

# **Enzymatische Dehydratisierung kurzkettiger Alkenole**

Von der Fakultät 4: Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

## **Dissertation**

vorgelegt von

**Max-Philipp Fischer**

aus Mannheim

Hauptberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer  
Mitberichter: Prof. Dr. Ralf Takors  
Vorsitzender: Prof. Dr. Georg Sprenger

Tag der mündlichen Prüfung: 03.09.2019

**Institut für Biochemie und Technische Biochemie  
Abteilung Technische Biochemie**



*„If I had eight hours to chop down a tree, I'd spend six sharpening my axe.”*

- Abraham Lincoln (1809 – 1865) -



### **Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Enzymatische Dehydratisierung kurzkettiger Alkenole“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Aus fremden Quellen entnommene Passagen sind als solche kenntlich gemacht. Des Weiteren bestätige ich ausdrücklich, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Institution zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

### **Declaration of Authorship**

I hereby declare that the present thesis entitled “Enzymatic dehydration of short-chain alkenols” is the result of my own work, that all sources used or quoted have been indicated, and that I have not used any illegitimate means. I further declare that I have not submitted this thesis for a degree in some form or another.

Mannheim, 02.05.2019

Max-Philipp Fischer



Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Anleitung von Prof. Dr. Bernhard Hauer am Institut für Biochemie und Technische Biochemie der Universität Stuttgart. Die experimentellen Arbeiten entstanden im Zeitraum von Mai 2015 bis März 2019 im Rahmen des *Horizon 2020 research and innovation* Programms der Europäischen Union als Teil des Projekts *EmPowerPutida - Exploiting native endowments by re-factoring, re-programming and implementing novel control loops in Pseudomonas putida for bespoke biocatalysis* (Grant Agreement No 635536).

**Im Zuge der vorliegenden Dissertation wurden folgende Artikel publiziert:**

Nestl, B. M., Geinitz, C., Popa, S., Rizek, S., Haselbeck, R. J., Stephen, R., Noble, M. A., **Fischer, M.-P.**, Ralph, E. C., Hau, H. T., Man, H., Omar, M., Turkenburg, J. P., van Dien, S., Culler, S. J., Grogan, G., & Hauer, B. (2017). Structural and functional insights into asymmetric enzymatic dehydration of alkenols. *Nature Chemical Biology*, *13*, 275–281.

Demming, R. M., **Fischer, M.-P.**, Schmid, J., & Hauer, B. (2018). (De)hydratases - recent developments and future perspectives. *Current Opinion in Chemical Biology*, *43*, 43–50.





## DANKSAGUNG

Im Folgenden möchte ich mich herzlich bei allen Menschen bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit auf die eine oder andere Weise nicht zustande gekommen wäre.

Mein größter Dank gilt Herrn Professor Bernhard Hauer für Überlassung des sehr interessanten und vielseitigen Themas ebenso wie für die ausgezeichnete Betreuung während der Bearbeitungszeit meiner Dissertation. Besonders die wertvollen Ratschläge und Hilfeleistungen während vieler Diskussionen inspirierten mich stets sehr.

Herrn Professor Ralf Takors möchte ich vielmals für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie viele interessante Diskussionen während der EPP Meetings danken. Ferner gilt mein Dank Herrn Professor Georg Sprenger für die Übernahme des Vorsitzes des Prüfungsausschusses.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Bettina Nestl und Dr. Bernd Nebel, die mir während der gesamten Zeit meiner Promotion stets mit Rat und Tat zur Seite standen, seien es chemische oder analytische Fragen, Unklarheiten in bürokratischen Angelegenheiten oder konstruktive Kritik nach dem Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit, aber auch in der Planung und Durchführung des ein oder anderen sozialen Events. Weiterhin danke ich meinen Praktikanten Lea Tröster und Tristan Rath sowie meinen Studenten Ludwig Bengel, Jan Seeger und Natalie Härterich für ihre gewissenhafte und motivierte Mitarbeit an dieser Arbeit. Ich wünsche euch alles Gute für eure wissenschaftliche und private Zukunft.

Allen Kooperationspartnern des EU-Projekts *EmPowerPutida* möchte ich herzlich danken für die vielen interessanten Gespräche und Erfahrungen wissenschaftlicher und eher spaßiger Natur sowie die stetige Unterstützung im Umgang mit *Pseudomonas* während unserer zahlreichen Treffen im In- und Ausland. Besonderer Dank gilt hierbei Professor Sven Panke für die Zurverfügungstellung des *E. coli* Stamms, der endlich die Expression von LinD ermöglichte sowie Professor Vítor Martins dos Santos und seinen Doktoranden Stamatiós Damalas, Christos Batianis und Lyon Bruinsma für die sehr angenehme und erfolgreiche Kooperation beim Abbau von Crotylalkohol.

Großer Dank gilt dem Hydratase-Team am IBTB, Jens und Rebecca, für die vielen konstruktiven Gespräche.

Weiterhin möchte ich allen Kollegen am IBTB, die ich während meiner Arbeit kennenlernen durfte, für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die überragende Hilfsbereitschaft danken; ganz besonders jedoch den aktuellen, ehemaligen und

zeitweisen Bewohnern des mit Abstand besten Labors der Welt, der Wellness Oase. Lisa Kühnel, Jan, Andreas H., Lisa Kontny, Julian Wissner, Andi S., Peter, Lea und Wendy, ihr seid die besten Kollegen, die man sich wünschen kann. Ich werde unsere gemeinsame Zeit, in der sich Forschen und Lachen auf die bestmögliche Weise die Waage hielten, nie vergessen. Besonders Dir, Jan, möchte ich danken, dass Du mir immer weitergeholfen hast, besonders in meiner Einarbeitungszeit, und Dir immer die Zeit genommen hast, auch die merkwürdigsten Hypothesen zu durchdenken.

Allen meinen Freunden zu Hause in Mannheim, in Münster und beim RT Schwetzingen möchte ich meinen größten Dank aussprechen für die Unterstützung und natürlich auch die willkommene Ablenkung während der letzten Jahre.

Größte Dankbarkeit gilt meiner Familie, meinen Eltern Ully und Bernd und meiner Schwester Marie, ohne die mir diese Arbeit auf so viele Weisen nicht möglich gewesen wäre. Ohne eure ständige und bedingungslose Unterstützung bei allem, was man sich nur vorstellen kann, und eure Aufmunterungen wäre ich sicherlich nicht durch diese Arbeit gekommen.

Ganz besonders danke ich aus tiefstem Herzen meiner besten Freundin und Ehefrau Eliane. Vielen Dank, dass Du mir immer für mich da bist, mich unterstützt und besonders während der letzten Monate, in denen Du ohne Frage mehr als genug mit Deiner eigenen Arbeit zu tun hattest, alle meine Launen hingenommen und mich immer wieder aufgebaut hast.

**ABSTRACT**

The bifunctional enzyme linalool dehydratase isomerase (LinD) from *Castellaniella defragrans* naturally catalyzes selective isomerization of geraniol to S-linalool as well as dehydration to myrcene. Topic of this dissertation was the examination of LinD towards the conversion of short chain alkenols.

Since previous work at the IBTB proved heterologous expression of LinD in *E. coli* to be difficult, mainly due to its natural periplasmic localization. Because of that, different *E. coli* strains, plasmids and signal peptide for the transport into the periplasm were investigated. Using the OmpA-tag, LinD could be expressed actively and reproducibly. Within an evaluation of external expression parameters OD<sub>600</sub> at induction, concentration of inductor and expression temperature have been analyzed to further enhance heterologous expression. Purification of functional LinD could not be achieved. Being able to control enzyme concentration, the construct OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) was cloned. After expression, it was shown, that OLm has 50% decreased activity compared to LinD without fusion partner, but also that fluorescence of the fusion protein correlated excellently with used lysate volumes.

Due to the high volatility of the partially gaseous analytes, reproducible analytics was hard to be established using classic extraction protocols. This is why a whole cell based two phase system in GC vials was established for biotransformations, allowing for skipping classic extraction. The samples were analyzed by GC/MS after injection directly out of the organic phase. High volatility allowed for the use of short isotherm methods (< 3 min) with separation of analytes before the solvent peak. This system was well suitable to screen approx. 30 samples per hour.

By semi-rational mutagenesis, the postulated mechanism of LinD should be further analyzed experimentally and, furthermore, the active site of LinD altered to improve the conversion of smaller alkenols to the respective alkenes. As model reaction for screening the generated variants, dehydration of 2-methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) to isoprene was chosen. By the variants of the putatively catalytic amino acids, their postulated role in the mechanism could be approved. None of the generated variants for adapting the active site showed increased product formation.

Analysis of B-factors of LinD showed an  $\alpha$ -helix on the inner surface of LinD homopentameric structure 15 Å from catalytic cysteines to be more flexible compared to the whole enzyme. These findings made the  $\alpha$ -helix interesting for further mutagenesis.

Initial alanine substitution variants of the ten helix residues proved severe influence on dehydration of 2-3-2 to isoprene manifesting in decreased or complete loss of activity. Based on these results, all ten helix positions K103 to D112 were saturated and screened using 2-3-2 as model substrate. Expression was controlled by the quotient [product] fluorescence<sup>-1</sup>. Hits were re-tested and four variants with increased product formation compared to parental OLM (K103N, R104G, G107T and D112T with 173%, 156%, 208% and 193%) were confirmed. Synergistic effects of the mutations could not be observed. The four identified variants were kinetically investigated using the established whole cell based two phase system. For G107T and D112T, drastically increased values for  $k_{cat}$  (317.6 and 134.6 s<sup>-1</sup>) compared to parental OLM (31.2 s<sup>-1</sup>) were obtained regarding the dehydration of 2-3-2. Adapting the reaction parameters by raising total cell density and substrate concentration as well as applying the whole cell based two phase system, formation of 14  $\mu$ M of 1,3-butadiene from 40 mM crotyl alcohol could reproducibly be observed for OLM. However, none of the generated variants showed increased formation of 1,3-butadiene.

Conversion of crotyl alcohol to 1,3-butadiene, should be reached by heterologous expression of an enzyme cascade in *Pseudomonas putida*. Within the frame of this work, different enzymatic alternatives were tested, but no detectable formation of crotyl alcohol was observed. Degradation experiments showed that *P. putida* EM42, KT2440 as well as KT2440's derivative GN346, which harbors two deletions in the degradation pathway of *n*-butanol, degrade crotyl alcohol. With EP1, a derivative of *P. putida* GN346, a strain with noticeably decreased crotyl alcohol degradation could be identified. However, using EP1, no detectable amounts of crotyl alcohol could be generated. CRISPRi-induced knock-downs of all 19 ADHs in EP1 was performed and several ADHs identified as potential targets for knock-outs decreasing crotyl alcohol degradation in *P. putida*. By this, application of the designed cascade for the production of 1,3-butadiene could be achieved *via* crotyl alcohol in a two-organism approach.

## ZUSAMMENFASSUNG

Das bifunktionale Enzym Linalool Dehydratase Isomerase (LinD) aus *Castellaniella defragrans* katalysiert wildtypisch die Isomerisierung von Geraniol selektiv zu *S*-Linalool sowie die Dehydratisierung zu Myrcen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte LinD auf die Umsetzung kurzkettiger Alkenole zu den entsprechenden Alkenen hin untersucht werden.

Da in vorangegangenen Arbeiten am IBTB gezeigt werden konnte, dass LinD auch wegen der wildtypisch periplasmatischen Lokalisation schwierig heterolog in *E. coli* zu exprimieren ist, wurden zunächst verschiedene Stämme, Plasmide und Signalpeptide für den Transport ins Periplasma untersucht. Unter Verwendung eines *OmpA-tags* konnte LinD schließlich aktiv und reproduzierbar exprimiert werden. Im Zuge einer Analyse der externen Expressionsparameter Induktions-OD<sub>600</sub>, Induktorkonzentration und Expressionstemperatur sollte die heterologe Expression weiter verbessert werden. Versuche, LinD funktional zu reinigen, scheiterten. Daher wurde zur Kontrolle der Expression und zur Normierung der Enzymmenge das Konstrukt *OmpA-LinD-mRFP1* (OLm) kloniert. Nach Expression zeigte sich, dass OLm zwar eine um 50% verringerte Aktivität gegenüber dem Enzym ohne Fusionspartner aufwies, die Fluoreszenz jedoch in Abhängigkeit eingesetzter Lysatmengen eine ausgezeichnete Korrelation aufzeigte.

Aufgrund der hohen Flüchtigkeit der teils gasförmigen Analyten gestaltete sich eine reproduzierbare Analytik nach klassischer Extraktion schwierig. Daher wurde ein ganzzellbasiertes Zweiphasensystem in GC *vials* für Biotransformationen etabliert, das ferner eine Extraktion überflüssig machte. Die Proben wurden durch direktes Injizieren aus der organischen Phase per GC/MS analysiert. Die hohe Flüchtigkeit erlaubte den Einsatz kurzer isothermer Methoden (< 3 min) mit einer Auftrennung der Analyten noch vor dem Lösungsmittelpeak. Das so etablierte System erlaubte einen Durchsatz von etwa 30 Proben pro Stunde.

Im Zuge einer semi-rationalen Mutagenese sollte der postulierte Mechanismus von LinD weiter experimentell untersucht werden und ferner die aktive Tasche von LinD dergestalt verändert werden, dass kleinere Alkenole zu den entsprechenden Alkenen umgesetzt werden können. Als Modellreaktion für das Screening der generierten Varianten wurde die Dehydratisierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) zu Isopren gewählt. Durch die Varianten der putativ katalytisch aktiven Aminosäuren konnte deren postulierte Rolle bestätigt werden. Die im Zuge der Anpassung der aktiven Tasche generierten Varianten hingegen zeigten alle niedrigere Produktbildung als OLm.

Die Analyse der B-Faktoren von LinD zeigte, dass eine kurze  $\alpha$ -Helix an der Innenseite der homopentameren Struktur im Abstand von ca. 15 Å zur katalytischen Maschinerie eine im Vergleich zum gesamten Enzym erhöhte Flexibilität aufweist, was diese Helix als potentielles Ziel für weitere Mutagenese interessant machte. Initiale Alaninsubstitutionsvarianten der zehn Helixreste zeigten einen deutlichen Einfluss auf die Dehydratisierung von 2-3-2 zu Isopren, die sich in reduzierter bis teilweise aufgehobener Produktbildung äußerten. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde eine Sättigung der zehn Helixpositionen K103 bis D112 durchgeführt, wobei 2-3-2 als Modellsubstrat Verwendung fand. Zur Kontrolle der Expression der Varianten wurde der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> herangezogen. Erneute Expressionen der Hits bestätigten vier Varianten, K103N, R104G, G107T und D112T, mit 173%, 156%, 208% und 193% Produktbildung im Vergleich zum parentalen Konstrukt OLM. Ein synergistischer Effekt der Mutationen konnte jedoch ausgeschlossen werden. Die vier identifizierten Varianten wurden nachfolgend kinetisch charakterisiert. Für G107T und D112T ergaben sich mit 317,6 und 134,6 s<sup>-1</sup> deutlich erhöhte Werte hinsichtlich  $k_{cat}$  im Vergleich zu OLM für die Dehydratisierung von 2-3-2 (31,2 s<sup>-1</sup>). Durch Anpassung der Reaktionsparameter durch Erhöhung von Zelldichte und Substratkonzentration sowie Anwendung des ganzzellbasierten Zweiphasensystems konnte für OLM eine Produktbildung von 14  $\mu$ M 1,3-Butadien aus 40 mM Crotylalkohol reproduzierbar nachgewiesen werden. Ein positiver Einfluss der Varianten auf die Umsetzung von Crotylalkohol zu 1,3-Butadien konnte hingegen nicht festgestellt werden.

Die Umsetzung von Crotylalkohol zu 1,3-Butadien sollte in *Pseudomonas putida* durch eine heterolog exprimierte Enzymkaskade erreicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene enzymatische Alternativen getestet, aber keine nachweisbare Menge an Crotylalkohol detektiert. Abbauprobe zeigten schließlich, dass *P. putida* EM42, KT2440 sowie das zwei Deletionen im *n*-Butanolstoffwechsel aufweisende Derivat von KT2440 GN346 Crotylalkohol abbauen. Der Stamm EP1, ein Derivat von GN346, wies einen deutlich verringerten Abbau von Crotylalkohol auf, jedoch konnte auch unter Verwendung von EP1 keine detektierbaren Mengen an Crotylalkohol generiert werden. Schließlich konnten durch CRISPRi-induzierte Herunterregulierungen aller 19 ADHs in *P. putida* EP1 mehrere ADHs identifiziert werden, die potentielle Ziele für *knock-outs* darstellen, um den Abbau von Crotylalkohol in *P. putida* zu reduzieren. Dies könnte die Anwendung der erstellten Kaskade zur Produktion von 1,3-Butadien über Crotylalkohol in einem Zweiorganismensystem ermöglichen.

## ABKÜRZUNGSSVERZEICHNIS

(v/v)	Volumen pro Volumen (engl. <i>volume per volume</i> )
(w/v)	Masse pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i> )
2-3-2	2-Methyl-3-buten-2-ol
3-2	3-Buten-2-ol
Å	Ångström ( $10^{-10}$ Meter)
ADH	Alkoholdehydrogenase
AtoB	Acetyl-CoA Acetyltransferase aus <i>Escherichia coli</i>
Bdh	Butanoldehydrogenase aus <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
Bld	Butyryl-CoA-Dehydrogenase aus <i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Cas	CRISPR-assoziiert
CRISPR(i)	gruppierte kurze palindromische Wiederholungen mit regelmäßigen Abständen (Interferenz) (engl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (interference)</i> )
Crt	Crotonase/Butyryl-CoA Dehydratase aus <i>Clostridium acetobutylicum</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCas9	dead Cas9 (inaktivierte Variante von Cas9)
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dd	doppelt destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DWP	<i>deep well</i> Platte
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMOPEC	empirisches Modell und Oligonukleotide für Änderungen in der Proteinexpression (engl. <i>Empirical Model and Oligos for Protein Expression Changes</i> )
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i> )
<i>for</i>	vorwärts (engl. <i>forward</i> )
g	Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m s}^{-2}$ )
GA	<i>Gibson Assembly</i>
GAD	Gluconatdehydratase
GC	Gaschromatograph/Gaschromatographie
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GRG	<i>Generalized Reduced Gradient</i>
Hbd	$\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase aus <i>Clostridium acetobutylicum</i>

HcSCDH	<i>short chain dehydrogenase-like protein</i> aus <i>Hahella chejuensis</i>
IMAC	immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPP	Isopentylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KDG	2-Keto-3-deoxy-D-gluconsäure
LB	lysogeny broth
LinD	Linalool Dehydratase Isomerase aus <i>Castellaniella defragrans</i>
Lis	Linalool Isomerase aus <i>Thauera linaloolentis</i>
LV	Leervektor
MAV	Mevalonat
MD	<i>molecular dynamics</i>
MEP	Methylerythritolphosphat
MKQ	Methode der kleinsen Quadrate
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPG	Monopropylenglykol
mRFP1	monomeres rot fluoreszierendes Protein 1
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MTP	Mikrotiterplatte
n.b.	nicht bestimmbar
n.v.	nicht vorhanden
n.z.	nicht zutreffend
NAD(P)	Nicotinamidadeninucleotid(phosphat)
noSP	kein Signalpeptid (engl. <i>no signal peptide</i> )
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
OL	OmpA-LinD
OLm	OmpA-LinD-mRFP1 (Fusionsprotein)
Om	OmpA-mRFP1
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PDB	Proteindatenbank
P <sub>i</sub>	Phosphat
ppb	Teile pro Milliarde (engl. <i>parts per billion</i> )
ppt	Teile pro Billion (engl. <i>parts per trillion</i> )
rE	relative Einheiten
RE	Restriktionsenzym
Ret.	Retentionszeit
rev	rückwärts (engl. <i>reverse</i> )
RK	Restriktionsklonierung
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SD	Shine-Dalgarno
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )



SEVA	<i>standard european vector architecture</i>
TB	<i>terrific broth</i>
üN	über Nacht
x	mal
YsADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Yokonella</i> sp.
ZS	Zwischensequenz

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>INLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	ENZYME IN DER INDUSTRIE.....	3
1.2	SAURE ENZYMATISCHE KATALYSE.....	5
1.3	(DE)HYDRATASEN.....	6
1.4	LINALOOL DEHYDRATASE-ISOMERASE (LIND).....	8
1.4.1	<i>Struktur und Mechanismus von LinD</i> .....	10
1.4.2	<i>Substratspektrum von LinD</i> .....	15
1.5	KURZKETTIGE ALKENE – WERTVOLLE AUSGANGSSTOFFE FÜR DIE CHEMISCHE INDUSTRIE.....	17
1.5.1	<i>1,3-Butadien</i> .....	18
1.5.2	<i>Isopren</i> .....	20
1.6	ZIELE DER DISSERTATION.....	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>23</b>
2.1	CHEMIKALIEN.....	23
2.2	VERBRAUCHSMATERIAL.....	23
2.3	PUFFER.....	24
2.3.1	<i>Natriumphosphatpuffer</i> .....	24
2.3.2	<i>Reaktionspuffer</i> .....	24
2.3.3	<i>TFBI Puffer</i> .....	24
2.3.4	<i>TFBI Puffer</i> .....	24
2.3.5	<i>Kaliumphosphatpuffer für TB Medium (10x)</i> .....	24
2.3.6	<i>Puffer für P. putida ruhende Zellen</i> .....	25
2.3.7	<i>SDS Probenpuffer (2x)</i> .....	25
2.3.8	<i>SDS-PAGE Färbelösung</i> .....	25
2.3.9	<i>SDS-PAGE Entfärbelösung</i> .....	25
2.3.10	<i>DNA Ladepuffer</i> .....	25
2.3.11	<i>PMSF Lösung</i> .....	25
2.3.12	<i>Transferpuffer (10x)</i> .....	25
2.3.13	<i>TBS Puffer (10x)</i> .....	26
2.3.14	<i>TBS-T Puffer</i> .....	26
2.3.15	<i>Western Blot Blockierlösung</i> .....	26
2.3.16	<i>Western Blot Antikörperlösung I</i> .....	26
2.3.17	<i>Western Blot Antikörperlösung II</i> .....	26
2.3.18	<i>Western Blot Lösung A</i> .....	26
2.3.19	<i>Western Blot Lösung B</i> .....	26
2.3.20	<i>Western Blot Entwicklungslösung</i> .....	26
2.3.21	<i>ISO reaction buffer (5x)</i> .....	27

2.3.22	<i>Gibson Assembly Mastermix</i> .....	27
2.3.23	<i>Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer (50x)</i> .....	27
2.4	ANTIKÖRPER .....	27
2.4.1	<i>Primärer monoklonaler anti-His tag Antikörper aus Maus</i> .....	28
2.4.2	<i>Sekundärer anti-Maus Antikörper aus Hase fusioniert mit Peroxidase</i> .....	28
2.5	MEDIEN .....	28
2.5.1	<i>LB Medium</i> .....	28
2.5.2	<i>TB Medium</i> .....	28
2.5.3	<i>SOC-Medium</i> .....	28
2.5.4	<i>Antibiotika</i> .....	28
2.6	OLIGONUKLEOTIDE .....	29
2.7	PLASMIDE .....	29
2.8	DNA- UND PROTEINSTANDARDS .....	29
2.9	BAKTERIENSTÄMME .....	30
2.9.1	<i>Escherichia coli</i> .....	30
2.9.2	<i>Pseudomonas putida</i> .....	31
2.10	KITS .....	31
2.11	ENZYME .....	31
<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>32</b>
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN .....	33
3.1.1	<i>Isolierung von Plasmid-DNA</i> .....	33
3.1.2	<i>Isolierung genomischer DNA</i> .....	33
3.1.3	<i>Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)</i> .....	33
3.1.4	<i>Kolonie-PCR</i> .....	34
3.1.5	<i>Ortsgerichtete Mutagenese durch QuikChange™</i> .....	35
3.1.6	<i>Sättigungsmutagenese durch overlap extension PCR und „22c-Trick“</i> .....	37
3.1.7	<i>Agarosegelelektrophorese</i> .....	38
3.1.8	<i>Restriktion von DNA</i> .....	39
3.1.9	<i>Ligation von DNA</i> .....	39
3.1.10	<i>Basengenaue Klonierung durch Gibson Assembly</i> .....	40
3.1.11	<i>Sequenzierung von DNA</i> .....	40
3.1.12	<i>Genregulierung durch CRISPRi</i> .....	40
3.1.13	<i>Anpassung der Shine-Dalgarno-Sequenz unter Verwendung des EMOPEC tools</i> .....	41
3.2	ARBEITEN MIT BAKTERIEN .....	43
3.2.1	<i>Bestimmung der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>)</i> .....	43
3.2.2	<i>Erstellung chemisch kompetenter E. coli nach der Rubidiumchloridmethode</i> .....	44
3.2.3	<i>Transformation chemisch kompetenter E. coli</i> .....	44

3.2.4	<i>Erstellung elektrokompenter P. putida</i> .....	45
3.2.5	<i>Transformation elektrokompenter P. putida</i> .....	45
3.2.6	<i>Proteinexpression</i> .....	45
3.2.7	<i>Zellaufschluss</i> .....	46
3.2.8	<i>Stammhaltung in Glycerinstocks</i> .....	47
3.2.9	<i>Quantitativer Nachweis des Abbaus von Crotylalkohol durch Pseudomonas putida</i> .....	47
3.3	<b>ARBEITEN MIT PROTEINEN</b> .....	48
3.3.1	<i>Quantitative Aktivitätsbestimmung von LinD</i> .....	48
3.3.2	<i>Proteinreinigung durch IMAC</i> .....	49
3.3.3	<i>Lyophilisierung</i> .....	49
3.3.4	<i>Kinetiken von LinD in E. coli Ganzzellen</i> .....	49
3.3.5	<i>Fitten von Aktivitätsdaten</i> .....	50
3.3.6	<i>Semiquantitative Expressionsanalyse durch SDS-PAGE</i> .....	51
3.3.7	<i>Semiquantitative Expressionsanalyse durch Western Blot</i> .....	52
3.3.8	<i>Quantifizierung des Gesamtproteingehalts einer Lösung durch microBCA</i> .....	53
3.4	<b>ANALYTIK</b> .....	53
3.4.1	<i>Quantitativer Nachweis durch GC/MS headspace</i> .....	53
3.4.2	<i>Quantitativer Nachweis durch GC/MS</i> .....	54
3.4.3	<i>Fluoreszenzmessung von mRFP1</i> .....	55
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>56</b>
4.1	<b>ETABLIERUNG EINES EXPRESSIONSSYSTEMS FÜR LIND IN E. COLI</b> .....	<b>56</b>
4.1.1	<i>Untersuchung verschiedener Vektoren, Signalsequenzen und E. coli Stämme</i> .....	56
4.2	<b>UNTERSUCHUNG DER AKTIVITÄT VON LIND GEGENÜBER KURZKETTIGEN ALKENOLEN</b> .....	<b>63</b>
4.3	<b>REINIGUNG VON LIND</b> .....	<b>65</b>
4.4	<b>UNTERSUCHUNG DER STABILITÄT</b> .....	<b>67</b>
4.5	<b>QUANTIFIZIERBARKEIT DURCH MRFP1-FUSIONSPROTEIN</b> .....	<b>69</b>
4.6	<b>ETABLIERUNG EINES GANZZELLBASIERTEN ZWEIFASSENSYSTEMS</b> .....	<b>71</b>
4.7	<b>EXPRESSIONSANALYSE VON LIND</b> .....	<b>75</b>
4.7.1	<i>Änderung der externen Expressionsparameter</i> .....	75
4.7.2	<i>Änderung der Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz</i> .....	78
4.8	<b>SEMI-RATIONALE MUTAGENESE</b> .....	<b>79</b>
4.8.1	<i>Substitutionsvarianten</i> .....	80
4.8.2	<i>B-Faktor Analyse</i> .....	84
4.8.3	<i>Alanin-Scan der <math>\alpha</math>-Helix</i> .....	87
4.8.4	<i>Sättigung der Positionen der <math>\alpha</math>-Helix (K103 – D112)</i> .....	88
4.8.5	<i>Bestätigung der Hits der Sättigungen</i> .....	91
4.8.6	<i>Kombinationsvarianten</i> .....	93

4.9	KINETISCHE STUDIEN ZU LIN D.....	97
4.9.1	<i>Kinetik von LinD im ganzzellbasierten Zweiphasensystem</i> .....	97
4.9.2	<i>Kinetische Studien zur Dehydratisierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol durch OmpA-LinD-mRFP1 K103N, R104G, G107T und D112T</i> .....	99
4.9.3	<i>Kinetische Studien zur bifunktionalen Umsetzung von Geraniol und Prenol und Crotylalkohol 101</i> .....	101
4.9.4	<i>Umsetzung von Crotylalkohol und 3-Buten-2-ol</i> .....	105
4.10	PRODUKTION VON CROTYLALKOHOL IN <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> .....	107
4.10.1	<i>Induzierbare Expression</i> .....	108
4.10.2	<i>Konstitutive Expression</i> .....	108
4.10.3	<i>Abbau von Crotylalkohol durch Pseudomonas putida</i> .....	110
4.10.4	<i>Herunterregulierung der Alkoholdehydrogenasen in P. putida EP1 durch CRISPRi</i> .....	112
4.10.5	<i>Untersuchung des genetischen Hintergrunds von P. putida GN346 und EP1</i> .....	115
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>118</b>
5.1	ETABLIERUNG EINES STABILEN UND QUANTIFIZIERBAREN EXPRESSIONSSYSTEMS FÜR LIN D IN <i>E. COLI</i> .....	118
5.1.1	<i>Heterologe Expression von LinD in E. coli</i> .....	119
5.1.2	<i>Reinigung von LinD</i> .....	120
5.1.3	<i>Fusionsprotein OmpA-LinD-mRFP1</i> .....	121
5.1.4	<i>Etablierung eines ganzzellbasierten Zweiphasensystems und mit zugehöriger Analytik</i> ....	122
5.1.5	<i>Expressionsanalyse</i> .....	123
5.2	MUTAGENESESTUDIEN .....	126
5.2.1	<i>Weitere Untersuchung des Mechanismus und reshaping der aktiven Tasche</i> .....	126
5.2.2	<i>B-Faktor Analyse und Kinetik der resultierenden Varianten</i> .....	130
5.2.3	<i>Aktive Form von LinD</i> .....	136
5.3	CROTYLALKOHOLSYNTHESE IN <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> .....	137
5.3.1	<i>1,3-Butadiensynthese</i> .....	140
5.4	AUSBlick.....	141
5.5	POTENTIELLE ANWENDUNGSGEBIETE FÜR LIN D .....	142
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>143</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>154</b>
7.1	OLIGONUKLEOTIDE .....	154
7.2	EXPRESSIONSPASMIDE .....	159



# 1 Einleitung

Enzyme stellen die Katalysatoren der lebenden Zellen dar und werden daher auch häufig als Biokatalysatoren bezeichnet. Die Mehrheit aller natürlich in Zellen ablaufenden chemischen Reaktionen ist enzymkatalysiert. Erst dies ermöglicht, dass die entsprechenden Prozesse unter physiologischen Bedingungen ablaufen können (Kula, 1980). Durch ihre Eigenschaft, chemische Reaktionen unter milden Bedingungen bei gleichzeitig oft hoher Regio- und Stereoselektivität katalysieren zu können, stellen Enzyme interessante Alternativen für eine Reihe von Anwendungen in der organischen Chemie dar (Schmid *et al.*, 2001). Ende des 19. Jahrhunderts wurden Enzyme von Eduard Buchner anhand von Extrakten aus Hefezellen als Katalysator der Spaltung von Glukose zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid identifiziert (Buchner, 1897). Im Jahre 1902 schließlich erhielt Hermann Emil Fischer den Nobelpreis für Chemie für seine Arbeiten zur enzymkatalysierten Hydrolyse von Saccharose (nobelprize.org vom 18.04.2019). Fischer schlug im Rahmen seiner Arbeiten an Hefeenzymen zudem als erster das bis heute anerkannte und durch moderne Methoden bestätigte Schlüssel-Schloss-Prinzip vor, das besagt, dass Enzyme nur Moleküle einer geeigneten Struktur als Substrat akzeptieren können, da sich Enzym und Substrat im Zuge der Katalyse zu einem Komplex zusammenlagern (Fischer, 1894; Horton *et al.*, 2008). Besonders in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden immense Fortschritte im Bereich der Enzymologie erzielt, wobei die Aufklärung der räumlichen Struktur der ersten Proteine die mitunter wichtigste Errungenschaft darstellte. Im Jahre 1956 wurde von Perutz eine Methode beschrieben, mit deren Hilfe das Phasenproblem bei der Aufklärung der Struktur komplexer Moleküle gelöst werden konnte (Perutz, 1956). Diese Entdeckung erlaubte unter anderem, dass 1958 von Kendrew und Kollegen mit Myoglobin die erste Struktur eines Proteins durch Röntgenkristallographie aufgeklärt werden konnte (Kendrew *et al.*, 1958). Ein Jahr später folgte die Aufklärung der Struktur von Hämoglobin durch Perutz und Kollegen (Perutz *et al.*, 1959). Für ihre Entdeckungen auf dem Gebiet der Röntgenstrukturanalyse erhielten Max Ferdinand Perutz und John Cowdery Kendrew 1962 den Nobelpreis für Chemie (Horton *et al.*, 2008). Seither wurden Enzyme für vielfältige technische Anwendungen untersucht und werden heute auch erfolgreich im großindustriellen Maßstab eingesetzt (Schmid *et al.*, 2001). Besonders das Aufkommen neuer molekularbiologischer Methoden, wie etwa der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase*

*chain reaction*; PCR), deren Entdeckung Kary Mullis im Jahre 1983 zugeschrieben wird (Mullis, 1990), ermöglichte die gezielte Evolution von Enzymen im Labor, um den Anforderungen der Industrie gerecht zu werden. Seither wurden viele unterschiedliche Methoden für die gezielte Anpassung von Enzymen entwickelt, die auf rationalen Untersuchungen oder zufälligen Mutationen basieren. Im Zuge eines rationalen Vorgehens werden *in silico*, meist anhand der Kristallstrukturen oder Homologiemodelle von Enzymen, Aminosäurereste identifiziert, deren Austausch verbesserte Eigenschaften mit sich bringen könnten, und diese anschließend im Labor erstellt und getestet. Insbesondere die Arbeiten von Warshel und Kollegen in den späten 1960er Jahren sowie Anfang der 1970er Jahre erbrachten neue Möglichkeiten, erhaltene Proteinstrukturen computerassistent zu untersuchen und so deren biologische Funktionen zu studieren (Lifson und Warshel, 1968; Warshel und Lifson, 1970; Warshel, 1976). Für die Entwicklung von Multiskalenmodellen für komplexe chemische Systeme wurden Arieh Warshel und Michael Levitt 2013 gemeinsam mit Martin Karplus mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet (nobelprize.org vom 18.04.2019). Der rationalen Anpassung eines Enzyms hin zu gewünschten Eigenschaften gegenüber steht die sogenannte gerichtete Evolution, bei der zufällige Mutationen in ein Enzym eingefügt werden. Aus einer sehr großen Anzahl dieser zufällig mutierten Enzymvarianten werden durch geeignete Selektionsmethoden schließlich diejenigen identifiziert, die positiven Einfluss auf die gewünschte Eigenschaft aufweisen (Ulmer, 1983). Für ihre Arbeiten auf dem Gebiet der gerichteten Evolution von Enzymen wurde Frances H. Arnold im Jahre 2018 der Nobelpreis in Chemie verliehen (nobelprize.org vom 18.04.2019). Möglich ist ebenso eine Kombination der beiden Methoden, etwa um *in silico* anhand der Kristallstruktur Bereiche oder Domänen auszumachen, die dann durch gerichtete Evolution mutiert werden. Dies kann die Anzahl an zu untersuchenden Varianten reduzieren.

Im Folgenden soll auf einige industriell relevante Enzyme, die saure enzymatische Katalyse als solche sowie die Enzymklasse der (De)hydratasen mit besonderem Augenmerk auf die Linalool Dehydratase Isomerase (LinD) eingegangen werden. Ferner sollen kurzkettige Alkene, besonders 1,3-Butadien und Isopren, als wertvolle und gefragte Ausgangsstoffe behandelt werden.

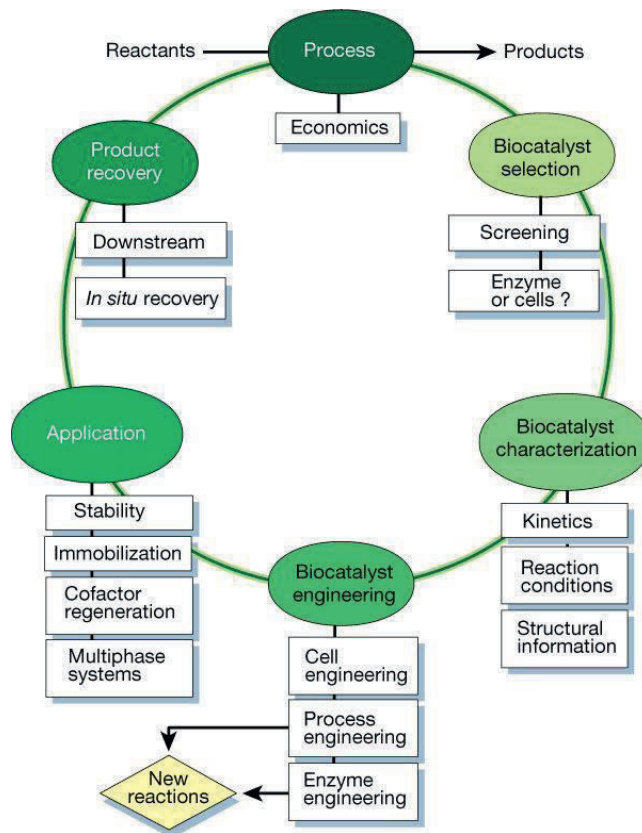


## 1.1 Enzyme in der Industrie

Lange galt die Biokatalyse als Bereich, der zwar ein bedeutendes Potential birgt, gleichsam aber durch verschiedene Limitierungen nur bedingt für die industrielle Anwendung geeignet ist. Die Arbeiten der vergangenen Jahrzehnte zeigten hingegen, dass der wirtschaftliche Einsatz ganzzellbasierter Verfahren sowie isolierter Enzyme einfacher zu realisieren ist als zunächst angenommen wurde, sodass nach und nach chemische Prozesse durch biokatalytische ergänzt oder sogar abgelöst wurden. Hierbei finden isolierte Enzyme häufig Verwendung für Isomerisierungs- oder Hydrolysereaktionen, während Ganzzellansätze besonders dort eingesetzt werden, wo Reaktionen durch den Einsatz von Oxidoreduktasen cofaktorabhängig zu katalysieren sind. Oxidoreduktasen katalysieren Redoxreaktionen, bei denen neben dem Substrat der Cofaktor oxidiert bzw. reduziert wird (Horton *et al.*, 2008). Der Einsatz ganzer Zellen kann das Recyclen der oft teuren Cofaktoren, wie etwa der Nikotinamidcofaktoren  $\text{NAD}^{(+)}/\text{NADP}^{(+)}$ , vereinfachen (Schmid *et al.*, 2001). Als Beispiel für großtechnisch eingesetzte enzymkatalysierte Prozesse ist etwa in der Herstellung von Butanol zu nennen. Bereits 1861 wurde von Pasteur ein Prozess für die Produktion von *n*-Butanol durch mikrobielle Fermentation beschrieben. Die Anwendung dieses Verfahrens erfolgte zunehmend im Zuge des Ersten Weltkriegs. Durch die Aceton-Butanol Fermentation entstand Butanol als Nebenprodukt der gesteigerten Acetonproduktion, wodurch auch die steigende Nachfrage an *n*-Butanol bedient werden konnte (Jones und Woods, 1986). Bis heute sind besonders in der Gattung *Clostridium* verschiedene butanolproduzierende Organismen bekannt, etwa *C. acetobutylicum*, durch Einsatz dessen Butanol ausgehend von Pyruvat mit Ethanol als Nebenprodukt entsteht (Lee *et al.*, 2008). Ferner findet die Aceton-Butanol-Ethanol Fermentation durch *C. beijerinckii* kommerziell Verwendung in der Erzeugung dieser industriell bedeutenden Stoffe (Qureshi und Blaschek, 2001).

Eine weitere industriell relevante enzymkatalysierte Reaktion, die bereits im großtechnischen Maßstab genutzt wird, ist die Hydratisierung von Acrylnitril zu Acrylamid. Chemisch ist diese Reaktion aufwendig umzusetzen, da sie unter Sauerstoffausschluss abzulaufen hat und etwa der kupferbasierte Katalysator schwierig vom entstandenen Produkt abzutrennen ist. Ferner ist bei diesem Prozess die Bildung vom ungewünschten Nebenprodukt Acrylsäure häufig höher als die des eigentlichen Produkts Acrylamid, während gleichzeitig weitere Nebenprodukte wie Nitriltrispropionamide oder Ethylencyanohydrin entstehen können. Enzymatisch läuft die

Reaktion jedoch bei Verwendung der Nitrilhydrataseaktivität aus *Rhodococcus rhodochrous* deutlich selektiver ab, während der Aufarbeitungsprozess deutlich weniger Schritte benötigt (Yamada und Kobayashi, 1996). Auf diese Weise wurden von Nitto Chemical Industry bereits 1996 bis zu 30.000 Tonnen Acrylamid produziert (Yamada *et al.*, 1996). Enzymkatalysierte Prozesse unterscheiden sich von herkömmlichen chemischen Prozessen außerdem in weiteren zu betrachtenden Parametern, die häufig angepasst werden müssen, um einen wirtschaftlichen Prozess erreichen zu können (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Der Zyklus der Biokatalyse.** Abbildung verändert nach Schmid *et al.*, 2001.

Der Suche nach einem geeigneten Biokatalysator schließt sich dessen Charakterisierung in Bezug auf prozessrelevante Parameter an. Durch gezieltes Anpassen des

Biokatalysators kann zudem eine gesteigerte Leistungsfähigkeit des gewählten Systems erreicht werden, etwa durch Verbesserungen der Wirtszelle, des Prozesses an sich oder durch Mutieren des Enzyms an sich im Zuge eines *enzyme engineering* Ansatzes. Ferner ist die Form der Anwendung des so entstandenen Biokatalysators anzupassen. Hierbei stellt sich vor allem die Frage nach der Stabilität der Enzyme unter Prozessbedingungen ebenso wie nach der Möglichkeit eines mehrfachen Einsatzes des Katalysators durch Immobilisierungsverfahren. Ferner ist die Abtrennung eines möglichst reinen Produkts zu berücksichtigen (Schmid *et al.*, 2001).

## 1.2 Saure enzymatische Katalyse

Protonierungen über Säure-Base-Mechanismen stellen eines der wesentlichen Prinzipien der organischen Chemie dar und sind für mannigfaltige chemische Transformationen von großer Bedeutung, etwa bestimmten Diels-Alder Reaktionen, der Nazarov Zyklisierung oder der Friedels-Crafts Alkylierung bzw. Acylierung (Terada, 2008; Rueping *et al.*, 2011; Akiyama 2007). Säure-Base-Mechanismen können sowohl von Lewis- als auch Brønsted-Säuren katalysiert werden, wobei beide Mechanismen auch natürlich von Enzymen genutzt werden. Hierbei finden sich Lewis-Säuren in Enzymen als katalytische Metallionen, etwa in der bereits beschriebenen Nitrilhydratase aus *R. rhodochrous*. Der Mechanismus dieses Enzyms verläuft über die Aktivierung eines Wassermoleküls durch ein als Lewis-Säure fungierendes Cobaltion, wodurch dieses als Nucleophil wirkt und die C≡N-Bindung des Nitrils angreifen kann (Hopmann *et al.*, 2007). Ein weiteres Beispiel stellt die in allen Tieren und photosynthesebetreibenden Organismen sowie einigen nicht-photosynthesebetreibenden Bakterien vorkommende Carboanhydrase dar. Dieses Enzym katalysiert die reversible Hydratisierung von Kohlenstoffdioxid, wobei ein Zinkion als Lewis-Säure ein Wassermolekül aktiviert (Lindskog, 1997). Brønsted-Säure-katalysierte Prozesse finden sich auch bei enzymatischen Reaktionen, bei denen die Säure bzw. Base durch saure oder basische Aminosäuren, wie Asparaginsäure, Glutaminsäure, Histidin, Lysin oder Tyrosin dargestellt wird (Horton *et al.*, 2008). Ein Beispiel für Brønsted-Säure-katalysierende Enzyme besteht in der Squalen-Hopen-Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Dieses Enzym katalysiert die Zyklisierung von Squalen initiiert durch die Protonierung einer C=C-Doppelbindung durch einen Asparaginsäurerest (Hammer *et al.*, 2012). Neben den bereits genannten gibt es in der Natur eine Vielzahl an Enzymen, die Reaktionen

durch die Aktivierung verschiedenster reaktiver Gruppen durch säureinitiierte Protonenübertragung katalysieren, etwa Decarboxylasen (Miyamoto *et al.*, 1992; Matoishi *et al.*, 2004; Miyamoto *et al.*, 2007), Esterasen (Hirata *et al.*, 1999), Lipasen (Sakai *et al.*, 2004) oder Hydratasen (Hiseni *et al.*, 2011; Todea *et al.*, 2015). Aufgrund ihrer häufig niedrigeren Aktivität und Selektivität sind Brønsted-Säure-katalysierende Enzyme im Vergleich zu Lewis-Säure-katalysierenden Enzymen weniger verbreitet (Richard, 1998). Industriell sind enzymatisch katalysierte Protonierungsreaktionen besonders dort interessant, wo chemisch unter sehr harschen Bedingungen mit niedrigen Selektivitäten gearbeitet werden muss, da erstere in der Regel bei deutlich milderen Bedingungen und zumeist in wässrigem Milieu ablaufen (Hammer *et al.*, 2014; Mohr *et al.*, 2009). So etwa bei der selektiven Hydratisierung oder Dehydratisierung durch (De)hydratasen, auf die im folgenden Kapitel genauer eingegangen werden soll.

### 1.3 (De)hydratasen

Die Addition oder Eliminierung von Wasser an nicht-aktivierte C=C Doppelbindungen ist eine sehr interessante Reaktion, die eine mannigfaltige Umwandlung funktioneller Gruppen ermöglicht. Chemisch ist diese Reaktion jedoch nur schwer selektiv umzusetzen und häufig mit dem Auftreten unerwünschter Nebenreaktion sowie oft extremen Reaktionsbedingungen verbunden (Demming, Fischer *et al.*, 2018). So werden für diese Reaktionen in der Regel hohe Temperaturen und Drücke sowie der Einsatz starker Säuren benötigt (Bearne *et al.*, 1995; Resch *et al.*, 2015). Durch die Verwendung von Übergangsmetallkatalysatoren, wie etwa Quecksilberacetat, kann der Markownikow-Regel folgend eine regioselektive Hydratisierung am niedriger substituierten C-Atom einer C=C Doppelbindung erreicht werden (Brown *et al.*, 1967). Der Einsatz von Quecksilberacetat ist jedoch aufgrund seiner hohen Toxizität und seiner Umweltunverträglichkeit für den industriellen Maßstab ungeeignet. Demgegenüber steht die Hydroborierung, bei der durch den Einsatz verschiedener Borane und Wasserstoffperoxid das höher substituierte C-Atom einer C=C Doppelbindung hydratisiert werden kann (Brown, 1961; Brown *et al.*, 1972).

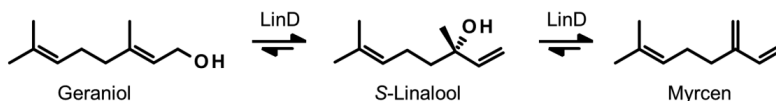
Aufgrund ihrer besseren Umweltverträglichkeit und ihrer teils sehr hohen Selektivität rückten teilweise oder vollständig enzymkatalysierte Reaktionen in den Focus wirtschaftlicher Interessen, etwa bei der Erzeugung optisch aktiver Alkohole. Hierfür wurden in der Vergangenheit verschiedene Routen etabliert. So konnte von Sato und

Kollegen 2011 gezeigt werden, dass die chemische Wacker-Oxidation in Verbindung mit einer Ketoreduktase ausgehend von Styrol in einem Reaktor zu hohen Ausbeuten und exzellentem Enantiomerenüberschuss des Produkts 1-Phenylethanol führte. Hierbei wird unter Einsatz von Kupferchlorid und Palladiumchlorid als Katalysatoren Styrol zunächst zum Keton oxidiert und schließlich enzymatisch zum Alkohol reduziert (Sato *et al.*, 2011). Jedoch ist dieser Prozess wegen der Lösungsmittelunverträglichkeit der Ketoreduktase notwendigen Kompartimentierung technisch aufwändig und ebenso auf den Einsatz von Schwermetallen angewiesen. Eine Alternative stellt die Lipase-katalysierte Racematspaltung von Alkoholen dar. So konnte von Kirchner und Kollegen bereits 1985 die Produktion optisch aktiver Alkohole in Zweiphasensystemen unter Einsatz der Lipase aus Schweinepankreas (PPL) etabliert werden. Im Zuge der Studien konnten so etwa 2-(*S*)-Octanol oder 2-(*S*)-Dodecanol in guten Ausbeuten und mit teils exzellentem Enantiomerenüberschuss erreicht werden (Kirchner *et al.*, 1985). Jedoch ist es für den Einsatz der Racematspaltung notwendig, den entsprechenden Alkohol zunächst chemisch zu synthetisieren. Da viele der bisherigen enzymatischen Alternativen zur Generierung optisch aktiver Alkohole, etwa die Ketoreduktasen (Huisman *et al.*, 2010), Dehydrogenasen (Hummel und Kula, 1989) oder Monoxygenasen (Huijbers *et al.*, 2013), zudem cofaktorabhängig sind, ist die Suche nach cofaktorfreien Enzymen ein unerlässlicher Schritt hin zu wirtschaftlichen Prozessen (Demming, Fischer *et al.*, 2018). Vor diesem Hintergrund wurde die relativ neue Enzymklasse der (De)hydratasen (EC 4.2.1.-) in jüngerer Vergangenheit vermehrt Gegenstand sowohl akademischer als auch industrieller Forschung. (De)hydratasen katalysieren die (De)hydratisierung isolierter sowie konjugierter C=C Doppelbindungen, wobei erstgenannte Reaktionen der Markownikow-Regel folgen (Isenberg *et al.*, 1969). Bereits seit den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wird beispielsweise Äpfelsäure mit Hilfe von Mikroorganismen, etwa Hefen oder Brevibakterien, unter Ausnutzung derer natürlichen Dehydratisierungsmaschinerie ausgehend von Fumarat produziert (Yamamoto *et al.*, 1976; Neufeld *et al.*, 1991). Dehydratisierungsreaktionen sind in der Natur weit verbreitet; sie finden sich beispielsweise in Mitochondrien von Hefe, wo sie an der Synthese gesättigter Fettsäuren beteiligt sind (Kastaniotis *et al.*, 2004), oder in den Peroxisomen in der Rattenleber, wo sie einen Schritt im Abbau von mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysieren (Li *et al.*, 1990). Bis heute ist die kommerzielle Nutzung heterolog exprimierter Dehydratasen wenig verbreitet. Ein Beispiel für heterolog genutzte Dehydratasen besteht in der Produktion von 2-Keto-3-deoxyzuckersäuren. Diese

stellen Schlüsselintermediate im Metabolismus von Arten aus allen drei Domänen des Lebens dar. So sind 2-Keto-3-deoxyzuckersäuren integrale Bestandteile bakterieller Polysaccharide, Lipopolysaccharide und Zellwandbausteine. Matsubara und Kollegen konnten 2014 den vollständigen Umsatz von 3,3 g Gluconsäure zu 2-Keto-3-deoxy-D-gluconsäure (KDG) im 1,5 L Maßstab durch die Aktivität der Gluconatdehydratase (GAD) aus dem hyperthermophilen Crenarcheon *Thermoproteus tenax* zeigen. Für die Produktion von KDG sind chemisch aufwändige mehrstufige Synthesen unter harschen Bedingungen vonnöten, die häufig nicht-selektive Schritte beinhalten (Matsubara *et al.*, 2014). Somit stellt die einstufige GAD-katalysierte Produktion von KDG eine interessante Alternative zur klassischen chemischen Synthese dar.

#### 1.4 Linalool Dehydratase-Isomerase (LinD)

Die Linalool Dehydratase-Isomerase (LinD) ist ein bifunktionales Enzym, das 2010 erstmals aus Rohextrakten des fakultativ anaeroben  $\beta$ -Proteobakteriums *Castellaniella defragrans* isoliert wurde, wobei seine Funktion mit dem Abbau von Monoterpenen in Verbindung gebracht wurde (Brodkorb *et al.*, 2010). LinD katalysiert hier die selektive Hydratisierung von Myrcen zu *S*-Linalool und ebenso die Isomerisierung von *S*-Linalool zu Geraniol (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Natürliche Reaktion der Linalool Dehydratase-Isomerase (LinD).**

In ersten Studien konnten Brodkorb und Kollegen LinD mit einer Ausbeute von 0,02% des gesamten löslichen Extrakts aus *C. defragrans* 65Phen isolieren. Das Enzym wurde als Homotetramer und die Masse eines Monomers mit 40 kDa beschrieben. Obwohl das Gleichgewicht der natürlichen LinD-katalysierten Reaktion aufgrund der thermodynamisch höheren Stabilität weit auf der Seite von Myrcen liegt, schlagen die Autoren vor, dass das Enzym am ersten Schritt des Abbaus von Myrcen durch Hydratisierung beteiligt ist. Die nicht-favorisierte Reaktion wird in *C. defragrans* durch die Weiteroxidation von Geraniol über Geranial zu Geranialsäure und die damit einhergehende Verschiebung des chemischen Gleichgewichts aufrechterhalten (Brodkorb *et al.*, 2010). Da die Aktivität von LinD nicht durch den Einsatz von EDTA

beeinflusst wird, ist davon auszugehen, dass das Enzym keine Metallionen für die Katalyse benötigt. Folgende biochemische Studien zeigten ein Temperaturoptimum für LinD bei 35 °C sowie ein pH-Optimum im leicht alkalischen Bereich auf, während die Aktivität bei pH größer 9,0 deutlich abfiel. Ferner konnte gezeigt werden, dass LinD nicht mit einem Cofaktor assoziiert. Ebenso deutet die Tatsache, dass LinD sensitiv gegenüber molekularem Sauerstoff ist und schwach reduzierende Reagenzien nötig sind, um volle Aktivität zu gewährleisten, darauf hin, dass das Reduktions- bzw. Oxidationsstadium einiger Reste des Enzyms entscheidend für effiziente Katalyse ist (Brodkorb *et al.*, 2010). Das offene Leseraster des Enzyms konnte identifiziert und somit gezeigt werden, dass LinD aus 397 Aminosäuren besteht, wobei die ersten 27 N-terminalen Aminosäuren einem Signalpeptid entsprechen, was starke Hinweise auf die natürlicherweise periplasmatische Expression des Enzyms liefert. Da weder  $\alpha$ - noch  $\beta$ -Ocimen und ebenso weder Citronellol noch Nerol von LinD als Substrat akzeptiert werden, kann eine sehr spezifische Bindetasche des Enzyms angenommen werden (Brodkorb *et al.*, 2010). Weitere Studien von Lüddecke und Harder (2011) zeigten auf, dass LinD  $\beta$ -Myrcen enantioselektiv zu *S*-(+)-Linalool (Coriandrol) umsetzt (*ee* > 95,4%).

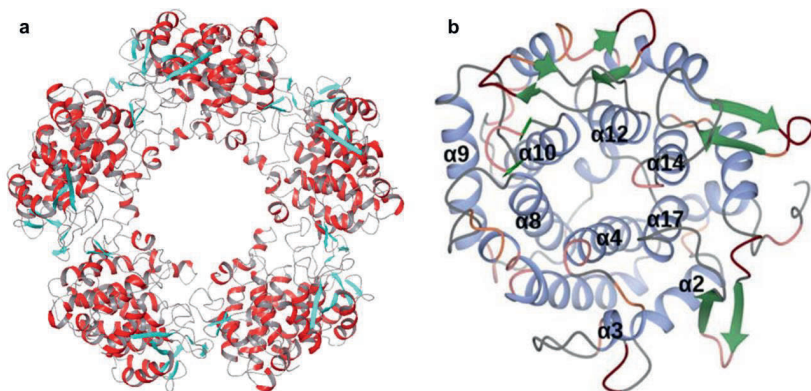
Bis heute sind nur zwei enzymatische Aktivitäten bekannt, die ähnliche Reaktionen wie LinD katalysieren, von denen jedoch nur das 2016 von Marmulla und Kollegen beschriebene Enzym Linalool Isomerase (Lis) aus *Thauera linaloolentis* 47Lol charakterisiert wurde. Lis katalysiert die reversible Isomerisierung von Linalool zu Geraniol. Das Protein wurde anhand seiner Aminosäuresequenzähnlichkeit zu LinD von 20% identifiziert. Lis besteht aus 644 Aminosäuren und weist keine Signalsequenzen, etwa für den Transport in Periplasma, auf. N-terminal konnten innerhalb der ersten 139 Aminosäuren von Lis vier Transmembrandomänen identifiziert werden, während der C-terminale Teil (Aminosäuren 140-644) cytoplasmatisch gefaltet vorliegt. Die Sequenzähnlichkeit zu LinD besteht hauptsächlich im C-terminalen Teil. Ebenso wie bei LinD konnte eine Aktivität von Lis nur unter reduzierenden Bedingungen nachgewiesen werden. Bezogen auf die Substrataffinität sowie den pH- und Temperaturbereich weist Lis ebenfalls Ähnlichkeiten zu LinD auf, jedoch konnte kein Dehydratisierungsprodukt in Lis-katalysierten Reaktionen detektiert werden. Ferner erzeugt Lis im Gegensatz zu LinD sowohl *R*- als auch *S*-Linalool als Isomerisierungsprodukte ausgehend von Geraniol (Marmulla *et al.*, 2016). Die zweite LinD-ähnliche enzymatische Aktivität wurde 2010 von Thompson und Kollegen in *Rhodococcus erythropolis* MLT1 gefunden. In Biotransformationen mit ruhenden Zellen des Stamms unter Verwendung von Myrcen als

Substrat konnte unter aeroben Bedingungen die Produktion von Geraniol beobachtet werden, unter anaeroben Bedingungen, wie im Fall von *C. defragrans*, jedoch nicht. Durch Wachstum von *R. erythropolis* auf Myrcen konnte im Vergleich zu Kontrollen auf Glukose die Hochregulierung von vier Proteinen nachgewiesen werden, wobei keine weiterführenden Charakterisierungen der entsprechenden Enzyme durchgeführt wurde, weswegen das oder die verantwortliche(n) Enzym(e) bislang nicht identifiziert wurde(n) (Thompson *et al.*, 2010).

Erst kürzlich wurde im Vorfeld zur vorliegenden Arbeit die Kristallstruktur von LinD zeitgleich von Nestl und Kollegen (2017) sowie Weidenweber und Kollegen (2016) gelöst.

### 1.4.1 Struktur und Mechanismus von LinD

Im Gegensatz zu bisherigen Annahmen zeigten erste Kristallstrukturen im Rahmen der Arbeiten von Nestl und Kollegen (2017), dass das Enzym ein Homopentamer bildet, wobei die jeweiligen Untereinheiten hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices bestehen und eine  $(\alpha, \alpha)_6$  Fassfaltung aufweisen (Abbildung 3). Diese Beobachtungen konnten in unabhängigen Studien von Weidenweber und Kollegen bestätigt werden, die 2016 ebenfalls die Kristallstruktur der LinD (PDB: 5HLR) lösten.

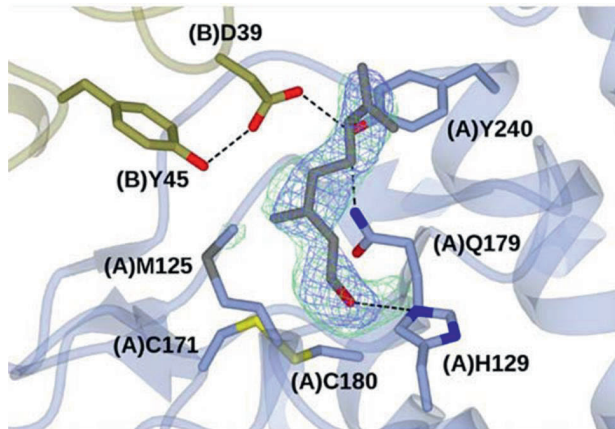


**Abbildung 3: Kristallstruktur der Linalool Dehydratase Isomerase (LinD).** a, homopentamere Struktur in *ribbon* Darstellung farbkodiert auf Sekundärstrukturelemente ( $\alpha$ -Helices in rot,  $\beta$ -Faltblätter in cyan; PDB: 5G1W); b, Darstellung eines Monomers in  $(\alpha, \alpha)_6$ -Fassfaltung. Abbildung b verändert nach Nestl, Fischer *et al.* (2017).

Durch *soaking* mit dem natürlichen Substrat Geraniol konnte gezeigt werden, dass die aktive Tasche an der Berührungsfläche zweier benachbarter Monomere liegt und aus den



Aminosäurereste M125, C171, C180, H129, Q179 und Y240 aus Kette A sowie D39 und Y45 aus Kette B besteht (Abbildung 4; Nestl, Fischer *et al.*, 2017).



**Abbildung 4: Aktive Tasche der Linalool Dehydratase-Isomerase (LinD).** Die aktive Tasche befindet sich an der Berührungsfäche zweier benachbarter Monomere und wird aus Aminosäuren aus beiden Ketten gebildet. Die Reste M125, C171, C180, H129, Q179 und Y240 sind Teil von Kette A (dargestellt in blau), während sich die Reste D39 und Y45 auf Kette B (dargestellt in gelb) befinden. Abbildung verändert nach Nestl, Fischer *et al.* (2017).

Die Analyse strukturell verwandter Monomere im Zuge der Studie von Nestl und Kollegen zeigte, dass LinD strukturelle Ähnlichkeiten sowohl mit der Rhamnogalacturonylhydrolyase aus *Bacillus subtilis* (Itoh *et al.*, 2006; PDB: 2GH4) als auch der Cellobiose-2-epimerase aus *Ruminococcus albus* (Fujiwara *et al.*, 2013; PDB: 3VW5) aufweist. Beide Enzyme weisen mit 8% und 6% jedoch nur recht geringe Sequenzidentitäten mit LinD auf. Für die Rhamnogalacturonylhydrolyase, die ebenso eine Dehydratisierungsreaktion katalysiert, konnte jedoch durch Überlagerung der Strukturen eine Homologie der Enzyme nachgewiesen werden. Die Ausbildung einer  $(\alpha, \alpha)_6$  Fassfaltung ist für Enzyme mit ähnlicher Funktion nicht ungewöhnlich. Farnesyltransferasen weisen ebenso  $(\alpha, \alpha)_6$  Fassfaltungen auf und sind an der Terpenbiochemie beteiligt. Die als Monomer fungierende Farnesyltransferase aus *Rattus norvegicus* (Long *et al.*, 1998; PDB: 1FT2) etwa weist eine Sequenzidentität zu LinD von 12% auf (Nestl, Fischer *et al.*, 2017). Die Lokalisierung der aktiven Tasche an der Berührungsfäche zweier Untereinheiten ist für  $(\alpha, \alpha)_6$  Proteine hingegen ungewöhnlich und war bislang nicht bekannt (Wendt *et al.*, 1997).

Substitutionsvarianten im Rahmen der Arbeiten von Nestl und Kollegen (2017) zeigten fünf Reste auf, die an der Katalyse der Isomerisierungs- sowie der Dehydratisierungsreaktion beteiligt sind, Y45, M125, H129, C171 und C180. Relative Aktivitäten der Varianten sind in Abbildung 5 dargestellt. Untersucht wurde der Einfluss der Varianten T45F, M125A, H129A, C171A und C180A auf die Isomerisierung und Dehydratisierung von Geraniol zu Myrcen sowie auf die Dehydratisierung von *S*-Linalool zu Myrcen, wobei die Aktivitäten auf die des Wildtyps normiert wurden.

LinD Variante	WT	Y45F	M125A	H129A	C171A	C180A
<b>Norm. Aktivität [%]</b>	100	20	2	30	< 0.5	< 0.5

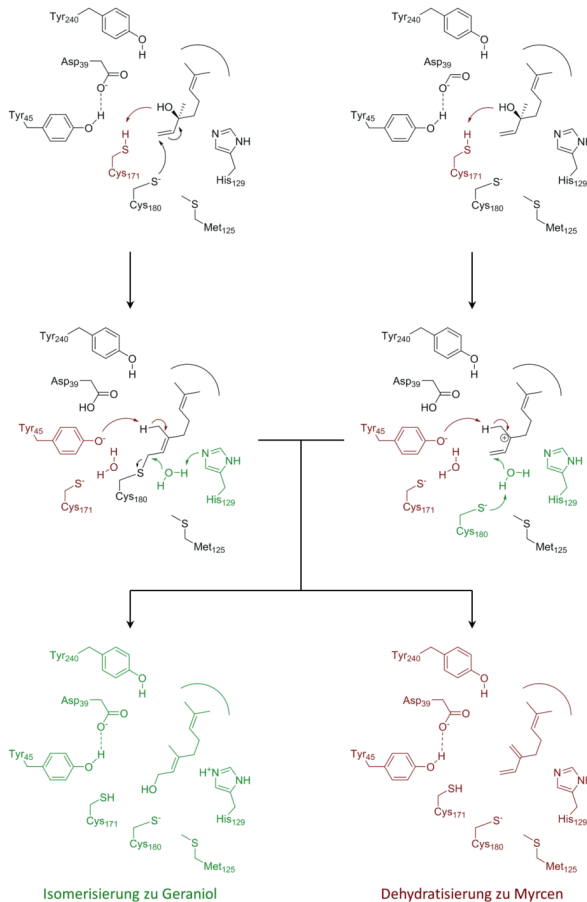
  

The diagram illustrates the enzymatic conversion of Geraniol to Myrcen. Geraniol (a diene with a primary alcohol) is first converted to *S*-Linalool (a diene with a secondary alcohol) by the enzyme LinD. *S*-Linalool is then converted to Myrcen (a diene with a terminal double bond) by LinD. Dashed arrows indicate the overall conversion from Geraniol to Myrcen.

LinD Variante	WT	Y45F	M125A	H129A	C171A	C180A
<b>Norm. Aktivität [%]</b>	100	< 1	< 1	7	< 0.5	< 0.5

**Abbildung 5:** Einfluss von Substitutionsvarianten der putativ an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste auf die Aktivität der Linalool Dehydratase Isomerase (LinD) gegenüber den natürlichen Substraten Geraniol und Linalool. Oben, Einfluss auf die Isomerisierung und Dehydratisierung von Geraniol zu Myrcen; unten, Einfluss auf die Dehydratisierung von Linalool zu Myrcen. Die Aktivitäten der Varianten ist normiert in Relation zu der Aktivität des Wildtyps (WT) angegeben.

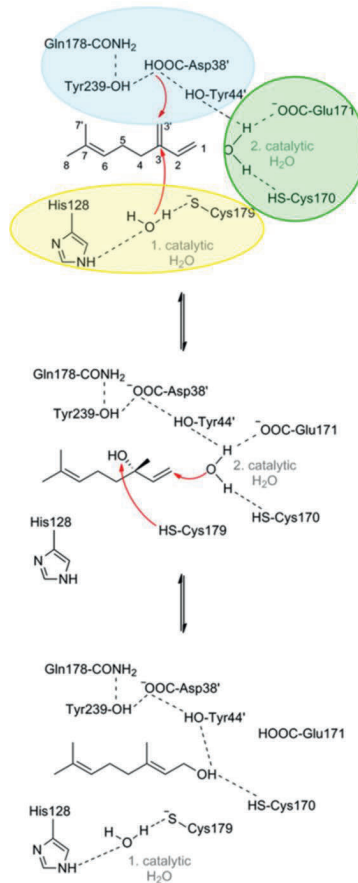
Auf der Grundlage der Aktivitätsdaten der Substitutionsvarianten sowie der Kristallstruktur wurden von Nestl und Kollegen zwei mögliche Mechanismen der Isomerisierungs- sowie der Dehydratisierungsreaktion postuliert, wobei einer über ein kovalent gebundenes Intermediat und der andere über ein carbokationisches abläuft. Die beiden Mechanismen werden durch die Protonierung der Hydroxygruppe von Linalool initiiert und sind in Abbildung 6 aufgezeigt.



**Abbildung 6: Vorgeschlagene Mechanismen der Linalool Dehydratase-Isomerase (Lind) in Bezug auf die Isomerisierung von S-Linalool zu Geraniol sowie die Dehydratisierung zu Myrcen nach Nestl und Kollegen (2017).** Im Zuge des kovalenten Mechanismus (links) protoniert Cys171 die OH-Gruppe von S-Linalool, was im Abgang von Wasser resultiert, während Cys180 S-Linalool nucleophil am terminalen Alken angreift. Somit bildet sich ein kovalent gebundenes Thioesterintermediat aus. Durch die Relokalisierung von Met125 wird die Bindung und Aktivierung eines Wassermoleküls durch His129 ermöglicht, wodurch das so aktivierte Wassermolekül hydrolytisch das kovalente Intermediat spaltet und Geraniol entsteht (grün). Die in braun dargestellte Dehydratisierung von Myrcen wird durch die Abstrahierung eines Protons der Methylgruppe von Linalool durch das durch Asp39 deprotonierte Tyr45 erreicht, wodurch Myrcen entsteht. In einem Säure-Base-katalysierten Mechanismus (rechts) verläuft die Isomerisierung von S-Linalool zu Geraniol (grün) sowie die Dehydratisierung zu Myrcen (braun) über ein carbokationisches Intermediat. Hierbei wird initial ebenfalls die OH-Gruppe von S-Linalool durch Cys171 protoniert und ein Wassermolekül freigesetzt. Durch Deprotonierung der Methylgruppe durch Tyr45 wird das carbokationische Intermediat in der Dehydratisierungsreaktion zu Myrcen gequenchet, während die Addition eines durch Cys180 oder His129 aktivierten Wassermoleküls in der Isomerisierungsreaktion zu Geraniol resultiert. Abbildung verändert nach Nestl, Fischer *et al.* (2017).

Ferner wurde von Weidenweber und Kollegen (2016) ein weiterer Säure-Base Mechanismus postuliert, in dem die katalytischen Reste sowie Wassermoleküle in drei *cluster* unterteilt wurden (Abbildung 7). *Cluster* I wird hier von C180, H129, Y73 und einem Wassermolekül gebildet, während *cluster* II D39, Y45, Y240 und Q179 sowie putativ ein katalytisches Wassermolekül beinhaltet. *Cluster* III besteht aus C171, Q172 und Y45, wobei hier für alle Reste die entsprechende Nummerierung nach Nestl und Kollegen (2017) verwendet wird. Dem postulierten Mechanismus zufolge wird die Isomerisierungsreaktion von Geraniol zu *S*-Linalool durch den nukleophilen Angriff des katalytischen Wassermoleküls aus *cluster* I eingeleitet, wodurch es zu einer allylischen Umlagerung und der Abspaltung der Hydroxylgruppe, wobei Q172 aus *cluster* III als Protonendonator fungiert, kommt. Ferner wird postuliert, dass die Dehydratisierung von *S*-Linalool zu Myrcen durch Deprotonierung an C3' *via* D39 oder Y45 aus *cluster* II und Dehydroxylierung von C3 durch Protonierung eingeleitet wird, wobei das katalytische Wasser aus *cluster* I freigesetzt wird (Weidenweber *et al.*, 2016).

In einer Studie von Ling und Kollegen aus dem Jahr 2018 wurden die von Nestl und Kollegen postulierten Mechanismen sowie der von Weidenweber und Kollegen vorgeschlagene Mechanismus durch einen kombinierten quanten- und molekularmechanischen (QM/MM) Ansatz überprüft. Die hieraus resultierenden Modelle lassen die von Nestl und Kollegen postulierten Mechanismen aufgrund von strukturellen Änderungen in der aktiven Tasche sowie der Protonierungsstadien der katalytischen Maschinerie unwahrscheinlich erscheinen (Ling *et al.*, 2018). Die Ergebnisse der Studie bestätigen hingegen den von Weidenweber und Kollegen postulierten Mechanismus. Im Zuge derselben Studie wurde außerdem die Möglichkeit einer direkten LinD-katalysierten Umsetzung von Myrcen zu Geraniol *in silico* untersucht. Aufgrund der relativ niedrigen totalen Energiebarriere dieses direkten Wegs, die etwas niedriger als die des initialen Hydratisierungsschritts von Myrcen liegt, ergab sich, dass die direkte Umsetzung von Myrcen zu Geraniol theoretisch möglich ist (Ling *et al.*, 2018).

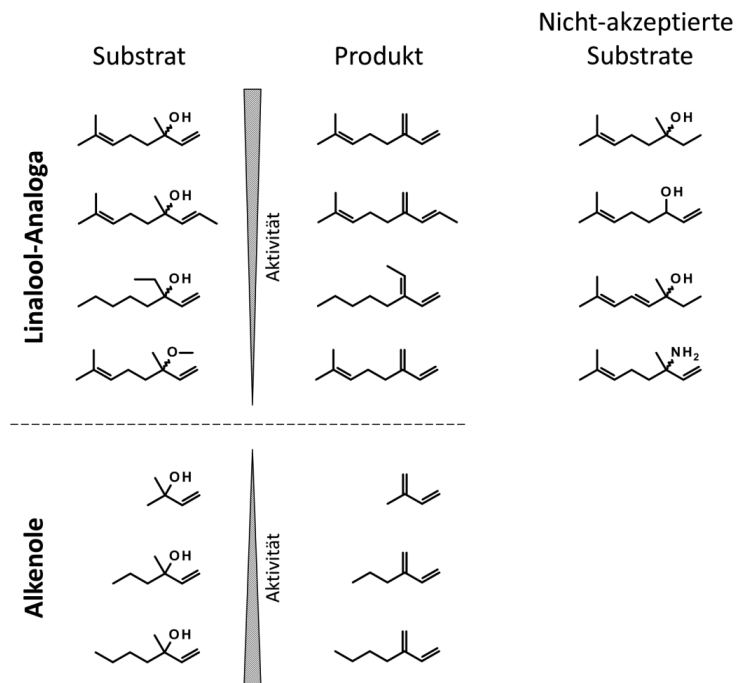


**Abbildung 7: Postulierter Mechanismus der Linalool Dehydratase-Isomerase von Myrcen über S-Linalool zu Geraniol nach Weidenweber und Kollegen (2016).** Die putativ katalytischen *cluster* sind farbig hervorgehoben (*cluster* I, gelb; *cluster* II, blau; *cluster* III, grün). Abbildung verändert nach Weidenweber *et al.* (2016).

#### 1.4.2 Substratspektrum von LinD

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LinD neben dem natürlichen Substrat Geraniol weitere Substrate für die Isomerisierung akzeptiert, die hauptsächlich in der Kettenlänge des Terpenrests variieren. Ferner werden neben dem natürlichen Substrat Linalool weitere Substrate für die Dehydratisierung akzeptiert, solange diese die in Linalool vorkommende terminale Methylvinylalkoholgruppe oder ähnliche Derivate hiervon tragen (Nestl, Fischer *et al.*, 2017). So resultieren beispielsweise Änderungen des Doppelbindungsmusters oder die Umwandlung der Endgruppe in eine Ethylvinyl-

alkoholgruppe in Aktivität, wenn auch geringer als die des Wildtyps (Abbildung 8). Ebenso ist eine LinD-katalysierte Demethoxylierung unter Abspaltung von Methanol anstelle von Wasser möglich. Wird die terminale Methylvinylalkoholgruppe jedoch zu stark geändert, etwa durch Wegfall der Vinylfunktionalität, der Entfernung der Methylgruppe oder durch Einführen einer Aminogruppe anstelle der Alkoholfunktion, wird das entsprechende Molekül nicht mehr als Substrat akzeptiert (Abbildung 8; Nestl, Fischer *et al.*, 2017).



**Abbildung 8: Substratspektrum der Linalool Dehydratase-Isomerase (LinD).** Das Substratspektrum von LinD beinhaltet neben Analoga zum natürlichen Substrat Linalool (oben) auch Alkenole variierender Kettenlänge. Hierbei wurden unterschiedliche Aktivitäten von LinD gegenüber den entsprechenden Substraten festgestellt. Rechts dargestellt sind Beispiele nicht-akzeptierter Substrate. Abbildung verändert nach Nestl, Fischer *et al.* (2017).

Wie in Abbildung 8 dargestellt, konnte bereits gezeigt werden, dass LinD Substrate bis hinab zu C5-Alkenolen akzeptiert, was das besondere Potential des Enzyms für die Dehydratisierung kurzkettiger Alkenole zu den entsprechenden Alkenen verdeutlicht. Auf diese technisch und kommerziell sehr interessanten Stoffe soll im Folgenden gesondert eingegangen werden.

## 1.5 Kurzkettige Alkene – wertvolle Ausgangsstoffe für die chemische Industrie

Kurzkettige Alkene sind für die chemische Industrie von großem Interesse, da sie als Ausgangsstoffe für die Synthese mannigfaltiger kurzkettiger Produkte sowie Polymere benötigt werden. Beispiele hierfür stellen etwa Alkohole, Aldehyde oder Nitrile sowie Kunststoffe und -fasern, Pharmazeutika, Insektizide, Klebstoffe oder Lösungsmittel dar. Klassisch werden kurzkettige Alkene wie Ethen, Propen, 1- und 2-Buten oder 1,2- und 1,3-Butadien in *steam crackern* aus der leichten Erdölfraktion Naphtha gewonnen. Dieser Prozess erfordert jedoch den Einsatz gewaltiger Energiemengen; so werden bis zu 40% der Energie, die in der gesamten petrochemischen Industrie aufgebracht wird, durch den Betrieb der *steam cracker* benötigt, weswegen der Prozess wegen seiner Klimaunverträglichkeit in der Kritik steht (Yoshimura *et al.*, 2000). Ein großes Manko stellt zudem das ungünstige Verhältnis der zu erhaltenden Produkte dar. Je nach Fahrweise eines *steam crackers* kann die Produktverteilung deutlich variieren. Ein entscheidendes Maß der Fahrweise ist die sogenannte Severität, die durch die Temperatur des Prozesses gesteuert wird und an die jeweilige Qualität des Naphthas angepasst werden kann, wobei höhere Temperaturen in der Regel eine höhere Severität zur Folge haben und *vice versa* (Golombok *et al.*, 2001). Typischerweise können aus Naphtha etwa 30% Ethen, etwa 16% Propen und nur etwa 10% ungesättigte C4- Fragmente, Butene, Butadiene und Isobuten, erreicht werden (Behr *et al.*, 2010), wobei der Anteil der C4-Fragmente bei einer hohen Severität weiter sinken kann. Gerade diese ungesättigten C4-Fragmente sind jedoch Ausgangsstoffe für kommerziell interessante Verbindungen wie beispielsweise Polyisobuten, Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymere oder Styrol-Butadien-Kautschuk. So wurden beispielsweise 2012 weltweit etwa 5,4 Mt Styrol-Butadien-Kautschuk, hauptsächlich in der Reifen- und Transportbandherstellung, verbraucht (Tse *et al.*, 2004; ceresana.com vom 07. August 2018). Die Reduzierung des Energieaufwands bei der Herstellung dieser begehrten Rohstoffe könnte durch weniger umweltschädliche biokatalytische Verfahren realisiert werden.

Bei der Herstellung von Ethanol haben sich fermentative Verfahren bereits zu kommerziell interessanten Alternativen entwickelt. Ethanol stellt einen immer wichtiger werdenden Rohstoff, in erster Linie für die Kraftstoffindustrie, dar, das hier als „grüner“ Zusatz fossilen Kraftstoffen in steigenden Mengen beigemischt wird oder sogar in Reinform als vollwertiger Ersatz fungieren kann (Olsson *et al.*, 1996; Bai *et al.*, 2008).

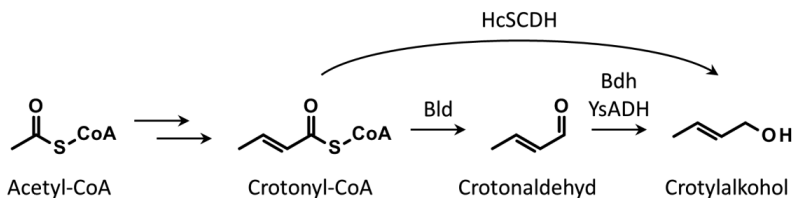
Jedoch kann fermentativ gewonnenes Ethanol auch für weitere Veredelungsprozesse hin zu hochwertigeren Produkten eingesetzt werden. So stellt die Firma Braskem S.A. aus São Paulo (Brasilien) ausgehend von aus Zuckerrohr fermentativ gewonnenem Ethanol durch Dehydratisierung Ethen her. Dieses wird in einem weiteren chemischen Schritt zu Polyethylen polymerisiert, einem vollwertig recyclebaren Biokunststoff. Mit einer Kapazität von ca.  $200.000 \text{ t a}^{-1}$  ist diese Anlage die größte, die bis dato weltweit in Betrieb genommen wurde (chemicals-technology.com vom 07. August 2015). Im Folgenden soll mit 1,3-Butadien und Isopren auf zwei kurzketzige Alkene mit großer wirtschaftlicher Bedeutung vertiefend eingegangen werden.

### 1.5.1 1,3-Butadien

Von den beiden vorkommenden Isomeren von Butadien, 1,2-Butadien und 1,3-Butadien, hat letzteres eine deutlich größere industrielle Bedeutung. 1,3-Butadien stellt einen wichtigen Rohstoff für die Produktion verschiedener Polymere mit großer wirtschaftlicher Bedeutung dar, etwa die synthetischen Kautschuke Styrol-Butadien-Kautschuk, Polybutadien oder Adiponitril, die in der Herstellung von Nylon, Autoreifenkautschuk oder Schläuchen für verschiedenste technische Anwendungen Verwendung finden (Morrow, 1990; White, 2007). Am Beispiel von Adiponitril lässt sich die wirtschaftliche Bedeutung von 1,3-Butadien verdeutlichen. Nach der Explosion einer chinesischen Fabrik im Jahre 2015 kam es zu einem Engpass in der Produktion von Adiponitril, der einen globalen Mangel an Nylon 6,6 zur Folge hatte, der bis heute andauert. Der Preis von Nylon 6,6 betrug somit Ende 2018  $\$ 5,00 \text{ kg}^{-1}$ , ein Anstieg von  $\$ 2,00$  im Vergleich zum Vorjahr (Tullo, 2018). Die rasante Preisentwicklung von Nylon 6,6 könnte sich nach Angaben der ICIS AG (London, Vereinigtes Königreich) in Europa bis 2022 fortsetzen (icis.com aufgerufen am 15.01.2019). Adiponitril wird weltweit von drei Firmen im technischen Maßstab hergestellt, von denen zwei eine Syntheseroute ausgehend von einer Hydrocyanierung von 1,3-Butadien und Blausäure nutzen (Tullo, 2018). Für die wirtschaftliche Produktion von 1,3-Butadien wiederum sind drei Wege etabliert, (i) *steam cracking* von paraffinischen Kohlenwasserstoffen, (ii) katalytische Dehydrogenierung von *n*-Butan oder *n*-Buten sowie (iii) die oxidative Dehydrogenierung von *n*-Buten. 95% des weltweit produzierten 1,3-Butadien werden jedoch, wie in 1.5 beschrieben, durch *steam cracking* als Nebenprodukt der Ethenproduktion gewonnen. Im Jahr 2004 wurde der weltweite Bedarf an 1,3-Butadien auf über 9 Mt geschätzt (White, 2007). Wegen der aufgeführten Probleme besteht



weltweit Bedarf an einer nachhaltigen und günstigen Alternative für die auf Öl basierende Produktion von 1,3-Butadien. Eine Möglichkeit besteht hierbei in der Herstellung ausgehend von fermentativ gewonnenem Crotylalkohol. In verschiedenen Patenten sowie Studien sind Wege beschrieben worden, Crotylalkohol enzymatisch ausgehend von Crotonyl-CoA herstellen zu können. Drei mögliche Wege sind in Abbildung 9 dargestellt. Eine Möglichkeit besteht in der Kombination der Butyryl-CoA-Dehydrogenase Bld und der Butanoldehydrogenase Bdh aus *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, die in Kombination bereits effektiv für die Reduktion von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu 1,4-Butandiol in *E. coli* Ganzzellen verwendet wurden (Hwang *et al.*, 2014). Die Reduktion von Crotonaldehyd zu Crotylalkohol wurde außerdem in einer 2014 veröffentlichten Studie von Ying und Kollegen unter Verwendung einer Alkoholdehydrogenase aus *Yakonella* sp. (YsADH) durchgeführt, was in Umsätzen von über 96% resultierte. In einem Patent aus dem Jahr 2013 wurde für die Produktion von 1,3-Butadien ebenso ein Weg über Crotonyl-CoA beschrieben, bei dem mit *short chain dehydrogenase-like protein* ein bifunktionaler Enzymkomplex aus *Hahella chejuensis* eingesetzt wurde, der sowohl die Reduktion von Crotonyl-CoA zu Crotonaldehyd als auch die weitere Reduktion zu Crotylalkohol katalysiert (Marlière, 2013).



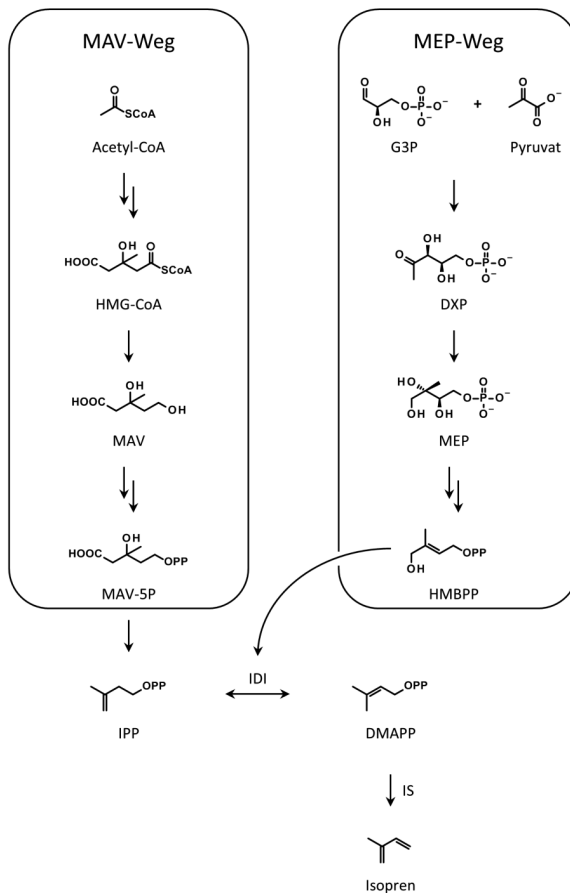
**Abbildung 9: Enzymatische Route zu Crotylalkohol ausgehend von Acetyl-CoA.** Bld, Butyryl-CoA-Dehydrogenase aus *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*; Bdh, Butanoldehydrogenase aus *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*; YsADH, Alkoholdehydrogenase aus *Yakonella* sp.; HcSCDH, Short chain dehydrogenase-like protein aus *Hahella chejuensis*.

In diesem Patent wird von Marlière für die weitere Prozessierung die Phosphorylierung zu Crotylphosphat und schließlich die Dephosphorylierung zu 1,3-Butadien genutzt. Im selben Jahr wurde zudem ein weiteres Patent angemeldet, das die Produktion von 1,3-Butadien über verschiedene enzymatische Wege beschreibt, unter anderem durch Einsatz von Dehydratasen ausgehend von Butandiolen oder Butenolen, Isoprensynthasen ausgehend von Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentylpyrophosphat (IPP) oder Decarboxylasen ausgehend von  $\beta$ -Hydroxypentensäuren (Pearlman *et al.*, 2013).

Eine weitere enzymatische Möglichkeit zu Herstellung von 1,3-Butadien wird in einem Patent von 2018 beschrieben. Hier werden ebenfalls Decarboxylasen für die Umsetzung Penten- und Pentadiensäuren, die enzymatisch über Ketoaleryl-CoA synthetisiert wurden, genutzt. Ferner wird die Möglichkeit beschrieben, Crotylalkohol, der über Crotonyl-CoA aus  $\gamma$ -Hydroxy- oder  $\omega$ -Hydroxybutyryl-CoA erzeugt wurde, enzymatisch zu dehydratisieren (Schreiner Garcez Lopes *et al.*, 2018).

### 1.5.2 Isopren

Isopren, auch 2-Methyl-1,3-butadien, ist ein zweifach ungesättigter C<sub>5</sub> Kohlenwasserstoff, der in der pflanzlichen Biosynthese eine entscheidende Rolle spielt. So besteht natürlicher Kautschuk, der von dikotyledonen Angiospermen synthetisiert wird, hauptsächlich aus *cis*-1,4-Polyisopren, das durch Polykondensation aus den aktivierten Isoprenen Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentylpyrophosphat (IPP) gebildet wird (Greve, 2012). Ferner bestehen auf ähnlichem Wege gewonnene Terpene und Terpenoide der „Isoprenregel“ zufolge aus Oligomeren von Isopren (Ruzicka, 1953). Isopren wird in der Pflanze aus DMAPP durch die Aktivität der in Chloroplasten lokalisierten Isoprensynthase erzeugt (Silver und Fall, 1991). Neben seiner Funktion in der Synthese von Kautschuk sowie Terpenen und Terpenoiden ist Isopren ferner einer der im größten Umfang von Pflanzen in die Umwelt abgegebene Stoff. Die durchschnittliche globale Emissionsrate von Isopren beträgt zwischen 175 und 503 Mt a<sup>-1</sup> (Möller, 2003); die atmosphärische Konzentration liegt im Mittel im ppb bis ppt Bereich (Kesselmeier und Staudt, 1999). Gründe für die pflanzliche Isoprenemission könnten in erhöhter Thermotoleranz, dem Abbau atmosphärischer reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) oder in der Freisetzung überschüssiger Energie liegen (Sharkey, 2008). Technisch wird Isopren hauptsächlich als Nebenprodukt der Ethenproduktion durch *steam cracking* hergestellt, wobei ca. 95% des gewonnenen Isoprens für die Herstellung von Kunstkautschuk verwendet werden (Chauvel und Lefebvre, 1989). Aufgrund der Umweltunverträglichkeit des *steam crackings* wurde in der Vergangenheit vermehrt nach alternativen biotechnologischen Verfahren gesucht, um die Produktion von erdölbasierten Rohstoffen zu entkoppeln. Abbildung 10 zeigt zwei mögliche Wege hierfür auf.



**Abbildung 10: Enzymatische Route zu Isopren ausgehend von Acetyl-CoA (MAV-Weg) oder G3P und Pyruvat (MEP-Weg).** Links, Route ausgehend von Acetyl-CoA über Mevalonat (MAV). Nach Diphosphorylierung durch Kinasenaktivität wird Mevalonat zu Mevalonat-5-pyrophosphat umgesetzt. Durch Decarboxylierung entsteht IPP, das durch die Aktivität der Isopentenylpyrophosphat:Diemethylallylpyrophosphatisomerase (IDI) zu DMAPP isomerisiert wird. DMAPP kann schließlich durch pflanzliche Isoprensynthasen (IS) zu Isopren dephosphoryliert werden; Rechts, Route ausgehend von G3P und Pyruvat. MEP entsteht nach synthasekatalysierter Anlagerung von Pyruvat an G3P und Reduktion sowie Isomerisierung des Produkts DXP. Nach Cytidylanlagerung und weiterer Aktivierung durch Kinasenaktivität sowie einer synthasekatalysierten Abspaltung des Cytidylrests entsteht HMBPP, das durch die Aktivität einer Diphosphatreduktase zu IPP und DMAPP reduziert wird, wobei das IPP ebenfalls durch IDI zu DMAPP isomerisiert wird. DMAPP kann schließlich durch Aktivität pflanzlicher Isoprensynthasen zu Isoeren dephosphoryliert werden. HMG-CoA, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA; MAV, Mevalonat; MAV-5P, Mevalonat-5-phosphat; G3P, D-Glyceraldehyd-3-phosphat; DXP, 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat; MEP, 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat; HMBPP, (E)-4-Hydroxy-3-methyl-2-buten-1-ylidiphosphat; IPP, Isopentenylpyrophosphat; DMAPP, Dimethylallyl-pyrophosphat; IDI, Isopentenylpyrophosphat:Diemethylallylpyrophosphatisomerase; IS, Isoprensynthase.

Eine Möglichkeit besteht hierin in der Verwendung pflanzlicher Isoprensynthasen ausgehend von DMAPP (McGenity *et al.*, 2018). Im Zuge des Methylerythritolphosphat-(MEP-)wegs können beide Intermediate über eine Enzymkaskade ausgehend von D-Glyceraldehyd-3-phosphat (G3P) und Pyruvat angereichert werden (Xue *et al.*, 2015) (Abbildung 10, links). Eine weitere Möglichkeit besteht im Mevalonat- (MAV-)weg, bei dem DMAPP und IPP über eine Kaskade ausgehend von Acetyl-CoA über Mevalonat synthetisiert werden (Zheng *et al.*, 2013) (Abbildung 10, rechts).

## 1.6 Ziele der Dissertation

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des *Horizon 2020 research and innovation* Programms der Europäischen Union als Teil des Projekts *EmPowerPutida* (Grant Agreement No 635536) durchgeführt. Im Fokus des Projektes stand *Pseudomonas putida*, ein Bakterium mit industriell interessanten Eigenschaften, wie etwa einer relativ hohen Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln. Dieses Bakterium sollte als Chassis für künftige biotechnologische Anwendungen etabliert werden. Eines der Beispielmoleküle stellte 1,3-Butadien dar, das durch die Aktivität des bifunktionalen Enzyms Linalool Dehydratase Isomerase (LinD) aus *Castellaniella defragrans* durch Dehydratisierung von Crotylalkohol synthetisiert werden sollte.

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Bereitstellung und Charakterisierung von LinD-Varianten für die Umsetzung von Crotylalkohol zu 1,3-Butadien. Dazu sollte zunächst ein stabiles System für die heterologe Expression von LinD und Varianten in *E. coli* etabliert werden. Anschließend sollte durch Substitutionsvarianten in der aktiven Tasche der bereits postulierte Mechanismus weiter untersucht sowie erste Positionen identifiziert werden, deren Mutagenese verbesserte Umsetzungen kürzerkettiger Alkenole ermöglichen. Die Enzybibibliotheken sollten dann durch Identifizierung weiterer Proteindomänen als potentielle Mutageneseregionen ausgebaut werden. Zur Identifizierung und Charakterisierung der Enzymvarianten galt es ein Analysesystem für die teils gasförmigen Substrate und Produkte aufzubauen. Schließlich sollten einige ausgewählte Varianten kinetisch charakterisiert werden.

Außerdem sollten erste Untersuchungen bezogen auf die Synthese von Crotylalkohol in *P. putida* durchgeführt werden, um so das Substrat für die LinD-katalysierte Umsetzung zu 1,3-Butadien bereitzustellen.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind kommerziell erhältlich und wurden in den jeweils höchsten verfügbaren Reinheitsgraden von Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Macherey-Nagel (Düren, Deutschland), Alfa-Aesar (Ward Hill, Massachusetts, USA) und Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

### 2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 1 zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien unter Angabe des Herstellers auf.

**Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien unter Angabe des Herstellers.**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
1,5 mL und 2 mL Mikroreaktionsgefäß	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
15 mL und 50 mL Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Petrischalen (92 x 16 mm, mit Nocken)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Petrischalen (150 x 20 mm, mit Nocken)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen (20, 200 und 1000 µL)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
2 mL Reaktionsgefäß mit Schraubgewinde	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
2 mL Autosampler vials mit 11 mm Rollrand	Wicom (Heppenheim, Deutschland)
Micro Insert 300 µL	Wicom (Heppenheim, Deutschland)
11 mm Alu-Crimp Caps mit Septum	Wicom (Heppenheim, Deutschland)
50 x Ø 10 mm Glas vials	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<i>Headspace</i> -Schraubverschluss-Probenflaschen-Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, USA)
Mikortiterplatte 96 Well	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Riplate® sw 2 mL Deepwellplatten	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
24-Deepwell Microplates (11 mL)	EnzyScreen (Heemstede, Niederlande)
<i>Breath-EASIER sealing membrane for multiwell plates</i>	Diversified Biotech (Dedham, Massachusetts, USA)
<i>Nunc™ Sealing Tapes Aluminium Acrylate</i>	Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, USA)
<i>ExpressPlus™ PAGE Gels, 10 x 8 cm, 12%</i>	GenScript Biotech Corp. (Piscataway, New Jersey, USA)
TRIS-MOPS-SDS-Fertigpuffer	GenScript Biotech Corp. (Piscataway, New Jersey, USA)
Halbmirko Küvette	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Elektroproportionsküvette 2 mm	Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, USA)
His GraviTrap TALON	GE Healthcare (Chicago, Illinois, USA)
<i>Express Plus SDS Gel 4-20%</i>	GenScript (Piscataway, New Jersey, USA)
<i>Tris-MOPS-SDS Running Buffer</i>	GenScript (Piscataway, New Jersey, USA)
<i>BugBuster 10x Protein Extraction Reagent</i>	Novagen (Piscataway, New Jersey, USA)
<i>Midori Green Advance</i>	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)

## 2.3 Puffer

### 2.3.1 Natriumphosphatpuffer

12 mM Dinatriumhydrogenphosphat

88 mM Natriumdihydrogenphosphat

| pH 6,0 überprüfen, autoklavieren

### 2.3.2 Reaktionspuffer

12 mM Dinatriumhydrogenphosphat

88 mM Natriumdihydrogenphosphat

| autoklavieren

2% (w/v) D-Sorbit

| pH 6,0 überprüfen, steril filtrieren

### 2.3.3 TFBI Puffer

30 mM Kaliumacetat

10 mM Calciumchlorid

50 mM Manganchlorid \* 4 H<sub>2</sub>O

100 mM Rubidiumchlorid

15% (v/v) Glycerin

| pH 5,8 (1 M Essigsäure), steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C

### 2.3.4 TFBII Puffer

10 mM MOPS

10 mM Rubidiumchlorid

75 mM Calciumchlorid \* 2 H<sub>2</sub>O

15% (v/v) Glycerin

| pH 8,0 (1 M Kaliumhydroxid), steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C

### 2.3.5 Kaliumphosphatpuffer für TB Medium (10x)

720 mM Dikaliumhydrogenphosphat

170 mM Kaliumdihydrogenphosphat

| autoklavieren

**2.3.6 Puffer für *P. putida* ruhende Zellen**

30,75 mM Dikaliumhydrogenphosphat

19,25 mM Kaliumdihydrogenphosphat

| autoklavieren

50 mM D-Glukose

| pH 7,0 überprüfen, steril filtrieren

**2.3.7 SDS Probenpuffer (2x)**

35% (v/v) Tris Puffer 1 M, pH 6,8

30% (v/v) Glycerin

10% (w/v) Natriumdodecylsulfat

600 mM Dithiothreitol

0,18 mM Bromphenolblau

| Lagerung bei -20 °C

**2.3.8 SDS-PAGE Färbelösung**

30% (v/v) Ethanol<sub>techn.</sub>

10% (v/v) Essigsäure 96%

0,1% (w/v) Coomassie Brilliantblau R250

**2.3.9 SDS-PAGE Entfärbelösung**

30% (v/v) Ethanol<sub>techn.</sub>

10% (v/v) Essigsäure 96%

**2.3.10 DNA Ladepuffer**

50% (v/v) Glycerin

0,01% (w/v) Bromphenolblau

**2.3.11 PMSF Lösung**

100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid

| in Ethanol, Lagerung bei -20 °C

**2.3.12 Transferpuffer (10x)**

250 mM Tris

1920 mM Glycin

**2.3.13 TBS Puffer (10x)**

500 mM            Tris  
1500 mM         Natriumchlorid  
30 mM            Kaliumchlorid  
| pH 7,4 (1 M Salzsäure)

**2.3.14 TBS-T Puffer**

10% (v/v)        TBS Puffer (10x) (2.3.13)  
0,1% (v/v)       Tween 20

**2.3.15 Western Blot Blockierlösung**

4% (w/v)        Milchpulver  
| in 1x TBS Puffer (2.3.13)

**2.3.16 Western Blot Antikörperlösung I**

0,01% (w/v)     *Monoclonal Anti-His tag antibody produced in mouse* (2.4.1)  
| in *Western Blot* Blockierlösung (2.3.15), Lagerung bei 4 °C

**2.3.17 Western Blot Antikörperlösung II**

0,01% (w/v)     *Anti-mouse IgG (whole molecule)-peroxidase antibody produced in rabbit* (2.4.2)  
| in *Western Blot* Blockierlösung (2.3.15), Lagerung bei 4 °C

**2.3.18 Western Blot Lösung A**

100 mM          Tris  
0,025% (w/v)    Luminol  
| pH 8,6 (HCl), Lagerung bei 4 °C

**2.3.19 Western Blot Lösung B**

0,11% (w/v)     p-Cumarsäure  
| in DMSO, Lagerung im Dunkeln bei RT

**2.3.20 Western Blot Entwicklungslösung**

4 mL             *Western Blot* Lösung A (2.3.18)  
400 µL           *Western Blot* Lösung B (2.3.19)



1,2  $\mu\text{L}$                       Wasserstoffperoxid (35%)

| nach Zugabe von Wasserstoffperoxid sofort zu verwenden, keine Lagerung möglich

### 2.3.21 *ISO reaction buffer (5x)*

1,5 g                      25% (w/v) PEG-8000  
 3 mL                      500 mM Tris-HCl (pH 7,5)  
 0,15 mL                  50 mM Magnesiumchlorid  
 0,3 mL                    50 mM Dithiothreitol  
 0,06 mL                  1 mM dATP  
 0,06 mL                  1 mM dCTP  
 0,06 mL                  1 mM dGTP  
 0,06 mL                  1 mM dTTP  
 0,3 mL                    5 mM NAD

### 2.3.22 *Gibson Assembly Mastermix*

26,67% (v/v)              ISO reaction buffer (5x) (2.3.21)  
 0,53 U  $\mu\text{L}^{-1}$               T5 Exonuklease (2.11)  
 3,33 U  $\mu\text{L}^{-1}$               Phusion HF DNA Polymerase (2.11)  
 533,3 U  $\mu\text{L}^{-1}$               *Taq* DNA Ligase (2.11)

### 2.3.23 *Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer (50x)*

2 M                      Tris  
 10% (v/v)                500 mM EDTA, pH 8,0  
 1 M                      Essigsäure 96%

## 2.4 Antikörper

Im Zuge dieser Dissertation wurden Antikörper ausschließlich zum Nachweis von Proteinen durch *Western Blot* angewendet. Hier wurde ein System aus primärem und sekundärem Antikörper gewählt, um eine größtmögliche Signalintensität zu erhalten. Zum Einsatz kamen zwei kommerziell verfügbare Antikörper, die von Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) bezogen wurden.

### 2.4.1 Primärer monoklonaler anti-His tag Antikörper aus Maus

Als primärer Antikörper wurde ein anti-His tag Antikörper aus Maus (*Monoclonal Anti-His tag antibody produced in mouse*) gewählt, der spezifisch His tags bindet.

### 2.4.2 Sekundärer anti-Maus Antikörper aus Hase fusioniert mit Peroxidase

Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Maus Antikörper aus Hase, der mit einer Peroxidase fusioniert war, gewählt (*Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in rabbit*).

## 2.5 Medien

### 2.5.1 LB Medium

10 g L <sup>-1</sup>	Trypton
5 g L <sup>-1</sup>	Hefeextrakt
10 g L <sup>-1</sup>	Natriumchlorid
15 g L <sup>-1</sup>	Agar Agar (Für Agarplatten)

### 2.5.2 TB Medium

12 g L <sup>-1</sup>	Trypton
24 g L <sup>-1</sup>	Hefeextrakt
5 g L <sup>-1</sup>	Glycerin
10% (v/v)	Kaliumphosphatpuffer (10x) (2.3.5)

### 2.5.3 SOC-Medium

20 g L <sup>-1</sup>	Trypton
5 g L <sup>-1</sup>	Hefeextrakt
10 mM	Natriumchlorid
2,5 mM	Kaliumchlorid
autoklavieren	
10 mM	Magnesiumchlorid (aus 1 M sterilfiltrierter Lösung)
20 mM	Glukose (aus 1 M sterilfiltrierter Lösung)

### 2.5.4 Antibiotika

In dieser Arbeit wurden die Antibiotika Kanamycin (Kan), Ampicillin (Amp) sowie Gentamicin (Genta) zur Selektion transformierter bakterieller Kulturen verwendet.

Einsatz fanden diese Antibiotika, falls nicht anders beschrieben, in den üblichen Konzentrationen von 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Kan), 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Amp) sowie 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Genta).

## 2.6 Oligonukleotide

Die in dieser Dissertation verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried, Deutschland) bezogen und sind unter Angabe der verwendeten Nummerierung, des Namens, der Sequenz sowie der Schmelztemperatur Tabelle 23 im Anhang (7.1) zu entnehmen.

## 2.7 Plasmide

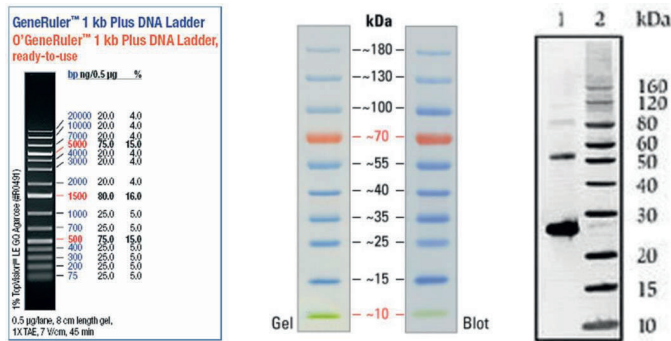
Tabelle 2 gibt Aufschluss über die in dieser Arbeit für Klonierungen verwendeten Plasmide sowie deren Herkunft.

**Tabelle 2: Verwendete Plasmide unter Angabe des Herstellers bzw. der Referenz.**

<b>Name</b>	<b>Hersteller/Referenz</b>
pQE-31	QIAGEN N.V. (Venlo, Niederlande)
pET-22b(+)	Novagen Inc. (Madison, Wisconsin, USA)
pET-28a(+)	Novagen Inc. (Madison, Wisconsin, USA)
pSEVA231	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013
pSEVA238	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013
pBAD	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
pDHE	BASF SE (Ludwigshafen, Deutschland)

## 2.8 DNA- und Proteinstandards

In dieser Arbeit wurde als DNA-Standard für Agarosegele ausschließlich *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen AG; Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet. Für SDS-PAGES fand *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA) Verwendung. Wurden SDS-PAGES für *Western Blots* angefertigt, so wurde *BenchMark™ His-tagged Protein Standard* (Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Charakteristische Bandenmuster dieser Standards sind in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11: Verwendete DNA- und Proteinstandards.** V.l.n.r., *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder*, *PageRuler Prestained Protein Ladder*, *BenchMark™ His-tagged Protein Standard*. Abbildungen verändert nach fishersci.de (aufgerufen am 10.01.2019).

## 2.9 Bakterienstämme

### 2.9.1 *Escherichia coli*

Tabelle 3 zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme unter Angabe des Genotyps sowie des Herstellers oder der Referenz auf.

**Tabelle 3: Verwendete *Escherichia coli* Stämme unter Angabe des Genotyps und des Herstellers.**

Stamm	Genotyp	Hersteller/Referenz
XL1 Blue	endA1 gyrA96(nal <sup>R</sup> ) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F <sup>+</sup> ::Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Stratagene (San Diego, Kalifornien, USA)
BL21(DE3)	F <sup>+</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> ) λ(DE3)	Novagen Inc. (Madison, Wisconsin, USA)
BL21(DE3) [pLysS]	F <sup>+</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> ) λ(DE3) [pLysS]	Novagen Inc. (Madison, Wisconsin, USA)
Jm105	endA1 glnV44 sbcB15 rpsL thi-1 Δ(lac-proAB) [F <sup>+</sup> traD36 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZΔM15] hsdR4(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Promega (Mannheim, Deutschland)
Jm109	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB <sup>+</sup> Δ(lac-proAB) e14 <sup>+</sup> [F <sup>+</sup> traD36 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZΔM15] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Promega (Mannheim, Deutschland)
M15[pREP4]	F <sup>+</sup> Φ80ΔlacM15 thi lac <sup>-</sup> mtl <sup>-</sup> recA <sup>+</sup> KmR [pREP4]	Qiagen N.V. (Venlo, Niederlande)
ITB94	glnV44 thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(r <sub>K</sub> -m <sub>K</sub> -) F <sup>+</sup> [traD36 proAB <sup>+</sup> lacIq lacZΔM15] rha-14::Tn10 Δ(yahK) Δ(yjgB) [pHSG575 <sup>+</sup> ] [pAgro4]	BASF SE (Ludwigshafen am Rhein, Deutschland)
TOP10	F <sup>+</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 λ	Invitrogen AG (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Jm83	rpsL ara Δ(lac-proAB) Φ80dlacZΔM15	Prof. Sven Panke (ETH Zürich, Basel, Schweiz)
Jm83(DE3)	rpsL ara Δ(lac-proAB) Φ80dlacZΔM15 λ(DE3)	Prof. Sven Panke (ETH Zürich, Basel, Schweiz)

### 2.9.2 *Pseudomonas putida*

Tabelle 4 zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten *P. putida* Stämme unter Angabe des Genotyps sowie des Herstellers oder der Referenz auf.

**Tabelle 4: Verwendete *Pseudomonas putida* Stämme unter Angabe des Genotyps und des Herstellers.**

Stamm	Genotyp	Hersteller/Referenz
KT2440	rmo- mod+	Franklin <i>et al.</i> , 1981
EM42	rmo- mod+ $\Delta$ prophage1 $\Delta$ prophage4 $\Delta$ prophage3 $\Delta$ prophage2 $\Delta$ Tn7 $\Delta$ endA-1 $\Delta$ endA-2 $\Delta$ hsdRMS $\Delta$ flagellum $\Delta$ Tn4652	Martinez-Garcia <i>et al.</i> , 2014
EM383	rmo- mod+ $\Delta$ prophage1 $\Delta$ prophage4 $\Delta$ prophage3 $\Delta$ prophage2 $\Delta$ Tn7 $\Delta$ endA-1 $\Delta$ endA-2 $\Delta$ hsdRMS $\Delta$ flagellum $\Delta$ Tn4652 $\Delta$ recA	Prof. Victor de Lorenzo (CSIC, Madrid, Spanien)
GN346	rmo- mod+ $\Delta$ upp $\Delta$ pedE $\Delta$ pedH $\Delta$ aldB-I $\Delta$ aldB-II	Simon <i>et al.</i> , 2015
EPI	rmo- mod+ $\Delta$ upp $\Delta$ pedE $\Delta$ pedH $\Delta$ aldB-I $\Delta$ aldB-II $\Delta$ bkdAA	Robert Nitschel (Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart)

### 2.10 Kits

Tabelle 5 zeigt die im Zuge dieser Dissertation verwendeten Kits auf. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Kits den Herstellerangaben zufolge verwendet.

**Tabelle 5: Verwendete Kits unter Angabe des Verwendungszwecks sowie des Herstellers.**

Kit	Verwendungszweck	Hersteller
<i>Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit</i>	Isolierung von Plasmid-DNA	Zymo Research Corp. (Irvine, Kalifornien, USA)
<i>Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit</i>	Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen	Zymo Research Corp. (Irvine, Kalifornien, USA)
<i>Zyppy™ DNA Clean and Concentrator Kit</i>	Reinigung und Konzentrierung von PCR-Fragmenten und Gibson Assembly Produkten	Zymo Research Corp. (Irvine, Kalifornien, USA)
<i>Micro BCA™ Protein Assay Kit</i>	Bestimmung des Gesamtproteingehalts einer Lösung	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
<i>PureLink® Genomic DNA Kits</i>	Isolierung genomischer DNA	Invitrogen AG (Carlsbad, Kalifornien, USA)
<i>For purification of genomic DNA</i>		
<i>HOT FIREPol® MultiPlex Mix</i>	<i>Taq</i> Polymerase Mastermixe für	Solis BioDyne (Tartu, Estland)
<i>RTL</i>	Kolonie-PCR	

### 2.11 Enzyme

Linalool Dehydratase-Isomerase (LinD) aus *Castellaniella defragrans* (EC 4.2.1.127) wurde im Vorfeld dieser Arbeit am Institut für Biochemie und Technische Biochemie der Universität Stuttgart von Geneart AG (Regensburg, Deutschland) codonoptimiert für *E. coli* bzw. *P. putida* synthetisiert. In Tabelle 6 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme aufgeführt, die nicht als Bestandteil eines Kits Verwendung fanden.

**Tabelle 6: Verwendete Enzyme unter Verwendung der typischen Konzentration (falls vorhanden) sowie des Herstellers. n.z., nicht zutreffend.**

<b>Enzym</b>	<b>Konzentration [U <math>\mu</math>L<sup>-1</sup>]</b>	<b>Hersteller/Referenz</b>
Linalool Dehydratase-Isomerase (LinD)	n.z.	Geneart AG (Regensburg, Deutschland)
KOD Hot Start DNA Polymerase	1	Novagen® (Darmstadt, Deutschland)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	25	New England BioLabs® GmbH (Ipswich, Massachusetts, USA)
T5 Exonuklease	10	New England BioLabs® GmbH (Ipswich, Massachusetts, USA)
Phusion HF DNA Polymerase	2	New England BioLabs® GmbH (Ipswich, Massachusetts, USA)
<i>Taq</i> DNA Ligase	40	New England BioLabs® GmbH (Ipswich, Massachusetts, USA)
T4 DNA Ligase	5	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
<i>Bam</i> HI	20.000	New England BioLabs® GmbH (Ipswich, Massachusetts, USA)
<i>Sal</i> I	100.000	New England BioLabs® GmbH (Ipswich, Massachusetts, USA)
<i>Eco</i> RI-HF	20.000	New England BioLabs® GmbH (Ipswich, Massachusetts, USA)
<i>Nde</i> I	20.000	New England BioLabs® GmbH (Ipswich, Massachusetts, USA)
<i>Kpn</i> I	20.000	New England BioLabs® GmbH (Ipswich, Massachusetts, USA)
<i>Dpn</i> I	20	New England BioLabs® GmbH (Ipswich, Massachusetts, USA)
Acetyl-CoA Acetyltransferase (AtoB)	n.z.	Gruppe von Prof. Vitor Martins dos Santos ( <i>Systems and Synthetic Biology</i> , Universität Wageningen, Niederlande)
$\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (Hbd)	n.z.	Gruppe von Prof. Vitor Martins dos Santos ( <i>Systems and Synthetic Biology</i> , Universität Wageningen, Niederlande)
Crotonase/Butyryl-CoA Dehydratase (Crt)	n.z.	Gruppe von Prof. Vitor Martins dos Santos ( <i>Systems and Synthetic Biology</i> , Universität Wageningen, Niederlande)
Butyryl-CoA Dehydrogenase (Bld)	n.z.	Geneart AG (Regensburg, Deutschland)
Butanoldehydrogenase (Bdh)	n.z.	Geneart AG (Regensburg, Deutschland)
Allylische Alkoholdehydrogenase (YsADH)	n.z.	Geneart AG (Regensburg, Deutschland)
<i>short chain alcohol dehydrogenase-like protein</i> (HcSCDH)	n.z.	Geneart AG (Regensburg, Deutschland)

### 3 Methoden

Im Folgenden sind die zur Erstellung der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden beschrieben. Hierbei ist immer die Standardvorgehensweise aufgezeigt. Sollte von dieser abgewichen worden sein, ist dies an den entsprechenden Stellen deutlich gemacht. Wenn nicht anders beschrieben, wurde bei der Verwendung von Kits nach Herstellerangaben vorgegangen.

## 3.1 Molekularbiologische Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse unter Verwendung des Kits *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research Corp., Irvine, Kalifornien, USA) aus üN-Kulturen in LB Flüssigmedium (2.5.1). Hierfür wurden 4 mL Zellsuspension 1 min bei 11,000 x g und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 600 µL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Es folgte die Behandlung der Proben nach Herstellerangaben. Vor dem Eluieren wurde, um auf der Silicamembran verbleibendes Ethanol restlos zu entfernen, für 2 min bei 11,000 x g und RT zentrifugiert. Die Eluierung erfolgte mit 40 µL ddH<sub>2</sub>O.

### 3.1.2 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus Gram-negativen Bakterien erfolgte aus lysierten Zellen nach dem Prinzip des selektiven Bindens der DNA an Silicamembranen in der Gegenwart chaotropischer Salze. Hierfür wurde das Kit *PureLink® genomic DNA Kits For purification of genomic DNA* (2.10) nach Herstellerangaben verwendet. Die Lyse von 1 mL Vorkulturen in LB Flüssigmedium (2.5.1) wurde nach den Anweisungen des Kits folgender Behandlung für 2 h bei 55 °C durchgeführt. Eluiert wurde die gDNA in 100 µL ddH<sub>2</sub>O. Gelagert wurde die gDNA bei -20 °C.


### 3.1.3 Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) ist ein Verfahren zur exponentiellen Amplifizierung eines spezifischen Bereichs der DNA. Hierfür wird eine hitzebeständige DNA-abhängige DNA Polymerase verwendet. Die Spezifität der Amplifizierung wird durch den Einsatz zweier synthetischer Oligonukleotide induziert, die gegenläufig den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Zunächst wird der DNA-Doppelstrang des Templats bei ca. 95 °C denaturiert. Es folgt die Temperierung der Probe auf die spezifische *annealing*-Temperatur der verwendeten Oligonukleotide, wodurch diese an die DNA-Einzelstränge binden können. Im Zuge der Elongation wird die Probe auf die dem Aktivitätsmaximum der verwendeten DNA Polymerase entsprechenden Temperatur gebracht, wodurch ausgehend von den 3'-OH-Gruppen der Oligonukleotide die einzelsträngige Templat-DNA zu Doppelsträngen komplementiert wird. Die Dauer der Elongationsphase ist hierbei abhängig von der Länge des zu amplifizierenden

Bereichs sowie der spezifischen Geschwindigkeit der verwendeten DNA Polymerase. Durch zyklische Wiederholung der Schritte Denaturierung, *annealing* und Elongation wird eine exponentielle Vervielfältigung des flankierten Fragments erreicht, wobei im Idealfall während jedem Schritt eine Verdopplung stattfindet. Durch PCR können zudem sowohl in 5'- als in 3'-Richtung Überhänge an das Amplifikat angehängt werden, etwa Restriktionsschnittstellen, Linker, komplementäre Bereiche oder *tags*. Hierfür wird ein nicht-komplementärer Überhang an das 5'-Ende eines oder beider Oligonukleotide angehängt. Im ersten Zyklus entsteht so ein Hybridfragment mit einzelsträngigem Überhang, der im zweiten Zyklus ausgehend vom jeweils anderen Oligonukleotid komplementiert wird. Ab dem dritten Zyklus erfolgt so die Amplifizierung des gesamten Fragments inklusive des Überhangs. Tabelle 7 zeigt standardisiert ein PCR-Programm unter Verwendung der *KOD Hot Start DNA Polymerase* (2.11) auf.

**Tabelle 7: Beispiel eines Standardtemperaturprofils einer PCR unter Verwendung der KOD Hot Start DNA Polymerase.**

T (°C)	t (min)	Beschreibung
95	2	Initiale Denaturierung
95	0,5	Denaturierung
55	0,5	<i>annealing</i>
70	0,3 kb <sup>-1</sup>	Elongation
70	5	Finale Elongation



### 3.1.4 Kolonie-PCR

Zur schnellen und unkomplizierten Überprüfung der korrekten Integrierung eines Inserts in einen Vektor wurde die Methode der Kolonie-PCR angewendet. Hierbei werden nach Transformation des ligierten Konstrukts mittels einer sterilen Pipettenspitze Kolonien von der LB Agarplatte gepickt und direkt in einen PCR-Ansatz unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide für das einzubringende Fragment überführt. Im direkten Anschluss wird mit derselben Pipettenspitze über einen kleinen definierten Teil einer LB Agar Masterplatte mit entsprechenden Antibiotika gestrichen. Die Agarplatte wird während die PCR durchgeführt wird bei 37 °C inkubiert. Nach der PCR werden die Proben auf ein Agarosegel geladen und die Elektrophorese nach 3.1.7 durchgeführt. Durch den Einsatz der fragmentspezifischen Oligonukleotide kann so anhand des Vorhandenseins eines Amplifikats und gegebenenfalls dessen Größe evaluiert werden, ob das Konstrukt korrekt ligiert wurde. Von der LB Agar Masterplatte können so direkt im



Anschluss von positiven Kolonien Übernachtskulturen in LB Flüssigmedium inokuliert werden, um das Ergebnis durch Sequenzierung nach 3.1.11 zu bestätigen. Da für die analytische PCR keine *proof reading* Funktion der Polymerase benötigt wird, wurde hier das *HOT FIREPol® DNA Polymerase* basierte *HOT FIREPol® MultiPlex Mix RTL Kit* mit integriertem Ladepuffer (2.10) nach Herstellerangaben verwendet. Da in der Kolonie-PCR ganze Zellen in die PCR eingesetzt werden, wird die initiale Denaturierung deutlich verlängert, um einen thermischen Aufschluss der Zellen und damit die Freisetzung der Templat-DNA zu ermöglichen. Tabelle 8 zeigt das standardisierte PCR-Programm für in dieser Arbeit durchgeführte Kolonie-PCRs auf.

**Tabelle 8: Typisches Temperaturprogramm einer Kolonie-PCR unter Verwendung des HOT FIREPol® MultiPlex Mix RTL Kits.**

T (°C)	t (min)	Beschreibung
95	15	Initiale Denaturierung
95	0,33	Denaturierung
65	0,75	<i>annealing</i>
72	1 kb <sup>-1</sup>	Elongation
72	10	Finale Elongation

.....  
 35  
 Zyklen

### 3.1.5 Ortsgerichtete Mutagenese durch *QuikChange™*

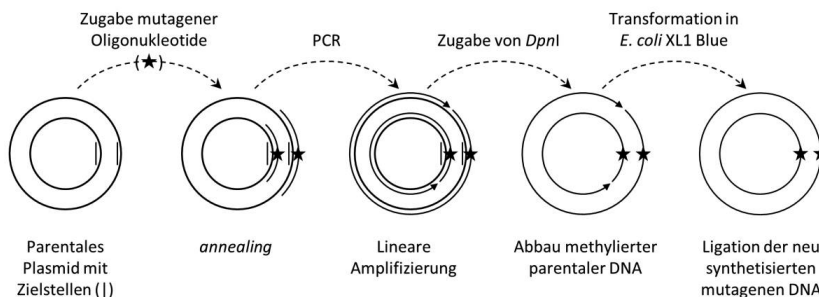
*QuikChange™* stellt eine Möglichkeit dar, gezielt Mutationen in Plasmid-DNA einzubauen. Dabei kann es sich sowohl um gezielte Austausche von einem bis zu dutzenden Basenpaaren als auch um deren Insertion sowie Deletion handeln. Die Methode beruht auf einer PCR unter Verwendung mutagener Oligonukleotide. Diese werden dergestalt abgeleitet, dass vor und nach der zu mutierenden Stelle ca. 20 bp komplementären Bereichs zur parentalen DNA vorliegt. Unter Verwendung der mutagenen Oligonukleotide wird ein PCR-Ansatz nach 3.1.3 unter Verwendung der *KOD Hot Start DNA Polymerase* (2.11) den Herstellerangaben folgend angesetzt. Den Ansätzen wurden 5% (v/v) DMSO zugefügt, um ein besseres *annealing* der Oligonukleotide zu ermöglichen. Tabelle 9 zeigt das standardisierte PCR-Programm für in dieser Arbeit durchgeführte *QuikChange™* Reaktionen auf.

**Tabelle 9:** Typisches Temperaturprogramm einer *QuikChange*<sup>TM</sup>-PCR unter Verwendung der *KOD Hot Start DNA Polymerase*.

T (°C)	t (min)	Beschreibung
95	2	Initiale Denaturierung
95	0,5	Denaturierung
55	0,5	<i>annealing</i>
70	0,3 kb <sup>-1</sup>	Elongation
70	5	Finale Elongation

22  
Zyklen

Im Zuge der PCR kommt es wegen der vollständig komplementären Oligonukleotide zu einer linearen Amplifizierung des gesamten Plasmids. Hierbei kann technikbedingt immer nur das parentale Plasmid als Templat für beide Oligonukleotide dienen. Als finales Produkt erhält man so Hybridplasmide aus parentaler, ringförmiger DNA und einem neu synthetisierten, offenen (genickten) Strang. Abbildung 12 zeigt schematisch den Vorgang der *QuikChange*<sup>TM</sup> Mutagenese auf.



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Vorgänge im Zuge einer *QuikChange*<sup>TM</sup>-PCR.

Durch Zugabe von 1,5 µL der Endonuklease *DpnI* und anschließender Inkubation bei 37 °C für 2 h wird nun die parentale, nicht-mutierte DNA abgebaut. Dies geschieht aufgrund der Aktivität von *DpnI* gegenüber methylierter DNA. Es ist daher unbedingt darauf zu achten, dass der Stamm, aus dem die parentale Plasmid-DNA gewonnen wird, DNA-Methylierungen durchführen kann. Neu synthetisierte DNA unter Verwendung von nicht-methyliertem dCTP hingegen weist keine Methylierungen auf und wird somit auch nicht von *DpnI* als Substrat erkannt. Nach der Inkubation wird die Endonuklease durch Inkubation bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Gleichzeitig fördert diese Inkubation bei erhöhter Temperatur das korrekte Zusammenlagern der beiden synthetisierten Stränge, die nun jeweils die gewünschte Mutation aufweisen. Die so entstandenen doppelt

genickten Plasmide werden im Anschluss unter Verwendung des *Zyppy DNA Clean and Concentrator Kits* nach Herstellerangaben gereinigt und in 10 µL ddH<sub>2</sub>O eluiert. Es folgte die Transformation der DNA in chemisch kompetente *E. coli* XL1 Blue (2.9.1; 3.2.2). XL1 Blue eignet sich besonders für die Transformation genickter DNA, da der Stamm über ein ungewöhnlich hohes Potential verfügt, genickte DNA durch Ligation zu reparieren.

### 3.1.6 Sättigungsmutagenese durch *overlap extension* PCR und „22c-Trick“

Rekombinante Sättigungsmutagenese wurde unter Verwendung der *overlap extension* (SOE) PCR durchgeführt (Kunkel *et al.*, 1985). Die Methode basiert auf der Verwendung zweier teilweise komplementärer Oligonukleotide, ein mutagenes *forward* Oligonukleotid sowie ein nicht-mutagenes *reverse* Oligonukleotid. Hierfür wurden zwei Oligonukleotide abgeleitet, die einen komplementären Überhang am 5'-Ende mit einer Schmelztemperatur > 55 °C aufwiesen, mindestens jedoch 20 bp. Der komplementäre Bereich wurde so gewählt, dass er direkt vor dem zu mutierenden Codon auf dem *leading strand* endet. Die nicht-komplementären 3'-Enden der Oligonukleotide wurden dergestalt abgeleitet, dass die Schmelztemperatur ca. 60 °C entsprach. Durch die Verwendung solcher Oligonukleotide kommt es zu einer exponentiellen Amplifizierung und somit zur Öffnung des Templat-Vektors. Für die Verwendung des 22c-Tricks (Kille *et al.*, 2012) wurden drei mutagene *forward* Oligonukleotide abgeleitet, die sich, bis auf das zu mutierende Codon, entsprachen. Das zu mutierende Codon wurde auf den drei Oligonukleotiden durch die degenerierten Codons NDT und VHG sowie TGG ausgetauscht. Hierbei codiert für NDT für zwölf Codons, VHG für neun und TGG für Tryptophan. Durch den Einsatz einer Mischung der drei Oligonukleotide im Verhältnis 12:9:1 kann so gewährleistet werden, dass Codons für jede der 20 proteinogenen Aminosäuren in einem statistischen Verhältnis eingebaut werden. Der Vorteil der Methode liegt unter anderem im geringeren *screening*-Aufwand; wird etwa ein degeneriertes NNK Codon für die Sättigung einer Position gewählt, müssen für eine 95%ige Abdeckung der 20 Aminosäuren 96 Kolonien getestet werden, da das NNK Codon für 32 Codons codiert. Unter Verwendung des 22c tricks können hingegen nur 22 Codons eingebaut werden, was dazu führt, dass beim Testen von 66 Kolonien bereits eine statistische Abdeckung von 95% erreicht werden kann. Unter Verwendung des Oligonukleotidgemischs für *forward* und dem nicht-mutagenen für *reverse* wurde eine PCR mit der *KOD Hot Start Polymerase* nach 3.1.3 durchgeführt. Die *annealing* Temperatur wurde, falls nicht anders vermerkt, auf 55 °C gesetzt. Die

Elongationszeit errechnete sich aus der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Falls nicht anders vermerkt, wurden 22 Zyklen durchgeführt. Nach der PCR wurde der Ansatz auf ein präparatives Agarosegel (3.1.7.1) beladen und das lineare Amplifikat durch Verwendung des *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits* (2.10) gereinigt. Im Anschluss wurde mit 5 µL des gereinigten Fragments in einem Gesamtvolumen von 20 µL ein *Gibson Assembly* nach 3.1.10 durchgeführt, wobei das lineare Fragment durch den komplementären Bereich der Oligonukleotide wieder geschlossen wird. Die Ansätze des *Gibson Assemblys* wurden im Anschluss mit dem *Zippy DNA Clean and Concentrator Kit* nach Herstellerangaben gereinigt und in 10 µL ddH<sub>2</sub>O eluiert. Es folgte die Transformation der DNA in chemisch kompetente *E. coli* XL1 Blue (2.9.1; 3.2.2). Hierbei wurde jedoch nach der Regeneration in LB Flüssigmedium (2.5.1) nicht, wie üblich, der Ansatz auf Agarplatten ausgestrichen, sondern mit dem gesamten Ansatz eine Übernachtskultur in 5 mL mit entsprechenden Antibiotika (2.5.4) versetztem LB Flüssigmedium (2.5.1) inokuliert. Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung der mutierten Plasmid-DNA. Zur Überprüfung wurden die Plasmide nach 3.1.11 sequenziert. Sollten an der mutierten Stelle Signale für alle einzubringenden Codons zu erkennen gewesen sein, wurde die DNA für die Expression nach 3.2.6 in chemisch kompetente *E. coli* Jm83(DE3) (2.9.1; 3.2.2) transformiert und zur besseren Handhabung und Vereinzeln von Kolonien auf größeren Petrischalen (150 x 20 mm; 2.2) ausplattiert.

### 3.1.7 Agarosegelelektrophorese

Im Zuge der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die durch den Phosphatrest negativ geladenen DNA-Moleküle wandern nach Anlegen einer elektrischen Spannung (~ 100 V) von der Kathode zur Anode durch das Agarosegel. Die eigentliche Trennung erfolgt durch die Porengröße des Agarosegels, da kleine Fragmente eine höhere Mobilität durch die Poren der Matrix aufweisen als größere Fragmente. Zum Erstellen der Agarosegele wurden, falls nicht anders vermerkt, 0,8% (w/v) Agarose in 1x TAE Puffer (2.3.23) kurz sprudelnd aufgeköcht und vor dem Gießen mit 120 µL L<sup>-1</sup> *Midori Green Advance* (2.2) versetzt. Dieser fluoreszierende Farbstoff bindet an das Rückgrat der DNA und ermöglicht so die Visualisierung der DNA-Banden unter blauem Licht. Die Proben wurden vor dem Beladen mit 10x DNA Ladepuffer (2.3.10) versetzt. Als Standard wurden 6 µL *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder* verwendet.

### 3.1.7.1 Präparative Agarosegelelektrophorese

Das Auftrennen der DNA-Fragmente nach Größe durch die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Präparation eines oder mehrerer Fragmente einer spezifischen Größe. Nach der Elektrophorese wurden hierfür mittels eines Skalpell die entsprechenden Banden aus dem Agarosegel herausgeschnitten und unter Zuhilfenahme des Kits *Zymoclean Gel DNA Recovery* (2.10) nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die DNA wurde, falls nicht anders vermerkt, in 10  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.1.8 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von DNA wurden in dieser Arbeit bakterielle Endonukleasen vom Typ II oder Typ IIM eingesetzt, die spezifische Regionen von 4 bis 8 bp in der DNA-Sequenz erkennen und innerhalb oder nahe dieser die DNA schneiden. Endonukleasen vom Typ II erzeugen durch das Schneiden spezifische glatte (*blunt*) oder versetzte Enden (*sticky ends*). Besonders *sticky ends* sind für Klonierungsarbeiten von Bedeutung, da durch die spezifischen einzelsträngigen und komplementären Überhänge DNA-Fragmente nach *annealing* in bestimmter Orientierung ligiert (3.1.9) werden können. Dies ist beim Einsatz von *blunt ends* schneidenden Endonukleasen nur bedingt möglich. Bei der einzigen Endonuklease vom Typ IIM, die verwendet wurde, handelt es sich um unspezifisch methylierte DNA schneidendes *DpnI*. *DpnI* fand Verwendung, wenn selektiv parentale, methylierte DNA abgebaut werden sollte, zum Beispiel während ortsgerichteter Mutagenese (3.1.5). Bei den verwendeten Endonukleasen vom Typ II (2.11) wurde den Herstellerangaben entsprechend verfahren. Die Reinigung und Aufarbeitung restringierter DNA erfolgte, falls nicht anders vermerkt, über präparative Agarosegelelektrophorese (3.1.7.1).

### 3.1.9 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in dieser Arbeit ausschließlich mit *sticky ends* unter Verwendung der T4 DNA Ligase (2.11). Für Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ L wurden 5 U des Enzyms verwendet. Die T4 DNA Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen der 3'-Hydroxylfunktion der Desoxyribose und des 5'-Phosphatrests. Es wurde ein molares Mengenverhältnis zwischen zu inserierendem DNA-Fragment und Vektor DNA von 3:1 gewählt. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C üN.

### 3.1.10 Basengenaue Klonierung durch *Gibson Assembly*

Das 2009 von Gibson und Kollegen entwickelte *Gibson Assembly* stellt eine verlässliche Methode dar, um zwei bis mehrere Fragmente DNA basengenau zu klonieren. Hierfür werden für jedes zu klonierende Fragment zwei spezifische Oligonukleotide abgeleitet, die am 5'-Ende einen komplementären Überhang zu der Sequenz beinhalten, an die das entsprechende Fragment angefügt werden soll. Durch mindestens zwei PCRs werden so von einem oder mehreren Templaten Fragmente amplifiziert. Nach Aufreinigung der PCR Fragmente werden diese in den *Gibson Assembly* Master Mix (2.3.22) überführt und für 1 h bei 50 °C inkubiert. Die im Mix enthaltene thermostabile T5-Exonuklease (2.11) restringiert vom 5'-Ende her die Fragmente, wobei einzelsträngige komplementäre Überhänge entstehen, die aneinander *annealen* können. Die ebenfalls enthaltene Polymerase (2.11) komplementiert die angelagerten Fragmente zu doppelsträngigen Konstrukten, während die thermostabile DNA Ligase (2.11) die Einzelstrangbrüche (engl. *nicks*) ligiert. Durch entsprechende abgeleitete Oligonukleotide können so basengenaue Klonierungen erfolgen ohne die Notwendigkeit einer Restriktionsschnittstelle (Gibson *et al.*, 2009).

### 3.1.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA sowie DNA-Fragmenten erfolgte durch den Dienstleister Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland; vormals GATC Biotech AG; Konstanz, Deutschland) nach der *cycle sequencing* Technologie (*dideoxy chain termination/cycle sequencing*) unter Verwendung von ABI 3730XL Sequenziergeräten (eurofinsgenomics.eu vom 26.08.2018). Es wurden 20 µL DNA einer Konzentration von 50 - 80 ng µL<sup>-1</sup> eingesetzt.

### 3.1.12 Genregulierung durch CRISPRi

CRISPR Interferenz (CRISPRi) ist ein Verfahren, um zielgerichtet die Expression eines bestimmten Gens herunterzuregulieren. Hierbei wird die Funktion des prokaryotischen Immunsystemäquivalents CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; gruppierte kurze palindromische Wiederholungen mit regelmäßigen Abständen) und des zugehörigen Cas9-Proteins (CRISPR-associated 9; CRISPR-assoziiert 9) genutzt. Eigentlich Teil der prokaryotischen Phagenabwehr, bestehen CRISPR aus sich wiederholenden Sequenzen, die durch *spacer* voneinander getrennt werden (Rath *et al.*, 2015). Diese *spacer* sind häufig von viraler DNA oder RNA abgeleitet und

werden von der Zelle eingesetzt, um sich gegen erneutes Eindringen zu schützen (Mojica *et al.*, 2005). Cas-Proteine werden durch CRISPR zielgenau zur abzubauenen DNA oder RNA geleitet und dauern diese beispielsweise durch ihre Endonukleasenaktivität ab (Garneau *et al.*, 2010). Im Falle von CRISPRi wird ein *spacer in silico* dergestalt abgeleitet, dass er einen spezifischen Bereich in der Promotorregion eines herunterzuregulierenden Gens binden kann. Durch Verwenden einer inaktiven Cas9 Variante, dCas9 (*dead* Cas9) wird so dieser Bereich geblockt, sodass die RNA-Polymerase nicht binden und somit keine Transkription stattfinden kann. Auf diese Weise konnte in Prokaryoten eine bis zu 99,9%ige Herunterregulierung erreicht werden (Qi *et al.*, 2013). Besonders durch die Möglichkeit, die Expression des CRISPRi Konstrukts induzierbar zu gestalten, können durch Anwendung der Methode auch Gene herunterreguliert werden, die beispielsweise essentiell für das Wachstum einer Zelle sind. In diesem Fall wird die Expression des CRISPRi Komplexes erst nach Erreichen einer bestimmten Wachstumsphase induziert. Dies stellt einen bedeutenden Vorteil im Vergleich zu einem *knock-out* dar, da diese sich je nach Zielgen stark auf den Metabolismus einer Zelle auswirken können. Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten CRISPRi Konstrukte wurden in Zusammenarbeit mit Christos Batianis und Lyon Bruinsma (Gruppe von Prof. Vítor Martins dos Santos, *Systems and Synthetic Biology*, Universität Wageningen, Niederlande) abgeleitet und erstellt.

### 3.1.13 Anpassung der Shine-Dalgarno-Sequenz unter Verwendung des EMOPEC tools

Die Translation ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der bakteriellen Genexpression und wird durch die Bindung des Ribosoms an die Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz auf der mRNA eingeleitet (Gold, 1988; Steitz *et al.*, 1975). Die SD-Sequenz bezeichnet hierbei eine 6 bp lange Region 6 – 12 bp *upstream* des Startcodons auf der mRNA. Häufig ist die Sequenz hierbei eine Variation der Konsensussequenz AGGAGG (Shine und Dalgarno, 1974 a und b; Steitz *et al.*, 1975). Im Jahre 2016 konnte gezeigt werden, dass eine Vorhersage der Expressionsstärke eines Gens in Abhängigkeit der Expression des Reportergens grün fluoreszierendes Protein (GFP) auf Basis einer Anpassung der SD-Sequenz sowohl als auch des Abstands der SD-Sequenz zum Startcodon möglich ist (Bonde *et al.*, 2016). Aus diesen Arbeiten ging das *online tool* EMOPEC (*Empirical Model and Oligos for Protein Expression Changes*; emopec.biosustain.dtu.dk vom 14.01.2018) hervor, das *in silico* eine Anpassung der SD-

Sequenz sowie deren Abstand zum Startcodon des folgenden Gens in Bezug auf eine möglichst hohe Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) voraussagt. Durch das *tool* konnte eine präzise Vorhersage der Expressionsstärke verschiedener Gene erreicht werden, wobei auf DNA-Ebene nur kleine Änderungen vorgenommen werden mussten (Bonde *et al.*, 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde EMOPEC verwendet, um die Expressionsstärke des Fusionsproteins OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) zu erhöhen. Hierbei sagt EMOPEC die entsprechende Expressionsstärke der Kombination aus SD-Sequenz und deren Abstand in Bezug auf GFP voraus. Der parentale Expressionsvektor weist eine 6 bp lange SD-Sequenz (AGGAGA) mit einem Abstand zum Startcodon von 6 bp (TATACC) auf. Dem EMOPEC *tool* wurde vorgegeben, SD-Sequenzen von weiterhin 6 bp mit einem Abstand zum Startcodon von 4 bp, 5 bp, 6 bp, 7 bp, 8 bp und 12 bp zu generieren. Es wurden relative Expressionsstärken im Verhältnis zu GFP von ca. 20%, 40%, 60% und 80% und die jeweils höchste Expressionsstärke, die unter Verwendung einer SD-Sequenz, die nicht der parentalen entspricht, gewählt (97% oder 98%). Ferner wurde jeweils die Expressionsstärke von 100%, die der parentalen SD-Sequenz entsprach, untersucht. Für die parentale Zwischensequenzlänge von 6 bp wurden Expressionsstärken in 10%-Schritten von 10% bis 98% erstellt sowie die parentale Sequenz (100%) zur Kontrolle mitgeführt. Tabelle 10 zeigt eine Übersicht der erstellten Konstrukte unter Angabe der für die Erstellung durch *QuikChange*<sup>TM</sup> nach 3.1.5 verwendeten Oligonukleotide.

**Tabelle 10: Durch EMOPEC ermittelte Varianten der Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz zum Erreichen unterschiedlicher Expressionsstärken.** Angegeben ist die Bezeichnung der resultierenden Variante, die mutierte SD-Sequenz, die Länge der Zwischensequenz (ZS) von SD-Sequenz zum Startcodon sowie deren Sequenz, die durch EMOPEC vorhergesagte Expressionstärke in Relation zu GFP und die verwendeten Oligonukleotide für die Mutagenese durch *QuikChange*<sup>TM</sup>.

Bezeichnung	SD-Sequenz	Länge ZS (bp)	ZS	Vorhergesagte Expressionsstärke (%GFP)	Oligonukleotide <i>for / rev</i>
OLm_4_20	AGTTGT	4	TATA	20	<b>42 / 43</b>
OLm_4_39	TTGGTA	4	TATA	39	<b>44 / 45</b>
OLm_4_59	AGTAGG	4	TATA	59	<b>46 / 47</b>
OLm_4_80	GAGAAC	4	TATA	80	<b>48 / 49</b>
OLm_4_97	TGGAGA	4	TATA	97	<b>50 / 51</b>
OLm_4_100	AGGAGA	4	TATA	100	<b>52 / 53</b>
OLm_5_20	TCCGGT	5	TATAC	20	<b>54 / 55</b>
OLm_5_39	TTGGTA	5	TATAC	39	<b>56 / 57</b>
OLm_5_60	GAGCTT	5	TATAC	60	<b>58 / 59</b>
OLm_5_80	GAGAAC	5	TATAC	80	<b>60 / 61</b>



OLm_5_98	AGGAGC	5	TATAC	98	<b>62 / 63</b>
OLm_5_100	AGGAGA	5	TATAC	100	<b>64 / 65</b>
OLm_6_11	TTTTGC	6	TATACC	11	<b>66 / 67</b>
OLm_6_20	AGTTGT	6	TATACC	20	<b>68 / 69</b>
OLm_6_30	TGGAAC	6	TATACC	30	<b>70 / 71</b>
OLm_6_39	TTGGTA	6	TATACC	39	<b>72 / 73</b>
OLm_6_49	TTTGGA	6	TATACC	49	<b>74 / 75</b>
OLm_6_60	ACGAGT	6	TATACC	60	<b>76 / 77</b>
OLm_6_69	TTAGGA	6	TATACC	69	<b>78 / 79</b>
OLm_6_80	GAGAAC	6	TATACC	80	<b>80 / 81</b>
OLm_6_90	AGGAAC	6	TATACC	90	<b>82 / 83</b>
OLm_6_97	TGGAGA	6	TATACC	97	<b>84 / 85</b>
OLm_parental	AGGAGA	6	TATACC	100	<b>86 / 87</b>
OLm_7_20	AGTTGT	7	TATACCT	20	<b>88 / 89</b>
OLm_7_39	TTGGTA	7	TATACCT	39	<b>90 / 91</b>
OLm_7_59	TAAGGA	7	TATACCT	59	<b>92 / 93</b>
OLm_7_80	CGAGTA	7	TATACCT	80	<b>94 / 95</b>
OLm_7_97	TGGAGA	7	TATACCT	97	<b>96 / 97</b>
OLm_7_100	AGGAGA	7	TATACCT	100	<b>98 / 99</b>
OLm_8_20	AGTTGT	8	TATACCTA	20	<b>100 / 101</b>
OLm_8_40	CGAGTC	8	TATACCTA	40	<b>102 / 103</b>
OLm_8_59	TAAGGA	8	TATACCTA	59	<b>104 / 105</b>
OLm_8_80	TAGAGA	8	TATACCTA	80	<b>106 / 107</b>
OLm_8_97	TGGAGA	8	TATACCTA	97	<b>108 / 109</b>
OLm_8_100	AGGAGA	8	TATACCTA	100	<b>110 / 111</b>
OLm_12_20	AGTTGT	12	TATACCTATACC	12	<b>112 / 113</b>
OLm_12_40	CGAGTC	12	TATACCTATACC	40	<b>114 / 115</b>
OLm_12_59	TAAGGA	12	TATACCTATACC	59	<b>116 / 117</b>
OLm_12_80	TAGAGA	12	TATACCTATACC	80	<b>118 / 119</b>
OLm_12_98	AGGAGC	12	TATACCTATACC	98	<b>120 / 121</b>
OLm_12_100	AGGAGA	12	TATACCTATACC	100	<b>122 / 123</b>

## 3.2 Arbeiten mit Bakterien

### 3.2.1 Bestimmung der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>)

Die Bestimmung der optischen Dichte bei der Wellenlänge  $\lambda = 600$  nm einer Bakteriensuspension erfolgte durch das Lambert-Beer'sche Gesetz unter Verwendung der Formel

$$E_{\lambda} = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon_{\lambda} * c * d$$

mit  $I_0$ , Intensität des einfallenden Lichts in [ $\text{W m}^{-2}$ ];  $I$ , Intensität des transmittierten Lichts in [ $\text{W m}^{-2}$ ];  $\varepsilon_{\lambda}$ ; dekadischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$  in [ $\text{m}^2 \text{mol}^{-1}$ ];  $c$ ,

Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz in  $[\text{mol L}^{-1}]$ ; d, Schichtdicke in [m].

Nach einer Nullmessung wurde die zu messende Suspension entsprechend verdünnt und anhand dieser Formel unter Kenntnis der Schichtdicke und des Extinktionskoeffizienten bestimmt.

### 3.2.2 Erstellung chemisch kompetenter *E. coli* nach der Rubidiumchloridmethode

Zur Erstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde die Rubidiumchloridmethode angewendet. Hierfür wurde eine Vorkultur des Stamms in 5 mL LB Medium inokuliert, dem je nach Stamm entsprechendes Antibiotikum zugesetzt wurde (2.5.4). Die Vorkulturen wurden  $\mu\text{N}$  bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Es folgte das Inokulieren einer Hauptkultur in 100 mL LB Medium mit 1% (v/v) der Vorkultur in einem 500 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, der bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 inkubiert wurde. Nach dem Erreichen der gewünschten  $\text{OD}_{600}$  wurden die Zellen durch Zentrifugieren für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C geerntet. Zur Verbesserung der Kompetenz der zu erstellenden Zellen, wurde ab sofort ausschließlich bei 4 °C im Kühlraum unter Einsatz vorgekühlter Materialien und Pipetten und eiskalter Puffer gearbeitet. Der Überstand der zentrifugierten Suspensionen wurde verworfen und die Zellen in 30 mL eiskaltem TFBI Puffer (2.3.3) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 90 min auf Eis, wonach die Zellen erneut für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurden. Der entstehende Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 mL eiskaltem TFBII Puffer (2.3.4) resuspendiert. Nach dem Inkubieren für 15 min auf Eis wurden die Zellen in 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Hierbei wurden für Klonierungsstämme 25  $\mu\text{L}$  und für Expressionsstämme 50  $\mu\text{L}$  Aliquots gewählt. Die fertigen Aliquots wurden zur Lagerung in auf -80 °C vorgekühlte Boxen überführt und bei -80 °C über mehrere Monate gelagert.

### 3.2.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* erfolgte nach Auftauen der nach 3.2.2 erzeugten Zellen auf Eis. Zu den aufgetauten wurden je nach Anwendung 1  $\mu\text{L}$  Plasmid-DNA (~ 80 ng), 3  $\mu\text{L}$  gereinigter *QuikChange*<sup>TM</sup> (3.1.5) Ansätze oder 3  $\mu\text{L}$  *Gibson Assembly* (3.1.10) Produkt zugegeben und durch leichtes Schnipsen gemischt. Nach Inkubation der Zellen für 15 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C im Thermoblock. Anschließend wurden die Ansätze kurz auf Eis gekühlt und 500  $\mu\text{L}$  steriles

LB Flüssigmedium (2.5.1) zugegeben. Die Regeneration der Zellen erfolgte für 45 min bei 37 °C im Thermoblock. Anschließend wurden im Fall einer Retransformation gereinigter Plasmid-DNA 20 µL des Ansatzes auf LB Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika (2.5.4) ausgestrichen. Falls durch *QuikChange*<sup>TM</sup> oder *Gibson Assembly* erhaltene Plasmide transformiert wurden, wurde der gesamte Ansatz auf entsprechende Agarplatten ausgestrichen. In beiden Fällen wurden die Platten nach dem Ausstreichen üN bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgte über mehrere Tage bei 4 °C.

### 3.2.4 Erstellung elektrokompetenter *P. putida*

Ausgehend von einer Vorkultur *P. putida* in LB Flüssigmedium (2.5.1) wurde 1 mL auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4 eingestellt. Die Zellen wurden zentrifugiert und einmal mit sterilem 15% (v/v) Glycerin gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 1 mL sterilem 15% (v/v) Glycerin resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### 3.2.5 Transformation elektrokompetenter *P. putida*

Zur Transformation elektrokompetenter *P. putida* wurden die nach 3.2.4 erstellten Zellen zu je 50 µL aliquotiert und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2.2) überführt. Nach Zugabe von 1 µL Plasmid-DNA (~ 80 ng) wurde für 4,5 ms bei 2,5 kV elektroporiert. Es folgte die sofortige Zugabe von 2 mL auf 30 °C vortemperierten SOC-Mediums (2.5.3), worauf die Zellen in ein steriles üN-Kulturröhrchen überführt und für 1 h bei 30 °C und 180 rpm regeneriert wurden. Anschließend wurden im Fall einer Retransformation aufgereinigter Plasmid-DNA 50 µL des Ansatzes auf LB Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika (2.5.4) ausgestrichen.

### 3.2.6 Proteinexpression

Zur Expression der Gene von Interesse wurden Vorkulturen mit einer Einzelkolonie nach 3.2.3 oder 3.2.5 transformierter Zellen in LB Flüssigmedium (2.5.1) unter Zugabe entsprechender Antibiotika (2.5.4) inokuliert und üN bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Dies erfolgte für die Expression in Erlenmeyerkolben in 5 mL Flüssigmedium in Vorkulturröhrchen oder 3 mL Flüssigmedium in 24 *deep well* Platten (24 DWPs). Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur in 20% des maximalen Volumens eines Erlenmeyerkolbens oder pauschal 4 mL TB Flüssigmedium (2.5.2) im Fall von 24 DWPs mit, falls nicht anders vermerkt, 1% (v/v) der Vorkultur inokuliert und 4 h bei 37 °C und

180 rpm inkubiert bis zum Erreichen einer  $OD_{600} \sim 2,0$ . Gene unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors (7.2) wurden anschließend durch Zugabe des Induktors in angegebener Konzentration induziert, nachdem die Zellen auf die nachfolgende Expressionstemperatur heruntergekühlt worden waren. Die Expression erfolgte in  $\mu$ N bei 20 °C und 180 rpm, falls nicht anders vermerkt. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugieren für 20 min bei 1,700 x g und 4 °C geerntet und die Überstände, falls nicht anders vermerkt, verworfen. Die Zellpellets wurden bei der Expression in Erlenmeyerkolben, falls nicht anders vermerkt, in 3 mL g<sup>-1</sup> und bei der Expression in 24 DWPs in 3 mL NaP<sub>i</sub>-Puffer (2.3.1) oder Reaktionspuffer (2.3.2) resuspendiert und entweder sofort weiterverarbeitet oder für wenige Stunden bei 4 °C oder mehrere Tage bei -20 °C gelagert.

### 3.2.7 Zellaufschluss

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nach 2.3.6 vorbehandelte *E. coli* sowie *P. putida* Zellen durch zwei verschiedene Arten aufgeschlossen. Zur Erstellung von Lysaten, die für Aktivitätstests nach 3.3.1 dienen sollten, wurden Volumina > 1 mL mechanisch durch Ultraschall aufgeschlossen, während kleinere Volumina (150  $\mu$ L) zum Bestimmen der Fluoreszenz des resultierenden Lysats nach 3.4.3 ausschließlich chemisch aufgeschlossen wurden.

#### 3.2.7.1 Mechanischer Zellaufschluss durch Ultraschall

Der Zellaufschluss durch Ultraschall erfolgte nach Zugabe von 0,1% (v/v) einer 0,1 mM PMSF Lösung (2.3.11) zur Inhibierung der zelleigenen Proteasen. Die aufzuschließenden Proben wurden im Eisbad vorgekühlt und für 5 min bei einem *Output* von 4 und einem *duty cycle* von 35% sonifiziert. Hierbei wurden die Proben stets weiterhin im Eisbad gekühlt. Der entstandene Rohextrakt wurde für 20 min bei 21.000 x g und 4 °C zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile, den Debris, zu pelletieren. Schließlich wurde der Überstand, das Lysat, abgenommen und durch sterile 0,2  $\mu$ m Filter filtriert. Der Debris wurde in dem Lysat entsprechenden Volumen resuspendiert. Beide Fraktionen wurden entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -20 °C mehrere Tage gelagert.

#### 3.2.7.2 Chemischer Zellaufschluss

Der chemische Zellaufschluss erfolgte ausschließlich mit in Reaktionspuffer (2.3.2) resuspendierten Zellen. Hierfür wurden 150  $\mu$ L der Suspension in eine 96 MTP überführt und 150  $\mu$ L 1x *BugBuster*<sup>®</sup> (2.2) in Reaktionspuffer (2.3.2) zugegeben. Es folgte eine

Inkubation für 20 min bei 300 rpm und RT. Anschließend wurden die Extrakte für 20 min bei 1700 x g und 4 °C zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile, den Debris, zu pelletieren. Die lösliche Fraktion, das Lysat, wurde abgenommen und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -20 °C mehrere Tage gelagert.

### 3.2.8 Stammhaltung in Glycerinstocks

Die mittel- bis längerfristige Lagerung von *E. coli* sowie *P. putida* Stämmen erfolgte als Glycerinstocks in Schraubdeckelröhrchen. Hierfür wurden 750 µL einer Übernachtskultur in LB Flüssigmedium (2.5.1) zu 750 µL sterilem 50% (v/v) Glycerin gegeben und durch Vortexen gründlich gemischt. Direkt im Anschluss wurden die Röhrchen in vorgekühlte Boxen überführt und bei -80 °C für mehrere Monate gelagert.

### 3.2.9 Quantitativer Nachweis des Abbaus von Crotylalkohol durch *Pseudomonas putida*

Der quantitative Nachweis des Abbaus von Crotylalkohol durch *P. putida* erfolgte nach Anzucht der entsprechenden Stämme in biologischen Triplikaten in LB Flüssigmedium (2.5.1) nach 3.2.6 in 24 DWPs. Nach Übernachtsinkubation wurden die Zellen durch Zentrifugieren 20 min bei 1,700 x g und 4 °C geerntet, zweimal mit 50 mM  $KP_i$ , pH 7,5 gewaschen und in 50 mM  $KP_i$  + 50 mM Glukose, pH 7,5 resuspendiert. Die  $OD_{600}$  der so erzeugten ruhenden Zellen wurde für alle verwendeten Stämme mit 50 mM  $KP_i$  + 50 mM Glukose, pH 7,5 auf 2,0 eingestellt und 5 mL in neue 24 DWPs überführt. Nach Zugabe von 20 mM Crotylalkohol wurden die Platten luftdicht verschlossen und bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Nach 2 h, 4 h und 6 h wurde jeweils 1 mL Probe entnommen und in 96 DWPs überführt. Die Lagerung bis zur Extraktion erfolgte luftdicht verschlossen bei 4 °C. Vor der Extraktion wurden die Platten für 20 min bei 1,700 x g und 4 °C zentrifugiert, um die Zellen abzutrennen. 500 µL des Überstands wurde in neue 96 DWPs überführt und 500 µL MTBE zugegeben. Nach luftdichtem Verschließen der Platten wurden diese für 10 min bei > 800 rpm geschüttelt und im Anschluss für 20 min bei 1,700 x g und 4 °C zentrifugiert. Schließlich wurden 150 µL der organischen Phase in GC vials mit *inlets* überführt und durch GC/MS nach 3.4.2 analysiert.

### 3.3 Arbeiten mit Proteinen

#### 3.3.1 Quantitative Aktivitätsbestimmung von LinD

##### 3.3.1.1 Quantitative Aktivitätsbestimmung von LinD in Lysaten

Die quantitative Bestimmung der Aktivität von LinD aus Lysaten von *E. coli* oder *P. putida* erfolgte nach Aufschluss der nach 3.2.6 exprimierten Zellen. Hierfür wurden die Zellen geerntet, der Überstand verworfen, das Pellet in 3 mL g<sup>-1</sup> NaP<sub>i</sub>-Puffer (2.3.1) oder Reaktionspuffer (2.3.2) resuspendiert und nach 3.2.7.1 mechanisch aufgeschlossen. Standardmäßig wurden Biotransformationen im 1000 µL Maßstab angesetzt. Hierfür wurden 100 µL des Lysats zu 850 µL Reaktionspuffer in 50 x Ø 10 mm Glas *vials* (2.2) gegeben. Nach Zugabe von 100 µL DTT Lösung (20 mM in Reaktionspuffer) wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µL Substratlösung (200 mM in DMSO) gestartet. Die *vials* wurden mit den zugehörigen Stopfen verschlossen und zusätzlich mit Parafilm luftdicht abgedichtet. Im Falle der Analytik durch GC/MS *headspace* Messungen wurde das Reaktionsvolumen verdoppelt und in 20 mL *headspace* Schraubverschluss-Probenflaschen angesetzt. Die Biotransformationen wurden üN bei 30 °C und 700 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Für *headspace* Messungen erfolgte die Analyse direkt nach 3.4.1. Bei allen anderen Proben erfolgte die Extraktion von Substrat und Produkt durch Zugabe von 700 µL Cyclohexan und Vortexen für 2 min. Nach Zentrifugieren für 10 min bei 2400 x g wurden 300 µL der organischen Phase in ein GC *vial* überführt und je nach Substrat und Produkt mittels GC/MS nach 3.4.2 analysiert.

##### 3.3.1.2 Quantitative Aktivitätsbestimmung von LinD in *E. coli* Ganzzellen

Die quantitative Bestimmung der Aktivität von LinD in *E. coli* Ganzzellen erfolgte nach Expression nach 3.2.6. Je nach Substrat wurden 100 - 850 µL der Zellsuspension in GC *vials* überführt und mit Reaktionspuffer (2.3.2) auf ein Volumen von 850 µL aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 100 µL DTT Lösung (20 mM in Reaktionspuffer). Anschließend wurden die Ansätze mit 900 µL Cyclohexan überschichtet. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µL Substratlösung (200 mM in DMSO), wonach die *vials* sofort mit GC Caps luftdicht verschlossen wurden. Die Proben wurden üN bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Auf eine nachfolgende Extraktion wurde aufgrund des verwendeten Systems verzichtet und die Proben direkt im Anschluss per GC/MS nach 3.4.2 analysiert, wobei direkt aus der organischen Phase in das Gerät injiziert wurde.

### 3.3.2 Proteinreinigung durch IMAC

IMAC (immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie) ist ein Verfahren, mit dem Proteine, die einen C- oder N-terminal fusionierten Poly-His-*tag*, beispielsweise einen His<sub>6</sub>-*tag*, aufweisen, spezifisch gereinigt werden können. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass His<sub>6</sub>-*tags* zweiwertige Ni<sup>2+</sup>- oder Co<sup>2+</sup>-Ionen unter Ausbildung eines Chelatkomplexes binden können. In dieser Arbeit wurden His GraviTrap TALON Säulen (2.2) verwendet, die über in eine Matrix eingelagerte Co<sup>2+</sup>-Ionen verfügen. Nach dem Beladen der Säulen mit nach mechanischem Aufschluss nach 3.2.7.1 generiertem Zellysats wird das zu reinigende Protein so an die Matrix gebunden. Durch Spülen der Säulen mit Imidazolösungen steigender Konzentration wird das zu reinigende Protein von der Säule eluiert, da Imidazol eine höhere Affinität zu den Co<sup>2+</sup>-Ionen aufweist als der His<sub>6</sub>-*tag*. Vor dem Beladen wurden die Säulen zweimal mit vollem Säulenvolumen ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit einem vollen Säulenvolumen des verwendeten Puffers äquilibriert. Die Eluierung erfolgte durch Zugabe von je 2 mL Imidazolösung in Puffer mit ansteigenden Konzentrationen von 5 - 500 mM. Nach der Eluierung wurden die Säulen erneut mit einem vollen Säulenvolumen ddH<sub>2</sub>O und zwei vollen Säulenvolumen 20% (v/v) Ethanol gewaschen. Die Lagerung der Säulen erfolgte mit einem halben Säulenvolumen 20% (v/v) Ethanol bei 4 °C. Bei allen Fraktionen wurde der gesamte Durchfluss aufgefangen und über Nacht gegen 5 L Puffer dialysiert.

### 3.3.3 Lyophilisierung

Die Lyophilisierung oder Gefriertrocknung ermöglicht eine Trocknung von Proteinen unter milden Bedingungen. Es wird hierbei das Prinzip der Sublimation genutzt, bei dem das in gefrorenen Proben enthaltene Wasser im Vakuum direkt in den gasförmigen Zustand übergeht. Lyophilisiert wurde durch IMAC (3.3.2) in einem ALPHA 2-4 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH; Osterode am Harz, Deutschland) für 24 h unter ca. 0,02 mbar Unterdruck. So erhaltenes Proteinpulver kann bei 4 °C für mehrere Monate gelagert werden.

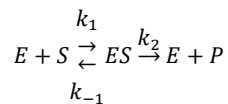
### 3.3.4 Kinetiken von LinD in *E. coli* Ganzzellen

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_m$  und  $v_{max}$  nach Michaelis und Menten (1913) wurden Ganzzellbiotransformationen von LinD exprimiert in *E. coli* Jm83(DE3) nach (3.3.1) durchgeführt. Hierbei wurden variierende Substratkonzentrationen gewählt und die eingesetzte Zellmenge dergestalt gewählt, dass bei jeder eingesetzten

Substratkonzentration die Produktbildung 10% der eingesetzten Substratmenge nicht überschritt. Durch Einsatz des OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) Fusionsproteins konnte die Fluoreszenz nach chemischer Lyse (3.2.7.2) gemessen und nach Kalibrierung mit durch IMAC (3.3.2) gereinigtem mRFP1 hieraus die LinD-Konzentration in den Zellen bestimmt werden. Die erhaltenen Produktkonzentrationen konnten unter Berücksichtigung der Reaktionszeit in Aktivität umgerechnet werden. Die Daten wurden daraufhin nach 3.3.5 gefittet.

### 3.3.5 Fitten von Aktivitätsdaten

Das Fitten erfolgte unter Einsatz der Michaelis-Menten Gleichung (Michaelis und Menten, 1913), deren Herleitung im Folgenden dargestellt ist. Hierbei wurde angenommen, dass die enzymatische Reaktion irreversibel ist und gleichzeitig das Produkt nicht an das Enzym binden kann.



Die kinetischen Formeln können hierbei formuliert werden, wenn ein *steady-state* Zustand für den Enzym-Substrat-Komplex sowie eine konstante Enzymkonzentration angenommen werden kann.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - [ES](k_{-1} + k_2) \stackrel{\text{def}}{=} 0$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$$

$$[E_0] = [E] + [ES] \stackrel{\text{def}}{=} \text{konstant}$$

Ausdrücken des Terms [ES] mithilfe der anderen Variablen

$$0 = k_1[S]([E_0] - [ES]) - [ES](k_{-1} + k_2)$$

$$k_1[S][E_0] = k_1[S][ES] + [ES](k_{-1} + k_2)$$

$$[S][E_0] = [S][ES] + [ES] \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Mit

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

ergibt sich

$$[S][E_0] = (K_m + [S])[ES]$$



$$[ES] = \frac{[S][E_0]}{K_m + [S]}$$

Hiermit lässt sich die initiale Aktivität angeben durch

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = v_0 = k_2[E_0] \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Mit

$$k_2[E_0] = v_{max}$$

ergibt sich

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Das Fitten der Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  sowie  $v_{max}$  wurde mithilfe der Methode der kleinsten Quadrate (MKQ) durchgeführt. Die Minimierung wurde durch Einsatz des MS Excel Solvers unter Verwendung des nicht-linearen GRG-Algorithmus erreicht.

### 3.3.6 Semiquantitative Expressionsanalyse durch SDS-PAGE

Für die semiquantitative Analyse der Expression von Proteinen wurde SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electro-phoresis*, SDS-PAGE; Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese) angewandt. Hierfür wurden ca. 10 mg Gesamtprotein (ca. 2 - 5  $\mu$ L Lysat oder Zellsuspension) mit SDS-Probenpuffer (2.3.7) versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Das im Probenpuffer enthaltene SDS denaturiert Proteine und lagert sich an diese an, was die Auftrennung nach der Größe durch die Poren des Polyacrylamidgels im elektrischen Feld ermöglicht. Die in dieser Arbeit verwendeten Fertiggele (2.2) wiesen zwei Phasen auf, ein Sammelgel, in dem die Proben mit relativ geringer Trennleistung zu einer kompakten Bande konzentriert wird, und ein Trenngel, das aufgrund seiner feineren Poren die Auftrennung nach der Größe ermöglicht. Als Laufpuffer wurde TRIS-MOPS-SDS-Fertigpuffer (2.2) verwendet. Als Proteinstandard kamen 8  $\mu$ L *PageRuler Prestained Protein Ladder* (2.8) zum Einsatz. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant angelegter Stromstärke. Zunächst wurden die Proben bei 20 mA im Sammelgel konzentriert. Nach ca. 15 min wurde die Stromstärke auf 35 mA erhöht. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele der Kammer entnommen und in SDS-PAGE Färbelösung (2.3.8) auf einer Wippe inkubiert. Nachfolgend wurden die Gele in SDS-PAGE Entfärbelösung (2.3.9) überführt und mehrere Stunden darin inkubiert, bis sich die gewünschte Intensität der Banden eingestellt

hatte. Der Kontrast der Banden zum Hintergrund konnte zudem durch Inkubation in ddH<sub>2</sub>O für ca. 1 h erhöht werden.

### 3.3.7 Semiquantitative Expressionsanalyse durch *Western Blot*

Das Prinzip des *Western Blots* beruht auf der Bindung von spezifischen Antikörpern an Bereiche eines Proteins. Hierfür wird zunächst ein primärer Antikörper aus Maus verwendet, der spezifisch *His-tags* binden kann. Ein sekundärer anti-Maus Antikörper aus Hase, der mit einer Peroxidase fusioniert ist, kann schließlich den primären Antikörper binden und anschließend durch den Einsatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und einer Luminollösung durch Lumineszenzbestimmung nachgewiesen werden. Durch den Einsatz eines primären und eines sekundären Antikörpers kommt es zu einer Verstärkung des Signals, da ein primärer Antikörper von mehreren sekundären gebunden werden kann.

Sollte die Expressionsanalyse von Proteinen durch SDS-PAGE nach 3.3.6 keine Überexpression aufgezeigt haben, wurden, falls es sich um Konstrukte mit einem *His<sub>6</sub>-tag* handelte, *Western Blots* durchgeführt. Hierfür wurde ein SDS-Gel hälftig repetitiv mit je denselben Proben beladen. Als Proteinstandard für *Western Blots* wurde *BenchMark™ His-tagged Protein Standard* (2.8) verwendet, bei dem die Proteinbanden ihrerseits *His<sub>6</sub>-tags* aufweisen und so durch *Western Blot* sichtbar gemacht werden können und gleichzeitig als Positivkontrolle dienen. Nach der Elektrophorese nach 3.3.6 wurde das Gel in der Mitte durchgeschnitten und eine Hälfte nach 3.3.6 gefärbt und entfärbt, während die andere Hälfte für den nachfolgenden *Western Blot* vorbereitet wurde. Hierfür wurde das Gel sowie eine in ihrer Größe dem Gel entsprechende Nitrozellulosemembran in getrennten Gefäßen für 10 min bei RT in 1x Transferpuffer (2.3.12) inkubiert. Vier Stücke *Whatman paper*, die etwas größer als Gel und Nitrozellulosemembran geschnitten wurden, wurden kurz in 1x Transferpuffer getränkt. Schließlich wurde wie folgt auf die Kontaktplatte des Blotters (Trans-Blot® SD, semi-dry transfer cell; Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, Kalifornien, USA) geschichtet (v.u.n.o.): 2x *Whatman paper*, Nitrozellulosemembran, Gel, 2x *Whatman paper*. Nach Anlegen einer Spannung von 15 V (Anode oben, Kathode unten) für 45 min wurde die Membran entnommen und 1 h bei RT in *Western Blot* Blockierlösung (2.3.15) inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran in TBS-T Puffer (2.3.14) für 15 min bei RT gewaschen. Der Waschschritt wurde zweimal mit frischem Puffer wiederholt. Nachfolgend wurde die Membran in *Western Blot* Antikörperlösung I (2.3.16)  $\mu$ n bei 4 °C wippend inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen für 15 min bei RT in jeweils

frischem TBS-T Puffer (2.3.14), wonach die Membran in *Western Blot* Antikörperlösung II (2.3.17) für 50 min bei RT wippend inkubiert wurde. Es folgte erneutes dreimaliges Waschen für 15 min in je frischem TBS-T Puffer (2.3.14). Im Anschluss wurde die Membran durch Zugabe von 4,4 mL frisch angesetzter *Western Blot* Entwicklungslösung (2.3.20) und ständigem Benetzen mit einer Pipette entwickelt. Nach ca. 2 min erfolgte die Aufnahme der Lumineszenz in einer Geldokumentationskammer (Quantum ST4 (1,4 Megapixel); Vilber Lourmat Deutschland GmbH; Eberhardzell, Deutschland).

### 3.3.8 Quantifizierung des Gesamtproteingehalts einer Lösung durch *microBCA*

Zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts einer Lösung wurde das *Micro BCA™ Protein Assay Kit* (2.10) verwendet. Hierfür wurden 150 µL zu untersuchender Lösung in Verdünnungen von 1:100 bis 1:1.000.000 in Triplikaten in eine 96 MTP vorgelegt. Die Wahl der Verdünnungsstufe erfolgte nach der zu erwartenden Proteinkonzentration. Der Assay wurde durch Zugabe von 150 µL der Arbeitslösung nach Herstellerangaben gestartet und für 2 h bei RT im Dunklen inkubiert. Neben den zu untersuchenden Proben wurde auf jeder MTP ein BSA (bovines Serumalbumin) als Standard in Triplikaten mitgeführt und analog behandelt. Hierfür wurde eine 1 mg mL<sup>-1</sup> BSA-Lösung erstellt und ausgehend hiervon eine 50 µg mL<sup>-1</sup> Lösung verdünnt. Eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 wurde bis zu einer finalen Konzentration von 0,78 µg mL<sup>-1</sup> durchgeführt. Ferner wurde eine Pufferkontrolle als 0 mg mL<sup>-1</sup> angenommen. Nach der Inkubation wurde die Absorption bei 562 nm in einem SpectraMax 340PC384 (Molecular Devices; Sunnyvale, Kalifornien, USA) durchgeführt. Ausgehend von Rohdaten wurde die Proteinkonzentration der Proben von Interesse anhand der Standardreihe berechnet.

## 3.4 Analytik

### 3.4.1 Quantitativer Nachweis durch *GC/MS headspace*

Für den quantitativen Nachweis von in *headspace* Schraubverschluss Probenflaschen nach 3.3.1.1. durchgeführten Biotransformationen wurde ein GC/MS-QP2010 (Shimadzu Corp.; Kyoto, Japan) verwendet, der mit einem PAL AOC-5000 Auto Injektor (Shimadzu Corp.; Kyoto, Japan) ausgerüstet war. Als Säule wurde eine Zebtron ZB-5MSi Kapillarsäule (Art. Nr. 7HG-G018-11 (5%-Phenyl-)methyl- 95%-dimethylpolysiloxane, Länge 30 m, Durchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm; Phenomenex Inc.; Torrance, Kalifornien, USA) verwendet. Als Trägergas wurde Helium bei einem konstanten Druck

von 26,7 kPa verwendet. Die Proben wurden für 3 min bei 95 °C inkubiert und im Anschluss 250 µL der Gasphase bei einer Spritztemperatur von 120 °C und einer Injektionstemperatur von 250 °C bei einem Split von 50 injiziert. Die Säulentemperatur wurde zu Beginn 3 min bei 45 °C gehalten. Es folgte Erhitzen bei 5 K min<sup>-1</sup> auf 55 °C, anschließend wurde mit 10 K min<sup>-1</sup> auf 80 °C und schließlich mit 70 K min<sup>-1</sup> auf 310 °C erhitzt. Schließlich wurden 310 °C für 2 min gehalten. Analysiert wurde im Scan Modus bei m/z 25-500 für 1-10 min. Die Retentionszeiten für die untersuchten Analyten betragen so 3,84 min (2-Methyl-3-buten-1-ol), 2,67 min (2-Methyl-3-buten-2-ol), 5,44 min (3-Methyl-2-buten-1-ol/Prenol), 4,26 min (3-Methyl-3-buten-1-ol), 3,36 min (2-Buten-1-ol/Crotylalkohol), 2,96 min (3-Buten-1-ol) und 2,46 min (3-Buten-2-ol).

### 3.4.2 Quantitativer Nachweis durch GC/MS

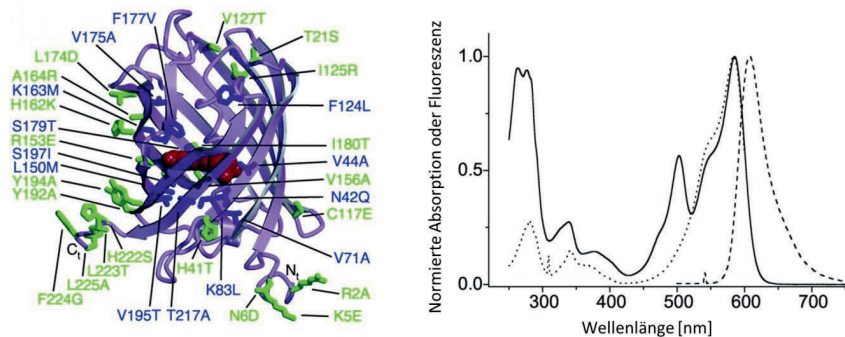
Für den quantitativen Nachweis wurde ein GC/MS-QP2010 (Shimadzu Corp.; Kyoto, Japan), das mit einem PAL AOC-5000 Auto Injektor (Shimadzu Corp.; Kyoto, Japan) ausgerüstet war, eingesetzt. Als Säule wurde eine Zebron ZB-5MSi Kapillarsäule (Art. Nr. 7HG-G018-11 (5%-Phenyl)-methyl- 95%-dimethylpolysiloxane, Länge 30 m, Durchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm; Phenomenex Inc.; Torrance, Kalifornien, USA) verwendet. Als Trägergas wurde Helium bei einem konstanten Druck von 26,7 kPa verwendet. Injiziert wurde je 1 µL extrahierter Probe bei einer Injektionstemperatur von 250 °C. Für alle zu analysierenden Stoffe wurden kurze isotherme Methoden gewählt. Tabelle 11 zeigt die verwendeten Temperaturen, den gewählten Split sowie die Detektionsmethoden auf.

**Tabelle 11: GC/MS Programme zur quantitativen Analyse.** 2-3-2, 2-Methyl-3-buten-2-ol; 3-2, 3-Buten-2-ol. ET, *event time*, Ret, Retentionszeit.

Stoffe	GC			MS				Ret. (min)
	T (°C)	t (min)	Split	Modus	m/z	ET (s)	t (min)	
Geraniol	160	4,50	50	Scan	15-160	0,3	2,50-4,50	4,03
Linalool								3,07
Myrcen								2,71
2-3-2	70	2,60	50	SIM	67; 71	0,3	1,80-2,50	2,29
Isopren								2,05
1,3-Butadien	60	3,00	15	Scan	53-54	0,15	1,7-2,2	1,94
Crotylalkohol	70	3,00	50	SIM	57	0,3	2,25-2,70	2,56

### 3.4.3 Fluoreszenzmessung von mRFP1

mRFP1 (monomeres rot fluoreszierendes Protein 1) wurde in dieser Arbeit als fluoreszierender Marker verwendet, um die Expression von LinD vergleichend oder absolut in Zelllysaten bestimmen zu können. mRFP1 ist eine Variante des rot fluoreszierenden Proteins DsRed aus *Dicosoma coral*, dessen natürliche tetramere Struktur von Campbell und Kollegen im Jahr 2002 aufgelöst und somit mRFP1 als monomeres fluoreszierendes Protein etabliert wurde (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Struktur sowie Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von mRFP1.** Links, Struktur von mRFP1. In grün sind die in Bezug auf das  $\beta$ -Fass externen sowie in blau die internen Mutationen dargestellt, die in DsRed eingefügt wurden, um mRFP1 zu erhalten; Rechts, Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von mRFP1. Das Absorptionsspektrum ist als durchgezogene Linie dargestellt, Das Anregungsspektrum als gepunktete Linie sowie das Emissionsspektrum als gestrichelte Linie. mRFP1, monomeres rot fluoreszierendes Protein. Abbildungen verändert nach Campbell *et al.* (2002).

Nach einer Anregung bei 584 nm emittiert mRFP1 rotes Licht der Wellenlänge 607 nm. Nach Expression wurden Zellsuspensionen mit mRFP1 oder mRFP1-Fusionsproteinen chemisch nach 3.2.7.2 aufgeschlossen und sofort 100  $\mu$ L des Lysats in eine neue 96 MTP überführt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte auf einem POLARstar Omega (BMG Labtech GmbH; Ortenberg, Deutschland) bei einem konstanten *gain* von 2200 als Endpunktmessung. Als Anregungswellenlänge wurden 575 nm gewählt, die Messung der Emission erfolgte bei 610 nm. Als Filter fanden Filter für POLARstar Omega (Ser.-Nr. 415-1499, 575-10 und 610-10; BMG Labtech GmbH; Ortenberg, Deutschland) Verwendung. Die sich ergebenden Werte wurden verwendet, um die Expressionsstärke verschiedener LinD-Varianten relativ zu vergleichen oder um bezogen auf eine im Vorfeld erstellte Kalibrierungsgerade mit per IMAC nach 3.3.2 gereinigten mRFP1-His die absolute Proteinkonzentration zu errechnen.

## 4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die im Zuge der vorliegenden Dissertation erhobenen Ergebnisse dargelegt und beschrieben. Trotz der Bifunktionalität des untersuchten Enzyms Linalool Dehydratase Isomerase (LinD) aus *C. defragrans*, die in der natürlichen Reaktion in der Isomerisierung von Geraniol zu *S*-Linalool sowie der Dehydratisierung zu Myrcen besteht, lag der Fokus der durchgeführten Experimente auf der Dehydratisierungsreaktion. Unter Verwendung des natürlichen Substrats Linalool sowie der Modellsubstrats 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) und 3-Buten-2-ol (3-2) konnten die möglichen Isomerisierungsprodukte Geraniol, Prenol und Crotylalkohol in den durchgeführten Messungen nicht detektiert werden. Wurde die LinD-katalysierte bifunktionale Umsetzung von Prenol, Geraniol und Crotylalkohol zu Isopren, Myrcen und 1,3-Butadien betrachtet, so wurde ausschließlich die Produktbildung der dehydratisierten Produkte herangezogen. Alle durchgeführten Messungen wurden, wenn nicht an entsprechender Stelle anders beschrieben, in Triplikaten durchgeführt. Eine Übersicht aller verwendeter Oligonukleotide unter Angabe der Sequenz sowie der Schmelztemperatur findet sich im Anhang (7.1). Ebenso sind alle verwendeten Plasmide im Anhang zu finden (7.2).

### 4.1 Etablierung eines Expressionssystems für LinD in *E. coli*

Da sich die stabile und reproduzierbare Expression von LinD im Vorfeld zu dieser Arbeit als schwierig erwies, wurde eine detaillierte Analyse der Expression des Enzyms in *E. coli* unter Verwendung verschiedener Vektoren, Signalsequenzen und Stämme durchgeführt. Die Quantifizierung der Expression erfolgte durch Aktivitätstests nach 3.3.1, SDS-PAGEs nach 3.3.6 sowie *Western Blots* nach 3.3.7 wurden zum qualitativen Nachweis der Expression durchgeführt.

#### 4.1.1 Untersuchung verschiedener Vektoren, Signalsequenzen und *E. coli* Stämme

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Vektoren auf die Expression von LinD in *E. coli* untersucht. Diese weisen unterschiedliche Promotoren und Signalsequenzen auf. Wildtypisch liegt LinD mit einer 25 Aminosäuren langen N-terminalen Signalsequenz für den Transport ins Periplasma von *C. defragrans* vor. In vorangegangenen Arbeiten am Institut für Biochemie und Technische Biochemie konnte gezeigt werden, dass LinD ohne

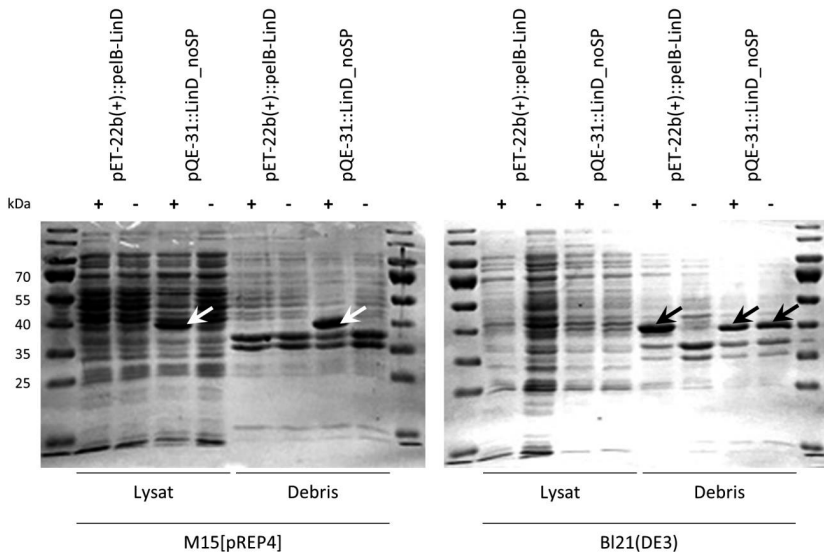
Signalsequenz in *E. coli* cytoplasmatisch exprimiert werden kann, diese Expression jedoch sehr instabil ist. Daher wurden Varianten des Enzyms erstellt, die über die natürliche Signalsequenz aus *C. defragrans* verfügte, sowie solche unter Einbringung der Sequenzen pelB und OmpA. Ferner wurde weiterhin die Expression ohne Signalsequenz untersucht. Das codonoptimierte *linD* Gen wurde durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotide **1** und **2** unter Einbringung von Restriktionsschnittstellen (5': *Bam*HI, 3': *Sal*I) nach 3.1.3 amplifiziert und nach Restriktion nach 3.1.8 in ebenfalls *Bam*HI/*Sal*I restringierten pQE-31 Vektor nach 3.1.9 ligiert, was im Konstrukt pQE-31::LinD resultierte. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Sequenzierung nach 3.1.11 bestätigt. Alle weiteren Konstrukte wurden ausgehend von diesem Konstrukt entweder durch Restriktionsklonierung nach 3.1.8 und Ligation nach 3.1.9 oder *Gibson Assembly* nach 3.1.10 erstellt und durch Sequenzieren bestätigt. Ferner wurde die *linD* Wildtyp Sequenz aus *C. defragrans* nicht codon-optimiert synthetisiert, und in pET-28a(+) kloniert. Das Fragment OmpA-LinD-His wurde durch Amplifizierung von pQE-31::LinD\_noSP (Tabelle 12) mit den Oligonukleotiden **20** und **21** amplifiziert, wobei N-terminal der OmpA-tag und C-terminal ein His<sub>6</sub>-tag durch Überhang-PCR angefügt wurde. Dieses Fragment diene als Templat für die weitere Klonierung der Konstrukte unter Verwendung des OmpA-tags. Eine Erläuterung der Klonierungsstrategien ist Tabelle 12 zu entnehmen.

**Tabelle 12: Übersicht der Klonierungsstrategien der in dieser Arbeit verwendeten LinD-Konstrukte.** Die Sequenzen der Oligonukleotide unter Angabe der Schmelztemperaturen finden sich im Anhang (7.1). RK, Restriktionsklonierung; GA, Gibson Assembly; *for*, *forward*; *rev*, *reverse*; RE, Restriktionsenzym.

Konstrukt	Methode	Oligonukleotide		Templat	RE
		<i>for</i>	<i>rev</i>		
pQE-31::LinD	RK	<b>1</b>	<b>2</b>	synthetisiertes Gen/ pQE-31	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I
pQE-31::LinD_noSP	RK	<b>3</b>	<b>4</b>	pQE-31::LinD	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I
pET-22b(+):pelB-LinD-His	GA	<b>5/7</b>	<b>6/8</b>	pET-22b(+)/ pQE-31::LinD_noSP	---
pQE-31::pelB-LinD-His	RK	<b>9</b>	<b>10</b>	pET-22b(+):pelB-LinD	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I
pDHE::pelB-LinD-His	RK	<b>11/14</b>	<b>12/15</b>	pQE-31::pelB-LinD- His/pDHE::Lb-ADH	<i>Nde</i> I/ <i>Kpn</i> I
pET-28a(+):pelB-LinD-His	RK	<b>9</b>	<b>10</b>	pET-22b(+):pelB-LinD	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I
pET-28a(+):LinD	RK	<b>13</b>	<b>2</b>	pQE-31::LinD	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I
pET-28a(+):LinD_wt	GA	<b>16/18</b>	<b>17/19</b>	synthetisiertes Gen/ pET-28a(+)	---
pQE-31::OmpA-LinD-His	GA	<b>22/24</b>	<b>23/25</b>	OmpA-LinD-His/pQE-31	---
pET-28a(+):OmpA-LinD-His	GA	<b>26/28</b>	<b>27/29</b>	OmpA-LinD-His/ pET-28a(+)	---

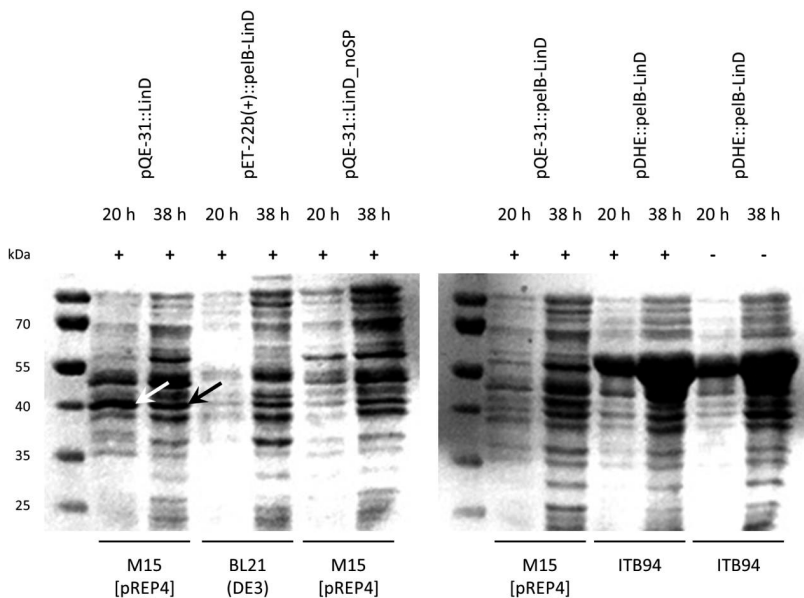
Zu Beginn wurde das Konstrukt pQE-31::LinD nach 3.2.3 in die chemisch kompetenten *E. coli* Stämme Jm105, Jm109, M15[pREP4] sowie XL1 Blue transformiert und nach 3.2.6 bei 16 °C, 20 °C und 25 °C in LB Flüssigmedium (2.5.1) exprimiert. Die Expression wurde nach mechanischer Lyse nach 3.2.7.1 durch SDS-PAGE nach 3.3.6 überprüft. In keinem der Stämme konnte eine Überexpression des Konstrukts in der löslichen Fraktion festgestellt werden. Lediglich in den unlöslichen Fraktionen (Debris) konnte bei einigen der Stämme Banden der erwarteten Größe von 45 kDa detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Da angenommen wurde, dass das wildtypische Signalpeptid aus *C. defragrans* nicht ideal mit der Sekretionsmaschinerie in *E. coli* kompatibel ist, wurde das Fragment LinD\_noSP wie in Tabelle 12 beschrieben von pQE-31::LinD amplifiziert und in pQE-31 ligiert, um LinD ohne das Signalpeptid (noSP, *no signal peptide*; kein Signalpeptid) exprimieren zu können. Weiterhin wurde die gleiche Sequenz durch *Gibson Assembly* direkt hinter das Signalpeptid pelB in den Vektor pET-22b(+) kloniert; pelB stellt hierbei ein universelles 22 Aminosäuren langes Signalpeptid für den Transport ins Periplasma Gram-negativer Bakterien dar und wurde bereits erfolgreich in *E. coli* angewendet (Sokolosky *et al.*, 2013). Als Expressionsstämme wurden die *E. coli* Stämme M15[pREP4] und BL21(DE3) gewählt. Exprimiert wurde nach 3.2.6 bei 16 °C in LB Flüssigmedium (2.5.1), wobei je eine Expression induziert wurde, während eine weitere zur Kontrolle ohne Induktion mitgeführt wurde. Die Expression wurde durch SDS-PAGE nach 3.3.6 überprüft. Obwohl eine Expression von pET-22b(+):pelB-LinD in *E. coli* M15[pREP4] aufgrund der nicht vorhandenen T7 DNA-abhängigen RNA-Polymerase nicht möglich ist, wurden diese Expressionen zur Kontrolle analog zu den übrigen Proben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Wie aus der Abbildung hervorgeht, konnte im Lysat der induzierten Expression von pQE-31::LinD\_noSP in M15[pREP4] eine Bande der erwarteten Größe von 40 kDa nachgewiesen werden. In der zugehörigen Debris Probe ist diese Bande deutlich stärker ausgebildet. Für die Expression von pET-22b(+):pelB-LinD in BL21(DE3) ist ausschließlich in der Debrisprobe eine deutliche Überexpression zu erkennen. Zudem sind Banden für die Expression im Debris für die Expression von pQE-31::LinD\_noSP zu erkennen, sowohl für die induzierte als auch für die nicht-induzierte Probe. Dies deutet auf eine schlechte Regulierung der Expression der pQE-Konstrukte in BL21(DE3) hin. Erwartungsgemäß konnte keine Expression des pET-Konstrukts in M15[pREP4] beobachtet werden.





**Abbildung 14:** SDS-PAGE-Gele nach Expression der Konstrukte pET-22b(+):pelB-LinD und pQE-31-LinD\_noSP in *E. coli* M15[pREP4] und BL21(DE3). Die Pfeile zeigen die erfolgreiche Überexpression von LinD an. noSP, *no signal peptide* (kein Signalpeptid).

Da für das pQE-Konstrukt eine Überexpression gezeigt werden konnte, jedoch ein erheblich größerer Teil des Gesamtproteins unlöslich im Debris verbleibt (Abbildung 14), wurde nach Tabelle 12 das Konstrukt pDHE::pelB-LinD kloniert und im *E. coli* Stamm ITB94 nach 3.2.6 exprimiert. Durch die Helferplasmide pHSG575<sup>4</sup>, das für die starke Regulierung durch lacI<sup>q</sup> codiert, sowie pAgro4, das für die Chaperone GroELS codiert, wurde so eine erhöhte Expression löslichen Enzyms erwartet. Die Expression der Konstrukte pDHE::pelB-LinD sowie pQE-31::LinD, pQE-31::LinD-noSP, pQE-31::pelB-LinD und pET-22b(+):pelB-LinD erfolgte nach 3.2.6 in TB Flüssigmedium (2.5.2). Exprimiert wurde für alle Stämme für 20 h und 38 h. Auf dem in Abbildung 15 dargestellten SDS-PAGE-Gel sind nur Lysate der induzierten Expression (+) aufgezeigt. Zusätzlich wurden für die Expression in ITB94 zur Kontrolle die Lysate der nicht-induzierten Proben (-) aufgetragen.

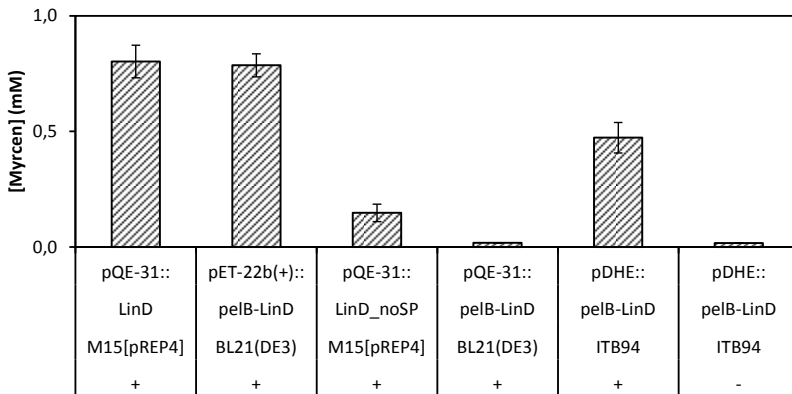


**Abbildung 15:** SDS-PAGE-Gele nach Expression der Konstrukte pQE-31::LinD, pET-22b(+):pelB-LinD und pQE-31-LinD\_noSP in *E. coli* M15[pREP4], BL21(DE3) und ITB94. Die Pfeile zeigen die erfolgreiche Überexpression von LinD an. noSP, *no signal peptide* (kein Signalpeptid); +, induziert; -, nicht-induziert.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, konnte für das Konstrukt pQE-31::LinD eine Überexpression nach 20 h ausgemacht werden. Eine Bande derselben Größe ist in der 38 h Probe zu erkennen. Bei allen anderen Konstrukten ist keine Bande zu erkennen, die eine Überexpression andeutet. Lediglich für die Expressionen in ITB94 sind in sowohl den induzierten als auch den nicht-induzierten Proben sehr starke Banden zu erkennen, die auf eine extreme Überexpression der Chaperone schließen lassen.

Mit den Lysaten aller Konstrukte wurden Biotransformationen nach 3.3.1.1 mit dem natürlichen Substrat Linalool (10 mM) durchgeführt. Hier zeigte sich für die Expression für 20 h in keiner der Proben Produktbildung (Daten nicht gezeigt). Für die 38 h Proben konnte hingegen eine Bildung des Produkts Myrcen detektiert werden. Die besten Produktbildungen konnten bei Verwendung der Konstrukte pQE-31::LinD und pET-22b(+):pelB-LinD in den Stämmen M15[pREP4] und BL21(DE3) mit je  $0,8 \pm 0,1$  mM ausgehend von 10 mM Linalool erreicht werden (Abbildung 16). Die Produktbildung mit LinD\_noPSP von pQE-31 in M15[pREP4] war mit  $0,2 \pm 0,1$  mM deutlich geringer. pelB-LinD von pQE-31 in BL21(DE3) exprimiert zeigte mit  $< 0,05$  mM eine vernachlässigbare

Produktbildung. Für das Konstrukt pDHE::pelB-LinD in ITB94 exprimiert konnte mit  $0,5 \pm 0,1$  mM eine moderate Produktbildung detektiert werden, dasselbe Vorgehen ohne Induktion der Expression (-) zeigte erwartungsgemäß mit  $< 0,05$  mM ebenso eine vernachlässigbare Produktbildung.



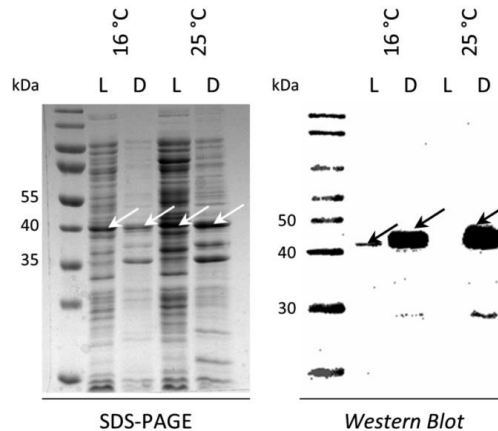
**Abbildung 16: Detektierte Produktbildung nach Biotransformationen mit pQE-31::LinD, pET-22b(+>::pelB-LinD und pQE-31::LinD\_noSP exprimiert in *E. coli* M15[pREP4], BL21(DE3) und ITB94.** Eingesetzt wurden 10 mM des natürlichen Substrats Linalool. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messungen in Triplikaten auf. noSP, *no signal peptide* (kein Signalpeptid); +, induziert; -, nicht induziert.

Nach Tabelle 12 wurden ferner die Fragmente LinD sowie pelB-LinD in den alternativen Vektor pET-28a(+) kloniert. Zur Kontrolle wurde außerdem die wildtypische nicht-codonoptimierte Sequenz in pET-28a(+) kloniert. Nach Expression für 20 h bei 16 °C, 20 °C und 25 °C konnte jedoch in keinem der Ansätze Expression durch SDS-PAGE nachgewiesen werden. Auch Aktivitätstests blieben ergebnislos (Daten nicht gezeigt).

Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass das Vorhandensein einer Signalsequenz für eine aktive Expression von LinD unumgänglich ist, da unter Verwendung der Konstrukte mit der wildtypischen oder der pelB-Signalsequenz deutlich höhere Produktbildungen erzielt werden konnten (Abbildung 16). Ferner wurde das pDHE-System aufgrund der drastischen Überexpression der Chaperone sowie der moderaten Produktbildung verworfen.

Als alternative Signalsequenz wurde der literaturbekannte *OmpA-tag* untersucht, der bereits erfolgreich für den Transport verschiedener Proteine in das *E. coli* Periplasma eingesetzt wurde (Humphreys *et al.*, 2010; Makrides, 1996). Ferner wurde der *E. coli* Stamm Jm83(DE3) (2.9.1) vom Projektpartner Prof. Sven Panke (*Department of*

*Biosystems Science and Engineering*; ETH Zürich; Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt, da in diesem die periplasmatische Expression einiger Enzyme unter Verwendung des *OmpA-tags* erfolgreich durchgeführt werden konnte (interne Information). Nach erfolgreicher Generierung des *OmpA-LinD-His*-Fragments durch PCR (*vide supra*) wurde dieses durch *Gibson Assembly* nach Tabelle 12 in pQE-31 sowie pET-28a(+) kloniert. Das erfolgreiche Einbringen des Konstrukts wurde durch Kolonie-PCR nach 3.1.4 sowie Sequenzierung nach 3.1.11 überprüft. Als Expressionsstämme (2.9.1) wurden M15[pREP4] und TOP10 für das pQE- und Jm83(DE3) für das pET-Konstrukt gewählt. Die Expression der Konstrukte erfolgte nach 3.2.6 für 20 h bei 16 °C und 25 °C. Das Expressionslevel im Lysat wurde durch SDS-PAGE und *Western Blot* nach 3.3.6 und 3.3.7 überprüft. Für die Expression von pQE-31::*OmpA-LinD-His* konnte weder in M15[pREP4] noch TOP10 eine erfolgreiche Überexpression gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Expression von pET-28a(+)::*OmpA-LinD-His* resultierte hingegen bei 16 °C und 25 °C in einer Überexpression im Lysat, die ebenfalls durch *Western Blot* bestätigt werden konnte (Abbildung 17).

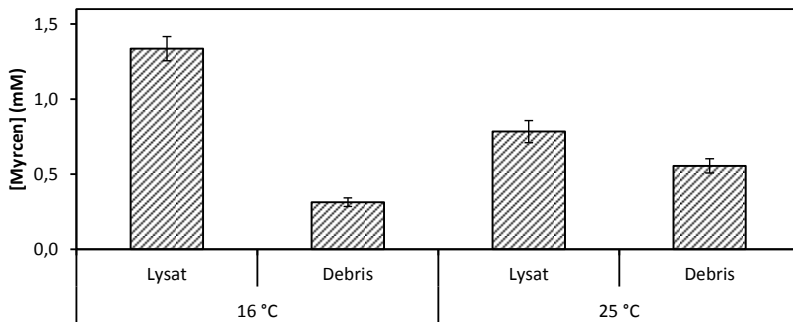


**Abbildung 17:** SDS-PAGE-Gel und *Western Blot* der Expression von pET-28a(+)::*OmpA-LinD-His* exprimiert in *E. coli* Jm83(DE3). Die Pfeile zeigen die erfolgreiche Überexpression von LinD an. L, Lysat; D, Debris.

Nach Expression bei 16 °C konnte nach SDS-PAGE sowohl im Lysat als auch im Debris eine Bande der erwarteten Größe ausgemacht werden. Ebenso konnten durch *Western Blot* Banden der entsprechenden Größe ausgemacht werden. Hier ist für die Lysatprobe der Expression bei 16 °C eine schwache Bande zu erkennen, nach Expression bei 25 °C

ist jedoch kein Signal ersichtlich. Bei 16 °C und 25 °C ist jedoch eine deutlich stärker ausgeprägte Bande in den Debrisproben zu erkennen.

Sowohl mit den Lysaten als auch dem Zelldebris wurden nachfolgend Biotransformationen unter Verwendung des natürlichen Substrats Linalool (10 mM) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Wie aus der Abbildung hervorgeht, konnte nach Expression des Plasmids pET-28a(+):OmpA-LinD-His in Jm83(DE3) für alle Proben Produktbildung nachgewiesen werden. Hier zeigt das Lysat nach Expression bei 16 °C mit  $1,3 \pm 0,1$  mM die höchste Produktbildung, während die Lysatproben nach Expression bei 25 °C mit  $0,8 \pm 0,1$  mM etwa die Hälfte an Produktbildung erreichten. Auch für die Debrisproben konnten Produktbildungen nachgewiesen werden, die mit  $0,3 \pm 0,0$  mM beziehungsweise  $0,6 \pm 0,0$  mM jedoch deutlich niedriger ausfielen als die der Lysate.



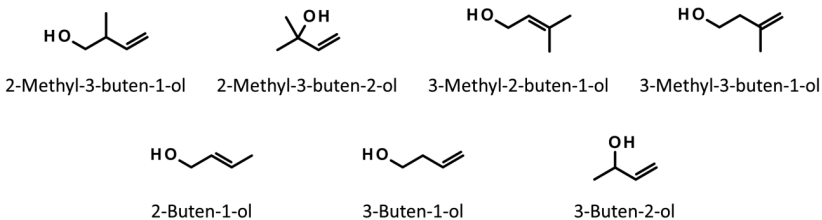
**Abbildung 18:** Detektierte Produktbildung nach Biotransformationen mit Lysaten sowie den unlöslichen Debrisfraktionen von OmpA-LinD-His exprimiert von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3). Eingesetzt wurden 10 mM des natürlichen Substrats Linalool. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messungen in Triplikaten auf.

Da unter Verwendung des Konstrukts pET-28a(+):OmpA-LinD-His exprimiert in *E. coli* Jm83(DE3) die höchsten Produktbildungen aller getesteten Konstrukte erreicht werden konnten und diese eine sehr gute Reproduzierbarkeit aufwiesen, wurde fortan weiter mit diesem etablierten System gearbeitet.

## 4.2 Untersuchung der Aktivität von LinD gegenüber kurzkettigen Alkenolen

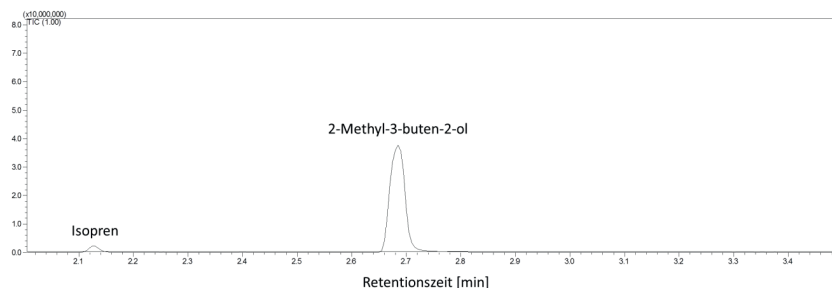
Unter Verwendung des in 4.1 etablierten Expressionssystems sollte die Aktivität von LinD gegenüber allen verfügbaren C4 (Butenole) und verzweigten C5 Alkenolen

(Methylbutenole) untersucht werden. Die Strukturformeln dieser potentiellen Substrate sind in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19:** Kurzkettige Alkenole als potentielle Substrate für LinD.

Zur Untersuchung der Aktivität gegenüber den in Abbildung 19 aufgezeigten kurzkettigen Alkenolen wurde pET-28a(+):OmpA-LinD-His (OL) in *E. coli* Jm83(DE3) nach 3.2.6 exprimiert und Lysat nach 3.2.7.1 hergestellt. Je 100  $\mu$ L Lysat wurden in Biotransformationen eingesetzt unter Einsatz von je 10 mM der in Abbildung 19 aufgezeigten Substrate. Mit Ausnahme von 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) konnte für keines der eingesetzten Substrate eine Produktbildung festgestellt werden. Abbildung 10 zeigt ein GC/MS Chromatogramm einer Umsetzung von 2-3-2. Das Produkt Isopren konnte anhand des Massenspektrums identifiziert und durch den Einsatz eines Referenzstandards bestätigt werden.



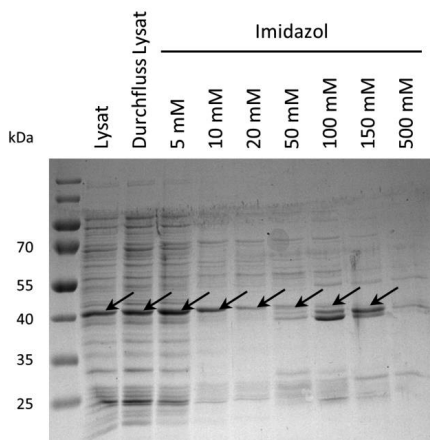
**Abbildung 20:** GC/MS Chromatogramm nach der Biotransformation von 2-Methyl-3-buten-2-ol unter Einsatz von OmpA-LinD-His exprimiert von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) in Lysat. Eingesetzt wurden 10 mM 2-Methyl-3-buten-2-ol als Substrat.

Aufgrund der Flüchtigkeit der zu analysierenden Stoffe, sowohl der Substrate als sogar noch stärker der Produkte, konnte mit dem bis dato genutzten System von Biotransformation und Extraktion keine reproduzierbaren Kalibrierungen der entsprechenden Stoffe erstellt werden, die eine Quantifizierung zugelassen hätten.

Versuche, Kalibrierungen durch *headspace* Messungen nach 3.4.1 zu erzielen, lieferten ebenso keine reproduzierbaren Daten, weswegen auf eine weitere Anwendung der Methode verzichtet wurde (Daten nicht gezeigt). Da anhand des in Abbildung 20 gezeigten Chromatogramms jedoch auf relativ geringe Produktbildung geschlossen wurde, sollte zunächst die Enzymmenge für nachfolgende Experimente durch Reinigung und damit verbundene Konzentrierung erhöht werden, um höhere Produktbildungen im bestehenden Versuchsaufbau erzielen zu können.

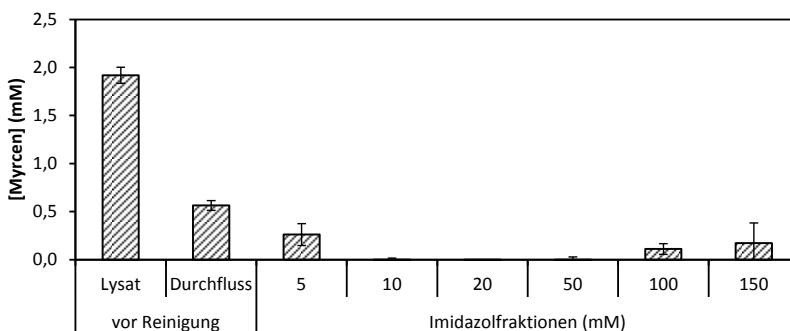
### 4.3 Reinigung von LinD

Da in künftigen Experimenten kinetische Untersuchungen von LinD in Bezug auf verschiedene Substrate durchgeführt werden sollten, wurden Versuche unternommen, das mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-tag versehene Konstrukt OmpA-LinD-His (OL) durch IMAC zu reinigen. Durch die Reinigung sollte für folgende Experimente die Möglichkeit der Normierung der eingesetzten Enzymmenge gewährleistet werden. Hierfür wurde pET-28a(+):OmpA-LinD-His nach 3.2.6 in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert und erzeugte Lysate (3.2.7.1) nach 3.3.2 durch IMAC gereinigt. Nach Dialyse gegen 5 L NaP<sub>i</sub>-Puffer (2.3.1) über Nacht wurde die Gesamtproteinmenge nach 3.3.8 durch microBCA bestimmt (Daten nicht gezeigt) und jeweils 20 µg Gesamtprotein auf ein SDS-PAGE-Gel geladen. Wie aus Abbildung 21 hervorgeht, konnte eine Überexpression von OL im Lysat gezeigt werden (schwarzer Pfeil). Da sich die Durchflussfraktion des Lysats jedoch kaum von der Lysatprobe unterscheidet, war die Bindungseffizienz offensichtlich nicht hoch. In allen Eluierungsstufen mit Ausnahme der 500 mM Fraktion konnte die OL-Bande ausgemacht werden. Am stärksten war sie in der 5 mM Fraktion ausgeprägt. Die Intensität der OL-Bande konnte im Vergleich zum Hintergrund nur wenig gesteigert werden; generell war in allen Fraktionen ein schwächer werdender, aber dennoch deutlicher Hintergrund unerwünschter Proteine auszumachen.



**Abbildung 21:** SDS-PAGE-Gel nach Reinigung von OmpA-LinD-His exprimiert von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) durch IMAC. Aufgetragen wurden je 20 µg Gesamtprotein des (v.l.n.r.) Lysats vor der Reinigung, des Durchflusses nach dem Beladen der Säulen sowie der Eluierungsfractionen mit 5 - 500 mM Imidazol.

Mit allen Fractionen mit Ausnahme der 500 mM wurden im Anschluss Biotransformationen nach 3.3.1.1 unter Verwendung des natürlichen Substrats Linalool (10 mM) durchgeführt. Hierbei wurde in alle Biotransformationen eine Gesamtproteinmenge von 2 mg mL<sup>-1</sup> eingesetzt, wobei aufgrund der sehr geringen Konzentration in der 150 mM Fraction und des möglichen Gesamtvolumens der Probe hier nur 500 µg eingesetzt werden konnten. Die erhaltenen Produktbildungen sind in Abbildung 22 dargestellt.



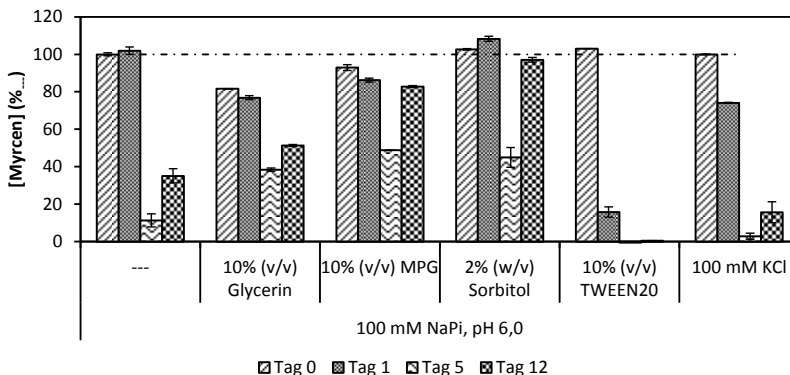
**Abbildung 22:** Detektierte Produktbildung nach Biotransformationen mit Lysat von OmpA-LinD-His exprimiert von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) sowie der Reinigungsfractionen nach IMAC. Eingesetzt wurden je 2 mg Gesamtprotein sowie 10 mM des natürlichen Substrats Linalool. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messungen in Triplikaten auf.



Das Lysat zeigte mit  $1,9 \pm 0,1$  mM eine Produktbildung, die auf dem Niveau der bisher erzielten Produktbildungen lag (vgl. Abbildung 18). Der Durchfluss des Lysats zeigte mit  $0,6 \pm 0,1$  mM eine deutliche Restaktivität. Von den getesteten Fraktionen zeigten nur diejenigen mit 5 mM, 100 mM und 150 mM Imidazol detektierbare Produktbildungen, die mit  $0,3 \pm 0,1$  mM,  $0,1 \pm 0,1$  mM und  $0,2 \pm 0,2$  mM jedoch weit unter denen des Lysats oder gar des Lysatdurchflusses lagen. Anhand der vorliegenden Daten wurde auf eine Instabilität von LinD im Lysat geschlossen, da das in Abbildung 21 SDS-PAGE-Gel der Fraktionen eine erfolgreiche Überexpression des Enzyms in der löslichen Fraktion indizierte.

#### 4.4 Untersuchung der Stabilität

Da in verschiedenen Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass die Lagerung von LinD bei  $-20$  °C mit deutlicher Abnahme der Aktivität nach Auftauen verbunden ist (Daten nicht gezeigt), sollte die Zugabe verschiedener Additive zum verwendeten  $\text{NaP}_i$ -Puffer (2.3.1) in Bezug auf eine etwaige Erhöhung der Lagerstabilität untersucht werden. Als Additive wurden 10% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) MPG, 2% (w/v) Sorbitol, 10% (v/v) TWEEN20 sowie 100 mM KCl gewählt. Zur Untersuchung wurde pET-28a(+):OmpA-LinD-His (OL) in *E. coli* Jm83(DE3) nach 3.2.6 exprimiert. Anschließend wurde je 0,25 g Pellet pro mL  $\text{NaP}_i$ -Puffer (2.3.1), dem die verschiedenen Additive vor der Einstellung des pH zugegeben worden waren, resuspendiert und nach 2.3.7.1 per Ultraschall aufgeschlossen. Zur Kontrolle wurde zudem ein Ansatz parallel behandelt, in dem die Zellen in  $\text{NaP}_i$ -Puffer (2.3.1) ohne Zugabe eines Additivs resuspendiert wurden. Für jedes Additiv sowie die Kontrolle wurden zweimal 1 mL Lysat aliquotiert; ein Aliquot wurde sofort bei  $-20$  °C weggefroren und mit dem jeweils anderen Aktivitätstests nach 3.3.1.1 unter Verwendung von Linalool als Substrat in Triplikaten durchgeführt (Tag 0), bevor dieses ebenfalls bei  $-20$  °C gelagert wurde. Das Aliquot, das für Tag 0 verwendet worden war, wurde an Tag 1 und Tag 5 auf Eis aufgetaut und erneut Aktivitätstests nach 3.3.1.1 unter Verwendung von 10 mM Linalool als Substrat in Triplikaten durchgeführt. An Tag 12 wurde das sofort weggefrorene und bis dato nicht wieder aufgetaute Aliquot langsam auf Eis aufgetaut und mit diesem Aktivitätstests nach 3.3.1.1 mit 10 mM Linalool als Substrat in Triplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 gezeigt. Die erhaltenen Produktbildungen wurden auf die Kontrolle ohne Zugabe eines Additivs an Tag 0 normiert.



**Abbildung 23: Detektierte Produktbildung nach Biotransformationen mit Lysat von OmpA-LinD-His exprimiert von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) an verschiedenen Tagen.** Die Lysate wurden in Puffer unter der Zugabe verschiedener Additive erstellt und Biotransformationen an den angegebenen Tagen nach Lagerung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Eingesetzt wurden je  $10\text{ mM}$  des natürlichen Substrats Linalool. Die detektierten Produktbildungen wurden relativ zu derjenigen des nicht-gefrorenen Lysats (Tag 0) in Puffer ohne Additiv (---) normiert (gestrichelte Linie). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messungen in Triplikaten auf.

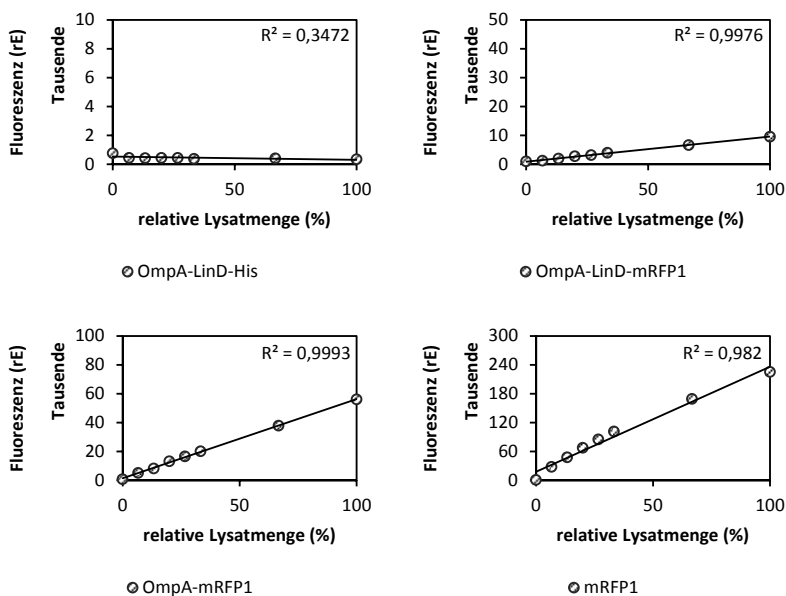
Wie aus der Abbildung hervorgeht, ist die Produktbildung ohne Additive an Tag 1 auf dem Niveau der Tag 0 Kontrolle, während sie an Tag 5 mit  $11 \pm 4\%$  drastisch abnimmt. Nach 12 Tagen Lagerung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  konnten ohne den Einsatz von Additiven noch  $35 \pm 4\%$  der initialen Produktbildung detektiert werden. Die Zugabe von Glycerin oder MPG wirkt sich negativ auf die Produktbildung aus; hier konnten an Tag 0 nur  $82 \pm 0\%$  bzw.  $93 \pm 2\%$  der Produktbildung ohne Additiv erreicht werden. Die Zugabe von Sorbitol, TWEEN 20 und KCl zeigte jedoch keine Auswirkung auf die Produktbildung an Tag 0. An Tag 1 konnte für Glycerin, MPG und Sorbitol Produktbildung detektiert werden, die ähnlich wie bei der Kontrolle ohne Additiv etwa auf dem Niveau von Tag 0 lag. Für TWEEN 20 und KCl war an Tag 1 mit  $16 \pm 3\%$  bzw.  $74 \pm 2\%$  der jeweiligen Produktbildung an Tag 0 eine starke Abnahme zu erkennen. An Tag 5 war für diese Additive keine bis sehr geringe verbleibende Produktbildung nachweisbar. Durch den Einsatz von Glycerin, MPG und Sorbitol hingegen konnte die verbleibende Produktbildung im Vergleich zur Kontrolle ohne Additiv jedoch deutlich gesteigert werden. Mit Werten von  $38 \pm 1\%$ ,  $49 \pm 0\%$  und  $45 \pm 5\%$  lagen diese auf einem vergleichbaren Niveau und somit deutlich höher als die  $11 \pm 4\%$  der Kontrolle. Die Tag 12 Proben ohne Additiv wiesen nach erstmaligem Auftauen eine Produktbildung auf, die mit  $35 \pm 4\%$  etwa einem Drittel derjenigen von frischem Lysat entspricht. Durch den

Einsatz von Glycerin, MPG und Sorbitol konnte die verbleibende Aktivität auf  $51 \pm 1\%$ ,  $83 \pm 0\%$  sowie  $97 \pm 1\%$  gesteigert werden. Der Einsatz von TWEEN 20 und KCl verbesserte die Lagerstabilität bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  wie bisher beobachtet hingegen kaum.

Da für Sorbitol eine Erhöhung der Stabilität bei mehrmaligem Auftauen sowie besonders bei längeren Lagerperioden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Vergleich zur Kontrolle und den übrigen getesteten Additiven erreicht werden konnte und Sorbitol zudem keinen Einfluss auf die Reaktion zeigte, was durch die unveränderten Werte für die Tag 0 Proben im Vergleich zur Kontrolle ersichtlich wird, wurde in nachfolgenden Experimenten dem Reaktionspuffer immer 2% (*w/v*) Sorbitol zugefügt (2.3.2). Zur Vergleichbarkeit wurde auch mit diesem Puffer gearbeitet, wenn keine Lagerung der Lysate zu erwarten war.

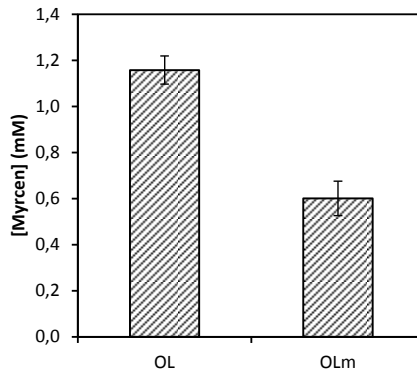
#### 4.5 Quantifizierbarkeit durch mRFP1-Fusionsprotein

Da die Reinigung von OmpA-LinD-His über IMAC auch mehrfach wiederholt nicht in konzentriertem, aktivem Enzym resultierte, wurde eine Fusion von LinD mit mRFP1 (monomeres rot fluoreszierendes Protein) als Alternative untersucht, die absolute LinD-Konzentration in Lysaten basierend auf der Fluoreszenz von mRFP1 messen zu können. Das Gen *mrfp1* wurde codonoptimiert für *E. coli* synthetisiert (Geneart AG; Regensburg, Deutschland). Unter Verwendung der Oligonukleotide **30 - 33** wurde per *Gibson Assembly* nach 3.1.10 das Konstrukt pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 kloniert. Zur Kontrolle wurden ebenso nach 3.1.10 die Konstrukte pET-28a(+):mRFP1 (Oligonukleotide **34 - 37**) sowie pET-28a(+):OmpA-mRFP1 (Oligonukleotide **38 - 41**) kloniert. Nach positiver Sequenzierung wurden die Konstrukte nach 3.2.3 in *E. coli* Jm83(DE3) (2.9.1) transformiert und nach 3.2.6 exprimiert. Als Negativkontrolle wurde pET-28a(+):OmpA-LinD-His analog behandelt. Nach der Ernte wurden die Zellen in Reaktionspuffer (2.3.2) normiert auf die  $OD_{600}$  resuspendiert und mechanisch nach 3.2.7.1 lysiert. Mit allen vier Ansätzen wurden Verdünnungsreihen mit Reaktionspuffer erstellt und die Fluoreszenz im Anschluss nach 3.4.3 gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24: Fluoreszenzmessung der erstellten mRFP1-Konstrukte.** Aufgetragen ist die bei 610 nm gemessene Emission nach Anregung bei 575 nm für OmpA-LinD-His (oben links), OmpA-LinD-mRFP1 (oben rechts), OmpA-mRFP1 (unten links) und mRFP1 (unten rechts). Alle Konstrukte wurden von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messungen in Triplikaten auf. Die lineare Regression ist als Linie unter Angabe des Korrelationskoeffizienten  $R^2$  aufgezeigt. rE, relative Einheiten.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, konnten für alle getesteten Lysate gute bis sehr gute Korrelationen erreicht werden. Erwartungsgemäß war die Fluoreszenz bei freiem, cytoplasmatisch exprimiertem mRFP1 am höchsten, gefolgt von periplasmatisch exprimiertem OmpA-LinD (OL). Die Fluoreszenz des Fusionsproteins OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) war zwar deutlich geringer, aber deutlich höher als die der zur Kontrolle mitgeführten OL-Lysats. Freie LinD weist den Ergebnissen zufolge eine zu vernachlässigende Hintergrundfluoreszenz auf, während das Fusionsprotein OLm reproduzierbar in guter Korrelation fluoresziert. Es folgte die Überprüfung der Aktivität des Fusionsproteins OLm in Vergleich zum bisher genutzten Konstrukt OL. Hierfür wurden mit analog erstellten Lysaten Biotransformationen nach 3.3.1.1 unter Verwendung des natürlichen Substrats Linalool (10 mM) angesetzt. Die Ergebnisse sind Abbildung 25 zu entnehmen.



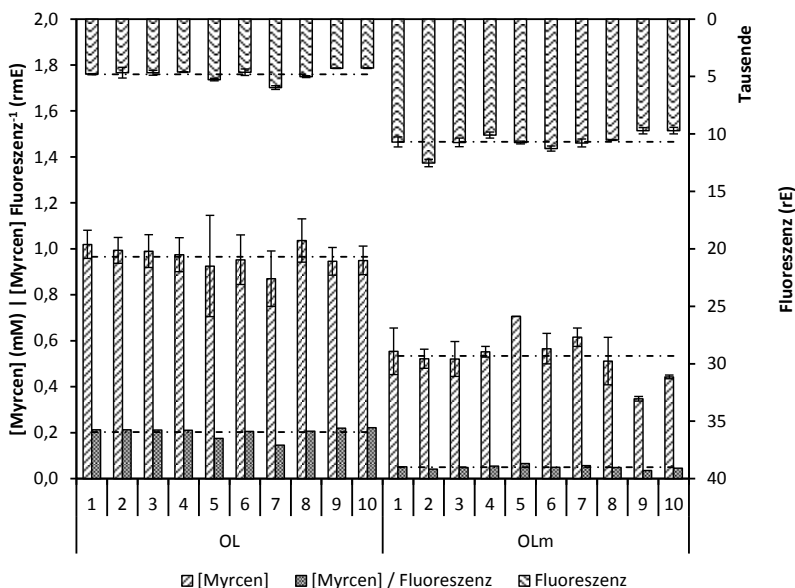
**Abbildung 25: Vergleich der Produktbildung unter Verwendung von OmpA-LinD und OmpA-LinD-mRFP1.** OmpA-LinD (OL) und OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) wurden von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert und Biotransformationen in Lysaten angesetzt. Eingesetzt wurden 10 mM des natürlichen Substrats Linalool. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messungen in biologischen Triplikaten auf

Unter Verwendung des Fusionsproteins OLm konnte mit  $0,6 \pm 0,1$  mM eine Produktbildung erreicht werden, die zwar um die Hälfte geringer ausfiel als mit OL ( $1,2 \pm 0,1$  mM), die aber ebenso eine gute Reproduzierbarkeit aufwies. Aufgrund der Möglichkeit, die Enzymkonzentration mit dem so etablierten System messen zu können, wurde für folgende Experimente das Fusionsprotein OLm eingesetzt.

#### 4.6 Etablierung eines ganzzellbasierten Zweiphasensystems

Aufgrund der hohen Flüchtigkeit des natürlichen Substrate Geraniol und Linalool sowie des natürlichen Produkts Myrcen ebenso wie der noch deutlich größeren Volatilität der weiterhin zu testenden Substrate und Produkte wurde die Möglichkeit untersucht, in einem Zweiphasensystem zu arbeiten. Dieses sollte aus einer wässrigen Reaktionsphase überschichtet mit einer zweiten Phase bestehend aus einem nicht-mischbaren organischen Lösungsmittel bestehen. So sollte die Evaporation der volatilen Stoffe aus der wässrigen Phase verhindert werden. Als organische Phase wurde das bisherige Extraktionsmittel Cyclohexan gewählt. Ferner wurde untersucht, ob anstelle der bisher genutzten Lysate Ansätze mit ganzen Zellen durchgeführt werden können, was den Aufwand bei der Probenvorbereitung bedeutend senken würde. Zunächst wurde die Möglichkeit untersucht, ein entsprechendes System in 96 DWPs zu etablieren. Hierfür wurden OL und OLm in 24 DWPs nach 3.2.6 in biologischen Decaplikaten exprimiert und mit Ganzzellen

aus jedem der Wells Biotransformationen in Triplikaten in 96 DWPs angesetzt. Es wurde ein Verhältnis von 1 mL Reaktionsansatz zu 600  $\mu$ L Cyclohexan gewählt. Die Ergebnisse der Messungen der zehn biologischen Wiederholungen in Triplikaten sind in Abbildung 26 dargestellt. Gemessen wurde die Produktbildung mit dem natürlichen Substrat Linalool (10 mM) nach 3.4.2 sowie die Fluoreszenz nach 3.4.3. Ferner ist der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> aufgezeigt, der zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit herangezogen wurde, da so Unterschiede im Expressionslevel des Konstrukts detektiert werden konnten.



**Abbildung 26: Etablierung eines ganzzellbasierten Zweiphasensystems in 96 DWPs.** Verglichen wurde die Produktbildung von Myrcen aus 10 mM Linalool als Substrat, die Fluoreszenz sowie der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> für OmpA-LinD (OL) und das Fusionskonstrukt OmpA-LinD-mRFP1 (OLm). 1 mL wässriger Reaktionsansatz wurde in 96 DWPs vorgelegt und mit 600  $\mu$ L Cyclohexan überschichtet. Nach Inkubation  $\mu$ N bei 30 °C und 180 rpm wurde direkt aus der organischen Phase in GC/MS injiziert. Exprimiert wurden pET-28a(+):OmpA-LinD und pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 in biologischen Decaplikaten. Biotransformationen wurden je in technischen Triplikaten durchgeführt. Die gestrichelten Linien zeigen jeweils den Mittelwert der 30 Einzelmessungen auf. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Triplikate an. rE, relative Einheiten.

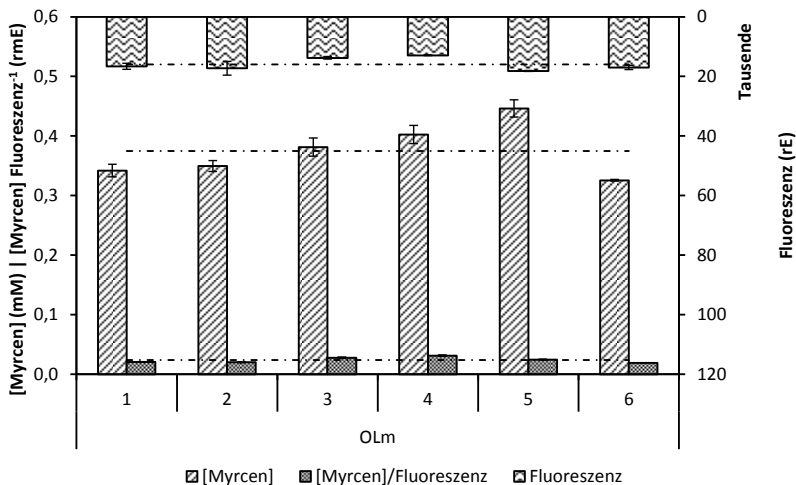
Mit dem so etablierten Zweiphasensystem konnte eine gute Reproduzierbarkeit für OL bezogen auf die Produktbildung erreicht werden. In den 30 analysierten Biotransformationen konnte eine durchschnittliche Produktkonzentration von

1,0 ± 0,1 mM erreicht werden. Der Varianzkoeffizient  $c_v$  wurde hierbei mit 5% berechnet. Die Werte für die Fluoreszenz sowie den Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> sind hierbei als Hintergrundsignale zu deuten, da OL keinen Fluorophor aufweist. Die Signalstärke entspricht hierbei der des Puffers ohne Enzym (Daten nicht gezeigt). Für OLM zeigte sich eine mittlere Produktbildung von 0,5 ± 0,1 mM bei einem  $c_v$  von 17%. Die Fluoreszenz wies einen mittleren dimensionslosen Wert von 10683 ± 775 und somit einen  $c_v$  von 7% auf. Der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> wurde mit einem mittleren Wert von 0,05 ± 0,01 und einem  $c_v$  von 16% errechnet. Die Mittelwerte der in Abbildung 26 dargestellten Messungen sind in Tabelle 13 unter Angabe des Varianzkoeffizienten  $c_v$  zusammengefasst.

**Tabelle 13: Detektierte Produktbildung, Fluoreszenz und Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> für LinD-katalysierte Dehydratisierung von Linalool in einem ganzzellbasierten Zweiphasensystem in 96 DWPs.** Mittelwerte der bestimmten Produktbildung nach der LinD-katalysierten Dehydratisierung von 10 mM Linalool sowie der gemessenen Fluoreszenz der verwendeten Konstrukte OmpA-LinD (OL) und OmpA-LinD-mRFPI (OLm) in biologischen Decaplikaten, die je in technischen Triplikaten analysiert wurden. Für OLM ist zudem der Mittelwert des Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> angegeben. Da OL keinen Fluorophor aufweist und die erhaltene Fluoreszenz als Hintergrund zu deuten ist, wurde der Quotient für OL nicht bestimmt. Für alle gemessenen und errechneten Werte ist der Varianzkoeffizient  $c_v$  angegeben. rE, relative Einheiten; n.b., nicht bestimmbar.

	[Myrcen] (mM)		Fluoreszenz (rE)		[Myrcen] Fluoreszenz <sup>-1</sup> (rmE)	
	MW	$c_v$ (%)	MW	$c_v$ (%)	MW	$c_v$ (%)
OL	1,0 ± 0,1	5	4820 ± 475	10	n.b.	n.b.
Olm	0,5 ± 0,1	17	10683 ± 775	7	0,05 ± 0,01	16

OLm zeigte den Daten entsprechend einen annehmbaren  $c_v$  sowohl für die Produktbildung als auch für die Fluoreszenzmessung und somit auch für den Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup>. Da sich die Messung in 96 DWPs jedoch weiter als kritisch wegen der Volatilität von Substrat, Produkt und organischer Phase erwies, wurde ferner untersucht, ob ein System in luftdicht verschlossenen GC *vials* etabliert werden kann, um den verdampfungsbedingten Fehler weiter zu reduzieren. In biologischen Hexaplikaten wurde pET-28a(+):OLm in *E. coli* Jm83(DE3) nach 3.2.6 in 24 DWPs exprimiert und jeweils Biotransformationen in technischen Triplikaten nach 3.3.1.2 angesetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 30 °C und 180 rpm wurde die Produktbildung durch GC/MS bestimmt. Hierbei wurde auf eine Extraktion der Proben verzichtet und direkt 1 µL aus der organischen Phase in das Gerät injiziert (3.4.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27: Etablierung eines ganzzellbasierten Zweiphasensystems in GC vials.** Verglichen wurde die Produktbildung von Myrcen aus 10 mM Linalool als Substrat, die Fluoreszenz sowie der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> für das Fusionskonstrukt OmpA-LinD-mRFP1 (OLm). 1 mL wässriger Reaktionsansatz wurde in GC vials vorgelegt und mit 900  $\mu$ L Cyclohexan überschichtet. Nach Inkubation  $\mu$ n bei 30 °C und 180 rpm wurde direkt aus der organischen Phase in GC/MS injiziert. Exprimiert wurde pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 in biologischen Hexaplikaten. Biotransformationen wurden je in technischen Triplikaten durchgeführt. Die gestrichelten Linien zeigen jeweils den Mittelwert der 18 Einzelmessungen auf. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Triplikate an. rE, relative Einheiten.

Es ergab sich aus den 18 vermessen Proben eine durchschnittliche Produktkonzentration von  $0,4 \pm 0,0$  mM, was einem  $c_v$  von 11% entspricht. Die Fluoreszenz wurde mit  $15946 \pm 1924$  bestimmt ( $c_v = 12\%$ ) und der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> mit  $0,02 \pm 0,00$  rmE bei einem  $c_v$  von 18% (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Detektierte Produktbildung, Fluoreszenz und Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> für LinD-katalysierte Dehydratisierung von Linalool in einem ganzzellbasierten Zweiphasensystem in GC vials.** Mittelwerte der bestimmten Produktbildung nach der LinD-katalysierten Dehydratisierung von 10 mM Linalool sowie der gemessenen Fluoreszenz des verwendeten Konstrukts OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) in biologischen Hexaplikaten, die je in technischen Triplikaten analysiert wurden. Ferner ist der Mittelwert des Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> angegeben. Für alle gemessenen und errechneten Werte ist der Varianzkoeffizient  $c_v$  angegeben. rE, relative Einheiten.

	[Myrcen] (mM)		Fluoreszenz (rE)		[Myrcen] Fluoreszenz <sup>-1</sup> (rmE)	
	MW	$c_v$ (%)	MW	$c_v$ (%)	MW	$c_v$ (%)
OLm	$0,4 \pm 0,0$	11	$15946 \pm 1924$	12	$0,02 \pm 0,00$	18



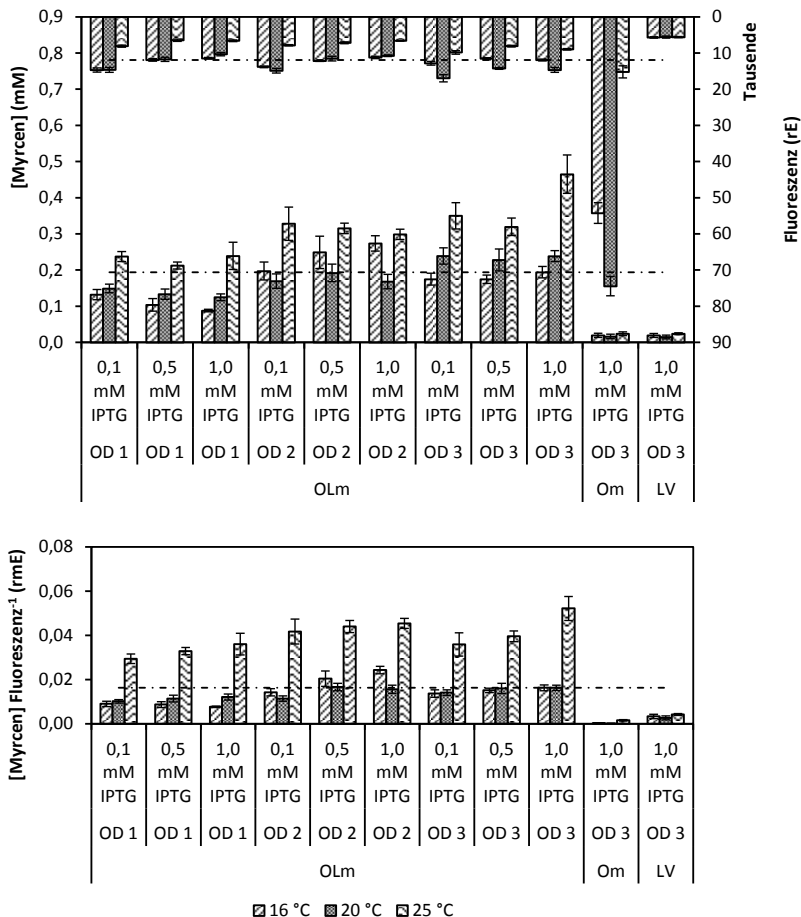
Durch den Einsatz des ganzzellbasierten Zweiphasensystems in GC *vials* war die erreichte Produktbildung mit 62% der in 96 DWPs erzielten Produktbildung zwar niedriger, jedoch konnte mit 11% ein im Vergleich zu 17% in 96 DWPs verbesserter  $c_v$  erreicht werden. Ferner wiesen die Werte für den Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> vernachlässigbare Unterschiede auf (Tabellen 13 und 14). Somit wurde für weitere Experimente das System in GC *vials* herangezogen. Aufgrund der Tatsache, dass die erzielten Umsätze verhältnismäßig gering waren, sollte im Zuge der Masterarbeit von Ludwig Bengel am Institut für Biochemie und Technische Biochemie der Universität Stuttgart, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit betreut wurde, eine Expressionsanalyse in Abhängigkeit externer Parameter durchgeführt werden, durch der zu erzielende Umsatz unter Verwendung des OLM Konstrukts erhöht werden sollte.

## 4.7 Expressionsanalyse von LinD

Im Zuge einer betreuten Masterarbeit (Ludwig Bengel; Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart) sollten die externen Expressionsparameter Induktions-OD<sub>600</sub>, Induktorkonzentration sowie Expressionstemperatur untersucht werden. Ferner sollte der Einfluss der Änderung der Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz sowie deren Abstand zum Startcodon von OLM durch Einsatz des EMOPEC *tools* (*Empirical Model and Oligos for Protein Expression Changes*, [emopec.biosustain.dtu.dk](http://emopec.biosustain.dtu.dk)) untersucht werden. Zur Überprüfung der Expressionsstärke wurde die Fluoreszenz des Fusionskonstrukts sowie der Umsatz in Bezug auf das natürliche Substrat Linalool untersucht werden. Alle Biotransformationen erfolgten durch das in 4.6 etablierte ganzzellbasierte Zweiphasensystem in GC *vials*.

### 4.7.1 Änderung der externen Expressionsparameter

Standardmäßig wurde die Expression OLM bis dato nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 3,0 durch Zugabe 1 mM induziert und üN bei 16 °C und 180 rpm inkubiert. Im Zuge der betreuten Masterarbeit von Ludwig Bengel sollte der Einfluss dieser externen Expressionsparameter untersucht werden. Für die Induktions-OD<sub>600</sub> wurden 1,0, 2,0 und 3,0 gewählt, die Induktorkonzentration zwischen 0,1 mM, 0,5 mM und 1,0 mM variiert sowie Expressionstemperaturen von 16 °C, 20 °C und 25 °C verglichen. Die Expression erfolgte hierbei in 24 DWPs nach 3.2.6, wobei jeweils die angesprochenen Parameter in allen sich ergebenden Kombinationen verglichen wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt.

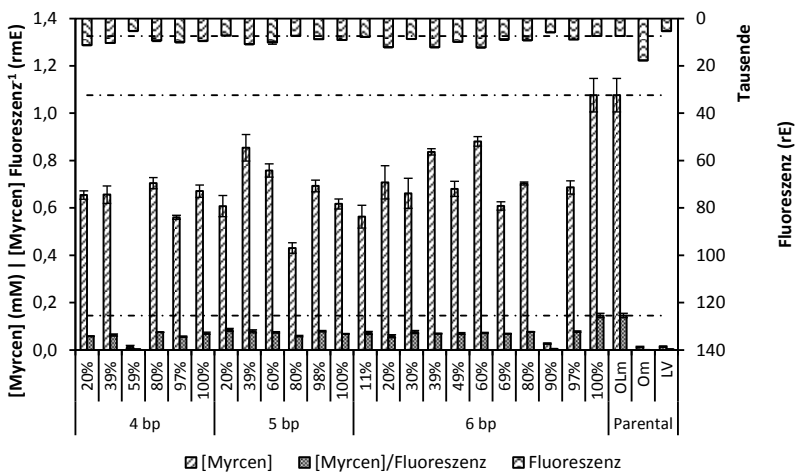


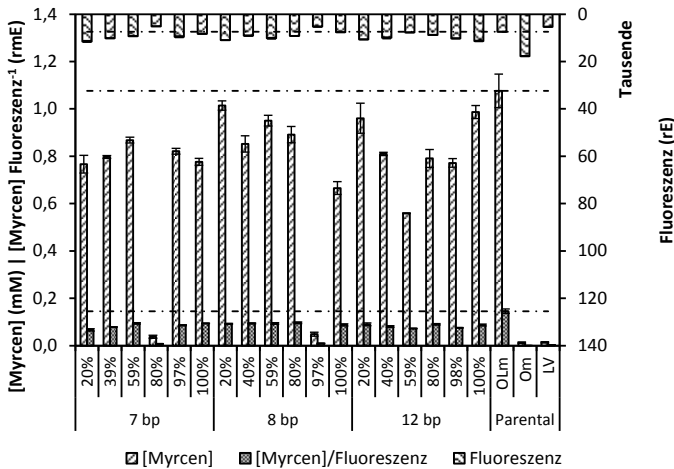
**Abbildung 28: Einfluss externer Expressionsparameter Induktions-OD<sub>600</sub>, Induktorkonzentration sowie Expressionstemperatur auf Produktbildung bei der LinD-katalysierten Dehydratisierung von Linalool sowie die Fluoreszenz des Fusionsproteins.** Verglichen wurde die Produktbildung von Myrcen aus 10 mM Linalool als Substrat, die Fluoreszenz sowie der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> für das Fusionskonstrukt OmpA-LinD-mRFP1 (OLm). Die Biotransformationen wurden im beschriebenen ganzzellbasierten Zweiphasensystem nach Expression von pET-28a(+):OLm in *E. coli* Jm83(DE3) durchgeführt, wobei die Induktions-OD<sub>600</sub> mit 1,0, 2,0 sowie 3,0 gewählt wurde. Ferner wurde die Induktorkonzentration (IPTG) mit 0,1 mM, 0,5 mM sowie 1,0 mM und die Expressionstemperatur mit 16 °C, 20 °C sowie 25 °C variiert. Zur Kontrolle wurde pET-28a(+):OmpA-mRFP1 (Om) sowie der pET-28a(+) Leervektor (LV) mitgeführt und analog behandelt. Die gestrichelten Linien zeigen die Werte der unter Standardbedingungen erhaltenen Werte auf (OD<sub>600</sub> von 3,0, 1,0 mM IPTG und Expression bei 16 °C). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der biologischen Triplikate an. rE, relative Einheiten.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, zeigt OLM exprimiert bei 25 °C erhöhte Produktbildungen im Vergleich zu den Standardbedingungen (gestrichelte Linie), wobei derjenige nach Induktion bei  $OD_{600}$  von 3,0 der höchsten gemessenen Produktbildung entspricht. Die Fluoreszenz hingegen nimmt nach Expression bei 25 °C deutlich ab. Dies ist besonders deutlich an der OmpA-mRFP1 (Om)-Kontrolle zu sehen. Exprimiert bei 16 und 20 °C waren hier mit ca. 54.000 und ca. 74.000 relativen Einheiten (rE) sehr hohe Fluoreszenzen detektierbar, während die Fluoreszenz des bei 25 °C exprimierten mRFP1 mit ca. 15.000 rE etwa auf dem Niveau der OLM Konstrukte liegt. Aufgrund der niedrigen Fluoreszenz sind ebenfalls die Werte für den Quotienten  $[\text{Produkt}] \text{Fluoreszenz}^{-1}$  deutlich höher als bei den bei niedrigeren Temperaturen exprimierten Proben. Da hierdurch eine Verfälschung der Expressionsstärke durch Fluoreszenzmessung zu erwarten war, wurde eine Expression bei 25 °C trotz der erhöhten Produktbildung nicht weiter betrachtet. Bei einer Induktions- $OD_{600}$  von 3,0 zeigten die Expressionen bei 20 °C höhere Produktbildungen verglichen mit Expression bei 16 °C, wobei hier kein eindeutiger Einfluss der IPTG Konzentration ausgemacht werden konnte. In Betrachtung auf den Quotienten  $[\text{Produkt}] \text{Fluoreszenz}^{-1}$  war dieser Trend jedoch nicht weiterhin erkennbar; hier lagen die Werte auf einem den Standardbedingungen vergleichbaren Niveau. Die Fluoreszenz der Fusionsproteine war nach Expression bei 20 °C höher als die der bei 16 °C exprimierten, besonders für die bei einer  $OD_{600}$  von 3,0 induzierten Proben. Bezogen auf den Quotienten  $[\text{Produkt}] \text{Fluoreszenz}^{-1}$  hoben sich diese Effekte gegenseitig auf, was sich in relativ konstanten Quotienten für die bei  $OD_{600}$  von 3,0 induzierten Proben niederschlägt. Auch hier ist kein deutlicher Effekt durch variierende Induktorkonzentration offensichtlich. Die höchste Produktbildung mit Ausnahme der 25 °C Proben konnte nach Expression bei 16 °C nach Induktion mit 0,5 mM bzw. 1,0 mM IPTG detektiert werden, wobei sich diese beiden Proben angesichts der Standardabweichung kaum unterscheiden. Aufgrund der technisch leichter zu bewerkstelligen Expression bei 20 °C und der Tatsache, dass die Unterschiede in der Produktbildung zwischen 16 °C und 20 °C relativ gering ausfielen, wurde für künftige Proben eine Expression bei 20 °C gewählt. Ferner ist bei dieser Temperatur die Fluoreszenz des Fusionsproteins sowohl als auch des freien periplasmatisch exprimierten Proteins Om nachweislich höher als bei 16 °C.

#### 4.7.2 Änderung der Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz

Unter Verwendung des EMOPEC *tools* wurden Konstrukte nach 3.1.13 *in silico* erstellt, um den Einfluss der Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz auf Umsatz sowie Fluoreszenz des OLm Fusionsproteins und somit die Expression zu untersuchen. Hierbei wurde die parentale SD-Sequenz von pET-28a(+):OLm sowie deren Abstand zum Startcodon von OLm durch den Algorithmus des *tools* in Bezug auf die Expressionsstärke des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) nach 3.1.13 (Tabelle 10) verändert. Nach erfolgreicher Erstellung der Konstrukte und deren Bestätigung durch Sequenzieren nach 3.1.11 wurden die Plasmide nach 3.2.3 in *E. coli* Jm83(DE3) transformiert und nach 3.2.6 in 24 DWPs exprimiert. Nach der Expression wurden die Zellen geerntet und in 3 mL Reaktionspuffer (2.3.2) aufgenommen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde von allen Konstrukten die OD<sub>600</sub> gemessen und schließlich auf einen Wert von 2,0 eingestellt. Die anschließenden Biotransformationen wurden nach 3.3.1.2 unter Verwendung des etablierten ganzzellbasierten Zweiphasensystems angesetzt, wobei das natürliche Substrat Linalool (10 mM) eingesetzt wurde. Zur Kontrolle wurde das Konstrukt pET-28a(+):Om sowie der pET-28a(+) Leervektor (LV) mitgeführt und analog behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.





**Abbildung 29: Einfluss der Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz sowie deren Abstand zum Startcodon auf die Expression von OmpA-LinD-mRFP1.** Anhand des EMOPEC *tools* wurden *in silico* Konstrukte erstellt, bei denen die SD-Sequenz sowie deren Abstand zum Startcodon von OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) dergestalt verändert wurde, dass relative Expressionsstärken zum grün fluoreszierenden Protein (GFP) von ca. 20%, 40%, 60%, 80% und 100% vorhergesagt wurden. Als Abstände wurden 4 – 8 bp sowie 12 bp gewählt. Alle durch das EMOPEC *in silico* erstellten Konstrukte wurden von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert. Die Kontrolle der Expression erfolgte durch die Messung der Produktbildung von Myrcen, wobei 10 mM Linalool als Substrat eingesetzt wurden, im beschriebenen ganzzellbasierten Zweiphasensystem sowie durch Messung der Fluoreszenz. Ferner wurde der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> errechnet. Zur Kontrolle wurden die parentalen Konstrukte OLm, pET-28a(+):OmpA-mRFP1 (Om) sowie der pET-28a(+) Leervektor (LV) mitgeführt und analog behandelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen auf. rE, relative Einheiten.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, zeigten die gemessenen Produktbildungen ebenso wenig wie die gemessenen Fluoreszenzen Trends, die den von EMOPEC vorhergesagten Expressionsstärken entsprechen. Die höchste Fluoreszenz wurde erwartungsgemäß mit dem OLm Konstrukt gemessen. Die höchste gemessene Produktbildung wurde mit der parentalen SD-Sequenz und der ebenfalls parentalen Zwischensequenzlänge von 6 bp erreicht. Gleiches gilt auch für den Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup>, der ebenfalls beim parentalen Konstrukt OLm am höchsten war.

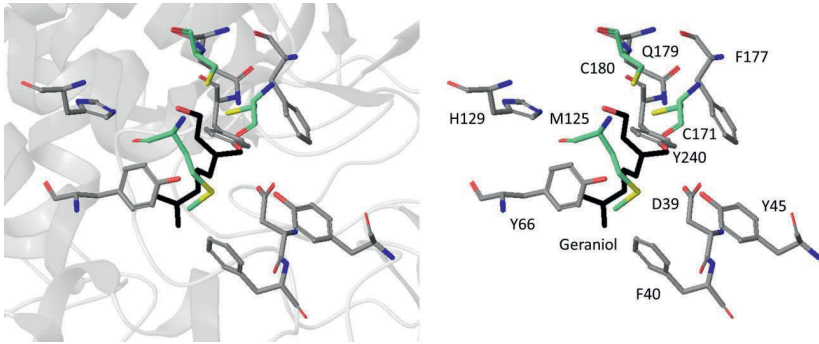
#### 4.8 Semi-rationale Mutagenese

Zur weiteren experimentellen Analyse des in Abbildung 6 dargestellten Mechanismus von LinD wurden ergänzend zu den in Abbildung 5 dargestellten weitere

Substitutionsvarianten erstellt, um den Einfluss der entsprechenden Positionen gezielt zu untersuchen. Ferner wurden anhand der Kristallstruktur von LinD mit *gesoaktem* Geraniol (PDB: 5G1U) semi-rational Positionen *in silico* identifiziert, von denen ein Einfluss auf die Umsetzung kurzkettiger Alkenole angenommen wurde. Da durch diese Varianten speziell die Umsetzung kurzkettiger Alkenole untersucht werden sollte, wurde für alle Varianten zunächst die Dehydratisierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) zu Isopren untersucht. Zunächst sollte die aktive Tasche der LinD durch Punktmutationen dergestalt verändert werden, dass die Bindung kurzkettigerer Moleküle als die natürlichen Substrate begünstigt wird. In einem weiteren Ansatz wurden die B-Faktoren der Struktur *in silico* unter- und nach flexiblen Bereichen gesucht, die womöglich einen Einfluss auf die Reaktivität des Enzyms haben könnten.

#### 4.8.1 Substitutionsvarianten

Der von Nestl und Kollegen 2017 postulierte Mechanismus umfasst insgesamt acht Aminosäuren, D39, Y45, M125, H129, C171, Q179, C180 und Y240. Von fünf hiervon wurden bereits Substitutionsvarianten (Y45F, M125A, H129A, C171A und C180S; Abbildung 5) erstellt, um anhand der verbleibenden Aktivität Rückschlüsse auf eine Beteiligung in der Katalyse zu erhalten. Diese sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergänzt werden, um die Kenntnisse über am Mechanismus beteiligte Reste weiter zu vertiefen. Hierfür wurden die Positionen D39, Y45, H129, Q179 sowie Y240 gewählt und durch hydrophobe Aminosäuren (A, F, L, W und Y) ersetzt. Ferner wurden anhand der Kristallstruktur von LinD (PDB: 5G1U) mit F40, Y66 und F177 Positionen gewählt, die einen Abstand von  $\leq 5 \text{ \AA}$  zur Hydroxygruppe des *gesoakten* Geraniols aufwiesen. Da die aktive Tasche von LinD hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren aufweist, wurden die identifizierten Reste zu großen und kleinen hydrophoben Aminosäuren mutiert. Hierbei wurde der Abstand des jeweiligen Rests vom *gesoakten* Geraniol bei der Wahl der Größe der einzusetzenden AS berücksichtigt. Abbildung 30 zeigt die entsprechenden Positionen auf.



**Abbildung 30:** *In silico* identifizierte zu mutierende Positionen in der LinD Kristallstruktur. Die Positionen D39, Y45, H129, Q179 sowie Y240 sind am von Nestl und Kollegen (2017) postulierten Mechanismus beteiligt. Die hydrophoben Reste F40, Y66 und F177 weisen einen Abstand von  $\leq 5$  Å zur Hydroxygruppe des *gesoakten* Geraniols in der Kristallstruktur (PDB: 5GIU) auf und sind somit Teil der aktiven Tasche des Enzyms.

Tabelle 15 gibt Aufschluss über die durchgeführten Substitutionen unter Angabe der verwendeten Oligonukleotide, die eingesetzt wurden, um Mutationen durch *QuikChange*<sup>TM</sup> nach 3.1.5 einzuführen. Die zu untersuchende Rolle der entsprechenden Mutation ist ebenso angegeben. Als Templat für die Mutagenese wurde pET-28a(+):OLm eingesetzt.

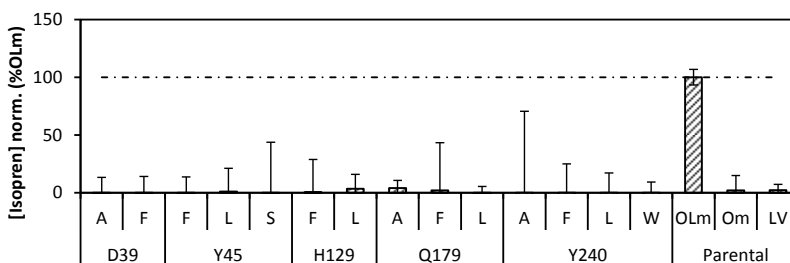
**Tabelle 15:** Übersicht der semi-rational durch *QuikChange*<sup>TM</sup> erstellten Substitutionsvarianten. Die Sequenzen der Oligonukleotide unter Angabe der Schmelztemperaturen finden sich im Anhang (7.1). AS, Aminosäure; *for*, *forward*; *rev*, *reverse*.

Position	Rolle	AS-Austausch	Oligonukleotide	
			<i>for</i>	<i>rev</i>
D39	Mechanismus	A	42	43
		F	44	45
		A*	46	47
		D	48	49
		E	50	51
		I	52	53
		L	54	55
F40	Bindung kleinerer Substrate	V	56	57
		W	58	59
		Y	60	61
		F	62	63
		L	64	65
Y45	Mechanismus	S	66	67
		A	68	69
		F	70	71
Y66	Bindung kleinerer Substrate	L	72	73
		W	74	75

H129	Mechanismus	F	76	77
		L	78	79
F177	Bindung kleinerer Substrate	A	80	81
		L	82	83
		W	84	85
		Y	86	87
Q179	Mechanismus	A	88	89
		F	90	91
		L	92	93
Y240	Mechanismus	A	94	95
		F	96	97
		L	98	99
		W	100	101

#### 4.8.1.1 Untersuchung des Mechanismus

Nachdem die in Tabelle 15 gezeigten Varianten erzeugt und durch Sequenzierung nach 3.1.11 bestätigt waren, wurden die entsprechenden Plasmide nach 3.2.3 in *E. coli* Jm83(DE3) transformiert und nach 3.2.6 exprimiert. Nach Ernte der Zellen wurden Biotransformationen mit dem Modellsubstrat 2-3-2 (10 mM) im in 4.6 etablierten ganzzellbasierten Zweiphasensystem in biologischen Triplikaten durchgeführt (3.3.1.2). Zur Kontrolle wurde pET-28a(+):Om sowie der pET-28a(+) Leervektor mitgeführt und analog behandelt. Die detektierten verbleibenden Aktivitäten sind in Abbildung 31 normiert auf das parentale Konstrukt OLm dargestellt.



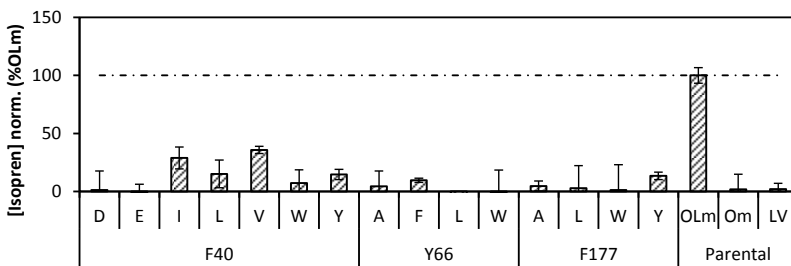
**Abbildung 31: Untersuchung von Substitutionsvarianten putativ am Mechanismus beteiligter Positionen.** Die erzeugten Varianten wurden in Biotransformationen im beschriebenen ganzzellbasierten Zweiphasensystem auf ihre Umsetzung von 10 mM 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) hin untersucht. Die Varianten wurden von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert. Zur Kontrolle wurden die parentalen Konstrukte OmpA-LinD-mRFP1 (OLm), OmpA-mRFP1 (Om) und der pET-28a(+) Leervektor (LV) mitgeführt und analog behandelt. Die gemessenen Produktbildungen wurden in Bezug auf das parentale Konstrukt OLm normiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen auf.



Wie aus der Abbildung hervorgeht, zeigte keine der getesteten Varianten eindeutige Restaktivität gegenüber dem Substrat 2-3-2. Die gemessenen Aktivitäten lagen standardabweichungsbereinigt auf dem Niveau der Negativkontrollen.

#### 4.8.1.2 Reshaping der aktiven Tasche

Nachdem die in Tabelle 15 gezeigten Varianten mit Ausnahme von F40A erzeugt und durch Sequenzierung nach 3.1.10 bestätigt waren, wurden die entsprechenden Plasmide nach 3.2.3 in *E. coli* Jm83(DE3) transformiert und nach 3.2.6 exprimiert. F40A konnte auch nach mehreren Versuchen nicht erfolgreich erzeugt werden, daher wurde auf eine weitere Verwendung verzichtet. Nach Ernte der Zellen wurden Biotransformationen mit dem Modellsubstrat 2-3-2 (10 mM) im in 4.6 etablierten ganzzellbasierten Zweiphasensystem in biologischen Triplikaten durchgeführt (3.3.1.2). Die detektierten Umsätze sind in Abbildung 32 normiert auf das parentale Konstrukt OLm dargestellt.

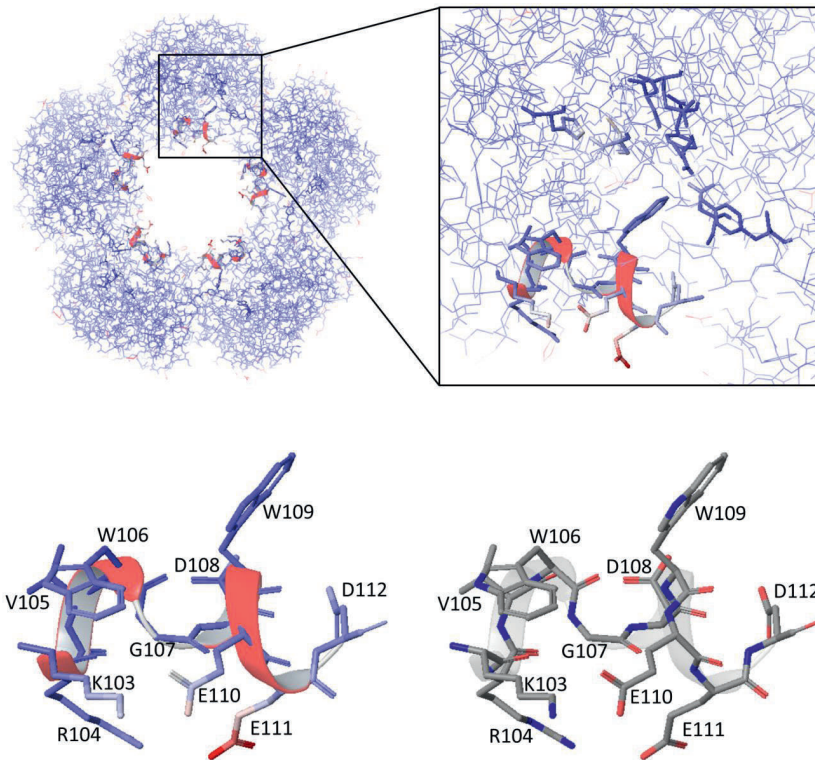


**Abbildung 32: Untersuchung von Substitutionsvarianten für *reshaping* der aktiven Tasche von Lind.** Die erzeugten Varianten wurden in Biotransformationen im beschriebenen ganzzellbasierten Zweiphasensystem auf ihre Umsetzung von 10 mM 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) hin untersucht. Die Varianten wurden von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert. Zur Kontrolle wurden die parentalen Konstrukte OmpA-LinD-mRFP1 (OLm), OmpA-mRFP1 (Om) und der pET-28a(+) Leervektor (LV) mitgeführt und analog behandelt. Die gemessenen Produktbildungen wurden in Bezug auf das parentale Konstrukt OLm normiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen auf.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, zeigte keine der getesteten Varianten einen positiven Einfluss auf den Umsatz von 2-3-2 zu Isopren. Vielmehr wiesen alle getesteten Varianten deutlich niedrigere bis keine detektierbaren Aktivitäten auf. Die Substitutionen an Position F40 zeigten die höchste residuale Aktivität, wobei F40V maximal  $36 \pm 3\%$  der Aktivität von OLm erreichte. F40I, F40L sowie F40Y zeigten mit relativ zu OLm  $29 \pm 9\%$ ,  $15 \pm 12\%$  sowie  $15 \pm 5\%$  ebenfalls eindeutig messbare Aktivitäten. An den verbleibenden Positionen konnte nur für Y66F sowie F177Y standardabweichungsbereinigt verbleibende Aktivität mit  $10 \pm 2\%$  sowie  $14 \pm 3\%$  nachgewiesen werden.

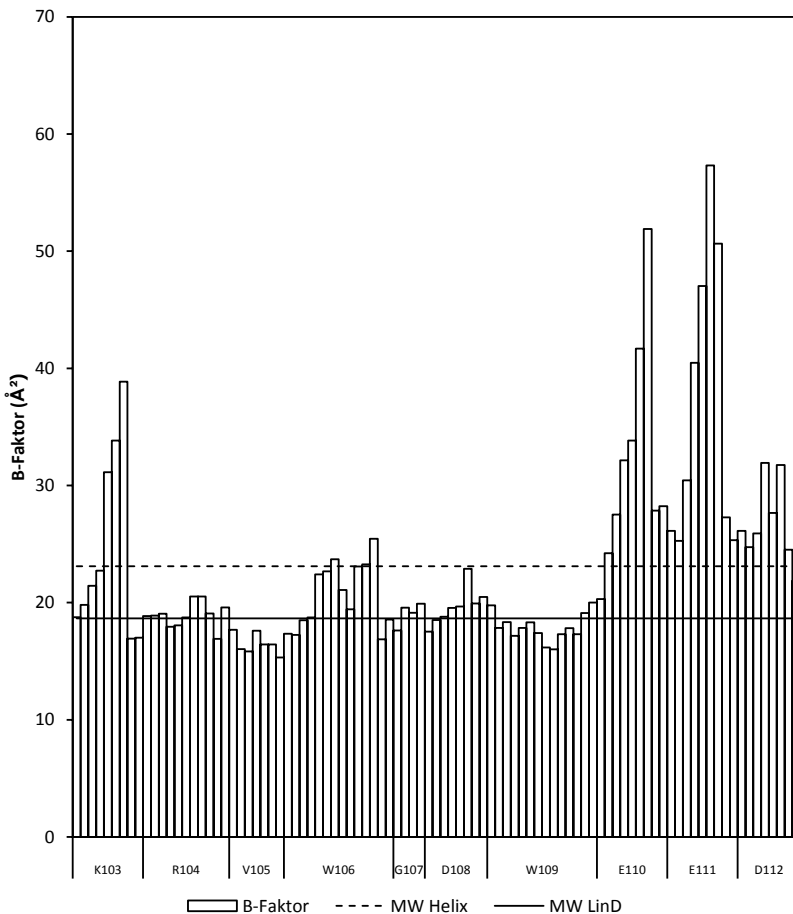
### 4.8.2 B-Faktor Analyse

Da durch semi-rationale Mutagenese keine aktiveren Varianten generiert werden konnten, wurde mit der Betrachtung der B-Faktoren (Temperaturfaktoren) ein anderer Ansatz zur Identifizierung von Positionen für weitere Mutagenese gewählt. Hohe B-Faktoren sprechen für eine hohe Beweglichkeit des entsprechenden Atoms (Debye, 1912; Waller, 1923). Der B-Faktor gibt die dynamische Verteilung eines Atoms durch dessen temperaturbedingte Vibration sowie die statische Verteilung durch kleine Unterschiede in den Einheitszellen einer Kristallstruktur an. Dimensioniert in  $\text{Å}^2$  spiegelt der B-Faktor folglich die flächige Abweichung eines Atoms von seiner Gleichgewichtsposition wider. Hierbei ist bei B-Faktoren bis  $30 \text{ Å}^2$  davon auszugehen, dass das Atom an der jeweiligen Position im Kristall lokalisiert ist; bei B-Faktoren über  $60 \text{ Å}^2$  hingegen ist von einer Delokalisierung des Atoms auszugehen (proxymol.com vom 29.01.2019). Für die Bestimmung der B-Faktoren wurde die LinD-Struktur (PDB: 5G1W) von Nestl und Kollegen (2017) herangezogen und die B-Faktoren durch Maestro Version 10.2.010 (Schrödinger K.K.; Tokio, Japan) abgebildet. Hierbei zeigten sich neben dem N-Terminus der Struktur besonders für eine auf der Innenseite des Pentamers liegende  $\alpha$ -Helix hohe B-Faktoren (Abbildung 33, oben). Diese  $\alpha$ -Helix besteht aus den Resten K103, R104, V105, W106, G107, D108, W109, E110, E111 und D112 (Abbildung 33, unten). Die Reste K103, E110 und E111 wiesen besonders hohe B-Faktoren auf (Abbildung 33, unten).



**Abbildung 33: Analyse der B-Faktoren in der LinD Kristallstruktur.** Anhand der Kristallstruktur von LinD (PDB: 5G1W) wurden die B-Faktoren der Atome durch Maestro Version 10.2.010 (Schrödinger K.K.; Tokio, Japan) abgebildet. Hohe B-Faktoren sind hierbei in rot, niedrige in blau dargestellt. In der Struktur sind die Aminosäurereste der aktiven Tasche dick dargestellt (oben), ebenso wie die Reste auf der identifizierten  $\alpha$ -Helix, die relativ hohe B-Faktoren aufweisen (schwarzer Kasten). Unten ist die  $\alpha$ -Helix von K103 bis D112 unter Aufzeigen der B-Faktoren (links) sowie ohne (rechts) dargestellt.

Ferner wurden die B-Faktoren aus der entsprechenden PDB-Datei (5G1W) extrahiert und in Abbildung 34 dargestellt. Wie aus den Abbildungen 33 und 34 hervorgeht, liegen die B-Faktoren der Reste K103 ( $24,5 \pm 7,6 \text{ \AA}^2$ ), W106 ( $20,6 \pm 2,7 \text{ \AA}^2$ ), E110 ( $32,0 \pm 91 \text{ \AA}^2$ ), E111 ( $36,7 \pm 11,7 \text{ \AA}^2$ ) und D112 ( $26,8 \pm 3,3 \text{ \AA}^2$ ) über dem Durchschnitt der B-Faktoren des gesamten Enzyms ( $18,7 \pm 6,7 \text{ \AA}^2$ ). K103, E110, E111 und D112 zeigen zudem B-Faktoren, die über dem Durchschnitt der betrachteten  $\alpha$ -Helix ( $23,1 \pm 8,3 \text{ \AA}^2$ ) liegen, wobei einige Atome der Reste E110 und E111 zudem Werte aufweisen, die nahe an  $60 \text{ \AA}^2$  liegen (*vide supra*).

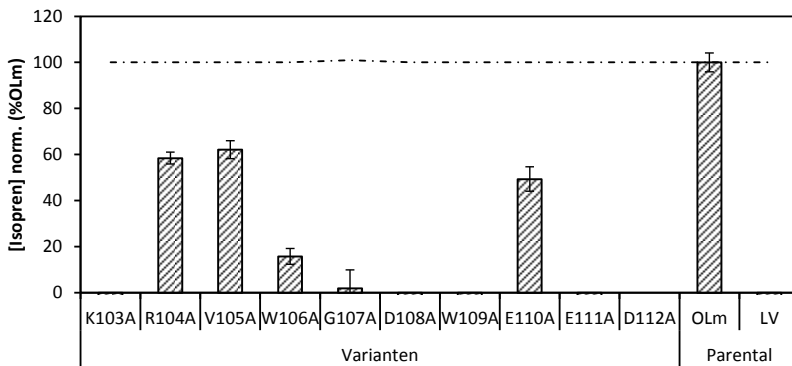


**Abbildung 34: B-Faktoren der identifizierten  $\alpha$ -Helix.** Die B-Faktoren der Atome in ( $\text{\AA}^2$ ) der identifizierten  $\alpha$ -Helix wurden der PDB-Datei der Kristallstruktur von LinD (PDB: 5G1W) entnommen. Die durchgezogene Linie zeigt den Mittelwert (MW) aller Atome in der LinD Struktur auf, die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert aller Atome der  $\alpha$ -Helix auf.

Aufgrund der beschriebenen B-Faktor-Analyse sollte der Einfluss der beschriebenen  $\alpha$ -Helix auf die Aktivität von LinD bestimmt werden. Hierfür wurden zunächst Alaninsubstitutionsvarianten erstellt.

### 4.8.3 Alanin-Scan der $\alpha$ -Helix

Die Alaninsubstitutionsvarianten der  $\alpha$ -Helix wurden durch *QuikChange*<sup>™</sup> nach 3.1.5 erstellt. Als Templat wurde pET-28a(+):OLm eingesetzt. Als Oligonukleotide kamen **102** und **103** (K103A), **104** und **105** (R104A), **106** und **107** (V105A), **108** und **109** (W106A), **110** und **111** (G107A), **112** und **113** (D108A), **114** und **115** (W109A), **116** und **117** (E110A), **118** und **119** (E111A) sowie **120** und **121** (D112A) zum Einsatz (7.1). Nachdem die Varianten erzeugt und durch Sequenzierung nach 3.1.11 bestätigt waren, wurden die entsprechenden Plasmide nach 3.2.3 in *E. coli* Jm83(DE3) transformiert und nach 3.2.6 exprimiert. Nach Ernte der Zellen wurden Biotransformationen mit dem Modellsubstrat 2-3-2 (10 mM) im in 4.6 etablierten ganzzellbasierten Zweiphasensystem in biologischen Triplikaten durchgeführt (3.3.1.2). Die detektierten Umsätze sind in Abbildung 35 normiert auf das parentale Konstrukt OLm dargestellt.



**Abbildung 35: Untersuchung von Alaninsubstitutionsvarianten der Aminosäurereste der identifizierten  $\alpha$ -Helix (K103 - D112).** Die erzeugten Varianten wurden in Biotransformationen im beschriebenen ganzzellbasierten Zweiphasensystem auf ihre Umsetzung von 10 mM 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) hin untersucht. Die Varianten wurden von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert. Zur Kontrolle wurden die parentalen Konstrukte *OmpA-LinD-mRFP1* (OLm) und der pET-28a(+) Leervektor (LV) mitgeführt und analog behandelt. Die gemessenen Produktbildungen wurden in Bezug auf das parentale Konstrukt OLm normiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen auf.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, zeigten fünf der getesteten zehn Varianten, K103A, D108A, W109A, E111A und D112A, keine detektierbare Produktbildung. Die übrigen fünf Varianten zeigten Produktbildung, die jedoch deutlich unter dem des parentalen Konstrukts OLm lag. R104A, V105A und E110A zeigten mit  $59 \pm 3\%$ ,  $62 \pm 4\%$  und  $49 \pm 5\%$  vergleichbare Produktbildungen in Relation zu OLm. Die für W106A detektierte Produktbildung fiel mit  $16 \pm 4\%$  jedoch deutlich niedriger aus. Für G107A wurde eine

vernachlässigbar kleine residuale Produktbildung detektiert. Aus der Datenlage wurde auf einen Einfluss der  $\alpha$ -Helix auf die LinD-katalysierte Dehydratisierung von 2-3-2 geschlossen. Zur weiteren Untersuchung dieses Effekts sollten die zehn in Abbildung 33 dargestellten Positionen der  $\alpha$ -Helix gesättigt werden.

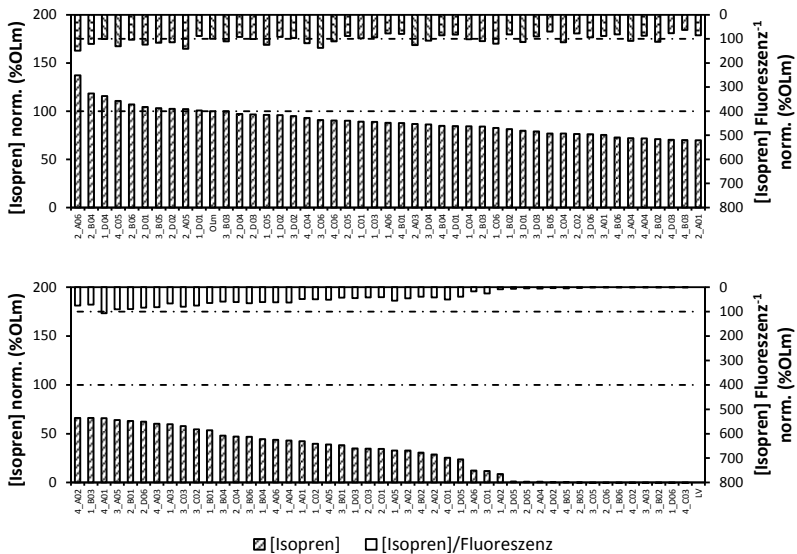
#### 4.8.4 Sättigung der Positionen der $\alpha$ -Helix (K103 – D112)

Die Sättigung der Reste der  $\alpha$ -Helix erfolgte durch *overlap extension*-PCR unter Verwendung des 22c-Tricks. Wie in 3.1.6 erläutert, werden bei dieser Methode drei *for* Oligonukleotide, die über degenerierte Codons verfügen, sowie ein *rev* Oligonukleotid in eine PCR nach 3.1.3 eingesetzt. Unter Verwendung der degenerierten Codons NDT (zwölf Codons) und VHG (neun Codons) können 19 der 20 proteinogenen Aminosäuren codiert werden. Da Tryptophan in diesen nicht enthalten ist, wird zudem ein Oligonukleotid mit dem für Tryptophan codierenden Codon TGG zugefügt. Durch Mischen der Oligonukleotide im Verhältnis 12:9:1 wird so der in die PCR eingesetzte *for* Oligonukleotidmix erstellt. Das *rev* Oligonukleotid hingegen wird nicht-mutagen abgeleitet. Tabelle 16 zeigt eine Übersicht der für die Sättigung der Positionen eingesetzten Oligonukleotide. Zur Kontrolle wurde die bereits händisch gesättigte Position G107 ebenfalls mitgeführt. Als Templat wurde pET-28a(+):OLm gewählt.

**Tabelle 16: Übersicht über die eingesetzten Oligonukleotide für die Sättigung der Aminosäurereste der identifizierten  $\alpha$ -Helix (K103-D112).** Die drei denaturierten *for* Oligonukleotide codieren für zwölf (NDT) und neun (VHG) Codons, in denen jedoch kein für Tryptophan codierendes Codon enthalten ist, weswegen ein zu TGG mutiertes Oligonukleotid gesondert zugegeben wird. Die *for* Oligonukleotide werden im Verhältnis 12:9:1 gemischt und in eine PCR unter Verwendung des jeweiligen nicht-nutagenen *rev* Oligonukleotids eingesetzt. Als Templat diente pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1. Die Sequenzen der Oligonukleotide unter Angabe der Schmelztemperaturen finden sich im Anhang (7.1). *for*, *forward*; *rev*, *reverse*.

Position	Oligonukleotide			
	<i>for</i> NDT	<i>for</i> VHG	<i>for</i> TGG	<i>rev</i>
K103	122	123	124	125
R104	126	127	128	129
V105	130	131	132	133
W106	134	135	136	137
G107	138	139	140	141
D108	142	143	144	145
W109	146	147	148	149
E110	150	151	152	153
E111	154	155	156	157
D112	158	159	160	161

Der Erfolg der Sättigung wurde jeweils durch Sequenzierung nach 3.1.11 der aus *E. coli* XL1 Blue isolierten Plasmid-DNA positiv überprüft (Daten nicht gezeigt). Nach erfolgreicher Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli* Jm83(DE3) wurden je 92 Kolonien gepickt und Vorkulturen in 4 mL LB Flüssigmedium (2.5.1) in 24 DWPs angesetzt. Zur Kontrolle wurde jeweils das parentale Konstrukt OLM sowie der pET-28a(+) Leervektor mitgeführt. Nach Expression (3.2.6) und Ernte der Zellen wurden Biotransformationen mit dem Modellsubstrat 2-3-2 (10 mM) im in 4.6 etablierten ganzzellbasierten Zweiphasensystem in biologischen Triplikaten durchgeführt (3.3.1.2). Zur Kontrolle der Expression der Varianten wurde die Fluoreszenz der nach 3.2.7.2 lysierten Zellen nach 3.4.3 gemessen und der Quotient  $[\text{Produkt}] \text{Fluoreszenz}^{-1}$  ermittelt. Exemplarisch sind die erhaltenen Daten für die Sättigung der Position K103 in Abbildung 36 dargestellt.



**Abbildung 36: Exemplarische Ergebnisse der nach Sättigung der Position K103 analysierten Kolonien.** Nach Sättigung durch *overlap extension*-PCR in Kombination mit dem „22c trick“ wurde der Sättigungsansatz in *E. coli* Jm83(DE3) transformiert und ausgehend von 92 Kolonien Biotransformationen unter Verwendung von 10 mM 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) im beschriebenen ganzzellbasierten Zweiphasensystem in Einzelbestimmung durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die parentalen Konstrukte OmpA-LinD-mRFP1 (OLM) sowie der pET-28a(+) Leervektor (LV) mitgeführt und analog behandelt. Die erhaltenen Produktbildungen wurden in Bezug auf OLM normiert und sind in absteigender Reihenfolge sortiert unter Angabe des Quotienten  $[\text{Produkt}] \text{Fluoreszenz}^{-1}$  dargestellt. Die gestrichelten Linien geben jeweils den Wert des parentalen Konstrukts OLM an (100%).

Die erhaltenen Daten wurden wie in Abbildung 36 exemplarisch gezeigt sowohl für die Produktbildung als auch für den Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> in Bezug auf das parentale Konstrukt OLM normiert und sortiert nach der Produktbildung aufgetragen. In erster Linie wurde bei der Wahl detailliert zu untersuchender Varianten auf die Produktbildung geachtet. Der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> diente der Kontrolle der Daten, um falsch-positive oder -negative Kolonien ausschließen zu können. So wurden neben Kolonien, die erhöhte Produktbildung aufwiesen, auch solche für eine erneute Betrachtung herangezogen, die einen außergewöhnlich hohen Quotienten bei relativ geringem Umsatz aufwiesen. Von Kolonien, die so als Hits identifiziert wurden, wurde aus den entsprechenden Vorkulturen die Plasmid-DNA nach 3.1.1 isoliert und durch Sequenzieren nach 3.1.11 untersucht. Nach erfolgreicher Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde diese erneut nach 3.2.3 in *E. coli* Jm83(DE3) transformiert. In Bezug auf die in Abbildung 36 nach Sättigung der Position K103 exemplarisch gezeigten Daten wurden demzufolge die Kolonien 2\_A06 und 2\_B04 als Hits identifiziert und wie beschrieben weiter behandelt. Alle auf diese Weise identifizierten Hits sind in Tabelle 17 unter Angabe der Sequenzierungsergebnisse dargestellt.

**Tabelle 17: Durch Sättigung der Reste K103-D112 identifizierte Hits in Bezug auf die Dehydratisierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol.** Aufgezeigt sind die Normierungen der gemessenen Produktbildung sowie der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> jeweils bezogen auf das parentale Konstrukt OmpA-LinD-mRFP1 (OLM). Von allen identifizierten Hits wurde Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung ist wiedergegeben, Sequenzierungsergebnisse, die dem parentalen Konstrukt entsprachen, sind mit |---| gekennzeichnet. n.z., nicht zutreffend.

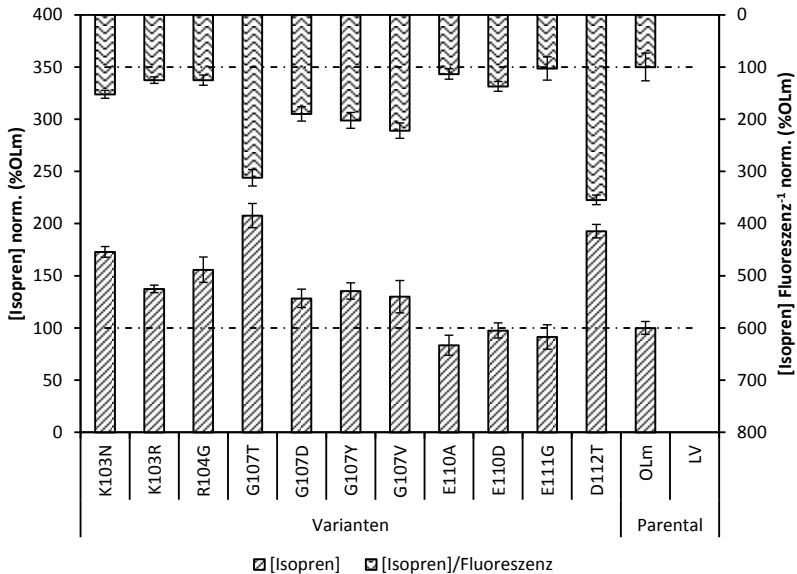
Position	[Isopren] norm. (%OLM)	[Isopren] Fluoreszenz <sup>-1</sup> norm. (%OLM)	Kolonie	Sequenzierung
K103	137	149	2_A06	K103N
	118	121	2_B04	K103R
R104	119	130	3_D06	R104G
	113	137	3_C05	---
V105	193	161	1_A06	---
	150	154	1_A01	---
W106	165	77	1_B04	---
	134	112	3_D04	---
G107	436	340	1_B06	G107T
	381	336	1_B04	G107D
	365	459	1_B01	G107Y
	250	344	2_A02	G107V



	141	148	3_A05	---
D108	137	151	4_D01	---
	135	217	2_C03	---
	135	162	2_B03	---
W109	115	142	4_A04	---
E110	347	113	1_A05	---
	310	169	2_B04	E110D
	292	130	1_C05	E110A
	272	139	1_C04	E110A
E111	106	221	2_B02	E111G
D112	479	305	1_D06	D112T
	255	119	1_A05	---
	228	139	1_D05	---
	210	170	2_A03	---
OLm	100	100	n.z.	n.z.

#### 4.8.5 Bestätigung der Hits der Sättigungen

Die in Tabelle 17 aufgeführten identifizierten Varianten wurden erneut in biologischen Triplikaten nach 3.2.6 exprimiert. Nach Ernte der Zellen wurden Biotransformationen mit dem Modellsubstrat 2-3-2 (10 mM) im in 4.6 etablierten ganzzellbasierten Zweiphasensystem in technischen Triplikaten durchgeführt (3.3.1.2). Zur Kontrolle der Expression der Varianten wurde die Fluoreszenz der nach 3.2.7.2 lysierten Zellen nach 3.4.3 gemessen und der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> ermittelt. Die detektierten Produktbildungen sowie der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> sind in Abbildung 37 normiert auf das parentale Konstrukt OLm dargestellt.



**Abbildung 37: Bestätigung der durch Sättigung der Reste K103 bis D112 erhaltenen Hits.** Isolierte Plasmid-DNA derjenigen Hits der Sättigung der  $\alpha$ -Helix (K103 - D112), für die durch Sequenzierung eine Mutation nachgewiesen werden konnte, wurde erneut in *E. coli* Jm83(DE3) transformiert und in biologischen Triplikaten exprimiert. Hiervon wurden je Biotransformationen unter Verwendung von 10 mM 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) im beschriebenen gazzellbasierten Zweiphasensystem in technischen Triplikaten durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die parentalen Konstrukte OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) sowie der pET-28a(+) Leervektor (LV) mitgeführt und analog behandelt. Die erhaltenen Produktbildungen wurden in Bezug auf OLm normiert und sind unter Angabe des Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> dargestellt. Die gestrichelten Linien geben jeweils den Wert des parentalen Konstrukts OLm an (100%).

Wie aus der Abbildung hervorgeht, konnte der positive Einfluss der in 4.8.4 identifizierten Varianten K103N, K103R, R104G, G107T, G107D, G107Y, G107V sowie D112T auf die Umsetzung von 2-3-2 in biologischen sowie je technischen Triplikaten bestätigt werden. Die Effekte fielen für einige Varianten jedoch nicht so deutlich aus, wie sie sich im initialen *screening* zeigten (Tabelle 17). Die Varianten E110A, E110D und E111G konnten in den Bestätigungsexperimenten nicht bestätigt werden und zeigten Produktbildungen, die etwa auf dem Niveau von OLm lagen. Daher sollten diese nicht weiter betrachtet werden. Die am stärksten gesteigerten Produktbildungen für Position K103 zeigte K103N mit  $173 \pm 5\%$  in Relation zum parentalen Konstrukt OLm. Für Position G107 zeigte die Variante G107T mit  $208 \pm 12\%$  die deutlichste Steigerung. Für die Positionen R104 und D112 wurde jeweils nur eine Variante mit gesteigerter

Produktbildung identifiziert (Tabelle 17), die in den Bestätigungsexperimenten mit  $156 \pm 12\%$  und  $193 \pm 6\%$  bestimmt wurde. Durch Betrachtung des Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> konnte zudem ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte auf erhöhte Expression der entsprechenden Varianten zurückzuführen ist. Alle Varianten mit gesteigerter Produktbildung zeigten auch eine Steigerung des Quotienten, während dieser für die nicht bestätigten Varianten etwa auf dem Niveau von OLM lag. Für D112T konnte mit  $355 \pm 9\%$  hier ein höherer Wert als für die etwas aktivere Variante G107T ( $312 \pm 16\%$ ) ermittelt werden. Die identifizierten Varianten sollten schließlich kombiniert werden, um etwaige synergistische Effekte der Mutationen zu studieren.

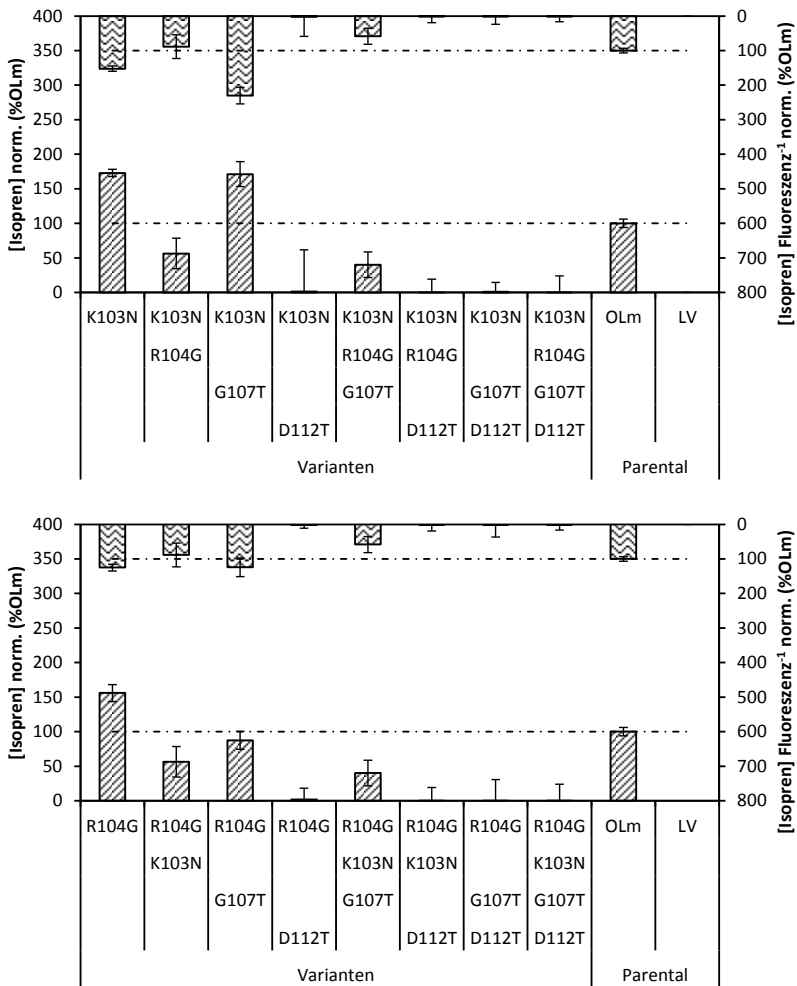
#### 4.8.6 Kombinationsvarianten

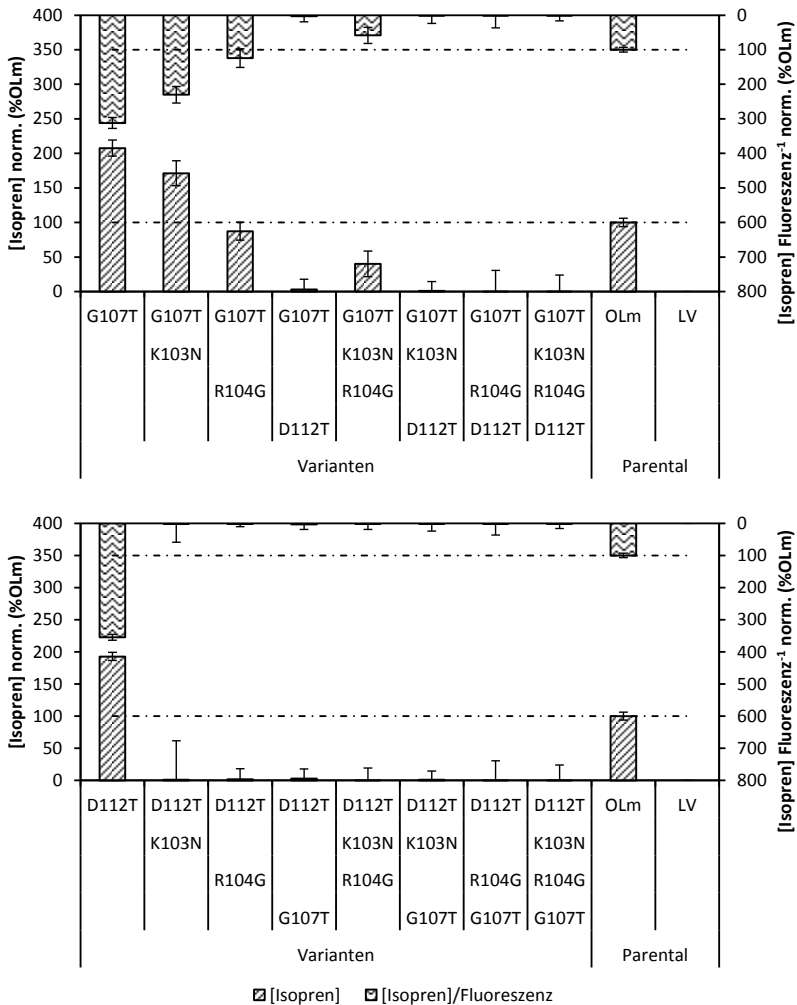
Durch *QuikChange*<sup>TM</sup> nach 3.1.5 wurden die Kombinationsvarianten von K103N, R104G und G107T ausgehend von pET-28a(+):OLm als Templat erstellt. Nach positiver Sequenzierung nach 3.1.11 wurden die möglichen Kombinationen mit D112T durch *overlap extension* PCR nach 3.1.6 erstellt, wobei die entsprechenden Plasmide ohne die D112T Mutation als Templat genutzt wurden. Da keine Sättigung erreicht werden sollte, wurde ein mutagenes Oligonukleotidpaar ohne degenerierte Codons eingesetzt. Tabelle 18 zeigt eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für die Generierung der Doppel- und Dreifach- sowie der Vierfachvariante.

**Tabelle 18: Übersicht der erstellten Kombinationsvarianten der identifizierten Hits K103N, R104G, G107T und D112T.** Alle möglichen Kombinationsvarianten der identifizierten Hits wurden entweder durch *QuikChange*<sup>TM</sup> (QC) oder *overlap extension*-PCR (SOE) erzeugt. Die verwendeten Template sowie Oligonukleotide sind angegeben. Die Sequenzen der Oligonukleotide unter Angabe der Schmelztemperaturen finden sich im Anhang (7.1). *for*, *forward*; *rev*, *reverse*.

Variante	Methode	Templat	Oligonukleotide	
			<i>for</i>	<i>rev</i>
K103N/R104G	QC	OLm	162	163
K103N/G107T	QC	OLm	164	165
K103N/D112T	SOE	K103N	166	167
K103N/R104G/G107T	QC	OLm	168	169
K103N/R104G/D112T	SOE	K103N/R104G	170	171
K103N/G107T/D112T	SOE	K103N/G107T	172	173
K103N/R104G/G107T/D112T	SOE	K103N/R104G/G107T	174	175
R104G/G107T	QC	OLm	176	177
R104G/D112T	SOE	R104G	178	179
R104G/G107T/D112T	SOE	R104G/G107T	180	181
G107T/D112T	SOE	G107T	182	183

Nach positiver Sequenzierung nach 3.1.11 wurden die Varianten nach 3.2.3 in *E. coli* Jm83(DE3) transformiert und nach 3.2.6 exprimiert. Biotransformationen mit 2-3-2 als Substrat (10 mM) wurden 3.3.1.2 zufolge angesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt. Hierbei sind zum besseren Verständnis je alle möglichen Kombinationen ausgehend von einer Variante in jedem der Diagramme dargestellt. Es ergeben sich daher Wiederholungen. Aufgezeigt ist jeweils die Produktbildung normiert auf das parentale Konstrukt OLm sowie der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup>, ebenso normiert auf OLm. Tabelle 19 fasst die normierten Werte zusammen.





**Abbildung 38: Kombinationen der Varianten K103N, R104G, G107T und D112T.** Alle möglichen Kombinationen der Varianten (Doppel- und Triplevarianten, sowie die Quadrupelvariante) mit der jeweils am deutlichsten gesteigerten Produktbildung in Bezug auf die Dehydratisierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol wurden von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) in biologischen Triplikaten exprimiert. Hiervon wurden je Biotransformationen unter Verwendung von 10 mM 2-3-2 im beschriebenen ganzzellbasierten Zweiphasensystem in technischen Triplikaten durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die parentalen Konstrukte OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) sowie der pET-28a(+) Leervektor (LV) mitgeführt und analog behandelt. Die erhaltenen Produktbildungen wurden in Bezug auf OLm normiert und sind unter Angabe des Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> dargestellt. Die gestrichelten Linien geben jeweils den Wert des parentalen Konstrukts OLm an (100%). Zum besseren Verständnis sind je alle möglichen Kombinationen ausgehend von einer der Varianten in jedem der Diagramme dargestellt. Es ergeben sich daher Wiederholungen.

**Tabelle 19: Produktbildung und Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> für die Kombinationsvarianten der identifizierten  $\alpha$ -Helix in Bezug auf die Dehydratisierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol.** Aufgezeigt ist die Produktbildung nach der Dehydratisierung von 10 mM 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) zu Isopren sowie der Quotient [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> der Varianten von OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) in biologischen Triplikaten, die je in technischen Triplikaten analysiert wurden. Die Daten wurden normiert auf das parentale Konstrukt OLm. LV, pET-28a(+) Leervektor.

Variante	[Isopren] (%OLm)	[Isopren] Fluoreszenz <sup>-1</sup> (%OLm)
K103N	173 $\pm$ 5	152 $\pm$ 8
K103N/R104G	56 $\pm$ 22	88 $\pm$ 34
K103N/G107T	171 $\pm$ 18	230 $\pm$ 24
K103N/D112T	2 $\pm$ 22	1 $\pm$ 57
K103N/R104G/G107T	40 $\pm$ 18	59 $\pm$ 23
K103N/R104G/D112T	0 $\pm$ 19	0 $\pm$ 19
K103N/G107T/D112T	1 $\pm$ 13	1 $\pm$ 23
K103N/R104G/G107T/D112T	0 $\pm$ 24	0 $\pm$ 16
R104G	156 $\pm$ 12	125 $\pm$ 10
R104G/G107T	129 $\pm$ 21	125 $\pm$ 27
R104G/D112T	2 $\pm$ 17	2 $\pm$ 9
R104G/G107T/D112T	1 $\pm$ 30	1 $\pm$ 36
G107T	208 $\pm$ 12	312 $\pm$ 16
G107T/D112T	3 $\pm$ 15	3 $\pm$ 16
D112T	193 $\pm$ 6	355 $\pm$ 9
OLm	100 $\pm$ 6	100 $\pm$ 7
LV	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 8

Wie aus Tabelle 19 hervorgeht, konnte für keine der generierten Kombinationsvarianten ein synergistischer Effekt der Mutationen nachgewiesen werden. Für die Kombinationen mit K103 zeigte sich für K103N/G107T mit  $171 \pm 18\%$  eine Produktbildung auf dem Niveau von K103N ( $173 \pm 5\%$ ). Dieser lag jedoch deutlich unter der Produktbildung von G107T mit  $208 \pm 12\%$ . Für R104G/G107T wurde eine Produktbildung von  $87 \pm 13\%$  ermittelt, der leicht unterhalb der des parentalen Konstrukts OLm ( $100 \pm 6\%$ ) lag, aber deutlich unter denen von R104G mit  $156 \pm 12\%$  sowie G107T mit  $208 \pm 12\%$ . In Kombination mit D112T zeigten alle getesteten Varianten Produktbildungen  $< 3\%$ . Die entsprechenden Trends lassen sich ebenfalls für errechnete Aktivität der Varianten sowie beim Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> beobachten. Einzig K103N/G107T zeigte hier mit  $230 \pm 24\%$  einen höheren Wert als K103N mit  $152 \pm 8\%$ , wobei dies bezogen auf die Produktbildung einen umgekehrten Trend darstellt. Aus den Daten des Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> geht ebenso hervor, dass alle Varianten exprimiert werden

konnten. Die Fluoreszenzdaten waren für alle getesteten Varianten auf einem ähnlichen Niveau (Daten nicht gezeigt). Da für keine der getesteten Kombinationsvarianten synergistische Effekte in Form von weiter gesteigerten Produktbildungen detektiert werden konnten, sollte nicht weiter mit den Kombinationsvarianten gearbeitet werden. In einer betreuten Bachelorarbeit (Jan Seeger; Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart) sollten die jeweils aktivsten Einzelvarianten jeder Position, K103N, R104G, G107T sowie D112T, kinetisch untersucht werden. Hierfür sollte zunächst untersucht werden, ob das etablierte ganzzellbasierte Zweiphasensystem für kinetische Studien anwendbar ist.

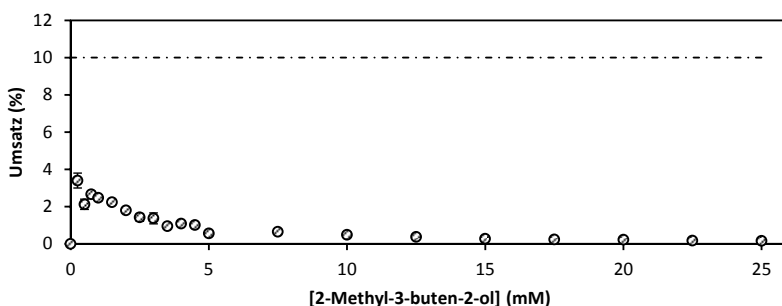
## 4.9 Kinetische Studien zu LinD

Biochemische Charakterisierungen der Hits der Sättigungsmutagenese der  $\alpha$ -Helix (4.8.4) waren Gegenstand der im Zuge dieser Arbeit betreuten Bachelorarbeit von Jan Seeger (Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart). Im Rahmen dieser Bachelorarbeit sollte ein System etabliert werden, um kinetische Studien der generierten Varianten durchführen zu können. Aufgrund der schlechten Ergebnisse mit gereinigtem Enzym (4.3) sollte überprüft werden, ob eine biochemische Charakterisierung im etablierten ganzzellbasierten Zweiphasensystem möglich ist. Ferner sollte eine Auswahl der in 4.8.4 beschriebenen Varianten charakterisiert werden.

### 4.9.1 Kinetik von LinD im ganzzellbasierten Zweiphasensystem

Da die Möglichkeit, kinetische Studien mit gereinigtem Enzym durchzuführen, nicht bestand (4.3), wurde zunächst untersucht, ob Lysate von pET-28a(+):OLm exprimiert in *E. coli* Jm83(DE3) für die durchzuführenden Experimente verwendet werden können. Aufgrund der hohen Volatilität der einzusetzenden Substrate und Produkte sollte an einem Zweiphasensystem festgehalten werden. Im Zuge der betreuten Bachelorarbeit von Jan Seeger konnte jedoch keine Umsetzung der Lysate von 2-3-2 im etablierten Zweiphasensystem festgestellt werden, weswegen die Möglichkeit untersucht wurde, das bereits etablierte ganzzellbasierte Zweiphasensystem zu verwenden (3.3.1.2). Hierfür wurde OLm wie in 3.2.6 beschrieben exprimiert und Zellsuspensionen ausgehend von gefrorenem Pellet hergestellt. Es wurde eine deutlich niedrigere Zellmengen in den anschließenden Biotransformationen nach 3.3.1.2 gewählt, um einen möglichst niedrigen, aber reproduzierbar quantifizierbaren, Umsatz für die kinetischen Experimente gewährleisten zu können. Die in 3.3.5 beschriebenen generellen Annahmen bei der

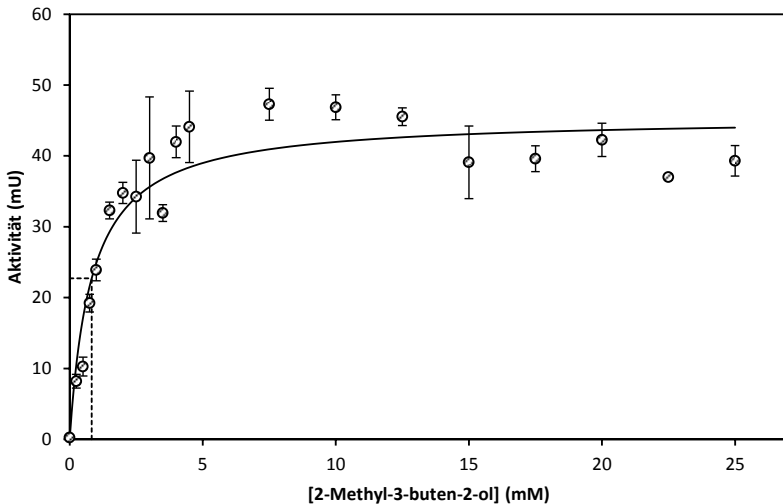
Herleitung der Michaelis-Menten-Gleichung sehen eine irreversible Produktbildung vor. Da diese unter Verwendung von LinD als Katalysator nicht gegeben ist, sollte der Umsatz möglichst niedrig gehalten werden, um das Gleichgewicht während der gesamten zu betrachtenden Reaktion weit auf der Seite der Dehydratisierungsreaktion zu halten und somit die reverse Hydratisierungsreaktion nicht zu begünstigen. Als nicht zu überschreitende Grenze für den Umsatz wurden so 10% festgelegt. Um den Umsatz niedrig zu halten, wurden 50  $\mu\text{L}$  der standardmäßigen Zellsuspension in die Biotransformationen eingesetzt anstelle der bisher verwendeten 450  $\mu\text{L}$ . Abbildung 39 zeigt die resultierenden Umsätze bei variierender Konzentration des Substrats 2-3-2 auf.



**Abbildung 39: Errechnete Umsätze für die Dehydratisierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) bei variierender Substratkonzentration.** OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) wurde von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert. Biotransformationen im beschriebenen ganzzellbasierten Zweiphasensystem wurden mit variierenden Konzentrationen des Substrats 2-3-2 (0 - 25 mM) durchgeführt. Aus den gemessenen Produktbildungen wurde in Bezug auf die initial eingesetzte Substratkonzentration der Umsatz bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen auf. Die gestrichelte Linie zeigt die festgelegte obere Grenze von 10% an.

Die ermittelten Umsätze unter Verwendung von OLm Ganzzellen überschritten bei keiner der getesteten Substratkonzentrationen den gesetzten Grenzwert von 10%. Bei einer Substratkonzentration von 2,5 mM war der Umsatz mit  $3 \pm 0\%$  am höchsten, während der Umsatz für Konzentrationen ab 5 mM unter 1% lag (Abbildung 39). Wegen des gut reproduzierbaren geringen Umsatzes wurde an diesem Versuchsaufbau festgehalten. Abbildung 40 zeigt die ermittelten Aktivitätsdaten in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Der *fit* der Daten erfolgte nach 3.1.5.





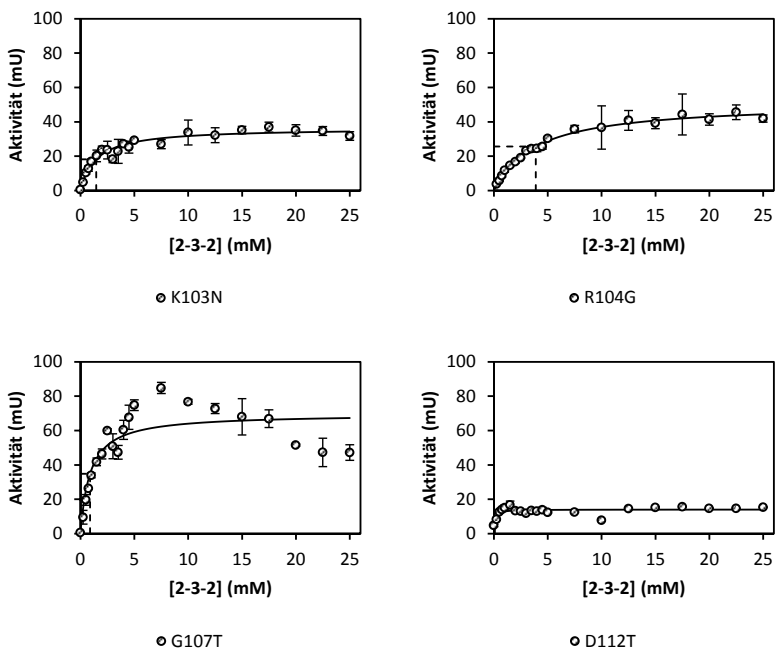
**Abbildung 40: Kinetische Analyse der OmpA-LinD-mRFP1 (OLm)-katalysierten Dehydratisierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol zu Isopren.** OLm wurde von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert. Biotransformationen im beschriebenen ganzzellbasierten Zweiphasensystem wurden mit variierenden Konzentrationen des Substrats 2-3-2 (0 - 25 mM) durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen. Aus den gemessenen Produktbildungen wurde unter Berücksichtigung der Dauer der Biotransformationen (18 h) die Aktivität errechnet. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte nach Michaelis-Menten (Michaelis und Menten, 1913) unter Verwendung des Excel Solvers (2010) mithilfe der Methode der kleinsten Quadrate und des GRG-nichtlinearen Algorithmus. Die durchgezogene Linie zeigt den *fit* der Daten auf. Die gestrichelten Linien geben die kinetischen Parameter  $K_m$  (Schnittpunkt mit x-Achse) und  $\frac{1}{2} v_{max}$  (Schnittpunkt mit der y-Achse) an.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, folgen die in ganzen Zellen ermittelten Werte der Michaelis-Menten-Kinetik. Für OLm wurde die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  mit 0,8 mM und die maximale Aktivität  $v_{max}$  mit 44,7 mU bestimmt. Anhand der Enzymkonzentrationsmessung durch Fluoreszenzmessung nach 3.4.3 ergab sich ein  $k_{cat}$  von  $31,2 \text{ s}^{-1}$ . Aufgrund der guten Anwendbarkeit wurde an diesem System festgehalten und die kinetischen Parameter ausgewählter der in 4.8.4 identifizierten Varianten anhand dieses Systems untersucht.

#### 4.9.2 Kinetische Studien zur Dehydratisierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol durch OmpA-LinD-mRFP1 K103N, R104G, G107T und D112T

Analog zum parentalen Konstrukt OLm wurden die in 4.8.4 identifizierten Varianten K103N, R104G, G107T und D112T nach 3.2.6 exprimiert und nach Ernte der Zellen

Biotransformationen mit dem Modellsubstrat 2-3-2 im in 4.6 etablierten ganzzellbasierten Zweiphasensystem (3.3.1.2) mit aufgetauten Zellen angesetzt. Hierbei wurden 50  $\mu\text{L}$  der nach Standard angesetzten Zellsuspensionen als Katalysator verwendet. Als Substrat wurde 2-3-2 in variierender Konzentration eingesetzt. Abbildung 41 zeigt die ermittelten Aktivitäten in Abhängigkeit der Substratkonzentration.



**Abbildung 41:** Kinetische Analyse der durch OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) Varianten K103N, R104G, G107T sowie D112T katalysierten Dehydratisierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol zu Isopren. Die Varianten wurden von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert. Biotransformationen im beschriebenen ganzzellbasierten Zweiphasensystem wurden mit variierenden Konzentrationen des Substrats 2-3-2 (0–25 mM) durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen. Aus den gemessenen Produktbildungen wurde unter Berücksichtigung der Dauer der Biotransformationen (18 h) die Aktivität errechnet. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte nach Michaelis-Menten (Michaelis und Menten, 1913) unter Verwendung des Excel Solvers (2010) mithilfe der Methode der kleinsten Quadrate und des GRG-nichtlinearen Algorithmus. Die durchgezogene Linie zeigt den  $f(t)$  der Daten auf. Die gestrichelten Linien geben die kinetischen Parameter  $K_m$  (Schnittpunkt mit x-Achse) und  $\frac{1}{2} v_{\max}$  (Schnittpunkt mit der y-Achse) an.

Die kinetischen Parameter der untersuchten Varianten K103N, R104G, G107T und D112T in Bezug auf die Dehydratisierung von 2-3-2 zu Isopren sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

**Tabelle 20: Übersicht der bestimmten kinetische Parameter der OmpA-LinD-mRFP1 (OLm)-katalysierten Dehydratisierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) zu Isopren.** Dargelegt sind die kinetischen Parameter  $K_m$ ,  $v_{max}$  sowie  $k_{cat}$  der Varianten K103N, R104G, G107T sowie D112T im Vergleich zu denen des parentalen Konstrukts OLm.

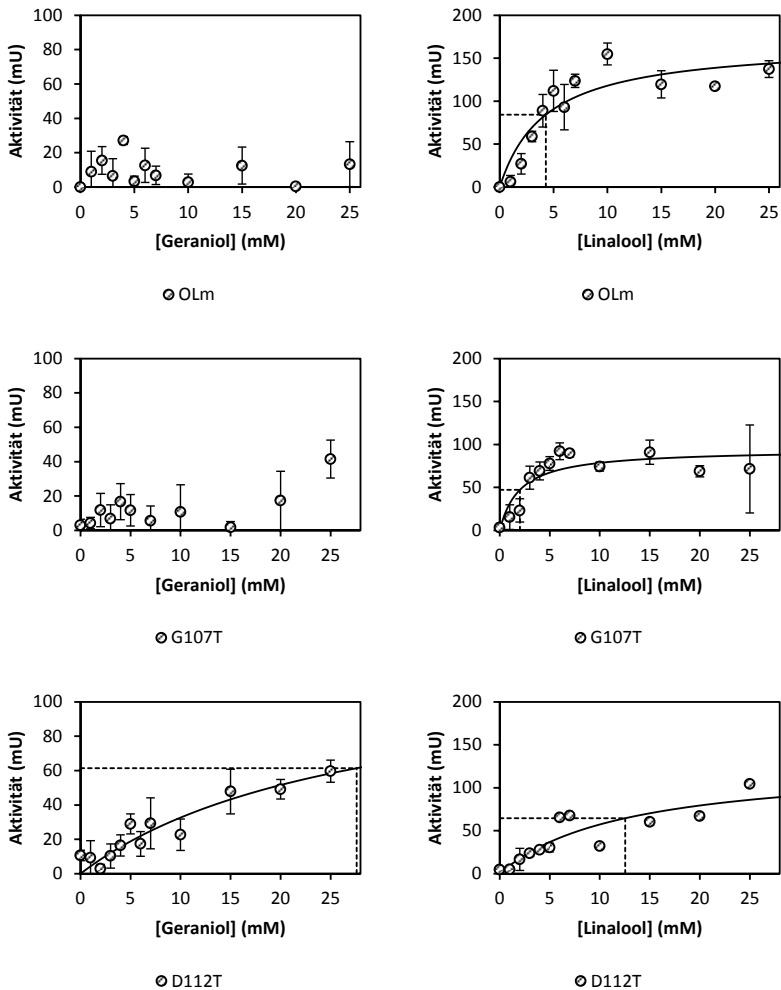
Variante	$K_m$ (mM)	$v_{max}$ (mU)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )
K103N	1,5	36,4	42,2
R104G	3,9	51,3	59,6
G107T	0,8	69,7	317,6
D112T	0,1	14,0	134,6
OLm	0,8	44,7	31,2

Wie aus Abbildung 41 und Tabelle 20 hervorgeht, ergaben sich deutliche Unterschiede in den kinetischen Parametern der Varianten und OLm. Für K103N und R104G konnte mit 1,5 mM und 3,9 mM ein erhöhter Wert  $K_m$  im Vergleich zu OLm (0,8 mM) ermittelt werden, während die maximale Aktivität  $v_{max}$  mit 36,4 mU und 51,3 mU etwa auf dem Niveau von OLm (44,7 mU) lag. Unter Berücksichtigung der durch Fluoreszenz nach 3.4.3 bestimmten Enzymkonzentration ergaben sich für  $k_{cat}$  mit 42,2  $s^{-1}$  und 59,6  $s^{-1}$  jedoch leicht erhöhte Werte im Vergleich zu OLm (31,2  $s^{-1}$ ). Für G107T wurde keine Änderung in  $K_m$  festgestellt, jedoch mit 69,7 mU eine deutliche Steigerung in  $v_{max}$ .  $k_{cat}$  zeigte mit 317,6  $s^{-1}$  einen um nahezu den Faktor 10 erhöhten Wert im Vergleich zu OLm. D112T zeigte mit 0,1 mM eine starke Erniedrigung für  $K_m$ , ebenso wurde für  $v_{max}$  ein deutlich niedrigerer Wert (14,0 mU) bestimmt. Für  $k_{cat}$  hingegen konnte mit 134,6  $s^{-1}$  ebenso eine deutliche Steigerung ausgemacht werden, wenngleich diese nicht so deutlich ausfiel wie für G107T. Die Varianten mit den am deutlichsten gesteigerten Werten für  $k_{cat}$ , G107T und D112T, sollten in folgenden Experimenten ebenso auf die bifunktionalen Umsetzungen von Geraniol, Prenol und Crotylalkohol zu Myrcen, Isopren und 1,3-Butadien hin kinetisch untersucht werden.

### 4.9.3 Kinetische Studien zur bifunktionalen Umsetzung von Geraniol und Prenol und Crotylalkohol

Die beiden besten in 4.8.4 identifizierten Varianten G107T und D112T sollten weitergehend charakterisiert werden. Hierfür sollte sowohl die natürliche Reaktion von Geraniol über Linalool zu Myrcen sowie allein die Dehydratisierung von Linalool zu Myrcen untersucht werden. Analog wurde die Umsetzung von Prenol über 2-3-2 zu Isopren im Vergleich zur beschriebenen Dehydratisierung von 2-3-2 analysiert. Ferner wurde die Umsetzung von Crotylalkohol über 3-Buten-2-ol (3-2) zu 1,3-Butadien untersucht sowie die Dehydratisierung von 3-2 allein. Hierfür wurden die Varianten

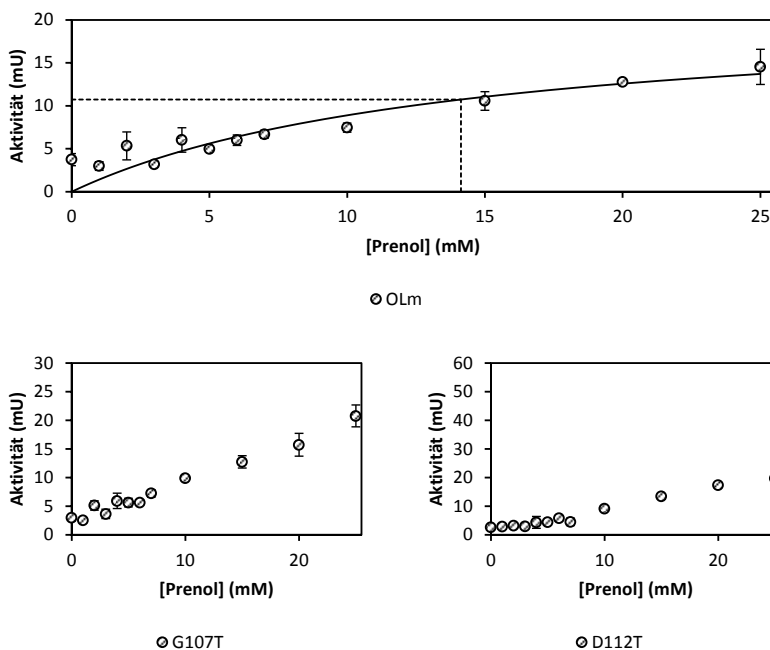
G107T und D112T nach 3.2.6 exprimiert und nach Ernte der Zellen Biotransformationen im ganzzellbasierten Zweiphasensystem nach 3.3.1.2 durchgeführt, wobei die als Substrate Geraniol, Linalool, Prenol, Crotylalkohol und 3-2 in variierender Konzentration zugegeben wurde. Die Bestimmung der kinetischen Parameter für 2-3-2 wurde bereits in 4.9.2 beschrieben und daher hier nicht wiederholt. Analog zu den Varianten wurde das parentale Konstrukt OLM als Kontrolle mitgeführt. Anhand der sich ergebenden Produktbildung wurde die Aktivität errechnet, wobei die Fluoreszenz des mRFP1 Fusionspartners nach 3.4.3 zur Bestimmung der Enzymkonzentration herangezogen wurde. Sowohl für die Umsetzung von Crotylalkohol zu 1,3-Butadien als auch die Umsetzung von 3-2 zu 1,3-Butadien konnten auch nach mehreren unabhängigen Versuchen keine Daten in hinreichender Qualität gewonnen werden, die einen Fit der Daten zugelassen hätte (Daten nicht gezeigt). Daher wird weitergehend nur auf die kinetische Untersuchung der natürlichen sowie der Modellsubstrate Prenol und 2-3-2 eingegangen. Die erhaltenen Aktivitätsdaten wurden nach 3.3.5 unter Verwendung des Excel Solvers und der Methode der kleinsten Quadrate gefittet. Hierbei wurde auch für die Umsetzung von Geraniol über Linalool ausschließlich die Konzentration des Produkts Myrcen berücksichtigt. Für die Umsetzungen von Geraniol durch OLM und G107T konnten die kinetischen Parameter nicht erfolgreich bestimmt werden. Abbildung 42 zeigt die erhaltenen Aktivitätsdaten sowie die *fits* der Daten mit Ausnahme der genannten. Für die dargestellte Umsetzung von Linalool zu Myrcen durch OLM (Abbildung 42, oben rechts) konnte die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  mit 4,3 mM und die maximale Aktivität  $v_{max}$  mit 168,5 mU bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der durch Fluoreszenz gemessenen Enzymkonzentration ergibt sich ein  $k_{cat}$  von  $585,0 \text{ s}^{-1}$ . Für dieselbe Reaktion unter Verwendung von G107T ergaben sich ein  $K_m$  von 2,0 mM, ein  $v_{max}$  von 94,4 mU und ein  $k_{cat}$  von  $606,1 \text{ s}^{-1}$ . Für die Variante D112T konnten für die Umsetzung von sowohl Geraniol als auch Linalool zu Myrcen die kinetischen Parameter bestimmt werden. Es ergaben sich Werte für  $K_m$  von 27,6 mM für Geraniol sowie 12,6 mM für Linalool bei  $v_{max}$  von 122,8 mU sowie 129,1 mU. Die Werte für  $k_{cat}$  konnten mit  $724,6 \text{ s}^{-1}$  sowie  $761,9 \text{ s}^{-1}$  errechnet werden.



**Abbildung 42:** Kinetische Analyse der durch OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) sowie den Varianten G107T und D112T katalysierten bifunktionalen Umsetzungen von Geraniol zu Myrcen sowie der Dehydratisierung von Linalool zu Myrcen. Die Varianten wurden von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert. Biotransformationen im beschriebenen ganzzellbasierten Zweiphasensystem wurden mit variierenden Konzentrationen der Substrate Geraniol und Linalool (0 - 25 mM) durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen. Aus den gemessenen Produktbildungen wurde unter Berücksichtigung der Dauer der Biotransformationen (18 h) die Aktivität errechnet. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte nach Michaelis-Menten (Michaelis und Menten, 1913) unter Verwendung des Excel Solvers (2010) mithilfe der Methode der kleinsten Quadrate und des GRG-nichtlinearen Algorithmus. Die durchgezogene Linie zeigt, sofern erfolgreich, den

*fit* der Daten auf. Die gestrichelten Linien geben die kinetischen Parameter  $K_m$  (Schnittpunkt mit x-Achse) und  $\frac{1}{2} v_{max}$  (Schnittpunkt mit der y-Achse) an.

Auch für die Umsetzung von Prenol über 2-3-2 wurde ausschließlich die Produktbildung von Isopren für die Berechnungen berücksichtigt. Die erhaltenen Aktivitätsdaten sowie die *fits* der Daten für OLM sind in Abbildung 43 dargestellt. Für G107T und D112T konnten die kinetischen Parameter nicht zweifelsfrei bestimmt werden.



**Abbildung 43:** Kinetische Analyse der durch OmpA-LinD-mRFPI (OLM) sowie den Varianten G107T und D112T katalysierten bifunktionalen Umsetzungen von Prenol zu Isopren. Die Varianten wurden von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert. Biotransformationen im beschriebenen ganzzellbasierten Zweiphasensystem wurden mit variierenden Konzentrationen des Substrats Prenol (0-25 mM) durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen. Aus den gemessenen Produktbildungen wurde unter Berücksichtigung der Dauer der Biotransformationen (18 h) die Aktivität errechnet. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte nach Michaelis-Menten (Michaelis und Menten, 1913) unter Verwendung des Excel Solvers (2010) mithilfe der Methode der kleinsten Quadrate und des GRG-nichtlinearen Algorithmus. Die durchgezogene Linie zeigt, sofern erfolgreich, den *fit* der Daten auf. Die gestrichelten Linien geben die kinetischen Parameter  $K_m$  (Schnittpunkt mit x-Achse) und  $\frac{1}{2} v_{max}$  (Schnittpunkt mit der y-Achse) an.

Für die in Abbildung 43 oben dargestellte Umsetzung von Prenol zu Isopren durch OLM konnte die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  mit 14,1 mM und die maximale Aktivität  $v_{max}$  mit 21,5 mU bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der durch Fluoreszenz

gemessenen Enzymkonzentrationen ergeben sich  $k_{\text{cat}}$  mit  $75,5 \text{ s}^{-1}$ . Wurde dieselbe Reaktion durch G107T oder D112T katalysiert, konnten keine kinetischen Parameter berechnet werden. Die kinetischen Parameter für die Umsetzung von Geraniol und Linalool zu Myrcen sowie von Prenol und 2-3-2 zu Isopren sind in Tabelle 21 vergleichend für OLm und die Varianten G107T und D112T zusammengefasst.

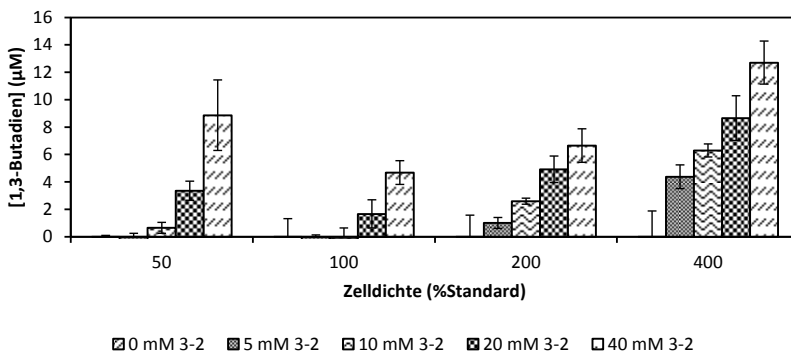
**Tabelle 21: Übersicht der bestimmten kinetischen Parameter für OmpA-LinD-mRFPI (OLm) sowie die Varianten G107T und D112T für die Umsetzungen der natürlichen Substrate Geraniol und Linalool zu Myrcen sowie der Modellsubstrate Prenol und 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) zu Isopren.** Dargelegt sind die kinetischen Parameter  $K_m$ ,  $v_{\text{max}}$  sowie  $k_{\text{cat}}$  der Varianten G107T und D112T im Vergleich zu denen des parentalen Konstrukts OLm. n.b., nicht bestimmbar.

Variante	Substrat	Produkt	$K_m$ (mM)	$v_{\text{max}}$ (mU)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
OLm	Geraniol	Myrcen	n.b.	n.b.	n.b.
	Linalool	Myrcen	4,3	168,5	584,5
	Prenol	Isopren	14,1	21,5	75,5
	2-3-2	Isopren	0,8	44,7	31,2
G107T	Geraniol	Myrcen	n.b.	n.b.	n.b.
	Linalool	Myrcen	2,0	94,4	606,1
	Prenol	Isopren	n.b.	n.b.	n.b.
	2-3-2	Isopren	0,8	69,7	317,6
D112T	Geraniol	Myrcen	27,6	122,8	724,6
	Linalool	Myrcen	12,6	129,1	761,9
	Prenol	Isopren	n.b.	n.b.	n.b.
	2-3-2	Isopren	0,1	14	134,6

#### 4.9.4 Umsetzung von Crotylalkohol und 3-Buten-2-ol

Da bisher nur Spuren des Produkts 1,3-Butadien in LinD-katalysierten Umsetzungen nachgewiesen werden konnten und der Versuch, Kinetiken für beide Substrate aufzunehmen, nicht erfolgreich war (*vide supra*), sollten die externen Parameter der Biotransformationen angepasst werden, um möglichst hohe Produktbildungen unter Verwendung der Zielsubstrate Crotylalkohol und 3-2 erzielen zu können. Die Analyse der Faktoren Substratkonzentration sowie Zelldichte erfolgte im Rahmen der betreuten Bachelorarbeit von Jan Seeger (Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart) für das parentale Konstrukt OLm. Hierfür wurde pET-28a(+):OLm nach 3.2.6 in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert und die Zellen nach der Expression geerntet. Schließlich wurden Suspensionen der Zellen in Reaktionspuffer (2.3.2) angesetzt, wobei die Zelldichte mit 50%, 100%, 200% und 400% der standardmäßig verwendeten gewählt

wurde. Analog wurde mit der Konzentration des Substrats 3-2 in Bezug auf die standardisierte Substratkonzentration (10 mM) verfahren, um den Bereich zu identifizieren, der für Erhebung kinetischer Daten von Interesse ist. Abbildung 44 zeigt die nach der Biotransformation gemessenen Produktkonzentrationen.



**Abbildung 44: Anpassung der externen Biotransformationsparameter Zelldichte und Substratkonzentration in Bezug auf die OmpA-LinD-mRFP1 (OLm)-katalysierte Dehydratisierung von 3-Buten-2-ol (3-2) zu 1,3-Butadien.** OLm wurde von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) exprimiert. Biotransformationen wurden im beschriebenen ganzzellbasierten Zweiphasensystem durchgeführt. Die eingesetzte Zelldichte wurde zu 50%, 200% und 400% in Bezug auf die standardmäßig für die Umsetzungen der Substrate Geraniol, Linalool, Prenol sowie 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2) eingesetzte Zelldichte angepasst; ebenso wurde mit der standardmäßig eingesetzten Substratkonzentration (10 mM) verfahren. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Messungen.

Wie in Abbildung 44 ersichtlich, konnte für die initial eingesetzte Zellkonzentration (100%) nur bei erhöhter Substratkonzentration Produktbildung detektiert werden. So konnten bei 20 mM Substrat  $1,7 \pm 1,0 \mu\text{M}$  des Produkts 1,3-Butadien nachgewiesen werden. Bei weiterer Erhöhung der Substratkonzentration zu 40 mM konnten  $4,7 \pm 0,9 \mu\text{M}$  Produkt detektiert werden. Für alle eingesetzten Zellkonzentrationen konnte mit steigender Substratkonzentration eine erhöhte Produktkonzentration nachgewiesen werden. Wurde die Zellkonzentration auf 400% des Standards erhöht, konnten für alle eingesetzten Substratkonzentrationen erhöhte Produktbildungen reproduzierbar nachgewiesen werden. Hier konnte für 5 mM, 10 mM, 20 mM sowie 40 mM die Produktkonzentration mit  $4,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ,  $6,3 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ,  $8,7 \pm 1,6 \mu\text{M}$  sowie  $12,7 \pm 1,6 \mu\text{M}$  quantifiziert werden, wobei letztere die höchste gemessene Produktkonzentration darstellt. Der Effekt der höheren Produktbildung mit steigender Substratkonzentration ist am deutlichsten für die Proben mit halbiertes Zellkonzentration zu erkennen, wobei hier erst ab einer Substratkonzentration von 10 mM Produktbildung von  $0,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$



detektiert werden konnte. Für 20 mM und 40 mM Substrat stieg die Produktkonzentration auf  $3,4 \pm 0,7 \mu\text{M}$  und  $8,9 \pm 0,9 \mu\text{M}$  an. Da durch eine Vervierfachung der Zellkonzentration jedoch die höchste Produktbildung erreicht werden konnte, wurde die erhöhte Zellkonzentration zugunsten einer besser zu quantifizierenden Produktbildung beibehalten und die sich hieraus ergebende verringerte Aktivität toleriert. Kinetische Untersuchungen unter Verwendung dieser verbesserten Versuchsanordnung resultierten aufgrund der sehr niedrigen Produktbildungen jedoch ebenso nicht in auswertbaren Daten (Daten nicht gezeigt).

#### 4.10 Produktion von Crotylalkohol in *Pseudomonas putida*

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte die Synthese von 1,3-Butadien ausgehend von Crotylalkohol durch LinD-katalysierte Isomerisierung sowie Dehydratisierung untersucht werden (*vide supra*). Die Bereitstellung von Crotylalkohol sollte durch eine in *Pseudomonas putida* heterolog exprimierte Enzymkaskade ermöglicht werden (Abbildung 9). Diese Kaskade wurde in einen *upstream* Teil, die Synthese von Crotonyl-CoA, sowie einen *downstream* Teil, die Synthese von Crotylalkohol ausgehend von Crotonyl-CoA unterteilt. Die Gene der in 1.5.1 beschriebenen Enzyme für die Umsetzung von Crotonyl-CoA über Crotonaldehyd zu Crotylalkohol Bld, Bdh, YsADH sowie HcSCDH wurden codonoptimiert für *P. putida* synthetisiert (Geneart AG; Regensburg, Deutschland). Für den *upstream* Teil, die Synthese von Crotonyl-CoA ausgehend von Acetyl-CoA, wurden in Kooperation mit der Universität Wageningen mit AtoB (Acetyl-CoA Acetyltransferase) aus *E. coli* und Hbd ( $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase) sowie Crt (Crotonase/Butyryl-CoA Dehydrogenase) aus *C. acetobutylicum* Enzyme identifiziert und die Kaskade auf einem gemeinsamen Plasmid für die induzierbare heterologe Expression in *P. putida* bereitgestellt (pBAD::AtoB-Crt-Hbd). Die drei alternativen Routen für den *downstream* Teil zu Crotylalkohol (Abbildung 9), die direkte Umsetzung durch HcSCDH und die Kombinationen aus Bld und Bdh sowie Bld und YsADH, wurden von den Kooperationspartnern Christos Batiannis und Lyon Bruinsma (Gruppe von Prof. Vitor Martins dos Santos, *Systems and Synthetic Biology*, Universität Wageningen, Niederlande) für die induzierbare heterologe Expression in *P. putida* kloniert und zur Verfügung gestellt (pSEVA238::HcSCDH, pSEVA238::Bld-Bdh und pSEVA238::Bld-YsADH; 7.2). Ferner wurden vom Kooperationspartner Plasmide kloniert und zur Verfügung gestellt, die für die gesamte Kaskade von Acetyl-CoA zu

Crotylalkohol unter Verwendung der drei Alternativen für den *downstream* Teil unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors codieren (pMETA23::AtoB-Hbd-Crt-HcSCDH, pMETA23::AtoB-Hbd-Crt-Bld-Bdh und pMETA23::AtoB-Hbd-Crt-Bld-YsADH; 7.2).

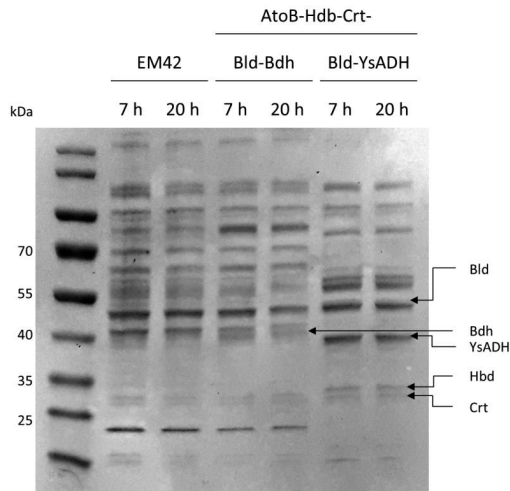
#### 4.10.1 Induzierbare Expression

Nach Cotransformation des Plasmids für den *upstream* Teil sowie jeweils eines Plasmids einer der drei Alternativen für den *downstream* Teil in *P. putida* EM42 durch Elektroporation nach 3.2.5 wurden die resultierenden Transformanden nach 3.2.6 exprimiert. Hierbei wurden verschiedene Zeitpunkte der Induktion der beiden Plasmide verglichen, direkt sowie 1 h, 3 h, 4 h und 6 h nach dem Inokulieren der Hauptkulturen. Ferner wurde die Konzentration der Induktoren *m*-Toluylsäure sowie L-Arabinose mit 3 mM, 5 mM und 10 mM sowie 0,2%, 0,4% und 2,0% (*w/v*) variiert. Für Expression wurde sowohl LB (2.5.1) als auch TB Flüssigmedium (2.5.2) in Erlenmeyerkolben mit und ohne Schikanen verglichen. Bei der Probenentnahme nach 20 h und der Extraktion konnte jedoch in keinem der Ansätze Crotylalkohol in quantifizierbaren Konzentrationen durch Analyse mittels GC/MS nach 3.4.2 nachgewiesen werden. Unter Verwendung der Kaskade AtoB-Hbd-Crt-Bld-YsADH in LB Medium in Erlenmeyerkolben ohne Schikanen bei Induktion nach 6 h mit 5 mM *m*-Toluylsäure und 0,4% (*w/v*) L-Arabinose konnten Spuren von Crotylalkohol detektiert werden, dies erwies sich jedoch als nicht reproduzierbar. Auch nach Verlängerung der Reaktionszeit auf bis zu 72 h konnten keine quantifizierbaren Konzentrationen an Crotylalkohol nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Kontrolle der Expression durch SDS-PAGE nach 3.3.6 ergab keine offensichtliche Überexpression der Enzyme (Daten nicht gezeigt).

#### 4.10.2 Konstitutive Expression

Aufgrund der in 4.10.1 beschriebenen Datenlage wurden vom Kooperationspartner neue Plasmide kloniert, die jeweils die gesamte Kaskade von Acetyl-CoA bis Crotylalkohol unter Verwendung der drei Alternativen für den *downstream* Teil auf einem Plasmid unter der Kontrolle eines gemeinsamen konstitutiven Anderson100 Promotors enthielten (7.2), und zur Verfügung gestellt. Die Plasmide wurden durch Elektroporation nach 3.2.5 in *P. putida* EM42 transformiert und nach 3.2.6 exprimiert. Nach 7 h und 20 h wurden Proben für die Extraktion von Crotylalkohol sowie die Überprüfung der Expression durch SDS-PAGE nach 3.3.6 entnommen. Zur Kontrolle wurde *P. putida* EM42 ohne Plasmid mitgeführt. Weder nach 7 h noch nach 20 h konnte in den Proben Crotylalkohol

nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das SDS-PAGE-Gel der konstitutiven Expression der Kaskade ist in Abbildung 45 am Beispiel der Kombinationen von Bld und Bdh sowie Bld und YsADH gezeigt.



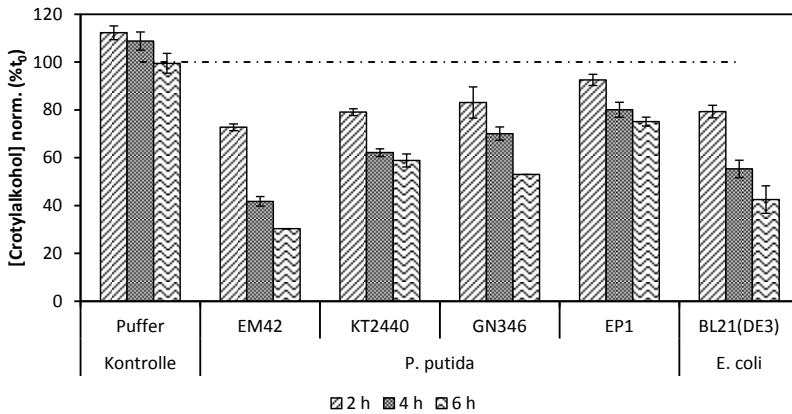
**Abbildung 45: SDS-PAGE-Gele nach konstitutiver Expression der Kaskaden für die Synthese von Crotylalkohol ausgehend von Acetyl-CoA in *P. putida* EM42.** Exemplarisch dargestellt sind SDS-PAGE-Gele nach Expression von Plasmiden mit zwei unterschiedlichen Kaskaden (AtoB-Hdb-Crt-Bld-Bdh und AtoB-Hdb-Crt-Bld-YsADH) im Vergleich zu nicht-transformiertem *P. putida* EM42 nach 7 h und 20 h Expression. Die Pfeile zeigen die putativ erfolgreiche Überexpression der entsprechenden Enzyme an. AtoB, Acetyl-CoA Acetyltransferase; Hbd,  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase; Crt, Crotonase/Butyryl-CoA Dehydratase; Bld, Butyryl-CoA Dehydrogenase; Bdh, Butanoldehydrogenase; YsADH, Allylische Alkoholdehydrogenase.

Für Hbd und Crt konnten, wie in Abbildung 45 gezeigt, Banden der erwarteten Größen (31 kDa und 28 kDa) in allen Proben beobachtet werden, ebenso in der Kontrolle des untransformierten Stamms. Ebenso konnte eine in der Größe zu Bdh passende Bande (42 kDa) in den Proben für die Coexpression von AtoB-Hdb-Crt-Bld-Bdh identifiziert werden. In den Proben der Coexpression von AtoB-Hdb-Crt-Bld-YsADH konnte eine Bande detektiert werden, die in ihrer Größe Bld (51 kDa) entspricht, jedoch ist diese Bande in den Proben der Coexpression von AtoB-Hdb-Crt-Bld-Bdh nicht zu erkennen, ebenso nicht in der Negativkontrolle. Die deutlichste Expression zeigte sich für YsADH, da in der Coexpression von AtoB-Hdb-Crt-Bld-YsADH starke Banden der erwarteten Größe von 37 kDa zu erkennen sind, die weder in der Negativkontrolle noch in der Coexpression von AtoB-Hdb-Crt-Bld-Bdh zu erkennen sind. AtoB mit einer Größe von 41 kDa konnte in keiner der Proben eine entsprechende Bande zugeordnet werden. Da

bislang keine Crotylalkoholproduktion unter allen getesteten Konditionen erreicht werden konnte, sollte ferner überprüft werden, ob *P. putida* EM42 in der Lage ist, Crotylalkohol zu verstoffwechseln. Hierfür wurden in Doppelbestimmung Kolben unter den gleichen Bedingungen wie für die Expression der konstitutiven Plasmide angesetzt und direkt nach dem Inokulieren 1 mM Crotylalkohol zugegeben. Nach 7,5 h sowie 24 h wurden Proben entnommen und auf den Crotylalkoholgehalt hin analysiert. In den Proben nach 7,5 h konnten in beiden Kolben nicht quantifizierbare Spuren an Crotylalkohol nachgewiesen werden, nach 24 h war kein Signal mehr detektierbar (Daten nicht gezeigt). Der vermutete Abbau von Crotylalkohol durch *P. putida* EM42 sollte durch weitere Experimente unter zusätzlicher Verwendung der defizienten Stämme GN346 und EP1 sowie deren genomischen Hintergrund KT2440 (Tabelle 4) untersucht werden. GN346, ein Derivat von KT2440, verfügt über vier Deletionen im *n*-Butanolstoffwechsel (Simon *et al.*, 2015). Hier sind die Gene *pedE* (Calciumabhängige Quinoprotein Ethanoldehydrogenase), *pedH* (Lanthanidabhängige Quinoprotein Ethanoldehydrogenase) sowie die beiden Aldehyddehydrogenasen *aldB*-I und *aldB*-II deletiert (Tabelle 4). EP1 ist wiederum ein Derivat von GN346, in dem vom Kooperationspartner Robert Nitschel (Gruppe von Prof. Ralf Takors, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, Deutschland) ferner die  $\alpha$ -Untereinheit des *branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase* Komplexes *bkdAA* deletiert wurde. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Crotylalkohol und *n*-Butanol wurde angenommen, dass die enthaltenen Deletionen ebenso dem Abbau von Crotylalkohol durch die Zelle vorbeugen könnten.

#### 4.10.3 Abbau von Crotylalkohol durch *Pseudomonas putida*

Die Untersuchung des Crotylalkoholabbaus in *P. putida* wurde neben dem bisher verwendeten Stamm EM42 in den Stämmen KT2440, GN346 und EP1 (Tabelle 4) durchgeführt. Zur Kontrolle wurde außerdem *E. coli* BL21(DE3) mitgeführt und analog behandelt. Die Probenentnahme erfolgte wie in 3.2.9 beschrieben nach 2 h, 4 h und 6 h Inkubation der ruhenden Zellen in Gegenwart 20 mM Crotylalkohol. In Abbildung 46 sind die Wiederfindungsraten normiert auf sofort nach Zugabe von 20 mM Crotylalkohol zu Puffer extrahierten Proben ( $t_0$ ) dargestellt.



**Abbildung 46: Abbau von Crotylalkohol in den *P. putida* Stämmen KT2440, GN346 und EP1.** In biologischen Triplikaten wurden ruhende Zellen der *P. putida* Stämme KT2440, GN346 und EP1 nach Zugabe von 20 mM Crotylalkohol bei 30 °C und 180 rpm inkubiert und nach 2 h, 4 h und 6 h Proben zur Analyse der Wiederfindungsrate entnommen. *E. coli* BL21(DE3) wurden zur Kontrolle mitgeführt und analog behandelt. Die Messdaten des verbleibenden Crotylalkohols wurden in Bezug auf eine sofort analysierte Probe in Puffer ( $t_0$ , gestrichelte Linie) normiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung auf.

Wie Abbildung 46 zu entnehmen ist, zeigen sich deutlich Unterschiede in den Raten an wiedergefundenem Crotylalkohol in den verschiedenen Stämmen. Am schnellsten wird Crotylalkohol im bisher verwendeten *P. putida* Stamm EM42 abgebaut; hier konnten nach 2 h noch  $73 \pm 1\%$  Crotylalkohol wiedergefunden werden, während nach 4 h noch  $42 \pm 2\%$  und nach 6 h lediglich  $30 \pm 0\%$  wiederzufinden waren. Ähnlich schnell baut *E. coli* BL21(DE3) Crotylalkohol ab. Nach 2 h konnten noch  $79 \pm 3\%$  der initial eingesetzten Menge wiedergefunden werden, nach 4 h noch  $55 \pm 4\%$  und nach 6 h  $42 \pm 6\%$ . Im *P. putida* Stamm KT2440, der keine Deletionen im Butanolabbauweg aufweist (Tabelle 4), konnte nach 2 h  $79 \pm 1\%$  des eingesetzten Crotylalkohols wiedergefunden werden, während nach 4 h und 6 h mit  $62 \pm 2\%$  und  $59 \pm 3\%$  etwas mehr als die Hälfte der eingesetzten Menge detektiert werden konnte. Für GN346, in dem vier Gene deletiert wurden (Tabelle 4), ergaben die Messungen nach 2 h einen zu GN346 vergleichbaren Wert von  $83 \pm 7\%$ , wohingegen die Werte nach 4 h mit  $70 \pm 3\%$  im Vergleich zu GN346 leicht erhöht und nach 6 h mit  $53 \pm 0\%$  hingegen leicht geringer ausfielen. Deutlich am meisten Crotylalkohol konnte zu allen Zeitpunkten im Stamm EP1 nachgewiesen werden. Hier lagen die Werte nach 2 h bei  $93 \pm 2\%$ , nach 4 h bei  $80 \pm 3\%$  und nach 6 h bei  $75 \pm 2\%$ . Durch die nicht wesentliche Änderung des wiedergefundenen

Crotylalkohols in der Pufferkontrolle konnte eine Verfälschung der Daten durch Evaporation ausgeschlossen werden. Im Folgenden sollte durch CRISPRi die Expression aller Alkoholdehydrogenasen in *P. putida* herunterreguliert werden, da von diesen angenommen wurde, den ersten Schritt im Crotylalkoholabbau zu katalysieren. So sollten Ziele für weitere Deletionen identifizieren werden, die den Abbau von Crotylalkohol mindern könnten. Da EP1 sich durch den niedrigsten gemessenen Abbau von Crotylalkohol auszeichnete, wurden die Versuche in diesem Stamm durchgeführt.

#### 4.10.4 Herunterregulierung der Alkoholdehydrogenasen in *P. putida* EP1 durch CRISPRi

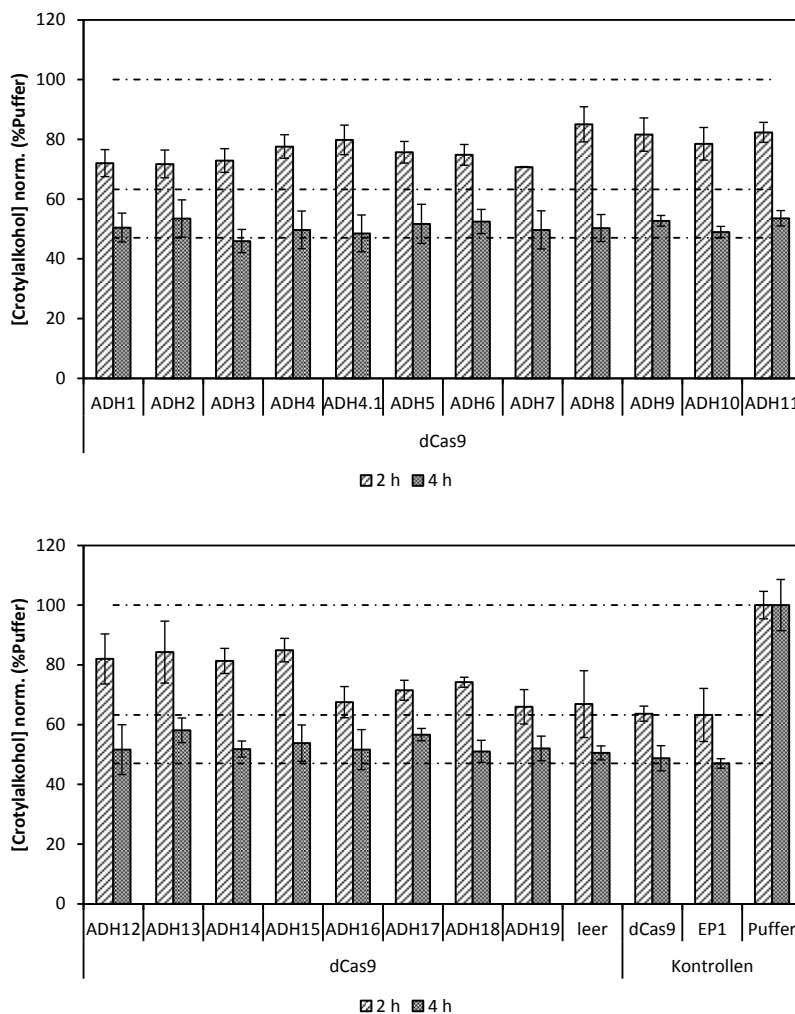
Durch die kooperierende Gruppe von Prof. Vítor Martins dos Santos (*Systems and Synthetic Biology*, Universität Wageningen, Niederlande) wurden in *P. putida* 19 verschiedene Alkoholdehydrogenasen (ADHs) *in silico* identifiziert. Für diese 19 Gene wurden vom Kooperationspartner *spacer* für CRISPRi abgeleitet und kloniert, die eine Herunterregulierung der Gene nach 3.1.12 ermöglichen. Die entsprechenden Plasmide für die konstitutive Expression in *P. putida* sowie ein Plasmid, das die inaktive Variante von Cas9 (dCas9) codiert, wurden schließlich bereitgestellt. Eine Übersicht der Zielgene unter Angabe des Locus, der Genlänge sowie einer Beschreibung ist Tabelle 22 zu entnehmen. Für PP\_2049 (ADH4) wurden zwei *spacer* abgeleitet, da die Promotorregion dieses Gens im ORF von PP\_2048 liegt. ADH4 hat somit den Promotor im ORF des davor liegenden Gens, während ADH4.1 den Bereich direkt vor dem Startcodon von PP\_2048 als Zielregion hat, der außerhalb des ORFs von PP\_2048 liegt.

**Tabelle 22: Übersicht der als Ziele für CRISPRi-induzierte Herunterregulierung in *P. putida* identifizierten Alkoholdehydrogenasen.** Angegeben sind die fortführend verwendeten Nummern der Alkoholdehydrogenasen (ADHs), deren Loci im *P. putida* Genom, die Genlänge, der Genname (falls vorhanden) sowie die Beschreibung des Genprodukts. Genlänge, Locus, Gennamen und Beschreibung wurde pseudomonas.com (vom 08.02.2019) entnommen. ADH, Alkoholdehydrogenase; bp, Basenpaare; n.v., nicht vorhanden.

ADH Nummer	Locus	Genlänge (bp)	Gen	Beschreibung
1	PP_1616	1116	<i>frmA</i>	Glutathionabhängige Formaldehyddehydrogenase
2	PP_1720	963	n.v.	Alkoholdehydrogenase
3	PP_1816	1002	n.v.	Alkoholdehydrogenase
4   4.1	PP_2049	1164	n.v.	Alkoholdehydrogenase
5	PP_2426	1053	<i>calA</i>	Coniferylalkoholdehydrogenase
6	PP_2492	1158	<i>yqhD</i>	NAD(P)-abhängige Alkoholdehydrogenase

7	PP_2674	1896	<i>pedE</i>	Calciumabhängige Quinoprotein Ethanoldehydrogenase
8	PP_2679	1788	<i>pedH</i>	Lanthanidabhängige Quinoprotein Ethanoldehydrogenase
9	PP_2682	1164	<i>yiaY</i>	Eisenhaltige Alkoholdehydrogenase
10	PP_2803	1185	<i>dhaT</i>	1,3-Propanioldehydrogenase
11	PP_2827	1023	n.v.	Alkoholdehydrogenase
12	PP_2953	1008	n.v.	Alkoholdehydrogenase
13	PP_2962	1002	n.v.	Alkoholdehydrogenase
14	PP_2988	1017	n.v.	Alkoholdehydrogenase
15	PP_3623	1344	<i>adhB</i>	Alkoholdehydrogenase Cytochrom C Untereinheit
16	PP_3839	1011	<i>adhP</i>	Alkoholdehydrogenase
17	PP_4760	1011	n.v.	Alkoholdehydrogenase
18	PP_5210	978	n.v.	Alkoholdehydrogenase
19	PP_2476	1035	<i>curA</i>	NADPH-anhängige Curcumin- /Dihydrocurcuminreduktase

Das Plasmid codierend für dCas9 wurde durch Elektroporation nach 3.2.5 in *P. putida* EP1 transformiert. Die Plasmide codierend für die *spacer* der in Tabelle 22 gezeigten ADHs wurden im Anschluss in die bereits transformierten Zellen durch Elektroporation nach 3.2.5 transformiert. Zur Kontrolle wurde ferner ausschließlich das dCas9 Plasmid transformiert. Die Zellen wurden nach 3.2.6 in 24 DWPs kultiviert; die Untersuchung des Abbaus von Crotylalkohol in Gegenwart der CRISPRi Konstrukte erfolgte nach 3.2.9. Abbildung 47 zeigt die Wiederfindungsraten nach 2 h und 4 h jeweils normiert auf die mitgeführte Pufferkontrolle. Gezeigt sind die Wiederfindungsraten für dCas9 cotransformiert mit den in Tabelle 22 beschriebenen *spacern* sowie zur Kontrolle dCas9 cotransformiert mit einem leeren *spacer*, der keine Zielsequenz aufweist. Ferner wurde dCas9 ohne cotransformiertes Plasmid, der untransformierte Stamm EP1 und eine Pufferkontrolle mitgeführt.



**Abbildung 47: Abbau von Crotylalkohol in *P. putida* EP1 bei CRISPRi-induzierter Herunterregulierung von Alkoholdehydrogenasen (ADHs).** In biologischen Triplikaten wurden ruhende Zellen von mit den zwei für CRISPRi-Konstrukte (dCas9 bzw. die entsprechenden *spacer*) codierenden Plasmiden cotransformierten *P. putida* EP1 nach Zugabe von 20 mM Crotylalkohol bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Nach 2 h und 4 h Proben zur Analyse der Wiederfindungsrate entnommen. Zur Kontrolle wurden Zellen, in die ein *spacer* ohne Ziel im Genom (leer) zum dCas9-Plasmid cotransformiert wurde, sowie ausschließlich mit dem dCas9-Plasmid transformierte Zellen mitgeführt und analog behandelt. Die Messdaten des verbleibenden Crotylalkohols wurden in Bezug auf die ebenso mitgeführte und analog behandelte Pufferkontrolle normiert. Die drei gestrichelten Linien zeigen die auf 100% gesetzte Wiederfindungsrate der Pufferkontrolle sowie den Wert für EP1 nach 2 h und nach 4 h an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung auf.

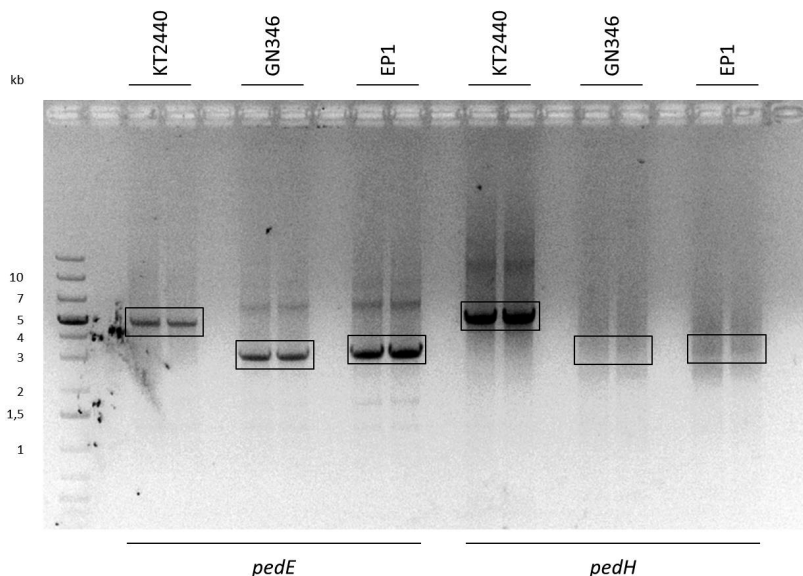


Wie aus der Abbildung hervorgeht, ist die Wiederfindungsrate für alle getesteten Konstrukte niedriger als in der Pufferkontrolle. Hierbei ist zu beachten, dass sich in den Kontrollen von dCas9 mit dem leeren *spacer*, dCas9 allein sowie EP1 ein vergleichbares Maß in der Wiederfindung sowohl nach 2 h als auch nach 4 h zeigt. Für die Herunterregulierungen der verschiedenen ADHs konnten Unterschiede in der wiedergefundenen Konzentration von Crotylalkohol aufgezeigt werden. Diese sind besonders nach 2 h deutlich. Hier sind die Wiederfindungsraten von ADH8 bis ADH15 auffällig höher als die der EP1 Kontrolle. ADH8 weist mit  $85 \pm 6\%$  die höchste normierte Wiederfindungsrate auf. Für ADH9 bis ADH15 ist diese mit Werten zwischen 79% und 85% unwesentlich geringer. In diesem Bereich befinden sich ebenso ADH8 und ADH9. Nach 4 h war die wiedergefundene Konzentration an Crotylalkohol in allen Proben deutlich niedriger. Die höchste gemessene Konzentration wurde hier bei ADH13 und ADH17 mit  $58 \pm 4\%$  und  $57 \pm 2\%$  gemessen, während in der EP1 Kontrolle  $47 \pm 2\%$  detektiert wurden. Für ADH7 und ADH8 (*pedE* und *pedH*) wurden, wie Tabelle 4 zu entnehmen ist, in EP1 sowie dem parentalen Stamm GN346 *knock-outs* vorgenommen. Überraschenderweise unterscheiden sich die Proben für ADH8 jedoch, besonders nach 2 h, deutlich von der EP1 Kontrolle. Für ADH7 ist dieser Effekt weniger stark ausgeprägt. Durch PCR auf genomische DNA (gDNA) von EP1 und GN346 mit spezifischen Oligonukleotiden für die Amplifizierung der beiden Loci PP\_2674 sowie PP\_2679 mit sollte somit der genetische Hintergrund von EP1 im Vergleich zu GN346 und KT2440 untersucht werden.

#### 4.10.5 Untersuchung des genetischen Hintergrunds von *P. putida* GN346 und EP1

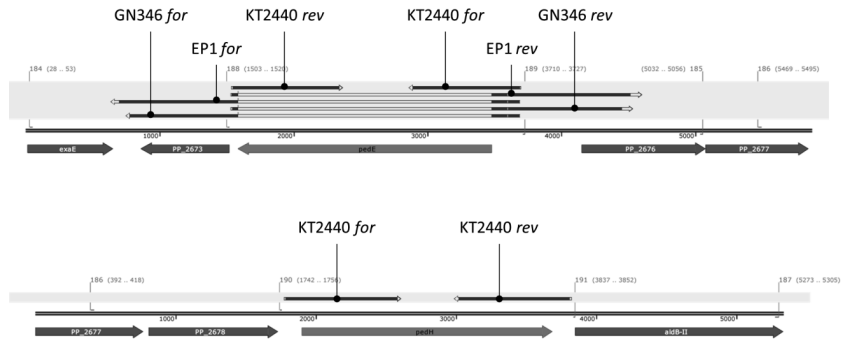
Die nach 3.1.2 isolierte gDNA der *P. putida* Stämme KT2440, GN346 und EP1 wurde als Templat in PCRs nach 3.1.3 eingesetzt, um unter Verwendung der Oligonukleotide **184** und **185** sowie **186** und **187** die Gene *pedE* und *pedH* mit Überhängen von ca. 1,5 kb in 5'- sowie 3'-Richtung zu amplifizieren. Eingesetzt wurden 100 ng der gDNA. Mit den Größen von *pedE* und *pedH* von 2,2 und 2,1 kb ergeben sich somit im Stamm KT2440 Amplifikate von 5,0 kb und 4,9 kb. Hiervon abweichende Größen sprechen für eine Deletion der Gene, während die Modifikation der Gene durch beispielsweise Austausch der Startcodons durch Extraktion der DNA aus dem Agarosegel nach 3.1.7.1 und Sequenzierung nach 3.1.11 überprüft werden sollten. Das präparative Agarosegel nach PCR ist in Abbildung 48 dargestellt, wobei je zwei nebeneinander liegende Proben aus derselben PCR stammen. Im parentalen Stamm KT2440 konnten Banden der erwarteten

Größen ausgemacht werden. Für GN346 sowie EP1 konnten für *pedE* Banden einer Größe von 2,8 kb ausgemacht werden, die der Größe des amplifizierten Bereichs ohne das Gen entsprechen. Für *pedH* konnten sehr schwache Banden der Größe von 2,9 kb ausgemacht werden, die ebenfalls der Größe des amplifizierten Bereichs ohne *pedH* entsprechen. Weder für GN346 noch für EP1 konnten Banden identifiziert werden, die der Größe des amplifizierten Bereichs inkludierend die untersuchten Gene entsprechen. Die beschriebenen Banden sind in Abbildung 48 mit schwarzen Kästen hervorgehoben.



**Abbildung 48:** Präparatives Agarosegel der PCRs auf genomische DNA von *P. putida* KT2440, GN346 und EP1. Die 50  $\mu$ L PCR Ansätze wurden je auf zwei nebeneinander liegende Geltaschen aufgeteilt. Schwarze Kästen kennzeichnen die Banden der erwarteten Größen unter Verwendung der Oligonukleotide **184** und **185** sowie **186** und **187** (Für KT2440: 5,0 kb und 4,9 kb für *pedE* und *pedH*, für GN346 sowie EP1: 2,8 kb und 2,9 kb für *pedE* und *pedH*).

Die in Abbildung 48 gekennzeichneten Banden von Interesse wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA nach 3.1.7.1 extrahiert und gereinigt. Hierbei wurden jeweils die aus demselben PCR-Ansatz stammenden nebeneinander liegenden Banden als ein Gelfragment behandelt. Im Anschluss wurden die gereinigten Amplifikate unter Verwendung der Oligonukleotide **188** und **189** (*pedE*) sowie **190** und **191** (*pedH*) sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind Abbildung 49 zu entnehmen.



**Abbildung 49:** Sequenzierungsergebnisse der von gDNA der *P. putida* Stämme KT2440, GN346 und EP1 amplifizierten Fragmente. Die nach PCR aus einem präparativen Agarosegel isolierten Fragmente wurden unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden für die Gene *pedE* (oben) und *pedH* (unten) sequenziert. Für die Sequenzierung von *pedH* amplifiziert von gDNA aus GN346 und EP1 konnte kein Ergebnis erhalten werden. *for*, *forward*; *rev*, *reverse*.

Für *pedE* konnte bei der Sequenzierung der vom KT2440 Genom amplifizierten Fragmente das Vorhandensein des Gens nachgewiesen werden. Die isolierte Bande aus Abbildung 48 entspricht dem annotierten Genom. Für GN346 und EP1 ergab die Sequenzierung erwartungsgemäß eine Deletion des Gens in beiden Stämmen. Das Vorhandensein des Gen *pedH* wurde ebenso erfolgreich für KT2440 nachgewiesen. Auch hier entspricht das Sequenzierungsergebnis dem annotierten Genom. Für GN346 sowie EP1 ergab die Sequenzierung der sehr schwachen Banden aus Abbildung 48 jedoch keine Ergebnisse, weswegen hier kein *alignment* vorgenommen werden konnte.

Die präsentierten Ergebnisse, die im Zuge der vorliegenden Arbeit erhoben wurden, sollen im Folgenden diskutiert werden. Ferner sollen weiterführende Experimente beschrieben werden.

## 5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte mit Linalool Dehydratase Isomerase (LinD) aus *Castellaniella defragrans* ein Biokatalysator für die Isomerisierung und Dehydratisierung kurzkettiger Alkenole etabliert werden. LinD wurde in vorangegangenen Arbeiten als Enzym mit einzigartigem bifunktionalem Mechanismus und, solange ein bestimmtes Signaturmotiv vorliegt, einer großen Bandbreite an akzeptierten Substraten beschrieben. Diese Bifunktionalität sollte ausgenutzt werden, um deutlich kleinere als die wildtypischen Substrate Geraniol, Linalool bzw. Myrcen umzusetzen. Als Modellreaktion für die Umsetzung kleinerer Alkenole wurde die Dehydratisierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2; C<sub>5</sub>) zu Isopren gewählt. Die erhaltenen Erkenntnisse sollten auf sowohl die bifunktionale Umsetzung von Prenol über 2-3-2 zu Isopren als auch die Isomerisierung und Dehydratisierung des C<sub>4</sub>-Alkenols Crotylalkohol über 3-Buten-2-ol (3-2) zu 1,3-Butadien übertragen werden. Für letztere Reaktion sollte das Substrat Crotylalkohol durch eine heterolog in *Pseudomonas putida* exprimierte Enzymkaskade ausgehend von Acetyl-CoA zur Verfügung gestellt werden. Das natürliche Reaktionsgleichgewicht von LinD-katalysierten Reaktionen liegt weit auf Seite des Dehydratisierungsprodukts (Brodkorb *et al.*, 2010). Obwohl LinD sowohl die Isomerisierung von Linalool zu Geraniol als auch die Dehydratisierung zu Myrcen katalysiert, wurde unter Einsatz von Linalool als Substrat in LinD-katalysierten Reaktionen ausschließlich das Dehydratisierungsprodukt Myrcen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Ebenso wurde in Reaktionen unter Verwendung der Substrate 2-3-2 sowie 3-2 kein Isomerisierungsprodukt detektiert (Daten nicht gezeigt). Alle im Folgenden genannten Produktbildungen beziehen sich daher nur auf das Dehydratisierungsprodukt.

### 5.1 Etablierung eines stabilen und quantifizierbaren Expressionssystems für LinD in *E. coli*

Aufgrund der verhältnismäßig schlechten Exprimierbarkeit von LinD sollte zunächst ein stabiles Expressionssystem in *Escherichia coli* etabliert werden. Ferner sollte durch semi-rationale Mutagenese LinD dergestalt verändert werden, dass kleinere Moleküle besser umgesetzt werden, wobei die Dehydratisierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol als Modellreaktion gewählt wurde. Da sich die Quantifizierung der stark flüchtigen oder gar gasförmigen Produkte als schwierig herausstellte, sollte zudem ein ganzzellbasiertes

Zweiphasensystem etabliert werden, um möglichst geringe Verluste der flüchtigen Verbindungen während der Biotransformationen gewährleisten zu können.

### 5.1.1 Heterologe Expression von LinD in *E. coli*

Die verhältnismäßige schlechte Exprimierbarkeit von LinD zeigte sich in vorangegangenen Studien am Institut für Biochemie und Technische Biochemie im Zuge der Dissertation von Dr. Christopher Geinitz (Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart; interne Information). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene Konstrukte, Plasmide und *E. coli* Stämme auf die Expression sowie die zu erreichende Umsetzung des natürlichen Substrats Linalool durch LinD zu Myrcen untersucht. LinD verfügt wildtypisch über ein 27 Aminosäuren langes N-terminales Signalpeptid, was auf die periplasmatische Lokalisation des Enzyms in *C. defragrans* hindeutet (Brodkorb *et al.*, 2010). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese These. So zeigte sich für die Expression von pQE-31::LinD in *E. coli* M15[pREP4] für die Dehydratisierung von 10 mM Linalool eine Produktbildung von  $0,8 \pm 0,1$  mM, während der Umsatz für das Konstrukt pQE-31::LinD\_noPSP, bei dem die N-terminale Sequenz deletiert wurde, in *E. coli* M15[pREP4] eine deutlich geringere Produktbildung von  $0,1 \pm 0,1$  mM erbrachte. Durch Umklonierung in pET-22b(+) wurde das wildtypische Signalpeptid durch den in *E. coli* für den Transport ins Periplasma etablierten pelB-tag ersetzt. Die Expression des resultierenden Konstrukts pET-22b(+):pelB-LinD in *E. coli* BL21(DE3) resultierte in einer Produktbildung, die mit  $0,8 \pm 0,1$  mM auf vergleichbarem Niveau des wildtypischen Konstrukts lag. Zudem wurde untersucht, ob eine verbesserte Regulation durch Verwendung des rhamnoseinduzierten pDHE-Plasmidsystems in *E. coli* ITB94, der ferner durch das Vorhandensein von Chaperonen (GroELS) die Faltung des Enzyms begünstigen sollte, in gesteigerten Umsetzungen von Linalool resultiert. Die Verwendung des pDHE-Konstrukts führte zu keiner erkennbar gesteigerten Expression von LinD, jedoch zu einer extremen Überexpression der Chaperone. Auch die erreichte Produktbildung ausgehend von 10 mM Linalool unter Verwendung dieses Systems fiel mit  $0,5 \pm 0,1$  mM moderat aus. Diese Ergebnisse belegen eine gesteigerte Aktivität von periplasmatisch exprimierter LinD im Vergleich zu cytoplasmatisch exprimiertem Enzym. Ko und Kollegen konnten 1995 die Expression der wildtypisch sekretierten Streptokinase aus *Streptococcus* in *E. coli* durch den Einsatz des OmpA-tags deutlich steigern. Der Austausch des wildtypischen Signalpeptids von LinD durch den OmpA-tag und dessen Expression von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) schließlich führte erstmals

zu durch *Western Blot* eindeutig nachweisbare Überexpression des Enzyms, wenngleich der größere Teil des Enzyms unlöslich vorlag. Ferner wurde in Biotransformationen mit dem natürlichen Substrat Linalool (10 mM) mit  $1,3 \pm 0,1$  mM eine gesteigerte Produktbildung gemessen. Der verhältnismäßig große Anteil von unlöslichem Enzym deutet auf eine zu starke Überexpression hin, was die Ausbildung von *inclusion bodies* bedingen könnte. Dies wird zudem durch die Ergebnisse der Expression bei 25 °C bekräftigt, bei der ausschließlich in der unlöslichen Fraktion LinD durch *Western Blot* nachgewiesen werden konnte, während bei einer Senkung der Expressionstemperatur und der damit verbundenen langsameren Expression lösliches Enzym nachgewiesen werden konnte.

### 5.1.2 Reinigung von LinD

Literaturbekannte, erfolgreiche Reinigung von LinD konnte durch hydrophobe Interaktion und Anionenaustausch (Weidenweber *et al.*, 2016) sowie über IMAC unter Verwendung eines His<sub>6</sub>-tags (Nestl, Fischer *et al.*, 2017) erreicht werden. Im Zuge dieser Arbeit sollte der Ansatz von Nestl und Kollegen weiterverfolgt werden, da durch IMAC unter Verwendung der His GraviTrap TALON Säulen (2.2) mehrere Varianten zur selben Zeit gereinigt werden können und der Aufwand im Vergleich zur von Weidenweber und Kollegen postulierten Reinigung über hydrophobe Interaktion, Anionenaustausch und Größenausschluss verhältnismäßig gering ist. Die Reinigung von OmpA-LinD-His nach Expression von pET-28a(+) in *E. coli* Jm83(DE3) resultierte jedoch nicht in der Konzentrierung aktiven Enzyms. Gründe hierfür könnten in den unterschiedlichen verwendeten Puffern liegen. Im Zuge dieser Arbeit wurde der 100 mM NaPi bei pH 6,0 zur Reinigung verwendet, während von Nestl und Kollegen 50 mM TRIS-HCl bei pH 8,0 zum Einsatz kam, dem zudem 500 mM NaCl zugesetzt wurde. Ferner wurden von Nestl und Kollegen mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladene TALON Säulen verwendet, während in dieser Arbeit Co<sup>2+</sup>-Ionen Verwendung fanden. Der deutlich abweichende pH, der im Zuge dieser Arbeit gewählt wurde, könnte die Interaktion der Monomere und damit die Ausbildung eines funktionalen Homopentamers durch unterschiedliche Protonierungsstadien der Reste an den Interaktionsstellen der Monomere behindern. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Daten erhoben wurden, ob LinD während bzw. nach der Reinigung durch TALON Säulen als Monomer vorliegt oder eine Bindung an die Matrix als Pentamer erfolgt. Durch native SDS-PAGE-Gele könnte dies untersucht werden, um die Parameter Puffer und pH für künftige

Experimente gezielt anzupassen, was in einer verbesserten Ausbeute an funktionalem Enzym resultieren sollte. Im Rahmen der betreuten Masterarbeit von Ludwig Bengel (Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart) konnte ferner gezeigt werden, dass sich das pMAL™ *Protein Fusion & Purification System* Kit sehr gut eignet, um LinD nach Fusion mit dem Maltose bindenden Protein (MBP) funktional zu reinigen (Daten nicht gezeigt). Das Kit wurde ausschließlich im größeren Maßstab (ca. 100 mL Lysat) durch Äkta getestet, kann aber auch im kleineren Maßstab durchgeführt werden. Durch Verwendung dieses Kits konnte MBP-LinD aktiv gereinigt werden, wobei die erreichte Reinheit nicht bestimmt wurde. Ferner wurde das gereinigte Protein lyophilisiert, wobei nach erneuter Lösung des Lyophilisats ebenso Aktivität nachgewiesen werden konnte. Eine Abspaltung des MBP-Fusionspartner durch die in den verwendeten Vektoren vorhandene *Factor XA* Erkennungssequenz wurde bisher noch nicht vorgenommen, jedoch besteht hierin eine interessante Möglichkeit, LinD ohne Fusionspartner *in vitro* zu charakterisieren.

### 5.1.3 Fusionsprotein OmpA-LinD-mRFP1

Die C-terminale Fusion von OmpA-LinD mit dem monomer rot fluoreszierenden Protein I (mRFP1) durch das Konstrukt OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) eröffnete die Möglichkeit, den Enzymgehalt in Lysaten anhand der Fluoreszenz des Fusionspartners mRFP1 zu berechnen. Für mRFP1 konnte bereits nachgewiesen werden, dass seine Fluoreszenz nach Transport ins Periplasma von *E. coli* bestehen bleibt, weswegen sich für diesen Fluoreszenzmarker entschieden wurde (Chen *et al.*, 2005; Lewenza *et al.*, 2006). OLm zeigte im Vergleich zu OmpA-LinD (OL) zwar eine um die Hälfte verringerte Aktivität, da aber die Quantifizierbarkeit einen deutlichen Mehrwert in weiteren Arbeiten mit sich brachte, wurde an dem Konstrukt festgehalten. Für die Fluoreszenz von OLm konnte zudem eine ausgezeichnete Korrelation zwischen eingesetzter Lysatmenge und Fluoreszenz beobachtet werden, was auf eine mögliche Quantifizierbarkeit des Fusionsproteins hinwies. Nach Expression von pET-28a(+), Reinigung durch IMAC und Lyophilisierung konnte mRFP1 genutzt werden, um eine Kalibrierung der Fluoreszenz in Bezug auf die eingesetzte Proteinmenge zu erstellen. Kontrollen der Reinheit des gereinigten Proteins erfolgten in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten ausschließlich durch SDS-PAGE-Gele, die keine weiteren als die erwarteten Banden aufzeigten (Daten nicht gezeigt). Diese Kalibrierung wurde bei der Berechnung der Konzentration von OLm in Ganzzellen herangezogen. Nach chemischer Lyse wurde die

Fluoreszenz gemessen und im Verhältnis zur Kalibrierung unter Einbeziehung eines Korrekturfaktors, der sich aus der unterschiedlichen molaren Masse von mRFP1 und OLm ergab, die Konzentration des Fusionsproteins zu bestimmen. Eine ähnliche Methode wurde bereits beschrieben, um die Konzentration sekretierter Proteine zu bestimmen (Duellman *et al.*, 2015). Hier wurden Fusionsproteine mit mCherry, einer Variante von mRFP1, erstellt und die Proteinkonzentration entsprechend anhand der Fluoreszenz ermittelt. Die Autoren konnten im Zuge ihrer Studien zeigen, dass die Fluoreszenz von mCherry sehr gut mit der eingesetzten Proteinmenge korreliert (Duellman *et al.*, 2015). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde angenommen, dass die Fluoreszenz von mRFP1 nach Fusion mit OL vollständig erhalten bleibt.

In künftigen Studien sollte OLm gereinigt und lyophilisiert werden, um die Fluoreszenz von OLm mit derjenigen von mRFP1 bei gleicher totaler Proteinmenge vergleichen zu können. Hierfür könnte das pMAL™ *Protein Fusion & Purification System* Kit verwendet werden, da bereits gezeigt werden, dass sich LinD unter Verwendung des MBP-Fusionspartners aktiv reinigen lässt (*vide supra*). Hierbei bliebe jedoch ferner zu untersuchen, ob ein Dreifachfusionsprotein mit der verhältnismäßig komplexen Quartärstruktur von LinD in Einklang zu bringen ist. Weiterhin sollten die Reinheit sowie die Ausbeute an gereinigtem Protein weiter untersucht werden, um eine Eignung des Kits mit bisher etablierten Methoden für die Reinigung von LinD vergleichen zu können. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung sollte zudem Aufschluss darüber bringen, ob OLm tatsächlich im Periplasma von *E. coli* vorliegt. Hierzu sollte ein Vergleich mit Om sowie cytoplasmatisch exprimiertem mRFP1 vorgenommen werden, um die jeweilige Lokalisation der Proteine in der Zelle zu bestimmen, wie bereits für Fusionsproteine mit GFP und RFP (Lewenza *et al.*, 2006) sowie GFP und HALO-tag (Ke *et al.*, 2016) gezeigt werden konnte.

#### **5.1.4 Etablierung eines ganzzellbasierten Zweiphasensystems und mit zugehöriger Analytik**

Aufgrund der relativ hohen Volatilität der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Substrate sowie der entsprechenden Produkte, wurde ein ganzzellbasiertes Zweiphasensystem etabliert. Hierfür wurde eine wässrige Suspension ganzer Zellen von *E. coli* Jm83(DE3) in GC vials mit 90% (v/v) Cyclohexan überschichtet und nach Zugabe des Substrats luftdicht verschlossen. Durch die direkte Injektion aus der organischen Phase für die Analyse durch GC/MS wurde ein Verfahren entwickelt, volatile oder gar



gasförmige Stoffe quantifizieren zu können, ohne die entsprechenden Versuchsansätze erneut zu öffnen, wodurch verdampfungsbedingte Verluste minimiert werden konnten. Da durch die katalysierte Dehydratisierung der Stoffe zudem die Produkte im Vergleich zu den Substraten hydrophober wurden, konnte unter Verwendung des beschriebenen Vorgehens auf eine Extraktion verzichtet werden. Die hydrophilen, teils wassermischbaren Substrate wurden in der wässrigen Phase vermutet, während die hydrophoberen Produkte in der organischen Phase gelöst und somit aus der Reaktion herausgezogen wurden. Aufgrund der Tatsache, dass keine Extraktion vorgenommen wurde, wurde für die Analytik kein interner oder externer Standard eingesetzt, um die Extraktionseffizienz messen zu können. Wegen der hohen Volatilität einiger Substrate und Produkte konnte eine Trennung der Analyten noch vor der Retentionszeit des Lösungsmittels Cyclohexan erreicht werden. Dies ermöglichte den Einsatz sehr kurzer GC-Methoden im Bereich  $< 3$  min, wodurch ein verhältnismäßig hoher Durchsatz von etwa 20 gemessenen Proben pro Stunde erreicht werden konnte.

### 5.1.5 Expressionsanalyse

Im Zuge der betreuten Masterarbeit von Ludwig Bengel (Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart) wurden die externen Expressionsparameter Induktions-OD<sub>600</sub>, Induktorkonzentration und Expressions-temperatur auf die Expression von pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) in *E. coli* Jm83(DE3) untersucht. Ferner wurde der Einfluss der Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz sowie deren Abstand zum Startcodon in Hinblick auf die Expression von OLm untersucht.

#### 5.1.5.1 Anpassung der externen Expressionsparameter

Die Kontrolle der Expression erfolgte primär durch Aktivitätstests im etablierten ganzzellbasierten Zweiphasensystem unter Verwendung des natürlichen Substrats Linalool. Da in Vorversuchen eine ausgezeichnete Korrelation der mRFP1-bedingten Fluoreszenz zur eingesetzten Proteinmenge gereinigten Enzyms festgestellt werden konnte, wurde zusätzlich die Fluoreszenz des Fusionsproteins OLm berücksichtigt. In Hinblick auf die Expressionstemperatur konnte nach Expression bei 25 °C für OLm eine erhöhte Produktbildung im Vergleich zu Expression bei 16 °C und 20 °C gemessen werden. Dies ist ein Einklang mit den Erkenntnissen von Schein und Noteborn, die 1988 zeigen konnten, dass bei einer Wachstumstemperatur von 23 - 30 °C ungefähr 30 - 90% heterolog in *E. coli* exprimierten Enzyms löslich vorlagen. Die erhöhte Produktbildung

bei erhöhter Induktions-OD<sub>600</sub> kann mit der höheren Gesamtzellzahl nach der Expression erklärt werden. Da die Teilungsrate von *E. coli* bei niedrigeren Temperaturen niedriger ist, erhöht sich die Gesamtzellzahl während der Expression bei niedrigeren Temperaturen entsprechend weniger. Ferner können zu hohe Induktorkonzentrationen Zellen metabolischem Stress aussetzen, der in negativer Beeinträchtigung der heterologen Überexpression eines Enzyms sowie des Zellwachstums bis hin zu verfrühtem Zelltod resultieren kann (Glick, 1995). Die Kombination dieser Faktoren ist besonders am Beispiel der Produktbildung nach Expression bei 16 °C und Induktion bei OD<sub>600</sub> von 1,0 ersichtlich, die mit steigender Induktorkonzentration deutlich abnimmt. Bei höherer Induktions-OD<sub>600</sub> scheint dieser Effekt jedoch kompensiert zu werden. Die Expressionstemperatur zeigte ebenso einen Einfluss auf die Fluoreszenz des Fusionsproteins OLM, die nach Expression bei 25 °C niedriger war als nach Expression bei 16 und 20 °C. Besonders deutlich wird dieser Effekt anhand der Fluoreszenz des periplasmatisch exprimierten OmpA-mRFP1 (Om). Da mRFP1 in Studien von Campbell und Kollegen (2002) wie in vorangegangenen Arbeiten von Baird und Kollegen 1999 beschrieben für 6 h bei Raumtemperatur und im Anschluss über Nacht bei 4 °C exprimiert wurde, spricht dies für eine schlechtere Faltung des Proteins bei erhöhter Expressionstemperatur. In dieser Arbeit konnte die höchste Fluoreszenz von Om jedoch nach Expression bei 20 °C und, nicht wie literaturbedingt erwartet, bei 16 °C detektiert werden. Die Parameter Induktions-OD<sub>600</sub> sowie Induktorkonzentration wurden für Om nicht detailliert untersucht; in Hinblick hierauf unterschied sich die Fluoreszenz des Fusionsproteins OLM jedoch kaum. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse verdeutlichen, dass die Expression von OLM von mehreren sich bedingenden Parametern abhängig ist. Zur Identifizierung der faktisch besten externen Expressionsparameter sollte daher der Ansatz der statistischen Versuchsplanung herangezogen werden. Demming und Kollegen konnten 2017 am Beispiel der externen Reaktionsparameter in Hydratisierungsreaktionen unter Verwendung der Aktivität der Oleathydratase aus *Elizabethkingia meningoseptica* sowie nicht-natürlicher Substrate zeigen, dass sich die Software MODDE (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) eignet, um komplexe Zusammenhänge verschiedener Parameter zu entschlüsseln.

#### 5.1.5.2 Einfluss der Shine-Dalgarno-Sequenz

Die erhobenen Ergebnisse unter Verwendung der durch EMOPEC generierten OLM-Konstrukte zeigten weder in Bezug auf die Produktbildung noch die Fluoreszenz

von OLM nachvollziehbare Trends in Bezug auf die vorhergesagte Expressionsstärke. So wurden in Biotransformationen mit den generierten Konstrukten ausnahmslos niedrigere Produktbildungen detektiert als unter Verwendung des parentalen Konstrukts, das über die in pET-28a(+) enthaltene Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz sowie den dort durch Platzierung der Schnittstelle für *NdeI* indizierten Abstand zum Startcodon verfügte. Obwohl EMOPEC die Expressionsstärke relativ zur Expression von GFP vorhersagt, konnte für die Expression von mRFP1 eine gewisse Korrelation nachgewiesen werden und somit die Eignung der Analyse der Ergebnisse durch Messen der mRFP1-bedingten Fluoreszenz bestätigt werden (Bonde *et al.*, 2016). Der Einfluss des Transports ins Periplasma hingegen wird in der Vorhersage durch EMOPEC nicht berücksichtigt. In einer Studie von 2018 untersuchten Lichtenstein und Höcker vom EMOPEC *tool* vorhergesagte Konstrukte, um eine gesteigerte Expression eines periplasmatisch exprimierten Proteins erreichen zu können. Als Signalpeptid wurde hier unter anderem der in der vorliegenden Arbeit verwendete *OmpA-tag* eingesetzt. Die Autoren vergleichen zwei SD-Sequenzen, die von EMOPEC als besonders stark vorhergesagt wurden, die sich aber in ihren Sequenzen mit *AGGAGG* und *AGGAGA* nur wenig unterscheiden. Es konnten sehr gute Expressionslevel unter Verwendung dieser SD-Sequenzen erreicht werden (Lichtenstein und Höcker, 2018). Diese Ergebnisse bestätigen die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse, denen zufolge ebenfalls die SD-Sequenz *AGGAGA* die beste Expression von OLM bewirkte. Interessanterweise wurde in der Studie von Lichtenstein und Höcker ein Abstand von 8 bp zum Startcodon gewählt. Dieser Abstand zeigte in den Experimenten der vorliegenden Arbeit mit Ausnahme einer inaktiven Variante durchweg relativ hohe Expressionen, wenngleich die parentale und ebenfalls von in der beschriebenen Studie gewählte SD-Sequenz *AGGAGA* hier, mit Ausnahme der inaktiven Variante, die niedrigste Produktbildung und Fluoreszenz hervorbrachte. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Expressionsstärke eines Proteins mehr Parametern zu unterliegen scheint, als SD-Sequenz sowie deren Abstand zum Startcodon. In den der EMOPEC Datenbank zugrundeliegenden Experimenten wurden ferner deutlich kleinere Fusionsproteine als das hier untersuchte OLM untersucht. Dies könnte eine weitere Erklärung dafür sein, dass in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation der vorhergesagten Expressionsstärke mit Produktbildung und Fluoreszenz festgestellt werden konnte. Die Ursache für eine nahezu vollständige Inaktivität einiger Konstrukte kann ebenso nicht schlüssig erklärt werden, lässt aufgrund der Durchführung

der Experimente in biologischen Triplikaten jedoch nicht auf systemische Fehler schließen. Die tatsächliche Eignung des *tools* für die Vorhersage der Expression von LinD sollte künftig durch Reinigung des Enzyms nach Expression der generierten Konstrukte und direkte Bestimmung des Proteingehalts überprüft werden, wobei auf die Verwendung eines Fusionsproteins verzichtet werden sollte. Hierfür könnte auf das bereits beschriebene pMAL™ *Protein Fusion & Purification System* Kit zurückgegriffen werden, das eine funktionale Reinigung von LinD erlaubt.

## 5.2 Mutagenesestudien

Im Zuge dieser Arbeit sollte durch die Erstellung von Substitutionsvarianten von putativ am Mechanismus beteiligten Aminosäuren deren Rolle im postulierten Mechanismus weiter aufgeklärt werden. Ferner sollte die LinD-katalysierte Umsetzung kurzkettiger Alkenole durch semi-rationale Mutagenese gesteigert werden. Hierfür wurde zunächst die aktive Tasche betrachtet und durch gezielte Aminosäureaustausche zu kleineren sowie größeren Resten verändert. Ferner wurde durch Analyse der B-Faktoren in der Kristallstruktur eine flexible  $\alpha$ -Helix als potentielles Ziel für Mutagenese identifiziert. Durch Sättigungsmutagenese dieser  $\alpha$ -Helix konnten schließlich Varianten bestätigt werden, die sich positiv auf die Umsetzung kurzkettiger Alkenole auswirken.

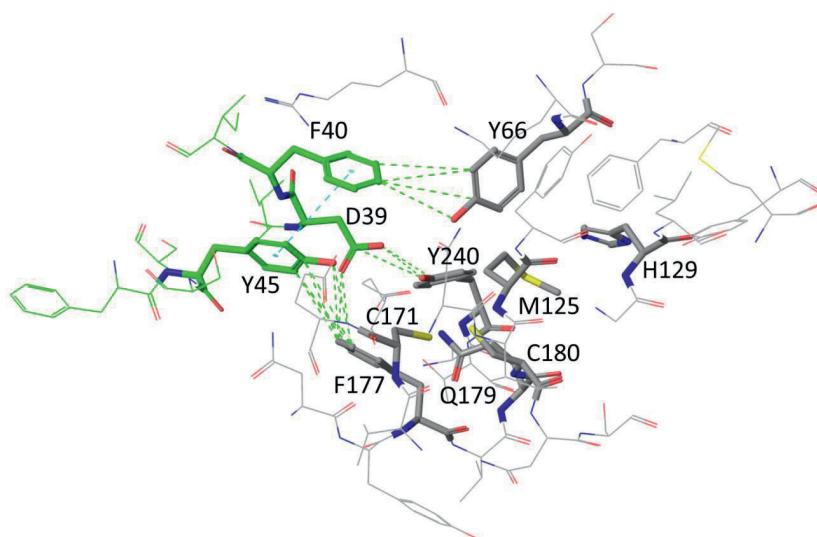
### 5.2.1 Weitere Untersuchung des Mechanismus und *reshaping* der aktiven Tasche

Aminosäuren, die am von Nestl und Kollegen 2017 postulierten Mechanismus beteiligt sind, deren Beteiligung bisher aber nicht durch Substitutionsvarianten bestätigt wurde, sind D39, Q179 und Y240. Für Y45 und H129 wurden bereits Substitutionen zu Phenylalanin bzw. Alanin durchgeführt, jedoch sollte das Spektrum an zu substituierenden Resten durch größere und kleinere hydrophobe Aminosäuren erweitert werden. Der Ansatz, die vorhandenen Reste durch größere und kleinere hydrophobe Aminosäuren auszutauschen, wurde ebenso für die putativ nicht am Mechanismus beteiligten Positionen F40, Y66, F177 und Y240 angewandt. Als Substrat fand für alle Varianten 2-Methyl-3-buten-2-ol (2-3-2; 10 mM) Verwendung, dessen Umsetzung durch LinD bereits beschrieben wurde (Nestl, Fischer *et al.*, 2017). Aufgrund der von Nestl und Kollegen 2017 sowie Weidenweber und Kollegen 2016 postulierten Mechanismen überrascht die nicht nachweisbare Restaktivität von LinD bei Austausch der Reste D39, Y45 und H129 nicht. Die Substitution von D39 zu nicht-azidischen Resten sowie die

Austausche von Y45 zu Leucin und Serin unterstützen den von Nestl und Kollegen postulierten Mechanismus, im Zuge dessen D39 die Hydroxygruppe von Y45 deprotoniert, das somit in der Dehydratisierungsreaktion die Methylgruppe des Substrats deprotonieren kann. Diese Reaktion ist für Y45F sowie Y45L nicht möglich. Die Substitution des Tyrosins zu Serin resultierte ebenfalls in zu vernachlässigender Restaktivität. Deprotonierte Serinreste, die als starke Nukleophile fungieren, sind beispielsweise Teil der katalytischen Triade von Serinproteasen, etwa Chymotrypsin (Polgár, 2015). Hier liegt Serin durch Histidin deprotoniert vor und kann als Nukleophil das Substrat angreifen. Somit könnte in der Variante Y45S Serin theoretisch ebenfalls durch das deprotoniert vorliegende D39 deprotoniert werden; aufgrund des bedeutenden Unterschieds in der Größe der beiden Reste und dem damit verbundenen Abstand zu D39 sowie dem größeren Abstand des Serins zum Substrat kann auf diese Weise jedoch die Aktivität von LinD nicht aufrecht erhalten werden. Die anhand der Alaninsubstitutionsvariante von Nestl und Kollegen 2017 nachgewiesene Beteiligung von H129 an der Katalyse durch Aktivierung eines Wassermoleküls wurde durch die in dieser Arbeit durchgeführten weiteren Austausche von H129 zu Phenylalanin und Leucin unterstützt. Diese nicht-basischen Reste sind nicht in der Lage, Wasser zu aktivieren (kovalenter Mechanismus) oder zu stabilisieren (carbokationischer Mechanismus), was die nicht detektierbare Aktivität der Varianten H129F und H129L erklären könnte. Die Reste Q179 und Y240 bilden in der LinD Struktur eine Wasserstoffbrücke aus, die für die korrekte Ausrichtung von D39 von Bedeutung sein könnte. Beide Reste sind ebenfalls Teil des *cluster II* im von Weidenweber und Kollegen 2016 postulierten Mechanismus, das für die Protonierung der Hydroxygruppe von Linalool verantwortlich gemacht wird. Hier scheint die korrekte Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerks entscheidend für die korrekte Positionierung der putativen Säuren, die durch den Austausch eines oder beider der Reste durch Aminosäuren, deren Seitenketten keine Wasserstoffbrücken ausbilden können, verhindert wird.

Durch semi-rationale Mutagenese wurden von Resten, die einen Abstand von  $\leq 5 \text{ \AA}$  zum *gesoakten* Geraniol aus der LinD-Struktur (PDB: 5G1U) nach Nestl und Kollegen (2017) aufweisen, Substitutionsvarianten erstellt. Hierbei wurden die entsprechenden Reste durch größere und kleinere hydrophobe Aminosäuren ausgetauscht, da die aktive Tasche insgesamt hauptsächlich hydrophobe Reste aufweist (Nestl, Fischer *et al.*, 2017; Weidenweber *et al.*, 2016). Diese putativ nicht am Mechanismus von LinD beteiligten Reste F40, Y66 und F177 wurden durch größere und kleinere hydrophobe Aminosäuren

ausgetauscht, um das Volumen der aktiven Tasche sowie die Ausrichtung der Reste dergestalt zu verändern, dass die Umsetzung kleinerer Moleküle begünstigt wird. Tatsächlich wurde aber für keine der Varianten gesteigerte Aktivität nachgewiesen, vielmehr war eine deutlich erniedrigte Umsetzung von 2-3-2 bis hin zu nahezu vollständiger Aktivität ersichtlich. Gründe hierfür könnten in der Interaktion dieser Reste zu Resten des benachbarten Monomers sein, womit die aktive Zusammenlagerung des LinD Homopentamers ermöglicht wird. Eine Untersuchung der Interaktion der Reste mit jeweils ausschließlich Resten der benachbarten Untereinheit ist in Abbildung 50 dargestellt, wobei die Interaktionen durch die Software Maestro 10.2.010 (Schrödinger K.K.; Tokio, Japan) berechnet wurden.



**Abbildung 50: Interaktion der Aminosäurereste in der aktiven Tasche von LinD.** Die beiden benachbarten Monomere, die die aktive Tasche von LinD ausbilden, sind farbcodiert dargestellt (grün versus grau). Aufgezeigt sind ausschließlich solche Interaktionen, die zwischen Aminosäureresten zweier unterschiedlicher Monomere durch Einsatz der Software Maestro 10.2.010 (Schrödinger K.K.; Tokio, Japan) in der LinD Kristallstruktur (PDB: 5G1W) detektiert wurden (grün gestrichelte Linien geben von der Software als „gut“ interpretierte Interaktionen an). Blau gestrichelte Linien geben Aufschluss über von der Software identifizierte  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen.

Es zeigte sich, dass die untersuchten Reste F40, Y66 und F177 mit Aminosäuren des benachbarten Monomers interagieren. Diese in Abbildung 50 durch grüne gestrichelte Linien dargestellten Interaktionen zeigen hierbei *gute* Kontakte C nach der Formel  $C = D_{12} (R_1 + R_2)^{-1}$  auf, wobei  $D_{12}$  den Abstand der Atomzentren 1 und 2 sowie  $R_1$  und

$R_2$  die van der Waals Radii der Atomzentren 1 und 2 bezeichnen (Software Maestro 10.2.010; Schrödinger K.K.; Tokio, Japan). Hierbei wurden die von der Software indizierten Grenzwerte von 1,30 für gute (*good*), 0,89 für schlechte (*poor*) und 0,75 für sehr schlechte (*ugly*) übernommen. Je niedriger C, umso schlechter wird ein Kontakt durch Anwendung dieser Formel bewertet. *Poor* und *ugly* Kontakte wurden in der Struktur nicht aufgefunden, da diese wegen des zu geringen Abstands nativ nicht vorliegen können. Sollte sich bei der Betrachtung ein Wert  $C > 1,3$  ergeben, interpretiert die Software keinen Kontakt, da sich die Atomzentren zu weit voneinander entfernt befinden. Eine Substitution des Rests Y66 könnte so Auswirkungen auf die Ausbildung dieser Kontakte haben, weswegen das funktionale Homopentamer des Enzyms nicht ausgebildet werden kann. Die Vergrößerung des Rests zu Tryptophan könnte somit zu sterischen Behinderungen in der Interaktion mit F40 und einer Verschlechterung des Kontakts führen, was eine Ausbildung des Homopentamers behindert oder die funktionale Ausbildung der aktiven Tasche nicht zulässt, indem zum Beispiel eine Bindung des Substrats nicht mehr ermöglicht wird. Ein Austausch zum nahezu gleich großen Phenylalanin zeigte eine gewisse verbleibende, wenn auch deutlich verringerte, Aktivität auf. Diese Verringerung ist nicht auf die Unfähigkeit von Y66F Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) einzugehen zurückzuführen, da Y66 der Kristallstruktur zufolge H-Brücken eingeht. Für Position F177 konnte einzig bei der Variante F177Y eine Restaktivität detektiert werden. Dies lässt sich zum einen mit der ähnlichen Größe der Reste erklären, die die Ausbildung der Kontakte nur bedingt beeinflussen sollte. Die deutlichere Verringerung zum anderen könnte damit erklärt werden, dass F177Y in der Lage sein könnte, eine Wasserstoffbrücke zu Y45 auszubilden. Der Abstand in der *in silico* generierten Variante ist mit 3,01 Å zwar etwas zu groß, nativ könnte dieser jedoch durch Umlagerung der beteiligten Reste bis auf den zur Ausbildung einer H-Brücke erforderlichen Abstand von etwa 2,8 Å herabgesetzt werden; ferner könnte unter nativen Bedingungen ein H-Brückennetzwerk über ein Wassermolekül aufrechterhalten werden. Eine H-Brücke zu Y45 könnte daher die Lage des putativ als Base im Mechanismus beteiligten Rests beeinflussen und somit die Aktivität aufgrund nicht-favorisierter Abstände zum Substrat verringern. Außerdem ist aus Abbildung 50 ersichtlich, dass zwischen den aromatischen Resten F40 und Y45 eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung besteht (blaue gestrichelte Linie). Diese wird naturgemäß aufgehoben, wenn einer der Reste zu einer nicht-aromatischen Aminosäure oder einer aromatischen Aminosäure mit nicht-favorisiertem Abstand mutiert wird. Diese Bindung

scheint jedoch für die korrekte Ausrichtung von Y45 für die Katalyse nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Der Austausch von F40 zum etwa gleich großen Tyrosin zeigte eine deutliche Erniedrigung der Aktivität. Die höchste Restaktivität konnte hingegen durch Substitution zu den hydrophoben und verzweigten Aminosäuren Isoleucin und Valin erreicht werden, wenngleich diese ebenso nur etwa eine Drittel der Aktivität von OLM entsprachen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Varianten von putativ am Mechanismus beteiligten Aminosäuren konnte deren Rolle im postulierten Mechanismus bestätigen. Weitere untersuchte Varianten von Aminosäureresten der aktiven Tasche, von denen bislang nicht von einer direkten Beteiligung am Mechanismus ausgegangen worden war, wiesen allesamt deutlich verringerte oder gar keine Aktivität auf, was deren Rolle als ebenso katalytisch essentielle Reste bekräftigt. Durch das etablierte ganzzellbasierte Zweiphasensystem in Verbindung mit kurzen Methoden könnte deren Beteiligung durch iterative Sättigungsmutagenese weiter untersucht und eine Steigerung der Aktivität in Bezug auf die Umsetzung von Prenol und 2-3-2 erreicht werden. Das etablierte System erlaubt das *screening* der verhältnismäßig großen durch einen solchen Ansatz anfallenden Probenmenge. Hierfür sollte der Radius der zu betrachtenden Reste erhöht werden, um gleichzeitig Effekte von Mutationen, die nicht direkt mit dem Substrat oder untereinander interagieren, aber Einfluss auf die Konformation der aktiven Tasche haben, mit abbilden zu können. Eine verbesserte Aktivität von LinD in Bezug auf die Umsetzung von Prenol zu Isopren würde das Enzym für den Einsatz in Kaskaden zur Isoprenproduktion, etwa in Verbindung mit dem MAV- oder MEP-Weg, interessant für künftige Anwendungen machen.

### 5.2.2 B-Faktor Analyse und Kinetik der resultierenden Varianten

Durch die Analyse der B-Faktoren in der Struktur von LinD (PDB: 5G1W) wurde eine  $\alpha$ -Helix an der Innenseite des Homopentamers identifiziert, deren B-Faktor im Mittel über dem des Gesamtzyms liegt. Diese  $\alpha$ -Helix wird aus den Resten K103, R104, V105, W106, G107, D108, W109, E110, E111 und D112 gebildet und flankiert den Bereich eines von Weidenweber und Kollegen (2016) postulierten Kanals in der LinD Struktur. B-Faktoren geben gewöhnlicherweise Auskunft über die räumliche Flexibilität durch atomare Fluktuation, wie Vibration, ebenso wie kollektive Bewegungen von kovalent gebundenen Atomgruppen wie Aminosäuren, nicht jedoch über die nicht-zufälligen konformationellen Änderungen einer Proteindomäne (Yuan *et al.*, 2003). Somit könnte

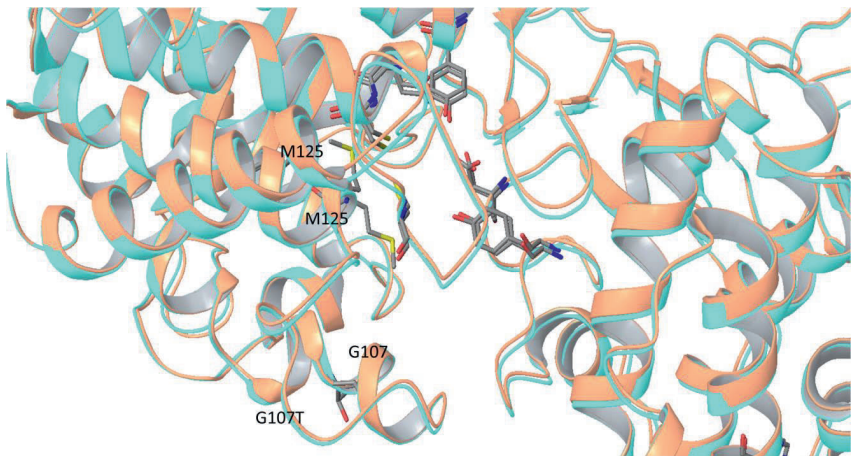


eine Umlagerung, in diesem Fall etwa das Öffnen oder Schließen eines Kanals, durch die Analyse der B-Faktoren nicht erkannt werden. Auf der anderen Seite könnten anhand der Flexibilität einer Domäne, bzw. der Reste einer Domäne, Rückschlüsse auf potentielle Interaktionen der Reste untereinander sowie mit weiteren Resten in räumlicher Nähe getroffen werden. Zur initialen Untersuchung wurden so Alaninsubstitutionsvarianten aller entsprechenden Reste erstellt. Es zeigte sich für alle untersuchten Varianten zwar eine Reduzierung in der Produktbildung für die Dehydratisierung von 2-3-2, jedoch unterschieden sich die Varianten deutlich in der Intensität deren Ausprägung. Es wurden sowohl Varianten mit nicht nachweisbarer Restaktivität (K103A, G107A, D108A, W109A, E111A und D112A) als auch Varianten mit deutlich vorhandener Restaktivität (R104A, V195A, W106A und E110A) beobachtet. Dies ließ auf eine Beteiligung der untersuchten  $\alpha$ -Helix an der Umsetzung sowie auf eine potentielle Evolvierbarkeit der Region schließen. Die Sättigung aller zehn Reste durch 22c-trick ergab elf identifizierte Mutationen, von denen acht (an vier verschiedenen Positionen) eine erhöhte Produktbildung in der Dehydratisierung von 2-3-2 sowie erhöhte Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> im Vergleich zu OLM aufwiesen. Für weitere Untersuchungen wurden mit K103N, R104G, G107T und D112T die besten Varianten jeder Position gewählt und alle möglichen Kombinationsvarianten erstellt. Bei keiner der erstellten Doppel- oder Dreifachvarianten und ebenso nicht der Quadrupelvariante ergaben sich weitere Produktbildungssteigerungen. Die Doppelvariante K103N/G107T war unter allen getesteten Doppelvarianten diejenige mit der höchsten detektierten Produktbildung. Mit  $171 \pm 18\%$  relativ zum parentalen Konstrukt OLM lag diese etwa auf dem Niveau der Einfachvariante K103N ( $173 \pm 5\%$ ), jedoch deutlich unter dem der Einfachvariante G107T ( $208 \pm 12\%$ ). Für alle weiteren Doppelvarianten wurden deutlich reduzierte Produktbildungen im Vergleich zu den jeweiligen Einzelvarianten beobachtet bis hin zu keiner nachweisbaren Restaktivität. Ähnlich verhielt es sich mit den erstellten Dreifachvarianten, wobei hier ausschließlich K103N/R104G/G107T mit  $40 \pm 12\%$  eine nachweisbare Restaktivität aufwies. Interessanterweise zeigten alle Kombinationsvarianten, in denen beliebige Mutationen mit D112T kombiniert wurden, keine verbleibende Restaktivität. Dies schließt auch die Quadrupelvariante ein. Erstaunlich ist die Beobachtung vor allem, da D112T allein nach G107T die zweithöchste Produktbildung aller getesteten Varianten und den höchsten errechneten Quotienten [Produkt] Fluoreszenz<sup>-1</sup> aufwies. Zudem wurden im Rahmen der betreuten Bachelorarbeit von Jan Seeger (Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart)

vom parentalen Konstrukt OLM und den vier Einzelvarianten Kinetiken für die Dehydratisierung von 2-3-2 zu Isopren erstellt. Die kinetischen Daten zeigen, dass die gesteigerte Produktbildung von G107T auf eine deutliche Erhöhung der maximalen Aktivität  $v_{\max}$  zurückzuführen ist, da die durch die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  ausgedrückte Affinität gegenüber 2-3-2 mit 0,8 mM der von OLM entspricht. Nach Bestimmen der Enzymkonzentration durch Fluoreszenzmessung ergab sich eine Steigerung in der Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  durch diese Mutation um den Faktor 10 von 31,2 (OLM) auf 317,6  $\text{s}^{-1}$ . Bei der Variante D112T hingegen wurde eine deutliche Erhöhung der Affinität festgestellt, gleichzeitig aber eine Erniedrigung der maximalen Aktivität. Hier wurde  $K_m$  mit 0,1 mM bestimmt sowie ein  $k_{\text{cat}}$  von 134,6  $\text{s}^{-1}$ . Die Variante K103N zeigte mit 1,5 mM einen leicht erhöhten  $K_m$ -Wert, aber eine Steigerung in  $k_{\text{cat}}$  von etwa einem Drittel im Vergleich zu OLM auf 42,2  $\text{s}^{-1}$ . Die Affinität von R104G hingegen nahm deutlich ab im Vergleich zu OLM, was sich in einem  $K_m$  von 3,9 mM ausdrückt.  $k_{\text{cat}}$  wurde für R104G mit 59,6  $\text{s}^{-1}$  bestimmt, was in etwa dem Doppelten von OLM entspricht. Mit den beiden Varianten, die im Vergleich zu OLM die deutlichsten Steigerungen in  $k_{\text{cat}}$  zeigten, G107T und D112T, wurden Kinetiken mit den natürlichen Substraten Geraniol und Linalool erstellt. Es ergaben sich hierbei wiederum deutliche Unterschiede in den kinetischen Parametern  $K_m$  und  $k_{\text{cat}}$  in Bezug auf die Umsetzung der verschiedenen Substrate. Da unter Verwendung der Isomerisierungssubstrate Geraniol und Prenol die Bildung der finalen Produkte Myrcen und Isopren durch die Bildung der Intermediate Linalool und 2-3-2 verfälscht wird, konnten hier anhand der generierten Daten nur für die Umsetzungen von Geraniol durch D112T und von Prenol durch OLM kinetische Parameter durch *fits* bestimmt werden. Diese konnten jedoch nur unter Einsatz von manuell zugefügten Restriktionen während der Minimierung durch Excel Solver erreicht werden. Somit entsprechen die erhaltenen Minimierungen aller Wahrscheinlichkeit nach nicht den globalen Minima. Daher wird in der folgenden Diskussion auf diese Werte keine Rücksicht genommen. Es werden ausschließlich die Parameter in Bezug auf die Dehydratisierung von Linalool und 2-3-2 behandelt. Für das parentale OLM und die beiden Varianten G107T und D112T ergab sich eine deutlich höhere Affinität gegenüber 2-3-2 als dies für das natürliche Substrat Linalool der Fall ist. Diese höhere Affinität könnte sich dadurch ergeben, dass 2-3-2 leichter in die aktive Tasche gelangen kann als das verhältnismäßig sperrigere Substrat Linalool. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass Linalool als racemisches Gemisch eingesetzt wurde, obwohl LinD ausschließlich

*S*-Linalool (Coriandrol) als Substrat akzeptiert (Lüddeke und Harder, 2011). Coriandrol ist jedoch kommerziell nicht erhältlich und stand somit nicht für Umsetzungen zur Verfügung. Aufgrund der Selektivität von LinD könnte *R*-Linalool (Licareol) LinD kompetitiv inhibieren. Die kompetitive Inhibition durch Enantiomere eines Substrats wurde bereits für die  $\omega$ -Transaminase auf *Vibrio fluvialis* gezeigt (Shin und Kim, 2002). Dieser Effekt könnte durch die Enantiomerentrennung von racemischen Linalool, etwa durch semi-präparative Flüssigchromatographie unter Verwendung einer chiralen Säule, und die Titration von Coriandrol und Licareol gegeneinander überprüft werden.

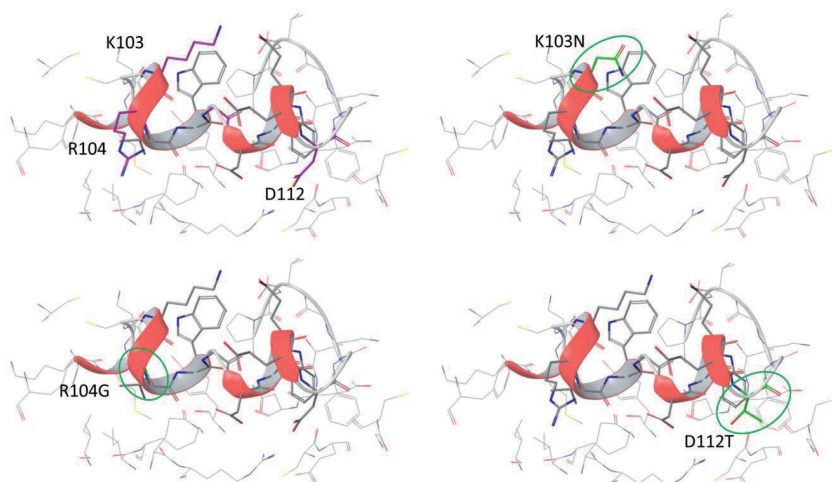
Die teils deutlichen beobachteten Unterschiede in  $K_m$  und  $k_{cat}$  für die Varianten in Bezug auf die Dehydratisierung desselben Substrats könnten durch Konformationsänderungen der  $\alpha$ -Helix erklärt werden. Für G107T wurde als einzige Variante die Kristallstruktur in der Gruppe von Prof. Gideon Grogan (*Structural and Applied Enzymology, University of York, Vereinigtes Königreich*) gelöst; diese zeigte jedoch mit Ausnahme eines Rotamers des katalytischen M125 keine offensichtlichen Unterschiede (Abbildung 51).



**Abbildung 51: Strukturelles alignment von LinD mit der Variante G107T.** Die LinD Struktur (PDB: 5G1W) ist in orange dargestellt, die bisher unveröffentlichte Struktur der Variante G107T in cyan (zur Verfügung gestellt von Prof. Gideon Grogan; *Structural and Applied Enzymology, University of York, Vereinigtes Königreich*). Das strukturelle alignment erfolgte durch die Software Maestro 10.2.010 (Schrodinger K.K.; Tokio, Japan). Die Aminosäuren der aktiven Tasche sind hervorgehoben, ebenso die entsprechende Position G107/G107T.

Für G107T könnte die Ausbildung einer zusätzlichen H-Brücke zu E111 eine Stärkung der helikalen Struktur bedeuten. Unabhängig von H-Brücken stärkt der Austausch eines

Glycins zu einem Threonin in einer  $\alpha$ -Helix deren helikale Struktur deutlich. Neben Prolin ist Glycin die einzige proteinogene Aminosäure, die als Helixbrecher gilt, das heißt die helikale Struktur aufgrund fehlender H-Brücken im Rückgrat aufbricht. Diese Tendenz ist für Threonin hingegen deutlich geringer, weswegen Threonin als durchschnittlicher Helixbildner anzusehen ist (Pace und Scholtz, 1998). Da für alle anderen Varianten bislang keine Kristallstrukturen gelöst wurden, wurden die entsprechenden Mutationen manuell in die Struktur von LinD (PDB: 5G1W) eingefügt und konnten aus technischen Gründen keiner Energieminimierung unterzogen werden. Abbildung 52 zeigt die Region um die entsprechende helikale Struktur für LinD sowie die Varianten K103N, R104G und D112T.



**Abbildung 52: Manuell erstellte Strukturen der Varianten K103N, R104G und D112T.** oben links, wildtypische Struktur (PDB: 5G1W); oben rechts, K103N; unten links, R104G; unten rechts, D112T; grün markiert. Die entsprechenden Mutationen wurden manuell in die Struktur von LinD unter Verwendung der Software Maestro 10.2.010 (Schrödinger K.K.; Tokio, Japan) eingefügt. Die wildtypischen Aminosäurereste sind in magenta dargestellt, die mutierten in grün.

Für die Varianten K103N (Abbildung 52, oben rechts), R104G (Abbildung 52, unten links) und D112T (Abbildung 52; unten rechts) lassen sich anhand der *in silico* erstellten Strukturen keine Indizien für konformationelle Unterschiede im Bereich der  $\alpha$ -Helix feststellen. Die für den Effekt der Variante G107T aufgestellte Hypothese, nach der die Erhöhung der Aktivität mit dem höheren Helixbildungspotential in Zusammenhang steht (*vide supra*), lässt sich nicht auf die übrigen gefundenen Varianten mit erhöhter Produktbildung übertragen, da für alle übrigen Varianten die

substituierte Aminosäure ein geringeres Helixbildungspotential aufweist als die wildtypischen Reste (Pace und Scholtz, 1998).

Die angesprochenen Potentiale von Aminosäuren,  $\alpha$ -Helices auszubilden, hängen jedoch nicht nur von den Resten allein, sondern auch von der Sequenz ab. Der Einfluss der Sequenz wurde in einer Studie von Alías und Kollegen 2010 anhand von nicht-kanonischen Austauschen in einem kurzen helikalen Peptid untersucht. Jedoch konnten in der Studie keine eindeutigen Aussagen über die Vorhersagbarkeit der Tendenz Helices auszubilden getroffen werden, da diese vielen weiteren äußeren Einflüssen unterliegen. Da B-Faktoren keinen Aufschluss über die räumliche Relokalisierung der behandelten  $\alpha$ -Helix geben können (*vide supra*) und die native Ausrichtung der besprochenen  $\alpha$ -Helix ferner von der in der Kristallstruktur indizierten abweichen kann, kann eine tatsächliche Umlagerung der  $\alpha$ -Helix anhand der Datenlage weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Eine Möglichkeit, die Ausbildung der  $\alpha$ -Helix und somit die Wichtigkeit der Stabilität oder Instabilität der Struktur beurteilen zu können, liegt in der UV-Spektroskopie. Durch diese Methode können *in vitro* Unterschiede in der Ausbildung von  $\alpha$ -Helices untersucht und verglichen werden (Dahiyat *et al.*, 1997). Hierfür sollte jedoch wildtypische LinD ohne Fusionsprotein untersucht werden. Für künftige Messungen sollte das beschriebene pMAL™ *Protein Fusion & Purification System Kit* (*vide supra*) herangezogen werden, um LinD in seiner aktiven Konformation gereinigt untersuchen zu können. Eine weitere Alternative bestünde in MD-Simulationen der betreffenden Region. Sollte für eine solch anspruchsvolle Berechnung hinreichend Kapazität zur Verfügung stehen, könnte durch die Simulation des Transports von Substrat in oder Produkt aus der aktiven Tasche heraus untersucht werden, ob die postulierte Bewegung der Helix mit den beobachteten Änderungen in der Affinität und Aktivität korreliert. Zudem könnte durch hinreichend lange MD-Simulationen eine sogenannte *free energy landscape* (Karte der freien Energie) erstellt werden, die Aufschluss darüber geben kann, ob eine Variante bevorzugt in einer anderen Konformation, etwa durch eine Umlagerung einer flexiblen  $\alpha$ -Helix, vorliegt (Maria-Solano *et al.*, 2018). Vorbereitungen für entsprechende Simulationen wurden zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Dissertation (April 2019) bereits in der Gruppe von Dr. Silvia Osuna (*Institut de Química Computacional i Catàlisi*; Universität Girona, Spanien) vorgenommen.

### 5.2.3 Aktive Form von LinD

Wie beschrieben, liegt LinD in den bisher gelösten Kristallstrukturen stets als Homopentamer vor (Nestl, Fischer *et al.*, 2017; Weidenweber *et al.*, 2016). Bisher wurde jedoch nicht zweifelsfrei geklärt, ob dies auch der aktiven Form des Enzyms unter physiologischen Bedingungen entspricht. Die Studien von Brodkorb und Kollegen ergaben 2010, dass die aktive Form der LinD einem Homotetramer entspricht, da die Molekülmasse des isolierten Enzyms mit ca. 160 kDa bestimmt wurde und die Masse des Monomers ca. 40 kDa entspricht. In folgenden Studien und ebenso der vorliegenden Arbeit wurde die native Form des Enzyms jedoch nicht weiter untersucht. Es ist daher im Bereich des Möglichen, dass die Ausbildung des in den Kristallstrukturen identifizierten Homopentamers für LinD-katalysierte Reaktion nicht notwendig ist. Ebenso könnte ein Dimer oder das initial beschriebene Homotetramer die aktive Form darstellen. Durch Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography, sec*) könnte die LinD unter nativen Bedingungen weitergehend untersucht und Aufschluss über die tatsächlich aktive Form gewonnen werden. In der Ausbildung der aktiven Form des Enzyms sowie deren Stabilisierung besteht ferner eine mögliche Erklärung des positiven Einflusses der identifizierten Varianten auf die Aktivität (*vide supra*). Ein Vergleich des wildtypischen Enzyms mit den Varianten sollte in Bezug auf die Stabilität des Enzyms unternommen werden. Sollten die gesteigerten Werte für  $k_{cat}$  für die Varianten G107T und D112T von einer verbesserten Stabilität des aktiven Oligomers unter Biotransformationsbedingungen herrühren, könnte dies durch Inkubation der Varianten vor der eigentlichen Biotransformation aufgedeckt werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Aktivitätsmessungen beruhen zudem ausschließlich auf Endpunktbestimmungen nach 18 h Biotransformation. Verkürzte Biotransformationen könnten aufzeigen, ob der beobachtete Effekt nach etwa 2 h in gleichem Maße aufzufinden ist. Das etablierte ganzzellbasierte Zweiphasensystem eignete sich jedoch auch, um die Produktbildung über Zeit mit mehrfach durchgeführten Messungen zu verfolgen. Dies könnte eine beobachtete gesteigerte Produktbildung von der tatsächlichen Produktbildungsrate entkoppeln. Vorversuche zeigten, dass das etablierte System bei RT ohne Schütteln inkubiert eine nachvollziehbare Quantifizierung des Produkts zulässt, wobei die Standardabweichungen der Messungen naturgemäß größer sind. Ferner zeigte sich, dass auch nach mehreren Messungen die Septen der als Reaktionsgefäße genutzten GC *vials* hinreichende Dichtigkeit aufweisen, da ein zu vernachlässigender Verdampfungsverlust beobachtet

wurde (Daten nicht gezeigt). Die Biotransformationen könnten zudem unter Verwendung von Magnetrührern direkt im zur Quantifizierung genutzten GC/MS-System durchgeführt werden, wodurch regelmäßiges Messen über nahezu beliebig lange Zeiträume ermöglicht würde.

### 5.3 Crotylalkoholsynthese in *Pseudomonas putida*

Da gezeigt werden konnte, dass LinD Crotylalkohol als Substrat akzeptiert und so die Synthese von 1,3-Butadien LinD-katalysiert möglich ist, sollte durch die heterologe Expression einer Enzymkaskade Crotylalkohol in *P. putida* synthetisiert werden. Dieser sollte somit als Substrat für LinD zur Verfügung stehen. Ausgehend von Acetyl-CoA sollte durch die Aktivität von drei Enzymen Crotonyl-CoA gebildet werden. Von den Kooperationspartnern Christos Batianis und Lyon Bruinsma (Gruppe von Prof. Vitor Martins dos Santos, *Systems and Synthetic Biology*, Universität Wageningen, Niederlande) wurden mit AtoB, Hbd und Crt drei Enzyme identifiziert und für die heterologe Expression in *P. putida* kloniert. Für die Umsetzung von Crotonyl-CoA zu Crotonaldehyd wurde Bld gewählt, für die weitere Reaktion zu Crotylalkohol mit Bdh und YsADH zwei alternative Enzyme. Ferner wurde mit HcSCDH ein Enzymkomplex gewählt, der die Reaktion von Crotonyl-CoA zu Crotylalkohol katalysieren kann. Die vier Enzyme wurden für die Expression in *P. putida* codonoptimiert synthetisiert und ebenfalls von den Kooperationspartnern kloniert. Da die Intermediate der Enzymkaskade nicht kommerziell verfügbar waren, wurde ausschließlich die Bildung von Crotylalkohol nach Coexpression der Gene in *P. putida* EM42 betrachtet. Alle Versuche unter Verwendung der Coexpressionen von AtoB-Hbd-Crt-Bld-Bdh, AtoB-Hbd-Crt-Bld-YsADH sowie AtoB-Hbd-Crt-HcSCDH resultierten jedoch in keiner nachweisbaren Produktion von Crotylalkohol. Der Einsatz konstitutiver Promotoren sowie die Kontrolle der Expression durch SDS-PAGE erbrachte Indizien für eine mögliche Expression von Bld, Bdh, YsADH, Hbd sowie Crt, wohingegen für AtoB keine Bande der entsprechenden Größe ausgemacht werden konnte. Mit Ausnahme von YsADH war die Analyse jedoch nicht eindeutig, da die entsprechenden Banden schwächer ausgeprägt waren als dies unter Verwendung des relativ starken konstitutiven Promotors erwartet wurde und einige der putativen Banden ebenso in dem als Negativkontrolle eingesetzten Leerstamms EM42 nachgewiesen wurden. Eine mögliche Erklärung besteht in der nicht idealen Abstimmung der Expressionsstärke der Enzyme. Die Ausbalancierung der

Expressionsstärken in Kaskaden kann eine entscheidende Rolle in der Produktionsrate spielen. Sollte ein Enzym in der Kaskade eine relativ geringe spezifische Aktivität haben, könnte es etwa zu einer ungewollten Anreicherung eines Intermediats kommen, das schließlich auf anderem Weg weiterreagieren könnte. Ebenso könnte eine verhältnismäßig geringe Affinität eines Enzyms in einer Kaskade die Überproduktion eines Intermediats *upstream* notwendig machen, um hinreichend Substrat für die Kompensierung hiervon bereitzustellen. Am Beispiel des 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat- (MEP-) Wegs konnte beispielsweise von Li und Kollegen 2017 gezeigt werden, dass die Ausbalancierung der beteiligten Enzyme ispG und ispH die Produktion von Lycopin sowie  $\beta$ -Carotin um 73% und 77% gesteigert werden konnte. Die alleinige Überexpression von ispG führte zu einer Akkumulation des cytotoxischen Intermediats HMBPP und somit zum Absterben der *E. coli* Zellen. Dies konnte durch eine stärkere Überexpression von ispH zwar ausgeglichen werden, doch die besten Ergebnisse wurden erst nach dem Ausbalancieren der Expressionsstärken erreicht (Li *et al.*, 2017). Für die Ausbalancierung kam eine mRNA stabilisierende (mRS) Promotorbibliothek zum Einsatz, die anhand gesteigerter *lacZ* Expression identifiziert wurde (Lu *et al.*, 2012). Diese mRS-Bibliothek beinhaltet Promotoren, die die Expression um Faktoren zwischen 0,03 und 7,00 veränderte. Der Einbau der veränderten Promotorregionen kann zeitgleich durch mehrstufige homologe Rekombination erreicht werden, wodurch mehrere Zielregionen verändert und anschließend *gescreent* werden können (Li *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2012). Durch Anwendung dieser mRS-Bibliothek könnten die Expressionsstärken der ausgewählten Gene für die Synthese von Crotylalkohol ausbalanciert werden, was zu gesteigerter Produktivität führen könnte. Hierfür müssten jedoch zunächst Methoden entwickelt werden, um alle Intermediate quantifizieren zu können, was sich aufgrund der Instabilität einiger Verbindungen herausfordernd gestalten könnte. Ferner könnte die nicht erfolgreiche Synthese von Crotylalkohol auf den Abbau des Produkts durch den verwendeten Stamm KT2440 zurückzuführen sein. Sollten geringe Mengen Crotylalkohol gebildet, aber vom Stamm abgebaut werden, könnte dies ebenfalls in keiner detektierbaren Produktion resultieren. Der Abbau durch EM42 konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Auch die anderen untersuchten *P. putida* Stämme GN346 und EP1 bauen Crotylalkohol über Zeit ab. Interessanterweise wurde GN346 erstellt, um den in KT2440 beobachteten Abbau von *n*-Butanol durch die Deletion insbesondere zweier Alkoholdehydrogenasen pedE und pedH zu reduzieren



(Simon *et al.*, 2015). Obwohl strukturell sehr ähnlich, wird der Abbau von Crotylalkohol durch diesen Stamm jedoch nur bedingt verbessert. Mit EP1, einem Derivat von GN346, zur Verfügung gestellt vom Kooperationspartner Robert Nitschel (Gruppe von Prof. Ralf Takors, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, Deutschland), in dem zusätzlich das die *branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex subunit alpha* (BkdAA) codierende Gen deletiert wurde, konnte eine deutlich gesteigerte Wiederfindungsrate für Crotylalkohol festgestellt werden. Der Einfluss von bkdAA auf den Abbau von Crotylalkohol ist aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Datenlänge jedoch nicht erklärbar. Da aber auch unter Verwendung von EP1 ein deutlicher Abbau von Crotylalkohol zu erkennen war, sollten durch eine CRISPRi-Bibliothek alle 19 identifizierten Alkoholdehydrogenasen (ADHs) herunterreguliert werden, da angenommen wurde, dass der erste Schritt im Abbau von Crotylalkohol von einer ADH katalysiert wird. Als genetischer Hintergrund für diese Versuche wurde EP1 gewählt und die von den Kooperationspartnern Christos Batianis und Lyon Bruinsma (Gruppe von Prof. Vitor Martins dos Santos, *Systems and Synthetic Biology*, Universität Wageningen, Niederlande) zur Verfügung gestellten Plasmide coexprimiert. Es zeigte sich ein deutlicher Einfluss mehrerer ADHs auf die Wiederfindungsrate von Crotylalkohol nach 2 h, wobei besonders die ADHs 8 bis 15 deutlich verringerten Abbau zeigten. Der Effekt der Herunterregulierung von ADH 8 überraschte jedoch, da diese der in EP1 deletierten *pedH* entspricht. Die Herunterregulierung von *pedE* (ADH 7) hingegen verhielt sich ähnlich dem parental Stamm EP1. Da naturgemäß kein Einfluss in der Herunterregulierung eines bereits deletierten Gens erwartet wurde, wurde der genetische Hintergrund des Stamms EP1 in Bezug auf das Vorhandensein der Gene *pedE* und *pedH* untersucht. Bezogen auf *pedE* ergab sich eine eindeutige durch Sequenzierung nachgewiesene Deletion des Gens. Für *pedH* hingegen konnte die Deletion nicht bestätigt werden. Unter Verwendung der abgeleiteten Oligonukleotide von KT2440 gDNA konnte ein Fragment der erwarteten Größe amplifiziert werden, von aus GN346 sowie EP1 isolierter gDNA jedoch kein klares Amplifikat erreicht werden. Dies spricht für eine eventuelle Rekombination auf dem Genom von GN346 und somit vermutlich auch EP1, die im Zuge der Stammentwicklung aufgetreten sein könnte, bevor EP1 durch die weitere Deletion in GN346 erstellt wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Oligonukleotide gewählt, die ca. 1,5 kb in 5'- bzw. 3'-Richtung zum Start- bzw. Stopcodon des entsprechenden Gens binden, um Aufschluss über eine erfolgreiche Deletion zu erhalten. Weitere Analysen, etwa durch Amplifizierung mit entsprechenden Oligonukleotiden, die

komplementär zu verschiedenen Bereichen innerhalb des Gens sind, könnten eventuell aufgetretene Rekombinationsereignisse aufklären.

### 5.3.1 1,3-Butadiensynthese

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass LinD Crotylalkohol zu 1,3-Butadien umsetzen kann, hier aber höhere Konzentrationen zu deutlich verbesserten Produktbildungen führen. Da eine Expression von LinD in *P. putida* möglich ist (Daten nicht gezeigt), die Aktivität von in *E. coli* exprimiertem Enzym jedoch deutlich höher ausfällt, scheint die Möglichkeit, die gesamte Kaskade von Acetyl-CoA über Crotylalkohol zu 1,3-Butadien in *P. putida* zu exprimieren, nicht ideal. Für LinD-katalysierte Umsetzungen von Crotylalkohol sind bislang verhältnismäßig hohe Konzentrationen von etwa 20 - 40 mM notwendig. Selbst wenn es durch weitere Mutagenese gelingt, die katalytische Effizienz von LinD in Bezug auf Crotylalkohol zu steigern, wird aufgrund der in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse nicht unbedingt davon ausgegangen, entsprechende Konzentrationen an Crotylalkohol in der Zelle erzeugen zu können. Ferner konnte vom Kooperationspartner Christos Batianis beobachtet werden, dass derart hohe Crotylalkoholkonzentrationen für *P. putida* cytotoxisch wirken (Daten nicht gezeigt), was die Möglichkeit einer fermentativen Synthese stark einschränkt. In LinD-katalysierten Umsetzungen von Crotylalkohol konnte das etablierte *E. coli* ganzzellbasierte Zweiphasensystem verwendet werden, das das entstandene 1,3-Butadien in der organischen Phase auffängt und anreichert. Ein solcher Ansatz ist wegen des strikt aeroben Wachstums von *P. putida* fermentativ jedoch nicht möglich. 1,3-Butadien würde in höherer Konzentration vermutlich aus dem wässrigen Fermentationsansatz ausgasen und durch aufwändige Verfahren aufgefangen werden müssen. Aus diesen Gründen sollte in weiterführenden Arbeiten die Möglichkeit eines räumlich und zeitlich getrennten Zweiorganismensystems untersucht werden. Durch Fermentation der beschriebenen und eventuell verbesserten Kaskade sollte Crotylalkohol fermentativ in *P. putida* synthetisiert werden. Der crotylalkoholhaltige Überstand könnte nach Abtrennen der Zellen in einen Bioreaktor überführt werden und *E. coli* Ganzzellen, in denen LinD überexprimiert wurde, zugefügt werden. Da für die folgende Biokatalyse kein Sauerstoff notwendig ist, könnte der Ansatz mit organischem Lösungsmittel überschichtet werden und der Prozess so im beschriebenen System gefahren werden. Auf diese Weise könnte eine Anreicherung von 1,3-Butadien in der organischen Phase erreicht werden.

## 5.4 Ausblick

Wie bereits beschrieben, konnte die periplasmatische Lokalisierung von OmpA-LinD (OL) bisher nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Unter Verwendung des Fusionsproteins OmpA-LinD-mRFP1 (OLm) könnte dies jedoch durch Fluoreszenzmikroskopie im Vergleich zu periplasmatisch durch OmpA-tag sowie cytoplasmatisch exprimiertem mRFP1 untersucht werden. Ferner sollte durch weitere Mutagenese der aktiven Tasche Versuche unternommen werden, die Isomerisierungs- von der Dehydratisierungsreaktion zu trennen, worin neue potentielle Einsatzgebiete des Enzyms erschlossen werden würden. Ferner könnte das in dieser Arbeit etablierte Biotransformations- und Analytiksystem, das beschriebene ganzzellbasierte Zweiphasensystem, genutzt werden, um eine größere Anzahl an Varianten zu untersuchen. Dies ermöglichte etwa die iterative Sättigung aller Reste in der aktiven Tasche, die in der Trennung der Teilreaktionen sowie in der Akzeptanz weiterer Substrate resultieren sollte. Besonders durch die Erweiterung des Substratspektrums von LinD in Verbindung mit einer evolvierten Monofunktionalität könnte die außergewöhnliche Chemie des Enzyms verwendet werden, um Verbindungen von industrieller Relevanz zu produzieren. Auf ähnliche Weise sollte ebenso die beschriebene  $\alpha$ -Helix iterativ gesättigt werden, um synergistische Effekte, die bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kombination der positiven Varianten verborgen blieben, aufzuklären. Hierdurch sollte eine weitere Steigerung der Aktivität von LinD gegenüber Prenol sowie Crotylalkohol erreicht werden. Durch bioinformatische Methoden, etwa MD-Simulationen, sollten zudem weitere Bereiche oder Domänen des Enzyms identifiziert werden, die einem Mutageneseansatz zum Ziel gewählt werden könnten. Das beschriebene ganzzellbasierte Zweiphasensystem würde zudem den Einsatz einer vollständig zufälligen Mutagenese von LinD erlauben, etwa im Zuge eines *error prone*-PCR-Ansatzes. Auf diese Weise könnten ebenso neue Domänen identifiziert werden, die im Zuge einer semi-rationalen Mutagenese weiterführend untersucht werden könnten.

Da die CRISPRi-induzierte Herunterregulierung einzelner ADHs in *P. putida* ergab, dass diese Enzyme einen entscheidenden Einfluss auf den Abbau von Crotylalkohol haben, sollte in folgenden Experimenten die Expression mehrerer ADHs auf einmal herunterzuregulieren. Auf diese Weise könnte die Abbaurate von Crotylalkohol weiter reduziert werden. Ferner sollte ein System etabliert werden, um die Herunterregulierung der Gene induzierbar zu gestalten, sodass auch bei der zeitgleichen Herunterregulierung

mehrerer ADHs kein Einfluss auf das Wachstum der Zellen zu erwarten wäre. Diese Studie könnten zudem genauere Einsicht in die Rolle der ADHs erbringen, die letztlich in *knock-out* Stämmen resultieren könnten, die sich eignen, um Crotylalkohol in hinreichenden Titern für die Umsetzung durch LinD bereitstellen zu können. Ebenso könnte auf diese Weise der Abbau von weiteren Alkoholen, etwa Terpenoiden, verringert werden, was *P. putida* zudem als Produktionsstamm für eine Reihe weiterer Verbindungen interessant machen könnte.

## 5.5 Potentielle Anwendungsgebiete für LinD

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass LinD sich für den Umsatz von Prenol zu Isopren eignet. Durch in künftigen Arbeiten gesteigerte Aktivität des Enzyms in Kombination mit verbesserter Stabilität könnte der Einsatz von LinD als Teil einer enzymatischen Kaskade genutzt werden, um etwa durch Verwendung des MEP- oder MAV-Wegs Isopren in fermentativen Verfahren zu produzieren. Industriell von Interesse ist zudem die Selektivität von LinD gegenüber dem natürlichen Substrat *S*-Linalool (Coriandrol), einem gesuchten Stoff für Aromaindustrie, der kommerziell kaum verfügbar ist. In künftigen Studien sollten daher Versuche unternommen werden, LinD dergestalt zu mutieren, dass die Isomerisierungs- von der Dehydratisierungsmaschinerie getrennt wird. Dies könnte es ermöglichen, Coriandrol entweder durch Isomerisierung von Geraniol oder durch Hydratisierung von Myrcen zu produzieren. Auch für weitere Anwendungen im Bereich der Aromastoffe könnte LinD interessant sein. Durch die einzigartige Chemie des Enzyms könnten gut verfügbare und somit günstige Terpene zu schlecht verfügbaren oder neuen Aromastoffen umgewandelt werden. Insbesondere die Fähigkeit, Umsetzungen von oder zu tertiären Alkoholen zu katalysieren, unterstreicht dieses Potential, da entsprechende Reaktionen chemisch schwer zugänglich sind. Da LinD über ein breites Substratspektrum verfügt, solange das Substrat über die terminale Methylvinylalkoholgruppe oder ähnliche Derivate hiervon verfügt, sollten weitere potentiell interessante Verbindungen auf etwaige LinD-katalysierte Umsetzungen untersucht werden. Ferner sollte durch weitere Mutagenese das Enzym auf eine gesteigerte Aktivität gegenüber Crotylalkohol für die Produktion von 1,3-Butadien angepasst werden, um die Produktion künftig von fossilen Rohstoffen entkoppeln zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akiyama, T. (2007). Stronger Brønsted Acids. *Chemical Reviews*, 107, 5744–5758.
- Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26, 89–105.
- Baird, G. S., Zacharias, D. A., & Tsien, R. Y. (1999). Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 11241–11246.
- Bearne, S. L., & Wolfenden, R. (1995). Enzymatic Hydration of an Olefin: The Burden Borne by Fumarase. *Journal of the American Chemical Society*, 117, 9588–9589.
- Behr, A., Agar, D. W., & Jörissen, J. (2010). *Einführung In Die Technische Chemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Bengel, L. (2018). *Studien zur Expression der Linalool Dehydratase Isomerase (LinD) in Escherichia coli*. Masterarbeit, Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart.
- Bonde, M. T., Pedersen, M., Klausen, M. S., Jensen, S. I., Wulff, T., Harrison, S., Nielsen, Alex T., Herrgård Markus J., & Sommer, M. O. A. (2016). Predictable tuning of protein expression in bacteria. *Nature Methods*, 13(3), 233–240.
- Brodkorb, D., Gottschall, M., Marmulla, R., Lüddecke, F., & Harder, J. (2010). Linalool Dehydratase-Isomerase, a Bifunctional Enzyme in the Anaerobic Degradation of Monoterpenes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(40), 30436–30442.
- Brown, H. C. (1961). Hydroboration-a powerful synthetic tool. *Tetrahedron*, 12, 117–138.
- Brown, H. C., & Geoghegan, P. J. (1967). The Oxymercuration-Demercuration of Representative Olefins. A Convenient, Mild Procedure for the Markovnikov Hydration of the Carbon-Carbon Double Bond. *Journal of the American Chemical Society*, 89(6), 1522–1524.
- Brown, H. C., & Gupta, S. K. (1972). Catecholborane (1,3,2-Benzodioxaborole) as a New, General Monohydroboration Reagent for Alkynes. A Convenient Synthesis of Alkenboronic Esters and Acids from Alkynes via Hydroboration. *Journal of the American Chemical Society*, 94(12), 4370–4371.
- Buchner, E. (1897). Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 30(1), 117–124.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., & Tsien, R. Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 7877–7882.

- Chauvel, A., & Lefebvre, G. (1989). The Treatment of Olefinic C4 and C5 Cuts. In *Petrochemical Processes*. Paris: Editions OPHRYS.
- Chen, J. C., Viollier, P. H., & Shapiro, L. (2005). A membrane metalloprotease participates in the sequential degradation of a *Caulobacter* polarity determinant. *Molecular Microbiology*, 55(4), 1085–1103.
- Dahiyat, B. I., Gordon, D. B., & Mayo, S. L. (1997). Automated design of the surface positions of protein helices. *Protein Science*, 6, 1333–1337.
- Debye, P. (1912). Interferenz von Röntgenstrahlen und Wärmebewegung. *Annalen Der Physik*, 34(4), 49–92.
- Demming, R. M., Otte, K. B., Nestl, B. M., & Hauer, B. (2017). Optimized Reaction Conditions Enable the Hydration of Non-natural Substrates by the Oleate Hydratase from *Elizabethkingia meningoseptica*. *Chemical Catalysis Catalytical Chemisrty*, 9, 758–766.
- Demming, R. M., Fischer, M.-P., Schmid, J., & Hauer, B. (2018). (De)hydratases - recent developments and future perspectives. *Current Opinion in Chemical Biology*, 43, 43–50.
- Duellman, T., Burnett, J., & Yang, J. (2015). Quantitation of secreted proteins using mCherry fusion constructs and a fluorescent microplate reader. *Analytical Biochemistry*, 473, 34–40.
- Dulla, G., & Lindow, S. E. (2008). Quorum size of *Pseudomonas syringae* is small and dictated by water availability on the leaf surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 3082–3087.
- Fischer, E. (1894). Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 27(3), 2985–2993.
- Franklin, F. C., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M. M., & Timmis, K. N. (1981). Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12), 7458–7462.
- Fujiwara, T., Saburi, W., Inoue, S., Mori, H., Matsui, H., Tanaka, I., & Yao, M. (2013). Crystal structure of *Ruminococcus albus* cellobiose 2-epimerase: Structural insights into epimerization of unmodified sugar. *FEBS Letters*, 587, 840–846.
- Garneau, J. E., Dupuis, M.-È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, X., Horcath, P., Magadán, A. H., & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468, 67–71.
- Geinitz, C. (2015). *Studien zur Substratspezifität der Linalool Dehydratase-Isomerase mit dem Fokus auf der Dehydratisierung von tertiären Alkoholen*. Dissertation, Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart.

- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A. I., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345.
- Glick, B. R. (1995). Metabolic Load and Heterologous Gene Expression. *Biotechnology Advances*, 13(2), 247–261.
- Gold, L. (1988). Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 199–233.
- Greve, H.-H. (2012). Rubber, 2. Natural. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (31st ed., pp. 583–596). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & KGaA.
- Guenther, A., Karl, T., Harley, P., Wiedinmyer, C., Palmer, P. I., & Geron, C. (2006). Estimates of global terrestrial isoprene emissions using MEGAN (Model of Emissions of Gases and Aerosols from Nature). *Atmospheric Chemistry and Physics*, 6, 3181–3210.
- Hammer, S. C., Dominicus, J. M., Syrén, P. O., Nestl, B. M., & Hauer, B. (2012). Stereoselective Friedel-Crafts alkylation catalyzed by squalene hopene cyclases. *Tetrahedron*, 68, 7624–7629.
- Hammer, S. C., Marjanovic, A., Dominicus, J. M., Nestl, B. M., & Hauer, B. (2014). Squalene hopene cyclases are protonases for stereoselective Brønsted acid catalysis. *Nature Chemical Biology*, 11(2), 121–126.
- Hirata, T., Shimoda, K., & Kawano, T. (1999). Asymmetric hydrolysis of enol esters with two esterases from *Marchantia polymorpha*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11(5), 1063–1066.
- Hiseni, A., Arends, I. W. C. E., & Otten, L. G. (2011). Biochemical characterization of the carotenoid 1,2-hydratases (CrtC) from *Rubrivivax gelatinosus* and *Thiocapsa roseopersicina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 1029–1036.
- Hopmann, K. H., Guo, J.-D., & Himo, F. (2007). Theoretical Investigation of the First-Shell Mechanism of Nitrile Hydratase. *Inorganic Chemistry*, 46, 4850–4856.
- Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., & Rawn, J. D. (2008). Säure-Base-Katalyse. In *Biochemie* (4., aktual, pp. 228–229). München: Pearson Education Deutschland GmbH.
- Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., & Rawn, J. D. (2008). Die sechs Enzym-Klassen. In *Biochemie* (4., aktual, pp. 178–181). München: Pearson Education Deutschland GmbH.
- Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., & Rawn, J. D. (2008). Biochemie: Eine moderne Wissenschaft. In *Biochemie* (4., aktual, pp. 4–6). München: Pearson Education Deutschland GmbH.

- Huijbers, M. M. E., Montersino, S., Westphal, A. H., Tischler, D., & Van Berkel, W. J. H. (2014). Flavin dependent monooxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *544*, 2–17.
- Huisman, G. W., Liang, J., & Krebber, A. (2010). Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases. *Current Opinion in Chemical Biology*, *14*, 122–129.
- Hummel, W., & Kula, M.-R. (1989). Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *European Journal of Biochemistry*, *184*, 1–13.
- Humphreys, D. P., Sehdev, M., Chapman, A. P., Ganesh, R., Smith, B. J., King, L. M., Glover, D. J., Reeks, D. G., & Stephens, P. E. (2000). High-Level Periplasmic Expression in *Escherichia coli* Using a Eukaryotic Signal Peptide: Importance of Codon Usage at the 5' End of the Coding Sequence, *264*, 252–264.
- Hwang, H. J., Park, J. H., Kim, J. H., Kong, M. K., Kim, J. W., Park, J. W., Cho, K. M., & Lee, P. C. (2014). Engineering of a Butyraldehyde Dehydrogenase of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* to Fit an Engineered 1,4-Butanediol Pathway in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, *111*(7), 1374–1384.
- Isenberg, N., & Grdinic, M. (1969). A Modern Look at Markovnikov's Rule and the Peroxide Effect. *Journal of Chemical Education*, *46*(9), 601–605.
- Itoh, T., Ochiai, A., Mikami, B., Hashimoto, W., & Murata, K. (2006). Structure of unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase complexed with substrate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *347*, 1021–1029.
- Jensen, V. J., & Rugh, S. (1987). Industrial-scale production and application of immobilized glucose isomerase. *Methods in Enzymology*, *136*, 356–370.
- Jin, J., & Hanefeld, U. (2011). The selective addition of water to C=C bonds; enzymes are the best chemists. *Chemical Communications*, *47*, 2502–2510.
- Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews*, *50*(4), 484–524.
- Kastaniotis, A. J., Autio, K. J., Sormunen, R. T., & Hiltunen, J. K. (2004). Htd2p/Yhr067p is a yeast 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase essential for mitochondrial function and morphology. *Molecular Microbiology*, *53*(5), 1407–1421.
- Ke, N., Landgraf, D., Paulsson, J., & Berkmen, M. (2016). Visualization of Periplasmic and Cytoplasmic Proteins with a Self-Labeling Protein Tag. *Journal of Bacteriology*, *198*(7), 1035–1043.
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H., & Phillips, D. C. (1958). A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*, *181*, 662–666.



- Kesselmeier, J., & Staudt, M. (1999). Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology. *Journal of Atmospheric Chemistry*, *33*, 23–88.
- Kille, S., Acevedo-Rocha, C. G., Parra, L. P., Zhang, Z. G., Opperman, D. J., Reetz, M. T., & Acevedo, J. P. (2013). Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. *ACS Synthetic Biology*, *2*, 83–92.
- Kirchner, G., Scollar, M. P., & Klibanov, A. M. (1985). Resolution of Racemic Mixtures via Lipase Catalysis in Organic Solvents. *Journal of the American Chemical Society*, *107*, 7072–7076.
- Kula, M. (1980). Enzyme in der Technik. *Chemie in Unserer Zeit*, *14*(2), 61–70.
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D., & Zakour, R. A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods in Enzymology*, *154*, 367–382.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative Butanol Production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, *101*(2), 209–228.
- Lewenza, S., Vidal-Ingigliardi, D., & Pugsley, A. P. (2006). Direct Visualization of Red Fluorescent Lipoproteins Indicates Conservation of the Membrane Sorting Rules in the Family *Enterobacteriaceae*. *Journal of Bacteriology*, *188*(10), 3516–3524.
- Li, J., Smeland, T. E., & Schulz, H. (1990). D-3-Hydroxyacyl Coenzyme A Dehydratase from Rat Liver Peroxisomes. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(23), 13629–13634.
- Li, Q., Fan, F., Gao, X., Yang, C., Bi, C., Tang, J., Liu, T., & Zhang, X. (2017). Balanced activation of IspG and IspH to eliminate MEP intermediate accumulation and improve isoprenoids production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, *44*, 13–21.
- Lichtenstein, B. R., & Höcker, B. (2018). Engineering an AB<sub>5</sub> Protein Carrier. *Scientific Reports*, *8*, 1–11.
- Lifson, S., & Warshel, A. (1968). Consistent Force Field for Calculations of Conformations, Vibrational Spectra, and Enthalpies of Cycloalkane and *n*-Alkane Molecules. *The Journal of Chemical Physics*, *49*, 5116–5129.
- Lindskog, S. (1997). Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharmacology and Therapeutics*, *74*(1), 1–20.
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, *56*, 658–666.

- Ling, B., Wang, X., Su, H., Liu, R., & Liu, Y. (2018). Protonation state and fine structure of the active site determine the reactivity of dehydratase: Hydration and isomerization of  $\beta$ -myrcene catalyzed by linalool dehydratase/isomerase from *Castellaniella defragrans*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20, 17342–17352.
- Long, S. B., Casey, P. J., & Beese, L. S. (1998). Cocystal structure of protein farnesyltransferase complexed with a farnesyl diphosphate substrate. *Biochemistry*, 37(27), 9612–9618.
- Lu, J., Tang, J., Liu, Y., Zhu, X., Zhang, T., & Zhang, X. (2012). Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 2455–2462.
- Makrides, S. C. (1996). Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 60(3), 512–538.
- Maria-Solano, M. A., Serrano-Hervás, E., Romero-Rivera, A., Iglesias-Fernández, J., & Osuna, S. (2018). Role of conformational dynamics in the evolution of novel enzyme function. *Chemical Communications*, 54, 6622–6634.
- Marlière, P. (2013). Method for the enzymatic production of butadiene. WO 2013/057194 A1
- Marmulla, R., Šafarić, B., Markert, S., Schweder, T., & Harder, J. (2016). Linalool isomerase, a membrane-anchored enzyme in the anaerobic monoterpene degradation in *Thaueria linaloolentis* 47Lol. *BMC Biochemistry*, 17(6), 1–11.
- Martínez-García, E., Nikel, P. I., Aparicio, T., & de Lorenzo, V. (2014). *Pseudomonas* 2.0: genetic upgrading of *P. putida* KT2440 as an enhanced host for heterologous gene expression. *Microbial Cell Factories*, 13, 1–15.
- Matoishi, K., Ueda, M., Miyamoto, K., & Ohta, H. (2004). Mechanism of asymmetric decarboxylation of  $\alpha$ -aryl- $\alpha$ -methylmalonate catalyzed by arylmalonate decarboxylase originated from *Alcaligenes bronchisepticus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27, 161–168.
- Matsubara, K., Köhling, R., Schönenberger, B., Kouril, T., Esser, D., Bräsen, C., Siebers, B., & Wohlgemuth, R. (2014). One-step synthesis of 2-keto-3-deoxy-D-gluconate by biocatalytic dehydration of D-gluconate. *Journal of Biotechnology*, 191, 69–77.
- McGenity, T. J., Crombie, A. T., & Murrell, J. C. (2018). Microbial cycling of isoprene, the most abundantly produced biological volatile organic compound on Earth. *The ISME Journal*, 12, 931–941.
- Michaelis L., & Menten M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333–369.
- Miyamoto, K., & Ohta, H. (1992). Purification and properties of a novel arylmalonate decarboxylase from *Alcaligenes bronchisepticus* KU-1201. *European Journal of Biochemistry*, 210(2), 475–481.

- Miyamoto, K., Hirokawa, S., & Ohta, H. (2007). Conversion of  $\alpha$ -methyltropate to optically active  $\alpha$ -phenylpropionate by tropate-degrading *Rhodococcus* sp. KU1314. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 46, 14–19.
- Mohr, J. T., Hong, A. Y., & Stoltz, B. M. (2009). Enantioselective protonation. *Nature Chemistry*, 1, 359–369.
- Mojica, F. J. M., Diez-Villasenor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60, 174–182.
- Möller, D. (2003). *Luft: Chemie, Physik, Biologie, Reinhaltung, Recht*. Berlin: Walter de Gruyter.
- Morrow, N. L. (1990). The Industrial Production and Use of 1,3-Butadiene. *Environmental Health Perspectives*, 86, 7–8.
- Mulis Kary B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262, 56–65.
- Nestl, B. M., Geinitz, C., Popa, S., Rizek, S., Haselbeck, R. J., Stephen, R., Noble, M. A., Fischer, M.-P., Ralph, E. C., Hau, H. T., Man, H., Omar, M., Turkenburg, J. P., van Dien, S., Culler, S. J., Grogan, G., & Hauer, B. (2017). Structural and functional insights into asymmetric enzymatic dehydration of alkenols. *Nature Chemical Biology*, 13, 275–281.
- Neufeld, R. J., Peleg, Y., Rokem, J. S., Pines, O., & Goldberg, I. (1991). L-Malic acid formation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* amplified for fumerase. *Enzyme and Microbial Technology*, 13, 991–996.
- Olsson, L., & Hahn-Hägerdal, B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 312–331.
- Pearlman, P. S., Chen, C., Botes, A. L., & Van Eck Conradie, A. (2013). Methods for biosynthesizing 1,3 Butadien. US 2013/0189753 A1.
- Perutz, M. F. (1956). Isomorphous Replacement and Phase Determination in Non-centrosymmetric Space Groups. *Acta Crystallographica*, 9, 867–873.
- Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G., & North, A. C. T. (1960). Structure of haemoglobin. *Nature*, 185, 416–422.
- Polgár, L. (2005). The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2161–2172.
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Resource Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *CELL*, 152, 1173–1183.

- Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2001). Recent advances in ABE fermentation: hyperbutanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27, 287–291.
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). Biochimie The CRISPR-Cas immune system : Biology , mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119–128.
- Resch, V., & Hanefeld, U. (2015). The selective addition of water. *Catalysis Science & Technology*, 5, 1385–1399.
- Richard, J. P. (1998). The Enhancement of Enzymatic Rate Accelerations by Brønsted Acid-Base Catalysis. *Biochemistry*, 37, 4305–4309.
- Rueping, M., Nachtsheim, B. J., Jeawsuwan, W., & Atodiresei, I. (2011). Modulating the acidity: Highly acidic Brønsted acids in asymmetric catalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(30), 6707–6720.
- Ruzicka, L. (1953). The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds. *Experientia*, 9(10), 357–367.
- Sakai, T., Matsuda, A., Tanaka, Y., Korenaga, T., & Ema, T. (2004). The effect of temperature on the lipase-catalyzed asymmetric protonation of 1-acetoxy-2-methylcyclohexene giving (*R*)-2-methylcyclohexanone. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15(12), 1929–1932.
- Sato, H., Hummel, W., & Gröger, H. (2015). Cooperative Catalysis of Noncompatible Catalysts through Compartmentalization: Wacker Oxidation and Enzymatic Reduction in a One-Pot Process in Aqueous Media. *Angewandte Chemie International Edition*, 54, 4488–4492.
- Schein, C. H., & Noteborn, M. H. M. (1988). Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia coli* is Favored by Lower Growth Temperature. *Nature Biotechnology*, 6, 291–294.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., & Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409, 258–268.
- Schreiner Garcez Lopes, M., Slovic, A. M., Gouvea, I. E., Rincones Perez, J., & Pedersen Parizzi, L. (2018). Modified Microorganisms and methods of making butadiene using same. US 2018/0346936 A1.
- Seeger, J. (2018). *Kinetische Studien zur LinD katalysierten Umsetzung kurzkettiger Alkenole*. Bachelorarbeit, Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart.
- Sharkey, T. D., Wiberley, A. E., & Donohue, A. R. (2008). Isoprene Emission from Plants: Why and How. *Annals of Botany*, 101, 5–18.

- Shin, J.-S., & Kim, B.-G. (2002). Substrate Inhibition Mode of  $\omega$ -Transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 Is Dependent on the Chirality of Substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(7), 832–837.
- Shine, J., & Dalgarno, L. (1974). a. Identical 3'-Terminal Octanucleotide Sequence in 18S Ribosomal Ribonucleic Acid from Different Eukaryotes. *Biochemical Journal*, 141, 609–615.
- Shine, J., & Dalgarno, L. (1974). b. The 3'-Terminal Sequence of *Escherichia coli* 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(4), 1342–1346.
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., de las Heras, A., Páez-Espino, A. D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nickel, P. I., Platero, R., & de Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, 41, 666–675.
- Silver, G. M., & Fall, R. (1991). Enzymatic Synthesis of Isoprene from Dimethylallyl Diphosphate in Aspen Leaf Extracts. *Plant Physiology*, 97, 1588–1591.
- Simon, O., Klebensberger, J., Mükschel, B., Klaiber, I., Graf, N., Altenbuchner, J., Huber, A., Hauer, B., & Pfannstiel, J. (2015). Analysis of the molecular response of *Pseudomonas putida* KT2440 to the next-generation biofuel n-butanol. *Journal of Proteomics*, 122, 11–25.
- Sockolosky, J. T., & Szoka, F. C. (2013). Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. *Protein Expression and Purification*, 87, 129–135.
- Steitz, J. A., & Jakes, K. (1975). How ribosomes select initiator regions in mRNA: Base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 72(12), 4734–4738.
- Terada, M. (2008). Binaphthol-derived phosphoric acid as a versatile catalyst for enantioselective carbon-carbon bond forming reactions. *Chemical Communications*, (35), 4097–4112.
- Thompson, M. L., Marriott, R., Dowle, A., & Grogan, G. (2010). Biotransformation of  $\beta$ -myrcene to geraniol by a strain of *Rhodococcus erythropolis* isolated by selective enrichment from hop plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 721–730.
- Todea, A., Hiseni, A., Otten, L. G., Arends, I. W. C. E., Peter, F., & Boeriu, C. G. (2015). Increase of stability of oleate hydratase by appropriate immobilization technique and conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 119, 40–47.
- Toews, M. W., Warmbold, J., Konzack, S., Rischitor, P., Veith, D., Vienken, K., Vinuesa, C., Wei, H., & Fischer, R. (2004). Establishment of mRPF1 as a fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput

- protein tagging using recombination in vitro (GATEWAY). *Current Genetics*, 45, 383–389.
- Tse, C. K. W., Penciu, A., McInenly, P. J., Kumar, K. R., Drewitt, M. J., & Baird, M. C. (2004). Isobutene homo- and isobutene-isoprene copolymerization initiated by protic initiators associated with a series of novel, weakly coordinating counteranions. *European Polymer Journal*, 40, 2653–2657.
- Tullo, A. H. (2019). The chemical industry is bracing for a nylon 6,6 shortage. *Chemical & Engineering News*, 96(40).
- Ulmer, K. M. (1983). Protein Engineering. *Science*, 219, 666–671.
- Waller, I. (1923). Zur Frage der Einwirkung von Wärmebewegung auf die Interferenz von Röntgenstrahlen. *Zeitschrift Für Physik*, 17(1), 398–408.
- Warshel, A., & Levitt, M. (1976). Theoretical Studies of Enzymic Reactions: Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of the Carbonium Ion in the Reaction of Lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 103, 328–329.
- Warshel, A., & Lifson, S. (1970). Consistent Force Field Calculations. II. Crystal Structures, Sublimation Energies, Molecular and Lattice Vibrations, Molecular Conformations, and Enthalpies of Alkanes. *The Journal of Chemical Physics*, 53(2), 582–594.
- Weidenweber, S., Marmulla, R., Ermler, U., & Harder, J. (2016). X-ray structure of linalool dehydratase/isomerase from *Castellaniella defragrans* reveals enzymatic alkene synthesis. *FEBS Letters*, 590, 1375–1383.
- Wendt, K. U., Poralla, K., & Schulz, G. E. (1997). Structure and Function of a Squalene Cyclase. *Science*, 277, 1811–1815.
- White, W. C. (2007). Butadiene production process overview. *Chemico-Biological Interactions*, 166, 10–14.
- Xue, D., Abdallah, I. I., de Haan, I. E. M. De, Sibbald, M. J. J. B., & Quax, W. J. (2015). Enhanced C<sub>30</sub> carotenoid production in *Bacillus subtilis* by systematic overexpression of MEP pathway genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 99, 5907–5915.
- Yamada, H., & Kobayashi, M. (1996). Nitrile Hydratase and Its Application to Industrial Production of Acrylamide. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(9), 1391–1400.
- Yamamoto, K., Tosa, T., Yamashita, K., & Chibata, I. (1976). Continuous production of L-malic acid by immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells. *European Journal of Applied Microbiology*, 3, 169–183.
- Ying, X., Wang, Y., Xiong, B., Wu, T., Xie, L., Yu, M., & Wang, Z. (2014). Characterization of an Allylic/Benzyl Alcohol Dehydrogenase from *Yokenella* sp.

- Strain WZY002, an Organism Potentially Useful for the Synthesis of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Alcohols from Allylic Aldehydes and Ketones. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2399–2409.
- Yoshimura, Y., Kijima, N., Hayakawa, T., Murata, K., Suzuki, K., Mizukami, F., Matano, K., Konishi T., Oikawa T., Saito M., Shiozawa K., Wakui, K., Sawada G., Sato, K., Matsuo, S., & Yamaoka, N. (2000). Catalytic cracking of naphtha to light olefins. *Catalysis Surveys From Japan*, 4(2), 157–167.
- Yuan, Z., Zhao, J., & Wang, Z.-X. (2003). Flexibility analysis of enzyme active sites by crystallographic temperature factors. *Protein Engineering*, 16(2), 109–114.
- Zheng, Y., Liu, Q., Li, L., Qin, W., Yang, J., Zhang, H., Jiang, X., Cheng, T., Liu, W., Xu, X., & Xian, M. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-specificity production of isoprenol and prenol as next generation of biofuels. *Biotechnology for Biofuels*, 6(57), 1–13.

## 7 Anhang

### 7.1 Oligonukleotide

**Tabelle 23: Verwendete Oligonukleotide.** Angegeben ist die in dieser Arbeit verwendete Nummerierung, der Name des jeweiligen Oligonukleotids, die Sequenz in 5'-3'-Richtung sowie die Schmelztemperatur  $T_m$ .

#	Name	Sequenz (5' -> 3')	$T_m$ (°C)
1	mfi_LDI_for_BamHI_c	GTACGGGATCCCATGCGTTTTACCCTGAAA	72
2	mfi_LDI_rev_SalI_c	CGACGGTCGACTTAAAGCTTTTTACCTGCCAG	74
3	mfiLDInoPSPfor_BamHI	GTACGGGATCCCATGGAAGTGCCTCCGGGTGCTCTGG	71
4	mfiLDIrevnoSTOP_SalI	CGACGGTCGACAAGCTTTTTACCTGCCAG	54
5	mfiGA22b-pelB-LDIff	CTGCCAGCCGGCGATGGCCATGGAAGTGCCTCCGG	78
6	mfiGA22b-pelB-LDIfr	TGGTGGTGGTGCAGTGCAGCTTTTTACCTGCCAG TTTTGCT	73
7	mfiGA22b-pelB-LDIvf	CGACCCGGAGGCAGTTCCATGGCCATCGCCGG	75
8	mfiGA22b-pelB-LDIvr	AACTGGCAGGTAAAAAGCTTGCCTCGAGCACCACCAC C	71
9	mfi_pelB-LDI_EcoRIff	GCTAGCCGAATTCATGAAATACCTGCTGCCGACCCTG C	60
10	mfi_pelB-LDI_Sallr	GCTAGGTCGACTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGC	69
11	mfi_pelB-LDI_fNdeI	GCATCGCATATGAAATACCTGCTGCCGACCCGCTGCT	71
12	mfi_pelB-LDI_rKpnI	CTCACGGTACCCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGC	74
13	mfi_LDI+2_for_BamHI	GCTATCGGATCCCCATGCGTTTTACCTGAAAACCA	58
14	mfi_pDHE_for_KpnI	CTCACGGTACCCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGC	67
15	mfi_pDHE_rev_NdeI	CGGTTAGACATATGTATACTCCTTCTAAGAATTGTT TTTAAGAAGGAGATATACCAATCGCGTTCACATTGAAG ACGACGGC	55
16	mfi_GA28a-LinD_WT ff	TGGTGCCTCGAGTGCGGCCGCTTTCCTGCGAGCTTGGC CGCC	68
17	mfi_GA28a-LinD_WT fr	GTCTTCAATGTGAACCCGATTGGTATATCTCCTTCTTA AAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGA	81
18	mfi_GA28a-LinD_WT vf	CGGCCAAGCTCGCAGGGAAGCGCCGCACTCGAGC	67
19	mfi_GA28a-LinD_WT vr	ATGAAAAAACGGCAATTGCCATCGCAGTGGCTCTGGC AGGATTTGCGACAGTAGCCAGGCTGAAGTCCCTCCGG GTCGTCTGG	78
20	mfi_OmpA-LinD_for	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT TTTTACCTGCCAGTTTTGC	80
21	mfi_LinD-His rev	TTAAAGAGGAGAAAATTAAGTATGAAAAAACGGCAATT GCCATCG	75
22	mfi_pQE-OmpA-LinDff	CTATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGTGGTGGTGGTGGT GTGC	64
23	mfi_pQE-OmpA-LinDfr	ACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACC AGA	71
24	mfi_pQE-OmpA-LinDvf	GCAATTGCCGTTTTTTTCATAGTTAATTTCTCCTCTTT AATGAATTCTGTGTGAAATTG	65
25	mfi_pQE-OmpA-LinDvr	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGAAAAAACGGCAATT GCCATCG	65
26	mfi_pET-OmpA-LinDff	CAGCTTCTTTCGGGCTTTGGTGGTGGTGGTGGTGGT C	74
27	mfi_pET-OmpA-LinDfr	AGCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACC GCAATTGCCGTTTTTTTCATAGTTAATTTCTCCTCTTAA	72
28	mfi_pET-OmpA-LinDvf	AGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGG	65
29	mfi_pET-OmpA-LinDvr	GGTAAAAAGCTTCTTGCCTCGAGGCCAGCAGCGAGGA C	71
30	mfi_pET-OL-mRFP1 ff	CAGCGGTGGCAGCAGCCAACTCAGGCACCGGTGCGAG	76
31	mfi_pET-OL-mRFP1 fr	GTCCTCGACCGGTGCCTGAGTTGGCTGCTGCCAC	74
32	mfi_pET-OL-mRFP1 vf		



33	mfi_pET-OL-mRFP1 vr	GATCACGTCCTCGCTGCTGGCCTCGAGTGAAGAAGCT TTTACC	73
34	mfi_pET-mRFP1 ff	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCCAGCAGCGAGGAC GTG	69
35	mfi_pET-mRFP1 fr	CAGCGGTGGCAGCAGCCAACTCAGGCACCGGTGCGAG	76
36	mfi_pET-mRFP1 vf	GTCACTCGACCGGTGCCTGAGTTGGCTGCTGCCAC CGTCCTCGCTGCTGGCCATGGTATATCTCCTTCTTAAA	74
37	mfi_pET-mRFP1 vr	GTAAACA AAAATTATTTCTAGAGG	69
38	mfi_pET-OmRFP1 ff	CAGGATTTGCGACAGTAGCCGCCAGCAGCGAGGACG	74
39	mfi_pET-OmRFP1 fr	CAGCGTGGCAGCAGCCAACTCAGGCACCGGTGCGAG	76
40	mfi_pET-OmRFP1 vf	GTCACTCGACCGGTGCCTGAGTTGGCTGCTGCCAC GATCACGTCCTCGCTGCTGGCGCTACTGTGCGAAATC	74
41	mfi_pET-OmRFP1 vr	CTGC GCATATATGAACTATATTGCATTATCAGCCCGTTTTA TAGC	75
42	mfi_D39A_LinD for	GCTATAAAAACGGGCTGATAAATGCAATATAGTTCATAT ATGC	61
43	mfi_D39A_LinD rev	GCATATATGAACTATATTTTTTTTTATCAGCCCGTTTTA TAGC	61
44	mfi_D39F_LinD for	GCTATAAAAACGGGCTGATAAAAAAATATAGTTCATAT ATGC	59
45	mfi_D39F_LinD rev	GGCATATATGAACTATATTGATGCAATCAGCCCGTTTT ATAGCCGTG	59
46	mfi_F40A_LinD for	CACGGCTATAAAAACGGGCTGATTGCATCAATATAGTTC ATATATGCC	66
47	mfi_F40A_LinD rev	GAACTATATTGATGATATCAGCCCGTTTTATAGCC	66
48	mfi_F40D_LinD for	GGCTATAAAAACGGGCTGATATCATCAATATAGTTC	60
49	mfi_F40D_LinD rev	GAACTATATTGATGAAATCAGCCCGTTTTATAGCC	60
50	mfi_F40E_LinD for	GGCTATAAAAACGGGCTGATTTTCATCAATATAGTTC	60
51	mfi_F40E_LinD rev	GGCATATATGAACTATATTGATATTATCAGCCCGTTTT ATAGCCGTG	60
52	mfi_F40I_LinD for	CACGGCTATAAAAACGGGCTGATAAATCAATATAGTTC ATATATGCC	64
53	mfi_F40I_LinD rev	GGCATATATGAACTATATTGATCTGATCAGCCCGTTTT ATAGCCGTG	64
54	mfi_F40L_LinD for	CACGGCTATAAAAACGGGCTGATCAGATCAATATAGTTC ATATATGCC	66
55	mfi_F40L_LinD rev	GGCATATATGAACTATATTGATGTTATCAGCCCGTTTT ATAGCCGTG	66
56	mfi_F40V_LinD for	CACGGCTATAAAAACGGGCTGATAACATCAATATAGTTC ATATATGCC	65
57	mfi_F40V_LinD rev	GGCATATATGAACTATATTGATTGATCAGCCCGTTTT ATAGCCGTG	65
58	mfi_F40W_LinD for	CACGGCTATAAAAACGGGCTGATCCAATCAATATAGTTC ATATATGCC	66
59	mfi_F40W_LinD rev	GGCATATATGAACTATATTGATTATATCAGCCCGTTTT ATAGCCGTG	66
60	mfi_F40Y_LinD for	CACGGCTATAAAAACGGGCTGATAAATCAATATAGTTC ATATATGCC	64
61	mfi_F40Y_LinD rev	GAACTATATTGATTTTATCAGCCCGTTTTTTAGCCGTG GCTGTAGCTTTGAAGCATGGG	64
62	mfi_Y45F_LinD for	CCCATGCTTCAAAGCTACAGCCACGGCTAAAAACGGG CTGATAAAATCAATATAGTTC	70
63	mfi_Y45F_LinD rev	GAACTATATTGATTTTATCAGCCCGTTTCTGAGCCGTG GCTGTAGCTTTGAAGCATGGG	70
64	mfi_Y45L_LinD for	CCCATGCTTCAAAGCTACAGCCACGGCTCAGAAACGGG CTGATAAAATCAATATAGTTC	71
65	mfi_Y45L_LinD rev	GATTTTATCAGCCCGTTTAGCAGCCGTGGCTGTAGCTT TGAAGC	71
66	mfi_Y45S_LinD for	GCTTCAAAGCTACAGCCACGGCTGCTAAAACGGGCTGAT AAAAATC	64
67	mfi_Y45S_LinD rev		64

68	mfi_Y66A_LinD for	CCGCAGCGTGTATCAAAGCAAGCATTGCCTTTTATGC C	69
69	mfi_Y66A_LinD rev	GGCATAAAAGGCAATGCTAAATTTGATAACACGCTGCG G	67
70	mfi_Y66F_LinD for	CCGCAGCGTGTATCAAATTTAGCATTGCCTTTTATGC C	67
71	mfi_Y66F_LinD rev	GGCATAAAAGGCAATGCTAAATTTGATAACACGCTGCG G	67
72	mfi_Y66L_LinD for	CCGCAGCGTGTATCAAAGTGCAGTTCGCTTTTATGC C	69
73	mfi_Y66L_LinD rev	GGCATAAAAGGCAATGCTCAGTTTGATAACACGCTGCG G	69
74	mfi_Y66W_LinD for	CCGCAGCGTGTATCAAATGGAGCATTGCCTTTTATGC C	69
75	mfi_Y66W_LinD rev	GGCATAAAAGGCAATGCTCCATTTGATAACACGCTGCG G	69
76	mfi_H129F_LinD for	CATTATGTATAAAGGCTTCTGAATCTGATGTATG	57
77	mfi_H129F_LinD rev	CATACATCAGATTTCAGAAAGCCTTTATACATAATG	57
78	mfi_H129L_LinD for	CATTATGTATAAAGGCTGCTGAATCTGATGTATG	60
79	mfi_H129L_LinD rev	CATACATCAGATTTCAGCAGCCCTTTATACATAATG	60
80	mfi_F177A_LinD for	GTGAACCGGATAAAGTATGCAGTGCAGTGAATAGCGTT GCC	68
81	mfi_F177A_LinD rev	GGCAACGCTATTACACTGCATGCATAGTTATCCGGTT CAC	68
82	mfi_F177L_LinD for	GTGAACCGGATAAAGTATCTGGTGCAGTGAATAGCGTT GCC	68
83	mfi_F177L_LinD rev	GGCAACGCTATTACACTGCACCAGATAGTTATCCGGTT CAC	68
84	mfi_F177W_LinD for	GTGAACCGGATAAAGTATGGGTGCAGTGAATAGCGTT GCC	68
85	mfi_F177W_LinD rev	GGCAACGCTATTACACTGCACCAATAGTTATCCGGTT CAC	68
86	mfi_F177Y_LinD for	GTGAACCGGATAAAGTATGTGCAGTGAATAGCGTT GCC	66
87	mfi_F177Y_LinD rev	GGCAACGCTATTACACTGCACATAATAGTTATCCGGTT CAC	66
88	mfi_Q179A_LinD for	GGATAACTATTTTGTGGCATGTAATAGCGTTGCCT	63
89	mfi_Q179A_LinD rev	AGGCAACGCTATTACATGCCACAAAATAGTTATCC	63
90	mfi_Q179F_LinD for	GGATAACTATTTTGTGTTTTGTAATAGCGTTGCCT	61
91	mfi_Q179F_LinD rev	AGGCAACGCTATTACAAAACACAAAATAGTTATCC	61
92	mfi_Q179L_LinD for	GGATAACTATTTTGTGCTGTGTAATAGCGTTGCCT	63
93	mfi_Q179L_LinD rev	AGGCAACGCTATTACACAGCACAAAATAGTTATCC	63
94	mfi_Y240A_LinD for	CCGTGGATTAGCGCAGCAACCCCGCATGGACCC	73
95	mfi_Y240A_LinD rev	GGGTCCATGCGGTGGTGTCTGCGCTAATCCACGG	73
96	mfi_Y240F_LinD for	CCGTGGATTAGCGCATTTACCACCGCATGGACCC	71
97	mfi_Y240F_LinD rev	GGGTCCATGCGGTGGTAAATGCGCTAATCCACGG	71
98	mfi_Y240L_LinD for	CCGTGGATTAGCGCACTGACCACCGCATGGACCC	73
99	mfi_Y240L_LinD rev	GGGTCCATGCGGTGGTCACTGCGCTAATCCACGG	73
100	mfi_Y240W_LinD for	CCGTGGATTAGCGCATGGACCACCGCATGGACCC	73
101	mfi_Y240W_LinD rev	GGGTCCATGCGGTGGTCCATGCCCTAATCCACGG	73
102	mfi_K103A_LinD for	GCAAAATGAAATGCGCGCGTGTTTGGGGTGATTGGG	71
103	mfi_K103A_LinD rev	CCCAATCACCCTAACACGCGCGCATTTTCAATTTGC	71
104	mfi_R104A_LinD for	GCAAAATGAAATGCAAAAGCGTTTGGGGTGATTGGG	68
105	mfi_R104A_LinD rev	CCCAATCACCCTAACCCGCTTTGCATTTCAATTTGC	68
106	mfi_V105A_LinD for	GCAAAATGAAATGCAAAAGTGCCTGGGGTGATTGGGAA GAAGATGG	71
107	mfi_V105A_LinD rev	CCATCTTCTTCCCAATCACCACCGCAGCTTTGCATTT CATTTTGC	71
108	mfi_W106A_LinD for	GCAAAATGAAATGCAAAAGTGTTCGGGTGATTGGGAA GAAGATGG	70
109	mfi_W106A_LinD rev	CATCTTCTTCCCAATCACCACCGCAGCTTTGCATTT C	70

		ATTTTGC	
110	mfi_G107A_LinD for	GAAATGCAAACGTGTTTGGGCGGATTGGGAAGAAGATG	63
		GTTTTG	
111	mfi_G107A_LinD rev	CAAAACCATCTTCTTCCCAATCCGCCAAACACGTTTG	62
		CATTTT	
112	mfi_D108A_LinD for	GCAAACGTGTTTGGGGTGCCTGGGAAGAAGATGG	70
113	mfi_D108A_LinD rev	CCATCTTCTTCCACGCACCCCAACACGTTTGC	70
114	mfi_W109A_LinD for	CGTGTTTGGGGTGATGCGGAAGAAGATGGTTTTGGC	69
115	mfi_W109A_LinD rev	GCCAAAACCATCTTCTTCCGCATCACCCCAACACG	69
		CGTGTTTGGGGTGATTGGGCGGAAGATGGTTTTGGCAC	
116	mfi_E110A_LinD for	CG	73
		CGGTGCCAAAACCATCTTCCGCCAATCACCCCAACA	
117	mfi_E110A_LinD rev	CG	73
		GTTTGGGGTGATTGGGAAGCGGATGGTTTTGGCACCGA	
118	mfi_E111A_LinD for	TCCG	73
		CGGATCGGTGCCAAAACCATCCGCTTCCCAATCACCCC	
119	mfi_E111A_LinD rev	AAAC	73
		GGGGTGATTGGGAAGAAGCGGGTTTTGGCACCGATCCG	
120	mfi_D112A_LinD for	CGGATCGGTGCCAAAACCCGCTTCTTCCCAATCACCCC	73
121	mfi_D112A_LinD rev	GCAGTTAGCAAAAATGAAATGCNDTCGTGTTGGGGTGA	73
122	mfi_OLm_K103X_22C_f1	TTGGG	60
		GCAGTTAGCAAAAATGAAATGCVHGCCTGTTTGGGGTGA	
123	mfi_OLm_K103X_22C_f2	TTGGG	60
		GCAGTTAGCAAAAATGAAATGCTGGCGTGTGGGGTGA	
124	mfi_OLm_K103X_22C_f3	TTGGG	60
		GCATTTTCATTTTGTCTAACTGCAATATCCAGATCATGAC	
125	mfi_OLm_K103X_22C_r	CTGCCAGTG	60
		GCAGTTAGCAAAAATGAAATGCAAANDTGTGGGGTGA	
126	mfi_OLm_R104X_22C_f1	TTGGGAAG	60
		GCAGTTAGCAAAAATGAAATGCAAHVHGGTTGGGGTGA	
127	mfi_OLm_R104X_22C_f2	TTGGGAAG	60
		GCAGTTAGCAAAAATGAAATGCAAATGGGTTGGGGTGA	
128	mfi_OLm_R104X_22C_f3	TTGGGAAG	60
		TTTGCAATTCATTTTGTCTAACTGCAATATCCAGATCAT	
129	mfi_OLm_R104X_22C_r	GACCTGCCAGTG	60
		GTTAGCAAAAATGAAATGCAAACGTNDTGGGGTGATTG	
130	mfi_OLm_V105X_22C_f1	GGAAGAAGATG	60
		GTTAGCAAAAATGAAATGCAAACGTVHGTGGGGTGATTG	
131	mfi_OLm_V105X_22C_f2	GGAAGAAGATG	60
		GTTAGCAAAAATGAAATGCAAACGTGGTGGGGTGATTG	
132	mfi_OLm_V105X_22C_f3	GGAAGAAGATG	60
		ACGTTTGCATTTTCATTTTGTCTAACTGCAATATCCAGAT	
133	mfi_OLm_V105X_22C_r	CATGACCTGCC	60
		GCAAAAATGAAATGCAAACGTGTNDTGGTGATTGGGAA	
134	mfi_OLm_W106X_22C_f1	GAAGATGG	60
		GCAAAAATGAAATGCAAACGTGTVHGGGTGATTGGGAA	
135	mfi_OLm_W106X_22C_f2	GAAGATGG	60
		GCAAAAATGAAATGCAAACGTGTTGGGGTGATTGGGAA	
136	mfi_OLm_W106X_22C_f3	GAAGATGG	60
		AACACGTTTGCAATTTTCATTTTGTCTAACTGCAATATCCA	
137	mfi_OLm_W106X_22C_r	GATCATGACCTGCC	60
		CAAAATGAAATGCAAACGTGTTTGGNDTGATTGGGAAG	
138	mfi_OLm_G107X_22C_f1	AAGATGGTTTTGGC	60
		CAAAATGAAATGCAAACGTGTTGGVHGGATTGGGAAG	
139	mfi_OLm_G107X_22C_f2	AAGATGGTTTTGGC	60
		CAAAATGAAATGCAAACGTGTTGGTGGGATTGGGAAG	
140	mfi_OLm_G107X_22C_f3	AAGATGGTTTTGGC	60
		CCAACACGTTTGCATTTTCATTTTGTCTAACTGCAATAT	
141	mfi_OLm_G107X_22C_r	CCAGATCATGACCTG	60
		GAAATGCAAACGTGTTGGGGTNDTGGGAAGAAGATG	
142	mfi_OLm_D108X_22C_f1	GTTTTGGC	60

143	mfi_OLm_D108X_22C_f2	GAAATGCAAACGTGTTTGGGGTGHGTGGGAAGAAGATG GTTTTGGC	60
144	mfi_OLm_D108X_22C_f3	GAAATGCAAACGTGTTTGGGGTGTGGTGGGAAGAAGATG GTTTTGGC	60
145	mfi_OLm_D108X_22C_r	ACCCCAAACACGTTTGCATTTTCATTTTGCTAACTGCAA TATCCAGATCATGACC	60
146	mfi_OLm_W109X_22C_f1	GAAATGCAAACGTGTTTGGGGTGATNDTGAAGAAGATG GTTTTGGCACC	60
147	mfi_OLm_W109X_22C_f2	GAAATGCAAACGTGTTTGGGGTGATVHGGGAAGAAGATG GTTTTGGCACC	60
148	mfi_OLm_W109X_22C_f3	GAAATGCAAACGTGTTTGGGGTGATTGGGAAGAAGATG GTTTTGGCACC	60
149	mfi_OLm_W109X_22C_r	ATCACCCCAAACACGTTTGCATTTTCATTTTGCTAACTG CAATATCCAGATCATGACC	60
150	mfi_OLm_E110X_22C_f1	CAAACGTGTTTGGGGTGATTGGNDTGAAGATGGTTTTG GCACCGATCC	60
151	mfi_OLm_E110X_22C_f2	CAAACGTGTTTGGGGTGATTGGVHGGGAAGATGGTTTTG GCACCGATCC	60
152	mfi_OLm_E110X_22C_f3	CAAACGTGTTTGGGGTGATTGGTGGGAAGATGGTTTTG GCACCGATCC	60
153	mfi_OLm_E110X_22C_r	CCAATCACCCCAAACACGTTTGCATTTTCATTTTGCTAA CTGCAATATCCAGATC	60
154	mfi_OLm_E111X_22C_f1	CGTGGTTGGGGTGATTGGGAANDTGATGGTTTTGGCAC CGATCC	60
155	mfi_OLm_E111X_22C_f2	CGTGGTTGGGGTGATTGGGAAVHGGATGGTTTTGGCAC CGATCC	60
156	mfi_OLm_E111X_22C_f3	CGTGGTTGGGGTGATTGGGAATGGGATGGTTTTGGCAC CGATCC	60
157	mfi_OLm_E111X_22C_r	TTCCCAATCACCCCAAACACGTTTGCATTTTCATTTTG TAACTGCAATATCCAG	60
158	mfi_OLm_D112X_22C_f1	GTGTTTGGGGTGATTGGGAAGAAANDTGGTTTTGGCACC GATCCGATTG	60
159	mfi_OLm_D112X_22C_f2	GTGTTTGGGGTGATTGGGAAGAAVHGGGTTTTGGCACC GATCCGATTG	60
160	mfi_OLm_D112X_22C_f3	GTGTTTGGGGTGATTGGGAAGAAATGGGGTTTTGGCACC GATCCGATTG	60
161	mfi_OLm_D112X_22C_r	TTCTTCCCAATCACCCCAAACACGTTTGCATTTTCATTT TGCTAACTGCAATATCC	60
162	mfi_3N_4G LinD f	GTTAGCAAAATGAAATGCAATGGTGTGGGGTGATTG GGAAG	67
163	mfi_3N_4G LinD r	CTTCCCAATCACCCCAAACACCATTTGCATTTTCATTTG CTAAC	67
164	mfi_3N_7T LinD f	GTTAGCAAAATGAAATGCAATCGTGTGGACCATTG GGAAGAAGATGG	69
165	mfi_3N_7T LinD r	CCATCTTCTTCCCAATCGGTCCAAACACGATTGCATTT CATTTTGCTAAC	69
166	mfi_3N_12T_soe f	GTTTGGGGTGATTGGGAAGAAACCGGTTTTGGCACCGA TC	60
167	mfi_3N_12T_soe r	TTCTTCCCAATCACCCCAAACACGATTGCATTTTCATTT TGCTAACTGC	60
168	mfi_3N_4G_7T LinD f	GTTAGCAAAATGAAATGCAATGGTGTGGACCATTG GGAAGAAGATGG	69
169	mfi_3N_4G_7T LinD r	CCATCTTCTTCCCAATCGGTCCAAACACCATTTGCATTT CATTTTGCTAAC	69
170	mfi_3N_4G_12T_soe f	GTTTGGGGTGATTGGGAAGAAACCGGTTTTGGCACCGA TC	60
171	mfi_3N_4G_12T_soe r	TTCTTCCCAATCACCCCAAACACCATTTGCATTTTCATTT TGCTAACTGC	60
172	mfi_3N_7T_12T_soe f	GGACCATTGGGAAGAAACCGGTTTTGGCACCGATCC	60
173	mfi_3N_7T_12T_soe r	TTCTTCCCAATCGGTCCAAACACGATTGCATTTTCATTT TGCTAACTGC	60

174	mfi_3N_4G_7T_12T f	GGACCGATTGGGAAGAAACCGGTTTTGGCACCGATCC	60
175	mfi_3N_4G_7T_12T r	TTCTTCCCAATCGGTCCAACACCATTGCATTTTCATTT TGCTAAC	60
176	mfi_4G_7T LinD f	GCAAAATGAAATGCAAAGGTGTTGGACCGATTGGGAA GAAGATGG	69
177	mfi_4G_7T LinD r	CCATCTTCTTCCCAATCGGTCCAACACCTTTGCATTT CATTTTGC	69
178	mfi_4G_12T_soe f	GTTTGGGGTGATTGGGAAGAAACCGGTTTTGGCACCGA TC	60
179	mfi_4G_12T_soe r	TTCTTCCCAATCACCCCAACACCTTTGCATTTTCATTT TGCTAACTGC	60
180	mfi_4G_7T_12T_soe f	GGACCGATTGGGAAGAAACCGGTTTTGGCACCGATC	60
181	mfi_4G_7T_12T_soe r	TTCTTCCCAATCGGTCCAACACCTTTGCATTTTCATTT TGCTAACTGC	60
182	mfi_7T_12T_soe f	GGACCGATTGGGAAGAAACCGGTTTTGGCACCGATC	60
183	mfi_7T_12T_soe r	TTCTTCCCAATCCGTCCAACACGTTTGCATTTTCATTT TGCTAACTGC	60
184	mfi_qedH-1 for_n_lg	GGTCGATGACCACGCCGTGGTCCGCC	72
185	mfi_qedH-1 rev_n_lg	CCTCGTAACGCAGGCCGTACGCCGC	71
186	mfi_qedH-2 for_n_lg	GGCCTGTGGCACGTCCGTTCCGACCCTG	71
187	mfi_qedH-2 rev_n_lg	GCATCATCTTGTGGGTCTCACGGCCAACACCCG	71
188	mfi_qedH-I for	GGGCAGGTAATTCATGGC	54
189	mfi_qedH-I rev	GCCTCACCATTGCACAC	57
190	mfi_qedH-II for	GCCTGT CAGCCCCCG	59
191	mfi_qedH-II rev	GCTGAGCCTCTCGCGG	59

## 7.2 Expressionsplasmide

**Tabelle 24: Verwendete Expressionsplasmide.** Angegeben ist die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung der Plasmide, die interne Benennung am Institut für Biochemie und Technische Biochemie der Universität Stuttgart (ITB), der Promotor, die Resistenz sowie eine Referenz über den Ursprung des entsprechenden Plasmids. Amp, Ampicillin; Kan, Kanamycin; genta, Gentamicin; nativ, nativer Promotor von *cas9* aus *Streptococcus*; <sup>1</sup>, diese Arbeit; <sup>2</sup>, kloniert und zur Verfügung gestellt von Christos Batianis und Lyon Bruinsma (Gruppe von Prof. Vitor Martins dos Santos, *Systems and Synthetic Biology*, Universität Wageningen, Niederlande).

ITB	Name	Prom	Res.	Ref.
pITB5526	pQE-31::LinD	T5	Amp	1
pITB5527	pQE-31::LinD_noSP	T5	Amp	1
pITB5528	pET-22b(+):pelB-LinD-His	T7	Amp	1
pITB5529	pQE-31::pelB-LinD-His	T5	Amp	1
pITB5530	pET-28a(+):pelB-LinD-His	T7	Kan	1
pITB5531	pET-28a(+):LinD	T7	Kan	1
pITB5532	pET-28a(+):LinD_wt	T7	Kan	1
pITB5533	pQE-31::OmpA-LinD-His	T5	Amp	1
pITB5534	pET-28a(+):OmpA-LinD-His	T7	Kan	1
pITB5535	pDHE::pelB-LinD-His	rhaB	Amp	1
pITB5536	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1	T7	Kan	1
pITB5537	pET-28a(+):OmpA-mRFP1	T7	Kan	1
pITB5538	pET-28a(+):mRFP1	T7	Kan	1
pITB5539	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 K103N	T7	Kan	1

pITB5540	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 R104G	T7	Kan	1
pITB5541	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 G107T	T7	Kan	1
pITB5542	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 D112T	T7	Kan	1
pITB5543	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 K103N/R104G	T7	Kan	1
pITB5544	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 K103N/G107T	T7	Kan	1
pITB5545	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 K103N/D112T	T7	Kan	1
pITB5546	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 K103N/R104G/G107T	T7	Kan	1
pITB5547	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 K103N/R104G/D112T	T7	Kan	1
pITB5548	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 K103N/G107T/D112T	T7	Kan	1
pITB5549	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 K103N/R104G/G107T/D112T	T7	Kan	1
pITB5550	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 R104G/G107T	T7	Kan	1
pITB5551	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 R104G/D112T	T7	Kan	1
pITB5552	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 R104G/G107T/D112T	T7	Kan	1
pITB5553	pET-28a(+):OmpA-LinD-mRFP1 G107T/D112T	T7	Kan	1
pITB5554	pMETA65::AtoB-Crt-Hbd	Ara	Genta	2
pITB5555	pSEVA238::HcSCDH	Ara	Kan	2
pITB5556	pSEVA238::Bld-Bdh	Ara	Kan	2
pITB5557	pSEVA238::Bld-YsADH	Ara	Kan	2
pITB5558	pMETA23::AtoB-Hbd-Crt-HcSCDH	A100	Kan	2
pITB5559	pMETA23::AtoB-Hbd-Crt-Bld-Bdh	A100	Kan	2
pITB5560	pMETA23::AtoB-Hbd-Crt-Bld-YsADH	A100	Kan	2
pITB5561	pMETA65::dCas9	Pm/XylS	Genta	2
pITB5562	pSEVA231::CRISPRi-leer	nativ	Kan	2
pITB5563	pSEVA231::CRISPRi-AHD1	nativ	Kan	2
pITB5564	pSEVA231::CRISPRi-AHD2	nativ	Kan	2
pITB5565	pSEVA231::CRISPRi-AHD3	nativ	Kan	2
pITB5566	pSEVA231::CRISPRi-AHD4	nativ	Kan	2
pITB5567	pSEVA231::CRISPRi-AHD4.1	nativ	Kan	2
pITB5568	pSEVA231::CRISPRi-AHD5	nativ	Kan	2
pITB5569	pSEVA231::CRISPRi-AHD6	nativ	Kan	2
pITB5570	pSEVA231::CRISPRi-AHD7	nativ	Kan	2
pITB5571	pSEVA231::CRISPRi-AHD8	nativ	Kan	2
pITB5572	pSEVA231::CRISPRi-AHD9	nativ	Kan	2
pITB5573	pSEVA231::CRISPRi-AHD10	nativ	Kan	2
pITB5574	pSEVA231::CRISPRi-AHD11	nativ	Kan	2
pITB5575	pSEVA231::CRISPRi-AHD12	nativ	Kan	2
pITB5576	pSEVA231::CRISPRi-AHD13	nativ	Kan	2
pITB5577	pSEVA231::CRISPRi-AHD14	nativ	Kan	2
pITB5578	pSEVA231::CRISPRi-AHD15	nativ	Kan	2

---

pITB5579	pSEVA231::CRISPRi-AHD16	nativ	Kan	2
pITB5580	pSEVA231::CRISPRi-AHD17	nativ	Kan	2
pITB5581	pSEVA231::CRISPRi-AHD18	nativ	Kan	2
pITB5582	pSEVA231::CRISPRi-AHD19	nativ	Kan	2

---

