

Mikrobielle Biosynthese von (3S,4R)-4-Amino-3-hydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure mit rekombinanten *Escherichia coli*-Zellen: Molekulargenetische und biochemische Untersuchungen

Von der Fakultät für Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Stefan Kozak

aus Aachen

Hauptberichter: Prof. Dr. G. A. Sprenger

Mitberichter: Prof. Dr. A. Stolz

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2006

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart

2006

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden unter der Leitung von Prof. Dr. G. A. Sprenger am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart sowie am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich durchgeführt.

Kurzfassung

Ziel dieser Arbeit war die mikrobielle Biosynthese des Aminocyclitols (3S,4R)-4-Amino-3-hydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure (3,4-CHA) aus dem nachwachsenden Rohstoff Glukose; sie sollte ausgehend von Chorisminsäure über das Intermediat 4-Amino-4-desoxychoris-minsäure (ADC) ablaufen. Chorisminsäure ist der zentrale Verzweigungspunkt bei der Bio-synthese von aromatischen Verbindungen in *Escherichia coli*, ADC tritt in *E. coli* als Inter-mediat bei der Biosynthese von *p*-Aminobenzoessäure auf. Durch eine für *E. coli* nicht physiologische Etherspaltung sollte dann ADC zum Zielprodukt 3,4-CHA und Pyruvat umgesetzt werden. Da zu Beginn dieser Arbeit kein Enzym beschrieben worden war, das diese Reaktion katalysiert, war zunächst nicht bekannt, ob und mit welchem Enzym diese Reaktion durchführbar sein würde.

Zunächst wurde das vermutete Gen einer ADC-Synthase, *pabAB*, aus *Corynebacterium glutamicum* in den Expressionsvektor pJF119EH kloniert. Der *E. coli*-Stamm KB532, ein Stamm mit einem erhöhten Stofffluss zu Chorisminsäure, wurde anschließend mit dem Plasmid transformiert und fermentiert. Im Fermentationsüberstand wurden 7 g/l ADC und 15,4 g/l Chorisminsäure nachgewiesen. Somit konnte ein ADC-produzierender *E. coli*-Stamm etabliert und gezeigt werden, dass das Gen *pabAB_{C.gl.}* eine aktive ADC-Synthase kodiert.

Um ein geeignetes Konstrukt für die Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA zu erhalten, wurde das Gen *His₁₀-phzD*, das ein Fusionsprotein der Isochorismatase PhzD aus *Pseudomonas aeruginosa* mit einem aminoterminalen Histidinschwanz kodiert, zusammen mit *pabAB_{C.gl.}* in den Expressionsvektor pJF119EH kloniert. Dieses Plasmid wurde anschließend in den *E. coli*-Stamm KB532 transformiert. Bei einer Fermentation des erzeugten Stammes konnte im Kulturüberstand eine maximale Produktkonzentration von 2,8 g/l 3,4-CHA erreicht werden; die Cyclohexadiendiol-carbonsäure (3S,4R)-3,4-Dihydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure (3,4-CHD) trat hierbei als Nebenprodukt auf. Das Verhältnis von gebildetem 3,4-CHA zu 3,4-CHD schwankte je nach Fermentationsbedingungen und -dauer zwischen 1:1 und 1:3. Die erreichten Produktausbeuten zeigen, dass PhzD sowohl ADC als auch Chorisminsäure als Substrate akzeptiert und diese zu 3,4-CHA und Pyruvat bzw. 3,4-CHD und Pyruvat umsetzt. Dies war auch während der Durchführung dieser Arbeit berichtet worden (Parsons, J. *et al.* (2003) *Biochemistry* 42: 5684-5693), jedoch war die bei der Fermentation erhaltene 3,4-CHA-Produktausbeute größer, als die veröffentlichten Ergebnisse erwarten ließen.

Die Isochorismatase PhzD aus *Pseudomonas aeruginosa* und die Isochorismatase EntB aus *Escherichia coli* wurden biochemisch charakterisiert. Das *phzD*-Gen wurde kloniert und als Fusionsprotein mit einem aminoterminalen 10-fachen Histidinschwanz überexprimiert; *entB*

wurde ebenfalls kloniert und mit einem 6-fachen carboxyterminalen Histidinschwanz über-exprimiert. Ausgehend vom Rohextrakt eines rekombinanten *E. coli*-Stamms wurden die beiden Enzyme in einem Schritt mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt. Die Ausbeute betrug hierbei je Liter Expressionskultur 20 mg EntB-Fusionsprotein bzw. 25 mg PhzD-Fusionsprotein. Von beiden aufgereinigten Enzymen wurden die kinetischen Parameter für die Substrate ADC und Chorisminsäure mit einem gekoppelten Enzymtest bestimmt. Bei einem pH-Wert von 7,5 und einer Temperatur von 37 °C wurden für PhzD die folgenden Werte für k_{cat} und K_{M} ermittelt. Für das Substrat ADC beträgt der K_{M} -Wert $1,5 \pm 0,3$ mM und k_{cat} ist $4,1 \pm 0,12$ s⁻¹; bei dem Substrat Chorisminsäure beträgt der K_{M} -Wert $1,2 \pm 0,15$ mM und k_{cat} $39 \pm 0,8$ s⁻¹. Für das Enzym EntB wurden unter den gleichen Bedingungen für das Substrat ADC ein K_{M} -Wert von $1,4 \pm 0,3$ mM und ein k_{cat} -Wert von $2 \pm 0,05$ s⁻¹ bestimmt. Für das Substrat Chorisminsäure betrug der K_{M} -Wert $1,1 \pm 0,15$ mM und k_{cat} 56 ± 3 s⁻¹. Die kinetischen Parameter zeigen, dass mit beiden Enzymen die Um-setzung von ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat möglich ist. PhzD ist jedoch hierfür besser geeig-net, während sich EntB besser für die Umsetzung von Chorisminsäure zu 3,4-CHD und Pyruvat eignet. Die ermittelten kinetischen Parameter für PhzD unterscheiden sich von den bereits veröffentlichten Werten (Parsons, J. *et al.* (2003) *Biochemistry* 42: 5684-5693). Während die Werte für K_{M} in der gleichen Größenordnung liegen, sind die bestimmten Werte für k_{cat} für die beiden Substrate Chorisminsäure und ADC deutlich größer als beschrieben.

Abstract

The purpose of this thesis was the microbial biosynthesis of aminocyclitol (3S,4R)-4-amino-3-hydroxycyclohexa-1,5-dienecarboxylic acid (3,4-CHA) from glucose resulting from a synthesis starting with chorismic acid via the intermediate 4-amino-4-deoxychorismate (ADC). Chorismic acid is the central branchpoint in the biosynthesis of aromatic compounds in *Escherichia coli*. ADC is an intermediate in the biosynthesis of folic acid in *E. coli*. An ether cleavage, non-physiological for *E. coli*, should yield the target compound 3,4-CHA along with pyruvate. This conversion has not been described in literature prior to the beginning of this thesis and it was uncertain whether it would actually be possible.

First, the putative gene of an ADC-synthase in *Corynebacterium glutamicum*, *pabAB_{C.gl.}*, was cloned in the expression vector pJF119EH. The plasmid was then transformed in *E. coli*-strain KB532, which has an increased flux towards chorismic acid. Upon fermentation, this strain yielded 7g/l ADC along with 15,4 g/l chorismic acid in the fermentation broth. Thus, an ADC-producing strain was established and proof was given that the gene *pabAB_{C.gl.}* encodes for an active ADC-synthase.

To get a suitable construct for the conversion of ADC to 3,4-CHA, the gene *his-phzD*, which encodes for a fusion protein of isochorismatase PhzD from *Pseudomonas aeruginosa* with an amino-terminal histidin-tag was cloned in the expression vector pJF119EH together with *pabAB_{C.gl.}*. This construct was transformed into KB532 and upon fermentation, this strain yielded 2,8 g/l 3,4-CHA along with cyclohexadienediol (3S,4R)-3,4-dihydroxycyclohexa-1,5-dienecarboxylic acid (3,4-CHD) as byproduct. The ratio of 3,4-CHA to 3,4-CHD varied between 1:1 and 1:3 depending on fermentation conditions. These product yields indicate that PhzD accepts both, ADC and chorismic acid, as a substrate and converts them to 3,4-CHA and pyruvate or 3,4-CHD and pyruvate. This has also been reported in the meantime (Parsons, J. *et al.* (2003) *Biochemistry* 42: 5684-5693), although the resulting 3,4-CHA yield in the fermentation was much higher than expected according to the published data.

Both isochorismatase PhzD from *Pseudomonas aeruginosa* and isochorismatase EntB from *Escherichia coli* have been characterized biochemically. The *phzD*-gene has been cloned and overexpressed as a fusion protein with a 10-fold amino-terminal histidin-tag, *entB* has been cloned as well and was overexpressed as a fusion protein with a 6-fold carboxy-terminal histidin tag. Both enzymes were purified to apparent homogeneity in a one-step purification by Ni²⁺-affinity chromatography from crude extract of recombinant *E. coli*-strains. The protein yield for EntB was 20 mg per liter expression culture and for PhzD 25 mg per liter expression culture. For both purified enzymes the kinetic constants have been determined by a

coupled enzymatic assay at pH 7,5 and 37 °C. For the enzyme PhzD, K_M is $1,5 \pm 0,3$ mM and k_{cat} is $4,1 \pm 0,12$ s⁻¹ for the substrate ADC, K_M is $1,2 \pm 0,15$ mM and k_{cat} is $39 \pm 0,8$ s⁻¹ for the substrate chorismic acid. For the enzyme EntB and the substrate ADC values are $1,4 \pm 0,3$ mM for K_M and $2 \pm 0,05$ s⁻¹ for k_{cat} . For the substrate chorismic acid values for K_M and k_{cat} have been determined to be $1,1 \pm 0,15$ mM and 56 ± 3 s⁻¹. These kinetic constants show, that both enzymes are capable of converting ADC to 3,4-CHA and pyruvate. While EntB is better suited to convert chorismic acid to 3,4-CHD and pyruvate, PhzD is the better enzyme for the conversion of ADC to 3,4-CHA and pyruvate. The measured kinetic constants differ from those previously reported (Parsons, J. *et al.* (2003) *Biochemistry* 42: 5684-5693). The values for K_M are about the same order of magnitude, but the values for k_{cat} are significantly higher than the published data.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	3
Abstract	5
Abkürzungen	11
1. Einleitung	15
1.1 Der Shikimisäureweg	15
1.2 Mikrobielle Produktion von Chorisminsäure	18
1.3 CHORUS (Chorisminsäure als universeller Synthesebaustein)	19
1.4 Mikrobielle Produktion der Cyclohexadiendiole 2,3-CHD und 3,4-CHD	22
1.5 Die funktionalisierten Cyclohexadienaminoalkohole 2,3-CHA und 3,4-CHA.....	25
1.6 Darstellung von 2,3-CHA und ADIC	25
1.6.1 Synthetischer Zugang zu 2,3-CHA und ADIC	25
1.6.2 Mikrobieller Zugang zu 2,3-CHA	26
1.6.3 Mögliche Anwendungen für 2,3-CHA	26
1.7 Der Cyclohexadienaminoalkohol 3,4-CHA	27
1.8 Bisheriger Zugang zu 3,4-CHA und ADC	30
1.9 Zielsetzung der Arbeit	31
1.10 Vorarbeiten zu den einzelnen geplanten Schritten zur mikrobiellen Synthese von 3,4-CHA	34
1.10.1 Schritt 1: Konstruktion eines Stamms mit hohem Stofffluss zu Choris- minsäure	34
1.10.2 Schritt 2: Erhöhung des Stoffflusses von Chorisminsäure zu ADC: Aminierung von Chorisminsäure durch das Enzym ADC-Synthase	36
1.10.3 Schritt 3: (Effektive) Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat	39
1.10.3.1 Die Isochorismatase EntB aus <i>E. coli</i>	39
1.10.3.2 Die Isochorismatase PhzD aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
2. Material und Methoden	42
2.1 Chemikalien und Enzyme	42
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	43
2.3 Kultivierung von Bakterien	45
2.3.1 Nährmedien	45
2.3.2 Medienzusätze	46

2.3.3	Kultivierungsbedingungen	47
2.3.4	Bestimmung von Biomasse	47
2.4	Transformation von <i>E. coli</i>	47
2.5	Molekularbiologische Methoden	49
2.5.1	DNA-Präparation	49
2.5.2	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	49
2.5.3	DNA-Fällung durch Ethanol	49
2.5.4	Agarose-Gelelektrophorese	50
2.5.5	Behandlung mit alkalischer Phosphatase	50
2.5.6	Ligation von DNA-Fragmenten	50
2.5.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	51
2.5.8	<i>error-prone</i> PCR	52
2.5.9	Overlap-PCR	52
2.5.10	Ortsgerichtete Mutagenese	53
2.5.11	DNA-Sequenzierung	54
2.5.12	P1-Transduktion von <i>Escherichia coli</i>	55
2.5.13	Chromosomale Integration von Genen	55
2.6	Proteinbiochemische Methoden	56
2.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	56
2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
2.6.3	Proteinfällung durch Trichloressigsäure	57
2.6.4	Zellaufschluss	58
2.6.4.1	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	58
2.6.4.2	Zellaufschluss durch Ultraschall	58
2.6.5	Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie	58
2.6.6	Ultrafiltration von Proteinen	59
2.6.7	Entfernung des aminoterminalen Histidinschwanzes von Proteinen	59
2.6.8	Bestimmung der Glukosekonzentration	60
2.7	Enzymaktivitätsbestimmungen	60
2.7.1	Photometrischer gekoppelter enzymatischer Test	60
2.7.2	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	60

3. Ergebnisse	62
3.1 Mikrobielle Synthese von ADC: Aminierung von Chorisminsäure durch das Enzym ADC-Synthase (PabAB)	62
3.1.1 Die ADC-Synthase PabA/PabB aus <i>E. coli</i>	62
3.1.2 Die vermutete ADC-Synthase PabAB aus <i>Corynebacterium glutamicum</i> ...	63
3.1.3 Die ADC-Synthase PabAB _{C.gl.} mit aminoterminalem Histidinschwanz	67
3.1.4 Mikrobielle Synthese von ADC mit KB532/pC53	69
3.2 Mikrobielle Synthese von 3,4-CHA: Spaltung von ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat durch das Enzym PhzD	71
3.2.1 Überexpression der Isochorismatase PhzD	71
3.2.2 Mikrobielle Synthese von 3,4-CHA mit KB532/pC78	73
3.2.3 Einfluss der Deletion des Gens der pABA-Synthase <i>pabC</i> auf die 3,4-CHA-Produktion	77
3.3 Biochemische Charakterisierung der Isochorismatasen PhzD und EntB	78
3.3.1 Expression und Aufreinigung von PhzD und EntB	78
3.3.2 Qualitativer Nachweis der PhzD- und EntB-Aktivität mittels RP-HPLC	80
3.3.3 Bestimmung der kinetischen Parameter von PhzD und EntB	81
3.3.4 Einfluss der Mutation V71M auf die PhzD-Aktivität	83
3.3.5 Einfluss des Histidinschwanzes auf die PhzD-Aktivität	84
3.3.6 Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivität	85
3.4 Veränderung der Enzymaktivität von PhzD	86
3.4.1 Ortsgerichtete Mutagenese	87
3.4.2 Erstellung einer PhzD-Mutein-Bibliothek mittels <i>error-prone</i> PCR	87
3.4.3 ¹ H-NMR-Screening der PhzD-Mutein-Bibliothek	91
3.5 Mikrobielle 3,4-CHA-Synthese im Schüttelkolben	92
3.6 Stammkonstruktion und Pyruvat-Recycling	94
4. Diskussion	98
4.1 Die ADC-Synthase PabA/PabB aus <i>Escherichia coli</i>	99
4.2 Die ADC-Synthase PabAB _{C.gl.} aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	100
4.3 Mikrobielle Synthese von ADC und 3,4-CHA	102
4.3.1 Mikrobielle Synthese von ADC	102
4.3.2 Mikrobielle Synthese von 3,4-CHA im Fermenter	104
4.3.3 Mikrobielle Synthese von 3,4-CHA im Schüttelkolben	110

4.4 Biochemische Charakterisierung der beiden Enzyme PhzD und EntB	111
4.5 Einfluss von Mutationen auf die Enzymaktivität von PhzD	118
4.6 Zusammenfassung	123
5. Literatur	125
Danksagung	136
Lebenslauf	137

Abkürzungen

2,3-CHA	(5S,6S)-6-Amino-5-hydroxycyclohexa-1,3-dien-carbonsäure
2,3-CHD	(5S,6S)-5-6-Dihydroxycyclohexa-1-3-dien-carbonsäure
3,4-CHA	(3R,4R)-4-Amino-3-hydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure
3,4-CHD	(3R,4R)-3,4-Dihydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure
Å	Ångström = 10^{-10} m (Längeneinheit)
ADC	4-Amino-4-desoxychorisminsäure
ADIC	2-Amino-2-desoxyisochorisminsäure
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
AroB	DHQ-Synthase
AroF	DAHP-Synthase; durch Tyrosin inhibierbar
AroF*	DAHP-Synthase; nicht mehr durch Tyrosin inhibierbar
AroG	DAHP-Synthase; durch Phenylalanin inhibierbar
AroH	DAHP-Synthase; durch Tryptophan inhibierbar
AroL	Shikimat-Kinase
ATP	Adenosin-triphosphat
AU	Absorptionseinheit
b	Base
Bla	β-Lactamase
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius (Temperatureinheit)
<i>C. gl.</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
CHA	Cyclohexadienaminoalkohol-Carbonsäure
CHD	Cyclohexadiendiol-Carbonsäure
CHORUS	Chorisminsäure als universeller Synthesebaustein
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
c-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
DAHP	3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat
d. h.	das heißt
DHHA	<i>trans</i> -2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilsäure
DHQ	3-Dehydroquininsäure (3-Dehydrochinasäure)
DHS	3-Dehydroshikimisäure
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMA	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ε	Extinktionskoeffizient bei einer bestimmten Wellenlänge
E4P	Erythrose-4-phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EntA	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoat-Dehydrogenase

EntB	Isochorismatase aus <i>Escherichia coli</i>
EntC	Isochorismat-Synthase aus <i>Escherichia coli</i>
entCEBA	Operon, das Gene zur Biosynthese von Enterobactin kodiert
EPSP	5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat
et al.	et alteri
etc.	et cetera
FAME	Mikrobielle Aromatensynthese auf Zuckerbasis – Prozessentwicklung zur biotechnologischen Herstellung von Feinchemikalien (Fermentation and Metabolic Engineering for the sustainable production of fine chemicals)
g	Gramm (Masseneinheit)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde (Zeiteinheit)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	Hochleistungs-/Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IBT	Institut für Biotechnologie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
J	Joule (Energieeinheit)
k	Präfix: kilo- (10^3)
K	Kelvin (Temperatureinheit)
Kan	Kanamycin
k_{cat}	Wechselzahl (Einheit = [1/s])
K_M	Michaelis-Konstante (Einheit = [M])
K_m^R	Kanamycin-Resistenz
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB	Luria-Bertani
LDH	L-Lactat-Dehydrogenase
ln	natürlicher Logarithmus
μ	Präfix: mikro- (10^{-6})
m	Meter (Längeneinheit) Präfix: milli- (10^{-3})
M	molar
MenF	Isochorismat-Synthase aus <i>Escherichia coli</i>
m-CPBA	meta-Chlorperoxybenzoesäure
min	Minute (Zeiteinheit)
MM	Minimalmedium
mol	Mol (Stoffmengeneinheit)
MOM	Methoxymethyl
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
n	Präfix: nano- (10^{-9})
NAD	Nicotin-adenin-dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotin-adenin-dinukleotid (reduzierte Form)
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
PabA	Glutamin-Amidotransferase, Hilfsenzym der ADC-Synthase PabB
pABA	para-Aminobenzoesäure
PabAB	ADC-Synthase
PabB	ADC-Synthase
PabC	pABA-Synthase

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
P _i	anorganisches Phosphat
PheA	Chorisminsäure-Mutase/Prephensäure-Dehydratase
PhzD	Isochorismatase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PhzE	2-Amino-2-desoxyisochorisminsäure-Synthase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Ppc	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
Ppm	parts per million
<i>pps</i>	Gen der Phosphoenolpyruvat-Synthetase
PQQ	Pyrroloquinolin-Quinon
Pyk	Pyruvat-Kinase
Pyr	Pyruvat
<i>rac</i>	racemisch
RE	Rohextrakt
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reversed phase
s	Sekunde (Zeiteinheit)
S3P	Shikimisäure-3-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBS-Tf	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyltriflat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transferribonukleinsäure
TrpE	Anthranilat-Synthase
TrpG	Glutamin-Amidotransferase, Bestandteil der Anthranilat-Synthase
TyrA	Chorisminsäure-Mutase/Prephensäure-Dehydrogenase
U	Unit (Enzymeinheit in [μmol/min])
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit (Einheit = [U/mg])
Wt	Wildtyp

Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

Escherichia coli ist ein vielfach untersuchter Mikroorganismus und wird als prokaryotischer Modellorganismus angesehen (Neidhardt *et al.*, 1996). Mit *E. coli* werden eine Vielzahl von Verbindungen biotechnologisch produziert, so z.B. die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan (Leuchtenberger, 1996). Die Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tryptophan sind für Vertebraten essentiell und müssen daher mit der Nahrung aufgenommen werden. Sie werden z.B. als Futteradditive verwendet, und deshalb besteht ein hoher Bedarf dieser Aminosäuren.

Ausgehend von den aromatischen Aminosäuren werden eine Vielzahl von enzymatischen und chemischen Synthesen durchgeführt. Der Farbstoff Indigo kann biotechnologisch ausgehend von L-Tryptophan gebildet werden (Ensley *et al.*, 1983; Murdock *et al.*, 1993), und L-Tyrosin kann für die Produktion von Melanin eingesetzt werden (Della-Cioppa *et al.*, 1990). Eine weitere wichtige Synthese besteht in der Produktion des künstlichen Süßstoffs Aspartam (L-Aspartyl-L-Phenylalaninmethylester) aus L-Phenylalanin (Grinter, 1998).

Viele der eingesetzten Produktionsstämme sind nicht durch rationales Design, sogenanntes „metabolic Engineering“ (Bailey, 1991) entstanden, bei dem mit Hilfe von rekombinanter DNA gezielt bestimmte Enzym-, Regulations- oder Transportaktivitäten in Zellen verändert werden. Für diesen Ansatz ist eine sehr genaue Kenntnis der relevanten Stoffwechselwege der Zelle sowie deren Regulation wichtig. Da diese Kenntnisse jedoch häufig nicht in ausreichendem Maße gegeben sind, wurden bislang viele Produktionsstämme stattdessen durch ungerichtete Mutagenese, gefolgt von anschließender Selektion sowie der Verwendung von Antimetaboliten, erhalten (Leuchtenberger, 1996).

1.1 Der Shikimisäureweg

Die aromatischen Aminosäuren sowie eine Vielzahl von aromatischen Sekundärmetaboliten werden ausgehend von dem Synthesebaustein Chorisminsäure gebildet. Chorisminsäure wird in *E. coli* durch den Shikimisäureweg gebildet (Pittard, 1996) (Abbildung 1).

Die Eingangsreaktion dieses Stoffwechselwegs besteht aus der Synthese von 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) aus den beiden Verbindungen Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-phosphat (E4P); PEP stammt aus der Glykolyse und E4P aus dem Pentosephosphatweg. In drei weiteren Biosyntheseschritten wird Shikimisäure gebildet, die zum Namensgeber dieses Biosynthesewegs wurde (Haslam, 1974; Eykmann, J.F., 1891).

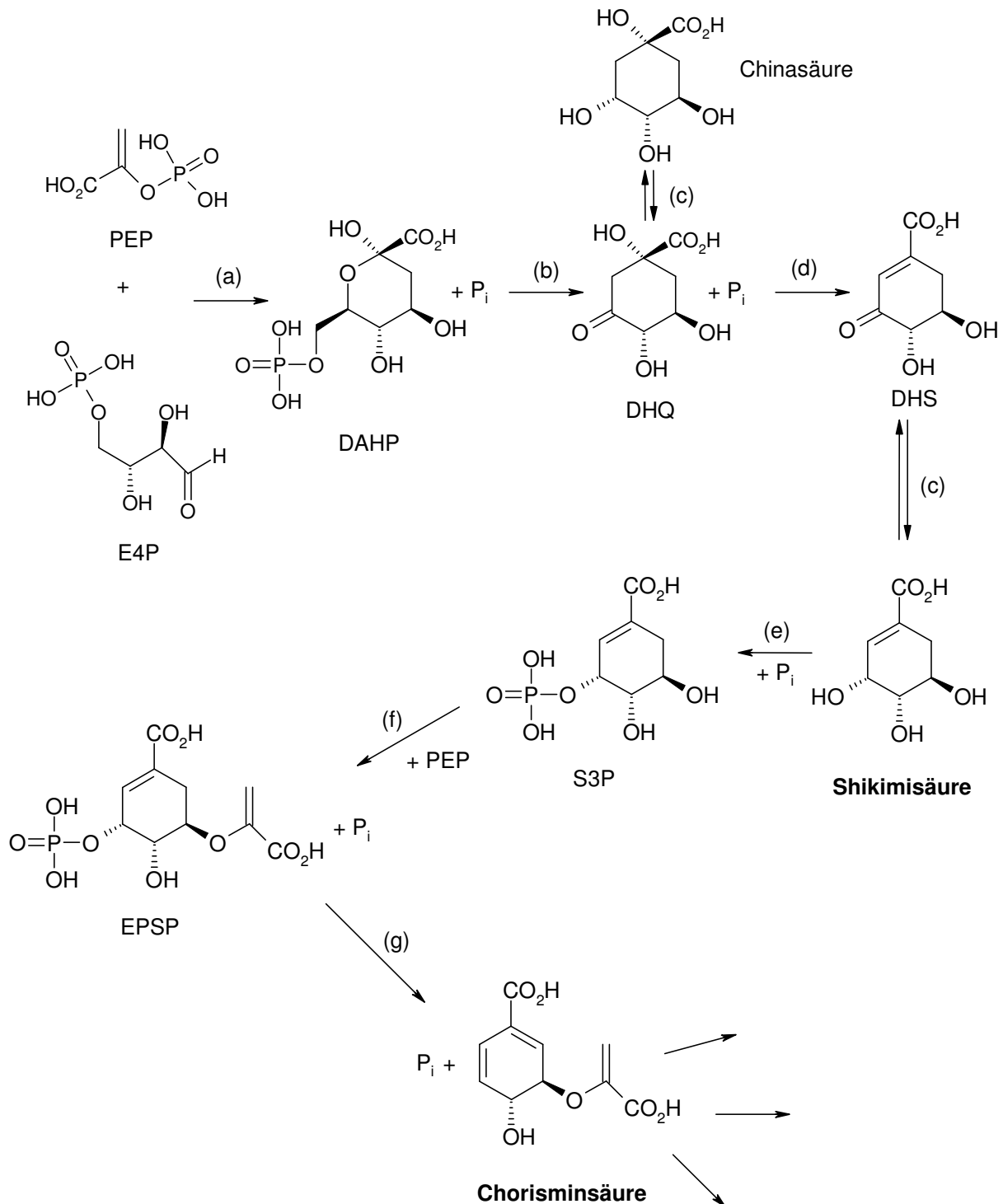


Abbildung 1: Der Shikimisäureweg in *Escherichia coli*

Ausgehend von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat (E4P) wird im Shikimisäureweg Chorisminsäure gebildet; hierbei tritt Shikimisäure als Intermediat auf.

Erklärung der auftretenden Metabolite: DAHP: 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphat; DHQ: 3-Dehydroquininsäure (3-Dehydrochinasäure); DHS: 3-Dehydroshikimisäure; S3P: Shikimat-3-Phosphat; EPSP: 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat

Erklärung der beteiligten Enzyme: (a): DAHP-Synthasen AroF, AroG und AroH; (b): 3-Dehydroquinat-Synthase AroB; (c): 3-Dehydroquinat-Dehydratase AroD; (d): Shikimat-Dehydrogenase AroE; (e): Shikimatkinasen AroL und AroK; (f): EPSP-Synthase AroA; (g): Chorismat-Synthase AroC

Anschließend wird durch Phosphorylierung, Addition eines weiteren PEP-Moleküls und nachfolgende Dephosphorylierung Chorisminsäure gebildet.

Die Aromatenbiosynthese wird in *E. coli* auf mehreren Ebenen reguliert (Neidhardt *et al.*, 1990) und zwar sowohl auf genetischer Ebene durch Attenuation und Repression wie auch durch Endprodukthemmung von Enzymen (Frost und Draths, 1995; Pittard, 1996). Der Shikimisäureweg wird vor allem durch die Steuerung der Eingangsreaktion, die durch drei verschiedene Isoenzyme der DAHP-Synthase (kodiert durch die Gene *aroF*, *aroG* und *aroH*) katalysiert wird, reguliert. Das AroG-Genprodukt macht in *E. coli* 80% der Gesamtkativität aller DAHP-Synthasen aus (Tribe *et al.*, 1976; Pittard, 1996); AroG wird durch die aromatische Aminosäure L-Phenylalanin zu 95% inhibiert. AroF wird durch L-Tyrosin ebenfalls zu 95% inhibiert, während AroH bis zu 60% durch L-Tryptophan inhibiert werden kann (Camakarlis und Pittard, 1974). Da AroH nur teilweise durch L-Tryptophan inhibierbar ist, wird der Shikimisäureweg auch bei hohen Konzentrationen aller drei aromatischen Aminosäuren nicht vollständig inhibiert, so dass durch die verbleibende Restaktivität immer noch etwas Chorisminsäure gebildet werden kann, die dann für weitere andere Biosynthesewege verfügbar ist.

Untersuchungen zum Stofffluss durch den Shikimisäureweg haben ergeben, dass dieser hauptsächlich durch die Aktivität der 3-Dehydroquinat-Synthase (AroB) limitiert ist (Snell *et al.*, 1996; Pittard, 1996; Yi *et al.*, 2002). Desweiteren wurde eine Limitierung durch die Enzyme AroL, AroA und AroC beobachtet (Oldiges *et al.*, 2004). Nach Aufhebung dieser Limitierungen kann der Stofffluss in den Shikimisäureweg durch Erhöhung der Bereitstellung der beiden Ausgangsverbindungen PEP und E4P weiter erhöht werden (Krämer, 2000; Draths und Frost, 1990,1992; Patnaik *et al.*, 1995). Dies kann durch Proteinüberexpression von Transketolase (*tkt*) und/oder Transaldolase (*tal*) erreicht werden (Sprenger *et al.*, 1997).

Durch Deletion einzelner Gene von Enzymen des Shikimisäurewegs konnte eine Vielzahl von Verbindungen des Shikimisäurewegs mikrobiell gewonnen werden (Tabelle 1).

Produkt	Erreichte Produktkonzentration [g/l]	Referenz
DAHP	16	Patnaik und Liao, 1994
DHQ	9	Li und Frost, 1999; Yi <i>et al.</i> , 2002
Quininsäure (Chinasäure)	60	Draths <i>et al.</i> , 1999 und 1992
DHS	69	Li <i>et al.</i> , 1999; Yi <i>et al.</i> , 2003
Shikimisäure	87	Chandran <i>et al.</i> , 2003
Chorisminsäure	0,6	Grisostomi <i>et al.</i> , 1997

Tabelle 1: Biotechnologische Produktion von Verbindungen des Shikimisäurewegs mit rekombinanten *E. coli*-Stämmen

Die Zugänglichkeit dieser Verbindungen ermöglicht deren Einsatz in Natur- und Wirkstoffsynthesen. So werden derzeit der Neuraminidaseinhibitor Oseltamivirphosphat (GS-4104-02, TamifluTM), der als Anti-Grippe-Mittel eingesetzt wird, sowie dessen Analoga ausgehend von Shikimisäure oder Quininsäure großtechnisch in einer 11 stufigen Synthese mit geringer Selektivität produziert (Kim *et al.*, 1997; McGowan und Berchtold, 1981).

Neben der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese ist auch die Darstellung von Massenkemikalien ausgehend von Verbindungen des Shikimisäurewegs denkbar. So wurde kürzlich Phenol ausgehend von Shikimisäure synthetisiert (Gibson *et al.*, 2001) (Abbildung 2).

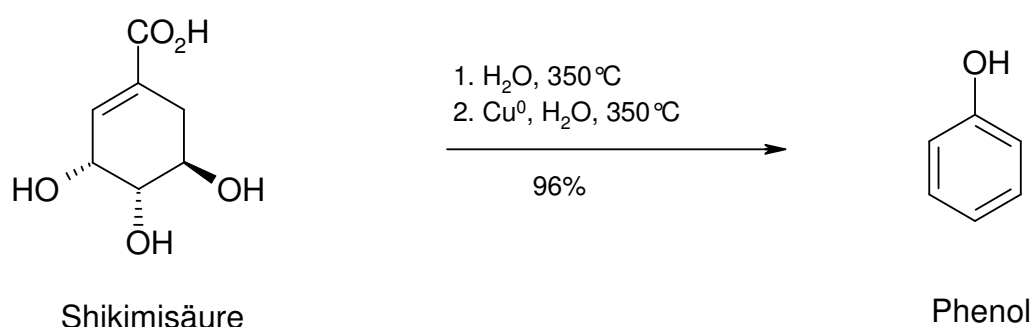


Abbildung 2: Phenolsynthese ausgehend von Shikimisäure, welche wiederum aus dem nachwachsenden Rohstoff Glukose gewonnen wurde (nach Gibson *et al.*, 2001)

Der Shikimisäureweg findet sich nur in Pflanzen und Mikroorganismen. Aus diesem Grund bietet der Shikimisäureweg einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung von Herbiziden, Fungiziden und Antibiotika (Floss, 1997).

1.2 Mikrobielle Produktion von Chorisminsäure

Chorisminsäure zählt mit seinem hochfunktionalisierten Cyclohexadiensystem zu den interessantesten Bausteinen des Shikimisäurewegs. Jedoch ist aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit bzw. des hohen Preises (958 €/100 mg (Reinheit \geq 80%) bzw. 202 €/100 mg (Reinheit 60-80% beim Hersteller Sigma-Aldrich) das synthetische Interesse an Chorisminsäure bisher nur gering. So weisen die bisher entwickelten biotechnologischen und chemischen Zugänge zu Chorisminsäure eine hohe Komplexität verbunden mit geringen Ausbeuten und Reinheiten auf (Tabelle 2).

bisher beschriebene Zugänge zu Chorisminsäure		
Max. Konzentrationen bzw. Ausbeuten	Verfahren	Referenz
0,4 g/l	mikrobiell (<i>K. pneumoniae</i>)	Gibson, 1968
0,9 g/l	mikrobiell (<i>K. pneumoniae</i>)	Rieger und Turnbull, 1996
0,6 g/l	mikrobiell (<i>E. coli</i>)	Grisostomi <i>et al.</i> , 1997
7 %	chemische Synthese	Hoare <i>et al.</i> , 1983; Pawlak und Berchtold, 1987
8 %	chemische Synthese	Wood und Ganem, 1990

Tabelle 2: Mikrobielle und chemische Zugänge zu Chorisminsäure

Im Rahmen des CHORUS-Projekts (siehe 1.9) konnte ein verbesserter mikrobieller Zugang zu Chorisminsäure etabliert werden. So wurden am IBT-2 (Forschungszentrum Jülich) mit dem *E. coli*-Stamm KB532 bei 2l-Fermentationen Produktkonzentrationen von über 20 g/l erreicht (Bujnicki, 2003, persönliche Mitteilung). Die Aufreinigung von Chorisminsäure aus dem Kulturüberstand erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Müller mittels Ionenaustauschchromatographie.

1.3 CHORUS (Chorisminsäure als universeller Synthesebaustein)

Chorisminsäure wird in *E. coli* als vielseitiger Synthesebaustein genutzt und diente dem CHORUS-Projekt (siehe Kapitel 1.9), in dessen Rahmen diese Arbeit durchgeführt wurde, als Namensgeber. So werden ausgehend von Chorisminsäure die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan sowie Folsäure, verschiedene Chinone und eine Vielzahl von zumeist aromatischen Sekundärmetaboliten gebildet (Pittard, 1996; Floss, 1986). Abbildung 3 verdeutlicht die Vielseitigkeit von Chorisminsäure als Synthesebaustein: Chorisminsäure besitzt bereits eine hohe Funktionalisierung, d.h., eine Vielzahl von funktionellen Gruppen, und weist eine hohe synthetische Flexibilität in ihrer Struktur auf, die eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen ermöglicht und so zu der beobachteten Produktvielfalt führt.

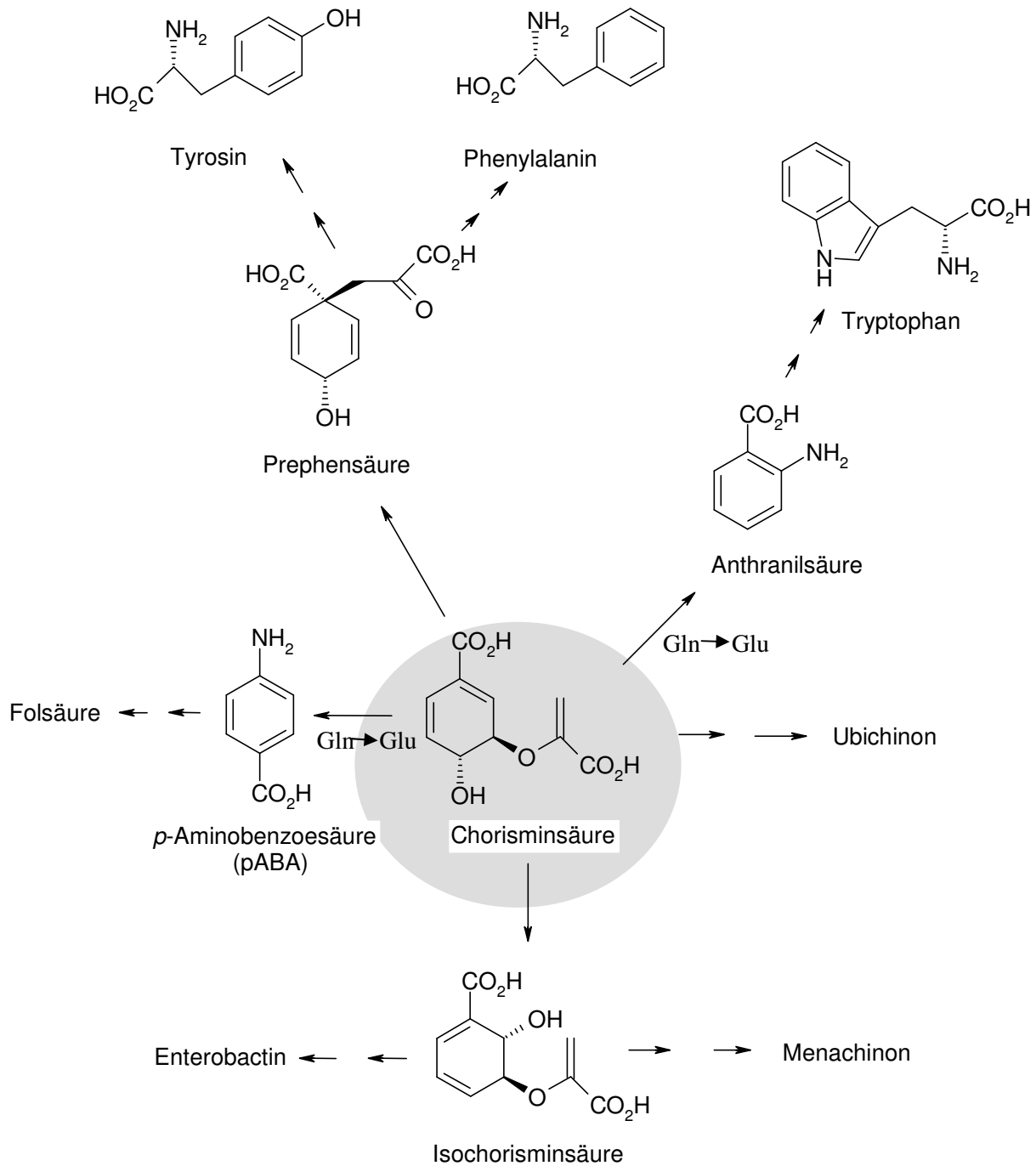


Abbildung 3: Chorisminsäure als universeller Synthesebaustein (CHORUS)

Ausgehend von Chorisminsäure werden die aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan synthetisiert. Ebenfalls aus Chorisminsäure entstehen Folsäure, Ubichinon, Menachinon und Enterobactin.

Als unmittelbare Folgeprodukte von Chorisminsäure treten dabei zumeist strukturell verwandte Cyclohexadienderivate auf (Abbildung 4).

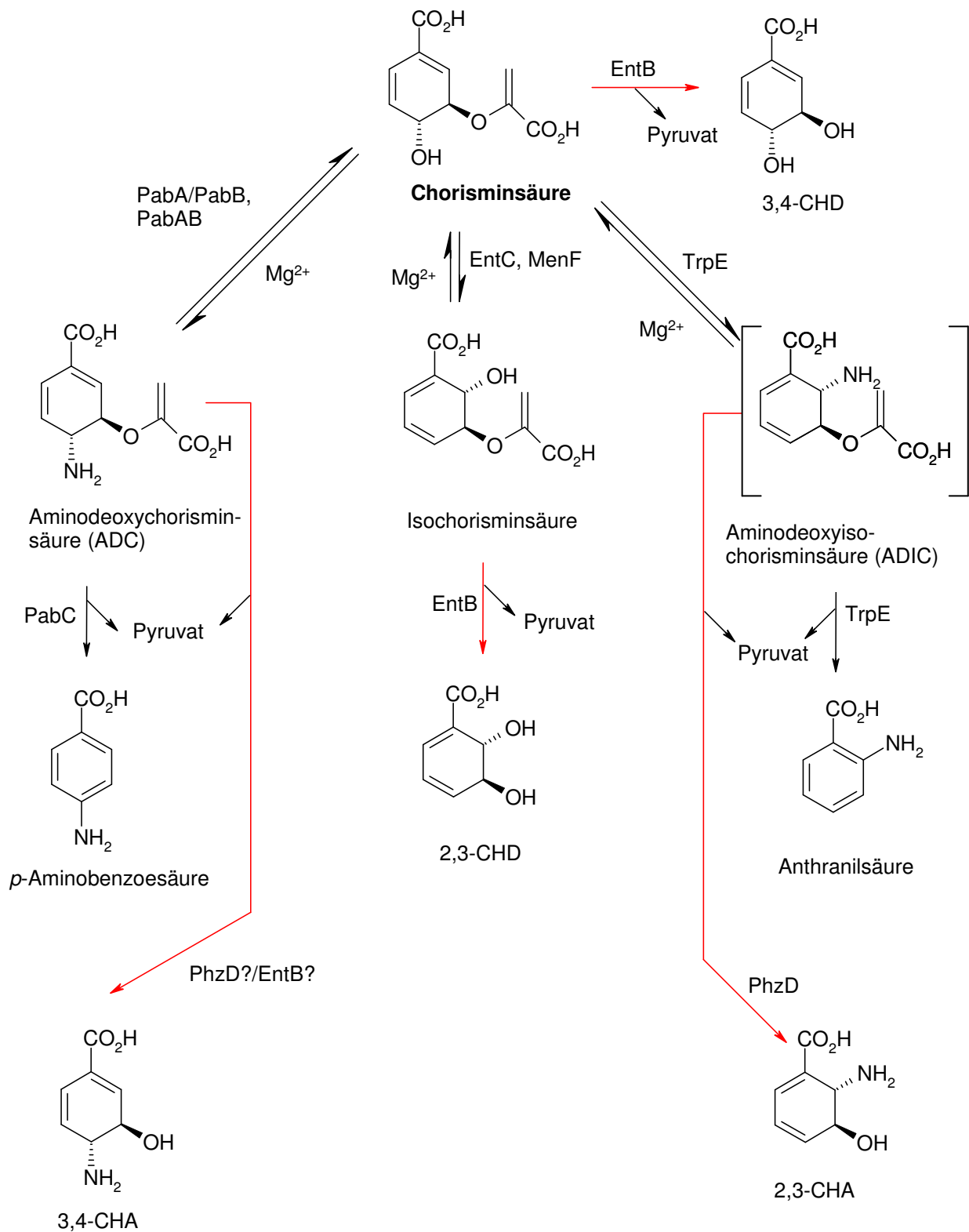


Abbildung 4: Wichtige, von Chorisminsäure abgeleitete, Cyclohexadienderivate

Chorisminsäure kann direkt in die Cyclohexadienderivate ADC, Isochorisminsäure, ADIC und 3,4-CHD umgewandelt werden. Durch zwei Reaktionschritte können aus Chorisminsäure die Cyclohexadienderivate 2,3-CHD und 2,3-CHA gebildet werden (Franke *et al.*, 2003, Lorbach, 2005); ebenfalls in zwei Reaktionschritten geplant ist in dieser Arbeit die Synthese von 3,4-CHA über das Intermediat ADC. In rot dargestellt sind die Abspaltungen des Enolpyruvylrestes jeweils von Chorisminsäure, Isochorisminsäure und ADIC, durch die die drei funktionalisierten Cyclohexadiene 3,4-CHD, 2,3-CHD

und 2,3-CHA erhalten werden. Durch Abspaltung des Enolpyruvylrestes von ADC könnte 3,4-CHA erhalten werden.

Erklärung der beteiligten Enzyme: PabA/PabB, PabAB: ADC-Synthase; EntC, MenF: Isochorismat-Synthasen; TrpE: Anthranilat-Synthase; EntB, PhzD: Isochorismatasen; PabC: *p*ABA-Synthase

Erklärung der auftretenden Metabolite: 2,3-CHD: (5S,6S)-5-6-Dihydroxycyclohexa-1-3-dien-carbonsäure; 3,4-CHD: (3R,4R)-3,4-Dihydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure; 2,3-CHA: (5S,6S)-6-Amino-5-hydroxycyclohexa-1,3-dien-carbonsäure; 3,4-CHA: (3R,4R)-4-Amino-3-hydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure

So gehören zu den in einem Reaktionsschritt von Chorisminsäure abgeleiteten Metaboliten Isochorisminsäure, ein Intermediat bei der Biosynthese von Menachinon und Enterobactin, sowie 4-Aminodeoxychorisminsäure (ADC), ein Intermediat bei Biosynthese von Folsäure. Ebenfalls in einem Reaktionsschritt aus Chorisminsäure entstehen die Verbindungen 2-Aminodeoxyisochorisminsäure (ADIC), ein enzymgebundenes Intermediat bei der Biosynthese von Tryptophan, sowie Prephensäure, aus der die beiden aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin gebildet werden.

Durch Abspaltung des Enolpyruvylrestes von Chorisminsäure, Isochorisminsäure und ADIC können die funktionalisierten Cyclohexadiene 2,3-CHD, 3,4-CHD und 2,3-CHA erhalten werden, deren mikrobielle Biosynthese ein Ziel des CHORUS-Projektes war (Franke *et al.*, 2003) (Tabelle 3). Diese Reaktion ist eine Vinyletherspaltung und wird durch das *E. coli*-Enzym EntB bzw. das *Pseudomonas aeruginosa*-Enzym PhzD katalysiert (siehe 1.4 und 1.6.2). Die in dieser Arbeit geplante Spaltung von ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat wäre ebenfalls eine Vinyletherspaltung.

Abkürzung	vollständige Bezeichnung
2,3-CHD	(5S,6S)-5-6-Dihydroxycyclohexa-1-3-dien-carbonsäure
3,4-CHD	(3S,4R)-3,4-Dihydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure
2,3-CHA	(5S,6S)-6-Amino-5-hydroxycyclohexa-1,3-dien-carbonsäure
3,4-CHA	(3S,4R)-4-Amino-3-hydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure

Tabelle 3: Von Chorisminsäure abgeleitete Zielprodukte des CHORUS-Projektes

1.4 Mikrobielle Produktion der Cyclohexadiendirole 2,3-CHD und 3,4-CHD

Die mikrobielle Produktion der beiden Cyclohexadiendiolcarbonsäuren 2,3-CHD und 3,4-CHD war ein Ziel des CHORUS-Projektes. Während 2,3-CHD ein Intermediat bei der Biosynthese des Eisenchelators Enterobactin ist, ist bisher für 3,4-CHD keine Funktion im Stoffwechsel von *E. coli* beschrieben worden. 2,3-CHD und 3,4-CHD sind als Ausgangsmaterialien für potentielle Natur- und Wirkstoffsynthesen sehr interessant. Jedoch verhindert der

geringe Zugang zu diesen beiden Verbindungen bisher deren kommerzielle Anwendung, wie dies bei *cis*-CHD der Fall ist. Der effektive Zugang zu *cis*-CHD hat eine Vielzahl von Natur- und Wirkstoffsynthesen ermöglicht, wie z.B. die Synthese von Inositolen oder der Alkaloide Trihydroxyheliotridan, Lycoricidin, Kifunensin und Pancratistatin (Hudlicky *et al.*, 1990, 1992, 1994 und 1995).

Jedoch lassen die bisher beschriebenen chemischen Synthesen zur Darstellung von 2,3-CHD und 3,4-CHD eine breite Anwendung wie bei *cis*-CHD nicht zu, da sie aus einer komplizierten mehrstufigen Synthese mit geringer Enantioselektivität bestehen und nur zu einer geringen Gesamtausbeute führen (Tabelle 4).

beschriebene chemische Synthesen von <i>trans</i> -CHD		
Produkt	Reaktionsstufen (Ausbeute)	Referenz
bromsubstituiertes <i>trans</i> -2,3-CHD	3 (48%)	Boyd <i>et al.</i> , 1996
bromsubstituiertes <i>trans</i> -2,3-CHD	8 (8%)	McKibben <i>et al.</i> , 1995
(rac) 2,3-CHD	5 (5%)	DeMarinis <i>et al.</i> , 1974
(rac) 3,4-CHD	6 (7%)	Chiasson und Berchtold, 1974
(rac) 3,4-CHD	3 (14%)	Roberts <i>et al.</i> , 1996

Tabelle 4: Synthetischer Zugang zu 2,3-CHD, 3,4-CHD und deren Derivaten

Mit einem mikrobiellen Ansatz konnten bisher mit einem modifizierten *Klebsiella pneumoniae*-Stamm Produktkonzentrationen von 0,2 g/l 2,3-CHD und 0,15 g/l 3,4-CHD im Kulturüberstand erreicht werden (Müller *et al.*, 1996).

Im CHORUS-Projekt konnten diese Ausbeuten mit modifizierten *E. coli*-Stämmen auf 21,9 g/l 2,3-CHD und 25,9 g/l 3,4-CHD gesteigert werden (Bujnicki, 2003, persönliche Mitteilung). Benutzt wurde hierbei für die mikrobielle Biosynthese von 2,3-CHD der Stamm F111/pC20 (Abbildung 5a). Im Stamm F111 (LJ110 $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)\ \Delta(entCEBA)::kan(Km^R)\ \Delta\ gcd::cat(Cm^R)$) ist das Operon *entCEBA* deletiert. Diese Deletion verhindert die Umsetzung von 2,3-CHD zu 2,3-Dihydroxybenzoesäure, die ansonsten auf dem weiteren Weg zur Enterobactinbiosynthese stattfinden würde. Durch Deletion der Gene *pheA* und *tyrA* wird die Umsetzung von Chorisminsäure zu den aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin verhindert; daher ist dieser Stamm auxotroph für diese beiden Aminosäuren (Abbildung 5). Die Deletion des Gens *gcd* (kodiert für die membranständige Glukose-Dehydrogenase) verhindert das Auftreten von Glukonsäure als Nebenprodukt, das bei einer Fermentation ohne deletiertem *gcd*-Gen beobachtet worden war (Bujnicki, 2002, persönliche Mitteilung). Für die Glukose-Dehydrogenase war beschrieben worden, dass diese in Anwesenheit des von *E. coli* nicht synthetisierbaren Cofaktors Pyrroloquinolin-Quinon (PQQ)

Glukose zu Gluconsäure umwandeln kann (Yamada *et al.*, 1993). Warum diese Umsetzung auch in Abwesenheit von PQQ bei der Fermentation stattfindet, konnte bisher nicht erklärt werden. Mit Hilfe des Plasmids pC20 werden die beiden Enzyme EntB und EntC überexprimiert, die die Umsetzung von Chorisminsäure zum Zielprodukt 2,3-CHD über das Intermediat Isochorisminsäure katalysieren (siehe Abbildung 5a). Ebenfalls durch pC20 werden die beiden Enzyme AroB und AroL des Shikimisäurewegs überexprimiert; durch deren Überexpression erhöht sich der Stofffluss zu Chorisminsäure (Abbildung 5a).

Für die mikrobielle Produktion von 3,4-CHD wurde der Stamm F82/pC22 (LJ110 $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)\ \Delta(entCEBA)::kan\ (Km^R)\ /pC22$) eingesetzt (Abbildung 5b). Das Plasmid pC22 bewirkt eine Überexpression des Enzyms EntB, das die Spaltung von Chorisminsäure zu 3,4-CHD katalysiert, sowie der beiden Enzyme AroB und AroL.

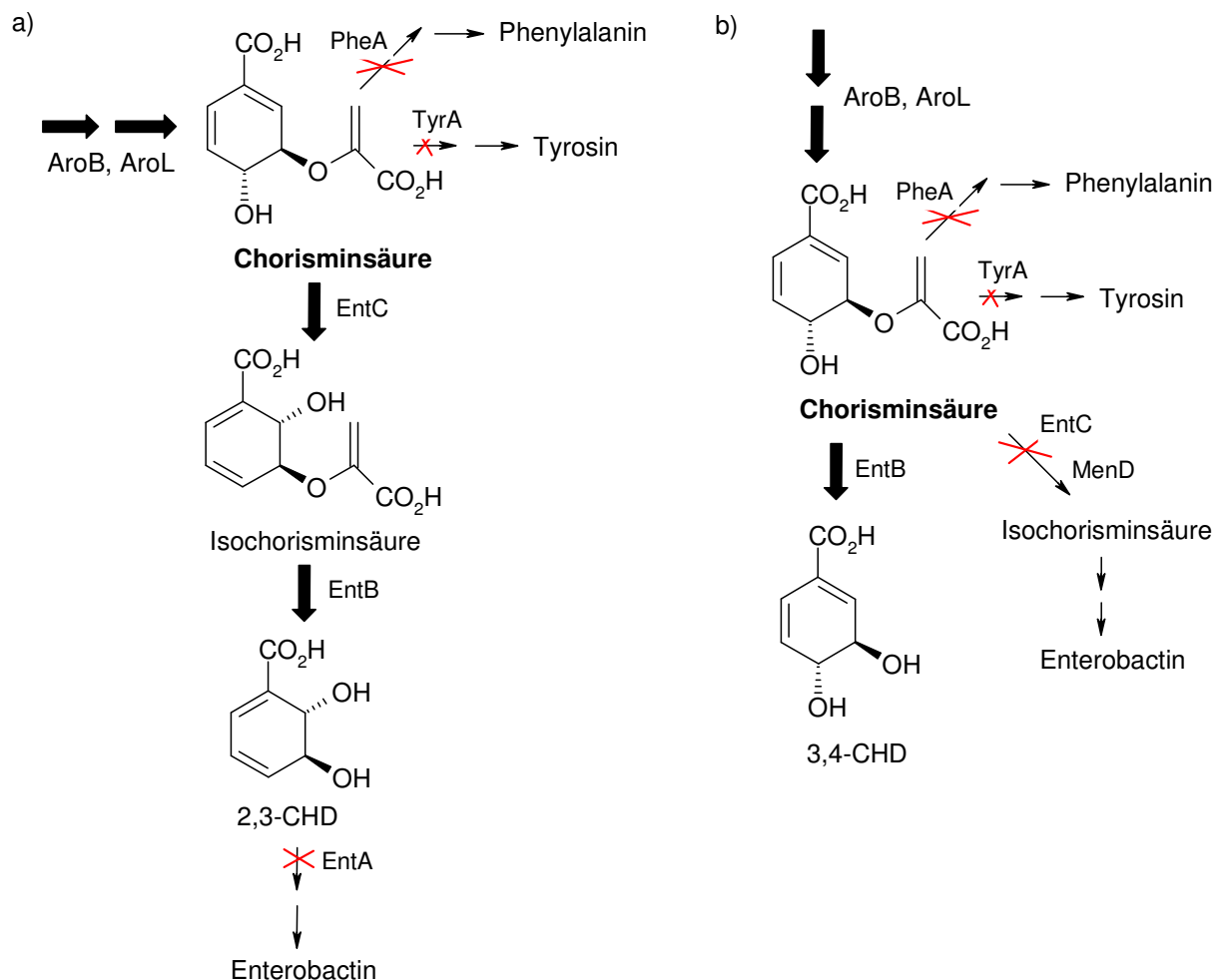


Abbildung 5: Veränderte *E. coli*-Stämme zur mikrobiellen Synthese von 2,3-CHD und 3,4-CHD

a) Veränderter *E. coli*-Stamm F111/pC20 zur mikrobiellen Synthese von 2,3-CHD
 Durch Deletion der Gene *pheA* und *tyrA* sollte mehr Chorisminsäure für die Bildung von Isochorisminsäure und 2,3-CHD zur Verfügung stehen. Die Deletion von *entA* verhindert die unerwünschte weitere Umsetzung von 2,3-CHD auf dem Weg zur Biosynthese von Enterobactin.

b) Veränderter E. coli-Stamm F82/pC22 zur mikrobiellen Synthese von 3,4-CHD

Durch Deletion der Gene *pheA* und *tyrA* sollte mehr Chorisminsäure für die Bildung von 3,4-CHD zur Verfügung stehen. Die Deletion des Operons *entCEBA* verhindert die Biosynthese von Enterobactin und verringert den Umsatz von Chorisminsäure zu Isochorisminsäure, dem ersten Schritt der Enterobactin-Biosynthese.

Erklärung der beteiligten Enzyme: AroB: DHQ-Synthase; AroL: Shikimat-Kinase; PheA: Chorisminsäure-Mutase/Prephensäure-Dehydratase; TyrA: Chorisminsäure-Mutase/Prephensäure-Dehydrogenase; EntC: Isochorismat-Synthase; EntB: Isochorismatase; EntA: 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoat-Dehydrogenase; MenD: Isochorismat-Synthase

1.5. Die funktionalisierten Cyclohexadienaminoalkohole 2,3-CHA und 3,4-CHA

Cyclohexadiene mit zueinander *trans*-ständiger Amino- und Hydroxygruppe bzw. deren Derivate sind als biosynthetische Zwischenprodukte beschrieben worden. So konnte ADIC als enzymgebundenes Intermediat bei der Biosynthese von Anthranilsäure durch die Anthranilat-Synthase nachgewiesen werden. Durch Verwendung der mutierten Anthranilat-Synthase H398M aus *Salmonella typhimurium* gelang die Anreicherung und Isolierung von ADIC (Morollo und Bauerle, 1993; Byrnes *et al.*, 2000). 2,3-CHA tritt als Intermediat bei der Biosynthese von Phenazin-1-carbonsäure auf (McDonald *et al.*, 2001), aus der eine große Anzahl verschiedener Phenazine synthetisiert werden können. Phenazine werden u. a. von Pseudomonaden und Streptomyceten synthetisiert und besitzen teilweise eine antibiotische Wirkung (Laursen and Nielsen, 2004; Turner and Messenger, 1986).

Bei der Biosynthese von Folsäure konnte ADC als Zwischenprodukt nachgewiesen werden; es wird durch die ADC-Synthase PabA/PabB unmittelbar aus Chorisminsäure gebildet (He *et al.*, 2004; Parsons *et al.*, 2002; Viswanathan *et al.*, 1995). Für den Cyclohexadienaminoalkohol 3,4-CHA ist bisher keine biologische Funktion beschrieben worden, und über ein mögliches Vorkommen in Mikroorganismen ist nichts bekannt.

1.6 Darstellung von 2,3-CHA und ADIC

1.6.1 Synthetischer Zugang zu 2,3-CHA und ADIC

Ein synthetischer Zugang zu 2,3-CHA und ADIC ist bereits mehrfach beschrieben worden, jedoch sind diese chemischen Synthesen nicht geeignet, um 2,3-CHA enantiomerenrein und in einer für eine Verwendung als synthetisches Ausgangsmaterial nötigen Menge zu erhalten (Tabelle 5).

beschriebene chemische Synthesen von 2,3-CHA und ADIC		
Produkt	Reaktionsstufen (Ausbeute)	Referenz
(rac) 2,3-CHA-Derivate	1 (36%)	Fukuyama <i>et al.</i> , 1981
(rac) ADIC	7 (0,4%)	Policastro <i>et al.</i> , 1984
ADIC	8 (13%)	Teng und Ganem, 1984
(rac) 2,3-CHA	3 (12%)	Kozlowski <i>et al.</i> , 1995
2,3-CHA	8 (10%)	Bunnage <i>et al.</i> , 2003

Tabelle 5: Synthetischer Zugang zu ADIC und 2,3-CHA und deren Derivaten

1.6.2 Mikrobieller Zugang zu 2,3-CHA

Ein erster mikrobieller Zugang zu 2,3-CHA wurde schon 1961 von McCormick *et al.* beschrieben (McCormick *et al.*, 1961 und 1962). Durch Fermentation einer nicht genau charakterisierten Mutante von *Streptomyces aureofaciens* gelang es, eine Produktkonzentration von 10 g/l 2,3-CHA im Kulturüberstand zu erreichen.

Im Rahmen des CHORUS-Projekts konnte der mikrobielle Zugang zu 2,3-CHA jedoch weiter verbessert werden. So konnte mit dem Stamm *E. coli* KB532/pC27 eine Produktausbeute von 15,7 g/l 2,3-CHA im Kulturüberstand erreicht werden (Lorbach, 2005). Das Plasmid pC27 bewirkt die Überexpression der beiden Enzyme PhzE und PhzD aus *Pseudomonas aeruginosa*, die Chorisminsäure über das Intermediat ADIC zu 2,3-CHA umsetzen (Abbildung 6).

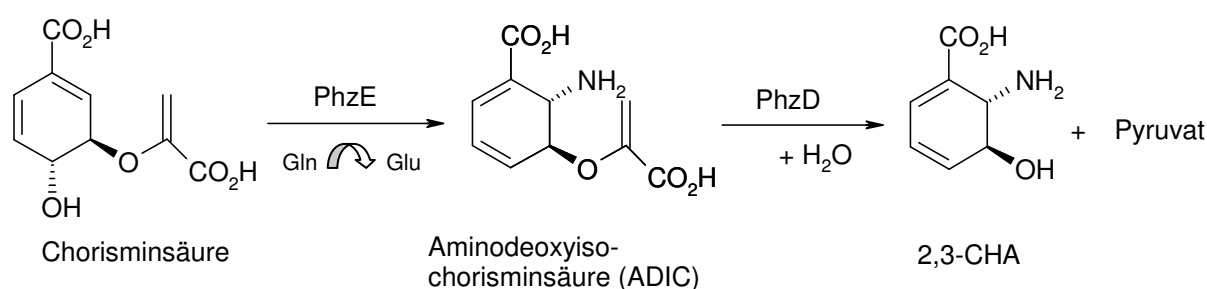


Abbildung 6: Mikrobieller Zugang zu 2,3-CHA

Ausgehend von Chorisminsäure wird über das Intermediat ADIC 2,3-CHA gebildet. Der Aminogruppendonor bei dieser Reaktion ist Glutamin. Benutzt werden für die mikrobielle Synthese von 2,3-CHA in *E. coli* die beiden Enzyme PhzE und PhzD von *Pseudomonas aeruginosa*.

1.6.3 Mögliche Anwendungen für 2,3-CHA

Wie die beiden Cyclohexadiendiole 2,3-CHD und 3,4-CHD ist auch 2,3-CHA als Ausgangsstoff für Natur- und Wirkstoffsynthesen interessant. Eine zusätzliche Verwendungsmöglichkeit ergibt sich aus der Tatsache, dass 2,3-CHA eine β -Aminosäure ist. Somit ist der Einsatz

von 2,3-CHA in sogenannten β -Peptiden denkbar (Porter et al., 2000; Raguse et al., 2002), die häufig eine biologische Aktivität besitzen und stabil gegenüber Proteolyse sein können. Wie die Aminosäure Prolin, die eine sekundäre Aminogruppe besitzt, (Hajos und Parrish, 1974; Eder *et al.*, 1971; List *et al.*, 2000; Notz und List, 2000) ist auch 2,3-CHA eine organokatalytisch aktive Substanz und kann in einem Zink-2,3-CHA-Komplex als Katalysator wirken (Lorbach, 2005).

1.7 Der Cyclohexadienaminoalkohol 3,4-CHA

3,4-CHA ist ein potentiell sehr interessanter Synthesebaustein, der jedoch bisher aufgrund fehlender Verfügbarkeit noch nicht für chemische Natur- und Wirkstoffsynthesen genutzt wurde. Der hohe Funktionalisierungsgrad von 3,4-CHA eröffnet die Möglichkeit zu einer Vielzahl von chemischen Modifizierungen sowie der Einführung neuer funktioneller Gruppen (Abbildung 7).

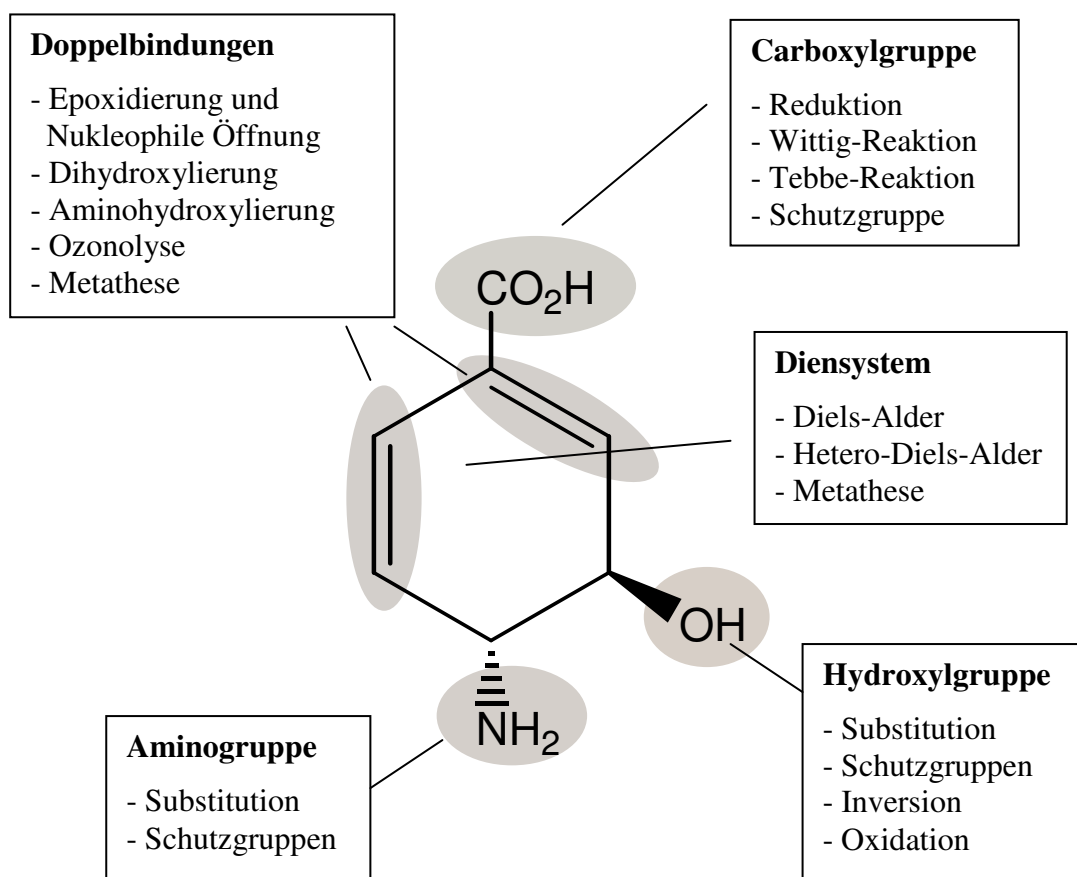


Abbildung 7: Überblick über die verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten des 3,4-CHA (nach Lorbach, 2005)

Eine potentielle Anwendung von 3,4-CHA besteht in der Vereinfachung der bisher durchgeführten Synthese von Oseltamivirphosphat mit Shikimisäure als Ausgangsverbindung (Abbildung 8). Oseltamivirphosphat ist ein Neuraminidase-Inhibitor (US-Patent #5763483; Gilead Sciences, Inc.) und Wirkstoff des Anti-Grippe-Mittels Tamiflu[®]. Die weltweite Nachfrage nach diesem Wirkstoff ist kürzlich sehr stark gestiegen und übersteigt derzeit die maximal produzierbare Menge des Medikaments (Moscona, 2005). Der Grund für die gestiegene Nachfrage liegt darin, dass Tamiflu[®] derzeit neben Relenza[®] (Wirkstoff Zanamivir) das einzig verfügbare Medikament ist, das gegen alle Formen von Influenza-Viren und auch gegen das gefährliche und kürzlich erneut aufgetretene Vogelgrippe-Virus H5N1 wirksam ist (Moscona, 2005). Um einer möglichen Pandemie vorzubeugen, die bei einem Überspringen des Virus auf den Menschen ausgelöst werden könnte, wollen sich viele Staaten derzeit einen Vorrat von Tamiflu[®] anlegen. Oseltamivirphosphat und Zanamivir wirken als Neuraminidase-Inhibitoren und verhindern auf diese Weise die Freisetzung weiterer Grippe-Viren von bereits infizierten Wirtszellen.

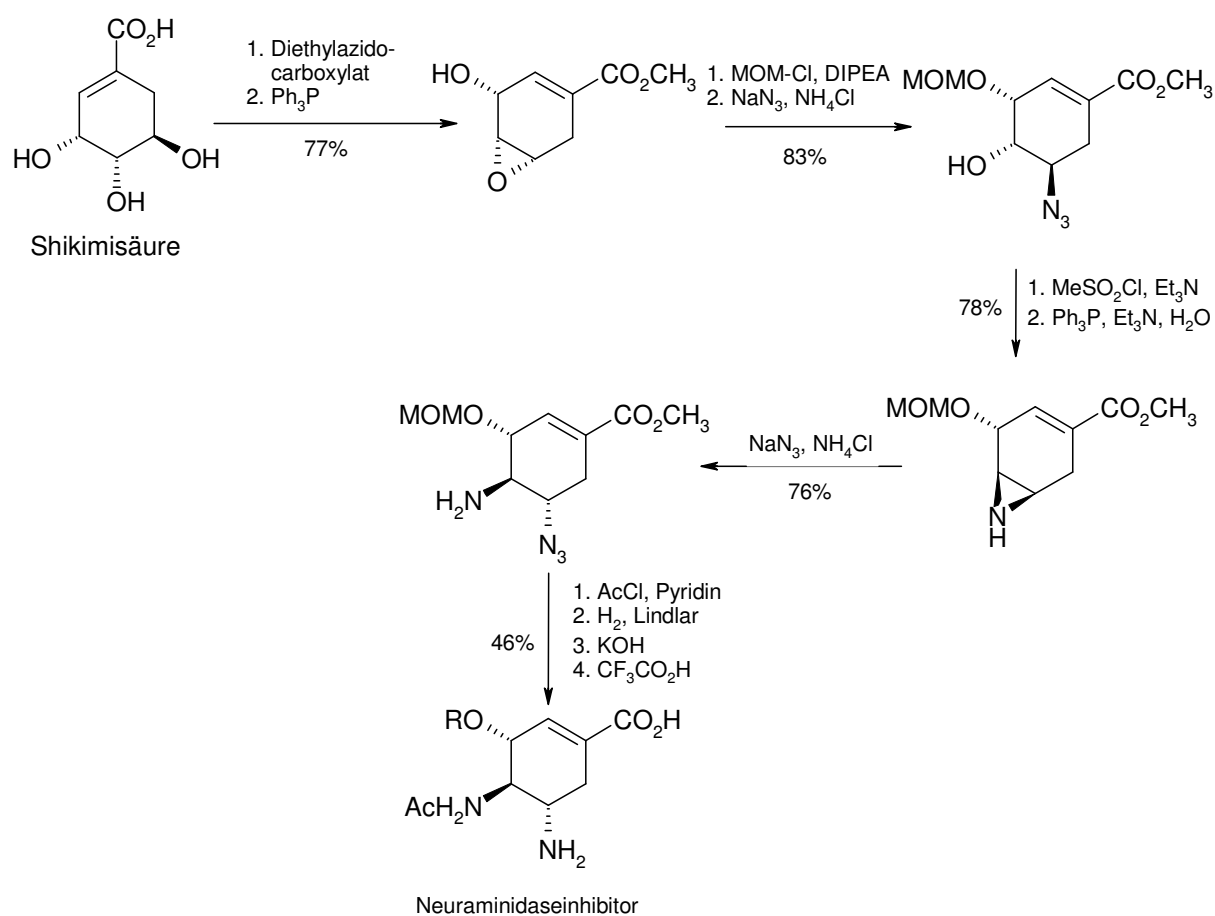


Abbildung 8: Synthese von Neuraminidaseinhibitoren nach Kim *et al.*, 1997

Die Synthese von Neuraminidaseinhibitoren kann ausgehend von Shikimisäure erfolgen. Die Synthese ist vielstufig und läuft mit geringer Selektivität ab. R können verschiedene Alkylreste sein, jedoch

wird mit $R = \text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ (Oseltamivirphosphat) die stärkste Inhibierung der Neuraminidase erreicht ($K_i < 1 \text{ nM}$ (Eisenberg *et al.*, 1997)).

Ausgehend von 3,4-CHA ist eine verkürzte Synthese von Oseltamivirphosphat in nur noch 5 Reaktionsschritten denkbar (Sprenger *et al.*, 2004)(Abbildung 9).

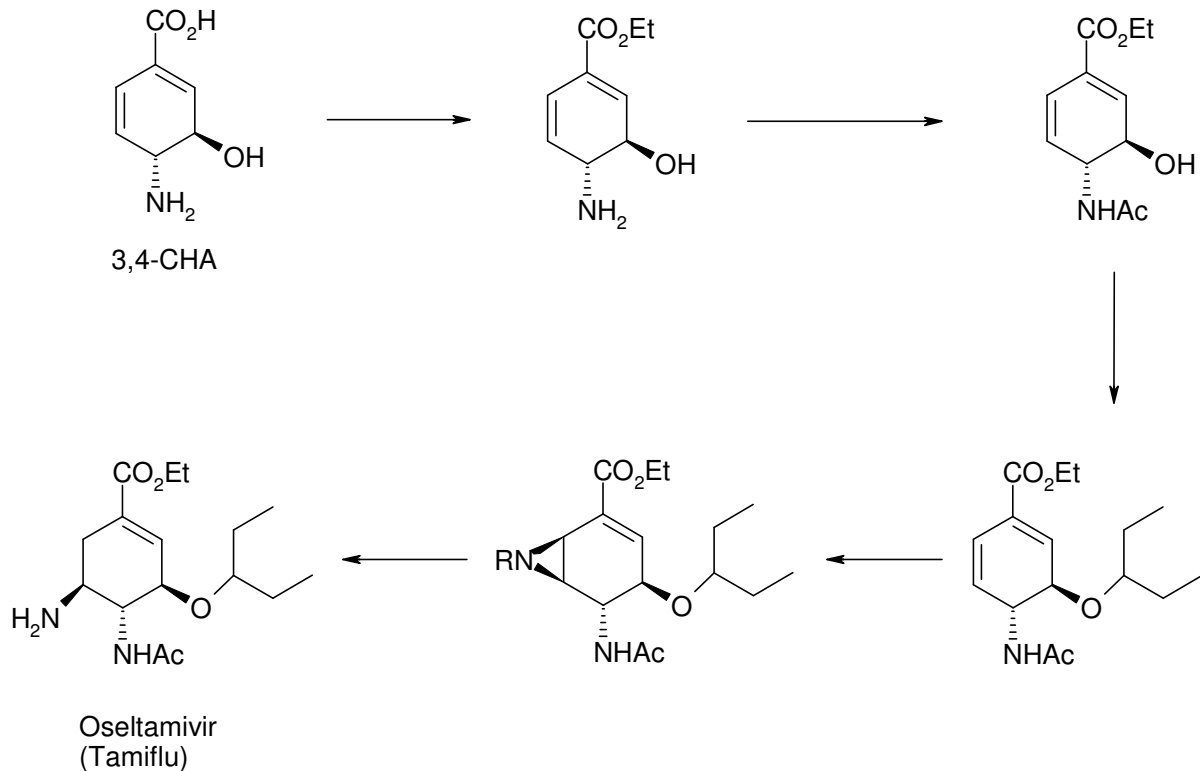


Abbildung 9: Geplante chemische Synthese von Oseltamivir ausgehend von 3,4-CHA (Sprenger *et al.*, 2004)

Problematisch bei der bisher durchgeführten Synthese von Oseltamivir (Roche) ist vor allen Dingen, dass bei einem Reaktionsschritt mit Natriumazid gearbeitet werden muss. Diese Verbindung ist sehr giftig und explosiv und macht somit diesen Syntheseschritt sehr gefährlich und begrenzt den Maßstab der durchführbaren Synthesemenge. Die vorgeschlagene vereinfachte Oseltamivir-Synthese ausgehend von 3,4-CHA ist eventuell ohne eine Anwendung von Natriumazid möglich, so dass das Problem eines explosionsgefährlichen Reaktionsschrittes mit diesem Syntheseweg unter Umständen umgangen werden könnte. Eine Oseltamivir-Synthese ausgehend von 3,4-CHA wäre, vom ökologischen Standpunkt aus gesehen, vorteilhafter, da eine Ökobilanzierung des geplanten Syntheseweges ergeben hat, dass die Umweltbelastung bei einer Synthese ausgehend von 3,4-CHA um ein Drittel reduziert wäre

im Vergleich zur derzeit durchgeführten Synthese ausgehend von Shikimisäure (Kroh und Sell, DECHEMA, 2005, unveröffentlichte Daten).

1.8 Bisheriger Zugang zu 3,4-CHA und ADC

Ein mikrobieller Zugang zu den beiden Verbindungen 3,4-CHA und ADC ist bisher nicht beschrieben worden. Ein Grund hierfür ist sicherlich, dass 3,4-CHA bisher in keinem Organismus als Stoffwechselintermediat beschrieben wurde und somit ein einfacher Zugang zur mikrobiellen Darstellung von 3,4-CHA nicht offensichtlich ist.

Die beschriebenen chemischen Synthesen von 3,4-CHA sind durch eine komplizierte vielstufige Synthese mit geringer Enantioselektivität und geringer Ausbeute gekennzeichnet und ermöglichen daher nicht die Nutzung von 3,4-CHA als Synthesebaustein für Natur- und Wirkstoffsynthesen (Tabelle 6).

beschriebene chemische Synthesen von ADC und 3,4-CHA		
Produkt	Reaktionsstufen (Ausbeute)	Referenz
(<i>rac</i>) ADC	7 (7%)	Teng <i>et al.</i> , 1985
(<i>rac</i>) ADC	3 (80%)	Campbell und McLeish, 1993
(<i>rac</i>) 3,4-CHA	8 (13%)	Teng und Ganem, 1982

Tabelle 6: Synthetischer Zugang zu ADC und 3,4-CHA

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit sollte im Rahmen des CHORUS-Projekts durchgeführt werden. Das Projekt CHORUS wurde im Zeitraum Februar 2002 bis Januar 2005 vom BMBF gefördert. Es wurde in Zusammenarbeit mit dem Industriepartner DSM Biotech GmbH, Jülich und den Instituten IBT-1/Institut für Mikrobiologie (Forschungszentrum Jülich bzw. Universität Stuttgart) und IBT-2 (Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Ziel war die mikrobielle Synthese verschiedener funktionalisierter Cyclohexadiene, die sich von dem Synthesebaustein Chorisminsäure ableiten sowie deren Untersuchung auf ihre Verwendbarkeit als chirale Synthesebausteine. Durch die DECHEMA (Arbeitsgruppe Dr. Sell) sollte eine Ökobilanzierung der beteiligten Prozesse stattfinden. Die Biosynthese aller CHORUS-Produkte sollte mit rekombinanten *E. coli*-Stämmen erfolgen, ausgehend von dem nachwachsenden Rohstoff Glukose (Abbildung 10).

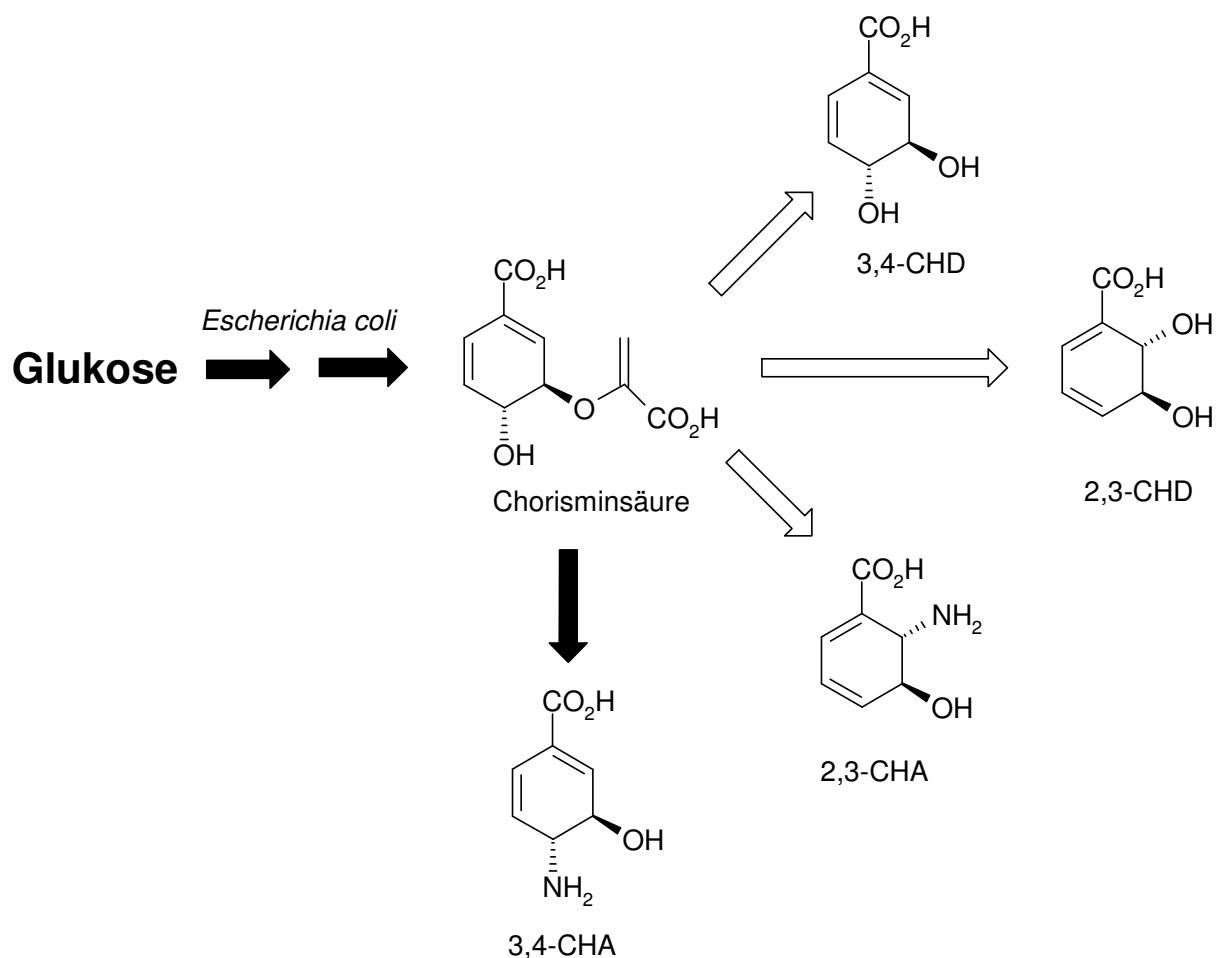


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Ziele des CHORUS-Projektes

Ziel des CHORUS-Projektes war die Gewinnung der funktionalisierten Cyclohexadiene 2,3-CHD, 3,4-CHD, 2,3-CHA und 3,4-CHA mit rekombinanten *E. coli*-Stämmen ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen wie Glukose.

Ziel dieser Arbeit war die mikrobielle Biosynthese des Aminocyclitols 3,4-CHA mit rekombinanten *E. coli*-Stämmen, die eine nachhaltige Synthese ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen wie z.B. Glukose möglich machen.

Als mit dieser Arbeit im August 2002 begonnen wurde, war es im CHORUS-Projekt bereits gelungen, die beiden Cyclitole 2,3-CHD und 3,4-CHD mit einem mikrobiellen Ansatz darzustellen. Aus diesen Ergebnissen war absehbar, dass die angestrebte mikrobielle Biosynthese von 3,4-CHA grundsätzlich möglich sein sollte, wenn geeignete Enzyme für die Umsetzung von Chorisminsäure zu 3,4-CHA gefunden werden und diese überexprimiert werden. Die Bio-synthese von 3,4-CHA sollte ausgehend von Chorisminsäure über das Intermediat ADC zu 3,4-CHA erfolgen (Abbildung 11).

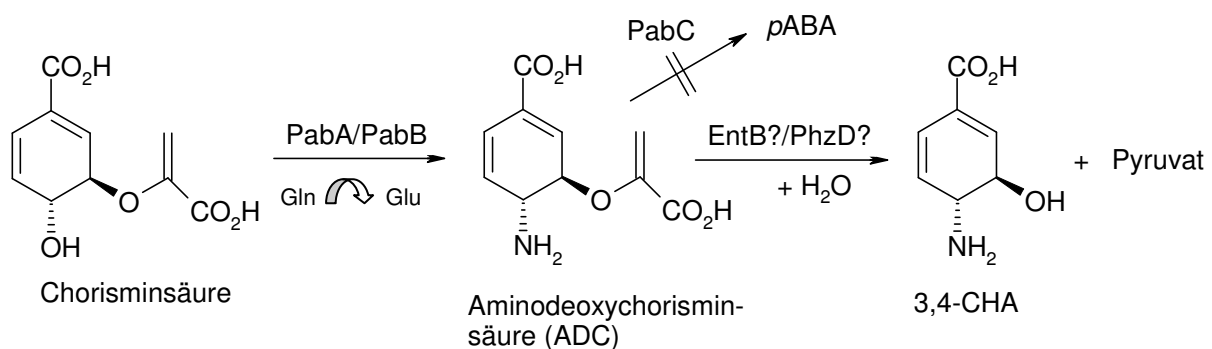


Abbildung 11: Geplante mikrobielle Synthese von 3,4-CHA

Ausgehend von Chorisminsäure soll 3,4-CHA über das Intermediat ADC gebildet werden. Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, ob die Isochorismatasen EntB oder PhzD die Umwandlung von ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat katalysieren können. Die Deletion des Gens *pabC* verhindert die in *E. coli* physiologische Umsetzung von ADC zu *pABA* durch die ADC-Lyase PabC.

Eine effektive mikrobielle Synthese von 3,4-CHA sollte durch folgende Synthesestrategie ermöglicht werden:

1. Konstruktion eines Stamms mit hohem Stofffluss zu Chorisminsäure
2. Erhöhung des Stoffflusses von Chorisminsäure zu ADC
3. (Effektive) Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat

Da es bereits gelungen war, die beiden Cyclitole 2,3-CHD und 3,4-CHD mikrobiell darzustellen und diese sich jeweils im Kulturüberstand befanden, sollte das chemisch ähnliche 3,4-CHA auch die Zellmembran passieren können und sich im Kulturüberstand nachweisen lassen.

Als Produzentenstamm für die bereits erfolgreich durchgeführten mikrobiellen Synthesen von 2,3-CHD und 3,4-CHD wurde jeweils ein je nach Zielprodukt unterschiedlich modifizierter *E. coli*-Stamm W3110 LJ110 verwendet. Aufgrund dieser positiven Erfahrungen mit dem Stamm LJ110 sollte dieser auch in dieser Arbeit eingesetzt werden.

Der erste benötigte Schritt bei der Biosynthese von 3,4-CHA, die Umwandlung von Chorisminsäure zu ADC, besteht formal aus einer Substitution der *para*-ständigen Hydroxygruppe in Chorisminsäure durch eine Aminogruppe. Diese Reaktion ist physiologisch für *E. coli* und war bereits mehrfach beschrieben worden (Walsh *et al.*, 1987; Green and Nichols, 1991; Viswanathan *et al.*, 1995; Parsons *et al.*, 2002). Daher sollten zunächst die beiden diese Reaktion katalysierenden Enzyme PabA und PabB überexprimiert werden, um einen erhöhten Stofffluss zu ADC zu erreichen.

Der zweite Schritt bei der geplanten mikrobiellen Biosynthese von 3,4-CHA besteht in der Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat. Diese Reaktion ist nicht physiologisch für *E. coli*; es handelt sich hierbei um die Hydrolyse eines Vinylethers. Zu Beginn dieser Arbeit war noch kein Enzym beschrieben worden, das in der Lage ist, ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat zu spalten. Daher sollten die beiden Enzyme PhzD und EntB, von denen bekannt war, dass sie Vinyletherspaltungen katalysieren, auf eine mögliche Aktivität gegenüber dem Substrat ADC getestet werden. Von EntB war schon bekannt, dass es ein breites Substratspektrum besitzt und neben dem physiologischen Substrat Isochorisminsäure auch Chorisminsäure als Substrat akzeptiert (Franke *et al.*, 2003; Rusnak *et al.*, 1990).

Für eine effektive Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA wäre die Deletion des Gens *pabC* notwendig, das die ADC-Lyase PabC kodiert (Green *et al.*, 1992), um die für *E. coli* physiologische Umsetzung von ADC zu *pABA* zu unterbinden.

Falls eine Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA mit EntB oder PhzD nicht oder nur unzureichend möglich sein sollte, würde durch Mutagenese versucht werden, ein für diese Umsetzung geeigneteres Mutein zu finden.

Durch eine kombinierte Proteinüberexpression dieses Muteins zusammen mit PabA und PabB sollte dann 3,4-CHA mikrobiell synthetisiert werden.

1.10 Vorarbeiten zu den einzelnen geplanten Schritten zur mikrobiellen Synthese von 3,4-CHA

1.10.1 Schritt 1: Konstruktion eines Stamms mit hohem Stofffluss zu Chorisminsäure

Da die zu untersuchende mikrobielle Synthese von 3,4-CHA ausgehend von Chorisminsäure über das Intermediat ADC läuft (Abbildung 11), hängt die erreichbare Produktausbeute von der Verfügbarkeit von ADC innerhalb der Zelle ab. Diese wiederum ist abhängig von der Verfügbarkeit von Chorisminsäure und Glutamin. Aus diesem Grund ist es vorteilhaft, einen Stamm zu benutzen, der einen erhöhten Stofffluss zu Chorisminsäure aufweist. Im Rahmen des CHORUS-Projekts/FAME-Projekts wurde deshalb bereits im Stamm LJ110 der Stofffluss zu Chorisminsäure erfolgreich erhöht, indem die folgenden Gene des Shikimisäurewegs (siehe 1.1) chromosomal integriert wurden (Stamm F82) bzw. plasmidkodiert überexprimiert wurden: *aroF*^{*} (kodiert ein feedbackinhibitions-resistentes Enzym AroF, siehe unten), *aroB* und *aroL* (Plasmide pC20, pC22 und pC57).

Die Überexpression dieser drei Genprodukte bewirkt einen erhöhten Stofffluss durch den Shikimisäureweg und somit auch einen erhöhten Fluss zu Chorisminsäure in der Zelle. Der erste Schritt des Shikimisäurewegs wird durch das Enzym DAHP-Synthase katalysiert. Es gibt drei verschiedene Isoformen dieses Enzyms, wobei jede durch eine andere aromatische Aminosäure (Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan) inhibiert wird. Das Enzym AroF wird durch die aromatische Aminosäure Tyrosin, ein Endprodukt des Shikimisäurewegs, inhibiert (Feedback-Inhibition). Um eine Inhibition von AroF zu verhindern, wurde das Enzym AroF^{*} benutzt, bei dem an Position 8 Asparagin durch Lysin substituiert ist. Diese Mutation führt zu einem feedbackinhibitions-resistenten Enzym (Jossek *et al*, 2001).

Chorisminsäure wird von *E. coli* für eine Vielzahl von Biosynthesen genutzt (siehe 1.3). Um zu verhindern, dass Chorisminsäure für andere Synthesewege als den Weg zu Folsäure über das Intermediat ADC benutzt wird und somit nicht für die Produktion von 3,4-CHA zur Verfügung steht, wurden zu Beginn des CHORUS-Projektes die Gene *tyrA* und *pheA* sowie das Operon *entCEBA* im Chromosom des *E. coli*-Stammes LJ110 deletiert. Die beiden Gene kodieren für die Enzyme Chorisminsäure-Mutase/Prephensäure-Dehydrogenase (TyrA) und Chorisminsäure-Mutase/Prephensäure-Dehydratase (PheA). Durch deren Deletion ist die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin nicht mehr möglich, so dass der resultierende Stamm auxotroph für diese beiden Aminosäuren ist. Das Operon

entCEBA ermöglicht die Biosynthese von Enterobactin, einem Eisenchelator, ausgehend von Chorisminsäure über das Zwischenprodukt Isochorisminsäure.

Durch die oben beschriebenen Deletionen sind die drei wichtigsten Biosynthesewege, die von Chorisminsäure ausgehen, unterbrochen, so dass im Stamm F82 (LJ110 $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)\ \Delta(entCEBA)::kan\ (Km^R)$) der Großteil der Chorisminsäure für die Biosynthese von 3,4-CHA zur Verfügung steht (Abbildung 12). Eine Deletion des Gens *trpE*, das für das Enzym Anthranilsäure-Synthase kodiert und für die Biosynthese der aromatischen Aminosäure Tryptophan essentiell ist, ist nicht erforderlich, da eine solche Deletion keine Erhöhung der Produktausbeute bei der Produktion von 2,3-CHD und 3,4-CHD bewirkt (Franke *et al.*, 2003). Für eine effektive mikrobielle Synthese von 3,4-CHA muss jedoch das Gen *pabC* deletiert werden, damit ADC ausschließlich zum Zielprodukt 3,4-CHA und nicht zu *pABA* umgesetzt wird.

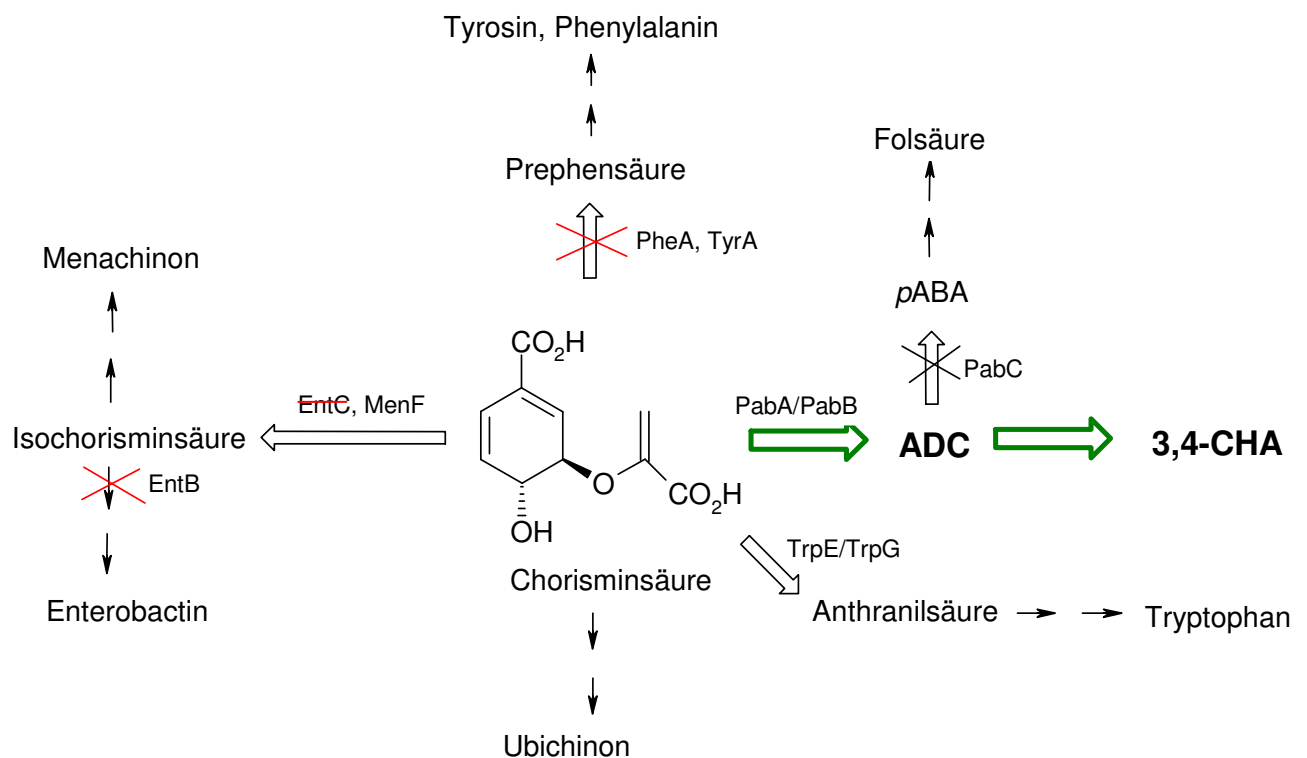


Abbildung 12: Ein veränderter *E. coli*-Stamm zur mikrobiellen Synthese von 3,4-CHA

Durch Deletion des *entCEBA*-Operons sowie der Gene *pheA* und *tyrA* sollte mehr Chorisminsäure für die Bildung von ADC und 3,4-CHA zur Verfügung stehen, da Chorisminsäure nicht mehr zu Tyrosin, Phenylalanin oder Enterobactin umgesetzt werden kann. Die Deletion des Gens *pabC* sollte durchgeführt werden, um die unerwünschte Umsetzung von ADC zu *pABA* zu verhindern.

Als alternativer Produktionsstamm zur Biosynthese von 3,4-CHA steht der *E. coli*-Stamm KB532 von der Firma DSM Biotech (Jülich) zur Verfügung, der aufgrund seines sehr hohen Stoffflusses durch den Shikimisäureweg auch einen hohen Stofffluss zu Chorisminsäure aufweist und daher ebenfalls geeignet ist. Die chromosomalen Veränderungen, die diesen erhöhten Fluss bewirken, sind nur unzureichend bekannt und bisher nicht näher untersucht.

1.10.2 Schritt 2: Erhöhung des Stoffflusses von Chorisminsäure zu ADC: Aminierung von Chorisminsäure durch das Enzym ADC-Synthase

Der erste Schritt bei der geplanten Biosynthese von 3,4-CHA besteht in der Aminierung von Chorisminsäure zu ADC (Abbildung 13).

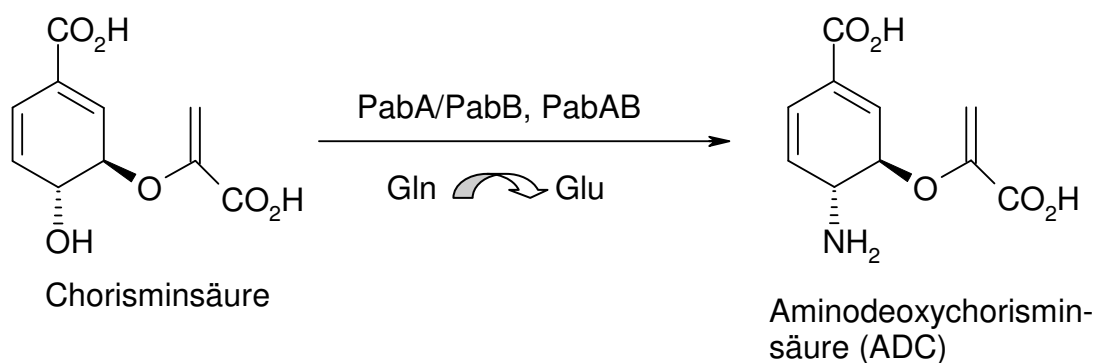


Abbildung 13: Aminierung von Chorisminsäure zu ADC

Die *E. coli*-Enzyme PabA und PabB aminieren Chorisminsäure zu ADC. Die hierfür benötigte Aminogruppe wird von Glutamin übertragen, das hierbei zu Glutaminsäure wird. Die gleiche Reaktion wird bei Streptomyceten durch das Enzym PabAB katalysiert.

Diese Reaktion findet in *E. coli* bei der Biosynthese von Folsäure statt und wird durch das Enzym PabB katalysiert. Die ADC-Synthase PabB hat ein Molekulargewicht von 51 kDa, bindet Chorisminsäure und benutzt Ammoniumionen, um die Bildung von ADC zu katalysieren. *In vivo* werden die für die Reaktion benötigten Ammoniumionen durch Hydrolyse von Glutamin bereitgestellt. Dies geschieht durch das Hilfsenzym PabA, eine Glutamin-Amidotransferase der Klasse I mit einem Molekulargewicht von 21 kDa (Nichols *et al.*, 1989). PabB kann bei hohen Ammoniumionenkonzentrationen auch ohne PabA die Aminierung von Chorisminsäure zu ADC katalysieren. Essentiell für die Aminierungsreaktion durch PabB ist ein Magnesiumion als Kofaktor. PabA und PabB bilden *in vivo* einen Komplex als Heterodimer. Dieser bildet sich allerdings nur vorübergehend, da die Wechselwirkungen zwischen PabA und PabB nur sehr schwach sind (Roux *et al.*, 1992; Rayl *et al.*, 1996). Seit 2002

ist eine Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2 Å von PabB bekannt (Parsons *et al.*, 2002). PabB besitzt eine komplexe α/β -Faltung: Der Enzymkern besteht aus zwei Domänen, die ein β -Sandwich bilden, das außen von α -Helices und Loops ummantelt ist (Abbildung 14).

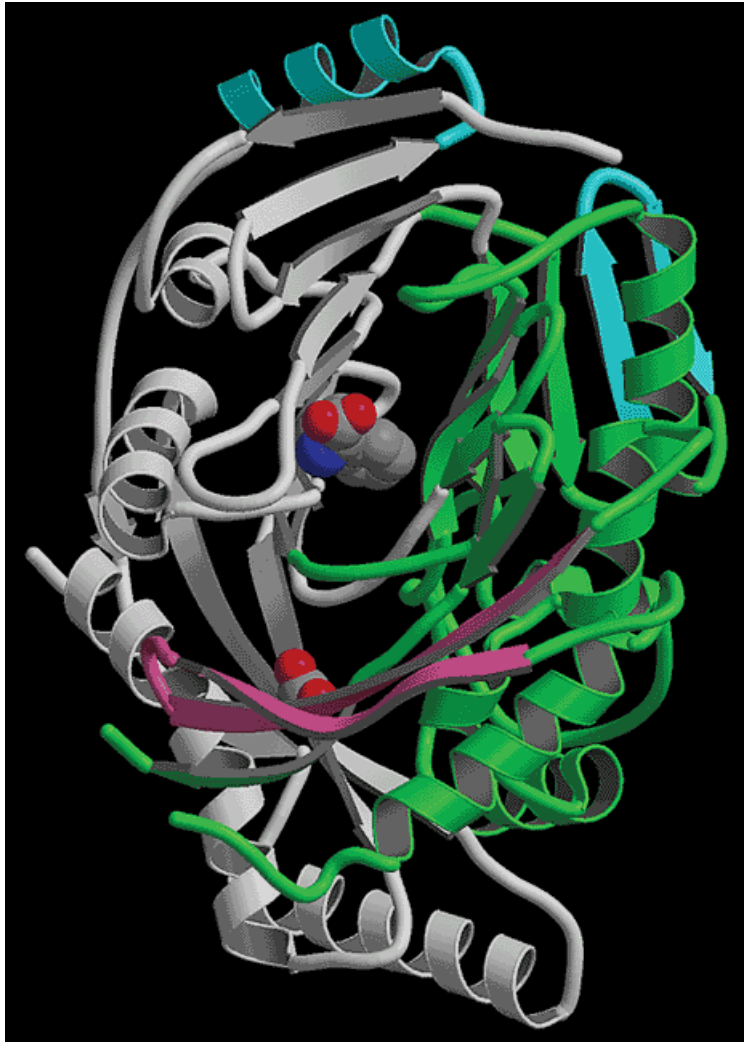


Abbildung 14: Modell der Struktur der ADC-Synthase PabB aus *E. coli* (nach Parsons *et al.*, 2002)

In grün und grau dargestellt sind die zwei Domänen, die den Enzymkern von PabB bilden. In pink dargestellt ist ein Deckel aus 14 Aminosäuren, der das vermutete aktive Zentrum des Enzyms bedeckt. Der cyan dargestellte Enzymteil fehlt in der Struktur der Anthranilat-Synthase von *Sulfolobus solfataricus*. In einem raumfüllenden Modell sind das fest gebundene Tryptophanmolekül sowie ein Formiat-Ion gezeigt, das sich bei der Proteinkristallisierung in die Struktur eingelagert hat.

Einzelheiten über die Bindung von Chorisminsäure im aktiven Zentrum von PabB sind aus der Kristallstruktur nicht ableitbar. Daher ist bisher auch noch kein möglicher Reaktionsmechanismus des Enzyms postuliert worden. Die Aufklärung mechanistischer Einzelheiten der Chorisminsäurebindung sowie des Reaktionsmechanismus wird dadurch erschwert, dass

Chorisminsäure in Lösung als ein Gemisch verschiedener Konformere vorliegt (Copley und Knowles, 1987) und die mögliche Bindung verschiedener Konformere im aktiven Zentrum berücksichtigt werden muss.

Auffällig ist eine hohe Sequenzübereinstimmung zwischen PabA und TrpG (ebenfalls eine Glutamin-Amidotransferase, die bei der Biosynthese von Anthranilsäure beteiligt ist) von 44% sowie eine Sequenzidentität von 26% zwischen PabB und TrpE, der Anthranilsäure-Synthase. Der erste Schritt der von der Anthranilsäure-Synthase katalysierten Reaktion besteht in der Aminierung von Isochorisminsäure zu 2-Amino-2-deoxy-Isochorisminsäure (ADIC). Es handelt sich hierbei also um eine ähnliche Reaktion wie die von PabB katalysierte, außer, dass die Aminierung an C2 statt an C4 stattfindet.

Die aktiven Zentren von PabB und TrpE ähneln sich stark. Beide besitzen an vergleichbarer Position Asparaginsäure- und Glutaminsäurereste, die für die Koordination des Magnesiumions erforderlich sind. Trotz dieser Ähnlichkeit findet die Aminierungsreaktion mit unterschiedlicher Selektivität statt. Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den beiden Enzymen ist, dass PabB ausschließlich die Aminierungsreaktion katalysiert, während TrpE zusätzlich anschließend noch die Eliminierung von Pyruvat von dem gebildeten Intermediat ADIC katalysiert. Dieser zweite Reaktionsschritt findet bei der Biosynthese von Folsäure in vergleichbarer Form ebenfalls statt, allerdings wird diese Reaktion hier durch ein zusätzliches Enzym, die ADC-Lyase PabC, katalysiert, das ADC in *p*ABA umwandelt (Green and Nichols, 1991). Sowohl PabB als auch TrpE besitzen eine Bindungstasche für Tryptophan, allerdings mit unterschiedlicher Funktion. Während Tryptophan bei PabB irreversibel gebunden ist und diese Bindung wahrscheinlich essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms ist, ist die Bindung bei TrpE reversibel und führt zu einer Inhibition des Enzyms (Produkt-Inhibition) (Parsons *et al.*, 2002).

Trotz der Ähnlichkeit von PabA und TrpG sowie PabB und TrpE unterscheiden sich die katalytisch aktiven Proteinkomplexe deutlich in ihrer Quartärstruktur. PabA/PabB bildet transient ein Heterodimer, während TrpG/TrpE ein stabiles Heterotetramer bildet (Zalkin, 1985).

Bei einigen anderen Organismen wie Streptomyceten gibt es statt der Proteine PabA und PabB nur ein Protein PabAB (Brown *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2001), das genau wie PabA/PabB die Aminierung von Chorisminsäure zu ADC katalysiert. In *Corynebacterium*

glutamicum gibt es ein Gen, das vermutlich eine ADC-Synthase PabAB_{C.gl.} kodiert. Der N-terminale Teil von PabAB ähnelt PabA, während der C-terminale Teil Sequenzähnlichkeit zu PabB aufweist. Verbunden sind diese beiden Teile im vermuteten PabAB_{C.gl.} durch eine Linkersequenz bestehend aus den 5 Aminosäureresten Alanin, Arginin, Threonin, Tyrosin und Arginin.

1.10.3 Schritt 3: (Effektive) Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat

Um 3,4-CHA mikrobiell zu synthetisieren, ist im letzten Schritt die Umwandlung der für *E. coli* physiologischen Verbindung ADC zum nicht physiologischen Endprodukt 3,4-CHA notwendig (Abbildung 15).

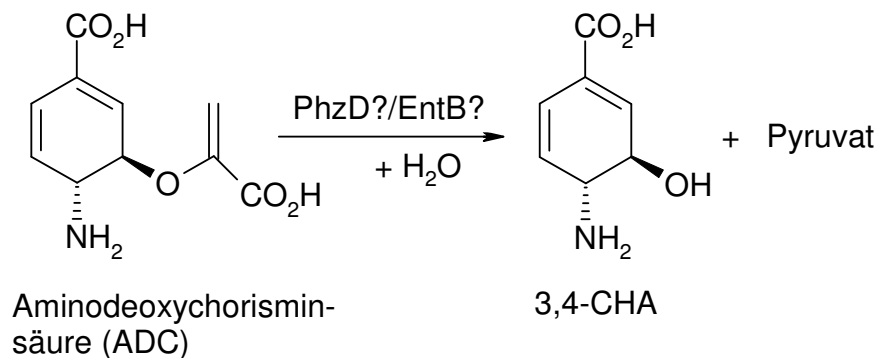


Abbildung 15: Umwandlung von ADC zu 3,4-CHA

Durch Abspaltung des Enolpyruvylrestes von ADC entstehen 3,4-CHA und Pyruvat. Eine solche Etherspaltung könnte durch die Isochorismatase EntB aus *E. coli* oder die Isochorismatase PhzD aus *Pseudomonas aeruginosa* katalysiert werden.

Bei dieser Reaktion handelt es sich um die Hydrolyse eines Vinylethers. Diese Reaktion ist sehr ungewöhnlich in biologischen Systemen. Die einzigen beiden bekannten Beispiele sind die Alkenyletherhydrolasen, die sich in den meisten Säugerzellen finden (Jurkowitz *et al.*, 1999), sowie die Isochorismatase, die Isochorisminsäure zu 2,3-CHD und Pyruvat spaltet (Rusnak *et al.*, 1990) bzw. ADIC zu 2,3-CHA und Pyruvat (Mavrodi *et al.*, 1998).

1.10.3.1 Die Isochorismatase EntB aus *E. coli*

E. coli besitzt die Isochorismatase EntB, die für die Biosynthese von Enterobactin essentiell ist. EntB katalysiert in *E. coli* die Spaltung von Isochorisminsäure zu 2,3-CHD und Pyruvat; bei dieser Reaktion handelt es sich um die Hydrolyse eines Vinylethers. EntB besteht aus 285

Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 32,5 kDa (Nahlik *et al.*, 1989). Für das native Protein wurde mittels Gelfiltration eine Größe von 159 kDa ermittelt; EntB liegt demnach im nativen Zustand als Pentamer vor (Rusnak *et al.*, 1990). EntB ist ein bifunktionales Enzym, dessen N-Terminus Isochorismatase-Aktivität besitzt, während der C-terminale Teil eine apo-Aryl-Carrier-Proteindomäne enthält, die nach einer Phosphopantetheinylierung für die Membranlokalisation von EntB sorgt (Gehring *et al.*, 1997). Im Rahmen des CHORUS-Projekts wurde EntB schon für die Biosynthese von 2,3-CHD und 3,4-CHD genutzt. Es war also bekannt, dass EntB anscheinend ein breites Substratspektrum aufweist und neben dem eigentlichen, physiologischen Substrat Isochorisminsäure auch Chorisminsäure als Substrat akzeptiert und zu 3,4-CHD umsetzt. Eine solche Umsetzung von Chorisminsäure ist bei der Charakterisierung von EntB bereits beschrieben worden (Rusnak *et al.*, 1990). Für die beiden Substrate Isochorisminsäure und Chorisminsäure sind die folgenden kinetischen Parameter für EntB bestimmt worden:

Kinetische Konstanten von EntB gegenüber Chorisminsäure und Isochorisminsäure			
	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Isochorisminsäure	15	10	0,66
Chorisminsäure	≥ 37.000	≥ 21	$\geq 5,6 \times 10^{-3}$

Tabelle 7: Kinetische Parameter für das Enzym EntB (nach Rusnak *et al.*, 1990)

Die kinetischen Daten wurden in einem gekoppelten enzymatischen Test mit dem Hilfsenzym L-Lactat-Dehydrogenase bei 37 °C und einem pH-Wert von 7 (50 mM Kaliumphosphat-Puffer) bestimmt. Die Autoren weisen jedoch darauf hin, dass die für Chorisminsäure bestimmten Werte sehr ungenau sind und die wirklichen Werte deutlich von den in der Tabelle gezeigten abweichen können.

Neben den in Tabelle 7 gezeigten Substraten Chorisminsäure und Isochorisminsäure wurden noch 11 weitere Verbindungen als mögliche Substrate von EntB getestet, darunter drei Substrate, die wie Chorisminsäure am C₄-Atom eine Hydroxygruppe besitzen. Für alle drei Substrate wurden wie für Chorisminsäure sehr hohe K_M -Werte bestimmt, die drei Größenordnungen über dem K_M -Wert von Isochorisminsäure lagen.

Daher ist es zwar denkbar, dass EntB auch das zu Chorisminsäure strukturell ähnliche ADC als Substrat akzeptiert und zu 3,4-CHA umsetzt; allerdings wird EntB voraussichtlich einen sehr hohen, mit Chorisminsäure vergleichbaren K_M -Wert im millimolaren Bereich für das Substrat ADC besitzen.

Aufgrund dieser Informationen über EntB ist jedoch klar, dass bei der Verwendung von EntB neben dem Zielprodukt 3,4-CHA auf jeden Fall auch mit 3,4-CHD als unerwünschtem Nebenprodukt gerechnet werden muss (Abbildung 16).

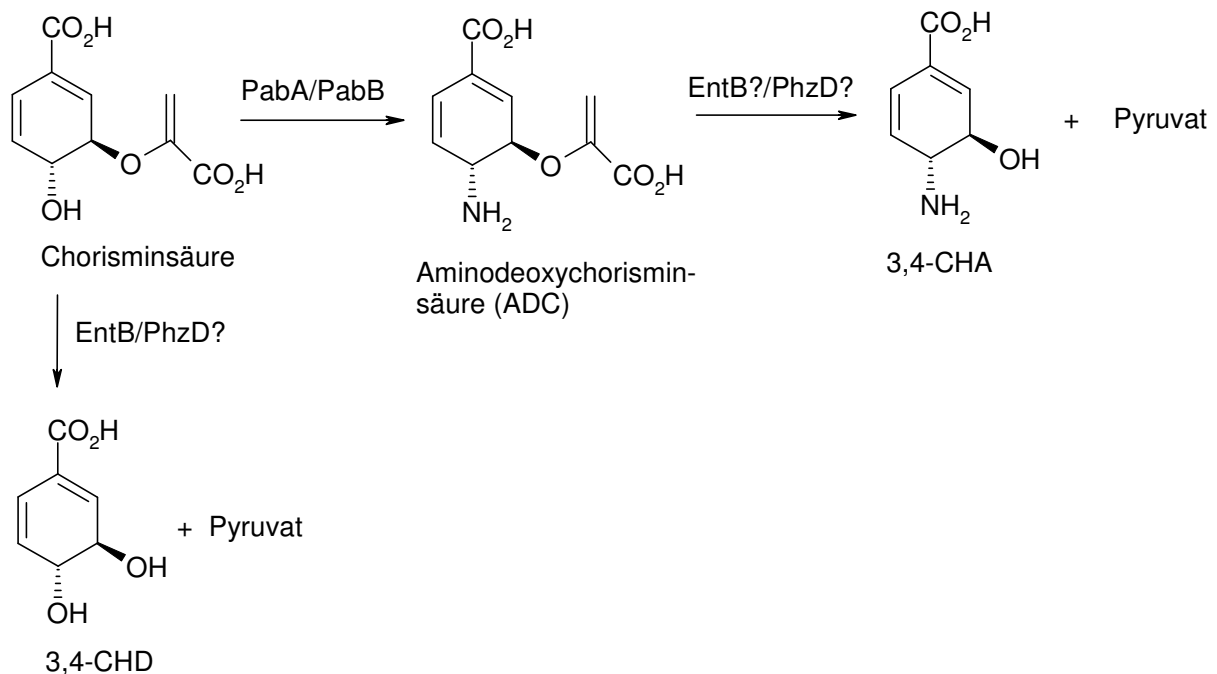


Abbildung 16: Problem von 3,4-CHD als Nebenprodukt bei der mikrobiellen Synthese von 3,4-CHA

In der Abbildung ist die geplante Abspaltung des Enolpyruvylrestes von ADC durch die Isochorismatasen EntB oder PhzD gezeigt. Neben den Zielprodukten 3,4-CHA und Pyruvat würde man bei Verwendung der Isochorismatase EntB auch das unerwünschte 3,4-CHD als Nebenprodukt erhalten, da EntB Chorisminsäure als Substrat akzeptiert und diese direkt zum unerwünschten 3,4-CHD umsetzen kann. Über das Substratspektrum von PhzD war zu Beginn der Arbeit nur bekannt, dass ADIC zu 2,3-CHA umgesetzt werden kann.

1.10.3.2 Die Isochorismatase PhzD aus *Pseudomonas aeruginosa*

Eine Alternative zu EntB wäre die Isochorismatase PhzD aus *Pseudomonas aeruginosa*. PhzD ist an der Phenazinbiosynthese beteiligt und katalysiert dort die Umwandlung von ADIC zu 2,3-CHA, ebenfalls eine Vinyletherspaltung (Mavrodi *et al.*, 1998). Über eine mögliche enzymatische Umsetzung von anderen, ADIC ähnelnden Verbindungen, wie z.B. ADC durch das Enzym PhzD war noch nichts berichtet worden. Eine Kristallstruktur von PhzD war noch nicht aufgeklärt worden; von PhzD war lediglich bekannt, dass das Enzym aus 207 Aminosäuren besteht und Homologien zur Isochorismatase EntB aus *E. coli* aufweist (Mavrodi *et al.*, 1998).

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit in der unten aufgeführten Liste nicht anders vermerkt, von den Firmen Biomol GmbH (Hamburg), Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Serva (Heidelberg), Novagen (Schwalbach) und Roth (Karlsruhe) im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad bezogen. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten stammten von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim).

Die folgenden Produkte wurden von anderen Herstellern bezogen:

Becton Dickinson GmbH (Heidelberg):

Bacto Agar; Bacto Hefeextrakt; Bacto Trypton

Biomers.net (Ulm):

Oligonukleotide

DiaSys Diagnostic Systems GmbH (Holzheim):

Ecoline[®] S+-Kit

Gibco, Invitrogen GmbH (Karlsruhe):

Agarose; ElectroMAX[™] DH5 α -E[™]-Zellen

Macherey-Nagel (Düren):

DNA-Präparations- und DNA-Aufreinigungskits

Millipore GmbH (Eschborn):

Ultrafiltrationseinheit Centricon YM-10

MWG Biotech AG (Ebersberg):

Oligonukleotide

New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main):

Proteingrößenstandard

Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn):

Färbelösung für SDS-Polyacrylamid-Gele

Qiagen GmbH (Hilden):

DNA-Präparations- und DNA-Aufreinigungskits

Stratagene Europe (Amsterdam):

Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit, Gene Morph II Random Mutagenesis Kit

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 8 und die benutzten Plasmide in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 8: Verwendete Bakterienstämme und ihre relevanten genetischen Marker

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
BL21(DE3)	F ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) exprimiert T7-RNA-Polymerase	Novagen, Schwalbach
BL21(DE3)pLysS	F ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pLysS Cm ^R ; exprimiert T7-RNA-Polymerase	Novagen, Schwalbach
BW25113	lacI ^q rrnB _{T14} ΔlacZ _{WJ} ΔlacZ _{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD _{AH33} ΔrhaBAD _{LD78}	Datsenko und Wanner, 2000
DH5α	supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi ⁻¹ relA1	Rodriguez-Quinones und Benedi, 1993
ElectroMAX TM DH5α-E TM	F Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺) gal phoA supE44 λ ⁻ thi ⁻¹ gyrA96 relA1	Invitrogen, Karlsruhe
F82	LJ110 Δ(pheA tyrA aroF) Δ(entCEBA)::kan (Km ^R)	Orf und Bongaerts, 2002; persönliche Mitteilung
F96	F82 Δlac:::(Ptac-aroFBL)	Trachtmann, 2003; persönliche Mitteilung
F99	F82 Δ(lacIZYA)::aroFBL Δ(fucPI)::pps	diese Arbeit
F111	F82 Δgcd:::cat (Cm ^R)	Orf und Bongaerts, 2003; persönliche Mitteilung
K15	KB532 ΔpabC:::kan (Km ^R)	DSM
KB532	Chorisminsäure-Produktionsstamm (Δ(tyrR) Δ (pheA tyrA) aroF ^{tblr})	DSM
LJ110	Wildtyp (W3110), prototroph	Bachmann, 1972
XL1-Blue	RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F proAB lacI ^q Z ΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, Amsterdam

Tabelle 9: Verwendete Plasmide und ihre relevanten genetischen Marker

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pC10	pJF119EH-pabA-pabB; pabA kloniert mit <i>EcoRI/BamHI</i> , pabB kloniert mit <i>BamHI/HindIII</i>	Sprenger, 2002; per- sönliche Mitteilung
pC20	pJF119EH-aroF-entC-entB-aroB-aroL	Esser, 2002, persön- liche Mitteilung
pC22	pJF119EH-aroF-entB-aroB-aroL	Esser, 2002, persön- liche Mitteilung
pC27	pJF119EH-phzD-phzE; phzD-phzE PCR-Produkt kloniert mit <i>SacI/BamHI</i>	Lorbach, 2002, persön- liche Mitteilung
pC28	pET16b-entB; entB kloniert mit <i>NdeI/BamHI</i>	Schürmann, 2002; persönliche Mitteilung

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pC29	pET22b- <i>entB</i> ; <i>entB</i> kloniert mit <i>NdeI/XhoI</i>	Schürmann, 2002; persönliche Mitteilung
pC38	pJF119EH- <i>pabA</i> ; <i>pabA</i> kloniert mit <i>XbaI/PstI</i>	diese Arbeit
pC39	pJF119EH- <i>pabB</i> ; <i>pabB</i> kloniert mit <i>EcoRI/XbaI</i>	diese Arbeit
pC42	pJF119EH- <i>pabA-pabB</i> ; <i>pabB</i> kloniert aus pSZD52 mit <i>PstI/SphI</i> in pC38	diese Arbeit
pC49	pET16b- <i>phzD</i> ; <i>phzD</i> kloniert mit <i>NdeI/BamHI</i>	Degner, 2002; persönliche Mitteilung
pC49W94D	pC49; AS-Codon 94 durch GAT ersetzt	diese Arbeit
pC49W94E	pC49; AS-Codon 94 durch GAA ersetzt	diese Arbeit
pC49W94C	pC49; AS-Codon 94 durch TGC ersetzt	diese Arbeit
pC49W94G	pC49; AS-Codon 94 durch GGC ersetzt	diese Arbeit
pC49W94S	pC49; AS-Codon 94 durch AGC ersetzt	diese Arbeit
pC49W94M	pC49; AS-Codon 94 durch ATG ersetzt	diese Arbeit
pC49W94A	pC49; AS-Codon 94 durch GCG ersetzt	diese Arbeit
pC49W94F	pC49; AS-Codon 94 durch TTT ersetzt	diese Arbeit
pC49W94I	pC49; AS-Codon 94 durch ATT ersetzt	diese Arbeit
pC49W94T	pC49; AS-Codon 94 durch ACC ersetzt	diese Arbeit
pC50	pET22b- <i>phzD</i> ; <i>phzD</i> kloniert mit <i>NdeI/XhoI</i>	Degner, 2002; persönliche Mitteilung
pC53	pJF119EH- <i>pabAB</i> ; <i>pabAB</i> aus <i>Corynebacterium glutamicum</i> (ATCC 13032); kloniert mit <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pC57	pJF119EH- <i>aroF-phzD-phzE-aroB-aroL</i>	Orf, 2003; persönliche Mitteilung
pC61	pJF119EH- <i>pabA/pabB</i> ; <i>pabA/pabB</i> kloniert mit <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pC78	pJF119EH- <i>pabAB-His-phzD</i> ; <i>His-phzD</i> aus pC49 kloniert mit <i>BglIII/BamHI</i> in <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pC78*	pC78 mit <i>His-phzD</i> aus <i>error-prone</i> PCR-Reaktion; kloniert mit <i>XbaI/BamHI</i>	diese Arbeit
pC79	pJF119EH- <i>pps</i> ; kloniert mit <i>EcoRI/SacI</i>	Orf, 2003; persönliche Mitteilung
pC79/kan	pJF119EH - <i>pps-kan</i> ; kloniert mit <i>HindIII</i>	diese Arbeit
pC110	pJF119EH- <i>pabAB-cat</i> ; pC78 mit kloniertem <i>cat</i> -PCR-Produkt; kloniert mit <i>XbaI/SphI</i> in <i>XbaI</i>	Orf, 2004; persönliche Mitteilung
pC113	pET-Duet-1- <i>pabAB</i> ; <i>pabAB</i> aus pC53 mit <i>BamHI/SacI</i> in pET-Duet-1 kloniert	diese Arbeit
pC120	pJF119EH- <i>entC-menD</i> ; <i>menD</i> kloniert in pDF3 mit <i>BamHI/SphI</i>	diese Arbeit
pDF3	pJF119EH- <i>entC-entB</i>	Franke; 2001
pETDuet-1	Amp ^R , ori _{pBR322} , P ¹ _{T7lac} , 6x His, P ² _{T7lac}	Novagen, Schwalbach
pET16b	Amp ^R , ori _{pBR322} , P _{T7lac} , 10x His	Novagen, Schwalbach
pET22b	Amp ^R , ori _{pBR322} , P _{T7lac} , 6x His	Novagen, Schwalbach
pETDuet-1	Amp ^R , ori _{pBR322} , P ¹ _{T7lac} , 6x His, P ² _{T7lac}	Novagen, Schwalbach
pJF119EH	Amp ^R , <i>lacI^q</i> , <i>Ptac</i> , ori <i>colE1</i>	Fürste <i>et al.</i> ; 1986
pLysS	Cm ^R , ori _{p15A} , P _{tet} , T7-Lysozym	Novagen, Schwalbach
pSZD52	pUC19- <i>trpE-pabB</i>	Nichols <i>et al.</i> , 1989

2.3 Kultivierung von Bakterien

2.3.1 Nährmedien

Als Standardmedium für die Anzucht von *E. coli* diente Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989). Durch Zugabe von 2% Agar zum Medium wurde ein festes Nährmedium erhalten (Agarplatten).

LB-Medium: 10 g/l Trypton
 5 g/l Hefeextrakt
 5 g/l NaCl

Für die Elektroporation wurde SOB-Medium benutzt:

SOB-Medium: 20 g/l Trypton
 5 g/l Hefeextrakt
 0,5 g/l NaCl
 2,4 g/l MgSO₄ · 7 H₂O
 0,186 g/l KCl

Für SOC-Medium wurden zusätzlich noch die folgenden Komponenten hinzugegeben:

10 mM MgCl₂
20 mM Glukose

Zur mikrobiellen Produktion von 3,4-CHA und anderer aus dem Shikimisäureweg abgeleiteten Produkte wurde ein verändertes Minimalmedium (MM) nach Tanaka verwendet (Tanaka *et al.*, 1967; verändert nach Pan *et al.*, 1987):

Minimalmedium für *E. coli* Kultivierungen

Substanz	Endkonzentration [g/l]
KH ₂ PO ₄	3
K ₂ HPO ₄	12
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,3
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,015
NaCl	0,1
Glukose · H ₂ O	5
FeSO ₄ · 7 H ₂ O /NaCitrat	15 ml/l (von einer Lösung aus 7,5 g/l FeSO ₄ · 7 H ₂ O und 100 g/l NaCitrat)
Thiamin	0,0075
Spurenelemente (s.u.)	33 ml/l
Vitaminlösung (s.u.)	1 ml/l
L-Tyrosin	0,04
L-Phenylalanin	0,04

Der pH-Wert des Mediums wurde mit KOH auf 7,2 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

Spurenelementlösung (verändert nach Pan *et al.*, 1987)

Substanz	Konzentration [g/l]
AlCl ₃	26,7
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	9,3
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	33,25
H ₃ BO ₃	6,6
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	266
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	40
NiSO ₄ · 6 H ₂ O	26,6
ZnSO ₄	200

Die beschriebene Spurenelementstammlösung ist 50-fach konzentriert und wurde steril filtriert.

Vitaminlösung (nach Gerhardt *et al.*, 1994)

Substanz	Konzentration [mg/l]
p-Aminobenzoesäure	50
Folsäure	20
Biotin	20
Nicotinsäure	50
Calcium-Panthothenat	50
Riboflavin	50
Thiamin	50
Pyridoxin (B6)	100
Cyanocobalamin (B12)	5
Liponsäure	5

Mit KOH wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und die Lösung steril filtriert. Die Vitaminstammlösung ist 1000-fach konzentriert.

2.3.2 Medienzusätze

Zu den Medien wurde nach dem Autoklavieren bzw. vor dem Sterilfiltrieren die folgende Menge an entsprechenden für die Selektion nötigen Antibiotika zugegeben:

Ampicillin (gelöst in H ₂ O)	100 mg/l
Chloramphenicol (gelöst in 70% Ethanol)	34 mg/l
Kanamycin (gelöst in H ₂ O)	25 mg/l

Gene, die unter der Kontrolle des T7*lac*-Promotors stehen, wurden durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 0,1 mM (bei mikrobiellen Synthesen) bis 1 mM (bei Proteinaufreinigungen) induziert.

2.3.3 Kultivierungsbedingungen

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte aerob bei 37 °C auf Agarplatten oder in Flüssigkulturen auf einem Schüttler mit 220 Upm. Bei Volumina kleiner 5 ml wurden zur Anzucht sterile Reagenzgläser verwendet; bei größeren Volumina Erlenmeyerkolben, die mit nicht mehr als 10% des Gesamtvolumens befüllt wurden.

Kulturen, die der Expression rekombinanter Proteine dienten, wurden bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,8$ mit 1 mM IPTG induziert. Angeimpft wurden diese Hauptkulturen auf eine Start- OD_{600} von 0,05 ausgehend von einer Übernachtskultur. Nach einer Induktionszeit von vier Stunden wurde die Kultivierung gestoppt.

Kultivierungen zur mikrobiellen Synthese von 3,4-CHA wurden im beschriebenen Minimalmedium durchgeführt. Die Hauptkulturen wurden durch eine Übernachtskultur auf eine OD_{600} von 0,08 angeimpft und zunächst bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Bei einer OD_{600} von 0,7 wurde die Temperatur auf 25 °C gesenkt und bei einer OD_{600} von 0,8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Nach 24 stündiger Kultivierung wurde 5 g/l Glukose zugegeben und die Kultivierung nach insgesamt 48 Stunden gestoppt.

Zur langfristigen Stammhaltung wurden Übernachtskulturen mit 50% (v/v) sterilem Glycerin versetzt. Diese Glycerin-Dauerkulturen wurden bei -70 °C gelagert.

2.3.4 Bestimmung von Biomasse

Die Dichte von Bakterienkulturen wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Photometer (Cary 50 Bio, Varian) gegen einen Leerwert bestehend aus unbeimpftem Medium bestimmt. Proben mit einem Extinktionswert, der größer als 0,5 war, wurden vor der Messung mit Medium verdünnt, da bei höheren Extinktionswerten keine Proportionalität mehr zwischen Biomassenkonzentration und optischer Dichte besteht.

2.4 Transformation von *E. coli*

Transformationen wurden in dieser Arbeit nach der in der Literatur beschriebenen Rubidiumchlorid-Methode durchgeführt (Hanahan, 1983). Hierzu wurden die beiden jeweils steril filtrierten Lösungen RF1 und RF2 verwendet.

RF1:	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ · 4 H ₂ O 30 mM CH ₃ COO ⁻ K ⁺ 10 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O 15 g Glycerin (87%) pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt
RF2:	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O 15 g Glycerin (87%) pH 6,8 mit NaOH eingestellt

Die kompetenten Zellen wurden zumeist sofort verwendet (bei Ligationen) oder in 200 µl Aliquots bei -70 °C für den späteren Gebrauch gelagert. Für eine Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen mit 10-200 ng Plasmid-DNA bzw. einem kompletten Ligationsansatz versetzt. Der Transformationsansatz wurde nun 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann erfolgte für 90 Sekunden ein Hitzeschock bei 42 °C und eine zweiminütige erneute Inkubation auf Eis. Zur Regeneration wurden die Zellen 30-60 Minuten zusammen mit 800 µl LB-Medium bei 37 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Durch vorsichtiges Zentrifugieren (3 Minuten, 4000 x g) des Ansatzes und anschließendes Resuspendieren wurde das Kulturvolumen auf 100 µl reduziert und dieses auf Agarplatten mit dem für die Selektion geeigneten Antibiotikum ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Zur Transformation von linearem PCR-Produkt bei der chromosomalen Integration von Genen (siehe 2.5.13) nach einer Abwandlung der Methode von Datsenko und Wanner (Datsenko und Wanner, 2000) wurde die Methode der Elektroporation gewählt.

Die eingesetzten BW25113-*E. coli* Zellen wurden zunächst mit dem folgenden Protokoll elektrokompent gemacht:

- Wachstum der Zellen in einer 5 ml SOB-Kultur mit 5 mM L-Arabinose und Ampicillin bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6
- Dreimaliges Waschen und 100-faches Aufkonzentrieren der Zellen mit 10%igem eiskalten Glycerin

Bei der Transformation wurde auf Eis zu 100 µl Zellen 10 µl PCR-Produkt gegeben. Die Elektroporation erfolgte unter folgenden Bedingungen mit dem Gene Pulser[®] II (Bio-Rad): 200 Ω, 25 µF und 2,2 kV. Nach erfolgtem Spannungsimpuls wurde 1 ml SOC-Medium zu den Zellen gegeben. Diese wurden anschließend etwa drei Stunden bei 30 °C geschüttelt, dann auf

Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert und die Platten bis zum Wachstum von Kolonien bei 30 °C gelagert.

Zur Transformation des Ligationsansatzes aus *error-prone*-PCR-Produkt und pC110 (siehe 3.4.2) wurden ElectroMAX™ DH5 α -E™-Zellen (Invitrogen) benutzt. Diese Zellen besitzen eine sehr hohe Kompetenz und liefern mehr als 10¹⁰ Transformanten pro μ g eingesetzter pUC19 Plasmid-DNA. Die Elektroporation mit diesen Zellen wurde genau wie oben beschrieben durchgeführt. Vor der Transformation des Ligationsansatzes wurde dieser mit Hilfe des „MinElute Gel Extraction Kit“ (Qiagen) entsalzt und in H₂O aufgenommen.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 DNA-Präparation

Plasmid-DNA wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) oder durch das „NucleoSpin Plasmid Kit“ (Macherey-Nagel) nach Angaben der jeweiligen Hersteller isoliert.

Zur Isolation größerer Plasmidmengen wurde das „Nucleobond AX Kit“ (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers benutzt.

2.5.2 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim). In einem analytischen Restriktionsansatz wurden ca. 200 ng DNA in einem Volumen von 10-20 μ l verdaut; für einen präparativen Restriktionsverdau wurden bis zu 10 μ g DNA in einem Volumen bis 80 μ l eingesetzt. Um einen vollständigen DNA-Verdau zu erreichen, wurden pro μ g eingesetzter DNA 4-5 Units der Restriktionsendonuklease eingesetzt. Der Verdau wurde für ein bis drei Stunden (bei PCR-Produkten) bei der jeweils optimalen Temperatur durchgeführt.

2.5.3 DNA-Fällung durch Ethanol

Zum Entsalzen von Plasmid-DNA wurde die plasmidhaltige Lösung zunächst mit 0,25 M NaCl und dem 2,5-fachen Volumen an eiskaltem Ethanol versetzt und zur Fällung 30 Minuten

bei -70 °C gelagert. Danach wurde die Lösung mindestens 15 Minuten bei 4 °C und 14.000x g zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde mit 200 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in das gewünschte Volumen Wasser aufgenommen.

2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese wurden DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Die für die Gele eingesetzte Agarosekonzentration betrug je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente 0,5-2 %. Die aufzutragenden DNA-Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 5x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Gelelektrophorese wurde in TAE-Puffer und je nach Gelgröße bei 80 – 150 V durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen.

5x Probenpuffer: 0,1% Bromphenolblau
 30% Glycerin

50x TAE-Puffer 242 g/l TRIS
 18,61 g/l Titriplex III (Merck)
 pH 8,0 mit Essigsäure

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurden das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) und das „Nucleospin Extract Kit“ (Macherey-Nagel) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

2.5.5 Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Um eine Religation von linearisierter Plasmid-DNA in einem Ligationsansatz zu verhindern, wurden vor der Ligation die 5'-endständigen Phosphatgruppen mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase aus arktischen Garnelen (Roche Diagnostics), wie vom Hersteller beschrieben, entfernt.

2.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von linearisierter Plasmid-DNA mit entsprechend restringierten DNA-Fragmenten wurde mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche Diagnostics) nach den Angaben des

Herstellers durchgeführt. Wie in der Vorschrift empfohlen, wurde bei Ligationsansätzen ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 eingesetzt. Die Ligation erfolgte durch 15 minütige Inkubation des Ansatzes bei Raumtemperatur.

2.5.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987) wurden in dieser Arbeit DNA-Abschnitte mit einer Länge von 500 – 8000 bp von Plasmiden oder chromosomaler DNA amplifiziert. Die hierbei verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden so gewählt, dass sie jeweils komplementär zu den Randbereichen des zu amplifizierenden Bereichs waren (Tabelle 10). Um eine nachfolgende Klonierung des amplifizierten Bereichs zu ermöglichen, wurden an den äußeren Rand Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingebracht; um eine chromosomale Integration von PCR-Produkten mittels homologer Rekombination zu ermöglichen, wurde an den äußeren Rand der Primer eine Sequenz aus etwa 40 Nukleotiden angehängt, die homolog zu der gewünschten Integrationsstelle im Chromosom ist. In dieser Arbeit wurden für PCR-Reaktionen je nach Reaktionstyp Taq-Polymerase (PCR Core Kit) oder Pwo-DNA-Polymerase (beide Roche Diagnostic) eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden, wie vom Hersteller beschrieben, in 50 µl Ansätzen mit ca. 10 ng Plasmid-DNA oder 30 ng chromosomaler DNA als Matrize angesetzt. Die benutzten Primer stammten von MWG Biotech oder Biomers.net und finden sich in Tabelle 10. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Peltier Thermal Cycler (PTC-200, MJ Research) und einem Genius Thermal Cycler (Techne) durchgeführt, wobei die genauen Reaktionsbedingungen jeweils auf die Länge des PCR-Produkts und die Schmelztemperaturen der benutzten Primer abgestimmt wurden. Die jeweils erhaltenen PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese von Nebenprodukten und eingesetzter Matrizen-DNA getrennt und mittels Gelelution aus dem Agarosegel aufgereinigt.

Tabelle 10: Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation der aufgeführten Gene

Die Erkennungssequenzen der eingeführten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
<i>pabA</i> aus <i>Escherichia coli</i> in pJF119EH (pC38)		
PabA5XbaI	TT <u>TT</u> CTAGAGGTTCTTTTGTACCGGAGCCG	<i>XbaI</i>
PabA3PstI	TTTT <u>CTGCAGC</u> CAGAAATCAGCGATGCAGG	<i>PstI</i>
<i>pabB</i> aus <i>Escherichia coli</i> in pJF119EH (pC39)		
PabB5EcoRI	TTGA <u>ATTCCAC</u> ATAGCCAGTAGAGTCAGG	<i>EcoRI</i>

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
PabB3XbaI	<u>TTTCTAGAGGTATTC</u> CACGTCTTACTTCTCC	<i>XbaI</i>
<i>pabAB</i> aus <i>Corynebacterium glutamicum</i> in pJF119EH (pC53)		
PabAB(C.g.)_for	TTTTAGATCTGTGGTTTTGTCAGAGGATGTC	<i>BglII</i>
PabAB(C.g.)_rev	TTGGAT <u>CCCGTACGTC</u> ATGGAAATTCAAC	<i>BamHI</i>
<i>pps/kan</i> -PCR-Produkt aus pC79/ <i>kan</i> zur chromosomalen Integration des <i>pps</i> -Gens		
fucP-integr	TGCTGTGCTCACTGTTTTTTCTTTGGGCGGTAGCC AATAACCTTAACGACATTTTATTATCAAGGCGCAC TCCCGTTCTGG	keine
fucI-integr	CAGCATGGAGGCGAGAGTGATAAAGTCTGCGCCA ACGTGGCCGATGGTCAGAACCCCCAGGGTTATTG TTCATGAGCG	keine

2.5.8 error-prone PCR

Für die in dieser Arbeit durchgeführte *error-prone* PCR (Cadwell und Joyce, 1992) wurde das „GeneMorph II Random Mutagenesis Kit“ (Stratagene) gemäß der Beschreibung des Herstellers benutzt. Anders als in der Vorschrift beschrieben, wurde zu den PCR-Ansätzen 2% DMSO gegeben, da ohne DMSO kein PCR-Produkt erhalten wurde. Um die angestrebte Mutationsrate von einer Mutation pro *phzD*-Gen zu erhalten, wurden als Matrizen-DNA 500 ng pC49 eingesetzt; deutlich weniger als die in der Vorschrift beschriebenen 5-10 µg. Als Primer dienen die Oligonukleotide 5errorp und 3errorp (Tabelle 11).

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
5errorp	GGG <u>TCTAGAAATAAT</u> TTTTGTTTAACTTTAAG AAGGAGATATACCATG	<i>XbaI</i>
3errorp	AAAGGAT <u>CCCGCCAA</u> AACAGCCAAGCTTTCA	<i>BamHI</i>

Tabelle 11: Bezeichnung und Sequenz der bei der *error-prone* PCR benutzten Oligonukleotide

Die Erkennungssequenzen der eingeführten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

2.5.9 Overlap-PCR

Zur Generierung eines Gens für ein künstliches Fusionsprotein PabA/PabB (siehe 3.1.2) aus *Escherichia coli* wurde eine Overlap-PCR durchgeführt (Abbildung 17). Hierzu wurden zunächst mit den Primern PabA(pC10)_for (1) und AB-Fus(E.c.)A_re (3) sowie den Primern PabB(pC10)_rev (2) und AB-Fus(E.c.)B_fo (4) (Tabelle 12) jeweils eine separate PCR-Reaktion durchgeführt. Als Matrizen-DNA diente in beiden Fällen pC10 (Tabelle 9). Die beiden erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem gemeinsamen Ansatz gemischt, und mit

den Pri-mern PabA(pC10)_for (1) und PabB(pC10)A_rev (2) (Tabelle 12) wurde erneut eine PCR-Reaktion durchgeführt.

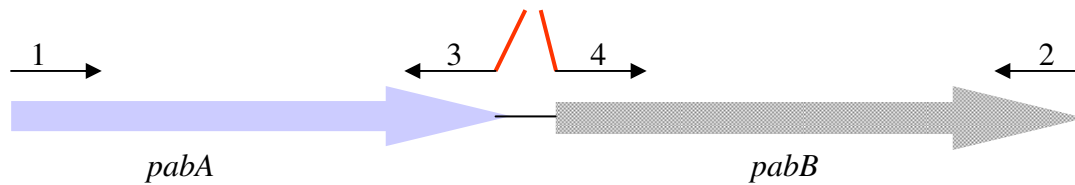


Abbildung 17: Schematische Darstellung der durchgeführten Overlap-PCR

Primer AB-Fus(E.c.)A_re (3) bindet am 3' Ende des *pabA*-Gens unmittelbar vor dem Stopcodon. Direkt dahinter sind 15 Basen eingebracht worden, die die Linkerregion von PabAB aus *Corynebacterium glutamicum* kodieren (in rot dargestellt). Das 5' Ende von Primer AB-Fus(E.c.)B_fo (4) enthält 15 zum 3' Ende von Primer (3) komplementäre Basen (in rot dargestellt), während das 3' Ende des Primers zum 5' Ende des *pabB*-Gens komplementär ist und dort bindet. Aufgrund der beiden komplementären Bereiche von Primer (3) und (4) lagern sich die beiden zunächst erhaltenen PCR-Produkte (*pabA* und *pabB*) aneinander, wenn sie sich bei der zweiten PCR-Reaktion zusammen in einem Ansatz befinden. Auf diese Weise wird in der zweiten PCR-Reaktion das Gen des künstlichen *Escherichia coli* Fusionsproteins PabA/PabB amplifiziert.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
PabA(pC10)_for (1)	TTTT <u>AGATCT</u> TTTTGTACCGAGCCGCCATG	<i>BglIII</i>
PabB(pC10)_rev (2)	TTGGATCCCTTACTTCTCCAGTTGCTTC	<i>BamHI</i>
AB-Fus(E.c.)A_re (3)	ACGATAGGTACGCGCGGATGCAGGAAATTAGC	-
AB-Fus(E.c.)B_fo (4)	GCGCGTACCTATCGTATGAAGACGTTATCTCCCG	-

Tabelle 12: Bezeichnung und Sequenz der bei der Overlap-PCR benutzten Oligonukleotide

Die Erkennungssequenzen der eingeführten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

2.5.10 Ortsgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe von ortsgerichteter Mutagenese (Gillam und Smith, 1979; Kunkel, 1985) wurde im *phzD*-Gen in pC49 das Codon für die Aminosäure W94 durch neun andere Codons ersetzt, die jeweils eine andere Aminosäure kodieren. Mit dieser Methode wurde auch die in pC49 gefundene Mutation V71M wieder rückgängig gemacht. Alle durchgeführten ortsgerichteten Mutagenesen wurden mit dem „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die folgenden Oligonukleotide dienten als Primer für die durchgeführten PCR-Reaktionen (Tabelle 13).

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Konstruktion der PhzD-Muteine	
5'W94A 3'W94A	GTCTGCTCAAGGACTTC <u>CGCG</u> GGGCGGGGCATGCGCG CGCGCATGCCCGGCCCGCGAAGTCCTTGAGCAGAC
5'W94C 3'W94C	GTCTGCTCAAGGACTTCT <u>GCG</u> GGGCGGGGCATGCGCG CGCGCATGCCCGGCCCGCAGAAGTCCTTGAGCAGAC
5'W94D 3'W94D	GTCTGCTCAAGGACTTCGATGGGCGGGGCATGCGCG CGCGCATGCCCGGCCCATCGAAGTCCTTGAGCAGAC
5'W94E 3'W94E	GTCTGCTCAAGGACTTCGAAGGGCGGGGCATGCGCG CGCGCATGCCCGGCCCTTCGAAGTCCTTGAGCAGAC
5'W94F 3'W94F	GTCTGCTCAAGGACTTCTTGGGCGGGGCATGCGCG CGCGCATGCCCGGCCAAAGAAGTCCTTGAGCAGAC
5'W94G 3'W94G	GTCTGCTCAAGGACTTCGGCGGGCGGGGCATGCGCG CGCGCATGCCCGGCCCGCGAAGTCCTTGAGCAGAC
5'W94I 3'W94I	GTCTGCTCAAGGACTTCATTGGGCGGGGCATGCGCG CGCGCATGCCCGGCCCAATGAAGTCCTTGAGCAGAC
5'W94M 3'W94M	GTCTGCTCAAGGACTTCATGGGCGGGGCATGCGCG CGCGCATGCCCGGCCCATGAAGTCCTTGAGCAGAC
5'W94T 3'W94T	GTCTGCTCAAGGACTTCACCGGGCGGGGCATGCGCG CGCGCATGCCCGGCCCGGTGAAGTCCTTGAGCAGAC
Wiederherstellung der PhzD-Wildtypsequenz	
5'M71V 3'M71V	GTGCGTCGAGCAGGGCGTGCAGATCGCCTACAC GTGTAGGCGATCTGCACGCCCTGCACGCAC

Tabelle 13: Beschreibung und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide für die ortsgerechtere Mutagenese des *phzD*-Gens aus *Pseudomonas aeruginosa* in pC49

Ausgetauschte Nukleotide sind unterstrichen dargestellt.

Mittels DNA-Sequenzierung (siehe 2.5.11) wurde die Richtigkeit aller eingebrachten Mutationen bestätigt.

2.5.11 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden in dieser Arbeit nach der Didesoxy-Methode nach Sanger durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Benutzt wurden hierzu nach den Angaben des Herstellers das „Thermo Sequenase Sequencing Kit“ (Amersham Pharmacia) und „Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit“ (Amersham Pharmacia). Die Sequenzierung erfolgte mit den Geräten LI-COR DNA Sequencer 4200 (MWG-Biotech) und *Alfexpress* DNA Sequencer (Pharmacia Biotech), jeweils nach den Angaben des Herstellers. Zur Datenerfassung und Auswertung wurden die beiden Programme „Base ImagIR 4.1“ und „AlfWin Sequence Analyser 2.10“ verwendet.

2.5.12 P1-Transduktion von *Escherichia coli*

Die Transduktion von *E. coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe des unspezifisch transduzierenden Phagen P1_{kc}. Mit diesem lassen sich DNA-Fragmente von bis zu 90 kbp Länge übertragen. Die Herstellung der P1_{kc}-Phagen sowie die Transduktion erfolgte nach der Methode von Miller (Miller, 1992).

2.5.13 Chromosomale Integration von Genen

In dieser Arbeit sollte das Gen der PEP-Synthetase (*pps*-Gen) chromosomal in den Fukose-Lokus von *E. coli*-Stämmen integriert werden. Hierzu wurde die Methode von Datsenko und Wanner (Datsenko und Wanner, 2000) zur Deletion von chromosomalen Genen in abgewandelter Form benutzt.

Zunächst wurde das Plasmid pC79/*kan* aus den schon vorhandenen Plasmiden pC79 und pC01Kan konstruiert (Trachtmann, 2003, persönliche Mitteilung) (Abbildung 18).

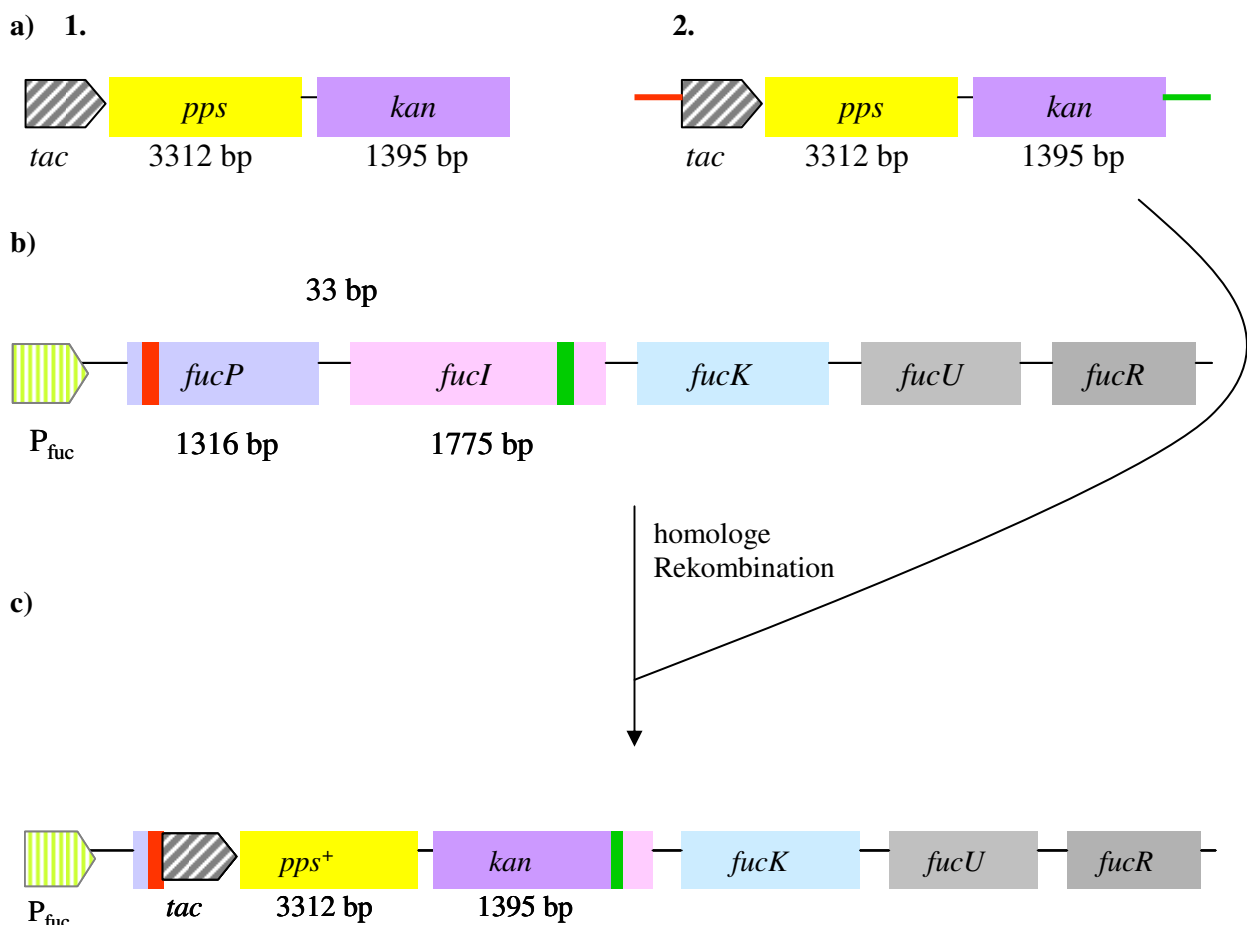


Abbildung 18: Schematische Darstellung der chromosomalen Integration des *pps*-Gens in den Fukose-Lokus.

a) 1) Darstellung des Plasmids pC79/*kan*; 2) Das erhaltene PCR-Produkt des *pps*-Gens mit gekoppeltem *kan*-Gen für Kanamycinresistenz; in rot und grün sind die durch die benutzten Primer eingebrachten homologen Bereiche zu Genen *fucP* und *fucI* dargestellt.

b) Schematische Darstellung des Fukose-Lokus in *E. coli*; in rot und grün sind Bereiche der Gene *fucP* und *fucI* markiert, die homolog zu den in a)2. eingesetzten Primern sind.

c) Schematische Darstellung des Fukose-Lokus in *E. coli* nach erfolgter chromosomaler Integration des *pps*-Gens mit gekoppeltem *kan*-Gen; das chromosomal integrierte *pps*-Gen steht unter der Kontrolle des *tac*-Promotors. Nicht gezeigt sind die die Kanamycin-Kassette flankierenden FRT-Sequenzen. Diese können von einer FLP-Rekombinase erkannt werden, mit deren Hilfe die Resistenz-Kassette aus dem Chromosom entfernt werden kann.

Erklärung der gezeigten Gene: *pps*: Gen kodiert die PEP-Synthetase; *fucP*: Gen kodiert die Fukose-Permease FucP; *fucI*: Gen kodiert die Fukulose-Isomerase FucI; *fucK*: Gen kodiert Fukulose-Kinase FucK; *fucU*: Gen kodiert ein Protein des Fukose-Abbauwegs; *fucR*: Gen kodiert ein Protein, das als Positivregulator des Fukose-Operons wirkt.

Zur Amplifizierung des *pps*-Gens mit gekoppeltem Kanamycinresistenzgen mittels PCR-Reaktion aus dem Plasmid pC79/*kan* wurden Primer verwendet, die an ihren Enden jeweils 45 Basen enthielten, die homolog zu den Genen *fucP* bzw. *fucI* waren. Auf diese Weise ist eine chromosomale Integration des PCR-Produkts durch homologe Rekombination in den Fukose-Lokus möglich (Abbildung 18); die Selektion von positiven Klonen ist durch die eingebrachte Kanamycinresistenz möglich.

Anschließend wurde das *pps*-Gen mittels P1-Transduktion (Miller, 1992) in den Fukose-Lokus des Stammes F96 transduziert (neuer Stamm F99 (*F96* Δ (*fucPI*::*pps*)). Die Transduktion ließ sich nur erfolgreich in den Stamm F96 mit entfernter Chloramphenicol-Resistenz durchführen. Eine Transduktion in den gleichen Stamm mit Chloramphenicol-Resistenz scheiterte trotz mehrfacher Versuche. Der Erfolg der Transduktion konnte durch eine PCR-Reaktion mit den oben beschriebenen Primern nachgewiesen werden, bei der der Fukose-Lokus als Matrize diente, weil sich durch die erfolgte chromosomale Integration die Größe des Fukose-Lokus geändert hat und somit auch die Größe des PCR-Produkts (Daten nicht gezeigt).

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde die Methode von Bradford (Bradford, 1976) angewendet. Die für diese Methode benötigte Kalibrierungsreihe wurde mit BSA im Bereich von 25 – 400 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt und war in diesem Bereich linear.

2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach deren Molekülgröße erfolgte unter denaturierenden Bedingungen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970).

Für die Elektrophorese wurden 12 %ige Trenngele, überschichtet von 6 %igen Sammelgelen verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Je nach Proteinprobe wurden 10-50 µg Protein pro Gelspur aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese in 1x SDS-Laufpuffer bei 80 – 150 V wurden die Proteinbanden durch Färben in „GelCode Blue Stain Reagent“ (Pierce) sichtbar gemacht. Als Protein-Größenstandard wurde der „Premixed Protein Molecular Weight Marker, Low-range Marker“ (Roche Diagnostics) benutzt.

12% Trenngel: 4,0 ml Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)
 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
 3,3 ml Wasser
 0,1 ml 10% SDS
 0,1 ml 10% APS
 5 µl TEMED

6% Sammelgel 0,83 ml 4,0 ml Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)
 1,25 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
 2,82 ml Wasser
 0,05 ml 10% SDS
 0,05 ml 10% APS
 5 µl TEMED

10x SDS-Laufpuffer 30,3 g/l TRIS
 141,1 g/l Glycin
 10 g/l SDS

2.6.3 Proteinfällung durch Trichloressigsäure

Um proteinhaltige Lösungen aufzukonzentrieren, wurden die Lösungen mit 7%iger Trichloressigsäure (TFA) versetzt und zur Fällung 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurde 15 Minuten bei 14.000 x g und 4 °C zentrifugiert und das Proteinsediment mit 200 µl 80%igem Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in Wasser oder dem gewünschten Puffer aufgenommen.

2.6.4 Zellaufschluss

2.6.4.1. Zellaufschluss von *E. coli* BL21(DE3)pLysS

E. coli BL21(DE3)pLysS-Zellen enthalten das Plasmid pLysS, das T7-Lysozym kodiert. T7 Lysozym ist ein natürlicher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase und unterdrückt in λ DE3-lysogenen *E. coli*-Stämmen die basale Expression der T7-Promotoren (Moffatt und Studier, 1987; Studier, 1991). Durch Einfrieren und Wiederauftauen der in einem geeigneten Puffer resuspendierten Zellen kann das T7-Lysozym ins Periplasma gelangen und die Zellen lysieren. Das Auftauen der Zellen findet bei 30 °C statt. Danach werden die Zellen eine Stunde auf Eis inkubiert, bevor dann durch einstündige Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 x g die Zelltrümmer abgetrennt werden. Diese Art des Zellaufschlusses ist unkompliziert und findet ohne mechanische Kraft statt, allerdings ist ein zeitaufwendiges Einfrieren der Zellen über Nacht bei -70 °C erforderlich.

2.6.4.2 Zellaufschluss durch Ultraschall

Alle in dieser Arbeit benutzten Zellen mit Ausnahme der unter 2.6.4.1. beschriebenen *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen. Die sedimentierten Zellen wurden zunächst in eiskaltem 50 mM Tris/HCl- Puffer (pH 7,5) resuspendiert und dann durch sechs dreißigsekündige Ultraschallpulse unter Eiskühlung aufgeschlossen (Dr. Hielscher Ultraschallprozessor UP200s (Dr. Hielscher GmbH, Teltow) und Bandelin Sonopuls HD 200 (BANDELIN electronic GmbH & Co., Berlin), jeweils Cycle 0,5 und Amplitude 55%; jeweils 30 Sekunden Pause zwischen den einzelnen Pulsen). Anschließend wurden durch einstündige Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 x g die Zelltrümmer abgetrennt.

2.6.5 Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Histidin-Fusionsproteine mit einem 6-fachen oder 10-fachen Histidinschwanz lassen sich durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufreinigen. Hierbei binden die Histidinreste an immobilisierte Nickelionen. Die Bindung wird anschließend durch Elution mit sehr hohen Imidazol-Konzentrationen wieder aufgehoben (Crowe *et al.*, 1994).

Zur Aufreinigung der in dieser Arbeit verwendeten Histidinfusionsproteine wurde eine mit 10 ml Ni-NTA Superflow (Qiagen) gepackte Chromatographie-Säule (Pharmacia Biotech) benutzt. Zunächst wurden die Zellrohextrakte (siehe 2.6.4) mit einer Flussrate von 1 ml/min auf

die mit Waschpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschließend wurden mit 3 Säulenvolumen Waschpuffer unspezifisch gebundene Proteine von der Säule entfernt und dann mit einem ansteigenden Gradienten aus Waschpuffer und Elutionspuffer die Histidin-Fusionsproteine von der Säule eluiert. Das Eluat wurde in 5 ml Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE (siehe 2.6.2) auf seinen Proteingehalt untersucht.

Waschpuffer: 20 mM HEPES
 300 mM NaCl
 1 mM DTT
 20 mM Imidazol
 pH 8,0 mit NaOH

Elutionspuffer: 20 mM HEPES
 300 mM NaCl
 1 mM DTT
 250 mM Imidazol
 pH 8,0 mit HCl

2.6.6 Ultrafiltration von Proteinen

Mit Hilfe der Ultrafiltrationseinheiten Centricon YM-10 (Millipore) wurden Proteinlösungen aufkonzentriert, umgepuffert und entsalzt bzw. Lösungen von darin enthaltenen Proteinen befreit. Die Ultrafiltration wurde stets bei 4 °C durchgeführt und erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.6.7 Entfernung des aminoterminalen Histidinschwanzes von Proteinen

Fusionsproteine mit einem 10-fachen aminoterminalen Histidinschwanz, die durch den Vektor pET16-b exprimiert werden, besitzen an ihrem Aminoterminus alle die Aminosäuresequenz Isoleucin-Glutaminsäure-Glycin-Arginin. Diese Sequenz wird von der Protease Factor Xa erkannt und gespalten (Fujikawa *et al.*, 1974; Nagai und Thogersen, 1984). Auf diese Weise wird der aminoternale Histidinschwanz abgespalten.

Diese Abspaltung wurde mit Hilfe des „Factor Xa Cleavage Capture Kit“ (Novagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Verdau mit Factor Xa erfolgte für 48 Stunden bei Raumtemperatur mit 0,1 U/μg Protein.

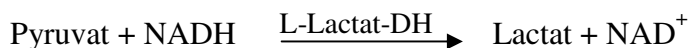
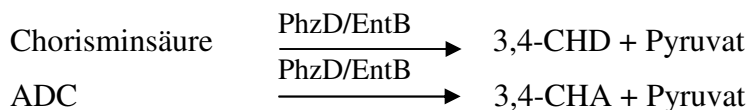
2.6.8 Bestimmung der Glukosekonzentration

Zur Bestimmung der Glukosekonzentration wurde das Ecoline[®]S+-Kit (DiaSys Diagnostic Systems) eingesetzt. Die Durchführung der Konzentrationsbestimmung erfolgte ohne Enteiweißung gemäß den Angaben des Herstellers.

2.7 Enzymaktivitätsbestimmungen

2.7.1 Photometrischer gekoppelter enzymatischer Test

Mit dem folgenden gekoppelten enzymatischen Test wurden die Enzymaktivitäten von PhzD und EntB bestimmt; als Hilfsenzym diente die L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus Kaninchenmuskel (Sigma). ADC und Chorisminsäure wurden von der Arbeitsgruppe Professor Müller (Pharmazeutisches Institut Freiburg) aus Fermentationsüberstand aufgereinigt und zur Verfügung gestellt (siehe 3.1.4) bzw. im Fall von Chorisminsäure auch von Sigma bezogen.



Bei den photometrischen Messungen (Power Wave_x, Bio-Tek Instruments) wurde die Abnahme der NADH₂-Konzentration ($\epsilon_{340} = 6,3 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) bei einer Wellenlänge von 340 nm über einen Zeitraum von 10 bis 40 Minuten bestimmt. Wegen der geringen Verfügbarkeit der Substrate ADC und Chorisminsäure wurden jeweils 100 μl Ansätze in 96well-Mikrotiterplatten (Nunclon, Nunc) gemessen. Jeder Ansatz wurde in 0,2 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5) gemessen und enthielt 10 U LDH und 1,2 mM NADH₂. Die Substratkonzentrationen von ADC und Chorisminsäure in den Ansätzen betrug 0,5 mM bis 20 mM.

2.7.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die direkte Bestimmung der Konzentrationen von Chorisminsäure, ADC, 3,4-CHD und 3,4-CHA erfolgte mit HPLC. Mit Hilfe von durchgeführten Kalibrierungsmessungen konnten die in den untersuchten Proben enthaltenen Substanzen identifiziert und quantifiziert werden. Vor der HPLC-Messung wurden eventuell in den Proben enthaltene Proteine mit Hilfe der

Ultrafiltrationseinheiten Centricon YM-10 (Millipore) entfernt und die Proben anschließend bei Bedarf verdünnt.

Die Proben wurden bei Raumtemperatur mit der HPLC-Anlage Waters 510 (Waters GmbH, Eschborn) durch die Säule LiChrospher 100 RP 8-5 μ EC (125 x 4 mm) aufgetrennt. Die 70 minütige Auftrennung erfolgte durch H₂O/1% TFA und einem zunehmenden Methanolgradienten (0-60%) bei einer Flussrate von 0,6 ml/min. Die Detektion erfolgte spektrophotometrisch (Waters 996 Photodiode Array Detector) in einem Wellenlängenbereich von 200 nm bis 400 nm bzw. bei einer für das nachzuweisende Produkt geeigneten Wellenlänge (275 nm bei 3,4-CHA und 278 nm bei ADC). Die Steuerung der HPLC-Anlage sowie die Datenerfassung und Auswertung erfolgte durch die Software „Millenium³²“.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte das chemisch nicht zugängliche Aminocyclitol 3,4-*trans*-CHA mikrobiell mit einem rekombinanten *E. coli*-Stamm gebildet werden. Wie unter Kapitel 1.9 beschrieben, soll die mikrobielle Biosynthese von 3,4-CHA ausgehend von Chorisminsäure über das Intermediat ADC stattfinden. Voraussetzung für eine produktive Synthese mit hoher Produktausbeute ist daher ein hoher Stofffluss zu Chorisminsäure in der Zelle. Für diese Arbeit standen die in Kapitel 1.10.1 beschriebenen Stämme KB532 und F82 zur Verfügung, die einen erhöhten Stofffluss durch den Shikimisäureweg aufweisen bzw. die gebildete Chorisminsäure nicht zu „unerwünschten“ Produkten wie L-Tyrosin, L-Phenylalanin oder Enterobactin umsetzen.

3.1. Mikrobielle Synthese von ADC: Aminierung von Chorisminsäure durch das Enzym ADC-Synthase (PabAB)

3.1.1 Die ADC-Synthase PabA/PabB aus *E. coli*

Der erste Schritt bei der mikrobiellen Biosynthese von 3,4-CHA besteht in der Aminierung von Chorisminsäure zu ADC. Da diese Reaktion für *E. coli* physiologisch ist und bei der Biosynthese von Folsäure abläuft, sollten zunächst die beiden beteiligten Enzyme PabA und PabB (siehe Kapitel 1.10.2) überexprimiert werden, um einen erhöhten Fluss von Chorisminsäure zu ADC zu ermöglichen.

Zur Überexpression von Proteinen wurde in dieser Arbeit der Expressionsvektor pJF119EH verwendet (Fürste *et al.*, 1986)(Abbildung 19). Dieser Vektor enthält einen *tac*-Promotor, der durch IPTG dereprimierbar ist. Durch diesen Promotor lassen sich die in den Vektor klonierten Gene gezielt durch Zugabe von IPTG exprimieren. Das auf dem Vektor befindliche Gen *bla* kodiert eine β -Lactamase, die der Zelle Ampicillinresistenz verleiht, die somit als Selektionskriterium dienen kann.

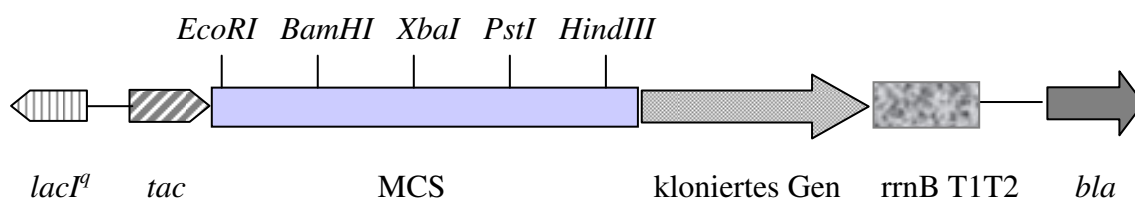


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pJF119EH

Gezeigt ist die linearisierte Form des Vektors. Wichtige Komponenten sind der durch IPTG-dereprimierbare *tac*-Promotor; das Gen *lacIq*, das für das LacI-Repressorprotein kodiert, welches durch IPTG inaktivierbar ist; die „Multiple cloning site“ mit den wichtigsten Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme (MCS), die Position eines klonierten Gens, die beiden Transkriptionsterminatoren *rrnB* T1T2 und das Gen *bla* (kodiert β -Lactamase).

Zunächst wurden die beiden Gene *pabA* und *pabB* jeweils einzeln in den Expressionsvektor pJF119EH kloniert (pC38 und pC39) und anschließend in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert. Eine Proteinüberexpression von PabA konnte mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden; eine Überexpression von PabB jedoch nicht. Deshalb wurde aus dem in der Literatur beschriebenen und zur PabB-Expression bereits erfolgreich eingesetzten Plasmid pSZD52 (Nichols et al., 1989) *pabB* mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten und hinter *pabA* in den Vektor pC38 umklontiert (Plasmid pC42). Zwar konnte mit SDS-PAGE eine Überexpression beider Proteine gezeigt werden, jedoch konnte im Zellrohextrakt keine Enzymaktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um die Enzymaktivität von PabB nachzuweisen, wurden Chorisminsäure, Glutamin und Mg²⁺-Ionen zum Zellrohextrakt gegeben und der Reaktionsansatz anschließend mittels RP-HPLC auf ein neu gebildetes Produkt untersucht (ADC oder dessen Folgeprodukt *pABA*, das durch Eliminierung von Pyruvat aus ADC entsteht; diese Reaktion wird durch die ADC-Lyase PabC katalysiert bzw. findet eventuell spontan statt (Tewari et al., 2002)). Bei einer Kultivierung des Stammes F82/pC42 im Schüttelkolben konnte im Kulturüberstand mit RP-HPLC ebenfalls kein ADC nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Parallel zu diesen Versuchen wurde in Jülich von Dr. Melanie Schürmann die *in vitro*-Aktivität von PabA und PabB untersucht. Sie benutzte bei ihren Versuchen aufgereinigte PabA- und PabB-Fusionsproteine, die mit einem aminoterminalen 10-fachen Histidinschwanz versehen waren (Schürmann, 2003, unveröffentlichte Daten). Jedoch konnte auch sie keine Umsetzung von Chorisminsäure zu ADC beobachten.

3.1.2 Die vermutete ADC-Synthase PabAB aus *Corynebacterium glutamicum*

Aufgrund dieser wenig vielversprechenden Versuche mit PabA und PabB sollte versucht werden, die Aminierung von Chorisminsäure zu ADC stattdessen mit dem Enzym PabAB zu katalysieren.

In Streptomyceten gibt es statt der beiden Enzyme PabA und PabB nur ein Enzym PabAB, das die Aminierung von Chorisminsäure zu ADC katalysiert (Brown et al., 1996; Chang et

al., 2001). Da die DNA-Sequenz des *pabAB*-Gens aus Streptomycceten jedoch sehr GC-reich ist (GC-Gehalt etwa 70% (Ikeda *et al.*, 2003)) und viele für *E. coli* seltene Codons enthält, wären Probleme bei der Überexpression von *pabAB* in *E. coli* zu erwarten gewesen. Daher ist von Dr. Bongaerts (DSM Biotech, Jülich) nach Alternativen gesucht worden. Eine vergleichende Datenbanksuche ergab, dass es in *Corynebacterium glutamicum* ein vermutetes *pabAB*-Gen gibt, das aus 621 Aminosäuren besteht und sich voraussichtlich besser in *E. coli* exprimieren ließe (Kalinowski *et al.*, 2003).

Deshalb sollte PabAB aus *Corynebacterium glutamicum* überexprimiert werden. Hierzu wurde das für die vermutete ADC-Synthase kodierende *pabAB_{C.gl}*-Gen unter Verwendung von sequenzspezifischen Primern mittels PCR aus der genomischen DNA von *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) amplifiziert (GenBank Accession: NC_006958, Nukleotid-bereich 1053491 – 1055353). Mit Hilfe der Primer wurden an den Enden des PCR-Amplifikates Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *BglIII* und *BamHI* eingefügt, so dass das *BglIII/BamHI*-behandelte PCR-Produkt in den mit *BamHI* geöffneten Vektor pJF119EH kloniert werden konnte (pC53). Bei dieser Klonierung verschwindet die *BglIII*-Schnittstelle in pC53. Durch Sequenzieren wurde die Korrektheit der Vektorsequenz überprüft.

Wie in Kapitel 1.10.2 beschrieben, besteht das vermutete PabAB_{C.gl} im Prinzip aus einer Verknüpfung von PabA und PabB durch eine Linkersequenz aus fünf Aminosäuren. Wenn man die Sequenzen von PabA und PabB aus *E. coli* durch diese Linkersequenz verbindet, erhält man ein PabA/PabB-Fusionsprotein, das eine Sequenzidentität von 23,4% und eine Sequenzähnlichkeit von 34% mit der Sequenz von PabAB aus *Corynebacterium glutamicum* aufweist (Abbildung 20).

PabAB-Fusion <i>E.coli</i>	1	MILLIDNYDSFTWNLYQYFCEL-GADVLVKRNDAITLADIDALKPKQKIV	48
PabAB <i>C.glutamicum</i>	1	MRVLIIDNYDSFTFNLATYVEEVTVGQAPVVVPND---QEIDEMLFDAVI	46
PabAB-Fusion <i>E.coli</i>	49	ISPGPCTPDEAGISLD-----VIRHYAGRLPILGVCLGHQAMAQAFGGK	92
PabAB <i>C.glutamicum</i>	47	LSPG---PGHAGVAADFGICAGVIER--ARVPILGVCLGHQGIALAYGGD	91
PabAB-Fusion <i>E.coli</i>	93	VVRAAKVMHGKTSPIITHNGEGVFRGLANPLTVTRYHSLVVE--PDSLPAAC	140
PabAB <i>C.glutamicum</i>	92	VDLAPRPVHGEVSQITHDGSGLFAGIPETFEAVRYHSMVATRLPESLKA-	140
PabAB-Fusion <i>E.coli</i>	141	FDVTAWSETREIMGIRHR---QWDLEGVQFHPESILSEQGHQLLANFLHR	187
PabAB <i>C.glutamicum</i>	141	---TATSDDGLIMALAHEVLPQW---GVQFHPESIGGQFGHQIKNFLNL	184
PabAB-Fusion <i>E.coli</i>	188	ARTYRM---KTLSPAVITLLWRQDAA---EFYFSRSLSHLPW----AMLL	226
PabAB <i>C.glutamicum</i>	185	ARTYRWQLTEKTIPLSV-----DSAAVFETFFAHSSSHAFWLDDAQGTS	227

Ergebnisse

PabAB-Fusion <i>E. coli</i>	227	HSGYADHPYSRFDIVVAEPICTLTTFGKETVVSESEKRTTTTDDPLQVLQ	276
PabAB <i>C. glutamicum</i>	228	YLGDASGPLAR-----TKTHNVGEGDFFTWLKED-----	256
PabAB-Fusion <i>E. coli</i>	277	QVLDRADIRPTHNEDLPFQGGALGLFGYDL---GRRFESLPEIAEQDIV	322
PabAB <i>C. glutamicum</i>	257	--LAANSVAPGQG---FRLGWVGYVGYELKAEAGAR-----AAHTSS	293
PabAB-Fusion <i>E. coli</i>	323	LPDMAVGIYDWALIVDHQRHTVSLLSHNDVNARRAWLES-----QQFSP	366
PabAB <i>C. glutamicum</i>	294	LPDAHLIFADRAIAVESDQVRLRALGEQD-----EWFEEETIKKHLNLVAP	338
PabAB-Fusion <i>E. coli</i>	367	QEDFTLTSDWQSNMTREQYGEKFRQVQEYLSHSGDCYQVNLAQRFHATYSG	416
PabAB <i>C. glutamicum</i>	339	RIPASGHLALQVRDSKDEYLDKIRRAQELITRGESEYICLTTKLQGTDTV	388
PabAB-Fusion <i>E. coli</i>	417	DEWQAFQLQNQANRAPFSAFLRLEQGAILSLSPERFILCDNS-EIQTRPI	465
PabAB <i>C. glutamicum</i>	389	APLAAYLALRGANPTAYGAYLQLGDT SILSSSPERFITIDSAGYVESKPI	438
PabAB-Fusion <i>E. coli</i>	466	KGTLPRLPDPQEDSKQAVKLANSADRAENLMIVDLMRNDIGRVAVAGSV	515
PabAB <i>C. glutamicum</i>	439	KGTRPRGRTAQEDQEIIAELRSNPKDRAENLMIVDLVRNDLARGALPTTV	488
PabAB-Fusion <i>E. coli</i>	516	KVPELFFVVEFPFAVHHLVSTITAQLPEQLHASDLLRAAFPGGSITGAPKV	565
PabAB <i>C. glutamicum</i>	489	KTSKLFDVETYATVHQLVSTVSAELGPR-SPIECVRAAFPGGSMTGAPKL	537
PabAB-Fusion <i>E. coli</i>	566	RAMEIIDELEPQRNNAWCGSIGYLSFCGNMDSITIRTLTAINGQIFCSA	615
PabAB <i>C. glutamicum</i>	538	RTMEIIDELEAAPRGIYSGGLGYFSLDGAVDLSMVIRTLVIQNNHVEYGV	587
PabAB-Fusion <i>E. coli</i>	616	GGGIVADSQEEAEYQETFDKVNRIKQLEK	645
PabAB <i>C. glutamicum</i>	588	GGALLALSDPEAEWEEIRVKSRPLLNLFVGEVFP	620

Abbildung 20: Vergleichende Anordnung („Alignment“) der Aminosäuresequenz der ADC-Synthase PabAB aus *Corynebacterium glutamicum* und dem künstlichen Fusionsprotein PabA/PabB aus *E. coli*

Aminosäurereste, die in beiden Proteinen identisch sind, sind durch einen Strich miteinander verbunden; Aminosäuren mit ähnlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften durch zwei Punkte und Aminosäuren mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften durch einen Punkt. Die Aminosäuresequenz von PabA bzw. dem PabA entsprechenden Teil aus PabAB ist rot dargestellt und die von PabB bzw. dem PabB entsprechenden Teil aus PabAB schwarz. In gelb ist die in PabA/PabB künstlich eingebrachte Linkerregion hervorgehoben.

Um zu testen, ob dieses künstliche *E. coli*-PabA/PabB-Fusionsprotein katalytisch aktiv ist und Chorisminsäure zu ADC umsetzen kann, wurde mit einer Overlap-PCR das Gen des oben beschriebenen Fusionsproteins generiert und amplifiziert (siehe 2.5.9). Mit Hilfe der Primer wurden erneut Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *BglIII* und *BamHI* eingefügt, so dass das *BglIII/BamHI*-behandelte PCR-Produkt in den mit *BamHI* geöffneten Vektor pJF119EH kloniert werden konnte (pC61). Die korrekte Sequenz von pC61 wurde durch Sequenzieren bestätigt.

Die beiden so erhaltenen Plasmide pC53 und pC61 wurden nun einzeln in *E. coli* DH5 α transformiert und die Proteinexpression des vermuteten PabAB_{C.gl.} und PabA/PabB nach IPTG-Induktion mittels SDS-PAGE untersucht (Abbildung 21).

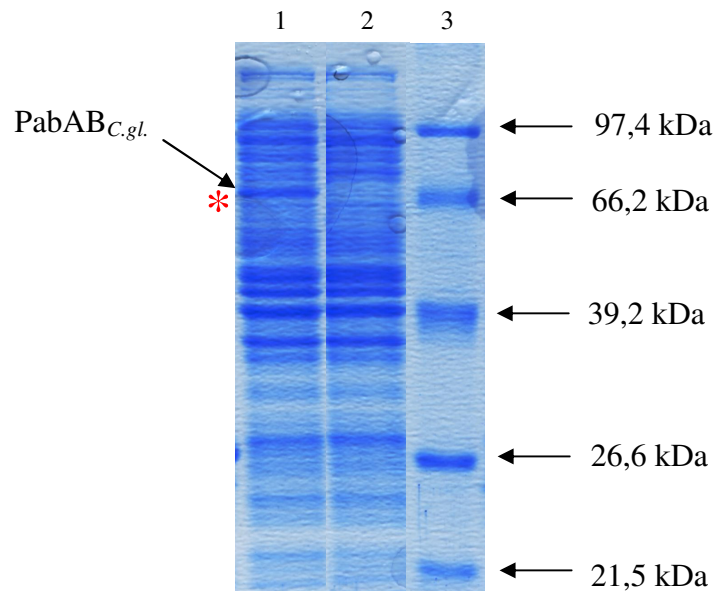


Abbildung 21: SDS-PAGE Analyse der Expression des Gens *pabAB*_{C.gl.} (*) in dem IPTG-induzierten und nicht induzierten *E. coli*-Stamm DH5 α /pC53

Spur 1: 50 μ g RE *E. coli* DH5 α /pC53 (1 mM IPTG)

Spur 2: 50 μ g RE *E. coli* DH5 α /pC53

Spur 3: Protein-Größenstandard [kDa]

Mit dem Vektor pC53 ließ sich ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 67 kDa erfolgreich überexprimieren, während eine sichtbare Überexpression des PabA/PabB-Fusionsproteins mit Hilfe des Vektors pC61 nicht möglich war (Daten nicht gezeigt).

Um die *in vivo*-Aktivität des überexprimierten Proteins zu testen, wurde pC53 in den Stamm LJ110 transformiert, da dieser Stamm schon erfolgreich zur mikrobiellen Synthese von 2,3-CHD und 3,4-CHD eingesetzt wurde (Franke *et al.*, 2003) und somit auch mit einer ADC-Bildung gerechnet werden konnte. Im Schüttelkolben wurde dieser Stamm mit IPTG-induziert und der Überstand mittels RP-HPLC auf einen neuen Peak hin (ADC oder *p*ABA) untersucht. Da ADC nicht käuflich zu erwerben ist und chemisch nicht ohne erheblichen Aufwand synthetisierbar ist, stand kein ADC-Standard zur Verfügung, so dass dessen Retentionszeit bei der RP-HPLC-Messung unbekannt war. Es konnte jedoch kein neuer Peak bei dem mit IPTG

induzierten Ansatz im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Parallel zu diesem Schüttelkolbenversuch wurde das Plasmid pC53 bei DSM Biotech (Jülich) in den Stamm KB532 transformiert (Stamm weist einen erhöhten Stofffluss zu Chorisminsäure auf) und der gleiche Versuch durchgeführt. Bei dem mit IPTG induzierten Ansatz fand sich ein neuer, unbekannter Peak im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Mittels $^1\text{H-NMR}$ konnte Dick Schipper (DSM, Delft) diesen neuen Peak als ADC identifizieren. Im Kulturüberstand von LJ110/pC53 konnte er ebenfalls ADC nachweisen, allerdings nur in Spuren ($< 30 \text{ mg/l}$) und somit in deutlich geringerer Konzentration als bei KB532/pC53 (Schipper, 2003, persönliche Mitteilung).

Mit diesem Experiment konnte die *in vivo*-Aktivität von PabAB_{C.gl.} nachgewiesen werden und gezeigt werden, dass das vermutete *pabAB*_{C.gl.}-Gen tatsächlich für eine aktive ADC-Synthase PabAB_{C.gl.} kodiert. Jedoch wurde ADC vom Stamm LJ110/pC53 nur in Spuren gebildet, so dass bei allen folgenden Experimenten der deutlich produktivere Stamm KB532 eingesetzt wurde.

Bei ähnlichen Schüttelkolbenversuchen mit dem Plasmid pC61 konnte kein ADC nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass das generierte PabA/PabB-Fusionsprotein entweder inaktiv ist oder überhaupt nicht exprimiert wird (mittels SDS-PAGE war keine Proteinexpression nachweisbar). Da mit dem Stamm KB532/pC53 nun ein Stamm mit einem hohen Stofffluss hin zu ADC etabliert worden war, wurde der alternative Zugang zu ADC durch Nutzung des künstlichen *E. coli*-PabA/PabB-Fusionsproteins nicht weiter verfolgt.

3.1.3 Die ADC-Synthase PabAB_{C.gl.} mit aminoterminalen Histidinschwanz

Um PabAB_{C.gl.} für eine Proteincharakterisierung problemlos aufzureinigen zu können und Chorisminsäure *in vitro* zu ADC umsetzen zu können, sollte *pabAB*_{C.gl.} in den Vektor pETDuet-1 (Novagen, Schwalbach) kloniert werden. Der Vektor pETDuet-1 ermöglicht die Koexpression von zwei Genen gleichzeitig, wobei beide als Fusionsprotein mit einem aminoterminalen 6-fachen Histidinschwanz exprimiert werden. Die Gene stehen in diesem Vektor unter der Kontrolle des T7lac-Promotors. Zur Expression der Gene wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen, Schwalbach) verwendet. Das pLysS-kodierte T7-Lysozym ist ein natürlicher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase (Moffatt und Studier, 1987; Studier, 1991) und dient in λ DE3-lysogenen *E. coli*-Stämmen der Reduktion der basa-

len Proteinexpression. Ebenfalls vorteilhaft ist der sehr einfach durchführbare Zellaufschluss, der durch einen Einfrier/Auftau-Mechanismus funktioniert und bei dem das T7-Lysozym durch das Auftauen ins Periplasma freigesetzt wird und somit die Zellyse bewirkt.

Zur Klonierung von *pabAB_{C.gl.}* wurde zunächst durch eine PCR-Reaktion das *pabAB_{C.gl.}*-Gen aus dem Vektor pC53 amplifiziert und dieses dann mit Hilfe der durch die Primer eingebrachten *Bam*HI und *Sac*I-Restriktionsschnittstellen in pETDuet-1 kloniert (pC113). Die korrekte Fusion des *pabAB_{C.gl.}*-Gens mit den Polyhistidinschwanz-Kodierungssequenzen des Plasmids pETDuet-1 wurde durch Sequenzieren überprüft.

Das PabAB_{C.gl.}-Fusionsprotein konnte mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie aus dem Rohextrakt des Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pC113 aufgereinigt werden und zwar mit einer Ausbeute von 5 mg PabAB_{C.gl.}-Fusionsprotein je Liter Expressionskultur (Abbildung 22). Jedoch ist bei etwa 28 kDa noch eine schwache, unbekannte Proteinbande sichtbar. Eine *in vitro*-Aktivität des Enzyms konnte jedoch nicht gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Dies kann entweder daran liegen, dass der Histidinschwanz eine Inaktivierung des PabAB_{C.gl.}-Fusionsproteins bewirkt oder dass das Fusionsprotein bei den im Enzymtest benutzten Bedingungen inaktiv war.

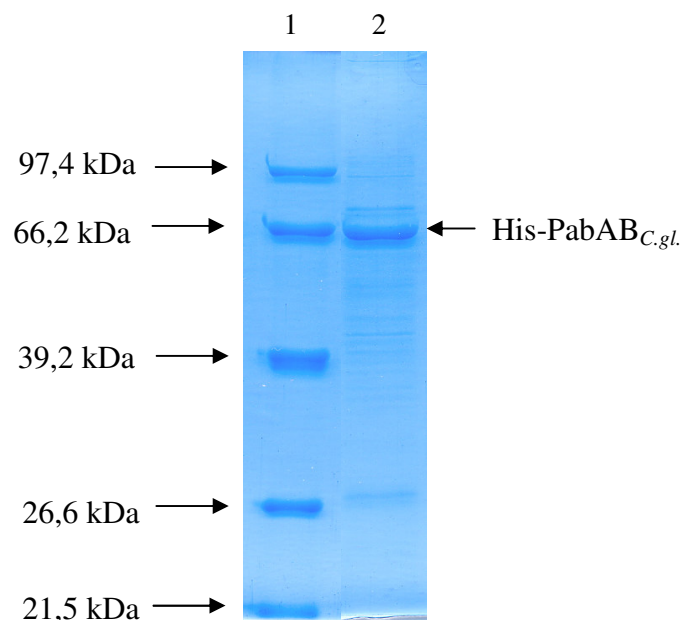


Abbildung 22: SDS-PAGE Analyse von mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigtem PabAB-Fusionsprotein

Spur 1: Protein-Größenstandard [kDa]

Spur 2: 5µg aufgereinigtes PabAB-Fusionsprotein aus Rohextrakt von *E.coli* BL21(DE3)pLysS/pC113 (1 mM IPTG)

3.1.4 Mikrobielle Synthese von ADC mit KB532/pC53

Für die mikrobielle Biosynthese von 3,4-CHA ist nach der Aminierung von Chorisminsäure zu ADC durch PabAB im zweiten Schritt die Eliminierung von Pyruvat von ADC nötig. Da diese Reaktion in keinem bekannten Organismus physiologisch ist und kein Enzym bekannt war, das diese Reaktion katalysiert, sollten verschiedene Enzyme auf diese Aktivität hin getestet werden. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass das Substrat ADC in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Aus diesem Grund wurde bei DSM-Biotech (Jülich) eine 5l Labfors-Fermentation des Stammes KB532/pC53 bei 33 °C durchgeführt, mit dem Ziel, größere Mengen ADC aufzureinigen. Bei dieser Fermentation wurden im Kulturüberstand 7 g/l ADC und 15,4 g/l Chorisminsäure gefunden (Kremer, 2003, persönliche Mitteilung). Von der bioorganischen Gruppe (IBT-2, Forschungszentrum Jülich) wurde aus dem Kulturüberstand mittels Ionenaustauschchromatographie ADC von Chorisminsäure getrennt und aufgereinigt.

Das aufgereinigte ADC hat bei einer Auftrennung durch RP-HPLC eine Retentionszeit von 8,5 Minuten und ein Absorptionsmaximum bei 278 nm (Abbildung 23a und 23b). Dieser Wert unterscheidet sich etwas von dem in der Literatur beschriebenen Absorptionsmaximum von 270 nm, das bei einer enzymatischen Umsetzung von Chorisminsäure durch das *E. coli*-Enzym PabB zur vermuteten Verbindung ADC bestimmt worden war (Ye *et al.*, 1990). Dick Schipper (DSM, Delft) konnte mittels ¹H-NMR jedoch zeigen, dass das aus der Fermentation aufgereinigte ADC nicht rein ist, sondern aus einer Mischung aus ADC und 4-Aminodeoxy-prephensäure besteht (Abbildung 23c), die durch chemische Umlagerung aus ADC entsteht (Schipper, 2003, persönliche Mitteilung). Das Verhältnis der beiden Stoffe zueinander beträgt etwa 1:1, wobei 4-Aminodeoxy-prephensäure mit der benutzten RP-HPLC im UV-Bereich nicht detektierbar war (Detektion erfolgte spektrophotometrisch in einem Wellenlängenbereich von 200-400 nm). Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass bei 4-Aminodeoxy-prephensäure im Gegensatz zu ADC keine konjugierten Doppelbindungen vorhanden sind und die Verbindung deshalb im UV-Bereich kein Licht absorbiert.

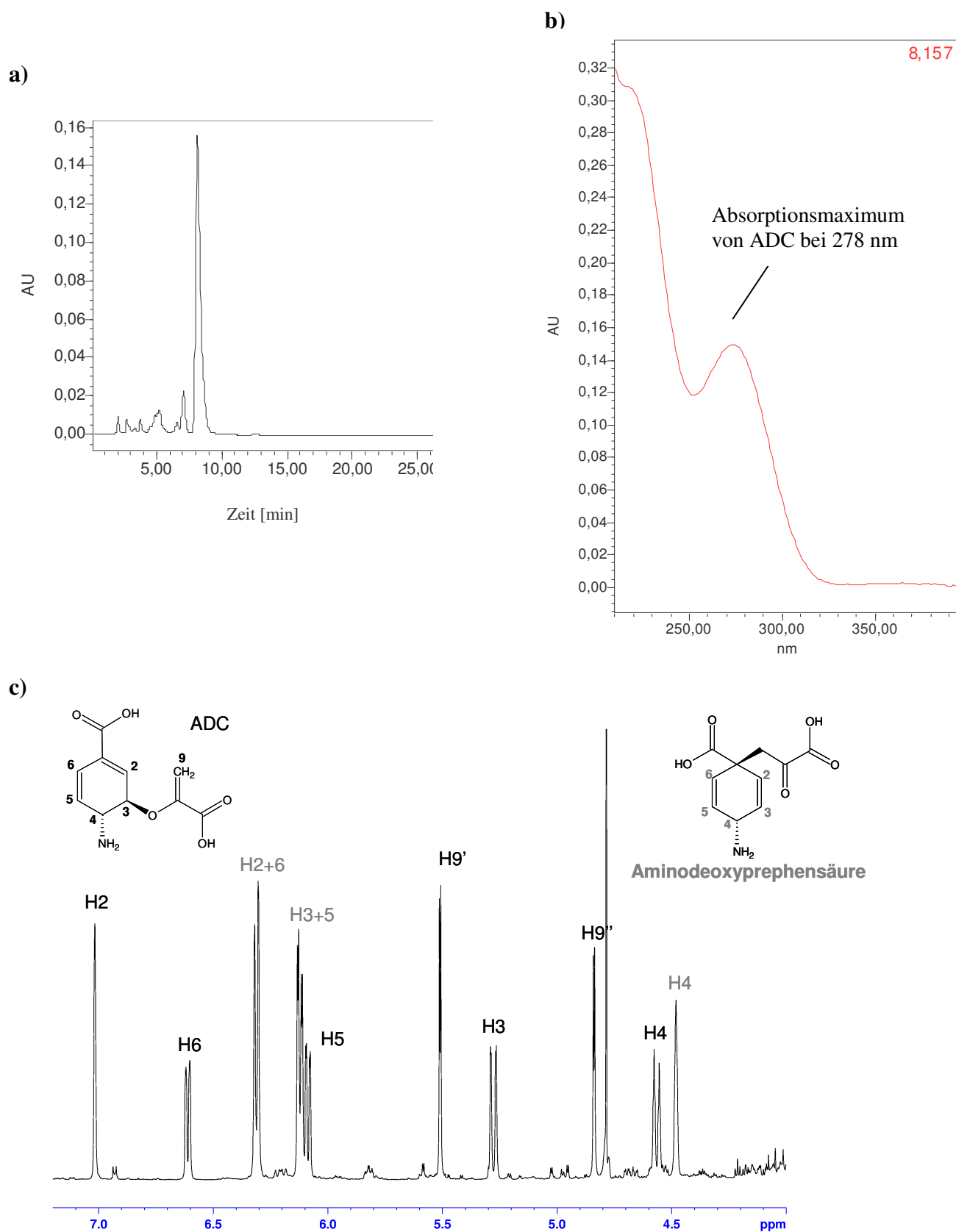


Abbildung 23: Reversed phase HPLC-Analyse und ^1H -NMR-Analyse von aufgereinigtem ADC

a) Analyse von ADC (0,75 g/l); Retentionszeit: 8,5 Minuten; aufgetragen als Absorptionseinheit [AU] gegen die Zeit [min].

Die Detektion erfolgte spektrophotometrisch in einem Wellenlängenbereich von 200-400 nm.

- b) Absorptionsspektrum von ADC: Absorptionsmaximum bei 278 nm; aufgetragen als Absorptionseinheit [AU] gegen die Wellenlänge [nm]
- c) ¹H-NMR-Spektrum von mit Ionenaustauscher aufgereinigtem ADC
Die Aufreinigung von ADC wurde von der Arbeitsgruppe Professor Müller am Institut für Biotechnologie 2 im Forschungszentrum Jülich durchgeführt; die ¹H-NMR-Messung erfolgte durch Dick Schipper (DSM, Delft). Gezeigt sind die charakteristischen Signale von ADC (in schwarz beschriftet) und Aminodeoxyrephensäure (in grau beschriftet).

3.2 Mikrobielle Synthese von 3,4-CHA: Spaltung von ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat durch das Enzym PhzD

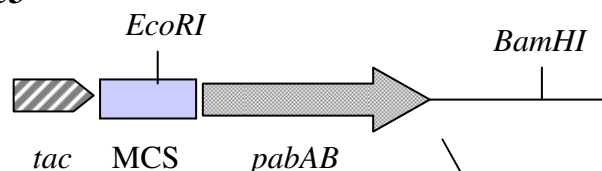
Um das Zielprodukt 3,4-CHA mikrobiell zu bilden, ist die Umwandlung von ADC in 3,4-CHA nötig. Bei dieser Reaktion wird Pyruvat von ADC abgespalten (siehe 1.10.3); es handelt sich um die Hydrolyse eines Vinylethers. Eine solche Spaltung ist für das *E. coli*-Enzym EntB bzw. das *Pseudomonas aeruginosa*-Enzym PhzD beschrieben worden, allerdings sind deren physiologische Substrate Isochorisminsäure bzw. ADIC und nicht ADC (Rusnak *et al.*, 1990; Mavrodi *et al.*, 1998).

3.2.1 Überexpression der Isochorismatase PhzD

Während dieser Arbeit war das Enzym PhzD aus *Pseudomonas aeruginosa* von Parsons *et al.* biochemisch charakterisiert worden (Parsons *et al.*, 2003). Obwohl PhzD für diese Reaktion als beinahe inaktiv beschrieben worden war (siehe 4.4), wurde trotzdem versucht, mit Hilfe von PhzD zumindest geringe Mengen 3,4-CHA zu produzieren, um den möglichen Zugang zu 3,4-CHA durch einen mikrobiellen Ansatz zu demonstrieren.

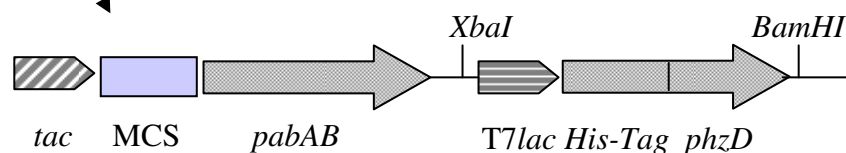
Mit dem Vektor pC49 (pET-16b mit kloniertem *phzD*) konnte von Dr. Melanie Schürmann eine starke Expression des mit einem aminoterminalen 10-fachen Histidinschwanz versehenen PhzD-Fusionsproteins erreicht werden (Schürmann, 2003, persönliche Mitteilung). Das vollständige *phzD*-Gen inklusive Promotorregion und Kodierungssequenzen für den Polyhistidinschwanz wurde mit *XbaI/BamHI* aus pC49 ausgeschnitten und in den Vektor pC53 hinter *pabAB_{C.gl.}* umkloniert (Vektor pC78) (Abbildung 24).

a) pC53

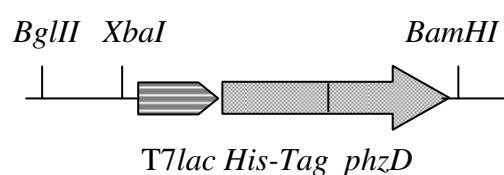


Restriktionsverdau
mit *BamHI*

c) pC78



b) pC49



Restriktionsverdau
mit *BglIII/BamHI*

Abbildung 24: Schematische Darstellung der drei Plasmide pC53, pC49 und pC78

- a) Darstellung des Plasmids pC53 zur Proteinüberexpression von PabAB: gezeigt sind die Promotorregion (*tac*), die „multiple cloning site“ (MCS), das klonierte Gen (*pabAB*) sowie wichtige Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen
- b) Darstellung des Plasmids pC49 zur Proteinüberexpression des Fusionsproteins PhzD mit aminoterminalen Histidinschwanz
- c) Darstellung des Plasmids pC78 zur Proteinüberexpression von PabAB und des Fusionsproteins PhzD mit aminoterminalen Histidinschwanz; entstanden durch Ligation des mit *BglIII/BamHI* aus pC49 ausgeschnittenen *phzD*-Genes in den mit *BamHI* geöffneten Vektor pC53

Durch Sequenzieren von pC78 wurde festgestellt, dass sich insgesamt drei Mutationen im *phzD*-Gen befinden. Zwei davon sind stille Mutationen, die zu keinem Aminosäureaustausch in PhzD führen, während die dritte Mutation Valin 71 der nativen Sequenz in Methionin 71 umwandelt. In Abbildung 25 ist ein Vergleich des PhzD-Wildtyp-Enzyms mit dem tatsächlich verwendeten Enzym dargestellt. Die Sequenzierung von pC78 erfolgte erst zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit. Deshalb wurde zunächst das Plasmid pC78 weiter verwendet und daher das PhzD-Mutein V71M benutzt.

PhzD (pC78)	1	MGHHHHHHHHSSGH	LEGR	HMSGIPEITAYPLPTAQQLPANLARWSLEP	50
PhzD-Wildtyp	1			MSGIPEITAYPLPTAQQLPANLARWSLEP	29
PhzD (pC78)	51	RRAVLLVHDMQRYFLRPLPESLRAGLVANAARLRRWCVEQGM	QIAYTAQP		100
PhzD-Wildtyp	30	RRAVLLVHDMQRYFLRPLPESLRAGLVANAARLRRWCVEQGVQ	IAYTAQP		79
PhzD (pC78)	101	GSMTEEQRGLLKDWFPGMRASPADREVVEELAPGPDWLLTKWRYSAFF			150
PhzD-Wildtyp	80	GSMTEEQRGLLKDWFPGMRASPADREVVEELAPGPDWLLTKWRYSAFF			129

Ergebnisse

PhzD (pC78)	151	HSDLLQRMRAAGRDQLVLCGVYAHVGVLISTVDAYSNDIQPFLVADAIAD	200
PhzD-Wildtyp	130	HSDLLQRMRAAGRDQLVLCGVYAHVGVLISTVDAYSNDIQPFLVADAIAD	179
PhzD (pC78)	201	FSEAHHRMALEYAASRCAMVVTTDEVLE	228
PhzD-Wildtyp	180	FSEAHHRMALEYAASRCAMVVTTDEVLE	207

Abbildung 25: Sequenzvergleich von PhzD-Wildtyp mit dem verwendeten PhzD-Mutein

Die rot bzw. grün dargestellten Aminosäuren unterscheiden sich zwischen den beiden Proteinen. Zusätzliche Aminosäuren des verwendeten PhzD-Muteins sind grün dargestellt; die Erkennungs- und -spaltsequenz der Protease Faktor Xa (siehe 3.3.5) ist gelb hinterlegt.

Mittels SDS-PAGE wurde die Proteinüberexpression von PabAB und His-PhzD im Stamm DH5 α /pC78 nachgewiesen (Abbildung 26).

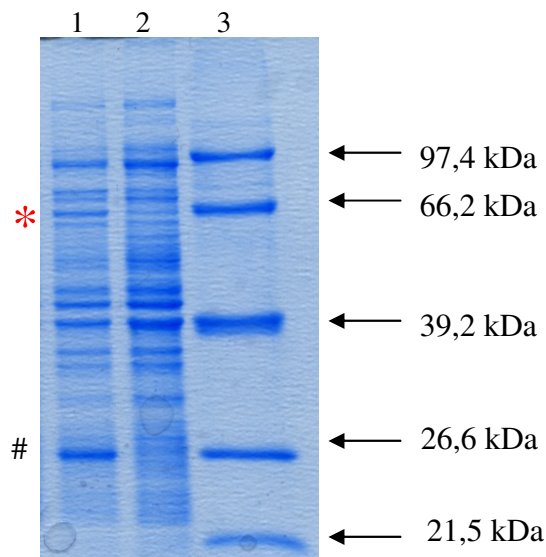


Abbildung 26: SDS-PAGE Analyse der Expression der Gene *pabAB* (*) und *phzD* (#) im IPTG-induzierten und nicht induzierten *E. coli*-Stamm DH5 α /pC78

Spur 1: 30 μ g RE *E. coli* DH5 α /pC78 (1mM IPTG)

Spur 2: 30 μ g RE *E. coli* DH5 α /pC78

Spur 3: Protein-Größenstandard [kDa]

Während His-PhzD sehr stark überexprimiert wird und etwa 20% des gesamten Zellproteins ausmacht, ist die Proteinüberexpression von PabAB_{C.gI.} mit ungefähr 5% des gesamten Zellproteins deutlich geringer.

3.2.2 Mikrobielle Synthese von 3,4-CHA mit KB532/pC78

pC78 wurde bei der Firma DSM Biotech (Jülich) in den Stamm KB532 transformiert und der erzeugte Stamm im Schüttelkolben auf 3,4-CHA-Bildung hin untersucht. Beim mit IPTG-induzierten Ansatz fand sich im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle ein neuer Peak bei

einer RP-HPLC-Messung der Kulturüberstände (Kremer, 2003, persönliche Mitteilung). Da 3,4-CHA nicht käuflich zu erwerben ist und chemisch nur sehr schwer synthetisierbar ist, stand kein 3,4-CHA-Standard zur Verfügung. Der neue, vermutete 3,4-CHA-Peak konnte von Dick Schipper (DSM, Delft) mittels $^1\text{H-NMR}$ als 3,4-CHA identifiziert werden (Schipper, 2003, persönliche Mitteilung). Die Konzentration an gebildetem 3,4-CHA im Kulturüberstand betrug etwa 100-150 mg/l. Wie erwartet trat auch 3,4-CHD als Nebenprodukt im Kulturüberstand auf und zwar mit einer Konzentration von etwa 0,5 g/l (Schipper, 2003, persönliche Mitteilung).

Bei den gleichen Versuchen im Schüttelkolben mit dem Stamm LJ110/pC78 konnte 3,4-CHA nur in Spuren (< 20 mg/l) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um 3,4-CHA im größeren Maßstab zu gewinnen, wurde bei DSM Biotech (Jülich) eine 5l Labfors-Fermentation des Stammes KB532/pC78 bei 33 °C durchgeführt (Abbildung 27).

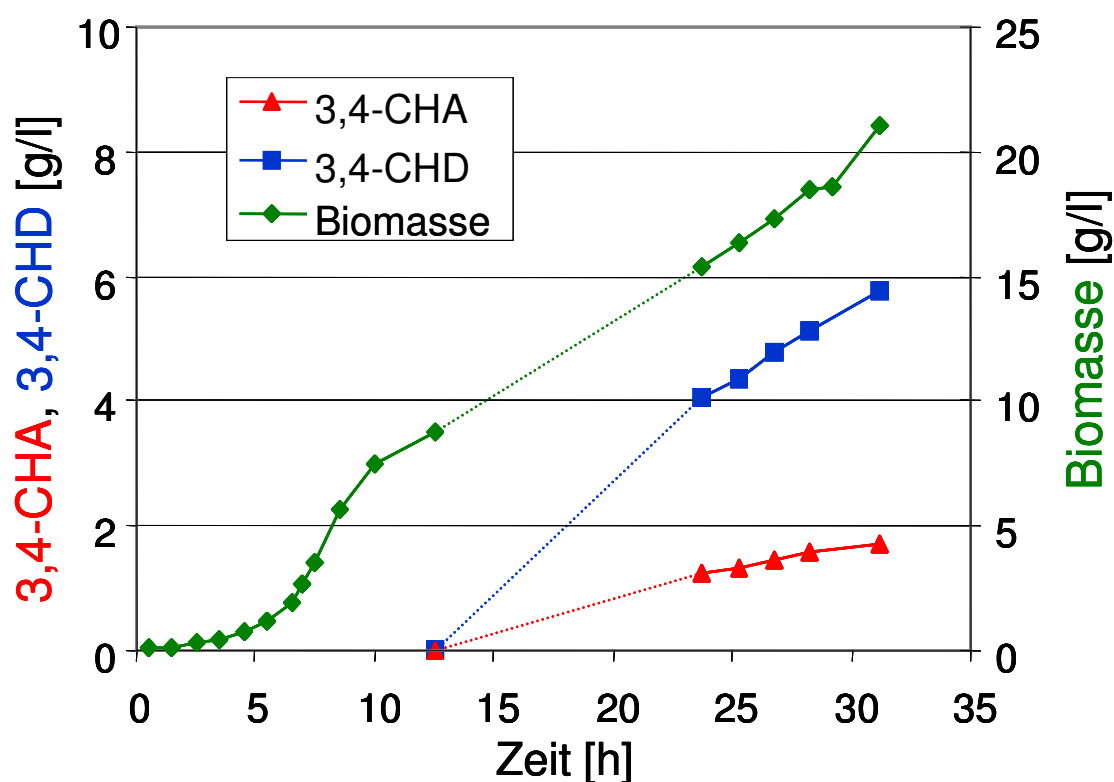


Abbildung 27: Verlauf einer 5l Labfors-Fermentation mit dem Stamm KB532/pC78 bei 33 °C
 Aufgetragen sind der zeitliche Verlauf der gebildeten Produktkonzentrationen von 3,4-CHA und 3,4-CHD sowie der gebildeten Biomasse (Kremer, 2004, persönliche Mitteilung). Der Bereich zwischen 12,5 und 23 Stunden ist gepunktet dargestellt, da aufgrund der in diesem Bereich fehlenden Messwerte keine zuverlässige Aussage über den jeweiligen Kurvenverlauf möglich ist. Bei der Fermentation handelt es sich um eine Batch/Fed-Batch Kultivierung; als Stickstoffquelle wurde Ammonium eingesetzt.

Im Fermentationsüberstand fanden sich am Ende der Fermentation nach 32 Stunden 1,8 g/l 3,4-CHA und 5,9 g/l 3,4-CHD; ADC war mit einer Konzentration kleiner als 37 mg/l kaum nachweisbar. Von der bioorganischen Gruppe (IBT-2, Forschungszentrum Jülich) wurde aus dem Kulturüberstand mittels Ionenaustauschchromatographie 3,4-CHA von 3,4-CHD getrennt und aufgereinigt.

Am Institut für Mikrobiologie in Stuttgart wurde von Shashank Ghanegaonkar bei 30°C eine 2l Labfors-Fermentation des Stammes KB532/pC78 durchgeführt (Abbildung 28).

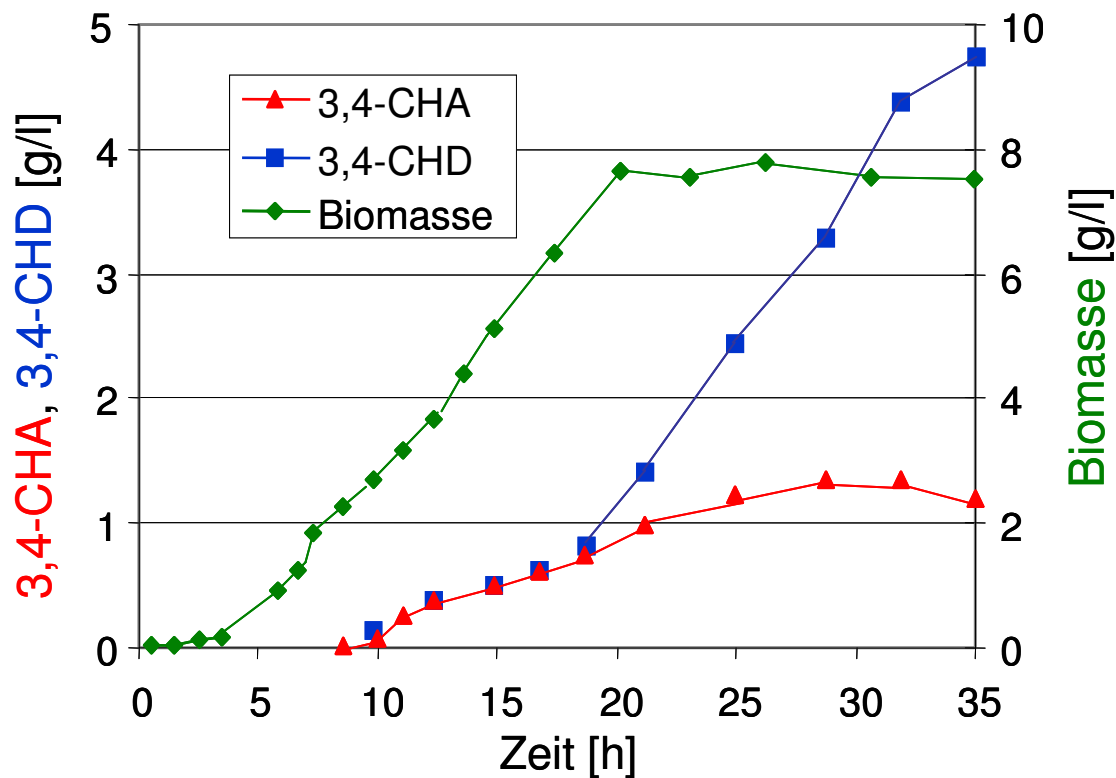


Abbildung 28: Verlauf einer 2l Labfors-Fermentation mit dem Stamm KB532/pC78 bei 30 °C

Aufgetragen sind der zeitliche Verlauf der gebildeten Produktkonzentrationen von 3,4-CHA und 3,4-CHD sowie der gebildeten Biomasse (Ghanegaonkar, 2005, persönliche Mitteilung). Bei der Fermentation handelt es sich um eine Batch/Fed-Batch Kultivierung; als Stickstoffquelle wurden Ammoniumionen eingesetzt.

Nach 32 Stunden konnte mittels RP-HPLC im Fermentationsüberstand eine maximale Produktkonzentration von 1,2 g/l 3,4-CHA nachgewiesen werden. Das Verhältnis von gebildetem 3,4-CHA zu 3,4-CHD betrug am Ende der Fermentation etwa 1:4. Im Zeitraum nach Einsetzen der Produktbildung nach etwa 10 Stunden bis ungefähr 20 Stunden werden 3,4-CHA und 3,4-CHD jedoch in einem weit günstigeren Verhältnis von nahezu 1:1 gebildet. Nach 22 Stunden wird praktisch nur noch 3,4-CHD gebildet, und die 3,4-CHA Konzentration im Kulturüberstand steigt kaum weiter an.

Das aus dem Fermentationsüberstand aufgereinigte 3,4-CHA hat bei einer Auftrennung durch RP-HPLC eine Retentionszeit von 2,5 Minuten und ein Absorptionsmaximum bei 275 nm (Abbildung 29).

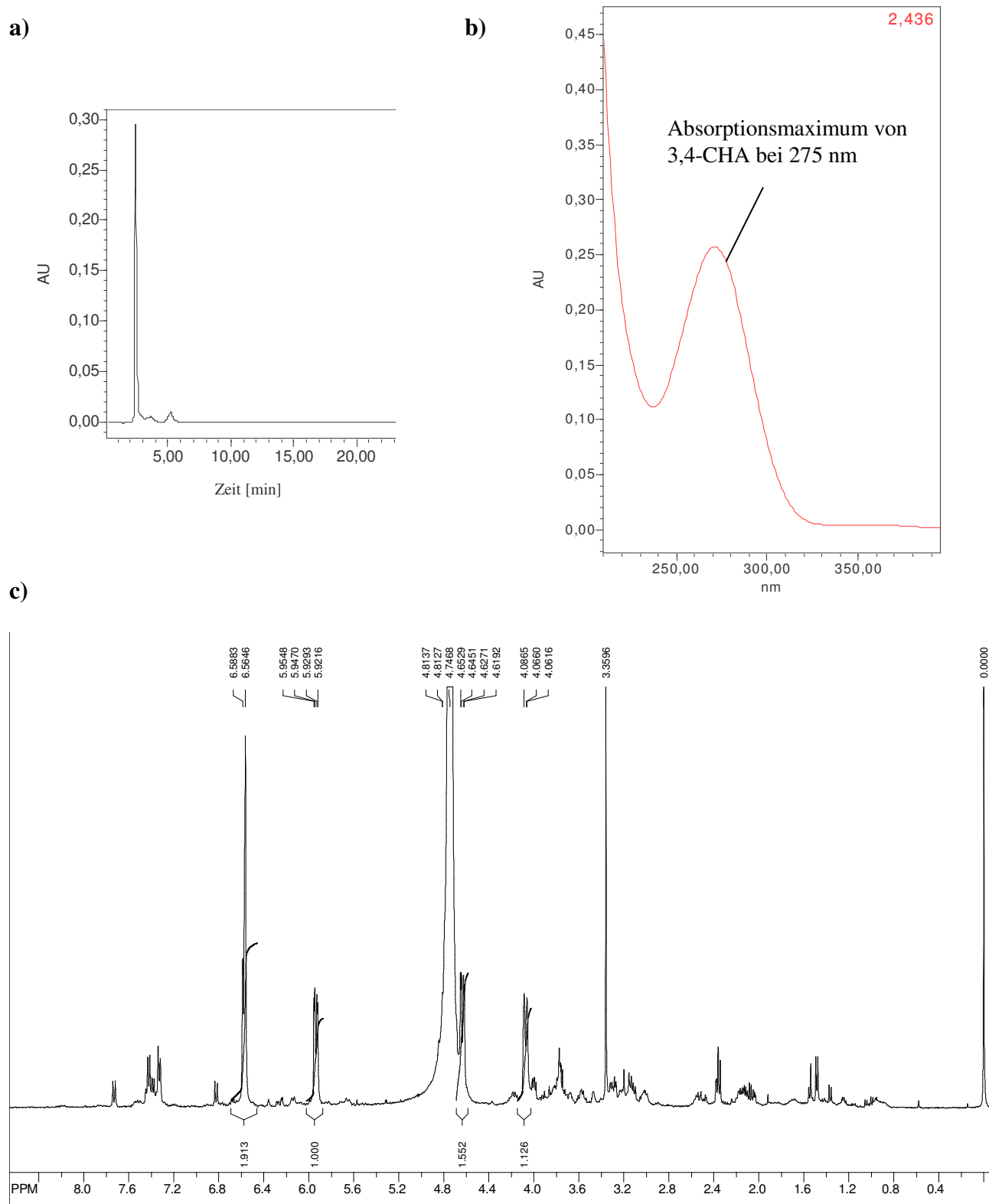


Abbildung 29: *Reversed phase* HPLC-Analyse und ^1H -NMR-Spektrum von aufgereinigtem 3,4-CHA

- a) Analyse von 3,4-CHA (1g/l); Retentionszeit: 2,5 Minuten; aufgetragen als Absorptionseinheit [AU] gegen die Zeit [min].
Die Detektion erfolgte spektrophotometrisch in einem Wellenlängenbereich von 200-400 nm.
- b) Absorptionsspektrum von 3,4-CHA: Absorptionsmaximum bei 275 nm; aufgetragen als Absorptionseinheit [AU] gegen die Wellenlänge [nm]
- c) $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von mit Ionenaustauscher aufgereinigtem 3,4-CHA, gelöst in Methanol (etwa 34,5% Massegehalt 3,4-CHA). Die Aufreinigung sowie die NMR-Messung wurden von der Arbeitsgruppe Professor Müller am Pharmazeutischen Institut Freiburg durchgeführt.
Erklärung der charakteristischen Signale: Die beiden Signale bei 4,05 ppm und 4,65 ppm (parts per million) stammen von den beiden sp_3 -hybridisierten C-Atomen mit Amino- bzw. Hydroxyfunktion. Das Signal bei 4,65 ppm wird teilweise vom Methanol-Signal bei 4,8 ppm überlagert. Die Signale der drei Doppelbindungsprotonen liegen bei 5,9 ppm und 6,5 ppm. Das Signal bei 6,5 ppm ist hierbei doppelt so groß wie das bei 5,9 ppm, hier überlagern sich die Signale von zwei Protonen. Die integrierte Fläche des Signals bei 5,9 ppm diente zur Normierung und wurde gleich 1 gesetzt. Das Signal bei 3,3 ppm stammt von Methanol.

3.2.3 Einfluss der Deletion des Gens der *pABA*-Synthase *pabC* auf die 3,4-CHA-Produktion

In *E. coli* kann das aus Chorisminsäure gebildete ADC durch das Enzym *pABA*-Synthase (PabC) zu *pABA* umgesetzt werden (Green *et al.*, 1992). *pABA* ist in *E. coli* ein Intermediat bei der Biosynthese von Folsäure, die durch weitere Reaktionsschritte aus *pABA* gebildet wird (siehe 1.2). Daher sollte in einem Stamm mit deletiertem *pabC*-Gen die Ausbeute an gebildetem 3,4-CHA größer sein, weil ADC nur noch zu 3,4-CHA umgesetzt werden kann und nicht mehr auf dem Weg zur Folsäure über das Intermediat *pABA* „verloren“ gehen kann. Um diese Hypothese zu testen, wurde pC78 in den Stamm K15 (KB532 mit deletiertem *pabC*) transformiert und im Schüttelkolben die 3,4-CHA-Bildung mit der des Stammes KB532/pC78 verglichen. Die gebildete 3,4-CHA-Konzentration des Stammes K15/pC78 war entgegen der Erwartungen mit 90-140 mg/l nicht höher als die des Stammes KB532/pC78 (100-150 mg/l) (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass PabC während der Fermentation nur schwach exprimiert wird bzw. aufgrund von Regulationsmechanismen kaum aktiv ist und keine signifikante Umsetzung von ADC zu *pABA* stattfindet. Da die erreichten 3,4-CHA-Ausbeuten mit beiden Stämmen vergleichbar sind, der Stamm K15 jedoch im Gegensatz zum Stamm KB532 eine Kanamycin-Resistenz besitzt, wurde bei allen weiteren Experimenten der resistenzfreie Stamm KB532 verwendet.

3.3 Biochemische Charakterisierung der Isochorismatasen PhzD und EntB

Unter 3.2.2. wurde beschrieben, dass 3,4-CHA durch Überexpression der beiden Proteine PabAB_{C.gl.} und PhzD mikrobiell synthetisiert werden kann, obwohl PhzD während der Durchführung dieser Arbeit gegenüber dem Substrat ADC als kaum aktiv beschrieben worden war (siehe 4.4) (Parsons *et al.*, 2003). Da PhzD anscheinend gegenüber dem Substrat ADC aktiver war als beschrieben, sollte es erneut charakterisiert werden. Die Isochorismatase EntB aus *E. coli* war noch nicht bezüglich ihrer Aktivität gegenüber ADC untersucht worden und sollte daher ebenfalls charakterisiert werden.

3.3.1 Expression und Aufreinigung von PhzD und EntB

Für die biochemische Charakterisierung der beiden Enzyme PhzD und EntB wurden Fusionsproteine mit einem aminoterminalen 10-fach (PhzD) bzw. einem carboxyterminalen 6-fach Histidinschwanz (EntB) eingesetzt. Für deren Überexpression wurden die beiden Vektoren pC49 und pC29 eingesetzt und in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert. Bei dem Plasmid pC49 handelt es sich um den Vektor pET-16b, in den das *phzD*-Gen kloniert wurde (siehe Abbildungen 24 und 30a); bei pC29 um den Vektor pET22 mit kloniertem *entB*-Gen (Abbildung 30b).

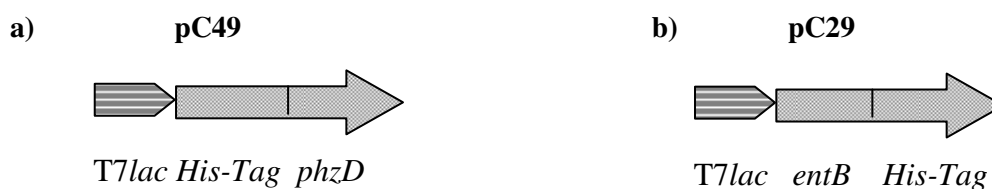


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Plasmide pC49 (a) und pC29 (b)

- a)** pC49 ermöglicht die Expression eines PhzD-Fusionsproteins mit einem aminoterminalen Histidinschwanz unter der Kontrolle des T7lac-Promotors.
b) pC29 ermöglicht die Expression eines EntB-Fusionsproteins mit einem carboxyterminalen Histidinschwanz unter der Kontrolle des T7lac-Promotors.

Für die beiden oben beschriebenen Fusionsproteine wurde ein Überexpressions- und Reinigungsprotokoll erstellt: Mit dem Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pC29 bzw. *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pC49 konnten mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie aus Proteinrohextrakt je Liter Expressionskultur 20 mg bis zur apparenten Homogenität (>95%) aufge-

reinigtes EntB bzw. 25 mg bis zur apparenten Homogenität aufgereinigtes PhzD gewonnen werden (Abbildung 31).

Da das *phzD*-Gen in pC49 die unter 3.2.1 beschriebene Mutation enthält (Valin 71 wird zu Methionin 71) und das aufgereinigte PhzD-Fusionsprotein daher nicht mit dem PhzD-Wildtyp-Protein identisch war, wurde durch ortsgerichtete Mutagenese die Mutation, die Valin 71 des Wildtyp-PhzD-Proteins in Methionin 71 umwandelt, rückgängig gemacht, so dass das mutationsfreie Wildtyp-His-PhzD-Protein exprimiert und aufgereinigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

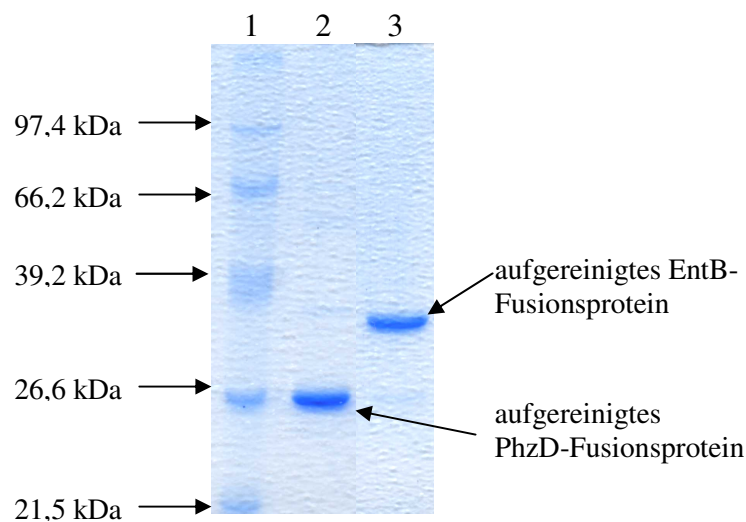


Abbildung 31: SDS-PAGE Analyse der mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie aufgereinigten PhzD- und EntB-Fusionsproteine

Spur 1: Protein-Größenstandard [kDa]

Spur 2: 5 μg aufgereinigtes PhzD-Fusionsprotein aus Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pC49 (1mM IPTG)

Spur 3: 5 μg aufgereinigtes EntB-Fusionsprotein aus Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pC29 (1 mM IPTG)

PhzD mit einem carboxyterminalen 6-fach Histidinschwanz (Plasmid pC50) und EntB mit einem aminoterminalen 10-fach Histidinschwanz (Plasmid pC28) wurden nicht biochemisch charakterisiert, da auf einem SDS-Gel keine Proteinüberexpression der beiden Proteine nachgewiesen werden konnte und sie sich nicht mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie aufreinigen ließen (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Qualitativer Nachweis der PhzD- und EntB-Aktivität mittels RP-HPLC

Zunächst sollte der direkte Nachweis der *in vitro*-Aktivitäten von PhzD und EntB durch RP-HPLC erbracht werden. Hierzu wurde jeweils zu Zellrohextrakt von BL21(DE3)pLysS/pC49 und BL21(DE3)pLysS/pC29 ADC gegeben und die Ansätze zu verschiedenen Zeitpunkten mittels RP-HPLC untersucht. Es konnte die Abnahme der ADC-Konzentration und die gleichzeitige Zunahme der 3,4-CHA-Konzentration beobachtet werden (Abbildung 32: gezeigt ist nur der Versuch mit Zellrohextrakt von BL21(DE3)pLysS/pC49; für Zellrohextrakt von BL21(DE3)pLysS/pC29 wurden vergleichbare Daten erhalten (Daten nicht gezeigt)), d.h., die Enzymaktivität von PhzD und EntB im Zellrohextrakt war eindeutig nachweisbar.

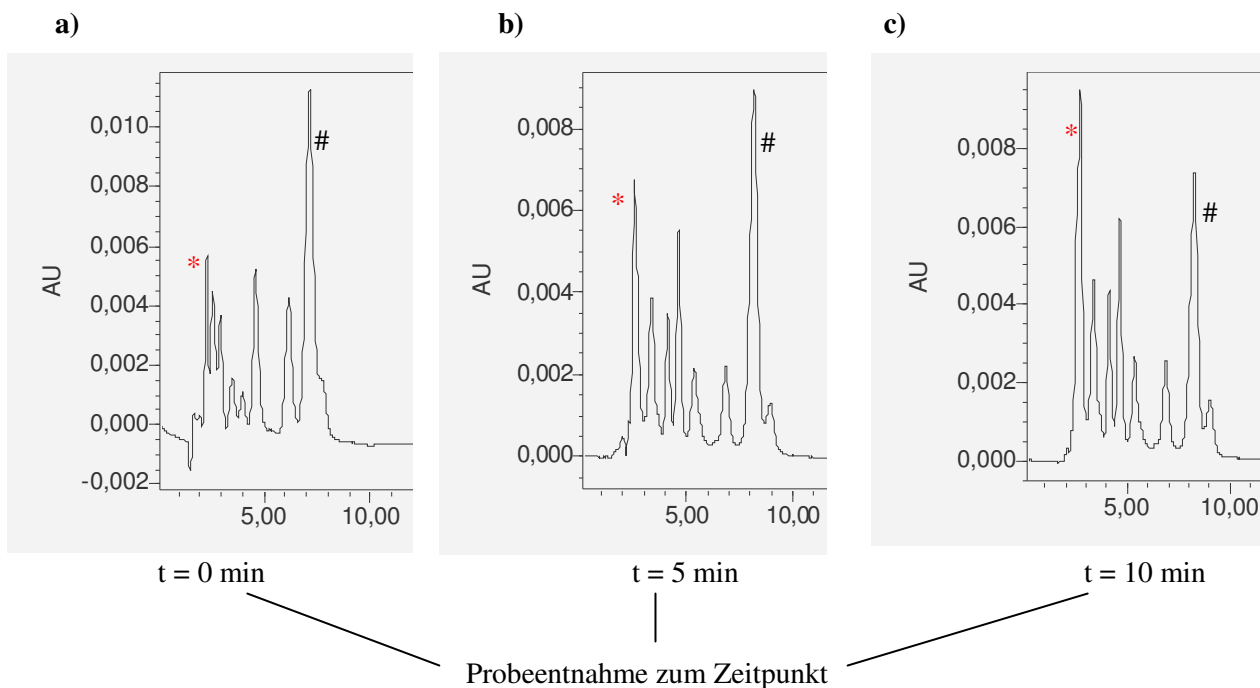


Abbildung 32: Reversed phase HPLC-Analyse eines Reaktionsansatzes aus ADC und BL21(DE3) pLysS/pC49-Zellrohextrakt zum qualitativen Nachweis der PhzD-Enzymaktivität

Die Detektion erfolgte jeweils spektrophotometrisch in einem Wellenlängenbereich von 200-400 nm. Die Reaktion wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ durch Zugabe von ADC gestartet und bei Raumtemperatur durchgeführt.

- a)** Zum Zeitpunkt $t = 0$ Minuten entnommene Probe; diese wurde vor der HPLC-Messung 14-fach verdünnt und die vorhandenen Proteine durch Ultrafiltration bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ entfernt; ADC (#) (Retentionszeit 8,5 Minuten) ist deutlich sichtbar. Eine geringe 3,4-CHA-Menge (*) (Retentionszeit 2,5 Minuten) ist auch zum Zeitpunkt $t = 0$ Minuten sichtbar. Dies erklärt sich durch eine langsame Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei der Entfernung der Proteine mittels Ultrafiltration.
- b)** Zum Zeitpunkt $t = 5$ Minuten entnommene Probe; Behandlung der Probe wie unter a) beschrieben; eine Abnahme der ADC-Konzentration (#) (Retentionszeit 8,5 Minuten) und die Zunahme der 3,4-CHA-Konzentration (*) (Retentionszeit 2,5 Minuten) sind sichtbar.
- c)** Zum Zeitpunkt $t = 10$ Minuten entnommene Probe; Probenbehandlung wie unter a) beschrieben; die weitere Abnahme der ADC-Konzentration (#) (Retentionszeit 8,5 Minuten) und eine weitere Zunahme der 3,4-CHA-Konzentration (*) (Retentionszeit 2,5 Minuten) sind sichtbar.

3.3.3 Bestimmung der kinetischen Parameter von PhzD und EntB

Zur quantitativen Bestimmung der Aktivitäten von PhzD und EntB gegenüber ADC und Chorisminsäure wurde folgender gekoppelter Enzymtest eingesetzt (Abbildung 33):

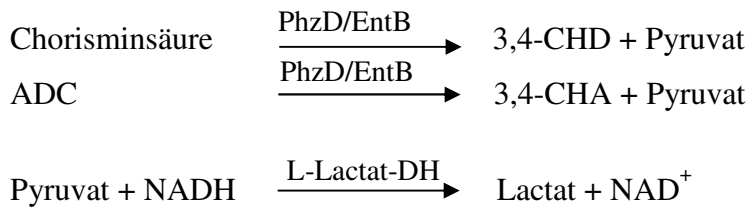


Abbildung 33: Schematische Darstellung des gekoppelten Enzymtests zur biochemischen Charakterisierung von EntB und PhzD

Die Abnahme der NADH-Konzentration wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt.

Bei diesem Test wird die Abnahme der NADH-Konzentration bei 340 nm photometrisch bestimmt; aus dieser kann dann auf die Aktivität von PhzD geschlossen werden, wenn das Enzym L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) im Vergleich zu PhzD im Überschuss vorliegt, weil dann die Aktivität von PhzD der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der gesamten Reaktion ist.

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante (K_M), einem Maß für die Affinität eines Enzyms zu einem bestimmten Substrat, und der Wechselzahl (k_{cat}) von EntB und PhzD wurden gereinigte Fusionsproteine mit einem 6-fachen bzw. 10-fachen Histidinschwanz eingesetzt. Der oben beschriebene gekoppelte Enzymtest wurde bei 37 °C und einem pH-Wert von 7,5 mit den beiden Substraten ADC und Chorisminsäure durchgeführt (Abbildung 34). Die in Abbildung 34 eingezeichneten Linien für v_{max} wurden mit dem Programm SigmaPlot 5.0 aus den in der Abbildung dargestellten Messwerten berechnet.

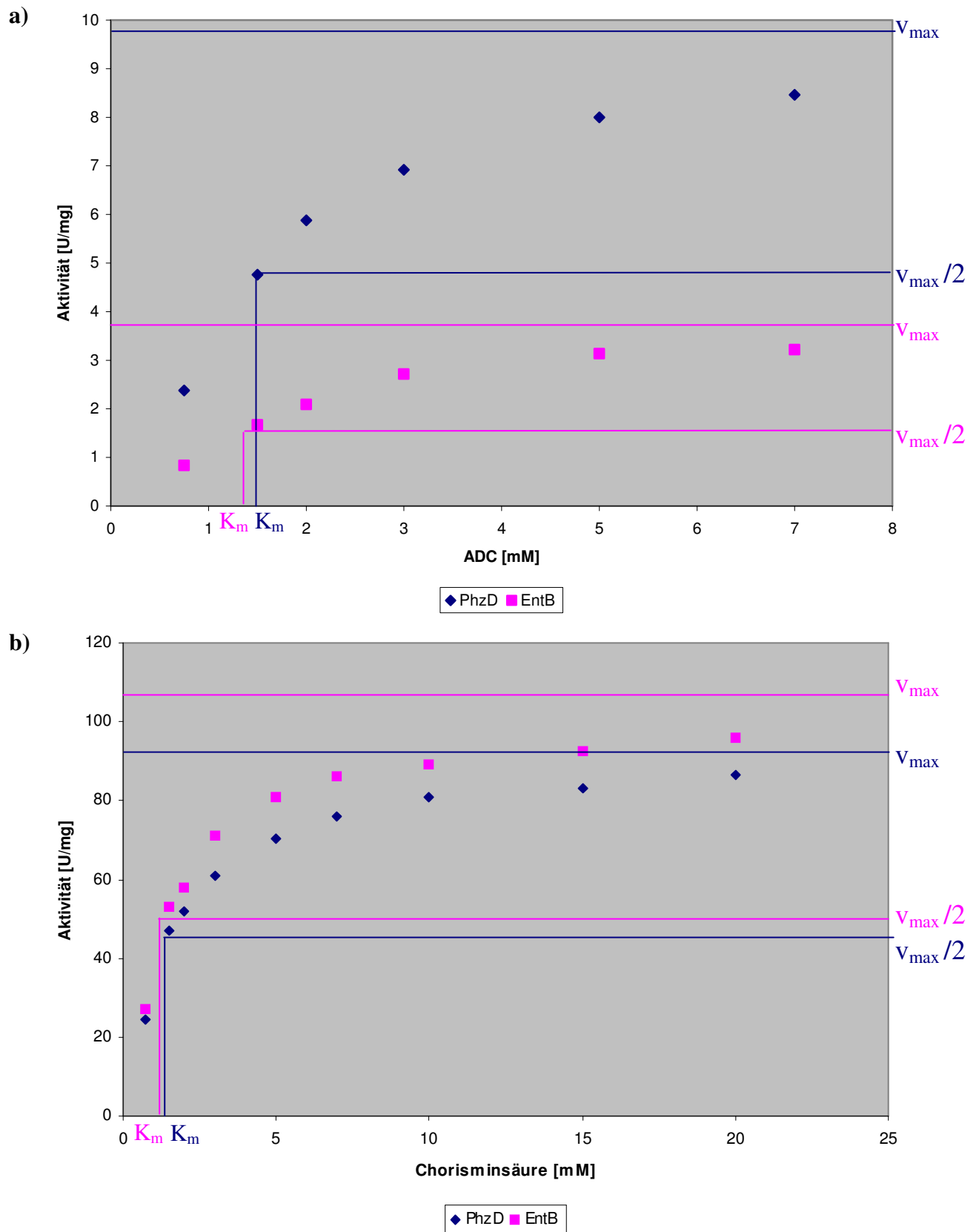


Abbildung 34: Bestimmung der Aktivität von His-PhzD und EntB-His für die nicht physiologischen Substrate ADC (Abbildung a) und Chorisminsäure (Abbildung b) bei einer Temperatur von 37 °C

Aufgetragen ist die Enzymaktivität [U/mg] gegen die Substratkonzentration; aufgeführt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Doppelmessungen. Die eingetragenen Linien für v_{\max} wurden mit dem Programm SigmaPlot 5.0 berechnet.

Aus den in Abbildung 34 dargestellten Messdaten wurden bei 37 °C und einem pH-Wert von 7,5 die in Tabelle 14 und Tabelle 15 aufgeführten Werte für K_M , v_{max} , k_{cat} und k_{cat}/K_M ermittelt:

Substrat	K_M [mM]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$s^{-1}M^{-1}$]
ADC	$1,5 \pm 0,3$	$9,8 \pm 0,3$	$4,1 \pm 0,12$	$2,73 \times 10^3$
Chorisminsäure	$1,2 \pm 0,15$	$93,3 \pm 2$	$39 \pm 0,8$	$32,5 \times 10^3$

Tabelle 14: Kinetische Parameter für das Enzym His-PhzD bei einer Temperatur von 37 °C und einem pH-Wert von 7,5

Die spezifischen Aktivitäten wurden mittels des Hilfsenzym L-Lactat-Dehydrogenase bestimmt. Die aufgeführten Daten resultieren aus Mittelwerten, die aus zwei unabhängigen Doppelmessungen erhalten wurden. Zur Berechnung der kinetischen Parameter wurde das Programm SigmaPlot 5.0 benutzt.

Substrat	K_M [mM]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$s^{-1}M^{-1}$]
ADC	$1,4 \pm 0,3$	$3,76 \pm 0,2$	$2 \pm 0,05$	$1,8 \times 10^3$
Chorisminsäure	$1,1 \pm 0,15$	$106,7 \pm 2,5$	56 ± 3	40×10^3

Tabelle 15: Kinetische Parameter für das Enzym EntB-His bei einer Temperatur von 37 °C und einem pH-Wert von 7,5

Die spezifischen Aktivitäten wurden mittels des Hilfsenzym L-Lactat-Dehydrogenase bestimmt; die aufgeführten Daten resultieren aus Mittelwerten, die aus zwei unabhängigen Doppelmessungen erhalten wurden. Zur Berechnung der kinetischen Parameter wurde das Programm SigmaPlot 5.0 benutzt.

Aufgrund dieser kinetischen Parameter der Enzyme His-PhzD und EntB-His scheint His-PhzD für die in dieser Arbeit gewünschte Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA besser geeignet zu sein als EntB-His. EntB-His hingegen ist besser für die Umsetzung von Chorisminsäure zu 3,4-CHD geeignet.

Für Isochorisminsäure, das eigentliche physiologische Substrat von EntB, sowie ADIC, das physiologische Substrat von PhzD, wurden keine kinetischen Daten ermittelt, da sie nicht käuflich erwerbbar sind und eine chemische Synthese äußerst aufwendig ist.

3.3.4 Einfluss der Mutation V71M auf die PhzD-Aktivität

Wie in 3.2.1 erwähnt, wurde für die mikrobielle Synthese von 3,4-CHA das PhzD-Mutein V71M eingesetzt. Um auszuschließen, dass die erfolgreiche 3,4-CHA-Produktion auf diese Mutation zurückzuführen ist und mit dem Wildtyp-Enzym eventuell nicht möglich ist, wurde

durch ortsgerichtete Mutagenese das Wildtyp-PhzD-Gen wiederhergestellt und die Aktivität der beiden Enzyme miteinander verglichen. Hierbei wurden im Rahmen der Messgenauigkeit annähernd gleiche kinetische Parameter für die beiden Varianten gemessen (Daten nicht gezeigt), so dass die Mutation V71M scheinbar keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hat und die in Tabelle 14 dargestellten Werte für beide PhzD-Enzyme zutreffen.

3.3.5 Einfluss des Histidinschwanzes auf die PhzD-Aktivität

Um einen eventuellen Effekt des verwendeten aminoterminalen Histidinschwanzes auf die Proteinaktivität zu untersuchen, wurde dieser enzymatisch entfernt und die Aktivitäten der beiden Enzyme (mit und ohne Histidinschwanz) bestimmt und miteinander verglichen. Zur Abtrennung des Histidinschwanzes wurde die Protease Faktor Xa eingesetzt.

Factor Xa ist eine sequenzspezifische Protease, die unmittelbar hinter der Aminosäuresequenz Isoleucin-Glutaminsäure-Glycin-Arginin schneidet. Diese Sequenz aus vier Aminosäuren findet sich im PhzD-Fusionsprotein unmittelbar hinter dem 10-fachen Histidinschwanz (siehe Abbildung 25), nicht jedoch im EntB-Fusionsprotein. Nach dem Schneiden mit Factor Xa entspricht das so erhaltene PhzD-Protein bis auf einen aminoterminalen zusätzlichen Histidinrest, der sich durch Faktor Xa nicht entfernen lässt, dem Wildtyp-PhzD-Protein. Die Spaltung des PhzD-Fusionsproteins ist jedoch nicht ganz vollständig; etwa 5% des im Verdau eingesetzten Proteins bleibt unverdaut (Abbildung 35).

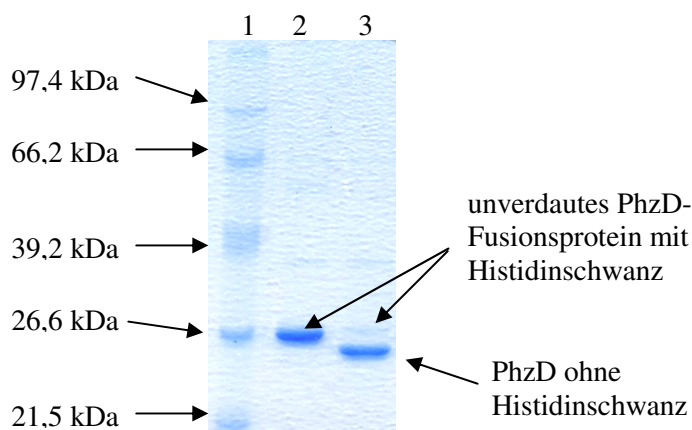


Abbildung 35: SDS-PAGE Analyse zur Überprüfung der Vollständigkeit der Abspaltung des aminoterminalen 10-fach Histidinschwanzes vom PhzD-Fusionsprotein durch die Protease Factor Xa

Spur 1: Protein-Größenstandard [kDa]

Spur 2: 5 µg aufgereinigtes, unverteuertes PhzD-Fusionsprotein

Spur 3: 5 µg PhzD, nach Abspaltung des aminoterminalen 10-fach Histidinschwanzes durch die Protease Factor Xa

Ein Vergleich der Enzymaktivitäten von PhzD mit und ohne Histidinschwanz lieferte im Rahmen der Messgenauigkeit ähnliche kinetische Parameter für die beiden Varianten (Daten nicht gezeigt), so dass der verwendete aminoternale 10-fach Histidinschwanz scheinbar keinen Einfluss auf die Proteinaktivität hat.

3.3.6 Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivität

Im Bereich von 25 °C bis 37 °C wurde der Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Enzymaktivität untersucht (Abbildung 36a). Innerhalb dieses Bereiches führt eine Temperaturerhöhung zu einer Erhöhung der Enzymaktivität; und zwar bei His-PhzD mit einem Q_{10} von 1,95 und bei EntB-His mit einem Q_{10} von 1,9.

Die PhzD- und EntB-Aktivität zeigt bei einer Arrhenius-Darstellung in Abhängigkeit von der Temperatur ein lineares Verhalten (Abbildung 36 b). Anhand der Steigung der Regressionsgeraden wurden für beide Enzyme die Aktivierungsenergien ermittelt; 66,15 kJ/mol für PhzD und 65,5 kJ/mol für EntB. Beide Werte liegen leicht über dem Wert von 40-50 kJ/mol, der häufig für Enzym-Aktivierungsenergien bestimmt wurde (Bisswanger, 2000).

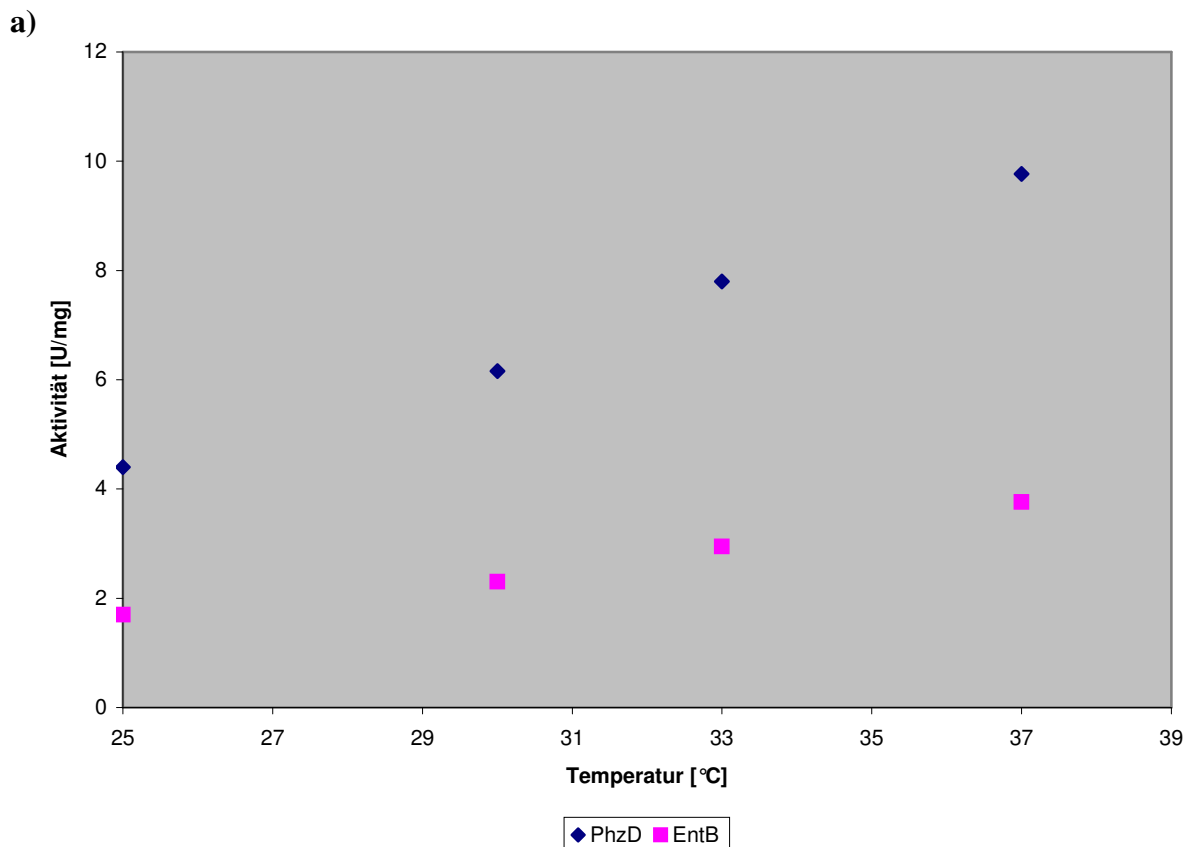
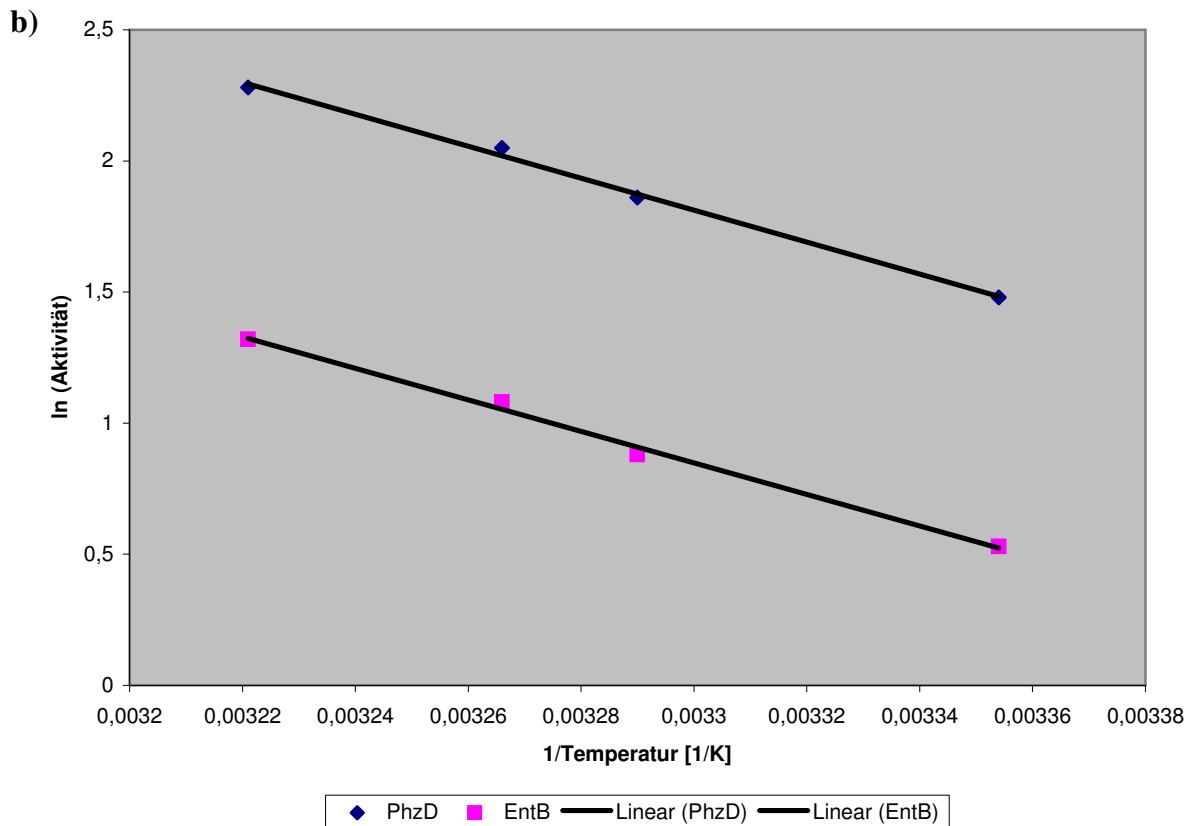


Abbildung 36: Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Enzymaktivität von PhzD und EntB

a) Direkte Auftragung der Enzymaktivität [U/mg] gegen die Reaktionstemperatur [°C].

b) Arrhenius-Darstellung, aufgetragen als natürlicher Logarithmus der Enzymaktivität gegen die reziproke Temperatur [1/K]

Die spezifische Aktivität von His-PhzD und EntB-His gegenüber dem Substrat ADC wurde mit dem Hilfsenzym L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) bei einem pH-Wert von 7,5 bestimmt. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus dreifach durchgeführten Messungen.



3.4 Veränderung der Enzymaktivität von PhzD

In Kapitel 3.2.2 wurde beschrieben, wie in einer 5l-Fermentation des Stammes KB532/pC78 eine maximale Produktkonzentration von 1,8 g/l 3,4-CHA erreicht worden ist. Je nach Fermentationsverlauf- und -dauer werden unterschiedliche Mengen des Nebenprodukts 3,4-CHD gebildet. Der Grund für die Bildung des Nebenprodukts 3,4-CHD liegt darin, dass PhzD neben ADC auch Chorisminsäure als Substrat akzeptiert und diese direkt zu 3,4-CHD umsetzen kann. Aus diesem Grund sollte versucht werden, durch Mutagenese ein PhzD-Mutein zu erhalten, das eine verbesserte Produktbildung ermöglicht. Dies wäre z.B. erreichbar, wenn sich die Aktivität des PhzD-Muteins für das Substrat ADC erhöht und/oder sich die Aktivität für das Substrat Chorisminsäure verringert. Auf diese Weise sollte sich die Menge des unerwünschten Nebenprodukts 3,4-CHD senken lassen. Veränderungen der Proteinstabilität sowie der Proteinexpression könnten ebenfalls einen Einfluss auf die Produktbildung haben.

3.4.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Daher wurden zunächst durch ortsgerechte Mutagenese die von Parsons *et al.* (siehe 4.5) vorgeschlagenen Mutationen an Position 94 von PhzD im Plasmid pC49 durchgeführt. Die ortsgerechte Mutagenese eignet sich zur Erzeugung von Punktmutationen, die zum Austausch, zur Insertion oder zur Deletion einzelner oder einiger weniger Aminosäuren führen (Gillam und Smith, 1979; Kunkel, 1985). In dieser Arbeit wurden alle durchgeführten ortsgerechten Mutagenesen mit Hilfe des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Strata-gene) durchgeführt. Neben der vorgeschlagenen Veränderung von Tryptophan 94 zu den beiden sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure wurde Tryptophan 94 auch durch die Aminosäuren Threonin, Cystein, Glycin, Phenylalanin, Methionin, Alanin und Isoleucin substituiert. Diese PhzD-Muteine wurden mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie aufgereinigt und mit Hilfe des in Abbildung 33 gezeigten gekoppelten Enzymtest auf ihre Aktivität untersucht.

Von allen getesteten PhzD-Muteinen war nur die Variante Threonin 94 in der Lage, ADC zu 3,4-CHA umzusetzen, und zwar mit einer zum Wildtyp-Enzym annähernd gleichen Aktivität. Alle anderen Substitutionen führten zu einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität gegenüber dem Substrat ADC (Daten nicht gezeigt).

Zu einer Umsetzung von Chorisminsäure zu 3,4-CHD waren nur die Varianten Threonin 94 und Asparaginsäure 94 fähig. Die Aktivität dieser beiden Muteine war annähernd gleich der Aktivität des Wildtyp-Enzyms. Die anderen Substitutionen führten zu einem Verlust der Enzymaktivität gegenüber dem Substrat Chorisminsäure (Daten nicht gezeigt).

Das PhzD-Mutein W94D besitzt also eine unveränderte Aktivität gegenüber dem Substrat Chorisminsäure, ist aber nicht mehr in der Lage, ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat umzusetzen.

3.4.2 Erstellung einer PhzD-Mutein-Bibliothek mittels *error-prone* PCR

Da die von Parsons *et al.* (siehe 4.4) vorgeschlagenen Mutationen an Position 94 von PhzD nicht zu einer gewünschten Veränderung der Enzymaktivität führten, sollte durch *error-prone* PCR eine PhzD-Mutein-Bibliothek erstellt werden. Bei dieser Methode wird eine PCR-Reaktion durchgeführt, bei der die verwendeten DNA-Polymerasen die DNA-Replikation relativ fehlerhaft durchführen. Auf diese Weise entstehen zufällige Mutationen im *phzD*-Gen, die zu der gewünschten PhzD-Mutein-Bibliothek führen. In dieser Arbeit wurde hierzu das GeneMorph[®] II Random Mutagenesis Kit (Stratagene) eingesetzt, weil die hierbei eingesetzte Mi-

sung zweier DNA-Polymerasen dafür sorgt, dass alle theoretisch möglichen Mutationen in etwa der gleichen Häufigkeit auftreten und nicht bestimmte Mutationen bevorzugt auftreten. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass man eine Aminosäure in der PhzD-Proteinsequenz nicht durch alle theoretisch möglichen 19 anderen Aminosäuren ersetzen kann, sondern nur durch diejenigen Aminosäuren, deren Codon durch die Mutation einer Base des ursprünglichen Codons entstehen kann. Durch die Zahl der Replikationszyklen und die eingesetzte Menge an Matrizen-DNA kann die Mutationsrate variiert werden. Für diese Arbeit wurde eine Mutationsrate von durchschnittlich einer Mutation im *phzD*-Gen angestrebt, da bei mehreren Mutationen das resultierende PhzD-Mutein eventuell inaktiv ist. Als Matrizen-DNA wurden 500 ng pC49-DNA eingesetzt und eine PCR-Reaktion mit 30 Zyklen durchgeführt (Abbildung 37).

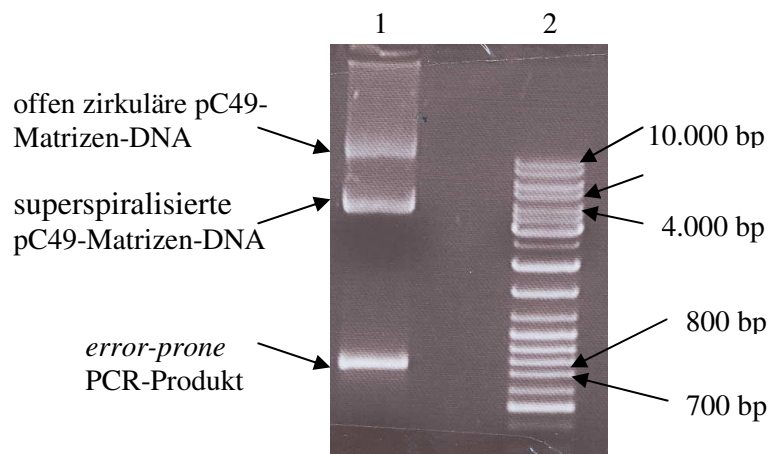


Abbildung 37: Agarosegel-Elektrophorese zum Nachweis des *error-prone* PCR-Produkts

Spur 1: sichtbar sind das *error-prone* PCR-Produkt von *phzD* (750 bp) sowie die offen zirkuläre (> 10 kb) und die superspiralisierte (etwa 5,5 kb) Form von pC49

Spur 2: DNA-Größenstandard [bp]

Die Primer für die *error-prone* PCR-Reaktion wurden so gewählt, dass das vollständige *phzD*-Gen inklusive T7-Promotorregion amplifiziert wurde und sich in unmittelbarer Nähe der Enden des PCR-Produktes Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *XbaI* und *BamHI* befanden.

Das in Abbildung 37 gezeigte PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *BamHI* verdaut und in das mit *XbaI* und *BamHI* geöffnete Plasmid pC110 ligiert (Abbildung 38). Auf diese Weise wurde eine Population von Plasmiden pC78* erhalten, die auf pC78 beruht, bei der das *phzD*-Gen jedoch aus der *error-prone* PCR stammt und sich daher vom Wildtyp-*phzD*-Gen unterscheiden kann.

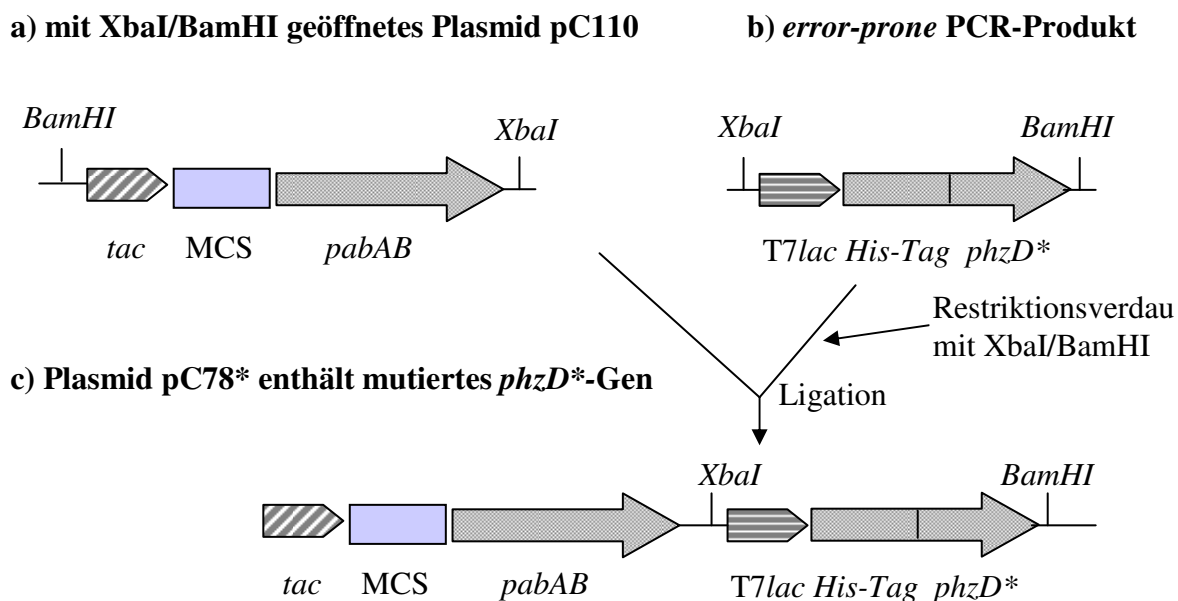


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pC78*, das eine Population aus mutierten *phzD-Genen enthält**

- a) Darstellung des mit *XbaI/BamHI* geöffneten Plasmid pC110; gezeigt sind die Promotorregion (*tac*), die „multiple cloning site“ (MCS), das klonierte Gen (*pabAB*) sowie wichtige Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen.
- b) Darstellung des *error-prone* PCR-Produkts mit mutiertem *phzD**-Gen; gezeigt sind die Promotorregion (*T7lac*), das sich unmittelbar hinter der den Histidinschwanz kodierenden Sequenz befindliche, mutierte *phzD**-Gen sowie wichtige Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen.
- c) Darstellung des Plasmids pC78* zur Proteinüberexpression von PabAB und des Fusionsproteins PhzD* mit aminoterminalem Histidinschwanz; entstanden durch Ligation des mit *XbaI/BamHI* geschnittenen *error-prone* PCR-Produkts in den mit *XbaI/BamHI* geöffneten Vektor pC110. Gezeigt ist eine linearisierte Form des Vektors mit den beiden klonierten Genen (*pabAB* und *phzD**).

Durch Sequenzierung von 14 Klonen mit pC78* wurde die durchschnittliche Mutationsrate von einer Mutation pro *phzD*-Gen im Vektor pC78* bestätigt (Tabelle 16).

	Zahl der gefundenen Mutationen pro <i>phzD</i> -Gen		
	0	1	2
Anzahl der Plasmide mit angegebener Mutationszahl	3	9	2

Tabelle 16: Durch DNA-Sequenzierung ermittelte Mutationsraten im *phzD*-Gen von 14 untersuchten pC78*-Plasmiden

Um eine möglichst große Zahl unterschiedlicher pC78*-Varianten zu erhalten, ist eine sehr effiziente Transformation des Ligationsansatzes (*error-prone* PCR-Produkt in pC110) wichtig, damit viele Klone mit pC78* erhalten werden. Aus diesem Grund wurden für diese Transformation superkompetente ElectroMaxTM DH5 α -ETM-Zellen (Invitrogen) verwendet und der Ligationsansatz durch Elektroporation transformiert. Es konnten etwa 7.000 Klone

erhalten werden. Diese wurden von den Agarplatten abgeschwemmt und deren Plasmide mit einer Plasmid-Midi-Preparation aufgereinigt.

Die so erhaltene pC78*-Bibliothek wurde erneut in DH5 α -Zellen transformiert und einzelne Klone auf ihren Plasmidgehalt und ihre Proteinexpression hin untersucht. Etwa zwei Drittel der untersuchten 16 Klone enthielten pC78*. Bei den Klonen mit pC78* konnte durch IPTG-Zugabe eine sichtbare Proteinüberexpression von PabAB und PhzD induziert werden (Abbildung 39). Somit enthielten etwa 4.800 der erhaltenen 7.000 Klone das Plasmid pC78*.

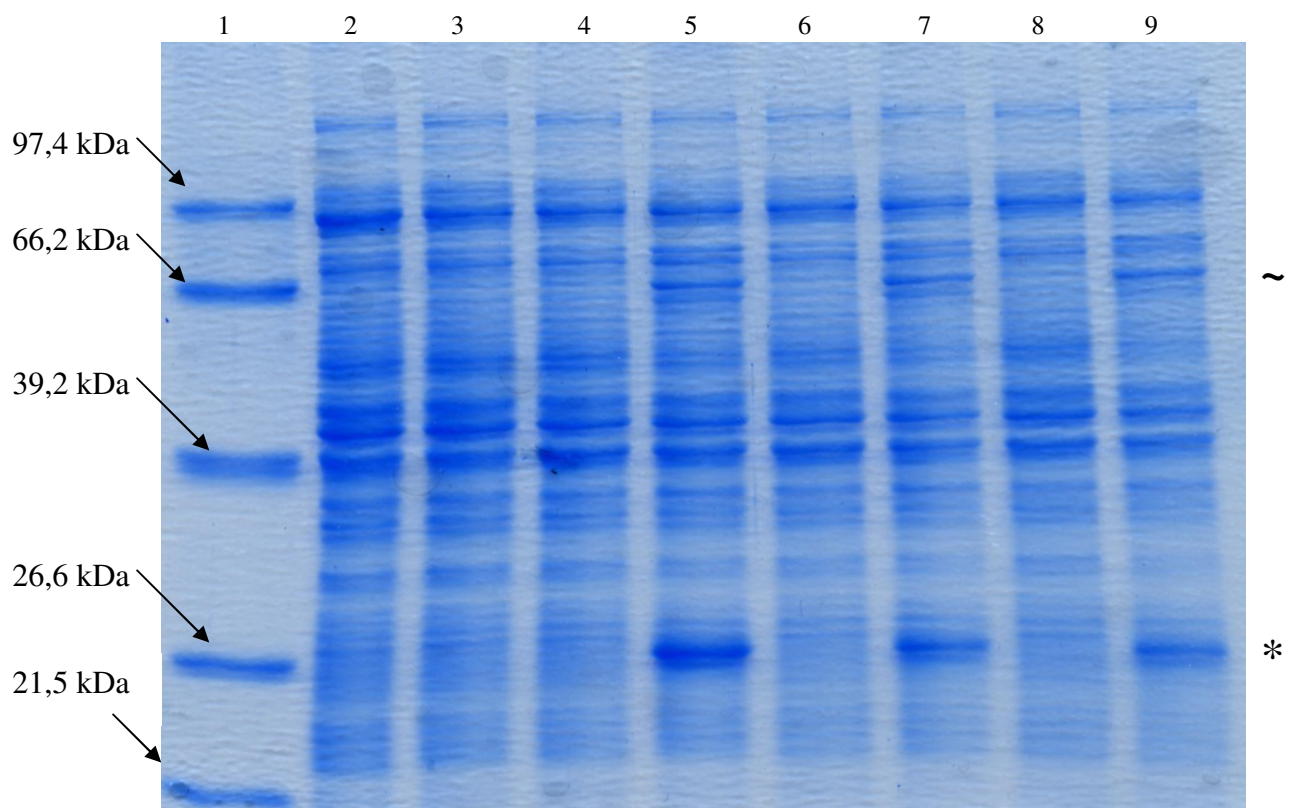


Abbildung 39: SDS-PAGE Analyse der gleichzeitigen Expression der Gene *pabAB* (~) und *phzD* (*) in den IPTG-induzierten und nicht induzierten *E. coli*-Stämmen DH5 α /pC78*

Spur 1: Protein-Größenstandard [kDa]

Spur 2: 50 μ g RE *E. coli* DH5 α /pC110

Spur 3: 50 μ g RE *E. coli* DH5 α /pC110 (1mM IPTG)

Spur 4: 50 μ g RE *E. coli* DH5 α /pC78

Spur 5: 50 μ g RE *E. coli* DH5 α /pC110 (1mM IPTG)

Spuren 6 und 8: je 50 μ g RE *E. coli* DH5 α /pC78* von 2 unterschiedlichen Klonen

Spuren 7 und 9: je 50 μ g RE *E. coli* DH5 α /pC78* von 2 unterschiedlichen Klonen (1mM IPTG)

3.4.3 ¹H-NMR-Screening der PhzD-Mutein-Bibliothek

Die in 3.4.2 erstellte pC78*-Bibliothek sollte nun auf PhzD-Muteine mit veränderter Enzymaktivität hin durchsucht werden. Da es kein geeignetes Selektionssystem gibt, um auf Klone mit einer verbesserten PhzD-Enzymaktivität zu selektionieren, sollte von etwa 10.000 Klonen mittels Hochdurchsatz-¹H-NMR deren gebildete 3,4-CHA und 3,4-CHD-Konzentrationen gemessen werden. Diese Messungen wurden von Dick Schipper und Aad Vollebregt (DSM, Delft) mit dem Stamm KB532/pC78* in 96er-Deepwell-Platten (2 ml Volumen) durchgeführt. Es wurden vielversprechende Klone mit einer höheren 3,4-CHA-Produktkonzentration oder einer niedrigeren 3,4-CHD-Produktkonzentration gefunden (Vollebregt und Schipper, 2005, persönliche Mitteilung). Die 48 vielversprechendsten Klone des Screenings wurden ausgewählt und von Aad Vollebregt in zwei parallel durchgeführten Schüttelkolbenexperimenten erneut auf deren 3,4-CHA und 3,4-CHD-Bildung hin untersucht, um festzustellen, ob sich die im Screening gemessenen Werte auch auf einen Versuch im Schüttelkolben übertragen lassen. Als Auswahlkriterium diente hierbei die insgesamt gebildete 3,4-CHA-Menge sowie das Verhältnis von gebildetem 3,4-CHA zu gebildetem 3,4-CHD. Bei den in Tabelle 17 gezeigten acht Klonen fanden sich auch im Schüttelkolbenexperiment veränderte 3,4-CHA und 3,4-CHD-Produktkonzentrationen (Vollebregt, 2005, persönliche Mitteilung), allerdings fällt bereits auf, dass keiner dieser Klone im Vergleich zum Stamm KB532/pC78 eine signifikant erhöhte 3,4-CHA-Bildungsrate aufweist. Diese Klone wurden anschließend in der vorliegenden Arbeit genauer charakterisiert.

Klon	Versuch 1		Versuch 2		Verhältnis 3,4-CHA zu 3,4-CHD (gemittelt aus Versuch 1 und 2)
	3,4-CHA	3,4-CHD	3,4-CHA	3,4-CHD	
D11	13	35	15	38	1:2,6
A9	10	27	12	36	1:2,9
C2	5	1	5	2	1:0,3
D7	12	33	15	38	1:2,6
C7	11	31	14	38	1:2,8
B3	11	32	16	39	1:2,6
D10	6	2	7	3	1:0,4
C8	4	1	8	3	1:0,3
pC78	8	24	7	27	1:3,4

Tabelle 17: Auflistung der Klone des Screenings mit veränderten Produktbildungsraten

Die Kultivierung der Klone erfolgte über 48 Stunden bei 25 °C und 220 Upm in 20 ml Minimalmedium. Durch Zugabe von 0,1 mM IPTG wurden PhzD und PabAB_{C.gl} überexprimiert. Bei den in der Tabelle gezeigten Werten handelt es sich um relative Einheiten. Bei den Werten für pC78 in der letzten Reihe handelt es sich um die Produktbildungsraten, die mit dem ursprünglichen Plasmid pC78 erreicht wurden.

Eine Sequenzierung der Plasmide der in Tabelle 17 aufgeführten Klone ergab nur bei zwei Klonen, den Klonen A9 und C2, eine veränderte Aminosäuresequenz von PhzD. Bei allen anderen fanden sich entweder keine Mutationen oder stille Mutationen, die zu keinem Aminosäureaustausch führen. Die beiden Klone C8 und D10 enthielten nur das Plasmid pC110 ohne ein kloniertes *error-prone* PCR-Produkt von *His-phzD*. Es ist daher fraglich, ob die in Tabelle 17 gezeigten 3,4-CHA-Werte relevant sein können.

Die beiden gefundenen PhzD-Muteine wiesen folgende Aminosäureaustausche auf: Arginin138 zu Lysin 138 (Klon A9) bzw. Serin165 zu Tyrosin165 (Klon C2). Die beiden Muteine wurden mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie aufgereinigt und biochemisch untersucht, wie in 3.3.3 beschrieben.

Das PhzD-Mutein Serin165 Tyrosin war gegenüber den getesteten Substraten ADC und Chorisminsäure vollständig inaktiv, während das Mutein Arginin138 Lysin eine annähernd gleiche Aktivität wie das Wildtyp-Protein aufwies (Daten nicht gezeigt).

Im Screening konnten also keine PhzD-Muteine gefunden werden, die auch bei Experimenten im Schüttelkolben im Vergleich zum ursprünglichen Stamm signifikant mehr 3,4-CHA bildeten.

3.5 Mikrobielle 3,4-CHA-Synthese im Schüttelkolben

Die in Tabelle 17 gezeigten Produktbildungsraten, die von Aad Vollebregt für einige Klone des Screenings ermittelt wurden, zeigen gegenüber dem Klon mit dem Wildtyp-Plasmid pC78 veränderte Werte, obwohl eine Sequenzierung dieser Klone ergeben hatte, dass außer bei den Klonen C2 und A9 keine Mutationen vorlagen, die zu einem Aminosäureaustausch in PhzD führen (siehe 3.4.3). Daher wurden diese Klone in dieser Arbeit erneut im Schüttelkolben auf ihre Produktbildung hin untersucht, um zu testen, ob sich die in Tabelle 17 gezeigten Werte bestätigen lassen und um absolute Werte für die erzielten Produktkonzentrationen zu erhalten. Die Kultivierungen wurden bei 25 °C durchgeführt, weil bei dieser Temperatur die Produktausbeute bei DSM (Delft) am größten war (Vollebregt, 2005, persönliche Mitteilung). Nach 24 und 48 Stunden wurden jeweils Proben entnommen und die gebildeten Produktkonzentrationen von 3,4-CHA und 3,4-CHD mittels RP-HPLC bestimmt; die Detektion erfolgte spektrophotometrisch in einem Wellenlängenbereich von 200 - 400 nm (Tabelle 18).

Stamm	OD ₆₀₀ , (48 Stunden)	3,4-CHA, 24 h [g/l]	3,4-CHD, 24h [g/l]	3,4-CHA, 48 h [g/l]	3,4-CHD, 48 h [g/l]
KB532/pC78	4,1	uD	uD	uD	uD
KB532/pC78 (+ IPTG)	4,2	0,22	0,33	0,72	0,98
KB532/A9 (R138K)	4,1	uD	uD	0,03	0,06
KB532/A9 (+ IPTG)	3,9	0,19	0,33	0,73	1,05
KB532/C2 (S165Y)	4,3	uD	uD	uD	uD
KB532/C2 (+ IPTG)	4,1	uD	uD	uD	uD
KB532/D7	4	uD	uD	uD	uD
KB532/D7 (+ IPTG)	3,9	0,22	0,28	0,69	0,99
KB532/D11	4,2	uD	uD	uD	uD
KB532/D11 (+ IPTG)	4,1	0,25	0,35	0,71	1,1

Tabelle 18: 3,4-CHA-Produktion verschiedener Stämme im Schüttelkolben

Die aufgeführten Werte sind jeweils Mittelwerte aus dreifach durchgeführten Messungen. Die Nachweisgrenze für 3,4-CHD und 3,4-CHA liegt bei etwa 0,05 g/l. Die Abkürzung „uD“ steht für „unterhalb der Detektionsgrenze“ und ist angegeben, wenn die gemessene 3,4-CHA oder 3,4-CHD-Konzentration unterhalb von 0,05 g/l liegt.

Die Ansätze enthielten jeweils 50 ml Minimalmedium in 500 ml Kolben und wurden zunächst bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde die Temperatur auf 25 °C gesenkt und die entsprechenden Ansätze mit 0,1 mM IPTG induziert. Nach 24 Stunden wurden 5 g/l Glukose nachgefüttert, und es wurde eine 1 ml Probe entnommen. Zu diesem Zeitpunkt war die Glukose des Minimalmediums fast vollständig verbraucht worden (Nachweis erfolgte mit dem Ecoline[®]S+-Kit). Das Experiment wurde nach 48 Stunden gestoppt, weil die Produktausbeute bei längerer Inkubation sank. Der pH-Wert in den Schüttelkolbenkulturen betrug nach 48 Stunden am Ende des Experiments 6,9.

Die aufgeführten Stämme KB532/D7 und KB532/D11 sind im Screening gefundene Klone mit dort erhöhter 3,4-CHA-Bildung, eine Sequenzierung ihrer Plasmide zeigte jedoch keine Mutationen in pC78*. KB532/A9 kodiert das PhzD-Mutein R138K und KB532/C2 das PhzD-Mutein S165Y.

Die gebildeten 3,4-CHA-Mengen sind nach 48 Stunden mit 0,69 g/l – 0,73 g/l bei den untersuchten Klonen relativ gleich. Wie erwartet, bildet der Klon mit dem inaktiven PhzD Serin 165 Tyrosin kein 3,4-CHA. Das Verhältnis von gebildetem 3,4-CHA zu gebildetem 3,4-CHD beträgt nach 48 Stunden bei allen untersuchten Stämmen (außer KB532/C4) etwa 1:1,5, d.h., es wird etwa 50% mehr unerwünschtes Nebenprodukt 3,4-CHD als das Zielprodukt 3,4-CHA gebildet.

Die im Schüttelkolben untersuchten Klone wiesen also keine erhöhte 3,4-CHA-Produktion auf. Eine Verbesserung des Verhältnisses aus gebildetem 3,4-CHA zu 3,4-CHD konnte ebenfalls nicht erreicht werden.

3.6 Stammkonstruktion und Pyruvat-Recycling

Bei der Biosynthese der Cyclitole und Aminocyclitole des CHORUS-Projekts wird im letzten Reaktionsschritt jeweils Pyruvat abgespalten (Abbildung 40).

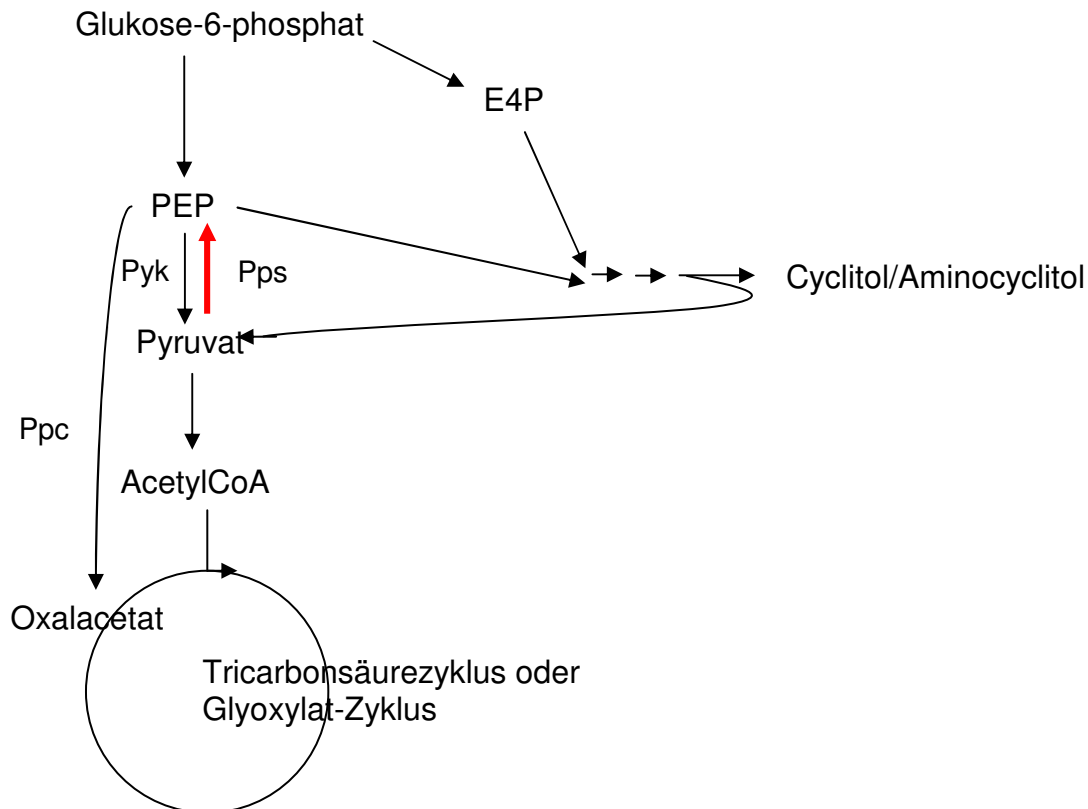


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Idee des PEP-Recycling

Das bei der Produktion von Cyclitolen oder Aminocyclitolen abgespaltene Pyruvat kann durch die PEP-Synthetase (durch das *pps*-Gen kodiert; in rot dargestellt) in PEP umgewandelt werden. Das gebildete PEP kann zusammen mit E4P zur erneuten Produktion von Cyclitolen/Aminocyclitolen eingesetzt werden. Der unerwünschte Abbau des abgespaltenen Pyruvats durch den Tricarbonsäurezyklus bzw. Glyoxylatzyklus sollte sich auf diese Weise reduzieren lassen.

Da Phosphoenolpyruvat neben Erythrose-4-Phosphat (E4P) eines von zwei Substraten für den ersten Schritt des Shikimisäurewegs ist, sollte versucht werden, durch ein „Recycling“ des freiwerdenden Pyruvats zu Phosphoenolpyruvat den Stofffluss in den Shikimisäureweg zu erhöhen. Dadurch sollte sich die Produktausbeute bei der mikrobiellen Synthese von 3,4-CHA und auch bei den anderen Zielprodukten des CHORUS-Projektes weiter erhöhen lassen. Die Umwandlung von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat (PEP) ist eine Reaktion der Glukoneogenese, die in *E. coli* durch die PEP-Synthetase (kodiert vom *pps*-Gen) katalysiert wird (Chao *et al.*, 1993). Durch die chromosomale Integration des *pps*-Gens in Produktionsstämme und

die daraus resultierende Proteinüberexpression der PEP-Synthetase könnte sich somit eventuell die Produktausbeute verbessern lassen.

In allen bisher durchgeführten Experimenten zur mikrobiellen Synthese von 3,4-CHA sind mit dem Stamm KB532 deutlich höhere Produktausbeuten als mit dem Stamm LJ110 bzw. einem veränderten LJ110-Stamm erzielt worden. Ein denkbarer Grund für die geringeren Produktbildungsraten bei LJ110 basierten Stämmen wäre, dass der Stofffluss zu Chorisminsäure in diesen Stämmen geringer ist als im *E. coli*-Stamm KB532. Aus diesem Grund sollte versucht werden, in dem Stamm F96 (LJ110 $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)\ \Delta(entCEBA)::kan\ (Km^R)\ \Delta(lacIZYA)::aroFBL)$ (Trachtmann, 2003, persönliche Mitteilung), der aufgrund der chromosomal integrierten Gene *aroFBL* bereits einen erhöhten Stofffluss zu Chorisminsäure im Vergleich zum Stamm LJ110 aufweisen sollte, durch die oben beschriebene chromosomale Integration des *pps*-Gens den Stofffluss zu Chorisminsäure noch weiter zu erhöhen und dadurch die Produktausbeute zu steigern.

Das *pps*-Gen wurde zunächst nach der Methode von Datsenko und Wanner (Datsenko und Wanner, 2000) in den Fukose-Lokus des *E. coli*-Stammes BW25113 chromosomal integriert (siehe 2.5.13). Anschließend wurde das *pps*-Gen mittels P1-Transduktion (Miller, 1992) in den Fukose-Lokus des Stammes F96 transduziert (neuer Stamm F99 (F96 $\Delta(fucPI)::pps$)) (siehe 2.5.12 und 2.5.13).

In den Stamm F99 wurde anschließend das Plasmid pC78 transformiert und F99/pC78 am IBT-1 in Jülich in einer 1,5l Sixfors-Fermentation auf seine 3,4-CHA-Produktion hin untersucht. Nach 48 stündiger Fermentation konnten 0,35 g/l 3,4-CHA und 1,5 g/l 3,4-CHD im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Daten sind Mittelwerte aus zwei parallel durchgeführten Fermentationen (Moch, 2005, persönliche Mitteilung)). Somit ist auch mit dem LJ110 basierten Stamm F99 ein mikrobieller Zugang zu 3,4-CHA möglich, allerdings mit einer deutlich geringeren Ausbeute als mit dem Stamm KB532.

Um zu untersuchen, ob die chromosomale Integration des *pps*-Gens in den Stamm F96 wirklich zu einer Erhöhung des Stoffflusses zu Chorisminsäure (durch Recycling des bei der 3,4-CHA und 3,4-CHD-Synthese abgespaltenen Pyruvats zu PEP) und somit auch zu einer erhöhten 3,4-CHA-Produktbildung führt, wurden die beiden Stämme F96/pC78 und F99/pC78 im Schüttelkolben kultiviert und die jeweils erreichten Produktbildungsraten miteinander verglichen (Ghanegaonkar, 2005, persönliche Mitteilung). Nach 24, 48 bzw. 65 Stunden wurden jeweils Proben entnommen und die Produktkonzentrationen im Kultur-

überstand mittels RP-HPLC bestimmt (Detektion erfolgte spektrophotometrisch in einem Wellenlängenbereich von 200 – 400 nm) (Tabelle 19).

	OD ₆₀₀	3,4-CHA [g/l]	3,4-CHD [g/l]	Chorisminsäure [g/l]
F96/pC78, 1. Experiment				
24 Stunden	5,03	0,07	0,04	0,57
48 Stunden	4,5	0,05	0,13	0,05
65 Stunden	5,42	0,07	0,38	0,04
F96/pC78, 2. Experiment				
24 Stunden	4,33	0,08	0,12	1,21
48 Stunden	4,53	0,09	0,13	0,46
F99/pC78, 1. Experiment				
24 Stunden	2,94	0,025	uD	0,07
48 Stunden	4,25	0,029	0,15	0,17
65 Stunden	5,63	0,03	0,44	0,16
F99/pC78, 2. Experiment				
24 Stunden	2,82	0,06	0,09	1,53
48 Stunden	4,4	0,06	0,11	0,23

Tabelle 19: Vergleich von F96/pC78 und F99/pC78 im Schüttelkolben

Die Kultivierung der Ansätze erfolgte bei 30 °C in 50 ml Minimalmedium (in 500 ml Kolben). Nach 4 Stunden wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG zu den Ansätzen die Proteinexpression von His-PhzD und PabAB_{C.gl.} induziert. Beim 1. Experiment wurde nach 48 Stunden 5 g/l Glukose nachgefüttert. Nach 24, 48 und 65 Stunden wurde von den Ansätzen jeweils eine 1 ml Probe entnommen. Die Abkürzung „uD“ steht für „unterhalb der Detektionsgrenze“.

Die Ergebnisse der beiden durchgeführten Kultivierungen der Stämme F96/pC78 und F99/pC78 im Schüttelkolben unterscheiden sich signifikant voneinander, d.h., eine reproduzierbare Kultivierung der beiden Stämme war im Schüttelkolben nicht möglich (Ghanegaonkar, 2005, persönliche Mitteilung). Es konnte aber gezeigt werden, dass mit beiden Stämmen die mikrobielle Biosynthese von 3,4-CHA im Schüttelkolben möglich ist und zwar mit Produktausbeuten von 0,03 – 0,09 g/l 3,4-CHA.

In beiden Experimenten ist die gebildete 3,4-CHA-Menge mit dem Stamm F99/pC78 geringer als mit dem Stamm F96/pC78, d.h., durch die chromosomale Integration des *pps*-Gens konnte die angestrebte Erhöhung der 3,4-CHA-Produktbildung nicht erreicht werden. Bei beiden Experimenten fällt auf, dass der Stamm F99/pC78 signifikant langsamer wächst als der Stamm F96/pC78. Durch eine schwache Überexpression der PEP-Synthetase läßt sich die Wachstumsrate von *E. coli* unter bestimmten Bedingungen erhöhen, jedoch bewirkt eine zu starke Überexpression der PEP-Synthetase eine Verringerung der Wachstumsrate (Chao *et al.*,

1993). Dies wäre durch eine hohe metabolische Belastung für die Zelle erklärbar, die aus der Entstehung eines sogenannten „Futile“-Zyklus resultiert, bei dem die beiden Verbindungen Pyruvat und PEP unter ATP-Verbrauch gegenseitig ineinander umgewandelt werden. Es ist allerdings fraglich, ob aus der chromosomalen Integration des *pps*-Gens eine so starke Überexpression der PEP-Synthetase resultiert, die das beobachtete verlangsamte Wachstum von F99/pC78 erklären könnte.

Die aus den beiden Experimenten ableitbaren Kohlenstoffflüsse durch den Shikimisäureweg hin zu Chorisminsäure und den beiden Produkten 3,4-CHA und 3,4-CHD scheinen bei beiden Stämmen in etwa vergleichbar zu sein (Daten nicht gezeigt). Eine zuverlässige Aussage hierüber ist jedoch aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit nicht möglich.

4. Diskussion

Chorisminsäure ist der zentrale Verzweigungspunkt bei der Biosynthese von aromatischen Verbindungen in *E. coli*. Chorisminsäure besitzt eine hohe Funktionalisierung und weist eine hohe synthetische Flexibilität auf, die eine Vielzahl verschiedener Reaktionen ermöglicht. So können ausgehend von Chorisminsäure so unterschiedliche Verbindungen wie Folsäure, Ubichinon, Menachinon oder die aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan synthetisiert werden.

Diese Vielseitigkeit des Synthesebausteins Chorisminsäure sollte auch innerhalb des CHORUS-Projektes genutzt werden. Ziel des Projekts war die mikrobielle Biosynthese der Cyclohexadienderivate 2,3-CHD, 3,4-CHD, 2,3-CHA und 3,4-CHA, deren Aufreinigung und Isolierung sowie die Demonstration von möglicher Folgechemie ausgehend von diesen Verbindungen. Für 2,3-CHD, 3,4-CHD und 2,3-CHA waren vor Beginn des CHORUS-Projekts schon mikrobielle Zugänge beschrieben worden (Müller et al., 1996; McCormick et al., 1961 und 1962), jedoch waren mit diesen Zugängen nur geringe Ausbeuten erreicht worden (0,15 g/l 3,4-CHD und 0,2 g/l 2,3-CHD) bzw. der Zugang war nur mit einem nicht genau charakterisierten *Streptomyces aureofaciens*-Stamm möglich (10 g/l 2,3-CHA). Innerhalb des CHORUS-Projekts konnten die mikrobiellen Zugänge zu diesen Verbindungen deutlich verbessert werden. Es konnten Produktausbeuten von 17,5 g/l 2,3-CHD und 30 g/l 3,4-CHD mit einem modifizierten *E. coli*-Stamm LJ110 erreicht werden. Für 2,3-CHA konnte die Produktausbeute auf 14 g/l gesteigert werden und dies unter Nutzung eines modifizierten *E. coli*-Stamms LJ110.

Hauptziel dieser Arbeit war die mikrobielle Synthese des Aminocyclitols 3,4-CHA. Im Gegensatz zu den anderen Zielprodukten des CHORUS-Projektes war für diese Verbindung noch kein mikrobieller Zugang beschrieben worden. Erschwert werden würde der mikrobielle Zugang zu 3,4-CHA durch die Tatsache, dass für diese Verbindung bisher keine physiologischen Funktionen beschrieben worden waren und auch keine Enzyme bekannt waren, die in der Lage sind, Umsetzungen zu dieser Verbindung zu katalysieren.

Geplant war ein mikrobieller Zugang zu 3,4-CHA ausgehend von Chorisminsäure über das Intermediat ADC (Abbildung 11).

Da die Aminierung von Chorisminsäure zu ADC physiologisch für *E. coli* ist und der erste Reaktionsschritt bei der Biosynthese von Folsäure ist, sollte durch Überexpression der beiden Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, PabA und PabB, eine effektive Umsetzung von

Chorisminsäure zu ADC ermöglicht werden. Für die Umsetzung von ADC zum Zielprodukt 3,4-CHA ist die Hydrolyse eines Vinylethers nötig. Eine solche Reaktion war zu Beginn dieser Arbeit für die beiden Enzyme PhzD (*Pseudomonas aeruginosa*) und EntB (*E. coli*) beschrieben worden (Mavrodi *et al.*, 1998), allerdings für die Substrate ADIC und Isochorisminsäure und nicht für ADC. Innerhalb des CHORUS-Projekts waren EntB und PhzD jedoch schon für die Umsetzung von Chorisminsäure zu 3,4-CHD erfolgreich eingesetzt worden, so dass beide Enzyme scheinbar ein breites Substratspektrum besitzen. Aus diesem Grund sollten beide Enzyme auch auf ihre Fähigkeit zur Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat getestet werden. Durch Mutagenese sollte gegebenenfalls versucht werden, die katalytischen Eigenschaften und das Substratspektrum von PhzD oder EntB so zu verändern, dass ADC von EntB oder PhzD besser zu 3,4-CHA umgesetzt werden kann.

Um das Hauptziel dieser Arbeit zu erreichen, die mikrobielle Biosynthese von 3,4-CHA mit einem rekombinanten *E. coli*-Stamm, ist es zunächst notwendig, einen geeigneten Stamm zur Verfügung zu haben, der einen hohen Stofffluss zu Chorisminsäure, der Ausgangsverbindung der geplanten Biosynthese, aufweist. Die mikrobielle Biosynthese der beiden Cyclitole 2,3-CHD und 3,4-CHD war schon erfolgreich mit einem veränderten *E. coli*-Stamm LJ110 (Stamm F82) innerhalb des CHORUS-Projektes durchgeführt worden. Das bedeutet, dass mit diesem Stamm theoretisch auch ähnliche Produktausbeuten für die Biosynthese von 3,4-CHA erreichbar sein sollten, vorausgesetzt die enzymatische Umwandlung von Chorisminsäure zu 3,4-CHA läuft mit vergleichbarer Effizienz ab wie die zu 2,3-CHD und 3,4-CHD. Aus diesem Grund wurde zunächst versucht, den Stamm F82 so zu modifizieren, dass er eine effiziente Umwandlung von Chorisminsäure zu ADC katalysieren kann.

4.1 Die ADC-Synthase PabA/PabB aus *Escherichia coli*

Die Umsetzung von Chorisminsäure zu ADC wird in *E. coli* von dem Enzym ADC-Synthase PabB katalysiert. Als Hilfsenzym dient hierbei die Glutamin-Amidotransferase PabA (Parsons *et al.*, 2002, Viswanathan *et al.*, 1995). Zunächst wurden daher die beiden Gene *pabA* und *pabB* in den Expressionsvektor pJF119EH kloniert (Plasmid pC42), um durch eine Proteinüberexpression von PabA und PabB die Umsetzung von Chorisminsäure zu ADC zu verstärken. Trotz sichtbarer Überexpression beider Proteine auf einem SDS-Gel konnte bei einem Experiment im Schüttelkolben mit dem Stamm F82/pC42 jedoch kein ADC im Überstand nachgewiesen werden. Parallel zu diesen Versuchen mit PabA und PabB wurden von Dr. Melanie Schürmann Versuche zur *in vitro*-Aktivität von PabA- und PabB-Fusionsproteinen

durchgeführt, die jeweils mit einem aminoterminalen 10-fachen Histidinschwanz versehen waren (Schürmann, 2003, unveröffentlichte Daten). Doch auch bei diesen Versuchen konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden.

Eine mögliche Ursache für die beobachtete Inaktivität von PabA und PabB könnte darin liegen, dass die beiden Enzyme PabA und PabB für eine effiziente Katalyse der Aminierung von Chorisminsäure zu ADC miteinander wechselwirken müssen. Diese Wechselwirkungen waren zuvor als relativ schwach beschrieben worden (Roux et al., 1992; Rayl et al., 1996). Es wäre denkbar, dass beide Enzyme nur miteinander interagieren können und somit auch aktiv sind, wenn sie im richtigen stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 zueinander vorliegen, das bei den in dieser Arbeit durchgeführten Aktivitätstests eventuell nicht der Fall war. In Abwesenheit von Chorisminsäure und PabA ist für PabB bei Inkubation bei 37 °C eine reversible Inaktivierung beschrieben worden. Diese lässt sich durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) wieder aufheben (Viswanathan *et al.*, 1995). Für die glutaminabhängige Aminierung von Chorisminsäure durch PabA/PabB ist für Chorisminsäure ein K_M -Wert von 4,2 μM und für Glutamin ein K_M -Wert von 1,6 μM bestimmt worden; bei der ammoniumabhängigen Aminierung nur durch PabB wurde für Chorisminsäure ein K_M -Wert von 83,8 μM und für Ammonium ein K_M -Wert von 138 mM ermittelt (Viswanathan *et al.*, 1995). Bei den von Dr. Schürmann durchgeführten Untersuchungen zur *in vitro*-Aktivität der PabA- und PabB-Fusionsproteine ist eine Proteininaktivierung durch den verwendeten Histidinschwanz denkbar, wie sie für einige andere Proteine beschrieben worden war (z.B. für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase Ppm (Johnen, 2005)). Der Histidinschwanz könnte auch eine Wechselwirkung zwischen PabA und PabB verhindern und so zu der beschriebenen Inaktivierung von PabB führen.

4.2 Die ADC-Synthase PabAB_{C.gl.} aus *Corynebacterium glutamicum*

Da mit den beiden Enzymen PabA und PabB keine effiziente Umwandlung von Chorisminsäure zu ADC gelang, sollte das Problem, beide Proteine im richtigen stöchiometrischen Verhältnis zueinander zu exprimieren, umgangen werden. Dies wäre möglich, indem statt mit den beiden Enzymen PabA und PabB mit nur einem Enzym PabAB gearbeitet wird. Für Streptomyceten war berichtet worden, dass dort die Umwandlung von Chorisminsäure zu ADC nicht wie bei *E. coli* durch PabA und PabB katalysiert wird, sondern durch ein einzelnes Enzym PabAB (Brown *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2001), dessen Aminosäuresequenz Homologie sowohl zu PabA als auch PabB aufweist.

Die genomische DNA von Streptomyceten weist jedoch einen durchschnittlichen GC-Gehalt von etwa 70% auf und ist damit deutlich GC-reicher als *E. coli*-DNA. Aus diesem Grund besitzen Streptomyceten eine andere Codon-Nutzung als *E. coli*; bestimmte Codons, die in *E. coli* nur sehr selten auftreten (Kane, 1995; Kurland und Gallant, 1996), werden von Streptomyceten sehr häufig genutzt. Daher kann es bei der Expression solcher heterologer Gene durch *E. coli* zu Limitierungen bei der Proteinexpression kommen, wenn das zu exprimierende Gen viele für *E. coli* seltene Codons besitzt und *E. coli* nur sehr wenige für die Translation dieser Codons nötigen tRNA-Moleküle besitzt. Eine solche reduzierte Proteinexpression von Genen mit vielen seltenen Codons war schon mehrfach berichtet worden (Brinkmann *et al.*, 1989; Del Tito *et al.*, 1995). Beispiele für von *E. coli* selten genutzte Aminosäurecodons sind die Arginin-kodierenden Codons AGA, AGG, CGA und CGG, das Glycin-kodierende Codon GGA, das Isoleucin-kodierende Codon AUA sowie das Prolin-kodierende Codon CCC.

Im *pabAB*-Gen von Streptomyceten (73% GC-Gehalt) kommen insgesamt über 100 der oben erwähnten seltenen Aminosäurecodons vor. Aus diesem Grund war mit erheblichen Problemen bei der Proteinexpression von PabAB aus Streptomyceten zu rechnen. Die Proteinexpression von PabAB ließe sich z.B. durch Nutzung eines *E. coli* Rosetta-Expressionsstammes (Novagen) wahrscheinlich verbessern, da dieser Stamm zusätzliche tRNA-Moleküle für die Aminosäurecodons AGA, AGG, AUA, CCC, GGA und CUA (Leucin-kodierendes Codon) besitzt. Ein solcher Stamm wäre jedoch nicht gut für die mikrobielle Synthese des Aminocyclitols 3,4-CHA, dem Hauptziel dieser Arbeit, geeignet, da dieser Stamm keinen erhöhten Stofffluss zu Chorisminsäure aufweist. Aus diesem Grund wurde von Dr. Bongaerts (DSM Biotech, Jülich) nach Alternativen aus anderen Organismen gesucht, die eine zu *E. coli* ähnliche Codon-Nutzung aufweisen als Streptomyceten. Eine vergleichende Datenbanksuche ergab, dass es in *Corynebacterium glutamicum* ein vermutetes *pabAB*_{C.gl.}-Gen gibt (Kalinowski *et al.*, 2003) und dessen DNA-Sequenz (GenBank Accession: NC_006958, Nukleotidbereich 1053491 – 1055353) mit insgesamt 24 seltenen Codons (2x AGA, 2x AGG, 2x CGA, 5x CGG, 5x GGA, 2x AUA und 6x CCC) weit besser für eine Expression in *E. coli* geeignet schien als das *pabAB*-Gen aus Streptomyceten. Daher wurde das vermutete *pabAB*_{C.gl.}-Gen in dieser Arbeit benutzt und in *E. coli* exprimiert (pC53). Auf einem SDS-Gel konnte eine sichtbare Proteinüberexpression von PabAB_{C.gl.} nachgewiesen werden (Abbildungen 21 und 26), jedoch ist diese mit einem Anteil von etwa 5% an der Gesamtproteinkonzentration nicht so hoch wie z.B. bei der Proteinexpression von His-PhzD (etwa 20% der Gesamtproteinkonzentration) und das, obwohl *phzD* in dem Plasmid pC78 hinter *pabAB*_{C.gl.} kloniert vorliegt. Dies spricht dafür, dass die im Vergleich zu His-PhzD schwächere Proteinüberexpression von

PabAB_{C.gl.} auf Probleme bei der Translation zurückzuführen ist. Eine mögliche Ursache hierfür könnten die 24 seltenen Codons im *pabAB*_{C.gl.}-Gen sein (Frequenz von 3,8%). Demgegenüber gibt es nur 6 seltene Codons (3x CGG und 3x CCC) im *His-phzD*-Gen (Frequenz von 2,9%). Durch einen Test der Proteinexpression im *E. coli*-Stamm Rosetta™ 2 (von BL21 abgeleitet) könnte diese Hypothese getestet werden. Der Stamm Rosetta™ 2 besitzt zusätzliche tRNAs für die seltenen *E. coli*-Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA und CGG und somit zusätzliche tRNAs für alle seltenen im *pabAB*_{C.gl.}-Gen vorhandenen Codons. Sollte sich die PabAB_{C.gl.}-Expression mit diesem Stamm verbessern lassen, wäre die beobachtete geringe PabAB-Überexpression auf die 24 seltenen Codons im *pabAB*_{C.gl.}-Gen zurückzuführen.

4.3 Mikrobielle Synthese von ADC und 3,4-CHA

Alle Produkte des CHORUS-Projektes inklusive ADC und 3,4-CHA, die mikrobiell synthetisiert wurden, waren vom jeweiligen Produzentenstamm ausgeschieden worden und ließen sich jeweils im Kulturüberstand nachweisen. Dies erleichterte die Produktaufreinigung und ermöglichte z.B. bei den Cyclohexadiendiolen 2,3-CHD und 3,4-CHD eine Produktabtrennung und -aufreinigung bereits während der Fermentation durch Reaktiv-Extraktion (Maass *et al.*, 1999). Auf welchem Weg die mikrobiell synthetisierten Produkte des CHORUS-Projektes ausgeschieden werden, ist jedoch nicht bekannt. Zwar sind die Exkretion von Shikimisäure (Draths *et al.*, 1999), Chorisminsäure (Grisostomi *et al.*, 1997) und Dehydroshikimisäure (Li *et al.*, 1999) bereits beschrieben worden, aber die einzelnen Komponenten dieses Exkretionssystems sind bisher nicht aufgeklärt worden. *E. coli* besitzt Transporter für Metabolite des Aromatenbiosyntheseweges; so ist z.B. für Shikimisäure ein Transportprotein (ShiA) für deren Aufnahme beschrieben worden (Whipp *et al.*, 1998). Transporter für die Exkretion von Metaboliten des Aromatenbiosyntheseweges sind jedoch bisher noch nicht beschrieben worden.

4.3.1 Mikrobielle Synthese von ADC

Um ADC mikrobiell synthetisieren zu können, ist die Aminierung von Chorisminsäure zu ADC nötig. Diese Reaktion ist physiologisch für *E. coli* und wird von dem Enzym PabB sowie dem Hilfsenzym PabA katalysiert. Da mit diesen beiden Enzymen jedoch *in vitro* keine Umsetzung von Chorisminsäure zu ADC erreicht werden konnte, sollte zur Katalyse dieser Reaktion stattdessen das Enzym PabAB_{C.gl.} benutzt werden. PabAB_{C.gl.} katalysiert diese

Reaktion in *Corynebacterium glutamicum*. Hierzu wurde das *pabAB_{C.gl.}*-Gen mittels PCR-Reaktion aus genomischer *Corynebacterium glutamicum*-DNA amplifiziert und in den Expressionsvektor pJF119EH kloniert (Plasmid pC53). pC53 wurde dann in den Stamm LJ110 transformiert, mit dem innerhalb des CHORUS-Projektes nach Einbringen der Plasmide pC20 bzw. pC22 bereits Produktausbeuten im g/l-Maßstab bei der mikrobiellen Synthese der beiden Cyclohexadiendiole 2,3-CHD und 3,4-CHD erreicht worden waren. Bei einer Kultivierung des Stammes LJ110/pC53 konnte jedoch mittels RP-HPLC kein ADC im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Eine Untersuchung des Kulturüberstandes durch ¹H-NMR (DSM, Delft) zeigte jedoch, dass ADC in Spuren (< 20 mg) im Kulturüberstand vorhanden war. Parallel zu diesen Schüttelkolbenversuchen mit dem Stamm LJ110/pC53 wurden bei DSM Biotech (Jülich) Schüttelkolbenversuche mit dem Stamm KB532/pC53 durchgeführt. Der Stamm KB532 war innerhalb des CHORUS-Projektes bereits erfolgreich zur mikrobiellen Synthese von Chorisminsäure eingesetzt worden (siehe 1.2), und besitzt offensichtlich einen erhöhten Stofffluss zu Chorisminsäure. Zur Erhöhung des Stoffflusses zu Chorisminsäure trägt in diesem Stamm die Expression der feedbackinhibitionsresistenten DAHP-Synthase AroF* bei. Im Kulturüberstand wurden mittels ¹H-NMR (DSM, Delft) ADC und Chorisminsäure nachgewiesen.

Der Stamm KB532/pC53 eignet sich also als Produzentenstamm zur mikrobiellen Synthese von ADC, während mit dem Stamm LJ110/pC53 keine effektive mikrobielle Synthese von ADC erreicht werden konnte. Eine mögliche Erklärung, warum eine effektive mikrobielle Synthese von ADC mit dem Stamm LJ110/pC53 nicht möglich ist, könnte sein, dass der Stofffluss zu Chorisminsäure in diesem Stamm geringer ist als im Stamm KB532/pC53. Die intrazelluläre Chorisminsäurekonzentration könnte als Folge dessen im Stamm LJ110/pC53 geringer sein als im Stamm KB532/pC53. Dieser Konzentrationsunterschied könnte der Grund für eine höhere Aktivität des überexprimierten Enzyms PabAB_{C.gl.} im Stamm KB532/pC53 sein, die zu einer verstärkten Umwandlung von Chorisminsäure zu ADC führt.

Bei einer 2l-Labfors-Fermentation des Stammes KB532/pC53 am IBT-2 im Forschungszentrum Jülich konnten im Kulturüberstand Produktkonzentrationen von 7 g/l ADC und 15,4 g/l Chorisminsäure erreicht werden. Die Tatsache, dass also mehr als doppelt soviel Chorisminsäure wie ADC vom Stamm KB532/pC53 ausgeschieden wird, spricht dafür, dass die von PabAB_{C.gl.} katalysierte Umwandlung von Chorisminsäure zu ADC der limitierende Schritt bei der Biosynthese von ADC ist und nicht etwa der Stofffluss durch den Shikimisäureweg bis hin zu Chorisminsäure. Als Grund für die beobachtete Limitierung bei der Umsetzung von

Chorisminsäure zu ADC wäre eine Limitierung durch die intrazelluläre Glutaminkonzentration denkbar. Bei der Aminierung von Chorisminsäure zu ADC wird von PabAB_{C.gl.} die hierfür benötigte Aminogruppe von Glutamin auf Chorisminsäure übertragen, und dabei wird Glutaminsäure freigesetzt. Bei einem starken Absinken der intrazellulären Glutaminkonzentration bzw. zu schwacher Glutaminnachlieferung wäre es möglich, dass PabAB_{C.gl.} die Umsetzung von Chorisminsäure zu ADC dann nicht mehr katalysieren könnte. Dies würde zu der beobachteten starken Ausscheidung von Chorisminsäure führen. Durch zusätzliche Zugabe von Glutamin während der Fermentation sollte sich die Ausbeute an ausgeschiedenem ADC erhöhen und die an ausgeschiedener Chorisminsäure senken lassen, falls der Grund für die starke Ausscheidung von Chorisminsäure in einer zu niedrigen intrazellulären Glutaminbereitstellung läge.

4.3.2 Mikrobielle Synthese von 3,4-CHA im Fermenter

Im Laufe dieser Arbeit wurden zwei Labfors-Fermentationen mit dem Stamm KB532/pC78 zur mikrobiellen Synthese von 3,4-CHA durchgeführt (Abbildungen 27 und 28). Die erste Fermentation war eine 5l-Labfors-Fermentation und wurde bei 33 °C bei DSM Biotech (Jülich) durchgeführt. Es wurden Produktausbeuten von 1,8 g/l 3,4-CHA und 5,9 g/l 3,4-CHD nach 32 Stunden erreicht; *p*ABA und ADC wurden mit Konzentrationen von < 27 mg/l bzw. < 37 mg/l kaum in den Kulturüberstand ausgeschieden. Am Institut für Mikrobiologie (Universität Stuttgart) wurde von Shashank Ghanegaonkar eine zweite Fermentation durchgeführt, diese jedoch als 2l-Labfors Fermentation und bei einer Temperatur von 30 °C. Die Temperatur wurde bei dieser Fermentation niedriger gewählt, weil bei niedrigeren Temperaturen bei Experimenten im Schüttelkolben und in Deepwell-Platten die Produktausbeuten am größten waren (Vollebregt, 2004, persönliche Mitteilung). Am Ende der Fermentation nach 32 Stunden konnten Produktkonzentrationen von 1,2 g/l 3,4-CHA und 4,4 g/l 3,4-CHD nachgewiesen werden.

Die beiden Fermentationen unterscheiden sich deutlich in der jeweils erreichten maximalen Biomasse; bei der Fermentation am IBT-2 wurde eine maximale Biomasse von 21 g/l erreicht, während die bei der zweiten Fermentation am Institut für Mikrobiologie erreichte maximale Biomasse mit 7,95 g/l deutlich geringer ist. Bei der ersten Fermentation war bis zum Ende der Fermentation eine ständige Zunahme an Biomasse zu beobachten, während bei der zweiten Fermentation nach etwa 20 Stunden keine weitere Zunahme der Biomasse mehr erfolgte und diese weitgehend konstant blieb. Mögliche Gründe für diese Unterschiede in der erreichten

Biomasse sind wahrscheinlich vor allem die unterschiedlichen Temperaturen bei den beiden Fermentationen (33 °C gegenüber 30 °C), aber auch die etwas unterschiedliche Zusammensetzung der benutzten Medien sowie die unterschiedliche Größe der Fermentationsansätze könnte eine Rolle spielen.

Bei der ersten Fermentation wurde mit 1,8 g/l 3,4-CHA zwar eine höhere Produktkonzentration erreicht als bei der zweiten Fermentation (1,2 g/l), bezogen auf die jeweilig vorhandene Biomasse war die zweite Fermentation jedoch nach 32 stündiger Fermentation deutlich effektiver (0,15 g 3,4-CHA/g Biomasse gegenüber 0,09 g 3,4-CHA/g Biomasse). Auch nach etwa 18 Stunden, nach einer Fermentationsdauer, bei der das Verhältnis aus gebildetem 3,4-CHA zu 3,4-CHD ungefähr 1:1 beträgt, ist die zweite Fermentation bei einer geringeren Temperatur effektiver mit einer erreichten Produktkonzentration von 0,125 g 3,4-CHA/g Biomasse gegenüber 0,08 g 3,4-CHA/g Biomasse bei der ersten Fermentation.

Das Verhältnis von gebildetem 3,4-CHA zu 3,4-CHD ist am Ende der Fermentation nach 32 Stunden mit 1:3,3 bzw. 1:3,6 bei beiden Fermentationen ungefähr gleich. Die Produktbildung beginnt bei der zweiten Fermentation nach ungefähr 10 Stunden; eine verlässliche Aussage zum Beginn der Produktbildung sowie zur anfänglichen Entwicklung der Produktkonzentrationen ist bei der ersten Fermentation aufgrund fehlender Meßdaten im Zeitraum von 12,5 bis 23 Stunden leider nicht möglich. Auffällig beim Verlauf der zweiten Fermentation ist jedoch, dass 3,4-CHA und 3,4-CHD von Beginn der Produktbildung nach etwa 10 Stunden bis zu einem Zeitpunkt nach etwa 18 Stunden nahezu in einem Verhältnis von 1:1 gebildet werden. Nach 20 Stunden steigt die Produktkonzentration von 3,4-CHA kaum noch weiter an, während sich die von gebildetem 3,4-CHD ständig weiter erhöht; d.h., nach 20 Stunden wird fast kein 3,4-CHA mehr sondern nur noch 3,4-CHD gebildet, bis am Ende der Fermentation das Verhältnis von gebildetem 3,4-CHA zu 3,4-CHD etwa 1:3 beträgt. Auch bei der ersten Fermentation bei 33 °C ist beobachtbar, dass die Produktkonzentration an gebildetem 3,4-CHD nach 23 Stunden weiter ansteigt, während die von 3,4-CHA kaum noch weiter steigt.

Der Grund für die beobachtete Zunahme der 3,4-CHD-Konzentration bei gleichzeitiger Stagnation der 3,4-CHA-Konzentration bei einem längeren Fermentationsverlauf als 20 Stunden ist wahrscheinlich, dass ab diesem Zeitpunkt die Umsetzung von Chorisminsäure zu ADC durch das Enzym PabAB_{C.gl.} nicht mehr so effektiv wie zu Beginn der Fermentation stattfindet. Ein Grund hierfür könnte ein Absinken der intrazellulären Chorisminsäurekonzentration sein. Wenn der K_M -Wert von PabAB_{C.gl.} für das Substrat Chorisminsäure deutlich größer wäre als der für PhzD ermittelte K_M -Wert für Chorisminsäure von 1,2 mM (siehe 3.3.3),

könnte ein Absinken der intrazellulären Chorisminsäurekonzentration die beobachtete Stagnation der 3,4-CHA-Konzentration bei gleichzeitigem Anstieg der 3,4-CHD-Konzentration erklären, weil dann die Umsetzung von Chorisminsäure zu 3,4-CHD durch PhzD gegenüber der Umsetzung von Chorisminsäure zu ADC durch PabAB_{C.gl.} bevorzugt ablaufen würde. Zwar ist der K_M-Wert von PabAB_{C.gl.} für das Substrat Chorisminsäure bisher nicht bestimmt worden, für PabB von *E. coli* wurde jedoch ein K_M-Wert von 4,2 µM für das Substrat Chorisminsäure bestimmt (Viswanathan *et al.*, 1995). Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass der K_M-Wert von PabAB_{C.gl.} deutlich größer als 1,2 mM ist und so stark von dem K_M-Wert des *E. coli*-Enzyms PabB abweicht.

Eine Inaktivität des Enzyms PhzD oder ein Rückgang in dessen Expression als Grund für die Stagnation der 3,4-CHA-Konzentration bei längerem Fermentationsverlauf kann ausgeschlossen werden, weil dann auch kein 3,4-CHD mehr gebildet werden könnte und ADC ausgeschieden werden müsste. Eine solche Ausscheidung wurde jedoch nicht beobachtet.

Ein weiterer Grund für die Stagnation der 3,4-CHA-Konzentration bei längerem Fermentationsverlauf könnte wie in 4.3.2 beschrieben eine zu niedrige intrazelluläre Glutaminkonzentration sein, die die Umsetzung von Chorisminsäure zu ADC durch das Enzym PabAB_{C.gl.} verhindern würde. Dann könnte kein 3,4-CHA mehr durch Umwandlung von ADC in 3,4-CHA (katalysiert durch PhzD) gebildet werden; die Umsetzung von Chorisminsäure zu 3,4-CHD durch das Enzym PhzD würde dadurch jedoch wahrscheinlich noch verstärkt werden, weil die intrazelluläre Chorisminsäurekonzentration als Folge der ausbleibenden Umsetzung zu ADC steigen sollte. Durch Zugabe von Glutamin bzw. Ammoniumionen während der Fermentation sollte die Bildung von 3,4-CHA auch bei einer längeren Fermentation aufrecht erhalten werden können, falls die obige Hypothese zutreffen sollte. Diese Hypothese wurde von Shashank Ghanegaonkar kürzlich durch eine erneute 2l-Labfors Fermentation des Stammes KB532/pC78 bei 30 °C getestet (Abbildung 41).

Insgesamt wurden zu vier Zeitpunkten während der Fermentation nach 26,4, 29, 32 und 47 Stunden Ammoniumionen zu der Fermentation zugegeben, und zwar jeweils 0,8 mM (1% der ursprünglich vorhandenen Menge an Ammoniumionen). In der Tat konnte auf diese Weise eine kontinuierliche 3,4-CHA-Bildung bis zu einem Zeitraum von etwa 33 Stunden aufrecht erhalten werden und die maximale Produktkonzentration auf 2,8 g/l gesteigert werden. Erst nach 33 Stunden kommt es auch bei dieser Fermentation zur Stagnation bzw. einem leichten Abfall der 3,4-CHA-Konzentration, während die 3,4-CHD-Konzentration kontinuierlich weiter steigt. Die Ergebnisse dieser Fermentation sprechen dafür, dass in der Tat eine Stickstofflimitierung des Mediums der Grund für den Rückgang der 3,4-CHA-Konzentration nach etwa

22 Stunden bei den ersten beiden Fermentationen ist. Auch die letzte Zugabe von Ammoniumionen nach 47 Stunden bewirkt kurzfristig wieder einen Anstieg der 3,4-CHA-Konzentration; dies spricht dafür, dass sowohl PabAB_{C.gl.} als auch PhzD zu diesem Zeitpunkt noch exprimiert werden und aktiv sind. Durch Zugabe von Ammoniumionen während der Fermentation lässt sich also die 3,4-CHA-Ausbeute erhöhen und der Zeitraum der effektiven 3,4-CHA-Bildung verlängern.

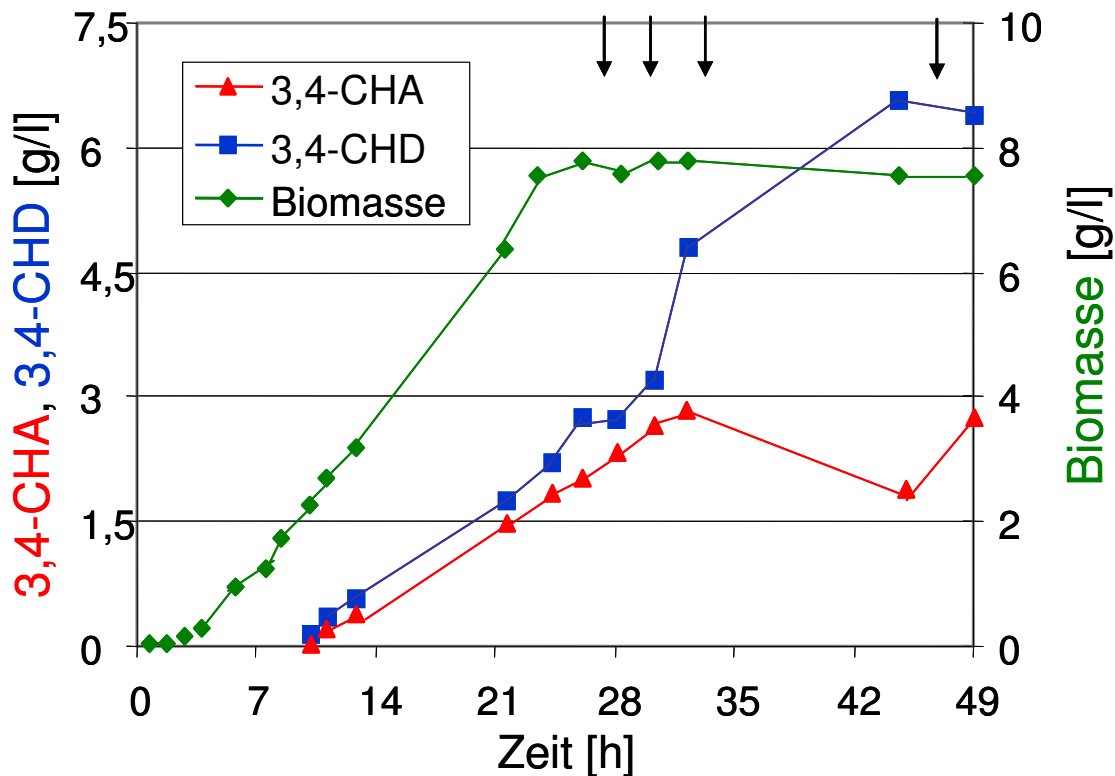


Abbildung 41: Verlauf einer 21 Labfors-Fermentation mit dem Stamm KB532/pC78 bei 30 °C mit Zugabe von Ammoniumionen während der Fermentation

Aufgetragen sind der zeitliche Verlauf der gebildeten Produktkonzentrationen von 3,4-CHA und 3,4-CHD sowie der gebildeten Biomasse (Ghanegaonkar, 2005, persönliche Mitteilung). Bei der Fermentation handelt es sich um eine Batch/Fed-Batch Kultivierung; als Stickstoffquelle wurden Ammoniumionen eingesetzt. Zu den mit einem schwarzen Pfeil markierten Zeitpunkten wurden jeweils 0,08 mM Ammoniumionen zu der Fermentation zugegeben.

Bei der Fermentation des Stammes KB532/ pC27 zur mikrobiellen Synthese von 2,3-CHA waren Produktkonzentrationen von 15,7 g/l erreicht worden (siehe 1.6.2). Zur Bildung von 2,3-CHA ist unter anderem zunächst die Umwandlung von Chorisminsäure zu ADIC notwendig. Der hierfür benötigte Aminogruppendonor ist wie bei der Synthese von 3,4-CHA Glutamin, das hierbei zu Glutaminsäure wird. Bei dieser Fermentation wurde während der

gesamten Fermentationsdauer ein kontinuierlicher Anstieg der 2,3-CHA-Konzentration beobachtet (Daten nicht gezeigt), allerdings wurde während der Fermentation zur Regulation des pH-Werts Ammoniaklösung zugegeben. Dadurch wurde die sich insgesamt im Medium befindliche Stickstoffmenge erhöht. Aus diesem Grund lässt sich nicht sagen, ob auch bei der mikrobiellen Biosynthese von 2,3-CHA die ursprünglich im Medium vorhandene Stickstoffmenge zu einer Limitierung bei der Produktbildung führen würde, wie dies bei der mikrobiellen Biosynthese von 3,4-CHA beobachtet worden ist.

Aus der Beobachtung, dass 3,4-CHA und 3,4-CHD bei der Fermentation bei 30 °C zunächst im Verhältnis 1:1 gebildet werden, lassen sich wertvolle Rückschlüsse über die intrazellulären Konzentrationen von ADC und Chorisminsäure bei dieser Fermentation schließen. Da die K_M -Werte von PhzD für die beiden Substrate Chorisminsäure und ADC nahezu gleich sind (1,2 mM und 1,5 mM), bedeutet die beobachtete Produktbildung von 3,4-CHA und 3,4-CHD im Verhältnis 1:1, dass k_{cat} von PhzD in der Zelle für beide Reaktionen ungefähr gleich groß sein muss (Abbildung 42).

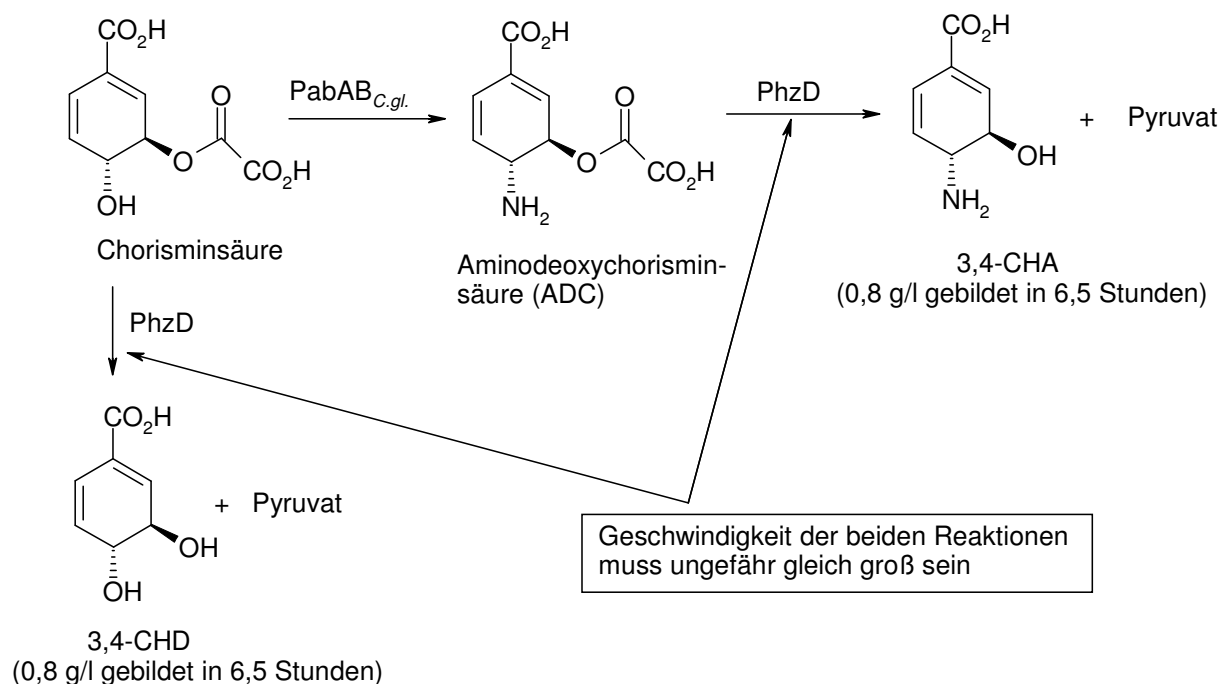


Abbildung 42: Darstellung der Reaktionswege, die zur Bildung von 3,4-CHA und 3,4-CHD aus Chorisminsäure führen

PhzD kann sowohl Chorisminsäure zu 3,4-CHD und Pyruvat als auch ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat umsetzen. Aus den beobachteten Produktbildungsraten von 3,4-CHA und 3,4-CHD lassen sich Rückschlüsse über die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten ziehen.

Bei der biochemischen Charakterisierung von PhzD wurden für k_{cat} Werte von 39 s^{-1} für das Substrat Chorisminsäure und $4,1 \text{ s}^{-1}$ für das Substrat ADC ermittelt. Wenn die Geschwindigkeit beider Reaktionen also gleich groß sein soll, kann k_{cat} für die Umsetzung von Chorisminsäure zu 3,4-CHD also maximal $4,1 \text{ s}^{-1}$ sein (unter der Voraussetzung, dass die Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA mit maximal möglicher Geschwindigkeit abläuft); d.h., k_{cat} für diese Reaktion liegt höchstens bei 10 % des maximal möglichen Wertes und die intrazellulär vorliegende Chorisminsäurekonzentration sollte somit deutlich unter dem K_M -Wert von 1,2 mM liegen. Im Substratkonzentrationsbereich, der deutlich kleiner als der K_M -Wert eines Enzyms ist, besteht eine nahezu lineare Abhängigkeit von k_{cat} von der Substratkonzentration; d.h., dass die intrazelluläre Chorisminsäurekonzentration bei der Fermentation $\leq 0,24 \text{ mM}$ sein sollte. 0,24 mM wäre die Substratkonzentration, bei der k_{cat} für Chorisminsäure $4,1 \text{ s}^{-1}$ (10 % des maximalen Werts) betragen würde, falls die lineare Abhängigkeit von k_{cat} von der Substratkonzentration bis Konzentrationen im Bereich des K_M -Werts gelten würde. Da dies annähernd der Fall ist, sollte bei einer Substratkonzentration von 0,24 mM k_{cat} für Chorisminsäure ungefähr $4,1 \text{ s}^{-1}$ sein. Die berechnete maximale Chorisminsäurekonzentration von 0,24 mM trifft nur zu, wenn die intrazelluläre ADC-Konzentration größer als 3 mM ist und PhzD ADC mit der maximal möglichen Geschwindigkeit von $4,1 \text{ s}^{-1}$ zu 3,4-CHA umsetzt. Die intrazelluläre ADC-Konzentration ist jedoch nicht bekannt, da sie nicht aus den gemessenen Produktbildungsraten ableitbar ist. Es ist auch möglich, die gemessenen Produktbildungsraten von 3,4-CHA und 3,4-CHD zu erhalten, wenn die intrazelluläre ADC-Konzentration deutlich geringer als 3 mM ist. Dann wäre k_{cat} für die beiden Umsetzungen von ADC und Chorisminsäure durch PhzD geringer als $4,1 \text{ s}^{-1}$. Aber auch in diesem Fall sollte die intrazelluläre ADC-Konzentration mindestens 10-mal so groß wie die intrazelluläre Chorisminsäurekonzentration sein.

Aus den Produktbildungsraten von 3,4-CHA und 3,4-CHD sowie der gebildeten Biomasse bei der Fermentation bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ lässt sich für den Zeitraum von 12,5 bis 18 Stunden, in dem 3,4-CHA und 3,4-CHD nahezu im Verhältnis 1:1 gebildet werden, die ungefähre *in vivo*-Aktivität von PabAB_{C.gl.} und PhzD abschätzen. In diesem Zeitraum beträgt die durchschnittlich vorhandene Biotrockenmasse 5,5 g/l, und gebildet werden in diesem Zeitraum jeweils etwa 0,8 g/l 3,4-CHA und 3,4-CHD. Etwa 54% der vorhandenen Biomasse besteht aus Protein (Robertson *et al.*, 1998; Churchward und Bremer, 1982); da etwa 20% des Gesamtproteins PhzD und etwa 5% PabAB_{C.gl.} sind (siehe 3.2.1), wurden also die beobachteten Produktkonzentrationen durch etwa 0,59 g PhzD und etwa 0,15g PabAB_{C.gl.} gebildet. Die erreichten Produktkonzentrationen von jeweils 0,8 g/l entsprechen einer Konzentration von 5,2 mmol/l.

Bezogen auf den Bildungszeitraum von 6,5 Stunden werden die beiden Produkte also mit einer Bildungsrate von $13,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{l}^{-1}$ gebildet. Das bedeutet, dass die *in vivo*-Aktivität von PabAB_{C.gl.} mindestens 13,3 U betragen muss. Die Aktivität von PhzD muss mindestens doppelt so groß sein, da PhzD sowohl ADC zu 3,4-CHA als auch Chorisminsäure zu 3,4-CHD umsetzen muss. Bezogen auf die oben berechneten Proteinmengen ergeben sich für die spezifischen *in vivo*-Aktivitäten folgende Werte: 45 mU/mg für PhzD und 89 mU/mg für PabAB_{C.gl.}. Die geschätzte *in vivo*-Aktivität von PhzD liegt damit deutlich unter der in 3.3.3 bestimmten maximal möglichen Aktivität von 9,8 U/mg für das Substrat ADC, allerdings wurde dieser Wert für eine Temperatur von 37 °C ermittelt. Für PabAB_{C.gl.} sind bisher keine kinetischen Parameter bestimmt worden, die als Vergleich dienen könnten.

4.3.3 Mikrobielle Synthese von 3,4-CHA im Schüttelkolben

Da der Stamm KB532 zu Beginn dieser Arbeit zur Nutzung weder am IBT-1 (Forschungszentrum Jülich) noch am Institut für Mikrobiologie (Universität Stuttgart) zur Verfügung stand, wurden die Schüttelkolbenexperimente zur mikrobiellen Synthese von 3,4-CHA zunächst bei DSM Biotech (Jülich) durchgeführt.

Nachdem bei DSM in Delft jedoch das Screening auf Klone mit veränderter PhzD-Aktivität durchgeführt worden war, wurden diese Klone zur Verfügung gestellt und konnten in dieser Arbeit auf ihre Produktbildungsrate von 3,4-CHA und 3,4-CHD getestet werden.

Aus Tabelle 18 ist ersichtlich, dass ohne Induktion mit IPTG auch kein 3,4-CHD und 3,4-CHA gebildet werden, d.h., dass die beiden Enzyme PhzD und PabAB_{C.gl.} nur nach Induktion durch IPTG exprimiert werden und der *tac*-Promotor in Abwesenheit von IPTG keine Genexpression der klonierten Gene zulässt. Die erreichten maximalen Produktkonzentrationen nach 48 Stunden von 3,4-CHA und 3,4-CHA sind bei den Klonen KB532/pC78, KB532/A9 (R138K), KB532/D7 und KB532/D11 nahezu gleich. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da eine Sequenzierung ergeben hatte, dass die Klone D7 und D11 im Plasmid pC78* keine Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch im PhzD-Fusionsprotein führen, besitzen. Für die Enzymaktivität des PhzD-Fusionsprotein R138K aus dem Stamm KB532/A9 war in 3.4.3 eine Enzymaktivität bestimmt worden, die annähernd gleich der des Wildtyp-PhzD-Fusionsproteins war, so dass auch eine zum Stamm KB532/pC78 vergleichbare Produktbildungsrate erwartet werden konnte.

Die gemessenen Produktkonzentrationen nach 24 Stunden lagen bei etwa 30% der nach 48 Stunden erreichten Maximalwerte; bei längerer Kultivierung als 48 Stunden sank die Produktkonzentration wieder ab. Mögliche Ursachen für das beobachtete Absinken der Produktkonzentration bei längerer Kultivierung als 48 Stunden könnte die Instabilität von 3,4-CHA sein oder eine Stickstofflimitierung des Mediums, die zu einem Absinken der Glutaminkonzentration in der Zelle führen könnte. Dann wäre die glutaminabhängige Umwandlung von Chorisminsäure zu ADC durch PabAB_{C.gl.} nicht mehr möglich, und es würde kein 3,4-CHA mehr gebildet werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint eine 48 stündige Kultivierung im Schüttelkolben unter den gewählten Bedingungen für die mikrobielle Synthese von 3,4-CHA am besten geeignet zu sein. Es lässt sich eine Produktkonzentration von etwa 0,7 g/l 3,4-CHA erreichen, bei einem Verhältnis von 3,4-CHA zu 3,4-CHD von etwa 1:1,5. Dies entspricht in etwa dem bei der Fermentation bei 30 °C nach 22 Stunden erreichten Verhältnis von 1:1,46.

4.4 Biochemische Charakterisierung der beiden Enzyme PhzD und EntB

Die *Escherichia coli*-Isochorismatase EntB war bereits 1990 von Rusnak *et al.* charakterisiert worden. Für das physiologische Substrat von EntB, Isochorisminsäure, war ein K_M -Wert von 15 μM und für k_{cat} ein Wert von 10 s^{-1} bestimmt worden. Neben Isochorisminsäure wurden insgesamt 12 weitere, Isochorisminsäure-ähnliche Substanzen auf eine mögliche Umsetzung durch EntB getestet, unter anderem auch Chorisminsäure. Für Chorisminsäure wurde ein K_M -Wert von $\geq 37 \text{ mM}$ und für k_{cat} ein Wert von $\geq 21 \text{ s}^{-1}$ bestimmt, allerdings konnten die kinetischen Parameter für das Substrat Chorisminsäure nur sehr ungenau bestimmt werden und sind mit einem großen Fehler behaftet (Rusnak *et al.*, 1990). Neben Chorisminsäure waren auch drei andere Substanzen, die wie Chorisminsäure am C₄-Atom eine Hydroxygruppe als Substituenten aufwiesen, auf ihre Umsetzbarkeit durch EntB getestet worden. Für alle drei Verbindungen waren ähnlich hohe K_M -Werte im millimolaren Bereich ermittelt worden. Daher wurde postuliert, dass eine Hydroxygruppe am C₄-Atom nicht die Umsetzung durch EntB behindert (k_{cat} für Chorisminsäure ist größer als k_{cat} für Isochorisminsäure), sondern vielmehr die Substratbindung an EntB verschlechtert.

Zu Beginn dieser Arbeit war die Isochorismatase PhzD aus *Pseudomonas aeruginosa* noch nicht biochemisch charakterisiert worden. Es war nur bekannt, dass das physiologische Substrat von PhzD 2-Aminodeoxyisochorisminsäure (ADIC) ist und dieses von PhzD zu 2,3-

CHA und Pyruvat gespalten wird. Andere Substrate waren noch nicht auf eine mögliche Umsetzung durch PhzD getestet worden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde PhzD von Parsons *et al.* biochemisch charakterisiert (Parsons *et al.*, 2003). PhzD gehört demnach zur Familie der α/β -Hydrolasen und besitzt strukturelle Ähnlichkeit zu anderen Vertretern der α/β -Hydrolasen, wie z. B. Pyrazinamidase und N-Carbamoylsarcosin-Amidohydrolase (Du *et al.*, 2001; Zajc *et al.*, 1996). Die Kristallstruktur von PhzD wurde mit einer Auflösung von 1,5 Å aufgeklärt (Parsons *et al.*, 2003). PhzD besteht aus einer einzelnen α/β -Domäne: drei Helices sind an eine Seite eines parallelen 6 gliedrigen β -Faltblatts gepackt, und eine lange Helix befindet sich auf der anderen Seite des β -Faltblatts. Das aktive Zentrum befindet sich am carboxyterminalen Ende des β -Faltblatts; für die katalytische Aktivität des Enzyms wichtige Aminosäuren befinden sich in Loops (Abbildung 43).

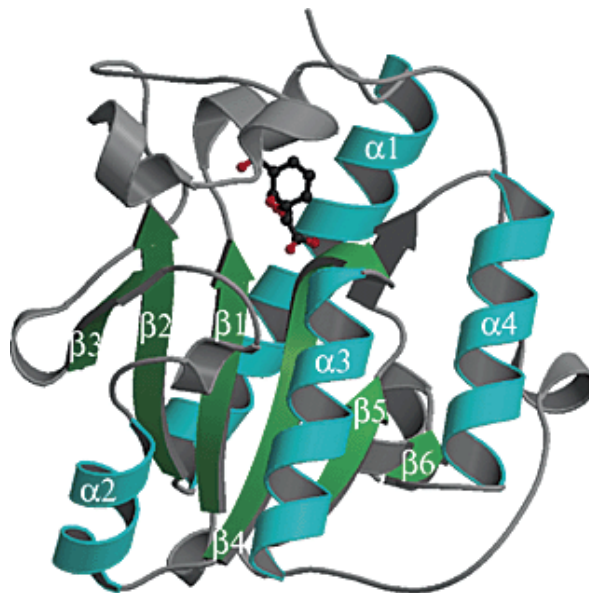


Abbildung 43: Modell der Struktur der Isochorismatase PhzD aus *Pseudomonas aeruginosa* (nach Parsons *et al.*, 2003)

Das Modell zeigt einen Komplex der PhzD-Mutante D38A mit Isochorisminsäure. PhzD besteht aus einer einzelnen α/β -Domäne: die drei Helices $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$ sind an einer Seite des parallelen 6 gliedrigen β -Faltblatts gepackt ($\beta 1$ -6), und eine lange Helix $\alpha 1$ befindet sich auf der anderen Seite des β -Faltblatts.

Die Autoren schlagen einen Reaktionsmechanismus vor, indem zunächst Asparaginsäure 38 als Säure fungiert und das Substrat protoniert. Anschließend wird wahrscheinlich ein Wassermolekül addiert, und es bildet sich ein instabiles Hemiketal-Intermediat, das spontan in die jeweiligen Produkte zerfällt (Abbildung 44).

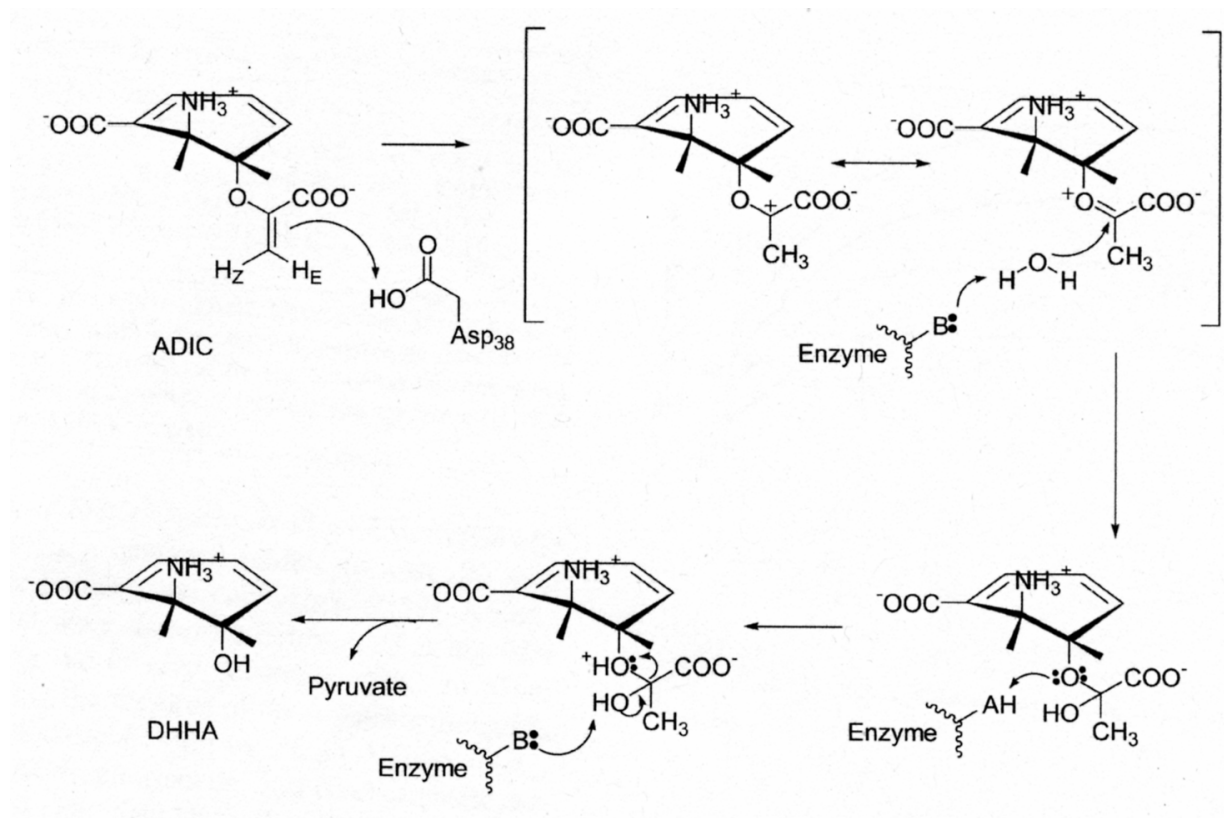


Abbildung 44: Postulierter Reaktionsmechanismus der Isochorismatase PhzD (nach Parsons *et al.*, 2003)

In der Abbildung ist die Spaltung des Vinyloxyethers von ADIC, dem physiologischen Substrat von PhzD, gezeigt. Im ersten Reaktionsschritt wird ADIC durch Asparaginsäure 38 (Asp₃₈) protoniert, und es bildet sich ein Carbokation. Nun wird ein Wassermolekül addiert, und es bildet sich ein Hemiketal-Intermediat, das in die Endprodukte Pyruvat und DHHA (*trans*-2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilsäure) zerfällt.

Jedoch wurde kürzlich für das Enzym Isochorisminsäure-Pyruvat-Lyase aus *Pseudomonas aeruginosa*, das die Spaltung von Isochorisminsäure zu Salicylsäure und Pyruvat katalysiert und somit eine formal sehr ähnliche Reaktion, beschrieben, dass der Reaktionsmechanismus hier wahrscheinlich über eine perizyklische Reaktion abläuft und nicht wie in Abbildung 43 beschrieben (DeClue *et al.*, 2005). Da die beiden von PhzD und der Isochorisminsäure-Pyruvat-Lyase katalysierten Reaktionen formal sehr ähnlich sind, ist ein perizyklischer Reaktionstyp auch für den Reaktionsmechanismus von PhzD vorstellbar. Der in Abbildung 43 postulierte Reaktionsmechanismus für PhzD sollte daher durch zusätzliche Experimente erneut untersucht werden.

PhzD besteht aus 207 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 23,5 kDa (Mavrodi *et al.*, 1998). In Lösung liegt PhzD jedoch als Dimer vor; mittels der Methode der „Dynamischen Lichtstreuung“ wurde die molekulare Masse von PhzD in Lösung auf 49,5 kDa be-

stimmt (Parsons et al., 2003). PhzD katalysiert in *Pseudomonas aeruginosa* die Spaltung von ADIC zu 2,3-CHA und Pyruvat. Bei dieser Reaktion handelt es sich um die Hydrolyse eines Vinylethers. Über mögliche andere Substrate von PhzD außer ADIC war zu Beginn dieser Arbeit noch nichts bekannt, jedoch wurden von Parsons *et al.* neben dem physiologischen Substrat ADIC unter anderem auch die Substrate ADC und Chorisminsäure als mögliche Substrate getestet und die kinetischen Parameter für diese Umsetzungen ermittelt (Tabelle 20).

Kinetische Konstanten von PhzD gegenüber unterschiedlichen Substraten				
	k_{cat}^a (s ⁻¹)	K_M (µM)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_d^b (µM)
ADIC	7.3 ± 0.2	68 ± 5	(1.1 ± 0.1) × 10 ⁵	0.021 ± 0.001
Isochorisminsäure	0.2 ± 0.03	4 ± 2	(5.0 ± 4) × 10 ⁴	0.015 ± 0.01
ADC	0.02 ± 0.002	590 ± 140	(3.4 ± 2.4) × 10 ¹	nd ^c
Chorisminsäure	1.2 ± 0.06	983 ± 77	(1.2 ± 0.2) × 10 ³	19 ± 2

Tabelle 20: Kinetische Konstanten der Isochorismatase PhzD (Parsons et al., 2003)

^aDie kinetischen Daten wurden in einem gekoppelten enzymatischen Test mit dem Hilfsenzym L-Lactat-Dehydrogenase bei einem pH-Wert von 6,5 (0,1 M Bis-Tris-Puffer) bestimmt.

^bWerte wurden mittels Fluoreszenz-Titration mit der inaktiven Mutante D38A ermittelt.

^cWert wurde nicht bestimmt.

ADC ist demnach kein gutes Substrat für PhzD (das schlechteste der getesteten vier Substrate) und wird viel langsamer umgesetzt als Chorisminsäure, welche wiederum langsamer umgesetzt wird als ADIC.

Die Autoren begründen dies anhand der Kristallstruktur von PhzD. Demnach wird die Substratbindungstasche des Enzyms unter anderem von der Aminosäure Tryptophan 94 gebildet, deren hydrophobe Seitenkette in unmittelbarem Kontakt zum hydrophilen Substituenten an der 4-Position tritt (NH₂ bei ADC und OH bei Chorisminsäure gegenüber H bei ADIC). Die Autoren schlagen daher vor, Tryptophan 94 durch eine negativ geladene Aminosäure (Asparaginsäure oder Glutaminsäure) zu ersetzen, um die Bindung von ADC in die Substratbindungstasche von PhzD zu verbessern und somit auch eine verbesserte Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA zu erreichen.

Die beiden Enzyme PhzD aus *Pseudomonas aeruginosa* und EntB aus *E. coli* besitzen eine Sequenzidentität von 45,5% und eine Sequenzähnlichkeit von 63,8% (bezogen auf den N-terminalen Isochorismataseteil von EntB). In der EntB-Sequenz findet sich an der zu Tryptophan 94 aus PhzD vergleichbaren Position 95 ebenfalls ein Tryptophanrest (Abbildung 45).

PhzD	1	MSGIPEITAYPLPTAQQLPANLARWSLEPRRAVLLVHDMQRYFLR-----	45
EntB	1	MAIPKQLQAYALPESHDIPOKVDWAFEPQRAALLIHDMQDYFVSEFWGEN	49
PhzD	46	-PLPESLRAGLVANAARLRRWCVEQGMQIAYTAQPGSMTEEQRGLLKDFW	94
EntB	50	CPMMEQ---VIANIAALRDYCKQHNIPVYYTAQPKEQSDRALNDMW	95
PhzD	95	GPGMRASPADREVVEELAPGPDWLLTKWRYSAFFHSDLLQRMRAAGRDQ	144
EntB	96	GPGLTRSPEQQKVVDRLLTPDADDTVLVKWRYSAFHRSPLEQMLKESGRNQ	145
PhzD	145	LVLGCVYAHVGLISTVDAYSNDIQPFLVADAIADFSEAHHRMALEYAAS	194
EntB	146	LIITGVYAHIGCMTTATDAFMRDIKPFMVADALADF SRDEHLMSLKYVAG	195
PhzD	195	RCAMVVTTDEVLE	207
EntB	196	RSGRVVMTEELLPAPIPASKAALREVILPLLDESDEPFDDNLDYGLDS	245
PhzD	208		207
EntB	246	VRMMALAARWRKVHGDIDFVMLAKNPTIDAWKLLSREVK	285

Abbildung 45: Vergleichende Anordnung („Alignment“) der Aminosäuresequenz der Isochorismatasen EntB und PhzD

Aminosäurereste, die in beiden Proteinen identisch sind, sind durch einen Strich miteinander verbunden; Aminosäuren mit ähnlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften durch zwei Punkte und Aminosäuren mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften durch einen Punkt. Die bei PhzD für die Substratbindung wichtige Aminosäure Tryptophan 94 ist rot dargestellt. Diese Aminosäure findet sich bei EntB an Position 95 und ist dort ebenfalls in rot dargestellt. Der carboxyterminale Teil von EntB hat keine homologe Region in PhzD, da dieser Bereich des Proteins für die Membranlokalisierung von EntB wichtig ist und PhzD einen solchen Bereich nicht besitzt.

Parsons *et al.* benutzten zur Messung der PhzD-Enzymaktivität den von Rusnak *et al.* beschriebenen gekoppelten Enzymtest mit dem Hilfsenzym Lactat-Dehydrogenase. Die Messung wurde in 0,1 M Bis-Tris-Puffer bei einem pH-Wert von 6,5 durchgeführt. In dieser Arbeit wurde jedoch festgestellt, dass die Enzymaktivität von PhzD und auch EntB in 0,2 M Kaliumphosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7,5 größer war (Daten nicht gezeigt). Bei Durchführung des Enzymtests in Tris-Puffer war die Enzymaktivität von PhzD ebenfalls geringer als in Kaliumphosphatpuffer (Daten nicht gezeigt). Ein solcher Aktivitätsverlust in Gegenwart der Puffersubstanz Tris war unter anderem schon für die aus *E. coli* stammenden Enzyme Transaldolase B (Sprenger *et al.*, 1995) und 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase (Schürmann, 2001) beschrieben worden. Aus diesem Grund erfolgte die Bestimmung der Enzymaktivität in dieser Arbeit unter den oben beschriebenen Bedingungen in Kaliumphosphatpuffer. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus der Isochorismat-Pyruvyl-Lyase aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde ebenfalls ein Kaliumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,5 benutzt (DeClue *et al.*, 2005).

Unter diesen Reaktionsbedingungen wurden die beiden Enzyme PhzD und EntB auf ihre Fähigkeit getestet, die beiden Substrate Chorisminsäure und ADC zu 3,4-CHD bzw. 3,4-CHA umzusetzen. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter von PhzD und EntB wurden jeweils Fusionsproteine mit einem Histidinschwanz eingesetzt und zwar ein PhzD-Fusionsprotein mit einem 10-fachen aminoterminalen Histidinschwanz und ein EntB-Fusionsprotein mit einem 6-fachen carboxyterminalen Histidinschwanz. Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte jeweils in einem Reaktionsschritt durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Aus Proteinrohextrakt konnten je Liter Expressionskultur 20 mg bis zur apparenten Homogenität (>95%) aufgereinigtes EntB bzw. 25 mg bis zur apparenten Homogenität (>95%) aufgereinigtes PhzD gewonnen werden. Für die PhzD- und EntB-Fusionsproteine wurden die in Tabelle 21 dargestellten Werte für die kinetischen Parameter K_M , v_{max} , k_{cat} und k_{cat}/K_M in 0,2 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) bei 37 °C bestimmt.

	K_M [mM]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]
PhzD				
ADC	1,5 ± 0,3	9,8 ± 0,3	4,1 ± 0,12	2,73 x 10 ³
Chorisminsäure	1,2 ± 0,15	93,3 ± 2	39 ± 0,8	32,5 x 10 ³
EntB				
ADC	1,4 ± 0,3	3,76 ± 0,2	2 ± 0,05	1,8 x 10 ³
Chorisminsäure	1,1 ± 0,15	106,7 ± 2,5	56 ± 3	40 x 10 ³

Tabelle 21: Kinetische Parameter für die Enzyme PhzD und EntB bei einem pH-Wert von 7,5 und einer Temperatur von 37 °C

Die kinetischen Parameter für das Substrat ADC sind jeweils mit einem größeren Fehler behaftet als die für das Substrat Chorisminsäure ermittelten, da die in den Enzymtests eingesetzte ADC-Konzentration nicht exakt bestimmt werden konnte. Dies liegt daran, dass sich ADC chemisch zu Aminodeoxyprephensäure umlagert und die beiden Verbindungen etwa im Verhältnis 1:1 vorliegen (siehe 3.1.4). Eine genaue Bestimmung dieses Verhältnisses ist durch ¹H-NMR möglich, konnte jedoch aus praktischen Gründen nicht unmittelbar vor den Enzymtests durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde zur Bestimmung der ADC-Konzentration in den Reaktionsansätzen von einem Verhältnis von ADC zu Aminodeoxyprephensäure von genau 1:1 ausgegangen.

Die für EntB ermittelten kinetischen Parameter für K_M und k_{cat} für das Substrat Chorisminsäure unterscheiden sich zwar von den von Rusnak *et al.* bestimmten Werten ($K_M = 1,1$ mM

gegenüber $K_M \geq 37$ mM und $k_{cat} = 56$ s⁻¹ gegenüber $k_{cat} \geq 21$ s⁻¹), liegen aber in der gleichen Größenordnung. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Autoren selbst die große Ungenauigkeit ihrer ermittelten kinetischen Parameter betonen, bestätigen die in dieser Arbeit ermittelten kinetischen Parameter durchaus die von Rusnak *et al.* schon grob bestimmten Werte. Das zu Chorisminsäure ähnliche ADC war noch nicht auf eine mögliche Umsetzung durch EntB getestet worden. Der in dieser Arbeit ermittelte K_M -Wert für das Substrat ADC liegt jedoch mit 1,4 mM nahe bei dem für Chorisminsäure ermittelten Wert; k_{cat} liegt mit 2 s⁻¹ etwas unter dem für Chorisminsäure ermittelten Wert. Diese kinetischen Parameter bestätigen die von Rusnak *et al.* formulierte Hypothese, dass ein Substituent an Position C₄ des Substrats die Bindung an EntB behindert.

Die für PhzD bestimmten kinetischen Parameter für die beiden Substrate Chorisminsäure und ADC unterscheiden sich von den von Parsons *et al.* ermittelten Werten. Die K_M -Werte liegen jedoch in der gleichen Größenordnung wie die von Parsons *et al.* ermittelten. Die in dieser Arbeit festgestellte chemische Umlagerung von ADC zu Aminodeoxyprephensäure ist bisher nicht beschrieben worden. ADC wurde von Parsons *et al.* enzymatisch synthetisiert wie zuvor in der Literatur beschrieben (Tewari *et al.*, 2002). Die Überprüfung der Reinheit des synthetisierten ADCs erfolgte jedoch nicht durch ¹H-NMR; daher konnte Aminodeoxyprephensäure bisher nicht im synthetisierten ADC nachgewiesen werden. Aus diesem Grund könnten die wirklichen ADC-Konzentrationen bei der von Parsons *et al.* durchgeführten biochemischen Charakterisierung von PhzD geringer gewesen sein als beschrieben, so dass deren ermittelter K_M -Wert von 590 μM für ADC größer als der wirkliche K_M -Wert sein könnte. Der in dieser Arbeit ermittelte K_M -Wert liegt mit 1,5 mM jedoch über dem von Parsons *et al.* ermittelten Wert, so dass dieser Unterschied im ermittelten K_M -Wert nicht durch Fehler bei der Ermittlung der ADC-Konzentration erklärbar ist.

Die in dieser Arbeit für k_{cat} ermittelten Werte für die Substrate Chorisminsäure und ADC unterscheiden sich deutlich von den zuvor bestimmten Werten (4,1 s⁻¹ gegenüber 0,02 s⁻¹ für das Substrat ADC und 39 s⁻¹ gegenüber 1,2 s⁻¹ für das Substrat Chorisminsäure). Ein Grund ist sicherlich, dass PhzD unter den in dieser Arbeit gewählten Pufferbedingungen aktiver ist als unter den von Parsons *et al.* gewählten Bedingungen. Dies kann jedoch nicht einen so deutlichen Unterschied in den für k_{cat} ermittelten Werten erklären.

Die bei den Fermentationen des Stammes KB532/pC78 erreichten Produktausbeuten von 3,4-CHA und 3,4-CHD (zu Beginn der Fermentation werden 3,4-CHA und 3,4-CHD nahezu im

Verhältnis 1:1 gebildet) sprechen dafür, dass die Aktivität von PhzD gegenüber ADC größer sein sollte, als zuvor von Parsons *et al.* bestimmt worden war.

Dass die in dieser Arbeit beobachtete höhere Aktivität von PhzD gegenüber dem Substrat ADC auf eine Änderung der Enzymaktivität durch den Einfluss des Histidinschwanzes des benutzten PhzD-Fusionsproteins zurückzuführen ist, konnte ausgeschlossen werden. Nach Abspaltung des aminoterminalen Histidinschwanzes durch die Protease Faktor Xa blieb die Enzymaktivität von PhzD unverändert. Da sich die Aminosäure Methionin1 am äußeren Rand des Enzyms befindet (siehe Abbildung 46) wird der aminoterminal Histidinschwanz wahrscheinlich ebenfalls außerhalb des Enzyms liegen, so dass auch anhand der Struktur von PhzD gut vorstellbar ist, dass der Histidinschwanz wie beobachtet keine Auswirkungen auf die Enzymaktivität hat.

Die von Parsons *et al.* ebenfalls untersuchten kinetischen Parameter von PhzD gegenüber den Substraten Isochorisminsäure und ADIC konnten aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit der beiden Substanzen in dieser Arbeit nicht bestimmt werden. Aus dem gleichen Grund wurden die kinetischen Parameter von EntB für das physiologische Substrat Isochorisminsäure nicht bestimmt.

Ein Vergleich der ermittelten kinetischen Parameter für die beiden Enzyme EntB und PhzD zeigt, dass die Umsetzung von Chorisminsäure zu 3,4-CHD mit dem Enzym EntB besser möglich ist als mit PhzD, während die in dieser Arbeit angestrebte Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA besser durch PhzD möglich ist.

In Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur zeigen die beiden Enzyme PhzD und EntB ein bei vielen Enzymen beobachtetes Verhalten: Die ermittelten Q_{10} -Werte von 1,95 und 1,9 entsprechen ungefähr den Werten vieler Enzyme mesophiler Organismen; die ermittelten Aktivierungsenergien von 66,15 kJ/mol für PhzD und 65,5 kJ/mol für EntB liegen etwas über dem Wert von 40-50 kJ/mol, der häufig für Enzymaktivierungsenergien bestimmt wurde (Bisswanger, 2000).

4.5 Einfluss von Mutationen auf die Enzymaktivität von PhzD

Bei der biochemischen Charakterisierung von PhzD durch Parsons *et al.* wurde das folgende Modell des aktiven Zentrums von PhzD erstellt (Abbildung 46).

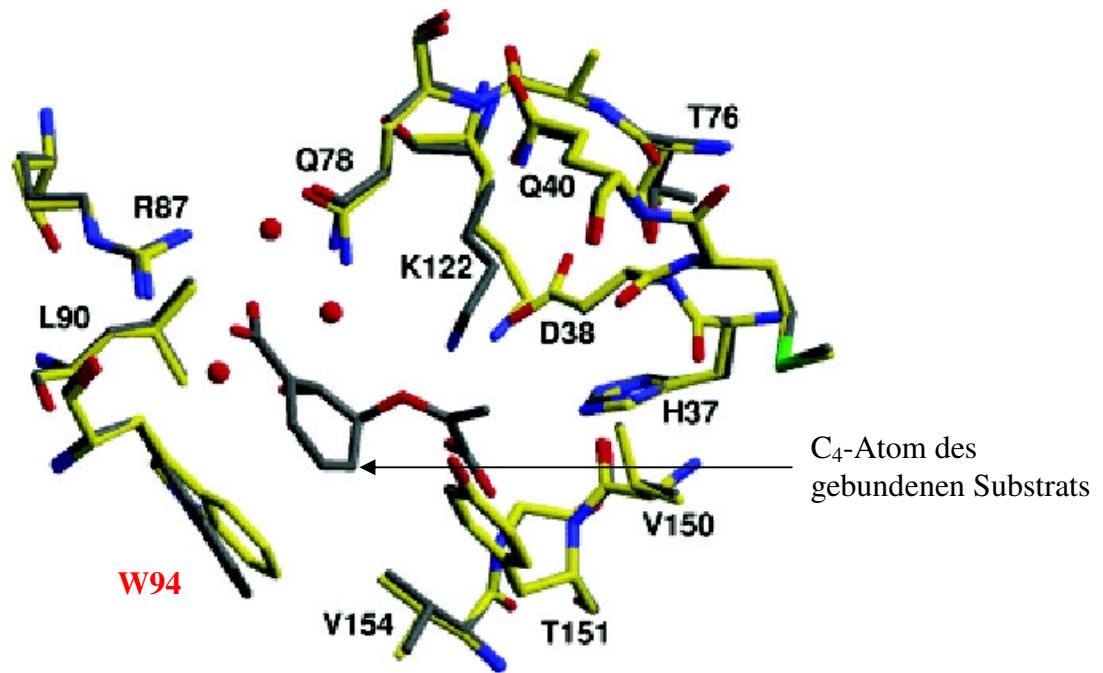


Abbildung 46: Stereodarstellung des aktiven Zentrums von PhzD (verändert nach Parsons et al., 2003)

Gezeigt ist eine Stereodarstellung des aktiven Zentrums von PhzD; in der Mitte ist enzymgebundene Isochorisminsäure sichtbar, die roten Kreise stellen in der Struktur gefundene Wassermoleküle dar. Die Aminosäure Tryptophan94 ist rot dargestellt.

Nach diesem Modell ist die Aminosäure W94 nicht wichtig für die Enzymaktivität, jedoch wichtig für die Substratbindung (siehe 4.4). Die hydrophobe Tasche, die durch Tryptophan94 gebildet wird, ermöglicht die Bindung von ADIC und Isochorisminsäure an das Enzym, erschwert jedoch die Bindung von Substraten, die an Position C₄ einen polaren Substituenten tragen, wie dies bei ADC und Chorisminsäure der Fall ist. Daher sollte nach diesem Modell die Substitution von Tryptophan94 durch eine polare Aminosäure die Enzymaktivität unbeeinflusst lassen bzw. nur gering beeinflussen, jedoch die Enzymbindung von Chorisminsäure und ADC verbessern. Die Substitution von Tryptophan94 durch eine saure Aminosäure wie Asparaginsäure oder Glutaminsäure sollte insbesondere zu einer Verbesserung der Enzymbindung für ADC führen, weil die negativ geladene Carboxylgruppe dieser Aminosäuren die positiv geladene Aminogruppe am C₄-Atom von ADC elektrostatisch anziehen sollte.

Diese Hypothese wurde mit Hilfe der enzymkinetischen Charakterisierung von PhzD-Mutanten, die mittels ortsgerechter Mutagenese erzeugt worden waren und an Position 94 eine Substitution von Tryptophan durch eine andere Aminosäure aufwiesen, untersucht. Die Substitution von Tryptophan94 durch die Aminosäuren Glutaminsäure, Alanin, Cystein, Glycin,

Isoleucin, Methionin oder Phenylalanin führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust von PhzD gegenüber den Substraten ADC und Chorisminsäure. Die Substitution von Tryptophan⁹⁴ durch Threonin bewirkte keine Veränderung der Enzymaktivität gegenüber den Substraten ADC und Chorisminsäure im Vergleich zum Wildtyp-Enzym, wohingegen die Substitution durch Asparaginsäure zu einem vollständigen Aktivitätsverlust gegenüber dem Substrat ADC führte, während die Aktivität gegenüber Chorisminsäure unverändert blieb. Diese Ergebnisse bestätigen zwar, dass die Aminosäure Tryptophan 94 eine wichtige Rolle im aktiven Zentrum von PhzD spielt und keine katalytische Funktion besitzt. Sie bestätigen jedoch nur unzureichend, dass ADC und Chorisminsäure nur schlecht im aktiven Zentrum von PhzD gebunden werden können, weil ihr polarer Substituent am C₄-Atom nicht gut in die hydrophobe Bindungstasche passt, die von Tryptophan⁹⁴ gebildet wird. Eine Substitution durch eine Aminosäure mit polarer Seitenkette wie Asparaginsäure oder Glutaminsäure bewirkt nämlich nicht die vorausgesagte verbesserte Enzymbindung von ADC und Chorisminsäure; sie führt im Gegenteil zu einer Inaktivierung des Enzyms gegenüber dem Substrat ADC und zu einer Inaktivierung des Enzyms gegenüber dem Substrat Chorisminsäure (außer bei einer Substitution durch Asparaginsäure). Die Substitution von Tryptophan⁹⁴ durch Asparaginsäure verändert das Substratspektrum des PhzD-Muteins; ADC wird nicht mehr als Substrat akzeptiert und kann nicht mehr zu 3,4-CHA umgesetzt werden, während sich die kinetischen Parameter des Muteins für Chorisminsäure nicht ändern. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass ADC aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen der Aminogruppe des C₄-Atoms und der Carboxylgruppe der Seitenkette von Asparaginsäure irreversibel im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden wird. Im Falle des Substrats Chorisminsäure wäre diese Wechselwirkung voraussichtlich deutlich schwächer. Dies könnte die unveränderte Umsetzung von Chorisminsäure zu 3,4-CHD erklären. Der beobachtete Aktivitätsverlust gegenüber dem Substrat ADC könnte auch auf eine starke Erhöhung des K_M-Werts für ADC zurückzuführen sein. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von ADC konnten jedoch nur ADC-Konzentrationen bis 7 mM für die Aktivitätsbestimmungen eingesetzt werden. Daher ist nicht auszuschließen, dass bei ADC-Konzentrationen, die deutlich über 7 mM liegen, eine Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat stattfindet. Dass die Substitution von Tryptophan⁹⁴ durch Glutaminsäure zu einer Inaktivierung von PhzD gegenüber den Substraten ADC und Chorisminsäure führt, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die im Vergleich zu Asparaginsäure längere Seitenkette der Glutaminsäure eine Konformationsänderung des aktiven Zentrums bewirkt, die zu einer Inaktivierung des Enzyms führt. Durch Substitution der

Aminosäure Tryptophan⁹⁴ durch andere Aminosäuren konnte also keine verbesserte Umsetzung der Substrate ADC und Chorisminsäure erreicht werden.

Bei DSM (Delft) wurde in einem ¹H-NMR-Screening eine PhzD-Mutein-Bibliothek auf Klone mit veränderten 3,4-CHA und 3,4-CHD-Produktbildungsraten untersucht. Eine Sequenzierung der Plasmide der interessantesten Klone ergab, dass nur in zwei Fällen Mutationen vorlagen, die zu einem Aminosäureaustausch im PhzD-Fusionsprotein führten.

Die biochemische Charakterisierung des im NMR-Screenings gefundenen PhzD-Muteins R138K ergab keine veränderten kinetischen Parameter des Enzyms gegenüber den beiden Substraten ADC und Chorisminsäure im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Das ebenfalls im Screening gefundene PhzD-Mutein S165Y war jedoch vollständig inaktiv gegenüber den Substraten ADC und Chorisminsäure. Aus Abbildung 47 ist ersichtlich, dass sich die beiden gefundenen Mutationen R138K und S165Y nicht in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum des Enzyms befinden. Trotzdem bewirkt der Aminosäureaustausch von Serin165 zu Tyrosin eine vollständige Inaktivierung von PhzD gegenüber den Substraten ADC und Chorisminsäure. Eine genaue Erklärung des beobachteten Aktivitätsverlusts mit Hilfe des Strukturmodells von PhzD ist deshalb nicht möglich. Scheinbar bewirkt dieser Aminosäureaustausch jedoch eine Strukturveränderung des Enzyms, die zu dessen Inaktivierung führt.

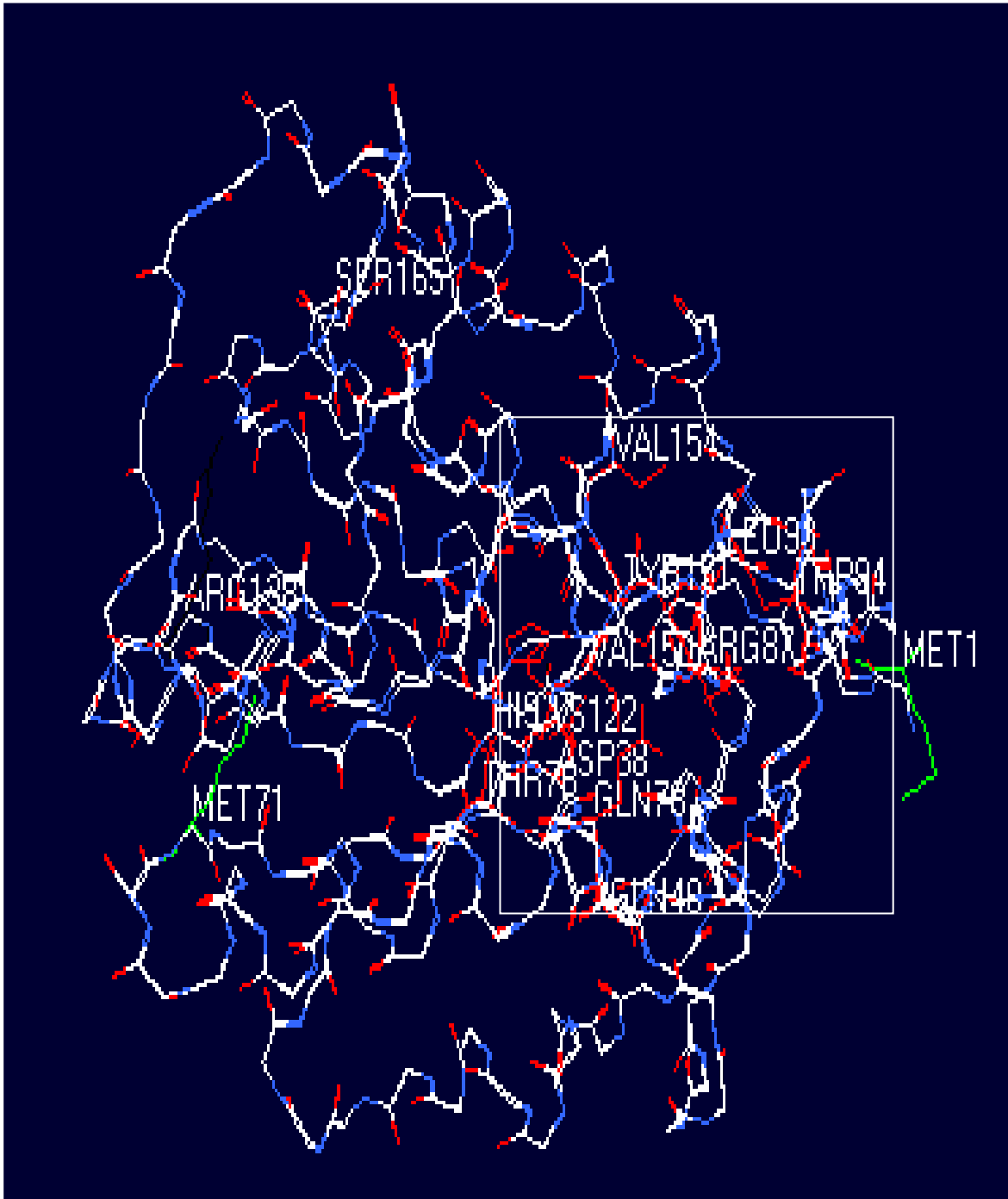


Abbildung 47: Darstellung der Struktur des PhzD-Muteins V71M

Die Darstellung erfolgte mit dem Programm DeepView / Swiss-PdbViewer 3.7 (SP5).

Zur mikrobiellen Synthese von 3,4-CHA wurde in dieser Arbeit der Stamm KB532/pC78 verwendet. pC78 kodiert das oben dargestellte PhzD-Mutein mit der Mutation V71M (grün dargestellt). Gezeigt ist eine veränderte pdb-Struktur von PhzD nach Parsons *et al.* Das aktive Zentrum des Enzyms ist durch den weißen Kasten markiert; wichtige Aminosäuren sind beschriftet. Die Aminosäure M1 ist grün dargestellt; sie liegt am äußeren Rand des Enzyms. Nicht gezeigt ist der aminoterminalen Histidinschwanz, der sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten PhzD-Fusionsprotein vor der Aminosäure M1 befindet.

4.6 Zusammenfassung

Chorisminsäure ist der zentrale Verzweigungspunkt bei der Biosynthese von aromatischen Verbindungen in *E. coli*. So können ausgehend von Chorisminsäure so unterschiedliche Verbindungen wie *p*-Aminobenzoessäure (*p*ABA), Ubichinon, Menachinon oder die aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan synthetisiert werden.

Ziel des CHORUS-Projektes, in dessen Rahmen diese Arbeit stattfand, war die mikrobielle Biosynthese der Cyclohexadiencarbonsäure-Derivate (5*S*,6*S*)-5-6-Dihydroxycyclohexa-1-3-dien-carbonsäure (2,3-CHD), (3*S*,4*R*)-3,4-Dihydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure (3,4-CHD), (5*S*,6*S*)-6-Amino-5-hydroxycyclohexa-1,3-dien-carbonsäure (2,3-CHA) und (3*S*,4*R*)-4-Amino-3-hydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure (3,4-CHA). Diese Verbindungen leiten sich alle von Chorisminsäure ab und besitzen wie Chorisminsäure eine hohe Funktionalisierung und gleichzeitig eine hohe synthetische Flexibilität. Sie besitzen als chirale, nicht racemische Synthesebausteine ein großes Potential in der Natur- und Wirkstoffsynthese; so ist z.B. ausgehend vom chemisch kaum zugänglichen 3,4-CHA eine Vereinfachung der derzeit von Roche durchgeführten Oseltamivir-Synthese (Tamiflu™) vorstellbar.

Ziel dieser Arbeit war die mikrobielle Biosynthese des Aminocyclitols 3,4-CHA. Sie sollte ausgehend von Chorisminsäure über das Intermediat 4-Amino-4-deoxychorisminsäure (ADC) ablaufen. ADC tritt in *E. coli* als Intermediat bei der Biosynthese von *p*ABA auf. Durch eine für *E. coli* nicht physiologische Etherspaltung sollte dann ADC zum Zielprodukt 3,4-CHA und Pyruvat umgesetzt werden. Zu Beginn dieser Arbeit war kein Enzym beschrieben worden, das diese Reaktion katalysiert. Deshalb war zunächst nicht bekannt, ob und mit welchem Enzym diese Reaktion durchführbar sein würde.

1. Das vermutete Gen einer ADC-Synthase, *pabAB*, aus *Corynebacterium glutamicum* wurde in den Expressionsvektor pJF119EH kloniert. Der *Escherichia coli*-Stamm KB532, ein Stamm mit einem erhöhten Stofffluss zu Chorisminsäure, wurde anschließend mit dem Plasmid transformiert und fermentiert. Im Fermentationsüberstand wurden 7 g/l ADC und 15,4 g/l Chorisminsäure nachgewiesen. Somit konnte ein ADC-produzierender *Escherichia coli*-Stamm etabliert und gezeigt werden, dass das Gen *pabAB*_{*C.gl.*} eine aktive ADC-Synthase kodiert.

2. Das Gen *his-phzD*, das ein Fusionsprotein der Isochorismatase PhzD aus *Pseudomonas aeruginosa* mit einem aminoterminalen Histidinschwanz kodiert, wurde zusammen mit *pabAB*_{*C.gl.*} in den Expressionsvektor pJF119EH kloniert. Das Plasmid wurde anschließend in

den *Escherichia coli*-Stamm KB532 transformiert. Bei einer Fermentation des Stammes konnte im Kulturüberstand eine maximale Produktkonzentration von 2,8 g/l 3,4-CHA erreicht werden; 3,4-CHD trat hierbei als Nebenprodukt auf. Das Verhältnis von gebildetem 3,4-CHA zu 3,4-CHD schwankte je nach Fermentationsbedingungen und -dauer zwischen 1:1 und 1:3. Die erreichten Produktausbeuten zeigen, dass PhzD sowohl ADC als auch Chorisminsäure als Substrate akzeptiert und diese zu 3,4-CHA und Pyruvat bzw. 3,4-CHD und Pyruvat umsetzt. Dies war auch während der Durchführung dieser Arbeit berichtet worden (Parsons, J. *et al.* (2003) *Biochemistry* 42: 5684-5693), jedoch war die bei der Fermentation erhaltene 3,4-CHA-Produktausbeute größer, als die veröffentlichten Ergebnisse erwarten ließen.

3. Die Isochorismatase PhzD aus *Pseudomonas aeruginosa* und die Isochorismatase EntB aus *Escherichia coli* wurden biochemisch charakterisiert. Das *phzD*-Gen wurde kloniert und als Fusionsprotein mit einem aminoterminalen 10-fachen Histidinschwanz überexprimiert; *entB* wurde mit einem 6-fachen carboxyterminalen Histidinschwanz kloniert und überexprimiert. Ausgehend vom Rohextrakt rekombinanter *E. coli*-Stämme wurden die beiden Enzyme in einem Schritt mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt. Die Ausbeute betrug hierbei je Liter Expressionskultur 20 mg EntB-Fusionsprotein bzw. 25 mg PhzD-Fusionsprotein. Von beiden aufgereinigten Enzymen wurden die kinetischen Parameter für die Substrate ADC und Chorisminsäure mit einem gekoppelten Enzymtest bestimmt. Das bei der Spaltung der Substrate freiwerdende Pyruvat wird hierbei durch das Hilfsenzym L-Lactat-Dehydrogenase zu Lactat umgesetzt. Bei einem pH-Wert von 7,5 und einer Temperatur von 37 °C wurden für PhzD folgende Werte für k_{cat} und K_{M} ermittelt: Für das Substrat ADC beträgt der K_{M} -Wert $1,5 \pm 0,3$ mM und k_{cat} ist $4,1 \pm 0,12$ s⁻¹; bei dem Substrat Chorisminsäure beträgt der K_{M} -Wert $1,2 \pm 0,15$ mM und k_{cat} ist $39 \pm 0,8$ s⁻¹. Für das Enzym EntB wurden unter den gleichen Bedingungen für das Substrat ADC ein K_{M} -Wert von $1,4 \pm 0,3$ mM und ein k_{cat} -Wert von $2 \pm 0,05$ s⁻¹ bestimmt. Für das Substrat Chorisminsäure betrug der K_{M} -Wert $1,1 \pm 0,15$ mM und k_{cat} 56 ± 3 s⁻¹. Die kinetischen Parameter zeigen, dass mit beiden Enzymen die Umsetzung von ADC zu 3,4-CHA und Pyruvat möglich ist. PhzD ist jedoch hierfür besser geeignet, während sich EntB besser für die Umsetzung von Chorisminsäure zu 3,4-CHD und Pyruvat eignet. Die ermittelten kinetischen Parameter für PhzD unterscheiden sich von den bereits veröffentlichten Werten (Parsons, J. *et al.* (2003) *Biochemistry* 42: 5684-5693). Während die Werte für K_{M} in der gleichen Größenordnung liegen, sind die bestimmten Werte für k_{cat} für beiden Substrate Chorisminsäure und ADC deutlich größer als beschrieben.

5. Literatur

- Bachman, B.J.** (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev.* 36: 525-557.
- Bailey, J.E.** (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252: 1668-1675.
- Bisswanger, H.** (2000). Enzymkinetik: Theorie und Methoden. (Wiley-VCH, Weinheim)
- Boyd, D.R., Sharma, N.D., Dalton, H. and Clarke, D.A.** (1996). Chemoenzymatic synthesis of arene oxides and trans-dihydrodiols from cis-dihydrodiols of monosubstituted benzenes. *Chem. Comm.* 1: 45-46.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brinkmann, U., Mattes, R.E. and Buckel, P.** (1989). High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* 85: 109-114.
- Brown, M.P., Aidoo, K.A. and Vining, L.C.** (1996). A role for *pabAB*, a p-aminobenzoate synthase gene of *Streptomyces venezuelae* ISP5230, in chloramphenicol biosynthesis. *Microbiology.* 142: 1345-1355.
- Bunnage, M.E., Ganesh, T., Masesane, I.B., Orton, D. and Steel, P.G.** (2003). Asymmetric Synthesis of the Putative Structure of (-)-Oryzoxymycin. *Org. Lett.* 5: 239-242.
- Byrnes, W.M., Goldberg, R.N., Holden, M.J., Mayhew, M.P. and Tewari, Y.B.** (2000). Thermodynamics of reactions catalyzed by anthranilate synthase. *Biophys. Chem.* 84: 45-64.
- Cadwell, R.C. and Joyce, G.F.** (1992). Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* 1: 28-33.
- Cadwell, R.C. and Joyce, G.F.** (1994). Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl.* 6: 136-140.
- Camakaris, J. and Pittard, J.** (1974). Purification and properties of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonic acid-7phosphate synthetase (*trp*) from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 120: 590-597.
- Campbell, M. and McLeish, M.J.** (1993). Improved synthesis of a precursor to 4-amino-4-deoxy-chorismic acid using an iminophosphorane as a base-labile protecting group. *J. Chem. Research* 4:148-149.
- Chandran, S.S., Yi, J., Draths, K.M., von Daeniken, R., Weber, W. and Frost, J.W.** (2003). Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol. Prog.* 19: 808-814.
- Chang, Z., Sun, Y., He, J. and Vining, L.C.** (2001). p-Aminobenzoic acid and chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: gene sets for a key enzyme, 4-amino-4-deoxy-chorismate synthase. *Microbiology.* 147: 2113-2126.

- Chao**, Y.-P., Patnaik, R., Roof, W.D., Young, R.F. and Liao, J.C. (1993). Control of Gluconeogenic Growth by *pps* and *pck* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 6939-6944.
- Chiasson**, B.A. and Berchtold, G.A. (1974). Synthesis of trans-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrobenzoic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 96: 2898-2900.
- Churchward**, G. and Bremer, H. (1982). Macromolecular composition of bacteria. *J. Theor. Biol.* 94: 651-670.
- Copley**, S.D. and Knowles, J.R. (1987). The conformational equilibrium of chorismate in solution: implications for the mechanism of the non-enzymic and the enzyme-catalyzed rearrangement of chorismate to prephenate. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 5008-5013.
- Crowe**, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D. and Henco, K. (1994). 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol. Biol.* 31: 371-387.
- Datsenko**, K.A. and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:6640-6645.
- DeClue**, M.S., Baldrige, K.K., Künzler, D.E., Kast, P. and Hilvert, D. (2005). Isochorismate Pyruvate Lyase: A Pericyclic Reaction Mechanism? *J. Am. Chem. Soc.* 127: 15002-15003.
- Della-Cioppa**, G., Garger, S.J., Sverlow, G.G., Turpen, T.H. and Grill, L.K. (1990). Melanin production in *Escherichia coli* from a cloned tyrosinase gene. *Biotechnology* 8: 634-638.
- Del Tito**, B.J., Ward, J.M., Hodgson, J., Gershater, C.J.L., Edwards, H., Wysocki, L.A., Watson, F.A., Sathe, G. and Kane, J.F. (1995). Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 7086-7091.
- DeMarinis**, R.M., Filer, C.N., Waraszkiewicz, S.M. and Berchtold, G.A. (1974). Synthesis of trans-2,3-dihydroxy-2, 3-dihydrobenzoic acid and related substances from 4-carbo-tert-butoxyoxepin. *J. Am. Chem. Soc.* 96: 1193-1197.
- Draths**, K.M. and Frost, J.W. (1990). Synthesis using plasmid-based biocatalysis: Plasmid assembly and 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate production. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 1657-1659.
- Draths**, K.M., Ward, T.L. and Frost, J.W. (1992). Biocatalysis and nineteenth century organic chemistry: conversion of D-glucose into quinoid organics. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 9725-9726.
- Draths**, K.M., Ward, T.L. and Frost, J.W. (1999). Shikimic acid and quinic acid: Replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 121:1603-1604.
- Draths**, K.M. and Frost, J.W. (2001). Benzene-Free Synthesis of Phenol. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 113: 1999-2002.
- Du**, X., Wang, W., Kim, R., Yakota, H., Nguyen, H. and Kim, S.H. (2001). Crystal Structure and Mechanism of Catalysis of a Pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry.* 40: 14166-14172.

Eder, U., Sauer, G. and Wiechert, R. (1971). New Type of Asymmetric Cyclization to Optically Active Steroid CD Partial Structures. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 10: 496-497.

Eisenberg, E.J., Bidgood, A. and Cundy, K.C. (1997). Penetration of GS4071, a novel influenza neuraminidase inhibitor, into rat bronchoalveolar lining fluid following oral administration of the prodrug GS4104. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 1949-1952.

Ensley, B.D., Ratzkin, B.J., Osslund, T.D., Simon, M.J., Wackett, L.P. and Gibson, D.T. (1983). Expression of naphtalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* 222: 167-169.

Eykmann, J.F. (1891). Ueber die Shikimisäure. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 24: 1278-1303.

Floss, H.G. (1986). The shikimate pathway - an overview. *Rec. Adv. in Phytochem.* 20: 13-55.

Floss, H.G. (1997). Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Nat. Prod. Rep.* 14: 433-452.

Franke, D., Lorbach, V., Esser, S., Dose, C., Sprenger, G.A., Halfar, M., Thommes, J., Müller, R., Takors, R. and Müller, M. (2003). (S,S)-2,3-Dihydroxy-2,3-dihydrobenzoic acid: microbial access with engineered cells of *Escherichia coli* and application as starting material in natural-product synthesis. *Chem. Eur. J.* 9: 4188-4196.

Franke, D., Sprenger, G.A. and Müller M. (2003). Easy access to (R,R)-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrobenzoic acid with engineered strains of *Escherichia coli*. *Chembiochem.* 4: 775-777.

Frost, J.W. and Draths, K.M. (1995). Biocatalytic syntheses of aromatics from D-glucose: renewable microbial sources of aromatic compounds. *Annu. Rev Microbiol.* 49: 557-579.

Fukuyama, T., Nakatsuka, S.-I. and Kishi, Y. (1981). Total synthesis of gliotoxin, dehydrogliotoxin and hyalodendrin. *Tetrahedron* 37: 2045-2078.

Fujikawa, K., Coan, M.H., Legaz, M.E. and Davie, E.W. (1974). Mechanism of activation of bovine factor X (Stuart factor) by intrinsic and extrinsic pathways. *Biochemistry* 13: 5290-5299.

Fürste, J.P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M. and Lanka, E. (1986). Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene.* 48: 119-131.

Gehring, A.M., Bradley, K.A. and Walsh, C.T. (1997). Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry.* 36: 8495-8503.

Gehring, A.M., Mori, I. and Walsh, C.T. (1998). Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry.* 37: 2648-2659.

Gerhardt, P., Murray, E.J., Wood, T. and Krieg, N.R. (1994). Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington DC.

- Gibson, F.** (1968). Chorismic acid. *Biochem Prep.* 12: 94-97.
- Gibson, J.M., Thomas, P.S., Thomas, J.D., Barker, J.L., Chandran, S.S., Harrup, M.K., Draths, K.M. and Frost, J.W.** (2001). Benzene-Free Synthesis of Phenol. *Angew. Chem.* 40: 1945-1948.
- Gillam, S. and Smith, M.** (1979). Site-specific mutagenesis using synthetic oligodeoxyribonucleotide primers: II. *In vitro* selection of mutant DNA. *Gene.* 8: 99-106.
- Gillam, S. and Smith, M.** (1979). Site-specific mutagenesis using synthetic oligodeoxyribonucleotide primers: I. Optimum conditions and minimum oligodeoxyribonucleotide length. *Gene.* 8: 81-97.
- Green, J.M. and Nichols, B.P.** (1991). *p*-Aminobenzoate biosynthesis in *Escherichia coli*. Purification of aminodeoxychorismate lyase and cloning of *pabC*. *J.Biol. Chem.* 266: 12971-12975. Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Green, J.M., Merkel, W.K. and Nichols, B.P.** (1992). Characterization and sequence of *Escherichia coli pabC*, the gene encoding aminodeoxychorismate lyase, a pyridoxal phosphate-containing enzyme. *J Bacteriol.* 174: 5317-5323.
- Grinter, N.** (1998). Developing an L-phenylalanine process. *Chemtech.* 33-37
- Grisostomi, C., Kast, P., Pulido, R., Huynh, J. and Hilvert, D.** (1997). Efficient *in Vivo* Synthesis and Rapid Purification of Chorismic Acid Using an Engineered *Escherichia coli* Strain. *Bioorg. Chem.* 25: 297-305.
- Hajos, Z.G. and Parrish, D.R.** (1974). Asymmetric synthesis of bicyclic intermediates of natural product chemistry. *J. Org. Chem.* 39: 1615-1621.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Haslam, E.** (1974). The Shikimate Pathway. Halstead Press, Wiley: New York, 1974.
- He, Z., Stigers Lavoie, K.D., Bartlett, P.A. and Toney, M.D.** (2004). Conservation of mechanism in three chorismate-utilizing enzymes. *J Am Chem Soc.* 126: 2378-2385.
- Hoare, J.H., Peter, P., Policastro, P.P. and Berchtold, G.A.** (1983). Improved synthesis of racemic chorismic acid. Claisen rearrangement of 4-epi-chorismic acid and dimethyl 4-epi-chorismate *J. Am. Chem. Soc.* 105: 6264-6267.
- Hudlicky, T. and Olivio, H.F.** (1992). A short synthesis of (+)-lycoricidine *J. Am. Chem. Soc.* 114: 9694-96.
- Hudlicky, T., Luna, H., Price, J.D. and Rulin, F.** (1990). Microbial oxidation of chloroaromatics in the enantiodivergent synthesis of pyrrolizidine alkaloids: trihydroxyheliotridanes. *J.Org. Chem.* 55: 4683-4687.

Hudlicky, T., Rouden, J., Luna, H. and Allen, S. (1994). Microbial Oxidation of Aromatics in Enantiocontrolled Synthesis. 2. Rational Design of Aza Sugars (endo-Nitrogenous). Total Synthesis of (&)-Kifunensine, Mannojirimycin, and Other Glycosidase Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 5099-5107.

Hudlicky, T., Tian, X. and Königsberger, K. (1995). First Total Synthesis of (+)-Pancratistatin: An Unusual Set of Problems. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 3643-3644.

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. and Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol.* 21: 526-531.

Johnen, S. (2005). Dissertation: Biosynthese von Phosphonaten: Charakterisierung des rekombinanten Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. *Schriften des Forschungszentrum Jülich*; Band 17.

Jossek, R., Bongaerts, J. and Sprenger, G.A. (2001). Characterization of a new feedback-resistant 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase AroF of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 202: 145-148.

Jurkowitz, M.S., Horrocks, L.A. and Litsky, M.L. (1999). Identification and characterization of alkenyl hydrolase (lysoplasmalogenase) in microsomes and identification of a plasmalogen-active phospholipase A2 in cytosol of small intestinal epithelium. *Biochim Biophys Acta.* 1437: 142-156.

Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Mockel, B., Pfefferle, W., Puhler, A., Rey, D.A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V.F., Wiegrabe, I. and Tauch, A. (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* 104: 5-25.

Kane, J.F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 494-500.

Kim, C.U., Lew, W., Williams, M.A., Liu, H., Zhang, L., Swaminathan, S., Bischofberger, N., Chen, M.S., Mendel, D.B., Tai, C.Y., Laver, W.G. and Stevens, R.C. (1997). Structure-activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 681-690.

Kozlowski, M.C., Tom, N.J., Seto, C.T., Seffler, A.M. and Bartlett P.A. (1995). Chorismate-utilizing enzymes isochorismate synthase, anthranilate synthase, and p-aminobenzoate synthase: mechanistic insight through inhibitor design. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 2128-2140.

Krämer, M. (2000). Dissertation: Untersuchungen zum Einfluß erhöhter Bereitstellung von Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg von *Escherichia coli*. *Schriften des Forschungszentrum Jülich*.

- Kunkel**, T.A. (1985). Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis without Phenotypic Selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 488-492.
- Kurland**, C., Gallant, J. (1996). Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol.* 7: 489-493.
- Laursen**, J.B. and Nielsen, J. (2004). Phenazine Natural Products: Biosynthesis, Synthetic Analogues, and Biological Activity. *Chem. Rev.* 104: 1663-1685.
- Laemmli**, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685
- Leuchtenberger**, W. (1996). Amino Acids – Technical Production and Use. *Biotechnology* 6: 465-502.
- Li**, K. and Frost, J.W. (1999). Microbial synthesis of 3-dehydroshikimic acid: a comparative analysis of D-xylose, L-arabinose, and D-glucose carbon sources. *Biotechnol. Prog.* 15: 876-883.
- Li**, K., Mikola, M.R., Draths, K.M., Worden, R.M. and Frost, J.W. (1999). Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 64: 61-73.
- Lio**, P. (2002). Investigating the Relationship Between Genome Structure, Composition, and Ecology in Prokaryotes. *Molecular Biology and Evolution.* 19: 789-800.
- List**, B., Lerner, R.A. and Barbas, C.F. III. (2000). Proline-Catalyzed Direct Asymmetric Aldol Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 2396-2396.
- Lorbach**, V. (2005). Dissertation: Von Chorismat abgeleitete funktionalisierte Cyclohexadiene: Verwendung als chirale Synthesebausteine und Erweiterung der mikrobiell zugänglichen Produktpalette um einen Aminoalkohol. *Universität Bonn*.
- Luli**, G.W. and Strohl, W.R. (1990). Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1004-1011.
- Maass**, D., Weuster-Botz, D., Takors, R., Wandrey, C. and Paschold, H. (1999). Verfahren zur Abtrennung organischer Substanzen aus einem wässrigen Gemisch, DE 19919490.4 (DE Anmeldung 29.04.99).
- Mavrodi**, D.V., Ksenzenko, V.N., Bonsall, R.F., Cook, R.J., Boronin, A.M. and Thomashow, L.S. (1998). A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens*. 2-79. *J Bacteriol.* 180: 2541-2548.
- McCormick**, J.R.D., Reichenthal, J., Hirsch, U. and Sjolander, N.O. (1961). (+)trans-2,3-Dihydro-3-Hydroxyanthranilic Acid. A New Amino Acid produced by *Streptomyces aureofaciens*. *J. Am. Chem. Soc.* 83: 4104-4105.

- McCormick**, J.R.D., Reichenthal, J., Hirsch, U. and Sjolander, N.O. (1962). Biosynthesis of the Tetracyclines. A New Amino Acid from *Streptomyces aureofaciens*: (+)-trans-2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* 84: 3711-3714.
- McDonald**, M., Mavrodi, D., Thomashow, L.S. and Floss, H.G. (2001). Phenazine Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: Branchpoint from the Primary Shikimate Biosynthetic Pathway and Role of Phenazine-1,6-dicarboxylic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 9459-9460.
- McGowan**, D.A. and Berchtold, G.A. (1981). (-)-Methyl-cis-3-hydroxy-4,5-oxocyclohex-1-enecarboxylate: stereospecific formation from and conversion to (-)-methyl shikimate; complex formation with bis(carbomethoxy)hydrazine. *J. Org. Chem.* 46: 2381-2383.
- McKibben**, B. P., Barnosky, G.S. and Hudlicky, T. (1995). Unusual Dehalogenation of a Bridgehead Halide. Biocatalytic Conversion of Halocyclohexadiene-cis-diols to the trans-Isomers and Synthesis of Optically Pure Cyclohexadiene-trans-diols. *Synlett* 8: 806-808.
- Miller**, J.H. (1992). A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbour Laboratory Press, N.Y.
- Moffatt**, B.A. and Studier, F.W. (1987). T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* 49: 221-227
- Morollo**, A.A. and Bauerle, R. (1993). Characterization of composite aminodeoxyisochorismate synthase and aminodeoxyisochorismate lyase activities of anthranilate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9983-9987.
- Moscona**, A. (2005). Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *N. Engl. J. Med.* 353: 1363-1373.
- Mullis**, K.B. and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Müller**, R., Breuer, M., Wagener, A., Schmidt, K. and Leistner, E. (1996). Bacterial production of transdihydroxycyclohexadiene carboxylates by metabolic pathway engineering. *Microbiology* 142: 1005-1012.
- Murdock**, D., Ensley, B.D., Serdar, C. and Thalen, M. (1993). Construction of metabolic operons catalyzing the de novo biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 11: 381-386.
- Nagai**, K. and Thogersen, H.C. (1984). Generation of beta-globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature*. 309: 810-812.
- Nahlik**, M.S., Brickman, T.J., Ozenberger, B.A. and McIntosh, M.A. (1989). Nucleotide sequence and transcriptional organization of the *Escherichia coli* enterobactin biosynthesis cistrons *entB* and *entA*. *J Bacteriol.* 171(2): 784-790.
- Neidhardt**, F.C., Curtis, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter M. and Umberger, H.E. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Vol 1, ASM Press, Washington, D.C.

- Neidhardt**, F.C., Ingraham, J.L. and Schaechter, M. (1990). Physiology of the bacterial cell: A molecular approach. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Nichols**, B.P., Seibold, A.M., Doktor, S.Z. (1989). *para*-aminobenzoate synthesis from chorismate occurs in two steps. *J Biol Chem.* 264:8597-8601.
- Nishio**, Y., Nakamura, Y., Kawarabayasi, Y., Usuda, Y., Kimura, E., Sugimoto, S., Matsui, K., Yamagishi, A., Kikuchi, H., Ikeo, K. and Gojobori, T. (2003). Comparative Complete Genome Sequence Analysis of the Amino Acid Replacements Responsible for the Thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Research* 13:1572-1579.
- Notz**, W. and List, B. (2000). Catalytic Asymmetric Synthesis of anti-1,2-Diols. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 7386-7387.
- Oldiges**, M., Kunze, M., Degenring, D., Sprenger, G.A. and Takors, R. (2004). Stimulation, monitoring, and analysis of pathway dynamics by metabolic profiling in the aromatic amino acid pathway. *Biotechnol. Prog.* 20: 1623-1633.
- Pan**, G.P., Rhee, J.S. and Lebeault, J.M. (1987). Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnology Letters.* 9: 89-94.
- Parsons**, J.F., Jensen, P.Y., Pachikara, A.S., Howard, A.J., Eisenstein, E. and Ladner, J.E. (2002). Structure of *Escherichia coli* aminodeoxychorismate synthase: architectural conservation and diversity in chorismate-utilizing enzymes. *Biochemistry.* 41:2198-2208.
- Parsons**, J.F., Calabrese, K., Eisenstein, E. and Ladner, J.E. (2003). Structure and mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* PhzD, an isochorismatase from the phenazine biosynthetic pathway. *Biochemistry.* 42:5684-5693.
- Patnaik**, R. and Liao, J.C. (1994). Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3903-3908.
- Patnaik**, R., Spitzer, R. and Liao, J.C. (1995). Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA and Pps activities. *Biotechnology and Bioengineering.* 46: 361-370.
- Pawlak**, J.L. and Berchtold, G.A. (1987). Total synthesis of (-)-chorismic acid and (-)-shikimic acid. *J. Org. Chem.* 52: 1765-1771.
- Pittard**, J. (1996). Biosynthesis of the aromatic amino acids. In: Neidhardt *et al.*: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Vol. 1, ASM Press, Washington, D.C.
- Policastro**, P.P., Au, K.G., Walsh, C.T. and Berchtold, G.A. (1984). *trans*-6-Amino-5-[(1-carboxyethenyl)oxy]-1,3-cyclohexadiene-1-carboxylic acid: an intermediate in the biosynthesis of anthranilate from chorismate. *J. Am. Chem. Soc.* 106: 2443-2444.

Porter, E.A., Wang, X., Lee, H.-S., Weisblum, B. and Gellman, S.H. (2000). Non-haemolytic beta-amino-acid oligomers. *Nature*. 404: 565.

Raguse, T.L., Porter, E.A., Weisblum, B. and Gellman, S.H. (2002). Structure-Activity Studies of 14-Helical Antimicrobial-Peptides: Probing the Relationship between Conformational Stability and Antimicrobial Potency. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 12774-12785.

Rayl, E.A., Green, J.M. and Nichols, B.P. (1996). *Escherichia coli* aminodeoxychorismate synthase: analysis of PabB mutations affecting catalysis and subunit association. *Biochim Biophys Acta*. 1295: 81-88.

Rieger, C.E. and Turnbull, J.L. (1996). Small scale biosynthesis and purification of gram quantities of chorismic acid. *Prep. Biochem. Biotech.* 26: 67-76.

Roberts, S.M., Sutton, P.W. and Wright, L. (1996). Reactions of diphenylketene and methylphenylketene with some cis-cyclohexa-3,5-diene-1,2-diol derivatives. *J. Chem. Soc., Perkins Trans.* 1:1157-1165.

Robertson, B.R., Button, D.K. and Koch, A.L. (1998). Determination of the biomasses of small bacteria at low concentrations in a mixture of species with forward light scatter measurements by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol.* 64: 3900-3909.

Rodriguez-Quinones, F. and Benedi, V.J. (1993). *Escherichia coli* strain DH5 α is a suitable host for the study of *phoA* insertions. *Focus*. 15: 110-112.

Roux, B. and Walsh, C.T. (1992). *p*-aminobenzoate synthesis in *Escherichia coli*: kinetic and mechanistic characterization of the amidotransferase PabA. *Biochemistry*. 31: 6904-6910.

Rusnak, F., Liu, J., Quinn, N., Berchtold, G.A. and Walsh, C.T. (1990). Subcloning of the enterobactin biosynthetic gene *entB*: expression, purification, characterization, and substrate specificity of isochorismatase. *Biochemistry*. 29: 1425-1435.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Schürmann, M. (2001). 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von *Escherichia coli*: Biochemische Charakterisierung und Struktur-Funktionsbeziehungen. Dissertation, *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*, Jül-3904.

Snell, K.D.; Draths, K.M. and Frost, J.W. (1996). Synthetic Modification of *Escherichia coli* Chromosome: Enhancing the Biocatalytic Conversion of Glucose into Aromatic Chemicals. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 5605-5614.

Sprenger, G.A., Schörken, U., Sprenger, G. und Sahm, H. (1995). Transaldolase B of *Escherichia coli* K-12: cloning of ist gene, *talB*, and characterization of the enzyme from recombinant strains. *J. Bacteriol.* 177: 5930-5936.

- Sprengrer**, G.A., Siewe, R., Sahm, H., Karutz, M. and Sonke, T. (1997). Microbial Preparation of Substances from Aromatic Metabolism / I, WO98/18936 (PCT Anmeldung 17.10.97).
- Sprengrer**, G.A., Siewe, R., Sahm, H., Karutz, M. and Sonke, T. (1997). Microbial Preparation of Substances from Aromatic Metabolism / II, WO98/18937 (PCT Anmeldung 17.10.97).
- Sprengrer**, G.A., Wubbolts, M., Bongaerts, J., Müller, M., Kozak, S. and Bovenberg, R. (2004). Biosynthetic production of 4-amino-4-deoxychorismate (ADC) and [3*R*,4*R*]-4-amino-3-hydroxycyclohexa-1,5-diene-1-carboxylic ACID (3,4-CHA). PCT/EP2005/005988, eingereicht 04.06.2004.
- Studier**, F.W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219: 37-44.
- Tanaka**, S., Lerner, S.A. and Lin, E.C. (1967). Replacement of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine nucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. *J. Bacteriol.* 93: 642-648.
- Teng**, C.-Y.P. and Ganem, B. (1982). Shikimate-derived metabolites. Synthetic studies on the biosynthesis of para-aminobenzoic acid. *Tetrahedron Lett.* 23: 313-316.
- Teng**, C.-Y. and Ganem, B. (1984). Shikimate-derived metabolites. A key intermediate in the biosynthesis of anthranilate from chorismate. *J. Am. Chem. Soc.* 106: 2463-2464.
- Teng**, C.-Y.P., Ganem, B., Doktor, S.Z., Nichols, B.P., Bhatnagar, R.K. and Vining, L.C. (1985). Total synthesis of (+-)-4-amino-4-deoxychorismic acid: a key intermediate in the biosynthesis of p-aminobenzoic acid and L-p-aminophenylalanine. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 5008-5009.
- Tewari**, Y.B., Jensen, P.Y., Kishore, N., Mayhew, M.P., Parsons, J.F., Eisenstein, E. and Goldberg, R.N. (2002). Thermodynamics of reactions catalyzed by PABA synthase. *Biophys Chem.* 96: 33-51.
- Tribe**, D.E. and Pittard, J. (1979). Hyperproduction of tryptophan by *Escherichia coli*: genetic manipulation of the pathways leading to tryptophan formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 181-190.
- Turner**, J.M. and Messenger, A.J. (1986). Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production, *J. Adv. Microb. Physiol.* 27: 211-275.
- Viswanathan**, V.K., Green, J.M. and Nichols, B.P. (1995). Kinetic characterization of 4-amino 4-deoxychorismate synthase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 5918-5923.
- Walsh**, C.T., Erion, M.D., Walts, A.E., Delany, J.J. and Berchtold, G.A. (1987). Chorismate aminations: partial purification of *Escherichia coli* PABA synthase and mechanistic comparison with anthranilate synthase. *Biochemistry.* 26: 4734-4745.
- Whipp**, M.J., Camakaris, H. and Pittard, A.J. (1998). Cloning and analysis of the *shiA* gene, which encodes the shikimate transport system of *Escherichia coli* K-12. *Gene.* 209: 185-92.

- Wood**, H.B. and Ganem, B. (1990). Short chemical synthesis of (-)-chorismic acid from (-)-shikimic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 8907-8909.
- Yamada**, M., Asaoka, S., Saier, M.H. Jr. and Yamada, Y. (1993). Characterization of the *gcd* gene from *Escherichia coli* K-12 W3110 and regulation of its expression. *J Bacteriol.* 175: 568-571.
- Ye**, Q.Z, Liu, J. and Walsh, C.T. (1990). *p*-Aminobenzoate synthesis in *Escherichia coli*: purification and characterization of PabB as aminodeoxychorismate synthase and enzyme X as aminodeoxychorismate lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 9391-9395.
- Yi**, J., Draths, K.M., Li, K. and Frost, J.W. (2003). Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol. Prog.* 19: 1450-1459.
- Yi**, J., Li, K., Draths, K.M. and Frost, J.W. (2002). Modulation of phosphoenolpyruvate synthase expression increases shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol. Prog.* 18: 1141-1148.
- Zajc**, A., Romao, M.J., Turk, B. and Huber, R. (1996). Crystallographic and fluorescence studies of ligand binding to N-carbamoylsarcosine amidohydrolase from *Arthrobacter sp.* *J Mol Biol.* 263: 269-283.
- Zalkin**, H. (1985). Anthranilate Synthase. *Methods Enzymol.* 113: 287-292.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde vom 1. August 2002 bis zum 30. Juni 2003 am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich angefertigt und ab dem 1. Juli 2003 am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart fortgesetzt.

Herrn Prof. Dr. G. A. Sprenger danke ich für die interessante Themenstellung und stete Unterstützung meiner Arbeit, sowie für die Freiheit und das Vertrauen, das er in mich setzte. Seine stetige Diskussionsbereitschaft sowie viele wertvolle Ratschläge und Anregungen haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. A. Stolz danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des CHORUS-Projektes, insbesondere bei Dr. Johannes Bongaerts und Simon Esser, für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die sehr gute Arbeitsatmosphäre. Dick Schipper und Aad Vollebregt von DSM Delft danke ich für die Durchführung des Screenings sowie die Durchführung der NMR-Messungen.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der ehemaligen Arbeitsgruppe Sprenger am IBT-1: Sandra Johnen, Peter Kreutzenbeck, Ulli Degner, Dr. Melanie Schürmann, Mauro Blanco und Tomoyuki Inoue.

Bei allen Mitarbeitern des Labors 1 am Institut für Mikrobiologie bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, viele anregende Gespräche und ihre große Hilfsbereitschaft. Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter des Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Dr. Nathalie Trachtmann und Shashank Ghanegaonkar für ihre tatkräftige Hilfe bzw. die Durchführung von Fermentationen.

Herzlicher Dank gilt auch meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, die mich zu jedem Zeitpunkt meiner Ausbildung unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kozak
Vorname: Stefan
Anschrift: Rotebühlstr. 53-57
70178 Stuttgart
Telefon: 0711/6855491
Email: skozak@gmx.de
Geburtsdatum, -ort: 20. Juni 1977 in Aachen
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Bildungsweg

08/1987 – 06/1996 Fichte Gymnasium, Krefeld
Allgemeine Hochschulreife; Note: 1,2
07/1996 – 04/1997 Grundwehrdienst beim Wachbataillon BMVg in Siegburg
10/1997 – 09/1999 Biochemiegrundstudium an der Ruhr-Universität Bochum
Diplom-Vorprüfung; Note: „sehr gut“
10/1999 – 06/2002 Hauptstudium an der privaten Universität Witten/Herdecke
Diplomprüfung; Note: „sehr gut“
11/2001 – 06/2002 Diplomarbeit an der privaten Universität Witten/Herdecke;
Prof. Lipps: „Scrambled genes in *Styloynchia lemnae*“
08/2002 – 06/2003 Doktorarbeit am Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich, im Rahmen des Projekts CHORUS, ein internationales Industriekooperationsprojekt mit der niederländischen Firma DSM;
Prof. Sprenger: „Mikrobielle Biosynthese von (3S,4R)-4-Amino-3-hydroxycyclo-hexa-1,5-dien-carbonsäure mit rekombinanten *Escherichia coli*-Zellen: Molekulargenetische und biochemische Untersuchungen“
07/2003 – 03/2006 Ortswechsel nach Stuttgart aufgrund der Berufung meines Doktorvaters an die Universität Stuttgart und Fortsetzung der Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie

Berufstätigkeit und Fortbildung

05/1997 – 07/1997	Praktikant in der Pharma Research Abteilung NASP Präparate-sammlung im Pharmaforschungszentrum Bayer Wuppertal
05/1997 – 09/1997	Aushilfstätigkeit als Schlaf- und Liegewagenbetreuer bei „Wagon-Lits“
07/1998 – 08/1998	Werkstudent in der Abteilung PH-R Chem. Forsch. NASP im Pharmaforschungszentrum Bayer Wuppertal
07/1999 – 08/1999	Werkstudent in der Abteilung PH-R Chem. Forsch. NASP im Pharmaforschungszentrum Bayer Wuppertal
05/2000 – 06/2000	Praktikum bei der bitop GmbH (Gesellschaft für biotechnologische Optimierung mbH) in Witten
07/2000 – 09/2000	Forschungspraktikum an der Princeton University/USA im Department of Molecular Biology bei Prof. Stock
02/2001 – 03/2001	Praktikum in der Pharma Research Abteilung Molekulare Screening Technologie im Pharmaforschungszentrum Bayer Wuppertal
09/2003	VAAM Sommerschule „Biokatalyse“, Bad Herrenalb