

Untersuchungen der biokatalytischen Reduktionen von nicht-aktivierten C=C-Doppelbindungen



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

vorgelegt von

Olexandr Shuster

aus Altschewsk, Ukraine

Freiburg im Breisgau 2015

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde, sowie Zitate kenntlich gemacht wurden.

Vorsitzender des Promotionsausschusses:

Prof. Dr. Stefan Weber

Referent:

Prof. Dr. Michael Müller

Korreferent:

Prof. Dr. Andreas Bechthold

Drittprüfer:

Prof. Dr. Matthias Boll

Tag der Promotion: 24.06.2015

... it is the perpetual error of the human intellect to be more moved and excited by affirmatives than by negatives; whereas it ought properly to hold itself indifferently disposed towards both alike.

Francis Bacon, 1645

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2010 bis April 2015 am Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Müller angefertigt.

- ❖ An dieser Stelle danke ich meinem Doktorvater für das anspruchsvolle Thema, die Unterstützung und Motivation. Sein unglaublich vielseitiges Fachwissen, seine Leistungsfähigkeit und visionären Ideen waren immer ein großes Vorbild für mich.
- ❖ Herrn Prof. Dr. Andreas Bechthold danke ich für die Übernahme des Koreferats und für die Begleitung durch Studium und Forschungspraktikum.
- ❖ Frau Prof. Dr. Marion Ansorge-Schumacher und Herrn Christoph Loderer für die freundliche Bereitstellung von CPCR2.
- ❖ Herrn Dr. Thomas Drepper und Armagan Özgür für die freundliche Übernahme der Expressionsarbeiten in *Rhodobacter capsulatus* und die großzügige Bereitstellung des pRhot-Hi2-Expressionsplasmids.
- ❖ Herrn Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories und seinen Mitarbeiter Dr. Peter Siegert, Dr. Jan Castonguay für die großzügige Bereitstellung des *S. cerevisiae* Expressionstamms und – pESCHIS-Plasmids sowie der Ultrazentrifuge. Vor allem Dr. Thilo Nölke für die stets freundliche Bereitschaft alle meinen Fragen zu beantworten und für die große Hilfe bei Western Blot.
- ❖ Herrn Prof. Dr. Lutz Hein und seinen Mitarbeitern, vor allem Dr. Sebastian Preißl für die freundliche Bereitstellung der Geräte für Western Blot Analytik.
- ❖ Volker Brecht, Sascha Ferlino, Simon Waltzer danke ich für die immer einwandfreien NMR-Messungen und allgemeine Unterstützung in allen technischen und IT-Fragen.
- ❖ Hülya Kazanci für die fachliche Unterstützung im Syntheselabor.
- ❖ Außerdem danke ich Anja Rüter, Stefanie Houwaart, David Conradt, Sebastian Thölken, Dr. Tobias Huber für die Geduld beim Korrekturlesen.
- ❖ Bei Sebastian Thölken und Dr. Tobias Huber möchte ich mich ganz herzlich für die geistliche und sportliche Anregung während dieser Jahre bedanken.
- ❖ Zuletzt danke ich meiner Familie für die Unterstützung während dieser Jahre.

Inhaltsverzeichnis

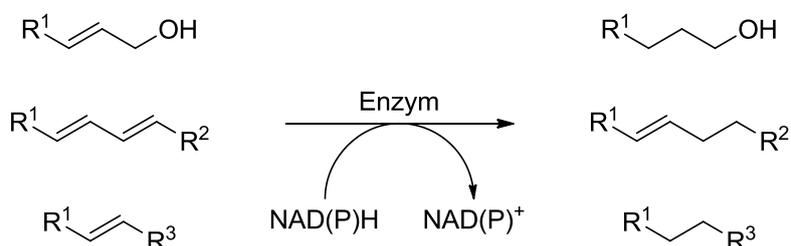
1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Cofaktorendiversität	3
2.1.1	Chemische Konvergenz	4
2.1.2	Cofaktor-bedingte Regioselektivität	5
2.1.3	Aktivierte vs. nicht aktivierte C=C-Doppelbindungen	7
2.2	Enzymatische Reduktion nicht aktivierter C=C-Doppelbindungen	8
2.2.1	Geranylgeranylreduktase	8
2.2.2	Polyprenolreduktase	9
2.2.3	Reduktion allylischer Alkohole durch Bäckerhefe	10
2.2.4	Carbonylreduktasen	10
2.2.5	Sterolbiosynthese	13
2.3	Weitere biokatalytische Aktivitäten mit bislang unbekanntem Enzymen	18
2.4	Zielsetzung	20
3	Spezieller Teil	21
3.1	Biokatalytische Reduktion von allylischen Alkoholen	21
3.1.1	Untersuchungen mit HLADH	21
A.	Biokatalyse mit HLADH-S und HLADH-E	21
B.	Reinigung der Isoenzyme HLADH-S und HLADH-E	27
C.	Biokatalyse mit gereinigten Isoenzymen HLADH-S und HLADH-E	27
3.1.2	Untersuchungen der Carbonylreduktase 2 aus <i>Candida parapsilosis</i> (CPCR2)	30
3.1.3	Untersuchungen zur Polyprenolreduktase (PPR)	32
A.	Molekularbiologische Arbeiten	32
B.	Proteinbiochemische Arbeiten	34
C.	Biokatalytische Umsetzungen mit Polyprenolreduktase	41
3.2	Biokatalytische Reduktion kumulierter C=C-Doppelbindungen	42

3.2.1	Expression in prokaryotischen Expressionssystemen	42
A.	Expressionsversuche in <i>E. coli</i>	42
B.	Expressionsversuche in <i>Rhodobacter capsulatus</i> B10S-T7	56
3.2.2	Expression in einem eukaryotischen Expressionssystem	59
A.	Molekularbiologische Arbeiten	59
B.	Expressionsversuche von Δ 14SR in <i>S. cerevisiae</i>	62
3.2.3	Δ 14SR aus <i>S. cerevisiae</i> (ERG24).....	71
A.	Molekularbiologische Arbeiten	71
B.	Protein-biochemische Arbeiten	72
C.	Biokatalytische Umsetzungen mit ERG24	74
4	Diskussion und Ausblick.....	77
4.1	Reduktion der allylischen Alkohole	77
4.1.1	Ausblick neue Enzyme	79
4.2	Reduktion kumulierter C=C-Doppelbindungen	81
4.2.1	Weitere Sterolreduktasen.....	82
4.3	Mechanistische Aspekte	83
4.3.1	Reduktion allylischer Alkohole	83
4.3.2	Reduktion der C=C-Doppelbindung in einem Diensystem.....	84
5	Experimenteller Teil.....	88
5.1	Materialien und Methoden	88
5.1.1	Verwendete Materialien und Geräte.....	88
5.1.2	Nährmedien	90
5.1.3	Puffer	95
5.1.4	Verwendete Stämme.....	106
5.1.5	Verwendete Vektoren	106
5.1.6	Verwendete Plasmide	107
5.2	Molekularbiologische Arbeiten und Methoden.....	108
5.2.1	Allgemeine Methoden	108

5.2.2	Herstellung der Expressionsplasmide.....	111
A.	Für <i>E. coli</i> Stämme	111
B.	Für <i>Rh. capsulatus</i> B10S-T7	114
C.	Für <i>S. cerevisiae</i>	115
5.3	Biochemische Arbeiten und Methoden	120
5.3.1	Allgemeine Methoden	120
5.3.2	Kultivierung der <i>E. coli</i> Kulturen	125
5.3.3	Expression in <i>E. coli</i> Stämmen.....	126
5.3.4	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	128
5.3.5	Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>	129
5.4	Chemische Synthesen.....	134
5.4.1	Lösungsmittel und Chemikalien.....	134
5.4.2	Analytik	134
5.4.3	Synthese der Substrate.....	136
5.5	Bestimmung der Aktivität von HLADH-Isoenzymen	138
5.6	Enzymatische Reaktionen	139
5.6.1	Negativkontrollen	139
5.6.2	Biokatalytische Reduktionen mit HLADH-Isoenzymen.....	140
5.6.3	Biokatalytische Umsetzungen mit CPCR2.....	144
5.6.4	Biokatalytische Umsetzungen mit PPR.....	145
5.6.5	Biokatalytische Umsetzungen mit ERG24	145
6	Abkürzungsverzeichnis	147
7	Abbildungsverzeichnis	150
8	Schemataverzeichnis	156
9	Tabellenverzeichnis.....	156
10	Literatur.....	157
11	Anhang	162

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung NAD(P)H-abhängiger Oxidoreduktasen und ihrer Rolle in der Reduktion der nicht aktivierten C=C-Doppelbindungen.



Schema 1: Theoretische biokatalytische Reduktion einer nicht aktivierten C=C-Doppelbindung.

Bislang ist kein technischer biokatalytischer Prozess nach Schema 1 mit einem isolierten Enzym für diesen Reaktionstyp bekannt. Außerdem konnte die in der Literatur beschriebene enzymatische Reduktion allylischer Alkohole noch nicht eindeutig geklärt werden. Diese Tatsachen dienen als Grundlage für die durchgeführten Untersuchungen.

Im ersten Teil wird die vermeintliche Reduktion der allylischen Alkohole durch die NADH-abhängigen Oxidoreduktasen Alkoholdehydrogenase aus *Equus caballus* (HLADH, engl. für horse liver alcohol dehydrogenase) und Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (CPCR) aufgeklärt. Durch die Verwendung gereinigter Proteine kombiniert mit dem Einsatz Deuterium-markierter Substanzen konnte eine Nebenaktivität nachgewiesen werden, welche durch andere Reduktasen des Expressionsorganismus hervorgerufen wird. Dies wiederum ermöglichte die Erklärung der zuvor publizierten Ergebnisse.

Zusätzlich wurde die membranintegrierte Polyprenolreduktase aus *Rattus norvegicus* (PPR) als potenzieller Kandidat für die biokatalytische Reduktion allylischer Alkohole untersucht. Die heterolog exprimierte PPR wurde für die Reduktion kurzkettiger Substanzen Farnesol (**8**) und Geranylgeraniol (**9**) aus der Klasse der Polyprenole getestet.

Der zweite Teil der Arbeit beschreibt die Expressionsversuche und die katalytische Aktivität der Δ 14-Sterol-Reduktase aus *Rattus rattus* (Δ 14SR) und des funktional homologen Enzyms aus *Saccharomyces cerevisiae* (ERG24). NADPH-abhängige membranintegrierte ERG24 aus dem Sterolbiosyntheseweg wurde für die Reduktion der $\Delta^{14(15)}$ -Doppelbindung in einem $\Delta^{8,14}$ -Diensystem (**17**) verwendet.

Basierend auf der umfassenden Analyse der enzymatischen Reduktion von nicht-aktivierten C=C-Doppelbindungen wird ein neues Paradigma bezüglich der limitierenden Faktoren in NAD(P)H-katalysierten C=C-Reduktionen sowie der reaktionsmechanistischen Aspekten der Reduktion von allylischen Alkoholen vorgeschlagen.

2 Einleitung

Die chemisch-pharmazeutische Industrie verzeichnet eine ständig wachsende Nachfrage nach neuen chiralen, enantiomerenreinen Chemikalien und Wirkstoffen.^[1] Die organische Chemie bietet hierfür eine Vielzahl von Synthesestrategien und Herstellungsmethoden. Durch die wachsenden Ansprüche bezüglich der Chemo- und Stereoselektivität, Wirtschaftlichkeit sowie Nachhaltigkeit treten die biokatalytischen Prozesse immer mehr in den Vordergrund.^[2-5]

Inmitten der großen Vielfalt an funktionellen Gruppen stellen ungesättigte Verbindungen wertvolle Ausgangsubstanzen und Zwischenstufen in der chemischen Synthese dar. Vor allem C=C-Doppelbindungen sind sowohl chemisch als auch biokatalytisch leicht zugänglich, sie sind stabil und bieten die Möglichkeit, weitere funktionelle Gruppen einzuführen.^[6-10] Durch ihre Prochiralität ist eine gerichtete stereoselektive Reaktion mit dem Einführen von bis zu zwei Stereozentren im gleichen Schritt möglich.^[11]

Zudem spielen ungesättigte Verbindungen sowie ihre Metabolisierung eine wichtige Rolle in allen Organismen. Biokatalytische Redoxreaktionen an C=C-Doppelbindungen sind in den drei Domänen Bakterien, Archaeen und Eukaryoten weit verbreitet. Die dafür verantwortlichen Enzyme sind sowohl an katabolen, anabolen, als auch regulativen Prozessen beteiligt. Damit eignen sie sich als mögliche Ziele für therapeutische Ansätze.

Die bereits bekannten biokatalytischen Reduktionen von nicht aktivierten C=C-Doppelbindungen, ihre mechanistischen Aspekte und die Bedeutung in der Natur werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

2.1 Cofaktorendiversität

Unter den Oxidoreduktasen sind Nicotinamid- und Flavin-basierte Cofaktoren am weitesten verbreitet. Diese lassen sich in zwei große Gruppen einteilen: Nicotinamidadenindinukleotid/Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat ($\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$) mit ihren reduzierten Formen NADH/NADPH und Flavinmononukleotid (FMN bzw. FMNH_2 als reduzierte Form)/Flavinadenindinukleotid (FAD bzw. FADH_2) (Abbildung 1).

Der entscheidende Unterschied zwischen diesen zwei Gruppen besteht darin, dass NAD(P)H nur ein Elektronenpaar als Hydrid (H^-) übertragen kann während die Flavin-abhängigen Oxidoreduktasen entweder zwei einzelne Elektronen und zwei Protonen nacheinander oder ein

Hydrid und Proton gemäß dem ECE/ECEC-Prinzip (E steht für den elektrochemischen, C – für chemischen Schritt) übertragen können.^[12] Dementsprechend benötigen die NAD(P)H-abhängigen Enzyme eine davor stattfindende Aktivierung der Doppelbindung. Im Gegensatz dazu sind die Flavin-abhängigen Enzyme in der Lage einen radikalischen Ablauf der Reduktion an einer nichtaktivierten C=C-Doppelbindung zu katalysieren.

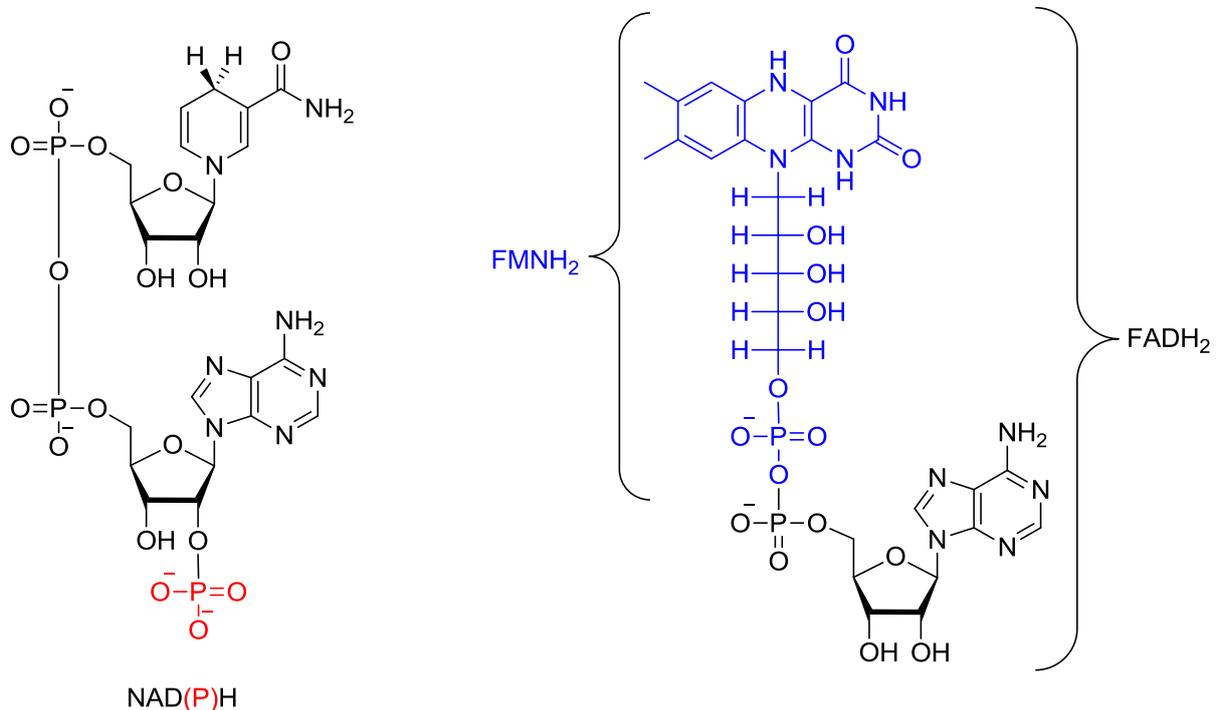


Abbildung 1: Die Cofaktoren Nicotinamadenindinukleotid/Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NAD⁺/NADP⁺) in ihrer reduzierten Form (NADH/NADPH) und Flavinmononukleotid/Flavinadenindinukleotid (FMN/FAD) in ihrer reduzierten Form (FMNH₂/FADH₂).

Darüber hinaus sind Eisen-Schwefel-Cluster und F₄₂₀-basierte Cofaktoren (ein Deazaflavin-Analogon von FAD) als Elektronenquelle für diese Art der Reduktion bekannt.^[13–16] Die durch Licht katalysierte NADPH-abhängige Reduktion von Protochlorophyllid stellt eine zusätzliche Variante der C=C-Reduktion dar.^[17,18]

2.1.1 Chemische Konvergenz

Diese Vielfalt an Biokatalysatoren kann unter dem Begriff „chemische Konvergenz“ eingeordnet werden. Das bedeutet, dass sich im Laufe der Evolution mehrere Wege in der Biosynthese entwickelt haben, welche am Ende zu gleichen oder sehr ähnlichen Produkten führen können. Diese Eigenschaft kann anhand des Beispiels der Reduktion aktivierter C=C-Doppelbindungen erläutert werden.

So können Carveol (**1**) und Dihydrocarveol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle von *Rhodococcus erythropolis* DCL14 assimiliert werden. Bei **1** findet zuerst die Oxidation zu Carvon (**2**) statt, welches anschließend durch Carvonreduktase (CR; EC 1.3.99.25) zu Dihydrocarvon (**2a**) reduziert wird (Abbildung 2).

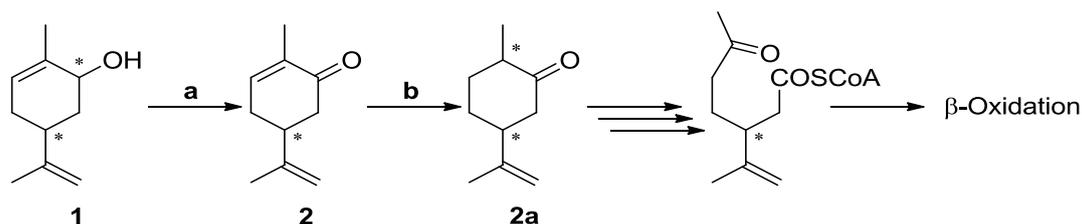


Abbildung 2: Abbau von Carveol (**1**) in *Rhodococcus erythropolis* DCL14. **a** Carveoldehydrogenase, **b** Carvonreduktase.^[19]

Die beschriebene Carvonreduktase zeigt keine Präferenz zu einem der bisher bekannten Cofaktoren.^[19] Im Gegensatz dazu katalysiert die Enreduktase¹ aus *Nicotiana tabacum* die gleiche Reaktion strikt NADPH-abhängig, ohne weitere Cofaktoren zu benötigen (*syn*-Addition von fiktivem H₂).^[20]

Zudem kann Carvon (**2**) aber auch durch Old Yellow Enzymes (engl. OYE), welche zu den Flavin-abhängigen Oxidoreduktasen gehören, reduziert werden. Diese katalysieren in vielen olefinischen und cyclischen Substraten eine *trans*-Addition von H₂ an eine aktivierte Doppelbindung.^[21] Zu dieser Gruppe gehören unter anderem die FMN-abhängige OYE1 aus *Saccharomyces pastorianus*, die Pentaerythryltetranitratreduktase (PETNR) aus *Enterobacter cloacae* st. PB2 sowie die thermophile Enreduktase (engl. Thermophile Old Yellow Enzyme, TOYE) aus *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* E39.^[22–24]

2.1.2 Cofaktor-bedingte Regioselektivität

An der β -Oxidation der Fettsäuren sind ebenfalls C=C-Reduktasen beteiligt. Vor allem beim Abbau mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Säugetieren katalysieren sie den zentralen Reduktionsschritt von *trans*-2,*trans*-4-Dienoyl-CoA (**3**) zu *trans*-3-Enoyl-CoA (**3a**) (Abbildung 3). Die humane mitochondriale NADPH-abhängige 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase (DCR; EC 1.3.1.34) katalysiert diese Reduktion durch eine direkte Hydrid-Übertragung an C5 und anschließende Protonierung an C2.^[25] In deutlichem Kontrast dazu stehen die homologen

¹ Enreduktasen katalysieren die Reduktion von aktivierten C=C-Doppelbindungen in α,β -ungesättigten Verbindungen.

bakteriellen 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktasen. DCR aus *Escherichia coli* enthält nichtkovalent gebundene FAD- und FMN-Moleküle und ein Eisen-Schwefel-Cluster (4Fe-4S-Cluster) als Cofaktoren. Der Elektronentransfer erfolgt zunächst durch die direkte Hydridübertragung von NADPH zu FAD, das resultierende FADH₂ reduziert über das 4Fe-4S-Cluster das FMN-Molekül. Anschließend findet eine Hydridübertragung vom FMNH₂ an das C5 des Substrates statt, gefolgt von der Protonierung an C4. Als Produkt entsteht *trans*-2-Enyol-CoA (**3a'**).^[26]

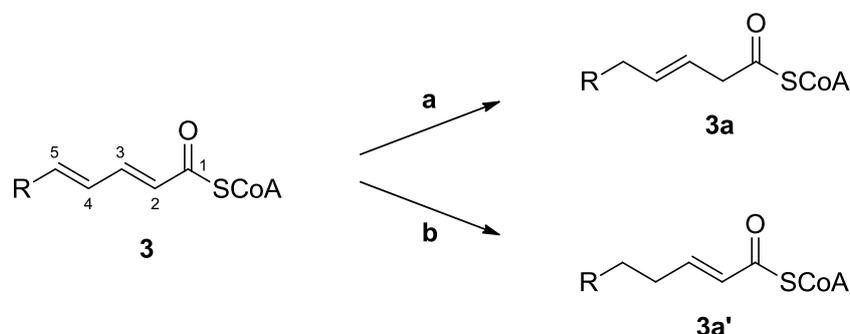


Abbildung 3: Reduktion eines Diensystems durch 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktasen. **a** humane mitochondriale NADPH-abhängige 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase;^[25] **b** FAD-/FMN- und 4Fe-4S-Cluster abhängige 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase aus *E. coli*.^[26]

Im Fall von 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktasen wird die ausgeprägte Regioselektivität biokatalytischer Prozesse verdeutlicht, da hier die verschiedenen Cofaktorsysteme Verwendung finden.

Das folgende Beispiel aus der Natur zeigt, dass diese Regioselektivität auch mit dem gleichen Cofaktor erreicht werden kann. An der Biosynthese von (-)-Menthol in *Mentha × piperita* sind zwei Oxidoreduktasen beteiligt. (-)-Isopiperitenonreduktase (ISPR; EC 1.3.1.82) katalysiert NADPH-abhängig die Reduktion von (-)-Isopiperitenon (**4**) zu (+)-*cis*-Isopulegon (**4a**) (Abbildung 4).

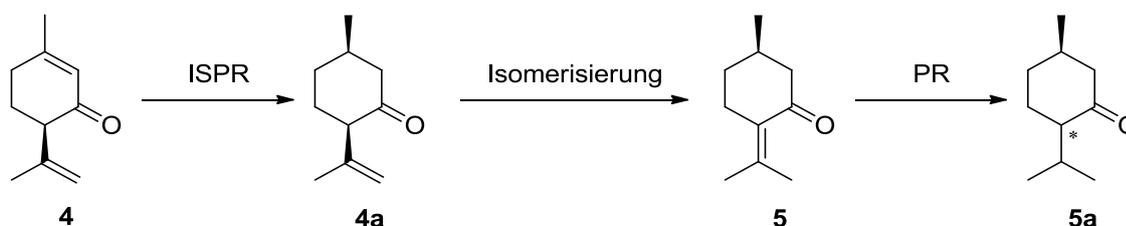


Abbildung 4: Ausschnitt aus der Mentholbiosynthese; regioselektive Reduktion, katalysiert durch die beiden NADPH-abhängigen (-)-Isopiperitenonreduktase (ISPR) und (+)-Pulegonreduktase (PR).

Nach der Isomerisierung zu (+)-Pulegon (**5**) wird dieses durch (+)-Pulegonreduktase (PR; EC 1.3.1.81) wiederum NADPH-abhängig zu (-)-Menthon (**5a**) reduziert.^[27]

Parallel zur Regioselektivität ist auch eine bemerkenswerte Stereoselektivität für die biokatalytischen Reduktionen charakteristisch. Allerdings wird diese Eigenschaft nicht ausschließlich durch den verwendeten Cofaktor oder die Enzymkonfiguration bestimmt. Substratkonformation, Lage des Substrates im aktiven Zentrum, sowie die unterschiedlich ablaufende Protonierung können die Stereoselektivität bedeutend beeinflussen.^[22,28,29]

2.1.3 Aktivierte vs. nicht aktivierte C=C-Doppelbindungen

In summa können die biokatalytischen C=C-Reduktionen der aktivierten Doppelbindungen mit ausgezeichneter Regio- und Stereoselektivität ablaufen. Die natürliche Vielfalt von verschiedenen Enzymen bietet eine große Auswahl an synthetischen Möglichkeiten (engl. „biocatalytic toolbox“). Dementsprechend gewinnen die zuvor beschriebenen und viele weitere Flavin- und NAD(P)H-abhängige Enreduktasen immer mehr an Bedeutung in der angewandten Biokatalyse. Jedoch stoßen die Enreduktasen mit ihrem Substratspektrum bei den nicht aktivierten C=C-Bindungen an ihre Grenzen.^[2,4,11,21,30]

Dies führt zu dem Grundgedanken dieser Arbeit: Ist es möglich, die Cofaktor-Diversität aus dem Bereich der Enreduktasen auch auf die Reduktion nicht aktivierter C=C-Doppelbindungen zu übertragen? Im Gegensatz zu den Enreduktasen finden diese Reduktasen bis jetzt keine Anwendungen in der technischen Biokatalyse. Auch die dazugehörigen Mechanismen sind noch nicht ausreichend erforscht.

2.2 Enzymatische Reduktion nicht aktivierter C=C-Doppelbindungen

2.2.1 Geranylgeranylreduktase

In lebenden Organismen spielen die nicht aktivierten isolierten bzw. konjugierten Doppelbindungen eine wichtige Rolle. So sind Archaeen aufgrund der Zusammensetzung ihrer Membranlipide in der Lage unter widrigen äußeren Bedingungen wie hohen Temperaturen und Salzkonzentrationen sowie extremen pH-Werten zu überleben. Im Gegensatz zu anderen Organismen bestehen die archealen Membranlipide nicht aus mit Glycerol veresterten Fettsäuren, sondern aus Isoprenoid-Glycerol-Ethern.^[31] Durch die Reduzierung der Doppelbindungszahl in den Isoprenoidketten (Membranrigidität) können sich Archaeen an äußere Bedingungen anpassen. Die Schlüsselrolle in diesen reduktiven Prozessen spielen Flavin-abhängige Geranylgeranylreduktasen (GGR; EC 1.3.1.83). Sie katalysieren schrittweise eine partielle oder vollständige Reduktion der isolierten C=C-Doppelbindungen in den Isoprenoidketten von 2,3-Di-*O*-Digeranylgeranylgeranyl-glycerolphosphat (**6**) zu 2,3-Di-*O*-Phytyl-glycerolphosphat (**6a**) (Abbildung 5, A).^[32-34] Bei der Umsetzung von Geranylgeranyldiphosphat (**7**) zu Phytyldiphosphat (**7a**) durch einige archeale oder auch pflanzliche GGRs wird die Doppelbindung in der α -Position nicht reduziert (Abbildung 5, B).^[34,35]

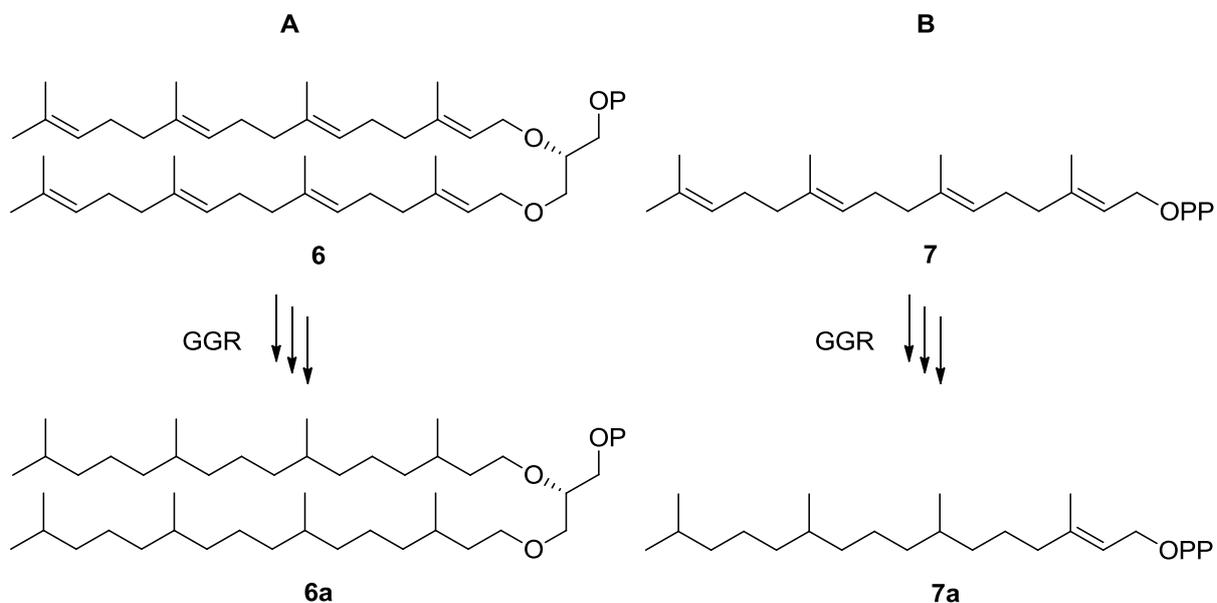


Abbildung 5: Reduktion nichtaktivierter C=C-Doppelbindungen, katalysiert durch GGR. **A:** 2,3-Di-*O*-Digeranylgeranyl-glycerolphosphat (**6**) zu 2,3-Di-*O*-Phytyl-glycerolphosphat (**6a**) durch GGR aus *H. japonica*.^[32] **B:** Geranylgeranyldiphosphat (**7**) zu Phytyldiphosphat (**7a**) durch GGR aus *Arabidopsis thaliana* und *Sulfolobus sp.*^[34,35]

2.2.2 Polyprenolreduktase

Dolichole sind ubiquitäre langkettige mehrfachungesättigte primäre Alkohole bestehend aus 16–21 Isopreneinheiten, wobei die α -Position gesättigt vorliegt (Abbildung 6). Diese Verbindungen spielen eine wichtige Rolle bei der N-Glykosylierung von Proteinen während posttranslationaler Modifikationen. Dolichole werden durch die Reduktion der α -ständigen C=C-Doppelbindung aus Polyprenolen produziert.^[36,37] Diese Reduktion wurde in Arbeiten von Ekström *et al.*, 1986 sowie Sagami *et al.*, 1993 und 1996 untersucht; das katalysierende Enzym in *Rattus sp.* und *S. cerevisiae* konnte als eine membranintegrierte NAD(P)H-abhängige Polyprenolreduktase (PPR) identifiziert werden.^[38-40] Im Jahr 2010 wurde das humane Gen *SRD5A3* von Cantagrel *et al.* beschrieben. Obwohl *SRD5A3* als Mitglied der Familie der Steroid-5 α -Reduktasen annotiert ist, katalysiert es selektiv die Reduktion der α -Einheit in Polyprenolen (Abbildung 6).

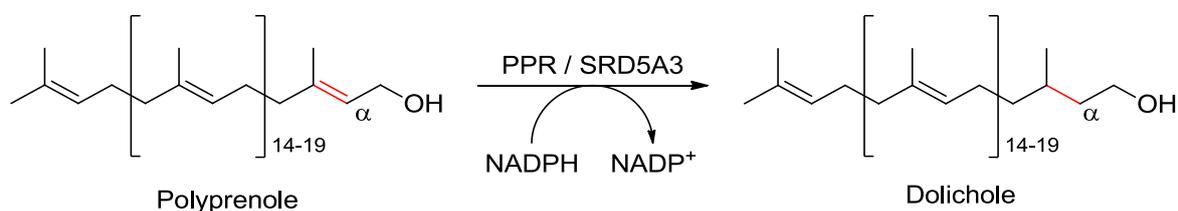


Abbildung 6: Reduktion der α -ständigen C=C-Doppelbindung in Polyprenolen, katalysiert durch PPR und *SRD5A3*.

In vitro Umsetzungen von Polyprenol-18 zu Dolichol-18 mit einem zellfreien Proteinextrakt aus mit dem *SRD5A3*-Gen transfizierten Säugetierzellen belegten die vermutete Reduktase-Aktivität. Allerdings wurden neben dem Hauptprodukt Dolichol-18 Nebenprodukte wie Polyprenol-19 und Dolichol-19 beobachtet.^[41] Diese Tatsache spricht dafür, dass die isolierten Polyprenole weiter phosphoryliert werden können und als Substrate sowohl für die Kettenverlängerung als auch für die Reduktion und Dephosphorylierung dienen können.

Kleinere polyprenolähnliche Moleküle wie Farnesol (**8**) oder Geranylgeraniol (**9**) wurden bislang noch nicht als Substrate eingesetzt, ebenso wurde die PPR bisher nicht heterolog exprimiert und als aktives Protein isoliert (Abbildung 7).

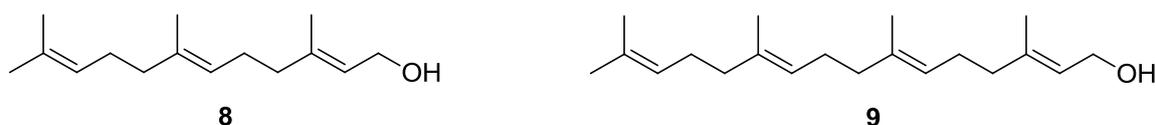


Abbildung 7: Mögliche Substrate für PPR.

2.2.3 Reduktion allylischer Alkohole durch Bäckerhefe

Die Reduktion von α,β -ungesättigten Alkoholen durch Ganzzell-Katalyse mit Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) wurde in zahlreichen Publikationen beschrieben.^[42–48] Eine direkte Reduktion der Doppelbindung erscheint aus mindestens zwei Gründen eher unwahrscheinlich: (i) Bisher wurden keine analoge Umsetzungen *in vitro* mit isoliertem Enzym nachgewiesen. Die Ganzzell-Katalyse erlaubt keine eindeutige Aussage über die einzelnen katalysierten Reaktionen, da Bäckerhefe eine große Zahl verschiedener Oxidoreduktasen aufweist;^[49,50] (ii) Entsprechend den publizierten Daten von Ferraboschi *et al.*, 1999 ist *S. cerevisiae* in der Lage, ausgehend von allylischen Alkoholen und entsprechenden ungesättigten Dimethylacetalen gesättigte Alkohole mit identischer Stereochemie zu produzieren (Abbildung 8).^[47]

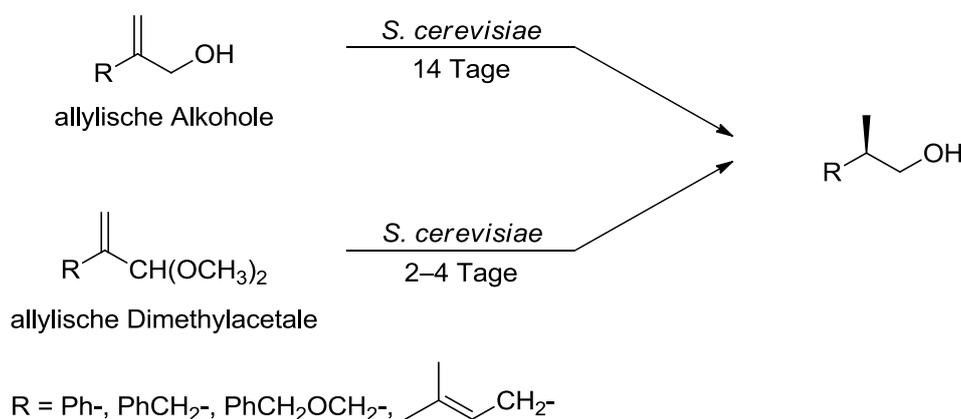


Abbildung 8: Die durch Bäckerhefe katalysierte Umwandlung von allylischen Alkoholen und Dimethylacetalen zu gesättigten Alkoholen nach Ferraboschi *et al.*, 1999.^[47]

Ein ähnliches Verhalten weist *S. cerevisiae* mit Geraniol/Nerol und den entsprechenden Aldehyden Geranial/Neral auf. Diese Beobachtungen können durch ein Zusammenspiel von zwei unterschiedlichen Enzymen – einer Alkoholdehydrogenase und einer Enreduktase – erklärt werden. Die entsprechenden Aldehyde können dabei als Intermediate auftreten.^[43,44,51]

2.2.4 Carbonylreduktasen

Die Alkoholdehydrogenase aus *Equus caballus* (HLADH; EC 1.1.1.1) und die Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (CPCR; EC 1.1.1.1) gehören zur Klasse der Zn^{2+} -abhängigen Oxidoreduktasen und sind sehr gut charakterisiert. Beide weisen ein breites Substratspektrum auf und katalysieren unter anderem die NADH-abhängige Reduktion von Ketogruppen zu sekundären Alkoholen.^[52–59]

Die biokatalytische Reduktion eines α,β -ungesättigten Ketons zu einem gesättigten Alkohol konnte bislang nur in Umsetzungen mit ganzen Zellen gezeigt werden (Abbildung 9).^[60,61]

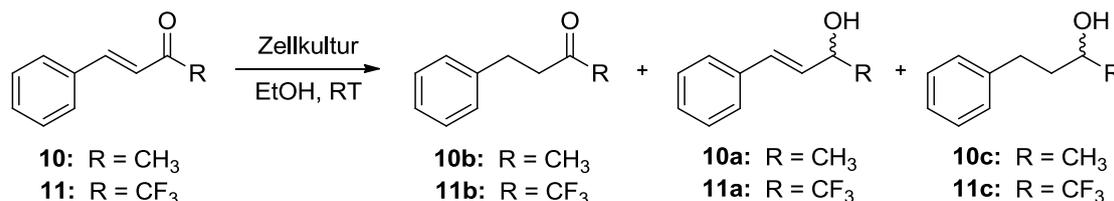


Abbildung 9: Reduktion von (E) -4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**) bzw. (E) -1,1,1-Trifluor-4-phenylbut-3-en-2-on (**11**), katalysiert durch *Geotrichum candidum*, *Hansenula anomala*, *S. cerevisiae* oder *Kloeckera saturnus* nach 27 Stunden in entsprechenden Puffern.^[60,61]

Erste Umsetzungen von (E) -4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**) mit aus *C. parapsilosis* DSM 70125 isolierter, partiell gereinigter CPCPR wurden von Zelinski *et al.*, 1999 durchgeführt. Die Bildung von 4-Phenylbutan-2-ol (**10c**) wurde auf eine 5%ige Verunreinigung des Eduktes mit dem gesättigten Keton 4-Phenylbutan-2-on (**10b**), welches ebenfalls von CPCPR reduziert wird, zurückgeführt.^[62] Ein weiteres Beispiel für eine CPCPR-katalysierte C=C-Doppelbindungsreduktion wurde von Thomas Schubert (Dissertation, 2002) beschrieben.^[63] Hier wurde neben dem olefinischen Alkohol **10a** auch der gesättigte Alkohol **10c** bis zu 40–50% Umsatz als zusätzliches Produkt beobachtet. Durch die Verwendung von angereinigten Enzympräparationen konnte die Bildung gesättigter Alkohole nicht eindeutig geklärt werden. Tatsächlich zeigte die zusätzlich chromatographisch aufgereinigte CPCPR eine um 25% reduzierte Bildung von **10c** (Abbildung 10).^[63] Jakoblinnert *et al.*, 2012 und Man *et al.*, 2014 zeigten, dass CPCPR in zwei isomeren Formen (CPCPR1 und CPCPR2) vorliegen kann. CPCPR2 (kodiert durch das *sadh*-Gen, NCBI: AB010636.1, UniProt: O42703) weist ein größeres Substratspektrum inklusive aromatische Verbindungen auf, womit die beschriebenen Umsetzungen von **10** auf eine Aktivität vom CPCPR2-Isoenzym zurück zu führen sind.^[57,59,64]

Ähnliche biokatalytische Aktivitäten wurden für HLADH beobachtet.^[63,65] HLADH gehört zur Familie der MDR (engl. für Medium-chain Dehydrogenases/Reductases) und kann in den zwei isomeren Formen E und S aus der Pferdeleber isoliert werden. In den späten 1960ern wurden die Isoenzyme von Pietruszko und Theorell erstmals beschrieben. Ihre fast identischen tertiären Strukturen ermöglichen die Bildung von dimeren Einheiten wie EE, ES oder SS.^[66] Spätere Untersuchungen zeigten, dass sich die beiden Isoenzyme in zehn Aminosäuren (neun Substitutionen und eine Deletion) unterscheiden. Diese Mutationen betreffen sowohl die an der Enzymoberfläche als auch im Inneren liegenden Aminosäuren. Die letzteren werden durch kleinere Aminosäuren ausgetauscht, so dass HLADH-S insgesamt positiver geladen vorliegen kann. Dadurch wird eine Änderung im Substratspektrum verursacht: Bedingt durch

eine langsamere Freisetzung von NADH aufgrund der positiven Ladung des Enzyms und daraus resultierenden stärkeren Wechselwirkungen zwischen dem Cofaktor und Enzym, zeigt HLADH-S eine geringere Aktivität in der Oxidation kurzkettiger, aliphatischer Alkohole (vor allem Ethanol). Auch die vergrößerte Bindungstasche führt zur verminderten Aktivität bezüglich der Oxidation von Ethanol.^[67,68] Eine weitere Besonderheit betrifft die Oxidation der Hydroxylgruppe großer Moleküle, wie der Steroide (z.B. 3 β -Hydroxysteroid). Diese Aktivität ist die Folge einer Deletion (D115), welche die Beweglichkeit der Aminosäure L116 im aktiven Zentrum erhöht und damit die Bindung von großen Molekülen erlaubt.^[68,69]

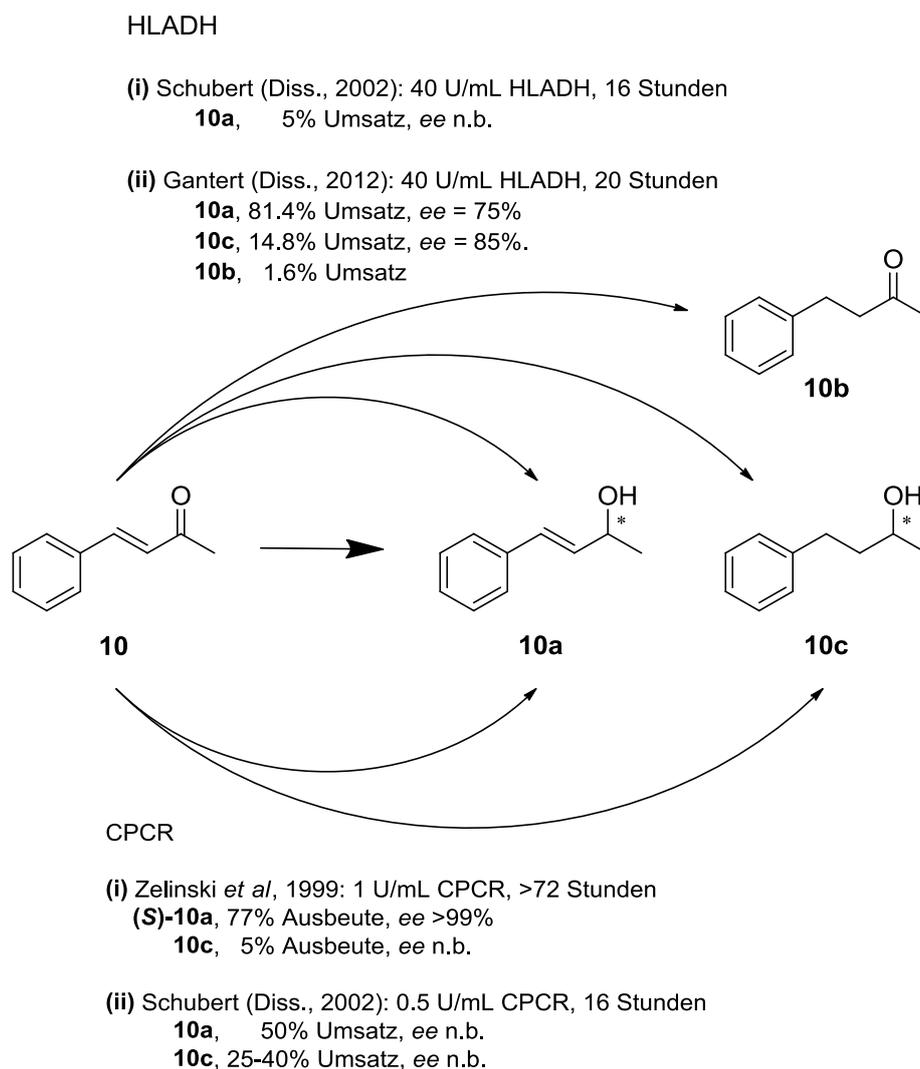


Abbildung 10: Umsetzungen von **10** (10–20 mM), katalysiert durch zellfreie Proteinrohextrakte von HLADH und CPCR.^[62,63,65] Alle Umsetzungen wurden mit 0.25–0.5 mM NAD⁺/(H) (Formiatdehydrogenase/Natriumformiatgekoppelte Cofaktorregenerierung oder Zugabe vom Cofaktor in der reduzierten Form) in TEA-Puffer (100 mM, pH 7.0), RT durchgeführt.

Im Fall der HLADH können die Unterschiede zwischen den beiden Isoenzymen E und S für die Erklärung der entstehenden Produkte herangezogen werden. Damit ist der in Abbildung 11

dargestellte Reaktionsablauf **A** mit der Reduktion von intermediär entstehendem allylischem Alkohol ähnlich zu PPR vorstellbar.

Eine andere mögliche Erklärung ist das Zusammenspiel verschiedener Enzyme, vor allem wenn das entsprechende Produktgemisch nach einem Ganzzellumsatz oder mit einem nicht gereinigten zellfreien Proteinrohextrakt erhalten wird. Dabei kann auch der alternative Reaktionsablauf **B**, bei dem die Reduktion der Doppelbindung den ersten Reaktionsschritt darstellt, nicht ausgeschlossen werden (Abbildung 11).

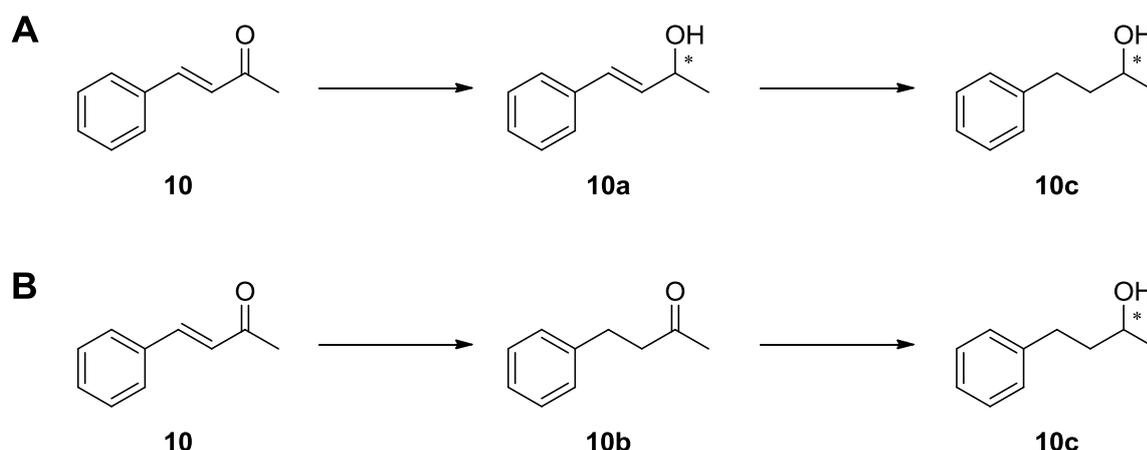


Abbildung 11: Mögliche zweistufige Reaktionsabläufe **A** und **B** bei der HLADH-katalysierten Reduktion von (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**).

2.2.5 Sterolbiosynthese

Sterine (Sterole) sind eine wichtige Gruppe der Membranlipide und spielen eine zentrale regulative Rolle in Eukaryoten, insbesondere als Vorläufer von Vitaminen und Hormonen bei der Embryogenese in Tieren.^[70–72]

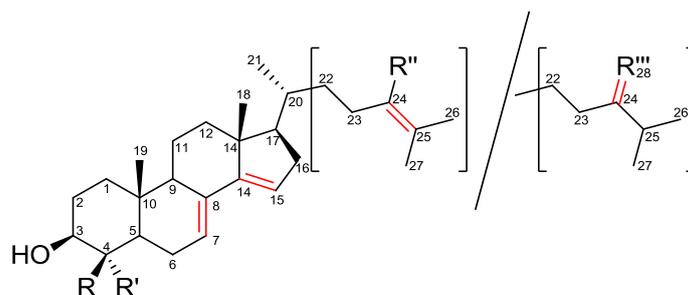


Abbildung 12: Sterol-Grundgerüst; reduzierbare C=C-Bindungen sind rot markiert. Weitere, nicht reduzierbare Doppelbindungen sind nicht eingezeichnet; R = -H, -CH₃, R' = -H, -CH₃, R'' = -CH₃, -C₂H₅, R''' = -CH₂, -CHCH₃.

Im Verlauf der Sterolbiosynthese werden die aus Lanosterol entstehenden Steroidvorläufermoleküle zwei bis drei C=C-Reduktionsschritten unterzogen. Die ungesättigten Bindungen zwischen den Atomen C7 und C8, C14 und C15, C24 und C25, sowie C24 und C28 (im Folgenden benannt als Δ^7 , Δ^{14} , Δ^{24} und $\Delta^{24(28)}$) werden abhängig von dem Organismus in unterschiedlichem Ausmaß reduziert (Abbildung 12).^[73–75] Allen diesen Bindungen ist ihr nicht aktivierter Charakter gemeinsam, wobei Δ^7 , Δ^{14} und $\Delta^{24(28)}$ im entsprechenden Substratmolekül als Diensysteme $\Delta^{5,7}$, $\Delta^{8,14}$ bzw. $\Delta^{22,24(28)}$ vorliegen (Abbildung 13).

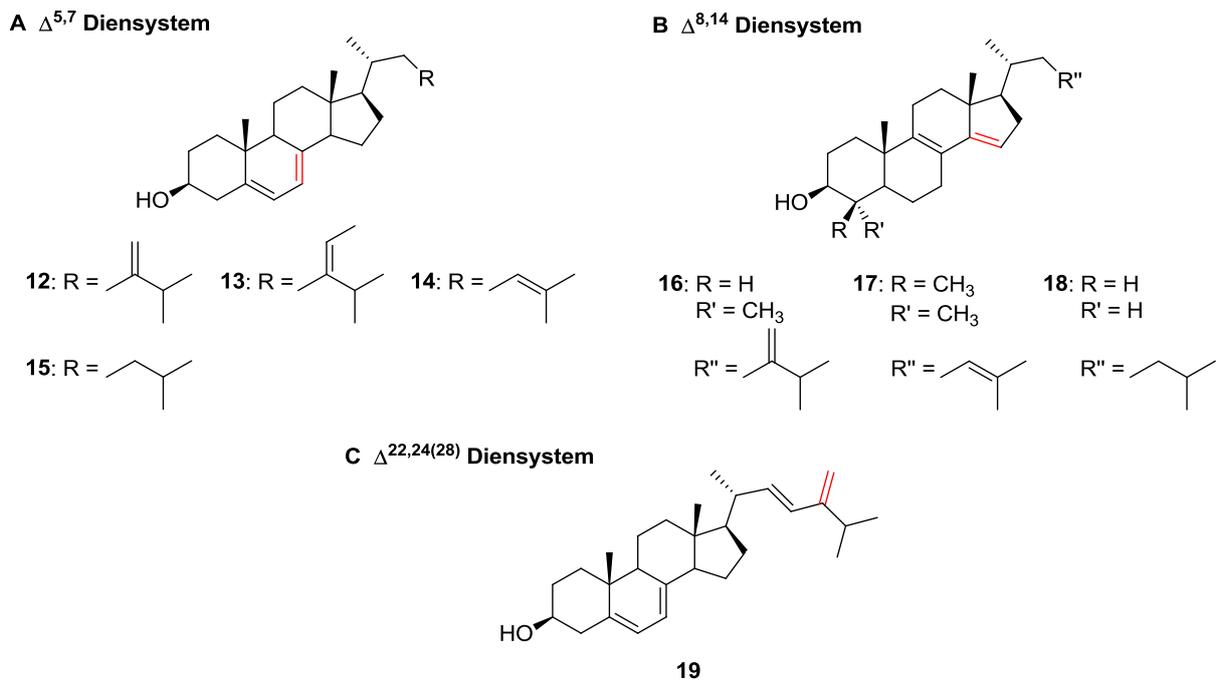


Abbildung 13: Diensysteme in der Sterolbiosynthese (reduzierbare Doppelbindungen sind rot markiert). **A:** 5-Dehydroepisterol (**12**), 5-Dehydroavenasterol (**13**), 7-Dehydrodesmosterol (**14**), 7-Dehydrocholesterol (**15**); **B:** 4 α -Methyl-5 α -ergosta-8,14,24(28)-trien-3 β -ol (**16**), 4,4-Dimethyl-5 α -cholesta-8,14,24-trien-3 β -ol (**17**), 5 α -Cholesta-8,14-dien-3 β -ol (**18**); **C:** Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3 β -ol (**19**).

Die entsprechenden Enzyme und die für sie kodierenden Gene wurden in den letzten 50 Jahren entdeckt und weitgehend charakterisiert ohne dass die Proteinstrukturen bislang kristallografisch bestimmt wurden. Eine heterologe Expression wurde bis auf wenige Ausnahmen noch nicht erfolgreich durchgeführt. Daher haben diese membranständigen Enzyme noch keine Bedeutung in der angewandten Biokatalyse.

Δ^7 -Sterol-Reduktase (auch 7-Dehydrocholesterol-Reduktase, 7DHCR)

Die NADPH-abhängige Reduktase Δ^7 SR (EC 1.3.1.21) wird im Menschen und in Tieren durch das Gen *DHCR7* kodiert. Δ^7 SR wird als membranintegriertes Protein mit bis zu neun Transmembranen Einheiten (TM-Einheiten) im endoplasmatischen Retikulum (ER)

exprimiert.^[76,77] Das native Enzym wurde 1997 von Lee und Paik aus Rattenleber gewonnen und unter anderem für die Reduktion der Δ^7 -Doppelbindung in 7-Dehydrocholesterol (**15**) und Ergosterol (**19a**) eingesetzt (siehe Abbildung 14 bzw. Abbildung 16).^[78] Außerdem wurde die $\Delta 7SR$ aus *Homo sapiens* und *Rattus sp.* in *S. cerevisiae* heterolog exprimiert, wobei eine funktionale mikrosomale Aktivität für die oben genannten Substrate nachgewiesen wurde.^[76,77]

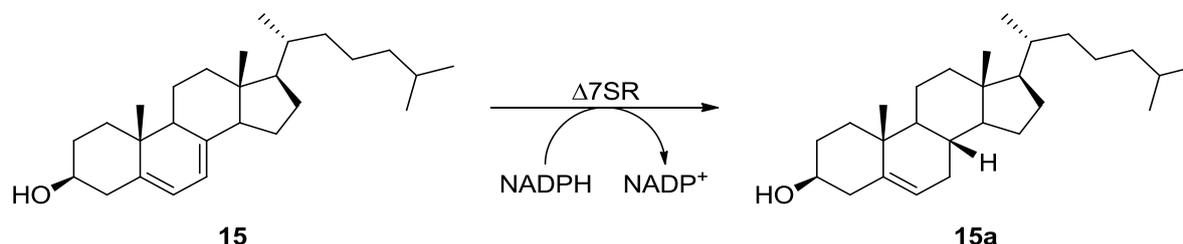


Abbildung 14: Reduktion der Δ^7 -Doppelbindung in 7-Dehydrocholesterol (**15**), katalysiert durch $\Delta 7SR$.^[79]

Obwohl eine streng NADPH-abhängige Reaktion in den obengenannten Studien gezeigt wurde, schließen spätere Untersuchungen die Beteiligung eines weiteren Cofaktors oder Enzyms nicht komplett aus.^[80,81]

$\Delta 14$ -Sterol-Reduktase ($\Delta 14SR$, auch *Delta14SR*)

$\Delta 14SR$ (EC 1.3.1.70) wird im Menschen und in Tieren durch das Gen *TM7sf2* (engl. für transmembrane 7 superfamily member 2), in höheren Pflanzen durch das Gen *FACKEL* und in Hefen, z.B. *S. cerevisiae*, durch *ERG24* kodiert. Wie $\Delta 7SR$ wird auch $\Delta 14SR$ als ein membranintegriertes Protein mit bis zu neun TM-Einheiten im ER exprimiert. Die durch dieses Enzym katalysierte NADPH-abhängige Reduktion der Δ^{14} -Doppelbindung findet in allen natürlich vorkommenden $\Delta^{8,14}$ -Dien-3 β -olen statt (Abbildung 13, A).^[82–84] Die ersten Untersuchungen mit einem nativen, gereinigten Protein aus *Rattus rattus* zeigten anhand des Beispiels von 4,4-Dimethyl-5 α -cholesta-7,14-dien-3 β -ol (**20**), dass $\Delta 14SR$ auch die $\Delta^{7,14}$ -Diensysteme reduzieren kann (Abbildung 13, B).^[85,86] Kim *et al.*, 1995 haben diese Ergebnisse bestätigt.^[87] Hingegen konnten die Untersuchungen mit zellfreiem Proteinrohextrakt aus Maiskeimen (*Zea mays*) nur eine Aktivität an $\Delta^{8,14}$ -Diensystemen nachweisen.^[88] Insgesamt deutet alles darauf hin, dass die $\Delta^{14(15)}$ -Doppelbindung nur in einem konjugierten Diensystem reduziert werden können. In der Arbeit von Prakash und Kasbekar, 2002 wurden bereits die für die Bindung von NADPH verantwortlichen Aminosäuren am Beispiel der ERG3-Reduktase aus *Neurospora crassa* identifiziert. Anhand der in der Membran liegenden essentiellen konservierten Aminosäuren wurde Tyrosin 445 als wahrscheinlicher Protondonor vorgeschlagen. Y445 ist von anderen aromatischen Aminosäuren wie F446, Y447,

Y450 und F451 umgeben. Diese Reste könnten sich an der Stabilisierung des Carbokations beteiligen.^[89] Insgesamt ist $\Delta 14SR$ eine der am besten charakterisierten Sterol-Reduktasen.

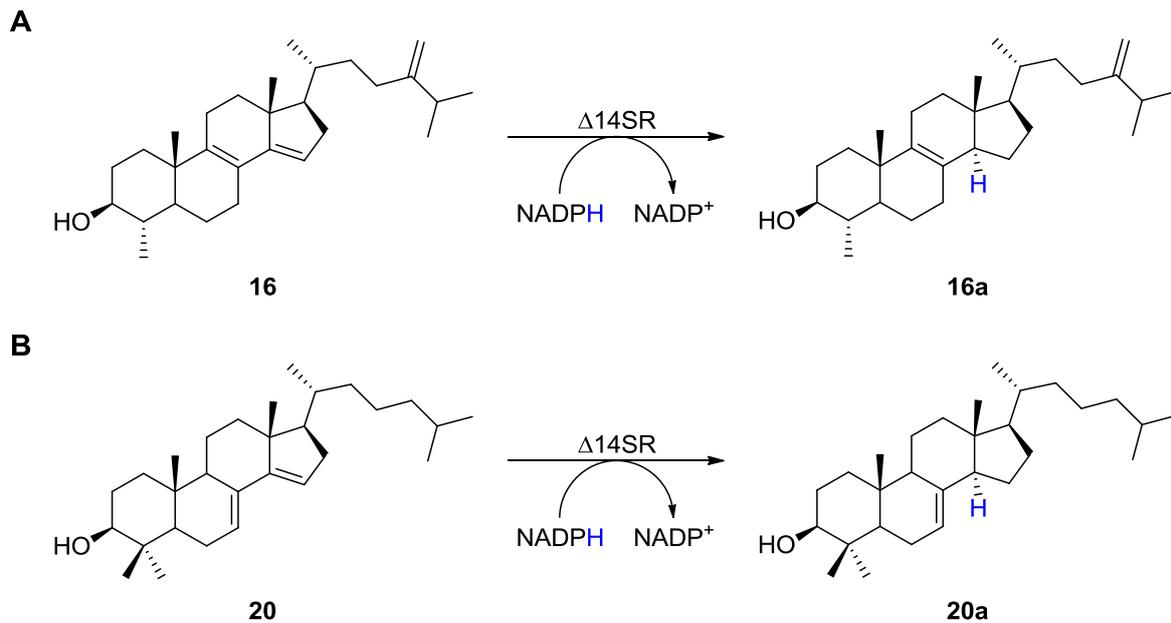


Abbildung 15: Reduktion der Δ^{14} -Doppelbindung am Beispiel von **A:** 4 α -Methyl-5 α -ergosta-8,14,24(28)-trien-3 β -ol (**16**)^[83] und **B:** 4,4-Dimethyl-5 α -cholesta-7,14-dien-3 β -ol (**20**),^[85,86] katalysiert durch $\Delta 14SR$.

Pilzliche $\Delta 24(28)$ -Sterol-Reduktase

Im letzten Schritt der Ergosterolbiosynthese findet die Reduktion von Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3 β -ol (**19**) katalysiert durch $\Delta 24(28)SR$ (EC 1.3.1.71) statt. Diese wird in *S. cerevisiae* durch das Gen *ERG4* kodiert und im ER als NADPH-abhängige, membranintegrierte Reduktase mit bis zu neun TM-Einheiten exprimiert. Die $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung wird als Teil eines konjugierten $\Delta^{22,24(28)}$ -Diensystems durch $\Delta 24(28)SR$ reduziert werden (Abbildung 16).^[90,91]

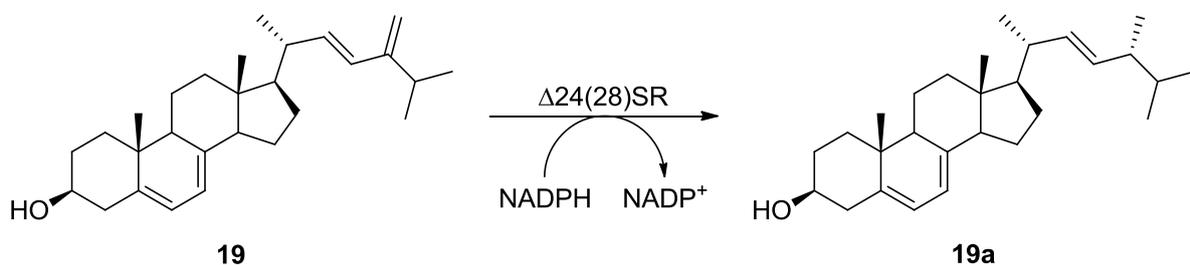


Abbildung 16: Reduktion der $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung in Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3 β -ol (**19**), katalysiert durch $\Delta 24(28)SR$.^[90]

Die Untersuchung von Lecain *et al.*, 1996 zeigte, dass alle drei Reduktasen $\Delta 7SR$, $\Delta 14SR$ und $\Delta 24(28)SR$ zu einer Familie gehören.^[92]

Pflanzliche $\Delta 24$ -Sterol-Reduktase ($\Delta 24SR$)

Im Vergleich zu Ergosterol-produzierenden Pilzen fungieren in höheren Pflanzen Campesterol (**22a**), sowie Sitosterol (**24a**) als Endprodukte der Sterolbiosynthese. So werden die isolierten $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindungen in Ergosta-5,24(28)-dien-3 β -ol (**21**) und Isofucosterol (**23**) zunächst zu 24-Methyl-desmosterol (**22**) bzw. $\Delta^{24(25)}$ -Sitosterol (**24**) isomerisiert und anschließend zu Campesterol (**22a**) bzw. Sitosterol (**24a**) reduziert (Abbildung 17). Die dafür verantwortliche Reduktase At $\Delta 24SR$ wird in *Arabidopsis thaliana* durch das Gen *DIMINUTO/DWARF1* (*DIM/DWF1*) kodiert und stellt ein membran-assoziiertes Protein mit ein bis zwei TM-Einheiten dar.^[93] Anders als die bisher erwähnten Sterol-Reduktasen enthält At $\Delta 24SR$ eine FAD-bindende Domäne, wobei FAD bis jetzt nicht eindeutig als Hydrid-Donor identifiziert wurde.^[94,95] At $\Delta 24SR$ wurde erfolgreich in *S. cerevisiae* exprimiert und ist in der Lage die *S. cerevisiae* *ERG4*-Nullmutante zu komplementieren.^[96]

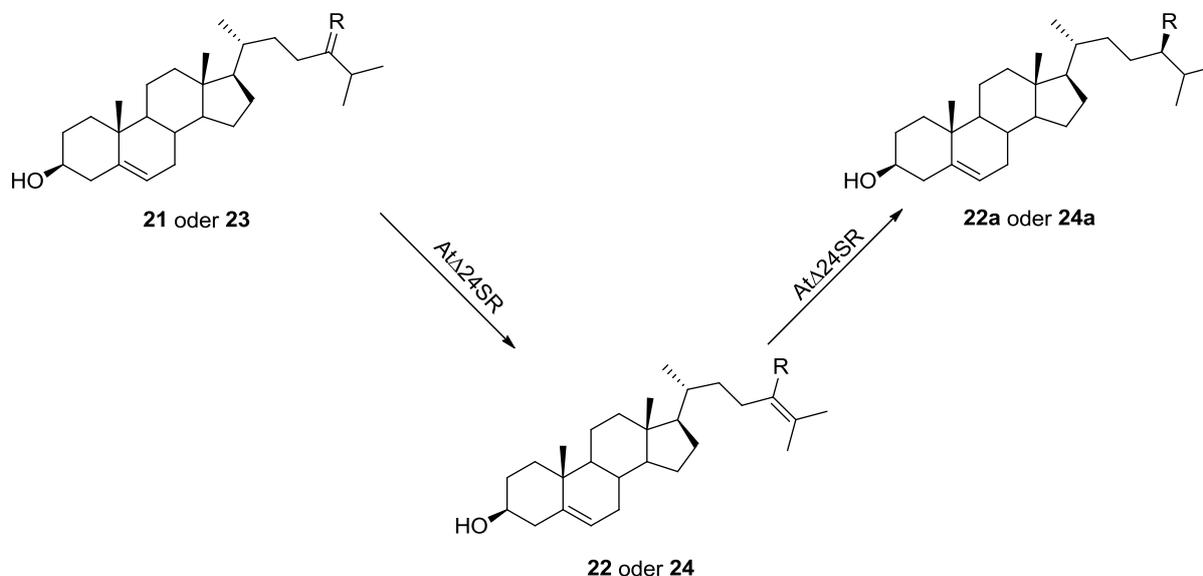


Abbildung 17: Isomerisierung der $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung zu $\Delta^{24(25)}$ mit darauffolgender Reduktion der $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung, katalysiert durch At $\Delta 24SR$. R = -CH₂ bei **21**, R = -CH₃ bei **22** und **22a**; R = -CHCH₃ bei **23**, R = -CH₂CH₃ bei **24** und **24a**.

Humane (tierische) $\Delta 24$ -Sterol-Reduktase ($\Delta 24SR$)

Das zum pflanzlichen *DIM/DWF1*-Gen homologe humane Gen *DHCR24* kodiert eine FAD-abhängige Oxidoreduktase (Hs $\Delta 24SR$, auch Seladin-1 Produkt genannt). Hs $\Delta 24SR$ (EC 1.3.1.72) wird im ER durch eine TM-Einheit verankert, dementsprechend kann sie als ein teilweise lösliches, membranständiges Enzym betrachtet werden. Obwohl das natürliche Substrat Desmosterol (**14a**) dem Substrat der At $\Delta 24SR$ ähnlich ist, weist Hs $\Delta 24SR$ mit dieser nur eine 4%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz auf (Abbildung 18).^[95,97] Anders als At $\Delta 24SR$ kann Hs $\Delta 24SR$ die Funktion der *S. cerevisiae* *ERG4*-Nullmutante nicht

wiederherstellen.^[98] Dieser Unterschied deutet darauf hin, dass die Art des beteiligten Cofaktors und die Proteineigenschaften (Topologie, Anzahl der TM-Einheiten, Löslichkeit) mit der Regio- und Stereoselektivität der katalysierten Reaktion korrelieren könnten.

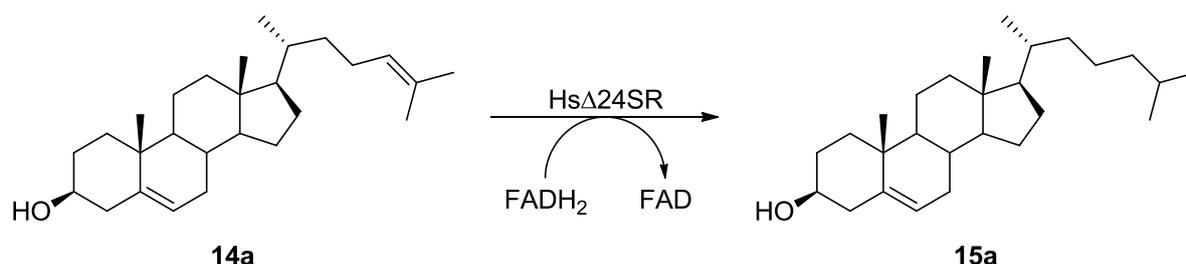


Abbildung 18: Reduktion der $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung in Desmosterol (**14a**), katalysiert durch Hs Δ 24SR.

2.3 Weitere biokatalytische Aktivitäten mit bislang unbekannten Enzymen

Neben den bis jetzt beschriebenen, durch bekannte Enzyme katalysierten Reduktionen existieren zahlreiche Belege für weitere biokatalytische, Organismus-bezogene Reduktionen nicht aktivierter C=C-Doppelbindungen. Unter diesen Enzymen sind Securinireduktase aus *Aspergillus versicolor* D-1,^[99,100] Zeatinreduktase aus *Phaseolus vulgaris* und *Pisum sativum*,^[101,102] Prenylreduktase aus *Actinoplanes missouriensis*,^[103] sowie Dihydrovomileninreduktase aus *Rauwolfia serpentina*.^[104,105]

Bei Securinireduktase ist der analoge Reaktionsmechanismus wie bei FAD- und 4Fe-4S-abhängigen 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase aus *E. coli* vorstellbar (Kapitel 2.1.2).^[26] Damit kann diese $\Delta^{14(15)}$ -Doppelbindung in **25** als eine aktivierte C=C-Doppelbindung und Securinireduktase als eine Enreduktase betrachtet werden (Abbildung 19).

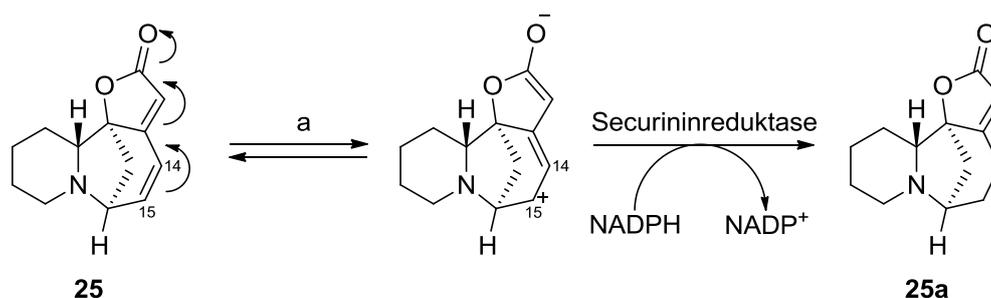


Abbildung 19: Möglicher Reaktionsmechanismus von Securinireduktase aus *Aspergillus versicolor* D-1; a: Enzym-katalysierte Aktivierung der γ,β -Doppelbindung.^[100]

Das entsprechende Gen ist bislang unbekannt.

Bei der Polyketidbiosynthese von Alkyl-*O*-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinon in *Actinoplanes missouriensis* findet eine Reduktion von der γ,β -ständigen C=C-Doppelbindung in prenyliertem Alkylphenol **26** statt (Abbildung 20).

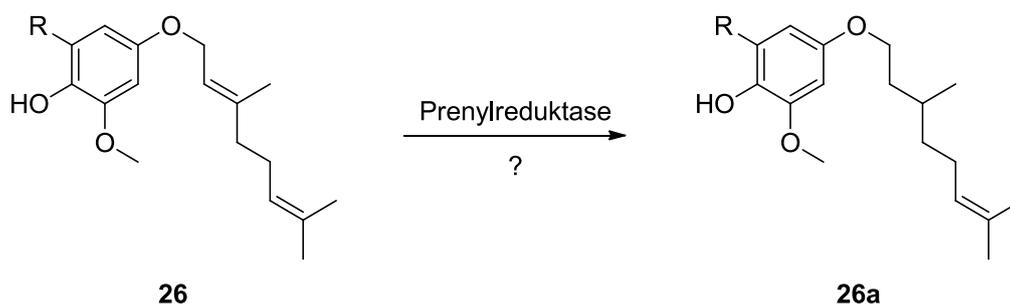


Abbildung 20: Putative Prenylreduktase aus der Biosynthese von Alkyl-*O*-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinonen in *Actinoplanes missouriensis*. R = Fettsäuren(C16–C17).^[103]

Das dafür verantwortliche Enzym ist bislang nicht bekannt. Eine Prenylreduktase („Geranylreduktase“) wird hier vermutet.^[103] Analog zu bereits bekannten Geranylgeranylreduktasen kann diese Reduktion FAD-abhängig ablaufen (siehe Kapitel 2.2.1).

Zeatinreduktase (EC 1.3.1.69) aus *Phaseolus vulgaris* und *Pisum sativum* katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Zeatin (**27**) zu Dihydrozeatin (**27a**) (Abbildung 21).^[101,102]

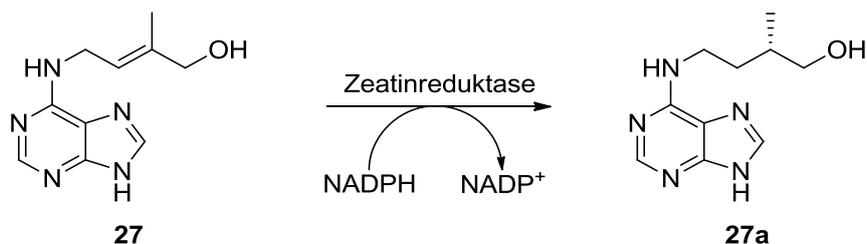


Abbildung 21: Reduktion von **27** durch Zeatinreduktase.^[101]

Das dafür kodierende Gen ist bislang unbekannt.

Eine ähnliche Aktivität weist Dihydrovomileninreduktase (DHVR; EC 1.3.1.73) aus *Rauvolfia serpentina* auf (Abbildung 22).^[104,105]

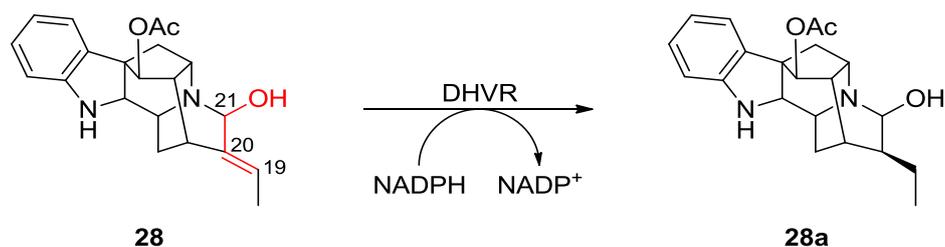


Abbildung 22: Reduktion von 1,2-Dihydrovomilenin (**28**) durch DHVR.^[104]

Die durch Zeatinreduktase und DHVR katalysierten Reaktionen korrelieren mit der Aktivität von Polyprenolreduktase; beide Substrate enthalten einen allylischen Alkohol als Teilstruktur und entsprechen damit den Polyprenolen (siehe Kapitel 2.2.2). Anders als Polyprenolreduktase sind Zeatinreduktase und DHVR lösliche Proteine und stellen damit vielversprechende Untersuchungsobjekte dar.

2.4 Zielsetzung

Biokatalytische Reduktionen nicht aktivierter C=C-Doppelbindungen allylischer Alkohole sowie isolierter/kumulierter Doppelbindungen haben bisher keine Bedeutung in der angewandten Biokatalyse. Daher wird die Untersuchung solcher Reduktasen als zentrale Frage der vorliegenden Arbeit definiert.

Mit dem Ziel, neue Anwendungen für isolierte C=C-reduzierende Enzyme zu etablieren, ergeben sich definierte Anforderungen an Expressionssysteme, Enzyme/Cofaktoren und katalysierte Reaktionen:

- Zur Untersuchung sollen Enzyme mit bereits bekannter Gensequenz herangezogen werden, wobei lösliche und stabile Enzyme bevorzugt betrachtet werden.
- Besonderes Augenmerk richtet sich auf NAD(P)H-abhängige Reduktasen aufgrund der vielen bereits etablierten Methoden der Cofaktor-Regenerierung.
- Einfache, robuste Expressionssysteme, allen voran bakterielle, werden bevorzugt. Damit sollen heterolog exprimierte, reine Enzyme zugänglich sein.
- Ein möglichst breites Substratspektrum, welches vor allem kleine Moleküle beinhaltet, soll zugänglich gemacht werden.

Anhand der chemischen Struktur der Substrate kann die vorliegende Arbeit in zwei Bereiche geteilt werden:

- I. Reduktion allylischer Alkohole.
- II. Reduktion kumulierter Doppelbindungen (-C=C-C=C-).

3 Spezieller Teil

3.1 Biokatalytische Reduktion von allylischen Alkoholen

Die Oxidoreduktasen HLADH und CPCR, sowie PPR sind nach aktuellem Wissensstand die einzigen isolierten Enzyme mit entsprechend bekannter Gensequenz, für welche eine mögliche Reduktion der C=C-Bindung in allylischen Alkoholen gezeigt werden konnte.^[38–41,62,63,65]

Keines der drei Enzyme wurde bisher als ein heterolog exprimiertes, rekombinantes und isoliertes Protein für entsprechende Biokatalysen verwendet.

Damit die gewünschte biokatalytische Aktivität nachgewiesen und einem Enzym eindeutig zugeordnet werden kann, sollen die genannten Enzyme in möglichst hoher Reinheit erhalten werden. Die dazugehörigen molekularbiologischen und proteinbiochemischen Arbeiten werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

3.1.1 Untersuchungen mit HLADH

Wie erwähnt, wird HLADH in Pferdeleber in Form von zwei Isoenzymen E und S exprimiert. Frühere Umsetzungen wurden mit einem Isoenzymgemisch durchgeführt (Kapitel 2.2.4). Mittlerweile sind beide rekombinanten Isoenzymreinen Varianten kommerziell zugänglich. Damit soll die Rolle der einzelnen Isoenzyme bei der Umsetzung von olefinischen Ketonen und Alkoholen näher untersucht werden.

A. Biokatalyse mit HLADH-S und HLADH-E

Zuerst soll geprüft werden, ob (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**) von HLADH-S bzw. HLADH-E als Substrat akzeptiert wird. Dazu wurde das olefinische Keton **10** sowohl von den einzelnen Isoenzymen als auch mit einem 1:1 Gemisch aus beiden Varianten umgesetzt (Abbildung 23).

Umsetzungen mit HLADH-E und HLADH-S ohne Cofaktorregenerierung

Bei der Umsetzung von (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**) mit jeweils einem der beiden rekombinanten Isoenzyme von HLADH (ohne Cofaktorregenerierung) wurde die Bildung des gesättigten Ketons **10b** und des gesättigten Alkohols **10c** beobachtet. Der olefinische Alkohol **10a** konnte im Rohproduktgemisch nicht identifiziert werden. HLADH-S zeigt mit 50% Gesamtumsatz eine höhere Aktivität als das E-Isoenzym mit entsprechend 18% Gesamtumsatz

(laut $^1\text{H-NMR}$ -Analytik nach drei Tagen). Zudem zeigt HLADH-S eine Präferenz zur Bildung des gesättigten Ketons (Produktverhältnis mittels GC-MS bestimmt: **10b/10c** 4:1) verglichen mit HLADH-E (**10b/10c** 1:1.4).

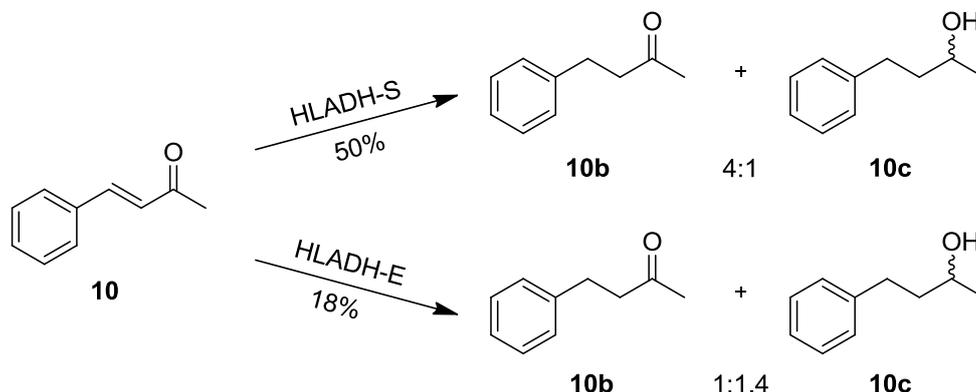


Abbildung 23: Umsetzung von **10** (10 mM) mit HLADH-S und HLADH-E. Bedingungen: 15 mM (1.5 Äq.) NADH, 40 U HLADH-S bzw. HLADH-E, KPi -Puffer (50 mM, pH 7.3), 25 °C. Gesamtumsatz nach drei Tagen Reaktionszeit bestimmt durch $^1\text{H-NMR}$ bzw. Produktverhältnis durch GC-MS. HLADH-S: Umsatz 50%, Produktverhältnis 4:1 zugunsten **10b**; HLADH-E: Umsatz 18%, Produktverhältnis 1:1.4 zugunsten **10c**.

Die gleichzeitige Anwendung von beiden Isoenzymen (1:1, ohne Cofaktorregenerierung) führte zur Bildung der oben genannten Produkte im Verhältnis **10b/10c** 3.6:1 (GC-MS) mit einem Umsatz von >98% nach drei Tagen ($^1\text{H-NMR}$). Der mögliche Grund dafür kann die zweifache Menge an Protein bzw. Cofaktor sein; so kann das Edukt **10** bereits in der initialen Phase zum größten Teil zu entsprechenden Produkten umgesetzt werden.

Umsetzungen mit HLADH-E und HLADH-S mit enzymgekoppelter Cofaktorregenerierung

Für die Cofaktorregenerierung wurde zusätzlich das Enzym Glucosedehydrogenase (GDH) sowie D-Glucose als Substrat verwendet. Dabei wird D-Glucose durch GDH zu D-Gluconolacton unter Bildung von NAD(P)H oxidiert. Dadurch wird eine kontinuierliche Zufuhr des Cofaktors in reduzierter Form gewährleistet (Abbildung 24).^[106,107]

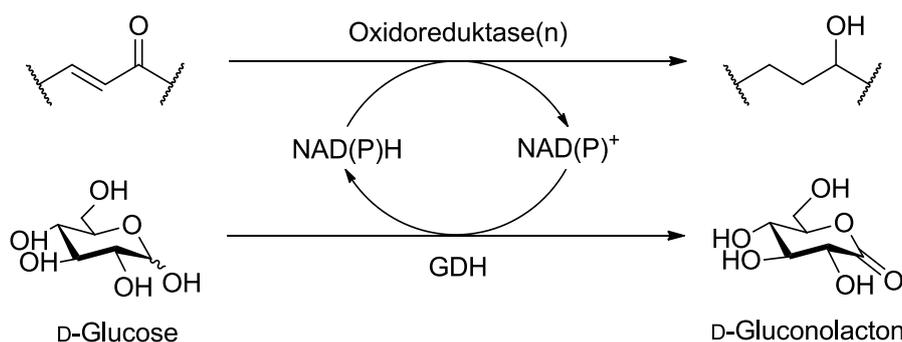
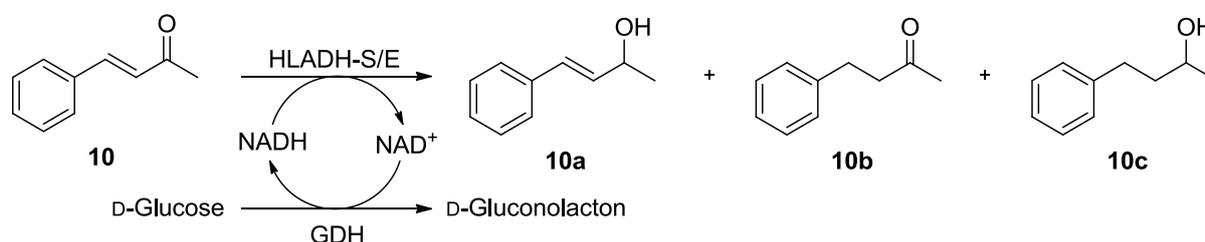


Abbildung 24: Enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung mit GDH und Glucose.

Bei der ausreichenden Bereitstellung des Cofaktors verläuft die HLADH-S/E-katalysierte Reaktion anders als in Abbildung 23 dargestellt, so dass 4-Phenylbutan-2-ol (**10c**) im Überschuss im Vergleich zu 4-Phenylbutan-2-on (**10b**) mit beiden Isoenzymen erhalten wurde. Zusätzlich kann die Bildung von (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (**10a**) beobachtet werden (Abbildung 25).



	HLADH-S	HLADH-E
Gesamtumsatz	32% ^{a)}	35% ^{b)}
10a	16%	21%
10b	1%	2%
10c	15%	12%

^{a)} Nach 20 Stunden Reaktionszeit, ^{b)} nach 21 Stunden Reaktionszeit.

Abbildung 25: Reduktion von **10** (10 mM) unter Glucose/GDH-Cofaktorregenerierung. Bedingungen: NAD⁺ (6 mol%), Glucose (5 Äq.), 40 U HLADH-S bzw. HLADH-E, 2 µL GDH (>500 U·mL⁻¹), TEA/NaOH-Puffer (100 mM, pH 7.0), 25 °C. Reaktionskontrolle erfolgte durch GC-MS.

Durch die Verwendung des Cofaktorregenerierungssystems im vom Hersteller angegebenen TEA/NaOH-Puffer (Triethanolamin/NaOH, 100 mM, pH 7.0) wurden für beide Isoenzyme vergleichbare Umsätze und Produktverhältnisse bestimmt. So erreicht HLADH-S nach 20 Stunden 32% Umsatz bzw. HLADH-E 35% nach 21 Stunden (GC-MS). In beiden Fällen entsteht der olefinische Alkohol **10a** als Hauptprodukt, gefolgt von **10c** und **10b**. Bei diesem System fallen die Unterschiede in den Aktivitäten von HLADH-S und -E weniger stark aus als unter Verwendung von KP_i-Puffer ohne Cofaktorregenerierung. Entsprechend lässt das Angleichen der verwendeten Biokatalysebedingungen einen Vergleich mit weiteren untersuchten Enzymen zu (Kapitel 3.1.2, CPCR).

Ein möglicher Einfluss von GDH auf das Produktverhältnis sollte ausgeschlossen werden. Dazu wurden alle vier Verbindungen **10**, **10a-c** mit GDH und NAD⁺ im analytischen Maßstab umgesetzt. Anhand der erhaltenen Ergebnisse stellen keine der getesteten Substanzen ein Substrat für GDH dar.

Umsetzung von (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (**10a**) mit HLADH

Um die Reihenfolge der durch HLADH-E/S katalysierten Umsetzung von Enon **10** eindeutig feststellen zu können, soll zunächst die Eignung von (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (**10a**) als Substrat untersucht werden. Dazu wurde das racemische **10a** ausgehend von **10** durch die Reduktion mit NaBH₄ synthetisiert. Der allylische Alkohol **10a** bleibt unter den Katalysebedingungen stabil und zeigt in der Lösung keine Disproportionierung zum Keton **10**. Bei der Umsetzung von **10a** mit HLADH-E unter N₂-Schutzatmosphäre konnten sowohl Oxidationsprodukte wie **10**, als auch Reduktionsprodukte wie **10b** und **10c** im Rohprodukt nachgewiesen werden. Das mögliche Reaktionsschema ist in Abbildung 26 dargestellt.

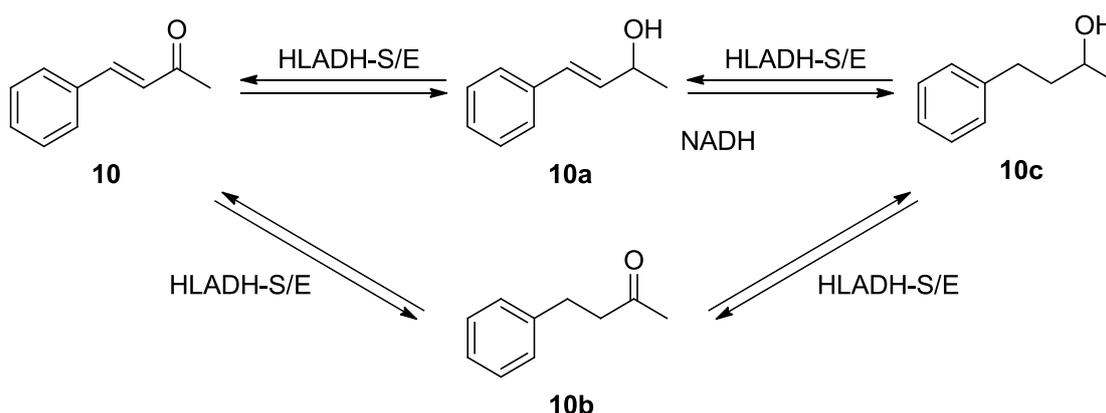


Abbildung 26: Mögliche Reaktionswege bei der biokatalytischen Umsetzung von allylischem Alkohol **10a** mit HLADH Isoenzymen.

Um das Reaktionsgleichgewicht möglichst nach rechts – auf die Seite der Reduktion – zu verschieben, wurde die oben genannte Umsetzung von allylischem Alkohol **10a** entweder mit einem Überschuss an NADH oder unter Cofaktorregenerierung durchgeführt.

Zudem wurde *rac*-[2-2H]-(*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (**10a_d**) als Substrat verwendet. Dadurch soll eine direkte Reduktion der C=C-Bindung in olefinischem Alkohol **10a** nachgewiesen werden.

Umsetzung von *rac*-[2-2H]-(*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (**10a_d**) mit HLADH

rac-[2-2H]-(*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (**10a_d**) wurde durch die Reduktion von (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**) mit NaBD₄ unter Zusatz von CeCl₃·7H₂O synthetisiert und in einer Ausbeute von 23% erhalten (Abbildung 27).

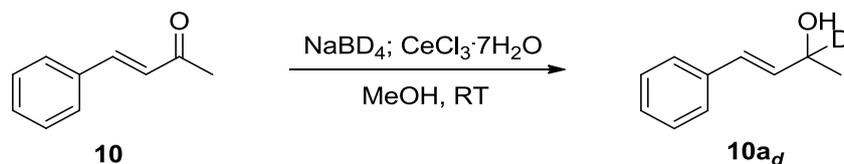


Abbildung 27: Synthese von Deuterium-markierten allylischen Alkohol **10a_d**.

Der deuterierte allylische Alkohol **10a_d** wurde mit HLADH-S und drei Äquivalenten NADH umgesetzt. Die Bildung des gesättigten Alkohols 4-Phenylbutan-2-deuterium-2-ol (**10c_d**), zumindest als Gemisch mit nicht deuteriertem Alkohol **10c**, konnte anhand des Massenspektrums (GC-MS) und 2D-NMR bestätigt werden (Abbildung 28).

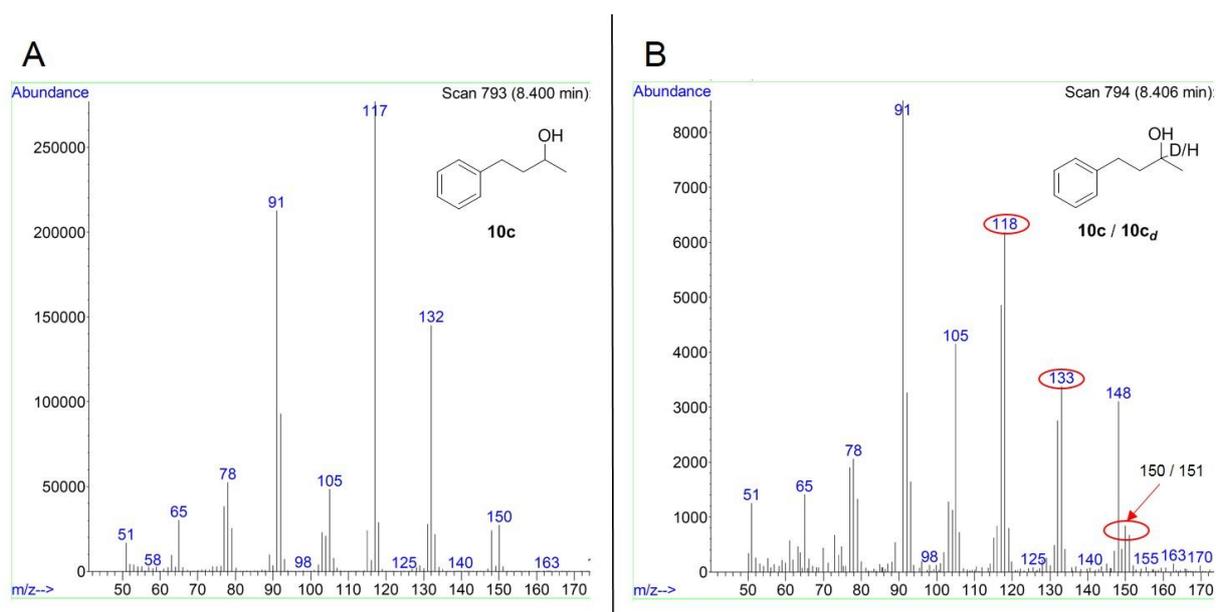


Abbildung 28: Massenspektren (GC-MS) aus der Umsetzung von **10a_d** (10 mM) mit 30 mM NADH, 40 U HLADH-S, TEA/NaOH-Puffer (100 mM, pH 7.0), 25 °C. Gesamtumsatz nach 6 Tagen >93%, **A**: Referenz-Massenspektrum von **10c**; **B**: Gemisch aus **10c** und **10c_d**, Massenzuwachs +1 in Massenpaaren 117/188, 132/133 und 150/151 rot markiert.

Mit diesem Versuch konnte jedoch kein eindeutiger Beweis einer direkten Reduktion von **10a_d** zum **10c_d** erbracht werden. Die Entstehung des beobachteten deuterierten Produktes **10c_d** kann folgendermaßen erklärt werden: Das durch HLADH-S katalysierte Oxidation von **10a_d** zu **10** entstandene NADD kann zum Teil für weitere Rückreduktion von **10b** wiederverwendet werden. Anhand des erhaltenen Massenspektrums kann gezeigt werden, dass NADD für die Reduktion der C=C-Doppelbindung nicht verwendet wurde (kein Massenzuwachs +1 beim Benzyl-Radikalkation $m/z = 91$). Die für die Reduktion der C=C-Doppelbindung verantwortliche Reduktase konnte dadurch nicht identifiziert werden.

Durch die Verwendung von enzymgekoppelter Cofaktorregenerierung konnte keine gesteigerte Bildung von gesättigtem Alkohol erreicht werden. Auch die substratgekoppelte Cofaktorregenerierung mit Ethanol brachte keine Steigerung des Umsatzes. In beiden Fällen konnten nur die Ketone **10** und **10b** als Produkte festgestellt werden.

Umsetzung von 4-Phenylbutan-2-on (**10b**) mit HLADH

Wie in Abbildung 26 dargestellt, kann eine mögliche Rückreaktion von **10c** zu **10b** nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Die Umsetzungen vom gesättigten Keton **10b** wurden daher mit beiden Isoenzymen HLADH-S und -E durchgeführt.

4-Phenylbutan-2-on (**10b**) wird von beiden Isoenzymen als Substrat akzeptiert; HLADH-S zeigt mit 33% Umsatz nach 20 Stunden eine deutlich höhere Aktivität als HLADH-E mit 3% Umsatz nach 24 Stunden. In beiden Fällen wird 4-Phenylbutan-2-ol (**10c**) als einziges Produkt identifiziert (Abbildung 29).

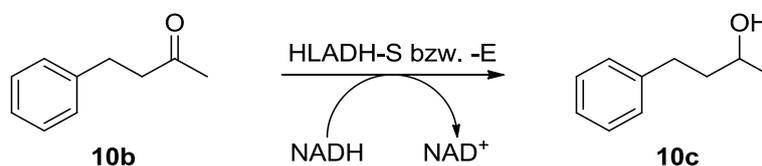


Abbildung 29: Umsetzung von **10b** (10 mM) mit HLADH-S bzw. HLADH-E. Bedingungen: 15 mM (1.5 Äq.) NADH, 40 U HLADH-S bzw. HLADH-E, TEA/NaOH-Puffer (100 mM, pH 7.0), 25 °C. Der Umsatz zu **10c** wurde nach 20–24 Stunden Reaktionszeit durch GC-MS-Analytik bestimmt.

Diese unterschiedliche Aktivität kann durch die im Kapitel 2.2.4 beschriebenen Unterschiede in der Substratazeptanz der einzelnen Isoenzyme erklärt werden.

Alle bisher beschriebenen Experimente konnten keinen eindeutigen Beweis für die HLADH-katalysierte Reduktion einer nichtaktivierten C=C-Bindung liefern. Eine weitere Möglichkeit besteht im Einsatz von gereinigter HLADH. Die dazugehörigen proteinbiochemischen Arbeiten werden im nächsten Abschnitt beschrieben.

B. Reinigung der Isoenzyme HLADH-S und HLADH-E

Beide Isoenzyme werden als Polyhistidin-Fusionsproteine (His-Tag N-terminal) heterolog in *E. coli* exprimiert und als Lyophilisate aus nicht gereinigten Proteinrohextrakten geliefert (Herstellerangaben). Das ermöglicht eine nachträgliche Proteinreinigung mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) nach Porath *et al.*, 1975.^[108] Dafür wurden 200 mg des jeweiligen Lyophilisats unter nativen Bedingungen an einer Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarosematrix (Ni-NTA-Säule) gereinigt (Kapitel 5.3.1). Die eluierten Proteine wurden von Imidazol befreit und für weitere Untersuchungen verwendet.

Aktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Aktivität der HLADH-Isoenzyme wurde die Umsetzung von Benzaldehyd mit NADH als Cofaktor genutzt.

Die Aktivität von gereinigter und aufkonzentrierter HLADH-E betrug $12.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, von HLADH-E Lyophilisat $30 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Der Durchlauf der Ni-NTA-Säule zeigte eine Restaktivität von $0.03 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

Die Aktivität von gereinigter und aufkonzentrierter HLADH-S betrug $1.76 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, von HLADH-S Lyophilisat $3.9 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Der Durchlauf der Ni-NTA-Säule zeigte eine Restaktivität von $0.03 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

C. Biokatalyse mit gereinigten Isoenzymen HLADH-S und HLADH-E

Die im Abschnitt A. beschriebenen biokatalytischen Umsetzungen von **10** und **10a** wurden mit gereinigten Enzymen wiederholt. Die biokatalytischen Aktivitäten von kommerziell erhältlichen HLADH-Lyophilisaten und deren gereinigten Fraktionen wurden neu bestimmt. Dazu wurden die Mengen an zugefügten gereinigten Proteinen entsprechend der Umsetzungen mit nicht gereinigtem Lyophilisat angepasst.

Als Positivkontrolle diente die Umsetzung von Benzaldehyd, mit welcher auch die Enzymaktivität getestet wurde. Beide HLADH-Isoenzyme setzen Benzaldehyd zu 99% innerhalb 24 Stunden um, die gesammelten Durchläufe der Ni-NTA-Säule zeigten eine geringe Restaktivität. Die beobachtete Restaktivität kann durch die nicht komplett gebundenen und abgetrennten Oxidoreduktasen verursacht worden sein.

Mit **10** zeigen HLADH-S und -E nur eine geringe Aktivität, wobei als Produkt lediglich **10a** beobachtet wurde (5% nach 48 Stunden). Die bei den mit Lyophilisat katalysierten Umsetzungen detektierten Produkte **10b** und **10c** wurden hier nicht gebildet (Abbildung 30).

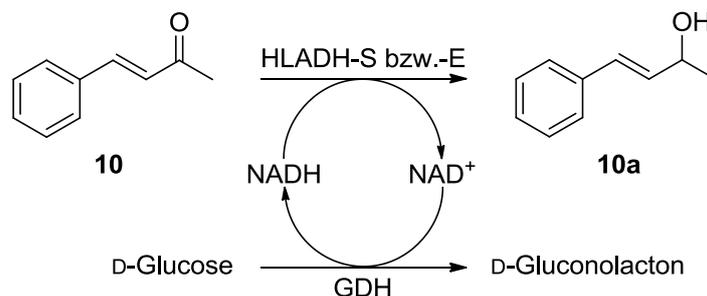


Abbildung 30: Umsetzung von **10** (10 mM) mit gereinigten HLADH-Isoenzymen S und E unter GDH/Glucose-Cofaktorregenerierung. Bedingungen: NAD⁺ (6 mol%), Glucose (5 Äq.), HLADH-S (38 μL , $1.76 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) bzw. HLADH-E (5 μL , $12.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 2 μL GDH ($>500 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), TEA/NaOH-Puffer (100 mM, pH 7.0), 25 °C. Reaktionskontrolle erfolgte durch GC-MS.

Der olefinische Alkohol **10a** wird von beiden gereinigten Isoenzymen nicht als Substrat akzeptiert. Zusätzlich konnte durch die verwendete Cofaktorregenerierung die früher beschriebene Rückoxidation zum α,β -ungesättigten Keton **10** (siehe Abbildung 26) in diesem Fall nicht beobachtet werden.

Der gesammelte Durchlauf der Ni-NTA-Säule zeigte mit olefinischem Keton **10** eine ausgeprägte Enreduktase-Aktivität: nach 48 Stunden konnte **10b** mit bis zu 15% Umsatz beobachtet werden (Abbildung 31).

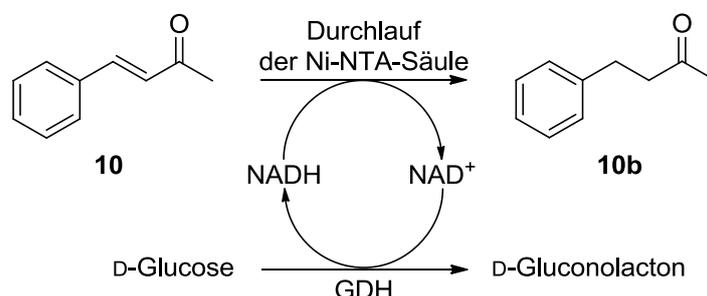


Abbildung 31: Umsetzung von **10** (10 mM) mit dem Durchlauf der Ni-NTA-Säule nach der Proteinbindung unter GDH/Glucose-Cofaktorregenerierung. Bedingungen: NAD⁺ (6 mol%), Glucose (5 Äq.), 100 μL des entsprechenden Durchlaufs, 2 μL GDH ($>500 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), TEA/NaOH-Puffer (100 mM, pH 7.0), 25 °C. Reaktionskontrolle erfolgte durch GC-MS. Jeweils 15% Umsatz nach 48 Stunden.

Insgesamt deuten die Experimente mit ungereinigten sowie gereinigten Isoenzymen auf das Vorhandensein einer Nebenaktivität der verwendeten Lyophilisate hin. Die durch den Durchlauf der Ni-NTA-Säule katalysierte Reduktion der aktivierten C=C-Doppelbindung bestätigt diese Annahme.

Mit dem Ziel einen eindeutigen Beweis für diese Nebenaktivität zu liefern wurden die Umsetzungen mit nativem zellfreiem Proteinextrakt aus *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Mit **10a** und **10b** zeigen *E. coli*-eigene Reduktasen keine Aktivität. Hingegen konnte ausgehend von **10** die Bildung von **10b** mit bis zu 14% Umsatz nach drei Tagen Reaktionszeit beobachtet werden.

Damit lässt sich der Reaktionsablauf mit beiden HLADH-Lyophilisaten rekonstruieren: Als erstes wird die Reduktion der C=C-Doppelbindung **10** durch eine oder mehrere *E. coli*-eigene Enreduktase(n) katalysiert. Das daraus resultierende gesättigte Keton **10b** wird durch die HLADH Isoenzyme zum gesättigten Alkohol **10c** reduziert. Parallel dazu wird **10** durch HLADH zu **10a** reduziert (Abbildung 32).

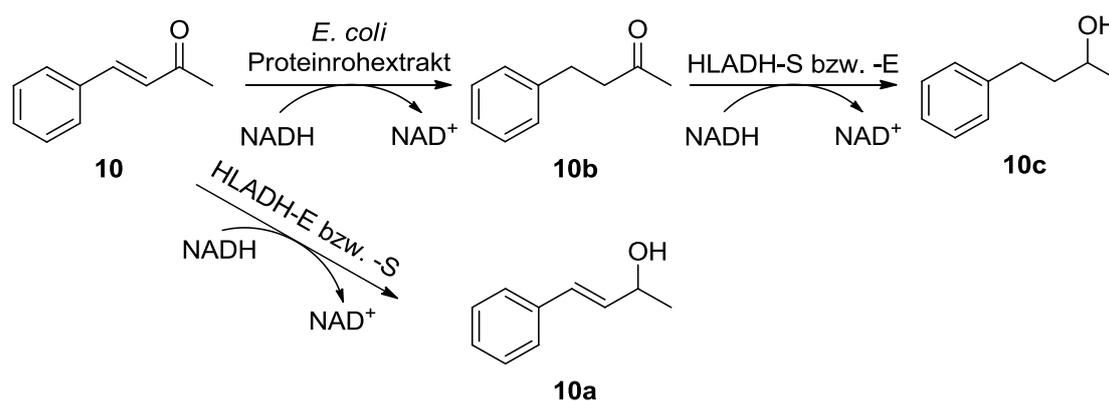


Abbildung 32: Ablauf der Umsetzung von **10** mit nicht gereinigten HLADH-Isoenzymen.

3.1.2 Untersuchungen der Carbonylreduktase 2 aus *Candida parapsilosis* (CPCR2)

Die Untersuchungen von Jakoblinnert *et al.*, 2012 zeigten, dass CPCR wie auch HLADH in zwei isomeren Formen – CPCR1 und CPCR2 – vorliegen kann. CPCR2 (*sadh*-Gen, NCBI: AB010636.1, UniProt: O42703) aus *C. parapsilosis* DSMZ 70125 weist ein breiteres Substratspektrum als CPCR1 (NCBI: AFD29185.1, UniProt: H9DXW0) auf und ist in der Lage voluminöse cyclische und aromatische Carbonyl-Verbindungen zu reduzieren.^[57] Die bereits heterolog exprimierte und gereinigte CPCR2 wurde von Prof. Dr. Marion Ansorge-Schumacher (TU Dresden) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das aktive Enzym wurde in einer Puffer/Glycerin-Lösung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die auf Acetophenon (**29**) bezogene Aktivität wurde mit ca. $60\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ angegeben. Als Positivkontrolle wurde die Umsetzung von **29** mit 0.5 U CPCR2 zu 1-Phenylethanol (**29a**) ausgenutzt (Kapitel 5.6.3). Der Umsatz nach 18 Stunden Reaktionszeit betrug $>99\%$ (GC-MS).

Umsetzung von (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**)

Die Umsetzung des aromatischen α,β -ungesättigten Ketons **10** erfolgte bei gleichen Bedingungen wie bei HLADH-katalysierten Umsetzungen mit 0.5 U CPCR2 in TEA/NaOH-Puffer (100 mM , $\text{pH } 7.0$) unter enzymgekoppelter Cofaktorregenerierung mit GDH und Glucose als Cosubstrat. Während 21 Stunden Reaktionszeit erfolgte die Bildung des ungesättigten Alkohols **10a** mit 78% Umsatz (GC-MS). Die vermutete Reduktion der C=C-Doppelbindung konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 33).

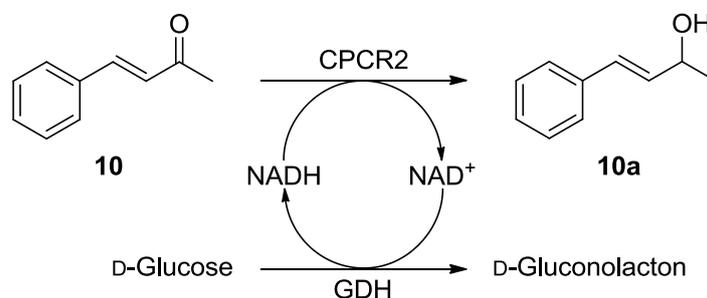


Abbildung 33: Umsetzung von **10** (10 mM), katalysiert durch CPCR2 unter Glucose/GDH-Cofaktorregenerierung. Bedingungen: NAD^+ ($6\text{ mol}\%$), Glucose (5 Äq.), 0.5 U CPCR2 , $2\text{ }\mu\text{L GDH}$ ($>500\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), TEA/NaOH-Puffer (100 mM , $\text{pH } 7.0$), $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reaktionskontrolle erfolgte durch GC-MS nach 21 Stunden.

Umsetzung von (E)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (10a)

Der allylische Alkohol **10a** wird von CPCR2 wie auch von den gereinigten HLADL-Isoenzymen nicht als Substrat akzeptiert. Nach 21 Stunden Reaktionszeit konnten keine Reduktionsprodukte beobachtet werden (GC-MS).

Damit konnte die durch Zelinski *et al.*, 1999 und Shubert (Dissertation, 2002) beobachtete Bildung von **10a** nicht bestätigt werden. Wie im Fall von HLADH-Isoenzymen (Kapitel 3.1.1), kann diese Nebenaktivität auf eine Verunreinigung mit nativen Enreduktasen aus *Candida parapsilosis* Kultur zurückgeführt werden.

3.1.3 Untersuchungen zur Polyprenolreduktase (PPR)

Die hier beschriebenen Arbeiten wurden chronologisch nach der Untersuchung der $\Delta 14$ -Sterol-Reduktase ($\Delta 14$ SR) durchgeführt. Anhand der erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Expression membranintegrierter Proteine mit einer großen Zahl an TM-Einheiten (wie $\Delta 14$ SR) wurden die Versuche zur Expression von Polyprenolreduktase (PPR) aus Ratte in *Saccharomyces cerevisiae* unternommen. Zur genauen Beschreibung des Expressionssystems siehe Kapitel 3.2.2, Abschnitt B und Kapitel 5.3.5.

A. Molekularbiologische Arbeiten

Expressionsplasmid *S. cerevisiae*::pESCHIS::PPR_C-His₆

Als Ausgangsmaterial für die molekularbiologischen Arbeiten diente die SRD5A3-Reduktase (UniProt: Q5RJM1, NCBI: BC086584.1) aus Ratte (*Rattus norvegicus*). Aufgrund des hohen GC-Gehaltes der kodierenden Sequenz von 58% wurde eine Codon-Optimierung für die geplante Expression in *S. cerevisiae* vorgenommen. Der finale GC-Gehalt des optimierten Gens betrug 41%. Zusätzlich wurde die codon-optimierte DNA-Sequenz N-terminal (5'-Ende) um die Kozak-Sequenz (AAAA) und C-terminal (3'-Ende) um einen Polyhistidin(6x)-Tag (C-His₆) und ein Stop-Codon (TGA) verlängert. Das native Stop-Codon wurde entfernt. Anschließend wurden an beiden Enden spezifische, 15 bp lange, dem Expressionsvektor pESCHIS homologe Überhänge nach den Anforderungen der ligasefreien In-Fusion[®] Klonierungsmethode eingeführt (Kapitel 5.2.1). Die finale 886 bp lange DNA-Sequenz (*PPR_C-His₆*) wurde synthetisch als freier Doppelstrang (GeneArt[®], LIFE TECHNOLOGIES) von der Fa. THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. erhalten (Kapitel 5.2.1).

Der pESCHIS-Vektor der Fa. AGILENT TECHNOLOGIES wurde per PCR linearisiert und amplifiziert (Kapitel 5.2.1). Die entsprechenden Primer wurden so gewählt, dass der 42 bp lange, für den FLAG-Tag kodierende DNA-Abschnitt zwischen den Basenpaaren 2271 und 2312 entfernt wurde (Kapitel 5.2.2, Abschnitt C). Das Insert *PPR_C-His₆* wurde in den linearisierten pESCHIS-Vektor unter die Kontrolle des GAL10-Promotors nach dem In-Fusion[®] Protokoll kloniert (Abbildung 34).

Kompetente *E. coli* TG1-Zellen wurden mit dem erhaltenen Konstrukt pESCHIS::*PPR_C-His₆* transformiert. Einer der *E. coli* Klone wurde in Flüssigkultur für die Plasmidisolierung

angezogen. Nach der DNA-Sequenzbestätigung wurde die Transformation in kompetente *S. cerevisiae* Zellen vorgenommen (Kapitel 5.2.1).

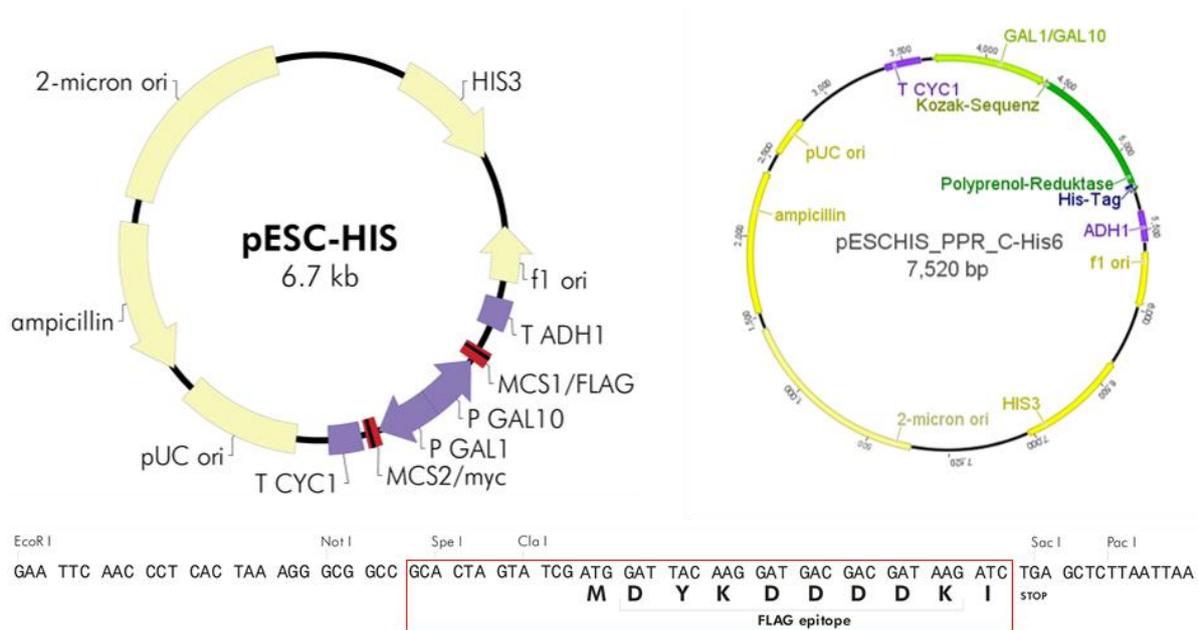


Abbildung 34: Der pESCHIS-Vektor (links); das Konstrukt pESCHIS::*PPR_C-His₆* (rechts); Ausschnitt aus der Multiple Cloning Site (*MCS*) mit FLAG-Tag, die per PCR entfernten Basenpaare sind rot markiert (unten).

Expressionsplasmid *S. cerevisiae*::pESCHIS::*PPR_C-His₁₀_FLAG*

Das Insert *PPR_C-His₆* wurde per PCR folgenderweise modifiziert: die bereits vorhandene N-terminale (5'-Ende) Kozak-Sequenz wurde um ein Adenin unter Einhaltung des Leserasters verlängert (AAAAA final), der C-terminale (3'-Ende) Hexahistidin-Tag (C-His₆) wurde zum Dekahistidin-Tag vergrößert (C-His₁₀), neue passende homologe In-Fusion[®] Bereiche wurden eingeführt. Zusätzlich wurde das Stop-Codon *TGA* entfernt, damit PPR als Dekahistidin-Fusionsprotein mit dem im Originalvektor vorhandenen ebenfalls C-terminalen FLAG-Tag exprimiert werden kann (Insert *PPR_C-His₁₀_FLAG*). Der His₁₀-Tag soll eine bessere Bindung an die Ni-NTA-Agarosematrix und eine damit verbundene Effizienzsteigerung der Proteinreinigung ermöglichen. Gleichzeitig soll der FLAG-Tag eine bessere Detektierbarkeit der produzierten Fusionsproteine gewährleisten. Der pESCHIS-Vektor wurde per PCR linearisiert und amplifiziert. Die entsprechenden Primer wurden so gewählt, dass der 29 bp lange DNA-Abschnitt der Multiple Cloning Site (*MCS*) zwischen den Basenpaaren 2304 und 2332 entfernt wurde. Die für *PPR_C-His₁₀_FLAG* kodierende, 899 bp lange DNA-Sequenz wurde in den linearisierten Vektor pESCHIS unter der Kontrolle des GAL10-Promotors nach dem In-Fusion[®] Protokoll kloniert (Kapitel 5.2.2, Abschnitt C; Abbildung 35).

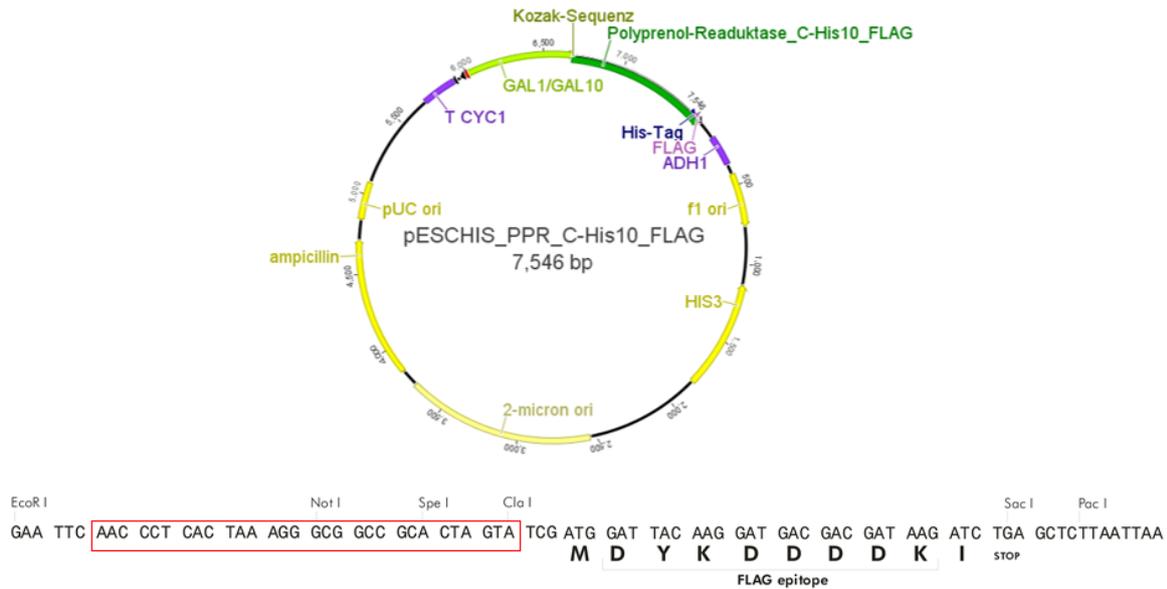


Abbildung 35: Das Konstrukt pESCHIS::*PPR_C*-His₁₀_FLAG (oben); Ausschnitt aus der *MCS*, der entfernte DNA-Bereich ist rot markiert (unten).

Kompetente *E. coli* TG1-Zellen wurden mit dem erhaltenen Konstrukt pESCHIS::*PPR_C*-His₁₀_FLAG transformiert. Einer der *E. coli* Klone wurde in Flüssigkultur für die Plasmidisolierung angezogen. Nach der DNA-Sequenzbestätigung wurde die Transformation in kompetente *S. cerevisiae* MH272-3fa/ α Zellen vorgenommen.

B. Proteinbiochemische Arbeiten

Expression von *S. cerevisiae*::pESCHIS::*PPR_C*-His₆

Initiale Testexpression erfolgte im 100 mL Maßstab nach Methode I (Kapitel 5.3.5). Bei den OD₆₀₀-Werten von über 1.5 (entspricht der späten Log-Phase) erfolgte die Induktion der Genexpression mit dem galaktosehaltigen Vollmedium YPG (2% Galaktose Endkonzentration). Nach 18 Stunden bei 24 °C wurde die resultierende Zellkultur in 3 Fraktionen mit je 2.5, 34 und 104 OD-Einheiten aufgeteilt.²

Zellaufschluss und Expressionsanalyse

Die Zellen aus der Fraktion mit 2.5 OD-Einheiten wurden unmittelbar nach der Expression pelletiert und nach der modifizierten Methode von Kushnirov alkalisch aufgeschlossen (Kapitel 5.3.1).^[109] Die qualitative Analytik der exprimierten Proteine in Fraktionen S1 und S2

² Die OD-Einheit wird definiert durch die erreichte optische Dichte (OD₆₀₀) multipliziert mit dem Gesamtvolumen der Kultur in mL, z.B. 2.5 OD-Einheiten entsprechen 1.2 mL Zellkultur bei OD₆₀₀ = 2.08.

erfolgte mittels SDS-PAGE. Als Kontrolle diente die parallel exprimierte und nach gleicher Methode aufgeschlossene *S. cerevisiae* Zellkultur mit dem Expressionsplasmid pESCHIS::*ERG24_C*-His₆ mit und ohne Induktion (Abbildung 36).

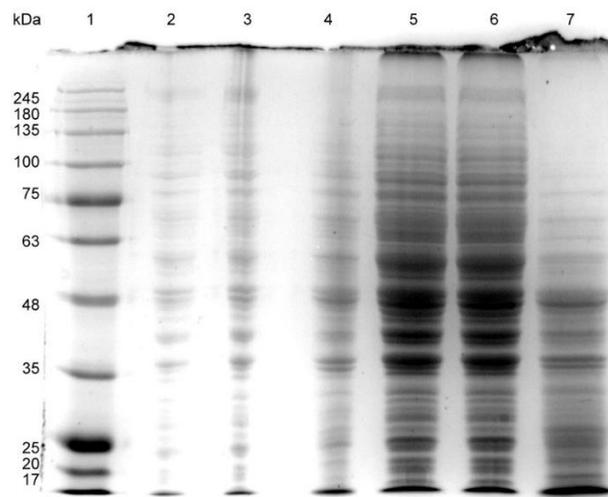


Abbildung 36: Proteingel von PPR_C-His₆ (erwartete Größe 34.5 kDa) und ERG24_C-His₆ (erwartete Größe 49 kDa) nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) PPR P2; 3) ERG24 P2; 4) ERG24 ohne Induktion P2; 5) PPR S2; 6) ERG24 S2; 7) ERG24 ohne Induktion S2.

Anhand des erhaltenen SDS-PAGE-Gels lässt sich keine qualitative Aussage über die erreichte Expression von *PPR* treffen.

Isolierung der Membranfraktion, Western Blot Analytik

Zusätzlich wurde der Zellaufschluss mit Glas-Beads mit anschließender Isolierung der membranhaltigen Fraktion durchgeführt (Kapitel 5.3.5). Dafür wurden 104 OD-Einheiten (ca. 1 g Zellen) verwendet. Der Überstand S2 und das membranhaltige Pellet P2 wurden mittels Western Blot mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper gegen das Polyhistidin-Epitop untersucht (Kapitel 5.3.1). Als Vergleich dienten Fraktionen aus der parallel aufgeschlossenen *S. cerevisiae* Zellkultur mit dem Expressionsplasmid pESCHIS::*ERG24_C*-His₆; zusätzlich wurden die Fraktionen aus dem Zellaufschluss nach Kushnirov analysiert (Abbildung 37). Die Analyse des Western Blots wird durch zahlreiche unspezifische Banden erschwert. Dessen unabhängig konnte beim Vergleich der paarweise angeordneten Fraktionen (jeweils PPR und ERG24) keine zusätzliche überproduzierte PPR_C-His₆-Bande beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigt die Tasche 7 eine deutliche ERG24_C-His₆ Bande bei ca. 30 kDa (roter Pfeil). Die abweichende Qualität der Taschen 6 und 7 kann mit einem unterschiedlichen Verhalten der mit der Zellmembranen angereicherten Fraktionen P2 im SDS-PAGE-Gel erklärt werden.

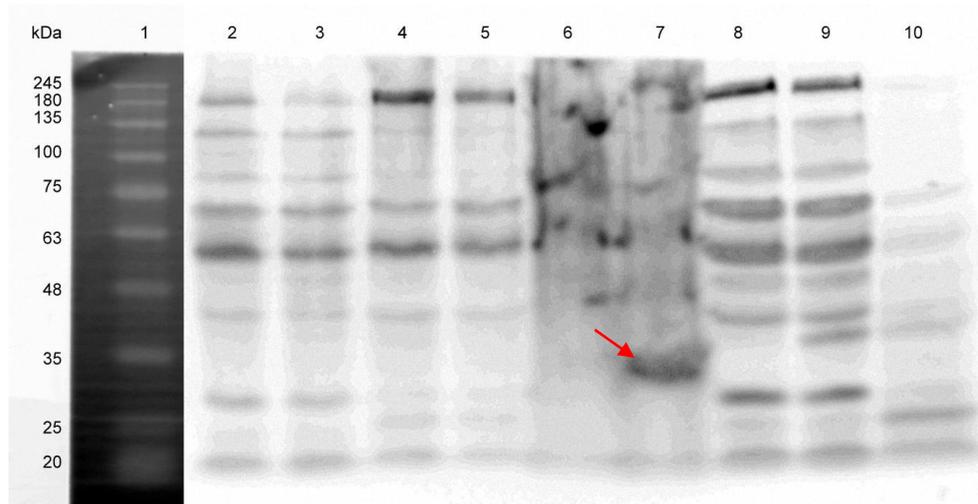


Abbildung 37: Western Blot Analyse von PPR_C-His₆ (erwartete Größe 34.5 kDa) und ERG24_C-His₆ (erwartete Größe 49 kDa) mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper. Zellaufschluss mit Glas-Beads: Tasche 1 bis 7, Zellaufschluss nach Kushnirov: Tasche 8 bis 10: 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) PPR P1; 3) ERG24 P1; 4) PPR S2; 5) ERG24 S2; 6) PPR P2; 7) ERG24 P2; 8) PPR P2; 9) ERG24 P2; 10) ERG24 ohne Induktion P2.

Weitere Untersuchungen (Induktionszeit- und Temperaturänderungen) mit diesem Konstrukt ergaben keine nachweisbare Überproduktion von PPR.

Expression von *S. cerevisiae*::pESCHIS::PPR_C-His₁₀_FLAG unter Glucose

Bei diesem Fusionsprotein wurde auf eine Testexpression verzichtet. Die Expression wurde nach Methode II durchgeführt (Kapitel 5.3.5).

Versuch der Solubilisierung und Reinigung der Membranproteine

S. cerevisiae::pESCHIS::PPR_C-His₁₀_FLAG Zellen wurden mittels eines Hochdruck-homogenisators aufgeschlossen. Nach der Fraktionierung des zellfreien Proteinrohextraktes S1 wurden die gereinigten Membranen in der Fraktion P3 abgetrennt. Die membranintegrierten Proteine aus dem Membranpellet P3 wurde in Solubilisierungspuffer unter Verwendung von n-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM, 30 mM) als nichtionisches Detergenz solubilisiert (Kapitel 5.3.5). Nach der erneuten Ultrazentrifugation wurden die solubilisierten Proteine in der Fraktion S4 dekantiert und an der entsprechend equilibrierten Ni-NTA-Säule gereinigt (Kapitel 5.3.1). Die qualitative Analytik der Proteinsolubilisierung und -Reinigung erfolgte mittels SDS-PAGE (Abbildung 38).

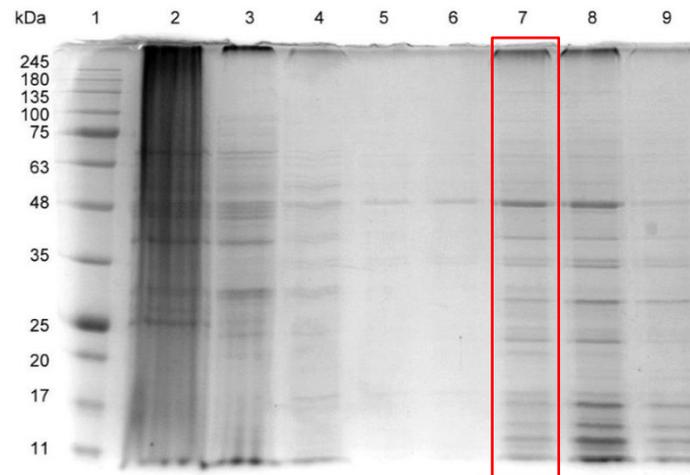


Abbildung 38: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung des solubilisierten Proteinanteils aus *S. cerevisiae*::pESCHIS::PPR_C-His₁₀-FLAG nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) S4; 3) Durchlauf; 4) 4. Waschfraktion (15 mM Imidazol); 5) 9. Waschfraktion (15 mM Imidazol); 6)–9) 1.–4. Eluatfraktion (300 mM Imidazol).

Die für die Proteinreinigung verwendeten Waschvorgänge waren in ihrer Qualität nicht ausreichend. Die 2. Eluatfraktion (Tasche 7, Abbildung 38) wurde später für die Western Blot Analytik mit „FLAG™ Epitope Tag (DYKDDDDK) HRP“-Antikörper verwendet (Tasche 7, Abbildung 40).

Der während der Fraktionierung abgetrennte Überstand S3 war durch die zusätzliche voluminöse Niederschlagschicht auffällig trüb. Diese Fraktion, als S3 „trüb“ bezeichnet, wurde mit NaCl (1 M), Imidazol (15 mM) und DDM (1 mM) eingestellt und eine Stunde bei 4 °C zwecks Solubilisierung der membranintegrierten Proteine sanft gerührt. Anschließend wurde die proteinhaltige Lösung auf die entsprechend equilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen. Die Abtrennung von unerwünschten Proteinen sowie die Elution erfolgten wie beschrieben. Die qualitative Analytik der Proteinsolubilisierung und -reinigung erfolgte ebenfalls mittels SDS-PAGE (Abbildung 39). Auf dem SDS-PAGE-Gel konnte eine Proteinbande bei ca. 37 kDa in der 2. Eluatfraktion mit 300 mM Imidazol (Tasche 8) festgestellt werden. Die Eluatfraktionen 1 bis 4 wurden mit einem Proteinkonzentrator mit 30 kDa Trenngrenze konzentriert ($E_{konz.}$ aus S3) und zusammen mit den anderen Fraktionen mittels Western Blot mit „FLAG™ Epitope Tag (DYKDDDDK) HRP“-Antikörper untersucht (Abbildung 40). Die durchgeführte Western Blot Analytik zeigt kein Hinweis auf das Vorhandensein überproduzierter, solubilisierter PPR. Die am stärksten ausgeprägte Proteinbande (2. Eluatfraktion: 8. Tasche in Abbildung 39, rot markiert) stimmt nicht mit der einzigen vorhandenen Western Blot Bande (Tasche 6 in Abbildung 40, rot markiert) überein.

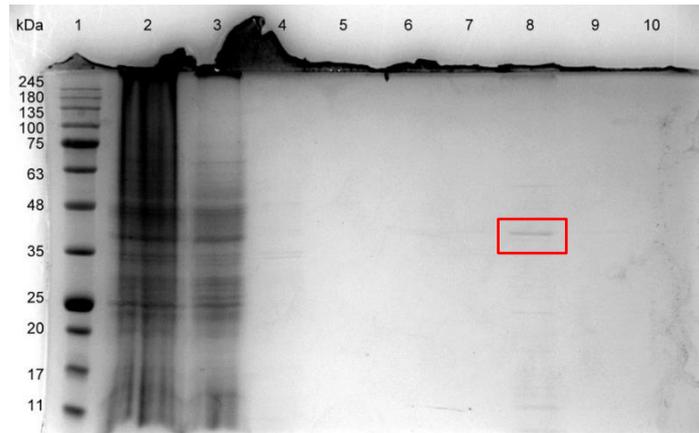


Abbildung 39: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung der Fraktion S3 „trüb“ aus *S. cerevisiae*::pESCHIS::*PPR_C*-His₁₀-FLAG nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) S3; 3) Durchlauf; 4) 4. Waschfraktion (15 mM Imidazol); 5) 10. Waschfraktion (15 mM Imidazol); 6) 9. Waschfraktion (30 mM Imidazol); 7) –8) 1.–4. Eluatfraktion (300 mM Imidazol).

Andere untersuchte Fraktionen aus den Solubilisierungsversuchen, sowie die zellfreien Proteinrohextrakte zeigen ein ähnliches Bandenmuster. Diese Tatsache deutet auf eine ausgeprägte unspezifische Bindung der FLAG-Antikörper hin.

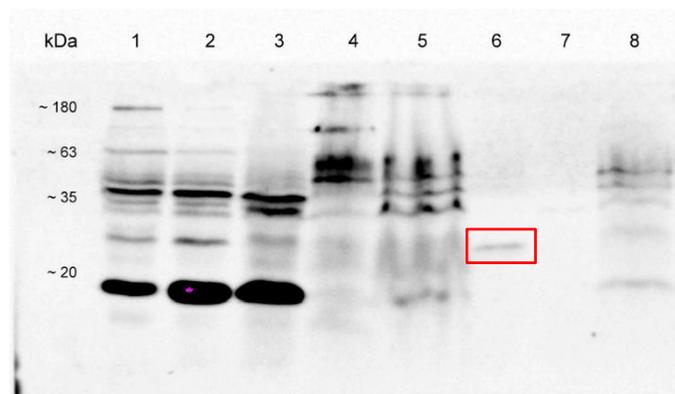


Abbildung 40: Western Blot Analyse von *PPR_C*-His₁₀-FLAG mit „FLAG™ Epitope Tag (DYKDDDDK) HRP“-Antikörper. 1) PPR P2, Zellaufschluss nach Kushnirov; 2) Negativkontrolle: Expression des pESCHIS Leervektor P2, Zellaufschluss nach Kushnirov; 3) PPR S2; 4) PPR P4; 5) PPR S3; 6) PPR Eluatfraktionen aufkonzentriert aus der Fraktion S3 „trüb“; 7) PPR 2. Eluatfraktion aus S3; 8) PPR S4.

Um diese Vermutung zu belegen wurden die Verdünnungsreihen von zellfreien Proteinrohextrakten aus den aus *S. cerevisiae*::pESCHIS::*PPR_C*-His₁₀-FLAG und pESCHIS-Leervektor Expressionskulturen mittels Western Blot mit „FLAG™ Epitope Tag (DYKDDDDK) HRP“-Antikörper analysiert. Dafür wurden frische 2.5 OD-Einheiten nach der modifizierten Methode von Kushnirov aufgeschlossen und in einer Verdünnungsreihe 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4 auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und analysiert (Abbildung 41).

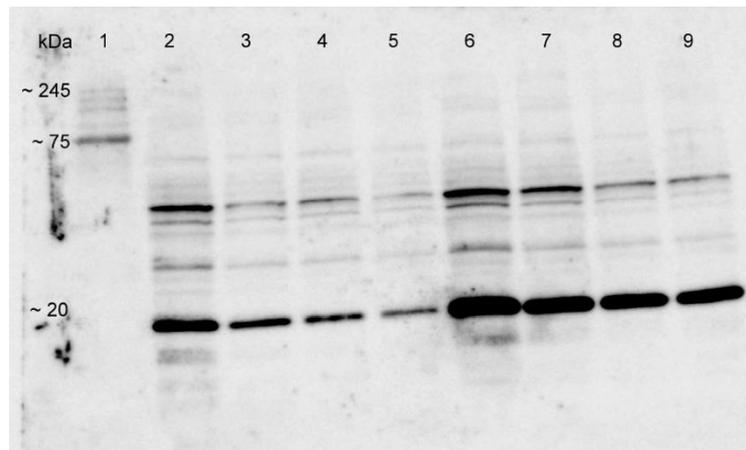


Abbildung 41: Western Blot Analyse von zellfreien Proteinrohextrakten aus *S. cerevisiae*::pESCHIS::PPR_C-His₁₀_FLAG und dem pESCHIS- Leervektor mit „FLAG™ Epitope Tag (DYKDDDDK) HRP^{cc}-Antikörper. 1) Proteinmarker, ausgewählte Gewichtsangaben in kDa; 2) PPR 1:1; 3) PPR 1:2 Verdünnung; 4) PPR 1:3 Verdünnung; 5) PPR 1:4 Verdünnung; 6) pESCHIS 1:1; 7) pESCHIS 1:2 Verdünnung; 8) pESCHIS 1:3 Verdünnung; 9) pESCHIS 1:4 Verdünnung.

Eine eindeutige Überexpression konnte auch hier nicht festgestellt werden. Alle Banden sind ebenfalls in der Negativkontrolle zu finden, was die Auswertung erschwert. Grund für diese Ergebnisse kann das allgemein niedrige Expressionsniveau sein, verursacht durch die restlichen, nicht komplett abgebauten Mengen an Glucose und die damit verbundene Suppression der Genexpression.

Expression von *S. cerevisiae*::pESCHIS::PPR_C-His₁₀_FLAG unter Raffinose

Gegenüber Glucose als Kohlenstoffquelle hat Raffinose den entscheidenden Vorteil kein Suppressor des GAL-Promoters zu sein. Demensprechend wurde die bereits beschriebene Expression nach Methode II auf Raffinose als einzige Kohlenstoffquelle in selektivem Minimalmedium SR/ØHis umgestellt (Methode III, Kapitel 5.3.5). Zusätzlich wurden L-Histidin (0.04% m/v Endkonzentration) und DMSO (2.5 % v/v Endkonzentration) als chemische Chaperone zugefügt. Nach 18 Stunden Induktionszeit mit YPG-Medium (2% Galactose Endkonzentration) bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen geerntet, mit H₂O_{bidest.} gewaschen und mit Glas-Beads aufgeschlossen. Nach der Fraktionierung wurden die proteinhaltigen gereinigten Membranen in Fraktion P3 gesammelt (Kapitel 5.3.5). Die voluminösen Niederschläge wurden diesmal vorsichtig dekantiert und als „S2 trüb“ und „S3 trüb“ einzeln aufbewahrt.

Western Blot Analytik

Für die Western Blot Analytik wurden alle proteinhaltigen Fraktionen auf ca. 5 mg·mL⁻¹ eingestellt. Die analysierten Fraktionen wurden 1:2 bzw. 1:4 verdünnt. Die „FLAG™ Epitope

Tag (DYKDDDDK) HRP^{cc}-Antikörper wurden zusätzlich stärker (1:3000) verdünnt um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden (Abbildung 42).

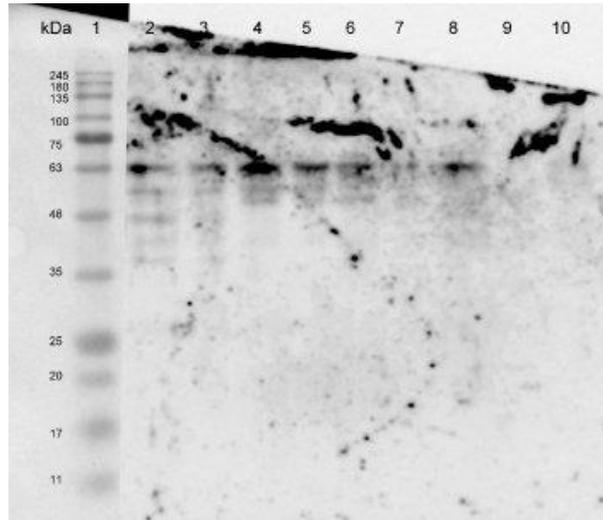


Abbildung 42: Western Blot Analyse von *PPR_C-His₁₀-FLAG* mit „FLAG™ Epitope Tag (DYKDDDDK) HRP^{cc}-Antikörper. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) S2 „trüb“ 1:2 Verdünnung; 3) S2 „trüb“ 1:4 Verdünnung; 4) P3 1:2 Verdünnung; 5) P3 1:4 Verdünnung; 6) S3 „trüb“ 1:2 Verdünnung; 7) S3 „trüb“ 1:4 Verdünnung; 8) Negativkontrolle: Expression des pESCHIS-Leervektor P2 1:2 Verdünnung; 9) Negativkontrolle: Expression des pESCHIS Leervektor P2 1:4 Verdünnung; 10) Positivkontrolle: FLAG-markiertes Protein, ca. 135 kDa.

Auch hier ist es nicht gelungen unspezifische Bindungen komplett zu vermeiden. Die allgemein niedrigere Qualität der Blots mit „FLAG™ Epitope Tag (DYKDDDDK) HRP^{cc}-Antikörper unterscheidet sich deutlich von dem Blot mit „HisProbe™-HRP^{cc}-Antikörper. Deswegen wurden die erhaltenen PPR-Fractionen zusätzlich mit Antikörpern gegen das Polyhistidin-Epitop untersucht (Abbildung 43).

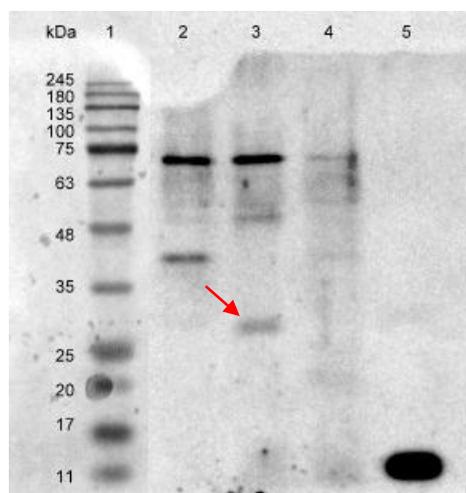


Abbildung 43: Western Blot Analyse von *PPR_C-His₁₀-FLAG* mit „HisProbe™-HRP^{cc}-Antikörper. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) ERG24_C-His₆ P3; 3) *PPR_C-His₁₀-FLAG* P3; 4) Negativkontrolle: Expression des pESCHIS-Leervektor P2; 5) Positivkontrolle His-markiertes Fusionsprotein Chorismatmutase, ca. 15 kDa.

Der Western Blot in der Abbildung 43 zeigt eine PPR-Expressionsbande bei ca. 30 kDa (roter Pfeil). Das theoretische Gewicht liegt allerdings bei 34.5 kDa. Diese Abweichung im Verhalten auf SDS-PAGE ist typisch für membranständige Proteine und kann durch ihre ausgeprägte hydrophobe Natur erklärt werden.^[98]

Die erreichte geringe Menge an produziertem Protein erlaubt keine effiziente quantitative Proteinreinigung in diesem Expressionsmaßstab. Bevor weitere Versuche der Expressionsoptimierung unternommen werden, soll zunächst die biokatalytische Eignung dieser Reduktase überprüft werden.

C. Biokatalytische Umsetzungen mit Polyprenolreduktase

Polyprenole – die nativen Substrate von PPR – waren im Zeitraum der Versuchsdurchführung nicht kommerziell erhältlich. Dementsprechend wurde das Substratrepertoire auf die kurzkettigen Polyprenol-Analoga Farnesol (**8**) und Geranylgeraniol (**9**) begrenzt. Für die Umsetzung von 0.1 mM Substratlösung in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 8.0) wurde die PPR-haltige Fraktion P3 verwendet (siehe Kapitel 5.6.4, Abbildung 44). Die Zusammensetzung der Ansätze wurde nach Sagami *et al.*, 1993 angepasst.^[39] Es konnte keine Reduktion der α -ständigen C=C-Doppelbindung bei beiden Substraten festgestellt werden (GC-MS).

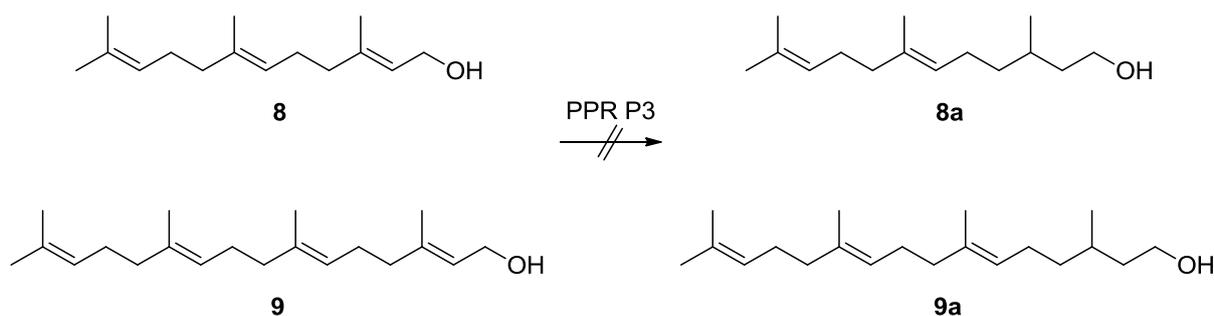


Abbildung 44: Versuch der biokatalytischen Umsetzung der kurzkettigen Polyprenole **8** (0.1 mM) und **9** (0.1 mM) mit PPR-Proteinrohextrakt (P3). Bedingungen: NADPH (10 mM), Glycerol (20%), DTT (1 mM), KF·2H₂O (50 mM), MgCl₂ (1 mM), 100 μ L PPR-haltige P3 Fraktion, Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 8.0, 0.05% (v/v) Tween 80), 27 °C. Reaktionskontrolle nach 18 Stunden mittels GC-MS.

3.2 Biokatalytische Reduktion kumulierter C=C-Doppelbindungen

Delta14-Sterol-Reduktase ($\Delta 14SR$) stellt eine der am besten charakterisierten Sterolreduktasen dar (Kapitel 2.2.5). Aufgrund der guten Ausgangsdatenlage wurde $\Delta 14SR$ als Testmodell für die Untersuchung der Reduktion kumulierter C=C-Doppelbindungen in Sterolvorläufern ausgewählt.

3.2.1 Expression in prokaryotischen Expressionssystemen

Als Ausgangsmaterial für die Produktion von $\Delta 14SR$ diente der für 418 Aminosäuren kodierende cDNA-Abschnitt (das *Tm7sf2*-Gen, NCBI: NM_001013071) aus Ratte (*Rattus rattus*).

A. Expressionsversuche in *E. coli*

Zunächst wurde die Expression in einem geeigneten prokaryotischen Expressionssystem versucht. Dazu wurden speziell für die Produktion von membranintegrierten Proteinen entwickelte *E. coli*-Stämme BL21(DE3) Gold und Lemo21 gewählt.^[110–112]

Bei einer heterologen rekombinanten Expression membranintegrierter Proteine in geeigneten *E. coli*-Stämmen soll der gewählte Vektor folgende Bedingungen erfüllen:

- Das Polyhistidin-Tag soll C-terminal vorliegen, da der N-terminale Proteinanteil eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Einfügung von Proteinen in die Membran spielen kann; zudem kann der N-terminale Proteinanteil durch Signalpeptidasen modifiziert werden, was das His-Tag unbrauchbar machen würde.^[113]
- Kanamycin als Selektionsmarker soll bevorzugt werden. Ampicillin ist aus zwei Gründen ungeeignet: (i) Um das Periplasma zu erreichen muss die für die Antibiotika-Resistenz verantwortliche β -Lactamase durch die gleichen proteinleitenden Kanäle transloziert werden wie das gewünschte überproduzierte Protein, dementsprechend vermindert β -Lactamase unnötig die Systemkapazität; (ii) Ampicillin kann rasch durch β -Lactamase degradiert werden, was zum Verlust des Selektionsdruckes führt.^[111]

Die Vektoren pET24b und pET28b der Fa. NOVAGEN erfüllen die oben genannten Bedingungen und wurden für weitere Arbeiten verwendet.

Expressionsplasmid pET24b:: $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$

Die für $\Delta 14SR$ kodierende Nukleotidensequenz wurde aus Ratten-cDNA mittels PCR mit entsprechenden Primern basierend auf der *Tm7sf2*-Gensequenz vervielfältigt. Der amplifizierte Genabschnitt ist ca. 1.2 kb groß und wurde mittels Gelelektrophorese aufgereinigt und von der Fa. GATC-BIOTECH sequenziert (Kapitel 5.2.1, Abbildung 45).

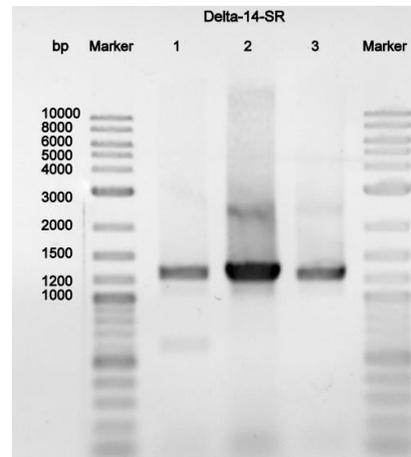


Abbildung 45: Das Agarosegel des $\Delta 14SR$ -Gens, amplifiziert per PCR aus Ratten-cDNA. Marker) DNA-Ladder, Gewichtsangaben in bp; 1)–3) PCR-Produkt $\Delta 14SR$.

Anschließend wurden an beiden Enden spezifische, 15 bp lange, dem Expressionsvektor pET24b homologe Überhänge nach den Anforderungen der ligasefreien In-Fusion[®] Klonierungsmethode eingeführt. Der pET24b-Vektor wurde per PCR linearisiert und amplifiziert. Die entsprechenden Primer wurden so gewählt, dass am Ende ein linearisierter Vektor vorliegt und der 33 bp lange DNA-Abschnitt zwischen den NdeI- und BamHI-Schnittstellen inklusive T7-Tag entfernt wird.

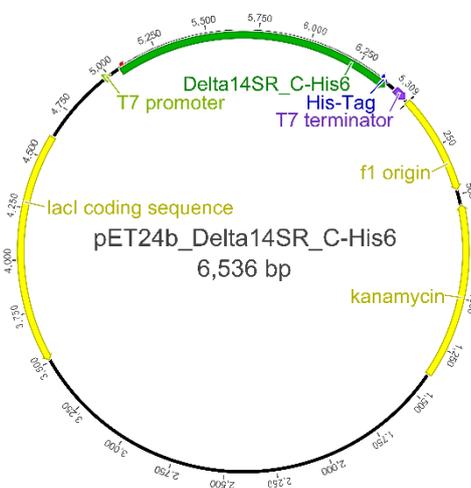


Abbildung 46: Das Konstrukt pET24b:: $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$, das Insert ist grün markiert.

Das $\Delta 14SR_C$ -His₆-Insert wurde nach dem In-Fusion[®] Protokoll in den linearisierten pET24b-Vektor kloniert (Kapitel 5.2.2, Abschnitt A; Abbildung 46). Kompetente *E. coli* TG1-Zellen wurden mit dem erhaltenen Konstrukt pET24b:: $\Delta 14SR_C$ -His₆ transformiert. Einer der *E. coli* Klone wurde in Flüssigkultur für die Plasmidisolierung angezogen. Nach der DNA-Sequenzbestätigung wurde die Transformation in kompetente *E. coli* Lemo21-Zellen vorgenommen (Kapitel 5.2.1).

Expression von *E. coli* Lemo21::pET24b:: $\Delta 14SR_C$ -His₆

Der *E. coli* Lemo21-Stamm enthält ein zusätzliches Plasmid kodierend für Lysozym (*lysY*) – ein weiterer Regulationsmechanismus des T7 RNA Polymerase-abhängigen Systems. Das Expressionsausmaß des Lysozyms wird durch den Zusatz von L-Rhamnose im Konzentrationsbereich bis zu 2 mM und der zusätzliche Selektionsdruck durch den Zusatz von Chloramphenicol erreicht. Dadurch soll eine kontrollierte Produktion der schwer exprimierbaren Proteine, vor allem der membranintegrierten Proteine, verbessert werden.^[110–112]

Testexpression

Zunächst wurde eine Expressionstestreihe für die Ermittlung der optimalen Konzentration an L-Rhamnose mit je 0 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 750 μ M, 1000 μ M und 2000 μ M nach Angaben des Herstellers gestartet (Kapitel 5.3.3). Die qualitative Analyse der jeweiligen zellfreien Proteinrohextrakte (S1) und Zellpellets P1 für alle getesteten L-Rhamnose-Konzentrationen erfolgte mittels SDS-PAGE (Abbildung 47 und Abbildung 48).

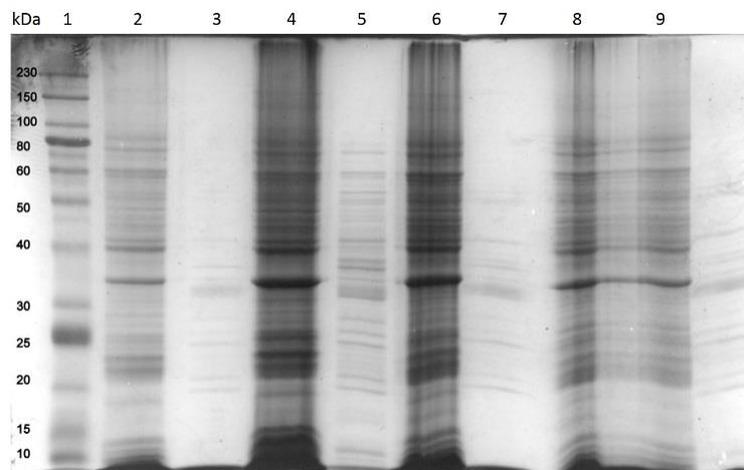


Abbildung 47: Proteingel von zellfreien Proteinrohextrakten aus *E. coli*::pET24b:: $\Delta 14SR_C$ -His₆ nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) P1 ohne L-Rhamnose; 3) S1 ohne L-Rhamnose; 4) P1 ohne L-Rhamnose, 24 Stunden exprimiert; 5) S1 ohne L-Rhamnose, 24 Stunden exprimiert; 6) P1 mit 100 μ M L-Rhamnose; 7) S1 mit 100 μ M L-Rhamnose; 8) P1 mit 250 μ M L-Rhamnose; 9) S1 mit 250 μ M L-Rhamnose.

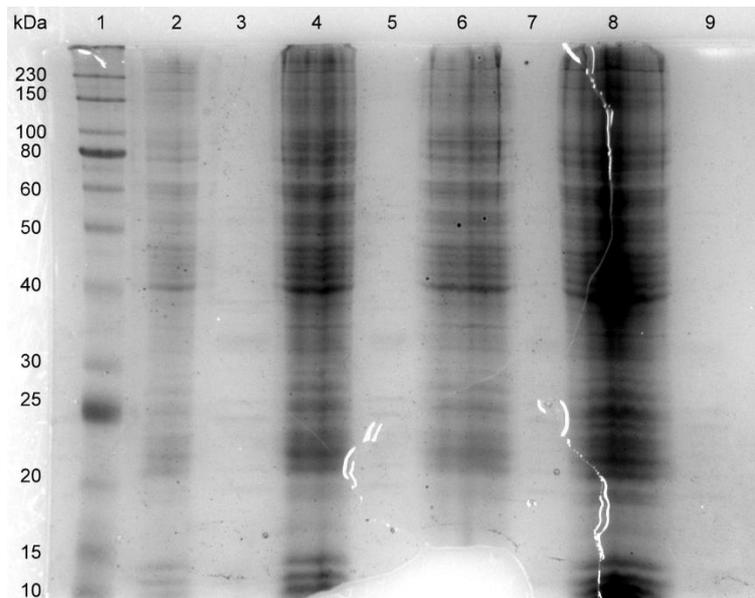


Abbildung 48: Proteingel von zellfreien Proteinrohextrakten aus *E. coli*::pET24b:: $\Delta 14SR_C$ -His₆ nach erfolgter SDS-PAGE, Fortführung. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) P1 mit 500 μM L-Rhamnose; 3) S1 mit 500 μM L-Rhamnose; 4) P1 mit 750 μM L-Rhamnose; 5) S1 mit 750 μM L-Rhamnose; 6) P1 mit 1000 μM L-Rhamnose; 7) S1 mit 1000 μM L-Rhamnose; 8) P1 mit 2000 μM L-Rhamnose; 9) S1 mit 2000 μM L-Rhamnose.

Wie den SDS-Polyacrylamidgelen entnommen werden kann, hat der Zusatz von L-Rhamnose keine signifikante Verbesserung der Proteinproduktion bewirkt. Die am stärksten ausgeprägte Bande liegt bei ca. 34 kDa (Abbildung 47). Bei den weiter steigenden L-Rhamnose-Konzentrationen (die Probe mit der sehr hohen L-Rhamnose-Konzentration von 2000 μM soll bereits als Negativkontrolle dienen) verschwindet diese Bande (Abbildung 48).

Obwohl das errechnete Gewicht von $\Delta 14SR_C$ -His₆ ca. 49 kDa beträgt, können membranständige Proteine bedingt durch die vielen hydrophoben Gruppen ein abweichendes Verhalten in SDS-PAGE-Gelen aufweisen. Dadurch können solche Proteine in SDS-PAGE-Gelen weiter wandern und einem kleineren Molekulargewicht entsprechen.^[98]

Untersuchung der löslichen Fraktion

Wenngleich $\Delta 14SR$ ein membranintegriertes Protein ist, könnte dennoch eine zum Teil lösliche Fraktion bei der Expression in *E. coli* entstehen. Dazu wurden die zellfreien Proteinrohextrakte aus der oben beschriebenen Expressionstestreihe vereint, mit einem Proteinkonzentrator mit 30 kDa Trenngrenze nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert und einer Proteinreinigung mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) an einer Ni-NTA-Säule nach Porath *et al.*, 1975 aufgearbeitet (Kapitel 5.3.1).^[108] Die erhaltenen Eluatfraktionen wurden mit dem Proteinkonzentrator mit 30 kDa Trenngrenze aufkonzentriert und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 49).

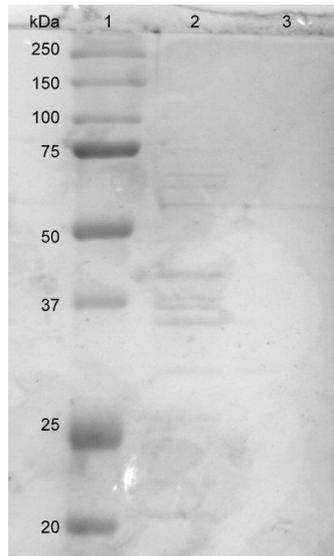


Abbildung 49: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung von S1-Fraktion aus *E. coli*_Lemo21::pET24b::A14SR_C-His₆ nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) Durchlauf der Ni-NTA-Säule; 3) Eluatfraktion, aufkonzentriert.

In der untersuchten Eluatfraktion konnte keine Proteinbande im Bereich zwischen 30 und 40 kDa beobachtet werden.

Versuch der Solubilisierung und Reinigung von Membranproteinen

Unter der Annahme, dass die in Abbildung 47 gezeigte Bande bei ca. 34 kDa das gewünschte überproduzierte Protein darstellt, wurde eine zusätzliche Expression von *E. coli*_Lemo21::pET24b::A14SR_C-His₆ im 1.6 L Maßstab unter Zusatz von L-Rhamnose (500 µM Endkonzentration) durchgeführt (Kapitel 5.3.3). Nach 18 Stunden Inkubation bei 24 °C wurden die Zellen pelletiert, in KP_i-Puffer (50 mM, pH 7.3) suspendiert und per Ultraschall aufgeschlossen (Kapitel 5.3.3). Das Rohlysat wurde für die Gewinnung der Zellmembranen verwendet. Dazu wurde das Zellpellet P1 bei 24000×g, 4 °C für 20 min zentrifugiert und der Überstand S1 wurde zweimal einer Ultrazentrifugation (164000×g, 60 min, 4 °C) unterzogen, wobei das Membranpellet in je 5 mL KP_i-Puffer (50 mM, pH 7.3) aufgenommen und resuspendiert wurde. Die membranintegrierten Proteine wurden mit n-Octyl-β-D-glucanopyranosid (nOG) und Natriumtaurodeoxycholat (STDC) nach Paik *et al.*, 1984 solubilisiert (Kapitel 5.3.3).^[86] Die nicht löslichen Anteile wurden durch die erneute Ultrazentrifugation abgetrennt. Die solubilisierte Fraktion wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 50).

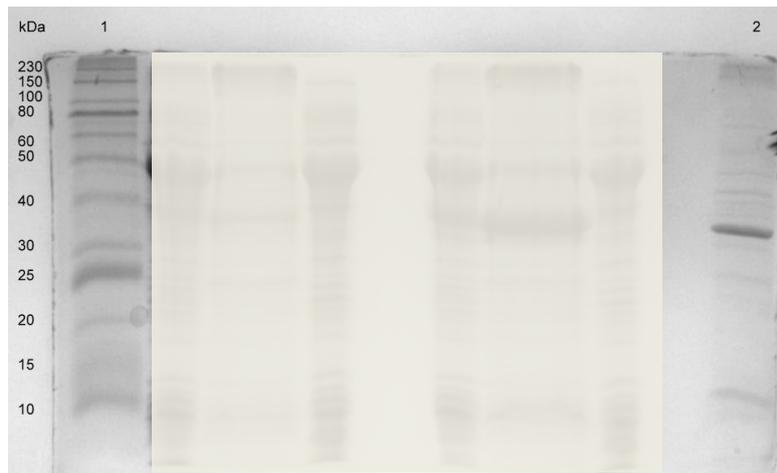


Abbildung 50: Proteingel des solubilisierten Anteils vom Membranpellet aus *E. coli*_Lemo21::pET24b::A14SR_C-His₆ nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) solubilisierter Überstand; weitere Proben sind ausgeblendet.

Die solubilisierten Proteine wurden an der Ni-NTA-Säule aufgearbeitet. Die Wasch- und Elutionsschritte erfolgten mit einem Imidazolstufengradient von 10 mM bis 300 mM (Kapitel 5.3.1). Die gesamte Proteinmenge befand sich im Durchlauf und den ersten drei Waschfraktionen (Abbildung 51).

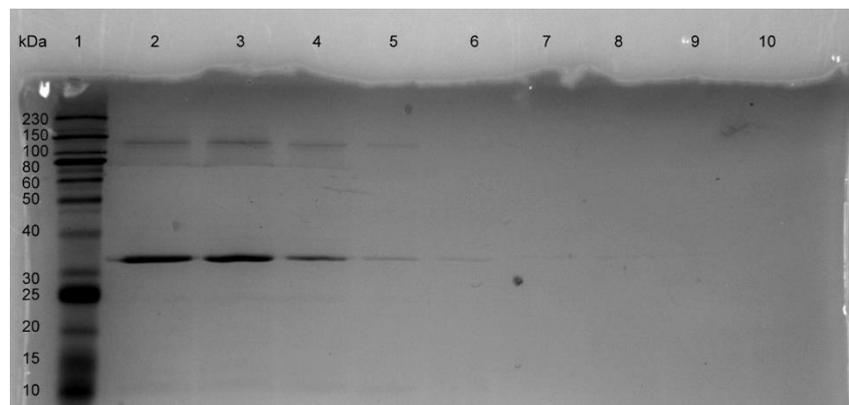


Abbildung 51: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung der solubilisierten Fraktion aus *E. coli*_Lemo21::pET24b::A14SR_C-His₆ nach erfolgter SDS-PAGE. Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) Durchlauf der Ni-NTA-Säule; 3)–6) Waschfraktionen (50 mM Imidazol); 7)–10) Eluatfraktionen (300 mM Imidazol).

Die fehlende Bindung an Ni-NTA spricht für ein unspezifisches, nicht His-markiertes Protein in der solubilisierten Fraktion.

Optimierung der Proteinexpression

Die zu optimierenden Parameter sind unter anderem die Zelldichte zum Zeitpunkt der Induktion und die Inkubationstemperatur. Dementsprechend erfolgte der Zusatz von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, 0.4 mM Endkonzentration) bei einer OD₆₀₀ von 0.4 mit

anschließender Inkubation für 20 Stunden bei 20 °C und 160 rpm. Zudem wurde die L-Rhamnose-Konzentration auf 100 µM vermindert. Die so erhaltenen Zellen wurden zentrifugiert, in 10 mL KP_i -Puffer (50 mM, pH 7.3), diesmal unter Zusatz von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 10 mM Endkonzentration), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und β -Mercaptoethanol (jeweils 1 mM Endkonzentration), resuspendiert und mittels eines Hochdruckhomogenisators aufgeschlossen (Kapitel 5.3.3). Nach der Fraktionierung wurden die membranintegrierten Proteine mit nOG und STDC solubilisiert und mittels Ni-NTA-Chromatographie aufgearbeitet. Die Imidazol-Konzentration in den verwendeten Waschpuffern wurde auf 10 bzw. 20 mM gesenkt, damit die eventuell schwach bindenden His-markierten membranintegrierten Proteine nur im Elutionsschritt von der Säule eluiert werden können. Um eine mögliche Fällung der solubilisierten Proteine bedingt durch die sinkende Detergenzenkonzentration in Wasch- und Elutionspuffer zu verhindern wurden alle verwendeten Puffer auf 0.2 % (m/v) nOG, 0.05 % (m/v) STDC und 1 mM β -Mercaptoethanol eingestellt (Abbildung 52).

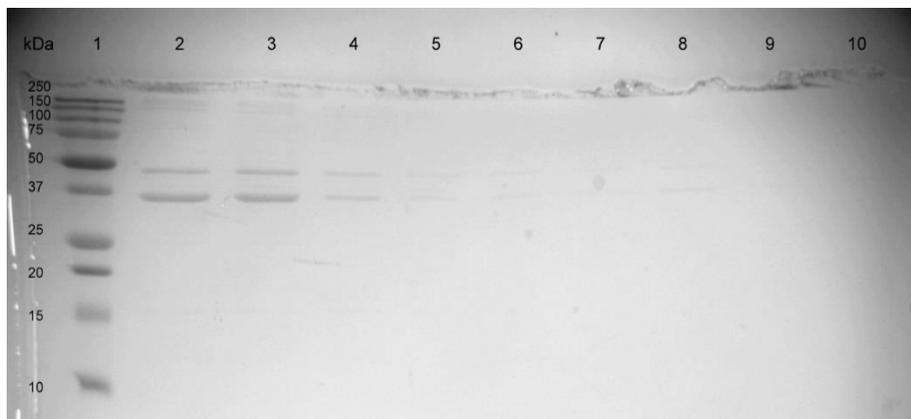


Abbildung 52: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung der solubilisierten Fraktion aus *E. coli*_Lemo21::pET24b::A14SR_C-His₆ (100 µM L-Rhamnose) nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) Durchfluss der Ni-NTA Säule; 3)–6) Waschfraktionen 10 mM Imidazol; 7)–10) Waschfraktionen 20 mM Imidazol.

Die SDS-PAGE-Analytik der Eluatfraktionen brachte keinen Proteinnachweis. Daher wurden die Eluatfraktionen (300 mM Imidazol) vereint und mit einem Proteinkonzentrator mit 30 kDa Trenngrenze aufkonzentriert. Die Analytik erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper gegen das Polyhistidin-Epitop. Obwohl im SDS-PAGE-Gel eine deutliche Bande bei ca. 34 kDa beobachtet werden kann (Abbildung 53), zeigte sie im Western Blot keine Antikörper-Bindung. Die zusätzlich untersuchten Pellets P1 und P2 (nach der Ultrazentrifugation) und das Rohlysate waren ebenfalls negativ (Abbildung 54).

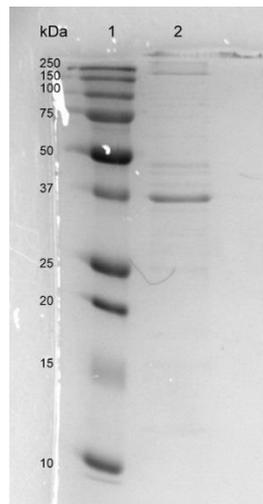


Abbildung 53: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung von $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$ aus *E. coli*_Lemo21::pET24b:: $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$ (100 μM L-Rhamnose) nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) aufkonzentrierte Eluatfraktion.



Abbildung 54: Western Blot Analyse von $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$ aus *E. coli*_Lemo21::pET24b:: $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$ mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) Positivkontrolle His-markiertes Fusionsprotein Chorismatmutase, ca. 15 kDa; 3) Rohlysate; 4) Pellet P1; 5) Pellet P2; 6) Rohlysate 1:2 verdünnt; 7) Pellet P1 1:2 verdünnt; 8) Pellet P1 1:2 verdünnt; 9) aufkonzentrierte Eluatfraktion.

Weitere Expressionsversuche in *E. coli*

Zusätzlich zu den beschriebenen Experimenten wurden weitere Optimierungsversuche der Expressionsbedingungen im Rahmen der Bachelorarbeit von Tobias Volk untersucht.^[114] Das tierische $\Delta 14SR$ -Gen wurde in den Vektor pET28b umkloniert und im *E. coli* Lemo21-Stamm in LB- bzw. TB-Medium exprimiert. Des Weiteren wurden neue Versuche der Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen mittels Ni-NTA-Chromatographie durchgeführt.

Eine am N-Terminus verkürzte Variante von $\Delta 14SR$ wurde ebenfalls hergestellt und für die Expressionsversuche in *E. coli* verwendet. Anhand der Daten von Prakash und Kasbekar, 2002 wurde der C-terminale Teil der $\Delta 14SR$ mit den essentiellen, stark konservierten Aminosäuren als $\Delta 14SR_{tr}$ -Version („tr“ steht für engl. truncated) hergestellt (Kapitel 2.2.5).^[89] Dafür wurde

die Originalsequenz N-terminal um 209 Aminosäuren gekürzt und als ein neues C-terminal Polyhistidin(6x)-markiertes Fusionsprotein für die Expression in *E. coli* Lemo21- und BL21(DE3) Gold-Stämmen verwendet (Abbildung 55).

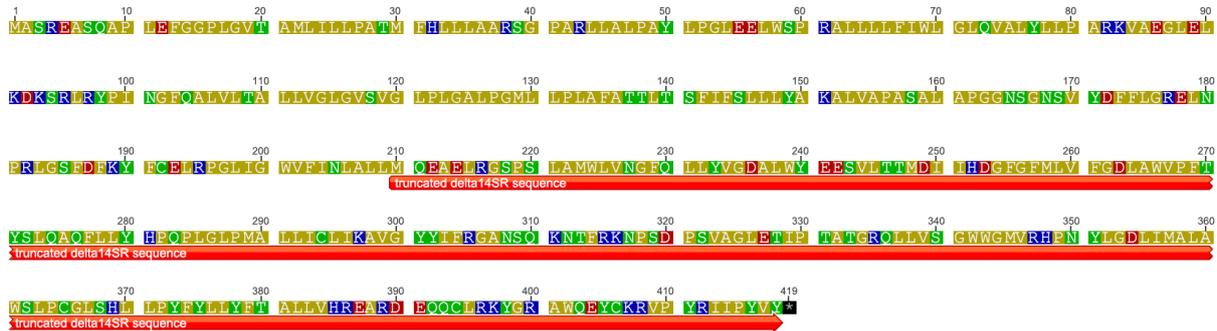


Abbildung 55: $\Delta 14SR$ -Aminosäuresequenz, die N-terminal gekürzte $\Delta 14SRtr$ -Variante ist rot markiert.

Expressionsplasmid pET28b:: $\Delta 14SR_C-His_6$

Das $\Delta 14SR$ -Gen wurde per PCR aus dem Insert für das Konstrukt pET24b:: $\Delta 14SR_C-His_6$ nach dem In-Fusion[®] Protokoll in den pET28b-Vektor umkloniert (Kapitel 5.2.2, Abschnitt A). Das neue Konstrukt pET28b:: $\Delta 14SR_C-His_6$ wurde für die Transformation kompetenter *E. coli* Lemo21-Zellen verwendet (Abbildung 56).

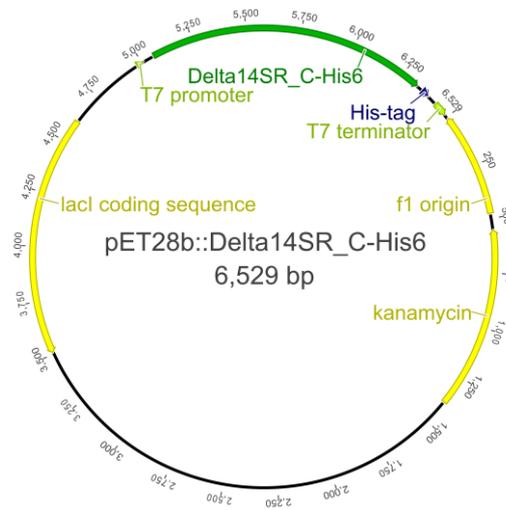


Abbildung 56: Das Konstrukt pET28b:: $\Delta 14SR_C-His_6$, das Insert ist grün markiert.

Expression von *E. coli* Lemo21::pET28b:: $\Delta 14SR_C-His_6$

Die Expressionen erfolgten im 1.6 L Maßstab in LB- und TB-Medium. Die entsprechenden Vorkulturen und die Hauptkulturen wurden nach dem Standardverfahren mit 100 μ M L-Rhamnose erzeugt (Kapitel 5.3.2). Die Induktion mit IPTG (0.4 mM Endkonzentration) erfolgte im Fall der LB-Kultur bei einer OD₆₀₀ von 0.2 und bei TB-Kultur

bei einer OD_{600} von 0.4. Die LB-Kultur wurde bei 28 °C und die TB-Kultur bei 22 °C für 18 Stunden inkubiert.

Reinigung unter denaturierenden Bedingungen

Je 4.3 g Zellen wurden mit EB1-Puffer (6 M Harnstoff) für Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen auf ca. 15 mL aufgefüllt und suspendiert (Kapitel 5.1.3, Abschnitt C). Der Zellaufschluss erfolgte mittels eines Hochdruckhomogenisators (Kapitel 5.3.3). Der entstandene zellfreie Proteinrohextrakt S1 wurde direkt auf eine entsprechend equilibrierte Ni-NTA-Säule gegeben. Nachdem der Durchlauf abgetrennt wurde, erfolgten die Waschschrte und die Elution der gebundenen Proteine (Kapitel 5.3.1). Die SDS-PAGE wurde als Analytik herangezogen (Abbildung 57 und Abbildung 58).

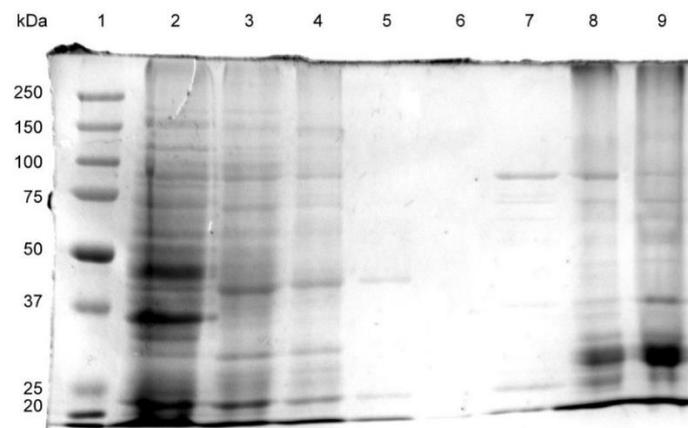


Abbildung 57: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen von $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$ aus *E. coli*_Lemo21::pET28b:: $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$ in LB-Medium nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) Durchlauf; 3)–6) Waschfraktionen; 7) Eluatfraktionen EIB1 und EIB2 vereinigt; 8) Eluatfraktion EIB3; 9) aufkonzentrierte Eluatfraktion aus EIB1–3.

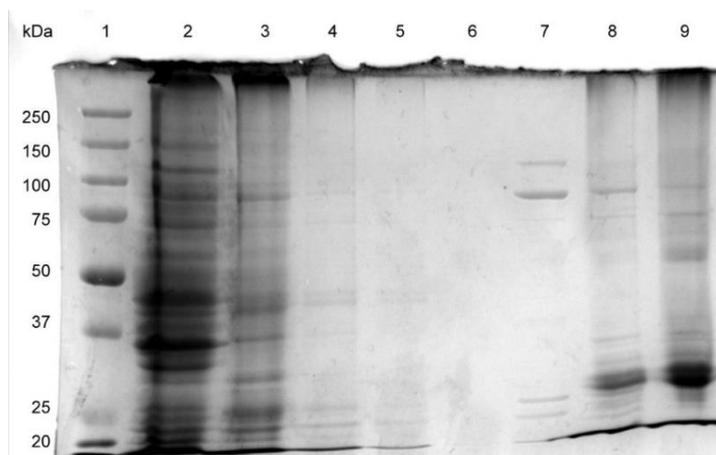


Abbildung 58: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen von *E. coli*_Lemo21::pET28b:: $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$ in TB-Medium nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) Durchlauf; 3)–6) Waschfraktionen; 7) Eluatfraktion EIB1; 8) Eluatfraktion EIB2; 9) Eluatfraktion EIB3.

In beiden Gelen weisen die Taschen Nr. 7 eine charakteristische Bande bei ca. 80 kDa auf.

Damit der Ursprung dieser Bande eindeutig nachgewiesen werden kann, wurden die nichttransformierten *E. coli* Lemo21-Zellen unter gleichen Bedingungen angezogen und untersucht (Abbildung 59, A). Zusätzlich wurden die Leervektor-Fractionen zusammen mit den $\Delta 14SR_C$ -His₆ Eluatfraktionen analysiert (Abbildung 59, B).

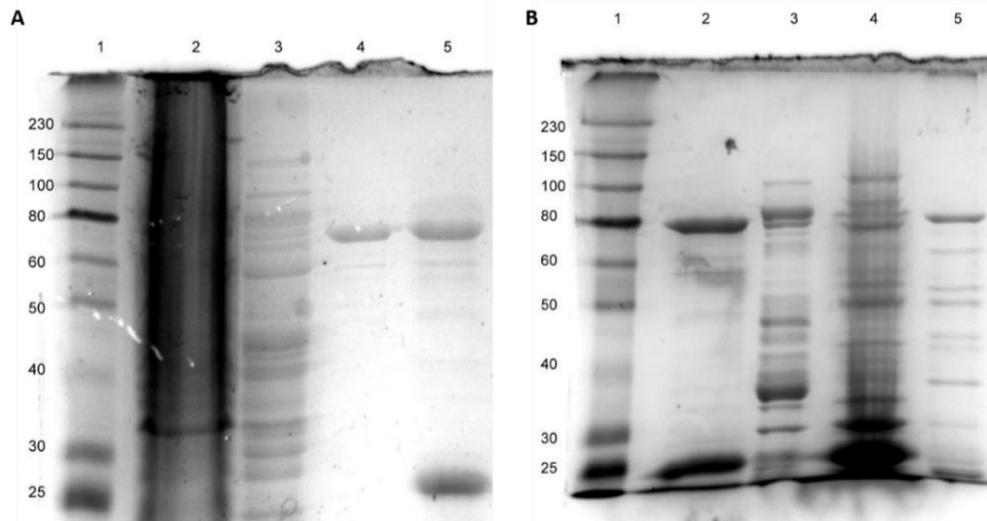


Abbildung 59: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen. **A:** *E. coli* Lemo21::pET28b (Leervektorexpression) nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) zellfreier Proteinrohextrakt; 3) Durchlauf der Ni-NTA-säule; 4) Eluatfraktion EIB1; 5) Eluatfraktion EIB2; **B:** Vergleich der Leervektorexpression mit *E. coli* Lemo21::pET28b:: $\Delta 14SR_C$ -His₆ in TB- und LB-Medium. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) Eluatfraktion EIB2 aus der Leervektorexpression; 3) Eluatfraktion EIB1 aus der Expression in TB-Medium; 4) Eluatfraktion EIB2 aus der Expression in TB-Medium; 5) Eluatfraktionen EIB1 und EIB2 vereinigt aus der Expression in LB-Medium.

Die Gelanalyse wird durch die bereits denaturierten und zum Teil abgebauten Proteine in den Eluatfraktionen (z.B. Tasche 7, Abbildung 58 und Tasche 3, Gel B, Abbildung 59) deutlich erschwert. Gleichwohl kann die in Frage kommende Bande bei ca. 80 kDa als eine unspezifische Bande erkannt werden (Taschen 4 und 5, Gel A, Abbildung 55).

Die Eluatfraktion EIB2 (enthält Banden bei ca. 80 und 25 kDa, Tasche 8, Abbildung 58) wurde zusätzlich mittels Western Blot Analytik mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper analysiert. Die $\Delta 14SR$ -Expression im *E. coli* Lemo21-Stamm konnte damit nicht gezeigt werden (Abbildung 60).

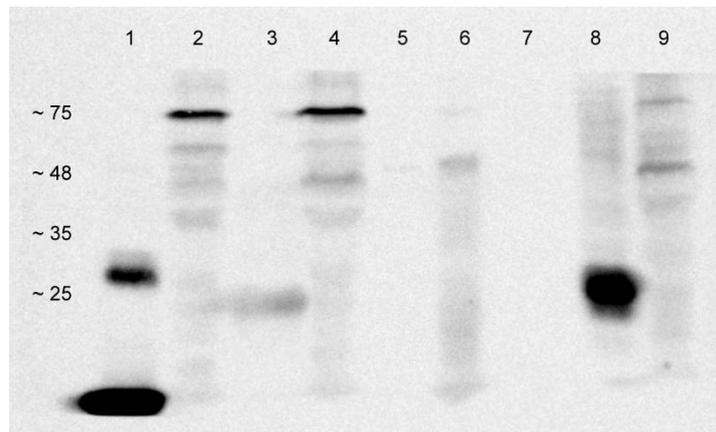


Abbildung 60: Western Blot Analyse von $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$ mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper. 1) Positivkontrolle His-markiertes Fusionsprotein Chorismatmutase, ca. 15 kDa; 3) Eluatfraktion EIB2 der Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen aus *E. coli*_Lemo21::pET28b:: $\Delta 14SRtr_C\text{-His}_6$; 8) Eluatfraktion EIB2 der Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen aus *E. coli*_Lemo21::pET28b:: $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$ in TB-Medium; 2), 5)–7) und 9) Fraktionen aus *S. cerevisiae*::pESCHIS:: $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$; 4) Negativkontrolle *S. cerevisiae*::pESCHIS Leervektor Rohlysat.

Die einzigen positiven Banden bei ca. 25–27 kDa sowohl in der Positivkontrolle (Tasche 1), als auch in den Eluatfraktionen (Taschen 3 und 8) konnten anhand des Molekulargewichts als *E. coli*-eigenes polyhistidinhaltiges Protein SlyD identifiziert werden.^[115]

Expressionsplasmid pET28b:: $\Delta 14SRtr_C\text{-His}_6$

Das für die gekürzte $\Delta 14SR$ -Variante kodierende $\Delta 14SR$ -Gen wurde per PCR mit entsprechenden Primern erzeugt und nach dem In-Fusion® Protokoll in den pET28b-Vektor kloniert (Kapitel 5.2.2, Abschnitt A). Das Konstrukt pET28b:: $\Delta 14SRtr_C\text{-His}_6$ wurde in kompetente *E. coli* BL21(DE3) Gold- und Lemo21-Zellen transformiert (Abbildung 61).

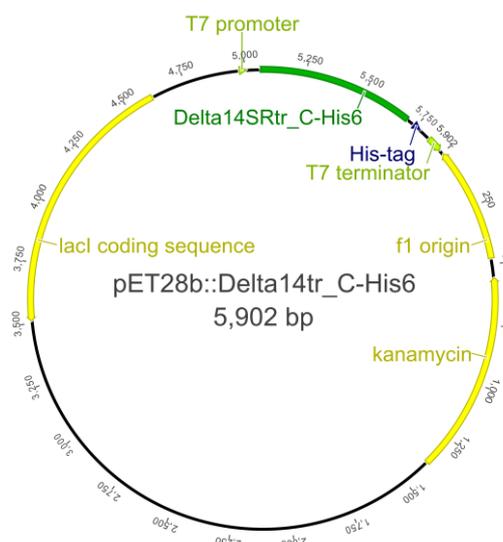


Abbildung 61: Das Konstrukt pET28b:: $\Delta 14SRtr_C\text{-His}_6$, das Insert ist grün markiert.

Expression von pET28b:: Δ 14SRtr_C-His₆ in *E. coli*

Die Expressionen in beiden Stämmen erfolgten im 200 mL Maßstab in TB-Medium. Die entsprechenden Vorkulturen und die Hauptkulturen wurden nach dem Standardverfahren ohne und mit 100 μ M bzw. 500 μ M L-Rhamnose erzeugt (Kapitel 5.3.2). Die Induktion mit IPTG (0.4 mM für Lemo21 bzw. 0.1 mM Endkonzentration für BL21(DE3) Gold) erfolgte bei einer OD₆₀₀ von ca. 0.4. Eine zusätzliche Lemo21-Kultur ohne L-Rhamnose sowie eine BL21(DE3)Gold-Kultur wurden als Negativkontrollen ohne Induktion weiter behandelt. Die Expression erfolgte bei 21 °C und 160 rpm für 18 Stunden. Je 110 mg Zellen aus allen Kulturen wurden durch Inkubation in harnstoffhaltigem (6 M) SDS-Puffer aufgeschlossen und pelletiert. Die zellfreien Proteinrohextrakte S1 wurden direkt mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 62). Die verstärkt auftretenden Banden in induzierten Lemo21-Fractionen ohne bzw. mit 100 μ M L-Rhamnose (roter Pfeil) entsprechen dem zu erwartenden Expressionsmuster in diesem Stamm (die Bande wird unter 500 μ M L-Rhamnose infolge der verminderten Effizienz des T7-Expressionssystems deutlich schwächer). Dementsprechend wurden die Rohlysate aus Lemo21-Ansätzen einer weiteren Proteinreinigung an einer Ni-NTA-Säule unter denaturierenden Bedingungen unterzogen (Kapitel 5.3.1).

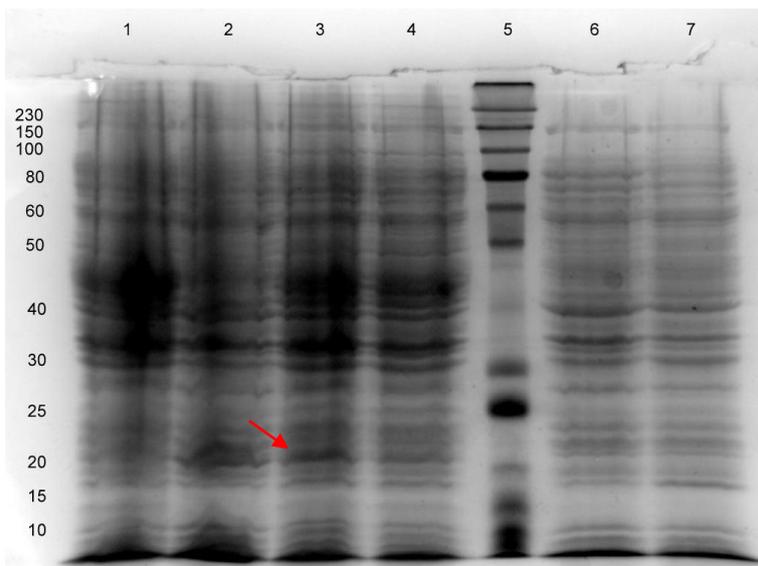


Abbildung 62: Proteingel von Δ 14SRtr_C-His₆; 2)–4) aus *E. coli* Lemo21; 6)–7) aus *E. coli* BL21(DE3) Gold nach erfolgter SDS-PAGE. 1) S1 ohne Induktion; 2) S1 ohne L-Rhamnose; 3) S1 mit 100 μ M L-Rhamnose; 4) S1 mit 500 μ M L-Rhamnose; 5) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 6) S1 ohne Induktion; 7) S1 induziert.

Ni-NTA-Proteinreinigung von $\Delta 14SRtr_C-His_6$

Die Zellen aus den drei erhaltenen Expressionskulturen im *E. coli* Lemo21-Stamm, (i) Negativkontrolle ohne Induktion, (ii) induziert ohne L-Rhamnose und (iii) induziert mit 100 μ M L-Rhamnose, wurden unter Zusatz von Proteaseinhibitoren (Kapitel 5.1.1) mittels Ultraschall aufgeschlossen und fraktioniert (Kapitel 5.3.3). Die erhaltenen zellfreien Proteinrohextrakte S1 wurden separat an Ni-NTA-Säulen unter denaturierenden Bedingungen aufgearbeitet (Kapitel 5.3.1). Die Eluate aus allen drei Proben wurden zusammen mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 63).

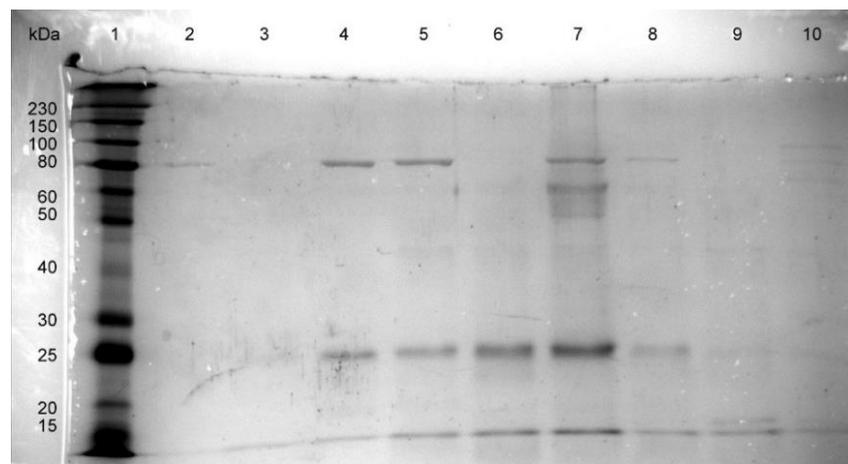


Abbildung 63: Proteingel von $\Delta 14SRtr_C-His_6$ nach der Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen aus *E. coli*_Lemo21::pET28b:: $\Delta 14SRtr_C-His_6$ nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) Eluat 1 ohne Induktion; 3) Eluat 1 induziert, ohne L-Rhamnose; 4) Eluat 1 induziert, 100 μ M L-Rhamnose; 5) Eluat 2 ohne Induktion; 6) Eluat 2 induziert, ohne L-Rhamnose; 7) Eluat 2 induziert, 100 μ M L-Rhamnose; 8) Eluat 3 ohne Induktion; 9) Eluat 3 induziert ohne L-Rhamnose; 10) Eluat 3 induziert, 100 μ M L-Rhamnose.

Hier erscheinen wieder bei 80 und 25 kDa die bereits als unspezifisch bindend charakterisierte Banden (vergleiche Abbildung 59). Die in Frage kommende Bande bei ca. 20 kDa (Tasche 3, Abbildung 62) lässt sich hier nicht wiederfinden. Die Eluatfraktion 2 aus der Kultur mit 100 μ M L-Rhamnose (Tasche 7, Abbildung 63) wurde zusätzlich mittels Western Blot analysiert (Tasche 3, Abbildung 60). Auch mit dieser Methode konnte nur ein unspezifisch bindendes Protein nachgewiesen werden.

Native $\Delta 14SR$ aus Ratte sowie ihre gekürzte Version $\Delta 14SRtr$ konnten in *E. coli* nicht produziert werden. Alle vorgenommenen Optimierungsversuche führten nicht zu einem nachweislich produzierten Protein. Ein möglicher Grund dafür könnte eine nicht ausreichende Membranoberflächenbereitstellung in *E. coli* sein. Dieses und die damit verbundenen Probleme wie fehlende Maschinerie für die Proteinfaltung und den Transport könnten durch eine Expression in *Rhodobacter capsulatus* gelöst werden.

B. Expressionsversuche in *Rhodobacter capsulatus* B10S-T7

Rhodobacter capsulatus ist ein Gram-negatives fakultativ phototrophes Bakterium. Es ist in der Lage unter phototrophen Wachstumsbedingungen zusätzliche intrazytoplasmatische Membranen mit für die Photosynthese benötigten membranintegrierten Proteinkomplexen auszubilden. Diese vergrößerte Membranfläche kann für die rekombinante Produktion von gewünschten Proteinen ausgenutzt werden. Zusätzlich wird die dafür benötigte entsprechende Proteinfaltungs- und Translokationsmaschinerie bereitgestellt. *Rh. capsulatus* Stamm B10S-T7 enthält das *T7-RNA-Polymerase*-Gen, welches unter Kontrolle eines Fructose-induzierbaren Promoters steht. Hierdurch ist es möglich, ohne zusätzliche molekular-biologische Modifikationen das gleiche Konstrukt auf der Basis vom pRhot-Hi2-Vektor sowohl für *E. coli* als auch für *Rh. capsulatus* zu verwenden.^[116] Diese Eigenschaften machen *Rh. capsulatus* B10S-T7 besonders geeignet für die Überproduktion membranintegrierter Proteine.

Expressionsplasmid pRhot-Hi2:: Δ 14SR_C-His₆

Als Ausgangsmaterial diente der für Δ 14SR kodierende Genabschnitt, gewonnen aus Ratten-cDNA (Kapitel 3.2.1, Abschnitt A; Abbildung 45). Der amplifizierte DNA-Abschnitt wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI verdaut und mittels Gelelektrophorese gereinigt. Der Vektor pRhot-Hi2 enthält einen induzierbaren T7-Promoter, Kanamycin- und Chloramphenicol-Resistenzmarker sowie einen C-terminalen Hexahistidin-Affinitätstag (His₆-Tag).^[116] Der pRhot-Hi2-Vektor wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI verdaut, mit der Antarctic Phosphatase dephosphoryliert und mittels Gelelektrophorese gereinigt (Kapitel 5.2.1).

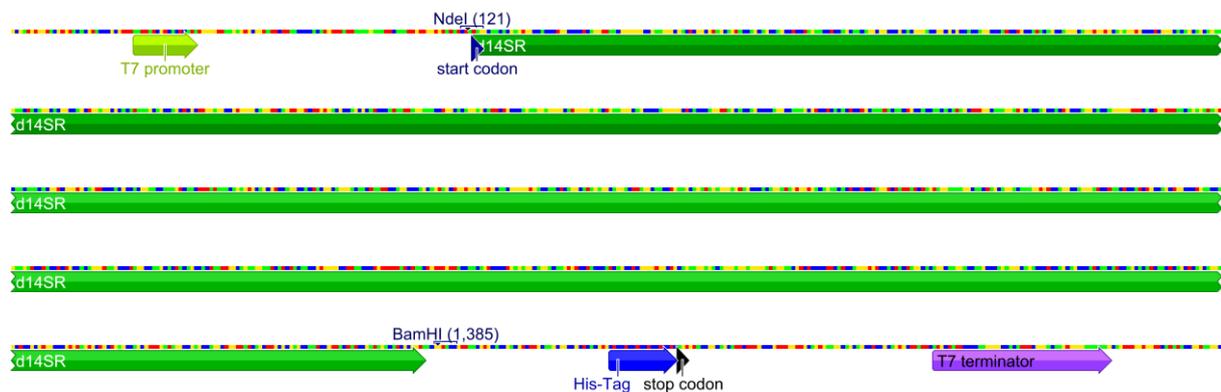


Abbildung 64: Ausschnitt aus dem Konstrukt pRhot-Hi2:: Δ 14SR_C-His₆; das Insert ist grün markiert.

Danach wurde der für $\Delta 14SR$ kodierende DNA-Abschnitt in den Vektor pRhot-Hi2 zwischen die NdeI- und BamHI-Schnittstellen kloniert und das erhaltene Konstrukt in kompetente *E. coli* TG1-Zellen transformiert (Kapitel 5.2.2, Abschnitt B). Die Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA bestätigte das gewünschte Konstrukt (Abbildung 64).

Expressionsplasmid pRhot-Hi2:: $\Delta 14SR$ _N-His₆

Das Vorhandensein eines N-terminalen Signalpeptides wurde für $\Delta 14SR$ nicht gezeigt. Auch die Analyse der Aminosäuresequenz mit den Bioinformatiktools „TMHMM Server v. 2.0“ und „Octopus“ erbrachte keinen Hinweis auf ein N-terminales Signalpeptid.^[117–119] Dementsprechend wurde auch eine zweite $\Delta 14SR$ -Variante mit einem N-terminalen Hexahistidin-Affinitätstag hergestellt.

Dafür wurde die $\Delta 14SR$ -Ausgangssequenz per PCR entsprechend modifiziert. Im ersten Schritt wurde der für $\Delta 14SR$ kodierende Genabschnitt mittels PCR unter gleichzeitiger Einführung des N-terminalen His₆-Tags vervielfältigt. Im zweiten PCR-Schritt wurden die spezifischen, 15 bp langen, dem Expressionsvektor pRhot-Hi2 homologen Überhänge an beiden Enden nach den Anforderungen der ligasefreien In-Fusion[®] Klonierungsmethode eingeführt. Der amplifizierte Genabschnitt ist ca. 1.2 kb groß und wurde mittels Gelelektrophorese gereinigt (Abbildung 65).

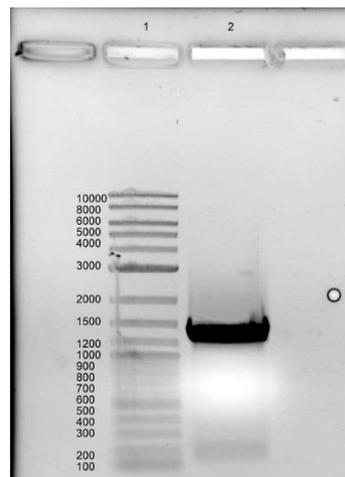


Abbildung 65: Agarosegel des PCR-Produkts $\Delta 14SR$. 1) Marker, Gewichtsangaben in bp; 2) das PCR-Produkt $\Delta 14SR$ für In-Fusion[®] Klonierungsmethode.

Für die Linearisierung und Amplifizierung des pRhot-Hi2-Vektors wurden spezielle Primer verwendet, so dass der DNA-Abschnitt zwischen der NdeI-Schnittstelle und dem Stopcodon TGA entfernt wurde. Anschließend wurde das $\Delta 14SR$ _N-His₆-Insert in den linearisierten Vektor nach dem In-Fusion[®] Protokoll kloniert (Kapitel 5.2.2, Abschnitt B). Kompetente

E. coli TG1-Zellen wurden mit dem erhaltenen Konstrukt transformiert. Die Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA bestätigte das gewünschte Konstrukt (Abbildung 66).

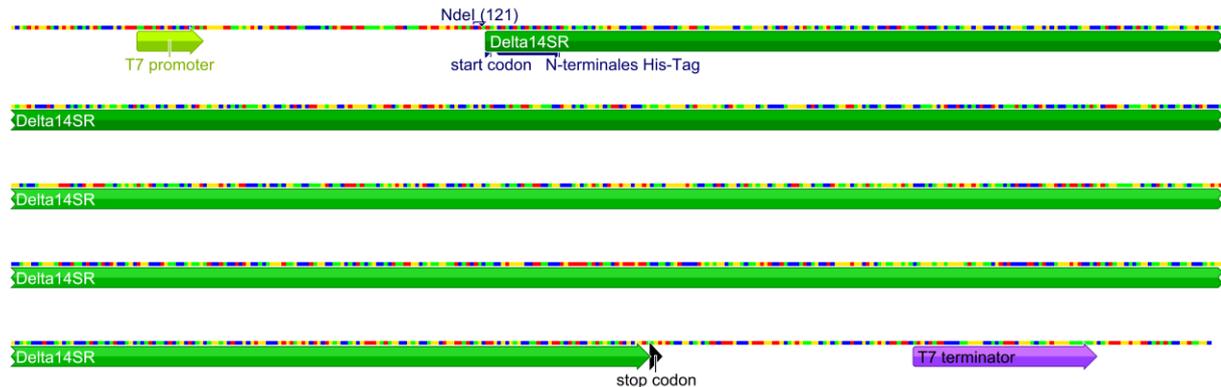


Abbildung 66: Das Konstrukt pRhot-Hi2:: $\Delta 14SR_N$ -His₆; das $\Delta 14SR$ -Gen ist grün markiert.

Expression von $\Delta 14SR$ in *Rhodobacter capsulatus*

Die erhaltenen Konstrukte wurden an den Arbeitskreis Dr. Thomas Drepper, Forschungszentrum Jülich GmbH weitergegeben. Dort wurde die Transformation in den Expressionsstamm *Rhodobacter capsulatus* B10S-T7 von Herrn Armagan Özgür erfolgreich durchgeführt. Das $\Delta 14SR$ -Gen wurde in den Expressionsstämmen *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* C43 (DE3) und *R. capsulatus* B10S-T7 unter der Kontrolle eines T7 RNA Polymerase basierten Systems durchgeführt, wohingegen in dem *R. capsulatus* Wildtyp B10S und der nifHDK Deletionsmutante TD22 die Expression des Gens unter der Kontrolle des nifHDK Promotors (pRhonHi-2) durchgeführt wurde. Die Expressionsversuche in *E. coli* wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Induktion mit 0,4 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,4–0,7; Probenentnahme in der logarithmischen und stationären Phase.

Der *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 wurde unter photoheterotrophen Bedingungen (3 Tage anaerob unter Beleuchtung mit Glühbirnenlicht) in RCV Minimalmedium mit NH₄⁺ als Stickstoffquelle angezogen. Induziert wurden die Kulturen mit 8 mM Fruktose. Das *T7 RNAP* Gen steht unter der Kontrolle eines Fruktoseinduzierbaren Promotors im Stamm B10S-T7. Die Deletionsmutante TD22 und der Wildtypstamm B10S wurden ebenfalls mit RCV Minimalmedium unter phototrophen Bedingungen angezogen mit dem Unterschied, dass für die Induktion der Zielgenexpression kein Fruktose ins Medium gegeben wurde, sondern eine alternative Stickstoffquelle. Während die Vorkulturen standardisiert mit NH₄⁺ angezogen wurden, wurde die Hauptkultur mit Serin angezogen, also unter Ammonium-depletierenden Bedingungen, die die Expression der Zielgene im pRhonHi-2-Vektor anschalten.

Die Expressionsversuche sowohl in *E. coli* als auch in *Rhodobacter capsulatus* B10S-T7 blieben erfolglos.

3.2.2 Expression in einem eukaryotischen Expressionssystem

Das gewählte Expressionssystem besteht aus dem Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* Stamm MH272 3fa und dem Vektor pESCHIS (Kapiteln 5.1.4 und 5.1.5). Dieser auxotrophe Hefestamm propagiert nur unter Zusatz der Aminosäuren L-Leucin, L-Tryptophan und L-Histidin, sowie den Nukleinbasen Uracil und Adenin. Im Fall des pESCHIS-Vektors wird der Selektionsdruck durch die Kultivierung in histidinfreien Medien erreicht. Der pESCHIS-Vektor besitzt das für die Synthese der Imidazol-Glycerinphosphat-Dehydrogenase benötigte *HIS3*-Gen und zwei *MCS*-Bereiche unter Kontrolle von den starken, durch Galactose induzierbaren, Promotoren GAL1 und GAL10. Des Weiteren bietet der pESCHIS-Vektor die Möglichkeit einer Mitexpression von künstlichen FLAGTM (DYKDDDDK)- und MYC1-Epitopen. Die dadurch markierten Fusionsproteine können mittels Western Blot mit entsprechenden Antikörpern detektiert werden. Der eingesetzte pESCHIS-Vektor besitzt keinen Polyhistidin-Tag, deswegen wurde die für $\Delta 14SR$ kodierende Sequenz molekularbiologisch entsprechend modifiziert.

A. Molekularbiologische Arbeiten

Für die heterologe rekombinante Expression in *S. cerevisiae* wurde die tierische $\Delta 14SR$ als Fusionsprotein mit einem C-terminalen (Konstrukt pESCHIS:: *$\Delta 14SR$ _C-His₆*) bzw. N-terminalen (Konstrukt pESCHIS:: *$\Delta 14SR$ _N-His₆*) Polyhistidin(6x)-Tag hergestellt. Zusätzlich wurde ein Expressionsplasmid mit zwei identischen OLR (offenes Leseraster) unter beiden Promotern GAL1 bzw. GAL10 hergestellt (pESCHIS::*2x $\Delta 14SR$ _C-His₆*).

Expressionsplasmide pECSHIS:: *$\Delta 14SR$ _C-His₆* und pECSHIS:: *$\Delta 14SR$ _N-His₆*

Es wurde die ligasefreie In-Fusion[®] Klonierungsstrategie verwendet. Beide Gene wurden jeweils unter GAL1-Promoter in den pESCHIS-Vektor kloniert (Kapitel 5.2.2, Abschnitt C). Kompetente *E. coli* TG1-Zellen wurden mit den erhaltenen Konstrukten transformiert (Abbildung 67 und Abbildung 68).

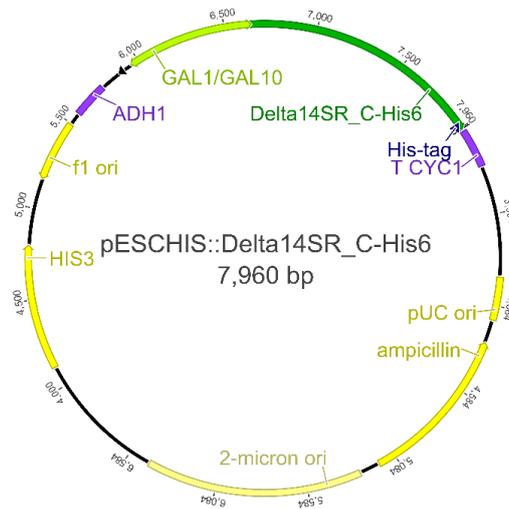


Abbildung 67: Das Konstrukt pESCHIS:: $\Delta 14SR_C$ -His₆; das Insert ist grün markiert.

Einer der erhaltenen *E. coli* Klone wurde in Flüssigkultur für die Plasmidisolierung angezogen. Nach der DNA-Sequenzbestätigung wurde die Transformation in kompetente *S. cerevisiae* MH272-3fa/ α Zellen vorgenommen.

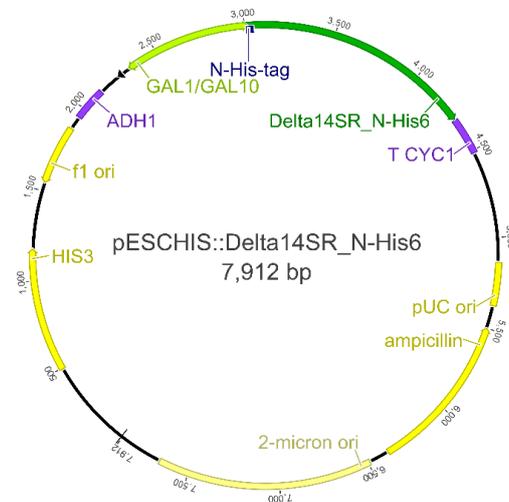


Abbildung 68: Das Konstrukt pESCHIS:: $\Delta 14SR_N$ -His₆; das Insert ist grün markiert.

Expressionsplasmid pECSHIS::2x $\Delta 14SR_C$ -His₆

Nach den ersten Expressionsversuchen mit einem $\Delta 14SR$ -OLR wurde versucht die Genkopienanzahl und damit die Transkriptanzahl zu erhöhen. Dafür wurde das $\Delta 14SR$ -Gen gleichzeitig unter beide Promotoren GAL1 und GAL10 in den pESCHIS-Vektor kloniert (Kapitel 5.2.2, Abschnitt C). Das erhaltene Konstrukt wurde in kompetente *E. coli* TG1-Zellen transformiert (Abbildung 69).

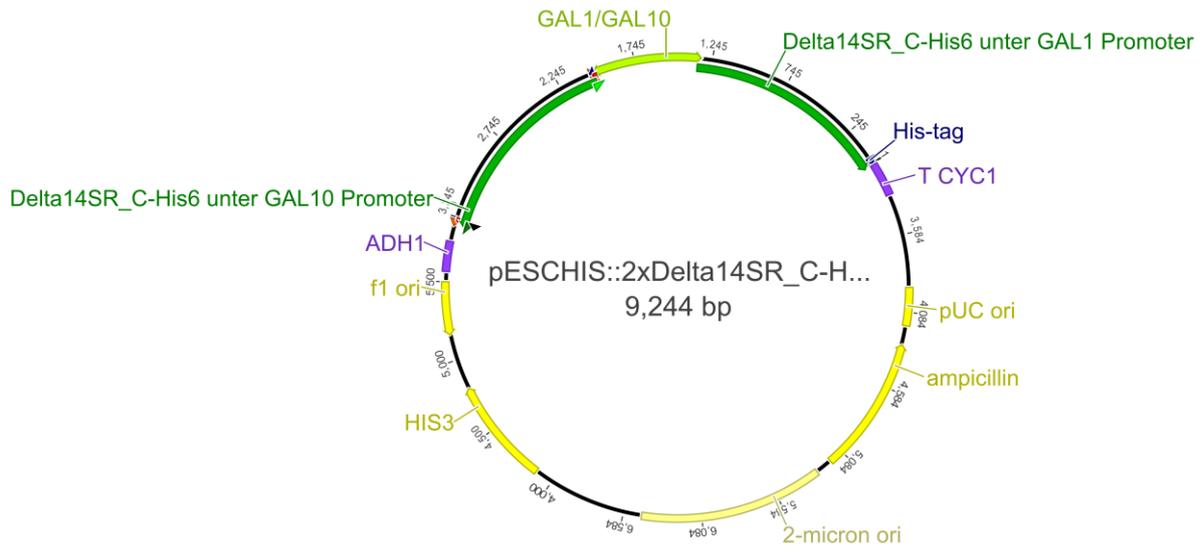


Abbildung 69: Das Konstrukt pESCHIS::2x Δ 14SR_C-His₆; die Δ 14SR-ORL sind grün markiert.

Nach der DNA-Sequenzbestätigung wurde die Transformation in kompetente *S. cerevisiae* MH272-3fa/ α Zellen vorgenommen.

B. Expressionsversuche von $\Delta 14SR$ in *S. cerevisiae*

Die grundsätzliche induzierbare Proteinexpression unter dem GAL-Promoter in Hefepilzen *S. cerevisiae* basiert auf einer Hauptkultur in einem glucosehaltigen Vollmedium (YPD) oder in einem selektiven Kompletmedium (SD). Bei Einsatz des Vollmediums kann kein Selektionsdruck ausgeübt werden, was bei längerer Kultivierung zum Verlust des Plasmids führen kann.^[120] Um eine maximale Expression zu gewährleisten wurde bei der Anzucht der Hauptkulturen bis auf eine Ausnahme auf das Vollmedium YPD verzichtet.

Glucose stellt einen starken Suppressor des GAL-Promoters dar und soll vor der Induktion entfernt werden. Die Induktion der Proteinexpression wird durch Zugabe von Galactose in Form eines galactosehaltigen selektiven Kompletmediums (SG) oder eines Vollmediums (YPG) erreicht. Dieses System kann auch durch eine kontinuierliche Expression in galactosehaltigen Voll- oder selektiven Kompletmedien (YPG oder SG) modifiziert werden. Weitere Unterschiede bestehen unter anderem in der Art der Glucoselimitierung, dem Einsatz von DMSO und L-Histidin.

Leervektorexpression pESCHIS als Negativkontrolle

Eine frische Zellkolonie, transformiert mit dem Leervektor pESCHIS, wurde in 10 mL SD/ \emptyset His resuspendiert und bei Standardbedingungen über Nacht inkubiert (Kapitel 5.3.4). 100 mL des galactosehaltigen selektiven Kompletmediums SG/ \emptyset His wurden mit dieser Standardvorkultur beimpft und für 72 Stunden bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 10000 $\times g$, 10 min, 4 °C geerntet und mit H₂O_{bidest.} gewaschen. Erhalten wurden 1.5 g Zellen, welche mit Lysepuffer II auf 10 mL aufgefüllt und suspendiert wurden. Der Zellaufschluss erfolgte mittels eines Hochdruckhomogenisators. Die nicht aufgeschlossenen Zellen und groben Zellreste wurden bei 10000 $\times g$, 15 min, 4 °C abgetrennt. Der erhaltene Überstand S1 wurde dekantiert, mit Glycerin (10% m/v Endkonzentration) versetzt und nochmals bei 164000 $\times g$, 60 min, 4 °C ultrazentrifugiert. Das Pellet P2 wurde abgetrennt, in 2 mL MRB-Puffer (engl. Membrane Resuspension Buffer) suspendiert und erneut bei 164000 $\times g$, 60 min, 4 °C zentrifugiert. Das membranhaltige Pellet P3 wurde abgetrennt und in 2 mL MRB-Puffer resuspendiert (Kapitel 5.3.5). Alle Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert und dienten weiter als Negativkontrollen für die SDS-PAGE- und Western Blot Analytik.

Expression von *S. cerevisiae*::pESCHIS:: Δ 14SR_C-His₆

Die Expression erfolgte nach Methode Ia in 100 mL SG/ØHis bei 24 °C für 48 Stunden (Kapitel 5.3.5). Die Zellen wurden geerntet, mit H₂O_{bidest.} gewaschen und mittels eines Hochdruckhomogenisators aufgeschlossen. Das erhaltene Rohlysat wurde der Fraktionierung zwecks Membranisolierung unterzogen (Kapitel 5.3.5). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abbildung 70 und 67).

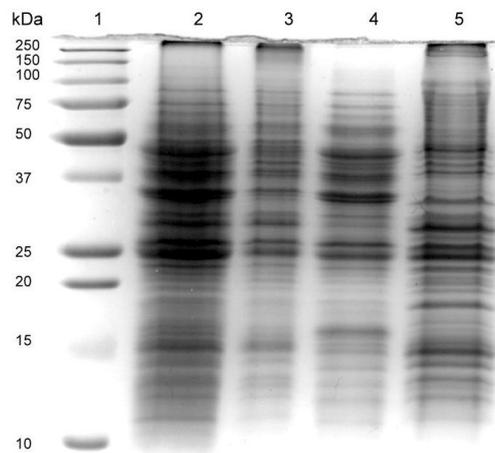


Abbildung 70: Proteingel von *S. cerevisiae*::pESCHIS:: Δ 14SR_C-His₆ nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) Rohlysat CE; 3) P1 nach 10000×g; 3) S2 nach 164000×g; 4) P2 nach 164000×g.

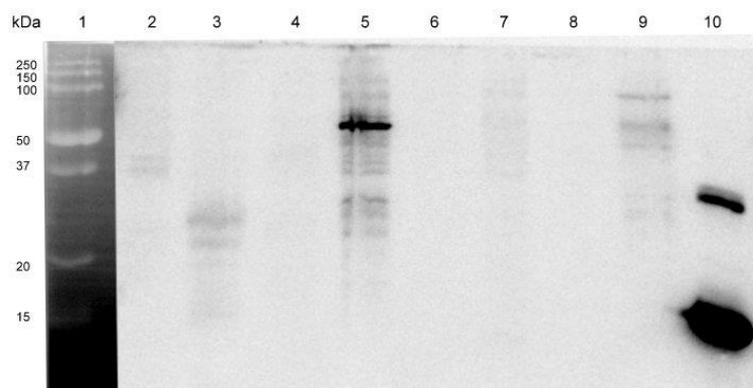


Abbildung 71: Western Blot Analyse von Δ 14SR_C-His₆ und Δ 14SR_N-His₆ mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) *S. cerevisiae*::pESCHIS:: Δ 14SR_C-His₆ Rohlysat; 3) *S. cerevisiae*::pESCHIS:: Δ 14SR_C-His₆ P1; 4) *S. cerevisiae*::pESCHIS:: Δ 14SR_C-His₆ S2; 5) *S. cerevisiae*::pESCHIS:: Δ 14SR_C-His₆ P2; 6)–9) *S. cerevisiae*::pESCHIS:: Δ 14SR_N-His₆ Fraktionen (Abbildung 71); 10) Positivkontrolle His-markiertes Fusionsprotein Chorismatmutase, ca. 15 kDa.

Die Bande bei ca. 75 kDa (Tasche 5, Abbildung 71) entspricht nicht dem errechneten Gewicht von Δ 14SR von ca. 49 kDa. Trotzdem wurde diese Fraktion für weitere Proteinisolierungsversuche verwendet. Dass es sich um eine unspezifische Bande handelt, wurde erst aus späteren Western Blot Versuchen ersichtlich (Abbildung 73).

Versuch der Solubilisierung und Reinigung

Das membranhaltige Pellet P2 wurde der Solubilisierung der Membranproteine mit anschließender Ni-NTA-Reinigung unterzogen (Kapitel 5.3.1). Die Analytik erfolgte mittels SDS-PAGE (Abbildung 72). Die Eluatfraktionen wurden mit einem Proteinkonzentrator mit 30 kDa Trenngrenze konzentriert und per Western Blot (Tasche 7, Abbildung 73) analysiert. Dabei konnte keine positive Bande identifiziert werden.

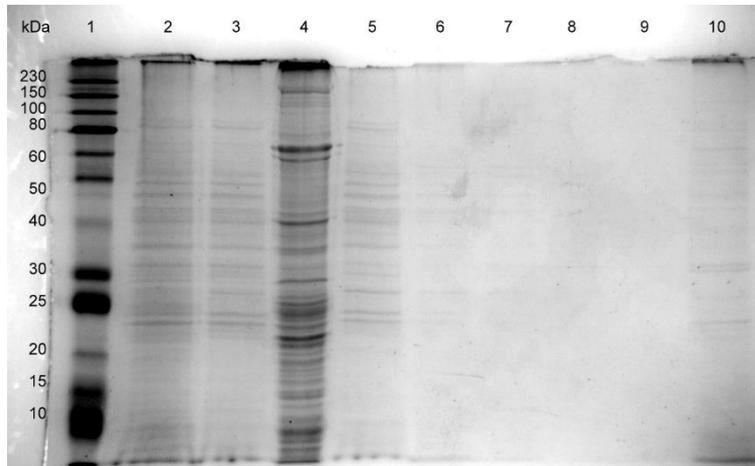


Abbildung 72: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung nach der Solubilisierung der Membranproteine von Fraktion P2 aus *S. cerevisiae*::pESCHIS:: Δ 14SR_C-His₆ nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) P3, resuspendiert; 3) S4; 4) P4; 5) Durchlauf; 6) 2. Waschfraktion; 7) 4. Waschfraktion; 8) 6. Waschfraktion; 9) 8. Waschfraktion; 10) Eluatfraktionen aufkonzentriert.

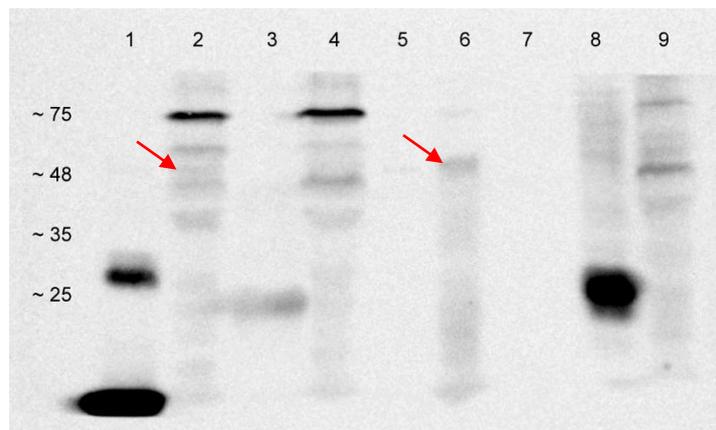


Abbildung 73: Western Blot Analyse von Δ 14SR_C-His₆ mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper. 1) Positivkontrolle His-markiertes Fusionsprotein Chorismatmutase, ca. 15 kDa; 2) *S. cerevisiae*::pESCHIS:: Δ 14SR_C-His₆ Rohlysate; 4) Negativkontrolle *S. cerevisiae*::pESCHIS (Leervektor) Rohlysate; 5) *S. cerevisiae*::pESCHIS:: Δ 14SR_C-His₆ P2; 6) *S. cerevisiae*::pESCHIS:: Δ 14SR_C-His₆ P1; 7) *S. cerevisiae*::pESCHIS:: Δ 14SR_C-His₆ konzentriertes Eluat der Ni-NTA-Reinigung nach Solubilisierung der membranintegrierten Proteine; 9) *S. cerevisiae*::pESCHIS:: Δ 14SR_C-His₆ P1; 3) Eluatfraktion 2 der Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen aus *E. coli*_Lemo21::pET28b:: Δ 14SRtr_C-His₆; 8) Eluatfraktion EIB2 der Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen aus *E. coli*_Lemo21::pET28b:: Δ 14SR_C-His₆ in TB-Medium.

Anhand des Western Blots (Abbildung 73) können folgende Aussagen getroffen werden: (i) Die früher beobachtete Bande bei ca. 75 kDa wird durch eine unspezifische Bindung der Antikörper verursacht (sie kommt auch in der Negativkontrolle vor); (ii) Das zur Proteinreinigung verwendete Pellet P2 sowie das konzentrierte Eluat enthalten keine His₆-markierte $\Delta 14SR$; (iii) Im Rohlysate sowie im Pellet P1 könnte möglicherweise $\Delta 14SR$ schwach überexprimiert vorhanden sein (rote Pfeile).

Expression von *S. cerevisiae*::pESCHIS:: $\Delta 14SR$ _N-His₆

Die Expression erfolgte im 400 mL Maßstab für 22 Stunden nach Methode Ia (Kapitel 5.3.5). 70 mL der induzierten Hauptkultur wurden nach vier Stunden abgetrennt und dienten als zusätzliche Kontrolle (die „4 Stunden“ Fraktion). Die geernteten und gewaschenen Zellen wurden in Lysepuffer II resuspendiert und mittels eines Hochdruckhomogenisators aufgeschlossen (Kapitel 5.3.5). Die erhaltenen Rohlysate wurden bei 10000×g, 15 min, 4 °C zentrifugiert. Die zellfreien Proteinrohextrakte S1 wurden zusätzlich bei 60000×g, 60 min, 4 °C zentrifugiert. Die daraus resultierenden Fraktionen S2, P2, P1 sowie die Rohlysate wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 74).

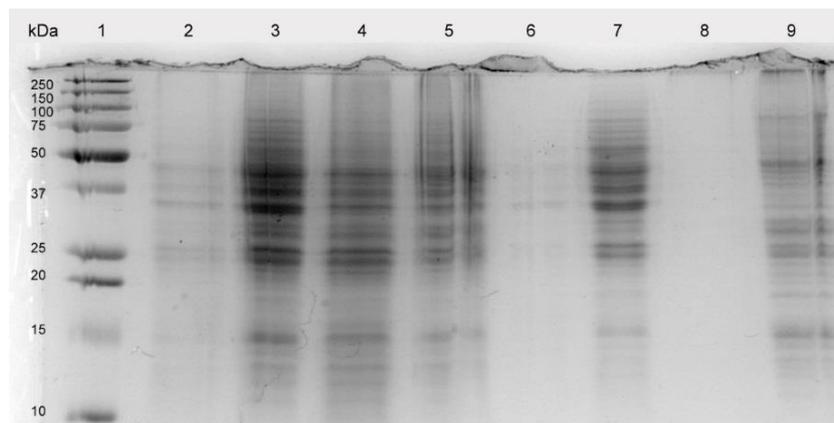


Abbildung 74: Proteingel von $\Delta 14SR$ _N-His₆ aus *S. cerevisiae*::pESCHIS:: $\Delta 14SR$ _N-His₆ nach erfolgter SDS-PAGE. Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) Rohlysate nach 4 Stunden; 3) Rohlysate nach 22 Stunden; 4) P1 nach 4 Stunden; 5) P1 nach 22 Stunden; 6) S2 nach 4 Stunden; 7) S2 nach 22 Stunden; 8) P2 nach 4 Stunden; 9) P2 nach 22 Stunden.

Die „4 Stunden“ Fraktion enthielt eine für die SDS-PAGE-Analytik nicht ausreichende Menge an Zellmaterial. Dementsprechend wurde der Western Blot als nächste analytische Methode angewendet (Abbildung 75).

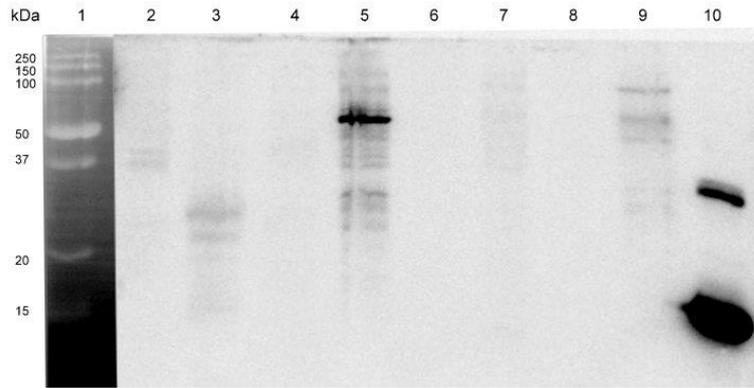


Abbildung 75: Western Blot Analyse von $\Delta 14SR_N\text{-His}_6$ mit „HISProbe™-HRP“ Antikörper. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2)–5) *S. cerevisiae::pESCHIS::Δ14SR_C-His₆* Fraktionen (Abbildung 67); 6) $\Delta 14SR_N\text{-His}_6$ Rohlysate nach 4 Stunden; 7) $\Delta 14SR_N\text{-His}_6$ Rohlysate nach 22 Stunden; 8) $\Delta 14SR_N\text{-His}_6$ P2 nach 4 Stunden; 9) $\Delta 14SR_N\text{-His}_6$ P2 nach 22 Stunden; 10) Positivkontrolle His-markiertes Fusionsprotein Chorismatmutase, ca. 15 kDa.

Weitere Versuche beinhalteten unter anderem die Expression mit der Hauptkultur im Vollmedium YPD unter Ethanolzusatz (2.5% Endkonzentration) mit anschließender Induktion im galactosehaltigen Vollmedium YPG bei niedrigen Temperaturen (24 °C) und verlängerter Induktionsdauer (48 Stunden). Die anschließenden Proteinreinigungsversuche an der Ni-NTA-Säule nach entsprechender Solubilisierung der membranintegrierten Proteine oder unter denaturierenden Bedingungen blieben erfolglos.

Expression von *S. cerevisiae::pESCHIS::2xΔ14SR_C-His₆*

Die Expression erfolgte im 50 mL Maßstab mit Hauptkulturen in den Vollmedien YPD (I) bzw. YPG (II) sowie in den selektiven Kompletmedien SD/ØHis (III) bzw. SG/ØHis (IV). Die Induktion der Proteinproduktion in glucosehaltigen Kulturen wurde durch Austausch mit galactosehaltigen Medien erreicht. Als Negativkontrolle diente eine zusätzliche Kultur in SD/ØHis (V) ohne weitere Induktion (Tabelle 1).

Tabelle 1: Testreihe der Expression von *S. cerevisiae::pESCHIS::2xΔ14SR_C-His₆*. Die glucosehaltigen Medien sind rot, die galactosehaltigen Medien sind grün markiert.

	Vollmedien		Selektive Kompletmedien		Negativkontrolle
	I	II	III	IV	V
Hauptkultur	YPD	YPG	SD/ØHis	SG/ØHis	SD/ØHis
Induktion	YPG	YPG	SG/ØHis	SG/ØHis	SD/ØHis

Mit dieser Expressionsreihe sollte sowohl eine kontinuierliche Expression während der Wachstumsphase (galactosehaltige Medien II und IV) als auch eine stark induzierte Expression in der Log-Phase (Austausch der Glucose mit der Galactose in Medien I und III) untersucht werden. Somit konnte zwischen einem Vollmedium und einem selektiven Kompletmedium in Bezug auf eine bessere Bereitstellung der benötigten Aminosäuren für die produzierten Proteine und damit verbundene größere Expressionsrate unterschieden werden. Nach dem analytischen Zellaufschluss mit Glas-Beads (Kapitel 5.3.5) wurden die erhaltenen Rohlysate durch SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abbildung 76 und 73).

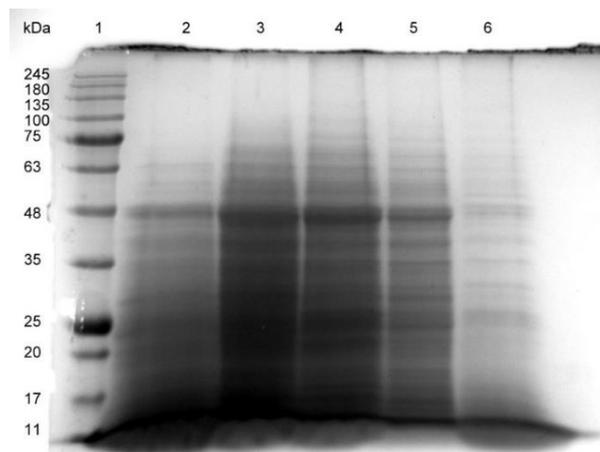


Abbildung 76: Proteingel von Rohlysaten aus *S. cerevisiae*::pESCHIS::2x*AI4SR_C*-His₆-Kulturen (I–V) nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) I; 3) II; 4) III; 5) IV; 6) V.

Die Auswertbarkeit des erhaltenen SDS-PAGE-Gels wird durch die unterschiedlichen Mengen an aufgetragenen Proteinen erschwert. Ähnliche Verhältnisse weist der dazugehörige Western Blot auf. So zeigen die charakteristischen Banden bei ca. 20 und 48 kDa einen konzentrationsabhängigen Verlauf (Abbildung 77).

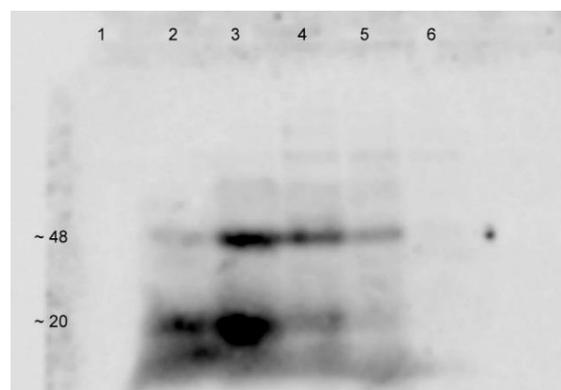


Abbildung 77: Western Blot Analyse von Rohlysaten aus *S. cerevisiae*::pESCHIS::2x*AI4SR_C*-His₆-Kulturen (I–V) mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) I; 3) II; 4) III; 5) IV; 6) V.

Die früher beobachtete Bande bei ca. 75 kDa fällt hier nicht auf. Die Negativkontrolle in der Tasche 6 zeigt keine Banden, womöglich bedingt durch eine zu niedrige Proteinkonzentration. Unter der Annahme, dass die Bande bei ca. 48 kDa tatsächlich der überproduzierten $\Delta 14SR$ entspricht, wurden die gleichen Mengen (300 μL) an Zellsuspension aus Expressionskulturen III und V mit Glas-Beads aufgeschlossen und der Fraktionierung zwecks Membrananreicherung unterzogen. Die erhaltenen Zellpellets P1, P2 und Überstände S2 wurden erneut mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abbildung 78 und 75).

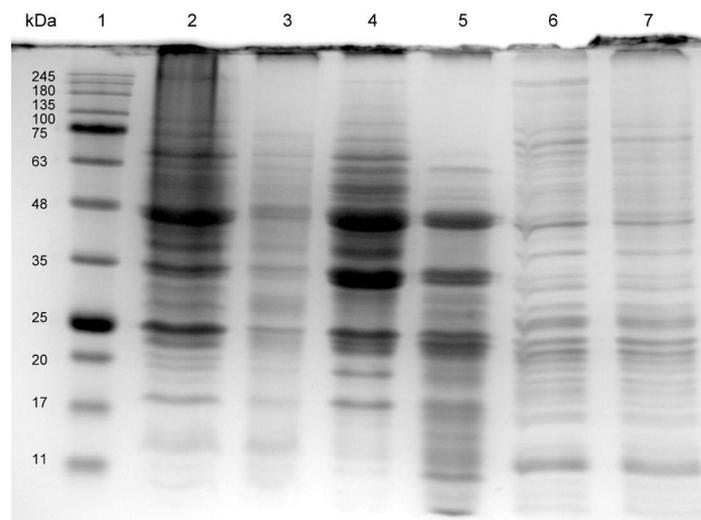


Abbildung 78: Proteingel von $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$ aus *S. cerevisiae::pESCHIS::2x $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$* -Kulturen (III und V) nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) III, P1; 3) V, P1; 4) III, S2; 5) V, S2; 6) III, P2; 7) V, P2.

Auch im Proteingel (Abbildung 78) konnte keine eindeutig überproduzierte Proteinbande beobachtet werden. Trotz ihrer Ausprägung können die Banden bei ca. 48 kDa in der Taschen 2 und 4 den entsprechenden Banden der Negativkontrolle zugeordnet werden. Anders verhält es sich mit der Bande bei ca. 40 kDa im Überstand S2 (Tasche 4). Allerdings erscheint das Vorliegen eines membranintegrierten Proteins in der löslichen Fraktion eher unwahrscheinlich. Eine alternative Erklärung der erhaltenen Ergebnisse wäre das Aggregieren der produzierten Proteine, welches in einem abweichenden Verhalten während der elektrophoretischen Trennung resultieren kann. Das Auftreten der Banden bei ca. 245 kDa in der Taschen 2, 4 und zum Teil 6 (alle Induktionsmedium) können damit erklärt werden. Die entsprechende Membran des Western Blots, angefertigt aus einem identischen SDS-PAGE-Gel, bestätigt diese Hypothese (Abbildung 79).

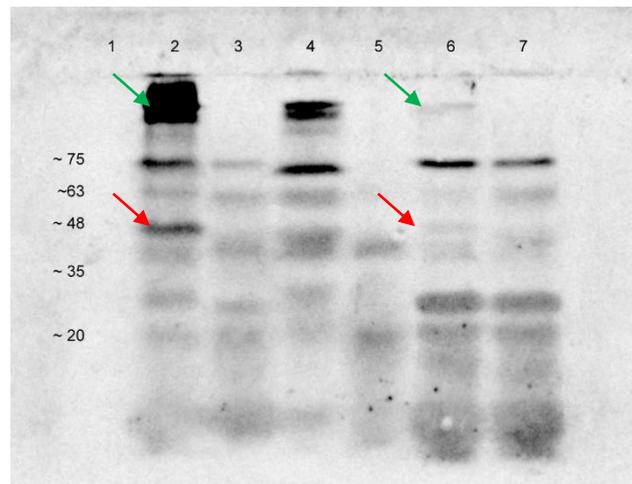


Abbildung 79: Western Blot Analyse von $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$ aus *S. cerevisiae::pESCHIS::2x\Delta 14SR_C\text{-His}_6* (III und V) mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) III, P1; 3) V, P1; 4) III, S2; 5) V, S2; 6) III, P2; 7) V, P2.

Die grün markierten Banden können nur bei Expressionsfraktionen beobachtet werden, während die bereits erwähnte Bande bei ca. 75 kDa auch in der Negativkontrolle identifiziert werden kann. Anders die rot markierte Bande bei ca. 48 kDa: Sie kann nur in Pellets P1, P2 und nur bei dem Induktionsmedium beobachtet werden, was einem überproduzierten membranständigen Protein entspricht.

Versuch der Solubilisierung und Reinigung

Das P1 Pellet aus der Kultur III wurde zur Solubilisierung und anschließenden Proteinreinigung der membranintegrierten Proteine ausgewählt. Nach der einstündigen Inkubation mit nOG und STDC wurde der abgetrennte Überstand mittels Ni-NTA-Chromatographie aufgearbeitet (Kapitel 5.3.5). Die nach der Reinigung erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 80). Bei ca. 48 kDa kann keine eindeutige Proteinbande identifiziert werden. Die Doppelbande bei ca. 35 kDa wurde bereits bei der Ni-NTA-Reinigung der $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$ aus *S. cerevisiae::pESCHIS::\Delta 14SR_C\text{-His}_6* in Abbildung 72 beobachtet. Damit blieb die Proteinreinigung erfolglos.

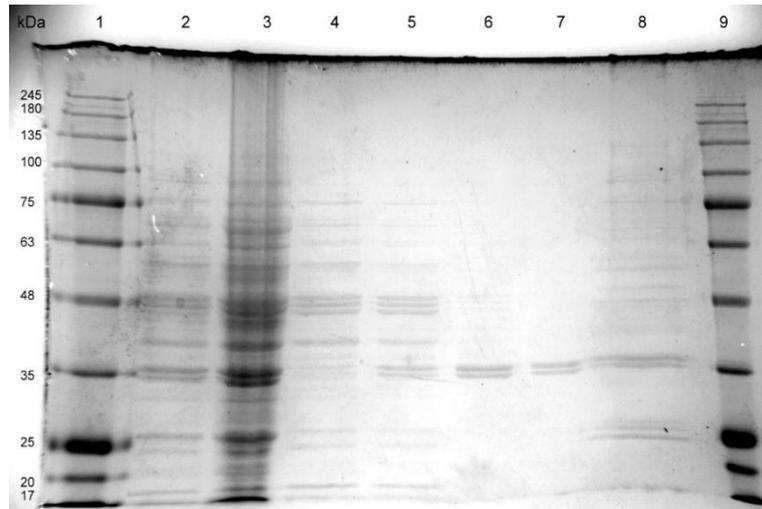


Abbildung 80: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung von $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$ aus *S. cerevisiae::pESCHIS::2x $\Delta 14SR_C\text{-His}_6$* (Kultur III) nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) P1; 3) P1 nach Solubilisierung; 4) Durchlauf; 5) 1. Waschfraktion; 6) 2. Waschfraktion; 7) 3. Waschfraktion; 8) Eluatfraktion, aufkonzentriert; 9) Proteinmarker.

3.2.3 $\Delta 14SR$ aus *S. cerevisiae* (ERG24)

Wie bereits gezeigt wurde, konnte tierische $\Delta 14SR$ zwar heterolog exprimiert, aber nicht isoliert werden. Zu diesem Zeitpunkt waren alle in Frage kommenden potenziellen Substrate nicht kommerziell zugänglich, was die Durchführung einer zusätzlichen Analytik der Enzymaktivität verhinderte.

Als eine mögliche Alternative wurde die Expression der hefeeigenen $\Delta 14SR$ als Polyhistidin(6x)-Fusionsprotein angesehen. Um eine mögliche Verwechslung mit der bis jetzt beschriebenen Reduktase aus Ratte zu vermeiden, wurde die Delta14-Sterol-Reduktase aus *S. cerevisiae*, kodiert durch das *ERG24*-Gen weiter als ERG24-Reduktase bezeichnet.

A. Molekularbiologische Arbeiten

Expressionsplasmid pESCHIS::*ERG24_C-His₆*

Als Ausgangsmaterial für die molekularbiologischen Arbeiten diente das für ERG24-Reduktase (NCBI: NM_001183118.1, UniProt: P32462) kodierende *ERG24*-Gen aus *S. cerevisiae* (Stamm: ATCC 204508/S288c, Locus: YNL280C). Das entsprechende OLR NO593 wurde im Vektor BG1805 von BIOSS TOOLBOX, Freiburg erhalten und für die geplante Expression in *S. cerevisiae* entsprechend modifiziert. Dafür wurde das *ERG24*-Gen mit entsprechenden Primern amplifiziert und im zweiten PCR-Schritt mit der originalen Kozak-Sequenz (AAAAGG) und dem C-terminalen Hexahistidin-Tag (C-His₆) versehen. Gleichzeitig wurden an beiden Enden spezifische, 15 bp lange, dem Expressionsvektor pESCHIS homologe Überhänge nach den Anforderungen der ligasefreien In-Fusion[®] Klonierungsmethode eingeführt (Insert *ERG24_C-His₆*). Der pESCHIS-Vektor wurde per PCR linearisiert und amplifiziert. Das *ERG24_C-His₆* Insert wurde in den linearisierten Vektor pESCHIS unter GAL10-Promotor-Kontrolle nach dem In-Fusion[®] Protokoll kloniert (Kapitel 5.2.2, Abschnitt C). Kompetente *E. coli* TG1-Zellen wurden mit dem erhaltenen Konstrukt transformiert. Einer der erhaltenen Klone wurde in Flüssigkultur für die Plasmidisolierung angezogen. Nach der DNA-Sequenzbestätigung wurde die Transformation in kompetente Hefezellen MH272-3fa/ α vorgenommen.

B. Protein-biochemische Arbeiten

Expression von *S. cerevisiae*::pESCHIS::ERG24_C-His₆

Die Expression wurde nach Methode II unter Zusatz von DMSO (2.5% v/v Endkonzentration) durchgeführt (Kapitel 5.3.5). 2.5 OD₆₀₀-Einheiten wurden nach Kushnirov analytisch aufgeschlossen und mittels SDS-PAGE analysiert (Kapitel 5.3.1, Abbildung 81).

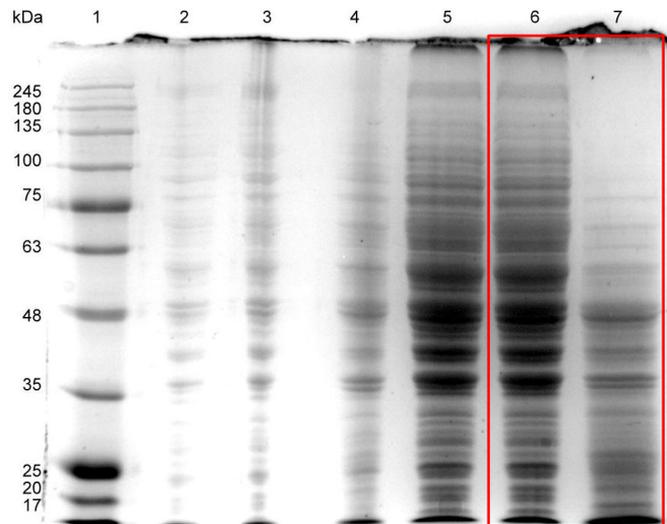


Abbildung 81: Proteingel von ERG24_C-His₆ (rot markiert) aus *S. cerevisiae*::pESCHIS::ERG24_C-His₆ nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 6) ERG24 S2 nach dem analytischen Zellaufschluss nach Kushnirov; 7) nicht induzierte Probe ERG24 S2 nach dem analytischen Zellaufschluss nach Kushnirov.

Die restlichen Zellen wurden in Lysepuffer I 1:2 suspendiert und mit Glas-Beads aufgeschlossen (Kapitel 5.3.5). Das Rohlysat wurde einer Fraktionierung unterzogen. Das Membranpellet P3 wurde abgetrennt und sofort bei -80 °C eingefroren. Alle restlichen gesammelten Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert. Die Expressionsanalytik erfolgte per SDS-PAGE, Western Blot und spezifischen Aktivitätsnachweis.

Im Western Blot konnte eine positive Bande (roter Pfeil) bei ca. 34 kDa identifiziert werden (Abbildung 82).

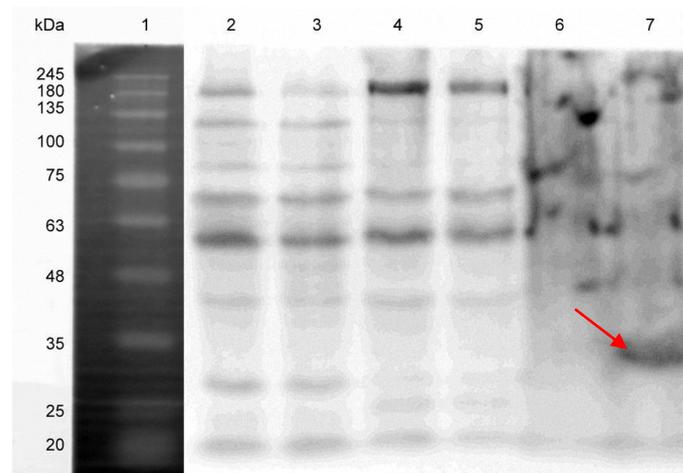


Abbildung 82: Western Blot Analyse von ERG24_C-His₆ Fraktionen nach Zellaufschluss und Fraktionierung (Geltaschen 3, 5 und 7) mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 3) ERG24 P1; 5) ERG24 S2; 7) ERG24 P2.

Optimierung der Western Blot Analytik

Die Western Blot Analytik wurde bezüglich der aufgetragenen Proteinmenge, Antikörperverdünnung, sowie der Blockpufferzusammensetzung optimiert. Dies ermöglichte das Auftreten der unspezifischen Banden bei ca. 75 kDa und 60 kDa in ihrer Intensität zu minimieren (Abbildung 83).

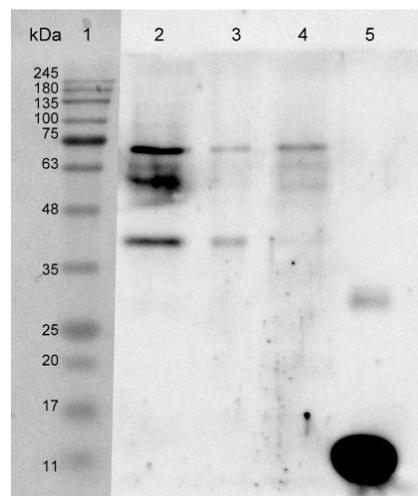


Abbildung 83: Western Blot Analyse von ERG24_C-His₆ mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) ERG24_C-His₆ P3; 3) Verdünnung (1:2) ERG24_C-His₆ P3; 4) Negativkontrolle: pESCHIS Leevektorexpression P2; 5) Positivkontrolle His-markiertes Fusionsprotein Chorismatmutase, ca. 15 kDa.

Damit konnte die Expression der ERG24_C-His₆ als ein ca. 40 kDa (Größe wurde ausgehend aus der Bande im Proteingel geschätzt) schweres Hexahistidin-Fusionsprotein nachgewiesen werden.

Versuch der Solubilisierung und Reinigung von *ERG24_C-His₆*

Es wurde der Versuch der Isolierung und Reinigung der His-markierten *ERG24* über die Bindung an der Ni-NTA-Matrix und anschließender Elution mit Imidazol-Lösung höherer Konzentration unternommen. Dafür wurde das membranhaltige Pellet P2 aus der *ERG24*-Expression in 2 mL MRB-Puffer suspendiert und bei $164000\times g$, 60 min, 4 °C ultrazentrifugiert. Die gewaschenen Membranen wurden als Pellet P3 abgetrennt, in 1 mL Solubilisierungspuffer suspendiert und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Proteinkonzentration betrug $14.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Die Membranen und nicht solubilisierten Proteine wurden durch die erneute Ultrazentrifugation bei $164000\times g$, 60 min, 4 °C abgetrennt. Die Ni-NTA-Agarosematrix wurde mit 10 mL Ni-NTA Puffer (15 mM Imidazol, 1 mM DDM) equilibriert. Der Überstand S4 ($5.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) wurde auf die Ni-NTA Säule gegeben und bei 4 °C, 1.5 Stunden bei leichtem Rotieren inkubiert. Nachdem der Durchlauf abgetrennt wurde, erfolgten zwei Waschschrte mit je zehn Säulenvolumina Ni-NTA Puffer 15 mM und 30 mM. Die Proteine wurden mit drei Säulenvolumina Ni-NTA Puffer 300 mM eluiert. Die Bradford-Kontrolle zeigte eine schwache Farbänderung. Auf dem SDS-PAGE-Gel konnte keine Proteinbande festgestellt werden. Der Versuch der Konzentrierung mit einem Proteinkonzentrator mit 30 kDa Trenngrenze brachte keine Verbesserung.

C. Biokatalytische Umsetzungen mit *ERG24*

Bislang konnte eine schwache Überexpression von *ERG24* anhand Western Blot nachgewiesen werden. Als weitere Nachweismöglichkeit wurde die katalysierte Umsetzung des natürlichen $\Delta^{14}\text{SR}$ -Substrates 4,4-Dimethyl-5 α -cholesta-8,14,24-trien-3 β -ol (**17**, bereitgestellt von der Fa. BAYER, weiter bezeichnet als FF-MAS) verwendet (Abbildung 84).

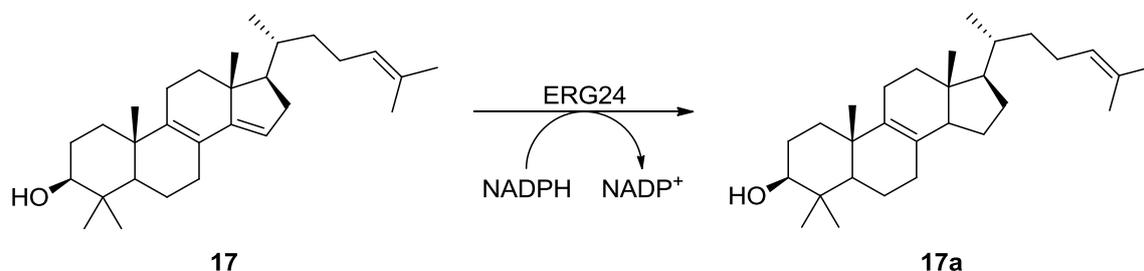


Abbildung 84: Reduktion der Δ^{14} -Doppelbindung in **17** ($60 \mu\text{M}$) katalysiert durch die *ERG24*-haltige Membranfraktion. Bedingungen: 2 mM NADPH, 0.14 M Glucose, GDH ($2 \mu\text{L}$, $>500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), 0.5 mM EDTA, 1 mM Glutathion, 50 μL *ERG24*-Fraktion, KPI -Puffer (100 mM, pH 7.4, 0.8% (v/v) Tween 80), 37 °C, 30 min. Die extrahierten Sterole wurden anschließend mit Essigsäureanhydrid und trockenem Pyridin (2:1) acetyliert. Der Umsatz von bis zu 10% wurde mittels GC-MS bestimmt.

Mit der im analytischen Bereich durchgeführten Umsetzung von **17** mit der membranhaltigen Fraktion P2 konnte eine selektive Reduktion, vermutlich der Δ^{14} -Doppelbindung, anhand des Massenspektrums aus der GC-MS-Analytik bestätigt werden (Abbildung 81, B). Bei der Verwendung einer nicht gereinigten Proteinfraction für den Aktivitätsnachweis kann die Hintergrundaktivität der Reduktasen aus dem Expressionsorganismus nicht komplett ausgeschlossen werden. Als Negativkontrolle diente die membranhaltige Fraktion P3 aus der pESCHIS-Leervektorexpression. Nach der Auswertung des Massenspektrums konnte keine Reduktion der Δ^{14} -Doppelbindung festgestellt werden (Abbildung 85, A).

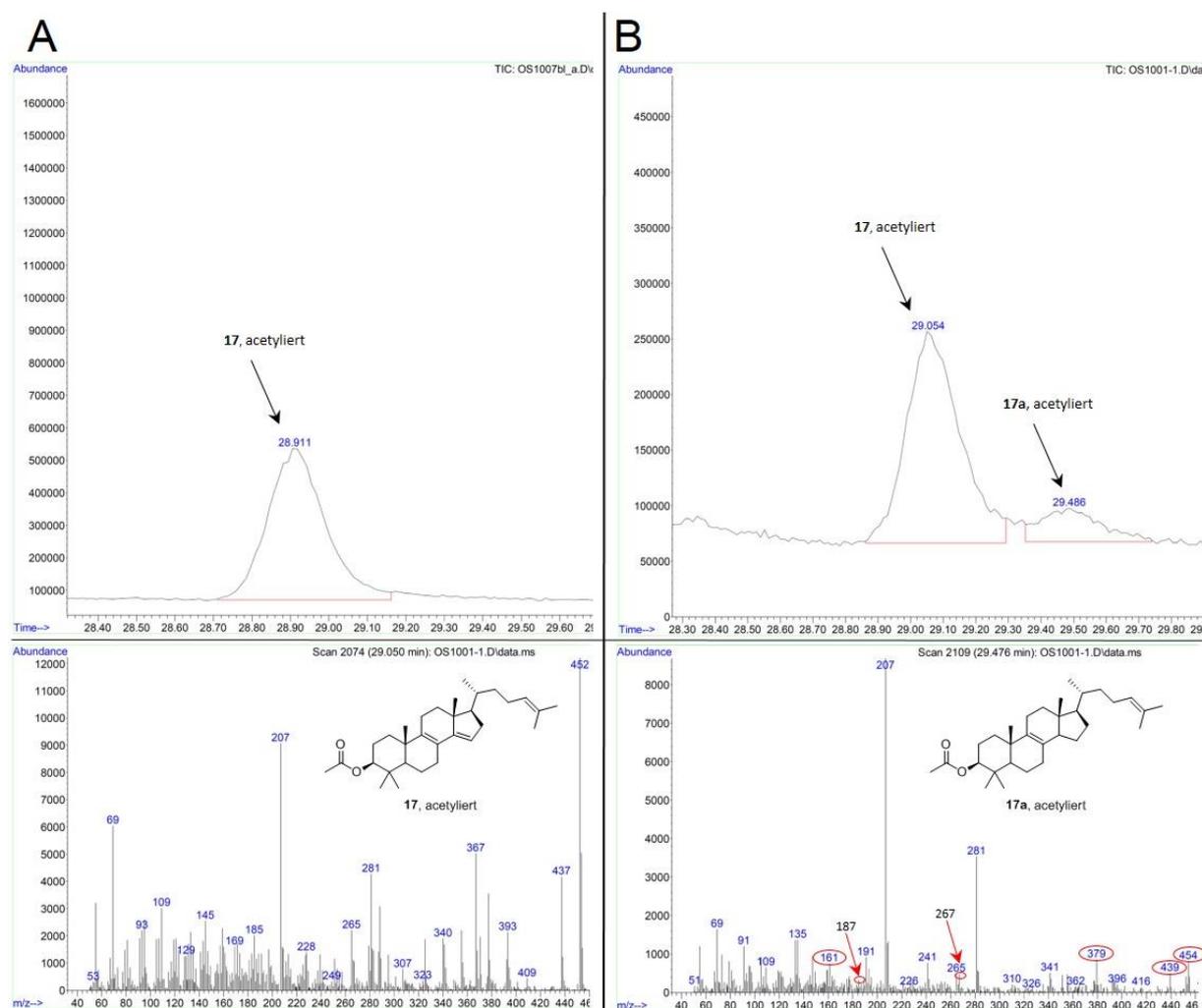


Abbildung 85: Massenspektrum (GC-MS) aus der Umsetzung von **17** mit ERG24 nach anschließender Acetylierung. **A:** **17**, acetyliert [M = 452]. **B:** Produkt **17a**, acetyliert [M = 454 (+2)] und weitere charakteristische Zerfallsprodukte sind rot markiert.

Eine weitere, nicht auszuschließende Interpretationsmöglichkeit der erhaltenen Ergebnisse wäre eine Reduktion der $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung in der aliphatischen Seitenkette in FF-MAS (**17**). Dagegen spricht das erhaltene Massenspektrum, wobei die +2 Masse von Fragmentationen der Reduktion von Δ^{14} -Doppelbindung entspricht (Fragmentationen mit M = 161, 187).

Delta-24-Sterol-Reduktase Aktivität

Als weiterer Nachweis wurde die Umsetzung vom Lanosterol (**30**) herangezogen. Die Verbindung **30** enthält im Vergleich zu **17** nur die isolierte $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung (zusätzlich zur Δ^8 -Doppelbindung) und stellt womöglich ein weiteres Substrat entweder für die überproduzierte ERG24_C-His₆ oder für die im Hintergrund vorhandenen hefeeigenen $\Delta^{24(25)}$ -Sterolreduktasen dar (Abbildung 86).

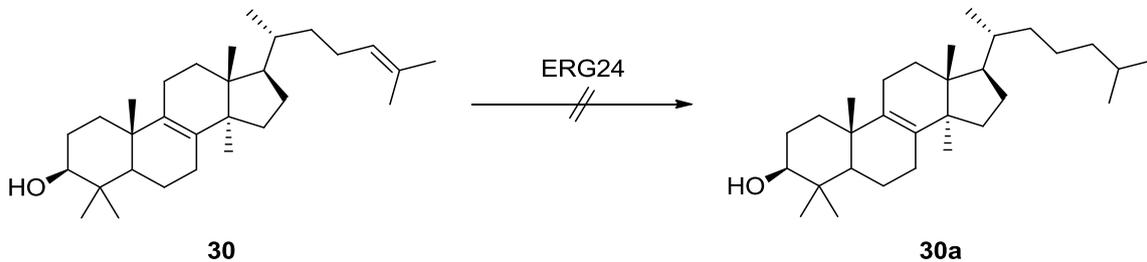


Abbildung 86: Umsetzung von **30** (60 μ M) als Negativkontrolle für ERG24. Bedingungen: 2 mM NADPH, 0.14 M Glucose, GDH (2 μ L, $>500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), 0.5 mM EDTA, 1 mM Glutathion, 50 μ L ERG24-Fraktion, KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.4, 0.8% (v/v) Tween 80), 37 °C, 30 min. Die Reaktionsanalytik wurde mittels GC-MS durchgeführt.

Die Umsetzung von **30** wurde bei gleichen Bedingungen wie die Reduktion von **17** durchgeführt. Das nach der Acetylierung von **30a** erhaltene GC-Chromatogramm zeigt keine Reduktion der aliphatischen Doppelbindung.

4 Diskussion und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen auf ihre Eignung zur Reduktion nicht aktivierter C=C-Doppelbindungen untersucht.

4.1 Reduktion der allylischen Alkohole

Durch die Verwendung der gereinigten Enzyme HLADH und CPR konnte der Ablauf der Reduktion allylischer Alkohole am Beispiel von (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (**10a**) geklärt werden (Abbildung 87).

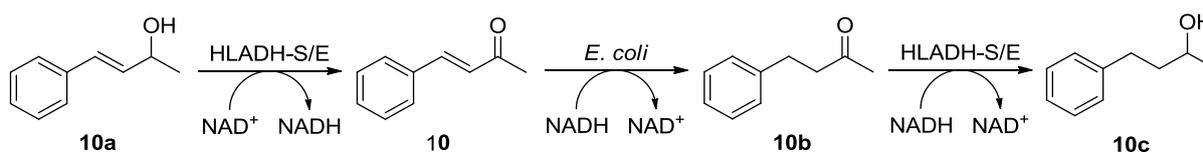


Abbildung 87: Ablauf der Biokatalyse von allylischem Alkohol **10a**, katalysiert durch die nicht gereinigten HLADH-Isoenzyme und *E. coli*-eigene Oxidoreduktasen.

Demnach stellt die nicht aktivierte C=C-Doppelbindung im allylischen Alkohol **10a** weder für HLADH noch für CPR ein Substrat dar. Die beobachtete Enreduktase-Aktivität konnte dem Durchlauf der Ni-NTA-Reinigung von HLADH-Enzympräparationen zugeordnet werden. Zugleich wurde diese Aktivität bei der Verwendung von nativem zellfreiem Proteinrohextrakt aus der *E. coli* (BL21)-Zellkultur beobachtet (Kapitel 3.1.1 und 3.1.2). Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten die früheren Annahmen der Beteiligung mehrerer Enzyme an dieser Umsetzung sowohl bei der Ganzzell-Katalyse mit Bäckerhefe als auch bei der Verwendung partiell gereinigter Enzyme.

Membranintegrierte Polyprenolreduktase (PPR) wurde in *S. cerevisiae* als ein rekombinantes Polyhistidin(10x)- und FLAG-markiertes Fusionsprotein heterolog exprimiert. Die Reinigungsversuche der überproduzierten PPR_C-His₁₀_FLAG an einer Ni-NTA-Säule führten nicht zu einem isolierten löslichen Protein. Die Reduktion der α -ständigen C=C-Doppelbindungen in Farnesol (**8**) und Geranylgeraniol (**9**) konnte nicht nachgewiesen werden (Kapitel 3.1.3). Diese fehlende enzymatische Aktivität kann mehrere Ursachen haben. Zum einen können diese olefinischen Alkohole eine zu kurze Kettenlänge aufweisen und damit nicht als geeignete Substrate für PPR fungieren, zum anderen konnte die eigentliche Aktivität von PPR mit einem physiologischen Substrat (Polyprenol-60–90) nicht getestet und damit auch

nicht nachgewiesen werden. Damit bleibt die Eignung der PPR für die Reduktion kurzkettiger Prenole offen.

Die eigentliche PPR-Aktivität an einem olefinischen Alkohol (Polyprenol) statt an ihren phosphorylierten Analoga (Polyprenol-PP) konnte bis jetzt nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zumindest für die volle Aktivität der mikrosomalen PPR unter NAD(P)H-Bereitstellung wird zusätzlich die lösliche proteinfreie Fraktion benötigt. Das spricht für das Vorhandensein eines unbekanntes löslichen Cofaktors. Zudem führt die Zugabe der löslichen proteinfreien Fraktion dazu, dass Polyprenol-PP auch als Substrat akzeptiert wird.^[39,40,121] Damit kann die Beteiligung eines zusätzlichen Cofaktors nicht allein als Ursache erklärt werden. Darüber hinaus konnten die Polyprenole nicht effektiv von Hefepilzen verwertet werden, was die Polyprenole als eigentliche Substrate für PPR in Frage stellt.^[40,122] Stattdessen können auch die langkettigen α,β -ungesättigten Aldehyde (Polyprenale, entsprechend der Reduktion von **10a**) als mögliche Substrate für PPR oder SRD5A3 nicht komplett ausgeschlossen werden (Abbildung 88). Ihre Eignung sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden (Kapitel 4.3).

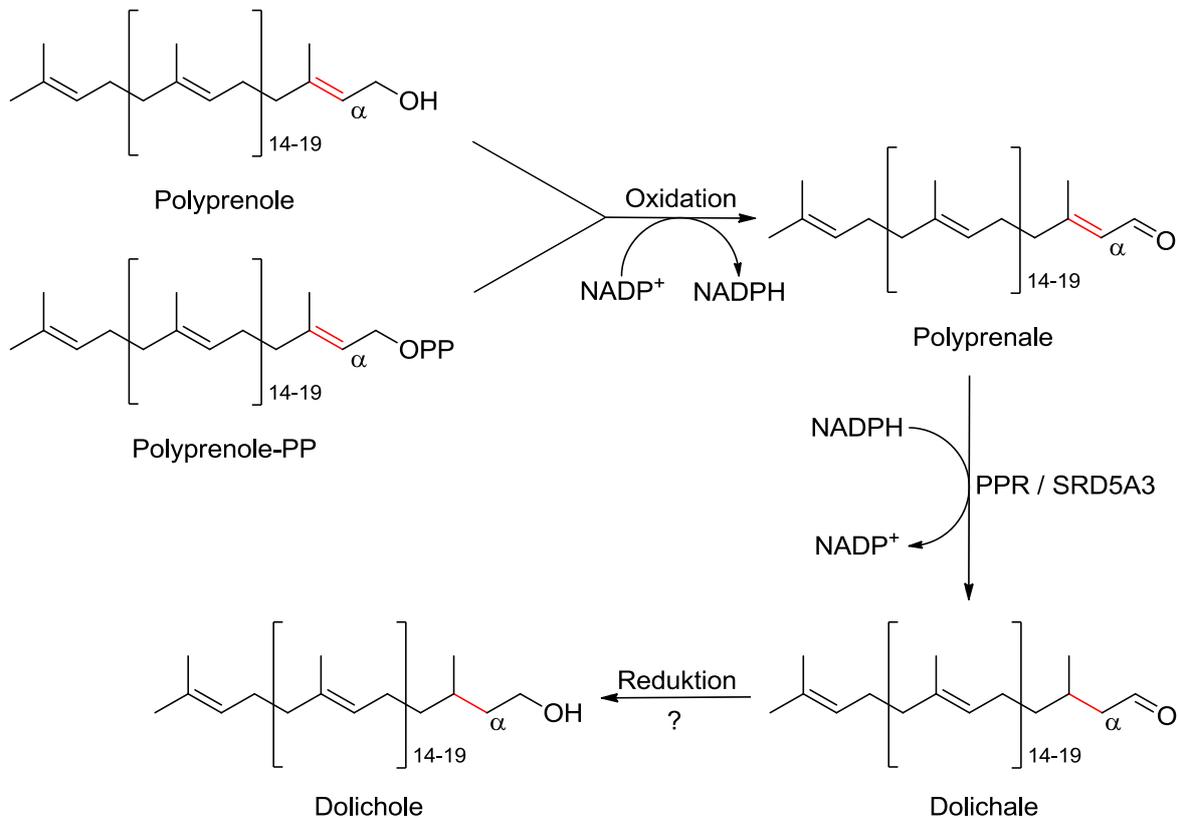


Abbildung 88: Möglicher Ablauf der Polyprenol-Reduktion.

Der Western Blot mit Antikörpern gegen das C-terminale FLAG-Epitop erwies sich als unvorteilhaft. Im Laufe der Untersuchungen wurde festgestellt, dass die verwendeten Antikörper „FLAG™ Epitope Tag (DYKDDDDK) HRP“ den „FLAG IgG2b M1“ monoklonalen Antikörpern der Fa. SIGMA-ALDRICH entsprechen. Diese Antikörper können nur N-terminales FLAG-Epitop erkennen. Für die C-terminal vorliegende DYKDDDDK-Sequenz werden andere Antikörper (FLAG IgG1 M2 oder 6F7) empfohlen. Aus Kostengründen empfiehlt sich hier die Verwendung eines anderen Epitops wie zum Beispiel His- oder MYC-Tag.

4.1.1 Ausblick neue Enzyme

Dihydrovomilenin-Reduktase

Zur Zeit der Verfassung dieser Arbeit sind die für Dihydrovomileninreduktase aus *Rauwolfia serpentina* (DHVR; EC 1.3.1.73) kodierenden Gene zugänglich geworden. Diese Reduktase aus dem Ajmalin-Biosyntheseweg soll eine spezifische NADPH-abhängige Reduktion der ungesättigten $\Delta^{19(20)}$ -Doppelbindung im 1,2-Dihydrovomilenin (**28**) zu 17-*O*-Acetylnorajmalin (**28a**) katalysieren (Abbildung 89).

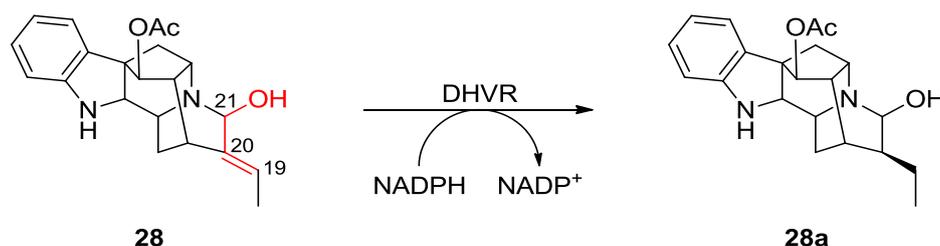
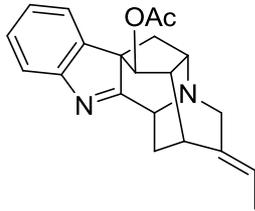


Abbildung 89: Reduktion von **28** durch DHVR.

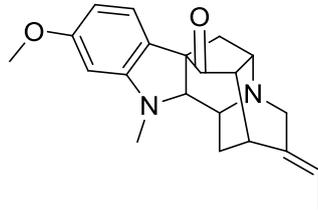
Diese Teilstruktur (der olefinische Alkohol, rot markiert in Abbildung 89) spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Synthese dieser Indolalkaloide spielen, da die Einführung der Hydroxygruppe in Position 21 der Doppelbindungsreduktion in der Biosynthese vorausgeht. Wenn der Hydroxylierungsschritt ausbleibt, wird die $\Delta^{19(20)}$ -Doppelbindung nicht weiter reduziert, wie z.B. in Vinorin (**31**) aus der Indolinin-Gruppe, Rauflexin (**32**) aus der Ajmalin-Untergruppe oder bei allen Vertretern der Tetraphyllicin-Gruppe (**33**). Die wenigen Ausnahmen stellen die Indolalkaloide vom Sarpagin-Typ wie 19,20-Dihydroakuammidin (**34**) (aus *R. mombasiana* und *R. caffra*), Dihydro-*O*-methylmacusin B (**35**) (aus *Strychnos usambarensis*) sowie 17-*O*-Acetyl-19,20-dihydrovoachalotin (**36**) (aus *Voacanga chalongiana* Pierre ex Stapf.)

dar, wobei alle anderen Vertreter der Akuammidin- bzw. Polyneuridin-Untergruppe ihre nicht reduzierte C=C-Doppelbindung behalten (Abbildung 90).^[123–125]

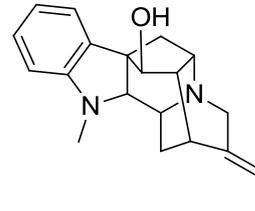
A



Vinorin
31

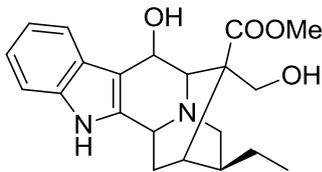


Rauflexin
32

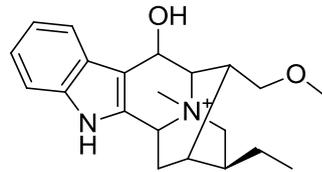


Tetraphyllicin
33

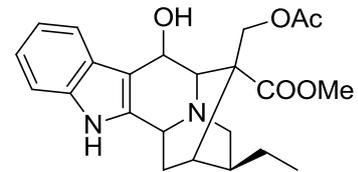
B



19,20-Dihydroakuammidin
34



Dihydro-O-methylmacusin B
35



17-O-Acetyl-19,20-dihydrovoachalotin
36

Abbildung 90: Indolalkaloide. **A:** die nicht reduzierte $\Delta^{19(20)}$ -Doppelbindung in den Endprodukten **31**, **32**, **33**. **B:** in Alkaloiden **34**, **35** und **36** wird die $\Delta^{19(20)}$ -Doppelbindung trotz der fehlenden Hydroxylierung in Position 21 reduziert.

Die dafür zuständige Reduktase ist unbekannt. Auf die mechanistische Rolle der Hydroxylgruppe wird in Kapitel 4.3 eingegangen.

Curcumin / Dihydrocurcumin-Reduktase

Ein weiteres potenziell interessantes Enzym stellt die CurA-Reduktase aus *E. coli* K-12, Unterstamm DH10B dar. Für diese NADPH-abhängige Oxidoreduktase wurde eine Aktivität an Resveratrol (**37**) in der Arbeit von Hassaninasab *et al.*, 2010 beschrieben (Abbildung 91).^[126]

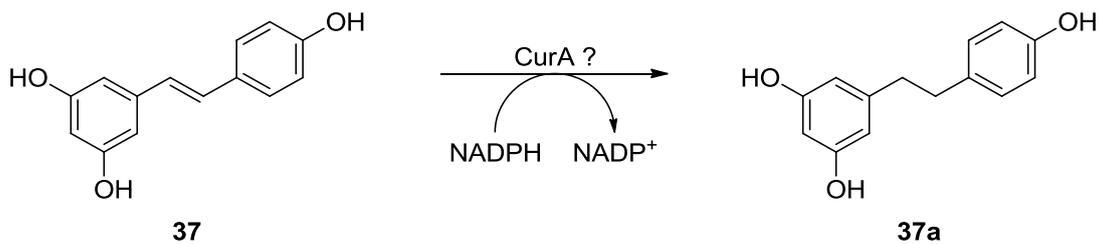


Abbildung 91: Putative Reduktion von **37** durch CurA.

Diese Aktivität stellt die einzige Ausnahme bei den untersuchten Substraten dar. Alle anderen reduzierbaren C=C-Doppelbindungen können in den getesteten Substraten, wie z.B. in Curcumin oder Hept-3-en-2-on, als klassische aktivierte C=C-Doppelbindungen bezeichnet werden. Für die katalysierten Reduktionen wurde von Hassaninasab *et al.* die photometrische Bestimmung des Verbrauchs an NADPH als analytische Methode verwendet. Diese Methode erlaubt keine eindeutige Aussage über die Art und Lage der tatsächlich reduzierten Doppelbindung. Dementsprechend sollten weitere Untersuchungen diese Frage klären.

4.2 Reduktion kumulierter C=C-Doppelbindungen

Delta14-Sterol-Reduktase ($\Delta 14SR$) tierischen Ursprungs konnte trotz aller durchgeführten Versuche nicht eindeutig produziert werden. Es wurde versucht, die native Reduktase aus der Ratte als Fusionsprotein entweder mit einem C- oder einem N-terminal vorliegenden Polyhistidin(6x)-Tag in prokaryotischen und eukaryotischen Organismen zu produzieren. Bei den Expressionsversuchen in *E. coli* und *Rh. capsulatus* konnte keine Proteinproduktion nachgewiesen werden. Die Produktion einer N-terminal gekürzten $\Delta 14SR$ (C-terminal Polyhistidin(6x)-markiertes Fusionsprotein $\Delta 14SR_{tr_C-His_6}$) in *E. coli* blieb ebenfalls erfolglos.

Bei der Verwendung eines eukaryotischen *S. cerevisiae* Expressionssystems wurde eine geringe Überexpression des $\Delta 14SR$ -Gens nachgewiesen, die erreichte Proteinmenge war aber für eine anschließende Reinigung nicht ausreichend. Unter Verwendung des Konstruktes pESCHIS::2x $\Delta 14SR_{tr_C-His_6}$ mit zwei parallel exprimierten $\Delta 14SR$ -ORL wurde eine schwache Überproduktion durch Western Blot Analytik nachgewiesen.

An dieser Stelle soll betont werden, dass die heterologe Expression von Proteinen aus der Sterolbiosynthese sich als generell schwierig erwiesen hat. Obwohl alle beteiligten Enzyme inzwischen gut charakterisiert sind und einige bereits als Targets für landwirtschaftliche und therapeutische Ansätze bekannt sind, konnten bis jetzt keine Kristallstrukturen gelöst werden.^[127] Vor allem die Expression des humanen *Tm7sf2*-Gens (humane Sterol-Reduktase 1, SR1) in *S. cerevisiae* erwies sich als äußerst schwierig. Die Ergebnisse von Prakash und Kasbekar, 2002 zeigen, dass SR1, im Gegensatz zur homologen Sterol-Reduktase *erg-3* aus *Neurospora crassa* oder zum paralogen Lamin-B-Rezeptor, die Funktion der *ERG24*-Nullmutante nicht wiederherstellen kann. Die chimären Proteine, hergestellt aus *erg-3* und *Tm7sf2* (SR1), zeigten ebenfalls keine $\Delta 14SR$ -Aktivität. Ein möglicher Grund könnte im

hohen GC-Gehalt und damit einhergehenden ungünstigen Codon-Gebrauch liegen.^[128] Die bessere $\Delta 14SR$ -Produktion erzielt mit dem pESCHIS::*2x* $\Delta 14SR_C$ -His₆ Konstrukt deutet daraufhin, dass nicht der Codon-Gebrauch während der Translation, sondern der GC-Gehalt und damit die Transkription das eigentliche Problem ist. So ist es gelungen, die niedrige Proteinproduktion durch die Erhöhung der Genkopienzahl zum Teil umzugehen. Obwohl $\Delta 14SR$ -Gen aus der Ratte mit 58.4% einen etwas niedrigeren GC-Gehalt gegenüber dem humanen Homolog *Tm7sf2* mit 63.4% aufweist, konnte keine signifikante Überproduktion erzielt werden. Die gleiche Ursache wird auch für die fehlende Expression der gekürzten $\Delta 14SRtr$ -Varinate vermutet.

Das für hefeeigene $\Delta 14$ -Sterol-Reduktase (ERG24) kodierende *ERG24*-Gen weist einen erheblich niedrigeren GC-Gehalt von 39.8% auf und wurde dementsprechend besser produziert. Auch die enzymspezifische selektive Reduktion der Δ^{14} -Doppelbindung in 4,4-Dimethyl-5 α -cholesta-8,14,24-trien-3 β -ol (**17**) wurde erfolgreich nachgewiesen. Die isolierte C²⁴⁽²⁵⁾-Doppelbindung sowohl in **17** als auch in Lanosterol (**30**) wurde unter den Versuchsbedingungen nicht reduziert. Dennoch verlief die Proteinreinigung mittels IMAC auch für ERG24 – zumindest in diesem Expressionsmaßstab – erfolglos. Da bei diesem niedrigen Expressionsniveau und der ineffektiven Proteinreinigung der Einfluss von anderen vorhandenen Reduktasen nicht ausgeschlossen werden kann, wurden keine weiteren Untersuchungen des Substratspektrums durchgeführt.

4.2.1 Weitere Sterolreduktasen

Das Problem des zu hohen GC-Gehaltes kann entweder durch eine Optimierung der Nukleotidsequenz oder durch die Expression des *Lamin-B-Rezeptors*-Gens (LBR) umgangen werden. Der C-terminale Anteil des LBR (LBR CTD, engl. für carboxyl terminal domain) weist einen niedrigen GC-Gehalt von ca. 40% und eine ausgeprägte $\Delta 14$ -Reduktase-Aktivität auf und wurde bereits in *S. cerevisiae* produziert.^[129] Davon unabhängig bleibt bei der Produktion dieser membranintegrierten Proteine das Löslichkeitsproblem bestehen.

Pflanzliche Delta(24)-Sterol-Reduktase ($\Delta 24SR$)

At $\Delta 24SR$ aus *A. thaliana* weist nur zwei TM-Einheiten auf und steht damit im Kontrast zu der bisher untersuchten $\Delta 14SR$. Diese Eigenschaft im Hinblick auf die schlechte Exprimierbarkeit und Löslichkeit von $\Delta 14SR$ macht At $\Delta 24SR$ für *in vitro* Untersuchungen sehr attraktiv. Eine

funktionelle Expression in *S. cerevisiae* wurde bereits publiziert; die Expression in *E. coli* blieb trotz allem erfolglos.^[96] Hier sollte eine Codon-Optimierung vorgenommen werden. Die FAD-Beteiligung als Cofaktor an der katalysierten Reduktion wurde bis jetzt nicht eindeutig nachgewiesen. Im Vergleich zu dem menschlichen Homolog (Hs Δ 24SR) kann At Δ 24SR die Aktivität an einem Diensystem der *S. cerevisiae* *ERG4*-Nullmutante wiederherstellen. Diese Tatsache spricht für eine mögliche duale Aktivität sowohl an einer isoliert vorliegenden C=C-Doppelbindung (**22**, **24**) als auch an einer in einem Diensystem (**19**) vorliegenden Doppelbindung. Durch *in vitro* Versuche könnte die Rolle der Isomerisierung und Eignung eines Diensystems als Substrat für pflanzliche At Δ 24SR eingehend untersucht werden.

4.3 Mechanistische Aspekte

4.3.1 Reduktion allylischer Alkohole

Alle bis jetzt gezeigten Reduktionen allylischer Alkohole beinhalten eine zusätzliche Umwandlung der allylischen Alkohole zu einer aktivierten C=C-Doppelbindung in Form eines α,β -ungesättigten Ketons oder Aldehyds. Sowohl bei der Biotransformation mit ganzen Zellen in Bäckerhefen als auch bei der Umsetzungen mit Proteingemischen mit, z.B. in zellfreien Proteinextrakten, spielen die entsprechenden Alkoholdehydrogenasen eine entscheidende Rolle. Am Beispiel von HLADH wurde gezeigt, dass diese Alkoholdehydrogenase(n) sowohl das α,β -ungesättigte als auch gesättigte Keton als Substrat zu reduzieren vermag. Durch die Oxidation von allylischem Alkohol **10a** wird das Substrat **10** für die *E. coli* eigene Enreduktase bereitgestellt.

Ein ähnlicher Schritt kann auch für PPR nicht ausgeschlossen werden. Die Oxidation zum Aldehyd wird vermutlich durch eine noch nicht identifizierte „Polyprenalreduktase“ katalysiert. Das Entstehen von diesen Intermediaten wird unter anderem durch die positive Auswirkung des NADP⁺-Zusatzes neben NADPH auf die Synthese von Dolicholen unterstützt (Abbildung 88).^[40,41]

Im Fall von 1,2-Dihydrovomilenin (**28**) kann dieser Schritt ohne zusätzliche Enzyme ablaufen. Ausgehend aus einem Hemiaminal kann sich die Ringöffnung in der Ausbildung eines α,β -ungesättigten Aldehyds resultieren.^[130] Diese Teilstruktur kann dann als eine aktivierte Doppelbindung reduziert werden (Abbildung 92). Diese potenzielle Ausbildung eines

α,β -ungesättigten Aldehyds als Intermediat eliminiert den Konflikt mit dem Reaktionsmechanismus der klassischen Enreduktasen.

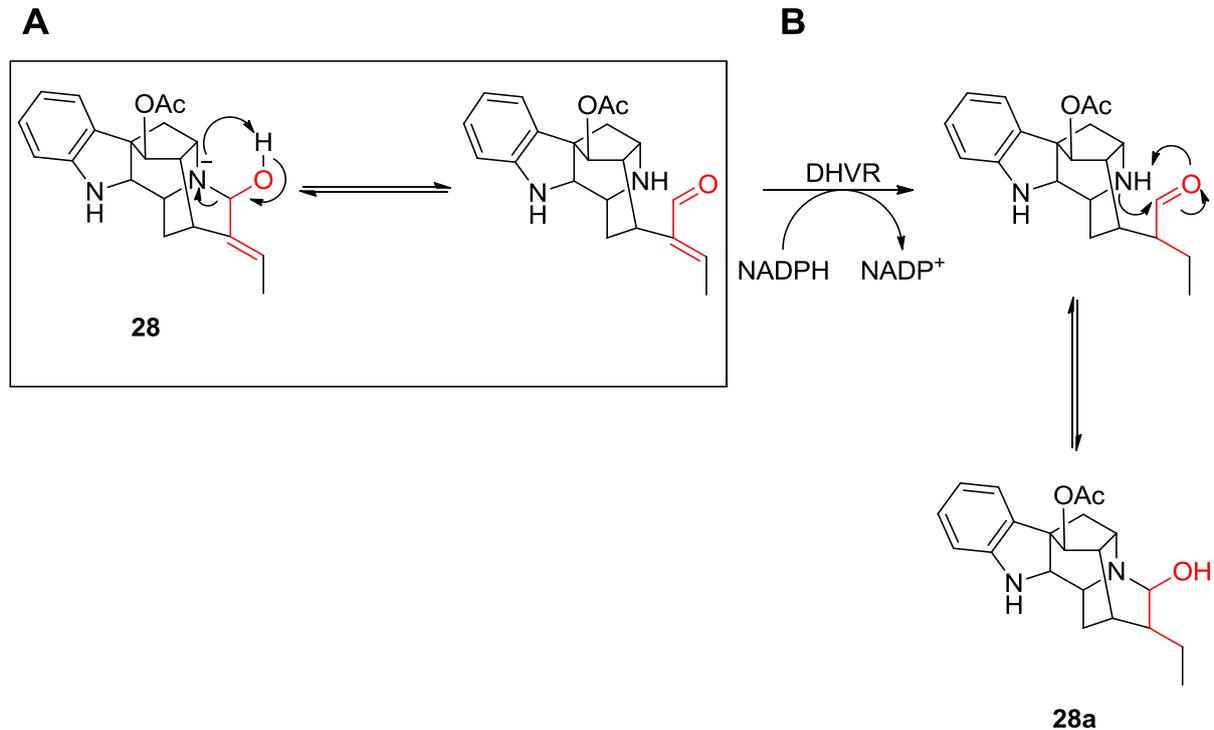


Abbildung 92: **A:** Hemiaminal-Ringöffnung in 1,2-Dihydrovomilenin (**28**) zum α,β -ungesättigten Aldehyd;^[130] **B:** anschließende Reduktion der $\Delta^{19(20)}$ -Doppelbindung zum 17-O-Norajmalin (**28a**), katalysiert durch DHVR.

4.3.2 Reduktion der C=C-Doppelbindung in einem Diensystem

Beim direkten Vergleich der Sterol-Reduktasen fällt auf, dass alle rein NADPH-abhängigen Reduktasen wie $\Delta 7$ SR, $\Delta 14$ SR und $\Delta 24(28)$ SR (ERG4) membranintegrierte Proteine mit bis zu neun TM-Einheiten sind. Diese Reduktasen weisen ihre Aktivität nur an einer C=C-Doppelbindung in einem Diensystem auf.

Desweiteren kann die Gruppe der FAD-abhängigen und membranständigen Reduktasen wie Hs Δ SR24 (DHCR24) und At Δ 24SR (DIM/DWF1) beschrieben werden. Aufgrund der fehlenden Daten erscheint zurzeit die pflanzliche $\Delta 24$ SR eher als ein Zwitter; dieses Enzym kann, genauso wie Hs Δ SR24, eine isolierte, nicht aktivierte C=C-Doppelbindung reduzieren. Zudem weisen beide Enzyme nur 1 bis 2 Transmembraneinheiten und eine putative FAD-bindende Domäne auf. Allerdings müsste die Frage über die tatsächliche Beteiligung von FAD an der katalysierten Reaktion im Fall von At $\Delta 24$ SR noch eindeutig geklärt werden. Zusätzlich kann At $\Delta 24$ SR die Aktivität von ERG4 an einem Diensystem anders als Hs Δ SR24

wiederherstellen. Das heißt, dass At Δ 24SR auch die $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung in einem Diensystem als Substrat akzeptieren könnte (Abbildung 93).

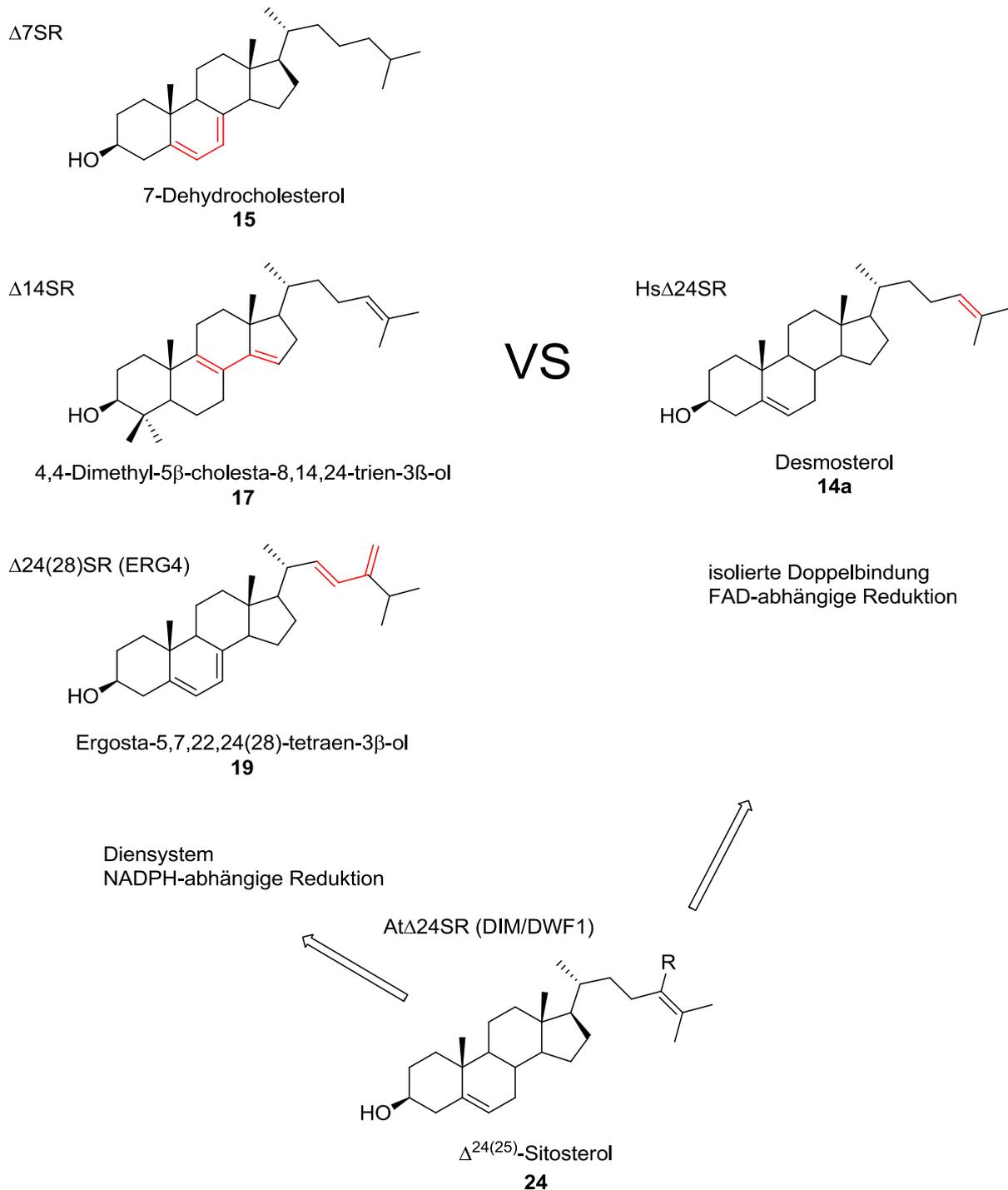


Abbildung 93: Duale Aktivität von At Δ 24SR an einem Diensystem und/oder an einer isolierten C=C-Doppelbindung. Die Substrate sind mit entsprechenden Enzymen angeführt.

Im Vergleich zur Reduktion der aktivierten C=C-Doppelbindungen, wobei der Hydridtransfer an ein Carbenium-Ion erst nach der Aktivierung durch eine elektronenziehende Gruppe (EZG) stattfindet, erscheint im Fall von Sterolreduktasen ein anderer Reaktionsmechanismus

plausibel. Hierbei findet erst die enzymkatalysierte elektrophile Protonierung der in einem Diensystem vorliegenden C=C-Doppelbindung statt. Dies führt zur Ausbildung eines Carbenium-Ions als Intermediat (HEI, engl. high energy intermediate). Die positive Ladung kann dann durch Mesomerie stabilisiert werden. Anschließend finden die Hydrid-Übertragung von NADPH an das entstandene Carbenium-Ion statt.^[88,127] Diese Hypothese vereint das intramembrane Vorliegen des aktiven Zentrums mit der Notwendigkeit eines Diensystems und erklärt auch die Wirkung von Morpholin-ähnlichen Inhibitoren (Carbenium-Ion-Mimetika).^[127] Insgesamt erscheint die Ausbildung des Carbenium-Ions als limitierender Schritt in der NAD(P)H-katalysierten Reduktionen (Abbildung 94).

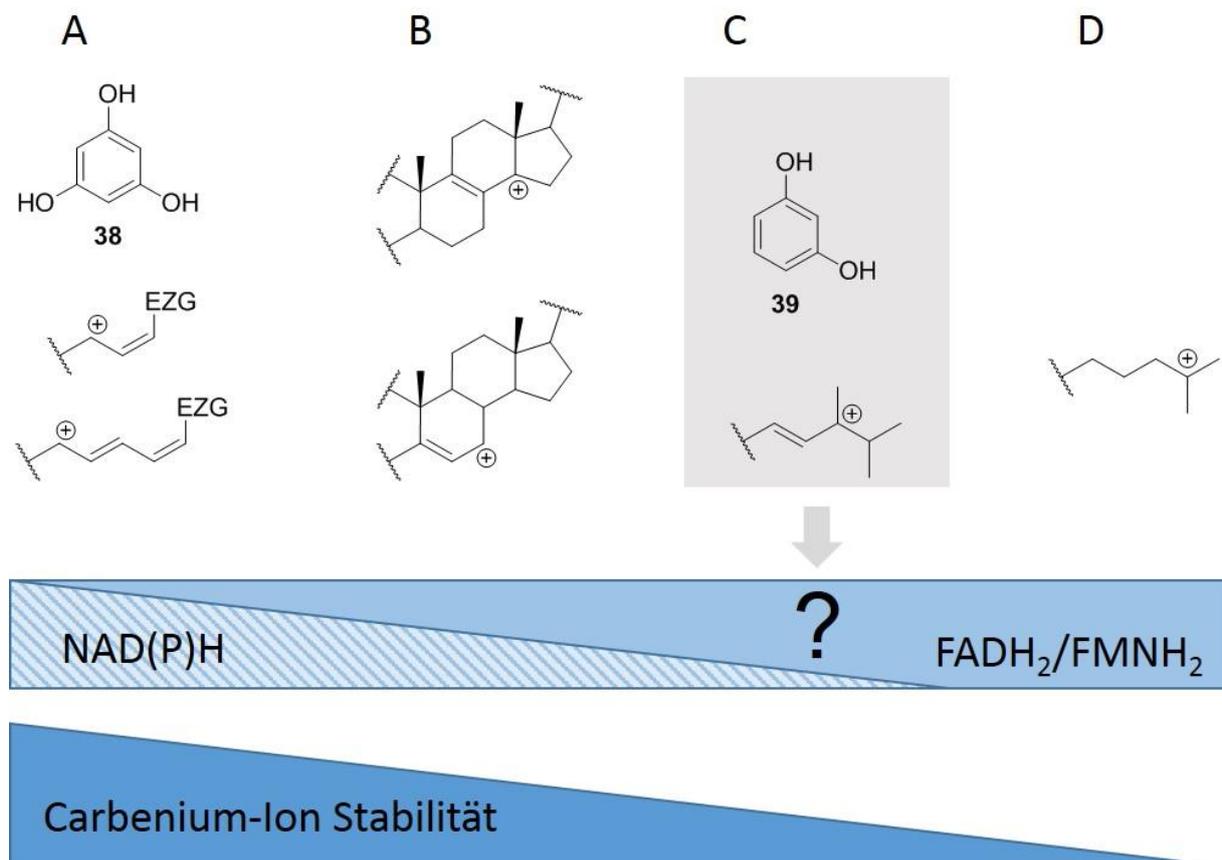


Abbildung 94: Positiv geladene Intermediate (HEI) und ihre Stabilität als limitierender Faktor bei der Reduktion von C=C-Doppelbindungen. **A:** durch eine Elektronziehende Gruppe (EZG) aktivierbare Doppelbindungen; **B:** durch eine initiale Protonierung aktivierbare Doppelbindungen in einem $\Delta^{5,7}$ - oder $\Delta^{8,14}$ -Sterol-Diensystem; **C:** putative „graue Zone“ mit einem aliphatischen Diensystem (siehe pilzliche $\Delta^{24(28)}$ SR und pflanzliche At Δ^{24} SR mit der gleichen Aktivität, der dazugehörige Cofaktor wurde bislang nicht bestimmt) und Resorcinreduktase (NAD(P)H-, FAD- oder Ferrodoxin-abhängig?); **D:** durch FAD aktivierbare isolierte $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung, reduziert durch Hs Δ^{24} SR.

Diese zwei oben beschriebenen Aktivierungswege scheinen für eine isoliert vorliegende C=C-Doppelbindung nicht vorhanden zu sein. Demnach benötigen die entsprechenden Enzyme andere Cofaktoren, wie z.B. FAD oder 4Fe-4S-Cluster. Der durch Boll postulierte Zusammenhang vom steigenden aromatischen Substratcharakter und der damit verbundenen

für die Reduktion zu überwindenden steigenden Redoxpotenziale wurden für die unterschiedlichen Cofaktor-Präferenzen verantwortlich gemacht. In der Tat, das sehr niedrige Redoxpotential der Ferredoxin-, ATP-abhängigen Benzoyl-CoA-Reduktase mit ca. -0.622 V (Benzoyl-CoA/1,5-Dienoyl-CoA-Paar) kann nur durch eine gekoppelte exergone Reaktion (ATP-Hydrolyse) überwunden werden.^[131-133] Der Unterschied zwischen einer 2-Elektron-Reduktion mit -0.324 V für NADPH und -0.219 V für FADH_2 (frei vorliegend und bis zu -0.4 V enzymgebunden) ist nicht besonders groß und erscheint im Licht der beschriebenen Ergebnisse nicht dafür verantwortlich zu sein.^[134] Anders als bei Phloroglucin (**38**) sind für Resorcin (**39**) keine stabilen Keto-Enol-Tautomeren bekannt, welche den Hydrid-Angriff an das Carbenium-Ion durch NAD(P)H erlauben (Abbildung 95).^[135]

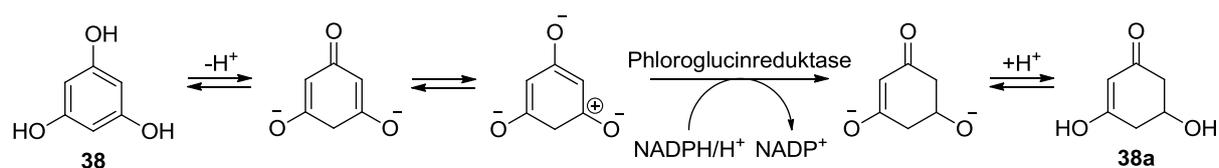


Abbildung 95: Der für Phloroglucinreduktase postulierte Reaktionsablauf. Die Ausbildung eines stabilen Dianions gefolgt von der NADPH-abhängigen Reduktion einer aktivierten (Keto-Enol-Tautomerie) C=C-Doppelbindung.^[135]

Eine enzymkatalysierte C=C-Doppelbindungsaktivierung durch die initiale Protonierung erscheint wiederum nur den membranintegrierten Reduktasen vorbehalten zu sein.

Die FAD-/FMN-abhängigen Reduktasen besitzen eine entscheidende Gemeinsamkeit mit Benzoyl-CoA-Reduktase: die Doppelbindungsaktivierung kann durch eine initiale 1-Elektron-Übertragung stattfinden.^[133,134] Das entspricht dem ECEC-Prinzip mit der elektrochemischen (E-Schritt) Aktivierung der Doppelbindung durch die zuerst stattfindende Elektron-Übertragung mit anschließender chemischen (C-Schritt) Protonierung.^[12] Damit kann die Reduktion der isoliert vorliegenden nicht aktivierten C=C-Doppelbindung erklärt werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien und Methoden

5.1.1 Verwendete Materialien und Geräte

Enzyme

Die Restriktionsendonukleasen NdeI und BamHI, T4-DNA-Ligase und Antarctic Phosphatase wurden von der Fa. NEW ENGLAND BIOLABS (NEB, Ipswich, USA) und der DNA Polymerase „Phusion[®] Flash High-Fidelity“ PCR Master Mix von der Fa. THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) bezogen.

Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden als synthetische, salzfreie und unmodifizierte Oligonukleotide von der Fa. EUROFINS MWG OPERON (Ebersberg, Deutschland) erhalten.

Ratten-cDNA (*Rattus rattus*)

cDNA Rat Liver Lot# A905005 wurde von der Fa. BIOCHAIN[®] INSTITUTE INC. (Newark, CA, USA) bezogen.

In-Fusion[®] HD Cloning Plus Kit

Der Master Mix (5x konz.) für die ligasefreie Klonierungsmethode wurde von der Fa. TAKARA BIO COMPANY (Mountain View, USA) bezogen.

DNA-Ladepuffer und DNA-Leiter

Der Ladepuffer „Gel Loading Dye #B7021S“ (6x konz.) und die DNA-Leiter „2-log DNA Ladder (0.1–10.0) #N3200S“ wurden von der Fa. NEB (Ipswich, USA) bezogen.

Proteinmarker

Der SDS-PAGE Proteinmarker „Precision Plus Protein Dual Color Standards“ wurde von der Fa. BIO-RAD LABORATORIES GMBH (München, Deutschland) und der „Proteinmarker VI (10–245), prestained A8889“ von der Fa. APPLICHEM (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) Stocklösung

Für eine 1 M Lösung wurden 238 mg IPTG in 1 mL H₂O_{bidest.} gelöst und bei –20 °C gelagert.

Selektionsantibiotika

Die Antibiotika Ampicillin, Kanamycin und Chloramphenicol wurden von der Fa. ROTH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Wässrige Antibiotika-Stocklösungen (1000x konz.) wurden steril filtriert. Alle Lösungen wurden zu je 1 mL bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Proteaseinhibitoren

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) wurde von der Fa. ROTH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und als gebrauchsfertige 100 mM PMSF (100x konz.) Stocklösung in reinem Isopropanol bei RT gelagert. Abweichende Endkonzentrationen werden bei den entsprechenden Versuchen separat angegeben.

Benzamidin, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A wurden von der Fa. SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Die Herstellung, Lagerung und Anwendung der entsprechenden Stocklösungen (100x konz.) erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Antikörper für Western Blot

Die Antikörper „HisProbe™-HRP“ und „FLAG™ Epitope Tag (DYKDDDDK) HRP“ wurden von der Fa. THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) bezogen. Die Herstellung und Lagerung der gebrauchsfertigen Stocklösungen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Abweichende Endkonzentrationen werden bei den entsprechenden Versuchen separat angegeben.

Schütteln und Mischen

Für sanftes Vermengen kleiner Volumina bis zu 15 mL wurde der „Thermomixer Comfort“ der Fa. EPPENDORF (Hamburg, Deutschland) mit einem entsprechenden Probenaufsatz (1.5 mL, 2 mL oder 15 mL) verwendet. Andernfalls wurde das Schüttelgerät „Vortex Genie 2“ der Fa. ROTH (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Dokumentation der Gele

Die Agarose- und SDS-PAGE-Gele wurden durch ein Geldokumentationssystem „UV-Transluminator Bio-Vision“ der Fa. VILBER LOURMAT (Eberhardzell, Deutschland) dokumentiert.

Sterilfiltration

Die Sterilfiltration erfolgte über Spritzenfilter „Rotilabo“ (CME, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ Porengröße) der Fa. ROTH (Karlsruhe, Deutschland).

Zentrifugation

Für kleine Volumina bis zu 2 mL wurden „Eppendorf Centrifuge 5417 C“ mit dem F-45-30-11 Rotor und für Volumina bis zu 50 mL „Eppendorf Centrifuge 5804 R“ mit dem F-34-6-38 Rotor Zentrifugen der Fa. EPPENDORF (Hamburg, Deutschland) verwendet. Zellkulturen bis 250 mL wurden an einer „Avanti J-26S XP“ Zentrifuge mit dem Rotor JLA-10.500 der Fa. BECKMAM COULTER (Pasadena, CA, USA) pelletiert. Die Ultrazentrifugation erfolgte durch „LE-80 Ultracentrifuge“ Zentrifuge mit dem Ti70 Rotor der Fa. BECKMAN COULTER (Pasadena, CA, USA).

5.1.2 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur; die tryptophanhaltigen Medien wurden zusätzlich lichtgeschützt gelagert.

Die Agar-Agar-haltigen Medien wurden autoklaviert und auf ca. 40 °C abgekühlt. Anschließend wurden sie mit entsprechenden Antibiotika versetzt und in Petrischalen zum Erstarren gegossen. Die gebrauchsfertigen Petrischalen wurden bei 4 °C bis zu 4 Wochen aufbewahrt.

A. Nährmedien für *E. coli* Kulturen

Luria Broth (LB) Medium

„LB-Medium (Lennox)“ wurde als gebrauchsfertiges Pulver von der Fa. ROTH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die Herstellung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
Trypton	1.0%	10 g
Hefeextrakt	0.5%	5 g
Natriumchlorid	0.5%	5 g
H ₂ O _{dem.}		ad 1000 mL

LB-Agar Festmedium

„LB-Agar (Lennox)“ wurde als gebrauchsfertiges Pulver von der Fa. ROTH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die Herstellung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
Trypton	1.0%	10 g
Hefeextrakt	0.5%	5 g
Natriumchlorid	0.5%	5 g
Agar-Agar	1.5%	15 g
H ₂ O _{dem.}		ad 1000 mL

Terrific Broth (TB) Medium

Zusammensetzung	Konzentration/Volumen	1 L
Trypton	1.2%	12 g
Hefeextrakt	2.4%	24 g
Glycerin	0.4%	4 mL
H ₂ O _{dem.}		ad 900 mL
<i>Alle Bestandteile in H₂O_{dem.} lösen und autoklavieren.</i>		
KH ₂ PO ₄ 0.17 M / K ₂ HPO ₄ 0.72 M (Stocklösung, steril filtriert)	100 mL	ad 1000 mL

B. Nährmedien für *S. cerevisiae* Kulturen

Supplemente

Für die Herstellung der selektiven Kompletmedien wurden alle benötigten Zusätze wie Adenin, Uracil, L-Leucin und L-Tryptophan als entsprechende Stocklösungen (100x konz.) hergestellt. Die Substanzen wurden einzeln eingewogen, in je 200 mL H₂O_{bidest.} gelöst und autoklaviert. Lagerung der fertigen Stocklösungen erfolgte bei RT, wobei L-Tryptophan zusätzlich lichtgeschützt gelagert wurde.

Zusammensetzung	Konzentration	200 mL
L-Leucin	76.2 mM	2 g
Uracil	17.8 mM	400 mg
Adenin	14.8 mM	400 mg
L-Tryptophan	9.8 mM	400 mg

Kohlenstoffquellen

D-Glucose

D-Glucose wurde als 40% ige Stocklösung durch Lösen in H₂O_{bidest.} hergestellt, autoklaviert und lichtgeschützt bei RT gelagert.

Galactose

Für die Herstellung einer 20% igen Galactose-Stocklösung wurde Galactose in heißem H₂O_{bidest.} unter starkem Rühren in Lösung gebracht und nach Abkühlen steril filtriert.

Raffinose

Eine 20% ige Raffinose-Stocklösung wurde durch Lösen in H₂O_{bidest.} unter starkem Rühren und anschließender Sterilfiltration hergestellt.

Vollmedien

Yeast Peptone Dextrose (engl., YPD), glucosehaltiges Vollmedium

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
Hefeextrakt	1%	10 g
Pepton	2%	20 g
D-Glucose	2%	20 g
H ₂ O _{dem.}		ad 1000 mL

YPD (4x konz.) Vollmedium

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
Hefeextrakt	4%	40 g
Pepton	8%	80 g
D-Glucose	8%	80 g
H ₂ O _{dem.}		ad 1000 mL

Yeast Peptone Galactose (engl., YPG), galactosehaltiges Vollmedium

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
Hefeextrakt	1%	10 g
Pepton	2%	20 g
Galactose	2%	20 g
H ₂ O _{dem.}		ad 1000 mL

YPG (4x konz.) Vollmedium

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
Hefeextrakt	4%	40 g
Pepton	8%	80 g
Galactose	8%	80 g
H ₂ O _{dem.}		ad 1000 mL

Selektive Komplettdien ohne Histidin

Synthetic Dextrose (engl. SD), glucosehaltiges Komplettdien ohne Histidin (SD/ØHis)

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
Yeast Nitrogen Base Sigma Y0626	1%	6.8 g
Drop-out Medium Suppl. w/o Histidine Sigma Y1751	2%	1.92 g
D-Glucose	2%	40 g
Supplemente (100x konz.)		je 10 mL
NaH ₂ PO ₄ (0.5 M, pH 6.0)		100 mL
H ₂ O _{dem.}		ad 1000 mL

Synthetic Raffinose (engl. SG) raffinosehaltiges Komplettdien ohne Histidin (SR/ØHis)

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
Yeast Nitrogen Base Sigma Y0626	1%	6.8 g
Drop-out Medium Suppl. w/o Histidine Sigma Y1751	2%	1.92 g
Galactose	2%	40 g
Supplemente (100x konz.)		je 10 mL
NaH ₂ PO ₄ (0.5 M, pH 6.0)		100 mL
H ₂ O _{dem.}		ad 1000 mL

Synthetic Dextrose Agar (engl. SD/Agar) festes glucosehaltiges Komplettmedium ohne Histidin (SD/Agar/ØHis)

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
Yeast Nitrogen Base Sigma Y0626	1%	6.8 g
Agar-Agar Kobe I	2%	20 g
D-Glucose	2%	40 g
Supplemente (100x konz.)		je 10 mL
H ₂ O _{dem.}		ad 1000 mL

5.1.3 Puffer

A. Für molekularbiologische Arbeiten

TSS-Puffer

Zusammensetzung	50 mL
LB-Medium	42.5 mL
PEG 6000	5 mL
DMSO	2.5 mL
MgCl ₂	0.51 g
Glycerin	5 mL

Steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C.

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer Stocklösung (50x konz.)

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
Tris	2 M	242.3 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	50 mM	18.61 g
H ₂ O _{dem.}		900 mL

pH wird mit Essigsäure auf 8.0 eingestellt, mit H₂O_{bidest.} ad 1000 mL aufgefüllt.

Tris / EDTA (TE)-Puffer Stocklösung (10x konz.)

Zusammensetzung	Konzentration	200 mL
Tris	0.1 M	2.42 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	10 mM	744 mg
H ₂ O _{dem.}		190 mL

pH wird mit HCl auf 7.5 eingestellt, mit H₂O_{bidest.} ad 200 mL aufgefüllt und autoklaviert.

Lithiumacetat (LiOAc)-Puffer Stocklösung (10x konz.)

Zusammensetzung	Konzentration	200 mL
LiOAc·2H ₂ O (98%)	1 M	20.82 g
H ₂ O _{dem.}		190 mL

pH wird mit HCl auf 7.5 eingestellt, mit H₂O_{bidest.} ad 200 mL aufgefüllt und autoklaviert.

PEG 4000 Puffer Stocklösung (10x konz.)

Eine 50 %ige (m/m) PEG4000-Lösung wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ hergestellt und autoklaviert.

B. Für protein-biochemische Arbeiten

Dikaliumhydrogenphosphat-Stocklösung 1M

174.18 g K_2HPO_4 wurden in 1 L $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$ gelöst und autoklaviert.

Kaliumdihydrogenphosphat-Stocklösung 1M

136.09 g KH_2PO_4 wurden in 1 L $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$ gelöst und autoklaviert.

0.17 M KH_2PO_4 / 0.72 M K_2HPO_4 Puffer

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
KH_2PO_4	0.17 M	23.1 g
K_2HPO_4	0.72 M	125.4 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$		ad 1000 mL

NaH_2PO_4 Stocklösung 0.5 M pH 6.0

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5 M	69.0 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$		ad 900 mL

pH wird mit NaOH auf 6.0 eingestellt, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$ ad 1000 mL aufgefüllt und autoklaviert.

Tris/HCl Stocklösung 1 M, pH 8.0

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
Tris	1 M	121.1 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$		ad 900 mL

pH wird mit HCL auf 8.0 eingestellt, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$ ad 1000 mL aufgefüllt und autoklaviert.

NaCl Stocklösung 5 M

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
NaCl	5 M	292.2 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$		ad 1000 mL

Lysepuffer I

Der Stockpuffer wurde aus Tris/HCl, NaCl durch Lösen im H₂O_{bidest.} hergestellt und bei 4 °C gelagert. Der gebrauchsfertige Lysepuffer wurde direkt vor der Anwendung aus 49.5 mL des Stockpuffers durch Zugabe von weiteren Bestandteilen auf 50 mL Endvolumen hergestellt.

Zusammensetzung		Konzentration	1 L	50 mL
Tris/HCl	(1 M)	50 mM	50 mL	
NaCl	(5 M)	250 mM	50 mL	
H ₂ O _{bidest.}			900 mL	
<i>pH wird mit HCL auf 8.0 eingestellt, mit H₂O_{dem.} ad 990 mL aufgefüllt und autoklaviert.</i>				
<i>Weitere Bestandteile werden unmittelbar vor der Anwendung zugefügt.</i>				
DTT		1 mM		7.5 mg
PMSF	(100x konz.)	1 mM		0.5 mL

Lysepuffer II

Der Stockpuffer wurde aus Tris/HCl, NaCl und Glycerin durch Lösen im H₂O_{bidest.} hergestellt und bei 4 °C gelagert. Der gebrauchsfertige Lysepuffer wurde direkt vor der Anwendung aus 49.5 mL des Stockpuffers durch Zugabe von weiteren Bestandteilen auf 50 mL Endvolumen hergestellt.

Zusammensetzung		Konzentration	1 L	50 mL
Tris/HCl	(1 M)	50 mM	50 mL	
NaCl	(5 M)	250 mM	50 mL	
Glycerin		20% (m/v)	200 g	
H ₂ O _{bidest.}			900 mL	
<i>pH wird mit HCL auf 8.0 eingestellt, mit H₂O_{dem.} ad 990 mL aufgefüllt und autoklaviert.</i>				
<i>Weitere Bestandteile werden unmittelbar vor der Anwendung zugefügt.</i>				
DTT		1 mM		7.5 mg
PMSF	(100x konz.)	1 mM		0.5 mL

Lysepuffer III

Der Stockpuffer wurde aus Tris/HCl, NaCl, Sorbitol und MgSO₄ durch Lösen im H₂O_{bidest.} hergestellt und bei 4 °C gelagert. Der gebrauchsfertige Lysepuffer wurde direkt vor der Anwendung aus 48.4 mL des Stockpuffers durch Zugabe von weiteren Bestandteilen auf 50 mL Endvolumen hergestellt.

Zusammensetzung		Konzentration	1 L	50 mL
Tris/HCl	(1 M)	50 mM	50 mL	
NaCl	(5 M)	250 mM	50 mL	
Sorbitol		0.6 M	109.3 g	
MgSO ₄		1.2 M	144.5 g	
H ₂ O _{bidest.}			900 mL	
<i>pH wird mit HCL auf 5.6–6.0 eingestellt, mit H₂O_{bidest.} ad 968 mL aufgefüllt.</i>				
<i>Weitere Bestandteile werden unmittelbar vor der Anwendung zugefügt.</i>				
DTT		1 mM		7.5 mg
PMSF	(100x konz.)	1 mM		0.5 mL
Proteaseinhibitoren (siehe Kapitel 5.1.1)				Σ1.1 mL

Membrane Resuspension Buffer (engl., MRB-Puffer)

Der Stockpuffer wurde aus Tris/HCl, NaCl und Saccharose durch Lösen im H₂O_{bidest.} hergestellt und bei 4 °C gelagert. Der gebrauchsfertige MRB-Puffer wurde direkt vor der Anwendung aus 9.68 mL des Stockpuffers durch Zugabe von weiteren Bestandteilen auf 10 mL Endvolumen hergestellt.

Zusammensetzung		Konzentration	1 L	10 mL
Tris/HCl	(1 M)	50 mM	50 mL	
NaCl	(5 M)	1 M	200 mL	
Saccharose		0.2 M	68.5 g	
H ₂ O _{bidest.}			900 mL	
<i>pH wird mit HCL auf 7.5 eingestellt, mit H₂O_{bidest.} ad 968 mL aufgefüllt.</i>				
<i>Weitere Bestandteile werden unmittelbar vor der Anwendung zugefügt.</i>				
DTT		1 mM		1.5 mg
PMSF	(100x konz.)	1 mM		0.1 mL
Proteaseinhibitoren (siehe Kapitel 5.1.1)				Σ0.22 mL

Solubilisierungspuffer

Der Stockpuffer wurde aus Tris/HCl, NaCl und Imidazol durch Lösen im H₂O_{bidest.} hergestellt und bei 4 °C gelagert. Der gebrauchsfertige Solubilisationspuffer wurde direkt vor der Anwendung aus 9.68 mL des Stockpuffers durch Zugabe von weiteren Bestandteilen auf 10 mL Endvolumen hergestellt.

Zusammensetzung		Konzentration	1 L	10 mL
Tris/HCl	(1 M)	50 mM	50 mL	
NaCl	(5 M)	1 M	200 mL	
Imidazol	(5 M)	15 mM	3 mL	
H ₂ O _{bidest.}			900 mL	
<i>pH wird mit HCl auf 7.5 eingestellt, mit H₂O_{bidest.} ad 968 mL aufgefüllt.</i>				
<i>Weitere Bestandteile werden unmittelbar vor der Anwendung zugefügt.</i>				
DTT		1 mM		1.5 mg
PMSF	(100x konz.)	1 mM		0.1 mL
n-Dodecyl-D-maltosid		30 mM		153.2 mg
Proteaseinhibitoren (siehe Kapitel 5.1.1)				Σ0.22 mL

SDS-PAGE-Puffer**Elektrophorese-Puffer (10x konz.), 0.1% SDS**

Zusammensetzung	1 L
Natriumlaurylsulfat (SDS)	10.0 g
Glycin	144.0 g
Tris	30.3 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 mL

SDS-Ladepuffer (2x konz.), reduzierend, 2% SDS

Zusammensetzung	8 mL
Tris/HCl-Puffer (0.5 M, pH 6.8)	1.0 mL
Bromphenolblau 0.1% (m/v)	0.2 mL
SDS-Lösung 10% (m/m)	1.6 mL
β-Mercaptoethanol	0.4 mL
Glycerin	1.6 mL
H ₂ O _{bidest.}	3.2 mL

SDS-PAGE-Gele

Zusammensetzung		Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Stammlösung	(30%)	4.00 mL	0.65 mL
Tris/HCl-Puffer	(1.5 M, pH 8.8)	2.50 mL	---
Tris/HCl-Puffer	(0.5 M, pH 6.8)	---	1.25 mL
H ₂ O _{bidest.}		3.35 mL	3.05 mL
SDS-lösung	(10% m/m)	100 µL	50 µL
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)		5 µL	5 µL
Ammoniumperoxodisulfat-Lösung	(10% m/v)	100 µL	50 µL

Färbelösung

Zusammensetzung		1 L
Coomassie Brilliant Blue R 250		2.5 g
Ethanol		300 mL
Eisessig		100 mL
H ₂ O _{dem.}		ad 1000 mL

Entfärbelösung

Zusammensetzung		1 L
Ethanol		200 mL
Eisessig		75 mL
H ₂ O _{dem.}		ad 1000 mL

Western Blot Puffer

Transferpuffer ohne Methanol (10x konz.)

Zusammensetzung		1 L
Tris		30.3 g
Glycin		144.1 g
H ₂ O _{bidest.}		ad 1000 mL

Transferpuffer (1x konz.)

Zusammensetzung	1 L
Transferpuffer ohne Methanol (10x konz.)	100 mL
Methanol	200 mL
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 mL

PBS-Puffer (engl. Phosphate Buffered Saline, 10x konz.)

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
NaCl	1370 mM	8 g
KCl	27 mM	2 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	81 mM	14.4 g
KH ₂ PO ₄	14.7 mM	2 g
H ₂ O _{bidest.}		800 mL

pH wird mit H₃PO₄ auf 7.4 eingestellt, mit H₂O_{bidest.} ad 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

Waschpuffer (PBST-Puffer)

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
PBS-Puffer (10x konz.)		100 mL
Tween 20		1 mL
H ₂ O _{bidest.}		ad 1000 mL

Blockpuffer

PBST-Puffer mit 5% Milchpulver der Fa. ROTH (Karlsruhe, Deutschland) und 1% BSA (engl. Bovine Serum Albumine) der Fa. ROTH (Karlsruhe, Deutschland) oder nur mit 5% BSA als optimierte Variante.

C. Ni-NTA-Puffer

Standard Ni-NTA Puffer unter nativen Bedingungen

Wurden in Anlehnung an Qiagen Ni-NTA Puffer für Proteinreinigung aus *E. coli* konzipiert.^[136] Alle Puffer wurden auf pH 7.3 eingestellt und bei RT gelagert. PMSF (10 mM) wurde unmittelbar vor der Anwendung zugefügt.

Imidazol Stocklösung 5 M

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
Imidazol	5 M	340.4 g
H ₂ O _{bidest.}		ad 1000 mL

Probenpuffer

Zusammensetzung	Konzentration	1 L	10 mL
KP _i -Puffer (50 mM)	50 mM	990 mL	49.5 mL
PMSF (1 M)	10 mM	10 mL	0.5 mL
Imidazol	10 mM	0.68 g	34 mg

Waschpuffer 1

Zusammensetzung	Konzentration	1 L	10 mL
KP _i -Puffer (50 mM)	50 mM	1000 mL	50 mL
Imidazol	10 mM	0.68 g	34 mg

Waschpuffer 2

Zusammensetzung	Konzentration	1 L	10 mL
KP _i -Puffer (50 mM)	50 mM	1000 mL	50 mL
Imidazol	50 mM	3.4 g	170 mg

Elutionspuffer

Zusammensetzung	Konzentration	1 L	10 mL
KP _i -Puffer (50 mM)	50 mM	1000 mL	50 mL
Imidazol	300 mM	20.4 g	1.02 g

Ni-NTA Puffer für Reinigung unter denaturierenden Bedingungen

Wurden in Anlehnung an Qiagen Ni-NTA Puffer für Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen konzipiert.^[136]

Extraktionspuffer 1 (engl. extraction buffer 1, EB1-Puffer)

Zusammensetzung	Konzentration	1 L	50 mL
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	100 mM	15.6 g	0.78 g
NaCl (5 M)	150 mM	30 mL	1.5 mL
Tris	10 mM	1.21 g	61 mg
Harnstoff	6 M	360 g	18 g
<i>pH</i> wird mit NaOH auf 8.0 eingestellt und mit H ₂ O _{bidest.} aufgefüllt		ad 1000 mL	ad 50 mL

Wasch-Puffer 1/2/3/4 (WB1/2/3/4-Puffer)

Zusammensetzung	Konzentration	1 L	50 mL
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	100 mM	15.6 g	0.78 g
Tris	10 mM	1.21 g	61 mg
Harnstoff	6/4/2/0 M	360/240/120/0 g	18/12/6/0 g
<i>pH</i> wird mit H ₃ PO ₄ auf 6.3 eingestellt und mit H ₂ O _{bidest.} aufgefüllt		ad 1000 mL	ad 50 mL
<i>Weitere Bestandteile werden unmittelbar vor der Anwendung zugefügt.</i>			
<i>n</i> -Octyl-β-D-glucopyranosid	1%		2 mg
Natriumtaurodeoxycholat	1%		2 mg

Elutionspuffer 1/2/3 (EIB1/2/3)

Zusammensetzung	Konzentration	1 L	50 mL
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	100 mM	15.6 g	0.78 g
Tris	10 mM	1.21 g	61 mg
Imidazol	50/200/250 mM	3.4/13.6/17.02 g	170/680/851 mg
<i>pH</i> wird mit H ₃ PO ₄ auf 5.9 eingestellt und mit H ₂ O _{bidest.} aufgefüllt		ad 1000 mL	ad 50 mL
<i>Weitere Bestandteile werden unmittelbar vor der Anwendung zugefügt.</i>			
<i>n</i> -Octyl-β-D-glucopyranosid	1%		2 mg
Natriumtaurodeoxycholat	1%		2 mg

Detergenzhaltiger Ni-NTA Puffer für Reinigung solubilisierter Proteine

Der Stockpuffer wurde aus 1 M Tris/HCl, 5 M NaCl und Glycerin durch Lösen im H₂O_{bidest.} hergestellt und bei 4 °C gelagert. Der gebrauchsfertige Puffer wird durch Zugabe von weiteren Bestandteilen wie Dithiothreitol (DTT), Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Detergenz *n*-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM) und Imidazol in entsprechenden Konzentration auf 50 mL Endvolumen hergestellt.

Zusammensetzung	Konzentration	1 L	50 mL
Tris/HCl (1 M)	20 mM	20 mL	
NaCl (5 M)	200 mM	40 mL	
Glycerin	10% (m/v)	100 g	
<i>pH</i> wird mit HCl auf 7.5 eingestellt und mit H ₂ O _{bidest.} aufgefüllt		ad 930 mL	
<i>Weitere Bestandteile werden unmittelbar vor der Anwendung zugefügt.</i>			
DTT	1 mM		7.5 mg
PMSF (100x. konz.)	1 mM		0.5 mL
DDM	1 mM		25.5 mg
 <u>Ni-NTA DDM 15 mM Imidazol</u>			
Imidazol (5 M)	15 mM		0.15 mL
H ₂ O _{bidest.} ad 50 mL			
 <u>Ni-NTA DDM 30 mM Imidazol</u>			
Imidazol (5 M)	30 mM		0.30 mL
H ₂ O _{bidest.} ad 50 mL			
 <u>Ni-NTA DDM 300 mM Imidazol</u>			
Imidazol (5 M)	300 mM		3.00 mL

D. Für biokatalytische Umsetzungen

Triethanolamin (TEA)-Puffer

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
TEA	0.1 mM	18.57 g
H ₂ O _{bidest.}		950 mL

pH wird mit NaOH auf 7.0 eingestellt, mit H₂O_{bidest.} ad 1000 mL aufgefüllt.

Kaliumphosphat (KPi)-Puffer, 50 mM

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
KH ₂ PO ₄ Stocklösung 1 M		40.1 mL
K ₂ HPO ₄ Stocklösung 1 M		9.9 mL
H ₂ O _{bidest.}		940 mL

pH wird mit KOH auf 7.3 eingestellt, mit H₂O_{bidest.} ad 1000 mL aufgefüllt.

Kaliumphosphat (KPi)-Puffer, 100 mM

Zusammensetzung	Konzentration	1 L
KH ₂ PO ₄ Stocklösung 1 M		80.2 mL
K ₂ HPO ₄ Stocklösung 1 M		19.8 mL
H ₂ O _{bidest.}		940 mL

pH wird mit KOH auf 7.4 eingestellt, mit H₂O_{bidest.} ad 1000 mL aufgefüllt.

5.1.4 Verwendete Stämme

Tabelle 2: Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
TG1	K-12 F' [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15</i>] <i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5, (r_Km_K)</i>	Stratagene
Lemo21	<i>huA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS/ pLemo(Cam^R)</i> <i>λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5pLemo = pACYC184-PrhaBAD-lysY</i>	NEB
BL21(DE3) Gold	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Stratagene

Tabelle 3: Verwendete *S. cerevisiae* Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
MH272-3fa/α	<i>(leu2 ura3 trp1 ade2 Δhis3 GAL+HMLa rme1)</i>	Zur Verfügung gestellt von Dr. Peter Siegert; Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Freiburg

5.1.5 Verwendete Vektoren

Tabelle 4: Verwendete Vektoren.

Vektoren	Genetische Marker	Referenz
pET24b	Kan ^R , ori _{pBr322} , P _{T7lac} , T7-Tag, C-terminal 6x His-Tag	Novagen
pET28b	Kan ^R , ori _{pBr322} , P _{T7lac} , C-terminal 6x His-Tag	Novagen
pESCHIS	2μ, pUC, (HIS3, TRP1, LEU2, URA3) GAL1 / GAL10, FLAG Epitop, C-MYC Epitop, f1 origin, AmpR	Agilent

5.1.6 Verwendete Plasmide

Tabelle 5: Verwendete rekombinante Plasmide. Alle Klonierungsarbeiten wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Plasmid	Beschreibung
pET24b:: <i>Δ14SR_C</i> -His ₆	<i>Δ14SR</i> Originalsequenz kloniert in pET24b nach In-Fusion [®] Protokoll in der <i>MCS</i>
pET28b:: <i>Δ14SR_C</i> -His ₆	<i>Δ14SR</i> Originalsequenz kloniert in pET28b nach In-Fusion [®] Protokoll in der <i>MCS</i>
pET28b:: <i>Δ14SRtr_C</i> -His ₆	Gekürzte <i>Δ14SR</i> kloniert in pET28b nach In-Fusion [®] Protokoll in der <i>MCS</i>
pRhot-Hi2:: <i>Δ14SR_C</i> -His ₆	<i>Δ14SR</i> Originalsequenz kloniert in pRhot-Hi2 durch Ligation in der <i>MCS</i> zwischen NdeI und BamHI
pRhot-Hi2:: <i>Δ14SR_N</i> -His ₆	<i>Δ14SR</i> Originalsequenz kloniert in pRhot-Hi2 nach In-Fusion [®] Protokoll in der <i>MCS</i>
pESCHIS:: <i>Δ14SR_C</i> -His ₆	<i>Δ14SR</i> Originalsequenz kloniert in pESCHIS nach In-Fusion [®] Protokoll in der <i>MCS</i> unter Kontrolle von GAL1 Promotor
pESCHIS:: <i>Δ14SR_N</i> -His ₆	<i>Δ14SR</i> Originalsequenz kloniert in pESCHIS nach In-Fusion [®] Protokoll in der <i>MCS</i> unter Kontrolle von GAL1 Promotor
pESCHIS:: <i>2xΔ14SR_C</i> -His ₆	<i>Δ14SR</i> Originalsequenz kloniert in pESCHIS nach In-Fusion [®] Protokoll in der <i>MCS</i> unter Kontrolle von GAL1 und GAL10 Promotoren
pESCHIS:: <i>ERG24_C</i> -His ₆	<i>ERG24</i> Originalsequenz kloniert in pESCHIS nach In-Fusion [®] Protokoll in der <i>MCS</i> unter Kontrolle von GAL10 Promotor
pESCHIS:: <i>PPR_C</i> -His ₆	Synthetisches <i>PPR</i> -Gen kloniert in pESCHIS nach In-Fusion [®] Protokoll in der <i>MCS</i> unter Kontrolle von GAL10 Promotor
pESCHIS:: <i>PPR_C</i> -His ₁₀ -FLAG	Synthetisches <i>PPR</i> -Gen kloniert in pESCHIS nach In-Fusion [®] Protokoll in der <i>MCS</i> unter Kontrolle von GAL10 Promotor als Dekahistidin-FLAG-Fusionsprotein

5.2 Molekularbiologische Arbeiten und Methoden

5.2.1 Allgemeine Methoden

Gensynthese

Der in *Rattus norvegicus* für PPR kodierende DNA-Abschnitt (NCBI: BC086584.1, 837 bp) wurde als Ausgangsequenz ausgewählt. Die kodierende DNA-Sequenz wurde mit GeneArt[®] Gene Synthesis Algorithmen von der Fa. THERMO FISCHER SCIENTIFIC INC. (Waltham, MA, USA) für die geplante Expression in *S. cerevisiae* bezüglich des GC-Gehaltes und Codon-Gebrauch optimiert. Die Herstellung eines Genes als ein doppelsträngiges DNA-Fragment erleichtert die Handhabung und erlaubt eine direkte Klonierung in einen geeigneten Vektor durch die ligasefreie In-Fusion[®] Klonierungsmethode. Die codonoptimierte Nukleotidsequenz ist im Anhang zu finden.

Das PPR-Fragment wurde als Lyophilisat (1.8 mg) erhalten. Durch Versetzen mit 45 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ wurde eine gebrauchsfertige Lösung ($40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) erhalten, die bei -20°C aufbewahrt wurde.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde der Thermocycler „primus advanced 25“ der Fa. PEQLAB (Erlangen, Deutschland) und der „Phusion[®] Flash High-Fidelity“ PRC Master Mix (2x konz.) verwendet. Die Ansatzgröße betrug 50 und 100 μL . Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

Zusammensetzung, 50–100 μL Ansätze

PCR Master Mix (2x konz.)		25–50 μL
Primer for	(10 μM)	1.0–2.5 μL
Primer rev	(10 μM)	1.0–2.5 μL
Templat	(8–35 ng)	0.5–1.0 μL
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$		ad 50–100 μL

PCR-Programm

Initiale Denaturierung	95 °C, 3 min.
30 Zyklen mit je:	
<i>Denaturierung</i>	95 °C, 30 sec.
<i>Annealing</i>	$T_M - 5\text{ °C bis } T_M\text{ °C}$, 30 sec.
<i>Elongation</i>	72 °C, 15–135 sec. ($4\text{ kb}\cdot\text{min}^{-1}$)
Finale Elongation	72 °C, 3–5 min.

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung linearisierter DNA-Fragmente wurde das „PerfectBlue Gelsystem Mini S“ der Fa. PEQLAB (Erlangen, Deutschland) verwendet. Die Agarosegele (1% m/v) wurden nach Sambrook und Russell durch das Lösen der entsprechenden Menge an Agarosepulver in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer, Kapitel 5.1.3) unter Wärmezufuhr hergestellt.^[137] Die noch warme Lösung wurde in den abgedichteten Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden mit dem Ladebuffer „Gel Loading Dye Blue 6x“ der Fa. NEB (Ipswich, USA) versetzt und gründlich gemischt. Nach Erstarren des Gels wurde der zuvor eingesetzte Kamm entfernt und die entstandenen Taschen mit den Proben beladen. Als interner Größenstandard wurde die DNA-Leiter „2-Log DNA Ladder“ (0.1–10.0 kb) der Fa. NEB (Ipswich, USA) verwendet. Bei der angelegten Spannung von 100 V (Consort E802 Powersupply) betrug die Dauer der elektrophoretischen Auftrennung in TAE-Puffer ca. 50–60 min je nach gewünschtem Auftrennungsgrad. Die Visualisierung unter UV-Licht (254 nm) erfolgte nach Färben des Gels in einem Ethidiumbromid-Bad für 10 min.

DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA-Fragmente aus einem Agarosegel erfolgte nach Herstellerangaben mit „Invisorb® Fragment Clean Up Kit“ der Fa. STRATEC MOLECULAR (Berlin, Deutschland).

Plasmid-Isolierung

Die Isolierung der Plasmide aus *E. coli* Zellen erfolgte nach Herstellerangaben mit „Zippy™ Plasmid Miniprep Kit“ der Fa. ZYMO RESEARCH (Irvine, USA).

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-konzentration wurde mit dem „NanoDrop 2000“ der Fa. THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) bei 260/230 nm und 260/280 nm Verhältnissen nach Herstellerangabe bestimmt.

DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der klonierten Gene wurde von der Fa. GATC BIOTECH (Konstanz, Deutschland) mit entsprechenden plasmidspezifischen Primern durchgeführt.

Ligasefreie In-Fusion[®] Klonierungsmethode

Die Konzentrationen an Gen-Insert und entsprechendem Vektor wurden mit Hilfe des Online-Dienstes „In-Fusion[®] Molar Ratio Calculator“ ausgehend von 200 ng Vektor und dem molaren Verhältnis 1:4 (Vektor/Insert) nach In-Fusion[®] Protokoll entsprechend angepasst. Das gereinigte PCR-Fragment oder synthetische Gen mit zu dem entsprechenden Vektor homologen Bereichen und der linearisierte Vektor wurden mit 2 µL InFusion HD Enzyme Premix (5x konz.) versetzt und mit H₂O_{bidest.} auf ein Endvolumen von 10 µL ergänzt. Der Gesamtansatz wurde bei 50 °C für 15–30 min inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt und ohne weitere Aufarbeitung für die Transformation in kompetente Zellen verwendet. Die Lagerung, falls notwendig, erfolgte bei –20 °C.

Transformation in *E. coli* Stämme

Transformation von *E. coli* TG1-Zellen

200 µL der CaCl₂-kompetenten *E. coli* TG1-Zellen (Kapitel 5.3.2) wurden 10 min auf Eis aufgetaut, mit 2.5 µL des In-Fusion[®] Klonierungsansatzes versetzt und sanft vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C, gefolgt von sofortiger Abkühlung auf Eis für 1 min. Die Zellsuspension wurde mit 300 µL LB-Medium verdünnt und bei 37 °C und 300 rpm für eine Stunde im Thermomixer inkubiert. Die transformierten Zellen wurden anschließend auf Antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der Erfolg der Transformation wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

Transformation von *E. coli* Lemo21-Zellen

Kompetente *E. coli* Lemo21-Zellen der Fa. NEB (Ipswich, USA) wurden 10 min auf Eis aufgetaut und mit ca. 120 ng DNA des entsprechenden Konstruktes versetzt und nach Angaben des Herstellers transformiert. Der Erfolg der Transformation wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

Transformation in *S. cerevisiae* Stämme

Für die Hauptkultur wurden 50 mL YPD-Vollmedium mit 5 mL *S. cerevisiae* Vorkultur angeimpft ($OD_{600} \sim 0.05$) und bei 30 °C, 200 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0.6 wurden die Zellen durch Zentrifugation ($10000 \times g$, 10 min, 4 °C) geerntet und mit $H_2O_{bidest.}$ zweimal gewaschen. In einem 1.5 mL Eppendorf-Tube wurden die Zellen in 1 mL TE/LiOAc-Puffer (1x konz., frisch hergestellt) resuspendiert, sofort pelletiert ($6000 \times g$, 2 min, 4 °C) und in 500 μ L TE/LiOAc-Puffer (1x konz., frisch hergestellt) suspendiert. 50 μ L der Zellsuspension wurden in 300 μ L PEG 4000-Puffer (40% PEG, 1x konz., frisch hergestellt) suspendiert und mit ca. 1 mg Plasmid-DNA gründlich vermischt und bei 30 °C, 400 rpm im Thermomixer für 30 min bei gelegentlichem Invertieren inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C im Wasserbad für 15 min. Zellen wurden mit 1 mL selektiv Kompletmedium SD/ \emptyset His dreimal gewaschen und anschließend in 500 μ L SD/ \emptyset His suspendiert und auf eine selektive SD/ \emptyset His-Agarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C im Brutschrank für mindestens 3 Tage. Als Negativkontrolle dienten untransformierte Zellen, als Positivkontrolle diente eine Transformation mit leerem pESCHIS-Vektor.

5.2.2 Herstellung der Expressionsplasmide

A. Für *E. coli* Stämme

Herstellung des Plasmids pET24b:: Δ 14SR_C-His₆

Gewinnung des Δ 14SR-Gens

Zur Amplifizierung des für Δ 14SR kodierenden Genes aus Ratten-cDNA (*Rattus rattus*, cDNA Rat Liver Lot# A905005 von der Fa. BIOCHAIN[®] INSTITUTE INC.) wurden entsprechend hybridisierende Primer anhand der mRNA des *Tm7sf2*-Gens (*Rattus norvegicus* transmembrane 7 superfamily member 2, NCBI: NM_001013071) hergestellt.

Primer:

sterol 14 red for: 5' - CCC ATA TTG CCT CTC GTG AGG CC -3'

sterol 14 red rev: 5' - GGA TCC GCG TAG ACA TAC GGT ATG A -3'

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und für die weitere PCR-basierte Modifizierung nach In-Fusion[®] Protokoll direkt verwendet (Kapitel 5.2.1). Dazu wurden Primer mit 15 bp langen genspezifischen Überhängen und

weiteren, dem Vektor pET24b homologen 15 bp hergestellt. Dadurch wurde das $\Delta 14SR$ -Gen so konzipiert, dass vor dem Startcodon am 5'-Ende ein 15 bp langer Bereich vorliegt, der dem Vektor pET24b in der *Multiple Cloning Side (MCS)* homolog ist. Ähnlich wurde am 3'-Ende ein 15 bp langer homologer Bereich per PCR eingeführt. Als Template diente vorher aus cDNA gewonnenes $\Delta 14SR$ -Gen.

Primer:

delta 14-SR for: 5'- GAA GGA GAT ATA CAT ATG GCT TCT CGT GAG -3'

delta 14-SR rev: 5'- CGA ATT CGG ATC CCG ATC CGC GTA GAC ATA -3'

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese aufgereinigt ($33 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) und mit den Primer „sterol 14 red for“ und „sterol 14 red rev“ durch Fa. GATC-BIOTECH (Konstanz, Deutschland) sequenziert.

Amplifizierung von pET24b-Vektor für In-Fusion[®] basierte Klonierung

Als Templat diente nativer pET24b-Vektor. Der Bereich zwischen dem Startcodon und der *Bam*HI-Schnittstelle wurde dabei entfernt werden. Mit Hilfe von pET24 for/rev Primern wurde die restliche DNA-Sequenz amplifiziert:

pET24 for: 5'- CGG GAT CCG AAT TCG AGC TCC GTC -3'

pET24 rev: 5'- ATG TAT ATC TCC TTC TTA AAG TTA AAC AAA ATT ATT TCT AGA G -3'

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese aufgereinigt ($59 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).

In-Fusion[®] Klonierung

Gereinigtes PCR-Produkt $\Delta 14SR$ mit zu dem Vektor homologen Bereichen und linearisierter Vektor pET24b wurden nach dem In-Fusion[®] Protokoll kloniert und ohne weitere Aufarbeitung für die Transformation kompetenter *E. coli* TG1-Zellen verwendet. (Kapitel 5.2.1).

Herstellung des Plasmids pET28b:: $\Delta 14SR$ _C-His₆

Gewinnung des $\Delta 14SR$ -Gens

Zur Amplifizierung des für $\Delta 14SR$ kodierenden Gens aus dem Insert „ $\Delta 14SR$ für In-Fusion in den pET24b-Vektor“ wurden entsprechend hybridisierende Primer hergestellt:

TV007 for: 5'- AGA AGG AGA TAT ACC ATG GCT TCT CGT GAG GCC TC -3'

TV008 rev: 5' - CGA ATC ATA CCG TAT GTC TAC CGG GAT CCG AAT TCG -3'

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese aufgereinigt ($46 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) und für In-Fusion[®] mit einem pET28b-Vektor verwendet.

Amplifizierung von pET28b-Vektor für In-Fusion[®] basierte Klonierung

Als Templat diente nativer pET28b-Vektor. Der Bereich zwischen dem Startcodon in der NcoI-Erkennungssequenz und BamHI-Schnittstelle (206–298 bp) soll dabei entfernt werden. Mit Hilfe von pET24 for und TV006a rev Primern wurde die restliche DNA-Sequenz amplifiziert:

pET24 for: 5' - CGG GAT CCG AAT TCG AGC TCC GTC -3'

TV006 rev: 5' - GGT ATA TCT CCT TCT TAA AGT TAA ACA AAA TTA TTT CTA GAG GGG AAT TGT TAT CC -3'

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese gereinigt ($54 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).

In-Fusion[®] Klonierung

Das gereinigte PCR-Produkt $\Delta 14SR$ mit zu dem Vektor homologen Bereichen und linearisierter Vektor pET28b wurden nach dem In-Fusion[®] Protokoll kloniert und ohne weitere Aufarbeitung für die Transformation kompetenter *E. coli* TG1-Zellen verwendet.

Herstellung des Plasmids pET28b:: $\Delta 14SRtr_C\text{-His}_6$

Gewinnung der gekürzten Version des $\Delta 14SR$ -Genes ($\Delta 14SRtr$)

Zur Amplifizierung des für $\Delta 14SRtr$ kodierenden Genes aus dem Fragment „ $\Delta 14SR$ für In-Fusion in pET28b-Vektor“ wurden entsprechend hybridisierende Primern hergestellt:

TV010 for: 5' - AGA AGG AGA TAT ACC ATG CAG GAG GCG GAG CTT C -3'

TV008 rev: 5' - CGA ATC ATA CCG TAT GTC TAC CGG GAT CCG AAT TCG -3'

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese aufgereinigt ($58 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).

Amplifizierung von pET28b-Vektor für In-Fusion[®] basierte Klonierung

Siehe vorheriger Abschnitt.

In-Fusion[®] Klonierung

Gereinigtes PCR-Fragment $\Delta 14SRtr$ mit zu dem Vektor homologen Bereichen und linearisierter Vektor pET28b wurden nach dem In-Fusion[®] Protokoll kloniert und ohne weitere Aufarbeitung für die Transformation kompetenter *E. coli* TG1-Zellen verwendet.

B. Für *Rh. capsulatus* B10S-T7

Herstellung des Plasmids pRhot-Hi2:: $\Delta 14SR_C$ -His₆

Gewinnung des $\Delta 14SR$ -Gens

Siehe Kapitel 5.2.2, Abschnitt A.

Für die Ligation wurden das PCR-Produkt $\Delta 14SR$ (ca. 2 μ g) und der linearisierte Vektor PRhoT-Hi2 (ca. 4.4 μ g) mit je 10 U Restriktionsenzymen NdeI und BamHI bei den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen verdaut mit anschließender Deaktivierung der Restriktionsenzyme bei 80 °C. Der Vektor wurde zusätzlich mit Antarctic Phosphatase nach Herstellerangaben dephosphoryliert.

Nach anschließender Reinigung mittels Gelelektrophorese wurden die isolierten DNA-Fragmente im Verhältnis Fragment/Vektor 1:5 durch T4-DNA-Ligase zum Plasmid pRhot-Hi2:: $\Delta 14SR_C$ -His₆ bei 4 °C über Nacht ligiert. Der erhaltene Ligationsansatz wurde für die Transformation kompetenter *E. coli* TG1-Zellen verwendet.

Herstellung des Plasmids pRhot-Hi2:: $\Delta 14SR_N$ -His₆

Die für $\Delta 14SR$ kodierende DNA-Sequenz wurde mit entsprechenden Primern in einer zweiten PCR-Reaktion für die In-Fusion[®] Klonierungsmethode modifiziert. Im ersten Schritt wurde das Startcodon *ATG* und die für den N-terminalen His₆-Tag kodierende Sequenz am 5'-Ende eingeführt. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

OS0010 for: 5' - ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT GCT TCT CGT GAG GCC -3'

OS0014 rev: 5' - GTA TGT CTA CGC GGA TTG AGA TCC GGC TGC T -3'

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und für weitere PCR-basierte Modifizierung nach In-Fusion[®] Überhängen direkt verwendet. Dazu wurden Primer mit 15 bp langen genspezifischen Anteilen und weiteren, dem Vektor pRhoT-Hi2 homologen 15 bp hergestellt:

OS0016 for: 5'- GGA GAT ATA CAT ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT -3'

OS0014 rev: 5'- GTA TGT CTA CGC GGA TTG AGA TCC GGC TGC T -3'

Amplifizierung von pRhoT-Hi2-Vektor für In-Fusion[®] basierte Klonierung

Als Templat diente nativer pRhoT-Hi2-Vektor. Der DNA-Abschnitt zwischen der NdeI-Schnittstelle und dem Stopcodon *TGA* wurde entfernt.

Primer:

OS0017 for: 5'- TGA GAT CCG GCT GCT AAC AAA G -3'

OS0015 rev: 5'- GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG -3'

In-Fusion[®] Klonierung

Das gereinigte PCR-Produkt $\Delta 14SR_N$ -His₆ mit zu dem Vektor homologen Bereichen und der linearisierte pRhoT-Hi2-Vektor wurden nach dem In-Fusion[®] Protokoll kloniert und ohne weitere Aufarbeitung für die Transformation kompetenter *E. coli* TG1-Zellen verwendet.

C. Für *S. cerevisiae*

Herstellung des Plasmids pESCHIS:: $\Delta 14SR_C$ -His₆

Nach Anforderungen der In-Fusion[®] Methode wurden Primer mit 18 bp langen genspezifischen Überhängen und weiteren, dem Vektor pESCHIS homologen 15 bp hergestellt. Dadurch wurde das $\Delta 14SR$ Gen so konzipiert, dass vor dem Startcodon am 5'-Ende ein 15 bp langer Überhang vorliegt, der dem Vektor pESCHIS vor *MCS* homolog ist. Analog wurde am 3'-Ende ein Polyhistidin(6x)-tag und ein 15 bp langer homologer Überhang per PCR eingeführt. Als Templat diente aus Ratten-cDNA (cDNA Rat Liver Lot# A905005 von der Fa. BIOCHAIN[®] INSTITUTE INC.) gewonnenes $\Delta 14SR$ -Gen.

Primer:

d14SR inf new for: 5'- GGA GAA AAA ACC CAT ATG GCT TCT CGT GAG GCC -3'

d14SR inf rev: 5'- GTA CCA AGC TTA CTC GTG GTG GTG GTG GTG -3'

Amplifizierung von pESCHIS-Vektor für In-Fusion[®] basierte Klonierung

Als Templat diente nativer pESCHIS-Vektor. Der Bereich zwischen dem GAL1-Promoter und dem Stopcodon wurde dabei entfernt werden. Mit Hilfe von pESCHIS inf for/rev Primer wurde die restliche Primer-Sequenz amplifiziert.

Primer:

pESCHIS inf for: 5'- GAG TAA GCT TGG TAC CGC GGC -3'

pESCHIS inf rev: 5'- ATG GGT TTT TTC TCC TTG ACG TTA AAG TAT -3'

In-Fusion[®] Klonierung

Gereinigtes PCR-Fragment *Δ14SR* mit zu dem Vektor homologen Überhängen und linearisierter Vektor pESCHIS wurden nach dem In-Fusion[®] Protokoll kloniert und ohne weitere Aufarbeitung für die Transformation kompetenter *E. coli* TG1-Zellen verwendet.

Herstellung des Plasmids pESCHIS::*Δ14SR*_N-His₆

Nach Anforderungen der In-Fusion[®] Methode wurden Primer mit 21 bp langen genspezifischen Überhängen und weiteren, dem Vektor pESCHIS homologen 15 bp hergestellt. Dadurch wurde das *Δ14SR*-Gen so konzipiert, dass vor dem Startcodon am 5'-Ende ein 15 bp langer Bereich vorliegt, der dem Vektor pESCHIS vor *MCS* homolog ist, gefolgt vom Start-Codon und His₆-tag. Diese DNA-Modifikation wurde durch zwei PCR-Ansätze eingeführt. Ähnlich wurde am 3'-Ende ein 15 bp langer homologer Bereich inklusive Stopcodon per PCR eingeführt. Als Templat diente pESCHIS::*Δ14SR*_C-His₆ Konstrukt.

Primer 1. PCR:

OS0010 for: 5'- ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT GCT TCT CGT GAG GCC -3'

OS0012 rev: 5'- GTA CCA AGC TTA CTC GTA GAC ATA CGG TAT GAT TCG -3'

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese gereinigt und für 2. PCR verwendet.

Primer 2. PCR:

OS0011 for: 5'- AAA ACC CCG GAT CCG ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT -3'

OS0012 rev: 5'- GTA CCA AGC TTA CTC GTA GAC ATA CGG TAT GAT TCG -3'

Amplifizierung von pESCHIS-Vektor für In-Fusion[®] basierte Klonierung

Als Templat diente nativer pESCHIS-Vektor. Der Bereich zwischen *Bam*HI-Schnittstelle und dem Stopcodon wurde dabei entfernt werden. Mit Hilfe von „pESCHIS inf for“ und „OS0013 vector rev“ Primer wurde die restliche DNA-Sequenz amplifiziert:

pESCHIS inf for: 5' - GAG TAA GCT TGG TAC CGC GGC -3'

OS0013 vector rev: 5' - CGG ATC CGG GGT TTT TTC TCC TTG -3'

InFusion[®] Klonierung

Gereinigtes PCR-Fragment *Δ14SR_N-His₆* mit zu dem Vektor homologen Bereichen und linearisierter Vektor pESCHIS wurden nach dem In-Fusion[®] Protokoll kloniert und ohne weitere Aufarbeitung für die Transformation kompetenter *E. coli* TG1-Zellen verwendet.

Herstellung des Plasmids pESCHIS::*ERG24_C-His₆*

Gewinnung des *ERG24*-Gens

Zur Amplifizierung von *ERG24*-Gen aus dem Plasmid YNL280C wurden entsprechend hybridisierende Primer hergestellt:

OS027 for: 5' - ATG GTA TCA GCT TTG AAT CCC AGA ACT ACA G -3'

OS028 rev: 5' - ATA AAC ATA TGG AAT GAT CTT GTA AGG AAC TTT TCT TTC G -3'

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und für die weitere PCR verwendet.

Amplifizierung von pESCHIS-Vektor für In-Fusion[®] basierte Klonierung

Als Templat diente nativer pESCHIS-Vektor. Der 42 bp lange Bereich in der *MCS* zwischen den Basenpaaren 2271 und 2312 inklusive FLAG-Tag wurde dabei entfernt werden. Die restliche DNA-Sequenz wurde per PCR amplifiziert und linearisiert:

OS020 inf for: 5' - TGA GCT CTT AAT TAA CAA TTC TTC GCC AGA GGT TTG GTC AAG -3'

OS021 inf rev: 5' - GGC CGC CCT TTA GTG AGG GTT GAA TTC GAA TTT TCA AAA ATT -3'

Einführung von homologen Bereichen, original Kozak-Sequenz und C-terminalem Polyhistidin(6x)-Tag

Nach Anforderungen des In-Fusion[®] Herstellers wurden Primer mit 15 bp langen genspezifischen (*ERG24*) Überhängen und weiteren, dem Vektor pESCHIS homologen 15 bp

hergestellt. Dadurch wird das *ERG24* Gen so konzipiert, dass vor dem Startcodon *ATG* am 5'-Ende die original Kozak Sequenz AAAAGG und ein 15 bp langer Bereich eingeführt wird, der dem Vektor pESCHIS in der *MCS* nach dem GAL10-Promoter homolog ist. Ähnlich wurde am 3'-Ende ein Polyhistidin(6x)-tag, das Stopcodon TGA und ein 15 bp langer dem Vektor pESCHIS homologer Bereich per PCR eingeführt. Als Templat diente das *ERG24*-Gen. Entsprechende Primer wurden verwendet:

OS029 for: 5'- CAC TAA AGG GCG GCC AAA AGG ATG GTA TCA GCT T -3'

OS030 rev: 5'- TTA ATT AAG AGC TCA ATG ATG GTG ATG ATG ATG ATA AAC ATA TGG AAT GAT C -3'

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und für In-Fusion[®] Klonierung in pESCHIS Vektor unter GAL10-Promoter Kontrolle verwendet.

InFusion[®] Klonierung

Gereinigtes PCR-Fragment *ERG24_C-His₆* mit zu dem Vektor homologen Überhängen und linearisierter Vektor pESCHIS wurden nach dem In-Fusion[®] Protokoll kloniert und ohne weitere Aufarbeitung für die Transformation kompetenter *E. coli* TG1-Zellen verwendet.

Herstellung des Plasmids pESCHIS::*PPR_C-His₆*

Das synthetische Insert *PPR_C-His₆* wurde direkt für die Klonierung verwendet (Kapitel 5.2.1).

Amplifizierung von pESCHIS-Vektor für In-Fusion[®] basierte Klonierung

Siehe Herstellung des Plasmids pESCHIS::*ERG24_C-His₆*, Amplifizierung vom Vektor.

In-Fusion[®] Klonierung

Das synthetisch erhaltene *PPR_C-His₆*-Gen mit zu dem Vektor homologen Überhängen und linearisierter Vektor pESCHIS wurden nach dem In-Fusion[®] Protokoll kloniert und ohne weitere Aufarbeitung für die Transformation kompetenter *E. coli* TG1-Zellen verwendet.

Herstellung des Plasmids pESCHIS::PPR_C-His₁₀_FLAG

Nach Anforderungen der In-Fusion[®] Methode wurden Primer mit genspezifischen Überhängen und weiteren, dem Vektor pESCHIS homologen 15 bp hergestellt. Dadurch wurde das neue PPR-Gen so konzipiert, dass vor dem Startcodon am 5'-Ende eine neue AAAAA Kozak-Sequenz (im Primer kursiv markiert) und ein 15 bp langer dem Vektor pESCHIS in MCS homologer Überhang (im Primer unterstrichen) vorliegt. Ähnlich wurde am 3'-Ende eine für Dekahistidin (His₁₀) kodierende Sequenz inklusive der dem Vektor pESCHIS 15 bp langer homologer Überhang im Bereich der für FLAG-Tag kodierenden Sequenz per PCR in 2 Schritten eingeführt. Als Templat diente das synthetische PPR-Gen.

Primer 1. PCR:

OS0031 for: 5' - *GA AAA TTC GAA TTC GAA AAA* ATG GCT GGT TGG GCT GGT GC -3'

OS0032-1 rev: 5' - CGA ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG TCT TCT AGA GG -3'

Primer 2. PCR:

OS0031 for: 5' - *GA AAA TTC GAA TTC GAA AAA* ATG GCT GGT TGG GCT GGT GC -3'

OS0032-2 rev: 5' - CTT GTA ATC CAT CGA ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG TCT T -3'

Amplifizierung von pESCHIS-Vektor für In-Fusion[®] basierte Klonierung

Als Templat diente nativer pESCHIS-Vektor. Der 29 bp lange DNA-Abschnitt in der MCS zwischen den Basenpaaren 2304 und 2332 wurde dabei entfernt werden. Mit Hilfe von OS034 for und OS033 rev Primern wurde die restliche DNA-Sequenz amplifiziert.

Primer:

OS034 for: 5' - TCG ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG ATC TG -3'

OS033 rev: 5' - CGA ATT CGA ATT TTC AAA AAT TCT TAC TTT TTT TTT GGA TGG ACG -3'

In-Fusion[®] Klonierung

Gereinigtes PCR-Fragment mit zu dem Vektor homologen Überhang und linearisierter Vektor pESCHIS wurden nach dem In-Fusion[®] Protokoll kloniert und ohne weitere Aufarbeitung für die Transformation kompetenter *E. coli* TG1-Zellen verwendet.

5.3 Biochemische Arbeiten und Methoden

Allgemeine Anmerkungen

Alle Arbeiten mit Ausnahme der Expressionsversuche in *Rhodobacter capsulatus* wurden am Institut für Pharmazeutische Wissenschaft am Lehrstuhl für Medizinische und Pharmazeutische Chemie (Arbeitskreis Prof. Dr. Michael Müller) an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt. Die Expressionsversuche in *Rhodobacter capsulatus* wurden durch Herr Armagan Özgür (Arbeitskreis Dr. Thomas Drepper) am Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

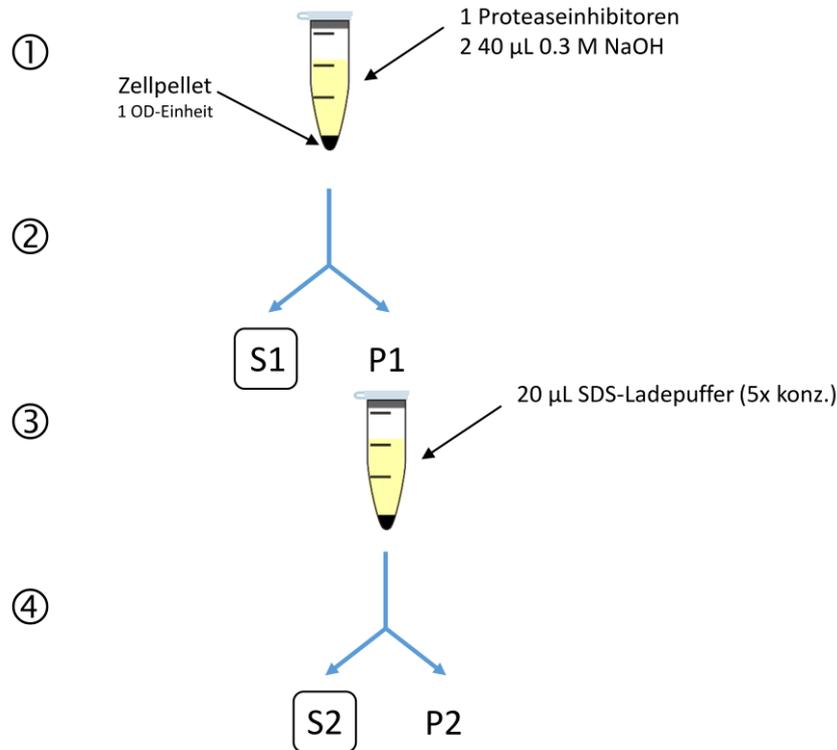
5.3.1 Allgemeine Methoden

Steriles Arbeiten

Bei der Verwendung von *E. coli* und *S. cerevisiae* Stämmen wurde unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 „Herasafe KS“ der Fa. THERMO FISCHER SCIENTIFIC INC. (Waltham, MA, USA) gearbeitet. Alle Medien, Behältnisse und Gegenstände wurden vor der Benutzung bzw. biologisch kontaminiertes Material vor der Entsorgung nach einem entsprechenden Protokoll (121 °C, 15 min, 2.1 bar) im „Systec V-95“ Autoklav der Fa. SYSTEC GMBH (Linden, Deutschland) autoklaviert.

Modifizierter Zellaufschluss nach Kushnirov^[109]

Das Zellpellet einer OD-Einheit aus einer *S. cerevisiae* Kultur wurde in 40 µL H₂O_{bidest.} suspendiert und mit Proteaseinhibitoren Benzamidin, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A, PMSF (jeweils 100x konz. Stocklösungen, siehe Kapitel 5.1.1) und 40 µL 0.3 M NaOH für 5 min bei RT inkubiert. Durch die darauffolgende Zentrifugation bei 16000×g, 5 min, 4 °C wurden die löslichen Zellbestandteile im Überstand S1 (engl. Supernatant 1) von den Zelltrümmern mit Membranen und nicht löslichen Proteinen im Pellet P1 abgetrennt. Die S1 Fraktion wurde dekantiert und das P1 Pellet in 20 µL SDS-Ladepuffer (5x konz.) resuspendiert und für 3 min bei 99 °C im Thermomixer der Fa. EPPENDORF (Hamburg, Deutschland) inkubiert. Durch die erneute Zentrifugation bei 16000×g, 5 min, 4 °C wurden alle aus der Zellmembran gelösten Proteine im Überstand S2 gesammelt. Die Fraktionen S1 und S2 wurden sofort der SDS-PAGE-Analytik unterzogen (pro eine OD-Einheit wurden ca. 2 µL auf ein Midi-Gel aufgetragen). Diese Methode wurde auch für *E. coli* Zellen verwendet (Schema 2).



Schema 2: Qualitative Zellaufschlussmethode nach Kushnirov.^[109] Pro OD-Einheit erfolgt: ① Inkubation der Zellen in 0.3 mM NaOH für 5 min bei RT; ② Zentrifugation des Rohlysates bei 16000×g, 5 min, 4 °C; ③ Überstand S1 wird dekantiert, Pellet P2 wird in reduzierenden SDS-Ladepuffer (5x konz.) für 3 min bei 99 °C erhitzt; ④ Zentrifugation bei 16000×g, 5 min, 4 °C; ⑤ Die Überstände S1 und S2 werden sofort auf das SDS-PAGE-Gel geladen.

Proteinreinigung

Für die Reinigung der Fusionsproteine mit einem Polyhistidin-Tag wurde eine Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) nach Porath *et al.* verwendet.^[108] Die IMAC-Methode basiert auf einer Chelat-Komplex-Bildung des Polyhistidin-Tags eines Fusionsproteins mit an der Nitrioloessigsäure-Matrix immobilisierten zweiwertigen Ni²⁺-Ionen (Ni-NTA) (Abbildung 96).

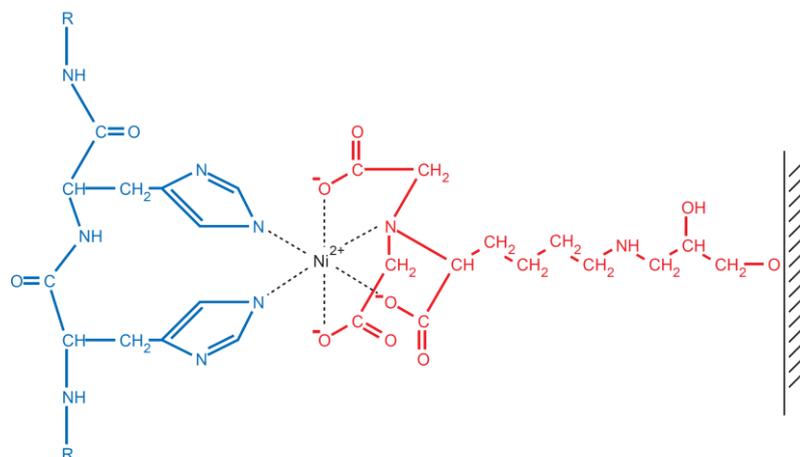


Abbildung 96: Bindung eines Polyhistidin-Tags an die Ni-NTA-Matrix.^[136]

20 mL „PolyPrep Chromatographiesäulen“ der Fa. BIO-RAD (Hercules, CA, USA) wurden im semipräparativen Maßstab verwendet. Als Säulenmaterial dienten 2–3 mL einer Ni-NTA-Agarosematrix (Ni-NTA Superflow) der Fa. QIAGEN (Hilden, Deutschland). Die Lagerung der Säulen erfolgte unter 20%ger EtOH-Lösung bei 4 °C.

Proteinreinigung unter nativen Bedingungen

Eine Ni-NTA-Säule wurde vor Gebrauch mit 40 mL Waschpuffer mit der niedrigsten Imidazol Konzentration equilibriert. Die proteinhaltige Lösung wurde auf die Säule gegeben, vorsichtig 3–4 Mal invertiert und für mindestens eine Stunde bei 4 °C langsam rotierend (70–100 rpm) inkubiert. Der Durchlauf wurde anschließend abgetrennt. Die Elution der unspezifisch gebundenen Proteine erfolgte durch die entsprechenden Waschpuffer (2–6 Säulenvolumina) mit niedrigen Imidazol-Konzentrationen (10–50 mM). Die Elution der gewünschten Fusionsproteine wurde durch Verdrängung mit hohen Imidazol-Konzentrationen (Elutionspuffer mit 200–300 mM Imidazol, 1–2 Säulenvolumina) erreicht (Kapitel 5.1.3, Abschnitt C). Die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden in 2 mL Fraktionen aufgefangen. Die Elutionskontrolle erfolgte mittels Bradford-Reagenz der Fa. ROTH (mit H₂O_{bidest.} 1:5 verdünnt) auf 96-Well-Platten anhand der spezifischen Farbänderung. Dafür wurden 5 µL einer proteinhaltigen Fraktion mit 100 µL Bradford-Reagenz gemischt. Die gereinigten Proteine wurden mit „Vivaspin“ Proteinkonzentratoren der Fa. GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES mit entsprechender Trenngrenze (Angaben in kDa) nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert. Durch das wiederholte Wiederaufnehmen in frischem Puffer und Aufkonzentrieren wurde das störende Imidazol entfernt (Entsalzung).

Reinigung von HLADH-Isoenzymen

Die Reinigung erfolgte unter nativen Bedingungen. Dafür wurden 200 mg des jeweiligen Lyophilisats in je 10 mL Ni-NTA Probenpuffer (KP_i-Puffer 50 mM, 10 mM Imidazol, 10 mM PMSF, pH 7.3) gelöst, auf eine Ni-NTA-Säule gegeben und eine Stunde bei 4 °C leicht rotierend inkubiert. Für die Elution der unspezifisch gebundenen Proteine wurden Waschpuffer 1 und 2 (10 mM bzw. 50 mM Imidazol) verwendet. HLADH wurde mit 2-fachem Säulenvolumen an Elutionspuffer 1 (300 mM Imidazol) eluiert. Das störende Imidazol wurde durch die dreimalige Zentrifugation am „Vivaspin“ Proteinkonzentrator mit 30 kDa Trenngrenze entfernt. Das fehlende Volumen wurde jeweils mit frischem KP_i-Puffer (50 mM, pH 7.3) aufgefüllt. Gleichzeitig wurde die Proteinlösung auf 1.2 mL konzentriert (die Proteinkonzentration wurde nicht bestimmt, nur die Aktivität). Die Proteinreinigung wurde per SDS-PAGE kontrolliert.

Reinigung unter denaturierenden Bedingungen

Die Ni-NTA-Säulen wurden vor Gebrauch mit 40 mL EB1-Puffer (der harnstoffhaltige (6 M) Extraktionspuffer 1, engl. für extraction buffer 1) equilibriert. Die proteinhaltige Lösung in EB1-Puffer wurde auf die Säule gegeben, vorsichtig 3–4 Mal invertiert und für mindestens eine Stunde bei 4 °C langsam rotierend inkubiert. Der Durchlauf wurde anschließend abgetrennt. Die Elution der unspezifisch gebundenen Proteine erfolgte durch die Waschpuffer 1, 2, 3 und 4 (jeweils zwei Säulenvolumina). Die Elution der gewünschten Fusionsproteine wurde durch Verdrängung mit hohen Imidazol-Konzentrationen (Elutionspuffer 1, 2 und 3 mit 50 mM, 200 mM bzw. 250 mM Imidazol, jeweils 1 bis 2 Säulenvolumina) erreicht (Kapitel 5.1.3, Abschnitt C).

Reinigung der solubilisierten Proteine

Für die Reinigung der solubilisierten Proteine wurden detergenzhaltige Ni-NTA-Puffer verwendet (Kapitel 5.1.3, Abschnitt C).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Trennung von Proteinen nach ihrer molaren Masse erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli,^[138] bestehend aus einem 4%igen Sammelgel und einem 12%igen Trenngel. Es wurde die „Mini Protean[®] Tetra Cell“ Gelapparatur der Fa. BIO-RAD LABORATORIES GMBH (München, Deutschland) verwendet. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet und erstarren lassen. Nachdem das überschüssige Ethanol dekantiert wurde, erfolgte das Gießen des Sammelgels. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V mit einer Stromstärke von max. 60 mA. Bei zwei parallel laufenden Gelen wurde die maximale Stromstärke verdoppelt. Die Trennungsdauer richtete sich vor allem nach gewünschtem Trennungsgrad und betrug ca. 45–60 min. Vor der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteinproben mit einem SDS-Ladepuffer (5x konz., reduzierend, 2% (v/v) SDS) versetzt und 5–10 min bei 95 °C und 1200 rpm denaturiert. Um eine Aggregation der membranintegrierten Proteine zu vermeiden, wurden die Proben zum Teil für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Disulfidbrücken wurden mit Hilfe von β -Mercaptoethanol gespalten. Die Gelkalibrierung erfolgte mittels eines Größenstandards „Precision Plus Protein Dual Color Standards“ der Fa. BIO-RAD LABORATORIES GMBH (München, Deutschland) oder „Proteinmarker VI (10–245), prestained A8889“ von der Fa. APPLICHEM (Darmstadt, Deutschland). Zur Visualisierung von aufgetrennten Proteinen wurde das Gel für zwei Stunden

bei 75 rpm in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das gefärbte Gel über Nacht in Entfärbelösung gewaschen, wobei überflüssiger, nicht gebundener Farbstoff entfernt und die Proteinbanden sichtbar wurden.

Western Blot

Die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran nach dem „Nass“-Prinzip transferiert und mit den gegen die Epitope His- und FLAGTM (DYKDDDDK)-Tag gerichteten Antikörpern detektiert. Für das Blotten wurde „Protran BA83 Nitrocellulose (NC) Blotting Membrane“ (0.2 µm, 82 mm) der Fa. GE HEALTHCARE GMBH (Solingen, Deutschland) in einer „Mini Trans-Blot[®]“ Zelle der Fa. BIO-RAD LABORATORIES GMBH (München, Deutschland) verwendet. Folgende Transfer-Parameter wurden benutzt: konstante Spannung 150 V, Stromstärke max. 400 mA, 150 W für zwei Stunden. Die Gele wurden für 15–30 min und die NC Membrane für 1–2 min im Western Blot Transfer Puffer equilibriert. Nach dem Assemblieren von Blotting-Sandwiches wurde die Mini Trans-Blot[®] Zelle mit einem Kühlelement bestückt und zur besseren Kühlung im Eisbad betrieben. Die NC Membrane wurde in ca. 50 mL Blockpuffer (PBST-Puffer mit 5% Milchpulver und 1% BSA oder nur 5% BSA³) bei leichtem Schütteln und RT für ca. 1–2 Stunden geblockt. Darauf folgend erfolgte der 1. Waschvorgang mit 4-fachem Wechsel des Waschpuffers (PBST-Puffer) für insgesamt 60 min bei Raumtemperatur. Für die Detektion der getagten Proteine wurden die mit Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP) konjugierten HisProbeTM-HRP- und FLAGTM Epitope Tag (DYKDDDDK) HRP-Antikörper der Fa. THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) benutzt. Dafür wurden die Antikörper in 5 mL PBST mit 2.5% BSA 1:6000 (HisProbeTM-HRP) und 1:2500 (FLAGTM-HRP) verdünnt. Anschließend wurden die NC Membrane in 50 mL Falcontube mit der proteinhaltigen Seite nach innen platziert und mit der entsprechenden Antikörper-Lösung bei leichtem Rotieren und 4 °C für eine Stunde inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden im 2. Waschvorgang mit 4-fachem Waschpufferwechsel bei Raumtemperatur für insgesamt 60 min entfernt. Die Detektion erfolgte nach Herstellerangaben mit „ImmunoCruzTM sc-2048“ Western Blot Luminol Reagenz der Fa. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. (Heidelberg, Deutschland) am „Luminescent Image Analyzer LAS-3000“ der Fa. FUJI (Tokyo, Japan). Für die Bildanalyse wurde „Fujifilm MultiGauge“ 3.0 Software verwendet.

³ Milchpulver kann manche Proteine von der Membran lösen; in späteren Versuchen wurde darauf verzichtet.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem „NanoDrop 2000“ der Fa. THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) bei 280 nm nach Herstellerangaben bestimmt.

5.3.2 Kultivierung der *E. coli* Kulturen

***E. coli* Zellanzucht**

Sofern nicht anders angegeben wurde die aerobe Anzucht der *E. coli* Stämme bei 37 °C auf LB-Agarplatten und anschließend in LB-Flüssigkulturen (5–10 mL) unter ständigem Schütteln bei 140–180 rpm in dem „Multitron“ Inkubationsschüttler der Fa. INFORS (Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Der Selektionsdruck wurde durch Zugabe von entsprechenden Antibiotika (Ampicillin 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Kanamycin 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ oder Chloramphenicol 34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) erreicht.

Herstellung der kompetenten *E. coli* TG1-Zellen

Die Vorkultur von *E. coli* TG1-Stamm wurde in 5 mL LB-Medium über Nacht bei Standardbedingungen angezogen. 500 mL LB-Medium in 2 L Schikanekolben wurden mit der Vorkultur angeimpft und bis zum Erreichen der optischen Dichte OD_{600} (bei $\lambda = 600$ nm) von ca. 0.4 bei Standardbedingungen inkubiert. Die Hauptkultur wurde in einen Zentrifugationsbecher überführt und 20 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation ($9000\times g$, 30 min, 4 °C) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 50 mL TSS-Puffer resuspendiert und zu je 200 μL fraktioniert. Die Fraktionen wurden sofort in flüssigem N_2 schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

***E. coli* Stammhaltung**

Die mit einzelnen Kolonien bewachsenen LB-Agarplatten wurden bis zu ca. 4 Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Für die dauerhafte Aufbewahrung wurden Kryokulturen angefertigt. Dafür wurden 600 μL aus einer über Nacht angezogenen Flüssigkultur abgenommen und mit 400 μL sterilem Glycerin in einem Simport CRYOVIAL[®] gründlich vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C bzw. -80 °C.

5.3.3 Expression in *E. coli* Stämmen

Testexpression in E. coli_Lemo21

Die Standardtestreihe besteht aus zehn 10 mL Kulturen mit L-Rhamnose 0 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM , 750 μM , 1000 μM und 2000 μM . Die Inkubation der 10 mL Zellkulturen wurde unter Standardbedingungen (37 °C, 140 rpm) durchgeführt. Der Selektionsdruck wurde durch Zusatz von Kanamycin (30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Endkonzentration) und Chloramphenicol (34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Endkonzentration) erreicht (Kapitel 5.3.2). Nach dem Erreichen einer OD_{600} von ca. 0.4 wurde die Induktion der Expression mit Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, 0.4 mM Endkonzentration) gestartet. Anschließend erfolgte eine fünfstündige Inkubation bei 37 °C und 140 rpm. Eine zusätzliche Zellkultur ohne L-Rhamnose wurde bei sonst gleichen Bedingungen für insgesamt 24 Stunden induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10000 \times g, 10 min, 4 °C) geerntet, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen und mittels Ultraschall aufgeschlossen (siehe Seite 129).

Standardexpression in E. coli_Lemo21

Zwei sterile 2 L Schikanekolben wurden mit je 800 mL LB- oder TB-Medium gefüllt und mit je 5 mL einer *E. coli_Lemo21* Standardvorkultur angeimpft (Kapitel 5.3.2). Der Selektionsdruck wurde durch Zugabe von Kanamycin und Chloramphenicol (30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bzw. 34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Endkonzentration) erreicht. Die Konzentration von L-Rhamnose variierte im Bereich von 0 μM bis 1000 μM und wurde bei entsprechenden Versuchen angegeben. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte bei Standardbedingungen. Das Zellwachstum wurde in regelmäßigen Abständen durch die Messung der optischen Dichte der Flüssigkulturen (OD_{600}) kontrolliert. Hierzu wurde 1 mL der Hauptkultur entnommen und mit dem Spektrophotometer „UVmini-1240“ der Fa. SHIMADZU (Duisburg, Deutschland) vermessen. Beim Erreichen einer OD_{600} von 0.2–0.6 wurde mit der Zugabe von 320 μL der 1 M IPTG-Stocklösung (0.4 mM Endkonzentration) die Expression des heterologen Gens induziert. Nach mindestens 18 Stunden Inkubation bei 24–28 °C und 140 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation (10000 \times g, 10 min, 4 °C) pelletiert und per Ultraschall oder mittels eines Hochdruckhomogenisators aufgeschlossen. Die abweichenden Parameter wurden bei entsprechenden Versuchen angegeben.

Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die frisch geernteten oder aufgetauten Zellen wurden in 2- bis 3-facher Menge an KPi-Puffer (50 mM, pH 7.3) durch vortexen resuspendiert. Der Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde standardmäßig mit einer enzymatischen Lyse mit Lysozym (1 mg·mL⁻¹, aus Hühnereiweiß 96381 U·mL⁻¹) und unter Zusatz von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 10 mM Endkonzentration) als Proteaseinhibitor kombiniert. Dafür wurde die Zellsuspension eine Stunde rotierend bei ca. 100 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall (Desintegrator „Sonifier W-250“ der Fa. BRANSON ULTRASONICS CORP., Danbury, CT, Großbritannien) mit folgenden Parametern aufgeschlossen: Duty Cycle 50%, Output Control: 6, 10 x 10 Impulse auf Eis, mit jeweils 30 Sekunden Pause dazwischen. Das entstandene Rohlysat wurde bei 100 rpm für weitere 30 min inkubiert. Im Anschluss daran wurden die unlöslichen Komponenten durch Zentrifugation (15000×g, 30 min) abgetrennt. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator

Ca. 10 g Zellen wurden mit kaltem KPi-Puffer (50 mM, pH 7.3) unter Zusatz von PMSF (1 mM Endkonzentration) und β-Mercaptoethanol bzw. DTT (jeweils 1 mM Endkonzentration) auf 15–20 mL aufgefüllt und durch vortexen resuspendiert. Im Fall der Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen wurde ca. die dreifache Menge (bezogen auf Zellvolumen) an EB1-Puffer verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit einem Hochdruckhomogenisator „EmulsiFlex-B30“ der Fa. AVESTIN (Ottawa, Canada) bei maximalem Druck von 43000 psi, 1 Durchgang aufgeschlossen. Das dadurch erhaltene Rohlysat wurde sofort der Zentrifugation (10000×g, 15 min, 4 °C) unterzogen. Der erhaltene zellfreie Proteinrohextrakt S1 wurde entweder für weitere Fraktionierungen verwendet oder bei -20 °C kurzfristig bzw. bei -80 °C dauerhaft gelagert.

Solubilisierung der Membranproteine aus *E. coli* nach Paik et al.^[86]

Zur Membransuspension wurden tropfenweise n-Octyl-β-D-glucopyranosid (nOG) und Natriumtaurodeoxycholat (STDC) als 20% (m/v) Stocklösung im KPi-Puffer (50 mM, pH 7.3) so zugegeben, dass das Detergenz/Protein Verhältnis für nOG 1.5:1 und für STDC 0.5:1 betrug. Bei Bedarf wurde die entstandene Lösung mit Detergenzien bzw. Puffer auf die Endkonzentration ca. 1% nOG angepasst. Nach einer Inkubation für eine Stunde auf Eis bei leichtem Rühren erfolgte ein Ultrazentrifugationsschritt (164000×g, 60 min, 4 °C) zur

Abtrennung der nicht gelösten Anteile. Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C.

5.3.4 Kultivierung von *S. cerevisiae*

***S. cerevisiae* Zellanzucht**

Sofern nicht anders angegeben wurde die aerobe Anzucht der *S. cerevisiae* Stämme bei 30 °C auf YPD-Agarplatten und anschließend in YPD-Flüssigkulturen bei 30 °C und 200 rpm in dem „Multitron“ Inkubationsschüttler der Fa. INFORS (Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Der Selektionsdruck wurde durch den Einsatz des selektiven glucose- oder raffinosehaltigen Komplettmediums ohne L-Histidin (SD/ØHis bzw. SR/ØHis) erreicht.

***S. cerevisiae* Vorkulturen**

In einem 50 ml Falcontube wurden 10 mL SD/ØHis-Medium mit einer frischen (3-5 Tagen nach der Transformation, aus einer SD/ØHis-Agarplatte) Zellkolonie oder mit 10 µL einer Kryokultur inokuliert und bei 30 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Ältere Zellkolonien benötigten in der Regel längere Wachstumsperioden und wurden dementsprechend bis zu 48 Stunden bei sonst gleichen Bedingungen inkubiert.

***S. cerevisiae* Stammhaltung**

Die mit einzelnen Kolonien bewachsenen YPD-Agarplatten oder SD/ØHis-Agarplatten wurden bis zu ca. 8 Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Für die dauerhafte Aufbewahrung wurden Kryokulturen angefertigt. Dafür wurden 850 µL aus einer über Nacht angezogenen Flüssigkultur abgenommen und mit 150 µL sterilem Glycerin in einem Simport CRYOVIAL® gründlich vermischt. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C bzw. –80 °C.

5.3.5 Proteinexpression in *S. cerevisiae*

Als Vorkultur dienten 10 mL einer Flüssigkultur mit entsprechendem Expressionsplasmid, hergestellt nach dem Standardverfahren im selektiven Komplettmedium ohne L-Histidin SD/ØHis (Kapitel 5.3.4 und Kapitel 5.1.2, Abschnitt B).

Die Hauptkulturen wurden durch die Inokulation von 100 bis 500 mL eines selektiven Komplett oder Vollmediums auf eine OD₆₀₀ von ca. 0.05–0.1 hergestellt. Je nach gewählter Expressionsmethode diente Glucose, Raffinose oder Galactose als Kohlenstoffquelle (jeweils 2% Endkonzentration). Weitere Inkubation erfolgte bei 30 °C und 200 rpm bis eine OD₆₀₀ > 1.5 erreicht wurde. Die Induktion erfolgte durch die Supplementierung mit galactosehaltigen Medien (2% Endkonzentration) für 18–72 Stunden bei 21–30 °C.

Nach der Induktion wurden die Zellen durch die Zentrifugation (10000×g, 15 min, 4 °C) pelletiert (Kapitel 5.1.1), mit H₂O_{bidest.} oder entsprechendem Lysepuffer gewaschen, bei –20 °C kurzfristig oder nach dem Schockgefrieren in flüssigem N₂ bei –80 °C gelagert.

Der Zellaufschluss erfolgte mittels Glas-Beads oder des Hochdruckhomogenisators „EmulsiFlex-B30“ mit oder ohne Zusatz von Glucanex[®] der Fa. SIGMA-ALDRICH. Das erhaltene Rohlysat wurde einer Fraktionierung einschließlich Ultrazentrifugation zwecks Membranisolierung unterzogen. Die erhaltenen Fraktionen wurden mit per SDS-PAGE oder Western Blot analysiert (Kapitel 5.3.1).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente variieren z.T. stark in ihrem Expressionsdesign und die abweichenden Parameter wurden jeweils für das entsprechende Expressionsplasmid angegeben.

Methode I

Diese Methode basiert auf einer 100 bzw. 400 mL Hauptkultur bestehend aus dem selektiven Komplettmedium SD/ØHis innokuliert mit einer Vorkultur im Verhältnis 1:5. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 200–240 rpm in einem mit Alufolie verschlossenen 500 bzw. 2000 mL Schikanekolben (Volumenverhältnis Kultur / Kolben 1:5). Die im Medium enthaltene Glucose stellt einen starken Suppressor des GAL-Promoters dar und soll vor der Induktion komplett entfernt werden. Nach dem Erreichen der späteren Log-Phase (entspricht einer OD₆₀₀ > 1.0–1.5) wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000×g, 10 min, RT) in Falcontubes (50 mL) pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 mL galactosehaltiges Vollmedium YPG resuspendiert und erneut pelletiert (6000×g, 10 min, RT). Das erhaltene

Zellpellet wurde in 10 mL YPG resuspendiert und in einem neuen 500 bzw. 2000 mL Schikanekolben auf 100 bzw. 400 mL mit YPG aufgefüllt. Die Proteinproduktion erfolgte bei 24–30 °C und bis zu 48 Stunden. Anschließend wurden die Zellen in zwei Falcontubes mit je 50 mL überführt und durch Zentrifugation (10000×g, 10–15 min, 4 °C) pelletiert oder nach entsprechend angegebenen OD-Einheiten getrennt und weiter verarbeitet bzw. bei –20 °C gelagert.

Methode Ia

Für die Induktion wurde das galactosehaltige selektive Komplettmedium SG/ØHis verwendet. Alle anderen Parameter der Methode I wurden beibehalten.

Expression von *S. cerevisiae*::pESCHIS::PPR_C-His₆

Die benötigte Vorkultur wurde nach einem Standardverfahren vorbereitet (Kapitel 5.3.4). Für die Hauptkultur wurden 40 mL des selektiven Komplettmediums SD/ØHis mit 10 mL Vorkultur inokuliert und bei Standardbedingungen inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ > 1.5 erfolgte die Induktion der Genexpression mit dem galactosehaltigen Vollmedium YPG. Dafür wurden die Zellen aus der Hauptkultur bei 6000×g, RT für 10 min abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 10 mL YPG resuspendiert und ein zweites mal der Zentrifugation bei gleichen Bedingungen unterzogen. Das erneut erhaltene Zellpellet wurde in insgesamt 100 mL YPG resuspendiert und in einen 500 mL Schikanekolben überführt. Die Induktion erfolgte bei 24 °C für 18 Stunden.

Expression von *S. cerevisiae*::pESCHIS::PPR_N-His₆

Die Expression erfolgte im 400 mL Maßstab. Die Hauptkultur aus 400 mL SD/ØHis wurde mit der Standardvorkultur angeimpft und über Nacht inkubiert. Bei den OD₆₀₀-Werten von über 1.5 die Zellen wurden abzentrifugiert. Die Induktion erfolgte mit 400 mL SG/ØHis mit anschließender Inkubation bei 30 °C für 22 Stunden.

Methode II

Bei dieser Methode betrug das Gesamtvolumen 2 x 0.5 L. Für die Hauptkultur wurden zwei 2 L Schikanekolben mit je 280 mL H₂O_{dem.} autoklaviert und mit je 95 mL SD/ØHis (4x konz., entspricht 2% Glucose Endkonzentration) versetzt. Für die Inokulation wurden je 5 mL Standardvorkultur verwendet. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte bei 30 °C für mindestens 24 Stunden. Das größere Volumen der Hauptkultur lässt keine effektive mechanische

Abtrennung des glucosehaltigen Mediums zu (keimfreie Handhabung der benötigten Geräte und Gefäße in diesen Größen kann nicht mehr optimal gewährleistet werden). Deswegen wurde der Glucoseverbrauch durch Konzentrationsmessung mit einem handelsüblichen Glucosemessgerät „Accu Chek Aviva Nano“ Glucosemessgerät der Fa. ROCHE DIAGNOSTICS DEUTSCHLAND GMBH (Mannheim, Deutschland) bestimmt. Bei Werten unter $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Display-Angabe „low“) wurde die Hauptkultur mit je 125 mL YPG (4x konz., entspricht 2% Galactose Endkonzentration) induziert und für 18–48 Stunden bei 24–30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch die Zentrifugation ($10000\times g$, 15 min, 4 °C) pelletiert und bei -20 °C gelagert.

Expression von *S. cerevisiae*::pESCHIS::PPR_C-His₁₀_FLAG unter Glucose

Zwei mit je 280 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$ autoklavierte 2 L Schikanekolben wurden mit je 95 mL SD/ØHis (4x konz.) versetzt und mit je 5 mL Standardvorkultur inokuliert. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte bei Standardbedingungen für mindestens 24 Stunden. Bei den Werten unter $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Display-Angabe „low“) wurde die Hauptkultur mit 125 mL YPG (4x konz.) induziert und 18 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die geernteten, zweimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschenen Zellen wurden bei -20 °C gelagert.

Expression von *S. cerevisiae*::pESCHIS::ERG24_C-His₆

Dafür wurden zwei 2 L Schikanekolben mit je 280 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$ autoklaviert. Nach der Zugabe von 95 mL des selektiven Nährmediums SD/ØHis (4x konz.) wurden die Hauptkulturen mit je 5 mL der Vorkultur angeimpft und mind. 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von je 125 mL YPG (4x konz.) auf insgesamt 2 x 500 mL Endvolumen (2% Galactose Endkonzentration). Außerdem wurden je 12.5 mL DMSO (2.5% v/v Endkonzentration) als zusätzlicher chemischer Induktionsfaktor zugegeben und 18 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die so erhaltenen Zellen wurden bei $10000\times g$, 4 °C für 15 min abzentrifugiert, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen und erneut pelletiert. Die Expression ergab 13.2 g Zellen.

Methode III

Expression erfolgte in 2 x 0.5 L Maßstab. Für die Hauptkultur wurden zwei 2 L Schikanekolben mit je 280 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$ autoklaviert und mit je 95 mL SR/ØHis (4x konz.) versetzt. Für die Inokulation wurden je 5 mL Standardvorkultur verwendet. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte für 24 Stunden. Die Hauptkultur wurde mit 125 mL YPG (4x konz., entspricht Galactose 2% Endkonzentration), L-Histidin (0.04% (m/v) Endkonzentration) und DMSO

(2.5% (v/v) Endkonzentration) induziert und für 18–48 Stunden bei 24–30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch die Zentrifugation (10000×g, 15 min, 4 °C) pelletiert und bei –20 °C gelagert.

Expression von *S. cerevisiae*::pESCHIS::2xΔ14SR_C-His₆

Die glucosehaltigen Kulturen I, III und IV wurden bei 30 °C und die galactosehaltigen II und IV bei 24 °C jeweils über Nacht angezogen. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ > 1.5 (die Kultur im selektiven galactosehaltigen Komplettmedium stellte mit der OD₆₀₀ von 0.97 die einzige Ausnahme dar) wurden die Zellen aus den glucosehaltigen Medien I und III bei 6000×g, RT für 10 min abzentrifugiert und für die Induktion der Proteinexpression in dem galactosehaltigen Vollmedium YPG bzw. selektiven Komplettmedium SG/ØHis resuspendiert. Die galactosehaltigen Kulturen II und IV sowie die Negativkontrolle V wurden weiter ohne Mediumsaustausch zusammen mit den anderen Expressionskulturen bei 26 °C für 23 Stunden inkubiert.

Zellaufschluss mit Glas-Beads

Pro 100 OD-Einheiten wurden insgesamt 1.33 mL Lysepuffer I (50 mM Tris/HCl, 250 mM NaCl, 1 mM DDT, 1 mM PMSF) in einem entsprechenden Gefäß für den Zellaufschluss verwendet. Dafür wurden die pelletierten Zellen erst in ca. 1.2 mL Lysepuffer resuspendiert und durch entsprechende zusätzliche Volumina an Proteaseinhibitoren Benzamidin, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A (100x konz.) aufgefüllt. Die dadurch entstandene Zellsuspension wurde mit ca. 1 mL Glas-Beads (425–600 µm) versetzt und durch wiederholtes vortexen (mind. 4 Wiederholungen) für 30 Sekunden mit angemessener Kühlung im Eisbad aufgeschlossen. Das dadurch erhaltene Rohlysat wurde sofort der Zentrifugation bei 10000×g, 15 min, 4 °C unterzogen. Der zellfreie Proteinrohextrakt S1 wurde entweder für weitere Fraktionierung verwendet oder bei –20 °C kurzfristig bzw. bei –80 °C dauerhaft gelagert.

Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator unter Zusatz von Glucanex[®]

6–10 g Zellen wurden mit Lysepuffer III (Tris/MgSO₄) auf 15–20 mL aufgefüllt. Zu den suspendierten Zellen wurde Glucanex[®] im Verhältnis 10 mg pro 1 g Zellen zugefügt und für zwei Stunden bei 37 °C bei gelegentlichem Invertieren inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Hochdruckhomogenisator „EmulsiFlex-B30“ durch 6 Zyklen bei maximalem Druck von 43000 psi aufgeschlossen. Das dadurch erhaltene Rohlysat wurde sofort der Zentrifugation (min. 10000×g, 15 min, 4 °C) unterzogen. Der erhaltene zellfreie Proteinextrakt

S1 wurde entweder für weitere Fraktionierungen verwendet oder bei -20 °C kurzfristig bzw. bei -80 °C dauerhaft gelagert.

Fraktionierung vom zellfreien Proteinrohextrakt aus *S. cerevisiae*

Der durch Aufschluss mittels Glas-Beads oder Hochdruckhomogenisator unter Zusatz von Glucanex[®] erhaltene zellfreie Proteinrohextrakt S1 wurde mit Glycerin (10% (m/v) Endkonzentration) versetzt (alle andere S1 Fraktionen enthalten bereits Glycerin) und bei $164000\times g$, 4 °C für 60 min ultrazentrifugiert. Das erhaltene Pellet P2 wurde in 2 mL MRB-Puffer (engl. Membrane Resuspension Buffer) resuspendiert und der zweiten Ultrazentrifugation ($164000\times g$, 60 min, 4 °C) unterzogen. Das erhaltene Pellet P3 wurde bei -20 °C gelagert. Der in manchen Fällen beobachtete voluminöse Niederschlag wurde extra dekantiert und als „S2 trüb“ bzw. „S3 trüb“ bezeichnet.

Solubilisierung der Membranproteine aus *S. cerevisiae* mit DDM

Das Membranpellet P3 wurde in 2 mL Solubilisierungspuffer mit 30 mM n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) als nichtionisches Detergenz suspendiert und eine Stunde bei 4 °C unter leichtem Rotieren inkubiert. Nach der Ultrazentrifugation bei $164000\times g$, 60 min, 4 °C wurden die solubilisierten Proteine in Fraktion S4 dekantiert.

Solubilisierung der Membranproteine aus *S. cerevisiae* nach Paik et al.^[86]

Siehe Kapitel 5.3.3.

5.4 Chemische Synthesen

5.4.1 Lösungsmittel und Chemikalien

Lösungsmittel und Chemikalien wurden von den Firmen SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen, Germany), ROTH (Karlsruhe, Deutschland) und APPLICHEM (Darmstadt, Deutschland) im höchst möglichen Reinheitsgrad bezogen. Deuterierte Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie wurden von der Fa. EURISO-TOP (Saint-Aubin, Frankreich) bezogen. Lösungsmittel wurden destilliert und falls nicht anders angegeben nach den literaturüblichen Methoden getrocknet. Das zur Cofaktor-Regenerierung benötigte Enzym GDH und HLADH-E/-S wurden von der Fa. EVOCATAL (Düsseldorf, Deutschland) bezogen.

5.4.2 Analytik

GC-MS

GC-MS-Analysen wurden mit einem "HP 6890 N Series GC-System" gekoppelt an einen "HP 5973 Network Mass Selective Detector" der Fa. AGILENT (Santa Carla, USA) durchgeführt. Es wurde die Säule DB-5ms (Länge = 30 m, innerer Durchmesser = 0.25 mm, Filmdicke = 0.25 μm) der Fa. AGILENT (Santa Carla, USA) eingesetzt. Weitere GC-Parameter: Injektionsvolumen 1 μL , Helium als Trägergas (1.0 mL/min, konstant), Injektor im Splitmodus (41.7 : 1, 250 °C). T (Injektor) = 250 °C, T (Ionenquelle) = 200 °C. Der detektierte Massenbereich für die Methode „M1-300“ betrug 50–300 m/z und für die Methode „M1-600“ 50–600 m/z. Temperaturprogramm (Ofen) für „M1-300“: Aufheizrate 20 °C·min⁻¹, $T_{0 \text{ min}} = 60 \text{ °C}$, $T_{3 \text{ min}} = 60 \text{ °C}$, $T_{14 \text{ min}} = 280 \text{ °C}$, $T_{19 \text{ min}} = 280 \text{ °C}$. Für „M1-600“: Aufheizrate 20 °C/min, $T_{0 \text{ min}} = 60 \text{ °C}$, $T_{3 \text{ min}} = 60 \text{ °C}$, $T_{14 \text{ min}} = 280 \text{ °C}$, $T_{19 \text{ min}} = 280 \text{ °C}$. Der Solvent-Delay betrug 3.75 min für „M1-300“ und „M1-600“.

NMR-Analytik

NMR-Spektren wurden mit dem Spektrometer "Bruker DRX 400" der Fa. BRUKER (¹H-NMR: 400 MHz, ¹³C-NMR: 100.6 MHz) aufgenommen. Angegeben werden die chemischen Verschiebungen δ in ppm, die Kopplungskonstanten J in Hz und die Multiplizitäten: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), quin (Quintett), sext (Sextett) und m (Multipllett). Fallen Kopplungen zu scheinbaren Multiplizitäten zusammen, wird die beobachtete Multiplizität in Anführungszeichen angegeben. Als interner Standard bei ¹H-NMR-Untersuchungen diente der undeuterierte Anteil des verwendeten Lösungsmittels

CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.28$ ppm) und bei ^{13}C -NMR mittleres Signal von CDCl_3 ($\delta_{\text{C}} = 77.0$ ppm). Zur Unterstützung der Signalzuordnung wurden zusätzlich (H,H)-COSY und TOCSY-Experimente durchgeführt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

UV/VIS

Die Aktivitätsmessungen von Enzymen erfolgten mit einem Spektralphotometer "UV 1650 PC". Die Bestimmung der optischen Dichte (OD_{600}) von Bakterienkulturen erfolgte mit einem Spektralphotometer „UV mini-1240“ der Fa. SHIMADZU (Duisburg, Deutschland) bei 600 nm.

Dünnschichtchromatographie

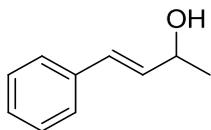
Die analytische Dünnschichtchromatographie (DC) erfolgte auf DC-Alufolien „Kieselgel 60 F₂₅₄“ der Fa. MERCK. Als Fließmittel diente ein Gemisch aus Ethylacetat und Cyclohexan. Die Mischungsverhältnisse wurden jeweils den zu trennenden Substanzen angepasst und entsprechend angegeben. Die Detektion erfolgte über Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm und Eigenfluoreszenz bei $\lambda = 366$ nm.

Automatisierte Flash-Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde mit einem Gerät „Isolera Prime“ der Fa. BIOTAGE (Uppsala, Schweden) an vorgepackten SNAP-Kieselgelsäulen der Fa. BIOTAGE (Uppsala, Schweden).

5.4.3 Synthese der Substrate

rac-(*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (**10a**):



In einem Rundkolben wurde (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**) (1.02 g, 7 mmol) in 5 mL Methanol gelöst, unter Rühren portionsweise mit Natriumborhydrid (292 mg, 7.7 mmol) versetzt und bei 0 °C zwei Stunden gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit HCl (2 M) angesäuert bis die Gasentwicklung aufhörte und mit EtOAc (3 × 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Die Reinigung des Rohproduktes durch automatisierte Flash-Säulenchromatographie (Isolera Biotage[®]) ergab 402 mg (39% d. Th.) **10a** als weißer kristalliner Feststoff.

DC (Cyclohexan/EtOAc 9:1 v/v): $R_f = 0.11$

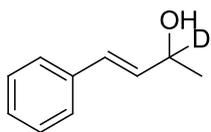
Isolera Säule: SNAP HP 10 g Kieselgel
 Fließmittel: Cyclohexan/EtOAc
 Flussrate: 20 mL·min⁻¹
 4 CV mit 10% EtOAc (Equilibrierung)
 10 CV mit 10%–80% EtOAc (linearer Gradient)
 UV1 $\lambda = 250$ nm
 UV2 $\lambda = 280$ nm

GC-MS (M1-300-0)
 $t_R = 8.90$ min, m/z: 148 ([M⁺], 66%), 133 ([M⁺ -CH₃⁺], 37%), 115 ([C₉H₇³⁺], 46%), 105 ([C₈H₉⁺], 100%), 91 ([C₇H₇⁺], 51%), 77 ([C₆H₅⁺], 37%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃); $\delta = 7.38$ (m, 2H, *ortho*-CH_{Ar}), $\delta = 7.34$ (m, 2H, *meta*-CH_{Ar}), $\delta = 7.24$ (m, 1H, *para*-CH_{Ar}), 6.57 (d, ³J = 15.9 Hz, 1H, PhCH_{olef}), 6.26 (dd, ³J = 15.9 Hz, ³J = 6.4 Hz, 1H, CH_{olef}COH), 4.50 (m, 1H, CHOH), 1.37 (d, ³J = 6.3 Hz, 3H, CH₃).

C₁₀H₁₂O 148.20 g·mol⁻¹

rac-(*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-deuterium-2-ol (**10a_d**):



Zu einer Lösung von (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**) (292 mg, 2 mmol) und $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (838 mg, 2.25 mmol) in 12.5 mL Methanol wurde NaBD_4 (88 mg, 2.1 mmol) portionsweise unter Rühren bei 0 °C zugegeben. Nach zwei Stunden Rühren bei RT wurde der Ansatz mit HCl (2M) angesäuert bis die Gasentwicklung nicht mehr stattfand und mit EtOAc (3×20 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingengt. Reinigung des Rohproduktes durch automatisierte Flash-Säulenchromatographie (Isolera Biotage[®]) ergab 68 mg (23% d. Th.) **10a_d** als farbloses Öl.

DC (Cyclohexan/EtOAc 4:1 v/v): $R_f = 0.16$

Isolera Säule: SNAP HP 10 g Kieselgel
 Fließmittel: Cyclohexan/EtOAc
 Flussrate: $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
 4 CV mit 10% EtOAc (Equilibrierung)
 10 CV mit 10%–90% EtOAc (linearer Gradient)
 UV1 $\lambda = 250 \text{ nm}$
 UV2 $\lambda = 280 \text{ nm}$

GC-MS (M1-300-0)
 $t_R = 8.89 \text{ min}$, m/z: 149 ($[\text{M}^+]$, 78%), 134 ($[\text{M} - \text{CH}_3^+]$, 43%), 116 ($[\text{C}_9\text{H}_7^{3+} + 1]$, 45%), 106 ($[\text{C}_8\text{H}_9^+]$, 100%), 91 ($[\text{C}_7\text{H}_7^+]$, 41%), 77 ($[\text{C}_6\text{H}_5^+]$, 27%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.38$ (m, 2H, *ortho*- CH_{Ar}), 7.32 (m, 2H, *meta*- CH_{Ar}), 7.24 (m, 1H, *para*- CH_{Ar}), 6.57 (d, $^3J = 15.9 \text{ Hz}$, 1H, $\text{PhCH}_{\text{olef}}$), 6.26 (d, $^3J = 15.9 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_{\text{olef}}\text{COH}$), 1.37 (s, 3H, CH_3).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 136.7$ (C_q), 133.5 ($\text{C}_q\text{CH}_{\text{olef}}$), 129.4 (C_{para}), 128.6 (2C, C_{meta}), 127.6 ($\text{C}_{\text{olef}}\text{COH}$), 126.4 (2C, C_{ortho}), 68.5 (m, COHD), 23.3 (CH_3).

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{DO}$ $149.21 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

5.5 Bestimmung der Aktivität von HLADH-Isoenzymen

Bei der Reduktion von Benzaldehyd durch HLADH wird der Cofaktor NADH in stöchiometrischen Verhältnissen oxidiert. NADH weist im Gegensatz zur oxidierten Form ein Absorptionsmaximum bei 340 nm auf. Die Absorptionsabnahme bei 340 nm wurde zur Bestimmung der Aktivität genutzt. Zu einer Mischung von 875 μL TEA-Puffer (100 mM, pH 7.0) und 100 μL Benzaldehyd-Lösung (30 mM in H_2O) wurden 20 μL NADH (12.5 mM) in TEA-Puffer (100 mM, pH 7.0) zugegeben. Die Lösung wurde umgerührt und mit 5 μL Enzymlösung vermischt. Die Absorptionsabnahme von NADH wurde über einen Zeitraum von 1 min bei Raumtemperatur photometrisch mit dem Spektralphotometer „UV 1650 PC“ der Fa. SHIMADZU (Duisburg, Deutschland) erfasst. Zur Messung der Hintergrundabsorption diente 1 mL TEA-Puffer (100 mM, pH 7.0). Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität in } U = \frac{\Delta A \cdot v_{\text{ges}}}{\varepsilon \cdot v_{\text{enzym}} \cdot d} \cdot f$$

ΔA_{340} = Absorptionsabnahme innerhalb 1 min

ε = molarer Extinktionskoeffizient von NADH ($\text{mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

v_{ges} = Probenvolumen (mL)

v_{Enzym} = Enzymlösungsvolumen (mL)

d = Schichtdicke der Messzelle (cm)

f = Verdünnungsfaktor

5.6 Enzymatische Reaktionen

5.6.1 Negativkontrollen

Die Negativkontrollen erfolgten im analytischen Maßstab (1 mL). Zu einer 10 mM Substratlösung in KP_i -Puffer (50 mM, pH 7.3) bzw. TEA/NaOH-Puffer (100 mM, pH 7.0) wurden NADH (11 mg, 0.015 mmol) und GDH (2 μ L, >500 U/mL) bzw. zellfreies Proteinrohextrakt *E. coli* BL21(DE3)-Zellen (0.2 mL) gegeben und bei 25 °C und 300 rpm inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch GC-MS-Analytik.

Umsetzung von (E)-4-Phenylbut-3-en-2-on (10) durch GDH-Rohextrakt:

Eine Reaktionskontrolle nach 20 Stunden durch GC-MS-Analytik zeigte keine Umsetzung von **10**.

Umsetzung von (E)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (10a) durch zellfreies Proteinrohextrakt aus E. coli BL21(DE3):

Eine Reaktionskontrolle nach 72 Stunden durch GC-MS-Analytik zeigte keine Umsetzung von **10a**.

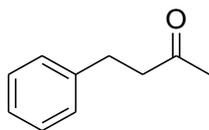
Umsetzung von 4-Phenylbutan-2-on (10b) durch zellfreies Proteinrohextrakt aus E. coli BL21(DE3):

Eine Reaktionskontrolle nach 20 Stunden durch GC-MS-Analytik zeigte keine Umsetzung von **10b**.

Umsetzung von (E)-4-Phenylbut-3-en-2-on (10) durch zellfreies Proteinrohextrakt aus E. coli BL21(DE3):

Der Umsatz zu **10b** betrug 14% nach 3 Tagen (GC-MS).

4-Phenylbutan-2-on (**10b**):



GC-MS (M1-300-0)

$t_R = 8.27$ min, m/z: 148 ($[M^+]$, 96%), 133 ($[M - CH_3^+]$, 18%), 105 ($[M - C_2H_3O^+]$, 100%), 91 ($[C_7H_7^+]$, 70%), 77 ($[C_6H_5^+]$, 24%).

$C_{10}H_{12}O$ 148.20 g·mol⁻¹

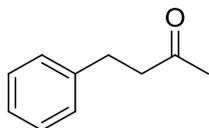
5.6.2 Biokatalytische Reduktionen mit HLADH-Isoenzymen

Die Menge an Lyophilisat wurde auf insgesamt je 40 U pro Isoenzym und Ansatz angepasst. Für die Aktivitätsberechnung wurden Herstellerdaten, wie die Proteinmenge im Lyophilisat und die auf die Umsetzung von Benzaldehyd bezogene Aktivität verwendet.

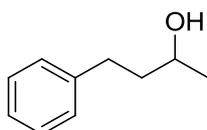
*Umsetzung von (E)-4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**) durch HLADH-S und HLADH-E:*

Zu einer Lösung von **10** (1.5 mg, 0.01 mmol) in KP_i-Puffer (1 mL, 50 mM, pH 7.3) wurden NADH (11 mg, 0.015 mmol) und HLADH-S (40 U, 18 mg Lyophilisat) bzw. HLADH-E (40 U, 11 mg Lyophilisat) gegeben und bei 25 °C und 300 rpm inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch GC-MS-Analytik. Nach 3 Tagen wurde die Mischung mit 300 µL CDCl₃ (3x) extrahiert. Der Umsatz zu 4-Phenylbutan-2-on (**10b**) und 4-Phenylbutan-2-ol (**10c**) betrug im Fall von HLADH-S nach 3 Tagen 50% (¹H-NMR) mit einem Produktverhältnis **10b/10c** von 4:1 (GC-MS). Bei der Umsetzung mit HLADH-E betrug der Umsatz zu **10b** und **10c** nach 3 Tagen 18% (¹H-NMR) mit einem Produktverhältnis **10b/10c** von 1:1.4 (GC-MS). Bei der Umsetzung mit beiden Isoenzymen betrug der Umsatz zu **10b** und **10c** nach 3 Tagen >98% (¹H-NMR) mit einem Produktverhältnis **10b/10c** von 3.6:1 (GC-MS).

4-Phenylbutan-2-on (**10b**):



GC-MS	(M1-300-0)
	$t_R = 8.27$ min, m/z: 148 ($[M^+]$, 96%), 133 ($[M - CH_3^+]$, 18%), 105 ($[M - C_2H_3O^+]$, 100%), 91 ($[C_7H_7^+]$, 70%), 77 ($[C_6H_5^+]$, 24%).
1H -NMR	(400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.30$ -7.17 (m, 5H, CH_{Ar}), 2.90 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, $PhCH_2$), 2.76 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.14 (s, 3H, CH_3).
$C_{10}H_{12}O$	$148.20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

4-Phenylbutan-2-ol (**10c**):

GC-MS	(M1-300-0)
	$t_R = 8.40$ min, m/z: 150 ($[M^+]$, 12%), 132 ($[M - H_2O^+]$, 75%), 117 ($[C_9H_9^{3+}]$, 100%), 105 ($[C_8H_9^+]$, 15%), 91 ($[C_7H_7^+]$, 100%), 77 ($[C_6H_5^+]$, 30%).
1H -NMR	(400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.30$ -7.17 (m, 5H, CH_{Ar}), 3.83 (q, $^3J = 6.4$ Hz, 1H, $CHOH$), 2.69 (m, 2H, $PhCH_2$), 1.77 (m, 2H, CH_2COH), 1.23 (d, $^3J = 6.2$ Hz, 3H, CH_3).
$C_{10}H_{14}O$	$150.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

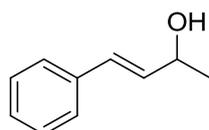
Umsetzung von (E)-4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**) durch HLADH-S bzw. HLADH-E mit Glucose/GDH-Cofaktorregenerierungssystem:

Zu einer Lösung von **10** (1.5 mg, 0.01 mmol) in TEA/NaOH-Puffer (0.95 mL, 100 mM, pH 7.0) wurden NAD^+ -Lösung (50 μ L, 1.2 mM in TEA/NaOH-Puffer), Glucose (9 mg, 0.05 mmol), 2 μ L GDH ($> 500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) und HLADH-S (40 U, 18 mg Lyophilisat) bzw. HLADH-E (40 U, 11 mg Lyophilisat) gegeben und bei 25 °C und 300 rpm inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch GC-MS-Analytik.

Tabelle 6: Umsetzung von (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**) durch HLADH-S bzw. HLADH-E mit Glucose/GDH-Cofaktorregenerierungssystem.

Enzym	Gesamtumsatz	10a	10b	10c
HLADH-S	32% nach 20 Stunden	16%	1%	15%
HLADH-E	35% nach 21 Stunden	21%	2%	12%

(*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (**10a**):



GC-MS (M1-300-0)

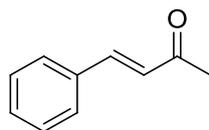
$t_R = 8.90$ min, m/z: 148 ($[M^+]$, 78%), 133 ($[M - CH_3^+]$, 37%), 115 ($[M - C_2H_5O^+]$, 50%), 105 ($[M - C_2H_3O^+]$, 100%), 91 ($[C_7H_7^+]$, 54%), 77 ($[C_6H_5^+]$, 37%).

$C_{10}H_{12}O$ 148.20 g·mol⁻¹

Umsetzung von (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (**10a**) durch HLADH-E unter Stickstoffatmosphäre:

Zu einer Lösung von **10a** (1.5 mg, 0.01 mmol) in TEA/NaOH-Puffer (1 mL, 100 mM, pH 7.0) wurden NADH (11 mg, 0.015 mmol, 1.5 Äq.) und HLADH-E (40 U, 11 mg Lyophilisat) gegeben und bei 25 °C und 300 rpm unter Stickstoffatmosphäre inkubiert. Die Reaktionskontrolle wurde mit GC-MS durchgeführt. Der Gesamtumsatz zu **10** (47%), **10b** (4%) und **10c** (<1%) betrug nach 23 Stunden >50% (GC-MS).

(*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**):



GC-MS (M1-300-0)

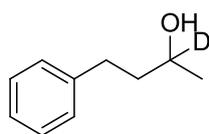
$t_R = 9.15$ min, m/z: 146 ($[M^+]$, 65%), 145 ($[M - H^+]$, 67%), 131 ($[M - CH_3^+]$, 100%), 115 ($[C_9H_7^{3+}]$, 4%), 103 ($[C_8H_7^+]$, 78%), 91 ($[C_7H_7^+]$, 2%), 77 ($[C_6H_5^+]$, 33%).

$C_{10}H_{10}O$ 146.19 g·mol⁻¹

Umsetzung von (E)-4-Phenylbut-3-en-2-deuterium-2-ol (**10aa**) durch HLADH-S mit 3 Äq. NADH:

Zu einer Lösung von **10aa** (1.5 mg, 0.01 mmol) in TEA/NaOH-Puffer (1 mL, 100 mM, pH 7.0) wurden NADH (22 mg, 0.03 mmol, 3 Äq.) und HLADH-S (40 U, 18 mg Lyophilisat) gegeben und bei 25 °C und 300 rpm inkubiert. Die Reaktionskontrolle wurde mittels GC-MS durchgeführt. Der Gesamtumsatz zu **10** (75%), **10b** (19%) und **10c/10ca** (<1%) betrug nach 6 Tagen >93% (GC-MS).

4-Phenylbutan-2-deuterium-2-ol (**10ca**):



GC-MS (M1-300-0)

$t_R = 8.41$ min, m/z: 151 ($[M^+]$, 9%), 133 ($[C_{10}H_{12}^{2+} + 1]$, 39%), 118 ($[C_9H_9^{3+} + 1]$, 72%), 105 ($[C_8H_9^+]$, 48%), 91 ($[C_7H_7^+]$, 100%), 77 ($[C_6H_5^+]$, 22%).

$C_{10}H_{13}DO$ 151.22 g·mol⁻¹

Umsetzung von 4-Phenylbutan-2-on (**10b**) durch HLADH-S bzw. HLADH-E:

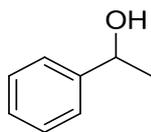
Zu einer Lösung von **10b** (1.5 mg, 0.01 mmol) in TEA/NaOH-Puffer (1 mL, 100 mM, pH 7.0) wurden NADH (11 mg, 0.015 mmol, 1.5 Äq.), HLADH-S (40 U, 18 mg Lyophilisat) bzw. HLADH-E (40 U, 11 mg Lyophilisat) gegeben und bei 25 °C und 300 rpm inkubiert. Die Reaktionskontrolle wurde mit GC-MS durchgeführt. Der Umsatz zu **10c** betrug nach 20 Stunden im Fall von HLADH-S 33% und bei HLADH-E nach 24 Stunden 3% (GC-MS).

Umsetzung von (E)-4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**) durch gereinigte HLADH-S bzw. HLADH-E:

Zu einer Lösung von **10** (1.5 mg, 0.01 mmol) in TEA/NaOH-Puffer (910 µL, 100 mM, pH 7.0) wurden NAD⁺-Lösung (50 µL 1.2 mM in TEA/NaOH-Puffer), Glucose (9 mg, 0.05 mmol), 2 µL GDH (>500 U·mL⁻¹) und gereinigte HLADH-S (38 µL, 1.76 U·µL⁻¹) bzw. HLADH-E (5 µL, 12.5 U·µL⁻¹) gegeben und bei 25 °C und 300 rpm inkubiert. Die Reaktionskontrolle wurde mittels GC-MS durchgeführt. Der Umsatz zu **10a** betrug nach 48 Stunden für beide Isoenzyme 5% (GC-MS).

5.6.3 Biokatalytische Umsetzungen mit CPCr2

1-Phenylethanol (29a):



Zu einer Lösung von Acetophenon (**29**) (1.17 μL , 0.01 mmol) in TEA/NaOH-Puffer (938 μL , 100 mM, pH 7.0) wurden NAD^+ -Lösung (50 μL 1.2 mM in TEA/NaOH-Puffer), Glucose (9 mg, 0.05 mmol), GDH (2 μL , $>500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) und 0.5 U gereinigte CPCr (8.3 μL) gegeben und bei 25 $^\circ\text{C}$ und 300 rpm inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch GC-MS-Analytik. Der Umsatz betrug nach 21 Stunden $>99\%$.

GC-MS (M1-300-0)

$t_{\text{R}} = 6.63 \text{ min}$, m/z: 122 [M^+], 107 [$\text{M} - \text{CH}_3^+$] 100%, 91 [C_7H_7^+], 77 [C_6H_5^+].

$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$ 122.16 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

(E)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (10a):

Zu einer Lösung von (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-on (**10**) (1.5 mg, 0.01 mmol) in TEA/NaOH-Puffer (943 μL , 100 mM, pH 7.0) wurden NAD^+ -Lösung (50 μL 1.2 mM in TEA/NaOH-Puffer), Glucose (9 mg, 0.05 mmol), GDH (2 μL , $>500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) und 0.5 U gereinigte CPCr (8.3 μL) gegeben und bei 25 $^\circ\text{C}$ und 300 rpm inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch GC-MS-Analytik. Der Umsatz betrug nach 21 Stunden 78%.

Umsetzung von (E)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (10a) durch CPCr:

Zu einer Lösung von **10a** (1.5 mg, 0.01 mmol) in TEA/NaOH-Puffer (943 μL , 100 mM, pH 7.0) wurden NAD^+ -Lösung (50 μL 1.2 mM in TEA/NaOH-Puffer), Glucose (9 mg, 0.05 mmol), GDH (2 μL , $>500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) und gereinigte CPCr (0.5 U, 8.3 μL) gegeben und bei 25 $^\circ\text{C}$ und 300 rpm inkubiert. Eine Reaktionskontrolle nach 21 Stunden durch GC-MS-Analytik zeigte keine Umsetzung von **10a**.

5.6.4 Biokatalytische Umsetzungen mit PPR

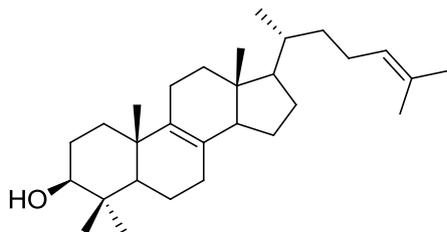
Mit den Substraten Farnesol (**8**) und Geranylgeraniol (**9**) wurden jeweils 0.5 mM Stocklösungen in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 8.0, 0.05% Tween 80 (v/v)) hergestellt.

Zu einer Mischung von 250 μL Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 8.0, 0.05 % Tween 80 (v/v)) und 200 μL (0.5 mM) der jeweiligen Substrat-Stocklösung wurde Glycerol (20 % Endkonzentration), DTT (1 mM Endkonzentration), $\text{KF}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50 mM Endkonzentration), MgCl_2 (1 mM Endkonzentration), NADPH (10 mM Endkonzentration) und 100 μL der PPR-haltigen Membranfraktion zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei für 18 Stunden bei 27 °C und 300 rpm. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc ($3 \times 100 \mu\text{L}$) extrahiert und mittels GC-MS analysiert.

Es konnte für **8** und **9** keine Reduktion der α -ständigen Doppelbindung festgestellt werden.

5.6.5 Biokatalytische Umsetzungen mit ERG24

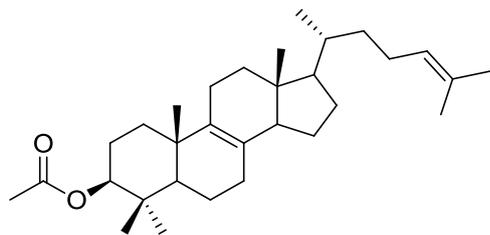
4,4-Dimethyl-5 α -cholesta-8,24-dien-3 β -ol (**17a**):



$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ 412.69 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Zu einer Lösung von 4,4-Dimethyl-5 α -cholesta-8,14,24-trien-3 β -ol (**17**) (12.3 μg , 0.03 μmol) in KP_1 -Puffer (100 mM, pH 7.4, 0.8% (v/v) Tween 80, O_2 -arm) und KP_1 -Puffer (300 μL , 100 mM, pH 7.4) wurde EDTA (0.5 mM Endkonzentration), GSH (1 mM Endkonzentration), NADPH (2 mM Endkonzentration), Glucose (12.5 mg, 0.14 M Endkonzentration) und GDH (2 μL , $>500 \text{ U/mL}$) gegeben. Der Ansatz wurde 4 min mit Stickstoff begast und anschließend mit 50 μL leicht resuspendierter ERG24-haltigen Membranfraktion versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C, 300 rpm wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mL KOH (20% in 50% MeOH) gestoppt. Als interner Standard wurde 5 μg von 5 α -Cholestan zugefügt. Organische Substanzen wurden mit Petrolether ($3 \times 500 \mu\text{L}$) extrahiert und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Die trockene organische Phase wurde mit einem Gemisch aus Essigsäureanhydrid und trockenem Pyridin (2:1) für eine Stunde bei 60 °C unter Rückflusskühlung inkubiert.

Anschließend wurde organische Phase eingetrocknet und in ca. 100 μL EtOAc aufgenommen. Die Analytik der acetylierten Form erfolgte durch GC-MS. Der Umsatz betrug 4–10%.



GC-MS (M1-600-60)

$t_R = 29.5$ min, m/z : 454 ($[\text{M}^+]$), 439 ($[\text{M}-\text{CH}_3^+]$), 411 ($[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_3\text{O}^+]$), 395 ($[\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{O}_3^+]$), 379 ($[\text{C}_{28}\text{H}_{43}^{3+}]$), 267 ($[\text{C}_{20}\text{H}_{27}^{4+}]$), 187 ($[\text{C}_{14}\text{H}_{19}^{6+}]$), 161 ($[\text{C}_{12}\text{H}_{17}^{4+}]$), 69 ($[\text{C}_5\text{H}_9^+]$).

$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ 454.73 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Umsetzung von Lanosterol (30) durch ERG24-haltige Membranfraktion aus S. cerevisiae::pESCHIS::ERG24_C-His6:

Zu einer Lösung von **30** (12.8 μg , 0.03 μmol) in KPi -Puffer (100 mM, pH 7.4, 0.8% (v/v) Tween 80, O_2 -arm) und KPi -Puffer (300 μL , 100 mM, pH 7.4) wurde EDTA (0.5 mM Endkonzentration), GSH (1 mM Endkonzentration), NADPH (2 mM Endkonzentration), Glucose (12.5 mg, 0.14 M Endkonzentration) und GDH (2 μL , >500 U/mL) gegeben. Der Ansatz wurde 4 min mit Stickstoff begast und anschließend mit 50 μL leicht resuspendierter ERG24-haltigen Membranfraktion versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 $^\circ\text{C}$, 300 rpm wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mL KOH (20% in 50% MeOH) gestoppt. Als interner Standard wurde 5 μg von 5 α -Cholestan zugefügt. Organische Substanzen wurden mit Petrolether (3 \times 500 μL) extrahiert und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Die trockene organische Phase wurde mit einem Gemisch aus Essigsäureanhydrid und trockenem Pyridin (2:1) für eine Stunde bei 60 $^\circ\text{C}$ unter Rückflusskühlung inkubiert. Anschließend wurde organische Phase eingetrocknet und in ca. 100 μL EtOAc aufgenommen.

Die Analytik der acetylierten Form durch GC-MS zeigte keine Umsetzung von **30**.

6 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
amp	Ampicillin
Äq.	Äquivalent
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
At Δ 24SR	Δ 24-Sterol-Reduktase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BSA	engl., bovine serum albumine
CPCR2	<i>Candida parapsylosis</i> Carbonylreduktase 2
CR	Carvonreduktase
CV	engl., column volume
d	Durchmesser in cm
DC	Dünnschichtchromatographie
DCR	2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltosid
dem.	demineralisiert
<i>DHCR24</i>	Dehydrocholesterol-Reduktase 24
<i>DHCR7</i>	Dehydrocholesterol-Reduktase 7
<i>DIM/DWF1</i>	<i>DIMINUTO/DWARF1</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl., deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECE	engl., electron-transfer
ECEC	engl., electron-transfer coupled with proton acceptance
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	engl., electron impact
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERG	engl, ETS-related gene
ERG24	Δ 14SR aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>et al.</i>	und andere
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
ETS	engl., erythroblast transformation-specific
f	Verdünnungsfaktor
FAD	Flavinadenindinukleotid
FF-MAS	engl., follicular fluid meiosis-activating sterol
FMN	Flavinmononukleotid
for	engl., forward
g	Gravitationskraft
GAL1 / GAL10	engl., galactose-induced promoters
GC	Gaschromatographie

GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie-Kopplung
GDH	Glucosedehydrogenase
GGR	<u>Geranylgeranyl</u> reduktase
His	Histidin
His-Tag	Polyhistidin-Tag
HLADH	engl., horse liver alcohol dehydrogenase
HLADH-E	HLADH Isoenzym E
HLADH-S	HLADH Isoenzym S
HRP	engl., horseradish peroxidase
Hs	<i>Homo sapiens</i>
Hs Δ 24SR	Δ 24-Sterol-Reduktase aus <i>Homo sapiens</i>
IMAC	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ISPR	(-)-Isopiperitenonreduktase
kann	Kanamycin
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
konz.	konzentriert
KP _i	Kaliumphosphat-Puffer
L	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
mA	Milliampere
MCS	engl., multiple cloning site
MDR	engl., <u>Medium-chain Dehydrogenases/Reductases</u>
MeOH	Methanol
min	Minute
mL	Milliliter
mM	millimolar
μ M	Mikromolar
MRB	engl., membrane resuspension buffer
mRNA	engl., messenger RNA
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NMR	engl., nuclear magnetic resonance
nOD	n-Octyl- β -D-glucopyranosid
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
OLR	offenes Leseraster
OYE	engl., old yellow enzymes
P CYC1	engl., promoter CYC1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	engl., phosphate buffered saline
PBST	PBS-Tween-Puffer

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PETNR	Pentaerythryltetranitratreduktase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPR	Polyprenolreduktase
PR	(+)-Pulegonreduktase
rev	engl., reverse
<i>Rh. capsulatus</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
RNA	engl., ribonucleic acid
rpm	engl., revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	engl., synthetic dextrose
SDS	engl., sodium dodecyl sulfate
sec.	Sekunde
SG	engl., synthetic galactose
<i>sp.</i>	<i>species</i>
SR	engl., synthetic raffinose
SRD5A3	engl., steroid 5-alpha-reduktase 3
STDC	engl., sodium taurodeoxycholate
T ADH1	engl., terminator alcohol dehydrogenase 1
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	terrific broth
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<i>TM7sf2</i>	engl., transmembrane 7 superfamily member 2
TM-Einheit	transmembrane Einheit
TOYE	engl., thermophile old yellow enzyme
t_R	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Volumen
w/o	engl., without
YPD	engl., yeast peptone dextrose
YPG	engl., yeast peptone galactose
$\Delta 14SR$	Delta14-Sterol-Reduktase
$\Delta 24(28)SR$	$\Delta 24(28)$ -Sterol-Reduktase
$\Delta 24SR$	$\Delta 24$ -Sterol-Reduktase
$\Delta 7SR$	$\Delta 7$ -Sterol-Reduktase
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Cofaktoren Nicotinamidadenindinukleotid/Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat (NAD ⁺ /NADP ⁺) in ihrer reduzierten Form (NADH/NADPH) und Flavinmononukleotid/Flavinadenindinukleotid (FMN/FAD) in ihrer reduzierten Form (FMNH ₂ /FADH ₂).	4
Abbildung 2: Abbau von Carveol (1) in <i>Rhodococcus erythropolis</i> DCL14.....	5
Abbildung 3: Reduktion eines Diensystems durch 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktasen.	6
Abbildung 4: Ausschnitt aus der Mentholbiosynthese; regioselektive Reduktion, katalysiert durch die beiden NADPH-abhängigen (-)-Isopiperitenonreduktase (ISPR) und (+)-Pulegonreduktase (PR).....	6
Abbildung 5: Reduktion nichtaktivierter C=C-Doppelbindungen, katalysiert durch GGR.....	8
Abbildung 6: Reduktion der α -ständigen C=C-Doppelbindung in Polyprenolen, katalysiert durch PPR und SRD5A3.	9
Abbildung 7: Mögliche Substrate für PPR.....	9
Abbildung 8: Die durch Bäckerhefe katalysierte Umwandlung von allylischen Alkoholen und Dimethylacetalen zu gesättigten Alkoholen nach Ferraboschi <i>et al.</i> , 1999. ^[47]	10
Abbildung 9: Reduktion von (<i>E</i>)-4-Phenylbut-3-en-2-on (10) bzw. (<i>E</i>)-1,1,1-Trifluor-4-phenylbut-3-en-2-on (11), katalysiert durch <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Hansenula anomala</i> , <i>S. cerevisiae</i> oder <i>Kloeckera saturnus</i> nach 27 Stunden in entsprechenden Puffern. ^[60,61]	11
Abbildung 10: Umsetzungen von 10 (10–20 mM), katalysiert durch zellfreie Proteinrohextrakte von HLADH und CPCR. ^[62,63,65]	12
Abbildung 11: Mögliche zweistufige Reaktionsabläufe A und B bei der HLADH-katalysierten Reduktion von (<i>E</i>)-4-Phenylbut-3-en-2-on (10).....	13
Abbildung 12: Sterol-Grundgerüst; reduzierbare C=C-Bindungen sind rot markiert.....	13
Abbildung 13: Diensysteme in der Sterolbiosynthese (reduzierbare Doppelbindungen sind rot markiert).....	14
Abbildung 14: Reduktion der Δ^7 -Doppelbindung in 7-Dehydrocholesterol (15), katalysiert durch Δ^7 SR. ^[79]	15
Abbildung 15: Reduktion der Δ^{14} -Doppelbindung am Beispiel von A: 4 α -Methyl-5 α -ergosta-8,14,24(28)-trien-3 β -ol (16) ^[83] und B: 4,4-Dimethyl-5 α -cholesta-7,14-dien-3 β -ol (20), ^[85,86] katalysiert durch Δ^{14} SR.....	16
Abbildung 16: Reduktion der $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung in Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3 β -ol (19), katalysiert durch $\Delta^{24(28)}$ SR. ^[90]	16

Abbildung 17: Isomerisierung der $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung zu $\Delta^{24(25)}$ mit darauffolgender Reduktion der $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung, katalysiert durch At Δ 24SR.	17
Abbildung 18: Reduktion der $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung in Desmosterol (14a), katalysiert durch Hs Δ 24SR.	18
Abbildung 19: Möglicher Reaktionsmechanismus von Securinireduktase aus <i>Aspergillus versicolor</i> D-1; a: Enzym-katalysierte Aktivierung der γ,β -Doppelbindung. ^[100]	18
Abbildung 20: Putative Prenylreduktase aus der Biosynthese von Alkyl- <i>O</i> -dihydrogeranyl-methoxyhydroquinonen in <i>Actinoplanes missouriensis</i> . R = Fettsäuren(C16–C17). ^[103]	19
Abbildung 21: Reduktion von 27 durch Zeatinreduktase. ^[101]	19
Abbildung 22: Reduktion von 1,2-Dihydrovomilenin (28) durch DHVR. ^[104]	19
Abbildung 23: Umsetzung von 10 (10 mM) mit HLADH-S und HLADH-E.....	22
Abbildung 24: Enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung mit GDH und Glucose.	22
Abbildung 25: Reduktion von 10 (10 mM) unter Glucose/GDH-Cofaktorregenerierung.	23
Abbildung 26: Mögliche Reaktionswege bei der biokatalytischen Umsetzung von allylischem Alkohol 10a mit HLADH Isoenzymen.	24
Abbildung 27: Synthese von Deuterium-markierten allylischen Alkohol 10ad	25
Abbildung 28: Massenspektren (GC-MS) aus der Umsetzung von 10ad (10 mM) mit 30 mM NADH, 40 U HLADH-S, TEA/NaOH-Puffer (100 mM, pH 7.0), 25 °C.....	25
Abbildung 29: Umsetzung von 10b (10 mM) mit HLADH-S bzw. HLADH-E.....	26
Abbildung 30: Umsetzung von 10 (10 mM) mit gereinigten HLADH-Isoenzymen S und E unter GDH/Glucose-Cofaktorregenerierung.	28
Abbildung 31: Umsetzung von 10 (10 mM) mit dem Durchlauf der Ni-NTA-Säule nach der Proteinbindung unter GDH/Glucose-Cofaktorregenerierung.	28
Abbildung 32: Ablauf der Umsetzung von 10 mit nicht gereinigten HLADH-Isoenzymen. ..	29
Abbildung 33: Umsetzung von 10 (10 mM), katalysiert durch CPCR2 unter Glucose/GDH-Cofaktorregenerierung.	30
Abbildung 34: Der pESCHIS-Vektor (links); das Konstrukt pESCHIS:: <i>PPR_C</i> -His ₆ (rechts); Ausschnitt aus der Multiple Cloning Site (<i>MCS</i>) mit FLAG-Tag, die per PCR entfernten Basenpaare sind rot markiert (unten).	33
Abbildung 35: Das Konstrukt pESCHIS:: <i>PPR_C</i> -His ₁₀ _FLAG (oben); Ausschnitt aus der <i>MCS</i> , der entfernte DNA-Bereich ist rot markiert (unten).....	34
Abbildung 36: Proteingel von <i>PPR_C</i> -His ₆ (erwartete Größe 34.5 kDa) und <i>ERG24_C</i> -His ₆ (erwartete Größe 49 kDa) nach erfolgter SDS-PAGE.	35

Abbildung 37: Western Blot Analyse von PPR_C-His ₆ (erwartete Größe 34.5 kDa) und ERG24_C-His ₆ (erwartete Größe 49 kDa) mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper.	36
Abbildung 38: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung des solubilisierten Proteinanteils aus <i>S. cerevisiae</i> ::pESCHIS::PPR_C-His ₁₀ _FLAG nach erfolgter SDS-PAGE.	37
Abbildung 39: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung der Fraktion S3 „trüb“ aus <i>S. cerevisiae</i> ::pESCHIS::PPR_C-His ₁₀ _FLAG nach erfolgter SDS-PAGE.	38
Abbildung 40: Western Blot Analyse von PPR_C-His ₁₀ _FLAG mit „FLAG™ Epitope Tag (DYKDDDDK) HRP“-Antikörper.....	38
Abbildung 41: Western Blot Analyse von zellfreien Proteinrohextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> ::pESCHIS::PPR_C-His ₁₀ _FLAG und dem pESCHIS- Leervektor mit „FLAG™ Epitope Tag (DYKDDDDK) HRP“-Antikörper.	39
Abbildung 42: Western Blot Analyse von PPR_C-His ₁₀ _FLAG mit „FLAG™ Epitope Tag (DYKDDDDK) HRP“-Antikörper.....	40
Abbildung 43: Western Blot Analyse von PPR_C-His ₁₀ _FLAG mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper.	40
Abbildung 44: Versuch der biokatalytischen Umsetzung der kurzkettigen Polyprenole 8 (0.1 mM) und 9 (0.1 mM) mit PPR-Proteinrohextrakt (P3).....	41
Abbildung 45: Das Agarosegel des <i>Δ14SR</i> -Gens, amplifiziert per PCR aus Ratten-cDNA. Marker) DNA-Ladder, Gewichtsangaben in bp; 1)–3) PCR-Produkt <i>Δ14SR</i>	43
Abbildung 46: Das Konstrukt pET24b:: <i>Δ14SR</i> _C-His ₆ , das Insert ist grün markiert.	43
Abbildung 47: Proteingel von zellfreien Proteinrohextrakten aus <i>E. coli</i> ::pET24b:: <i>Δ14SR</i> _C-His ₆ nach erfolgter SDS-PAGE.....	44
Abbildung 48: Proteingel von zellfreien Proteinrohextrakten aus <i>E. coli</i> ::pET24b:: <i>Δ14SR</i> _C-His ₆ nach erfolgter SDS-PAGE, Fortführung.	45
Abbildung 49: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung von S1-Fraktion aus <i>E. coli</i> _Lemo21::pET24b:: <i>Δ14SR</i> _C-His ₆ nach erfolgter SDS-PAGE.....	46
Abbildung 50: Proteingel des solubilisierten Anteils vom Membranpellet aus <i>E. coli</i> _Lemo21::pET24b:: <i>Δ14SR</i> _C-His ₆ nach erfolgter SDS-PAGE.....	47
Abbildung 51: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung der solubilisierten Fraktion aus <i>E. coli</i> _Lemo21::pET24b:: <i>Δ14SR</i> _C-His ₆ nach erfolgter SDS-PAGE.....	47
Abbildung 52: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung der solubilisierten Fraktion aus <i>E. coli</i> _Lemo21::pET24b:: <i>Δ14SR</i> _C-His ₆ (100 μM L-Rhamnose) nach erfolgter SDS-PAGE.	48

Abbildung 53: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung von $\Delta 14SR_C$ -His ₆ aus <i>E. coli</i> _Lemo21::pET24b:: $\Delta 14SR_C$ -His ₆ (100 μ M L-Rhamnose) nach erfolgter SDS-PAGE.	49
Abbildung 54: Western Blot Analyse von $\Delta 14SR_C$ -His ₆ aus <i>E. coli</i> _Lemo21::pET24b:: $\Delta 14SR_C$ -His ₆ mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper.....	49
Abbildung 55: $\Delta 14SR$ -Aminosäuresequenz, die N-terminal gekürzte $\Delta 14SRtr$ -Variante ist rot markiert.	50
Abbildung 56: Das Konstrukt pET28b:: $\Delta 14SR_C$ -His ₆ , das Insert ist grün markiert.	50
Abbildung 57: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen von $\Delta 14SR_C$ -His ₆ aus <i>E. coli</i> _Lemo21::pET28b:: $\Delta 14SR_C$ -His ₆ in LB-Medium nach erfolgter SDS-PAGE.....	51
Abbildung 58: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen von <i>E. coli</i> _Lemo21::pET28b:: $\Delta 14SR_C$ -His ₆ in TB-Medium nach erfolgter SDS-PAGE.....	51
Abbildung 59: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen. A: <i>E. coli</i> _Lemo21::pET28b (Leervektorexpression) nach erfolgter SDS-PAGE. 1) Proteinmarker, Gewichtsangaben in kDa; 2) zellfreier Proteinrohextrakt; 3) Durchlauf der Ni-NTA-säule; 4) Eluatfraktion ElB1; 5) Eluatfraktion ElB2; B: Vergleich der Leervektorexpression mit <i>E. coli</i> _Lemo21::pET28b:: $\Delta 14SR_C$ -His ₆ in TB- und LB-Medium.	52
Abbildung 60: Western Blot Analyse von $\Delta 14SR_C$ -His ₆ mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper.	53
Abbildung 61: Das Konstrukt pET28b:: $\Delta 14SRtr_C$ -His ₆ , das Insert ist grün markiert.	53
Abbildung 62: Proteingel von $\Delta 14SRtr_C$ -His ₆ : 2)–4) aus <i>E. coli</i> Lemo21; 6)–7) aus <i>E. coli</i> BL21(DE3) Gold nach erfolgter SDS-PAGE. 1)	54
Abbildung 63: Proteingel von $\Delta 14SRtr_C$ -His ₆ nach der Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen aus <i>E. coli</i> _Lemo21::pET28b:: $\Delta 14SRtr_C$ -His ₆ nach erfolgter SDS-PAGE.....	55
Abbildung 64: Ausschnitt aus dem Konstrukt pRhot-Hi2:: $\Delta 14SR_C$ -His ₆ ; das Insert ist grün markiert.	56
Abbildung 65: Agarosegel des PCR-Produkts $\Delta 14SR$	57
Abbildung 66: Das Konstrukt pRhot-Hi2:: $\Delta 14SR_N$ -His ₆ ; das $\Delta 14SR$ -Gen ist grün markiert.	58
Abbildung 67: Das Konstrukt pESCHIS:: $\Delta 14SR_C$ -His ₆ ; das Insert ist grün markiert.	60
Abbildung 68: Das Konstrukt pESCHIS:: $\Delta 14SR_N$ -His ₆ ; das Insert ist grün markiert.	60

Abbildung 69: Das Konstrukt pESCHIS:: <i>2xΔ14SR_C</i> -His ₆ ; die Δ14SR-ORL sind grün markiert.	61
Abbildung 70: Proteingel von <i>S. cerevisiae</i> ::pESCHIS:: <i>Δ14SR_C</i> -His ₆ nach erfolgter SDS-PAGE.	63
Abbildung 71: Western Blot Analyse von Δ14SR_C-His ₆ und Δ14SR_N-His ₆ mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper.....	63
Abbildung 72: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung nach der Solubilisierung der Membranproteine von Fraktion P2 aus <i>S. cerevisiae</i> ::pESCHIS:: <i>Δ14SR_C</i> -His ₆ nach erfolgter SDS-PAGE.....	64
Abbildung 73: Western Blot Analyse von Δ14SR_C-His ₆ mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper.	64
Abbildung 74: Proteingel von Δ14SR_N-His ₆ aus <i>S. cerevisiae</i> ::pESCHIS:: <i>Δ14SR_N</i> -His ₆ nach erfolgter SDS-PAGE.	65
Abbildung 75: Western Blot Analyse von Δ14SR_N-His ₆ mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper.	66
Abbildung 76: Proteingel von Rohlysaten aus <i>S. cerevisiae</i> ::pESCHIS:: <i>2xΔ14SR_C</i> -His ₆ -Kulturen (I–V) nach erfolgter SDS-PAGE.	67
Abbildung 77: Western Blot Analyse von Rohlysaten aus <i>S. cerevisiae</i> ::pESCHIS:: <i>2xΔ14SR_C</i> -His ₆ -Kulturen (I–V) mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper.	67
Abbildung 78: Proteingel von Δ14SR_C-His ₆ aus <i>S. cerevisiae</i> ::pESCHIS:: <i>2xΔ14SR_C</i> -His ₆ -Kulturen (III und V) nach erfolgter SDS-PAGE.....	68
Abbildung 79: Western Blot Analyse von Δ14SR_C-His ₆ aus <i>S. cerevisiae</i> ::pESCHIS:: <i>2xΔ14SR_C</i> -His ₆ (III und V) mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper.....	69
Abbildung 80: Proteingel der Ni-NTA-Reinigung von Δ14SR_C-His ₆ aus <i>S. cerevisiae</i> ::pESCHIS:: <i>2xΔ14SR_C</i> -His ₆ (Kultur III) nach erfolgter SDS-PAGE.	70
Abbildung 81: Proteingel von ERG24_C-His ₆ (rot markiert) aus <i>S. cerevisiae</i> ::pESCHIS:: <i>ERG24_C</i> -His ₆ nach erfolgter SDS-PAGE.....	72
Abbildung 82: Western Blot Analyse von ERG24_C-His ₆ Fraktionen nach Zellaufschluss und Fraktionierung (Geltaschen 3, 5 und 7) mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper.	73
Abbildung 83: Western Blot Analyse von ERG24_C-His ₆ mit „HisProbe™-HRP“-Antikörper.	73
Abbildung 84: Reduktion der Δ ¹⁴ -Doppelbindung in 17 (60 μM) katalysiert durch die ERG24-haltige Membranfraktion.....	74

Abbildung 85: Massenspektrum (GC-MS) aus der Umsetzung von 17 mit ERG24 nach anschließender Acetylierung.	75
Abbildung 86: Umsetzung von 30 (60 μ M) als Negativkontrolle für ERG24.	76
Abbildung 87: Ablauf der Biokatalyse von allylischem Alkohol 10a , katalysiert durch die nicht gereinigten HLADH-Isoenzyme und <i>E. coli</i> -eigene Oxidoreduktasen.	77
Abbildung 88: Möglicher Ablauf der Polyprenol-Reduktion.	78
Abbildung 89: Reduktion von 28 durch DHVR.	79
Abbildung 90: Indolalkaloide. A: die nicht reduzierte $\Delta^{19(20)}$ -Doppelbindung in den Endprodukten 31 , 32 , 33 . B: in Alkaloiden 34 , 35 und 36 wird die $\Delta^{19(20)}$ -Doppelbindung trotz der fehlenden Hydroxylierung in Position 21 reduziert.	80
Abbildung 91: Putative Reduktion von 37 durch CurA.	80
Abbildung 92: A: Hemiaminal-Ringöffnung in 1,2-Dihydrovomilenin (28) zum α,β -ungesättigten Aldehyd; ^[130] B: anschließende Reduktion der $\Delta^{19(20)}$ -Doppelbindung zum 17- <i>O</i> -Norajmalin (28a), katalysiert durch DHVR.	84
Abbildung 93: Duale Aktivität von At Δ 24SR an einem Diensystem und/oder an einer isolierten C=C-Doppelbindung.	85
Abbildung 94: Positiv geladene Intermediate (HEI) und ihre Stabilität als limitierender Faktor bei der Reduktion von C=C-Doppelbindungen. A: durch eine Elektronziehende Gruppe (EZG) aktivierbare Doppelbindungen; B: durch eine initiale Protonierung aktivierbare Doppelbindungen in einem $\Delta^{5,7}$ - oder $\Delta^{8,14}$ -Sterol-Diensystem; C: putative „graue Zone“ mit einem aliphatischen Diensystem (siehe pilzliche Δ 24(28)SR und pflanzliche At Δ 24SR mit der gleichen Aktivität, der dazugehörige Cofaktor wurde bislang nicht bestimmt) und Resorcinreduktase (NAD(P)H-, FAD- oder Ferredoxin-abhängig?); D: durch FAD aktivierbare isolierte $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung, reduziert durch Hs Δ 24SR.	86
Abbildung 95: Der für Phloroglucinreduktase postulierte Reaktionsablauf.	87
Abbildung 96: Bindung eines Polyhistidin-Tags an die Ni-NTA-Matrix. ^[136]	121

8 Schemataverzeichnis

Schema 1: Theoretische biokatalytische Reduktion einer nicht aktivierten C=C-Doppelbindung.	1
Schema 2: Qualitative Zellaufschlussmethode nach Kushnirov. ^[108]	121

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Testreihe der Expression von <i>S. cerevisiae</i> ::pESCHIS::2x <i>AI4SR_C</i> -His ₆	66
Tabelle 2: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.	106
Tabelle 3: Verwendete <i>S. cerevisiae</i> Stämme.	106
Tabelle 4: Verwendete Vektoren.	106
Tabelle 5: Verwendete rekombinante Plasmide.	107
Tabelle 6: Umsetzung von (<i>E</i>)-4-Phenylbut-3-en-2-on (10) durch HLADH-S bzw. HLADH-E mit Glucose/GDH- Cofaktorregenerierungssystem.	142

10 Literatur

- [1] *Chirality* **1992**, *4*, 338–340.
- [2] D. J. Pollard, J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 66–73.
- [3] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
- [4] H.-P. Meyer, E. Eichhorn, S. Hanlon, S. Lütz, M. Schürmann, R. Wohlgemuth, R. Coppolecchia, *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *3*, 29–40.
- [5] B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3070–3095.
- [6] G. W. Kabalka, R. S. Varma, *Org. Prep. Proced. Int.* **1987**, *19*, 283–328.
- [7] M. Schuster, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 2036–2056.
- [8] J. Wang, Ed., *Stereoselective Alkene Synthesis*, Springer Berlin, Heidelberg, **2012**.
- [9] M. Müller, G. A. Sprenger, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 261–270.
- [10] A. Cosp, C. Dresen, M. Pohl, L. Walter, C. Röhr, M. Müller, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 759–771.
- [11] H. S. Toogood, N. S. Scrutton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 107–115.
- [12] G. Nöll, E. Kozma, R. Grandori, J. Carey, T. Schödl, G. Hauska, J. Daub, *Langmuir* **2006**, *22*, 2378–2383.
- [13] P. Cheeseman, A. Toms-Wood, R. S. Wolfe, *J. Bacteriol.* **1972**, *112*, 527–531.
- [14] C. Walsh, *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 148–155.
- [15] K.-H. Roehm, *Electron Carriers: Proteins and Cofactors in Oxidative Phosphorylation. In: eLS.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, **2001**.
- [16] J. T. Jarrett, in *Encycl. Biophys.* (Ed.: G.C.K. Roberts), Springer Berlin, Heidelberg, **2013**, pp. 1153–1156.
- [17] D. J. Heyes, P. Heathcote, S. E. J. Rigby, M. A. Palacios, R. van Grondelle, C. N. Hunter, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26847–26853.
- [18] J. Nomata, T. Kondo, T. Mizoguchi, H. Tamiaki, S. Itoh, Y. Fujita, *Sci. Rep.* **2014**, *4*, Article number: 5455.
- [19] M. J. van der Werf, A. M. Boot, *Microbiology* **2000**, *146*, 1129–1141.
- [20] K. Shimoda, D. I. Ito, S. Izumi, T. Hirata, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1996**, *4*, 355–358.
- [21] H. S. Toogood, J. M. Gardiner, N. S. Scrutton, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 892–914.
- [22] S. K. Padhi, D. J. Bougioukou, J. D. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3271–3280.
- [23] A. Fryszkowska, H. Toogood, M. Sakuma, J. M. Gardiner, G. M. Stephens, N. S. Scrutton, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2976–2990.
- [24] B. V. Adalbjörnsson, H. S. Toogood, A. Fryszkowska, C. R. Pudney, T. A. Jowitt, D. Leys, N. S. Scrutton, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 197–207.
- [25] M. S. Alphey, W. Yu, E. Byres, D. Li, W. N. Hunter, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3068–3077.
- [26] P. A. Hubbard, X. Liang, H. Schulz, J.-J. P. Kim, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 37553–37560.
- [27] K. L. Ringer, M. E. McConkey, E. M. Davis, G. W. Rushing, R. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *418*, 80–92.
- [28] R. A. Dick, T. W. Kensler, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17269–17277.
- [29] R. G. Rosenthal, M.-O. Ebert, P. Kiefer, D. M. Peter, J. A. Vorholt, T. J. Erb, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 50–55.
- [30] S. Kara, J. H. Schrittwieser, F. Hollmann, M. B. Ansorge-Schumacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1517–1529.
- [31] M. De Rosa, A. Gambacorta, *Prog. Lipid Res.* **1988**, *27*, 153–175.
- [32] T. Eguchi, M. Morita, K. Kakinuma, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5427–5433.

- [33] Y. Nishimura, T. Eguchi, *Bioorg. Chem.* **2007**, *35*, 276–283.
- [34] S. Sato, M. Murakami, T. Yoshimura, H. Hemmi, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 3923–3929.
- [35] Y. Keller, F. Bouvier, A. d' Harlingue, B. Camara, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *251*, 413–417.
- [36] J. Pennock, F. Hemming, R. Morton, *Nature* **1960**, *186*, 470–472.
- [37] N. Behrens, L. Leloir, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1970**, *66*, 153–159.
- [38] T. J. Ekström, T. Chojnacki, G. Dallner, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4090–4097.
- [39] H. Sagami, A. Kurisaki, K. Ogura, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 10109–10113.
- [40] H. Sagami, Y. Igarashi, S. Tateyama, K. Ogura, J. Roos, W. J. Lennarz, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9560–9566.
- [41] V. Cantagrel, D. J. Lefeber, B. G. Ng, Z. Guan, J. L. Silhavy, S. L. Bielas, L. Lehle, H. Hombauer, M. Adamowicz, E. Swiezewska, et al., *Cell* **2010**, *142*, 203–217.
- [42] P. Gramatica, B. M. Ranzi, P. Manitto, *Bioorg. Chem.* **1981**, *10*, 22–28.
- [43] P. Gramatica, P. Manitto, B. M. Ranzi, A. Delbianco, M. Francavilla, *Experientia* **1982**, *38*, 775–776.
- [44] C. Fuganti, P. Grasselli, S. Servi, H.-E. Högberg, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1988**, *12*, 3061–3065.
- [45] P. Ferraboschi, S. Casati, E. Santaniello, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 19–20.
- [46] P. Ferraboschi, S. R. Elahi, E. Verza, F. M. Rivolta, E. Santaniello, *Synlett* **1996**, 1176–1778.
- [47] P. Ferraboschi, S. Reza-Elahi, E. Verza, E. Santaniello, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2639–2642.
- [48] C. Fuganti, S. Serra, A. Dulio, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1999**, *3*, 279–282.
- [49] H. A. Kirst, W.-K. Yeh, *Enzyme Technologies for Pharmaceutical and Biotechnological Applications*, CRC Press, Boca Raton, **2001**.
- [50] I. A. Kaluzna, T. Matsuda, A. K. Sewell, J. D. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12827–12832.
- [51] P. Gramatica, B. M. Ranzi, P. Manitto, *Bioorg. Chem.* **1981**, *10*, 22–28.
- [52] J. Peters, T. Minuth, M.-R. Kula, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 950–958.
- [53] C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Academic Press, New York, **1994**.
- [54] W. Hummel, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 487–492.
- [55] M. Müller, M. Wolberg, T. Schubert, W. Hummel, in *Technol. Transf. Biotechnol.*, Springer Berlin, Heidelberg, **2005**, pp. 261–287.
- [56] D. Gamemara, G. A. Seoane, P. Saenz-Méndez, P. D. de María, in *Redox Biocatal.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, **2012**, pp. 101–179.
- [57] A. Jakoblinert, M. Bocola, M. Bhattacharjee, S. Steinsiek, M. Bönitz-Dulat, U. Schwaneberg, M. B. Ansorge-Schumacher, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 803–809.
- [58] R. Guo, Y. Nie, X. Q. Mu, Y. Xu, R. Xiao, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *105*, 66–73.
- [59] H. Man, C. Loderer, M. B. Ansorge-Schumacher, G. Grogan, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1103–1111.
- [60] A. Arnone, R. Bernardi, F. Blasco, R. Cardillo, G. Resnati, I. I. Gerus, V. P. Kukhar, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2809–2818.
- [61] A. Hage, D. G. I. Petra, J. A. Field, D. Schipper, J. B. P. A. Wijnberg, P. C. J. Kamer, J. N. H. Reek, P. W. N. M. van Leeuwen, R. Wever, H. E. Schoemaker, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 1025–1034.
- [62] T. Zelinski, A. Liese, C. Wandrey, M.-R. Kula, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1681–1687.
- [63] T. Schubert, Dissertation, Forschungszentrum Jülich, **2002**.
- [64] H. Yamamoto, N. Kawada, A. Matsuyama, Y. Kobayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 1051–1055.

- [65] C. Gantert, Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, **2012**.
- [66] R. Pietruszko, H. Theorell, *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, *131*, 288–298.
- [67] H. Theorell, Å. Åkeson, B. Liszka-Kopeć, C. de Zalenski, *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *139*, 241–247.
- [68] D. H. Park, B. V. Plapp, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 13296–13302.
- [69] G. Waller, H. Theorell, J. Sjövall, *Arch. Biochem. Biophys.* **1965**, *111*, 671–684.
- [70] W. R. Nes, *Lipids* **1974**, *9*, 596–612.
- [71] H. Schaller, *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 163–175.
- [72] T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, M. Karttunen, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 97–121.
- [73] L. W. Parks, W. M. Casey, *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*, 95–116.
- [74] P. Benveniste, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, 429–457.
- [75] P. J. Espenshade, A. L. Hughes, *Annu. Rev. Genet.* **2007**, *41*, 401–427.
- [76] F. F. Moebius, B. U. Fitzky, J. N. Lee, Y.-K. Paik, H. Glossmann, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 1899–1902.
- [77] S.-H. Bae, J. N. Lee, B. U. Fitzky, J. Seong, Y.-K. Paik, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 14624–14631.
- [78] J.-N. Lee, Y.-K. Paik, *J. Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *5*, 370–377.
- [79] D. C. Wilton, K. A. Munday, S. J. M. Skinner, M. Akhtar, *Biochem. J.* **1968**, *106*, 803–810.
- [80] H. Nishino, T. Ishibashi, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *374*, 293–298.
- [81] L. Zou, L. Li, T. D. Porter, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *127*, 435–438.
- [82] I. H. Lemmens, K. Kas, J. Merregaert, W. J. M. Van de Ven, *Genomics* **1998**, *49*, 437–442.
- [83] K. Schrick, U. Mayer, A. Horrichs, C. Kuhnt, C. Bellini, J. Dangl, J. Schmidt, G. Jürgens, *Genes Dev.* **2000**, *14*, 1471–1484.
- [84] R. T. Lorenz, L. W. Parks, *DNA Cell Biol.* **1992**, *11*, 685–692.
- [85] M. Akhtar, (in part) C. Jones, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 813–832.
- [86] Y. K. Paik, J. M. Trzaskos, A. Shafiee, J. L. Gaylor, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 13413–13423.
- [87] C.-K. Kim, K.-I. Jeon, D.-M. Lim, T.-N. Johng, J. M. Trzaskos, J. L. Gaylor, Y.-K. Paik, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1995**, *1259*, 39–48.
- [88] M. Taton, P. Benveniste, A. Rahier, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *185*, 605–614.
- [89] A. Prakash, D. Kasbekar, *Mol. Genet. Genomics* **2002**, *266*, 787–795.
- [90] D. Zweytick, C. Hrastrnik, S. D. Kohlwein, G. Daum, *FEBS Lett.* **2000**, *470*, 83–87.
- [91] X. He, B. Zhang, H. Tan, *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 773–778.
- [92] E. Lecain, X. Chenivresse, R. Spagnoli, D. Pompon, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 10866–10873.
- [93] U. Klahre, T. Noguchi, S. Fujioka, S. Takatsuto, T. Yokota, T. Nomura, S. Yoshida, N.-H. Chua, *Plant Cell Online* **1998**, *10*, 1677–1690.
- [94] S. Choe, B. P. Dilkes, B. D. Gregory, A. S. Ross, H. Yuan, T. Noguchi, S. Fujioka, S. Takatsuto, A. Tanaka, S. Yoshida, et al., *Plant Physiol.* **1999**, *119*, 897–908.
- [95] H. R. Waterham, J. Koster, G. J. Romeijn, R. C. M. Hennekam, P. Vreken, H. C. Andersson, D. R. FitzPatrick, R. I. Kelley, R. J. A. Wanders, *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, *69*, 685–694.
- [96] D. Silvestro, T. G. Andersen, H. Schaller, P. E. Jensen, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56429.
- [97] X. Lu, Y. Li, J. Liu, X. Cao, X. Wang, D. Wang, H. Seo, B. Gao, *J. Mol. Endocrinol.* **2012**, *48*, 1–9.
- [98] S. D. Gilk, P. A. Beare, R. A. Heinzen, *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 6154–6159.
- [99] H. Guan, S. You, L. Yang, X. Wang, R. Ni, *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 1189–1193.

- [100] Hong Guan, Song You, Xu Wang, Li Yang, *Biocatal. Biotransformation* **2010**, 28, 185–191.
- [101] R. C. Martin, M. C. Mok, G. Shaw, D. W. S. Mok, *Plant Physiol.* **1989**, 90, 1630–1635.
- [102] A. Gaudinová, P. I. Dobrev, B. Šolcová, O. Novák, M. Strnad, D. Friedecký, V. Motyka, *J. Plant Growth Regul.* **2005**, 24, 188–200.
- [103] T. Awakawa, N. Fujita, M. Hayakawa, Y. Ohnishi, S. Horinouchi, *ChemBioChem* **2011**, 12, 439–448.
- [104] S. Gao, G. von Schumann, J. Stöckigt, *Planta Med.* **2002**, 68, 906–911.
- [105] M. Ruppert, X. Ma, J. Stöckigt, *Curr. Org. Chem.* **2005**, 9, 1431–1444.
- [106] H. R. Levy, F. A. Loewus, B. Vennesland, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 2949–2953.
- [107] H. K. Chenault, E. S. Simon, G. M. Whitesides, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1988**, 6, 221–70.
- [108] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature* **1975**, 258, 598–599.
- [109] V. V. Kushnirov, *Yeast* **2000**, 16, 857–860.
- [110] S. Wagner, M. M. Klepsch, S. Schlegel, A. Appel, R. Draheim, M. Tarry, M. Högbom, K. J. van Wijk, D. J. Slotboom, J. O. Persson, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105, 14371–14376.
- [111] A. S. Robinson, *Production of Membrane Proteins: Strategies for Expression and Isolation*, John Wiley & Sons, Singapore, **2011**.
- [112] S. Schlegel, J. Löfblom, C. Lee, A. Hjelm, M. Klepsch, M. Strous, D. Drew, D. J. Slotboom, J.-W. de Gier, *J. Mol. Biol.* **2012**, 423, 648–659.
- [113] M. A. White, K. M. Clark, E. J. Grayhack, M. E. Dumont, *J. Mol. Biol.* **2007**, 365, 621–636.
- [114] T. Volk, Dissertation, Hochschule Mannheim, **2013**.
- [115] C. Robichon, J. Luo, T. B. Causey, J. S. Benner, J. C. Samuelson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, 77, 4634–4646.
- [116] N. Katzke, S. Arvani, R. Bergmann, F. Circolone, A. Markert, V. Svensson, K.-E. Jaeger, A. Heck, T. Drepper, *Protein Expr. Purif.* **2010**, 69, 137–146.
- [117] A. Krogh, B. Larsson, G. von Heijne, E. L. L. Sonnhammer, *J. Mol. Biol.* **2001**, 305, 567–580.
- [118] E. L. Sonnhammer, G. von Heijne, A. Krogh, *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. ISMB Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **1998**, 6, 175–82.
- [119] H. Viklund, A. Elofsson, *Bioinformatics* **2008**, 24, 1662–1668.
- [120] I. Mus-Veteau, *Membrane Proteins Production for Structural Analysis*, Springer, New York, **2014**.
- [121] J. Stoll, A. G. Rosenwald, S. S. Krag, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 10774–10782.
- [122] S. Tateyama, H. Sagami, *J. Biochem. (Tokyo)* **2001**, 129, 297–302.
- [123] A. Koskinen, M. Lounasmaa, L. Zechmeister, Ed., *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer, New York, **1983**.
- [124] G. A. Cordell, *The Alkaloids Chemistry and Biology*, Academic Press, New York, **1998**.
- [125] E. Bombardelli, A. Bonati, B. Gabetta, E. Martinelli, G. Mustich, B. Danieli, *Phytochemistry* **1976**, 15, 2021–2022.
- [126] A. Hassaninasab, Y. Hashimoto, K. Tomita-Yokotani, M. Kobayashi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108, 6615–6620.
- [127] E. I. Mercer, *Lipids* **1991**, 26, 584–597.
- [128] A. Prakash, D. P. Kasbekar, *J. Biosci.* **2002**, 27, 105–112.
- [129] S. Silve, P.-H. Dupuy, P. Ferrara, G. Loison, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1998**, 1392, 233–244.
- [130] F. Libot, N. Kunesch, J. Poisson, *Phytochemistry* **1980**, 19, 989–991.
- [131] M. Boll, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 10, 132–142.

- [132] M. Boll, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2005**, 1707, 34–50.
- [133] J. W. Kung, S. Baumann, M. von Bergen, M. Müller, P.-L. Hagedoorn, W. R. Hagen, M. Boll, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 9850–9856.
- [134] A. M. Edwards, in *Flavins Flavoproteins* (Eds.: S. Weber, E. Schleicher), Springer New York, New York, NY, **2014**, pp. 3–13.
- [135] M. Lohrie, W. Knoche, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 919–924.
- [136] *The QIAexpressionist™ A Handbook for High-Level Expression and Purification of 6xHis-Tagged Proteins*, Qiagen, **2003**.
- [137] J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL Press, New York, **2001**.
- [138] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, 227, 680–685.

11 Anhang

Die codonoptimierte Sequenz PPR_C-His₆

```
1           10           20           30           40           50
|           |           |           |           |           |
CACTAAAGGGCGGCCAAAAATGGCTGGTGGGCTGGTGCTGAATTGTCTG
TTTTGAATCCATTGAGAGCTTTGTGGTTGTTGTTGGCTGCTGCTTTTTTG
TTGGCTTTGTTGTTGCAATTGGCTCCAGCTAGATTATTGCCATCTTGTGC
TTTGTTCOAAGACTTGATTAGATACGGTAAGACCAAGCAATCTGGTTCTA
GAAGACCAGCTGTATGTAGAGCTTTTGATGTTCCAAAGAGATACTTCTCC
CACTTCTACGTTGTTTTCTGTTTTGTGGAATGGTTCCTTGTTGTGGTTCTT
GTCTCAATCTTTGTTTTTGGGTGCTCCATTTCCATCTTGGTGTGGGCTT
TATTGAGAAGCTTTGGGTGTTACTCAATTCOAAGCTTTGGGTATGGAATCT
AAGGCCCTCTAGAATTCOAAGCTGGTGAATTGGCATTGTCCACTTTCTTGGT
TTTGGTTTTCTTGTGGGTTCACTCCTTGAGAAGATTATTCGAATGCTTCT
ACGTCAGTGTTTTCTCCAACACTGCTATCCATGTTGTTCAATACTGTTTC
GGTTTTGGTCTACTACGTTTTGGTTGGTTTGACTGTTTTGTCCCAAGTTCC
AATGAACGATAAGAACGTTTACGCCTTGGGTAAAGAACTTGTTGTTACAAG
CTAGATGGTTCCACATCTTGGGTATGATGATGTTTTTTTTGGTCCTCCGCT
CATCAATACAAGTGCCATGTTATTTTGTCCAATTTGAGAAGAAACAAGAA
GGGTGTTGTTATCCATTGCCAACATAGAATTCATTTCGGTGAAGTTG
AATTATACGGTGAAGAAAGATCTCCAGGTGATAGATTTCCATCCTCTAGA
AGACATCATCATCATCATTGAGCTCTTAATTAA
```