregulierte Gene in *S. cerevisiae*, rote Pfeile = runterregulierte Gene in *S. cerevisiae*, schwarze Pfeile = chemische Synthese.

Die Entwicklung des Produktionsstammes umfasst eine Reihe von molekularbiologischen Eingriffen in die Zelle. Die Isoprenoidsynthese findet in Hefezellen über den MVA-Stoffwechselweg statt. Um genug Prenylpyrophosphate in der Zelle zu erzeugen, wurde die Expression der Terpenbiosynthesegene hochreguliert. In konkurrierende, jedoch essentielle Biosynthesewege, wie die Ergosterolsynthese, wurde der metabolische Flux gering gehalten, indem diese auf genetischer Ebene runterreguliert wurden. Die Gensequenz der Amorphadiensynthase (ADS) wurde rekombinant in das Genom der *S. cerevisiae* integriert. Die Sesquiterpensynthase katalysiert die Bildung von Amorpha-4,11-dien (32) aus FPP. Parallel wurden auch die Gene fünf weiterer Enzyme in die Zellen transformiert, die für die Bildung von Artemisininsäure (30) aus Amorpha-4,11-dien (32) in einer dreistufigen Reaktionskaskade verantwortlich sind: Amorpha-4,11-dien-Monooxygenase aus *A. annua* (*CYP71AV1*), Cytochrom P-450 Reduktase (*CPR1*), Cytochrom b5 (*CYB5*), Artemisininalkohol-

Dehydrogenase aus *A. annua* (*ADH1*) und Artemisininaldehyd-Dehydrogenase aus *A. annua* (*ALDH1*).

Die Produktion von Artemisininsäure im Produktionsstamm *S. cerevisiae* Y1284 erfolgt in einem integrierten fed-batch-Bioprocess, der zur *in situ* Isolierung des Sesquiterpens mit 50 % (v/v) Isopropylmyristat (IPM) als Zwei-Phasen-System betrieben wird. Durch den Ethanol-Feed werden im Fermentationsprozess Produktiter von 25 g·L⁻¹ erreicht. Die jährliche Artemisininsäureproduktion nach diesem Verfahren beläuft sich auf 100 t. (Paddon et al. 2013; Paddon und Keasling 2014; Tsuruta et al. 2009)

Das kristalline Produkt wird in einem Photoreaktor in einer vierstufigen Eintopfsynthese zu Artemisinin weiterverarbeitet. Dihydroartemisininsäure, welche durch Hydrierung aus Artemisininsäure hergestellt wird, wird in einer photokatalysierten Reaktion durch Veresterung aktiviert und cyclisiert mit einer Gesamtausbeute von 55 % zu Artemisinin (Farret 2010; Peplow 2013). Im Jahr 2013 wurden nach diesem Verfahren 35 t semisynthetisches Artemisinin produziert, welches 70 Mio. Behandlungsdosen gegen Malaria entspricht (Keasling 2013).

Nicht jede Biosynthese eines Naturstoffs kann effizient in Mikroorganismen nachgebildet werden. Paclitaxel ist ein hoch funktionalisiertes Diterpen, das in 19 Schritten aus GGPP biosynthetisch produziert wird (Croteau et al. 2006). Bislang konnten allerdings nur zehn Gene identifiziert werden, die in der Biosynthese involviert sind. Kommerziell wurde Paclitaxel lange Zeit semisynthetisch aus 10-Deacetylbaaccatin III produziert, ein Taxan, welches aus den Nadeln der Europäischen Eibe gewonnen wird (Ganem und Franke 2007). Führender Hersteller von Paclitaxel ist heute Phyton Biotech. In Reaktorkapazitäten von bis zu 75.000 L wird Paclitaxel in Pflanzenzellkulturen produziert und deckt damit 60 % des globalen Jahresbedarfs des Chemotherapeutikums ab (Wink et al. 2005). Der genaue Produktionsprozess wurde bislang allerdings nicht der Öffentlichkeit zugänglich gemacht.

Unter dem Handelsnamen Genexol[®] stellte erstmals das koreanische Unternehmen Samyang Genex Paclitaxel aus Pflanzenzellkulturen her (Choi et al. 1998). Die Paclitaxel-Produktion mit der Produktionszelllinie *Taxus chinensis* SYG-1 wird in einem semi-kontinuierlichen Prozess durchgeführt, bei dem ein partieller Mediumwechsel nach definierten Zeitintervallen stattfindet. In zwei 21-tägigen Kulturzyklen wird dafür die Kultur im Verhältnis 1:5 auf frisches Medium überimpft. Die spezifische Medienzusammensetzung während der beiden Zyklen ist dabei entscheidend für die Paclitaxel-Ausbeute. Im ersten Zyklus wird das frisch inokulierte B5-Medium mit 10 µM AgNO₃ versetzt und nach 9 Tagen Ammoniumcitrat zu einer Konzentration von 5 mM und 2 % (w/v) Maltose zugegeben. Im zweiten Zyklus wird

das B5-Medium nur mit 3 % (w/v) Maltose zusätzlich versetzt. Der Paclitaxel-Titer nach diesem semi-kontinuierlichen Verfahren beträgt $284 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Weitere biotechnologische Verfahren für bioaktive Terpene sind auf die Forschung im akademischen Bereich beschränkt. Ein vielversprechendes Verfahren, das im industriellen Maßstab umgesetzt werden könnte, stellt ein integrierter Bioprozess zur Perillasäure-Herstellung dar (Mirata et al. 2010). Perillasäure ist aufgrund seiner antibakteriellen Eigenschaften sowohl für die Kosmetik- als auch Pharmaindustrie eine sehr interessante Verbindung. Die Perillasäure-Produktion erfolgt durch Oxidation von Limonen durch das gram-negative Bakterium *Pseudomonas putida* DSM 12264. Hohe Limonen und Perillasäure-Konzentrationen wirken sich hemmend auf die biotransformatorische Oxidation aus. Durch kontinuierliche Abreicherung von Perillasäure über einen Anionentauscher und kontinuierliche Zufuhr von Limonen wird der inhibierende Effekt umgangen und Perillasäure-Titer von $31 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht.

3.4 Zerumbon: ein bioaktives Sesquiterpenoid

Mit 53 Gattungen und mehr als 1.200 Arten sind die Zingiberacea (Ingwergewächse) die artenreichste Familie der Pflanzenordnung der Ingwerartigen. Die schwerpunktmäßig in Süd- und Südostasien wachsenden Pflanzen werden als Zierpflanzen sowie Gewürz- und Heilpflanzen vom Menschen genutzt. Ein populärer Vertreter der Zingiberacea-Familie ist der *Zingiber zerumbet* Smith (Abb. 5).



Abbildung 5: *Zingiber zerumbet* Smith.

(Links) Kegelförmige, rote Blüten der Pflanze (Aihuhua 2013). (Rechts) Rhizom eines jungen Shampoo Ingwers (Ngo 2014).

Die roten, kegelförmigen Blüten der tropischen Pflanze enthalten im reifen Zustand einen weißen, schleimigen Saft, der reich an natürlichen Tensiden ist und von indigenen Völkern zur Haarwäsche genutzt wird. Von wissenschaftlicher Bedeutung ist allerdings nicht der Spross der Pflanze, sondern die dicht an der Erdoberfläche wachsende Sprossachse: das Rhizom.

Das durch Wasserdampfdestillation gewonnene ätherische Öl aus dem Rhizom des *Zingiber zerumbet* Smith ist eine reiche Quelle an chemischen Metaboliten, wie Polyphenolen, Alkaloiden und Terpenen. Mit einem Anteil von bis zu 48,1 % ist das Sesquiterpenoid Zerumbon am stärksten im ätherischen Öl vertreten, das im besonderen Fokus pharmakologisch-chemischer Untersuchungen steht.

3.4.1 Biosynthese und alternative Synthesestrategien

Zerumbon wurde erstmals 1956 aus dem ätherischen Öl des Shampoo Ingwer Rhizoms isoliert und 1960 von Dev strukturell charakterisiert. Das Sesquiterpenoid besteht aus einem monocyclischen Grundgerüst aus 15 Kohlenstoffatomen, in dem drei C-C-Doppelbindungen vorhanden sind. Zwei dieser Doppelbindungen sind mit einer Carbonylgruppe konjugiert. Trotz der großen Popularität des Zerumbons, besonders in der Pflanzenheilkunde, wurde die Biosynthese des Zerumbons in *Zingiber zerumbet* Smith erst 2011 von Yu et al. aufgeklärt (Abb. 6). Wie bereits an der strukturellen Ähnlichkeit zu erkennen ist, wurde angenommen, dass das Sesquiterpen α -Humulen ein direkter Vorläufer des Zerumbons in der Pflanze sein muss. Beide Verbindungen unterscheiden sich nur durch eine Carbonylfunktion an C8-Position. Aus *Zinger zerumbet* Smith konnte 2008 die Gensequenz einer α -Humulensynthase isoliert und in *E. coli* rekombinant exprimiert werden (Yu et al. 2008). Diese Sesquiterpensynthase katalysiert die Reaktion von (2E,6E)-FPP zu α -Humulen (**34**) und β -Caryophyllen (**35**). Nach Abspaltung des Pyrophosphats im initialen Schritt, findet eine [1,1]-Cyclisierung zum Humulylkation **21** statt. Dieses kann durch Deprotonierung direkt zu α -Humulen (**34**) reagieren oder bildet nach einer zusätzlichen Cyclisierung den Bicyclus β -Caryophyllen (**35**). Obwohl α -Humulen ein in der Natur sehr weit verbreiteter Naturstoff ist, ist die Synthese aus dem Shampoo Ingwer das einzige bekannte Enzym, das α -Humulen mit 95 % als Hauptprodukt bildet.

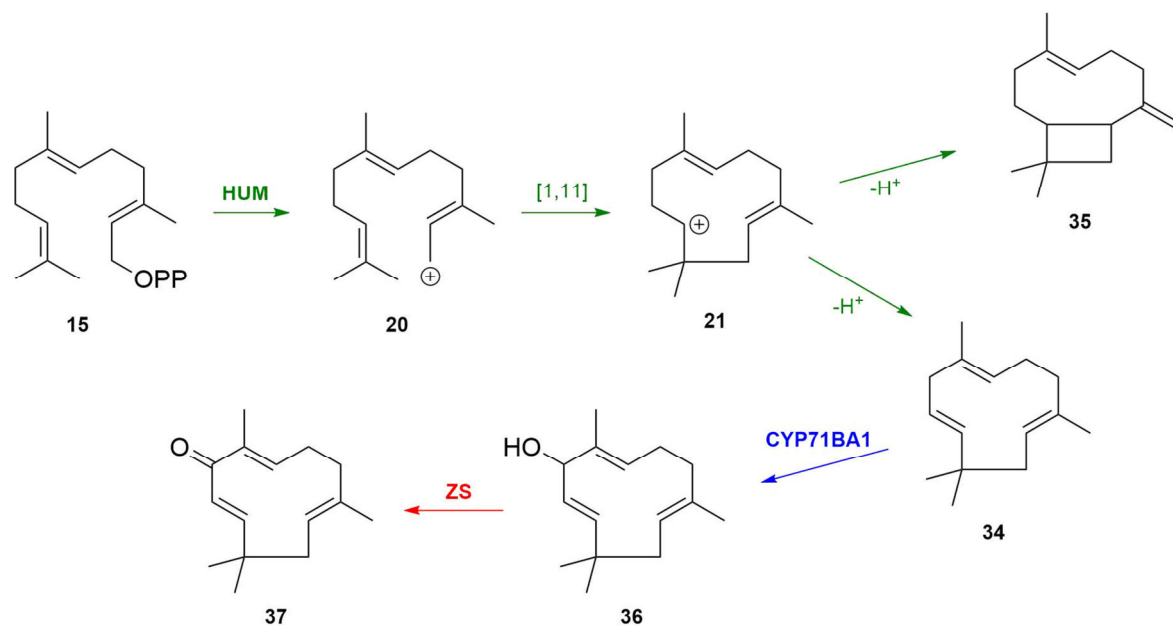


Abbildung 6: Biosynthese von Zerumbon (37).

Im nächsten Schritt wird eine Hydroxyfunktionalisierung an C8-Position eingeführt. YU beschrieb 2011 eine Cytochrom P450 Monooxygenase CYP71BA1, die fast ausschließlich im Rhizom des *Zingiber zerumbet* Smith exprimiert wird (Yu et al. 2011). Die Monooxygenase katalysiert die Bildung von 8-Hydroxy- α -humulen bzw. Zerumbol (36) aus α -Humulen. Erst in einem dritten enzymatischen Schritt wird das Zerumbon (37) mithilfe der Zerumbonsynthase, einer NAD⁺-abhängigen Alkoholdehydrogenase, gebildet (Okamoto et al. 2011).

Kommerziell erhältliches Zerumbon wird aus dem ätherischen Öl des *Zingiber zerumbet* Smith isoliert. Nichtsdestotrotz wurden verschiedene Versuche unternommen, das Sesquiterpenoid auf alternativen Wegen zu produzieren. Hierzu zählen chemisch-synthetische und biokatalytische sowie biotechnologische Strategien. Biokatalytische Ansätze Zerumbon mittels direkter Oxidation aus α -Humulen herzustellen, resultierten nur in verschiedenen Humulenoxiden und nicht dem gewünschten Produkt (Shirahama et al. 1981). Auch die direkte chemische Oxidation an C8-Position stellte eine kritische Strategie dar, da hauptsächlich das Humulen-6,7-epoxid gebildet wurde. Shirahama et al. stellten 1981 eine Syntheseroute ausgehend vom Humulen-6,7-epoxid (38) vor (Abb. 7). Das Epoxid wurde durch Behandlung mit Lithiumdiisopropylamid (LDA) zum Allylalkohol 39 geöffnet, welches anschließend mit *tert.*-Butylhydroperoxid (*t*BuOOH) und Vanadylacetylacetonat VO(acac)₂ zum Epoxyalkohol 40 umgesetzt wurde. Mit dem Collins-Reagenz wurde im nächsten Schritt die Oxidation zum Epoxyketon 41 durchgeführt. Nach einer Wolff-Kishner-Reduktion zum

Zerumbol (**36**), wurde die Hydroxygruppe an C8-Position mit Manganoxid zum Keton oxidiert und Zerumbon (**37**) mit einer Gesamtausbeute von 7,6 % erhalten.

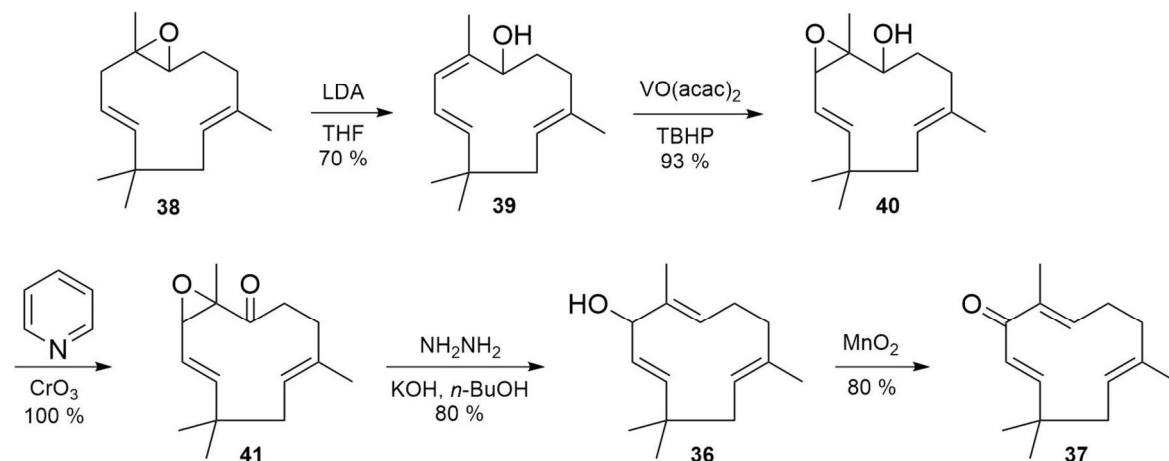


Abbildung 7: Zerumbonsynthese nach Shirahama.

Der erste totalsynthetische Ansatz wurde 1987 von Kodama et al. veröffentlicht (Abb. 8). Grundlage der Synthese ist eine intramolekulare Wittig-artige Reaktion, die zuvor zur Produktion oxyfunktionalisierter makrocyclischer Terpenoide erfolgreich angewandt wurde. Die Zerumbonsynthese beginnt mit der Umsetzung von Geranyl bromid (**42**) zum Ester **43** mit Methylisobutyrat und LDA . Die Funktionalisierung der Doppelbindung an C8 wurde in zwei Syntheseschritten durchgeführt. Die Reaktion mit N-Bromsuccinimid (NBS) und die anschließende Behandlung mit Kaliumcarbonat führte zunächst zum Epoxid **44**. Die Epoxidgruppe wurde in der nächsten Stufe mit Perchlorsäure zum Diol **45** geöffnet. Nachdem die Esterfunktion mit Lithiumaluminiumhydrid zum Alkohol **46** reduziert wurde, wurde mit Natriumperiodat das vicinale Diol oxidativ zum Aldehyd **47** gespalten. In der weiteren Reaktionssequenz wird eine *E*-selektive Wittig-Reaktion durchgeführt und die Aldehydfunktion in einen α,β -ungesättigten Ester **48** überführt. Die terminale Hydroxyfunktion wurde nach Oxidation mit Pyridiniumchlorochromat (PCC) zum Aldehyd **49** als Acetal **50** geschützt. Eine Phosphonylierung mit anschließender Entschützung der Aldehydgruppe führte im letzten Reaktionsschritt in einer Wittig-artigen Cyclisierung zum Dimer als Hauptprodukt und Zerumbon (**37**) als Nebenprodukt. Die Ausbeute an Zerumbon in dieser 11-stufigen Synthese betrug 0,3 %. (Kodama et al. 1987)

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

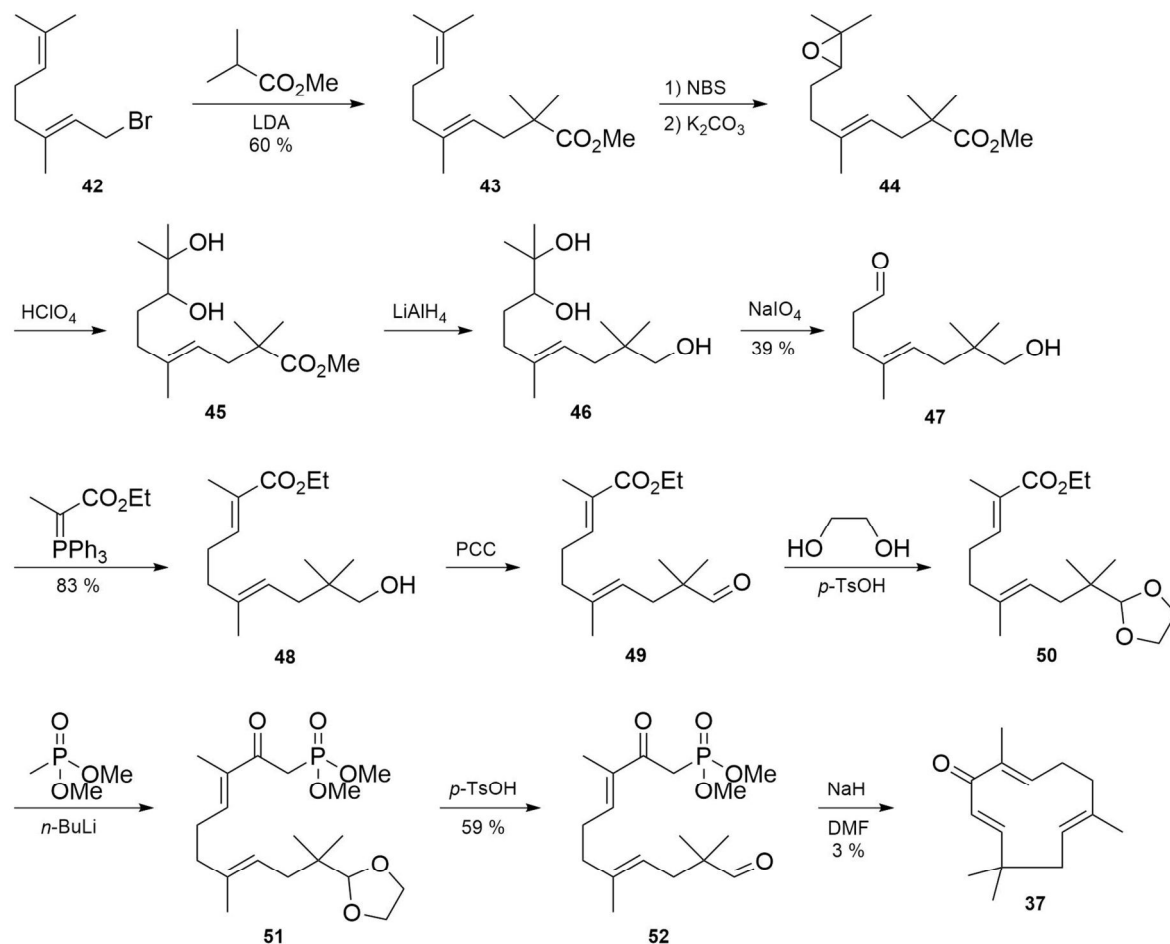


Abbildung 8: Zerumbonsynthese nach Kodama.

Die biotechnologische Produktion von Zerumbon wurde bisher nur an Pflanzenzellkulturen und heterolog in Mikroorganismen untersucht. Jalil et al. isolierten Zerumbon aus *Zingiber zerumbet* Smith Zellen in Suspensionskultur. Dabei wurde beobachtet, dass das Sesquiterpenoid in das Medium abgegeben wird und nur geringe Mengen in der Zellbiomasse verbleiben. In einer Reihe von Optimierungsversuchen stellte sich heraus, dass die Zerumbonproduktion maßgeblich von der Inkubationstemperatur und der Kohlenstoffquelle abhängt. Dabei konnte die höchste Zerumbonausbeute mit $3,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ mit Saccharose als Substrat und einer Inkubationstemperatur von $30 \text{ }^\circ\text{C}$ erzielt werden (Jalil et al. 2015).

Die heterologe Produktion von Zerumbon in Mikroorganismen wurde sehr eng mit der Aufklärung der Biosynthese von Zerumbon in Shampoo Ingwer von Utsumi et al. ausgearbeitet. Zur heterologen Produktion terpenoider Strukturen in *E. coli* wurden zwei Plasmidkonstrukte konstruiert. Das Plasmid pAC-MvATR2Hum enthält neben der kodierenden Gensequenz für die HUM (*hum*) vier Gene des Mevalonat-Stoffwechselweges (Mevalonat-Kinase, Phosphomevalonat-Kinase, Mevalonatdiphosphat-Decarboxylase und

Isopentenylidiphosphat-Isomerase), um über einen heterologen Syntheseweg die zentralen Bausteine der Terpensynthese Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat in ausreichender Konzentration in der Zelle bereit zu stellen. Mit dem Plasmid pET-CYP71BA1 wurde zusätzlich in die Zelle das Gen der Cytochrom P450 Monooxygenase CYP71BA1 inseriert. Mit diesem metabolisch optimierten Produktionsstamm konnte in einfachen *batch*-Kultivierungen in Komplexmedium ein 8-Hydroxy- α -humulen-Titer von $2,972 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht werden (Yu et al. 2011). Obwohl die Zerumbonsynthese aktiv in *E. coli* produziert werden konnte, wurde ein vollständiger heterologer Produktionsweg für Zerumbon bis dato nicht veröffentlicht.

3.4.2 Pharmakologische Eigenschaften

In der Naturheilkunde und Volksmedizin werden Knollen des *Zingiber zerumbet* seit 2.500 Jahren in China und Indien gegen Kopfschmerzen, Rheuma, Übelkeit und Erkältungen eingesetzt. Erst der technische Fortschritt in der Forschung ermöglichte es die komplexe chemische Zusammensetzung des ätherischen Öls des Rhizoms zu charakterisieren und einzelne Komponenten daraus zu isolieren. Obwohl Zerumbon bereits 1956 aus dem ätherischen Öl des Shampoo Ingwers isoliert wurde, begann die intensive Auseinandersetzung mit den pharmakologischen Eigenschaften des Sesquiterpenoids erst zur Jahrtausendwende. Diese sind in Reviews zum Thema *Zingiber zerumbet* Smith und Zerumbon ausführlich beschrieben (Rahman et al. 2014). Im Folgenden werden einige dieser pharmakologischen Effekte und Wirkmechanismen aufgegriffen.

Zerumbon besitzt multiple biomedizinische Eigenschaften, wie eine antiproliferative, entzündungshemmende und antioxidative Wirkung. Reges Interesse gewann Zerumbon durch die antikanzerogene Eigenschaft, die in zahlreichen *in vivo*- und *in vitro*-Studien (Tab. 1) untersucht wurde (Kapoor 2012). Zerumbon weist einen signifikanten antiproliferativen Effekt auf humane Krebszelllinien wie der Leberkrebszelllinie HepG2 ($\text{IC}_{50}=3,45 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 ($\text{IC}_{50}=3,73 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), der Ovarialkarzinom-Zelllinie Caov-3 ($\text{IC}_{50}=4,73 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) und der Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa ($\text{IC}_{50}=5,43 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) auf (Alwi et al. 2007). Zerumbon beeinflusst in vielen Fällen die Signaltransduktion innerhalb der Krebszellen und wirkt dadurch dem Zellwachstum und der Zellvermehrung entgegen. Nicht-entartete Zellen bleiben dabei unbeschädigt oder werden nur minimal beeinträchtigt (Prasannan et al. 2012; Sadhu et al. 2007; Rahman et al. 2013).

Tabelle 1: Beispiele der antikanzerogenen Wirkung von Zerumbon in *in vitro*-Studien.

Organ	Zelllinie	Bioaktivität des Zerumbon
Blut	Humane chronische myeloische Leukämie (KBM-5)	wirkt zytotoxisch (Sung et al. 2008)
	Humanes multiples Myelom (U266)	unterdrückt die CXCR4-Expression (Sung et al. 2009)
Haut	Humanes Melanom (WM1552C)	induziert Apoptose und Autophagie (Yi 2013)
Leber	Humanes Leber-Adenokarzinom (HepG2)	induziert Apoptose durch Hoch- und Runterregulierung von Bax/Bcl-2 Proteinen induziert DNA Fragmentierung (Sakinah et al. 2007)
	Humanes Hepatom (HTC)	wirkt zytotoxisch (Matthes et al. 1980)
Darm	Humanes Darm-Adenokarzinom (Caco-2, Colo320DM und HT-29)	induziert Expression von Interleukin IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor TNF- α (Murakami et al. 2002)
	Humanes Ovarialkarzinom (Caov-3)	inhibiert Zellwachstum und induziert Apoptose senkt die IL-6-Sekretion induziert G2/M Zellzyklusarretierung (Prasanna et al. 2012)
Pankreas	Humanes Pancreaskarzinom (PaCa)	inhibiert JAK2/STAT3 → inhibiert Genexpression, Zellwachstum und Zellmigration (Shamoto et al. 2014)
	Humanes nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (H1299)	inhibiert TNF-induzierte I κ B α -Protein-Degradation und -Phosphorylierung Erhöht TNF-induzierte Cytotoxizität und Apoptose (Takada et al. 2005)

Der zytotoxische Effekt von Zerumbon auf Krebszellen ist auf die pharmakophore α,β -ungesättigte Carbonylfunktion zurückzuführen, die aktiv mit Biomolekülen in der Zelle wechselwirken kann (Murakami et al. 2002). Murakami et al. stellten 2002 die dosisabhängige, antiproliferative Wirkung von Zerumbon auf Zellen diverser humaner Darmkrebs-Zelllinien fest, während gesunde Darm-Fibroblasten weitgehend unbeeinträchtigt blieben. Hoffmann et al. schlugen einen redoxregulierten Mechanismus für die antiproliferative Wirkung von Zerumbon vor. Wird das Redoxpotential der Zelle gestört, werden verschiedene

Mechanismen im Zellmetabolismus induziert. In den Zellen ist L-Glutathion essentiell für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Redoxgleichgewichtes. Zerumbon reagiert über die Carbonylfunktion mit intrazellulärem L-Glutathion zu einem Michael-Addukt, entfernt es aus dem Redoxgleichgewicht und lässt somit das Redoxpotential in der Zelle steigen (Hoffman 2002). Ein erhöhtes Redoxpotential der Zelle induziert die Dephosphorylierung und somit Aktivierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) (Hoffman 2002). Die Aktivierung des Proteins führt zu einer Zellzyklusarretierung, die auch zur Apoptose führen kann.

Das intrazelluläre Redoxpotential von proliferierenden Fibroblasten und proliferierenden Fibrosarcoma beträgt -220 mV bzw. -210 mV (Hutter et al. 1997). In Studien von Hoffmann et al. fand die Dephosphorylierung des Rb-Proteins bei einem Redoxpotential von -205 mV statt. Mit der optimalen Zerumbon-Dosis kann daher die Zellproliferation von Krebszellen gestoppt werden, während das intrazelluläre Redoxpotential der intakten Zellen den kritischen Wert noch nicht überstiegen hat.

Prasanna et al. bezeichneten Zerumbon als Multi-Target-Wirkstoff, der eine Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen unspezifisch beeinflussen kann (Prasanna et al. 2012). So berichteten Takeda et al., dass Zerumbon die Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Aktivität beeinflusst und dadurch antiproliferativ und entzündungshemmend wirkt (Takada et al. 2005). NF- κ B wird durch Kanzerogene, Tumorpromotoren oder inflammatorische Cytokine aktiviert, wodurch verschiedene NF- κ B-induzierte Signalwege die Apoptose der Zellen unterdrücken und die Chemoresistenz und die Tumorgenese fördern. Zerumbon hemmt die Aktivierung von NF- κ B in Tumorzellen, inhibiert konstitutiv aktives NF- κ B und die NF- κ B-regulierte Genexpression. Außerdem wirkt Zerumbon krebsvorbeugend, da die verminderte Genexpression zu einer Unterdrückung der durch TNF-induzierten Streuung von Krebszellen führt (Karin und Greten 2005).

Die Eigenschaft von Zerumbon die Metastasierung von Krebszellen zu unterdrücken, wurde auch von Sung et al. in Brust- und Pankreaskrebszelllinien beobachtet. Zerumbon wirkt als Inhibitor des CXC-Motiv-Chemokinrezeptors-4 (CXCR-4), der eine Schlüsselrolle bei der Mobilisierung und Wanderung von Zellen besitzt (Sung et al. 2008; Zhao et al. 2015). Darüber hinaus ist CXCR-4 an der Förderung der Angiogenese beteiligt (Liekens et al. 2010; Liang et al. 2007). Die Expression des CXCR-4 findet in vielen Tumorarten, wie Haut-, Lungen-, Gehirn-, Pankreas- und Ovarialkarzinomen, statt (Chatterjee et al. 2014; Cabioglu et al. 2005). Außerdem wirkt sich auch hier die inhibierende Wirkung des Zerumbons auf die NF- κ B-Aktivität aus, da NF- κ B an der Regulierung der CXCR-4-Expression direkt beteiligt ist (Zhi et al. 2015; Zhi et al. 2014).

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Yan et al. berichteten erst kürzlich über eine Zerumbon-induzierte Veränderung der Mitochondrien-Funktion in der humanen Melanomzelllinie CHL-1 (Yan et al. 2017). Die Behandlung der Zellen mit Zerumbon beeinträchtigte die mitochondriale Biogenese erheblich und führte zu einer erhöhten Konzentration an reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in den Zellen. In dem Bericht von Kang und Pervaiz wurde bereits erwähnt, dass sich eine signifikante Erhöhung der ROS in der Zelle schädlich auf die Mitochondrien-Funktion auswirkt (Kang und Pervaiz 2012). ROS werden im intakten Zellmetabolismus in einer Redoxreaktion mit Glutathion neutralisiert. Sinkt der Glutathion-Anteil in der Zelle, steigt die Konzentration an ROS an und löst verschiedene Signale zur Apoptose der Zelle aus (Armstrong et al. 2002). Vermutlich ist die molekulare Wechselwirkung von Zerumbon mit Glutathion, die bereits erwähnt wurde, Auslöser der antikanzerogenen Wirkung des Sesquiterpenoids. Allerdings ist die Wirkung auf molekularer Ebene in der Zelle noch nicht eindeutig geklärt und erfordert noch weitere grundlegende Versuche *in vivo* und *in vitro* um den Wirkmechanismus von Zerumbon in der Tumorzelle zu identifizieren.

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

4.1 Rekombinante Produktion der α -Humulensynthase aus *Zingiber zerumbet* Smith in *Escherichia coli*

Die Gensequenz der α -Humulensynthase (HUM) aus *Zingiber Zerumbet* Smith wurde erstmals 2006 von Yu et al. identifiziert und erfolgreich in *Escherichia coli* heterolog produziert (Yu et al. 2008). Eine umfassende Charakterisierung der Sesquiterpensynthase ist seit der erstmaligen Veröffentlichung ausgeblieben, obgleich es das einzige bekannte Enzym ist, das die Produktion von α -Humulen als Hauptprodukt katalysiert und somit eine Schlüsselrolle in der Zerumbonsynthese einnimmt.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete *E. coli*-Stamm zur Produktion der HUM wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von S. Hartwig erzeugt und zur Verfügung gestellt. Die DNA-Sequenz der HUM (*hum*) wurde codonoptimiert, in einen pET16b-Vektor inseriert und anschließend in einen *E. coli* BL21(DE3) Stamm transformiert. Die rekombinante HUM besitzt am N-Terminus eine zusätzliche His10-Sequenz. Die Expression des *hum*-Gens steht unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors, der durch die Zugabe von IPTG induziert wird. Das eingesetzte Plasmid besitzt außerdem mit einer Ampicillinresistenz einen Selektionsmarker, um sicherzustellen, dass nur Zellen, die das Plasmid enthalten, in dem Selektionsmedium überleben. Der Produktionsstamm wird im weiteren Verlauf der Arbeit als *E. coli* HUM1810 bezeichnet.

4.1.1 Optimierung der Expressionsbedingungen

Die Produktion von aktiven und löslichen Terpensynthasen geht in der Literatur immer mit einer geringen Expressionstemperatur einher. Für die HUM wurde nachgewiesen, dass besonders Temperaturen unterhalb von 20 °C eine bessere Produktion von löslichem Enzym gewährleisten (Hartwig 2016). Bei optimaler Wachstumstemperatur von 37 °C für *E. coli* wird die Sesquiterpensynthase nur in unlöslichen *inclusion bodies* hergestellt. Neben der Kultivierungstemperatur spielen auch die Induktorkonzentration und der Induktionszeitpunkt eine wichtige Rolle in der Optimierung der rekombinanten Enzymproduktion. Für die Optimierungsversuche wurde eine konstante Temperatur von 20 °C ausgewählt, die einen

Kompromiss zwischen einer hohen Produktion von löslicher HUM sowie einem guten Zellwachstum gewährleisten soll. In einer linearen Versuchsreihe wurden verschiedene Induktorkonzentrationen gescreent und die heterologe Genexpression zu verschiedenen Phasen des Zellwachstums induziert. Zur Optimierung der heterologen HUM-Produktion in *E. coli* HUM1810 wurden jeweils fünf verschiedene IPTG-Konzentrationen (0,025 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,15 mM und 0,2 mM) und optische Dichten (0,1 rel. AU, 0,5 rel. AU, 1 rel. AU, 3 rel. AU und 4 rel. AU) zur Induktion ausgewählt und getestet. Zunächst wurde der Einfluss des Induktionszeitpunktes auf die Proteinproduktion untersucht.

Die Optimierungsversuche erfolgten in Schüttelkolben im Komplexmedium *Terrific Broth* (TB, s. Abschnitt 6.4.1) mit Carbenicillin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) zur Selektion der Zellen, die das rekombinante Plasmid und somit auch die Antibiotikaresistenz in sich tragen. Die Hauptkulturen wurden auf eine Animpfdichte von $\text{OD}_{600} = 0,1$ rel. AU inokuliert und bei 37°C bis zu einer spezifischen optischen Dichte inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von $0,1$ mM IPTG induziert und die Zellen bei 20°C weiterkultiviert. Unmittelbar vor der Induktion (t_0) und 24 h nach Kultivierungsbeginn (t_1) wurden Proben zur weiteren Analyse der Proteinproduktion entnommen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Kultivierungsansätze untereinander gewährleisten zu können, wurden die entnommenen Proben basierend auf der Zelldichte nach der Formel $V_{\text{Probe}} = 2/\text{OD}_{600}$ normiert. Nach Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde die HUM-Produktion mittels SDS-PAGE analysiert und densitometrisch quantifiziert (s. Abschnitt 7.6 und 7.9) (Abb. 9, Tab. 2).

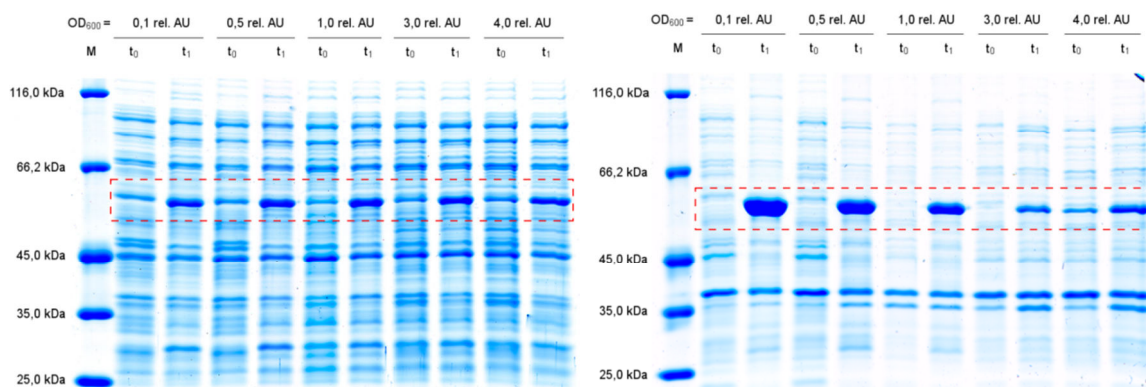


Abbildung 9: Produktion der HUM in *E. coli* HUM1810 in Abhängigkeit vom Induktionszeitpunkt.

Analyse der Produktion der rekombinanten HUM durch SDS-PAGE (10 %). Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und Proben der löslichen (links) und der unlöslichen Zellfraktion (rechts) untersucht. M = Proteinmarker, t_0 = Kulturprobe unmittelbar vor der Induktion mit IPTG, t_1 = Kulturprobe 24 h nach Induktion mit $0,1$ mM IPTG und Genexpression bei 20°C . Die Proben wurden basierend auf der optischen Dichte normiert. Die Laufhöhe der HUM ist rot-gestrichelt umrandet.

Tabelle 2: HUM-Ausbeute in Abhängigkeit des Induktionszeitpunktes.

Analyse der Produktion der HUM in *E. coli* HUM1810. HUM-Konzentrationen in löslicher und unlöslicher Zellfraktion wurden densitometrisch bestimmt und auf die Biofeuchtmasse (BFM) umgerechnet.

OD ₆₀₀ [rel. AU]	0,1	0,5	1,0	3,0	4,0
HUM _{löslich} [mg·g ⁻¹ BFM]	2,58	3,04	3,20	2,65	2,39
HUM _{unlöslich} [mg·g ⁻¹ BFM]	19,30	8,52	5,44	1,80	2,41

Bei allen durchgeführten Kultivierungen konnte nach der Induktion sowohl in der löslichen als auch unlöslichen Zellfraktion bei ca. 67 kDa die HUM-Bande (Größe der HUM mit His10-Tag) auf dem SDS-PAGE-Gel nachgewiesen werden. Positiv ist, dass vor der Induktion durch IPTG keine HUM-Produktion stattgefunden hat. Der *lac*-Operon-gesteuerte T7-Promotor ist demnach ohne Aktivierung nicht „leaky“ und es findet keine unkontrollierte Basalexpression statt. Die densitometrisch bestimmten Daten zur produzierten HUM-Konzentration zeigen zudem, dass der Zeitpunkt der Induktion sich gravierend auf die Produktion an unlöslicher HUM auswirkt. Die HUM-Konzentration zeigt eine Variation von 1,80 - 19,30 mg·g⁻¹ BFM. Wird die Genexpression mit IPTG bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt (OD₆₀₀ = 0,1 rel. AU) induziert, wird im Vergleich zu den restlichen Proben vermehrt HUM gebildet. Eine zu frühe Induktion hat allerdings den Nachteil, dass sich die Produktion des rekombinanten Proteins negativ auf das bakterielle Wachstum auswirkt. Ein später Induktionszeitpunkt dagegen führt zu einer insgesamt verringerten HUM-Produktion. Der Anteil an löslicher HUM unterscheidet sich in allen Proben nur gering. Da unter allen getesteten Induktionszeitpunkten die höchste lösliche HUM-Konzentration mit 3,20 mg·g⁻¹ BFM bei einer Induktion bei OD₆₀₀ = 1,0 rel. AU erreicht wurde, wurde dieser Zeitpunkt bei weiteren Versuchen zur Expressionsoptimierung zur Induktion weiterverwendet.

Die Kultivierungen zur Ermittlung der optimalen Induktorkonzentration erfolgten analog zu den bereits beschriebenen Versuchen. Nachdem die Hauptkulturen bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 1,0 rel. AU inkubiert wurden, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG induziert und die Zellen bei 20 °C weiterkultiviert. Um die Proteinproduktion zu analysieren, wurden normierte Proben unmittelbar vor der Induktion (t₀) und 24 h nach Kultivierungsbeginn (t₁) entnommen. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die löslichen und unlöslichen Fraktionen mittels SDS-PAGE und Densitometrie untersucht und quantifiziert (Abb. 10, Tab. 3).

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

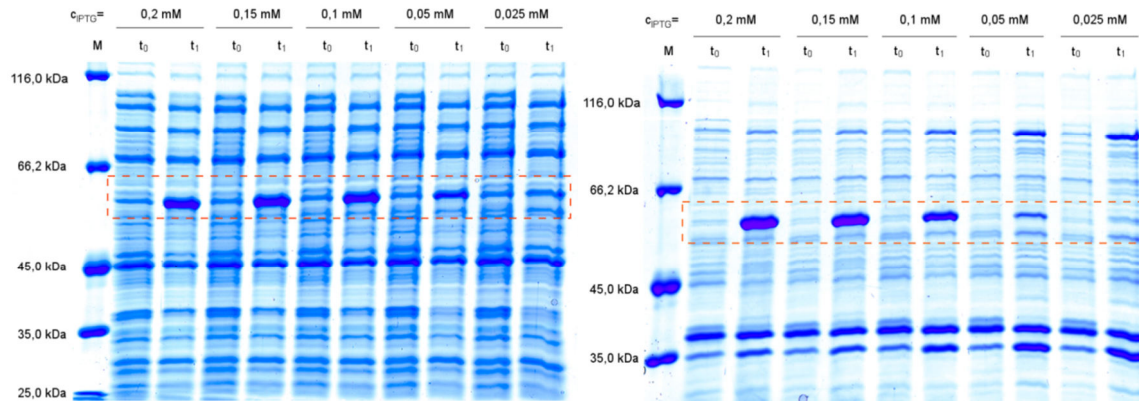


Abbildung 10: Produktion der HUM in *E. coli* HUM1810 in Abhängigkeit der Induktorkonzentration.

Analyse der Produktion der rekombinanten α -Humulensynthase durch SDS-PAGE (10 %). Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und Proben der löslichen (links) und der unlöslichen Zellfraktion (rechts) untersucht. M = Proteinmarker, t_0 = Kulturprobe unmittelbar vor der Induktion mit IPTG, t_1 = Kulturprobe 24 h nach Induktion mit IPTG und Genexpression bei 20 °C. Die Proben wurden basierend auf der optischen Dichte normiert. Die Laufhöhe der HUM ist rot-gestrichelt umrandet.

Tabelle 3: HUM-Ausbeute in Abhängigkeit der Induktorkonzentration.

Analyse der Produktion der HUM in *E. coli* HUM1810. HUM-Konzentrationen in löslicher und unlöslicher Zellfraktion wurden densitometrisch bestimmt und auf die Biofeuchtmasse (BFM) umgerechnet.

c_{IPTG} [mM]	0,2	0,15	0,1	0,05	0,025
$\text{HUM}_{\text{löslich}}$ [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ BFM]	3,00	3,35	2,99	1,15	0,50
$\text{HUM}_{\text{unlöslich}}$ [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ BFM]	2,36	1,96	0,74	0,43	0,58

In allen Kulturproben konnte nach der Induktion in beiden Zellfraktionen die HUM nachgewiesen werden. Die HUM-Produktion fällt bei einer IPTG Konzentration von 0,025 mM besonders gering aus. Mit steigender IPTG-Konzentration ist sowohl in der löslichen als auch der unlöslichen Proteinfraction eine steigende HUM-Produktion zu beobachten. Das Maximum an löslicher HUM stellt sich allerdings nicht bei der höchsten eingesetzten IPTG-Konzentration ein, sondern bereits bei 0,15 mM IPTG mit $3,35 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ BFM HUM. Es ist hier anzunehmen, dass das Löslichkeitsvolumen der HUM in der Zelle erreicht wurde. Die optimierten Induktionsparameter wurden somit mit einer Induktorkonzentration von 0,15 mM und einem Induktionszeitpunkt bei $\text{OD}_{600} = 1,0$ rel. AU bestimmt.

Die Verwendung von *E. coli* als Produktionsstamm ermöglicht den Einsatz einer Vielzahl von Flüssigmedien. Mit dem Ziel die HUM-Ausbeute weiter erhöhen zu können, wurden weitere komplexe wie auch definierte Medien getestet. In dem definierten Autoinduktionsmedium ZYP-31 (s. Abschnitt 6.4.1) werden als Kohlenstoffquelle Glucose, Glycerol und Lactose

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

eingesetzt. Die Bakterien wachsen zunächst durch die Verstoffwechslung von Glucose und Glycerol zu hohen Zelldichten an, bevor durch den Abbau von Lactose die Proteinexpression induziert wird. Obwohl verschiedene Glucose/Lactose-Verhältnisse untersucht und die Kultivierungsbedingungen variiert wurden, konnte mit dem definierten Autoinduktionsmedium keine nennenswerte HUM-Produktion nachgewiesen werden. So wurde der Fokus weiterhin auf eine Produktion der Sesquiterpensynthase in Komplexmedium gelegt.

Super Broth (SB, s. Abschnitt 6.4.1) ist im Vergleich zu TB-Medium ein reichhaltigeres Medium und ist damit besonders geeignet die Ausbeute an rekombinantem Protein zu erhöhen. SB-Medium wird im Gegensatz zu TB-Medium nicht mit einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle (Glycerol) versetzt, sondern enthält ein Vielfaches an Trypton. Die besonders hohe Anreicherung an Nährstoffen soll auch einen Nährstoffüberschuss nach Erreichen der stationären Phase gewährleisten. Der Einfluss des Kulturmediums wurde in einfachen Kultivierungsversuchen untersucht. Die Hauptkulturen wurden mit Vorkultur zu einer optischen Dichte von 0,1 rel. AU angeimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Zelldichte von 1,0 rel. AU inkubiert (s. Abschnitt 7.2.1). Die Genexpression wurde mit 0,15 mM IPTG induziert und die Kultivierungstemperatur auf 20 °C gesenkt. Normierte Kulturproben wurden unmittelbar vor der Induktion (t_0) und 24 h nach Kultivierungsbeginn (t_1) entnommen und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Um die HUM-Produktion wurde per SDS-PAGE analysiert und densitometrisch quantifiziert (Abb. 11, Tab. 4).

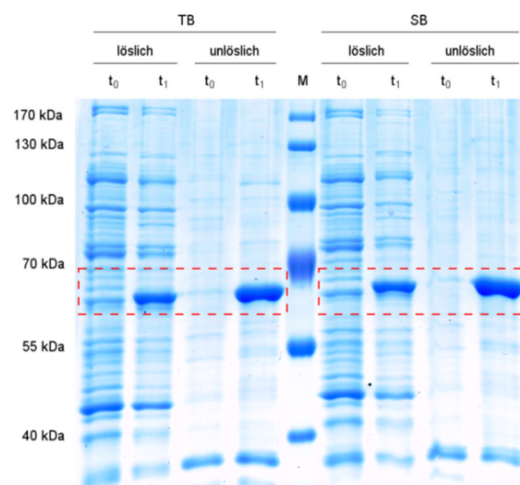


Abbildung 11: Produktion der rekombinanten HUM in *E. coli* HUM1810 in TB- und SB-Medium.

Analyse der Produktion der rekombinanten α -Humulensynthase durch SDS-PAGE (10 %). Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und Proben der löslichen und der unlöslichen Zellfraktion untersucht. M = Proteinmarker, t_0 = Kulturprobe unmittelbar vor der Induktion mit IPTG, t_1 = Kulturprobe 24 h nach Induktion mit IPTG und Genexpression bei 20 °C. Die Proben wurden basierend auf der optischen Dichte normiert. Die Laufhöhe der HUM ist rot-gestrichelt umrandet.

Tabelle 4: HUM-Ausbeute in Abhängigkeit des Kulturmediums.

Analyse der Produktion der HUM in *E. coli* HUM1810. HUM-Konzentrationen in löslicher und unlöslicher Zellfraktion wurden densitometrisch bestimmt und auf die Biofeuchtmasse (BFM) umgerechnet.

Medium	TB	SB
HUM _{löslich} [mg·g ⁻¹ BFM]	2,71	4,40
HUM _{unlöslich} [mg·g ⁻¹ BFM]	3,75	7,84

Noch bevor die Proteinproduktion weiter untersucht werden konnte, konnte bereits ein großer Vorteil des SB-Mediums beobachtet werden: Bei gleichen Expressionsbedingungen und gleicher Kultivierungszeit erreichen die Zellen in SB-Medium eine doppelt so hohe optische Dichte ($OD_{600} \approx 16$ rel. AU) als in TB-Medium ($OD_{600} \approx 8$ rel. AU). Auch die Ausbeute an löslicher HUM ist in SB-Medium mit $4,40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ BFM höher, sodass sowohl über die höhere Zelldichte als auch über die höhere Produktionsrate mehr HUM gewonnen werden konnte.

4.1.2 *Scale-up* und Kultivierung im Rührkessel-Bioreaktor

Um die HUM für weitere proteinchemische Versuche in ausreichenden Mengen bereitstellen zu können, wurde eine Aufskalierung der optimierten Produktion in den 2 L-Bioreaktormaßstab durchgeführt. Der Vorteil einer Reaktorkultivierung ist, dass physikalische Kultivierungsparameter wie Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffsättigung über die gesamte Kultivierungsperiode reguliert werden können.

Für die Kultivierung im 2 L-Rührkessel-Bioreaktor (BIOSTAT[®] A, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) wurde SB-Komplexmedium verwendet. Der pH-Wert wurde durch automatische Zudosierung von 1 M HCl bzw. 1 M NaOH auf pH 7,5 statiert. Die Begasung erfolgte bei 1 vvm Druckluft. Die Regelung der Rührergeschwindigkeit erfolgte zudem kaskadierend, sodass ein Sauerstoffpartialdruck von 20 % in der Kultur nicht unterschritten wurde. Zunächst wurde eine Vorvorkultur (VVK) in 25 mL LB-Medium (s. Abschnitt 6.4.1) mit einem Glycerolstock des Produktionsstammes angeimpft und 12 h bei 37 °C inkubiert. Die Vorkultur von 100 mL SB-Medium wurde mit der VVK zu einer optischen Dichte von 0,1 rel. AU inokuliert und über Nacht bei 37 °C und einer Schüttlergeschwindigkeit von 150 rpm inkubiert. Der Reaktor wurde mit einer Start- OD_{600} von 0,1 rel. AU angeimpft und die Zellen bis zu einer optischen Dichte von 1,0 rel. AU bei 37 °C inkubiert. Erst dann erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 0,15 mM IPTG. Die

Reaktortemperatur wurde auf 20 °C gesenkt und die Zellen für 24 h kultiviert. Während der Fermentation wurden stündlich Proben zur weiteren Analyse entnommen. Die entnommenen Proben wurden basierend auf der Zelldichte nach der Formel $V_{probe} = 2/OD_{600}$ normiert. Nach Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung wurden die löslichen und unlöslichen Fraktionen mittels SDS-PAGE auf die Produktion der HUM analysiert und densitometrisch quantifiziert (Abb. 12).

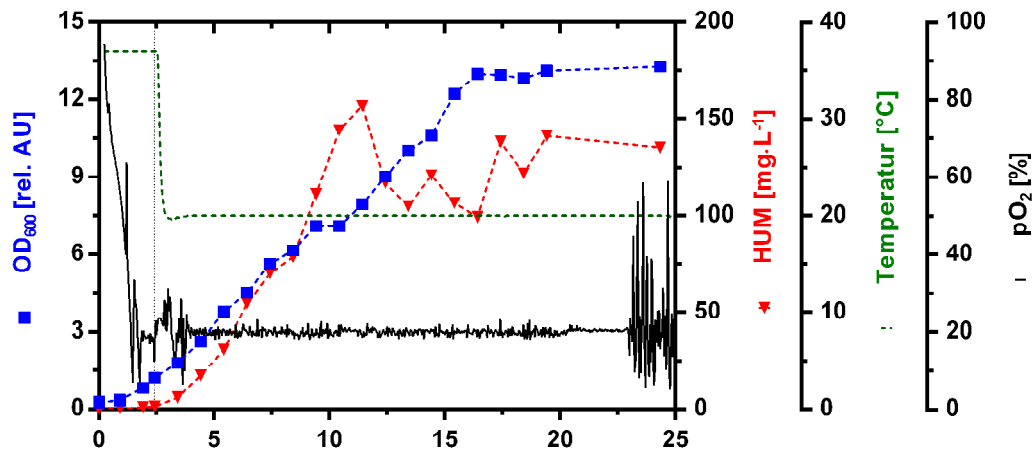


Abbildung 12: Produktion rekombinanter HUM in einer Batch-Kultivierung von *E. coli* HUM1810.

HUM-Konzentrationen in der löslichen Zellfraktion wurden nach Zellaufschluss mit Ultraschall densitometrisch bestimmt. Der Zeitpunkt der Induktion mit 0,15 mM IPTG ist durch eine gepunktete senkrechte Linie markiert.

Nach nur einer sehr kurzen lag-Phase geht die Kultur mit der Induktion und der Temperaturabsenkung in ein fast lineares Wachstumsverhalten über. Dieses liegt sowohl in der nicht-optimalen Wachstumstemperatur als auch in dem metabolischen Stress durch die rekombinante Proteinproduktion. Nach ca. 17 h gehen die Zellen in die stationäre Phase über. Die Sterbephase nach ca. 23 h wird durch den stark schwankenden Sauerstoffpartialdruck im Medium sichtbar.

Die HUM-Konzentration stieg direkt nach der Induktion kontinuierlich bis zu einer maximalen Enzymausbeute von ca. $160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kulturvolumen bei 9 h Kultivierungsdauer an und nahm danach, womöglich aufgrund zellinterner Degradation, ab. Im weiteren Kultivierungsverlauf wurde daraufhin ein un stetiges Abfallen und Steigen der HUM-Konzentration beobachtet, die sich am Ende der Kultivierung auf ca. $140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Reaktorvolumen belief. Dieses Verhalten der HUM-Produktion konnte zwar in weiteren Versuchen reproduziert werden, allerdings konnte nicht eindeutig geklärt werden, welche Faktoren den Abbau der HUM im Kultivierungsverlauf bedingen. Nährstoffmängel führen oft

dazu, dass rekombinant produzierte Proteine von der Produktionszelle wieder verstoffwechselt werden, um den eigenen Bedarf an Nährstoffen zu decken (Chow et al. 2006; Rosano und Ceccarelli 2014). In dem hier verwendeten SB-Medium liegen viele Nährstoffe im Überschuss vor. Ein Proteinabbau ist dadurch zwar unwahrscheinlich, ist allerdings ohne weitere Untersuchungen nicht vollständig auszuschließen.

4.1.3 Chromatographische Strategien zur Isolierung der α -Humulensynthase

Nach der erfolgreichen Produktion der codonoptimierten HUM im *E. coli*-Produktionsstamm, ist es für die weitere biochemische Charakterisierung der HUM in *in vitro* Studien wichtig, dass Enzym in reiner Form weiterzuverwenden. Für die Isolierung der Proteine aus dem Zellysate wurden affinitäts- und ionenchromatographische Aufreinigungsstrategien an einer Fast-Protein-Liquid-Chromatography-Anlage (FPLC) BioLogic Duo-Flow von Bio-Rad Laboratories, Inc., USA untersucht und weiterentwickelt.

4.1.3.1 Metallchelataffinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist ein effizientes Aufreinigungsverfahren, das auf der spezifischen Bindungsaffinität der Säulenmatrix mit einem bestimmten Molekül oder einer Molekülklasse beruht. Häufig werden rekombinante Proteine am C- oder N-Terminus um Affinitätstags, wie His-, Strep- und GST-Tags, erweitert, um die Aufreinigung der rekombinanten Proteine nach der Produktion zu erleichtern. Durch die Insertierung des *hum*-Gens in den pET16b-Vektor wird die HUM zusammen mit dem His10-Tag exprimiert und kann somit metallchelatchromatographisch von Zellbestandteilen isoliert werden.

Zur Isolierung der HUM wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst zwei unabhängige Aufreinigungsstrategien mit herkömmlichen Chromatographiesäulen und Membranadsorbentien verfolgt. Membranadsorbentien haben sich bereits bei der Isolierung von verschiedenen Proteinen bewährt und wurden auch für die Aufreinigung einer rekombinanten Patchouloolsynthase eingesetzt (Alemdar 2013). Für die Aufreinigung von His-getaggten Proteinen eignet sich der Sartobind® IDA75 Membranadsorbentien von Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, der an der Oberfläche mit Iminodiessigsäure (IDA) kovalent funktionalisiert ist und somit zweiwertige Metallionen chelieren können. Die experimentellen Versuche zur Aufreinigung der rekombinanten HUM über den Membranadsorbentien zeigten, dass das Enzym in hoher Reinheit isoliert werden konnte, allerdings konnte in anschließenden

Aktivitätsversuchen keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden (s. Abschnitt 8.1). Ein Enzymaktivitätsverlust in Kombination mit dem Einsatz des Sartobind® IDA75 Membranadsorbers war bisher nicht bekannt, allerdings wurde eine drastische Aktivitätsminderung bereits beschrieben (Schnatz 2014). Da sich der Einsatz von Membranadsorbern für die HUM nicht eignete, wurde der Fokus auf die Entwicklung einer Aufreinigungsstrategie mit klassischen Chromatographiesäulen gelegt.

4.1.3.1.1 Optimierung der Proteinisolierung durch Variation der immobilisierten Metallspezies

Die Metallchelataffinitätschromatographie von His-getaggtten Proteinen basiert auf der Affinität zweiwertiger Metallionen zu Histidinresten. An das stationäre Säulenmaterial sind mehrzählige Liganden gebunden, die mit zweiwertigen Metallionen einen Chelatkomplex ausbilden. Über die freien Koordinationstellen am Metallion können Imidazolringe der Histidinseitenketten von Proteinen wechselwirken und so aus komplexen Proteinlösungen isoliert werden.

Während standardgemäß besonders Nickel-Ionen einen großzügigen Einsatz finden, werden u.a. auch Kupfer-, Cobalt- oder Zink-Ionen verwendet. Die Auswahl des Metallions stellt allerdings einen nicht zu unterschätzenden Aspekt dar: die eingesetzte Metallspezies hat einen direkten Einfluss auf die Effizienz der Proteinisolierung (Porath et al. 1975). Zweiwertige Kupfer-Ionen haben eine besonders große Affinität zu Polyhistidin-Gruppen. Dieses wirkt sich allerdings negativ auf die Selektivität der Bindung aus. Neben dem His-getaggtten Protein werden auch endogene *E. coli* Proteine gebunden, die an ihrer Oberfläche eine lokal erhöhte Konzentration an Histidin-Gruppen aufweisen. Die Affinität der Metallionen zum His-Tag nimmt vom Kupfer, über Nickel und Zink zu Cobalt ab. Die Selektivität nimmt in gleicher Reihenfolge zu (Abb. 13).

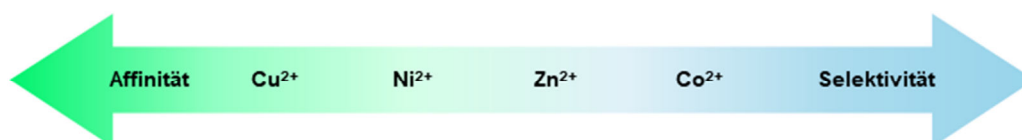


Abbildung 13: Auswahl an zweiwertigen Metallionen für die Metallchelataffinitätschromatographie.
Affinität und Selektivität zweiwertiger Metallionen für His-getaggte Proteine (nach Jena Bioscience GmbH 2011).

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

Um den Einfluss des chelatisierenden Metallions auf die Isolierung der produzierten HUM aus dem Zellysate zu untersuchen, wurden Aufreinigungsversuche mit einer GE Healthcare HiTrap FF Säule mit einem Bettvolumen von 5 mL durchgeführt. Die Affinitätssäule besteht aus mit Nitrilotriessigsäure(NTA)-modifizierter Sepharose, die mit den zu untersuchenden Metallionen beladen wurde. Für die Aufreinigung der HUM wurde ein auf Herstellerangaben beruhendes Protokoll entwickelt (s. Abschnitt 7.12.2). Die Auftragung des Proteinrohextraktes erfolgte mit 50 mM MOPS-Bindungspuffer mit 500 mM NaCl, 50 mM Imidazol und 10 % (w/v) Glycerol bei pH 7,5. Durch die Zugabe von geringen Mengen an Imidazol soll beim Probenauftrag die unspezifische Wechselwirkung von endogenen *E. coli* Proteinen an der Säulenoberfläche so gering wie möglich gehalten werden. Das gebundene Protein wurde mittels Stufenelution mit 500 mM Imidazol von der Säule eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden mit Vivaspin Zentrifugal-Ultrafiltrationseinheiten von Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa in MOPS-Lagerungspuffer umgepuffert und das Imidazol dadurch entfernt.

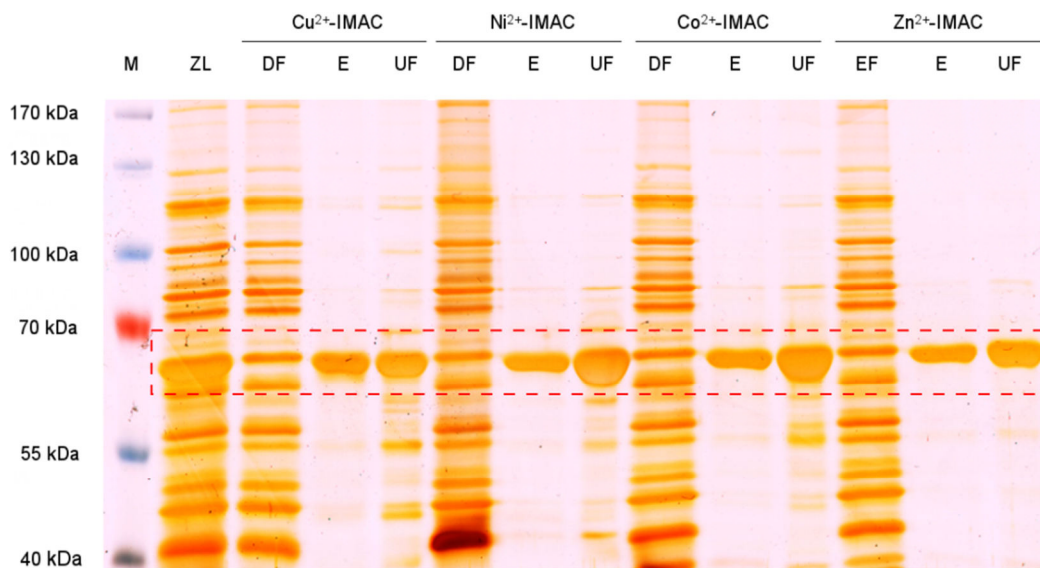


Abbildung 14: Chromatographische Aufreinigung der HUM in Abhängigkeit von der immobilisierten Metallspezies.

Analyse der Isolierung der rekombinanten HUM durch SDS-PAGE (10 %) und anschließender Silberfärbung. Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und die HUM aus der löslichen Zellfraktion chromatographisch über eine GE Healthcare HiTrap FF Säule aufgereinigt. M = Proteinmarker, ZL = Zellysate mit 140 mg Biomasse/mL Bindungspuffer, DF = Durchfluss mit Proteinen, die nicht an die Säule gebunden haben, E = Eluat mit Proteinen, die an die Säule gebunden haben, UF = Ultrafiltrat der eluierten Proteinfraktion. Alle Proben wurden unverdünnt aufgetragen. Die Laufhöhe der HUM ist rot-gestrichelt umrandet.

Die Effizienz der Proteinisolierung wurde hinsichtlich Ausbeute und Reinheit untersucht. Dafür wurden Proben des Zellysats (ZL), des Durchflusses (DF), des Eluats (E) und des Ultrafiltrats (UF) per SDS-PAGE untersucht und die Ergebnisse mit verschiedenen chelatisierenden Metallionen untereinander verglichen (Abb. 14). Um eine einfache Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde der Proteinrohextrakt einer *E. coli* HUM1810 *batch*-Kultivierung zu gleichen Volumina aufgeteilt und verwendet.

Die HUM wird bei jeder Variante an immobilisiertem Metallion effektiv an die Säulenmatrix gebunden. Allerdings sind in den eluierten Fraktionen sowie im Ultrafiltrat eindeutig Verunreinigungen durch Fremdproteine aus *E. coli* vorhanden. Hier zeigt sich bei den verwendeten Metallspezies ein großer Unterschied, was die Reinheit der isolierten HUM betrifft. Besonders die Aufreinigung mit immobilisierten Zn^{2+} -Ionen führt einer sehr reinen HUM-Probe, während die mit immobilisierten Cu^{2+} -Ionen aufgereinigte HUM in Relation dazu viele Fremdproteine noch aufweist. Die Quantifizierung der Ausbeute und Reinheit der isolierten HUM in Abhängigkeit der immobilisierten Metallspezies erfolgte densitometrisch. Proben des Eluats und des Ultrafiltrats wurden gemeinsam mit einer BSA-Standardreihe auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue-Lösung angefärbt. Über die Pixeldichte der einzelnen Banden kann der HUM-Anteil am Gesamtprotein quantifiziert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Bis auf die Anwendung mit Zn^{2+} -Ionen (ca. 81 %) konnte mit jeder verwendeten Metallspezies über 93 % der HUM aus dem Proteinrohextrakt an die Säule gebunden und eluiert werden. Nach der Ultrafiltration zeigen sich hier allerdings erhebliche Ausbeuteverluste von bis zu 60 %. Bereits beim Umpuffern mit der Ultrafiltrationseinheit wurden eine Ablagerung und ein Verblocken an der Filtrationsmembran mit bloßem Auge erkannt, die vermutlich auf denaturiertes Enzym zurückzuführen ist und somit zu drastischem Produktverlust führt.

Tabelle 5: Isolierung der HUM aus Proteinrohextrakt.

Ausbeute und Reinheit der HUM in Abhängigkeit der immobilisierten Metallspezies. Proteinausbeute und -reinheit wurden densitometrisch an einem Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel mithilfe einer BSA-Standardreihe bestimmt.

	Cu^{2+}	Ni^{2+}	Co^{2+}	Zn^{2+}
Ausbeute im Eluat [%]	96,5	93,0	95,3	80,9
Ausbeute im Ultrafiltrat [%]	37,2	62,5	59,9	43,1
Reinheit im Ultrafiltrat [%]	45,6	60,4	62,7	83,8

Konsistent mit der in der Literatur angegebenen hohen Affinität von Cu^{2+} -Ionen zu Histidinresten, ist bei der Cu^{2+} -IMAC mit 46 % Reinheit die am stärksten durch Fremdproteine verunreinigte HUM isoliert worden. Die Anwendung einer Ni^{2+} - bzw. Co^{2+} -IMAC führte zu sehr ähnlichen Ausbeute- (63 % resp. 60 %) und Reinheitswerten (60 % resp. 63 %). Obwohl die höchste Bindungsspezifität in der Literatur Co^{2+} -Ionen zugesprochen wird (Porath et al. 1975), konnte hier die höchste Reinheit mit 83,8 % durch die Immobilisierung von Zn^{2+} -Ionen erreicht werden. Allerdings ist hier die HUM-Ausbeute mit nur 43 % besonders gering. Da Co^{2+} -Ionen aufgrund der gewonnenen Ergebnisse eine gute Balance zwischen Ausbeute und Reinheit der isolierten HUM bieten, wurden weitere Optimierungsschritte der Aufreinigung an einer Co^{2+} -IMAC durchgeführt.

4.1.3.1.2 Optimierung der Proteinisolierung durch Variation des Elutionsverfahrens

In Abschnitt 4.1.3.1.1 wurde die gebundene HUM durch Anlegen einer Imidazolstufe von 50 mM auf 500 mM von der NTA-Sepharose-Säule eluiert und isoliert. Allerdings ist das Enzym noch stark mit endogenen *E. coli* Proteinen kontaminiert. Bakterielle Proteine besitzen zum Teil histidinreiche Regionen an ihrer Oberfläche und binden dadurch unspezifisch an die Affinitätssäule. Die Bindungsaffinität dieser Proteine ist in der Regel kleiner als die eines His-Tags mit 10 Histidinresten. Um die unspezifische Bindung an die Affinitätssäule zu unterdrücken, wurde bereits dem Bindungspuffer Imidazol zugesetzt. Da dieser Schritt allein nicht ausreicht, um die HUM effektiv von Proteinverunreinigungen zu befreien, wurde der Elutionsprozess der Co^{2+} -IMAC weiter untersucht und optimiert.

Zur Proteinelution können zwei Verfahren eingesetzt werden: 1. durch Anlegen eines linearen Gradienten und 2. durch einen Stufengradienten. Für die effiziente Abtrennung der Fremdproteine wurde zunächst ein linearer Imidazolgradient von 50 mM bis 500 mM angelegt und die eluierten Proteinfraktionen mittels SDS-PAGE auf ihre Zusammensetzung untersucht (s. Abschnitt 8.2). Es zeigte sich, dass bereits bei einer Imidazolkonzentration von 95 mM viele endogene *E. coli* Proteine von der Säule eluieren und erst ab 190 mM Imidazol die Elution der HUM in größeren Mengen stattfindet. Für die Aufreinigung der HUM per Co^{2+} -NTA-IMAC wurde daraufhin dem Hauptelutionsschritt mit 500 mM Imidazol eine Vorelutionsstufe mit 100 mM Imidazol vorgeschaltet (Abb. 15, links). Die Effizienz der Proteinisolierung wurde durch ausgewählte Proben des Zellysats (ZL), des Durchflusses (DF) und des Eluats (E) per SDS-PAGE untersucht (Abb. 15, rechts) und die Ausbeute und Reinheit der isolierten HUM densitometrisch bestimmt.

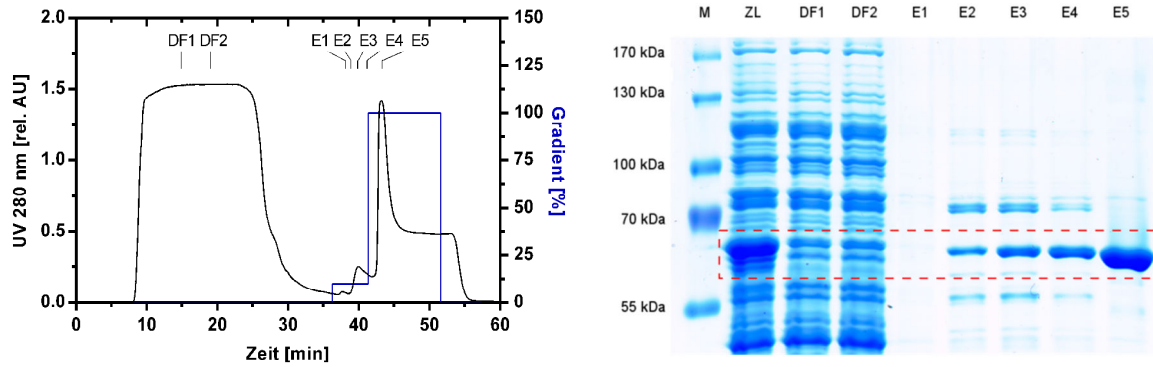


Abbildung 15: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels Co^{2+} -NTA-IMAC mit Zwei-Stufen-Elution.

(Links) Chromatogramm der Aufreinigung. (Rechts) Analyse der Isolierung der rekombinanten HUM durch SDS-PAGE (10 %) und anschließender Coomassie-Färbung. Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und die HUM aus der löslichen Zellfraktion chromatographisch über eine GE Healthcare HiTrap FF Säule aufgereinigt. M = Proteinmarker, ZL = Zellysate mit 140 mg Biomasse/mL Bindungspuffer, DF = Durchfluss mit Proteinen, die nicht an die Säule gebunden haben, E = Eluat mit Proteinen, die an die Säule gebunden haben. Alle Proben wurden unverdünnt aufgetragen. Die Laufhöhe der HUM ist rot-gestrichelt umrandet.

Durch den Einbau einer Vorelutionsstufe werden im Chromatogramm zwei kleine Peaks sichtbar, bei denen es sich sowohl um Fremdproteine aus *E. coli* handelt als auch um bereits eluierte HUM. Im Hauptelutionsschritt mit 500 mM Imidazol sind in der eluierten Fraktion kaum noch Verunreinigungen zu erkennen. Die Reinheit der anschließend ultrafiltrierten HUM wurde densitometrisch zu $\geq 92\%$ bestimmt, die Ausbeute betrug ca. 67 %.

Um zu bestätigen, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein um die HUM handelt, wurde ein Western Blot durchgeführt (Abb. 16). Da es keinen spezifischen Antikörper gegen die HUM gibt, wurde ein Anti-His-Antikörper gegen den His-Tag verwendet und die Detektion durch Färbereaktion mit 3,3,5,5-Tetramethyl-Benziden durchgeführt (s. Abschnitt 7.7).

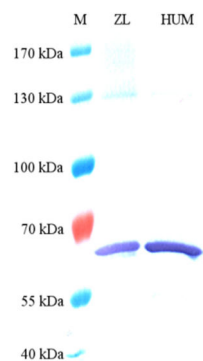


Abbildung 16: Western Blot der produzierten und aufgereinigten HUM.

Analyse der erfolgreichen Isolierung der HUM. Der Maus Anti-His-Antikörper bindet spezifisch an den His10-Tag der HUM, an welchen wiederum als sekundärer Markierungsantikörper der Ziege Anti-Maus-Antikörper bindet. Durch Farbreaktion mit 3,3,5,5-Tetramethyl-Benziden werden die markierten Banden sichtbar gemacht.

Der Western Blot bestätigt die erfolgreiche Produktion und Aufreinigung der HUM. Sowohl im Zellslysate als auch in der aufgereinigten Probe wurden die Banden bei ca. 67 kDa angefärbt. Mit dem entwickelten affinitätschromatographischen Verfahren via Co^{2+} -NTA-IMAC konnten somit 1,53 mg HUM/ g BFM aufgereinigt werden.

4.1.3.2 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie ist eine in industriellen Produktionsprozessen weit verbreitete Chromatographiemethode. Neben der kostengünstigen Prozessführung bietet die Ionenaustauschchromatographie den Vorteil, dass sie bei schonenden Bedingungen durchgeführt werden kann sowie ein *scale-up* vom analytischen in den präparativen Bereich problemlos möglich ist. Für eine erfolgreiche Aufreinigung des Proteins spielt der pI-Wert eine entscheidende Rolle. Nur wenn das Protein eine positive oder negative Nettoladung besitzt, bindet es an die Säulenmatrix. Entspricht der pH-Wert dem pI-Wert, so ist das Protein ungeladen und bindet nicht an die stationäre Phase.

Als alternative Aufreinigungsmethode wurde in der vorliegenden Arbeit die Ionenaustauschchromatographie (IEX) näher untersucht. Für die Versuchsplanung zur IEX ist es essentiell den pI-Wert der HUM zu kennen. Experimentelle Literaturdaten sind hierfür nicht bekannt. Um den pI-Wert zu bestimmen, wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese mit aufgereinigter HUM durchgeführt (s. Abschnitt 7.8). Dabei wurde das Enzym in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung auf einem Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG-Streifen) von pH 3-10 fokussiert. Im angelegten elektrischen Feld wandert das Enzym in Richtung des entgegengesetzten Pols. Wird der Bereich des isoelektrischen Punktes erreicht, stoppt das Enzym wegen der neutralen Nettoladung an dieser Stelle. Die zweite Dimension stellt eine SDS-PAGE dar, deren Laufrichtung um 90° versetzt ist. Um das Protein später zuordnen zu können, wurde ein Molekulargewichtsmarker mit aufgetragen. Das Coomassie-gefärbte Gel ist der Abbildung 17 zu entnehmen.

Der Zielprotein-Spot bei ca. 67 kDa wurde auf dem Gelbild rot umrandet. Die Länge des IPG-Streifens wurde zuvor auf dem Gel markiert. Der pI-Wert der rekombinanten HUM wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm GNU Image Manipulation Program (The GIMP Team, USA) ausgemessen. Mithilfe des ExPASy Prot/Param Tool wurde über die Aminosäuresequenz ein theoretischer pI_{theo} von 5,65 berechnet. Der hier ermittelte experimentelle pI_{exp} -Wert von 5,61 stimmt damit sehr gut überein und ist auch vergleichbar

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

mit bereits bekannten Daten in der Klasse der Terpensynthasen (Jayaramaiah et al. 2016; Munck und Croteau 1990; Dudareva 2003).

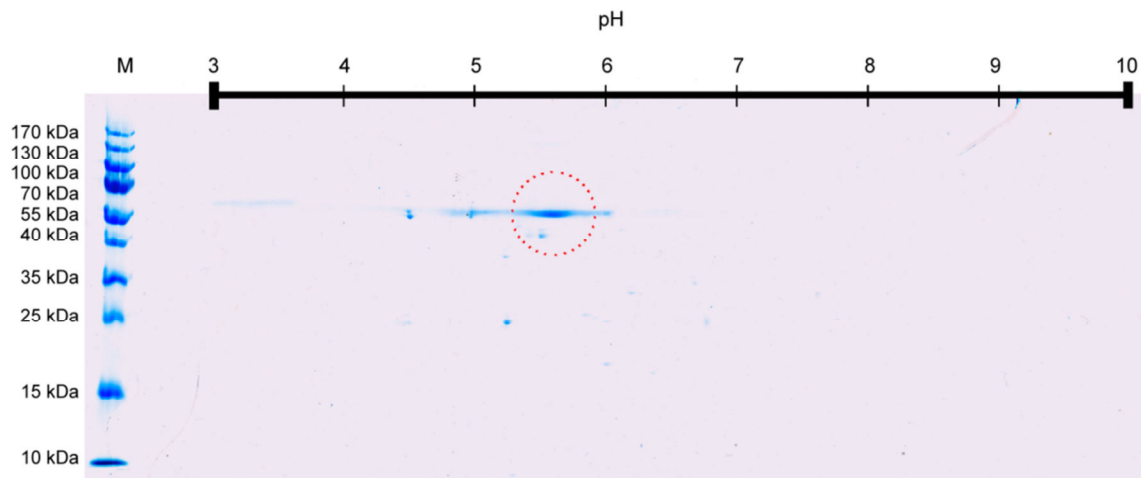


Abbildung 17: Zweidimensionale Gelelektrophorese der rekombinanten HUM.

Analyse des isoelektrischen Punktes der aufgereinigten, rekombinanten HUM durch 2D-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung. M = Proteinmarker. Der HUM-Spot ist rot-gepunktet umrandet.

Die Kenntnis über den pI-Wert der HUM bringt für die weitere Versuchsplanung eine zu beachtende Problemstellung mit sich: viele endogene *E. coli* Proteine besitzen einen pI im Bereich von pH 5-8. Eine gezielte spezifische Abtrennung des rekombinanten Proteins stellt somit eine große Herausforderung dar. Die Problematik kann durch den Einsatz von Kationenaustauschern minimiert werden, da nur wenige endogene *E. coli* Proteine an eine anionische Matrix binden. Allerdings muss die Wahl der chromatographischen Methode vorrangig auf die Enzymeigenschaften abgestimmt sein. Wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Aufreinigung des Proteins ist, dass der operative pH-Wert sich mindestens um eine pH-Einheit vom pI-Wert unterscheidet. Bei einer Kationenaustauschchromatographie müsste in dem vorliegenden Fall bei $\text{pH} \leq 4,6$ gearbeitet werden. Eine umfassende Enzymcharakterisierung in Abschnitt 4.1.4 zeigte allerdings, dass bei niedrigen pH-Werten die Aktivität der HUM rapide bis zum kompletten Aktivitätsverlust abnimmt. Deswegen wurde in diesem Fall nur eine Anionenaustauschchromatographie weiter untersucht.

Die Elution des gebundenen Proteins kann bei der IEX sowohl durch pH-Shift als auch durch Veränderung der Ionenstärke erfolgen. Der pH-Wert verändert die Nettoladung des Proteins, wodurch die Bindungseigenschaften zur Säule ebenfalls beeinflusst werden. Wird die Salzkonzentration erhöht, werden gebundene Proteine durch Fremdionen von der Säule verdrängt und eluieren. Allgemein kann durch die Anwendung eines Salzgradienten die Prozessgeschwindigkeit erhöht werden, was unerwünschte Diffusion in der Säulenmatrix

verhindert und somit zu einer besseren Auflösung beiträgt. Gegen die Elution mit pH-Shift spricht hier wieder die bereits genannte pH-Sensibilität der HUM.

Für die ionenchromatographische Isolierung der HUM aus dem Proteinrohextrakt wurden Versuche mit einer GE Healthcare HiPrep DEAE FF 16/10 Säule mit einem Bettvolumen von 20 mL durchgeführt. Die Säulenmatrix besteht aus mit Diethylaminoethyl(DEAE)-modifizierter Sepharose und zählt zu den schwachen Anionenaustauschern. Für die Aufreinigung der HUM wurde ein auf Herstellerangaben beruhendes Protokoll entwickelt (s. Abschnitt 7.12.3).

Die Auftragung des Proteinrohextraktes erfolgte mit 20 mM Tris-HCl-Startpuffer. Das gebundene Protein wurde über einen linearen Gradienten mit 20 mM Tris-HCl-Elutionspuffer und 1 M NaCl von der Säule eluiert. Die Anionenaustauschchromatographie wurde bei pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 und 8,5 durchgeführt. Die Effizienz der Proteinbindung als auch der Proteinisolierung wurde per SDS-PAGE untersucht. Um eine einfache Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde der Proteinrohextrakt einer *E. coli* HUM1810 *batch*-Kultivierung zu gleichen Volumina aufgeteilt und verwendet.

Von den durchgeführten Versuchen konnte nur bei pH 8,5 eine effektive Bindung der HUM gewährleistet werden (Abbildung 18). Bei allen anderen getesteten pH-Werten wurden im Durchfluss noch hohe Mengen an HUM per SDS-PAGE nachgewiesen (s. Abschnitt 8.3).

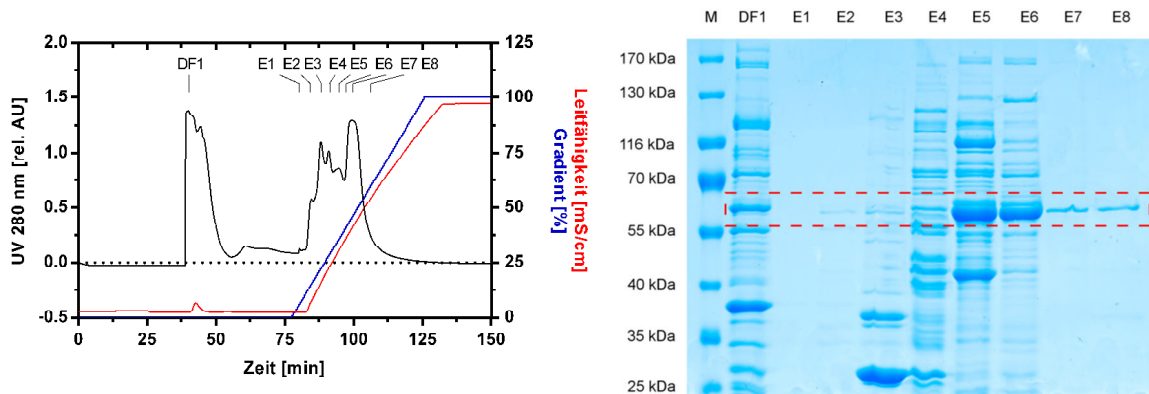


Abbildung 18: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels DEAE-IEX.

(Links) Chromatogramm der Aufreinigung bei pH 8,5. (Rechts) Analyse der Isolierung der rekombinanten HUM durch SDS-PAGE (10 %) und anschließender Coomassie-Färbung. Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und die HUM chromatographisch über eine GE Healthcare HiPrep DEAE FF 16/10 Säule aufgereinigt. M = Proteinmarker, DF = Durchfluss mit Proteinen, die nicht an die Säule gebunden haben, E = Eluat mit Proteinen, die an die Säule gebunden haben. Alle Proben wurden unverdünnt aufgetragen. Die Laufhöhe der HUM ist rot-gestrichelt umrandet.

Die Aufreinigung mittels DEAE-IEX bei pH 8,5 ermöglicht es zwar die HUM effizient zu binden, allerdings ist es nicht möglich gewesen mit dem angelegten linearen Salzgradienten effektiv die HUM von endogenen *E. coli* Proteinen abzutrennen. Wie bereits erwähnt, liegt hier die Schwierigkeit darin, dass viele *E. coli* Proteine einen ähnlichen pI-Wert wie die HUM besitzen und zudem über gute Bindeeigenschaften zu Anionenaustauschern besitzen. Nichtsdestotrotz konnte durch den Einsatz einer DEAE-IEX eine Aufkonzentrierung und grobe Aufreinigung der HUM ermöglicht werden. Da besonders in den letzten Fraktionen sehr reine HUM eluiert werden konnte, ist die DEAE-IEX für die Aufreinigung der HUM nicht auszuschließen. In Umsetzungsversuchen mit FPP konnte nach Umpuffern der eluierten Fraktionen aktive HUM nachgewiesen werden. Eine verbesserte Elutionsstrategie könnte sowohl für eine bessere Auflösung der Peaks im Chromatogramm als auch für eine höhere Reinheit der HUM sorgen.

4.1.4 Charakterisierung der α -Humulensynthase

Wird ein Enzym in einem Produktionsprozess eingesetzt, so besteht die Aufgabe zunächst darin, das Enzym näher zu charakterisieren. Hierzu gehören u.a. die Reaktions- und Substratspezifität und die Ermittlung der Bedingungen, unter denen das Enzym optimale Wirkung zeigen kann. Ebenso wichtig ist die Untersuchung der Stabilität des Enzyms. Für die HUM wurden viele wichtige enzymcharakteristische Daten bisher nicht bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine umfangreiche biochemische und biophysikalische Charakterisierung der HUM durchgeführt.

4.1.4.1 Produktspektrum

In den vorangegangenen Abschnitten konnte mit Erfolg die HUM aus *Zingiber zerumbet* Smith löslich in *E. coli* produziert und anschließend chromatographisch aufgereinigt werden. Die Aktivität des isolierten Enzyms wurde in Umsetzungsversuchen mit dem natürlichen Substrat (2*E*,6*E*)-FPP untersucht. Im Rahmen der Dissertation von T. Frister wurde ein Protokoll auf Basis des gaschromatographischen Aktivitätstests von O'Maille et al. entwickelt und in der vorliegenden Arbeit angewandt (O'Maille et al. 2004; Frister 2015). Die Umsetzungsversuche finden, wenn nicht anders angegeben, in einem Volumen von 500 μ L in Mg^{2+} -haltigen MOPS-Aktivitätspuffer statt. Der Aktivitätstest wurde mit 0,05 μ M HUM und 30 μ M (2*E*,6*E*)-FPP bei 40 °C und pH 7,5 durchgeführt. Die Temperatur und der pH-Wert wurden hier aufgrund

bekannter Daten aus der Literatur ausgewählt (Yu et al. 2008). Die Reaktionslösung wurde mit 200 μL Isooktan überschichtet und 15 min statisch inkubiert. Durch gründliches Durchmischen beider Phasen werden die Terpenprodukte in die organische Phase überführt und diese anschließend per GC/FID untersucht (s. Abschnitt 6.4.8) (Abb. 19).

Dem Chromatogramm sind zwei Peaks zu den Retentionszeiten 7,6 min und 8,3 min zu entnehmen. Durch massenspektrometrische Messungen konnte der erste Peak als β -Caryophyllen und der zweite als α -Humulen identifiziert werden (s. Abschnitt 8.4). Da die Peakfläche im Chromatogramm proportional zur Analytkonzentration ist, wurde über die Peakfläche der prozentuale Anteil von α -Humulen zu 94,5 % und β -Caryophyllen zu 5,5 % bestimmt. Diese Daten stimmen sehr gut mit den in der Literatur genannten Produktausbeuten (95 % α -Humulen, 5 % β -Caryophyllen) überein (Yu et al. 2008).

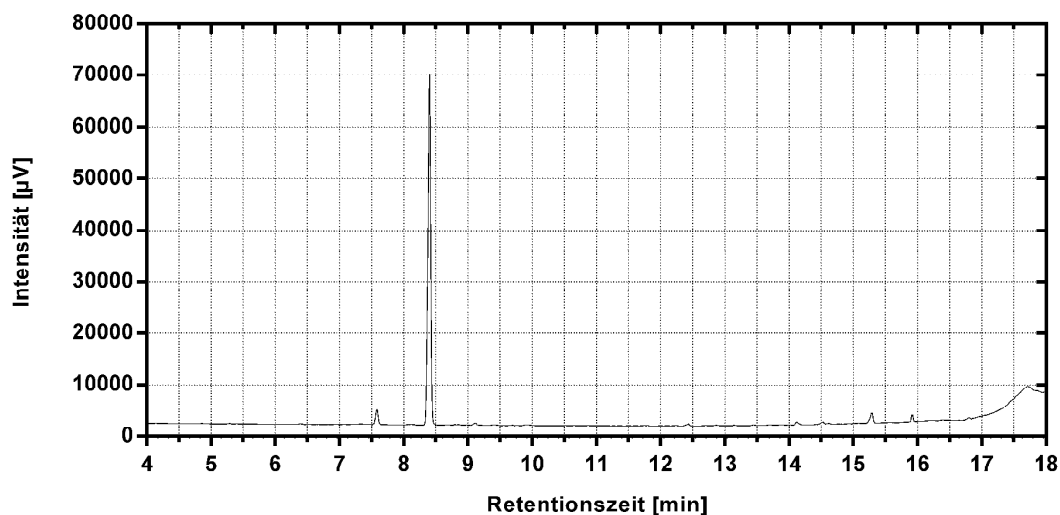


Abbildung 19: Enzymatische Umsetzung von (2*E*,6*E*)-FPP durch die rekombinante HUM.

GC/FID Chromatogramm der Produkte der rekombinanten HUM. Die Produkte wurden durch Extraktion mit Isooktan aus dem wässrigen Reaktionsgemisch isoliert und per GC/FID analysiert. Produktausbeute in % wurde über die Peakflächen bestimmt.

4.1.4.2 Enzymstabilität und -aktivität

Im Bereich der enzymtechnologischen Prozesse ist die Stabilität von Enzymen ein wichtiger Faktor. Die Enzymstabilität kann in zwei Teilbereiche aufgeteilt werden, die separat betrachtet werden müssen: 1. die operationelle Stabilität und 2. die Lagerstabilität. Ersteres bezieht sich auf die Aktivität des Enzyms im Einsatz als Biokatalysator, während letzteres auf die

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

Aktivitätsveränderung des Enzyms über die Zeit bei bestimmten Lagerbedingungen fokussiert.

Die operationelle Stabilität von Enzymen wird durch mehrere reaktionstechnische und chemische Faktoren wie pH-Wert, Temperatur und chemische Substanzen beeinflusst. So sind das Temperatur- und pH-Optimum für die Bestimmung der kinetischen Daten des Enzyms essentiell. Auch haben beide Faktoren einen enormen Einfluss auf die Enzymstabilität. Besonders die Veränderung des pH-Wertes hat eine direkte Auswirkung auf die chemischen Wechselwirkungen im Protein, die das dreidimensionale Gerüst zusammenhalten. Werden Seitengruppen des Proteins durch einen pH-Shift protoniert bzw. deprotoniert, wird das Gesamtgefüge der Wechselwirkungen im Protein beeinflusst. Die dreidimensionale Struktur des Enzyms wird verändert, welches im negativsten Fall auch eine Deaktivierung des Enzyms zur Folge hat.

Daten zur Enzymaktivität in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur waren für die HUM bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der HUM bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 34 °C bis 44 °C und im pH-Bereich von pH 6-9 untersucht (Abb. 20). Die Reaktionen wurden, wie in Abschnitt 4.1.4.1 beschrieben, in einem Zwei-Phasen-Reaktionssystem durchgeführt. Für die Auswertung wurden die Reaktionsraten zu Beginn der Reaktion bestimmt. Die höchste Reaktionsrate wurde hierbei mit einer Aktivität gleich 100 % gesetzt.

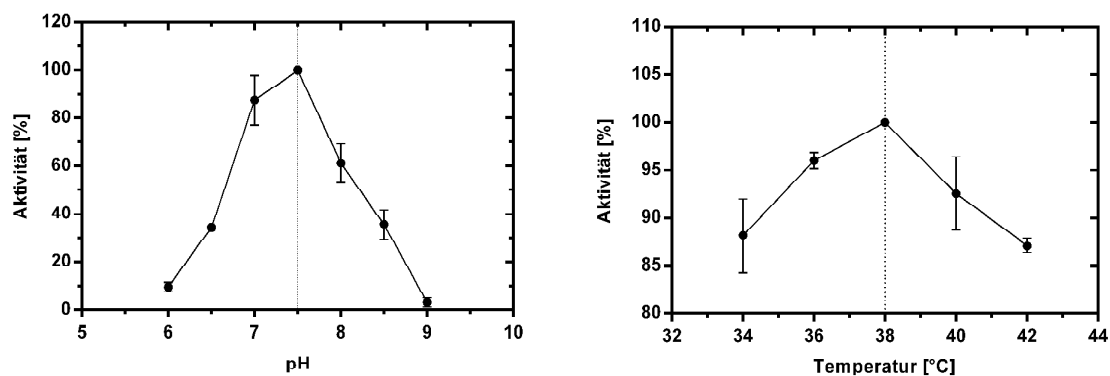


Abbildung 20: Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums der rekombinanten HUM.

Für jeden Messpunkt wurden Umsetzungsversuche im Zwei-Phasen-System mit (2*E*,6*E*)-FPP durchgeführt und mehrere Messpunkte über einen Zeitperiode von 4 min aufgenommen. Die Produkte in der organischen Phase wurden mittels GC/FID-Analyse quantifiziert und die Reaktionsrate für jede Umsetzung bestimmt. Die höchste Reaktionsrate wurde als 100 % Aktivität definiert. Für jeden Messpunkt wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die HUM zeigte bei 38 °C und pH 7,5 ihre höchste Aktivität. Diese Beobachtung ist auch konsistent mit bereits vorhandenen Daten aus der Literatur für Sesquiterpensynthesen. Typische Werte für Temperatur und pH-Optimum liegen bei 20-40 °C und pH 7. Besonders der pH-Wert hat einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der HUM. Während die Veränderung der Temperatur einen Aktivitätsverlust um maximal 15 % hervorrufen konnte, ist ein pH-Shift um 1,5 pH-Einheiten vom Optimum mit einem Aktivitätsverlust von fast 100 % verbunden. Somit ist die HUM ein sehr pH-sensitives Enzym. Ein Einfluss auf das Produktspektrum, wie es bei anderen Terpensynthesen bekannt ist (Frister et al. 2015), konnte bei beiden Faktoren nicht beobachtet werden.

Obwohl die HUM, wie aus vorangegangenen Versuchen ersichtlich wurde, aktiv und löslich isoliert werden konnte, zeigte sich in der aufgereinigten Enzymlösung direkt nach dem Auftauen eine mit bloßem Auge sichtbare Trübung der Lösung, die sich in nur kurzer Zeit verstärkte und zu einer signifikanten Ausflockung führte. Über SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass diese Partikelbildung mit einem erheblichen Verlust des löslichen Proteinanteils einher ging (König 2015). In der Literatur werden als Ursache der Aggregation von Proteinen beim Einfrieren meist physikalische Instabilitäten angegeben (Strambini und Gabellieri 1996; Jaenicke 1990; Nema und Avis 1993), die durch Kältedenaturierung (Franks 1995) oder Adsorption und Denaturierung an Eis-Wasser-Grenzschichten (Chang et al. 1996; Strambini und Gabellieri 1996) ausgelöst werden können. Ein weiterer Einflussfaktor ist die Aufkonzentrierung von Pufferbestandteilen durch das Auskristallisieren von Wasser, welches zu einer pH-Wert-Verschiebung führen kann (Pikal 1990a, 1990b; Anchordoquy und Carpenter 1996). Aufgrund der besseren Löslichkeit von Sauerstoff in wässrigen Lösungen bei niedriger Temperatur, können auch oxidative Abbauvorgänge das Enzym schädigen (Li et al. 1995).

Bei vielen Proteinen führt die Zugabe von bis zu 50 % (w/v) Glycerol zu einer erhöhten Stabilität und Löslichkeit (Vagenende et al. 2009). Glycerol komplexiert an Proteine und stabilisiert dadurch die dreidimensionale Struktur. Da der bisher genutzte Lagerungspuffer einen Glycerolanteil von 10 % (w/v) enthielt, wurde die Stabilität der HUM in Gegenwart von Glycerolkonzentration von 5, 10, 15 und 20 % (w/v) untersucht. So sollte auch überprüft werden, ob der Glycerolanteil im Lagerungspuffer einen Einfluss auf die HUM-Stabilität hat oder ob diese ausgeschlossen werden kann. Die Proteinstabilität wurde in Form der Änderung der Thermostabilität mittels dynamischer Differenzfluorometrie (auch differenzielle Scanning-Fluorometrie, DSF) an einem Prometheus nano.DSF48 Fluorimeter von NanoTemper Technologies, München bestimmt.

Für die thermischen Entfaltungsexperimente wurden je 10 μL der präparierten HUM-Lösungen ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in einer Kapillare einem thermischen Gradienten von 20-95 $^{\circ}\text{C}$ mit einer Heizrate von $1 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ausgesetzt. Die intrinsische Tryptophanfluoreszenz der HUM wurde dabei kontinuierlich bei 330 nm und 350 nm Wellenlänge gemessen. Die Ergebnisse der dynamischen Differenzfluorometrie sind in Abbildung 21 dargestellt.

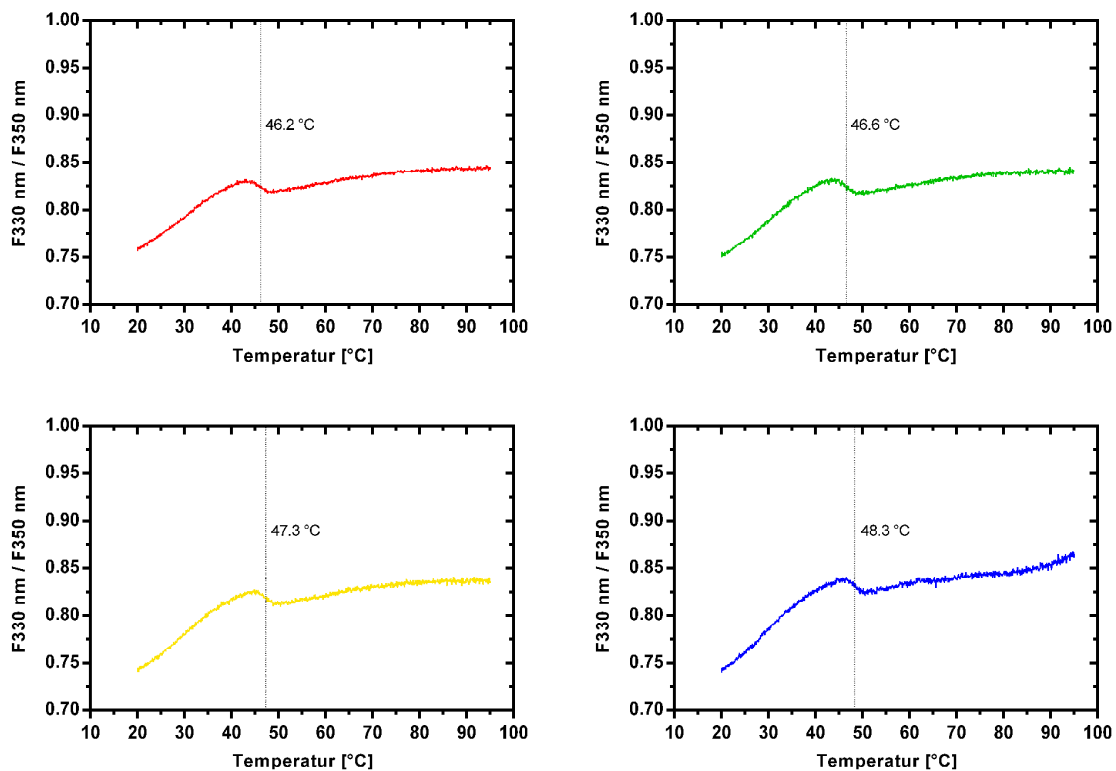


Abbildung 21: Änderung der Thermostabilität der Faltung der HUM in MOPS-Lagerpuffer in Gegenwart von Glycerol.

(Oben links) 5 % (w/v), (oben rechts) 10 % (w/v), (unten links) 15 % (w/v) und (unten rechts) 20 % (w/v) Glycerol. Analyse der Proteinestabilität durch dynamische Differenzfluorometrie. Proben der aufgereinigten HUM wurden in einer Kapillare mit einem Temperaturgradienten von 20-95 $^{\circ}\text{C}$ behandelt und die Tryptophanfluoreszenz bei 330 nm und 350 nm kontinuierlich gemessen. Der Schmelzpunkt T_M ist durch eine gepunktete Linie gekennzeichnet.

Wird das Verhältnis der Fluoreszenzintensität bei 330 nm und 350 nm gegen die Temperatur aufgetragen, wird im Idealfall eine sigmoidale Kurve erhalten, deren Wendepunkt der Schmelztemperatur T_M entspricht und den Übergang vom nativen zum denaturierten Protein dokumentiert. Der Schmelzpunkt wird automatisch aus dem Maximum der ersten Ableitung der Funktion berechnet und ausgegeben. Mit steigender Glycerol-Konzentration im Lagerungspuffer verschiebt sich die Schmelztemperatur der HUM auf höhere Temperaturen,

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

sodass die Temperaturdifferenz zwischen 5 % (w/v) Glycerol ($T_M = 46,2 \text{ }^\circ\text{C}$) und 20 % (w/v) Glycerol ($T_M = 48,3 \text{ }^\circ\text{C}$) bei ca. $2 \text{ }^\circ\text{C}$ liegt. Die höhere Schmelztemperatur ist ein Indiz dafür, dass durch die Zugabe höherer Mengen an Glycerol die HUM in ihrer Struktur stabilisiert wird. Tatsächlich konnte nach Optimierung des Lagerungspuffers durch Zugabe von 20 % (w/v) Glycerol auch keine Präzipitation nach dem Auftauen der HUM-Lösung mehr beobachtet werden.

Um den Einfluss der Lagerbedingungen auf die Aktivität der HUM zu untersuchen, wurden weitere Experimente bei unterschiedlichen Lagertemperaturen von $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Um auch das Verhalten der Sesquiterpensynthese bei Frier-Tau-Stress (F&T) zu untersuchen, wurde eine Probe der aufgereinigten HUM zu jedem Messtag aufgetaut und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ wieder eingefroren. Für die Lagerung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ohne F&T wurden pro Messpunkt je ein separates Aliquot verwendet.

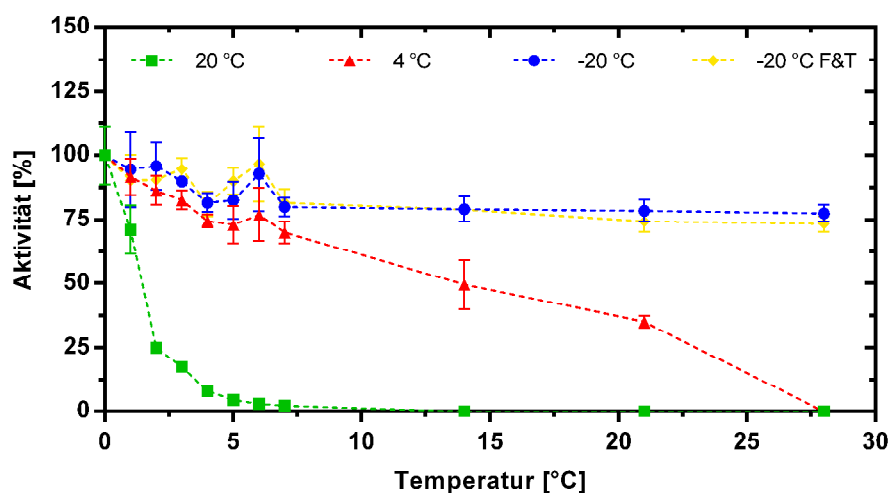


Abbildung 22: Stabilität der HUM bei verschiedenen Lagerbedingungen.

Aktivitätsverlust der HUM bei Lagerung bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Bei Lagerung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde ebenfalls der Einfluss von Frier-Tau-Stress untersucht. Enzymproben wurden im $500 \mu\text{L}$ Ansatz im Zwei-Phasen-System bei $38 \text{ }^\circ\text{C}$ und pH 7,5 auf Aktivität getestet. Die gebildeten Produkte wurden per GC/FID quantifiziert. Die Aktivität an Tag 0 direkt nach der Aufreinigung wurde gleich 100 % gesetzt und alle weiteren Messwerte in Relation dazu gesetzt. Alle Messpunkte unterliegen einer Zweifachbestimmung.

Die Aktivität des Enzyms wurde bei dieser Versuchsreihe nach der Endpunktmethode bestimmt (Abb. 22). Jede Reaktion wurde mit $30 \mu\text{M}$ FPP und $0,05 \mu\text{M}$ HUM in Aktivitätspuffer (pH 7,5) bei $38 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die Endprodukte wurden nach 10 min Reaktionszeit gaschromatographisch detektiert. Über einen Zeitraum von 28 Tagen wurden in den ersten sieben Tagen täglich und anschließend 7-tätig Proben der gelagerten HUM auf

Aktivität getestet. Da die Aktivität von Enzymen auch von verschiedenen Einflüssen während des gesamten Produktionsprozesses beeinträchtigt werden kann, wurde die hier eingesetzte HUM aus einem *batch*-Prozess gewonnen, aufgereinigt und aliquotiert. Die Aktivität der HUM wurde direkt nach dem Aufreinigungsprozess mittels Co^{2+} -NTA-IMAC bestimmt und auf 100 % gesetzt (Tag 0).

Im Verlauf der Messversuche ist über die Zeit bei allen untersuchten Lagerbedingungen eine Aktivitätsabnahme der HUM zu beobachten, wenngleich diese unterschiedlich stark ausfallen. Bei 20 °C Lagertemperatur fällt die Aktivität der HUM über die ersten 7 Tage derart drastisch ab, dass bei den nachfolgenden Messpunkten keine Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Die Lagerung bei 4 °C zeigt einen kontinuierlichen Abfall der Aktivität und erst nach 28 Tagen einen vollständigen Aktivitätsverlust. Nur bei Lagerung bei -20 °C weist die HUM am Ende der Versuchsreihe noch eine Restaktivität von ca. 75 % auf. Dabei findet zunächst ein kontinuierlicher Abfall der Aktivität über die ersten sieben Tage statt bis es anschließend einen nahezu konstanten Wert annimmt. Hierbei ist es auch unerheblich, ob die Probe dem Frier-Tau-Stress unterzogen wird, da hier keine Unterschiede in der Aktivität der verschiedenen Proben nachzuweisen ist. Es ist somit durchaus möglich, größere Aliquote der HUM tiefgekühlt zu lagern und mehrmals aufzutauen und einzufrieren.

4.1.4.3 Bestimmung der kinetischen Daten

Die kinetischen Daten von Enzymen gehören zu ihren wichtigsten Kenngrößen und geben Aufschluss über die Substrat- und Produktaffinität des Enzyms, sowie die Reaktionsrate der katalysierten Reaktion. Die reaktionskinetischen Eigenschaften der HUM wurden bisher nicht beschrieben, somit fehlen wichtige Daten zur Charakterisierung der Sesquiterpensynthase.

Die kinetische Analyse der HUM wurde mit einem optimierten diskontinuierlichen Assay nach O'Maille et al. in einem Zwei-Phasen-System durchgeführt. Als Substrat wurde (2*E*,6*E*)-FPP im Konzentrationsbereich von 1-100 μM eingesetzt. Für jede Substratkonzentration wurde ein Mastermix mit 0,05 μM HUM in Aktivitätspuffer (pH 7,5) fertiggestellt. Diese Enzymkonzentration erwies sich in vorangegangenen Experimenten als geeignet, um während einer Reaktionszeit von 4 min Anfangsgeschwindigkeiten im linearen Bereich zu erhalten (König 2015). Nach Enzymzugabe wurde der Mastermix sofort in fünf Proben aliquotiert und mit Isooktan vorsichtig überschichtet. Die einzelnen Proben wurden bei 38 °C inkubiert und zu definierten Zeitpunkten (0,5, 1, 2, 3 und 4 min) die Reaktion in je einem Aliquot durch intensives Durchmischen der wässrigen und organischen Phase beendet. Durch den Kontakt

mit dem organischen Lösungsmittel denaturiert die HUM und kann somit keine weitere Umsetzung des FPP katalysieren. Die Phasen wurden durch Zentrifugieren getrennt und die mit Umsetzungsprodukten angereicherte organische Phase im Gaschromatographen analysiert. Mithilfe einer α -Humulen-Kalibrationsgerade konnte über die Peakflächen im Chromatogramm die Konzentration der gebildeten Produkte quantifiziert werden. Durch Auftragen der Produktkonzentration gegen die Zeit konnte durch lineare Regression die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion berechnet werden. Die ermittelten Daten wurden gegen die Substratkonzentration aufgetragen und durch nicht-lineare Regression mit der mathematischen Software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., USA) dem Michaelis-Menten-Modell angepasst (Abbildung 23).

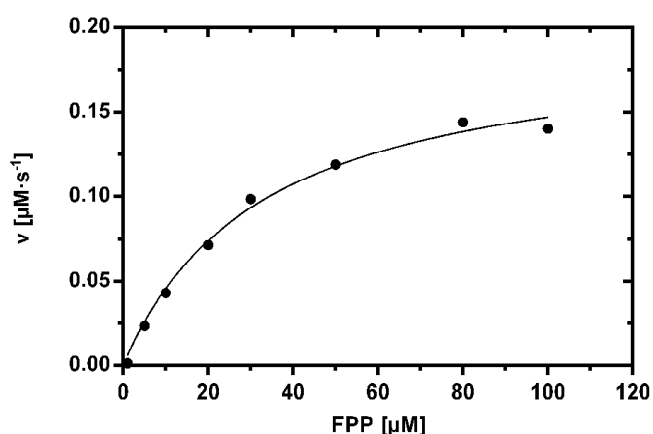


Abbildung 23: Michaelis-Menten-Kurve der Umsetzung von (2E,6E)-FPP durch die HUM.

Für jeden Messpunkt wurden Umsetzungsversuche im Zwei-Phasen-System mit (2E,6E)-FPP bei 38 °C und pH 7,5 durchgeführt und mehrere Messpunkte über einen Zeitperiode von 4 min aufgenommen. Die Produkte in der organischen Phase wurden mittels GC/FID-Analyse quantifiziert und die Reaktionsrate für jede Umsetzung bestimmt. Für jeden Messpunkt wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die kinetischen Parameter der HUM wurden für die Bildung des Gesamtproduktspektrums mit $K_M=32,79 \mu\text{M}$, $v_{\text{max}}=0,20 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}=3,91 \text{ s}^{-1}$ und einer spezifischen Enzymaktivität von $3,63 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ bestimmt. Der relativ niedrige K_M -Wert weist auf eine hohe Bindungsaffinität der HUM zum Substrat FPP hin. Im Vergleich zu bekannten anderen Sesquiterpensynthasen liegt der K_M -Wert der HUM meist wesentlich höher. Die (+)-Germacren-D-Synthase, die eine signifikante Sequenzähnlichkeit von über 63 % zur HUM aufweist, besitzt einen 13-fach niedrigeren K_M -Wert von $2,5 \mu\text{M}$ (Mercke et al. 2000). Wird allerdings die gesamte Klasse der Terpensynthasen betrachtet, sind ähnliche K_M -Werte durchaus weit vertreten und präsent (Crowell et al. 2002). Die ermittelte maximale Reaktionsgeschwindigkeit von $0,20 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ und

die resultierende Wechselzahl von $3,91 \text{ s}^{-1}$ sind relativ hoch im Vergleich zu vielen beschriebenen Sesquiterpensynthesen. Im Gegensatz zu vielen Sesquiterpensynthesen, die FPP in aufwendigen Reaktionsmechanismen zu einem breiten Spektrum an komplexen Produkten umsetzen (Bar-Even et al. 2011; Faraldos et al. 2012; Schifrin et al. 2016), wird von der HUM mit nur einer Cyclisierung eine sehr simple Reaktion katalysiert, welche die höhere Reaktionsgeschwindigkeit und Wechselzahl erklären kann. Trotzdem liegen die Werte durchaus im Durchschnitt der Enzyme des Sekundärmetabolismus von Pflanzen (Bar-Even et al. 2011) und sind auch unter Sesquiterpensynthesen mit vertreten (Agger et al. 2008; Pinedo et al. 2008). Ein weiterer wichtiger Aspekt, der bei der Deutung der kinetischen Daten in Betracht gezogen werden muss, ist der His10-Tag, der sich am N-Terminus der HUM befindet. In der Literatur werden zahlreiche Fälle diskutiert, in denen sich der His-Tag drastisch auf die biochemischen Eigenschaften auswirkt, indem u.a. die Michaelis-Menten-Konstante K_M erhöht und damit die Affinität zum Substrat gesenkt wird (Panek et al. 2013; Ledent et al. 1997; Sabaty et al. 2013; Dickson et al. 2013). Auf die Abspaltung des His-Tags wurde allerdings in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da die HUM auch mit Affinitätstag eine hohe Aktivität aufweist.

4.1.4.4 Untersuchungen zum Substratspektrum

Eine eindeutige Identifizierung der Substratspezifität anhand der Aminosäuresequenz ist bei Terpensynthesen bisher nicht möglich. Mithilfe von bioinformatischen Tools können über die Kristallstruktur des Enzyms mögliche Substrate vorgeschlagen werden, die in nachfolgenden experimentellen Arbeiten bestätigt werden können (Hermann et al. 2007). Die HUM ist in dieser Hinsicht ein wenig untersuchtes Enzym. Erschwerend kommt hinzu, dass Daten zur Kristallstruktur bislang nicht vorhanden sind. Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe von N. Sträter an der Universität Leipzig werden derzeit Forschungen zur Aufklärung der Kristallstruktur der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen HUM durchgeführt. Eine rationale Auswahl oder Synthese von alternativen Substraten nach den bereits genannten Aspekten ist somit noch nicht möglich.

Die Untersuchungen zur Substratspezifität der HUM bieten die Möglichkeit, u.a. über die Substratgröße und Hydrophobizität bzw. Hydrophilität, bisher nicht vorhandene Erkenntnisse zum aktiven Zentrum des Enzyms zu gewinnen. Durch Umsetzungsversuche mit alternativen Substraten kann nach dem *trial-and-error*-Prinzip die Substratspezifität untersucht und erste Rückschlüsse auf die Enzym-Substrat-Wechselwirkung getroffen werden. In Studien mit

Sesquiterpensynthesen konnte gezeigt werden, dass neben dem natürlichen Substrat FPP auch Monoterpen- und Diterpenvorläufer zu bereits bekannten Produkten umgesetzt werden (Frister et al. 2015; Oberhauser 2016). Auch die Umsetzung von unnatürlichen, synthetisch hergestellten Substraten ist bekannt, die sogar zu bislang nicht charakterisierten Produkten führten.

Alle Umsetzungsversuche mit alternativen Substraten wurden in MOPS-Aktivitätspuffer bei 38 °C und pH 7,5 durchgeführt. Im Vergleich zu den Umsetzungsversuchen mit FPP wurde hier eine Inkubationszeit von 1 h gewählt, um einen vollständigen Umsatz aller Substrate zu gewährleisten. Da es sich bei den hier eingesetzten Verbindungen nicht um das natürliche Substrat der HUM handelt, ist eine langsamere Umsetzung nicht auszuschließen. Die Isolierung und qualitative Detektion der Produkte erfolgte durch Extraktion mit organischem Lösungsmittel und anschließender GC/FID bzw. GC/MS. Die Identifikation der Produkte erfolgte durch Abgleich der gewonnenen MS-Spektren mit der NIST Mass Spectral Database und der Bestimmung der Kovats-Indices.

Erste Untersuchungen zum Substratspektrum wurden mit den Monoterpenvorläufern (2*Z*)-Nerylpyrophosphat (NPP) und (2*E*)-Geranylpyrophosphat (GPP) durchgeführt (Abb. 24). Beide Substrate unterscheiden sich nur durch eine *cis-trans*-Isomerie der ersten Doppelbindung im Kohlenstoffgerüst und wurden bereits erfolgreich in Umsetzungsversuchen mit Sesquiterpensynthesen eingesetzt. Die in den Versuchen verwendeten Substrate (2*E*)-GPP und (2*Z*)-NPP wurden im Rahmen der Dissertation von T. Frister synthetisiert und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

In den GC/FID-Chromatogrammen konnte für beide eingesetzten Monoterpenvorläufer ein erfolgreicher Umsatz durch das Entstehen mehrerer Peaks nachgewiesen werden. Da die Intensität vieler Produktpeaks gering ist, konnte nur ein Teil des Produktspektrums eindeutig identifiziert werden. Es ist auffällig, dass die Umsetzung von (2*Z*)-NPP zu einem wesentlich umfangreicheren Produktspektrum führt als es mit (2*E*)-GPP zu beobachten ist. Die Umsetzung von (2*E*)-GPP führt hauptsächlich zu acyclischen Produkten. Dabei wird das Produktspektrum von Geraniol und Linalool dominiert.

Die Umsetzung von (2*Z*)-NPP durch die HUM führt dagegen bevorzugt zu einem Spektrum verschiedener cyclischer Monoterpene, unter denen α -Terpineol und Limonen am stärksten vertreten sind. Da beide Substrate sich in Größe und elektronischen Eigenschaften nicht unterscheiden, muss die *cis-trans*-Isomerie der Doppelbindung an C2 einen erheblichen Einfluss auf das Produktspektrum haben.

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

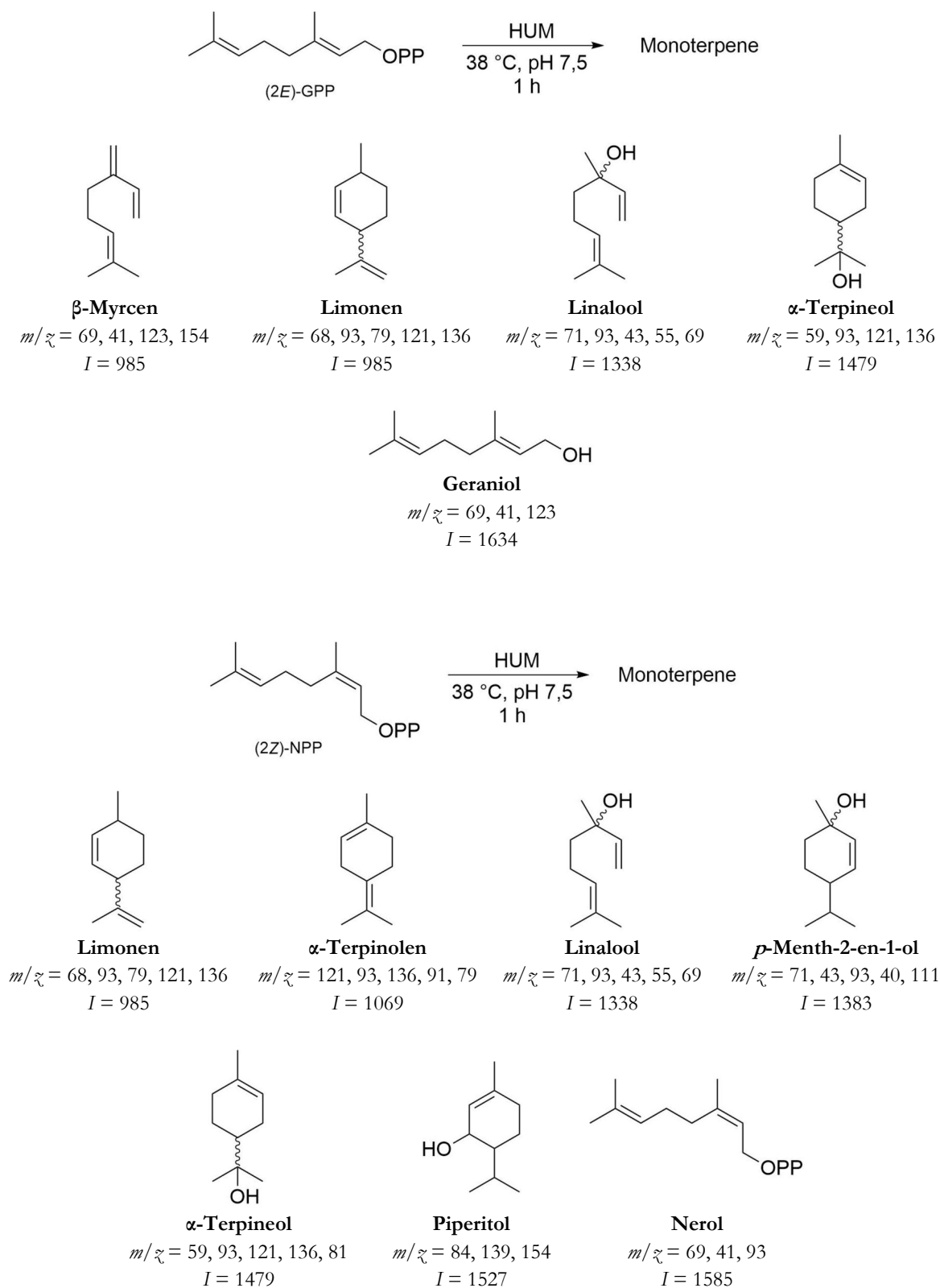


Abbildung 24: Identifizierte Produkte der Umsetzung von (2E)-GPP und (2Z)-NPP durch die rekombinante HUM.

Die Reaktion wurde bei optimalen Reaktionsbedingungen für die HUM durchgeführt. Produkte wurden durch Extraktion mit Pentan aus der wässrigen Reaktionslösung entfernt und per GC/MS untersucht. Die Identifikation der Produkte erfolgte über das NIST Mass Spectral Database und anhand der berechneten Kovats-Indices.

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

Aus den Produktbildungsmechanismen der hier gewonnenen Monoterpene können die Differenzen im Produktspektrum erläutert werden (Abb. 25). Alle cyclischen Monoterpenprodukte werden ausschließlich über das Nerylcarbokation **53** gebildet. Die räumliche Geometrie der *trans*-Doppelbindung des (*2E*)-GPP (**14**) eine Ringschlussreaktion. Die *cis*-Doppelbindung des (*2Z*)-NPP (**54**) hingegen begünstigt einen Ringschluss und ermöglicht so die Weiterreaktion zu verschiedenen cyclischen Produkten.

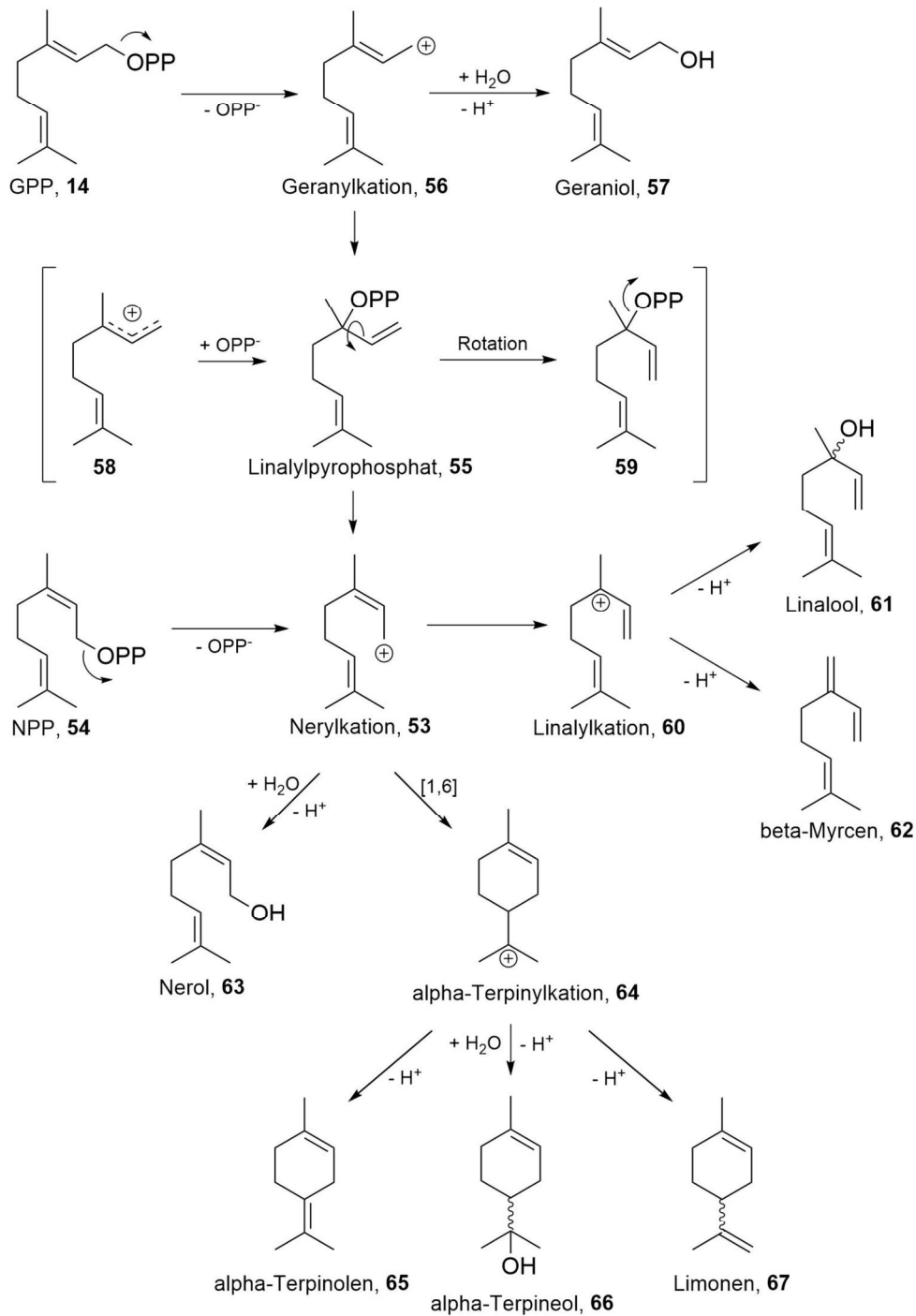


Abbildung 25: Reaktionsmechanismen für Produkte der Reaktion von (*2E*)-GPP und (*2Z*)-NPP.

Wie bereits in Abschnitt 3.1 erwähnt werden alle Monoterpene in der Natur aus (2*E*)-GPP (**14**) gebildet. (2*Z*)-NPP (**54**) ist kein unmittelbares Substrat für Monoterpensynthasen in diversen Organismen, nichtsdestotrotz wurde in der Natur eine Lösung gefunden, cyclische Reaktionsprodukte zu bilden. Durch eine allylische Umlagerung des Pyrophosphats am GPP wird über das Linalylpyrophosphat (**55**) die Bildung des Nerylcarbokations (**53**) ermöglicht. Diese Umlagerung ist thermodynamisch ungünstig und läuft freiwillig nicht ab. Einige Terpensynthasen können diese Reaktion allerdings in einer Mg²⁺-katalysierten Reaktion begünstigen. Die Tatsache, dass die Umsetzung von (2*E*)-GPP nur zu einem begrenzten Produktspektrum führt, lässt vermuten, dass das aktive Zentrum der HUM nicht in der Lage ist, effektiv die Isomerisierung des Geranylkatons (**56**) zum Nerylkation (**53**) zu katalysieren. Auch die dominante Präsenz von Geraniol (**57**) mit einem Anteil von ca. 70 % am Gesamtproduktspektrum spricht dafür, dass die Weiterreaktion des Geranylkatons (**56**) im aktiven Zentrum nicht begünstigt wird und es somit durch Abfangen eines Wassermoleküls hauptsächlich zum entsprechenden Alkohol umgewandelt wird. Wird allerdings das *cis*-Isomer vorgelegt, wird der Weg für cyclische Produkte eröffnet.

Die Substratakzeptanz der HUM wurde in weiteren Versuchen an zwei Doppelbindungsisomeren von (2*E*,6*E*)-FPP weiter untersucht (Abb. 26). Sowohl (2*E*,6*Z*)-FPP als auch (2*Z*,6*E*)-FPP werden in der Natur nicht als Substrate für Terpensynthasen genutzt. Beide Verbindungen wurden allerdings bereits erfolgreich als alternative Substrate von Sesquiterpensynthasen akzeptiert (Frister et al. 2015). Da beide FPP-Isomere nicht kommerziell erhältlich sind, wurden die Substrate im Rahmen der Dissertation von T. Frister synthetisiert und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die Umsetzung beider FPP-Isomere konnte erfolgreich in den GC/FID-Chromatogrammen nachgewiesen. Sowohl die Reaktion von (2*E*,6*Z*)-FPP als auch (2*Z*,6*E*)-FPP führte zu einem Produktspektrum mit je fünf Peaks im Chromatogramm, von denen aufgrund geringer Produktkonzentrationen nur je drei per GC/MS identifiziert werden konnten. Besonders auffällig ist, dass die HUM, deren natürliche Produkte einen sehr simplen Aufbau aufweisen, durch Vorlegen komplexerer Substrate durchaus in der Lage ist auch strukturell komplexere und hydroxylierte Produkte zu bilden. Die Umsetzung von (2*E*,6*Z*)-FPP führte neben dem jeweiligen Farnesylalkohol zu den tricyclischen Gerüsten α -Gurjunen und Epiglobulol. Die Reaktion von (2*Z*,6*E*)-FPP wiederum führte zusätzlich zur Bildung von α -Ylangen und Germacren-4-ol.

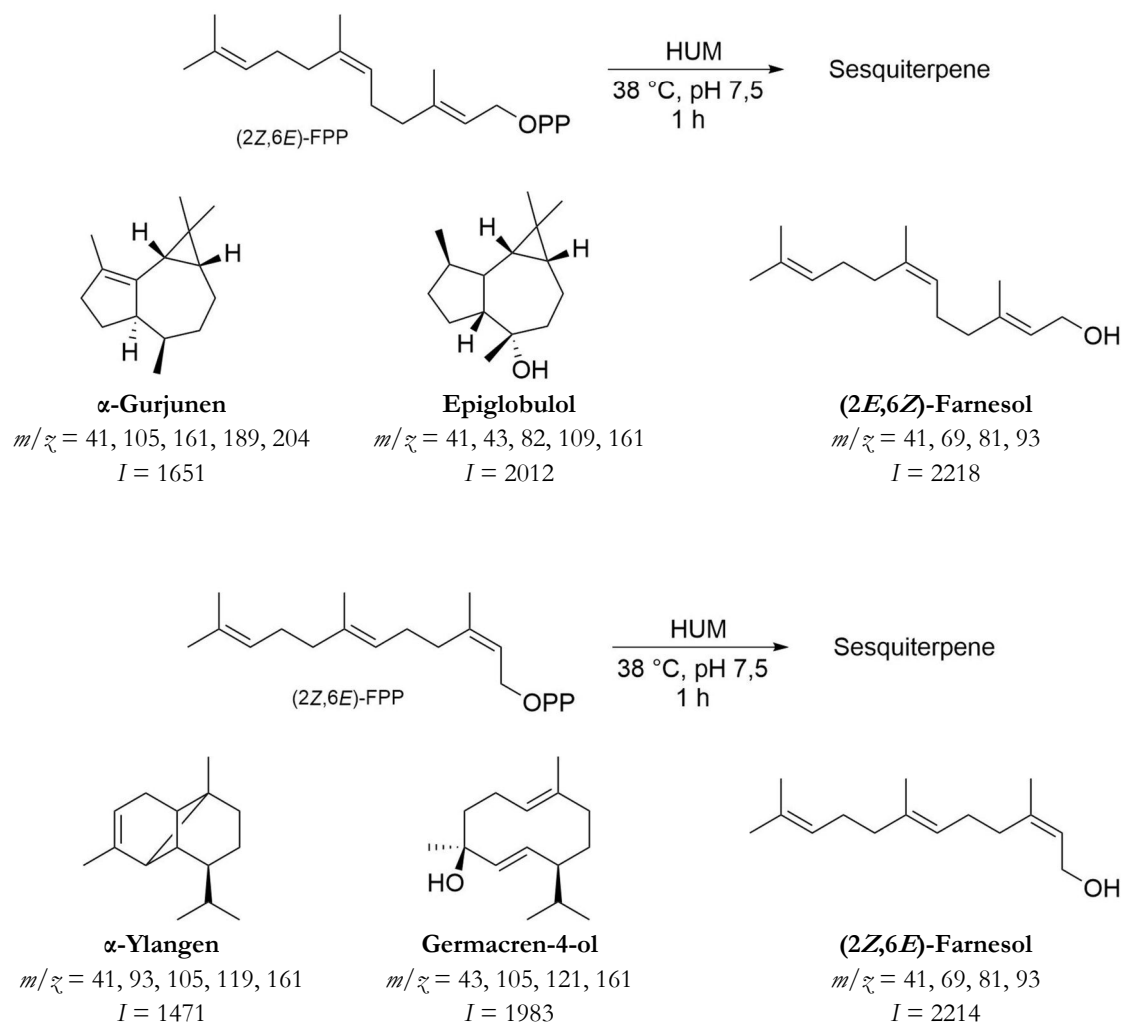


Abbildung 26: Identifizierte Produkte der Umsetzung von (2E,6Z)-FPP und (2Z,6E)-FPP durch die rekombinante HUM.

Die Reaktion wurde bei optimalen Reaktionsbedingungen für die HUM durchgeführt. Produkte wurden durch Extraktion mit Pentan aus der wässrigen Reaktionslösung entfernt und per GC/MS untersucht. Die Identifikation der Produkte erfolgte über das NIST Mass Spectral Database und anhand der berechneten Kovats-Indices.

Diese extreme Produktvarianz im Vergleich zum natürlichen Substrat muss eindeutig in der Doppelbindungsisomerie des FPP begründet liegen. Werden die Bildungsmechanismen der hier gebildeten Produkte genauer betrachtet, erkennt man, dass schon allein die räumliche Anordnung des FPP bestimmte Reaktionswege begünstigen muss (Abb. 27). Das (2Z,6E)-FPP (**68**) liegt mit der *cis*-Doppelbindung an C2 so günstig, dass bereits ohne die Cyclisierungsreaktion ein Germacradienyl-Grundgerüst **69** erkennbar ist. Ebenso ist die allylische Umlagerung der Pyrophosphat-Funktion von C1 zu C3 im (2Z,6E)-FPP (**68**) sterisch begünstigt, wodurch der Zugang zu Nerolidylpyrophosphat (**70**) und daraus entstehende Produkte ermöglicht wird.

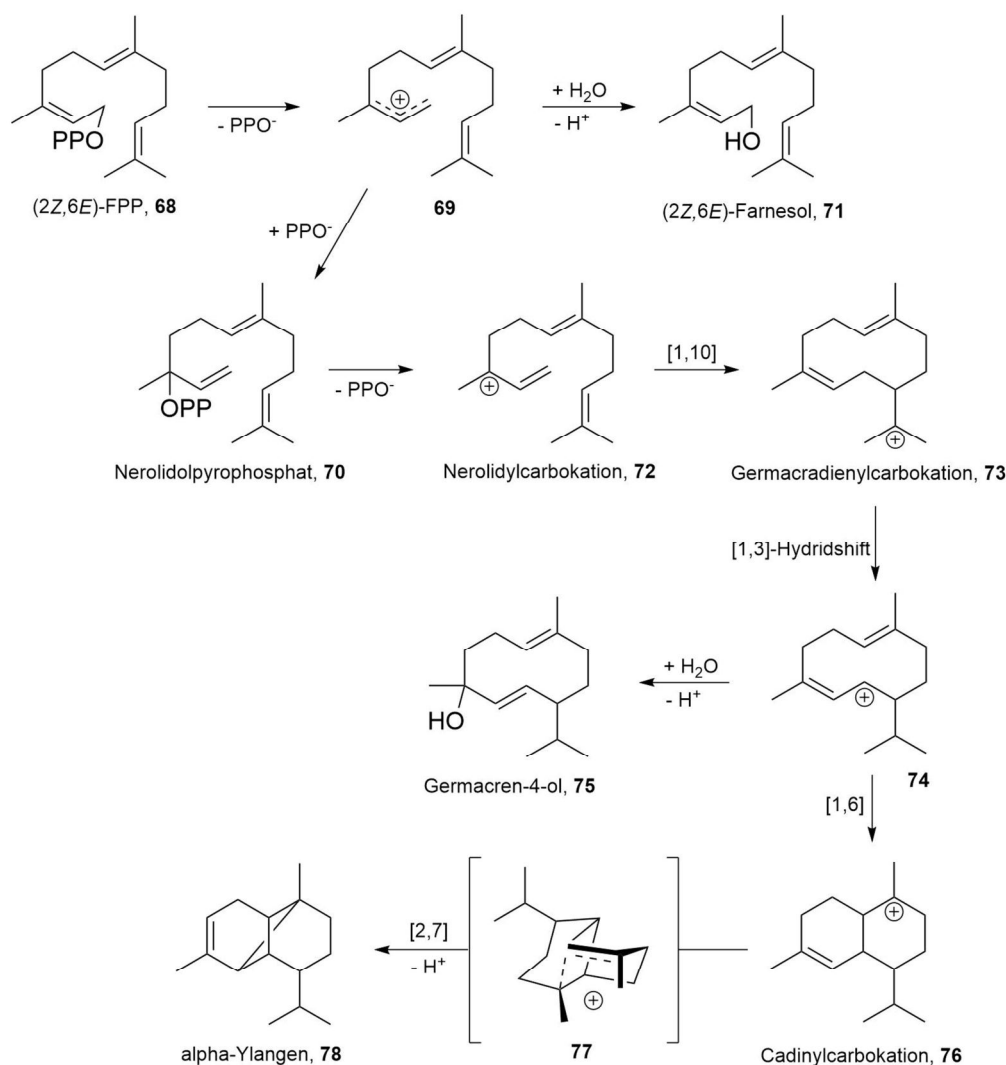


Abbildung 27: Postulierter Reaktionsmechanismus für Produkte der Reaktion von (2Z,6E)-FPP.

Da die bisherige Erkenntnis der HUM mit Monoterpenvorläufern und Doppelbindungsisomeren des FPP eine durchaus größere Klasse an möglichen Substraten für die HUM zuschreibt, wurden ebenfalls synthetische Verbindungen als Substrat in Betracht gezogen. Am Institut für Organische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität wurden im Rahmen der Dissertation von K. Seidel verschiedene Ether-Derivate des (2E,6E)-FPP synthetisiert und der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt (Seidel 2017). Die Ether-Derivate unterscheiden sich in ihrer Struktur vom FPP nur um ein Sauerstoffatom, welches in die Kohlenstoffkette eingebaut wurde (Abb. 28).

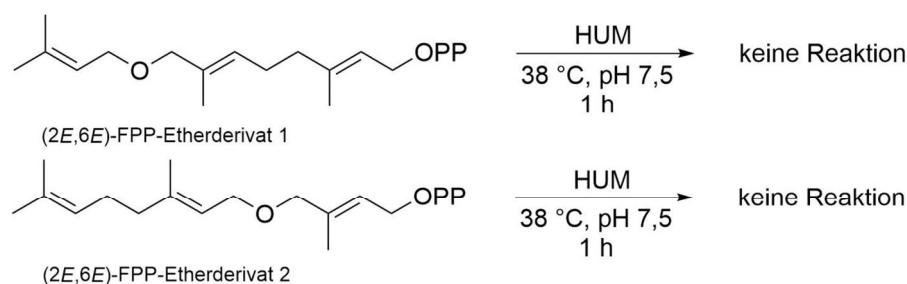


Abbildung 28: Umsetzung der FPP-Etherderivate durch die rekombinante HUM.

Die Reaktion wurde bei optimalen Reaktionsbedingungen für die HUM durchgeführt. Es konnte keine Produktbildung per GC/FID nachgewiesen werden.

Im Umsetzungsversuchen mit den FPP-Ether-Derivaten konnte mit beiden Substraten keine Produktbildung detektiert werden (s. Abschnitt 8.4). Vermutlich ist hier eine Grenze der Substratflexibilität der HUM erreicht, die sowohl mit der größeren Substratstruktur als auch mit den veränderten elektronischen Eigenschaften der Substrate begründet werden kann.

4.2 Entwicklung eines photometrischen Assays zur Bestimmung der Terpensynthase-Aktivität

Bei der Untersuchung von Terpensynthasen ist für die zuverlässige Bestimmung der Enzymaktivität ein geeignetes bioanalytisches Messverfahren unverzichtbar. Derzeit beruhen viele Methoden zur Messung der Terpensynthase-Aktivität auf der direkten chromatographischen oder radioaktiven Detektion der Terpenprodukte (Schnee et al. 2002). Beide Methoden sind genau und liefern zuverlässige Ergebnisse, allerdings sind sie mit einem erheblichen Versuchs- und Sicherheitsaufwand verbunden. Zudem liegen die Messergebnisse wegen der apparativen Bedingungen erst mit großem Zeitverzug vor. Photometrische Assays sind in der Handhabung einfacher und ermöglichen im Mikrotiterplatten-Format die Vermessung mehrerer Proben gleichzeitig. Lauchli et al. entwickelten hierzu einen gekoppelten Enzymassay für Terpensynthasen (Lauchli et al. 2013). Als Substrat werden Vinylmethylether-Derivate der Terpenvorläufer verwendet, die bei Umsetzung durch Terpensynthasen Methanol als Nebenprodukt freigegeben. Mithilfe einer Alkoholoxidase wird Methanol zu Formaldehyd umgewandelt, welches durch Zugabe von Purpald[®] einen lilafarbenen Komplex bildet und bei 550 nm detektiert werden kann. Ein erheblicher Nachteil dieser Methode, der die Anwendbarkeit auf alle Terpensynthasen beschränkt, ist das Substrat, welches nicht kommerziell verfügbar ist und individuell synthetisiert werden muss, sowie die

Tatsache, dass nicht alle Terpensynthesen Substrate mit veränderten chemischen Eigenschaften umsetzen können.

Die Entwicklung eines schnellen und einfachen Aktivitätstests für Terpensynthesen muss kritisch durchdacht werden. Eine direkte Detektion der Terpenprodukte aus einem Produktgemisch ist mit spektroskopischen Methoden nicht zuverlässig. Terpene sind weder fluoreszenzaktiv, noch bilden sie farbige Komplexe aus, die photometrisch vermessen werden können. Vardakou et al. umgingen dieses Problem, indem sie die Pyrophosphatbildung als Grundlage eines photometrischen Assays verwendeten (Vardakou et al. 2014). Die indirekte Bestimmung der Terpenkonzentration wurde auch in der vorliegenden Arbeit als Lösungsstrategie verfolgt.

4.2.1 Messprinzip und Validierung

Bei der enzymatischen Umsetzung von Terpenvorläufern durch die Terpensynthesen entsteht im ersten Schritt der komplexen Reaktionsmechanismen ein Äquivalent Pyrophosphat als Nebenprodukt. Pyrophosphat kann sowohl chemisch als auch enzymatisch in zwei Phosphationen gespalten werden. In der Literatur sind zahlreiche Methoden zur spektroskopischen Messung von Phosphat beschrieben (Drueckes et al. 1995; Munoz et al. 1983), wovon die photometrische Detektion als Malachitgrün-Komplex am weitesten verbreitet ist (Kirchgesser und Dahmann 1990; Sherwood et al. 2013; Cestari und Stuart 2013).

Für die Entwicklung des photometrischen Malachitgrün-Molybdat-Assays für Terpensynthesen wurden zunächst grundlegende Vorversuche durchgeführt, die die Funktionalität des Assays gewährleisten sollten. Die Auswahl der Reaktionslösung für die enzymatische Reaktion wurde wie bei vorangegangenen Aktivitätstests beim MOPS-Puffersystem belassen. Dieses hat zum einen den Vorteil, dass die Enzyme in MOPS-Puffer gelagert werden und somit keine Schwankungen in der Zusammensetzung der Reaktionslösungen auftreten, zum anderen ist das MOPS-Puffersystem als Reaktionslösung für Terpensynthesen vielseitig erprobt und bestätigt. Ebenso kann ein besserer Vergleich mit Daten durchgeführt werden, die per GC-Aktivitätstest ermittelt wurden, da eine Aktivitätsänderung durch Puffersystemdifferenzen ausgeschlossen werden kann. Etwaige Unterschiede in den Daten wären somit nur auf die verwendete Messmethode zurückzuführen.

Es wurden zunächst grundlegende Versuche zur Assayvalidierung bezüglich der Bildung des Malachitgrün-Komplexes und der Spaltung des Pyrophosphates durch die

Anorganische Pyrophosphatase durchgeführt. Die Anorganische Pyrophosphatase (APP) aus *S. cerevisiae* wurde kommerziell von Sigma Aldrich Corporation, USA bezogen.

Im Rahmen der Assayentwicklung wurden wichtige Faktoren wie das Absorptionsmaximum, Linearität, Präzision und Genauigkeit der Messmethode, sowie die Geschwindigkeit der Pyrophosphatspaltung durch die APP genauer untersucht. In der Literatur werden Absorptionsmaxima von 623 nm bis 630 nm für den Malachitgrün-Phosphomolybdat-Komplex angegeben. Um einen genauen Wert zu ermitteln, wurde das Absorptionsspektrum des Komplexes aufgenommen. Dafür wurde eine Phosphatlösung in MOPS-Aktivitätspuffer (pH 7,5) mit einer Konzentration von 30 μM in einer 96-well Platte vorgelegt und mit dem Malachitgrün-Molybdat-Färbereagenz versetzt. Das Absorptionsspektrum wurde im Bereich von 400-800 nm aufgezeichnet und das Absorptionsmaximum bei 625 nm bestimmt (Abb. 29). Typisch für den Malachitgrün-Farbstoff ist im Absorptionsspektrum ein zweiter Peak bei ca. 440 nm zu erkennen.

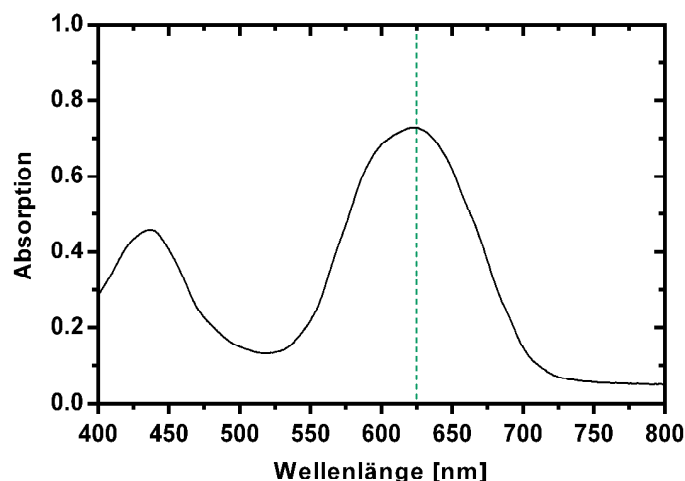


Abbildung 29: Absorptionsspektrum des Malachitgrün-Phosphomolybdat-Komplexes.

Aufnahme des Absorptionsspektrums des Farbkomplexes von 400-800 nm. Das Absorptionsmaximum bei 625 nm ist durch eine gepunktete Linie gekennzeichnet.

Die Kinetik der Bildung des Malachitgrün-Molybdat-Komplexes wurde über einen Zeitraum von 30 min am Spektrophotometer verfolgt und die Inkubationszeit bestimmt, die nötig ist, damit sich eine lineare Abhängigkeit zwischen Messsignal und Analytkonzentration einstellt (Abb. 30). Es wurde ein Konzentrationsbereich von 1-200 μM Phosphat untersucht.

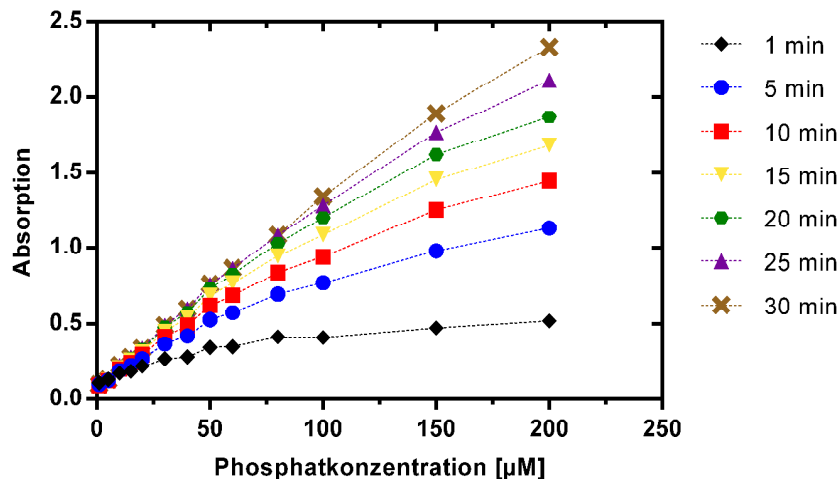


Abbildung 30: Kinetik der Bildung des Malachitgrün-Phosphomolybdat-Komplexes.

Analyse der vollständigen Ausbildung der Phosphomolybdat-Komplexe in Abhängigkeit der Zeit. Die Phosphat-Lösungen wurden mit Malachitgrün-Molybdat-Färbereagenz versetzt und durch Messung der Adsorption bei 625 nm die Komplexbildung zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert.

Auffällig ist, dass sich in kleinen Konzentrationsbereichen bis 20 µM Orthophosphat sehr schnell bei allen Inkubationszeiten eine Linearität zwischen Messsignal und Analytkonzentration ergibt. Allerdings sind bei höheren Phosphatkonzentrationen kürzere Inkubationszeiten von Nachteil, da hier nicht das gesamte vorliegende Phosphat vollständig komplexiert werden kann. Erst bei einer Inkubationszeit von 30 min ist das Messsignal direkt proportional zur Analytkonzentration. Für den weiteren Verlauf der Assayentwicklung wird somit eine Inkubationszeit von 30 min für den Komplexierungsschritt festgelegt.

Beim Einsatz von gekoppelten Enzymsystemen in Enzymassays ist es wichtig, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Umsetzungsreaktion mit dem zu untersuchenden Enzym ist und alle weiteren Enzymreaktionen für die Auswertung vernachlässigbar schnell ablaufen. Im vorliegenden Fall darf die Spaltung des Pyrophosphates durch die Anorganische Pyrophosphatase nicht länger dauern als die Umsetzung des FPP durch die HUM. Um die optimale Konzentration an APP zu bestimmen, wurden Umsetzungsversuche mit 100 µM Pyrophosphat mit verschiedenen APP-Mengen im 96-well Platten-Maßstab durchgeführt. Über einen Zeitraum von 30 min wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben mit dem Malachitgrün-Molybdat-Färbereagenz versetzt, die enzymatische Reaktion durch den pH-Shift gestoppt und die Absorption nach 30 min Inkubationszeit bei 625 nm am Photometer vermessen. In Anlehnung an die Literatur wurden APP-Konzentrationen im Bereich von 2,5 mU bis 10 mU getestet. Aus den kinetischen Messungen in Abschnitt 4.1.4.3 ist bekannt, dass die enzymatische Reaktion bis ca. 4 min eine lineare Steigung besitzt. Für den

photometrischen Enzymassay ist es deshalb wichtig, dass die Reaktion innerhalb dieses linearen Bereichs gestoppt wird, um mit der Endpunktmethode zuverlässige Ergebnisse zu erhalten. Wichtig ist daher auch, dass die Spaltung des Pyrophosphats durch die Anorganische Pyrophosphatase in diesem Zeitfenster quantitativ durchgeführt werden muss. Im Bereich von 2,5-10 mU APP ist ein vollständiger Umsatz des Pyrophosphats bei den vorhandenen Versuchsbedingungen nicht gegeben (Abb. 31). Durch die Erhöhung der APP-Konzentration um ein Vielfaches auf 100 mU, wurde bereits nach 2 min ein nahezu vollständiger Umsatz des Pyrophosphats registriert. Nachfolgende Messpunkte weisen außerdem darauf hin, dass die Reaktion bereits eine Sättigung erreicht hat. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde daher die Reaktionszeit im photometrischen Malachitgrün-Enzymassay für weitere Versuche auf 2 min festgesetzt.

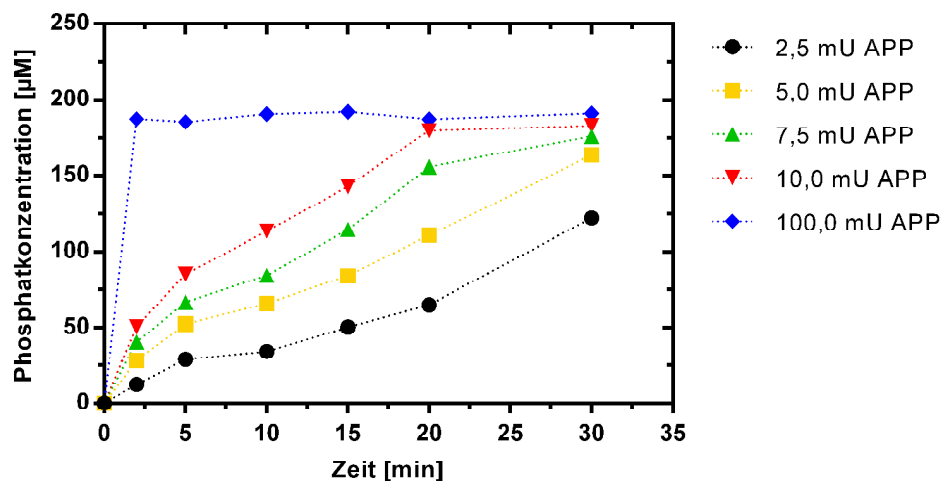


Abbildung 31: Umsetzung von Pyrophosphat durch die Anorganische Pyrophosphatase.

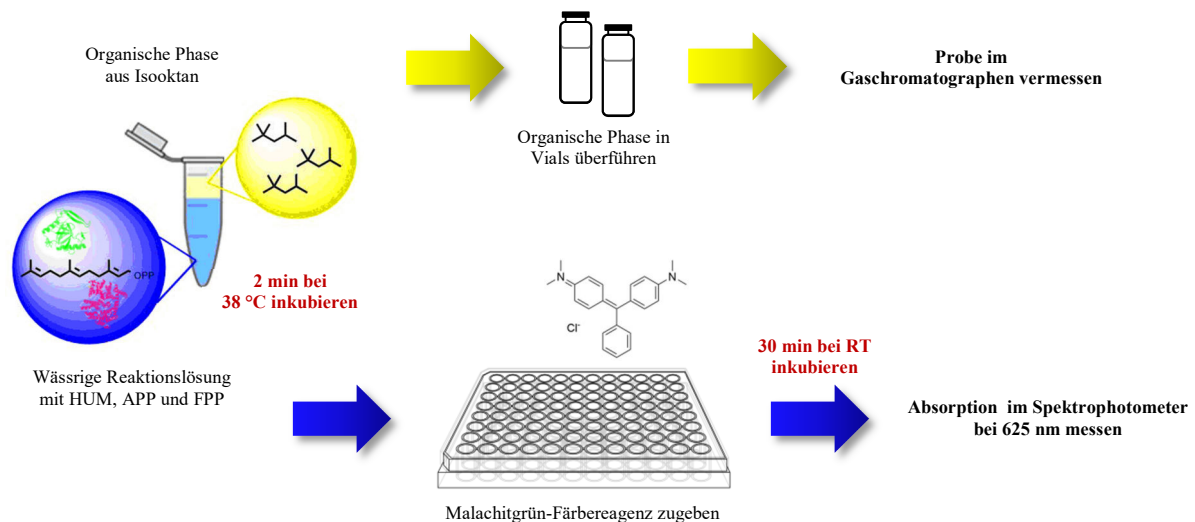
Analyse der vollständigen Umsetzung von 100 µM Pyrophosphat in Abhängigkeit der Enzymmenge. Das gebildete Phosphat wurde mit Malachitgrün-Molybdat-Färbereagenz versetzt und durch Messung der Adsorption bei 625 nm quantifiziert.

Mit den in den Vorversuchen ermittelten Parametern (Tab. 8) wurde die Funktionalität des Assays zur Bestimmung der Terpensynthase-Aktivität untersucht. Wichtig bei der Entwicklung neuer analytischer Methoden ist eine Referenzmethode, mit der die ermittelten Daten und Ergebnisse verglichen und in ihrer Richtigkeit abgesichert werden können. Für die Terpensynthasen ist in diesem Fall der gaschromatographische Assay eine etablierte Standardmethode, die in der Literatur vorwiegend verwendet wird und somit als Referenzmethode geeignet ist (Abb. 32).

Tabelle 6: Malachitgrün-Molybdat-Assay zur Bestimmung der Terpensynthase-Aktivität.

In Vorversuchen ermittelte Versuchsparameter. Reaktionszeit, Reaktionstemperatur und pH-Wert für die enzymatische Reaktion und Inkubationszeit und Inkubationstemperatur für den anschließenden Färbeschritt mit Malachitgrün-Molybdat-Färbereagenz.

Reaktionszeit	Reaktionstemperatur	pH-Wert	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur
2 min	38 °C	7,5	30 min	RT

**Abbildung 32: Validierung des photometrischen Malachitgrün-Molybdat-Assays.**

Zur Validierung des photometrischen Assays wurden fünf Reaktionslösungen mit verschiedenen FPP-Konzentrationen und drei Nullkontrollen (NK) angesetzt, die wie folgt zusammengesetzt waren:

- Proben 5-60 μM FPP, 0,05 μM HUM, 1 mU/ μL APP
- NK 1 30 μM FPP, 0,05 μM HUM
- NK 2 30 μM FPP, 1 mU/ μL APP
- NK 3 0,05 μM HUM, 1 mU/ μL APP

Die Nullkontrollen dienen dem Zweck falschpositive Ergebnisse mit dem photometrischen Assay ausschließen bzw. erkennen zu können. Alle Versuchsansätze wurden zunächst in 500 μL Maßstab durchgeführt, wobei die Reaktionslösung mit Isooktan überschichtet wurde. Nach der Reaktionszeit von 2 min wurden alle Proben intensiv vermisch, um die Extraktion der organischen Produkte aus der wässrigen Phase in die organische Phase zu gewährleisten. Die organische Phase wurde abgetrennt und für die weitere Analyse über GC/FID weiterverwendet. Anhand der Peakfläche im Chromatogramm wurde die Konzentration des

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

Produktes ermittelt. Die wässrige Reaktionsphase wurde in eine 96-well Platte überführt, mit Malachitgrün-Molybdat-Färbereagenz versetzt und weitere 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 625 nm am Photometer vermessen und die Konzentration an gebildetem Pyrophosphat über die gemessene Phosphatkonzentration ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 33 dargestellt.

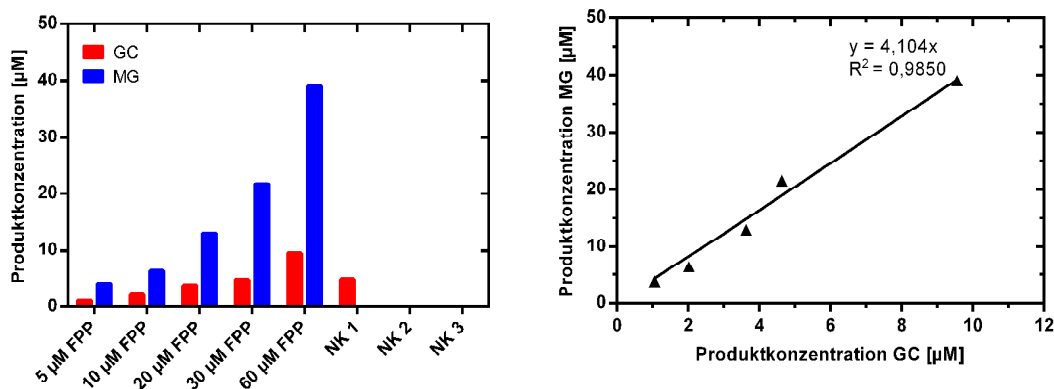


Abbildung 33: Validierung des Malachitgrün-Molybdat-Assays mit dem GC-Assay als Vergleichsmethode.

(Links) Umsetzung verschiedener Konzentrationen von (2*E*,6*E*)-FPP durch die HUM und Durchführen von Nullkontrollen. Die Terpenprodukte in der organischen Phase wurden per GC/FID quantifiziert. Das gebildete Phosphat in der wässrigen Lösung wurde mit Malachitgrün-Molybdat-Färbereagenz versetzt und durch Messung der Adsorption bei 625 nm quantifiziert. NK 1 = ohne Zugabe von APP, NK 2 = ohne Zugabe von HUM, NK 3 = ohne Zugabe von FPP. (Rechts) Auftragung der gemessenen Produktkonzentration im MG-Assay gegen die gemessene Produktkonzentration im GC-Assay.

Die Nullkontrollen zeigten die erwarteten Ergebnisse auf. NK 1 ist nur im GC-Assay positiv und im MG-Assay negativ. Dieses resultiert aus der Abwesenheit der APP in der Negativprobe und die daraufhin fehlende Spaltung von Pyrophosphat zu Phosphat. Diese Beobachtung weist auch auf einen Vorteil des MG-Assays hin, dass nur spezifisch Phosphat komplexiert und detektiert wird und restliches Pyrophosphat keinen Einfluss auf das Messergebnis hat. NK 2 und NK 3 sind in beiden Assays negativ. In NK 2 fehlt die HUM zur Umsetzung des FPP. Eine unspezifische Spaltung des gebundenen Pyrophosphats durch die APP findet nicht statt. Somit wird weder α -Humulen noch Phosphat detektiert. In NK 3 kann keine Umsetzung stattfinden, da kein Substrat vorhanden ist, demnach findet auch keine Produktbildung statt.

Bei den Reaktionsproben mit unterschiedlichen FPP-Konzentrationen ist die gemessene Produktkonzentration im MG-Assay durchgehend um das 4-fache höher als die

Konzentration, die mit dem GC-Assay bestimmt wurde. Allerdings liegen die gemessenen Produktkonzentrationen beim MG-Assay deutlich näher an erwarteten Werten als die Werte des GC-Assays. Auffällig ist auch, dass ein linearer Zusammenhang zwischen den Messergebnissen der beiden Assay-Methoden besteht. Da auch Versuchswiederholungen zum gleichen Ergebnis geführt haben, wurde ein systematischer Fehler in Betracht gezogen. In weiterführenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Extraktion der organischen Produkte mit Isooktan aus der wässrigen Lösung nicht vollständig erfolgt und demnach die gaschromatographisch ermittelten Werte niedriger sind als der tatsächliche Wert. Damit zeigt sich auch eine Problematik des GC-Assays, die bisher in der Literatur nicht diskutiert wurde. Umso mehr wurde beim MG-Assay ein Fokus auf die Realisierbarkeit einer alternativen kinetischen Messmethode gelegt.

4.2.2 Photometrische Bestimmung der α -Humulensynthase-Aktivität

Bereits in Abschnitt 4.1.4.3 wurden kinetische Parameter der HUM für die Umsetzung von FPP mithilfe des gaschromatographischen Enzymassays ermittelt. In Abschnitt 4.2.1 konnte gezeigt werden, dass sich ein photometrischer MG-Assay grundsätzlich für die Messung der Terpensynthaseaktivität eignet. Für eine kinetische Messung sind besondere Faktoren zu beachten. Eine kontinuierliche Messung der Produktbildung ist unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht möglich. Wird das farbbildende Reagenz von Beginn an zugegeben, wird keine enzymatische Reaktion stattfinden, da die Enzyme durch das saure Farbreagenz (pH 2) ihre Aktivität verlieren. Bei einer Endpunktmethode dagegen ist es wichtig, die Reaktion noch im linearen Bereich abzustoppen, um für die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion verlässliche Werte zu erhalten.

Die Bestimmung der kinetischen Daten der HUM mittels MG-Assay wurde mit den in Abschnitt 4.2.1 ermittelten Assaybedingungen nach der Endpunktmethode durchgeführt. Die Messung wurde in 96-well Platten mit 100 μ L Reaktionsvolumen durchgeführt. Im Reaktionspuffer wurden das Substrat (2E,6E)-FPP, (2E)-GPP bzw. (2Z)-NPP und die APP vorgelegt. Durch Zugabe der HUM wurde die Reaktion gestartet und die Platte bei 38 °C für 2 min inkubiert. Nach Zugabe von 25 μ L der Malachitgrün-Molybdat-Färbelösung wurde die Platte bei Raumtemperatur 30 min inkubiert und anschließend die Absorption bei 625 nm bestimmt. Über eine Phosphat-Kalibrationsreihe erfolgte die Quantifizierung der gebildeten Produktmenge. Durch Auftragung der gebildeten Produktmenge gegen die Zeit wurden schließlich die Anfangsgeschwindigkeiten der einzelnen Reaktionsansätze bestimmt. Die

anschließende Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration lieferte den Michaelis-Menten-Plot (Abb. 34). Die kinetischen Daten der Reaktion wurden mithilfe der Software GraphPad durch nicht-lineare Regression mit Michaelis-Menten-Fit bestimmt (Tab. 7).

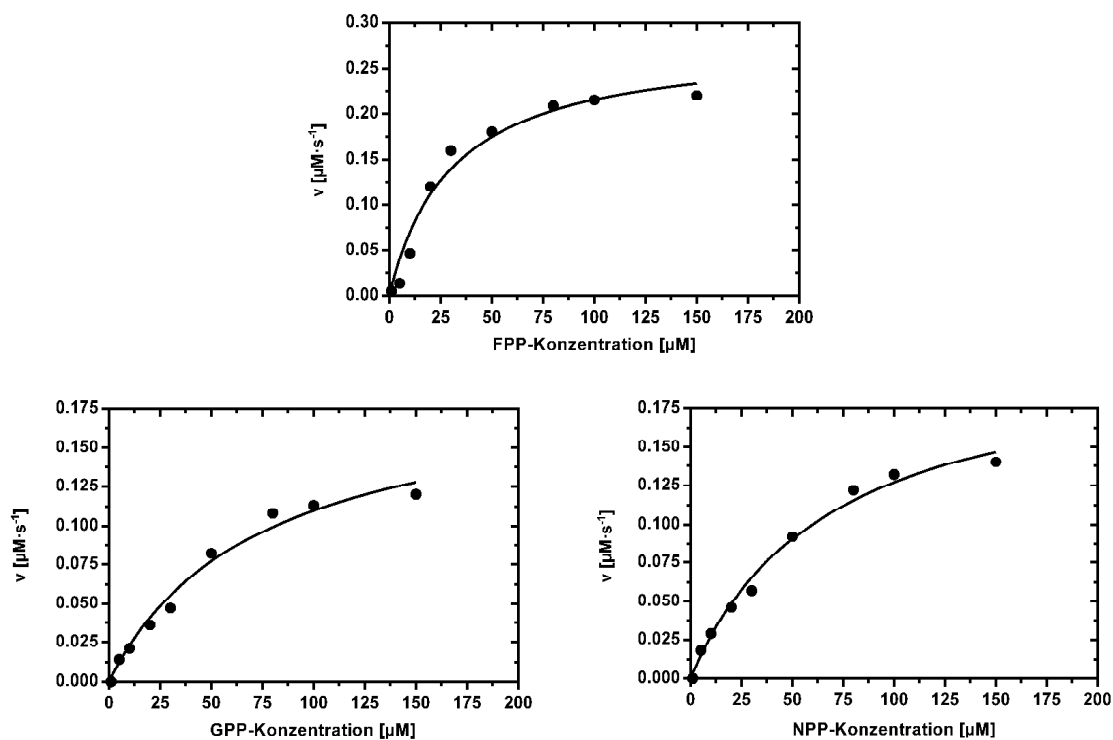


Abbildung 34: Michaelis-Menten-Kurven der Umsetzung von (2E,6E)-FPP, (2E)-GPP und (2Z)-NPP durch die HUM.

Für jeden Messpunkt wurden Umsetzungsversuche mit dem jeweiligen Substrat bei 38 °C und pH 7,5 durchgeführt und mehrere Messpunkte über einen Zeitperiode von 4 min aufgenommen. Die Produkte in der organischen Phase wurden mittels GC/FID-Analyse quantifiziert und die Reaktionsrate für jede Umsetzung bestimmt. Für jeden Messpunkt wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die kinetischen Parameter der Umsetzung von (2E,6E)-FPP wurden mit $K_M=30,33 \mu\text{M}$, $v_{\max}=0,28 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}=5,61 \text{ s}^{-1}$ und einer spezifischen Enzymaktivität von $5,08 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ bestimmt. Mit dem MG-Assay wird damit eine höhere Affinität der HUM zu (2E,6E)-FPP detektiert als mit dem GC-Assay. Auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, die Wechselzahl und die spezifische Aktivität liegen höher. Vermutlich liegt der Grund für den Unterschied der Werte in der nicht quantitativen, unvollständigen Extraktion der Produkte beim GC-Assay. Werden die kinetischen Daten für die Umsetzung von (2E)-GPP und (2Z)-NPP betrachtet, fällt auf, dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit sich mit $0,19 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ bzw. $0,20 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ kaum von der Umsetzung von (2E,6E)-FPP unterscheidet. Allerdings sind

die Michaelis-Menten-Konstanten mit 73,55 μM und 67,96 μM höher und weisen auf eine schlechtere Affinität des Enzyms zu den Monoterpenvorläufern hin. Die Bindungsaffinität zu (2Z)-NPP ist dabei größer als zu (2E)-GPP.

Tabelle 7: Kinetische Daten der Umsetzung von (2E,6E)-FPP, (2E)-GPP und (2Z)-NPP durch die HUM.

Assay-Methode	Substrat	K_M [μM]	v_{\max} [$\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$]	k_{cat} [s^{-1}]	Spezifische Aktivität [$\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$]
GC	FPP	32,79	0,20	3,91	3,63
MG	FPP	30,33	0,28	5,61	5,08
MG	GPP	73,55	0,19	3,80	3,45
MG	NPP	67,96	0,21	4,26	3,81

In der Literatur gibt es kaum Vertreter von Sesquiterpensynthasen, deren kinetische Daten zur Umsetzung von Monoterpenvorläufern bekannt sind. Seltene Beispiele sind die Amorpha-4,11-diensynthase (ADS) aus *Artemisia annua* und die α -Farnesensynthase (FS) aus *Actinidia deliciosa*, zu denen Daten für die Umsetzung von GPP vorliegen (Tab. 8) (Picaud et al. 2005; Nieuwenhuizen et al. 2009). Während die ADS wie die HUM eine geringere Bindungsaffinität zu GPP aufweist, ist diese bei der FS sogar höher. Allerdings findet bei diesem Enzym wie auch bei der ADS die Umsetzung des Substrates um ein Vielfaches langsamer statt. Ein allgemeingültiges Verhalten von Sesquiterpensynthasen gegenüber Monoterpenvorläufern kann demnach aufgrund der aktuellen Datenlage nicht vorausgesagt werden.

Tabelle 8: Kinetische Daten der Umsetzung von (2E,6E)-FPP und (2E)-GPP durch die ADS und FS..

Enzym	Substrat	K_M [μM]	k_{cat} [s^{-1}]
Amorpha-4,11-diensynthase	FPP	2,0	0,0108
	GPP	28,2	0,00034
α -Farnesensynthase	FPP	9,5	0,44
	GPP	2,8	0,03

Der MG-Assay zeigt hier vielseitige Einsatzmöglichkeiten. Er eignet sich sowohl für einfache Aktivitätsmessungen, als auch für kinetische Analysen. Als *High Throughput Screening Assay*

(Hochdurchsatz-Screening) kann ein schnelles Screening verschiedener Terpensynthesen durchgeführt werden. Sowohl Analysen zur Substratspezifität und Enzymkinetik können durchgeführt werden, wie auch Versuche zur Optimierung verschiedener Reaktionsbedingungen.

4.3 Heterologe Produktion von α -Humulen in *pathway-*optimierter *Escherichia coli*

Zahlreiche Strategien zur rekombinanten Produktion von Terpenen in Mikroorganismen wurden bereits entwickelt und werden erfolgreich für die industrielle Produktion von Terpenprodukten eingesetzt (Evolva 2016; Schalk und Deguerry 2017; Paddon und Keasling 2014). Neben der heterologen Expression der Terpenbiosynthesegene basieren diese *metabolic engineering* Ansätze häufig auf der Modifizierung des Mikroorganismus-eigenen Primärmetabolismus, um eine ausreichende Bereitstellung der isoprenoiden Vorläufer DMAPP und IPP zu gewährleisten.

Der in *E. coli* vorhandene MEP-Stoffwechselweg ist für die Zellen essentiell, da es den einzigen Stoffwechselweg zur Bildung der zelleigenen isoprenoiden Strukturen darstellt. Die heterologe Produktion von Terpenen in *E. coli* erweist sich zunächst als schwierig, da die Bereitstellung von ausreichender Konzentration an Terpenvorläufern durch zelleigene Kontroll- und Stoffwechselmechanismen nicht gegeben ist. Um hohe Konzentrationen von Terpenen heterolog in *E. coli* herstellen zu können, muss durch *metabolic engineering* eine Optimierung des Zellmetabolismus durchgeführt werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, rekombinant und getrennt von den zelleigenen Kontrollmechanismen, die Enzyme des Terpenmetabolismus in der Zelle zu exprimieren.

Von Keasling und Lee wurde ein synthetischer MVA-Weg zur Produktion von FPP entwickelt. Der synthetische MVA-Weg wurde mit acht Enzymen des Terpenstoffwechsels aufgebaut (Abb. 35). Fünf Enzyme, die HMG-CoA-Reduktase (*HMGs*), die HMG-CoA-Synthase (*tHMGR*), die Mevalonat-Kinase (*MK*), die Phosphomevalonat-Kinase (*PMK*) und die Mevalonatdiphosphat-Decarboxylase (*PMD*), stammen aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und wurden mit Ausnahme der *PMD* codonoptimiert. Der MVA-Weg wurde zur Optimierung in zwei Abschnitte aufgeteilt, die unter der Kontrolle von zwei Promotoren stehen. Der obere MVA-Weg mit den Enzymen *atoB*, *HMGs* und *tHMGR* ist für die Bildung von Mevalonat aus Acetyl-CoA zuständig, während die Enzyme im unteren MVA-Weg (*MK*,

PMK, *PMD*, *idi*, *ispA*) für die Bildung von FPP aus Mevalonat zuständig sind. (Peralta-Yahya et al. 2011)

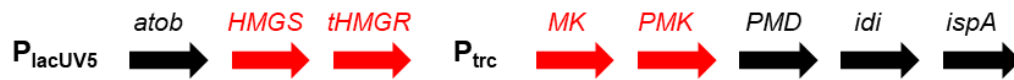


Abbildung 35: Synthetischer Mevalonat-Stoffwechselweg zur Isoprenoidproduktion in *E. coli*.

Gene in Kleinbuchstaben sind endogene Gene von *E. coli*, Gene in Großbuchstaben stammen aus *S. cerevisiae* und wurden zum Teil für *E. coli* codonoptimiert (rot).

Im Rahmen der abgeschlossenen Dissertation von S. Hartwig wurde unter Verwendung dieses Plasmidkonstruktes ein Expressionssystem zur heterologen Produktion von α -Humulen in *E. coli* BL21(DE3) hergestellt, welches in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden soll. Der Produktionsstamm wird im weiteren Verlauf der Arbeit als *E. coli* HUM_Mev1510 bezeichnet.

4.3.1 Optimierung der α -Humulenproduktion

Der für die Kultivierungsarbeiten verwendete Stamm enthält zwei verschiedene Plasmide, die das codierende Gen für die HUM bzw. die codierenden Gene für den synthetischen MVA-Weg enthalten. Die eingesetzten Plasmide besitzen mit einer Ampicillin- bzw. Chloramphenicolresistenz unterschiedliche Selektionsmarker, um sicherzustellen, dass nur Zellen, die beide Plasmide enthalten, in dem Selektionsmedium überleben.

Die Expression des *hum*-Gens wurde bereits in Abschnitt 4.1 behandelt und optimiert. Da die Gene des synthetischen MVA-Weges auf dem pBbA5c-Vektor unter der Kontrolle des *lacUV5*- bzw. *trc*-Promotors stehen, die auch beide mit IPTG induziert werden können, muss hier die IPTG-Konzentration zur Induktion aller rekombinanten Gene neu untersucht werden. Im gleichen Versuchsansatz soll außerdem der Einfluss des Induktionszeitpunktes auf die α -Humulenausbeute überprüft werden.

Zur Optimierung der heterologen α -Humulenproduktion in *E. coli* HUM_Mev1510 wurden vier verschiedene optische Dichten (0,1 rel. AU, 0,5 rel. AU, 1 rel. AU und 6 rel. AU) zur Induktion ausgewählt und getestet. Die Optimierungsversuche erfolgten in Schüttelkolben mit definiertem ZYP-31(mod)-Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle (s. Abschnitt 6.4.1) und Carbenicillin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) und Chloramphenicol ($34 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) zur Selektion. Definiertes

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

Medium wurde bevorzugt, um beim extraktiven Abtrennen des Produktes Verunreinigungen durch komplexe Medienbestandteile zu verhindern. Die Animpfdichte der Hauptkulturen betrug $OD_{600} = 0,1$ rel. AU. Bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Kulturen bis zu der spezifischen optischen Dichte inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von $0,1\text{ mM}$ IPTG induziert und die Zellen bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ weiterkultiviert. Unmittelbar vor der Induktion (t_0), 24 h (t_1) und 48 h (t_2) nach Kultivierungsbeginn wurden Proben zur weiteren Analyse der Protein- und Terpenproduktion entnommen. Um eine bessere Vergleichbarkeit gewährleisten zu können, wurden die entnommenen Proben basierend auf der Zelldichte nach der Formel $V_{Probe} = 2/OD_{600}$ normiert. Die Proteinexpression und Terpenproduktion wurden mittels SDS-PAGE bzw. GC/FID untersucht.

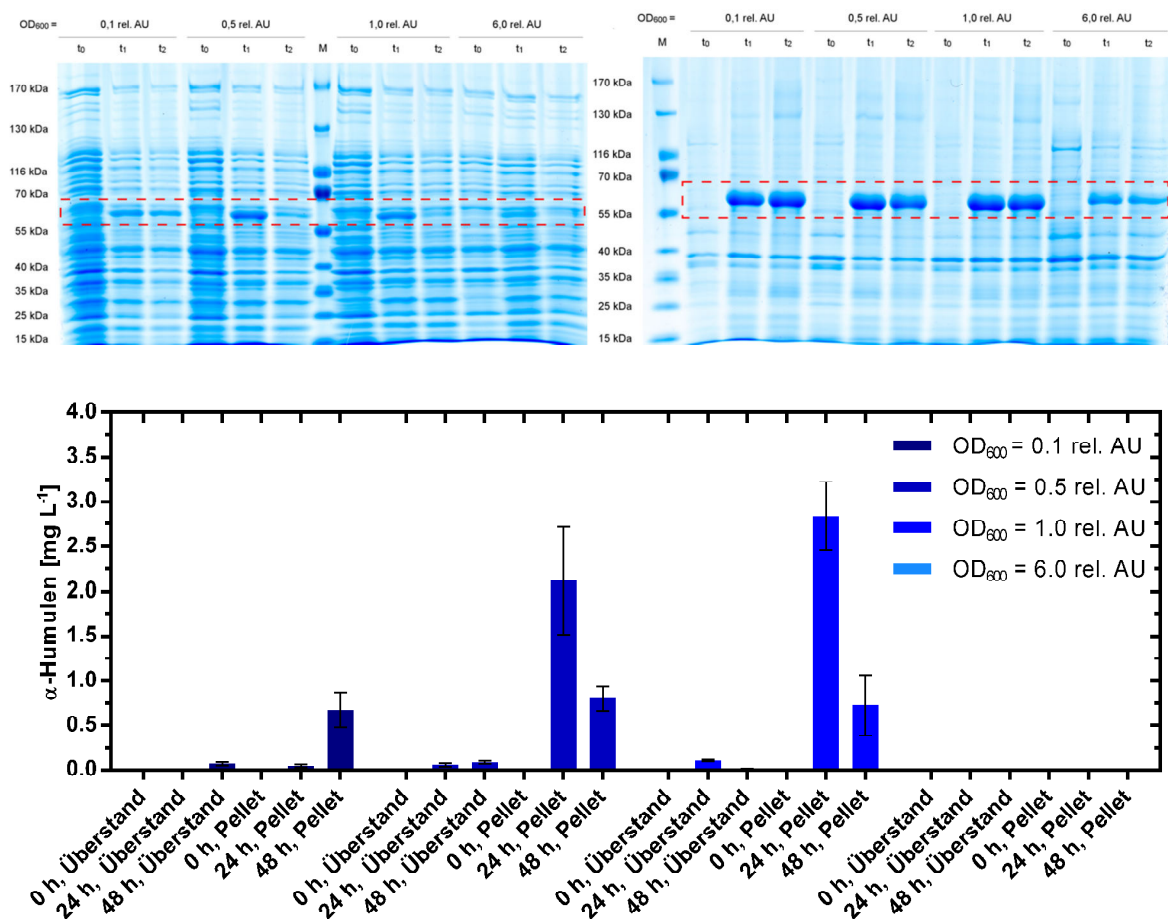


Abbildung 36: Expression des codon-optimierten *hum*-Gens in metabolisch optimierten *E. coli* HUM_Mev1510 Zellen in Abhängigkeit von der Induktionszeit.

Analyse der Produktion der rekombinanten HUM durch SDS-PAGE (10 %). Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und Proben der löslichen (oben links) und der unlöslichen Zellfraktion (oben rechts) untersucht. Zellysate und Kulturüberstände wurden mit Isooktan extrahiert und per GC/FID vermessen (unten). M = Proteinmarker, t_0 = Kulturprobe unmittelbar vor der Induktion mit IPTG, t_1 = Kulturprobe 24 h nach Induktion mit IPTG und Genexpression bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, t_2 = Kulturprobe 48 h nach Induktion mit IPTG und Genexpression bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Proben wurden basierend auf der optischen Dichte OD_{600} normiert.

Nach Zellaufschluss mithilfe von Ultraschall wurden die löslichen und unlöslichen Fraktionen mittels SDS-PAGE auf die Produktion der HUM und der Enzyme des synthetischen MVA-Stoffwechselwegs analysiert (Abb. 36 oben). Letztere konnten allerdings nicht per SDS-PAGE nachgewiesen werden. Da zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt war, ob α -Humulen in den Zellen akkumuliert oder in den Überstand sekretiert wird, wurden sowohl der Kulturüberstand als auch die aufgeschlossenen Zellen mit Isooktan extrahiert und per GC/FID untersucht (Abb. 36 unten). Dabei wurde beobachtet, dass α -Humulen sich hauptsächlich in den Zellen ansammelt. Bei allen durchgeführten Kultivierungen konnte nach Induktion in der löslichen Fraktion auf dem SDS-PAGE-Gel bei ca. 67 kDa die HUM-Bande nachgewiesen werden. Vergleicht man die Proteinproduktion bei verschiedenen Induktionszeitpunkten, fällt auf, dass sich ein später Induktionszeitpunkt insgesamt negativ auf die HUM-Produktion auswirkt. In der Kultur, die bei einer optischen Dichte von $OD_{600} = 6,0$ rel. AU induziert wurde, wurde auch durch GC/FID-Analyse keine Terpenproduktion detektiert. Da die Zellen sich bei dieser optischen Dichte am Anfang der stationären Phase befinden, ist anzunehmen, dass die vermehrte Produktion von zelleigenen Proteasen einen Abbau der HUM in der Zelle begünstigt. Auch eine frühe Induktion mit IPTG ist für die Produktion der HUM im *pathway*-optimierten Stamm unvorteilhaft, da das Enzym hauptsächlich unlöslich in der Zelle vorliegt, wie es auch schon bei *E. coli* HUM1810 in Abschnitt 4.1.1 beobachtet werden konnte. Optimal für die Proteinproduktion wirkt sich eine Induktion der Genexpression in der frühen exponentiellen Wachstumsphase aus. Sowohl bei $OD_{600} = 0,5$ rel. AU als auch bei $OD_{600} = 1,0$ rel. AU ist 24 h nach Induktion mit IPTG eine starke HUM-Bande im Proteingel und eine gute Terpenproduktion zu erkennen. Auffällig ist hier jedoch, dass nach 48 h die HUM-Konzentration in beiden Kulturen abnimmt. Das spiegelt sich auch in der Terpenproduktion wider. Die maximal erreichte Terpenkonzentration von $2,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Kulturvolumen wurde 24 h nach Induktion in der Kultur, die bei einer optischen Dichte von 1,0 rel. AU induziert wurde, bestimmt. Nach 48 h beträgt dieser Wert nur noch $0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Aufgrund des verwendeten Minimalmediums ist hier ein Nährstoffmangel nicht auszuschließen, dass durch die Verdauung des heterolog produzierten Enzyms und der Terpene überbrückt werden kann.

Die Kultivierungen zur Ermittlung der optimalen Induktorkonzentration wurden daraufhin nur über 24 h durchgeführt. Es wurden vier verschiedene IPTG-Konzentrationen (0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM und 1 mM) ausgewählt und getestet. Die Optimierungsversuche erfolgten wie bereits beschrieben in Schüttelkolben mit definiertem ZYP-31(mod)-Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle und Carbenicillin ($100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) und Chloramphenicol ($34 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) zur

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

Selektion. Die Hauptkulturen wurden zu einer Animpfdichte von 0,1 rel. AU inokuliert und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte 1,0 rel. AU inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG induziert und die Zellen bei 20 °C weiterkultiviert. Normierte Proben zum Nachweis der Protein- und Terpenproduktion wurden unmittelbar vor der Induktion (t_0) und 24 h (t_1) nach Kultivierungsbeginn entnommen und mittels SDS-PAGE bzw. GC/FID untersucht (Abb. 37).

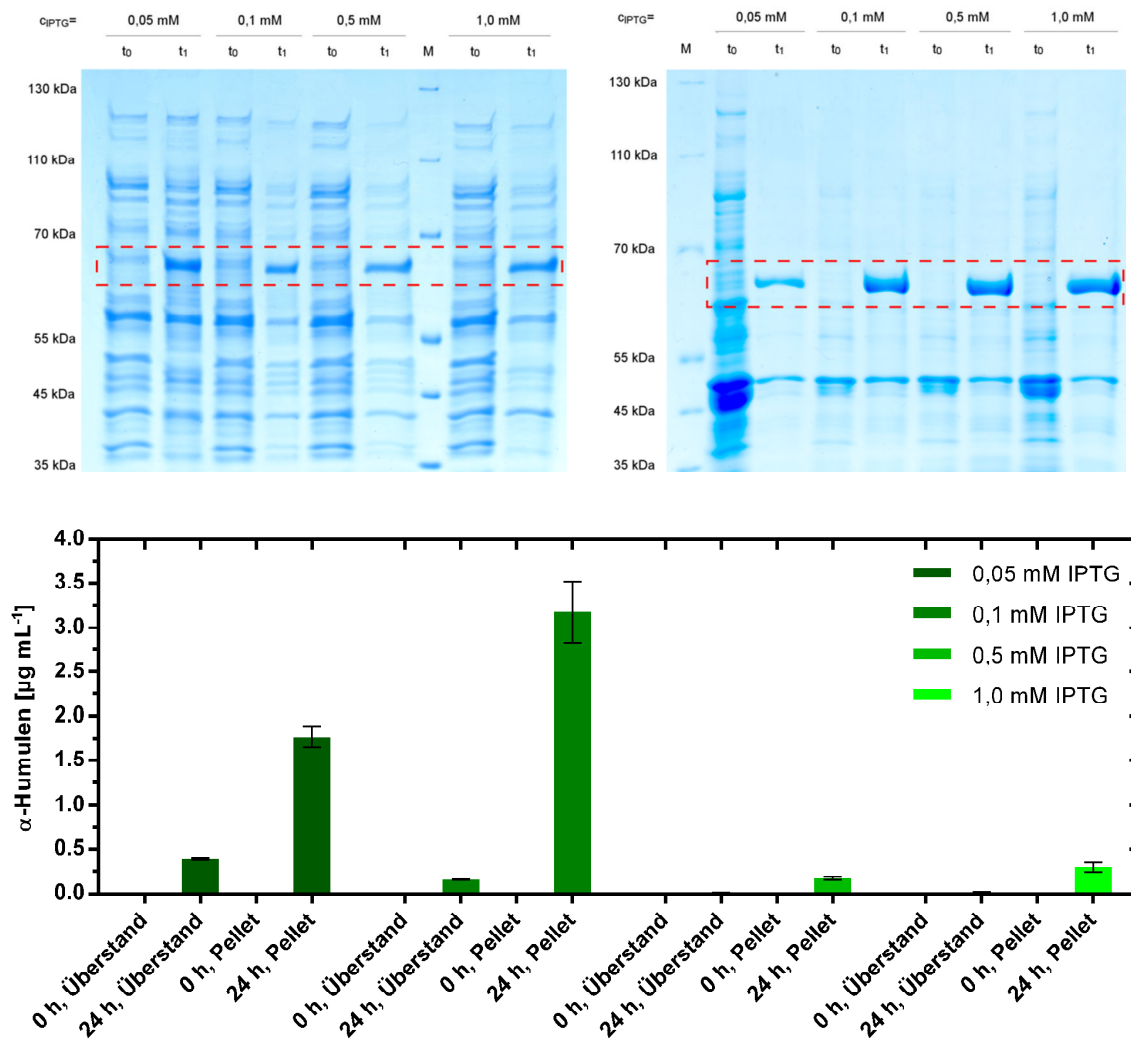


Abbildung 37: Expression des codon-optimierten *hum*-Gens in metabolisch optimierten *E. coli* HUM_Mev1510 Zellen in Abhängigkeit von der Induktorkonzentration.

Analyse der Produktion der rekombinanten HUM durch SDS-PAGE (10 %). Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und Proben der löslichen (oben links) und der unlöslichen Zellfraktion (oben rechts) untersucht. Zellysate und Kulturüberstand wurden mit Isooktan extrahiert und per GC/FID vermessen (unten). M = Proteinmarker, t_0 = Kulturprobe unmittelbar vor der Induktion mit IPTG, t_1 = Kulturprobe 24 h nach Induktion mit IPTG und Genexpression bei 20 °C. Die Proben wurden basierend auf der optischen Dichte OD_{600} normiert.

Bei allen eingesetzten IPTG-Konzentrationen sind auf dem SDS-PAGE-Gel sowohl in der löslichen als auch unlöslichen Zellfraktion eindeutige Banden bei ca. 67 kDa zu erkennen. Die Ausbeute an löslicher HUM unterscheidet sich unter den Versuchsansätzen kaum voneinander. Allerdings sind in der Terpenproduktion deutliche Differenzen zu sehen. Die höchste α -Humulenkonzentration konnte durch Induktion mit 0,1 mM IPTG ermittelt werden und beträgt $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Der Einsatz höherer IPTG-Konzentrationen von 0,5 mM und 1,0 mM IPTG führte wider Erwarten zu einer verringerten Terpenproduktion. Für die erfolgreiche Produktion der Terpene muss neben der Expression der HUM auch eine ausreichende Zufuhr von Terpenvorläufern gewährleistet sein. Während die Überexpression eines rekombinanten Proteins für die Zellen schon einen Stress darstellt (Bonomo und Gill 2005), ist die Expression einer Vielzahl von heterologen Genen von zwei Plasmiden eine enorme Belastung für den Zellmetabolismus. Vermutlich wurde durch die hohen IPTG-Konzentrationen eine Stressreaktion der Zellen ausgelöst und die Produktion der Enzyme des synthetischen MVA-Stoffwechselweges unterdrückt. Um solche Effekte zu minimieren, sollten Plasmide mit verschiedenen Promotoren verwendet werden, die nacheinander mit unterschiedlichen Effektormolekülen induziert werden (Schmidt et al. 2012; Rosano und Ceccarelli 2014).

4.3.2 *Scale-up* und Kultivierung im Rührkessel-Bioreaktor

Mit den ermittelten Werten für die optimale α -Humulenproduktion in stoffwechsel-optimierter *E. coli* HUM_Mev1510 wurde ein *scale-up* auf 10 L Bioreaktormaßstab durchgeführt. Die Bioreaktorkultivierung bietet den Vorteil, dass pH- und Temperaturwerte während der Kultivierung kontinuierlich geregelt werden können. Außerdem wird durch eine kontinuierliche Probenentnahme der Glucosegehalt in der Kultivierung verfolgt und somit der Verdacht auf einen eintretenden Nährstoffmangel gegebenenfalls bestätigt.

Für die Kultivierung im Bioreaktor wurde definiertes ZYP-31(mod)-Medium verwendet. Der pH-Wert wurde durch automatische Zudosierung von 1 M HCl bzw. 1 M NH₃ auf pH 7,5 statiert. Der pH-Wert ist hier besonders wichtig, da die HUM, wie in Abschnitt 4.1.4.2 gezeigt, ein pH-sensitives Enzym ist, deren Optimum bei pH 7,5 liegt. Die Regelung der Rührergeschwindigkeit erfolgte kaskadierend, sodass ein Sauerstoffpartialdruck von 30 % im Medium gewährleistet wurde. Zunächst wurde eine Vorvorkultur (VVK) in 25 mL LB-Medium mit einem Glycerolstock des Produktionsstammes angeimpft und 12 h bei 37 °C inkubiert. Die Vorkultur von 100 mL ZYP-31(mod)-Medium wurde mit der VVK zu einer

optischen Dichte von 0,1 rel. AU inokuliert und über Nacht bei 37 °C und einer Schüttlergeschwindigkeit von 150 rpm inkubiert. Der Reaktor wurde mit einer Start- OD_{600} von 0,1 rel. AU angeimpft und die Zellen bis zu einer optischen Dichte von 1,0 rel. AU bei 37 °C inkubiert. Erst dann erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Reaktortemperatur wurde auf 20 °C gesenkt und die Zellen für 24 Stunden kultiviert (Abb. 38). Die Temperatursenkung ist, wie in Abschnitt 4.1.1 erläutert, essentiell für die lösliche und aktive Produktion der HUM.

Während der Fermentation wurden stündlich Proben gleicher Volumina zur weiteren Analyse entnommen. Die Glucosekonzentration im Medium wurde mit einem YSI-Glucoseanalysator von YSI Incorporated quantifiziert. Aus vorangegangenen Schüttelkolbenexperimenten ist bekannt, dass α -Humulen in den Zellen akkumuliert. So wurde auch beim *batch*-Prozess im Bioreaktor die α -Humulenkonzentration in der Biomasse und im Kulturüberstand bestimmt, indem die Terpene mit Isooktan extrahiert und anschließend mittels GC/FID untersucht wurden.

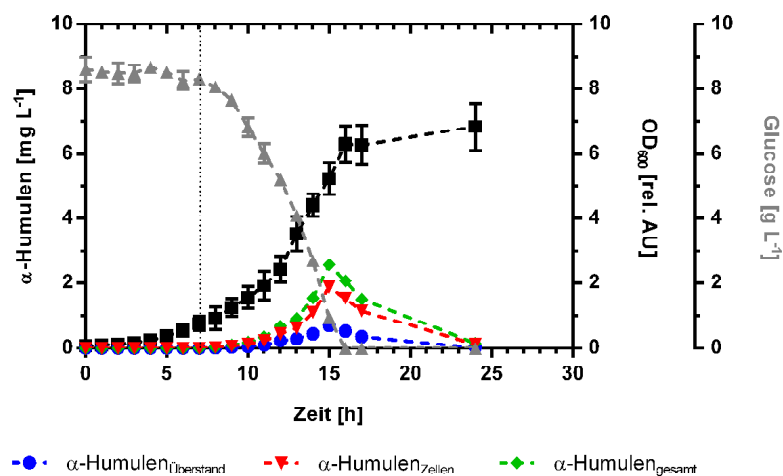


Abbildung 38: Heterologe Produktion von α -Humulen in einer *batch*-Kultivierung von *E. coli* HUM_Mev1510.

Produktion and Glucoseverbrauch des α -Humulen-produzierenden Stammes in einer *batch*-Kultivierung. Zellwachstum wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm überwacht. Die α -Humulenkonzentration in den Zellen und im Kulturüberstand wurde nach Extraktion mit Isooktan mittels GC/FID bestimmt. Glucosekonzentration wurde durch Messung am YSI Glucoseanalysator bestimmt. Der Zeitpunkt der Induktion mit 0,1 mM IPTG ist durch eine gepunktete senkrechte Linie markiert.

Nach einer etwa 5 h langen *lag*-Phase gehen die Produktionszellen in die *log*-Phase über. Erst nach Induktion mit IPTG ist ein langsamer und kontinuierlicher Anstieg der Humulenkonzentration in den Zellen und im Kulturüberstand bis zu 15 h zu erkennen. Die Gesamthumulenkonzentration beträgt hier 2,6 mg·L⁻¹. Im weiteren Kultivierungsverlauf

nimmt die α -Humulenkonzentration rapide ab, bis zum Kultivierungsende nach 24 h kein α -Humulen mehr in den Zellen und im Kulturüberstand nachweisbar war. Auffällig ist, dass der Verlust des Terpens erst nach komplettem Verbrauch von Glucose auftritt. Diese Beobachtung bestätigt zunächst, dass der Produktabbau an einen Nährstoffmangel gekoppelt ist.

Da in der Literatur bisher nicht untersucht wurde, ob α -Humulen von *E. coli* als alternative Kohlenstoffquelle genutzt wird, wurden zusätzliche Experimente im Schüttelkolben-Maßstab durchgeführt. Eine definierte Konzentration an α -Humulen wurde der Hauptkultur zugefügt und die Zellen nach Standardprotokoll kultiviert. Allerdings wurde die Expression der rekombinanten Gene im Produktionsstamm nicht induziert, um sicherzustellen, dass die gemessene Sesquiterpenkonzentration in der Kultur nur auf die vorgelegte α -Humulenmenge zurückzuführen ist. Wieder zeigte sich in der Kultur eine Abnahme der α -Humulenkonzentration, wodurch der Produktabbau durch den Produktionsstamm belegt wurde (s. Abschnitt 8.5). Bei Limitierung der Nährstoffquelle werden in *E. coli* die Expression von katabolischen Mechanismen aktiviert. Obwohl der Abbau von größeren Isoprenoiden in *E. coli* beschrieben ist (Jang et al. 2011), ist der genaue Abbaumechanismus von α -Humulen nicht untersucht. Auf Grundlage der literaturbekannten Abbaumechanismen in *E. coli* ist ein sequentieller oxidativer Abbau des Sesquiterpens sehr wahrscheinlich, bevor es über den Citratzyklus zur Energiegenerierung in der Zelle verwertet wird.

Um die Produktionsschwierigkeiten bedingt durch den α -Humulenabbau zu umgehen, wurde eine *in situ* Produktabtrennung in Betracht gezogen. Solche Strategien beugen dem Produktabbau vor, indem das Produkt während der Produktion der Kultur entzogen wird. Das bringt den zusätzlichen Vorteil, dass das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der Produktbildung verschoben werden kann (Dafoe und Daugulis 2014). Die Auswahl einer geeigneten und biokompatiblen Strategie für das vorliegende Produktionssystem erfolgte im weiteren Verlauf der Arbeit in zwei Schritten. Zunächst wurden verschiedene *in situ* Produktabtrennungsmethoden getestet, um sie anschließend mit dem Bioprozess zu kombinieren.

4.3.3 *In situ* Produktabtrennung

Methoden zur *in situ* Produktentfernung (*in situ product removal*, ISPR) werden bei biotechnologischen Prozessen oft angewandt, um die Produktivität von Prozessen, in denen das Produkt inhibierend wirkt oder degradiert wird, zu steigern. Die *in situ* Abtrennung von

fermentativ gewonnenen Bioprodukten, darunter auch von Duft- und Aromastoffen, ist ein in der Literatur und in der praktischen Anwendung gut untersuchtes Verfahren (Freeman et al. 1993; Stark und Stockar 2003). Allerdings ist zur *in situ* Abtrennung von α -Humulen bisher nur ein einziges extraktives Verfahren bekannt (Yu et al. 2008).

Geeignete Möglichkeiten des ISPR für die Abtrennung von α -Humulen wurden mithilfe des Entscheidungsbaums nach van Hecke et al. bestimmt (Abb. 39) (van Hecke et al. 2014). Zur Auswahl der ISPR-Methoden wurden vier Fragen zu den Eigenschaften des Produktes gestellt:

1. Wirkt das Produkt inhibierend auf die produzierenden Zellen?
2. Ist das Produkt instabil oder wird es von den Zellen degradiert?
3. Ist das Produkt flüchtig?
4. Ist das Produkt geladen?

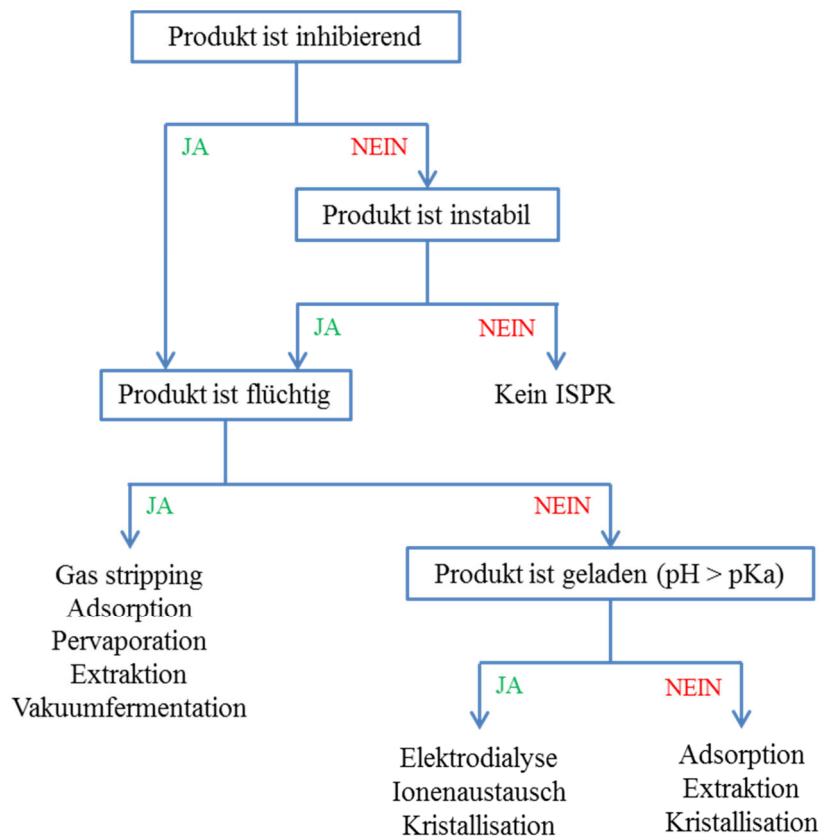


Abbildung 39: Entscheidungsbaum zur Auswahl geeigneter ISPR-Methoden nach van Hecke et al.

Je nachdem, wie die Antwort auf diese Fragen fällt, können verschiedene Methoden zur Abtrennung des Produktes angewandt werden. Eine inhibierende Wirkung von α -Humulen auf *E. coli* konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Stattdessen wird das Produkt von den Zellen abgebaut und verstoffwechselt. Da α -Humulen nicht flüchtig und ungeladen ist, kommen als ISPR-Methoden die Adsorption und Extraktion in Betracht. Die Abtrennung durch Kristallisation kann ausgeschlossen werden, da das zu produzierende Sesquiterpen bei Normalbedingungen flüssig ist und nicht kristallisiert.

Die richtige Adsorber- und Solvensauswahl ist eine entscheidende Überlegung zur *in situ* Abtrennung von Produkten. Ideale Solventien und Adsorber müssen biokompatibel und gleichzeitig nicht-biodegradierbar sein und eine hohe Affinität zum Produkt besitzen. In dieser Arbeit wurden verschiedene organische Lösungsmittel zur *in situ* Abtrennung von α -Humulen aus der Kulturbrühe getestet. Als potentielle Extraktionsmittel wurden Ethylacetat, Dichlormethan (DCM), Pentan, Isooktan, Nonan und Dekan untersucht. Für die adsorptive Entfernung von α -Humulen wurde der polyaromatische, hydrophobe Adsorber Amberlite® XAD4 ausgewählt. Neben einer hohen Affinität des Adsorbers zum abzutrennenden Produkt, wurden für eine effektive Elution des gebundenen Produktes die organischen Solventien Acetonitril, Ethylacetat, Ethanol, Aceton, Dichlormethan und Isooktan untersucht.

Die ausgesuchten Extraktionsmittel und der Adsorber wurden hinsichtlich ihrer Aufnahme von α -Humulen aus einer wässrigen Lösung untersucht. Hierfür wurde eine definierte α -Humulenkonzentration von $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in ZYP-31(mod)-Medium eingesetzt und in *batch*-Experimenten die Wiederfindungsrate und der Verteilungskoeffizient bestimmt (Tab. 9 und 10). Im Falle der Adsorption wurde der Verteilungskoeffizient über die vom Adsorber eluierte Menge an α -Humulen bestimmt. Da die an den Adsorber gebundene α -Humulenkonzentration nicht direkt gemessen werden konnte, wurde die eluierte Menge des Sesquiterpens mit der adsorbierten Menge gleichgesetzt.

Tabelle 9: Isolierung von α -Humulen aus wässriger Lösung mithilfe Extraktion.

Experimentelle Verteilungskoeffizienten und Wiederfindungsraten einer definierten α -Humulen-Testlösung mit ausgesuchten Solventien zur Extraktion.

Lösungsmittel	Ethylacetat	DCM	Pentan	Isooktan	Nonan	Dekan
$K_{ex} [\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$	0,846	0,157	0,246	0,193	0,078	0,006
$c_{aq t_{eq}} [\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$	2,709	4,320	4,014	4,192	4,637	4,971
$c_{ex} [\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$	2,291	0,680	0,986	0,808	0,363	0,029
Wiederfindungsrate [%]	45,8	13,6	19,7	16,2	7,0	0,1

Tabelle 10: Isolierung von α -Humulen aus wässriger Lösung mithilfe Adsorption.

Experimentelle Verteilungskoeffizienten und Wiederfindungsraten einer definierten α -Humulen-Testlösung mit ausgesuchten Solventien zur Elution vom hydrophoben Adsorber Amberlite® XAD4.

Lösungsmittel	Acetonitril	Ethylacetat	Ethanol	Aceton	DCM	Isooktan
K_{ad} [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	3,541	1,594	0,193	0,482	0,004	0,009
$c_{aq t_{eq}}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	1,101	1,927	4,188	3,374	4,981	4,953
c_{ad} [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	3,899	3,073	0,813	1,626	0,019	0,047
Wiederfindungsrate [%]	78,0	61,5	16,2	32,5	0,4	0,9

In den Extraktionsversuchen konnte in keinem Fall der eingesetzten organischen Solventien eine Wiederfindungsrate über 50 % erreicht werden. Mit Ethylacetat als Extraktionsmittel wurde eine Wiederfindungsrate von ca. 46 % bestimmt, wogegen bei allen anderen getesteten Solventien die Wiederfindungsrate durchgehend unter 20 % liegt. Auffällig ist, dass der Verteilungskoeffizient bei den eingesetzten Alkanen mit wachsender Kettenlänge kleiner wird und somit die Extraktion des Sesquiterpens ineffizienter. Im Vergleich zur Extraktion war die α -Humulenaufnahme aus der wässrigen Lösung mit dem hydrophoben Adsorber erfolgreicher. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass nicht jedes organische Lösungsmittel zur Elution des Sesquiterpens geeignet ist. Die höchste Wiederfindungsrate mit ca. 78 % wurde mit Acetonitril als Elutionsmittel erreicht. Positiv hierbei ist, dass Acetonitril im weiteren Verlauf der Arbeit als Solvens für die Oxidationsreaktion von α -Humulen zu Zerumbon verwendet werden kann und somit der verfahrenstechnische Vorteil besteht, dass kein Lösungsmittelaustausch stattfinden muss. Obwohl laut Herstellerangaben besonders polare Lösungsmittel für die Elution vom hydrophoben Adsorbens geeignet sein sollen, konnten in den Versuchen auch mit dem unpolaren Solvent Ethylacetat gute Ergebnisse mit einer Wiederfindungsrate von ca. 62 % erreicht werden. Die Raffinate aus den Versuchsansätzen wurden nach der Adsorption mit Ethylacetat extrahiert. Hierbei konnten keine weiteren α -Humulentrückstände in der wässrigen Phase nachgewiesen werden. Hieraus kann gefolgert werden, dass α -Humulen vollständig an den Adsorber bindet und nur das eingesetzte Elutionsmittel einen kritischen Faktor bezüglich der α -Humulentrückgewinnung darstellt.

Die Biokompatibilität des polyaromatischen Adsorbens Amberlite® XAD4 wurde mit dem Produktionsstamm *E. coli* HUM_Mev1510 getestet. In Schüttelkolbenexperimenten wurde das Wachstumsverhalten des Produktionsstammes in Gegenwart von 10 % (w/v) Amberlite® XAD4 im Vergleich zu einer Kontrollprobe ohne den Adsorber getestet. Wie auch aus der Literatur bekannt (Asada und Shuler 1989; Yan et al. 2005), wurde keine

Wachstumshemmung durch den Adsorber beobachtet, wodurch die Biokompatibilität des Adsorbers bestätigt wurde.

4.3.4 Integrierter Bioprozess zur α -Humulenproduktion

Werden ganze Zellen als Biokatalysatoren für die Synthese von Wertprodukten verwendet, ist der Produktionsprozess meist durch die Einhaltung physiologischer Grenzen gekennzeichnet. Charakteristisch sind milde Temperaturen und pH-Werte sowie niedrige Substrat- und Produktkonzentrationen, die sich aus produktionstechnischer Sicht einschränkend auswirken. Neben diesen Faktoren stellen außerdem die Akkumulation von toxischen Produkten in der Zelle und die Degradation der Zielprodukte durch den Produktionsstamm ein großes Problem dar. Die Leistungsfähigkeit von biotechnologischen Prozessen kann durch Verbesserung der Produktionsstämme (z.B. durch Gentechnologie oder Screening von leistungsfähigeren Mutanten) oder durch verfahrenstechnische Lösungsansätze verbessert werden.

Verfahrenstechnische Ansatzmöglichkeiten, um die Leistung eines bestehenden Produktionssystems zu verbessern, ist die Anwendung eines integrierten Bioprozesses mit *in situ* Produktabtrennung. Durch die Integration von Aufarbeitungsschritten in den Bioprozess können Ausbeute und Produktivität des Produktionssystems verbessert werden, indem Produktinhibition, Produktdegradation und die Anzahl an weiteren Aufarbeitungsschritten minimiert werden (Stark und Stockar 2003).

Ein integrierter Bioprozess für die α -Humulenproduktion stellt besonders wegen der problematischen mikrobiologischen Produktdegradation einen großen Vorteil dar. In Abschnitt 4.3.3 konnte gezeigt werden, dass α -Humulen erfolgreich mit dem hydrophoben Adsorber aus wässrigem Medium isoliert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein integrierter Bioprozess mit *in situ* Adsorption des Sesquiterpens ausgearbeitet.

Die Integration der Adsorption soll durch Bindung des Produktes zu einer Steigerung der Ausbeuten und Produktbildungsraten führen. Die Kultivierung wurde analog der einfachen *batch*-Kultivierung mit optimierten Kultivierungsbedingungen in ZYP-31(mod)-Medium durchgeführt. Die Adsorberpartikel wurden vor ihrem Einsatz mit demineralisiertem Wasser gewaschen und mit Acetonitril konditioniert. Die vorbereiteten Adsorberpartikel wurden direkt in das Medium der Hauptkultur zu einer Konzentration von $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ zugegeben.

Während des Kultivierungsprozesses wurden kontinuierlich Proben aus dem Reaktor entnommen und kritische Faktoren wie die optische Dichte, die Glucosekonzentration und die α -Humulenkonzentration offline bestimmt. In Abbildung 40 ist der Kultivierungsverlauf

zu entnehmen. Anhand des Wachstumsverhaltens der Zellen ist zu erkennen, dass die Zugabe des Adsorbers keinen negativen Effekt auf das Wachstum hat und keinen Unterschied zur einfachen *batch*-Kultivierung zeigt. Da weder der Adsorber noch die Sesquiterpene toxische Effekte auf den Produktionsstamm zeigten, ist auch kein verändertes Verhalten in der Wachstumsrate der Zellen zu erwarten. Im Gegensatz zur einfachen *batch*-Kultivierung in Abschnitt 4.3.2 ist zu erkennen, dass die α -Humulenkonzentration auch nach vollständigem Glucoseverbrauch nach 16 h weiterhin ansteigt. Durch die Bindung an den polymeren Adsorber wird das α -Humulen demnach erfolgreich von den Zellen abgetrennt und somit ein Abbau durch den Produktionsorganismus verhindert.

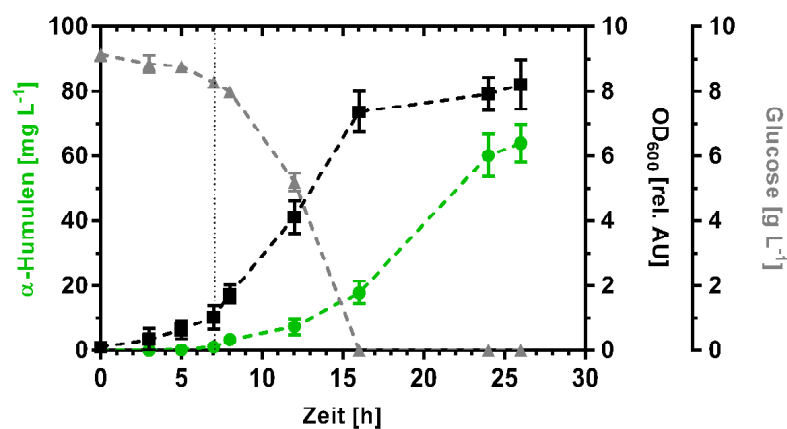


Abbildung 40: Wachstum und Produktion von α -Humulen in *E. coli* HUM_Mev1510 in einem integrierten Bioprozess mit *in situ* Produktabtrennung durch Adsorption.

Produktion and Glucoseverbrauch des α -Humulen-produzierenden Stammes in einer *batch*-Kultivierung. Zellwachstum wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm überwacht. α -Humulenproduktion wurde durch Elution des adsorbierten Produktes vom polyaromatischen Adsorber Amberlite® XAD4 mit Acetonitril und anschließender Messung per GC/FID quantifiziert. Glucosekonzentration wurde durch Messung am YSI Glucoseanalysator bestimmt.

Für die Bestimmung der α -Humulenkonzentration wurden zu jedem Messzeitpunkt die gebundene α -Humulenkonzentration am Adsorberpartikel sowie die α -Humulenkonzentration in den Zellen nach Zellaufschluss und im Medium durch Extraktion mit Ethylacetat bestimmt. Für die Elution vom Adsorber wurde jeweils eine Adsorbermenge von 50 mg eingesetzt und die Elution in drei Schritten mit Acetonitril durchgeführt. Die Produkte wurden gaschromatographisch analysiert und identifiziert (Abb. 41). Auffällig war, dass durch den Einsatz des polyaromatischen Adsorbers sowohl in den Zellen als auch im Medium kein α -Humulen mehr nachweisbar war. Die Produktionszellen besitzen keinen spezifischen Mechanismus zur Sekretion von α -Humulen. Vielmehr wird durch den kontinuierlichen Entzug des Sesquiterpens im Medium der Diffusionsgradient erhöht und der diffusive

Stofftransport aus der Zelle verstärkt. Somit wird die Akkumulation von α -Humulen in den Zellen verhindert und eine vollständige Adsorption an den Adsorber gewährleistet.

Durch die Anwendung eines integrierten Bioprozesses und der selektiven Konzentration des gebildeten α -Humulens auf dem Adsorbermaterial konnte insbesondere die Degradation des Produktes drastisch vermindert werden. Im integrierten Bioprozess wurde ein Produkttiter von $60,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Kulturvolumen erreicht. Die maximal erreichte Produktkonzentration betrug im einfachen *batch*-Prozess $2,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Somit konnte nur durch eine verfahrenstechnische Optimierung der Produktion die Produktausbeute um das 23-fache verbessert werden.

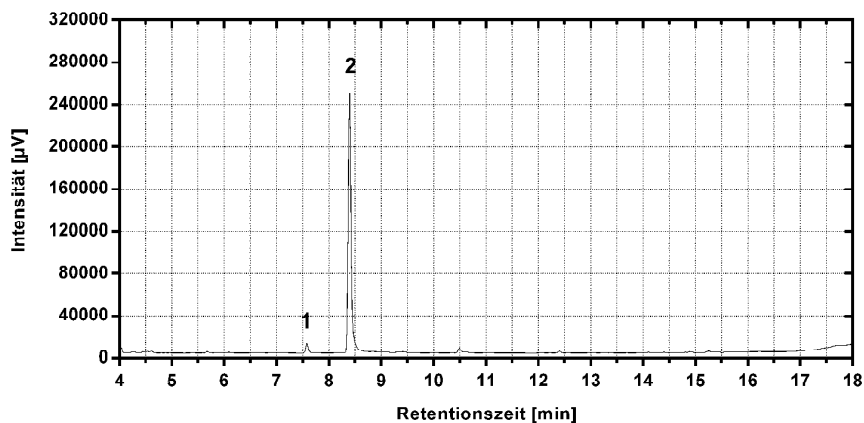


Abbildung 41: *In situ* Isolierung von α -Humulen aus *E. coli* HUM_Mev1510 Kultur.

GC/FID-Chromatogramm der eluierten Produkte vom hydrophoben Adsorber Amberlite® XAD4. β -Caryophyllen (1) und α -Humulen (2) wurden durch GC/MS-Analyse identifiziert.

Die gaschromatographische Analyse der vom Adsorber eluierten Produkte zeigt zudem nur zwei signifikante Peaks im Chromatogramm, die β -Caryophyllen (Peak 1) und α -Humulen (Peak 2) zugeordnet werden können. Das so gewonnene α -Humulen besitzt eine Reinheit von ca. 95 %. Da auch der kommerziell erhältliche α -Humulen-Standard mit einer Reinheit von $\geq 96 \%$ immer mit β -Caryophyllen zusammen vorliegt, wurde hier auf weitere Aufreinigungsschritte des biotechnologisch gewonnenen Produktes verzichtet. Das weist auf einen weiteren großen Vorteil des Verfahrens hin, da somit das in Acetonitril vorliegende und aufkonzentrierte Produkt direkt in weiteren Syntheserversuchen verwendet werden kann.

4.4 Übergangsmetall-katalysierte Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon

Ein möglicher Zugang zu Terpenoiden besteht in der Totalsynthese der Moleküle. Für einige der Terpene konnten bereits Totalsynthesen entwickelt werden (Ishihara und Baran 2010; Chen et al. 2010; Willot et al. 2009). Aufgrund der Größe und Komplexität der Moleküle weisen die arbeitsaufwendigen Synthesen sehr viele Stufen auf, was in relativ geringen Gesamtausbeuten resultiert. Für die zügige Untersuchung und Weiterentwicklung von Terpenderivaten als pharmakologisch interessante Moleküle sind die meisten Totalsynthesen zu aufwendig. Daher bietet sich die Semisynthese als mögliche Alternative an, um Terpene bereitzustellen.

4.4.1 Vorversuche

C-H-Bindungen in Allylstellung weisen aufgrund des benachbarten π -Elektronensystems eine erhöhte Reaktivität auf und sind meist schwächer als andere sp^3 -C-H-Bindungen. Durch das π -Elektronensystem einer Doppelbindung kann ein Carbokation oder Radikal in benachbarter Stellung resonanzstabilisiert werden. Diese erhöhte Reaktivität wird in der Naturstoffsynthese ausgenutzt, um selektiv funktionelle Gruppen einzuführen. Zu beachten ist hierbei, dass durch die strukturelle und chemische Diversität der Naturstoffe, die Reagenzien und Reaktionsbedingungen für allylische Funktionalisierungen in Bezug auf die Chemo-, Regio- und Stereoselektivität limitiert sind.

Die direkte Oxidation von α -Humulen in Allylstellung zu Zerumbon erwies sich bisher in der Literatur als schwierig. Verschiedene Versuche mit chemischen Reagenzien und enzymatischen Prozessen erwiesen sich als ineffizient und führten zum Humulen-6,7-epoxid als Hauptprodukt (Shirahama et al. 1981). Durch die Aufklärung der Biosynthese von Zerumbon in der tropischen Ingwerpflanze *Zingiber zerumbet* Smith konnte eine Monooxygenase identifiziert werden, die α -Humulen selektiv in C8-Position zum Alkohol hydroxyliert. Allerdings ist eine anschließende enzymatische Oxidation zum Keton durch eine Alkoholdehydrogenase oder durch chemische Reagenzien nötig. Außerdem ist die Monooxygenase zur Hydroxylierung kommerziell nicht erhältlich und müsste zusätzlich z.B. heterolog in *E. coli* hergestellt werden, was die Effizienz der Produktionsstrategie erheblich senken würde.

In der Literatur konnten mehrere Ansätze zur selektiven chemischen Oxidation in Allylstellung identifiziert werden (Ang und Lam 2015). Als Beispiel eines Sesquiterpens, das allylisch oxidiert wird, ist Valencen bekannt (Allal et al. 2003; Salvador und Clark 2002). Die Oxidation von Valencen (**79**) zu Nootkaton (**80**) wurde mit Übergangsmetallkatalysatoren in Gegenwart von *tert.*-Butylhydroperoxid als Oxidationsmittel erfolgreich durchgeführt (Salvador und Clark 2002). Aufgrund der regiostrukturellen Ähnlichkeit von Nootkaton an der oxidierten Position, wurde dieser Reaktionsansatz zur direkten Oxidation von α -Humulen (**34**) zu Zerumbon (**37**) weiterverfolgt (Abb. 42). Da die Möglichkeit eine Sauerstoffatmosphäre aufzubauen, wegen fehlender apparativer Ausrüstung, nicht bestand, wurde die Reaktion bei normaler Atmosphäre durchgeführt.

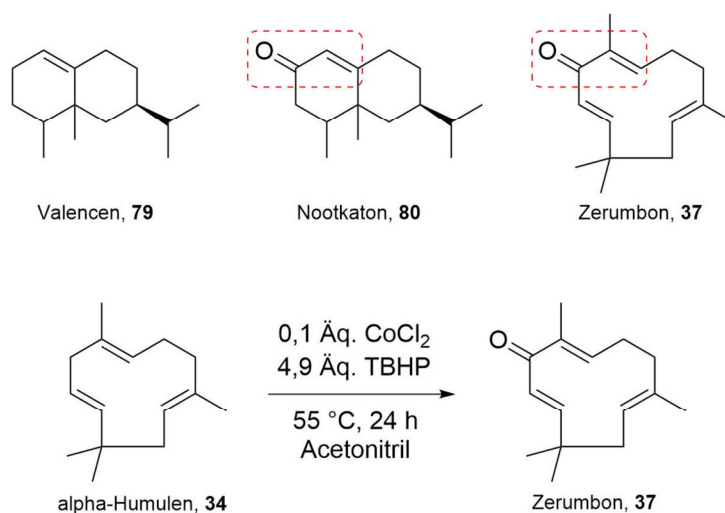


Abbildung 42: Allylische Oxidation.

(Oben) Strukturformeln von Valencen (**79**), Nootkaton (**80**) und Zerumbon (**37**). Nootkaton und Zerumbon besitzen beide eine Ketofunktion in Allylstellung. (Unten) Allylische Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon (**37**).

Kommerziell erhältliches α -Humulen wurde zunächst in Acetonitril vorgelegt und 0,1 Äq. CoCl_2 als Katalysator und 4,9 Äq. TBHP als Oxidationsmittel zugegeben. Die Reaktion wurde bei 55 °C für 24 h gerührt und anschließend mittels GC/FID die Produktbildung untersucht. Im Chromatogramm wurden viele Peaks detektiert, von denen ein Peak bei ca. 15,0 min als Zerumbon identifiziert werden konnte. Allerdings lag die Ausbeute an Zerumbon mit 26,8 % niedrig. Um die Zerumbonproduktion zu erhöhen, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit zusätzliche Versuche zur Optimierung der Reaktionsbedingungen durchgeführt.

4.4.2 Bestimmung der optimalen Reaktionsparameter mittels statistischer Versuchsplanung

Die Effizienz einer chemischen Reaktion wird meist durch das Zusammenwirken mehrerer Parameter bestimmt. Diese sollten so eingestellt sein, dass die Reaktion eine höchstmögliche Effizienz erreicht, z.B. eine maximale Produktausbeute und -selektivität. Diese Bedingungen bei unübersichtlichem Zusammenwirken vieler Einflussgrößen zu finden, ist das Ziel von statistischen Versuchsplanungen. Die Untersuchung der Einflussgrößen, auch Faktoren genannt, und die Optimierung erfolgen systematisch. Hierzu werden nach vorgegebenem Versuchsplan alle Faktoren gleichzeitig verändert und die Auswirkung auf die Zielgröße beobachtet.

Als elementare Parameter für die katalytische Oxidation von α -Humulen an der C8-Position sind die drei Variablen Temperatur, Konzentration des Katalysators und Konzentration des Oxidationsmittels zu nennen. Zur Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen wurde eine statistische Versuchsplanung nach Box-Behnken verwendet. Das Box-Behnken-Design stellt ein unabhängiges, quadratisches Design dar. Es beinhaltet kein eingebettetes faktorielles oder fraktionelles Design und setzt mindestens drei Stufen je Parameter voraus. Der Versuchsplan wurde mithilfe der Software Minitab erstellt (s. Abschnitt 8.6) und ausgewertet.

Die Optimierung der ausgewählten Faktoren erfolgte unter Anwendung eines Box-Behnken-Versuchsplans. Unter Berücksichtigung der typischerweise in der Literatur zum Thema allylische Oxidation gefundenen Werte (Choi und Doyle 2007; Serra 2015; Rothenberg et al. 1998), wurden die in Tabelle 10 angegebenen Faktorstufen gewählt.

Tabelle 11: Faktoren und Faktorstufen zur Optimierung der Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon unter Anwendung eines Box-Behnken-Designs.

Faktor	Faktorbezeichnung	Einheit	Faktorstufen		
			-1	0	1
A	Temperatur (<i>TEMP</i>)	°C	50	60	70
B	TBHP-Konzentration (<i>TBHP</i>)	Äq.	1	5,5	10
C	Katalysator-Konzentration (<i>KAT</i>)	Äq.	0,002	0,006	0,01

Aussagen über den Einfluss der untersuchten Faktoren auf die Zielgröße wurden mithilfe sogenannter Haupteffektediagramme getroffen, die die Änderung der Mittelwerte der

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

Zielgröße in Abhängigkeit von einem Faktor aufzeigen (Abb. 43). Im untersuchten Temperaturbereich ist zunächst eine Steigung des Mittelwertes bei Erhöhung der Temperatur von 50 °C auf 60 °C zu beobachten. Die Temperaturerhöhung wirkt sich allerdings auf die Zielgröße im weiteren Verlauf negativ aus, da sich der Mittelwert der Ausbeute bei 70 °C wieder verringert. Der positive Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Ausbeute lässt sich mit der erhöhten Reaktionskinetik erklären, da sich Teilchen bei höheren Temperaturen schneller bewegen. Allerdings kann eine zu hohe Temperatur auch zu ungünstigen Nebenreaktionen führen, die, wie im vorliegenden Fall, zu einer Mehrfachoxidation des Eduktes führen kann. Bei der TBHP-Konzentration kann ein ähnlicher Trend beobachtet werden. Auch hier wirkt sich die Erhöhung der TBHP-Konzentration von 1,0 Äq. auf 5,5 Äq. zunächst positiv auf den Mittelwert der Zielgröße aus, der bei weiterer Konzentrationserhöhung auf 10 Äq. einen starken negativen Effekt auf die Ausbeute hat. Bedingt durch den komplexen Mechanismus, der der Oxidation von α -Humulen zugrunde liegt, werden mehrere TBHP-Moleküle für die Oxidation eines Edukt-Moleküls benötigt. Ein extremer Überschuss an Oxidationsmittel führt wiederum zu vielfach oxidierten Produkten und somit einer geringeren Zerumbonausbeute. Die Erhöhung der Katalysator-Konzentration von 0,002 Äq. auf 0,006 Äq. hat einen sehr großen Effekt auf den Mittelwert der Zielgröße. Je mehr katalytische Substanz vorhanden ist, umso größer ist der Stoffumsatz. Eine weitere Erhöhung der Katalysator-Konzentration hat kaum Effekt auf den Mittelwert.

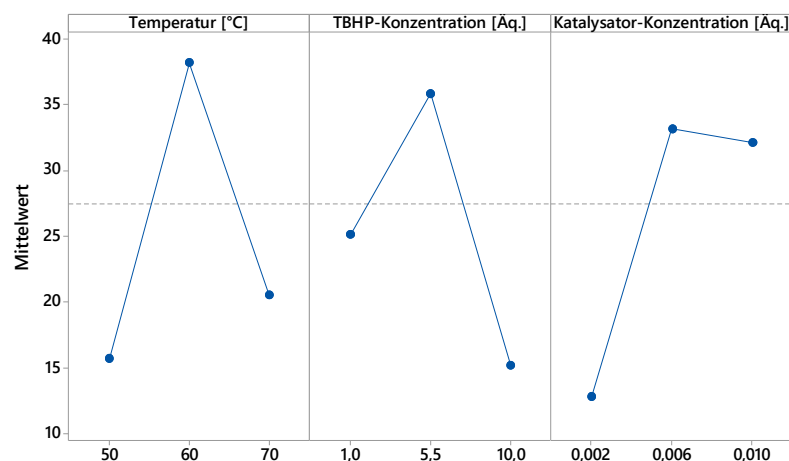


Abbildung 43: Haupteffektediagramm für die Ausbeute.

Um den Einfluss zweier Faktoren auf die Zielgröße zu untersuchen, wurden 2D-Konturplots herangezogen und ausgewertet. Wie aus Abb. 44 ersichtlich, weist jede Faktorkombination ein

Maximum auf und lässt Rückschlüsse darauf ziehen, dass die optimale Faktorkombination für eine maximale Ausbeute im untersuchten Versuchsraum liegen muss.

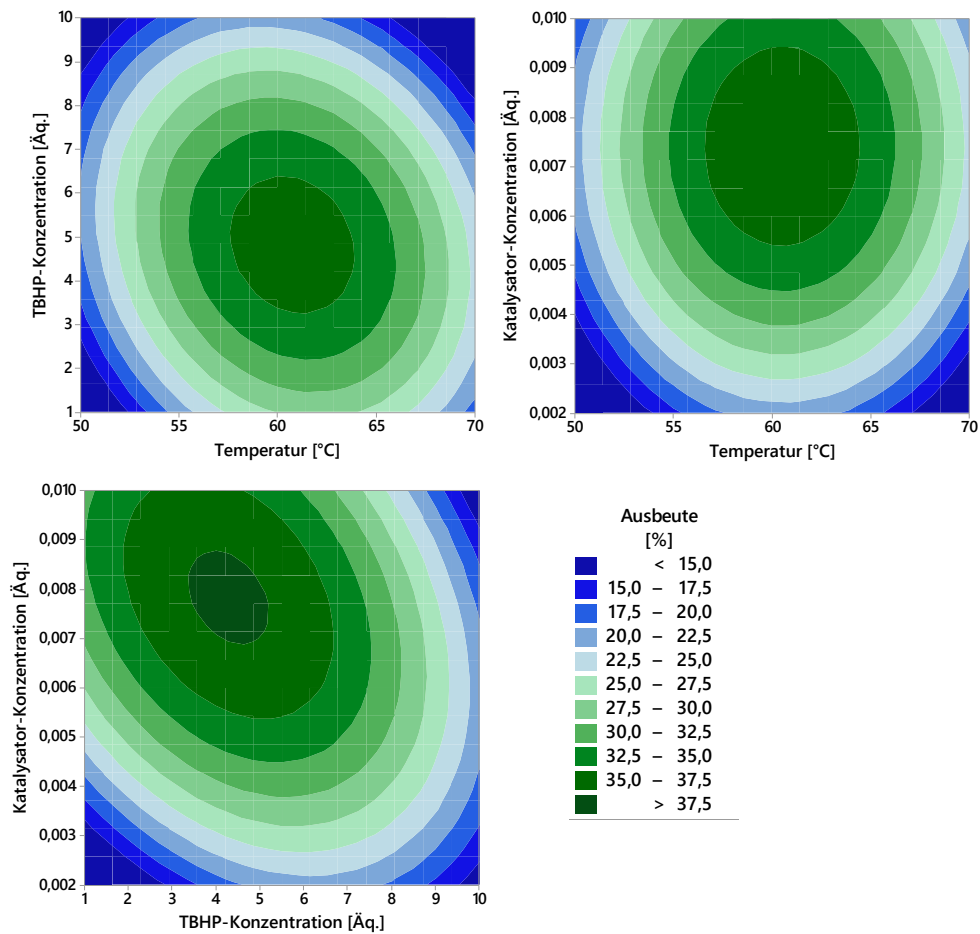


Abbildung 44: Konturdiagramme für die Ausbeute.

(Oben links) Konturdiagramm von Ausbeute vs. TBHP-Konzentration; Temperatur. Haltewert Katalysator-Konzentration = 0,006 Äq. (Oben rechts) Konturdiagramm von Ausbeute vs. Katalysator-Konzentration; Temperatur. Haltewert TBHP-Konzentration = 5,5 Äq. (Unten links) Konturdiagramm von Ausbeute vs. Katalysator-Konzentration; TBHP-Konzentration. Haltewert Temperatur = 60 °C.

Nach Abschluss der Untersuchungen wurde aus den Resultaten der Messergebnisse ein Modell in Minitab berechnet, welches die Zusammenhänge des Systems und den Einfluss der Faktoren beschreibt. Aus diesem Modell resultieren alle Antworten zur Lage der Optima und den Wechselwirkungen zwischen den Faktoren oder Zielgrößen bei neuen Koordinaten.

$$\begin{aligned}
 \text{Ausbeute} = & -718 + 22,33 \text{ TEMP} + 16,77 \text{ TBHP} + 12731 \text{ KAT} - 0,1792 \text{ TEMP} \cdot \text{TEMP} \\
 & - 0,721 \text{ TBHP} \cdot \text{TBHP} - 681843 \text{ KAT} \cdot \text{KAT} - 0,115 \text{ TEMP} \cdot \text{TBHP} - 0 \text{ TEMP} \cdot \text{KAT} \\
 & - 471 \text{ TBHP} \cdot \text{KAT}
 \end{aligned}$$

Die Güte des Modells kann durch Vergleich der experimentell bestimmten und den über das Modell berechneten Werten beurteilt werden. Hierfür wurden die experimentell bestimmten Daten gegen die vom Modell prognostizierten Ausbeuten aufgetragen (s. Abschnitt 8.6). Im Idealfall stimmen Experiment und Vorhersage komplett überein. Für das Modell konnte hier ein Regressionskoeffizient von 0,87 bestimmt werden, der die Zuverlässigkeit des Modells bestätigt.

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionsparameter wurde die Zielgrößenoptimierung der Statistiksoftware genutzt. In Minitab wird für die Zielgrößenoptimierung ein iterativer Algorithmus zur Suche nach Werten genutzt, für die die Zielgröße Ausbeute möglichst groß wird. Es wurden folgenden Parameter für eine maximale Ausbeute berechnet:

- Temperatur: 60,7 °C
- TBHP-Konzentration: 4,64 Äq.
- Katalysator-Konzentration: 0,0073 Äq.

Für diese Faktorkombination wurde eine Ausbeute von 38,1 % prognostiziert. Zur experimentellen Absicherung wurde die Oxidation von α -Humulen mit den optimierten Faktoren durchgeführt und die Zerumbonausbeute über die Peakfläche im Chromatogramm bestimmt. Die experimentell ermittelte Ausbeute lag bei 40,3 % und damit sehr nah am prognostizierten Wert. Für weitere Versuche wurde daher die optimierte Faktorkombination weiterverwendet.

4.4.3 Katalysatorscreening

Mit dem Ziel den optimalen Katalysator für die Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon zu finden, wurden ein Screening verschiedener Übergangsmetall-Salze durchgeführt. Als Katalysatoren wurden Kupfer(I)-iodid, Kupfer(II)-chlorid, Cobalt(II)-chlorid, Eisen(III)-chlorid und Mangan(II)-chlorid ausgewählt. Alle Katalysatoren weisen eine Löslichkeit in Acetonitril auf, dem Lösungsmittel für die Reaktion, und wurden bereits erfolgreich in allylischen Oxidationsreaktionen eingesetzt (Allal et al. 2003). Die eingesetzten Salze sind kommerziell erhältlich und weitgehend unempfindlich gegenüber Sauerstoff und Feuchtigkeit, was die verfahrenstechnische Durchführung der Reaktion erleichtert. Mit dem Katalysatorscreening soll eine maximale Zerumbonausbeute bei gegebenen

Reaktionsparametern erreicht werden. Für das Screening wurden die in Abschnitt 4.4.2 ermittelten optimierten Versuchsparameter verwendet.

Um das optimale Katalysatorsystem zu identifizieren, wurde in parallelen Experimenten die Oxidation von α -Humulen im μL -Maßstab durchgeführt. Das Edukt wurde in Acetonitril vorgelegt und nach Zugabe von 4,64 Äq. des Oxidationsmittels TBHP und 0,0073 Äq. des Katalysators, die Reaktionslösung auf 60,7 °C erwärmt. Um die Zerumbonbildung während einer Reaktionsperiode von 24 h zu verfolgen, wurden regelmäßig Proben aus der Reaktionslösung entnommen und per GC/FID analysiert. Die Zerumbonkonzentration wurde durch Peakflächenintegration quantifiziert und die Reaktionsausbeute bestimmt (Abb. 45).

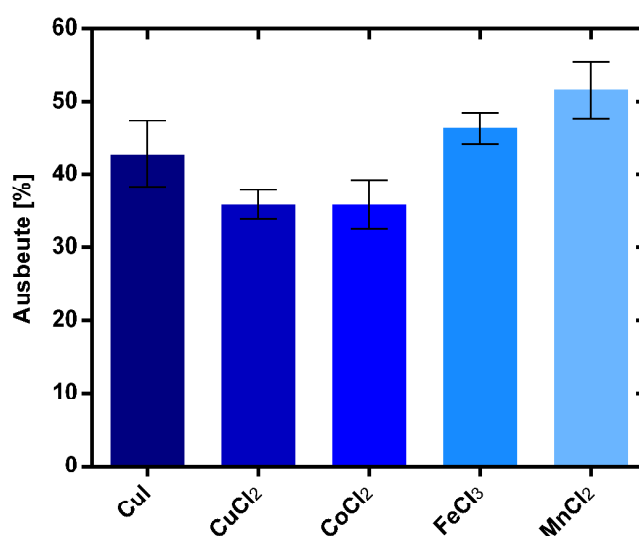


Abbildung 45: Katalysatorscreening zur direkten Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon.

Zerumbonausbeute nach 24 h Reaktionszeit. Proben wurden direkt aus der Reaktionslösung entnommen und per GC/FID quantifiziert.

Mit jedem eingesetzten Katalysatorsystem konnte nach 24 h eine vollständige Umsetzung des α -Humulens und eine Bildung des Zerumbons beobachtet werden. Da in allen Chromatogrammen neben Zerumbon diverse Nebenprodukte zu erkennen waren, fand keine selektive Umsetzung zu Zerumbon statt (s. Abschnitt 8.7). Die katalysierten Reaktionen zeigen Unterschiede im Produktspektrum und in der Selektivität der Zerumbonbildung. Der Einsatz von Kupfer- und Cobaltkatalysatoren führte zur Bildung von Produkten mit höherer Retentionszeit als Zerumbon, die vermutlich mehrfach oxidierte Verbindungen darstellen. Dieser Effekt trat bei Mangan- und Eisen-katalysierten Reaktionen nur vermindert auf. Eine genaue Identifizierung aller Nebenprodukte war im Rahmen der Arbeit nicht möglich.

Die höchste Selektivität der Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon wurde mit 51,6 % bei Einsatz des Mangan(II)-chlorid-Katalysators bestimmt. Diese Beobachtung ist konsistent mit in der Literatur beschriebenen Daten, dass Mangan(II)-chlorid im Vergleich zu anderen Katalysatoren eine höhere Reaktionsselektivität aufweist (Salvador und Clark 2002).

4.4.4 Semisynthese von Zerumbon

Nach den angewandten Optimierungsschritten zur Erhöhung der Zerumbonausbeute wurde die Reaktion zur Vervollständigung der Semisynthese mit biotechnologisch hergestelltem α -Humulen aus Abschnitt 4.3 durchgeführt und näher charakterisiert. Da das aus den *E. coli* Kulturen isolierte α -Humulen nach der Elution vom Adsorber bereits in Acetonitril vorliegt, muss kein Lösungsmittelaustausch stattfinden bzw. der Einfluss eines fremden Lösungsmittels befürchtet werden. Dies ist auch verfahrenstechnisch ein positiver Faktor, da sich dadurch der Gesamtprozess verkürzt. Für die Synthese von Zerumbon wurde das zuvor optimierte Verfahren verwendet. In die vorgelegte α -Humulen-Lösung wurden 4,64 Äq. TBHP und 0,0073 Äq. Mangan(II)-chlorid zugegeben und die Reaktionslösung bei 60,7 °C für 24 h gerührt. Die Reaktion durch Zugabe von 10 % (w/v) Natriumsulfit-Lösung beendet und die Reaktionslösung für die weitere Analyse der Produkte aufgearbeitet. Die Reaktion wurde sowohl gaschromatographisch als auch dünnschichtchromatographisch (DC) untersucht (Abb. 46).

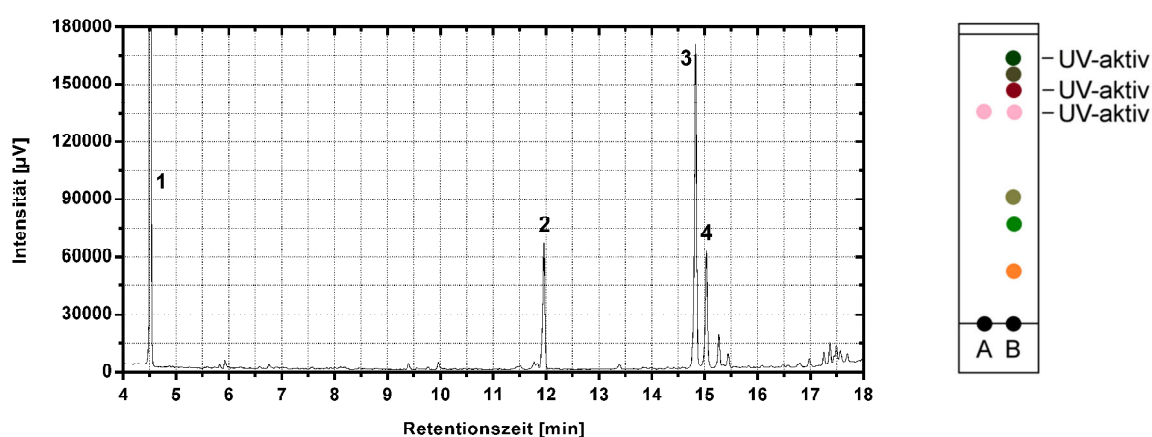


Abbildung 46: Übergangsmetall-katalysierte Oxidation von α -Humulen.

(Links) GC/FID-Chromatogramm der gebildeten Produkte. TBHP (1), Humulen-6,7-epoxid (2), Zerumbon (3) und Viridiflorol (4) wurden durch GC/MS-Analyse identifiziert. (Rechts) Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Produkte mit 6:1 *n*-Hexan:Ethylacetat-Laufmittel. A = Produktstandard, B = Produktgemisch. Spots wurden mit Anisaldehyd-Reagenz angefärbt. Bei 254 nm UV-aktive Spots sind markiert.

Die DC-Analyse bietet den Vorteil, dass Reaktionsprodukte schnell und einfach aufgetrennt und durch geeignete Färbereagenzien kenntlich gemacht werden können. Die Auftrennung der Produkte erfolgte mit einem *n*-Hexan/Ethylacetat-Gemisch im Verhältnis 6:1 als Laufmittel auf einer Silica-Platte. Ein kommerziell erhältlicher Zerumbon-Standard wurde als Referenz mit auf die Platte aufgetragen. Unter UV-Licht bei 254 nm konnten drei Spots auf der Platte erkannt werden. Aufgrund der Laufhöhe und des somit identischen Retentionsfaktors $R_f = 0,73$ konnte ein Spot bereits hier als Zerumbon identifiziert werden. Durch Anfärben mit Anisaldehyd-Färbereagenz wurden auf der DC-Platte weitere Spots mit unterschiedlichen Farbtönen visualisiert. Hierbei ist zu beachten, dass das Färbereagenz nur mit Verbindungen mit funktionellen Gruppen reagiert. Nicht-funktionalisierte Verbindungen wie α -Humulen können mit dem Anisaldehyd-Färbereagenz nicht detektiert werden.

Auch die gaschromatographische Untersuchung der Reaktion bestätigt die Zerumbonbildung. Eine eindeutige Identifizierung erfolgte über den Abgleich des MS-Spektrums mit der NIST Mass Spectral Database und dem Kovats-Index von $I = 2.084$. Nach Aufreinigung des Zerumbons über präparative Dünnschichtchromatographie betrug die Produktausbeute 46,6 %.

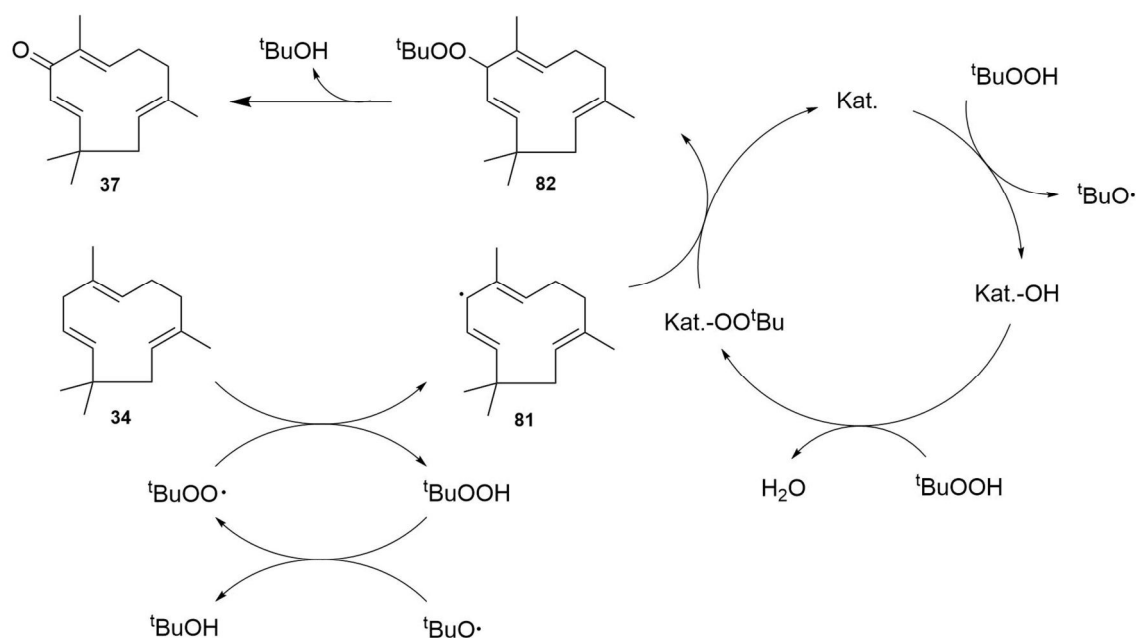


Abbildung 47: Postulierter Mechanismus der Übergangsmetall-katalysierten Oxidation von α -Humulen (34) zu Zerumbon (37) mit TBHP.

Da in der Literatur eine direkte Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon mit TBHP nicht bekannt ist, liegen hier auch keine reaktionsmechanistischen Daten vor. Die allylische Oxidation mit TBHP beruht auf der Eigenschaft des TBHP-Radikals ${}^t\text{BuOO}\cdot$ ein Wasserstoffatom von C-H-Bindungen abstrahieren zu können (McLaughlin et al. 2009). Da die C-H-Bindung in Allylposition relativ schwach ist, wird diese bevorzugt angegriffen. Übergangsmetall-katalysierte Oxidationen mit TBHP weisen meist einen komplexen Mechanismus auf, der auch im Fall der Bildung von Zerumbon wahrscheinlich ist (Abb. 47). Es finden mehrere Parallelreaktionen statt, in denen verschiedene radikalische Stufen des TBHP und des α -Humulens integriert sind. Das TBHP reagiert zunächst mit dem Katalysator zum TBHP-Radikal ${}^t\text{BuO}\cdot$ und zu Kat.-OH , indem die Peroxygruppe homogen gespalten und eine OH-Gruppe auf den Katalysator übertragen wird. Im nächsten Schritt findet mit einem neuen TBHP-Molekül ein Ligandenaustausch zu $\text{Kat.-OO}{}^t\text{Bu}$ statt. Die *tert.*-Butoxygruppe wird auf das bereits durch ${}^t\text{BuOO}\cdot$ aktivierte α -Humulen-Radikal **81** übertragen, welches dann unter Abspaltung von Butanol zu Zerumbon (**37**) reagiert.

Die Oxidationsreaktion führt neben dem Zerumbon als Hauptprodukt zu mehreren Nebenprodukten. Um die Produkte der Oxidationsreaktion zu charakterisieren, wurde eine Analyse per GC/MS durchgeführt. Die Identifizierung der Produkte erfolgte dabei über Abgleich der MS-Spektren (s. Abschnitt 8.7) mit der NIST Mass Spectral Database und der Bestimmung der Kovats-Indices. Nur zwei Nebenprodukte konnten eindeutig identifiziert werden: Humulen-6,7-epoxid ($I = 1.803$, Selektivität 21,0 %) und Viridiflorol ($I = 2.113$, Selektivität 19,5 %).

Die Bildung des Humulen-6,7-Epoxids resultiert aus der Konkurrenz der allylischen Oxidation mit der Epoxidierung. Welche Reaktion dabei überwiegt, liegt auch an den Reaktionsbedingungen. Besonders der Sauerstoffanteil in der Reaktionsatmosphäre hat einen großen Einfluss auf die Reaktion (Liu und Friend 2010). Vermutlich liegt auch hier der Erfolg der angewandten Synthesestrategie zur direkten Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon. In der Literatur wurden bisher nur Syntheseansätze in reiner Sauerstoffatmosphäre beschrieben, die hauptsächlich zum Humulen-6,7-Epoxid als Produkt geführt haben.

Viridiflorol ist ein sesquiterpenoide Duftstoff, der im ätherischen Öl des indischen Niaouli-Baums und des Salbeis vorkommt. Viridiflorol als Nebenprodukt erscheint auf dem ersten Blick ungewöhnlich, da das Kohlenstoffgrundgerüst aus einem Tricyclus besteht. Es ist bisher nicht über die Bildung von Viridiflorol aus α -Humulen berichtet worden. Da die Methylgruppen analog zum α -Humulen angeordnet sind, muss Viridiflorol ein Produkt der Oxidationsreaktion sein.

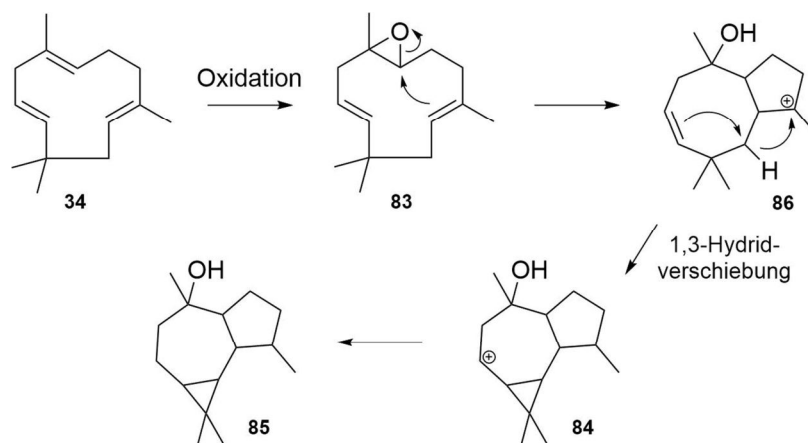


Abbildung 48: Postulierter Mechanismus für die Bildung von Viridiflorol (85) aus α -Humulen (34).

Reaktionsmechanistische Überlegungen zur Bildung des Sesquiterpenalkohols führten zu der Annahme, dass die Reaktion über das Humulen-6,7-Epoxid (83) verlaufen muss (Abb. 48). Durch diverse Umlagerungsreaktionen im Kohlenstoffgerüst und einem Hydridshift kann das Humulengerüst in das Aromadendrengerüst 84 umgewandelt werden und zum Viridiflorol (85) abreagieren. Somit wurde mit der hier optimierten Reaktion zur allylischen Oxidation nicht nur der Weg zur direkten Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon geöffnet, sondern auch eine vollständig neue Synthesestrategie für Viridiflorol entdeckt.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit zeigt die Untersuchungen im Rahmen der Entwicklung einer semisynthetischen Strategie zur Produktion des Sesquiterpenoids Zerumbon. In zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Studien wurden medizinisch wertvolle Eigenschaften des Sesquiterpenoids entdeckt, wovon besonders die Wirkung als Cytostatikum pharmazeutisch hochinteressant ist. Für die Produktion wurde ein zweistufiges Verfahren verfolgt, in dem das unfunktionalierte Vorläufermolekül α -Humulen in metabolisch optimierter *E. coli* produziert und anschließend über chemische Verfahren zum Zerumbon modifiziert wurde (Abb. 49).

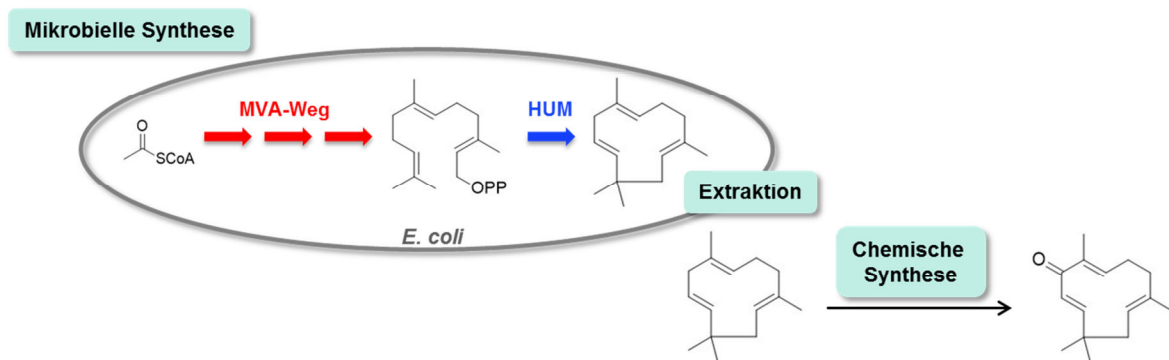


Abbildung 49: Semisynthetische Produktion von Zerumbon.

Der Precursor α -Humulen wird heterolog in *pathway*-optimierter *E. coli* produziert und isoliert. Anschließend findet eine MnCl_2 -katalysierte Oxidation mit TBHP zu Zerumbon statt.

Als Schlüsselenzym der Zerumbonbiosynthese wurde die HUM rekombinant in *E. coli* HUM1810 produziert, aufgereinigt und umfassend charakterisiert. Um ausreichend Enzymmaterial bereitzustellen, wurden zunächst Optimierungsversuche zur Enzymproduktion durchgeführt. Verschiedene Induktorkonzentrationen und Induktionszeitpunkte wurden im Schüttelkolbenmaßstab in TB-Medium untersucht. Mittels SDS-PAGE-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass durch Zugabe von 0,15 mM IPTG bei einer optischen Dichte von 1,0 rel. AU die höchste Produktion an löslicher HUM mit $3,35 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ BFM stattfindet. Für die optimale Produktion an löslicher HUM war es dabei wichtig die Kultivierungstemperatur nach der Induktion auf $20 \text{ }^\circ\text{C}$ abzusenken. Durch einen Medienwechsel zu SB-Medium konnte die HUM-Ausbeute weiter auf $4,40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ BFM erhöht werden. Durch die Kultivierung im 2 L Rührkesselfermenter konnte HUM zu einem

Produkttitert von $140 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ produziert und somit ausreichend Enzymmaterial für nachfolgende Experimente zur Verfügung gestellt werden.

Nach erfolgreicher Produktion der HUM wurden Versuche zur Aufreinigung des Enzyms aus der Feuchtzellbiomasse durchgeführt. Das primäre Ziel war dabei ein besonders reines Enzym für *in vitro* Studien zu isolieren. Da das Enzymkonstrukt über einen His10-Tag verfügt, wurde zunächst eine affinitätschromatographische Aufreinigung verfolgt. Die Isolierung des Enzyms über Sartobind[®] IDA75-Membranadsorber von Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen führte zu einem kompletten Aktivitätsverlust des Enzyms, weshalb eine Aufreinigungsstrategie über klassische HiTrap FF Affinitätssäulen von GE Healthcare, USA entwickelt wurde. Die Effizienz der Proteinisolierung wurde anhand des immobilisierten Metallions und verwendeten Elutionsverfahrens optimiert. Die untersuchten Metallionen Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} und Zn^{2+} zeigten unterschiedliche Affinitäten und Selektivitäten zum His-getaggten Enzym. Die Beladung der Säule mit Zn^{2+} -Ionen resultierte zwar in einer höheren Selektivität, allerdings war hier die HUM-Ausbeute unter allen eingesetzten Metallionen am geringsten. Das beste Verhältnis zwischen Affinität und Selektivität konnte die Beladung mit Co^{2+} -Ionen aufzeigen, die mit einer HUM-Reinheit von 62,7 % weiterer Optimierung bedürfte. Indem sowohl eine Stufen- als auch Gradientenelution mit Imidazol untersucht wurde, konnte aus den gewonnenen Versuchsergebnissen eine Aufreinigungsstrategie mit einer Zwei-Stufen-Elution etabliert werden. Mithilfe der ersten Stufe wurden unspezifisch bindende endogene *E. coli* Proteine abgetrennt, bevor die HUM mit einer Reinheit von $\geq 92 \%$ gewonnen wurde. Mit dem entwickelten affinitätschromatographischen Verfahren via Co^{2+} -NTA-IMAC konnten somit $1,53 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FBM an reiner HUM isoliert werden.

Als alternative Aufreinigungsstrategie wurde die Isolierung der HUM über einen schwachen Anionenaustauscher analysiert. Die Herausforderung bestand hier darin, selektiv die HUM aus dem Proteinrohextrakt zu isolieren. *E. coli* Proteine besitzen einen pI im Bereich von pH 5-8, in dem auch der pI der HUM mit pI=5,61 liegt. Die HUM konnte erfolgreich an die Säule gebunden und mit einem Salzgradienten eluiert werden. Allerdings wies das so gewonnene Enzym keine ausreichende Reinheit für weitere *in vitro* Versuche auf. Um eine effiziente Aufreinigung über IEX zu ermöglichen, müssten weitere Versuche zur Optimierung der Elutionsbedingungen durchgeführt werden.

Die Aktivität der aufgereinigten HUM wurde in Umsetzungsversuchen mit (2E,6E)-FPP überprüft. Die Reaktionslösung wurde mit Isooktan überschichtet, um die entstandenen Produkte *in situ* zu extrahieren und gaschromatographisch zu analysieren. Durch Vergleiche mit kommerziell erhältlichen Standards und der Bestimmung der MS-Spektren konnten als

Reaktionsprodukte α -Humulen (94,5 %) und β -Caryophyllen (5,5 %) identifiziert werden. In Studien zur Enzymstabilität und -aktivität wurde beobachtet, dass die HUM eine von Temperatur- und pH-Wert abhängige Aktivität aufweist. Dabei zeigte sich, dass die HUM gegenüber pH-Schwankungen besonders sensibel ist. Die höchste Aktivität konnte bei pH 7,5 bei 38 °C nachgewiesen werden. Studien zur Lagerstabilität zeigten außerdem, dass die HUM mit 20 % (w/v) Glycerol im Lagerungspuffer bei -20 °C gelagert werden sollte, um ein Präzipitieren des Enzyms beim Auftauen und einen Aktivitätsverlust über die Zeit zu verhindern. Dabei stellte sich auch heraus, dass die HUM unempfindlich gegenüber Frier-Tau-Stress ist.

Zur Bestimmung der Substratspezifität wurden Umsetzungsversuche mit den Monoterpenvorläufern (2*Z*)-NPP und (2*E*)-GPP, den FPP-Isomeren (2*E*,6*Z*)-FPP und (2*Z*,6*E*)-FPP sowie zwei synthetischen (2*E*,6*E*)-FPP-Etherderivaten durchgeführt. Dabei konnten alle Prenylpyrophosphate außer den beiden Etherderivaten erfolgreich umgesetzt werden. Es wurden sowohl unfunktionalisierte als auch hydroxylierte Produkte detektiert. Besonders bei den funktionalisierten Verbindungen stellt sich die Frage, ob es sich um Produkte enzymatischen Ursprungs handelt. Nach erfolgter Pyrophosphatabspaltung durch das Enzym sind sowohl die Ringschlussreaktionen als auch Reaktionen mit Wasser zu den resultierenden Alkoholen thermodynamisch begünstigte Reaktionen, die auch ohne enzymkatalytische Hilfe ablaufen. Um sicher nachzuweisen, dass alle hydroxylierten Produkte enzymatischen Ursprungs sind, muss die absolute Konfiguration der Produkte mittels GC/MS an chiralen Phasen bestimmt werden. Die Enantiomerenreinheit der Reaktion würde beweisen, dass es sich um eine enzymdirigierte Reaktion handelt, die einer stereochemischen Kontrolle unterliegt. Eine nicht-enzymatische Hydrolyse der Reaktion führt zu einem racemischen Gemisch des Produktes. Untersuchungen zu dieser Fragestellung wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt und bedürfen einer Aufklärung in weiterführenden Studien.

Die kinetischen Daten der HUM für die Umsetzung von (2*E*,6*E*)-FPP wurden mit einem diskontinuierlichen gaschromatographischen Assay basierend auf O'Maille et al. in einem Zwei-Phasen-System durchgeführt und die Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Der K_M von 32,79 μ M weist auf eine hohe Bindungsaffinität zum Substrat hin, ist aber im Vergleich zu einer Vielzahl an Sesquiterpensynthesen sehr hoch. Auch die Wechselzahl k_{cat} liegt mit 3,91 s^{-1} höher, als bekannte Sesquiterpensynthase-Daten aus der Literatur. Da das His-getaggte Enzym eine hohe Aktivität aufwies, wurde der His-Tag für die Versuche zur Enzymcharakterisierung nicht

abgespalten. Obwohl in der Literatur ähnliche kinetische Daten in der gesamten Klasse der Terpensynthasen vorkommen, ist ebenfalls bekannt, dass der His-Tag einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms ausüben kann. Ob und wie weit der His10-Tag die enzymchemischen Eigenschaften der HUM verändert ist noch aufzuklären. Vor diesem Hintergrund empfiehlt sich, in weiterführenden Arbeiten die Abspaltung des Affinitätstags durchzuführen und den Einfluss auf die enzymcharakteristischen Daten zu untersuchen.

Zur einfachen und schnellen Bestimmung der Aktivität von Terpensynthasen wurde ein photometrischer Assay entwickelt, der auf der Detektion von Phosphationen als farbiger Malachitgrün-Phosphomolybdat-Komplex basiert. Der Assay bietet den Vorteil, dass mehrere Versuche parallel im Mikrotiterplattenformat durchgeführt und vermessen werden können. Außerdem entfallen mühsame chromatographische Auswertungen, bei denen jeder Produktpeak zunächst einzeln quantifiziert werden muss. Die optimalen Assaybedingungen wurden in einer Validierungsstudie bestimmt und mit dem gaschromatographischen Assay als Referenzmethode verglichen. Die kinetischen Daten zur Umsetzung von (2*E*,6*E*)-FPP, (2*Z*)-NPP und (2*E*)-GPP wurden nach der Endpunktmethode bestimmt. Um die breite Anwendbarkeit des MG-Assays zu untersuchen, sollten Versuche mit weiteren Terpensynthasen durchgeführt werden. Eventuell können die unterschiedlichen Temperatur- und pH-Optima der Enzyme einen Einfluss auf den gesamten Detektionsmechanismus und die Aktivität der APP haben.

Proben der in dieser Arbeit produzierten und aufgereinigten HUM wurden für Kristallstrukturanalysen dem Institut für Bioanalytische Chemie der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt. Es existieren derzeit keine Daten zur Röntgenstrukturanalyse der HUM. Eine genaue Aufklärung der Struktur könnte in Zukunft einen genauen Einblick in die Enzym-Substrat-Wechselwirkung und den Reaktionsmechanismus geben.

Die heterologe Produktion von α -Humulen wurde in einem metabolisch optimierten *E. coli* BL21(DE3)-Stamm durchgeführt. Zur Steigerung der intrazellulären Konzentration an IPP und DMAPP ist dieser Stamm mit einem weiteren mit IPTG-induzierbarem Plasmid zur Codierung eines synthetischen, heterologen MVA-Weges cotransformiert. Durch schrittweise Optimierung der Fermentation konnte die Ausbeute an α -Humulen in Schüttelkolbenversuchen auf $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ erhöht werden. Dafür wurde die Kultur bei einer optischen Dichte von 1,0 rel. AU mit 0,1 mM IPTG induziert. Es stellte sich heraus, dass das gebildete Sesquiterpen in den Zellen akkumuliert und kaum ins Medium abgegeben wird. In Fermentationsversuchen im Rührkessel-Bioreaktor konnte gezeigt werden, dass das heterolog gebildete α -Humulen bei Mangel an Kohlenstoffquellen vom Produktionsorganismus

abgebaut wurde. Um diese Problematik zu umgehen, wurden *in situ* Produktabtrennungsverfahren in Betracht gezogen und extraktive und adsorptive Verfahren weiter analysiert. Untersuchungen mit definierten α -Humulen-Testlösungen führten zu dem Ergebnis, dass das Sesquiterpen durch keines der eingesetzten Extraktionsmittel vollständig aus der wässrigen Lösung entfernt werden konnte. Durch den Einsatz des polyaromatischen Adsorbers Amberlite® XAD4 konnte α -Humulen zwar vollständig aus der wässrigen Lösung isoliert werden, allerdings ist hier die Wiederfindungsrate stark vom eingesetzten Elutionsmittel abhängig. Mit einer Wiederfindungsrate von 78 % zeigte die Elution mit Acetonitril die besten Ergebnisse.

Aufgrund der Erkenntnisse aus den vorangegangenen Versuchen wurde ein integrierter Bioprozess zur α -Humulenproduktion etabliert. Der hydrophobe Adsorber zeigte keinen negativen Einfluss auf die Viabilität des Produktionsstammes und wurde in die Kultur gegeben, um gebildetes α -Humulen zu binden und einer Produktdegradation vorzubeugen. Durch die Applikation einer *in situ* Produktabtrennung konnte der Produkttiter auf $60,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ gesteigert werden. Durch den Einsatz der Adsorberpartikel konnte auch keine Akkumulation des Terpens in den Zellen mehr beobachtet werden. Da das vom Adsorber eluierte Produkt eine Reinheit von über 95 % besaß, wurde auf weitere Prozessierungsschritte zur Abtrennung von Verunreinigungen verzichtet.

Zur oxidativen Derivatisierung des α -Humulens zu Zerumbon wurde in der Literatur eine allylische Oxidation mit Cobaltsalz-Katalysator und TBHP als Oxidationsmittel identifiziert. Die Reaktion konnte bereits erfolgreich auf die Oxidation von Valencen zu Nootkaton angewandt werden. Allerdings bestand beim α -Humulen die Problematik, dass durch drei vorhandene C-C-Doppelbindungen mehrere Positionen zur allylischen Oxidation im Molekül zur Verfügung standen. Um Nebenreaktionen so gering wie möglich zu halten und die selektive Oxidation an C8-Position zum Zerumbon zu erhöhen, wurden die Reaktionsparameter Temperatur, Konzentration des Katalysators und Konzentration des Oxidationsmittels anhand eines statistischen Versuchsplans nach Box-Behnken mit kommerziell erhältlichem α -Humulen optimiert. Mit den optimierten Parametern wurden eine vollständige Umsetzung des α -Humulens und die Bildung von Zerumbon mit einer Selektivität von 40,3 % erreicht. Ein Katalysatorscreening wurde daraufhin durchgeführt und verschiedene Übergangsmetallsalze getestet. Der Einsatz eines Manganchlorid-Katalysators erhöhte die Selektivität der Reaktion auf 51,6 %.

Die optimierte Reaktion wurde auf biotechnologisch hergestelltes α -Humulen angewandt und das Produktspektrum genauer charakterisiert. Es wurde ein Reaktionsmechanismus zur

Bildung von Zerumbon postuliert, der auf mehreren parallel verlaufenden radikalchemischen Reaktionszyklen beruht. Aus GC/MS-Analysen sowie der Bestimmung der Kovats-Indices konnten nur zwei Nebenprodukte der Reaktion mit Humulen-6,7-Epoxid und Viridiflorol identifiziert werden. Während Humulen-6,7-Epoxid ein in der Literatur bekanntes Oxidationsprodukt des α -Humulens ist, war bislang die Synthese von Viridiflorol aus α -Humulen nicht bekannt. Das gebildete Zerumbon konnte erfolgreich über präparative Dünnschichtchromatographie mit einer Ausbeute von 46,6 % isoliert werden. Die allylische Oxidation zum Zerumbon konnte zwar erfolgreich im analytischen Maßstab durchgeführt werden, für eine weiterführende Nutzung muss allerdings die Hochskalierung des Reaktionsansatzes untersucht werden.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit verschiedene Problematiken der Terpen- und Terpensyntheseforschung adressiert. Terpensynthesen sind trotz ihrer überragenden funktionalen Eigenschaften eine nicht ausreichend charakterisierte Enzymgruppe. Ebenso existieren nur für wenige Terpene wirtschaftlich effiziente Produktionsstrategien. Das in der Arbeit präsentierte interdisziplinäre Verfahren unter Anwendung der Biotechnologie und organischen Synthese stellt nur eine von vielen Möglichkeiten zur Naturstoffdarstellung dar. Im Folgenden werden zwei verschiedene Ansätze dargestellt, die Thema zukünftiger Arbeiten sein können.

1. Heterologe Produktion von α -Humulen & enzymatische Oxidation zu Zerumbon:

Wie in Kapitel 3.3.1 erwähnt, wurde die Biosynthese von Zerumbon in *Zingiber zerumbet* Smith bereits aufgeklärt. In der Pflanze erfolgt die Oxidation an C8-Position zweistufig über ein Sesquiterpenalkohol. Die Gensequenzen der relevanten Cytochrom P450 Monooxygenase CYP71BA1 und Zerumbonsynthase sind literaturbekannt und können rekombinant in Mikroorganismen hergestellt werden. Durch Immobilisierung der Enzyme könnte eine kontinuierliche Reaktionsführung in Durchflussreaktoren realisiert werden. Die Immobilisierung würde außerdem den Vorteil der Enzymrückgewinnung sowie der effizienten Produktabtrennung anbieten.

2. Kopplung der α -Humulensynthese und -oxidation in einer Co-Kultivierung:

Die Expression von rekombinanten Genen ist für Zellen immer mit metabolischem Stress verbunden, der im Wachstum und der Produktion zu limitierenden Effekten führen kann. Um diese Probleme zu umgehen, können sogenannte Co-Kultivierungen eine interessante Lösung anbieten. Bei der gemischten Fermentation werden zwei Produktionsstämme in einem Kultivierungssystem gehalten. Im Falle der Zerumbonproduktion ist der erste Produktionsstamm mit *E. coli* HUM_Mev1510 bereits vorhanden. Ein zweiter

Produktionsstamm könnte mit einem Plasmid zur Codierung der Cytochrom P450 Monooxygenase CYP71BA1 und Zerumbonsynthase transformiert werden. Die Oxyfunktionalisierung des Monoterpens Limonen konnte bereits erfolgreich in Co-Kultivierungsversuchen realisiert werden (Willrodt et al. 2015). Eine Übertragung auf die Zerumbonproduktion würde dadurch durchaus denkbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und vorangegangener Arbeiten bieten eine Basis zur biotechnologischen Produktion von wertvollen Sesquiterpenen. Die Idee der *in vivo* Produktion von Precursormolekülen und die anschließende chemische Modifizierung stellt eine Alternative zu aufwändigen Isolierungsverfahren von Terpenen aus pflanzlichen Rohstoffen dar. Die Ausnutzung der Vorteile biotechnologischer und chemisch-synthetischer Methoden ermöglichen nicht nur die Produktion bereits bekannter Naturstoffe, sondern öffnen auch die Tür zur effizienten Synthese neuartiger Verbindungen.

6 MATERIALIEN

6.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller, Land
α -Humulen	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Agar	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Deutschland
Ammoniummolybdat ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄)	Merck KGaA, Deutschland
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Deutschland
Carbenicillin	Sigma-Aldrich Corporation, USA
CHAPS	GE Healthcare, Großbritannien
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck KGaA, Deutschland
Decan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Dichlormethan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Dinatriumhydrogendiphosphat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Dithiothreitol	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
EDTA-Dinatriumsalz	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Eisen(III)-chlorid	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethanol (96 %)	Merck KGaA, Deutschland
Ethylacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Farnesylpyrophosphat (Ammonium-Salz)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Geranylpyrophosphat (Ammonium-Salz)	Axon Medchem, Niederlande
Glucose-Monohydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Glycin	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 12: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller, Land
Hexan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
IPG-Puffer	GE Healthcare, Großbritannien
Imidazol	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Isooctan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Deutschland
Kaliumhexacyanidoferrat(III) (K ₃ [Fe(CN) ₆])	Riedel de-Haen (Sigma-Aldrich), USA
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Riedel de-Haen (Sigma-Aldrich), USA
Kupfer(I)-iodid	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Lactose-Monohydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Luperox TBH70X	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Magermilchpulver	Difco (Becton, Dickinson and Company), USA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Magnesiumchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Malachitgrün-Oxalat	Merck KGaA, Deutschland
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Merck KGaA, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Deutschland
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Natriumacetat-Trihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Natriumchlorid	Merck KGaA, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Natriumhydroxid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriummolybdat(VI)	Riedel de-Haen (Sigma-Aldrich), USA
Natriumphosphat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriumthiosulfat (Na ₂ SO ₃)	Riedel de-Haen (Sigma-Aldrich), USA
Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Nonan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Octoxinol-9 (Triton X-100)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
<i>p</i> -Anisaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Pentan	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Phosphorsäure (85 %)	Merck KGaA, Deutschland
Rotiphorese 40 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
<i>i</i> -Propanol	Merck KGaA, Deutschland
Salzsäure (37 %)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Schwefelsäure (96%)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG

Fortsetzung Tabelle 12: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller, Land
Titriplex III	Merck KGaA, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypton aus Casein	AppliChem GmbH, Deutschland
Tween-20	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Urea	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Zerumbon	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Zink(II)-chlorid	Merck KGaA, Deutschland

Tabelle 13: Verwendete Antikörper und Enzyme.

Antikörper/Enzym	Hersteller, Land
Anorganische Pyrophosphatase 2.000 U/mL	Lucigen Corporation, USA
Anti-His Antikörper, #MA1-21315	Thermo Fischer Scientific, Inc., USA
Goat Anti-Mouse IgG, horse reddish peroxidase conjugate, #401215	Calbiochem, USA

Tabelle 14: Verwendete Proteinmarker.

Proteinmarker	Hersteller, Land
Pierce Unstained Protein Molecular Weight Marker, 26610	Thermo Fischer Scientific, Inc., USA
PageRuler Prestained Protein Ladder, 26616	Thermo Fischer Scientific, Inc., USA

6.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Land
DC Kieselgel 60 F 254 Alufolien 20x20	Merck KGaA, Deutschland
Einwegspritzen (1 ml-20 ml)	Omnifix B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Kryoröhrchen 1,5 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Pipettenspitzen (versch. Größen)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Ansell Healthcare LLC, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Reaktionsgefäße (5 ml)	Eppendorf AG, Deutschland
Sterilfilter (Luer-Lock) Minisart 0,22 µm	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Land
Vivaspin 20 (MWCO 30 kDa)	Sartorius AG, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 mL und 50 mL)	Corning, Inc., USA

6.3 Geräte und Software

Tabelle 16: Verwendete Geräte.

Geräteart	Hersteller, Land
2D-Gelsystem Multiphor™ II Electrophoresis System	GE Healthcare, Großbritannien
Analysenwaage Analytik AC 210S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Autoklav Systec V-150	Systec GmbH, Deutschland
Bioreaktor Biostat® A Plus	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Chromatographiesäule HiPrep™ DEAE FF 16/10 20 mL	GE Healthcare, USA
Chromatographiesäule HiTrap™ IMAC FF 5 mL	GE Healthcare, USA
DC Doppeltrogkammer mit Glasdeckel	VWR International GmbH, Deutschland
Inkubator	Memmert GmbH & Co. KG, Deutschland
IPG-Streifen Immobiline™ DryStrip Kit	GE Healthcare, Großbritannien
Kolbenhubpipette Transferpette® S	Brand GmbH & Co. KG, Deutschland
pH-Elektrode	Leighton Buzzard, Großbritannien
Photometer Multiskan Spectrum	Thermo Fisher Scientific, Inc., USA
Photometer Multiskan GO	Thermo Fisher Scientific, Inc., USA
PVDF-Membran	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Reinstwassersystem arium® pro VF-B	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Membranadsorber Sartobind® IDA75	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Schüttelinkubator Certomat BS-1	B. Braun Biotech International GmbH, Deutschland
SDS-PAGE Gelsystem Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Ultraschallsonde LABSonic®	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Vortex Mixer VM-300	Vortexer GEMMY INDUSTRIAL CORP., Taiwan
YSI 2700 SELECT™ Biochemistry Analyzer	YSI Incorporated, USA
Zentrifuge Heraeus® Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Inc., USA
Zentrifuge Heraeus® Megafuge® 1.0 RS	Thermo Fisher Scientific, Inc., USA

Tabelle 17: Verwendete Software.

Software	Entwickler
ImageJ	Wayne Rasband (National Institute of Health), USA
ChemDraw	CambridgeSoft, USA
GraphPad PRISM	GraphPad Software, Inc., USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, USA
Minitab Statistical Software	Minitab, Inc., USA
GNU Image Manipulation Program	The GIMP Team, USA

6.4 Kulturmedien, Puffer und Reagenzlösungen

Die pH-Werte der hergestellten Lösungen und Puffer wurden, sofern nicht anders angegeben, mit 1 M HCl oder 5 M NaOH eingestellt. Sterilisieren wurde durch Autoklavieren (20 min bei 121 °C) oder Sterilfiltrieren (Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm) durchgeführt.

6.4.1 Kultivierung

Tabelle 18: Zusammensetzung des LB-Mediums.

Bestandteil	Menge	Konzentration
Trypton	10 g	10 g·L ⁻¹
Hefeextrakt	5 g	5 g·L ⁻¹
Natriumchlorid	10 g	10 g·L ⁻¹
Agar	15 g	15 g·L ⁻¹
demineralisiertes H ₂ O	ad 1 L	

Medienbestandteile in demineralisiertem H₂O lösen. Für Platten zusätzlich 15 g Agar zugeben. Das Medium autoklavieren und nach Abkühlen 1 mL der Antibiotika-Stammlösung zugeben.

Tabelle 19: Zusammensetzung des TB-Mediums.

Bestandteil	Menge	Konzentration
Trypton	12 g	12 g·L ⁻¹
Hefeextrakt	24 g	24 g·L ⁻¹
Glycerin	5 g	5 g·L ⁻¹
demineralisiertes H ₂ O	ad 900 mL	

Fortsetzung Tabelle 19: Zusammensetzung des TB-Mediums.

Bestandteil	Menge	Konzentration
KH ₂ PO ₄	2,314 g	0,17 M
K ₂ HPO ₄	12,541 g	0,72 M
demineralisiertes H ₂ O	ad 100 mL	

Trypton, Hefeextrakt und Glycerin sowie KH₂PO₄ und K₂HPO₄ in demineralisiertem H₂O lösen. Das Medium und den Puffer autoklavieren. Nach Abkühlen den Puffer dem Medium zusetzen und 1 mL der Antibiotika-Stammlösung zugeben.

Tabelle 20: Zusammensetzung des SB-Mediums.

Bestandteil	Menge	Konzentration
Trypton	32 g	32 g·L ⁻¹
Hefeextrakt	20 g	20 g·L ⁻¹
NaCl	5 g	5 g·L ⁻¹
NaOH (1 M)	5 mL	5 mmol·L ⁻¹
demineralisiertes H ₂ O	ad 1000 mL	

Medienbestandteile in demineralisiertem H₂O lösen. Das Medium autoklavieren und nach Abkühlen 1 mL der Antibiotika-Stammlösung zugeben.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Stammlösungen des ZYP-31- und ZYP-31(mod)-Mediums.

Nr.		Menge	Konzentration	Bemerkungen
A	KH ₂ PO ₄	6,8 g	7,23 g·L ⁻¹	Autoklavieren oder Sterilfiltrieren
	Na ₂ HPO ₄	7,1 g	7,55 g·L ⁻¹	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,3 g	3,51 g·L ⁻¹	
	demineralisiertes H ₂ O	ad 940 mL		
B	Glycerin	120 g	300 g·L ⁻¹	Autoklavieren oder Sterilfiltrieren
	Glucose-Monohydrat	13,2 g	33 g·L ⁻¹	
	Lactose-Monohydrat	16 g	40 g·L ⁻¹	
	demineralisiertes H ₂ O	ad 400 mL		
B*	Glucose-Monohydrat	100 g	200 g·L ⁻¹	Autoklavieren oder Sterilfiltrieren
demineralisiertes H ₂ O	ad 500 mL			
C	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,46 g	49,2 g·L ⁻¹	Sterilfiltrieren
	demineralisiertes H ₂ O	ad 50 mL		
C*	MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,92 g	98,4 g·L ⁻¹	Sterilfiltrieren
	demineralisiertes H ₂ O	ad 50 mL		

Fortsetzung Tabelle 21: Zusammensetzung der Stammlösungen des ZYP-31- und ZYP-31(mod)-Mediums.

D	Eisen(III)-chlorid	1,6 g	32 g·L ⁻¹	Sterilfiltrieren
	demineralisiertes H ₂ O	ad 50 mL		
E	ZnCl ₂	6,54 mg	65,4 mg·L ⁻¹	Sterilfiltrieren
	H ₃ BO ₃	2 mg	20 mg·L ⁻¹	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	8,9 mg	89 mg·L ⁻¹	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	5 mg	50 mg·L ⁻¹	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	10 mg	100 mg·L ⁻¹	
	NiSO ₄ ·6H ₂ O	10 mg	100 mg·L ⁻¹	
	demineralisiertes H ₂ O	ad 100 mL		
F	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,05 g	10,5 g·L ⁻¹	Sterilfiltrieren
	demineralisiertes H ₂ O	ad 50 mL		

Tabelle 22: Zusammensetzung des ZYP-31 und ZYP-31(mod)-Mediums.

Nr.	ZYP-31	ZYP-31(mod)
A	940 mL	900 mL
B	50 mL	
B*		50 mL
C	10 mL	
C*		50 mL
D	0,5 mL	0,5 mL
E	1 mL	1 mL
F	0,5 mL	0,5 mL

Medienbestandteile nach dem Sterilisieren zusammengeben. Dem Medium 1 mL der Antibiotika-Stammlösung zugeben.

Tabelle 23: Verwendete Antibiotika-Stammlösungen (1000x).

Antibiotikum	Menge	Konzentration
Carbenicillin	1,00 g	100 mg·mL ⁻¹
demineralisiertes H ₂ O	ad 10 mL	
Chloramphenicol	0,34 g	34 mg·mL ⁻¹
Ethanol	ad 10 mL	

Antibiotika-Stammlösungen sterilfiltrieren und in 1 mL Aliquots bei -80 °C wegfrieren.

Tabelle 24: IPTG-Stammlösung.

Bestandteil	Menge	Konzentration
IPTG	595 mg	0,5 M
demineralisiertes H ₂ O	ad 5 mL	

Die IPTG-Stammlösung wird sterilfiltriert und in 0,5 mL Aliquots bei -20 °C gelagert.

6.4.2 Zellaufschluss

Tabelle 25: Zusammensetzung des PBS-Puffers.

Bestandteil	Menge	Konzentration
NaCl	8 g	137 mM
KCl	0,2 g	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	1,42 g	10 mM
KH ₂ PO ₄	0,27 g	2 mM
demineralisiertes H ₂ O	ad 1 L	

Tabelle 26: Zusammensetzung des Extraktionspuffers.

Bestandteil	Menge	Konzentration
MOPS	1,05 g	50 mM
DTT	77 mg	5 mM
Glycerol	10 mL	10 %
demineralisiertes H ₂ O	ad 100 mL	

Tabelle 27: Zusammensetzung des Lysis-Puffers.

Bestandteil	Menge	Konzentration
Urea	36,04 g	6 M
Natriummetabisulfit	190,11 mg	10 mM
β -Mercaptoethanol	70,1 μ L	10 mM
Ascorbinsäure	176,13 mg	10 mM
demineralisiertes H ₂ O	ad 100 mL	

6.4.3 SDS-PAGE

Tabelle 28: Zusammensetzung eines 10 % Trenngels (für 2 Gele).

Bestandteil	Menge
Rotiphorese 40 (37,5:1)	2,5 mL
SDS (1 %)	1 mL
Tris/HCl (pH 8,8)	2,8 mL
demineralisiertes H ₂ O	3,7 mL
TEMED	20 µL
APS	20 µL

Tabelle 29: Zusammensetzung eines 5 % Sammelgels (für 1-4 Gele).

Bestandteil	Menge
Rotiphorese 40 (37,5:1)	750 µL
SDS (1 %)	300 µL
Tris/HCl (pH 6,8)	630 µL
demineralisiertes H ₂ O	3,77 mL
TEMED	10 µL
APS	10 µL

Tabelle 30: Zusammensetzung des 10x TGS-Puffers (pH 8,3).

Bestandteil	Menge	Konzentration
Tris	3 g	3 g·L ⁻¹
Glycin	140 g	140 g·L ⁻¹
SDS	10 g	10 g·L ⁻¹
demineralisiertes H ₂ O	ad 1 L	

Tabelle 31: Zusammensetzung 2x SDS-Probenpuffer.

Bestandteil	Menge	Konzentration
Bromphenolblau	20 mg	0,25 g·L ⁻¹
EDTA-Natriumsalz	58 mg	0,73 g·L ⁻¹
SDS	5 g	62,5 g·L ⁻¹
Tris-HCl	0,315 g	3,94 g·L ⁻¹
demineralisiertes H ₂ O	ad 80 mL	

Tabelle 32: Zusammensetzung Laemmli-Puffer.

Bestandteil	Menge
2x SDS Probenpuffer	800 μ L
Glycerin (55 %ig)	100 μ L
β -Mercaptoethanol	100 μ L

Tabelle 33: Zusammensetzung der kolloidalen Coomassie-Färbelösung (Candiano et al. 2004).

Bestandteil	Menge
Coomassie Brilliant Blue G 250	490 mg
Ammoniumsulfat	40,8 g
Phosphorsäure (85 %)	48 mL
Methanol	82 mL
demineralisiertes H ₂ O	367 mL

In einer braunen Glasflasche 40 mL demineralisiertes H₂O vorlegen und Phosphorsäure langsam zugeben. Ammoniumsulfat und Coomassie Brilliant Blue G-250 unter Rühren zugeben. Restliches demineralisiertes H₂O zugeben. Methanol langsam unter Rühren zugeben. Bei 4 °C lagern.

Tabelle 34: Entfärber/Fixierer-Lösung für kolloidale Coomassie-Färbung.

Bestandteil	Konzentration
Ethanol (96 %)	50%
Phosphorsäure (85 %)	20%
demineralisiertes H ₂ O	30%

Tabelle 35: Zusammensetzung des Silberentfärbers/-fixierers.

Bestandteil	Menge
Ethanol	450 mL
Essigsäure	100 mL
demineralisiertes H ₂ O	450 mL

Tabelle 36: Zusammensetzung des Farmers-Reducers.

Bestandteil	Menge
$K_3[Fe(CN)_6]$	Spatelspitze
$Na_2S_2O_3$	Spatelspitze
demineralisiertes H_2O	100 mL

Tabelle 37: Zusammensetzung der Silbernitratlösung.

Bestandteil	Menge
$AgNO_3$	Spatelspitze
demineralisiertes H_2O	100 mL

Tabelle 38: Färbelösung.

Bestandteil	Menge
Formaldehyd	300 μ L
2,5 %- Na_2CO_3 -Lösung	100 mL

6.4.4 Western-Blot

Tabelle 39: Zusammensetzung des Transferpuffers.

Bestandteil	Menge
Tris	0,45 g
Glycin	2,25 g
Methanol	30 mL
demineralisiertes H_2O	ad 150 mL

Tabelle 40: Zusammensetzung des 10x PBS-Puffers.

Bestandteil	Menge
$NaCl$	80 g
KCl	2 g
NaH_2PO_4	14,4 g
KH_2PO_4	2,4 g
demineralisiertes H_2O	ad 1 L

Tabelle 41: Zusammensetzung der Block-Lösung.

Bestandteil	Menge
Magermilchpulver	7,5 g
Polyvinylpyrrolidon	3 g
Tween 20	1,5 mL
10x PBS-Puffer	15 mL
demineralisiertes H ₂ O	ad 150 mL

Tabelle 42: Zusammensetzung der Waschlösung.

Bestandteil	Menge
10x PBS-Puffer	100 mL
demineralisiertes H ₂ O	900 mL
Tween 20	10 mL

Tabelle 43: Zusammensetzung des Probendiluenten.

Bestandteil	Menge
Blocklösung (vom Vortag)	90 mL
Waschlösung	90 mL

6.4.5 2D-Gelelektrophorese

Tabelle 44: Zusammensetzung des Rehydrierungspuffers.

Bestandteil	Konzentration
Urea	8 M
CHAPS	2 %
IPG-Puffer	0,5 %
Bromphenolblau	0,002 %
demineralisiertes H ₂ O	ad 25 mL

Rehydrierungspuffer in 1 mL Aliquots bei -20 °C lagern.

Tabelle 45: Zusammensetzung des Equilibrierungspuffers.

Bestandteil	Konzentration
Urea	6 M
Tris-HCl pH 8,8	75 mM
Glycerol	29,3 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
Bromphenolblau	0,002 %
demineralisiertes H ₂ O	ad 200 mL

6.4.6 FPLC und Ultrafiltration

Tabelle 46: Zusammensetzung des Equilibrierungspuffers für Sartobind® IDA75 Membranadsorber.

Bestandteil	Menge	Konzentration
Natriumacetat-Trihydrat	6,90 g	0,1 M
NaCl	14,61 g	0,5 M
demineralisiertes H ₂ O	ad 500 mL	

Bestandteile einwiegen und mit demineralisiertem H₂O auffüllen. Den pH-Wert auf 4,5 einstellen.

Tabelle 47: Zusammensetzung des Bindungspuffers für Sartobind® IDA75 Membranadsorber.

Bestandteil	Menge	Konzentration
NaH ₂ PO ₄	3 g	50 mM
NaCl	14,61 g	0,5 M
demineralisiertes H ₂ O	ad 500 mL	

Bestandteile einwiegen und mit demineralisiertem H₂O auffüllen. Den pH-Wert auf 8 einstellen.

Tabelle 48: Zusammensetzung des Elutionspuffers für Sartobind® IDA75 Membranadsorber (pH 8).

Bestandteil	Menge	Konzentration
Imidazol	17,02 g	0,5 M
Equilibrierungspuffer	ad 500 mL	

Tabelle 49: Zusammensetzung der Cobalt-Lösung für Sartobind® IDA75 Membranadsorber.

Bestandteil	Menge	Konzentration
CoCl ₂ ·3 H ₂ O	44,46 g	0,5 M
Equilibrierungspuffer	ad 500 mL	

Tabelle 50: Zusammensetzung der Nickel-Lösung für Sartobind® IDA75 Membranadsorber.

Bestandteil	Menge	Konzentration
NiSO ₄ ·7 H ₂ O	70,22 g	0,5 M
Equilibrierungspuffer	ad 500 mL	

Tabelle 51: Zusammensetzung der Kupfer-Lösung für Sartobind® IDA75 Membranadsorber.

Bestandteil	Menge	Konzentration
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	62,42 g	0,5 M
Equilibrierungspuffer	ad 500 mL	

Tabelle 52: Zusammensetzung der Zink-Lösung für Sartobind® IDA75 Membranadsorber.

Bestandteil	Menge	Konzentration
ZnCl ₂	34,07 g	0,5 M
Equilibrierungspuffer	ad 500 mL	

Tabelle 53: Zusammensetzung des Bindungspuffers für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.

Bestandteil	Menge	Konzentration
MOPS	10,463 g	50 mM
Imidazol	0,681 g	10 mM
NaCl	29,22 g	500 mM
Glycerin	100 g	10 %
demineralisiertes H ₂ O	ad 1 L	

Bestandteile einwiegen und mit demineralisiertem H₂O auffüllen. Den pH-Wert auf 7,5 einstellen.

Tabelle 54: Zusammensetzung des Elutionspuffers für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.

Bestandteil	Menge	Konzentration
MOPS	10,463 g	50 mM
Imidazol	34,04 g	500 mM
NaCl	29,22 g	500 mM
Glycerin	100 g	10 %
demineralisiertes H ₂ O	ad 1 L	

Bestandteile einwiegen und mit demineralisiertem H₂O auffüllen. Den pH-Wert auf 7,5 einstellen.

Tabelle 55: *Stripping*-Puffer für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.

Bestandteil	Menge	Konzentration
Na ₂ HPO ₄	2,82 g	20 mM
EDTA	14,61 g	50 mM
NaCl	29,22 g	500 mM
demineralisiertes H ₂ O	ad 1 L	

Bestandteile einwiegen und mit demineralisiertem H₂O auffüllen. Den pH-Wert auf 7,4 einstellen.

Tabelle 56: Zusammensetzung der Cobalt-Lösung für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.

Bestandteil	Menge	Konzentration
CoCl ₂ ·3 H ₂ O	8,89 g	0,1 M
demineralisiertes H ₂ O	ad 500 mL	

Bestandteile einwiegen und mit demineralisiertem H₂O auffüllen.

Tabelle 57: Zusammensetzung der Nickel-Lösung für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.

Bestandteil	Menge	Konzentration
NiSO ₄ ·7H ₂ O	14,044 g	0,1 M
demineralisiertes H ₂ O	ad 500 mL	

Bestandteile einwiegen und mit demineralisiertem H₂O auffüllen.

Tabelle 58: Zusammensetzung der Kupfer-Lösung für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.

Bestandteil	Menge	Konzentration
CuSO ₄ ·5H ₂ O	12,48 g	0,1 M
demineralisiertes H ₂ O	ad 500 mL	

Bestandteile einwiegen und mit demineralisiertem H₂O auffüllen.

Tabelle 59: Zusammensetzung der Zink-Lösung für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.

Bestandteil	Menge	Konzentration
ZnCl ₂	6,814 g	0,1 M
demineralisiertes H ₂ O	ad 500 mL	

Bestandteile einwiegen und mit demineralisiertem H₂O auffüllen.

Tabelle 60: Zusammensetzung des Startpuffers für GE Healthcare DEAE 16/10 FF Säule.

Bestandteil	Menge	Konzentration
Tris-HCl	6,814 g	20 mM
demineralisiertes H ₂ O	ad 1 L	

Bestandteile einwiegen und mit demineralisiertem H₂O auffüllen. Gewünschten pH-Wert einstellen.

Tabelle 61: Zusammensetzung des Elutionspuffers für GE Healthcare DEAE 16/10 FF Säule.

Bestandteil	Menge	Konzentration
Tris-HCl	3,152 g	20 mM
NaCl	58,44 g	1 M
demineralisiertes H ₂ O	ad 1 L	

Bestandteile einwiegen und mit demineralisiertem H₂O auffüllen. Gewünschten pH-Wert einstellen.

Tabelle 62: Zusammensetzung des Lagerungspuffers.

Bestandteil	Menge	Konzentration
MOPSO	4,51 g	20 mM
MgCl ₂	476 mg	5 mM
DTT	154,25 mg	1 mM
NaCl	11,69 g	200 mM
Glycerol	0-50 g	0-20 %
demineralisiertes H ₂ O	ad 1 L	

Bestandteile einwiegen und mit demineralisiertem H₂O auffüllen. Den pH-Wert auf 7,5 einstellen.

6.4.7 Bradford-Assay

Tabelle 63: Zusammensetzung der BSA-Stammlösung.

Bestandteil	Menge	Konzentration
BSA	1 g	2000 µg·mL ⁻¹
demineralisiertes H ₂ O	ad 5 mL	

Tabelle 64: BSA-Standardreihe.

	2000 µg·mL⁻¹	1000 µg·mL⁻¹	800 µg·mL⁻¹	700 µg·mL⁻¹
Stammlösung	2000 µL	1000 µL	800 µL	700 µL
demineralisiertes H ₂ O	0 µL	1000 µL	1200 µL	1300 µL
	600 µg·mL⁻¹	500 µg·mL⁻¹	400 µg·mL⁻¹	300 µg·mL⁻¹
Stammlösung	600 µL	500 µL	400 µL	300 µL
demineralisiertes H ₂ O	1400 µL	1500 µL	1600 µL	1700 µL
	250 µg·mL⁻¹	200 µg·mL⁻¹	150 µg·mL⁻¹	100 µg·mL⁻¹
Stammlösung	250 µL	200 µL	150 µL	100 µL
demineralisiertes H ₂ O	1750 µL	1800 µL	1850 µL	1900 µL
	50 µg·mL⁻¹	25 µg·mL⁻¹	0 µg·mL⁻¹	
Stammlösung	50 µL	25 µL	0 µL	
demineralisiertes H ₂ O	1950 µL	1975 µL	2000 µL	

Tabelle 65: Zusammensetzung des Bradford-Reagenzes.

Bestandteil	Menge
Coomassie Brilliant Blue G-250	10 mg
Ethanol (96 %)	5 mL
Phosphorsäure (85 %)	10 mL
demineralisiertes H ₂ O	ad 100 mL

Coomassie Brilliant Blue G-250 in Ethanol lösen und Phosphorsäure zugeben. Die Lösung unter Rühren in demineralisiertes H₂O zugeben und anschließend filtrieren. Bei 4 °C lagern.

6.4.8 Umsetzungsversuche

Tabelle 66: Zusammensetzung des Aktivitätspuffers.

Bestandteil	Menge	Konzentration
MgCl ₂	30 mg	15 mM
Extraktionspuffer	ad 10 mL	

Tabelle 67: Zusammensetzung der α -Humulen-Standardreihe.

Bestandteil	Menge	Konzentration
α -Humulen	11,25 μ L	1 mg·mL ⁻¹
Isooktan	ad 10 mL	

Tabelle 68: α -Humulen-Standardreihe.

	10 μ g·mL ⁻¹	5 μ g·mL ⁻¹	2,5 μ g·mL ⁻¹
Stammlösung	10 μ L	5 μ L	2,5 μ L
Isooktan	990 μ L	995 μ L	997,5 μ L
	1 μ g·mL ⁻¹	0,5 μ g·mL ⁻¹	0,05 μ g·mL ⁻¹
10 μ g·mL ⁻¹ -Lösung	100 μ L	50 μ L	5 μ L
Isooktan	900 μ L	950 μ L	995 μ L

Tabelle 69: FPP-Substratlösungen für die Reaktionskinetik der HUM (GC-Assay).

	1 μM	5 μM	10 μM
FPP-Stammlösung (1 g·L ⁻¹)	1,17 μL	5,88 μL	11,78 μL
Aktivitätspuffer	ad 2,7 mL	ad 2,7 mL	ad 2,7 mL
	20 μM	30 μM	50 μM
FPP-Stammlösung (1 g·L ⁻¹)	23,55 μL	35,32 μL	58,88 μL
Aktivitätspuffer	ad 2,7 mL	ad 2,7 mL	ad 2,7 mL
	80 μM	100 μM	
FPP-Stammlösung (1 g·L ⁻¹)	94,2 μL	117,2 μL	
Aktivitätspuffer	ad 2,7 mL	ad 2,7 mL	

Tabelle 70: FPP-Substratlösungen für die Reaktionskinetik der HUM (MG-Assay).

	5 μM	10 μM	20 μM
FPP-Stammlösung (1 g·L ⁻¹)	1,31 μL	2,62 μL	5,23 μL
APP (0,25 U·mL ⁻¹)	40 μL	40 μL	40 μL
Aktivitätspuffer	ad 600 μL	ad 600 μL	ad 600 μL
	30 μM	50 μM	80 μM
FPP-Stammlösung (1 g·L ⁻¹)	7,85 μL	13,08 μL	20,94 μL
APP (0,25 U·mL ⁻¹)	40 μL	40 μL	40 μL
Aktivitätspuffer	ad 600 μL	ad 600 μL	ad 600 μL
	100 μM	150 μM	
FPP-Stammlösung (1 g·L ⁻¹)	26,17 μL	39,25 μL	
APP (0,25 U·mL ⁻¹)	40 μL	40 μL	
Aktivitätspuffer	ad 600 μL	ad 600 μL	

Tabelle 71: GPP-Substratlösungen für die Reaktionskinetik der HUM (MG-Assay).

	5 μM	10 μM	20 μM
GPP-Stammlösung (1 g·L ⁻¹)	1,56 μL	3,13 μL	6,25 μL
APP (0,25 U·mL ⁻¹)	40 μL	40 μL	40 μL
Aktivitätspuffer	ad 600 μL	ad 600 μL	ad 600 μL

Fortsetzung Tabelle 71: GPP-Substratlösungen für die Reaktionskinetik der HUM (MG-Assay).

	30 μM	50 μM	80 μM
GPP-Stammlösung (1 g · L ⁻¹)	9,37 μL	15,62 μL	25,00 μL
APP (0,25 U · mL ⁻¹)	40 μL	40 μL	40 μL
Aktivitätspuffer	ad 600 μL	ad 600 μL	ad 600 μL
	100 μM	150 μM	
GPP-Stammlösung (1 g · L ⁻¹)	31,25 μL	46,87 μL	
APP (0,25 U · mL ⁻¹)	40 μL	40 μL	
Aktivitätspuffer	ad 600 μL	ad 600 μL	

Tabelle 72: NPP-Substratlösungen für die Reaktionskinetik der HUM (MG-Assay).

	5 μM	10 μM	20 μM
NPP-Stammlösung (1 g · L ⁻¹)	1,56 μL	3,13 μL	6,25 μL
APP (0,25 U · mL ⁻¹)	40 μL	40 μL	40 μL
Aktivitätspuffer	ad 600 μL	ad 600 μL	ad 600 μL
	30 μM	50 μM	80 μM
NPP-Stammlösung (1 g · L ⁻¹)	9,37 μL	15,62 μL	25,00 μL
APP (0,25 U · mL ⁻¹)	40 μL	40 μL	40 μL
Aktivitätspuffer	ad 600 μL	ad 600 μL	ad 600 μL
	100 μM	150 μM	
NPP-Stammlösung (1 g · L ⁻¹)	31,25 μL	46,87 μL	
APP (0,25 U · mL ⁻¹)	40 μL	40 μL	
Aktivitätspuffer	ad 600 μL	ad 600 μL	

6.4.9 Malachitgrün-Assay

Tabelle 73: Zusammensetzung des Malachitgrün-Molybdat-Reagenzes.

Bestandteil	Menge
Malachitgrün-Oxalat	2,2 g
Schwefelsäure (98 %)	300 mL
demineralisiertes H ₂ O	ad 100 mL

Schwefelsäure unter Rühren in demineralisiertem H₂O verdünnen. Malachitgrün-Oxalat zugeben und anschließend filtrieren. Bei 4 °C lagern.

Tabelle 74: Zusammensetzung der Entwicklungslösung.

Bestandteil	Menge
Malachitgrün-Molybdat-Reagenz	10 mL
7,5 % (w/v) Ammoniummolybdat	2,5 mL
11 %ig Tween 20	0,2 mL

Tabelle 75: Stammlösung für Phosphat-Standardreihe.

Bestandteil	Menge	Konzentration
Na ₃ PO ₄	14,20 mg	1 mg·mL ⁻¹
demineralisiertes ddH ₂ O	ad 10 mL	

Tabelle 76: Phosphat-Standardreihe.

	200 µg·mL ⁻¹	100 µg·mL ⁻¹	80 µg·mL ⁻¹
Stammlösung	200 µL	100 µL	80 µL
demineralisiertes ddH ₂ O	800 µL	900 µL	920 µL
	60 µg·mL ⁻¹	50 µg·mL ⁻¹	40 µg·mL ⁻¹
Stammlösung	60 µL	50 µL	40 µL
demineralisiertes ddH ₂ O	940 µL	950 µL	960 µL
	30 µg·mL ⁻¹	20 µg·mL ⁻¹	10 µg·mL ⁻¹
Stammlösung	30 µL	20 µL	10 µL
demineralisiertes ddH ₂ O	970 µL	980 µL	990 µL
	5 µg·mL ⁻¹	1 µg·mL ⁻¹	0 µg·mL ⁻¹
Stammlösung	5 µL	1 µL	0 µL
demineralisiertes ddH ₂ O	995 µL	999 µL	1000 µL

Tabelle 77: Stammlösung für Zerumbon-Standardreihe.

Bestandteil	Menge	Konzentration
Zerumbon	2,18 mg	1 mg·mL ⁻¹
Acetonitril	ad 10 mL	

Tabelle 78: Zerumbon-Standardreihe.

	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Stammlösung	1000 μL	800 μL	500 μL
Acetonitril	9000 μL	9200 μL	9500 μL
	30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Stammlösung	300 μL	200 μL	100 μL
Acetonitril	9700 μL	9800 μL	9900 μL
	5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Stammlösung	50 μL	10 μL	1 μL
Acetonitril	9950 μL	9990 μL	9999 μL

6.5 Stämme

Escherichia coli BL21(DE3), Bestellnr.: 69450 (Merck KGaA, Deutschland)

6.6 Plasmidkarten

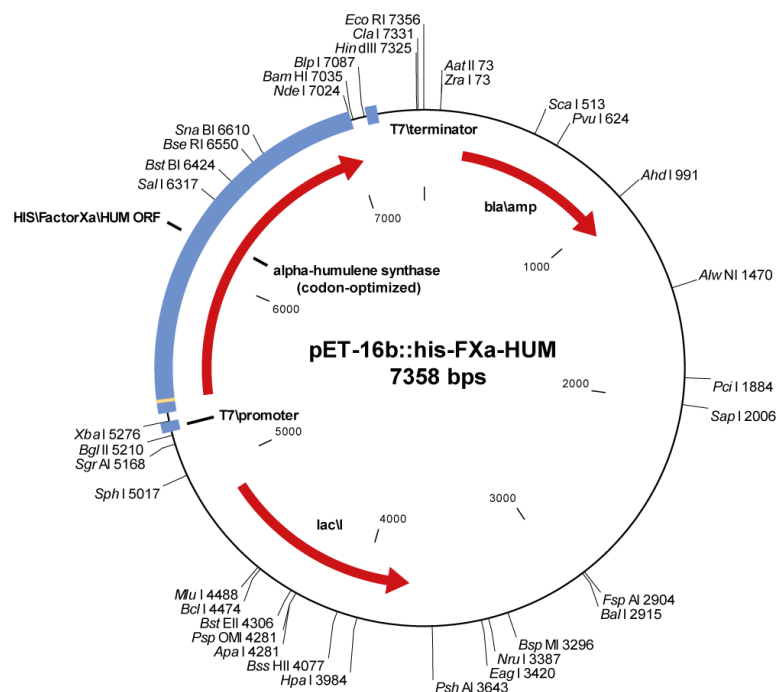


Abbildung 50: Plasmidkarte des Vektors pET-16b::his-FXa-HUM..

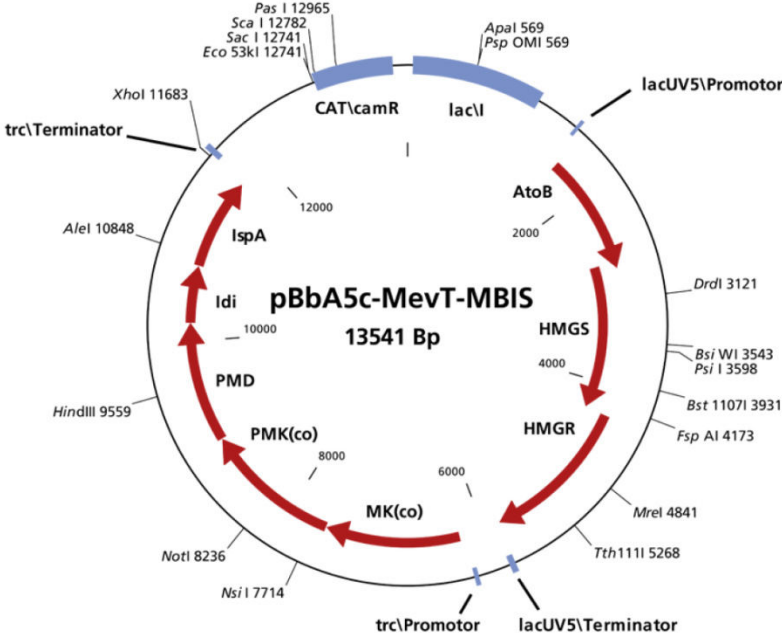


Abbildung 51: Plasmidkarte des Vektoren pBbA5c-MevT-MBIS.

7 METHODEN

7.1 Stammerhalt

Der Stamm wird auf den entsprechenden Medienplatten (mit Carbenicillin bzw. Carbenicillin und Chloramphenicol) bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und monatlich auf frische Platten überimpft. Die ausgestrichenen Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

7.2 Kultivierung im Schüttelkolben

7.2.1 Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) HUM1810 in TB- oder SB-Medium

Die Kultivierung des Stammes erfolgt in Schüttelkolben. Es wird eine Vorkultur in einem 100 mL Schüttelkolben mit vier Schikanen angesetzt. Es werden 25 mL LB-Medium mit einer Kolonie des Stammes von der Agar-Platte angeimpft. Die Zellen werden über Nacht bei 37 °C mit 150 rpm inkubiert. Die Hauptkultur wird in 500 mL Schüttelkolben mit drei Schikanen durchgeführt. Es werden 100 mL LB- bzw. TB-Medium zu einer optischen Dichte von 0,1 rel. AU mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 150 rpm bis zur Induktion inkubiert. Die Proteinexpression wird mit IPTG induziert und die Inkubation bei 20 °C und 150 rpm weitergeführt. Für weitere Untersuchungen wird aus der Kultur ein normiertes Volumen an Probe entnommen ($V_{Probe} = 2/OD_{600}$). Nach einer Kultivierungsdauer von 24 h nach Induktion wird die Kulturbrühe bei 9000x g und 4 °C 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 15-20 mL 1x PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein vorher ausgewogenes Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min bei 4 °C mit 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet ausgewogen. Für spätere Untersuchungen wird das Zellpellet bei -20 °C aufbewahrt.

7.2.2 Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) HUM1810 in ZYP-31-Medium

Die Kultivierung des Stammes erfolgt in Schüttelkolben. Es wird eine Vorvorkultur in einem 100 mL Schüttelkolben mit vier Schikanen angesetzt. Es werden 25 mL LB-Medium mit einer Kolonie des Stammes von der Agar-Platte angeimpft. Die Zellen werden über 10 h bei 37 °C

mit 150 rpm inkubiert. Die Vorkultur aus 25 mL ZYP-31-Medium wird mit der Vorvorkultur zu einer optischen Dichte von 0,1 rel. AU angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Die Hauptkultur wird in 500 mL Schüttelkolben mit drei Schikanen durchgeführt. Es werden 100 mL ZYP-31-Medium zu einer optischen Dichte von 0,1 rel. AU mit der Vorkultur angeimpft und 48 h bei 20 °C und 150 rpm inkubiert. Für weitere Untersuchungen wird aus der Kultur ein normiertes Volumen an Probe entnommen ($V_{Probe} = 2/OD_{600}$). Nach Kultivierungsende wird die Kulturbrühe bei 9000x g und 4 °C 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 15-20 mL 1x PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein vorher ausgewogenes Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min bei 4 °C mit 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet ausgewogen. Für spätere Untersuchungen wird das Zellpellet bei -20 °C aufbewahrt.

7.2.3 Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) HUM_Mev1510 in ZYP-31(mod)-Medium

Die Kultivierung des Stammes erfolgt in Schüttelkolben. Es wird eine Vorvorkultur in einem 100 mL Schüttelkolben mit vier Schikanen angesetzt. Es werden 25 mL LB-Medium mit einer Kolonie des Stammes von der Agar-Platte angeimpft. Die Zellen werden über 10 h bei 37 °C mit 150 rpm inkubiert. Die Vorkultur aus 25 mL ZYP-31-Medium wird mit der Vorvorkultur zu einer optischen Dichte von 0,1 rel. AU angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Die Hauptkultur wird in 500 mL Schüttelkolben mit drei Schikanen durchgeführt. Es werden 100 mL ZYP-31-Medium zu einer optischen Dichte von 0,1 rel. AU mit der Vorkultur angeimpft und 24 h bzw. 48 h bei 20 °C und 150 rpm inkubiert. Für weitere Untersuchungen wird aus der Kultur ein normiertes Volumen an Probe entnommen ($V_{Probe} = 2/OD_{600}$). Nach Kultivierungsende wird die Kulturbrühe bei 9000x g und 4 °C 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wird für die Terpenanalytik weiterverwendet und das Zellpellet in 15-20 mL 1x PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein vorher ausgewogenes Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min bei 4 °C mit 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet ausgewogen. Für spätere Untersuchungen wird das Zellpellet bei -20 °C aufbewahrt.

7.3 Kultivierung im Rührkessel-Bioreaktor

7.3.1 Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) HUM1810 in SB-Medium

Es wird eine Vorvorkultur in einem 100 mL Schüttelkolben mit vier Schikanen angesetzt. Es werden 25 mL LB-Medium mit einem Kryostock des Stamms angeimpft. Die Zellen werden über 10 h bei 37 °C mit 150 rpm inkubiert. Die Vorkultur aus 500 mL SB-Medium in 2 L Schüttelkolben wird mit der Vorvorkultur zu einer optischen Dichte von 0,1 rel. AU angeimpft und weitere 10 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

Die Hauptkultur wird in 1,8 L SB-Medium in einem 2 L Rührkessel-Bioreaktor durchgeführt. Zur Reduktion der Schaumbildung wird Antischaum dem Medium zugegeben. Der pH-Wert der Kultur wird durch Zugabe von 1 M NaOH auf pH 7 statiert. Die Begasung erfolgt mit 1 vvm Druckluft. Die Regelung der Rührergeschwindigkeit erfolgt kaskadierend, sodass ein Sauerstoffpartialdruck von 20 % in der Kultur nicht unterschritten wird.

Der Bioreaktor wird mit Vorkultur zu einer optischen Dichte von 0,1 rel. AU angeimpft. Die Kultur wird bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 1,0 rel. AU inkubiert. Die Proteinexpression wird mit 0,15 mM IPTG induziert und die Inkubation bei 20 °C und 150 rpm weitergeführt. Für weitere Untersuchungen wird aus der Kultur zu spezifischen Zeitintervallen ein normiertes Volumen an Probe entnommen ($V_{Probe} = 2/OD_{600}$). Nach einer Kultivierungsdauer von 24 h wird die Kulturbrühe bei 9000x g und 4 °C 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 15-20 mL 1x PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein vorher ausgewogenes Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min bei 4 °C mit 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet ausgewogen. Für spätere Untersuchungen wird das Zellpellet bei -20 °C aufbewahrt.

7.3.2 Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) HUM_Mev1510 in ZYP-31(mod)-Medium

Es wird eine Vorvorkultur in einem 100 mL Schüttelkolben mit vier Schikanen angesetzt. Es werden 25 mL LB-Medium mit einem Kryostock des Stamms angeimpft. Die Zellen werden über 10 h bei 37 °C mit 150 rpm inkubiert. Die Vorkultur aus 500 mL ZYP-31(mod)-Medium

in 2 L Schüttelkolben wird mit der Vorvorkultur zu einer optischen Dichte von 0,1 rel. AU angeimpft und weitere 10 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

Die Hauptkultur wird in 1,8 L bzw. 8 L ZYP-31(mod)-Medium in einem 2 L bzw. 10 L Rührkesselbioreaktor durchgeführt. Zur Reduktion der Schaumbildung wird Antischaum dem Medium zugegeben. Zur *in situ* Isolierung der Terpenprodukte wird der Kultur 50 g·L⁻¹ Amberlite® XAD4 zugegeben. Der pH-Wert der Kultur wird durch Zugabe von 1 M NaOH auf pH 7,5 statiert. Die Begasung erfolgt mit 1 vvm Druckluft. Die Regelung der Rührergeschwindigkeit erfolgt kaskadierend, sodass ein Sauerstoffpartialdruck von 30 % in der Kultur nicht unterschritten wird.

Der Bioreaktor wird mit Vorkultur zu einer optischen Dichte von 0,1 rel. AU angeimpft. Die Kultur wird bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 1,0 rel. AU inkubiert. Die Proteinexpression wird mit 0,1 mM IPTG induziert und die Inkubation bei 20 °C und 150 rpm weitergeführt. Für weitere Untersuchungen wird aus der Kultur zu spezifischen Zeitintervallen ein normiertes Volumen an Probe entnommen ($V_{Probe} = 2/OD_{600}$). Nach einer Kultivierungsdauer von 24 h wird die Kulturbrühe bei 9000x g und 4 °C 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 15-20 mL 1x PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein vorher ausgewogenes Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min bei 4 °C mit 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet ausgewogen. Für spätere Untersuchungen wird das Zellpellet bei -20 °C aufbewahrt.

7.4 Optische Dichte

Die Messung der Proben erfolgt bei 600 nm im Photometer. Bei optischen Dichten von über 0,8 rel. AU werden die Proben mit einer 0,9 % (w/v) Natriumchlorid-Lösung verdünnt und vermessen.

7.5 Zellaufschluss

Die abzentrifugierte Feuchtzellbiomasse wird in 300 µL des jeweiligen Aufschlusspuffers resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt mittels einer Ultraschallsonde (Amplitude = 70 %, 122

Zyklus = 0,6 s). Der Aufschluss erfolgt zehnmal für 15 s. Zwischen jeder Probenbeschallung wird die Suspension für 15 s auf Eis ruhen gelassen.

7.6 SDS-PAGE

7.6.1 Probenvorbereitung und Durchführung

Das 10-prozentige Trenngel wird zwischen die Glasplatten gegossen. Nach Auspolymerisieren wird das 6-prozentige Sammelgel über das Trenngel gegossen und ein Kamm hineingesteckt.

Die Proben werden im Verhältnis 1:1 mit vorbereitetem Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Proben werden 1 min bei 13.000x g zentrifugiert. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wird der Kamm vorsichtig entfernt und die Proben in die Geltaschen pipettiert (7 µL Probe, 1 µL des Prestained Proteinmarkers, 3 µL des Unstained Proteinmarkers). Das Gel wird in die mit Laufpuffer (1x TGS-Puffer) gefüllte Probenkammer eingesetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 100 V für ca. 2 h. Der Gellauf wird beendet, wenn die blaue Bromphenolblau-Bande aus dem Gel herausgelaufen ist. Das Gel wird anschließend mit kolloidaler Coomassie-Färbung angefärbt.

7.6.2 Kolloidale Coomassie-Färbung

Das Gel wird nach Ende der elektrophoretischen Auftrennung kurz mit demineralisiertem H₂O gespült und 10 min in Fixierlösung gelegt. Die Lösung wird verworfen und die kolloidale Coomassie-Färbelösung anschließend zugegeben. Das Gel wird über Nacht auf einer Schüttelplatte inkubiert. Die Entfärbung erfolgt durch mehrere Waschschrte mit demineralisiertem H₂O bis der Hintergrund des Gels farblos ist.

7.7 Western Blot

Die PVDF-Membran wird auf Größe eines SDS-PAGE-Gels zugeschnitten. Zur Aktivierung wird die Membran 5 min in Methanol gelegt und anschließend 10 min in Transferpuffer equilibriert. Das SDS-PAGE-Gel wird nach dem Gellauf mit Transferpuffer befeuchtet und die PVDF-Membran auf das Gel gelegt. Es wird ein in Transferpuffer getränktes Blotpapier

blasenfrei daraufgelegt und der Stapel auf die Blotkammer gestürzt. Es wird ein weiteres befeuchtetes Blotpapier darübergelegt und anschließend 50 min bei 15 V geblottet. Die Membran wird nach dem Blot in die Blocklösung gelegt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Membran wird auf Raumtemperatur erwärmt, dreimal je 5 min mit Waschpuffer gewaschen und 1 h im Probendiluent mit Anti-His Antikörper (1:1000 Verdünnung) inkubiert. Die Membran wird dreimal je 5 min mit Waschpuffer gewaschen, 1 h im Probendiluent mit Anti-Maus Antikörper (1:5000 Verdünnung) gelagert und im Anschluss erneut dreimal je 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion wird mehrmals 1 mL 3,3,5,5-Tetramethyl-Benziden auf die Membran pipettiert bis sich blaue Banden bilden. Die Färbereaktion wird durch Lagerung in demineralisiertem H₂O gestoppt.

7.8 2D-Gelelektrophorese

7.8.1 Probenvorbereitung und Durchführung

Die IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 3-10 werden vor der Verwendung rehydriert. Dafür werden 1 mL des Rehydrierungspuffers mit 2,8 mg DTT versetzt. Von dem Puffer werden 375 µL mit 25 µL der zu untersuchenden Probe vermischt und 340 µL des Gemisches auf den IPG-Streifen im Reswellingtray gegeben. Die Rehydrierung erfolgt über Nacht.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgt nach einem Gradientenprogramm.

- 500 V für 1 min
- 500-3.500 V für 1,5 h
- 3.500 V für 5,5 h

Der Gelstreifen wird nach Abschluss der Fokussierung mit demineralisiertem H₂O gespült und equilibriert. Dafür werden 5 mL des Equilibrierungspuffers mit 50 mg DTT versetzt und der Gelstreifen für 15 min auf dem Schüttler eingelegt. Es werden weitere 5 mL des Equilibrierungspuffers mit 125 mg Iodacetamid versetzt und der Gelstreifen erneut für 15 min eingelegt.

Für die zweite Dimension wird der equilibrierte Gelstreifen auf ein fertig gegossenes Polyacrylamid-Gel gelegt. Es wird ein Prestained Proteinmarker auf einen kleinen Papierstreifen pipettiert und auf Höhe des IPG-Streifens auf das Gel gelegt. Durch Anlegen einer Spannung diffundieren die Probenproteine in das Gel und werden elektrophoretisch

nach der Größe aufgetrennt. Der Gellauf wird beendet, wenn die Bromphenolblau-Bande die untere Begrenzung des Gels erreicht hat. Es wird eine Silberfärbung durchgeführt.

7.8.2 Silberfärbung

Das Gel wird für 1 h in den Silber-Entfärber/Fixierer gelegt. Nach zweimal Waschen mit demineralisiertem H₂O wird das Gel 2,5 min mit Farmers Reducer behandelt und anschließend je 5 min mit demineralisiertem H₂O gewaschen bis das Gel vollständig entfärbt ist. Das Gel wird 30 min in Silber-Lösung gelegt, zweimal 30 s mit demineralisiertem H₂O und einmal mit 2,5 % (w/v) Na₂CO₃-Lösung gespült. In 100 mL Na₂CO₃-Lösung werden 300 µL Formaldehyd zugegeben und das Gel entwickelt bis braune Banden zu erkennen sind. Die Farbentwicklung wird durch Lagerung in 5-prozentiger Essigsäure gestoppt.

7.9 Densitometrie

Die zu untersuchende Probe und eine BSA-Standardreihe werden wie unter Abschnitt 7.6 beschrieben vorbereitet und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird mit kolloidaler Coomassie-Lösung angefärbt. Die densitometrische Auswertung wird mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ durchgeführt und die relative Farbdichte der Proteinbanden bestimmt. Durch Auftragen der Intensität der BSA-Banden gegen die bekannte Konzentration, wird eine Kalibrationsgerade erhalten, anhand derer die Probenkonzentration bestimmt werden kann.

7.10 Extraktion und Adsorption von Terpenen aus wässriger

Lösung

Die wässrige α -Humulensäurelösung (1 mL) wird mit 40 % (v/v) organischem Lösungsmittel versetzt und 30 s bei 20 °C intensiv vermischt. Die Phasen werden durch Zentrifugation bei 14.800 rpm für 1 min getrennt. Die organische Phase wird abgenommen und für die GC-Analyse eingesetzt.

Der Verteilungskoeffizient K_{ex} wurde mit folgender Gleichung bestimmt:

$$K_{ex} = \frac{c_{ex}}{c_{aq|t_{eq}}}$$

c_{ex} ist die α -Humulenkonzentration in der organischen Phase und $c_{aq|t_{eq}}$ die α -Humulenkonzentration in der wässrigen Phase nach der Gleichgewichtseinstellung.

Die wässrige α -Humulenkonzentration (1 mL) wird mit 50 mg Amberlite® XAD4 versetzt und 30 min bei 20 °C und 400 rpm geschüttelt. Der Adsorber wird abfiltriert und in 1 mL organischem Lösungsmittel resuspendiert. Die Elution der gebundenen Produkte erfolgt durch Behandlung mit Ultraschall für 1 min und anschließendem Schütteln für 4 min bei 400 rpm. Die Elution wird dreimal wiederholt und die vereinigten organischen Phasen mittels GC analysiert.

Der Verteilungskoeffizient K_{ad} wurde mit folgender Gleichung bestimmt:

$$K_{ad} = \frac{c_{ad}}{c_{aq|t_{eq}}}$$

c_{ad} ist die α -Humulenkonzentration, die vom Adsorber eluiert wird, und $c_{aq|t_{eq}}$ die α -Humulenkonzentration in der wässrigen Phase nach der Gleichgewichtseinstellung.

7.11 Gaschromatographie

Die GC/FID wird an einem Shimadzu GC-2010 plus Gaschromatographen durchgeführt. Es wird eine Zerbon ZB-WAXplus Kapillarsäule von Phenomenex mit den Dimensionen 30 m x 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 μ m verwendet. Es werden 2 μ L der zu vermessenden Probe mithilfe eines Autosamplers direkt auf die Säule injiziert (splitless, Splittemperatur 240 °C). Als Trägergas wird Wasserstoff verwendet. Die Starttemperatur der Säule beträgt 40 °C (Haltezeit 20 s), wird mit einer Heizrate von 10 °C/min auf 200 °C (Haltezeit 30 s) und mit einer Heizrate von 30 °C/min auf 230 °C aufgeheizt. Die Endtemperatur wird 2 min gehalten. Als Detektor wird ein Flammenionisationsdetektor (300 °C) verwendet.

Die GC/MS wird an einem Fisons GC 8000 Gaschromatographen gekoppelt an einen Fisons MD 800 Massenspektrometer durchgeführt. Es wird eine Agilent VF-WAXms Kapillarsäule mit den Dimensionen 30 m x 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 μ m verwendet. Die Proben werden mit der Cool-on-Column-Methode direkt auf die Säule injiziert. Als Trägergas wird Helium mit einer Flussrate von 1,2 mL·min⁻¹ verwendet. Die Starttemperatur der Säule

beträgt 40 °C (Haltezeit 3 min) und wird mit einer Heizrate von 3 °C/min auf 230 °C aufgeheizt (Haltezeit 10 min).

Das Quadrupol-Massenspektrometer wird bei einer Temperatur von 150 °C betrieben (Ionenquelle 230 °C). Die Massenspektren werden durch Elektronenionisation bei 70 eV in einem Massenbereich von 33-300 amu aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte über die MassHunter Qualitative Analysis software (Agilent Technologies, USA).

Die Kovats-Indices (I_x) für temperaturprogrammierte Gaschromatographie werden über folgende Gleichung bestimmt:

$$I_x = 100n + \frac{100(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)}$$

t_x ist die Retentionszeit der untersuchten Komponente, n die Anzahl der Kohlenstoffatome des n -Alkans, welches direkt vor der Komponente eluiert, und $n+1$ die Anzahl der Kohlenstoffatome des n -Alkans, welches direkt nach der Komponente eluiert.

7.12 FPLC

7.12.1 Affinitätschromatographie mit IDA-Membranadsorbentien

Das Preloading des Membranadsorbentien wird nach Herstellerangaben (Sartorius Stedim Biotech GmbH 2014) durchgeführt. Der Membranadsorbentien wird an die FPLC-Anlage angeschlossen und die Kühlmaschine angeschaltet und auf 8 °C eingestellt. Die Apparatur wird mit Bindungspuffer gespült bis das Kühlmittel die Temperatur erreicht hat.

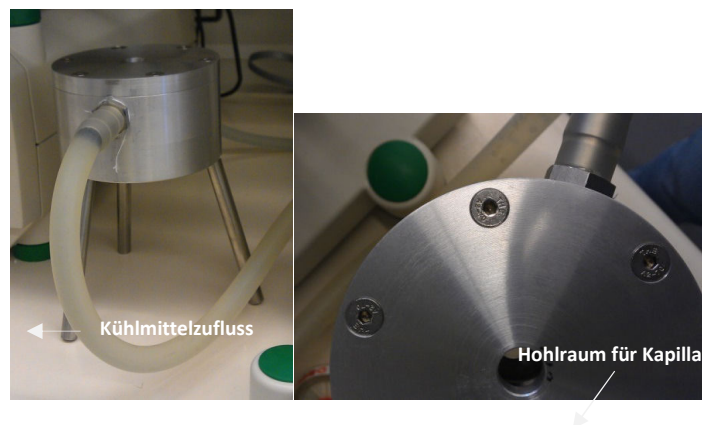


Abbildung 52: Kühlvorrichtung für Membranadsorbentien.

Das aufzureinigende Zellysate wird vorerst sterilfiltriert (0,2 µm) und die Pufferlösung im Ultraschallbad entgast. Nach Anschluss aller Puffer und Durchspülen der Schläuche wird das Programm gestartet (für max. 10 mL Zellysate mit Dichte 100 mg·mL⁻¹).

- Isocratic Flow (Bindungspuffer): 10 min, 1 mL·min⁻¹
- Isocratic Flow (Probe): 65 min, 1 mL·min⁻¹
- Isocratic Flow (Elutionspuffer): 30 min, 1 mL·min⁻¹
- Isocratic Flow (Bindungspuffer): 20 min, 1 mL·min⁻¹

Die eluierten Fraktionen werden vereint und in eine Vivaspin 20 (MWCO 10 kDa) Ultrafiltrationseinheit von Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen überführt. Es wird bis zum Dead-Stop-Volumen mit 4000x g bei 4 °C zentrifugiert. Es wird mit dem Lagerungspuffer auf 20 mL aufgefüllt und mit 4.000 g bei 4 °C erneut bis zum Dead-Stop-Volumen zentrifugiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Das Restvolumen in der Ultrafiltrationseinheit wird in ein 2 mL Gefäß überführt und die Ultrafiltrationseinheit mit Puffer nachgespült. Die aufgereinigte Enzymlösung wird mit Glycerol versetzt (20 % (v/v) Glycerol-Endkonzentration) und in 200 µL Aliquots bei -20 °C gelagert.

7.12.2 Affinitätschromatographie mit NTA-Chromatographiesäule

Für die Aufreinigung des Zielproteins wird eine GE Healthcare HiTrap NTA-IMAC Säule mit 5 mL Säulenvolumen verwendet. Die Beladung, sowie das Entfernen der verschiedenen zweiwertigen Metallionen (Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ und Zn²⁺) werden nach Herstellerangaben durchgeführt. Das aufzureinigende Zellysate wird vorerst sterilfiltriert (0,2 µm) und die Pufferlösung im Ultraschallbad entgast. Nach Anschluss aller Puffer und Durchspülen der Schläuche wird das Programm gestartet (für max. 40 mL Zellysate mit Dichte 140 mg·mL⁻¹).

- Isocratic Flow (Bindungspuffer): 5 min, 3 mL·min⁻¹
- Isocratic Flow (Probe): 20 min, 2,5 mL·min⁻¹
- Isocratic Flow (Bindungspuffer): 15 min, 2,5 mL·min⁻¹
- (Gradient Flow (Elutionspuffer 0-100%): 20 min, 2,5 mL·min⁻¹)^A
- (Isocratic Flow (90 % Bindungspuffer/10 % Elutionspuffer): 5 min, 2,5 mL·min⁻¹)^B
- Isocratic Flow (Elutionspuffer): 10 min, 3 mL·min⁻¹
- Isocratic Flow (Bindungspuffer): 15 min, 3 mL·min⁻¹
- (Isocratic Flow (Wasser und Ethanol 20 %): je 6 min, 3 mL·min⁻¹)^C

^A= Gradientenelution; ^B= Voreluat (10 % Stufe); ^C= für die Lagerung der Säule

Der Durchfluss und die eluierten Proben werden in Fraktionen von je 2 mL mithilfe eines Probensammlers aufgefangen. Die eluierten Fraktionen werden vereint und in eine Vivaspin 20 (MWCO 10 kDa) Ultrafiltrationseinheit von Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen überführt. Es wird bis zum Dead-Stop-Volumen mit 4000x g bei 4 °C zentrifugiert. Es wird mit dem Lagerungspuffer auf 20 mL aufgefüllt und mit 4000 g bei 4 °C erneut bis zum Dead-Stop-Volumen zentrifugiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Das Restvolumen in der Ultrafiltrationseinheit wird in ein 2 mL Gefäß überführt und die Ultrafiltrationseinheit mit Puffer nachgespült. Die aufgereinigte Enzymlösung wird mit 20 % (v/v) Glycerol versetzt und in 200 µL Aliquots bei -20 °C gelagert.

7.12.3 Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Chromatographiesäule

Für die Aufreinigung des Zielproteins wird eine GE Healthcare HiPrep DEAE FF 16/10 FF Säule mit 20 mL Säulenvolumen verwendet. Das aufzureinigende Zellysate wird vorerst sterilfiltriert (0,2 µm) und die Pufferlösung im Ultraschallbad entgast. Nach Anschluss aller Puffer und Durchspülen der Schläuche wird das Programm gestartet (für max. 20 mL Zellysate mit Dichte 140 mg·mL⁻¹).

- Isocratic Flow (demineralisiertes H₂O): 5 min, 4 mL·min⁻¹
- Isocratic Flow (Startpuffer): 30 min, 4 mL·min⁻¹
- Isocratic Flow (Probe): 7,5 min, 4 mL·min⁻¹
- Isocratic Flow (Startpuffer): 35 min, 4 mL·min⁻¹
- Gradient Flow (0-100 % Elutionspuffer): 50 min, 4 mL·min⁻¹
- Isocratic Flow (Elutionspuffer): 25 min, 4 mL·min⁻¹

Der Durchfluss und die eluierten Proben werden in Fraktionen von je 2 mL mithilfe eines Probensammlers aufgefangen. Die eluierten Fraktionen werden vereint und in eine Vivaspin 20 (MWCO 10 kDa) Ultrafiltrationseinheit von Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen überführt. Es wird bis zum Dead-Stop-Volumen mit 4000x g bei 4 °C zentrifugiert. Es wird mit dem Lagerungspuffer auf 20 mL aufgefüllt und mit 4000 g bei 4 °C erneut bis zum Dead-Stop-Volumen zentrifugiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Das Restvolumen in der Ultrafiltrationseinheit wird in ein 2 mL Gefäß überführt und die Ultrafiltrationseinheit mit Puffer nachgespült. Die aufgereinigte Enzymlösung wird mit 20 % (v/v) Glycerol versetzt und in 200 µL Aliquots bei -20 °C gelagert.

7.13 Bradford-Assay

In eine 96-well Mikrotiterplatte werden dreimal je 10 μL der Proben und des Standards pipettiert und 300 μL des Bradford-Reagenz zugegeben. Die Platte wird 30 s geschüttelt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 595 nm gemessen.

7.14 Umsetzungsversuche

In einem Reaktionsgefäß wird das Substrat in Aktivitätspuffer vorgelegt. Nach Zugabe des Enzyms wird die Reaktionslösung mit organischem Lösungsmittel überschichtet und bei 38 °C statisch inkubiert. Durch Schütteln und anschließender Zentrifugation (20.000x g, 1 min) wird die organische Phase mit einer Pipette abgetrennt. Die organische Phase wird im Gaschromatographen analysiert.

7.15 Malachitgrün-Phosphomolybdat-Assay

In eine 96-well Platte werden dreimal je 100 μL der Substratlösungen und der Phosphat-Standardlösungen pipettiert. Nach Zugabe des Enzyms wird die Platte bei 38 °C für 2 min inkubiert. Anschließend wird 25 μL Entwicklungslösung zugegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wird bei 625 nm am Spektrophotometer vermessen.

7.16 Übergangsmetall-katalysierte Oxidation von α -Humulen

Zu einer α -Humulen-Lösung (4,45 μg , 21,78 μmol) in 132 μL Acetonitril werden der Katalysator (0,006-0,01 Äq., 0,13-0,22 μmol) und TBHP (1-10 Äq., 21,78-217,75 μmol) zugegeben und unter Rühren 24 h bei vorgegebener Temperatur erhitzt. Während der Reaktionszeit werden regelmäßig 1 μL Proben entnommen, in 999 μL Acetonitril verdünnt und am GC/FID bzw. GC/MS vermessen.

7.17 MnCl₂-katalysierte Oxidation von α -Humulen

Zu einer α -Humulen-Lösung (44,50 μ g, 217,75 μ mol) in 1320 μ L Acetonitril werden MnCl₂ (0,0073 Äq., 1,59 μ mol) und TBHP (4,64 Äq., 1010,37 μ mol) zugegeben und unter Rühren 24 h bei 60,7 °C erhitzt. Während der Reaktionszeit werden regelmäßig 1 μ L Proben entnommen, in 999 μ L Acetonitril verdünnt und am GC/FID vermessen.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 % (w/v) Natriumsulfit-Lösung gestoppt und mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Reaktionsprodukte werden über präparative Dünnschichtchromatographie mit *n*-Hexan/Ethylacetat als Laufmittel im Verhältnis 6:1 aufgetrennt. Der UV-aktive Zerumbon-Spot wird unter UV-Licht mit 254 nm markiert. Die markierte Silikaschicht wird abgekratzt, mit Ethylacetat extrahiert, abfiltriert und das Filtrat mittels GC/MS untersucht.

8 ZUSÄTZLICHE EXPERIMENTELLE DATEN

8.1 Affinitätschromatographische Isolierung der α -Humulensynthase mit Membranadsorbern

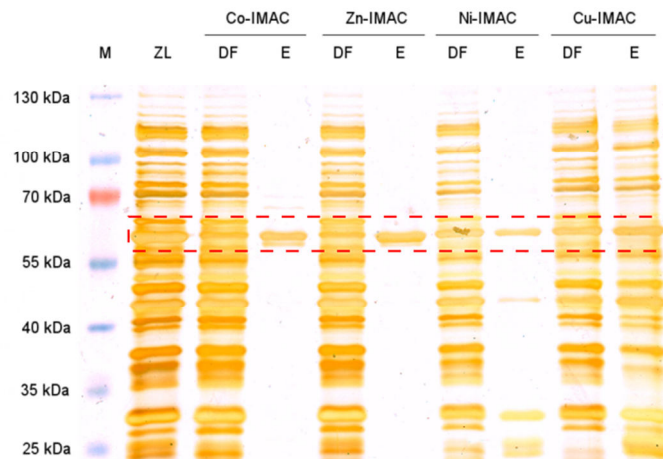


Abbildung 53: Chromatographische Aufreinigung der HUM in Abhängigkeit von der immobilisierten Metallspezies.

Analyse der Isolierung der rekombinanten HUM durch SDS-PAGE (10 %) und anschließender Silberfärbung. Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und die HUM aus der löslichen Zellfraktion chromatographisch über einen Sartobind® IDA75 Membranadsorber aufgereinigt. M = Proteinmarker, ZL = Zelldysat mit 140 mg Biomasse/mL Bindungspuffer, DF = Durchfluss mit Proteinen, die nicht an die Säule gebunden haben, E = Eluat mit Proteinen, die an die Säule gebunden haben. Alle Proben wurden unverdünnt aufgetragen. Die Laufhöhe der HUM ist rot-gestrichelt umrandet.

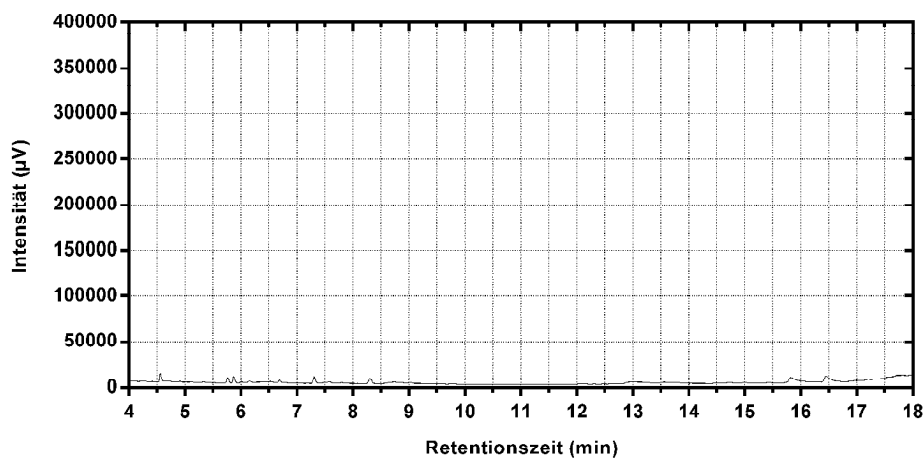


Abbildung 54: Enzymatische Umsetzung von (2E,2E)-FPP durch die rekombinante HUM.

GC/FID-Chromatogramm der Produkte. HUM wurde über Zn^{2+} -IDA-IMAC aufgereinigt. Die Produkte wurden durch Extraktion mit Isooktan aus dem wässrigen Reaktionsgemisch isoliert und per GC/FID analysiert.

8.2 Affinitätschromatographische Isolierung der α -Humulensynthase mit NTA-Chromatographiesäule

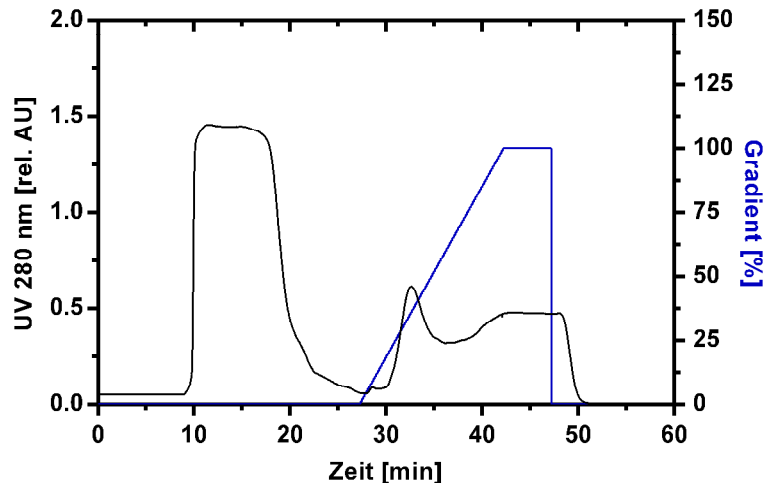


Abbildung 55: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels Co^{2+} -NTA-IMAC mit Gradientenelution.

8.3 Ionenaustauschchromatographische Isolierung der α -Humulensynthase mit DEAE-Chromatographiesäule

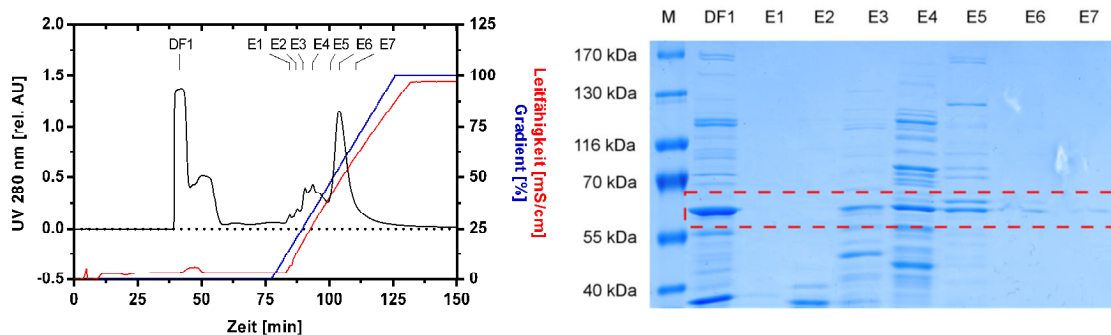


Abbildung 56: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels DEAE-IEX bei pH 6,5.

(Links) Chromatogramm der Aufreinigung. (Rechts) Analyse der Isolierung der rekombinanten HUM durch SDS-PAGE (10 %) und anschließender Coomassie-Färbung. Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und die HUM chromatographisch über eine GE Healthcare HiPrep DEAE FF 16/10 Säule aufgereinigt. M = Proteinmarker, DF = Durchfluss mit Proteinen, die nicht an die Säule gebunden haben, E = Eluat mit Proteinen, die an die Säule gebunden haben. Alle Proben wurden unverdünnt aufgetragen. Die Laufhöhe der HUM ist rot-gestrichelt umrandet.

8 ZUSÄTZLICHE EXPERIMENTELLE DATEN

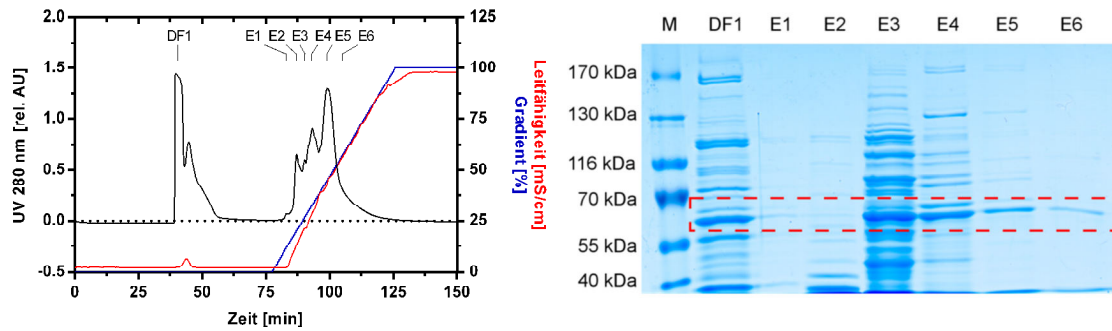


Abbildung 57: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels DEAE-IEX bei pH 7,0.

(Links) Chromatogramm der Aufreinigung. (Rechts) Analyse der Isolierung der rekombinanten HUM durch SDS-PAGE (10 %) und anschließender Coomassie-Färbung. Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und die HUM chromatographisch über eine GE Healthcare HiPrep DEAE FF 16/10 Säule aufgereinigt. M = Proteinmarker, DF = Durchfluss mit Proteinen, die nicht an die Säule gebunden haben, E = Eluat mit Proteinen, die an die Säule gebunden haben. Alle Proben wurden unverdünnt aufgetragen. Die Laufhöhe der HUM ist rot-gestrichelt umrandet.

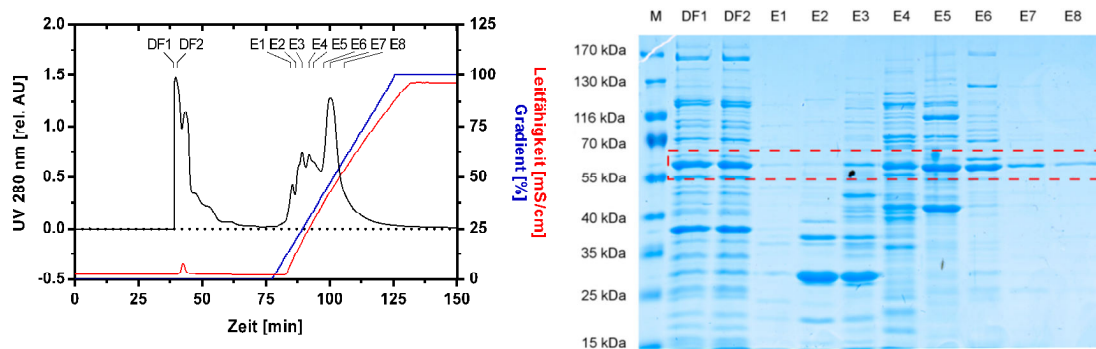


Abbildung 58: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels DEAE-IEX bei pH 7,5.

(Links) Chromatogramm der Aufreinigung. (Rechts) Analyse der Isolierung der rekombinanten HUM durch SDS-PAGE (10 %) und anschließender Coomassie-Färbung. Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und die HUM chromatographisch über eine GE Healthcare HiPrep DEAE FF 16/10 Säule aufgereinigt. M = Proteinmarker, DF = Durchfluss mit Proteinen, die nicht an die Säule gebunden haben, E = Eluat mit Proteinen, die an die Säule gebunden haben. Alle Proben wurden unverdünnt aufgetragen. Die Laufhöhe der HUM ist rot-gestrichelt umrandet.

8 ZUSÄTZLICHE EXPERIMENTELLE DATEN

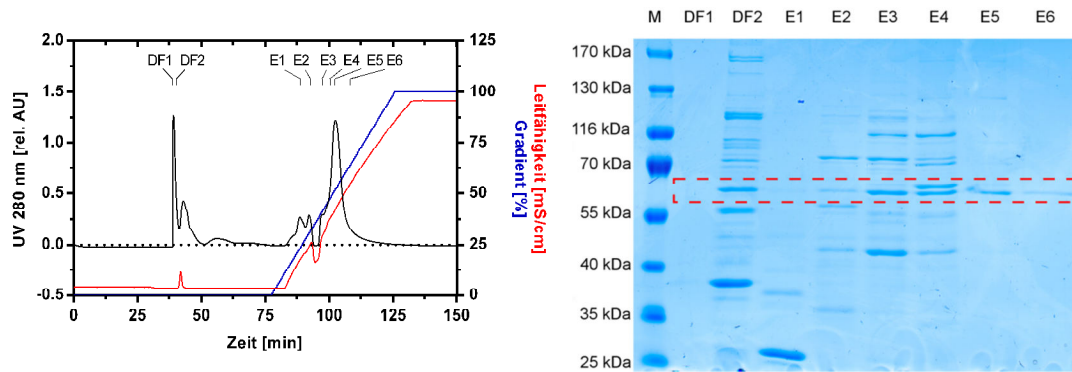


Abbildung 59: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels DEAE-IEX bei pH 8,0.

(Links) Chromatogramm der Aufreinigung. (Rechts) Analyse der Isolierung der rekombinanten HUM durch SDS-PAGE (10 %) und anschließender Coomassie-Färbung. Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und die HUM chromatographisch über eine GE Healthcare HiPrep DEAE FF 16/10 Säule aufgereinigt. M = Proteinmarker, DF = Durchfluss mit Proteinen, die nicht an die Säule gebunden haben, E = Eluat mit Proteinen, die an die Säule gebunden haben. Alle Proben wurden unverdünnt aufgetragen. Die Laufhöhe der HUM ist rot-gestrichelt umrandet.

8.4 Umsetzungsversuche mit der α -Humulensynthase

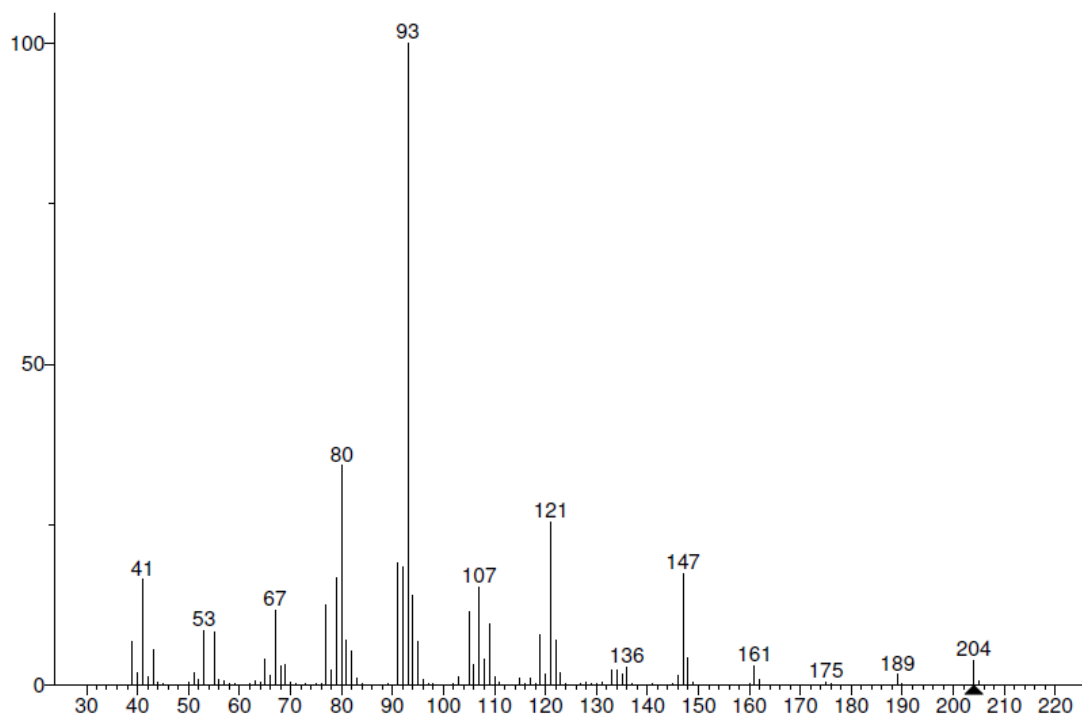


Abbildung 60: MS-Spektrum von α -Humulonen.

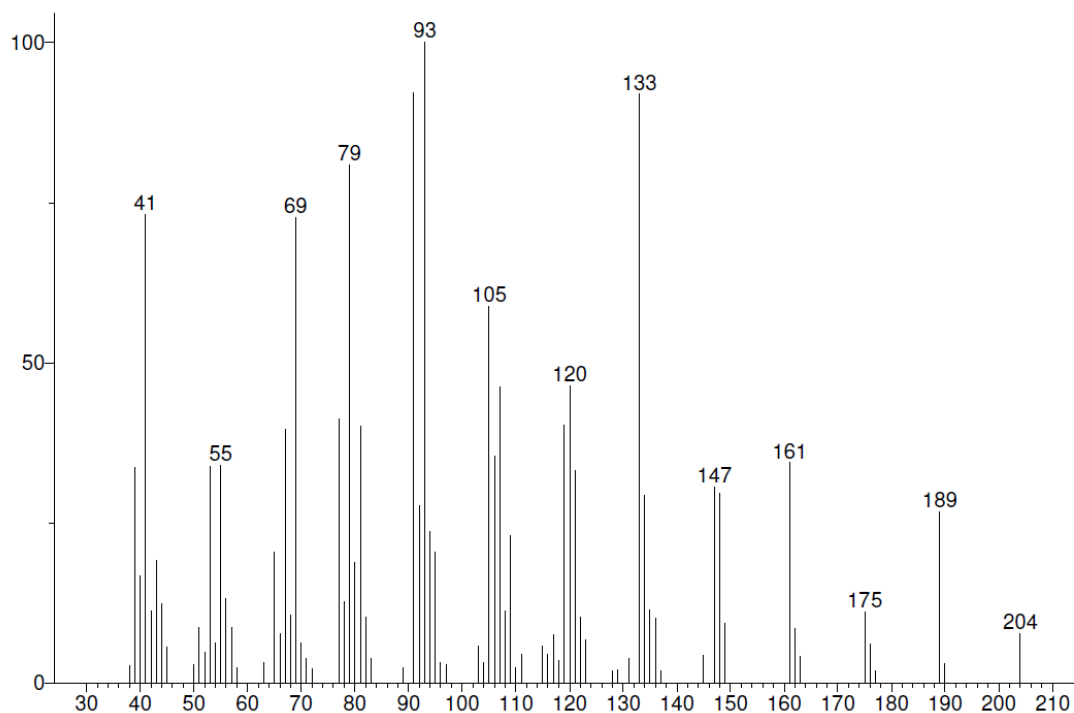


Abbildung 61: MS-Spektrum von β -Caryophyllen.

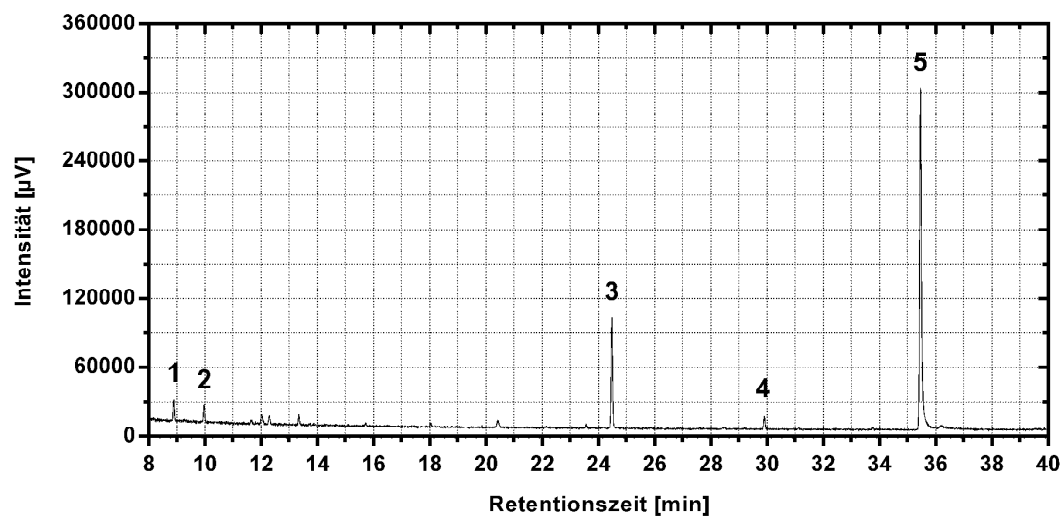


Abbildung 62: Enzymatische Umsetzung von $(2E)$ -GPP durch die rekombinante HUM.

GC/FID-Chromatogramm der Produkte. β -Myrcen (1), Limonen (2), Linalool (3), α -Terpineol (4) und $(2E)$ -Geraniol (5). Die Produkte wurden durch Extraktion mit Isooktan aus dem wässrigen Reaktionsgemisch isoliert und per GC/FID analysiert. Produkte wurden per GC/MS identifiziert.

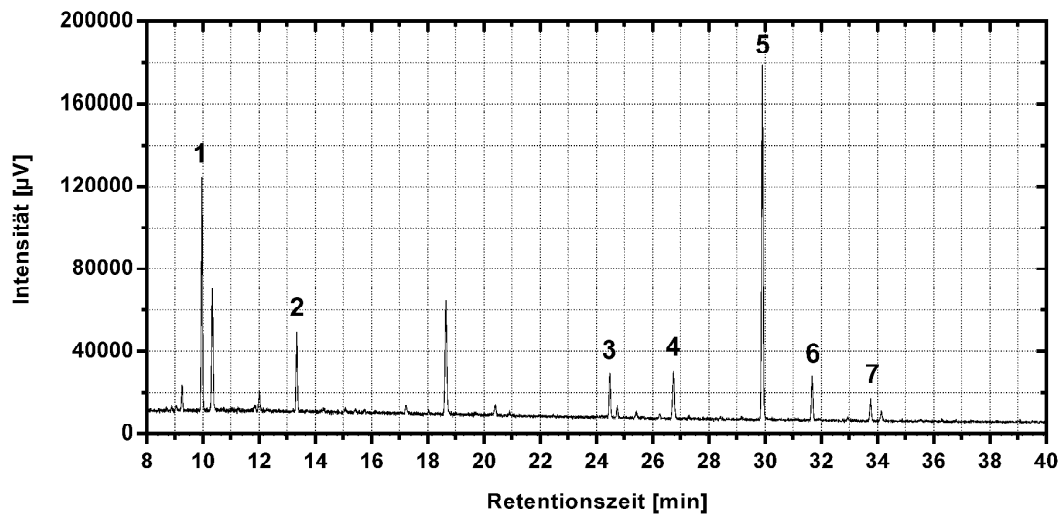


Abbildung 63: Enzymatische Umsetzung von (2Z)-NPP durch die rekombinante HUM.
GC/FID-Chromatogramm der Produkte. Limonen (1), α -Terpinolen (2), Linalool (3), *p*-Menth-2-en-1-ol (4), α -Terpineol (5), Piperitol (6) und (2Z)-Nerol (7). Die Produkte wurden durch Extraktion mit Isooktan aus dem wässrigen Reaktionsgemisch isoliert und per GC/FID analysiert. Produkte wurden per GC/MS identifiziert.

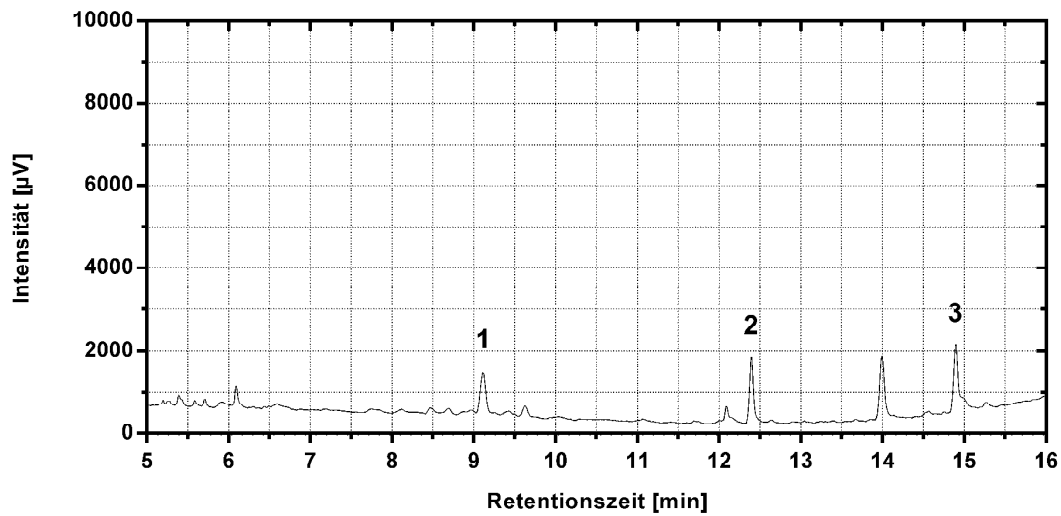


Abbildung 64: Enzymatische Umsetzung von (2E,6Z)-FPP durch die rekombinante HUM.
GC/FID-Chromatogramm der Produkte. α -Gurjunen (1), Epiglobulol (2) und (2E,6Z)-Farnesol (3). Die Produkte wurden durch Extraktion mit Isooktan aus dem wässrigen Reaktionsgemisch isoliert und per GC/FID analysiert. Produkte wurden per GC/MS identifiziert.

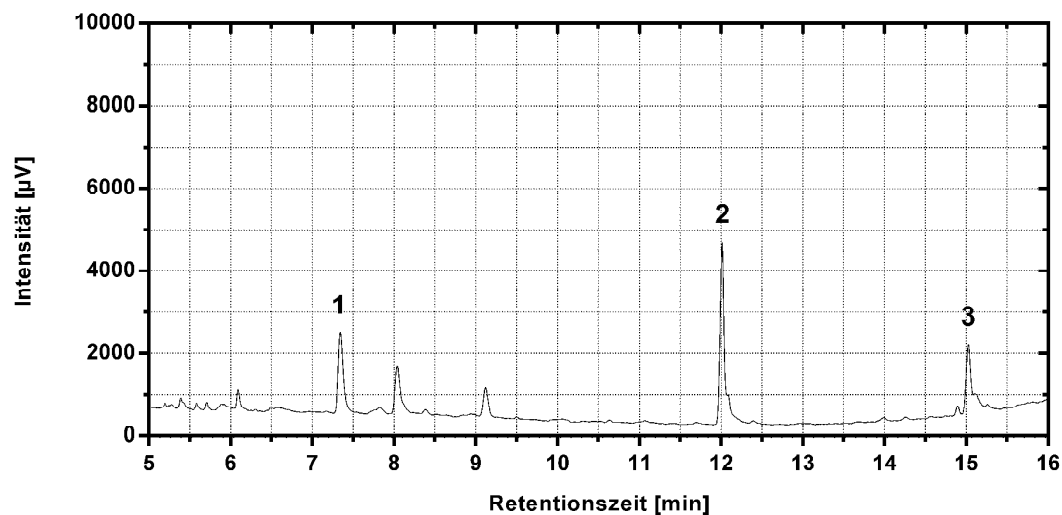


Abbildung 65: Enzymatische Umsetzung von (2Z,6E)-FPP durch die rekombinante HUM.
GC/FID-Chromatogramm der Produkte. α -Ylangen (1), Germacren-4-ol (2) und (2Z,6E)-Farnesol (3). Die Produkte wurden durch Extraktion mit Isooktan aus dem wässrigen Reaktionsgemisch isoliert und per GC/FID analysiert. Produkte wurden per GC/MS identifiziert.

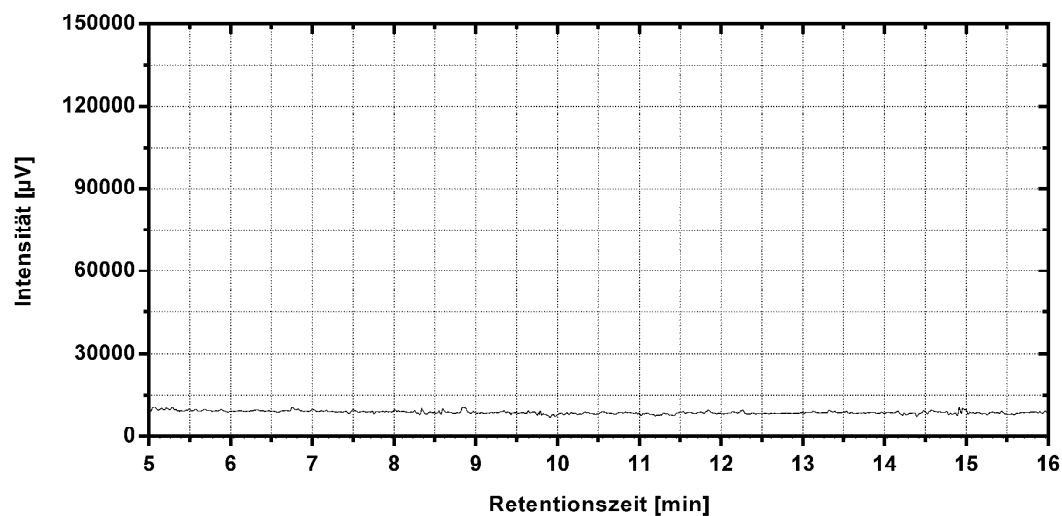


Abbildung 66: Enzymatische Umsetzung des (2E,6E)-FPP-Etherderivats 1 durch die rekombinante HUM.

GC/FID-Chromatogramm der Produkte. Die Produkte wurden durch Extraktion mit Isooktan aus dem wässrigen Reaktionsgemisch isoliert und per GC/FID analysiert. Produkte wurden per GC/MS identifiziert.

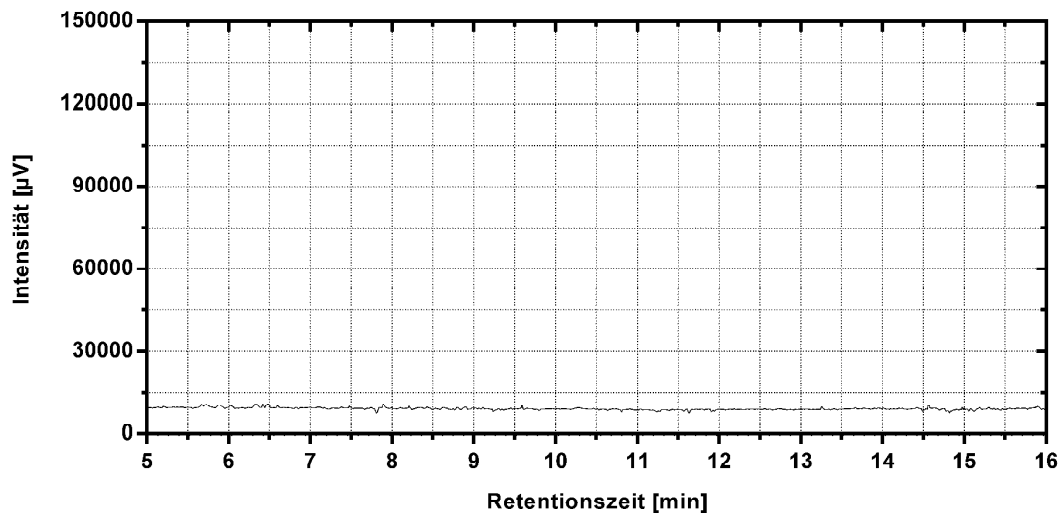


Abbildung 67: Enzymatische Umsetzung des (2*E*,6*E*)-FPP-Etherderivats 2 durch die rekombinante HUM.

GC/FID-Chromatogramm der Produkte. Die Produkte wurden durch Extraktion mit Isooktan aus dem wässrigen Reaktionsgemisch isoliert und per GC/FID analysiert. Produkte wurden per GC/MS identifiziert.

8.5 Heterologe Produktion von α -Humulen in *Escherichia coli*

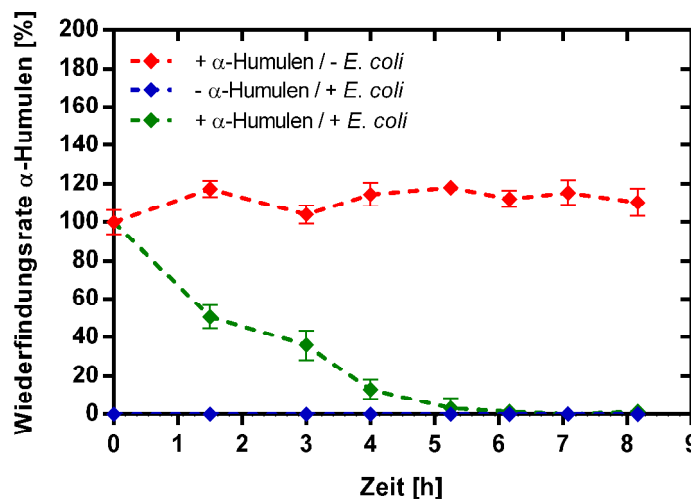


Abbildung 68: Isolierung von α -Humulen aus *E. coli*- und zellfreien Kulturen mithilfe Extraktion.

Experimentelle Wiederfindungsraten für α -Humulen. Eine definierte α -Humulen-Konzentration wurde dem Kulturmedium zugegeben und nach bestimmten Zeitintervallen Kulturproben mit Isooktan extrahiert und per GC/FID analysiert. *E. coli* Kulturen wurden nicht mit IPTG induziert.

8.6 Box-Behnken-Design zur Oxidation von α -Humulen

Tabelle 79: Versuchsplan nach Box-Behnken.

DlaufR	T [°C]	c _{TBHP} [Äq.]	c _{Katalysator} [Äq.]	Y _{experimentell} [%]	Y _{Modell} [%]
1	60	5,5	0,006	23,8725	17,6742
2	50	10,0	0,006	5,1844	7,5627
3	70	1,0	0,006	37,0904	36,0869
4	50	1,0	0,006	1,6169	3,4829
5	60	5,5	0,006	26,7921	18,9259
6	60	10,0	0,002	2,2089	6,4071
7	70	5,5	0,002	35,2319	36,0869
8	50	5,5	0,002	16,6890	20,7350
9	50	5,5	0,010	13,5654	11,8976
10	70	10,0	0,006	6,6809	4,3026
11	70	5,5	0,010	16,9310	13,1110
12	60	1,0	0,010	35,9384	36,0869
13	60	1,0	0,002	4,2228	5,8905
14	60	5,5	0,006	28,0011	31,8211
15	60	10,0	0,010	9,3311	5,2850

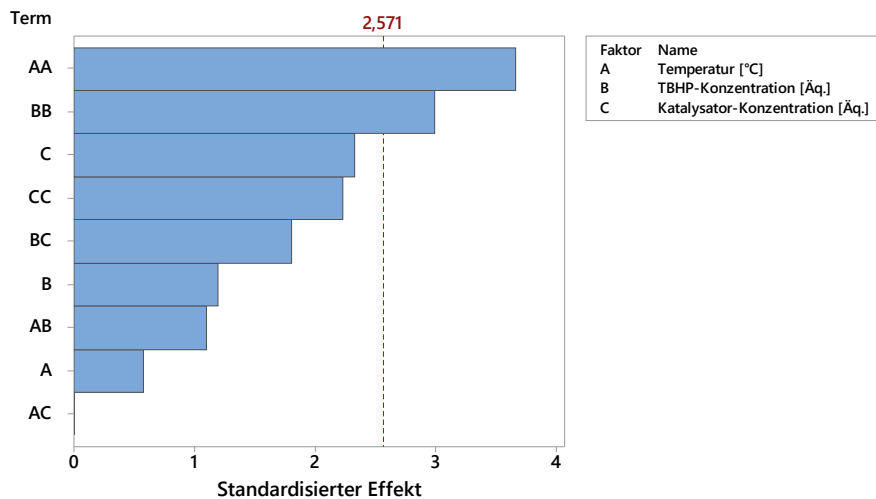
Abbildung 69: Pareto-Diagramm der standardisierten Effekte mit $\alpha = 0,05$.

Tabelle 80: Varianzanalyse für den Wirkungsflächenversuchsplan.

Quelle	DF	Kor SS	Kor MS	F-Wert	p-Wert
Modell	9	4903,57	544,84	3,97	0,072
Linear	3	989,42	329,81	2,40	0,184
T	1	46,67	46,67	0,34	0,585
TBHP	1	196,98	196,98	1,43	0,285
Kat.	1	745,77	745,77	5,43	0,067
Quadratisch	3	3297,40	1099,13	8,01	0,024
T x T	1	1852,79	1852,79	13,50	0,014
TBHP x TBHP	1	1230,15	1230,15	8,96	0,030
Kat. x Kat.	1	686,23	686,23	5,00	0,076
2-Faktor-WW	3	616,75	205,85	1,50	0,323
T x TBHP	1	167,05	167,05	1,22	0,320
T x Kat.	1	0,00	0,00	0,00	0,997
TBHP x Kat.	1	449,70	449,70	3,28	0,130
Fehler	5	686,40	137,28		
Fehlende Anpassung	3	682,10	227,37	105,82	0,0009
Reiner Fehler	2	4,30	2,15		
Gesamt	14	5589,97			

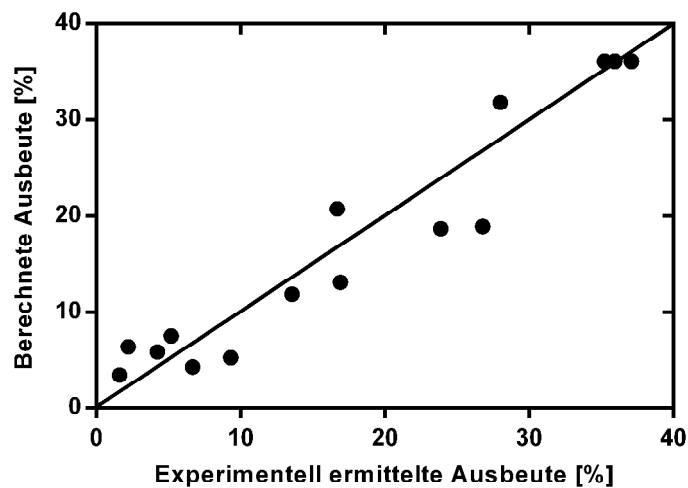


Abbildung 70: Auftragung der berechneten Ausbeute gegen die experimentell bestimmte Ausbeute.

Ausbeute an Zerumbon wurde nach einem Box-Behnken-Versuchsplan experimentell für verschiedene Faktorkonstellationen ermittelt. Theoretische Ausbeute wurde anhand des erstellten Modells in Minitab bestimmt.

8.7 Oxidation von Humulen mit verschiedenen Katalysatoren

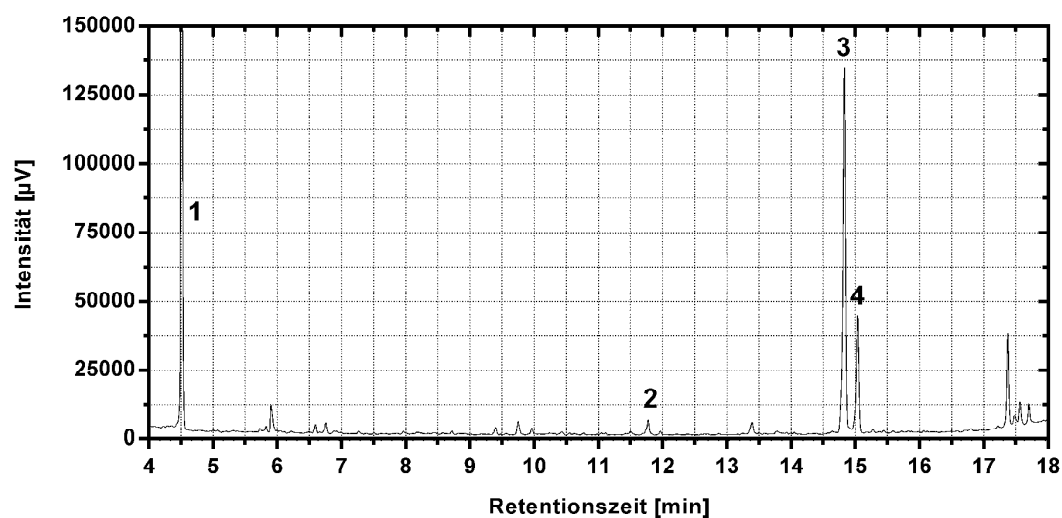


Abbildung 71: CuI-katalysierte Oxidation von α -Humulenen.

GC/FID-Chromatogramm der gebildeten Produkte. TBHP (1), Humulen-6,7-epoxid (2), Zerumbon (3) und Viridiflorol (4) wurden durch GC/MS-Analyse identifiziert.

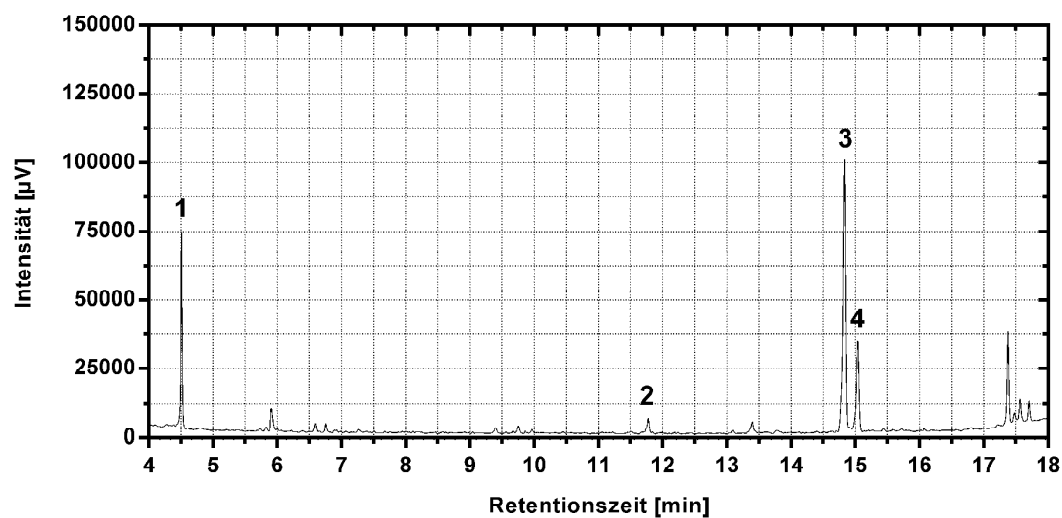


Abbildung 72: CuCl₂-katalysierte Oxidation von α -Humulenen.

GC/FID-Chromatogramm der gebildeten Produkte. TBHP (1), Humulen-6,7-epoxid (2), Zerumbon (3) und Viridiflorol (4) wurden durch GC/MS-Analyse identifiziert.

8 ZUSÄTZLICHE EXPERIMENTELLE DATEN

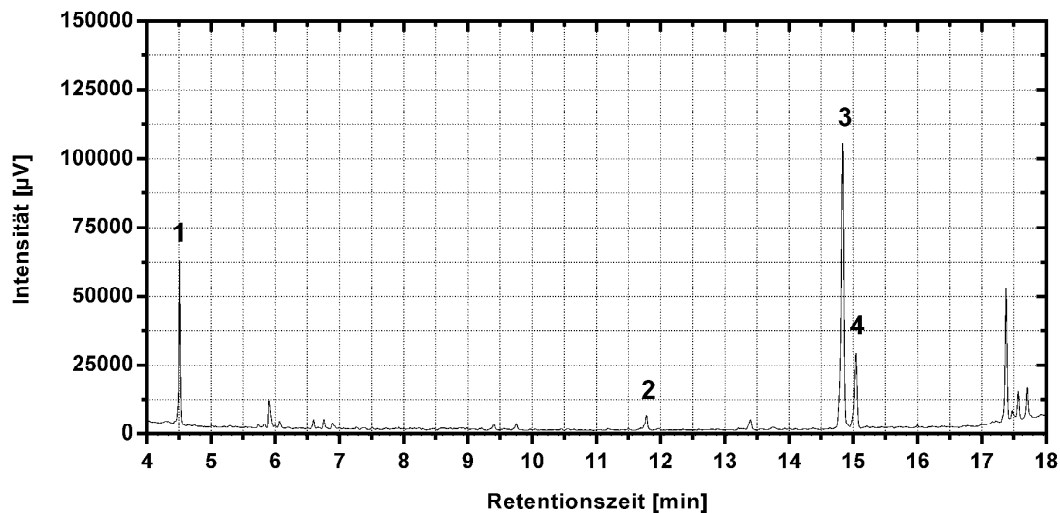


Abbildung 73: CoCl_2 -katalysierte Oxidation von α -Humulen.

GC/FID-Chromatogramm der gebildeten Produkte. TBHP (1), Humulen-6,7-epoxid (2), Zerumbon (3) und Viridiflorol (4) wurden durch GC/MS-Analyse identifiziert.

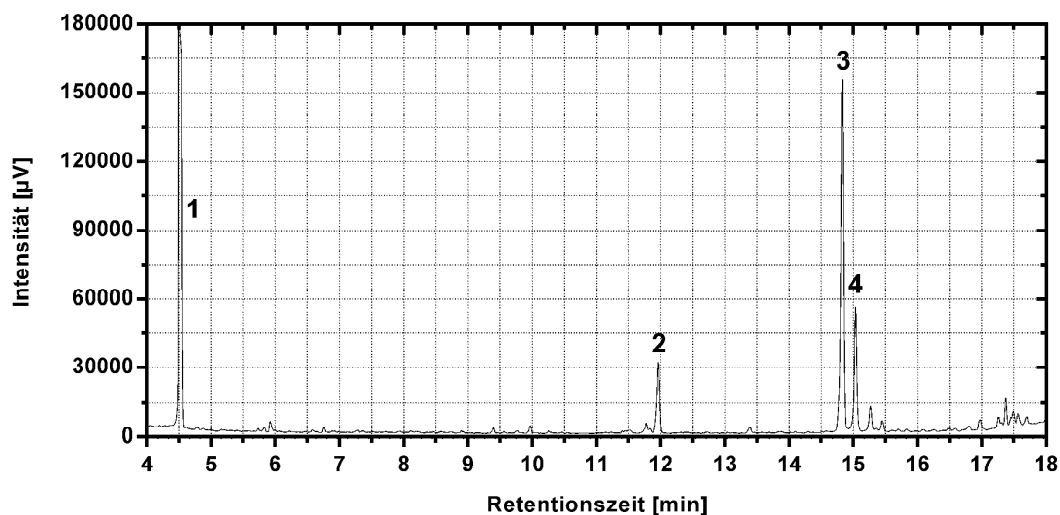


Abbildung 74: FeCl_3 -katalysierte Oxidation von α -Humulen.

GC/FID-Chromatogramm der gebildeten Produkte. TBHP (1), Humulen-6,7-epoxid (2), Zerumbon (3) und Viridiflorol (4) wurden durch GC/MS-Analyse identifiziert.

8 ZUSÄTZLICHE EXPERIMENTELLE DATEN

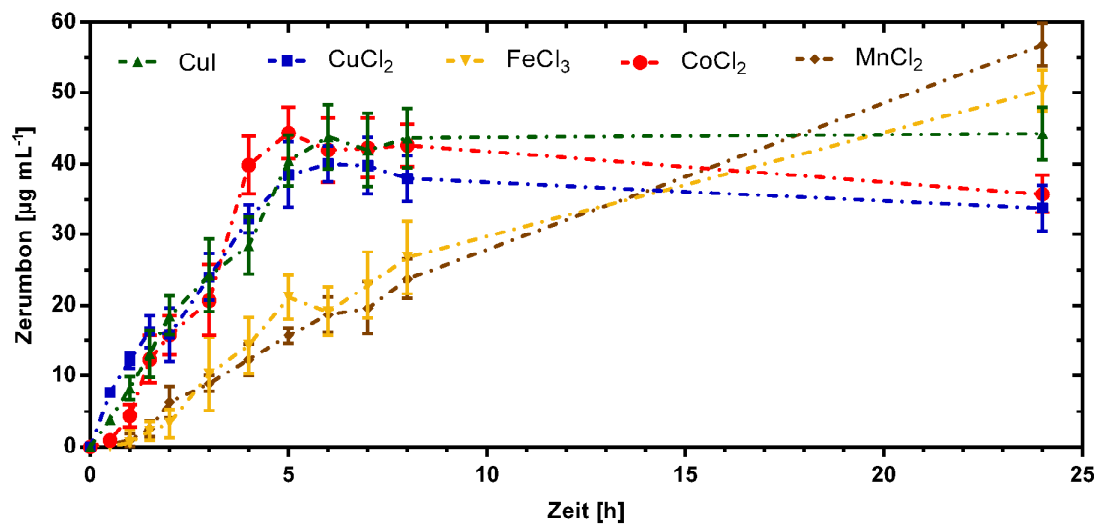


Abbildung 75: Katalysatorscreening zur Übergangsmetall-katalysierten Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon.

Zerumbonproduktion über 24 h Reaktionszeit. Proben wurden direkt aus der Reaktionslösung entnommen und per GC/FID quantifiziert.

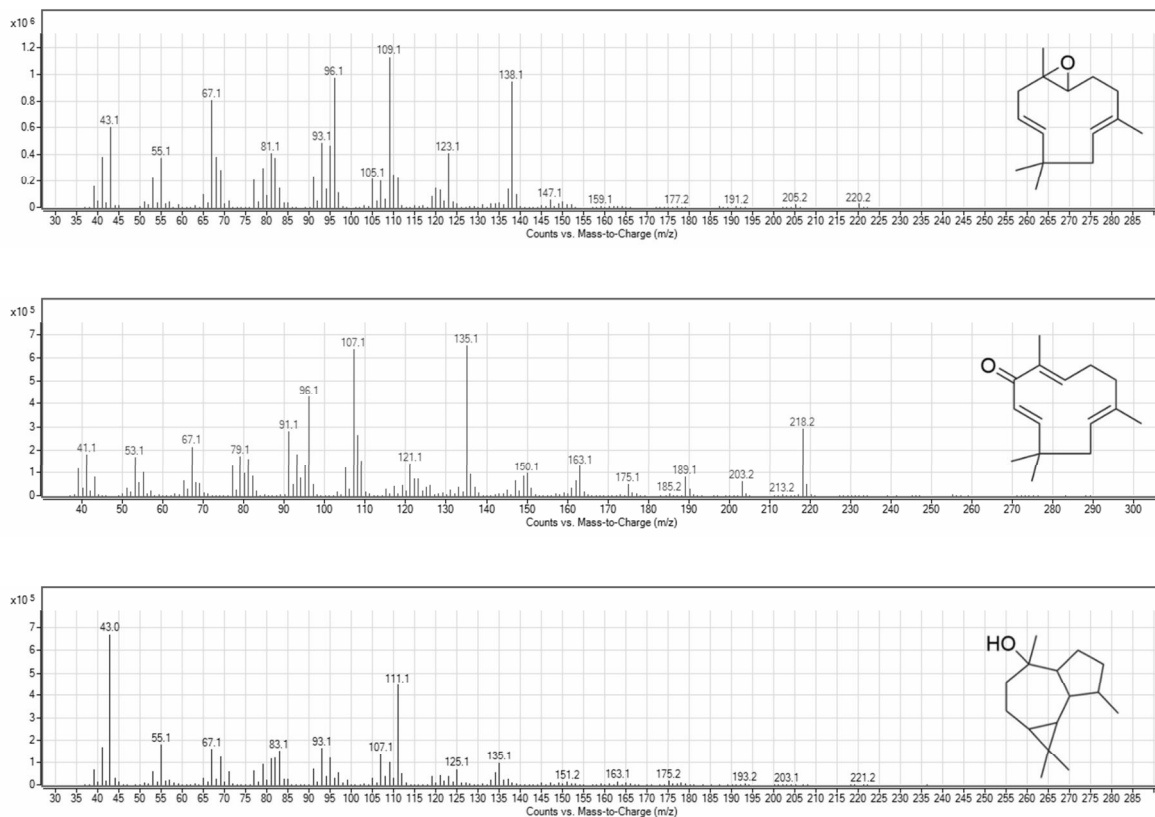


Abbildung 76: MS-Spektren von Humulen-6,7-epoxid (oben), Zerumbon (Mitte) und Viridiflorol (unten).

LITERATURVERZEICHNIS

- Agger, Sean A.; Lopez-Gallego, Fernando; Hoye, Thomas R.; Schmidt-Dannert, Claudia (2008): Identification of sesquiterpene synthases from *Nostoc punctiforme* PCC 73102 and *Nostoc* sp. strain PCC 7120. In: *Journal of bacteriology* 190 (18), S. 6084–6096. DOI: 10.1128/JB.00759-08.
- Aihuhua (2013). Online verfügbar unter <http://www.aihuhua.com/tupian/tupianbba.html>.
- Alemdar, Semra (2013): Expression, Aufreinigung und Einsatz rekombinanter Patchoulolsynthase in der Terpensynthese. Masterarbeit. Leibniz Universität Hannover, Hannover. Institut für Technische Chemie.
- Allal, Badia Ait; El Firdoussi, Larbi; Allaoud, Smail; Karim, Abdallah; Castanet, Yves; Mortreux, André (2003): Catalytic oxidation of α -pinene by transition metal using t-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide. In: *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 200 (1-2), S. 177–184. DOI: 10.1016/S1381-1169(03)00038-4.
- Alwi, S. S.; Nallappan, M.; Pihie, A. H. L. (2007): Zerumbone exerts antiproliferative activity via apoptosis on HepG2 cells. In: *Malaysian Journal. of Biochemistry and Molecular Biology* (15).
- Anchordoquy, T. J.; Carpenter, J. F. (1996): Polymers protect lactate dehydrogenase during freeze-drying by inhibiting dissociation in the frozen state. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 332 (2), S. 231–238. DOI: 10.1006/abbi.1996.0337.
- Ang, Wei Jie; Lam, Yulin (2015): Allylic and benzylic sp³ C-H oxidation in water. In: *Organic & biomolecular chemistry* 13 (4), S. 1048–1052. DOI: 10.1039/c4ob02017k.
- Arimura, Gen-ichiro; Ozawa, Rika; Nishioka, Takaaki; Boland, Wilhelm; Koch, Thomas; Kühnemann, Frank; Takabayashi, Junji (2002): Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 29 (1), S. 87–98.
- Armstrong, J. S.; Steinauer, K. K.; Hornung, B.; Irish, J. M.; Lecane, P.; Birrell, G. W. et al. (2002): Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. In: *Cell death and differentiation* 9 (3), S. 252–263. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400959.

Asada, Masanori; Shuler, Michael L. (1989): Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*. Effects of adsorption in situ, elicitors and alginate immobilization. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 30 (5). DOI: 10.1007/BF00263851.

Bach, Thomas J.; Rohmer, Michel (Hg.) (2013): Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms. New Concepts and Experimental Approaches. New York, NY: Springer.

Bar-Even, Arren; Noor, Elad; Savir, Yonatan; Liebermeister, Wolfram; Davidi, Dan; Tawfik, Dan S.; Milo, Ron (2011): The moderately efficient enzyme: evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters. In: *Biochemistry* 50 (21), S. 4402–4410. DOI: 10.1021/bi2002289.

Bennett, J. (1983): Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll a / b protein. In: *Biochem. J.* 212 (1), S. 1–13. DOI: 10.1042/bj2120001.

Bergner, Eike Johannes; Ebel, Klaus; Johann, Thorsten; Löber, Oliver (2010): Method for the production of menthol. Angemeldet durch BASF SE. Anmeldenr: 11/720279. Veröffentlichungsnr: US Patent 7709688.

Bohlmann, J.; Meyer-Gauen, G.; Croteau, R. (1998): Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (8), S. 4126–4133.

Bonomo, Jeanne; Gill, Ryan T. (2005): Amino acid content of recombinant proteins influences the metabolic burden response. In: *Biotechnology and bioengineering* 90 (1), S. 116–126. DOI: 10.1002/bit.20436.

Breitmaier, E. (2006): Terpenes. Flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. Weinheim, Germany: WILEY-VCH. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10301562>.

Cabioglu, Neslihan; Sahin, Aysegul; Doucet, Michele; Yavuz, Ekrem; Igci, Abdullah; O Yildirim, Engin et al. (2005): Chemokine receptor CXCR4 expression in breast cancer as a potential predictive marker of isolated tumor cells in bone marrow. In: *Clinical & experimental metastasis* 22 (1), S. 39–46. DOI: 10.1007/s10585-005-3222-y.

Candiano, Giovanni; Bruschi, Maurizio; Musante, Luca; Santucci, Laura; Ghiggeri, Gian Marco; Carnemolla, Barbara et al. (2004): Blue silver. A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. In: *Electrophoresis* 25 (9), S. 1327–1333. DOI: 10.1002/elps.200305844.

- Cestari, Igor; Stuart, Kenneth (2013): A spectrophotometric assay for quantitative measurement of aminoacyl-tRNA synthetase activity. In: *Journal of biomolecular screening* 18 (4), S. 490–497. DOI: 10.1177/1087057112465980.
- Chang, B. S.; Kendrick, B. S.; Carpenter, J. F. (1996): Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 85 (12), S. 1325–1330. DOI: 10.1021/js960080y.
- Chappell, Joseph (1995): Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants. In: *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 46 (1), S. 521–547. DOI: 10.1146/annurev.pp.46.060195.002513.
- Chatterjee, Samit; Behnam Azad, Babak; Nimmagadda, Sridhar (2014): The intricate role of CXCR4 in cancer. In: *Advances in cancer research* 124, S. 31–82. DOI: 10.1016/B978-0-12-411638-2.00002-1.
- Chen, Feng; Tholl, Dorothea; Bohlmann, Jörg; Pichersky, Eran (2011): The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 66 (1), S. 212–229. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04520.x.
- Chen, Ke; Ishihara, Yoshihiro; Galán, María Morón; Baran, Phil S. (2010): Total synthesis of eudesmane terpenes. Cyclase phase. In: *Tetrahedron* 66 (26), S. 4738–4744. DOI: 10.1016/j.tet.2010.02.088.
- Choi, Hojae; Doyle, Michael P. (2007): Optimal TBHP allylic oxidation of Delta5-steroids catalyzed by dirhodium caprolactamate. In: *Organic letters* 9 (26), S. 5349–5352. DOI: 10.1021/ol7025284.
- Choi, Hyung-Kyoon; Adams, Tom L.; Stahlhut, Roy W.; Kim, Sang-Ic; Yun, Jeong-Hwan; Song, Bong-Kyu et al. (1998): PRODUCTION OF TAXOL FROM TAXUS Production of Taxol from taxus plant cell culture adding silver nitrate. Angemeldet durch Samyang Genex, Corporation am 22.12.1998. Anmeldenr: 09/218,406. Veröffentlichungsnr: US 6,248,572 B1.
- Chow, Dominic C.; Dreher, Matthew R.; Trabbic-Carlson, Kimberly; Chilkoti, Ashutosh (2006): Ultra-high expression of a thermally responsive recombinant fusion protein in *E. coli*. In: *Biotechnology progress* 22 (3), S. 638–646. DOI: 10.1021/bp0503742.
- Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M. (1997): Natural products in drug discovery and development. In: *Journal of natural products* 60 (1), S. 52–60. DOI: 10.1021/np9604893.

- Croteau, Rodney; Ketchum, Raymond E. B.; Long, Robert M.; Kaspera, Rüdiger; Wildung, Mark R. (2006): Taxol biosynthesis and molecular genetics. In: *Phytochemistry reviews : proceedings of the Phytochemical Society of Europe* 5 (1), S. 75–97. DOI: 10.1007/s11101-005-3748-2.
- Crowell, Anastasia L.; Williams, David C.; Davis, Edward M.; Wildung, Mark R.; Croteau, Rodney (2002): Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 405 (1), S. 112–121.
- Dafoe, Julian T.; Daugulis, Andrew J. (2014): Production of 4-valerolactone by an equilibrium-limited transformation in a partitioning bioreactor: impact of absorptive polymer properties. In: *Bioprocess and biosystems engineering* 37 (3), S. 533–542. DOI: 10.1007/s00449-013-1020-5.
- Degenhardt, Jörg; Köllner, Tobias G.; Gershenzon, Jonathan (2009): Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. In: *Phytochemistry* 70 (15-16), S. 1621–1637. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.07.030.
- Dickson, James M. J.; Lee, Woo-Jeong; Shepherd, Peter R.; Buchanan, Christina M. (2013): Enzyme activity effects of N-terminal His-tag attached to catalytic sub-unit of phosphoinositide-3-kinase. In: *Bioscience reports* 33 (6). DOI: 10.1042/BSR20130075.
- Drueckes, P.; Schinzel, R.; Palm, D. (1995): Photometric microtiter assay of inorganic phosphate in the presence of acid-labile organic phosphates. In: *Analytical biochemistry* 230 (1), S. 173–177. DOI: 10.1006/abio.1995.1453.
- Dudareva, N. (2003): (E)-beta-Ocimene and Myrcene Synthase Genes of Floral Scent Biosynthesis in Snapdragon. Function and Expression of Three Terpene Synthase Genes of a New Terpene Synthase Subfamily. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 15 (5), S. 1227–1241. DOI: 10.1105/tpc.011015.
- Dudareva, Natalia; Martin, Diane; Kish, Christine M.; Kolosova, Natalia; Gorenstein, Nina; Fäldt, Jenny et al. (2003): (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. In: *The Plant cell* 15 (5), S. 1227–1241.
- Eisenreich, W.; Schwarz, M.; Cartayrade, A.; Arigoni, D.; Zenk, M. H.; Bacher, A. (1998): The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. In: *Chemistry & biology* 5 (9), R221-33.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ekor, Martins (2014): The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. In: *Frontiers in pharmacology* 4, S. 177. DOI: 10.3389/fphar.2013.00177.
- Evolva (2016): Nootkatone. Online verfügbar unter <http://www.evolva.com/nootkatone-flavor/>.
- Faraldos, Juan A.; Gonzalez, Veronica; Li, Amang; Yu, Fanglei; Köksal, Mustafa; Christianson, David W.; Allemann, Rudolf K. (2012): Probing the mechanism of 1,4-conjugate elimination reactions catalyzed by terpene synthases. In: *Journal of the American Chemical Society* 134 (51), S. 20844–20848. DOI: 10.1021/ja311022s.
- Farret, Henri (2010): Semi-Synthetic ARTEMISININ Project. WHO/MMV Artemisinin Conference. Antananarivo, Madagascar, 2010. Online verfügbar unter http://partnerships.ifpma.org/uploads/documents/36_1399899255.pdf, zuletzt geprüft am 09.10.2017.
- Fraga, Braulio M. (2001): Natural Sesquiterpenoids. In: *Nat. Prod. Rep.* 18 (6), S. 650–673. DOI: 10.1039/b009025p.
- Fraga, Braulio M. (2010): Natural sesquiterpenoids. In: *Natural product reports* 27 (11), S. 1681–1708. DOI: 10.1039/c0np00007h.
- Franks, F. (1995): Protein destabilization at low temperatures. In: *Advances in protein chemistry* 46, S. 105–139.
- Freeman, A.; Woodley, J. M.; Lilly, M. D. (1993): In situ product removal as a tool for bioprocessing. In: *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 11 (9), S. 1007–1012.
- Frister, Thore (2015): Herstellung, Charakterisierung und Anwendung einer rekombinanten Patchoulolsynthase zur biokatalytischen Herstellung von Sesquiterpenen. Dissertation. Leibniz Universität Hannover, Hannover. Institut für Technische Chemie.
- Frister, Thore; Hartwig, Steffen; Alemdar, Semra; Schnatz, Katharina; Thöns, Laura; Scheper, Thomas; Beutel, Sascha (2015): Characterisation of a Recombinant Patchoulol Synthase Variant for Biocatalytic Production of Terpenes. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 176 (8), S. 2185–2201. DOI: 10.1007/s12010-015-1707-y.
- Ganem, Bruce; Franke, Roland R. (2007): Paclitaxel from primary taxanes. A perspective on creative invention in organozirconium chemistry. In: *The Journal of organic chemistry* 72 (11), S. 3981–3987. DOI: 10.1021/jo070129s.

- Gutensohn, Michael; Nagegowda, Dinesh A.; Dudareva, Natalia (2013): Involvement of Compartmentalization in Monoterpene and Sesquiterpene Biosynthesis in Plants. In: Thomas J. Bach und Michel Rohmer (Hg.): *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms*. New Concepts and Experimental Approaches. New York, NY: Springer, S. 155–169.
- Hartwig, Steffen (2016): Biokatalytische Wege zur Darstellung funktioneller Sesquiterpene. Dissertation. Leibniz Universität Hannover, Hannover. Institut für Technische Chemie.
- Hermann, Johannes C.; Marti-Arbona, Ricardo; Fedorov, Alexander A.; Fedorov, Elena; Almo, Steven C.; Shoichet, Brian K.; Raushel, Frank M. (2007): Structure-based activity prediction for an enzyme of unknown function. In: *Nature* 448 (7155), S. 775–779. DOI: 10.1038/nature05981.
- Hoffman, A. (2002): Redox-regulated mechanism may account for zerumbone's ability to suppress cancer-cell proliferation. In: *Carcinogenesis* 23 (11), S. 1961–1962. DOI: 10.1093/carcin/23.11.1961.
- Hutter, D. E.; Till, B. G.; Greene, J. J. (1997): Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation. In: *Experimental cell research* 232 (2), S. 435–438. DOI: 10.1006/excr.1997.3527.
- Ishihara, Yoshihiro; Baran, Phil (2010): Two-Phase Terpene Total Synthesis. Historical Perspective and Application to the Taxol® Problem. In: *Synlett* 2010 (12), e6-e6. DOI: 10.1055/s-0030-1258492.
- Jaenicke, R. (1990): Protein structure and function at low temperatures. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 326 (1237), 535-51; discussion 551-3.
- Jalil, Mahanom; Annuar, Mohamad Suffian Mohamad; Tan, Boon Chin; Khalid, Norzulaani (2015): Effects of Selected Physicochemical Parameters on Zerumbone Production of Zingiber zerumbet Smith Cell Suspension Culture. In: *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2015, S. 757514. DOI: 10.1155/2015/757514.
- Jang, Hui-Jeong; Yoon, Sang-Hwal; Ryu, Hee-Kyung; Kim, Jung-Hun; Wang, Chong-Long; Kim, Jae-Yean et al. (2011): Retinoid production using metabolically engineered Escherichia coli with a two-phase culture system. In: *Microbial cell factories* 10, S. 59. DOI: 10.1186/1475-2859-10-59.

LITERATURVERZEICHNIS

Jayaramaiah, Ramesha H.; Anand, Atul; Beedkar, Supriya D.; Dholakia, Bhushan B.; Puneekar, Sachin A.; Kalunke, Raviraj M. et al. (2016): Functional characterization and transient expression manipulation of a new sesquiterpene synthase involved in β -caryophyllene accumulation in *Ocimum*. In: *Biochemical and biophysical research communications* 473 (1), S. 265–271. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.03.090.

Jena Bioscience GmbH (2011): IMAC – Immobilized Metal Affinity Chromatography. Online verfügbar unter https://www.jenabioscience.com/images/1b94dca880/Newsletter_Affi_May11.html, zuletzt geprüft am 09.10.2017.

Kang, Jia; Pervaiz, Shazib (2012): Mitochondria: redox metabolism and dysfunction. In: *Biochemistry research international* 2012, S. 896751. DOI: 10.1155/2012/896751.

Kapoor, Shailendra (2012): The rapidly emerging role of zerumbone in attenuating tumor growth in systemic malignancies. In: *Molecular nutrition & food research* 56 (10), S. 1487. DOI: 10.1002/mnfr.201270084.

Karin, Michael; Greten, Florian R. (2005): NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. In: *Nature reviews. Immunology* 5 (10), S. 749–759. DOI: 10.1038/nri1703.

Keasling, Jay (2013): A Conversation with Jay Keasling, PhD. In: *Industrial Biotechnology* 9 (4), S. 152–155. DOI: 10.1089/ind.2013.1585.

Kirchgesser, M.; Dahlmann, N. (1990): A Colorimetric Assay for the Determination of Acid Nucleoside Triphosphatase Activity. In: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 28 (6), S. 185. DOI: 10.1515/cclm.1990.28.6.407.

KODAMA, MITSUAKI; SHIOBARA, YOSHINORI; SUMITOMO, HISAKO; MITANI, KAZUKO; UENO, KUMIKO (1987): Synthesis of macrocyclic terpenoids by intramolecular cyclization. XI. Total synthesis of zerumbone. In: *Chem. Pharm. Bull.* 35 (10), S. 4039–4042. DOI: 10.1248/cpb.35.4039.

König, Jan Christoph (2015): Produktion und Charakterisierung einer α -Humulensynthase zur biotechnologischen Herstellung von Terpenen. Masterarbeit. Leibniz Universität Hannover, Hannover. Institut für Technische Chemie.

- Lange, B. M.; Rujan, T.; Martin, W.; Croteau, R. (2000): Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (24), S. 13172–13177. DOI: 10.1073/pnas.240454797.
- Lange, B. Markus; Ghassemian, Majid (2003): Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. In: *Plant molecular biology* 51 (6), S. 925–948.
- Lauchli, Ryan; Rabe, Kersten S.; Kalbarczyk, Karolina Z.; Tata, Amulya; Heel, Thomas; Kitto, Rebekah Z.; Arnold, Frances H. (2013): High-throughput screening for terpene-synthase-cyclization activity and directed evolution of a terpene synthase. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 52 (21), S. 5571–5574. DOI: 10.1002/anie.201301362.
- Ledent, P.; Duez, C.; Vanhove, M.; Lejeune, A.; Fonzé, E.; Charlier, P. et al. (1997): Unexpected influence of a C-terminal-fused His-tag on the processing of an enzyme and on the kinetic and folding parameters. In: *FEBS letters* 413 (2), S. 194–196.
- Li, S.; Schöneich, C.; Borchardt, R. T. (1995): Chemical instability of protein pharmaceuticals: Mechanisms of oxidation and strategies for stabilization. In: *Biotechnology and bioengineering* 48 (5), S. 490–500. DOI: 10.1002/bit.260480511.
- Liang, Zhongxing; Brooks, Joann; Willard, Margaret; Liang, Ke; Yoon, Younhyoun; Kang, Seunghee; Shim, Hyunsuk (2007): CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. In: *Biochemical and biophysical research communications* 359 (3), S. 716–722. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.05.182.
- Liekens, S.; Schols, D.; Hatse, S. (2010): CXCL12-CXCR4 axis in angiogenesis, metastasis and stem cell mobilization. In: *Current pharmaceutical design* 16 (35), S. 3903–3920.
- Liu, Xiaoying; Friend, Cynthia M. (2010): Competing Epoxidation and Allylic Hydrogen Activation. Trans- β -Methylstyrene Oxidation on Au(111). In: *J. Phys. Chem. C* 114 (11), S. 5141–5147. DOI: 10.1021/jp9121529.
- Matthes, H.W.D.; Luu, B.; Ourisson, G. (1980): Cytotoxic components of *Zingiber zerumbet*, *Curcuma zedoaria* and *C. domestica*. In: *Phytochemistry* 19 (12), S. 2643–2650. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)83937-0.
- McGarvey, D. J.; Croteau, R. (1995): Terpenoid metabolism. In: *The Plant cell* 7 (7), S. 1015–1026. DOI: 10.1105/tpc.7.7.1015.

LITERATURVERZEICHNIS

- McLaughlin, Emily C.; Choi, Hojae; Wang, Kan; Chiou, Grace; Doyle, Michael P. (2009): Allylic oxidations catalyzed by dirhodium caprolactamate via aqueous tert-butyl hydroperoxide: the role of the tert-butylperoxy radical. In: *The Journal of organic chemistry* 74 (2), S. 730–738. DOI: 10.1021/jo8021132.
- Mercke, P.; Bengtsson, M.; Bouwmeester, H. J.; Posthumus, M. A.; Brodelius, P. E. (2000): Molecular cloning, expression, and characterization of amorpho-4,11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 381 (2), S. 173–180. DOI: 10.1006/abbi.2000.1962.
- Mercke, P.; Crock, J.; Croteau, R.; Brodelius, P. E. (1999): Cloning, expression, and characterization of epi-cedrol synthase, a sesquiterpene cyclase from *Artemisia annua* L. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 369 (2), S. 213–222. DOI: 10.1006/abbi.1999.1358.
- Mirata, M. A.; Schewe, H.; Holtmann, D.; Schrader, J. (2010): Integrierte Bioproduktion und selektive Aufreinigung von Perillasäure. In: *Chemie Ingenieur Technik* 82 (1-2), S. 101–109. DOI: 10.1002/cite.200900115.
- Munck, S. L.; Croteau, R. (1990): Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase patchoulol synthase from *Pogostemon cablin*. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 282 (1), S. 58–64.
- Munoz, Maria A.; Balon, Manuel; Fernandez, Camilo (1983): Direct determination of Inorganic Phosphorus in Serum with a Single Reagent. In: *Clinical Chemistry* 29 (2), S. 372–374.
- Murakami, Akira; Takahashi, Daisuke; Kinoshita, Takashi; Koshimizu, Koichi; Kim, Ha Won; Yoshihiro, Akira et al. (2002): Zerumbone, a Southeast Asian ginger sesquiterpene, markedly suppresses free radical generation, proinflammatory protein production, and cancer cell proliferation accompanied by apoptosis: the alpha,beta-unsaturated carbonyl group is a prerequisite. In: *Carcinogenesis* 23 (5), S. 795–802.
- Nema, S.; Avis, K. E. (1993): Freeze-thaw studies of a model protein, lactate dehydrogenase, in the presence of cryoprotectants. In: *Journal of parenteral science and technology : a publication of the Parenteral Drug Association* 47 (2), S. 76–83.
- Newman, David J.; Cragg, Gordon M. (2016): Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. In: *Journal of natural products* 79 (3), S. 629–661. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.

- Ngo, Duy Thuong (2014): Gừng gió (thân củ & rễ) Zingiber zerumbet thuộc họ Gừng - ... | Flickr. Online verfügbar unter <https://www.flickr.com/photos/binh-minh/15251931931/in/photostream/>, zuletzt geprüft am 18.10.2017.
- Nieuwenhuizen, Niels J.; Wang, Mindy Y.; Matich, Adam J.; Green, Sol A.; Chen, Xiuyin; Yauk, Yar-Khing et al. (2009): Two terpene synthases are responsible for the major sesquiterpenes emitted from the flowers of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). In: *Journal of experimental botany* 60 (11), S. 3203–3219. DOI: 10.1093/jxb/erp162.
- Oberhauser, Clara (2016). Dissertation (unveröffentlichte Ergebnisse). Leibniz Universität Hannover, Hannover. Institut für Organische Chemie.
- Okamoto, Sho; Yu, Fengnian; Harada, Hisashi; Okajima, Toshihide; Hattan, Jun-ichiro; Misawa, Norihiko; Utsumi, Ryutaro (2011): A short-chain dehydrogenase involved in terpene metabolism from *Zingiber zerumbet*. In: *The FEBS journal* 278 (16), S. 2892–2900. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08211.x.
- O'Maille, Paul E.; Chappell, Joe; Noel, Joseph P. (2004): A single-vial analytical and quantitative gas chromatography-mass spectrometry assay for terpene synthases. In: *Analytical biochemistry* 335 (2), S. 210–217. DOI: 10.1016/j.ab.2004.09.011.
- Paddon, C. J.; Westfall, P. J.; Pitera, D. J.; Benjamin, K.; Fisher, K.; McPhee, D. et al. (2013): High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. In: *Nature* 496 (7446), S. 528–532. DOI: 10.1038/nature12051.
- Paddon, Chris J.; Keasling, Jay D. (2014): Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. In: *Nature reviews. Microbiology* 12 (5), S. 355–367. DOI: 10.1038/nrmicro3240.
- Panek, Anna; Pietrow, Olga; Filipkowski, Pawel; Synowiecki, Józef (2013): Effects of the polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*. In: *Acta biochimica Polonica* 60 (2), S. 163–166.
- Peplow, Marc (2013): Sanofi launches malaria drug production. Hg. v. Royal Society of Chemistry. Online verfügbar unter <https://www.chemistryworld.com/news/sanofi-launches-malaria-drug-production/6068.article>, zuletzt aktualisiert am 17.04.2013.
- Peralta-Yahya, Pamela P.; Ouellet, Mario; Chan, Rossana; Mukhopadhyay, Aindrila; Keasling, Jay D.; Lee, Taek Soon (2011): Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel. In: *Nature communications* 2, S. 483. DOI: 10.1038/ncomms1494.

- Picaud, Sarah; Olofsson, Linda; Brodelius, Maria; Brodelius, Peter E. (2005): Expression, purification, and characterization of recombinant amorpha-4,11-diene synthase from *Artemisia annua* L. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 436 (2), S. 215–226. DOI: 10.1016/j.abb.2005.02.012.
- Pichersky, Eran; Gershenzon, Jonathan (2002): The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. In: *Current opinion in plant biology* 5 (3), S. 237–243.
- Pikal, Michael J. (1990a): Freeze-drying of proteins. Part I: Process design. In: *BioPharm* 3 (8), S. 18–27.
- Pikal, Michael J. (1990b): Freeze-drying of proteins. Part II: Formulation selection. In: *BioPharm* 3 (9), S. 26–30.
- Pinedo, Cristina; Wang, Chieh-Mei; Pradier, Jean-Marc; Dalmais, Bérengère; Choquer, Mathias; Le Pêcheur, Pascal et al. (2008): Sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. In: *ACS chemical biology* 3 (12), S. 791–801. DOI: 10.1021/cb800225v.
- Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I.; Belfrage, G. (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. In: *Nature* 258 (5536), S. 598–599.
- Prasannan, Remya; Kalesh, Karunakaran A.; Shanmugam, Muthu K.; Nachiyappan, Alamelu; Ramachandran, Lalitha; Nguyen, An H. et al. (2012): Key cell signaling pathways modulated by zerumbone: role in the prevention and treatment of cancer. In: *Biochemical pharmacology* 84 (10), S. 1268–1276. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.07.015.
- Raguso, Robert A.; Pichersky, Eran (1995): Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C. concinna* (Onagraceae). Recent evolution of floral scent and moth pollination. In: *Pl Syst Evol* 194 (1-2), S. 55–67. DOI: 10.1007/BF00983216.
- Rahman, Heshu Sulaiman; Rasedee, Abdullah; How, Chee Wun; Abdul, Ahmad Bustamam; Zeenathul, Nazariah Allaudin; Othman, Hemn Hassan et al. (2013): Zerumbone-loaded nanostructured lipid carriers: preparation, characterization, and antileukemic effect. In: *International journal of nanomedicine* 8, S. 2769–2781. DOI: 10.2147/IJN.S45313.
- Rahman, Heshu Sulaiman; Rasedee, Abdullah; Yeap, Swee Keong; Othman, Hemn Hassan; Chartrand, Max Stanley; Namvar, Farideh et al. (2014): Biomedical properties of a natural

dietary plant metabolite, zerumbone, in cancer therapy and chemoprevention trials. In: *BioMed research international* 2014, S. 920742. DOI: 10.1155/2014/920742.

Rosano, Germán L.; Ceccarelli, Eduardo A. (2014): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. In: *Frontiers in microbiology* 5, S. 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.

Rothenberg, Gadi; Feldberg, Liron; Wiener, Harold; Sasson, Yoel (1998): Copper-catalyzed homolytic and heterolytic benzylic and allylic oxidation using tert-butyl hydroperoxide. In: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (11), S. 2429–2434. DOI: 10.1039/a805324c.

Sabaty, Monique; Grosse, Sandrine; Adryanczyk, Geraldine; Boiry, Séverine; Biaso, Frédéric; Arnoux, Pascal; Pignol, David (2013): Detrimental effect of the 6 His C-terminal tag on YedY enzymatic activity and influence of the TAT signal sequence on YedY synthesis. In: *BMC biochemistry* 14, S. 28. DOI: 10.1186/1471-2091-14-28.

Sadhu, Samir Kumar; Khatun, Amina; Ohtsuki, Takashi; Ishibashi, Masami (2007): First isolation of sesquiterpenes and flavonoids from *Zingiber spectabile* and identification of zerumbone as the major cell growth inhibitory component. In: *Natural product research* 21 (14), S. 1242–1247. DOI: 10.1080/14786410701371421.

Sakinah, S. A. Sharifah; Handayani, S. Tri; Hawariah, L. P. Azimahtol (2007): Zerumbone induced apoptosis in liver cancer cells via modulation of Bax/Bcl-2 ratio. In: *Cancer cell international* 7, S. 4. DOI: 10.1186/1475-2867-7-4.

Salvador, Jorge A. R.; Clark, James H. (2002): The allylic oxidation of unsaturated steroids by tert-butyl hydroperoxide using surface functionalised silica supported metal catalysts. In: *Green Chem.* 4 (4), S. 352–356. DOI: 10.1039/b201500p.

Sartorius Stedim Biotech GmbH (2014): Sartobind IDA75, A Separation Technology Based on Metal Chelate Membrane Adsorbers, Operating Instructions. Online verfügbar unter https://www.sartorius.com/_ui/images/hc3/hcb/8852873838622.pdf.

Schalk, Michel; Deguerry, Fabienne (2017): Method for producing patchoulol and 7-epi- α -selinene. Angemeldet durch Firmenich SA. Anmeldenr: US 14/577,475. Veröffentlichungsnr: US9714440 B2.

Schiffrin, Alexander; Khatri, Yogan; Kirsch, Philine; Thiel, Verena; Schulz, Stefan; Bernhardt, Rita (2016): A single terpene synthase is responsible for a wide variety of sesquiterpenes in

Sorangium cellulosum Soce56. In: *Organic & biomolecular chemistry* 14 (13), S. 3385–3393. DOI: 10.1039/c6ob00130k.

Schmidt, Calvin M.; Shis, David L.; Nguyen-Huu, Truong D.; Bennett, Matthew R. (2012): Stable maintenance of multiple plasmids in *E. coli* using a single selective marker. In: *ACS synthetic biology* 1 (10), S. 445–450. DOI: 10.1021/sb3000589.

Schnatz, Katharina (2014): Charakterisierung einer Patchoulolsynthese in Hinblick auf die biokatalytische Herstellung von Sesquiterpenen. Masterarbeit. Leibniz Universität Hannover, Hannover. Institut für Technische Chemie.

Schnee, Christiane; Köllner, Tobias G.; Gershenzon, Jonathan; Degenhardt, Jörg (2002): The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-beta-farnesene, (E)-nerolidol, and (E,E)-farnesol after herbivore damage. In: *Plant physiology* 130 (4), S. 2049–2060. DOI: 10.1104/pp.008326.

Schulz, Stefan; Dickschat, Jeroen S. (2007): Bacterial volatiles: the smell of small organisms. In: *Natural product reports* 24 (4), S. 814–842. DOI: 10.1039/b507392h.

Seidel, Katja (2017): Synthese und Untersuchung von superparamagnetischen Ansamitocin- und Lactose-Nanopartikel-Konjugaten für die zielgerichtete Wirkstofffreisetzung mittels induktiven Heizens - Synthese unnatürlicher Farnesylderivate als Testsubstrate für Sesquiterpencyclasen. Dissertation. Leibniz Universität Hannover, Hannover. Institut für Organische Chemie.

Serra, Stefano (2015): MnO₂/TBHP. A Versatile and User-Friendly Combination of Reagents for the Oxidation of Allylic and Benzylic Methylene Functional Groups. In: *Eur. J. Org. Chem.* 2015 (29), S. 6472–6478. DOI: 10.1002/ejoc.201500829.

Shamoto, Tomoya; Matsuo, Yoichi; Shibata, Takahiro; Tsuboi, Ken; Nagasaki, Takaya; Takahashi, Hiroki et al. (2014): Zerumbone inhibits angiogenesis by blocking NF- κ B activity in pancreatic cancer. In: *Pancreas* 43 (3), S. 396–404. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000039.

Shen, Ben (2015): A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. In: *Cell* 163 (6), S. 1297–1300. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.031.

Sherwood, Amanda R.; Paasch, Bradley C.; Worby, Carolyn A.; Gentry, Matthew S. (2013): A malachite green-based assay to assess glucan phosphatase activity. In: *Analytical biochemistry* 435 (1), S. 54–56. DOI: 10.1016/j.ab.2012.10.044.

Shirahama, Haruhisa; Chhabra, Baldev R.; Matsumoto, Takeshi (1981): CONVERSION OF HUMULENE TO ZERUMBONE. In: *Chem. Lett.* 10 (6), S. 717–718. DOI: 10.1246/cl.1981.717.

Stark, Daniel; Stockar, Urs von (2003): In situ product removal (ISPR) in whole cell biotechnology during the last twenty years. In: *Advances in biochemical engineering/ biotechnology* 80, S. 149–175.

Steele, Christopher L.; Crock, John; Bohlmann, Jörg; Croteau, Rodney (1998): Sesquiterpene Synthases from Grand Fir (*Abies grandis*). In: *J. Biol. Chem.* 273 (4), S. 2078–2089. DOI: 10.1074/jbc.273.4.2078.

Strambini, G. B.; Gabellieri, E. (1996): Proteins in frozen solutions. Evidence of ice-induced partial unfolding. In: *Biophysical Journal* 70 (2), S. 971–976. DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79640-6.

Sung, Bokyung; Jhurani, Sonia; Ahn, Kwang Seok; Mastuo, Yoichi; Yi, Tingfang; Guha, Sushovan et al. (2008): Zerumbone down-regulates chemokine receptor CXCR4 expression leading to inhibition of CXCL12-induced invasion of breast and pancreatic tumor cells. In: *Cancer research* 68 (21), S. 8938–8944. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2155.

Sung, Bokyung; Murakami, Akira; Oyajobi, Babatunde O.; Aggarwal, Bharat B. (2009): Zerumbone abolishes RANKL-induced NF-kappaB activation, inhibits osteoclastogenesis, and suppresses human breast cancer-induced bone loss in athymic nude mice. In: *Cancer research* 69 (4), S. 1477–1484. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3249.

Takada, Yasunari; Murakami, Akira; Aggarwal, Bharat B. (2005): Zerumbone abolishes NF-kappaB and IkappaBalpha kinase activation leading to suppression of antiapoptotic and metastatic gene expression, upregulation of apoptosis, and downregulation of invasion. In: *Oncogene* 24 (46), S. 6957–6969. DOI: 10.1038/sj.onc.1208845.

Trapp, S. C.; Croteau, R. B. (2001): Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. In: *Genetics* 158 (2), S. 811–832.

Tsuruta, Hiroko; Paddon, Christopher J.; Eng, Diana; Lenihan, Jacob R.; Horning, Tizita; Anthony, Larry C. et al. (2009): High-level production of amorphadiene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. In: *PloS one* 4 (2), e4489. DOI: 10.1371/journal.pone.0004489.

- Unsicker, Sybille B.; Kunert, Grit; Gershenzon, Jonathan (2009): Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. In: *Current opinion in plant biology* 12 (4), S. 479–485. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.04.001.
- Vagenende, Vincent; Yap, Miranda G. S.; Trout, Bernhardt L. (2009): Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. In: *Biochemistry* 48 (46), S. 11084–11096. DOI: 10.1021/bi900649t.
- van Hecke, Wouter; Kaur, Guneet; Wever, Heleen de (2014): Advances in in-situ product recovery (ISPR) in whole cell biotechnology during the last decade. In: *Biotechnology advances* 32 (7), S. 1245–1255. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.07.003.
- Vardakou, Maria; Salmon, Melissa; Faraldos, Juan A.; O'Maille, Paul E. (2014): Comparative analysis and validation of the malachite green assay for the high throughput biochemical characterization of terpene synthases. In: *MethodsX* 1, S. 187–196. DOI: 10.1016/j.mex.2014.08.007.
- Willot, Matthieu; Radtke, Lea; Könning, Daniel; Fröhlich, Roland; Gessner, Viktoria H.; Strohmann, Carsten; Christmann, Mathias (2009): Total synthesis and absolute configuration of the guaiane sesquiterpene englerin A. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 48 (48), S. 9105–9108. DOI: 10.1002/anie.200905032.
- Willrodt, Christian; Hoschek, Anna; Bühler, Bruno; Schmid, Andreas; Julsing, Mattijs K. (2015): Coupling limonene formation and oxyfunctionalization by mixed-culture resting cell fermentation. In: *Biotechnology and bioengineering* 112 (9), S. 1738–1750. DOI: 10.1002/bit.25592.
- Wink, Michael; Alfermann, A. Wilhelm; Franke, Rochus; Wetterauer, Bernhard; Distl, Melanie; Windhövel, Jörg et al. (2005): Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant in vitro cultures. Anticancer agents. In: *Plant Genet. Res.* 3 (02), S. 90–100. DOI: 10.1079/PGR200575.
- World Health Organization (2013): Factsheet on the World Malaria Report 2013. Online verfügbar unter http://www.who.int/malaria/media/world_malaria_report_2013/en/, zuletzt aktualisiert am 12.2013, zuletzt geprüft am 09.10.2017.
- Yan, Hua; Ren, Ming-Yuan; Wang, Zheng-Xiang; Feng, Shi-Jun; Li, Si; Cheng, Yi et al. (2017): Zerumbone inhibits melanoma cell proliferation and migration by altering mitochondrial functions. In: *Oncology letters* 13 (4), S. 2397–2402. DOI: 10.3892/ol.2017.5742.
- Yan, Qiong; Hu, Zongding; Tan, Ren Xiang; Wu, Jianyong (2005): Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with in situ

adsorption, elicitation and semi-continuous operation. In: *Journal of biotechnology* 119 (4), S. 416–424. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.04.020.

Yi, N. (2013): In vitro and in vivo studies of pharmacological effects of zerumbone on human malignant melanoma. Dissertation.

Yu, Fengnian; Okamoto, Sho; Harada, Hisashi; Yamasaki, Kazuhisa; Misawa, Norihiko; Utsumi, Ryutaro (2011): Zingiber zerumbet CYP71BA1 catalyzes the conversion of α -humulene to 8-hydroxy- α -humulene in zerumbone biosynthesis. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68 (6), S. 1033–1040. DOI: 10.1007/s00018-010-0506-4.

Yu, Fengnian; Okamoto, Sho; Nakasone, Kaoru; Adachi, Kyoko; Matsuda, Satoru; Harada, Hisashi et al. (2008): 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 (6), S. 1291–1299. DOI: 10.1007/s00425-008-0700-x.

Zhang, Lixin; Demain, Arnold L. (Hg.) (2005): Natural Products. Drug Discovery and Therapeutic Medicine. Totowa, NJ: Humana Press Inc. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10217925>.

Zhao, Hongli; Guo, Liyuan; Zhao, Hong; Zhao, Jiaxin; Weng, Hao; Zhao, Bin (2015): CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. In: *Oncotarget* 6 (7), S. 5022–5040. DOI: 10.18632/oncotarget.3217.

Zhi, Yunlai; Duan, Yuhe; Zhou, Xianjun; Yin, Xiaofeng; Guan, Ge; Zhang, Hong et al. (2014): NF- κ B signaling pathway confers neuroblastoma cells migration and invasion ability via the regulation of CXCR4. In: *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 20, S. 2746–2752. DOI: 10.12659/MSM.892597.

Zhi, Yunlai; Lu, Hongting; Duan, Yuhe; Sun, Weisheng; Guan, Ge; Dong, Qian; Yang, Chuanmin (2015): Involvement of the nuclear factor- κ B signaling pathway in the regulation of CXC chemokine receptor-4 expression in neuroblastoma cells induced by tumor necrosis factor- α . In: *International journal of molecular medicine* 35 (2), S. 349–357. DOI: 10.3892/ijmm.2014.2032

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Kompartiment-spezifische Isoprenoidbiosynthese in Pflanzenzellen.	5
Abbildung 2: Bildung verschiedener Sesquiterpengrundgerüste aus FPP (15).	8
Abbildung 3: Durch die U. S. Food and Drug Administration zugelassene Wirkstoffe von 1981-2014.	10
Abbildung 4: Semisynthese von Artemisinin (31).	12
Abbildung 5: <i>Zingiber zerumbet</i> Smith.	14
Abbildung 6: Biosynthese von Zerumbon (37).	16
Abbildung 7: Zerumbonsynthese nach Shirahama.	17
Abbildung 8: Zerumbonsynthese nach Kodama.	18
Abbildung 9: Produktion der HUM in <i>E. coli</i> HUM1810 in Abhängigkeit vom Induktionszeitpunkt.	24
Abbildung 10: Produktion der HUM in <i>E. coli</i> HUM1810 in Abhängigkeit der Induktorkonzentration.	26
Abbildung 11: Produktion der rekombinanten HUM in <i>E. coli</i> HUM1810 in TB- und SB-Medium.	27
Abbildung 12: Produktion rekombinanter HUM in einer Batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> HUM1810.	29
Abbildung 13: Auswahl an zweiwertigen Metallionen für die Metallchelataffinitätschromatographie.	31
Abbildung 14: Chromatographische Aufreinigung der HUM in Abhängigkeit von der immobilisierten Metallspezies.	32
Abbildung 15: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels Co^{2+} -NTA-IMAC mit Zwei-Stufen-Elution.	35
Abbildung 16: Western Blot der produzierten und aufgereinigten HUM.	35
Abbildung 17: Zweidimensionale Gelelektrophorese der rekombinanten HUM.	37
Abbildung 18: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels DEAE-IEC.	38
Abbildung 19: Enzymatische Umsetzung von (2E,6E)-FPP durch die rekombinante HUM.	40
Abbildung 20: Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums der rekombinanten HUM.	41
Abbildung 21: Änderung der Thermostabilität der Faltung der HUM in MOPS-Lagerpuffer in Gegenwart von Glycerol.	43
Abbildung 22: Stabilität der HUM bei verschiedenen Lagerbedingungen.	44

Abbildung 23: Michaelis-Menten-Kurve der Umsetzung von (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-FPP durch die HUM.	46
Abbildung 24: Identifizierte Produkte der Umsetzung von (2 <i>E</i>)-GPP und (2 <i>Z</i>)-NPP durch die rekombinante HUM.	49
Abbildung 25: Reaktionsmechanismen für Produkte der Reaktion von (2 <i>E</i>)-GPP und (2 <i>Z</i>)-NPP.	50
Abbildung 26: Identifizierte Produkte der Umsetzung von (2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)-FPP und (2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-FPP durch die rekombinante HUM.	52
Abbildung 27: Postulierter Reaktionsmechanismus für Produkte der Reaktion von (2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-FPP.	53
Abbildung 28: Umsetzung der FPP-Etherderivate durch die rekombinante HUM.	54
Abbildung 29: Absorptionsspektrum des Malachitgrün-Phosphomolybdat-Komplexes.	56
Abbildung 30: Kinetik der Bildung des Malachitgrün-Phosphomolybdat-Komplexes.	57
Abbildung 31: Umsetzung von Pyrophosphat durch die Anorganische Pyrophosphatase.	58
Abbildung 32: Validierung des photometrischen Malachitgrün-Molybdat-Assays.	59
Abbildung 33: Validierung des Malachitgrün-Molybdat-Assays mit dem GC-Assay als Vergleichsmethode.	60
Abbildung 34: Michaelis-Menten-Kurve der Umsetzung von (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-FPP, (2 <i>E</i>)-GPP und (2 <i>Z</i>)-NPP durch die HUM.	62
Abbildung 35: Synthetischer Mevalonat-Stoffwechselweg zur Isoprenoidproduktion in <i>E. coli</i> .	65
Abbildung 36: Expression des codon-optimierten <i>hum</i> -Gens in metabolisch optimierten <i>E. coli</i> HUM_Mev1510 Zellen in Abhängigkeit von der Induktionszeit.	66
Abbildung 37: Expression des codon-optimierten <i>hum</i> -Gens in metabolisch optimierten <i>E. coli</i> HUM_Mev1510 Zellen in Abhängigkeit von der Induktorkonzentration.	68
Abbildung 38: Heterologe Produktion von α -Humulen in einer <i>batch</i> -Kultivierung von <i>E. coli</i> HUM_Mev1510.	70
Abbildung 39: Entscheidungsbaum zur Auswahl geeigneter ISPR-Methoden nach van Hecke et al.	72
Abbildung 40: Wachstum und Produktion von α -Humulen in <i>E. coli</i> HUM_Mev1510 in einem integrierten Bioprozess mit <i>in situ</i> Produktabtrennung durch Adsorption.	76
Abbildung 41: <i>In situ</i> Isolierung von α -Humulen aus <i>E. coli</i> HUM_Mev1510 Kultur.	77
Abbildung 42: Allylische Oxidation.	79
Abbildung 43: Haupteffektediagramm für die Ausbeute.	81
Abbildung 44: Konturdiagramme für die Ausbeute.	82

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 45: Katalysatorscreening zur direkten Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon.	84
Abbildung 46: Übergangsmetall-katalysierte Oxidation von α -Humulen.	85
Abbildung 47: Postulierter Mechanismus der Übergangsmetall-katalysierten Oxidation von α -Humulen (34) zu Zerumbon (37) mit TBHP.	86
Abbildung 48: Postulierter Mechanismus für die Bildung von Viridiflorol (85) aus α -Humulen (34).	88
Abbildung 49: Semisynthetische Produktion von Zerumbon.	89
Abbildung 50: Plasmidkarte des Vektoren pET-16b::his-FXa-HUM..	117
Abbildung 51: Plasmidkarte des Vektoren pBbA5c-MevT-MBIS.	118
Abbildung 52: Kühlvorrichtung für Membranadsorber.	127
Abbildung 53: Chromatographische Aufreinigung der HUM in Abhängigkeit von der immobilisierten Metallspezies.	132
Abbildung 54: Enzymatische Umsetzung von (2E,2E)-FPP durch die rekombinante HUM.	132
Abbildung 55: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels Co ²⁺ -NTA-IMAC mit Gradientenelution.	133
Abbildung 56: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels DEAE-IEX bei pH 6,5.	133
Abbildung 57: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels DEAE-IEX bei pH 7,0.	134
Abbildung 58: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels DEAE-IEX bei pH 7,5.	134
Abbildung 59: Chromatographische Aufreinigung der HUM mittels DEAE-IEX bei pH 8,0.	135
Abbildung 60: MS-Spektrum von α -Humulen.	135
Abbildung 61: MS-Spektrum von β -Caryophyllen.	136
Abbildung 62: Enzymatische Umsetzung von (2E)-GPP durch die rekombinante HUM.	136
Abbildung 63: Enzymatische Umsetzung von (2Z)-NPP durch die rekombinante HUM.	137
Abbildung 64: Enzymatische Umsetzung von (2E,6Z)-FPP durch die rekombinante HUM.	137
Abbildung 65: Enzymatische Umsetzung von (2Z,6E)-FPP durch die rekombinante HUM.	138
Abbildung 66: Enzymatische Umsetzung des (2E,6E)-FPP-Etherderivats 1 durch die rekombinante HUM.	138
Abbildung 67: Enzymatische Umsetzung des (2E,6E)-FPP-Etherderivats 2 durch die rekombinante HUM.	139

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 68: Isolierung von α -Humulen aus <i>E. coli</i> und zellfreien Kulturen mithilfe Extraktion.	139
Abbildung 69: Pareto-Diagramm der standardisierten Effekte mit $\alpha= 0,05$.	140
Abbildung 70: Auftragung der berechneten Ausbeute gegen die experimentell bestimmte Ausbeute.	141
Abbildung 71: CuI-katalysierte Oxidation von α -Humulen.	142
Abbildung 72: CuCl ₂ -katalysierte Oxidation von α -Humulen.	142
Abbildung 73: CoCl ₂ -katalysierte Oxidation von α -Humulen.	143
Abbildung 74: FeCl ₃ -katalysierte Oxidation von α -Humulen.	143
Abbildung 75: Katalysatorscreening zur α -Humulen zu Zerumbon.	144
Abbildung 76: MS-Spektren von Humulen-6,7-epoxid (oben), Zerumbon (Mitte) und Viridiflorol (unten).	144

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Beispiele der antikanzerogenen Wirkung von Zerumbon in <i>in vitro</i> -Studien.	20
Tabelle 2: HUM-Ausbeute in Abhängigkeit des Induktionszeitpunktes.	25
Tabelle 3: HUM-Ausbeute in Abhängigkeit der Induktorkonzentration.	26
Tabelle 4: HUM-Ausbeute in Abhängigkeit des Kulturmediums.	28
Tabelle 5: Isolierung der HUM aus Proteinrohextrakt.	33
Tabelle 6: Malachitgrün-Molybdat-Assay zur Bestimmung der Terpensynthase-Aktivität.	59
Tabelle 7: Kinetische Daten der Umsetzung von (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-FPP, (2 <i>E</i>)-GPP und (2 <i>Z</i>)-NPP durch die HUM.	63
Tabelle 8: Kinetische Daten der Umsetzung von (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-FPP und (2 <i>E</i>)-GPP durch die ADS und FS..	63
Tabelle 9: Isolierung von α -Humulen aus wässriger Lösung mithilfe Extraktion.	73
Tabelle 10: Isolierung von α -Humulen aus wässriger Lösung mithilfe Adsorption.	74
Tabelle 11: Faktoren und Faktorstufen zur Optimierung der Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon unter Anwendung eines Box-Behnken-Designs.	80
Tabelle 12: Verwendete Chemikalien.	96
Tabelle 13: Verwendete Antikörper und Enzyme.	98
Tabelle 14: Verwendete Proteinmarker.	98
Tabelle 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	98
Tabelle 16: Verwendete Geräte.	99
Tabelle 17: Verwendete Software.	100
Tabelle 18: Zusammensetzung des LB-Mediums.	100
Tabelle 19: Zusammensetzung des TB-Mediums.	100
Tabelle 20: Zusammensetzung des SB-Mediums.	101
Tabelle 21: Zusammensetzung der Stammlösungen des ZYP-31- und ZYP-31(mod)-Mediums.	101
Tabelle 22: Zusammensetzung des ZYP-31 und ZYP-31(mod)-Mediums.	102
Tabelle 23: Verwendete Antibiotika-Stammlösungen (1000x).	102
Tabelle 24: IPTG-Stammlösung.	103
Tabelle 25: Zusammensetzung des PBS-Puffers.	103
Tabelle 26: Zusammensetzung des Extraktionspuffers.	103

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 27: Zusammensetzung des Lysis-Puffers.	103
Tabelle 28: Zusammensetzung eines 10 % Trenngels (für 2 Gele).	104
Tabelle 29: Zusammensetzung eines 5 % Sammelgels (für 1-4 Gele).	104
Tabelle 30: Zusammensetzung des 10x TGS-Puffers (pH 8,3).	104
Tabelle 31: Zusammensetzung 2x SDS-Probenpuffer.	104
Tabelle 32: Zusammensetzung Laemmli-Puffer.	105
Tabelle 33: Zusammensetzung der kolloidalen Coomassie-Färbelösung.	105
Tabelle 34: Entfärber/Fixierer-Lösung für kolloidale Coomassie-Färbung.	105
Tabelle 35: Zusammensetzung des Silberentfärbers/-fixierers.	105
Tabelle 36: Zusammensetzung des Farmers-Reducers.	106
Tabelle 37: Zusammensetzung der Silbernitratlösung.	106
Tabelle 38: Färbelösung.	106
Tabelle 39: Zusammensetzung des Transferpuffers.	106
Tabelle 40: Zusammensetzung des 10x PBS-Puffers.	106
Tabelle 41: Zusammensetzung der Block-Lösung.	107
Tabelle 42: Zusammensetzung der Waschlösung.	107
Tabelle 43: Zusammensetzung des Probendiluents.	107
Tabelle 44: Zusammensetzung des Rehydrierungspuffers.	107
Tabelle 45: Zusammensetzung des Equilibrierungspuffers.	108
Tabelle 46: Zusammensetzung des Equilibrierungspuffers für Sartobind® IDA75 Membranadsorber.	108
Tabelle 47: Zusammensetzung des Bindungspuffers für Sartobind® IDA75 Membranadsorber.	108
Tabelle 48: Zusammensetzung des Elutionspuffers für Sartobind® IDA75 Membranadsorber (pH 8).	108
Tabelle 49: Zusammensetzung der Cobalt-Lösung für Sartobind® IDA75 Membranadsorber.	109
Tabelle 50: Zusammensetzung der Nickel-Lösung für Sartobind® IDA75 Membranadsorber.	109
Tabelle 51: Zusammensetzung der Kupfer-Lösung für Sartobind® IDA75 Membranadsorber.	109
Tabelle 52: Zusammensetzung der Zink-Lösung für Sartobind® IDA75 Membranadsorber.	109
Tabelle 53: Zusammensetzung des Bindungspuffers für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.	109

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 54: Zusammensetzung des Elutionspuffers für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.	110
Tabelle 55: <i>Stripping</i> -Puffer für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.	110
Tabelle 56: Zusammensetzung der Cobalt-Lösung für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.	110
Tabelle 57: Zusammensetzung der Nickel-Lösung für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.	110
Tabelle 58: Zusammensetzung der Kupfer-Lösung für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.	111
Tabelle 59: Zusammensetzung der Zink-Lösung für GE Healthcare NTA-IMAC FF Säule.	111
Tabelle 60: Zusammensetzung des Startpuffers für GE Healthcare DEAE 16/10 FF Säule.	111
Tabelle 61: Zusammensetzung des Elutionspuffers für GE Healthcare DEAE 16/10 FF Säule.	111
Tabelle 62: Zusammensetzung des Lagerungspuffers.	112
Tabelle 63: Zusammensetzung der BSA-Stammlösung.	112
Tabelle 64: BSA-Standardreihe.	112
Tabelle 65: Zusammensetzung des Bradford-Reagenzes.	113
Tabelle 66: Zusammensetzung des Aktivitätspuffers.	113
Tabelle 67: Zusammensetzung der α -Humulen-Standardreihe.	113
Tabelle 68: α -Humulen-Standardreihe.	113
Tabelle 69: FPP-Substratlösungen für die Reaktionskinetik der HUM (GC-Assay).	114
Tabelle 70: FPP-Substratlösungen für die Reaktionskinetik der HUM (MG-Assay).	114
Tabelle 71: GPP-Substratlösungen für die Reaktionskinetik der HUM (MG-Assay).	114
Tabelle 72: NPP-Substratlösungen für die Reaktionskinetik der HUM (MG-Assay).	115
Tabelle 73: Zusammensetzung des Malachitgrün-Molybdat-Reagenzes.	115
Tabelle 74: Zusammensetzung der Entwicklungslösung.	116
Tabelle 75: Stammlösung für Phosphat-Standardreihe.	116
Tabelle 76: Phosphat-Standardreihe.	116
Tabelle 77: Stammlösung für Zerumbon-Standardreihe.	116
Tabelle 78: Zerumbon-Standardreihe.	117
Tabelle 79: Versuchsplan nach Box-Behnken.	140
Tabelle 80: Varianzanalyse für den Wirkungsflächenversuchsplan.	141

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Semra Alemdar
Geburtsdatum/-ort: 7. August 1988/Hannover
Nationalität: türkisch

Schulische und akademische Ausbildung

02/2014 - 01/2018 Leibniz Universität Hannover, Promotion in Chemie
Promotionsthema: Entwicklung einer biotechnologischen
Produktionsstrategie für das Sesquiterpenoid Zerumbon
10/2011 - 02/2014 Leibniz Universität Hannover, M. Sc. in Wirk- und Naturstoffchemie
Thema der Masterarbeit: Expression, Aufreinigung und Einsatz
rekombinanter Patchoulolsynthase in der Terpensynthese
10/2007 - 11/2011 Leibniz Universität Hannover, B. Sc. in Chemie
Thema der Bachelorarbeit: Proteolytischer Verdau von Simplesse -
einem neuartigen Fettaustauschstoff auf Molkenproteinbasis
08/2000 - 06/2007 Leibnizschule in Hannover, Abitur

Berufliche Erfahrungen

03/2017 - 05/2017 Honorarkraft, Deutsche Messe AG, smartLAB, Hannover
02/2014 - 03/2017 Wissenschaftliche Hilfskraft/ Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut
für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover, Hannover
08/2015 - 10/2015 Honorarkraft, Deutsche Messe AG, smartLAB, Hannover
07/2011 - 10/2011 Studentische Hilfskraft, Leibniz Universität Hannover, Institut für
Organische Chemie, Hannover
05/2009 - 10/2009 Studentische Hilfskraft, Leibniz Universität Hannover, Institut für
Anorganische Chemie, Hannover