
Verbesserung der Substrataufnahme in Ganzzellbiotransformationen mit *Escherichia coli*

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur
Sebastian Hofzumaha
aus Essen (NRW, Deutschland)

Berichter: Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Anett Schallmey
Univ. Prof. Dr.-Ing. Lars M. Blank

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2013

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht sind und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Aachen, den

Sebastian Hofzumahaus

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Jun.-Prof. Dr. Anett Schallmey bedanken, für die Gelegenheit an so einem interessanten und neuen Thema zu arbeiten, für die persönliche Betreuung und die spannenden Einblicke in die Biokatalyse, einen für mich damals relativ neuen Themenbereich.

Ich bedanke mich auch bei Alan Mertens, Dr. Fabrizio Sibilla, Julia Koopmeiners und Paula Bracco für die hilfreichen fachlichen (und nichtfachlichen) Diskussionen in den letzten dreieinviertel Jahren auf der Arbeit oder beim Grillen auf der Terrasse. Insbesondere möchte ich mich bei Paula für die enge Zusammenarbeit bedanken und dafür, dass sie bezüglich Fragen zu GC und HPLC jederzeit zur Verfügung gestanden hat (Gracias!). Weiterhin möchte ich Dr. Marco Bocola für seine Hilfestellung bei der Generierung der Doppelmutanten und Marcus Schallmey für einige gute Ideen danken.

Ein Dankeschön geht auch an die beiden Studenten Louisa Engel und Simon Loevenich, die mit ihren Arbeiten zur Expression und Coexpression der Elicitine zu meiner Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank geht natürlich auch an alle anderen Mitarbeiter des Lehrstuhls für Biotechnologie, für ihre Hilfsbereitschaft, die fachlichen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Vor allen Dingen möchte ich mich aber bei meiner Frau Isabell bedanken, die mir während der gesamten Zeit zur Seite stand und mich immer wieder motivierte, wenn es mit der Arbeit einmal nicht weiter ging.

Ein großes Dankeschön für die Unterstützung während meiner Doktorarbeit geht auch an meine Familie, insbesondere meine Mutter. Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei all meinen Freunden bedanken, mit denen ich auch während meiner Freizeit sehr viel Spaß hatte.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgendem Artikel publiziert:

*„Escherichia coli-based expression system for the heterologous expression and purification of the elicitor β -cinnamomin from *Phytophthora cinnamomi*“*

S. Hofzumahaus, A. Schallmey, Protein Expr. Purif. 90 (2013) 117-123.

(<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.05.010>)

Ein Manuskript zu weiteren Teilen dieser Arbeit, zur Ganzzellbiokatalyse mit Zusatz von β -Cinnamomin und zur Ganzzellbiokatalyse mit coexprimiertem β -Cinnamomin, befindet sich in Arbeit.

Einige Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen folgender von mir betreuter Bachelorarbeiten erzielt:

*„Expression und Charakterisierung von β -Cryptogein aus *Phytophthora cryptogea* in *Escherichia coli*“*

Louisa Engel, Bachelorarbeit, RWTH Aachen (August 2012).

„Einsatz von Elicitinen in der Ganzzellbiokatalyse“

Simon Loevenich, Bachelorarbeit, RWTH Aachen (Juli 2013).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Motivation	1
1.2	Elicidine: eine neue Klasse von Steroltransportern	1
1.2.1	Hintergrund	1
1.2.2	Strukturelle Aspekte	2
1.2.3	Biologische Funktion	3
1.2.4	Expression.....	4
1.3	Heterologe Expression von Disulfidbrücken-haltigen Proteinen in <i>Escherichia coli</i>	4
1.3.1	Cytoplasmatische Expression	5
1.3.2	Periplasmatische Expression	7
1.4	Enzyme und ihr Einsatz in der organischen Synthese	9
1.5	Cytochrom P450 Monooxygenasen	10
1.5.1	Hintergrund	10
1.5.2	Elektronentransfersysteme	12
1.5.3	Reaktionsmechanismus.....	13
1.6	Steroidhydroxylierung durch Cytochrom P450 Monooxygenasen	14
1.7	Substratlimitierung in der Ganzzellbiokatalyse	16
1.8	Mutagenese.....	19
1.9	Zielsetzung.....	20
2	Ergebnisse.....	22
2.1	Design der synthetischen Elicitingene.....	22
2.2	Expression und Proteinaufreinigung der Elicidine	22
2.2.1	Cytoplasmatische Expression in <i>Escherichia coli</i>	23
2.2.1.1	Expression mit pBADN	23
2.2.1.2	Expression mit pET-28a(+)	26
2.2.2	Konstitutive Expression in <i>Pichia pastoris</i>	33
2.2.2.1	Expression mit pGAPZαA in <i>Pichia pastoris</i> X-33.....	33
2.2.3	Periplasmatische Expression in <i>Escherichia coli</i>	36
2.2.3.1	Expression mit pET-22b(+).....	36
2.2.3.2	Expression mit pET-28a(+)MalEssCin und pET-28a(+)DsbAssCin	37
2.2.3.3	Expression mit pET-28a(+)DsbAssCinHis, pET-28a(+)MalEssCinHis und pET-28a(+)-PelBssCinHis.....	44
2.2.3.4	Expression mit pET-28a(+)MalEssCryHis	53

2.2.4	Dehydroergosterolassay.....	55
2.2.5	Test der Steroidbindekazapazität	57
2.3	Rationales Proteindesign von β -Cinnamomin	57
2.3.1	Rationales Proteindesign.....	57
2.3.2	Expression und Aufreinigung der Doppelmutanten.....	58
2.4	Ganzzellbiokatalyse	59
2.4.1	Vorversuche zur Optimierung der Prozessparameter.....	60
2.4.1.1	Expression des Ganzzellbiokatalysators für die Vorversuche	60
2.4.1.2	Umsatz von 2 mM Pregnenolon und 2 mM Testosteron	60
2.4.1.3	Optimierung der Prozessparameter der Ganzzellbiokatalyse.....	62
2.4.2	Ganzzellbiokatalysen mit Zusatz von aufgereinigtem β -Cinnamomin	63
2.4.2.1	Expression des Ganzzellbiokatalysators	63
2.4.2.2	Expression des β -Cinnamomins.....	63
2.4.2.3	Kalibrationsgeraden.....	64
2.4.2.4	Ganzzellbiokatalysen mit Zusatz von 100 μ M β -Cinnamomin	64
2.4.2.5	Ganzzellbiokatalysen mit Zusatz von 200 μ M β -Cinnamomin	65
2.4.2.6	Ganzzellbiokatalysen mit aufgereinigtem β -Cinnamomin im Zeitverlauf	67
2.4.3	Ganzzellbiokatalysen mit coexprimiertem β -Cinnamomin	68
2.4.3.1	Coexpression von CYP154C5, Pdx, PdR und β -Cinnamomin in <i>Escherichia coli</i> C43(DE3)	68
2.4.3.2	Ganzzellbiokatalyse mit coexprimiertem β -Cinnamomin	70
2.4.4	Ganzzellbiokatalysen mit Zusatz von 100 μ M β -Cryptogein	74
3	Diskussion.....	76
3.1	Expression und Proteinaufreinigung	76
3.1.1	Cytoplasmatische Expression in <i>Escherichia coli</i>	76
3.1.2	Konstitutive Expression in <i>Pichia pastoris</i>	77
3.1.3	Periplasmatische Expression in <i>Escherichia coli</i>	79
3.1.3.1	Expression von β -Cinnamomin	79
3.1.3.2	Expression von β -Cryptogein	82
3.1.3.3	Dehydroergosterolassay und Test der Sterolbindekazapazität	83
3.2	Rationales Proteindesign und Expression der Doppelmutanten	84
3.3	Biokatalyse.....	86
3.3.1	Ganzzellbiokatalyse mit Zusatz von β -Cinnamomin.....	86
3.3.2	Ganzzellbiokatalyse mit Coexpression von β -Cinnamomin	89
3.3.3	Ganzzellbiokatalyse mit Zusatz von β -Cryptogein.....	93

4	Zusammenfassung.....	98
5	Material und Methoden.....	101
5.1	Material	101
5.1.1	Gene	101
5.1.2	Primer	102
5.1.3	Plasmide	103
5.1.4	Mikroorganismen	104
5.1.5	Medien	104
5.1.6	Puffer und Lösungen	106
5.1.7	Substratstammlösungen für die Biokatalyse.....	115
5.1.8	Antibiotika	117
5.1.9	Enzyme	118
5.1.10	DNA- und Proteinmarker.....	118
5.1.11	Chemikalien	119
5.1.12	Geräte und Zubehör	119
5.1.13	Kits	121
5.2	Molekular- und mikrobiologische Methoden	121
5.2.1	Übernachtskulturen von <i>Escherichia coli</i>	121
5.2.2	Übernachtskulturen von <i>Pichia pastoris</i>	122
5.2.3	Gefrierkulturen.....	122
5.2.4	Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i>	122
5.2.5	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Pichia pastoris</i>	122
5.2.6	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	123
5.2.7	Agarosegelelektrophorese	123
5.2.8	Restriktionsverdau.....	123
5.2.9	Ligation	124
5.2.10	Polymerasekettenreaktion	124
5.2.11	Kolonie-PCR	125
5.2.12	Rationales Proteindesign.....	126
5.2.13	Herstellung kompetenter Zellen	128
5.2.13.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	128
5.2.13.2	Herstellung von elektrokompetenten <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	128
5.2.13.3	Herstellung elektrokompetenter <i>Pichia pastoris</i> -Zellen	128
5.2.14	Transformation.....	129
5.2.14.1	Transformation in chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	129

5.2.14.2	Transformation in elektrokompetente <i>Escherichia coli</i> -Zellen	129
5.2.14.3	Transformation elektrokompetenter <i>Pichia pastoris</i> -Zellen	129
5.2.15	Expression in <i>Escherichia coli</i>	130
5.2.15.1	Expression der Elicitine im Schüttelkolben.....	130
5.2.15.2	Expression von β -Cinnamomin im Fermenter	131
5.2.15.3	Coexpression von CYP154C5, Pdx, PdR und β -Cinnamomin im Schüttelkolben ..	131
5.2.15.4	Coexpression von CYP154C5, Pdx und PdR im Fermenter	131
5.2.16	Expression in <i>Pichia pastoris</i> im Schüttelkolben	132
5.2.17	Probenahme zur Analyse der Expressionen mittels SDS-PAGE.....	132
5.2.17.1	Probenahme der <i>Escherichia coli</i> -Expressionen.....	132
5.2.17.2	Isolierung der periplasmatischen Fraktion von <i>Escherichia coli</i> -Proben.....	132
5.2.17.3	Probenahme der <i>Pichia pastoris</i> -Expressionen.....	133
5.2.18	Isolierung der periplasmatischen Fraktion von <i>Escherichia coli</i>	133
5.2.19	Zellaufschluss.....	133
5.3	Biochemische Methoden.....	134
5.3.1	Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	134
5.3.2	Western Blot.....	134
5.3.3	Ammoniumsulfatfällung.....	135
5.3.4	Kationenaustauschchromatographie	135
5.3.4.1	Aufreinigung der gefällten Proteine des Kulturüberstandes der <i>Pichia pastoris</i> -Expression	135
5.3.4.2	Aufreinigung der periplasmatischen Fraktion <i>Escherichia colis</i>	136
5.3.5	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie	136
5.3.5.1	Aufreinigung von α -Capsicein, α -Megaspermin, β -Cinnamomin und β -Cryptogein mittels Protino® Ni-IDA-Säulen	136
5.3.5.2	Aufreinigung der resolubilisierten β -Cinnamominlösung	136
5.3.5.3	Aufreinigung der periplasmatischen β -Cinnamomin- und β -Cryptogein-expressionen	137
5.3.6	Rückfaltung von β -Cinnamomin aus <i>inclusion bodies</i>	137
5.3.7	Aufkonzentrieren und Umpuffern der aufgereinigten Elicitinlösungen	138
5.3.7.1	Aufkonzentrieren.....	138
5.3.7.2	Umpuffern	138
5.3.8	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	138
5.3.8.1	Bradfordassay	138
5.3.8.2	Experion.....	139
5.3.8.3	Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm	139

5.3.9	Dehydroergosterolassay.....	140
5.3.10	Test der Steroidbindekazapazität	140
5.3.11	Bestimmung der CYP154C5-Konzentration und der spezifischen Aktivität der Elektronentransferkomponenten.....	141
5.3.11.1	Bestimmung der Konzentration der CYP154C5.....	141
5.3.11.2	Bestimmung der Aktivität der Elektronentransferkomponenten	141
5.4	Ganzzellbiokatalyse mit ruhenden Zellen	142
5.4.1.1	Kalibrationsgeraden.....	142
5.4.1.2	Ganzzellbiokatalyse mit ruhenden Zellen.....	142
5.4.1.3	Extraktion der Steroide.....	143
5.4.1.4	Analyse der biokatalytischen Umsätze.....	143
6	Literaturverzeichnis.....	145
7	Anhang.....	151
7.1	DNA-Marker	151
7.2	Proteinmarker	151
7.3	Vektorkarten.....	152
7.3.1	pBADN	152
7.3.2	pET-28a(+)	152
7.3.3	pGAPZ α A.....	153
7.3.4	pET-22b(+)	153
7.3.5	pIT2.....	154
7.3.6	pACYCDuet™-1	154
7.4	Gen- und Proteinsequenzen.....	155
7.4.1	α -Capsicein	155
7.4.2	α -Megaspermin	155
7.4.3	β -Cinnamomin	155
7.4.4	β -Cryptogein.....	156
7.4.5	CYP154C5.....	156
7.4.6	Elektronentransferkomponenten.....	156
7.4.7	Sekretionssignalsequenzen	157
7.5	BSA Standardgerade.....	158
7.6	Ganzzellbiokatalysekalibrationsgeraden.....	158
7.6.1	Kalibrationsgeraden der Vorversuche.....	158
7.6.1.1	Pregnenolon in Methanol.....	158
7.6.1.2	Testosteron in Methanol	159

7.6.2	Kalibrationsgeraden der Hauptversuche.....	159
7.6.2.1	Pregnenolon in Methanol.....	159
7.6.2.2	Pregnenolon in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin.....	160
7.6.2.3	Testosteron in Methanol	160
7.6.2.4	Testosteron in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	161
7.6.2.5	Progesteron in Methanol.....	161
7.6.2.6	Progesteron in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	162
7.6.2.7	Dehydroepiandrosteron in Methanol	162
7.6.2.8	Dehydroepiandrosteron in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	163
7.6.2.9	Androstendion in Methanol	163
7.6.2.10	Androstendion in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	164
7.6.2.11	Nandrolon in Methanol	164
7.6.2.12	Nandrolon in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	165

Abkürzungsverzeichnis

A ₂₈₀	Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm
AGE	Agarosegelelektrophorese
akt (ETK)	Volumetrische Aktivität der Elektronentransferkomponenten [U/mL]
δ -ALA	5-Aminolävulinsäure (<i>aminolevulinic acid</i>)
AOX1	Alkoholoxidase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>cap</i>	α -Capsiceingen aus <i>Phytophthora capsici</i>
Cap	α -Capsiceinprotein aus <i>Phytophthora capsici</i>
CHCl ₃	Chloroform
<i>cin</i>	β -Cinnamomingen aus <i>Phytophthora cinnamomi</i>
Cin	β -Cinnamominprotein aus <i>Phytophthora cinnamomi</i>
c _f	Finale Konzentration in Lösung
<i>cry</i>	β -Cryptogeingen aus <i>Phytophthora cryptogea</i>
Cry	β -Cryptogeinprotein aus <i>Phytophthora cryptogea</i>
c (P450)	Konzentration der P450 Monooxygenase
c (TP)	Gesamtproteingehalt
DHE	Dehydroergosterol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DsbA	Disulfidbindepotein A
DsbAss	DsbA Sekretionssignalsequenz
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. carotovora</i>	<i>Erwinia carotovora</i>
ETK	Elektronentransferkomponenten
EtOAc	Ethylacetat
Falcon	Falconröhrchen
FID	Flammenionisationsdetektor
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie

h	Stunden
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ISTD	Interner Standard
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
LCI	<i>leech carboxypeptidase inhibitor</i>
MalE	Maltosebindeprotein E
MalEss	MalE Sekretionssignalsequenz
<i>meg</i>	α -Megaspermingen aus <i>Phytophthora megasperma</i>
Meg	α -Megasperminprotein aus <i>Phytophthora megasperma</i>
min	Minuten
Miniprep	Mini Präparationsansatz eines Plasmids
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NMWL	<i>nominal molecular weight limit</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte: Absorption einer Zellkultur bei $\lambda = 600$ nm
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PdR	Putidaredoxinreduktase
Pdx	Putidaredoxin
PelBss	PelB Sekretionssignalsequenz
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>P. cryptogea</i>	<i>Phytophthora cryptogea</i>
<i>P. cinnamomi</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>
<i>P. capsici</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
<i>P. megasperma</i>	<i>Phytophthora megasperma</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PPiasen	Peptidyl-Prolyl <i>cis/trans</i> -Isomerasen
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAR	Induzierte Resistenz (<i>systemic acquired resistance</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SRP	<i>signal recognition particle</i>
spez.akt. (ETK)	Spezifische Aktivität der Elektronentransferkomponenten [U/mg]
SV	Säulenvolumen
Tat	<i>twin-arginine</i>
TB	terrific broth
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	<i>trigger factor</i>
T _m	Schmelztemperatur
Tricine	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜS	Löslicher Überstand nach dem Zellaufschluss und Zentrifugation
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>

1 Einleitung

1.1 Motivation

Ganzzellbiokatalyse ist eine Methode zur umweltfreundlichen Synthese von Feinchemikalien und pharmazeutischen Produkten, die heutzutage immer wichtiger wird. Viele wichtige Medikamente, wie zum Beispiel Pravastatin, ein Cholesterol-senkendes Medikament, oder CDP-Cholin, welches zur Behandlung von Schlaganfällen verwendet wird, werden bereits mittels Ganzzellbiokatalysen mit gramnegativen Mikroorganismen hergestellt. Allerdings wird die Biokatalyse, insbesondere mit gramnegativen Zellen, durch die Limitierung der Substrataufnahmeraten einiger Substrate eingeschränkt, da sich Zellwände in der Natur entwickelt haben, um die Zellen vor äußeren Einflüssen zu schützen. Vor allem hydrophobe Substrate können aufgrund des Aufbaus der gramnegativen Zellwand nur mit sehr langsamen Raten aufgenommen werden. Die Entwicklung von Lösungen zur Überwindung dieser Substratlimitierungen ist daher äußerst wichtig für zukünftige industrielle Ganzzellbiokatalyseprozesse. Da jedoch bislang nur Möglichkeiten zur Verbesserung des Umsatzes kleiner hydrophober Substratmoleküle gefunden wurde, sollte in dieser Arbeit eine neue Möglichkeit getestet werden, mit der auch die Substratlimitierung großer hydrophober Substrate reduziert werden kann: Die Verwendung von Elicitinen als Transporter von Sterolen.

1.2 Elicitine: eine neue Klasse von Steroltransportern

1.2.1 Hintergrund

Elicitine sind eine Familie niedermolekularer Proteine, die in hohen Konzentrationen von den Oomycetengattungen *Phytophthora* und *Phytium* in ihre Umgebung sekretiert werden [51,90], untereinander eine hohe Sequenzidentität aufweisen [94], aber zu keiner anderen Proteinklasse Ähnlichkeit zeigen [87]. *Phytium* und insbesondere die *Phytophthora*-Arten sind Pflanzenpathogene, die für ökonomisch wichtige Pflanzen wie zum Beispiel Kartoffeln, Tomaten, Sojabohnen, Tabak, Kakao oder Eichen weltweit eine Gefahr darstellen [60,61] und in der Vergangenheit schwere Schäden angerichtet haben. Vor allem *Phytophthora cinnamomi* gilt als eines der gefährlichsten Pflanzenpathogene und wurde unter anderem mit dem weit verbreiteten Sterben der Korkeiche (*Quercus suber*) und der Steineiche (*Quercus ilex*) in Portugal und Spanien in Verbindung gebracht [21,22]. Die ersten Elicitine wurden 1988 chromatographisch isoliert [14] und die ersten Aminosäuresequenzen ein Jahr später publiziert [51,94]. Elicitine wurden basierend auf ihrer Toxizität in zwei Gruppen eingeteilt [59,62]: die α -Elicitine mit einem isoelektrischen Punkt im sauren pH-Bereich ($pI < 5$) und die β -Elicitine, welche einen isoelektrischen Punkt im basischen pH-Bereich ($pI > 7.5$) besitzen und die höhere Toxizität aufweisen [19,80].

1.2.2 Strukturelle Aspekte

Elicidine sind kleine, etwa 10 kDa große, nichtglykosylierte Proteine, die aus 98 Aminosäuren bestehen und drei konservierte Disulfidbrücken besitzen. Sie weisen eine sehr spezifische Aminosäuresammensetzung auf, die durch die Abwesenheit von Tryptophan, Histidin und Arginin und eine Häufung von Serin und Threonin (ca. 30 % des Proteins), Alanin (> 10 %) und Leucin (etwa 10 %) geprägt ist [90]. In den vergangenen Jahren wurden mehrere Kristallstrukturen von β -Cryptogein aus *Phytophthora cryptogea* [15,16,39,67] und β -Cinnamomin aus *Phytophthora cinnamomi* [5,97,98] mit und ohne gebundene Substratmoleküle aufgelöst. Die einzigartige Faltung der Elicidine besteht aus sechs α -Helices, einer hydrophoben Bindetasche im Inneren des Proteins und dem sogenannten *beak-like motif*, das aus einem antiparallelen β -Faltblatt und einem ω -Loop besteht [15]. Auf einer Seite der Elicidine bilden die sechs α -Helices das Rückgrat der Elicidine, auf der gegenüber liegenden Seite bilden das β -Faltblatt und der ω -Loop die hydrophobe Tasche, die viele stark konservierte Aminosäurereste enthält. Der ω -Loop ist ebenfalls konserviert und relativ flexibel, was auf eine wichtige Rolle in der Funktion der Elicidine hindeuten könnte. Elicidine besitzen alle eine fast identische Struktur. In Abbildung 1 ist der Vergleich des von Rodrigues *et al.* publizierten β -Cinnamomin-Ergosterolkomplex mit dem von Boissy *et al.* kristallisierten β -Cryptogein-Ergosterolkomplex zu sehen.

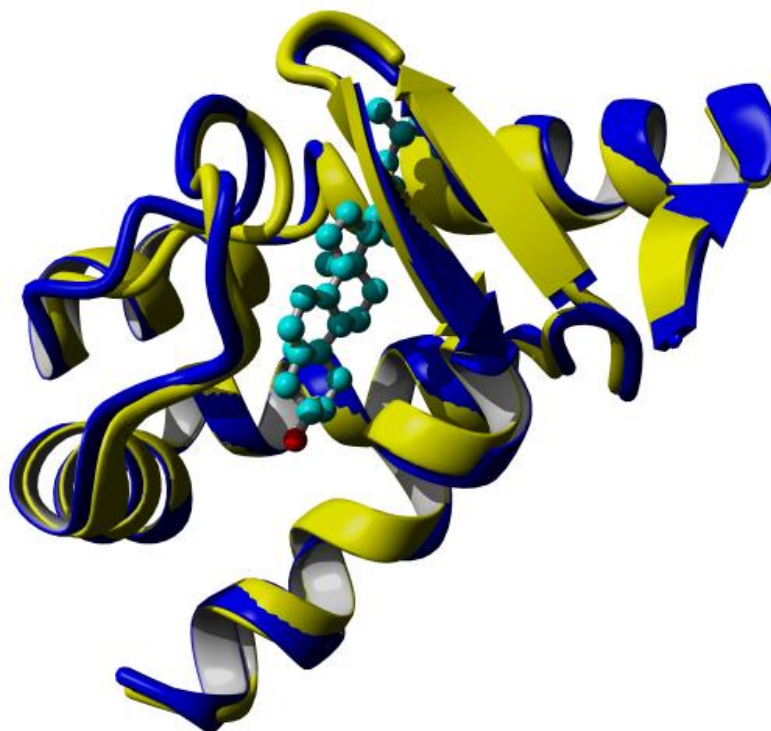


Abbildung 1. β -Cryptogeinstruktur (PDB: 1beo, gelb) überlagert mit der β -Cinnamominstruktur (PDB: 2aib, blau) mit einem Molekül Ergosterol (cyan) gebunden in der hydrophoben Bindetasche des β -Cinnamomins.

Beide Komplexe weisen eine nahezu identische Struktur auf. Elicidine scheinen außerdem relativ stabil zu sein, da β -Cinnamomin sich als sehr lösungsmittelresistent erwies. Nach der Extraktion des

Sterols in purem Chloroform (CHCl_3) zeigte β -Cinnamomin immer noch dieselbe biologische Aktivität und eine ähnliche Steroltransporteraktivität, wie vor der Extraktion [98].

1.2.3 Biologische Funktion

Elicidine können Sterole binden und sie zwischen Membranen transportieren [75,76,113]. Mikes *et al.* zeigten, dass das Elicitin β -Cryptogein Sterole nicht nur in Lösung oder aus liposomalen Membranen binden, sondern sie auch zwischen artifiziellen Membranen transportieren kann [76]. Kurz darauf wiesen sie Steroltransporteraktivität für drei weitere Elicidine, die drei α -Elicidine Cactorein aus *Phytophthora cactorum*, Capsicein aus *Phytophthora capsici* und Parasiticein aus *Phytophthora parasitica* nach, die jedoch niedriger ausfiel als die Aktivität des β -Elicitins [75]. Vauthrin *et al.* wiesen nach, dass Elicidine nicht nur den Transport von Sterolen zwischen artifiziellen, sondern auch zwischen natürlichen Membranen wie zum Beispiel aufgereinigten Tabakplasmamembranen ermöglichen [113]. β -Cryptogein weist zudem weder Protease-, β -Glucanase-, Phospholipase- oder eine sonstige Enzymaktivität auf [109]. Da auch für andere Elicidine keine Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte, werden sie daher vermutlich von *Phytophthora* und *Phytium sp.* in ihre Umgebung sekretiert, um dort Sterole aufzunehmen, die von den beiden Gattungen im Gegensatz zu anderen Oomyceten nicht selbst synthetisiert werden können [48,115]. Yousef *et al.* wiesen den Einfluss von nanomolaren Konzentrationen von Sterolen im Kulturmedium auf die Expression der Elicidine nach [120]. Weiterhin konnten Osman *et al.* zeigen, dass auch Fettsäuren von β -Cryptogein gebunden werden können, wenn auch mit wesentlich geringerer Affinität [85].

In machen Pflanzen lösen Elicidine durch einen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus eine hypersensitive Reaktion aus. Diese beginnt gewöhnlich an der Stelle, an der die Pflanze von dem Pathogen befallen wird, und wird von der Ausbildung einer örtlich begrenzten nekrotischen Läsion begleitet, die zu einer regionalen Eingrenzung der Infektion führen soll. Einige dieser Pflanzen können außerdem eine sogenannte induzierte Resistenz (eng. *systemic acquired resistance*, SAR) ausbilden, die nicht nur eine Resistenz gegen den eigentlichen pathogenen Organismus, sondern gegen eine ganze Bandbreite an unterschiedlichen Pathogenen darstellt [17,64,88]. Zu der Ausbildung einer induzierten Resistenz tragen viele unterschiedliche Prozesse bei, wie beispielsweise die Ausbildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Calciumioneneinstrom durch die Plasmamembran, die Expression einer Reihe von Abwehrgenen oder die Aktivierung von Enzymen, die den Aufbau der Zellwand verstärken sollen. Auch die hypersensitive Reaktion ist einer der Prozesse, die im späteren Verlauf der Ausbildung einer induzierten Resistenz auftreten können [65].

Ein Hinweis auf eine mögliche Verbindung der Steroltransporter- und der Nekroseaktivität wurde von Osman *et al.* geliefert. Sie zeigten, dass β -Cryptogein mit gebundenem Sterol besser an einen hochspezifischen Rezeptor der Tabakplasmamembran bindet, der für die Ausbildung der hypersensitiven

Reaktion verantwortlich sein könnte [86]. Weil in der Kristallstruktur von Boissy *et al.* eine leichte Konformationsänderung des ω -Loop durch die Bindung des Substrats erkennbar ist [16], stellten sie die These auf, dass Elicitine durch die Bindung eines Sterols „aktiviert“ werden, was wiederum die Bindung des Elicitin-Sterolkomplexes an den Rezeptor ermöglicht. Dies würde auch erklären, warum die nekrotischeren β -Elicitine auch gleichzeitig die besseren Steroltransporter sind [86]. Lochman *et al.* stellten dagegen die These auf, dass das Auslösen der nekrotischen Reaktion wahrscheinlicher auf die Gesamtstruktur des Proteins und die Verteilung der Ladungen auf der Oberfläche der Proteine zurückzuführen ist [70]. Im Widerspruch zu beiden Thesen konnten Dokládal *et al.* keinen Zusammenhang zwischen der Steroltransporteraktivität und der Ausbildung der frühen Abwehrreaktionen oder der Nekrose der Pflanzen finden. Im Gegenteil generierten sie eine β -Cryptogeinmutante mit reduzierter Steroltransporteraktivität unter Beibehaltung des nekrotischen Potentials und eine Mutante mit Wildtyp-ähnlicher Steroltransporteraktivität und einem signifikant reduzierten nekrotischen Potential [33].

Die Fähigkeit der Elicitine, eine induzierte Resistenz und damit eine weitreichende Resistenz gegen eine Vielzahl von Pathogenen auszulösen, macht sie für biotechnologische Anwendungen sehr interessant. Mit ihrer Hilfe könnten künstliche Resistenzen in Pflanzen von agrarökonomischem Interesse erzeugt werden, wenn es gelingt, gleichzeitig die Toxizität der Elicitine den Pflanzen gegenüber zu reduzieren oder sogar ganz zu eliminieren [90].

1.2.4 Expression

Die lösliche Expression der Elicitine wurde bislang entweder homolog in den natürlichen *Phytophthora*- und *Phytium*-Stämmen oder heterolog in *Pichia pastoris* durchgeführt. Im Jahr 1995 konnten O'Donohue *et al.* zwar bereits die erste heterologe Expression β -Cryptogeins in *Escherichia coli* berichten, jedoch konnten sie es nur in unlöslicher Form in *inclusion bodies* exprimieren. Das Elicitin musste anschließend in die native Form zurückgefaltet werden, was aber nur mit sehr geringer Ausbeute gelang [83]. Ein Jahr später berichteten sie die erfolgreiche lösliche Expression β -Cryptogeins in einem heterologen *P. pastoris*-basierten Expressionssystem und damit die erste lösliche heterologe Expression eines Elicitins [82]. In den folgenden zwei Jahrzehnten wurden unterschiedliche Elicitine in den natürlichen Wirten *Phytophthora* und *Phytium sp.* [6,67,120] oder in *P. pastoris* [5,82,97] exprimiert.

1.3 Heterologe Expression von Disulfidbrücken-haltigen Proteinen in *Escherichia coli*

Das gramnegative Bakterium *E. coli* ist ein sehr erfolgreiches Expressionssystem für heterologe Proteine, welches sich vor allen Dingen durch seine Eigenschaft, schnell und zu hohen Zelldichten anzuwachsen, auszeichnet. Es wächst auf günstigen Medien, ist sehr gut charakterisiert und es sind eine

große Anzahl verschiedener Expressionsvektoren und -stämme bekannt und kommerziell erhältlich. Nicht zu seinen Eigenschaften zählt dagegen das Durchführen posttranslationaler Modifikationen, weshalb die Expression von Disulfidbrücken-reichen Proteinen in vielen Fällen ein Problem darstellt. Aus diesem Grund wurde eine Reihe von Möglichkeiten entwickelt, welche die Expression eines Disulfidbrückenproteins im Cytoplasma oder im Periplasma *E. coli* erleichtern und somit möglich machen können.

1.3.1 Cytoplasmatische Expression

Die lösliche Expression eines Disulfidbrücken-haltigen Proteins im Cytoplasma von *E. coli* ist grundsätzlich sehr schwierig, da die Bedingungen im Cytoplasma äußerst hinderlich für die Bildung korrekter und vor allem stabiler Disulfidbrücken sind [9]. Einerseits herrscht ein reduzierendes Milieu vor, weshalb sich Disulfidbrückenbindungen nur schwer bilden können. Andererseits werden korrekt gebildete Disulfidbrücken schnell wieder durch Thioredoxine und Glutaredoxine reduziert, so dass die dauerhafte Bildung stabiler Disulfidbindungen sehr effektiv verhindert wird. Hier spielen vor allem die Thioredoxine TrxA und TrxC eine Rolle, welche Disulfidbrücken reduzieren und dabei selber oxidiert werden [96]. Um die beiden Thioredoxine wieder in den reduzierten Grundzustand zu versetzen, werden sie unter NADPH-Verbrauch durch die Thioredoxinreduktase TrxB reduziert. Dieselbe Rolle übernehmen auch die Glutaredoxine GrxA, GrxB und GrxC, welche Disulfidbindungen reduzieren und selber wiederum durch die Genprodukte der Gene *gshA* und *gshB* reduziert werden. Dann reduziert die Glutathionreduktase Gor unter NADPH-Verbrauch GshA und GshB [9]. Aus diesem Grund ist es eine häufig angewendete Strategie, auf Stämme zurückzugreifen, die TrxB und Gor defizient sind. Durch den *knockout* von TrxB und Gor werden beide Zyklen unterbrochen und die dauerhafte Ausbildung von korrekten Disulfidbrücke wird erleichtert. Obwohl dies zu Beginn zu Wachstumsproblemen führte, sind mittlerweile eine Reihe von Stämmen entwickelt worden, die trotz des *knockouts* der beiden Gene gut wachsen können [13,58]. Neben dem *knockout* der Reduktasen, können jedoch auch einige der Chaperone *E. coli*s, wie zum Beispiel der *trigger factor* (TF), DnaK-DnaJ-GrpE oder GroEL-GroES, überexprimiert werden, um zu der korrekten Faltung der Disulfidbrückenproteine beizutragen [9]. Die Expressionstemperatur ist ein weiterer wichtiger Faktor, der die cytoplasmatische Faltung von Disulfidbrücken stark beeinflussen kann. Durch Senken der Temperatur laufen Transkription und Translation langsamer ab und es bleibt den Proteinen mehr Zeit, die richtige Konformation einzunehmen. Hydrophobe Wechselwirkungen, die unabhängig von den Disulfidbindungen zu einer falschen Faltung der rekombinanten Proteine führen können, werden durch Absenken der Temperatur ebenfalls reduziert und das gesamte cytoplasmatische Milieu wird weniger reduzierend, so dass sich die Disulfidbindungen noch besser bilden können [9,32,102]. Der letzte große Faktor, der Einfluss auf die Faltung rekombinanter Proteine im Cytoplasma hat, ist die Höhe des Expressionsniveaus. Je mehr Protein exprimiert wird, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit,

dass Protein fehlerhaft gefaltet wird. Um das Expressionsniveau zu steuern, können beispielsweise Plasmide mit einem Arabinosepromotor verwendet werden, der die Induktion der Expression mit unterschiedlichen Konzentrationen Arabinose ermöglicht [8,9].

Ist die lösliche Expression eines Proteins im Cytoplasma trotzdem nicht möglich und wird es stattdessen in unlöslicher Form in *inclusion bodies* gebildet, kann versucht werden, das Protein in seine native Form zurückzufalten. Die Expression in *inclusion bodies* erfolgt zwar grundsätzlich in inaktiver, unlöslicher Form mit nur einer *nativ-ähnlichen* Sekundärstruktur, bietet jedoch auch Vorteile. So können in *inclusion bodies* sehr hohe Expressionsraten erreicht werden und da sie fast ausschließlich das rekombinante Protein enthalten, wird die anschließende Aufreinigung vereinfacht. Durch die Verkapselung des heterolog exprimierten Proteins ist dieses außerdem besser vor der Proteolyse durch *E. coli*-eigene Proteasen geschützt. Da die Proteine inaktiv vorliegen, bietet die Expression in *inclusion bodies* vor allen Dingen für die Expression von toxischen Proteinen einen großen Vorteil, die so in hoher Ausbeute exprimiert werden können, ohne dass die Zellen geschädigt werden. Um aus der Expression rekombinanter Proteine in *inclusion bodies* einen Nutzen ziehen zu können, müssen die Proteine allerdings zuerst in ihre native Konformation zurück gefaltet werden, was das Hauptproblem dieser Form der Expression darstellt. Die Rückfaltung der Proteinen basiert in der Regel auf drei Schritten: Zunächst werden die *inclusion bodies* isoliert, dann wird das Protein aus den *inclusion bodies* resolubilisiert und anschließend in seine native Konformation zurückgefaltet. Wie ein bestimmtes Protein zurückgefaltet werden kann, ist immer unterschiedlich und muss meist empirisch bestimmt werden.

Wichtig für die Isolation der *inclusion bodies* ist ein möglichst guter Zellaufschluss, entweder durch Ultraschall, French Press oder Hochdruckhomogenisator. Um den Aufschluss zu verbessern, können zusätzlich Lysozym und EDTA eingesetzt werden. Triton X-100 oder niedrige Konzentrationen chaotropischer Salze reduzieren die Verunreinigung durch Proteine der äußeren Membran, die sonst mit den *inclusion bodies* präzipitieren [11,44,95]. Zum Beispiel durch Dichtegradientenzentrifugation können die Inclusion Bodies dann anschließend leicht von den Zelltrümmern abgetrennt werden.

Zur Resolubilisierung der Proteine aus den Inclusion Bodies wird in den meisten Fällen eine hohe Konzentration chaotropischer Reagenzien, wie zum Beispiel 6 - 8 M Harnstoff oder Guanidiniumchlorid eingesetzt [112]. Dies führt zwar zum Verlust der *nativ-ähnlichen* Sekundärstruktur, aber auch zu einer Resolubilisierung der Proteine mit hoher Ausbeute. Alternativ kann versucht werden, das Protein unter milden Bedingungen, wie niedrigen Konzentration chaotropischer Salze (zum Beispiel 2 M Harnstoff), extremen pH-Werten, Detergenzien oder Arginin mit einer geringeren Ausbeute zu resolubilisieren. So kann die *nativ-ähnliche* Sekundärstruktur erhalten und damit die Ausbeute der anschließenden Rückfaltung des Proteins verbessert werden [112]. Bei einem Disulfidbrückenprotein

muss zusätzlich ein reduzierendes Reagenz wie etwa Dithiothreitol (DTT) zugesetzt werden, damit die Cysteine des Proteins reduziert werden und eine fehlerhafte inter- und intramolekulare Disulfidbrückenbildung durch Oxidation durch Luftsauerstoff verhindert wird [11,28]. Der optimale pH liegt hier in dem niedrigen alkalischen Bereich. Vor dem Rückfaltungsprozess müssen die reduzierenden Reagenzien jedoch wieder rückstandslos entfernt werden, da es sonst zu verringerten Ausbeuten kommen kann.

Die Rückfaltung von Proteinen erfolgt nach dem Prinzip, dass das resolubilisierte denaturierte Protein durch Verringern der Konzentration der chaotropen Salze in die Lage versetzt wird, die energetisch sinnvollste und damit stabilste Konformation einzunehmen: die native Konformation. Dies kann beispielsweise in einem einzigen großen Verdünnungsschritt oder auch schrittweise durch mehrere kleine Verdünnungsschritte oder Dialyse der resolubilisierten Protein-Denaturantlösung passieren [116,119]. Alternative Methoden sind zum Beispiel Größenausschlusschromatographie (SEC), Matrix-assoziierte Rückfaltung oder Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) [112]. Wie einfach oder schwierig sich der gesamte Prozess gestaltet kann und wie die genauen Bedingungen aussehen, hängt immer von jeweiligen Protein ab und kann von Protein zu Protein sehr unterschiedlich sein. Im Falle der Disulfidbrückenproteine ist die Rückfaltung von aktivem Protein noch einmal wesentlich schwieriger, da zur Bildung der richtigen Disulfidbindungen zusätzlich die richtigen Redoxbedingungen eingestellt werden müssen [112]. Ein Beispiel ist der Zusatz von oxidiertem und reduziertem Glutathion, wobei sich ein Überschuss der reduzierten Form und ein leicht alkalischer pH als optimal zur Bildung der korrekten Disulfidbindungen herausgestellt haben [3,112]. Die Rückfaltung eines Proteins kann Sekunden bis mehrere Tage benötigen und konkurriert ständig mit der falschen Faltung und der Aggregation des Proteins. Die Faltung in die richtige Konformation beinhaltet intramolekulare Wechselwirkungen und ist damit eine Kinetik erster Ordnung, während die Aggregation der Proteine auf intermolekularen Wechselwirkungen freiliegender hydrophober Reste halbgefalteter Intermediate basiert, daher einer Kinetik zweiter oder höherer Ordnung ist und durch hohe Proteinkonzentrationen begünstigt wird [112]. Daher ist es durchaus möglich, dass ein Protein zwar resolubilisiert, aber nicht in die native Form zurück gefaltet werden kann und stattdessen aggregiert. Als Temperatur haben sich tiefere Temperaturen um 4 °C bewährt, da diese zwar den Faltungsprozess verlangsamen, aber die Aggregation durch hydrophobe Wechselwirkungen unterdrücken.

1.3.2 Periplasmatische Expression

Die periplasmatische Expression ist die zweite Möglichkeit, um Disulfidbrückenproteine in *E. coli* zu exprimieren. Auch *E. coli*-eigene Disulfidbrückenproteine werden ins Periplasma sekretiert [74], da im Periplasma im Gegensatz zum Cytoplasma oxidierende Bedingungen herrschen, weshalb Disulfidbindungen gebildet werden können. Anstelle der Thioredoxine und Glutaredoxine, die im Cytoplasma effektiv die Bildung von stabilen Disulfidbrücken verhindern, findet sich im Periplasma eine Reihe von

Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen, die Dsb-Proteine, welche die richtige Faltung von Disulfidbrückenbindungen im Periplasma aktiv unterstützten [9]. Cysteine werden durch DsbA oxidiert, welches dabei reduziert und anschließend selber wiederum durch DsbB oxidiert wird. Falsch gebildete Disulfidbrücken können durch die Disulfidisomerase DsbC und das Membranprotein DsbD unter NADH-Verbrauch in die richtige Form überführt werden. Abgesehen von den Disulfid-spezifischen Chaperonen, gibt es weitere Chaperone, die auch die allgemeine Faltung unterstützen. In den meisten Fällen wird sekretiertes Protein durch Skp gebunden, welches das Protein ATP-unabhängig und passiv bei der Faltung unterstützt [114]. Weitere Proteine mit Chaperonaktivität sind die Peptidyl-Prolyl *cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) SurA, FkpA, PpiA und PpiD [9]. Ein weiterer Vorteil ist, dass sich im Periplasma weniger Proteasen befinden, als im Cytoplasma. Die periplasmatische „Hauptprotease“ DegP schaltet bei niedrigen Temperaturen zudem von Protease- zu Chaperon-Aktivität um [105]. Eine weitere relevante Protease ist Prc (Tsp), welche vorwiegend Proteine mit unpolaren C-Termini, Membranproteine und ungefaltete Proteine angreift [63].

In *E. coli* existieren drei Sekretionsmechanismen (siehe Abbildung 2), mit denen Proteine aus dem Cytoplasma ins Periplasma transportiert werden können. Der Sec-abhängige Transport (**b**) ist der häufigste Sekretionsweg in *E. coli*. Er involviert die Proteine SecB, SecA und transportiert ungefaltete Proteine posttranslational durch das SecYEG-SecDFYajC Translocon ins Periplasma [9]. Preproteine mit einer leicht hydrophoben Sec-Sekretionssignalsequenz werden während der Translation von einer PPIase, dem bereits erwähnten *trigger factor* (TF), gebunden. Dieser verhindert die Faltung des Proteins und schützt es so vor Aggregation oder Degradation durch eine falsche Faltung. Im Anschluss an die Translation dissoziiert der TF und das ungefaltete Preprotein wird spezifisch durch SecB oder das Chaperon DnaK gebunden. Anschließend wird es zu SecA transportiert und unter ATP-Verbrauch durch das Translocon ins Periplasma geschleust [35,37]. Alternativ können Preproteine auch unspezifisch durch GroEL/GroES zu SecA transportiert werden [4].

Der zweite Sekretionsweg, über den in *E. coli* hauptsächlich Proteine der inneren Membran transportiert werden, ist der cotranslationale *signal recognition particle* (SRP)-Sekretionsmechanismus (**a**). Preproteine mit einer stark unpolaren Sekretionssignalsequenz oder Transmembransegmente von Proteinen der inneren Membran werden schon während der Translation von SRP gebunden und zu FtsY transportiert, von wo aus sie freigesetzt und anschließend über SecA durch das SecYEG-SecDFYajC Translocon ins Periplasma sekretiert werden [111]. Über den einen oder anderen Weg werden nahezu alle Proteine über SecA durch das SecYEG-SecDFYajC Translocon ins Periplasma geschleust.

Eine Ausnahme bildet der dritte und seltenste Mechanismus, der *twin-arginine* (Tat)-Sekretionsweg (**c**). Die Preproteine, die über diesen Weg in das Periplasma geschleust werden, besitzen eine Sekre-

tionssignalsequenz, die in den meisten Fällen ein sogenanntes *twin-arginine*-Motiv enthält und werden vollständig gefaltet über TatA, TatB, TatC und TatE ins Periplasma sekretiert [9]. Der Mechanismus des Tat-Sekretionswegs ist noch nicht eindeutig entschlüsselt, aber vermutlich werden die Proteine durch einen Komplex aus TatB und TatC gebunden und dann zu TatA oder Tat E transferiert, welche Tunnel bilden, durch die das Protein in das Periplasma geschleust werden kann [9]. Die Wahl der Sekretionssignalsequenz kann von entscheidender Bedeutung sein, da die erfolgreiche Sekretion eines Proteins häufig stark von der individuellen Paarung eines Proteins und einer Sekretionssignalsequenz abhängt [8,47].

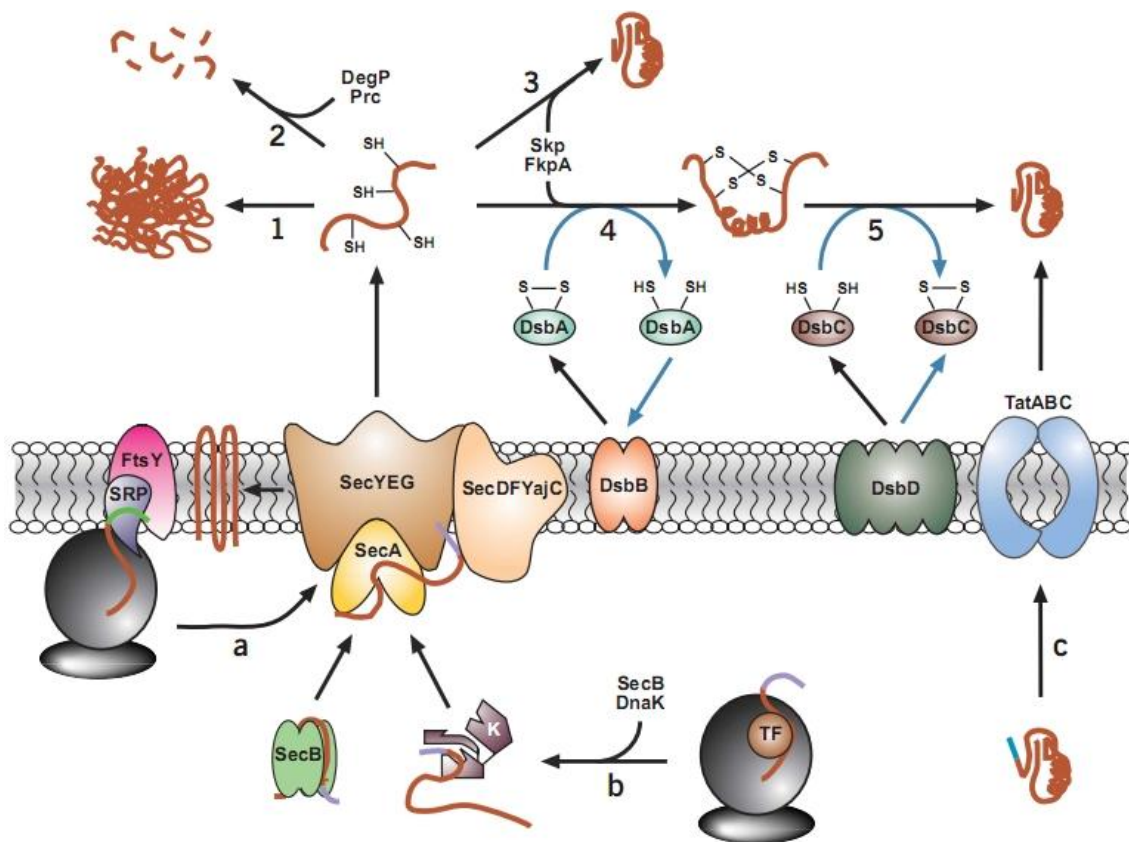


Abbildung 2. Proteinsekretionsmechanismen in *E. coli*. Sec- (a), SRP- (b) und Tat (c)-abhängiger Transport von Proteinen aus dem Cyto- in das Periplasma. Aggregation (1), Proteolyse (2) und native Faltung (3) der prozessierten Proteine. Cysteine-reiche Proteine werden durch DsbA (4) und DsbC (5) bei der korrekten Bildung von Disulfidbrückenbindungen unterstützt. Die Abbildung wurde Baneyx und Mujacic [9] entnommen.

1.4 Enzyme und ihr Einsatz in der organischen Synthese

Enzyme sind vielseitige Proteine, die sehr effektiv eine große Anzahl von chemischen Reaktionen in lebenden Organismen katalysieren. Als Biokatalysatoren senken sie die Aktivierungsenergie, die überwunden werden muss, damit eine chemische Reaktion ablaufen kann. Wie chemische Katalysatoren nehmen sie selbst an der Reaktion nur in Form eines intermediären Zwischenproduktes teil und gehen anschließend wieder unverändert aus der Reaktion hervor. Sie treten überall in der Natur auf und wurden bereits seit Jahrtausenden von Menschen unter anderem in der Lebensmittelherstel-

lung verwendet, um zum Beispiel Wein, Bier oder Käse herzustellen. Reaktionen, die durch Enzyme katalysiert werden, laufen in der Natur unter milden Bedingungen, wie in wässrigen Medien, bei neutralem pH-Wert und Temperaturen zwischen 20 und 40 °C ab. Zusätzlich weisen die meisten Enzyme eine hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektiv auf. Aufgrund der neutralen Reaktionsbedingungen und da weniger unnütze oder sogar toxischen Nebenprodukte anfallen, stellen sie eine ernst zu nehmende und umweltfreundliche Alternative zu chemischen Katalysatoren dar. In der sogenannten „Grünen Chemie“ wird konsequent versucht, etablierte chemische Prozesse schrittweise durch umweltverträgliche und nachhaltige Verfahren zu ersetzen und so Umweltverschmutzung zu vermeiden. Bei diesen handelt es sich, neben umweltfreundlicheren chemischen Prozessen, vor allen Dingen auch um den Einsatz von Enzymen. Bis zum heutigen Tag konnte eine große Anzahl verschiedener Enzyme beschrieben werden und für viele Anwendungen wurden bereits Enzyme mit passenden Reaktions- und Substratspezifitäten identifiziert und genauestens charakterisiert. In einigen Fällen konnten Enzyme bereits kommerziell und damit auch einem breiteren Publikum verfügbar gemacht werden. Die stetig zunehmende Anzahl der industriell angewandten biokatalytischen Prozesse ist ein klarer Indikator für die wachsende Akzeptanz von Enzymen in der chemischen Industrie [108].

Die häufigste Klasse der Enzyme die in der organischen Synthese eingesetzt wird, ist die Klasse der Hydrolasen (EC 3), die eine Vielzahl unterschiedlicher Hydrolysereaktionen katalysieren können. Sie zeigen eine hohe Selektivität und besitzen den großen Vorteil, auf zusätzliche Cofaktoren verzichten zu können [18]. Eine weitere industriell relevante Klasse von Enzymen sind die Oxidoreduktasen (EC 1). Im Gegensatz zu den Hydrolasen sind sie zwar auf zusätzliche Cofaktoren angewiesen und weisen in vielen Fällen eine relativ geringe Stabilität auf, können aber eine ganze Reihe von wichtigen Reaktionen katalysieren und werden daher bereits vielfach industriell eingesetzt [69]. Zu den Oxidoreduktasen zählen zum Beispiel Monooxygenasen, die ein einzelnes Sauerstoffatom auf ein Substrat übertragen können. Eine besonders wichtige Familie dieser Enzyme sind die Cytochrom P450 Monooxygenasen, da sie nicht aktivierte Kohlenstoffatome regio- und stereoselektiv hydroxylieren können. Aus diesem Grund spielen sie in der pharmazeutischen Industrie bei der Synthese von Steroidhormonen eine wichtige Rolle [20].

1.5 Cytochrom P450 Monooxygenasen

1.5.1 Hintergrund

Cytochrom P450 Monooxygenasen wurden vor ungefähr 50 Jahren entdeckt, gehören zur großen Familie der Häm-Eisen-enthaltenden Monooxygenasen und können in den Organismen fast aller biologischen Reiche gefunden werden. Sie katalysieren ein breites Spektrum chemischer Reaktionen und sind zum Beispiel beim Abbau von Xenobiotika und Kohlenstoffquellen oder in der Synthese von Sekundärmetaboliten involviert [79]. Insbesondere Sekundärmetabolite stellen für die Industrie ei-

nen großen wirtschaftlichen Wert dar, da sie zwar für das Wachstum und Überleben der Mikroorganismen nicht notwendig sind, es sich aber häufig um wertvolle biologische Wirkstoffe, wie zum Beispiel Antibiotika oder Insektizide handelt. P450 Monooxygenasen sind externe Monooxygenasen, welche die Übertragung eines einzelnen Sauerstoffatoms von molekularem Sauerstoff auf ein Substrat, unter Reduzierung des zweiten Sauerstoffatoms zu Wasser, katalysieren können. Die Elektronen, die sie dazu benötigen, beziehen sie von einem externen Elektronendonator, wie zum Beispiel NAD(P)H. Abgesehen von dem Cofaktor benötigen P450 zusätzlich Elektronentransferkomponenten (ETK), welche die Elektronen von dem Cofaktor auf das Häm der Enzyme übertragen können. In Abbildung 3 ist die allgemeine Reaktionsgleichung einer P450 Monooxygenase dargestellt.

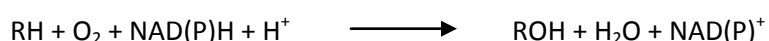


Abbildung 3. Grundlegende durch P450 Monooxygenasen katalysierte Reaktion.

Cytochrom (Cytochrom = Hämprotein) P450 (P = Pigment) Monooxygenasen wurden aufgrund des charakteristischen Absorptionsmaximums des reduzierten, Kohlenmonoxid-gebundenen Komplexes bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$ benannt [12]. Dieser charakteristische Peak wird bis heute zur Bestimmung der P450-Konzentration in wässrigen Lösungen verwendet [84]. In der Nomenklatur werden P450 mit „CYP“ abgekürzt, gefolgt von einer Ziffer für die Familie ($\geq 40 \%$ Sequenzidentität), einem Buchstaben für die Unterfamilie ($\geq 55 \%$ Sequenzidentität) und einer weiteren Ziffer, die jeder einzelnen P450 individuell zugeordnet wird. P450 Monooxygenasen besitzen trotz der geringen Sequenzidentität innerhalb der Superfamilie ($\leq 20 \%$) eine ähnliche Struktur (siehe Abbildung 4). Sie beinhalten vier konservierte Helices, drei parallele Helices (D, L und I) und eine antiparallele Helix (E). Die prosthetische Hämgruppe ist zwischen der distalen I-Helix und der proximalen L-Helix positioniert und ist über die sogenannte Cystein-Häm-Liganden-Schleife, die das P450 Aminosäuremotiv FxxGx(H/R)xCG enthält, an das Enzym gebunden. Das Häm-bindende Cystein ist konserviert und ist der Grund für das charakteristische Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$ [31].

Für die pharmazeutische Industrie sind sie vor allem interessant, da sie eine Vielfalt von chemischen Reaktionen wie die Hydroxylierung, Epoxidierung, Dealkylierung und Dehalogenierung katalysieren können und daher wertvolle Biokatalysatoren zur Synthese von Feinchemikalien und pharmazeutischen Produkten darstellen [12,54]. Bislang wurden P450 Monooxygenasen in der Industrie jedoch aufgrund ihrer Komplexität, Instabilität und der in einigen Fällen niedrigen katalytischen Aktivität relativ selten verwendet. Kommen sie in der Industrie zum Einsatz, werden sie meist in Form von ganzen Zellen eingesetzt. Alternativ werden P450 Monooxygenasen eingesetzt, die fusioniert an ihre ETK vorliegen und so als Ein-Komponentensystem ihren Bedarf an Elektronen „selbstständig“ decken können [12]. Zwei der bekanntesten und am besten charakterisierten P450 Monooxygenasen sind

CYP101A1 (P450cam) aus *Pseudomonas putida* und CYP102A1 (P450 BM3) aus *Bacillus megaterium*, die auch die ersten P450 waren, von denen Kristallstrukturen erzeugt werden konnten [91,93].

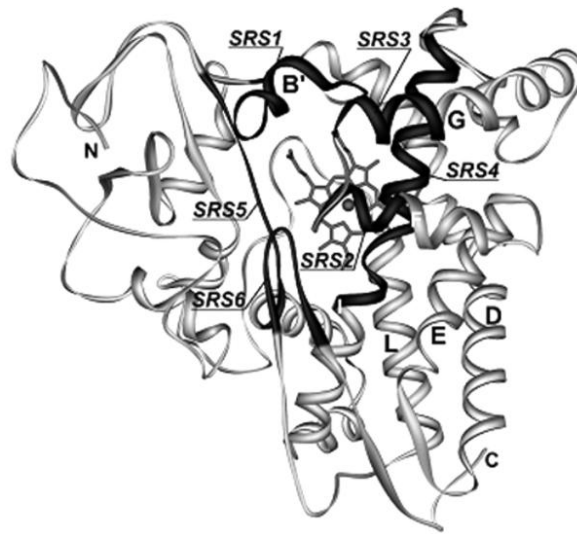


Abbildung 4. Struktur der Cytochrom P450 Monooxygenasen. Die Substraterkennungssequenzen SRS1 - SRS6 sind schwarz eingefärbt und die Helices D, L, I und E durch Beschriftung gekennzeichnet. Die Abbildung wurde Denisov *et al.* [31] entnommen.

1.5.2 Elektronentransfersysteme

Grundsätzlich werden P450 Monooxygenasen aufgrund ihrer Elektronentransfersysteme in zehn verschiedene Klassen eingeteilt [46]. Die wichtigsten Klassen der Cytochrom P450 Monooxygenasen, die Klassen I, II und VIII, sind in Abbildung 5 dargestellt [12]. Zur Klasse I der P450 Monooxygenasen gehören bakterielle und mitochondriale Drei-Komponentensysteme, die aus einem Ferredoxin, einer Ferredoxinreduktase und einer P450 bestehen. Die Ferredoxinreduktase bindet mittels FAD zwei Elektronen von NAD(P)H, welche anschließend einzeln durch das Ferredoxin (Eisen-Schwefel-Cluster) von der Reduktase auf das Häm der P450 übertragen werden. Die bakteriellen P450 Monooxygenasen liegen gelöst und die mitochondrialen P450 membrangebunden vor. Das bekannteste Beispiel für eine Klasse I-P450 ist das P450cam-System, welches NADH-abhängig ist und aus P450cam und den ETK Putidaredoxin (Pdx) und Putidaredoxinreduktase (PdR) aus *P. putida* besteht. In seiner natürlichen Funktion hydroxyliert es Campher in seiner 5-exo-Position.

Klasse II P450 Monooxygenasen sind membrangebundene Zwei-Komponentensysteme, bei denen die Elektronen von NAD(P)H direkt von einer membranassoziierten Cytochrom P450 Reduktase (CPR) auf das Häm übertragen werden. Die meisten eukaryotischen P450 Monooxygenasen fallen in diese Gruppe. Zudem gibt es eine einzelne prokaryotische P450 Monooxygenase (CYP105A3 aus *Streptomyces carbophilus*), die in diese Gruppe einsortiert werden kann und die nicht membrangebunden, sondern löslich im Cytoplasma vorliegt.

Die dritte wichtige Klasse sind die Klasse VIII P450, die wie die bakterielle Klasse I P450 gelöst, aber, im Unterschied zur Klasse I, fusioniert an ihren Reduktasepartner CPR vorliegen und so Ein-Komponentensysteme darstellen. P450 BM3 ist das bekannteste und wohl am besten charakterisierte Beispiel dieser Klasse. Das P450 BM3-System ist NADPH-abhängig, hydroxyliert langkettige Fettsäuren in der ω -1 bis ω -3 Position und weist die bislang höchste in der Literatur beschriebene Aktivität für Cytochrom P450 Monooxygenasen auf [12].

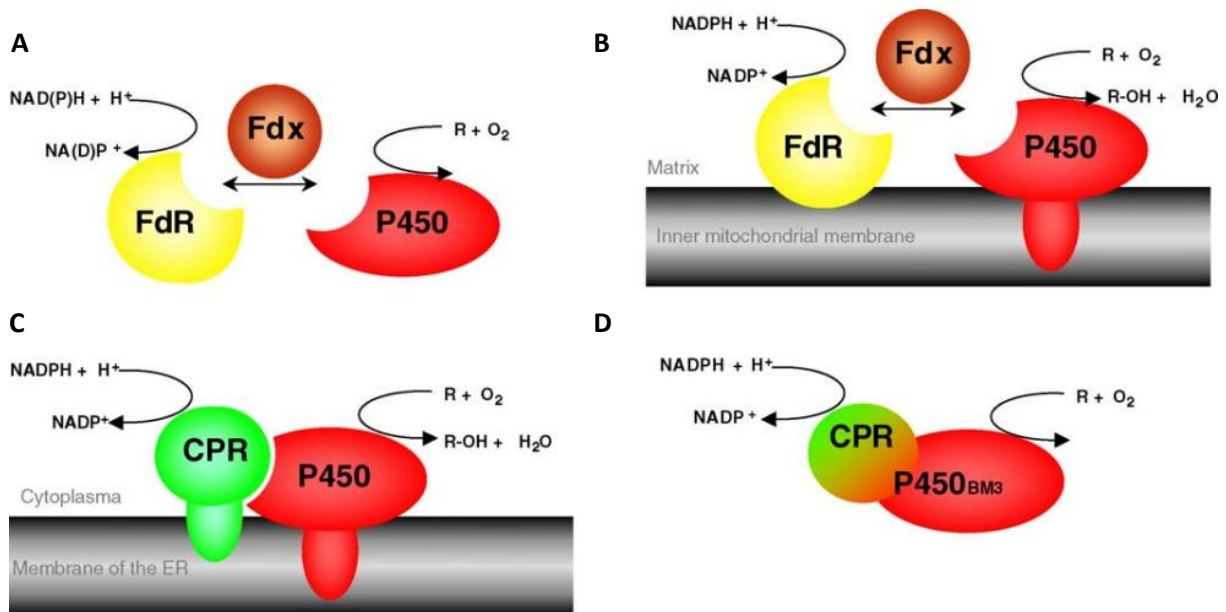


Abbildung 5. Schematische Darstellung der wichtigsten P450 Elektronentransfersysteme. A: Bakterielle Cytochrom P450 Monooxygenasen der Klasse I. B: Mitochondriale Cytochrom P450 Monooxygenasen der Klasse I. C: Mikrosomale Cytochrom P450 Monooxygenasen der Klasse II. D: Fusionierte Cytochrom P450 Monooxygenasen der Klasse VIII. FdR: Ferredoxin-reduktase. Fdx: Ferredoxin. P450: Cytochrom P450 Monooxygenase. CPR: Cytochrom P450 Reduktase. Die Abbildung wurde Bernhardt [12] entnommen.

1.5.3 Reaktionsmechanismus

Der Katalysemechanismus der Cytochrom P450 Monooxygenasen ist vereinfacht in Abbildung 6 dargestellt. Die Reaktion beginnt durch die Bindung des Substrats im aktiven Zentrum der P450 und die Verdrängung des Wassermoleküls als sechstem Liganden des Häms (**2**). Dabei geht das Fe³⁺ vom *low-spin* in den *high-spin* Zustand über, wodurch sich dessen Redoxpotential ändert. Im nächsten Schritt wird das Häm-Eisen durch die Übertragung des ersten Elektrons von NAD(P)H durch die Elektronentransferkomponenten reduziert (**3**). Die Reduktion des Fe³⁺ zu Fe²⁺ ermöglicht die Bindung eines Sauerstoffmoleküls unter Ausbildung eines Eisen(III)-Sauerstoffkomplexes (**4**). Dieser bildet durch Aufnahme des zweiten Elektrons des Cofaktors ein Eisen(III)-Peroxyanion (**5a**), welches durch Protonierung in einen Eisen(III)-Hydroperoxidkomplex überführt wird (**5b**). In der darauf folgenden Protonierung wird durch heterolytische Abspaltung eines Wassermoleküls der Eisen(IV)-Oxokomplex gebildet (**6**), der das Substrat bindet und zum hydroxylierten Produkt umsetzt (**7**). Das hydroxylierte Produkt

wird freigesetzt, ein Wassermolekül nimmt erneut den Platz des sechsten Liganden des Häm ein und der Zyklus kann von vorn beginnen (1) [12,31].

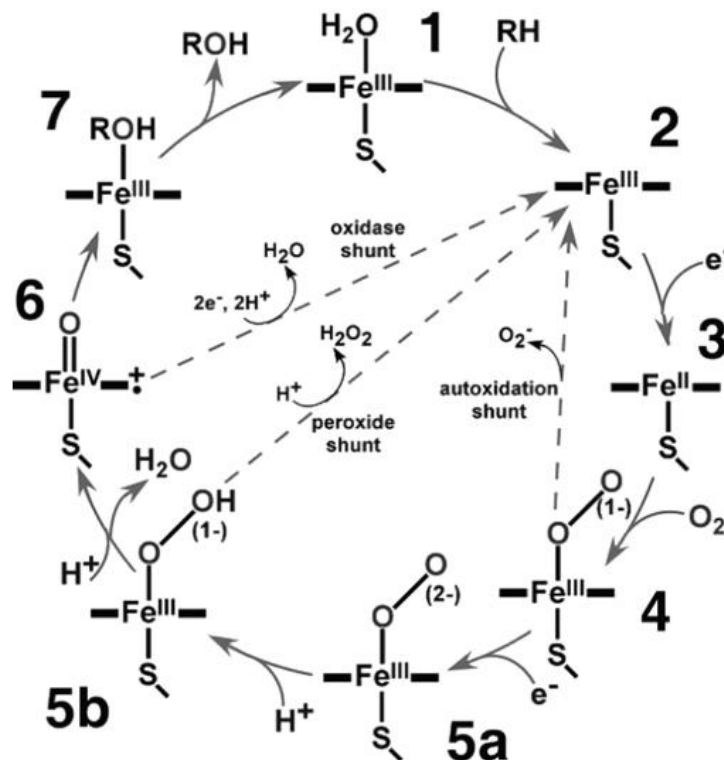


Abbildung 6. Katalysezyklus der Cytochrom P450 Monooxygenasen. Die Abbildung wurde Denisov *et al.* entnommen [31].

Der Zyklus kann durch drei Entkopplungsreaktionen unterbrochen werden. Ist kein passendes Substrat vorhanden, können manche reduzierten P450 Monooxygenasen durch Autooxidation des Eisen(III)-Sauerstoffkomplexes Superoxidanionen (O_2^-) bilden (*autooxidation shunt*). Dies kann dann in einigen Organismen zur Einleitung von Apoptose führen. Die zweite Entkopplungsreaktion ist der *oxidase shunt*, in welcher der Eisen(IV)-Oxokomplex zu Fe^{3+} reduziert und Wasser freigesetzt wird [12]. Die dritte Möglichkeit ist der sogenannte *peroxide shunt*, in dem der proximale Sauerstoff des Eisen(III)-Hydroperoxidkomplexes protoniert und so Wasserstoffperoxid anstelle des Eisen(IV)-Oxokomplexes gebildet wird. Dieser Mechanismus eröffnet biotechnologisch die interessante Möglichkeit, auf den Einsatz und die umständliche Regeneration von teuren Cofaktoren wie NAD(P)H zu verzichten und das Substrat direkt mit Peroxiden hydroxylieren zu können. Die katalytischen Raten mit Peroxiden liegen jedoch wesentlich unter denen, die mit NAD(P)H erreicht werden können. Außerdem wird das Häm durch den Kontakt mit Wasserstoffperoxid zerstört, weshalb das Enzym im Verlauf der Zeit an Aktivität verliert. [12].

1.6 Steroidhydroxylierung durch Cytochrom P450 Monooxygenasen

Eine der wichtigsten Reaktionen, die von P450 Monooxygenasen katalysiert werden, ist die selektive Oxidierung von nicht aktivierten Kohlenwasserstoffverbindungen durch molekularen Sauerstoff. Auf

diese Weise können unter anderem Steroide regio- und stereoselektiv hydroxyliert werden. Durch die Hydroxylierung von Steroiden können so wertvolle Steroidhormone, wie zum Beispiel Glucocorticoide, Mineralcorticoide und Sexualhormone, synthetisiert werden [12,23]. In der Natur kommen Steroide in großer Zahl vor. Ihre Struktur leitet sich von dem Sterangrundgerüst ab, welches in Abbildung 7 dargestellt ist. Es besteht aus drei sechsgliedrigen Ringen (A, B, C) und einem fünfgliedrigen Ring (D) mit insgesamt sechs Stereozentren (5, 10, 8, 9, 13, 14). Ergänzt werden Steroide durch unterschiedliche funktionelle Gruppen, wie zum Beispiel Hydroxylgruppen. Die Art, Anzahl und Position dieser funktionellen Gruppen hat direkten Einfluss auf die physiologische Aktivität der Steroide, wie zum Beispiel Zellteilung und -differenzierung, die Regulation der Expression verschiedener Gene oder die Regulation von Signalübertragungswegen durch Binden der Steroide an spezifische intrazelluläre Rezeptoren [34]. Steroide sind als pharmazeutische Wirkstoffe für unsere Gesellschaft aufgrund ihrer riesigen Wirkspanne von sehr großer therapeutischer Bedeutung. So gibt es beispielsweise Steroide mit Antitumor-, entzündungshemmender, antimikrobieller, antiviraler, antimykotischer, antiöstrogener, antiepileptischer und antiallergischer Aktivität, die zur akuten und präventiven Therapie vieler verschiedener Krebsarten, Stoffwechselstörungen und altersbedingter Erkrankungen eingesetzt werden. Bis heute sind ungefähr 300 verschiedene pharmazeutische Steroide zugelassen, welche die zweitgrößte Sparte auf dem Markt für medizinische Produkte, direkt nach den Antibiotika, darstellen [34]. Die stereo- und regioselektive Addition von funktionellen Gruppen an Steroide ist daher äußerst wichtig für die Entwicklung von neuartigen pharmazeutisch wirksamen Steroiden. Aktuelle Studien zur Identifikation neuer Biokatalysatoren untersuchen z.B. die Oxyfunktionalisierung der Positionen 7α , 9α , 11α , 11β , 16α und 17α [20,34,40,41]. Die Oxyfunktionalisierung der Position 11 ist vor allem wichtig für die Herstellung von therapeutischen Wirkstoffen, wie Hydrocortison mit entzündungshemmenden Eigenschaften. Die Hydroxylierung der Position 16 ist dagegen zur Synthese von Glucocorticoiden wichtig [23].

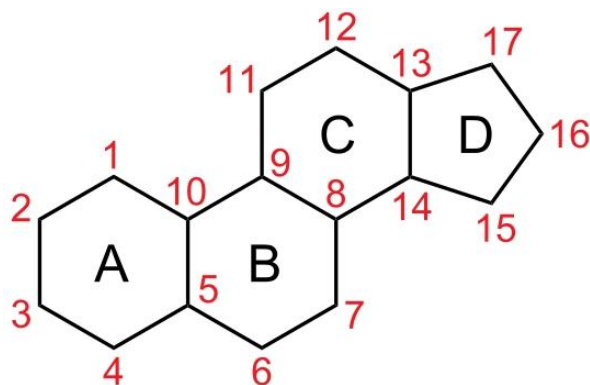


Abbildung 7. Steranstrukturformel: Zu erkennen ist der typische Aufbau des Sterangrundgerüsts mit den 17 Kohlenstoffatomen, welche durch rote Ziffern (1 - 17) hervorgehoben sind, den drei sechsgliedrigen Ringen, A, B, C, und dem fünfgliedrigen Ring, D, welche ebenfalls durch Beschriftung in schwarz gekennzeichnet sind.

Da sehr viele eukaryotische P450 Monooxygenase in ihrer natürlichen Funktion eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Steroidhormonen spielen, sind sehr viel mehr eukaryotische als prokaryotische P450 Monooxygenasen zu der Hydroxylierung von Steroidsubstraten fähig. Ihr biotechnologischer Nutzen ist jedoch stark eingeschränkt, da sie einerseits membrangebunden vorliegen [46] und andererseits eine vergleichsweise niedrige Aktivitäten aufweisen [20]. Bakterielle P450 Monooxygenasen liegen dagegen löslich vor und können in großen Mengen überexprimiert werden, so dass eine wesentlich höhere Gesamtaktivität der prokaryotischen P450 erreicht werden kann. Allerdings sind nur sehr wenige bakterielle P450 Monooxygenasen bekannt, die die Hydroxylierung von Steroiden katalysieren können [122]. So konnten zum Beispiel Agematu *et al.* nur für 24 von 213 unterschiedlichen bakteriellen P450 Monooxygenasen Aktivität zur Hydroxylierung von Testosteron nachweisen. Eine dieser P450 Monooxygenasen ist CYP154C5 aus dem humanpathogenen Krankheitserreger *Nocardia farcinica* [1], welche zuvor von Ishikawa *et al.* durch das Screening des vollständigen Genoms von *N. farcinica* IFM 10152 als putative P450 Monooxygenase identifiziert werden konnte [53].

N. farcinica gehört zu den *Actinobacteria* und ist ein Bodenbakterium, welches ein möglicher Auslöser der sogenannten Nocardiose ist. Diese ist eine granulomatöse Infektionskrankheit, an der hauptsächlich immungeschwächte Personen erkranken und die Lunge, Gehirn, das zentrale Nervensystem oder die Haut befallen kann [53]. CYP154C5 ist eine Klasse I Cytochrom P450 Monooxygenase, deren Eigenschaft, Testosteron mit hoher Aktivität selektiv an der 16 α -Position zu hydroxylieren, von Agematu *et al.* nachgewiesen [1] und von Bracco *et al.* eingehender charakterisiert wurde [20]. Da die natürlichen Elektronentransferkomponenten von CYP154C5 bislang unbekannt sind, konnten sie unter anderem durch die Elektronentransferkomponenten Putidaredoxinreduktase (Pdr) und Putidaredoxin (Pdx) des P450cam-Systems aus *Pseudomonas putida* erfolgreich ersetzt werden [1,20,89].

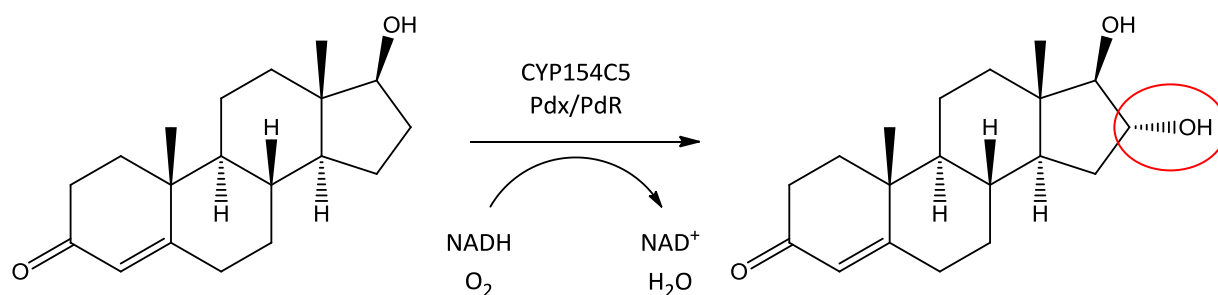


Abbildung 8. Hydroxylierung der 16 α -Position von Testosteron durch die Klasse I Cytochrom P450 Monooxygenase CYP154C5 aus *Nocardia farcinica* mit den Elektronentransferkomponenten Pdx und Pdr des P450cam-Systems.

1.7 Substratlimitierung in der Ganzzellbiokatalyse

Die Biokatalyse ist zweifelsfrei eine sehr wichtige, immer häufiger genutzte Möglichkeit zur umweltfreundlichen Synthese von Feinchemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen. In einigen industriellen Prozessen werden Enzyme bereits häufiger in Form von Ganzellsystemen als in Form isolierter

Enzyme zur Biokatalyse eingesetzt [108]. Grundsätzlich benötigen isolierte Enzyme aufwendigere *upstream* Verfahren, während Ganzzellsysteme mit einem höheren *downstream* Aufwand verbunden sind. Der größte Vorteil ganzer Zellen ist die Möglichkeit, auf die aufwendige Regeneration von teuren Cofaktoren verzichten zu können, da NADH und NADPH durch den zelleigenen Metabolismus regeneriert werden. NADH kann in Glykolyse und Zitronensäurezyklus und NADPH in der oxidativen Phase des Pentose Phosphatwegs regeneriert werden. Desweiteren zeigen Enzyme in Ganzzellsystemen eine wesentlich höhere Stabilität, als in isolierter und aufgereinigter Form. In einigen Fällen ermöglichen sie zudem Reaktionen, die durch isolierte Enzyme nicht katalysiert werden können. So wird durch Ganzzellbiokatalyse zum Beispiel der Einsatz von Enzymkaskaden möglich, welche die Synthese von Stoffen ermöglichen, die nur von mehr als einem Enzym synthetisiert werden können [118].

Der Einsatz von Ganzzellbiokatalysatoren besitzt daher auf der einen Seite einige entscheidende Vorteile. Auf der anderen Seite laufen Biotransformationen mit Ganzzellsystemen in der Regel ein- bis zweimal langsamer ab, da die natürliche Funktion der Zellwand im Kontrast zu den Bedürfnissen der Industrie steht. Verhindert die Zellwand in der Natur die Aufnahme von für die Zelle toxischen Substanzen, kann sie in industriellen Prozessen effektiv die Aufnahme mancher Substrate bzw. das Freisetzen einiger Produkte einschränken. Die langsame Substrataufnahmerate wirkt sich dann entsprechend limitierend auf die Substratumsatzraten aus. Die reduzierte Produktabgaberate kann zum Akkumulieren von für die Zelle toxischen Produkten innerhalb der Zelle und damit zu Produktinhibition führen [25]. Vor allem die Biotransformation von hydrophoben Substraten, wie zum Beispiel die Hydroxylierung von Steroiden mit P450 Monooxygenasen, kann in einigen Fällen durch eine stark eingeschränkte Substrataufnahmerate verlangsamt werden. So stellt vor allen Dingen die Zellwand der gramnegativen Bakterien aufgrund ihrer Beschaffenheit eine sehr effektive natürliche Barriere gegen die Aufnahme von hydrophoben Molekülen dar [10,81]. Der Aufbau der gramnegativen Zellwand ist in Abbildung 9 dargestellt.

Gramnegative Bakterien sind von zwei Membranen umgeben. Bei der inneren Membran handelt es sich um eine gewöhnliche Lipiddoppelschicht, die aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften für die Aufnahme von hydrophoben Substanzen kein Problem darstellt [25]. Im Gegensatz dazu besteht die äußere Membran jedoch aus einer inneren Schicht Phospholipiden und einer äußeren Schicht Lipopolysaccharide (LPS). Die Zuckermoleküle der sogenannten LPS-Schicht schränken äußerst effektiv die spontane Diffusion von hydrophoben Molekülen durch die Zellwand und somit sowohl die Aufnahme von Substrat-, als auch die Abgabe von Produktmolekülen ein. Studien haben gezeigt, dass hydrophobe Moleküle ungefähr 100 bis 150 mal langsamer durch die amphiphile LPS-Schicht dringen können, als durch eine Lipiddoppelschicht [25].

Um dennoch den Transport von Molekülen durch die äußere Membran zu ermöglichen, enthält sie Transportproteine. Die regulären Transportproteine der äußeren Membran werden in drei verschiedene Klassen eingeteilt. Die Porine, wie OmpC oder OmpF, erlauben nur die unspezifische Aufnahme von kleinen hydrophilen Molekülen, die nicht größer als 0,6 kDa sind. Die zweite Klasse sind substratspezifische Kanäle, wie beispielsweise der Zuckertransporter LamB aus *E. coli*, der Maltose und Maltodextrin transportieren kann. Bei der dritten Klasse handelt es sich um die TonB-anhängigen Rezeptoren, aktive Transporter, die hydrophile Moleküle gegen einen Konzentrationsgradienten transportieren können. In einer Vielzahl von Studien konnte nur einer sehr geringen Anzahl dieser Transportproteine eine Aktivität für hydrophobe Moleküle nachgewiesen werden. Eine der wenigen Ausnahmen bildet zum Beispiel FadL aus *E. coli*, welches langkettige Fettsäuren transportieren kann [10]. Die Aufnahme und Ausschleusung von hydrophoben Molekülen findet daher im Allgemeinen fast ausschließlich durch passive Diffusion statt.

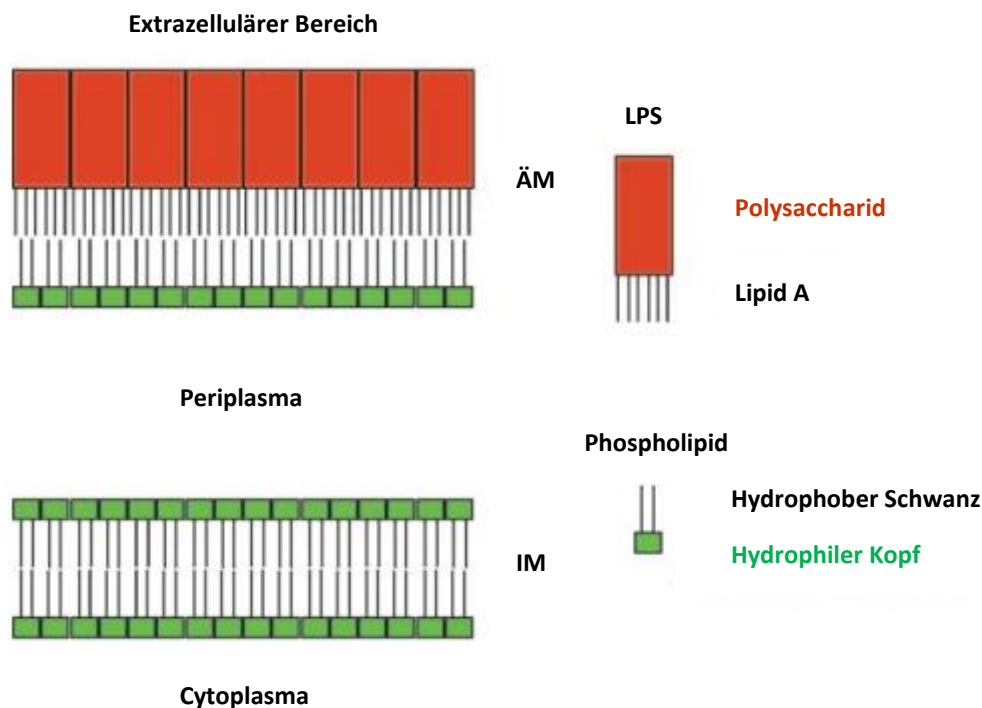


Abbildung 9. Schematische Darstellung des Aufbaus der gramnegativen Bakterienzellwand. IM: Innere Membran. ÄM: Äußere Membran. Die Abbildung wurde von den Berg *et al.* [10] entnommen.

Ein weiteres Problem hydrophober Substrate ist die geringe Löslichkeit in wässrigen Medien, was die Bioverfügbarkeit zusätzlich reduziert. Aus diesem Grund werden in der Biokatalyse entweder organische Medien als Lösungsmittel zugesetzt [73] oder die Löslichkeit der hydrophoben Substrate und die Permeabilität der Zellwände durch Zusatz von Detergenzien, Tensiden und Cyclodextrinen verbessert [72]. Allerdings sind diese Additive im industriellen Maßstab entweder zu teuer oder wirken sich negativ auf die Stabilität der Zellwand aus.

1.8 Mutagenese

Besitzt ein Enzym oder Protein nicht die Eigenschaften, die für einen industriellen Prozess benötigt werden, können sie durch Protein *engineering* „maßgeschneidert“ werden. Durch gerichtete Evolution oder rationales Proteindesign ist es möglich, maßgeschneiderte Enzyme und Proteine zu generieren, welche die gewünschten Eigenschaften, wie zum Beispiel eine andere Stereo- oder Regioselektivität oder ein erhöhtes Temperaturoptimum besitzen.

Bei der gerichteten Evolution wird durch rekombinierende oder nichtrekombinierende Methoden eine unbestimmte Anzahl Mutationen zufällig in ein Protein eingeführt. Die häufigste in der Biotechnologie verwendete nichtrekombinierende Methode ist die *error prone* Polymerasekettenreaktion [27], in der ein Gen durch eine DNA-Polymerase mit reduzierter Korrekturlesefunktion amplifiziert wird. Durch Variation der Bedingungen der Polymerasekettenreaktion (PCR) und der Zusammensetzung des PCR *master mix*, kann die Fehlerrate zusätzlich erhöht werden. Aufgrund des degenerierten genetischen Codes (*codon bias*), einem unterschiedlichen Mutationsspektrum der eingesetzten Polymerasen (*error bias*) und da bestimmte Arten von Mutationen häufiger eingebaut werden als andere (*mutational bias*), existiert jedoch ein hohes Ungleichgewicht in Häufigkeit und Art der Mutationen. In Folge dessen wurden eine Vielzahl von Methoden entwickelt, die zum Beispiel durch Verwendung von Nucleotidanaloga die Fehlerrate und das Verhältnis von Transversionen zu Transitionen beeinflussen können [117,121]. Rekombinierende Methoden beruhen auf der homologen Rekombination von Genen, die als natürlicher Evolutionsprozess, genau wie einzelne Mutationen, zur Entwicklung neuer und zur Verbesserung bereits vorhandener Proteine *in vivo* führen kann. Die bekannteste rekombinierende Methode ist das sogenannte *DNA shuffling*, das bereits 1994 von Stemmer *et al.* entwickelt wurde [107]. Damit eine verbesserte Mutante identifiziert werden kann, müssen die generierten Mutantenbibliotheken aufwendig durch *screening* oder Selektion durchgemustert werden. Durch *screening* können Klone mittels Protein-spezifischen Hochdurchsatztests getestet werden. Bei der Selektion können nur die Klone überleben, die die gewünschte Mutation oder Eigenschaft besitzen [2,49]. Da durch Selektion wesentlich größere Mutantenbibliotheken durchgemustert werden können, ist sie zwar grundsätzlich zu bevorzugen, allerdings muss häufig erst sehr aufwendig ein funktionierendes Selektionssystem entwickelt werden.

Das rationale Proteindesign beruht auf einer Fülle von Hintergrundinformationen über das Protein, dessen Struktur und Eigenschaften. Basierend auf den Informationen, die über das Protein bekannt sind, können ganz gezielt Mutationen durch ortsspezifische Mutagenese in ein Protein eingebaut werden, die dann zu der gewünschten Eigenschaft führen. Häufig wird zur Berechnung von sinnvollen Mutanten Software aus der Bioinformatik herangezogen, mit denen beispielsweise berechnet werden kann, ob ein Protein stabiler wird, wenn an einer spezifischen Stelle eine bestimmte Aminosäure gegen eine andere ausgetauscht wird. Die generierten Mutanten eines rationalen Proteindesigns

durchzumustern, ist wesentlich schneller und einfacher, da im Gegensatz zu den riesigen Bibliotheken der gerichteten Evolution nur eine sehr kleine überschaubare Anzahl an Mutanten getestet werden muss.

1.9 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung des Substratumsatzes hydrophober Substrate in Ganzzellbiotransformationen mit *E. coli* anhand des Beispiels von Steroidhydroxylierungen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen. Dabei sollte die limitierende Substrataufnahme in den Ganzzellbiokatalysen durch den Einsatz von Elicitinen vermindert und der Umsatz somit verbessert werden, um so letztendlich auf den Einsatz von teuren oder Zellwand-destabilisierenden Additiven verzichten zu können.

Um dies zu erreichen, musste zunächst ein schnelles und einfaches System zur heterologen Expression und Aufreinigung rekombinanter Elicitine in *E. coli* etabliert werden. Da die lösliche Expression der Elicitine in *E. coli* zuvor an den drei konservierten Disulfidbrücken gescheitert war, sollten unterschiedliche Wege zur heterologen Expression von Disulfidbrückenproteinen in *E. coli* getestet werden. Die Expression von vier Elicitinen, α -Capsicein aus *Phytophthora capsici*, α -Megaspermin aus *Phytophthora megasperma*, β -Cinnamomin aus *Phytophthora cinnamomi* und β -Cryptogein aus *Phytophthora cryptogea*, sollte cytoplasmatisch in Stämmen, die für die Expression von Disulfidbrückenproteinen in *E. coli* optimiert wurden, oder durch Sekretion ins Periplasma von *E. coli* optimiert werden. In einem weiteren Ansatz sollte die Anzahl der Disulfidbrücken durch ortsspezifische Mutagenese verringert werden. Da die Aufreinigung der Elicitine bislang aus mindestens zwei chromatographischen Schritten bestand und die Aufreinigung durch immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie mittels His-tag noch nicht versucht worden war, sollte auch die Expression und Aufreinigung mit N- bzw. C-terminalem His-tag getestet werden. Um die funktionelle Expression der Elicitine sicherzustellen, sollte anschließend die Sterolbindefähigkeit der exprimierten Elicitine getestet werden.

Um den grundlegenden Beweis zu erbringen, dass Elicitine einen positiven Einfluss auf den Substratumsatz von Ganzzellbiokatalysen mit *E. coli* zu zeigen, sollten Ganzzellbiotransformationen mit Zusatz von aufgereinigtem Elicitin untersucht werden. Als Beispielreaktion sollte die Hydroxylierung von sechs Steroidsubstraten (siehe Abbildung 10) durch *E. coli* C43(DE3)-Zellen dienen, in welchen zuvor die P450 Monooxygenase CYP154C5 aus *N. farcinica* und die Elektronentransferkomponenten Pdx und PdR des P450cam-Systems coexprimiert wurden. Im Anschluss daran sollte die Coexpression der Elicitine mit CYP154C5, Pdx und PdR in *E. coli* C43(DE3) getestet werden. Die Hydroxylierung der sechs Steroide sollte dann mit dem so modifizierten Ganzzellbiokatalysator getestet werden, um den Effekt der Elicitine auch *in-vivo* auf den Steroidumsatz zu untersuchen.

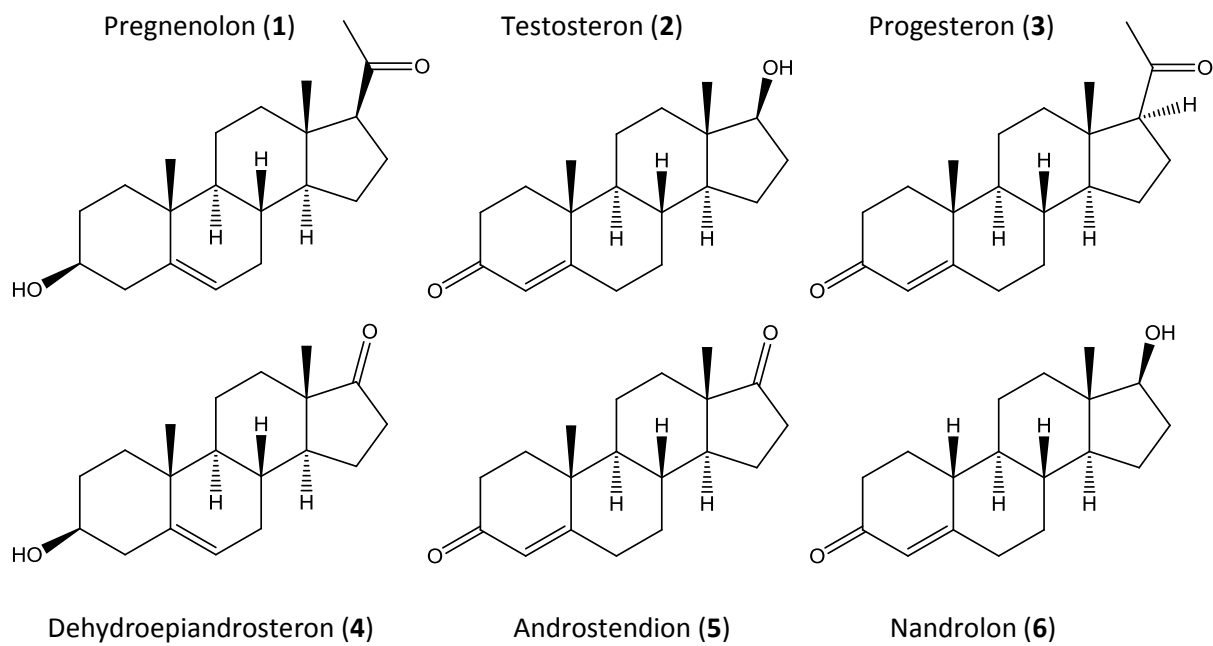


Abbildung 10. Strukturformeln der sechs Steroids substrate Pregnenolon (1), Testosteron (2), Progesteron (3), Dehydroepiandrosteron (4), Androstendion (5) und Nandrolon (6), deren Umsatz in dieser Arbeit, mit und ohne Zusatz von Elicitin, getestet werden sollte.

2 Ergebnisse

2.1 Design der synthetischen Elicitingene

Um die Expression der Elicitine in *E. coli* zu etablieren, wurden die vier Elicitine α -Capsicein (Accession: [Q547Q9](#)), α -Megaspermin (Accession: [Q8L691](#)), β -Cinnamomin (Accession: [Q9T0M7](#)) und β -Cryptogein (Accession: [P15570](#)) ausgewählt. Zu den beiden β -Elicitinen existierten zu Beginn der Arbeit bereits Kristallstrukturen, die sich bei einer späteren gerichteten Evolution von Vorteil erweisen hätten können und mehrere Publikationen, in denen gezeigt wurde, dass es sich bei beiden Elicitinen um gute Steroltransporter handelt. Da sich β -Cryptogein bislang nicht in *E. coli* exprimieren ließ und die beiden β -Elicitine eine hohe Sequenzidentität aufwiesen, wurden daher zusätzlich die beiden α -Elicitine ausgewählt, da diese etwas größere Sequenzunterschiede besaßen und so vielleicht eine heterologe Expression in *E. coli* ermöglichen würden. Weil die Expression der nativen β -Cryptogeingensequenz zuvor misslang [83], sollten die synthetischen Gene der vier Elicitine außerdem in *E. coli* Codongebrauch generiert werden.

Die Proteinsequenzen der vier Proteine wurden der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen und mit Hilfe der Gene Designer Software Version 1.1.4.1 der Firma DNA 2.0 (Menlo Park, USA) in die DNA-Sequenz in *E. coli* Codongebrauch „zurücktranslatiert“. Da die Elicitine im Anschluss an die Expression unter anderem über His-tag aufgereinigt werden sollten, sich aber auf dem pET-28a(+)-Plasmid im Anschluss an den N-terminalen His-tag eine Thrombinerkennungssequenz befand, wurden zusätzlich die Erkennungssequenz der spezifischeren TEV-Protease und ein N-terminaler His-tag an den Anfang der synthetischen Gene gestellt. Durch voranstellen einer *NcoI*-Restriktionsschnittstelle wurde so der Austausch der Erkennungssequenz der weniger spezifischen Thrombinprotease mit der TEV-Erkennungssequenz während der Klonierung in pET-28a(+) ermöglicht. Damit die synthetischen Gene auch in pBADN kloniert werden konnten, wurde zwischen der TEV-Erkennungssequenz und den eigentlichen Genen eine *NdeI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt, um so anschließend die Klonierung in pBADN ohne His-tag zu ermöglichen. Als zweite Restriktionsschnittstelle für die Klonierung in pET-28a(+) und pBADN wurde die *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle C-terminal an die synthetische Gene angehängt. Die synthetischen Gene der vier Elicitine *cap*, *meg*, *cin* und *cry* wurden von der Firma Mr. Gene GmbH synthetisiert und in den pMA-T-Plasmiden geliefert. Die Plasmide mit den synthetischen Genen wurden in *E. coli* Top10 transformiert und die Gene anschließend durch Sequenzierung verifiziert.

2.2 Expression und Proteinaufreinigung der Elicitine

Zunächst sollte die Expression der Elicitine in *E. coli* optimiert werden, da die lösliche Expression der Elicitine in *E. coli* zuvor nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Da letztendlich der Steroidsubstratumsatz in der Biokatalyse durch Coexpression der Elicitine mit CYP154C5, Pdx und PdR in *E.*

coli verbessert werden sollte, musste daher zuerst die Expression optimiert werden und ausreichend Elicitin hergestellt werden, bevor mit den biokatalytischen Versuchen begonnen werden konnte.

2.2.1 Cytoplasmatische Expression in *Escherichia coli*

Die cytoplasmatische Expression der Elicitine wurde in den beiden *E. coli*-Stämmen SHuffle® T7 und SHuffle® T7 Express getestet, die für die Expression von Proteinen mit mehreren Disulfidbrücken im Cytoplasma optimiert wurden, indem unter anderem sowohl die Glutathionreduktase Gor, als auch die Thioredoxinreduktase TrxB „ausgeknockt“ wurden. Um die korrekte Bildung der Disulfidbrücken im Cytoplasma zusätzlich zu unterstützen, exprimieren die Stämme konstitutiv eine chromosomale Kopie der Disulfidisomerase DsbC. *E. coli* SHuffle® T7 Express ist außerdem Lon- und OmpT-defizient, der *E. coli* SHuffle® T7-Stamm trägt das *lacI*^q-Allel, das die Repression des lac-Promotors um einen Faktor von ungefähr fünf bis zehn verbessert. Als Expressionsplasmide wurden pET-28a(+) und pBADN ausgewählt. Ersteres gehört zu den pET-Plasmiden von Merck Millipore, mit denen bereits viele Proteine mit Hilfe der starken T7-Polymerase unter Kontrolle des Lac-Promotors sehr erfolgreich exprimiert werden konnten. Bei pBADN handelte es sich um eine von Jin *et al.* [56] modifizierte Variante des kommerziellen pBAD/myc-HisA von Invitrogen. Von pBADN sollten die Elicitine über den etwas schwächeren Arabinosepromotor araBAD exprimiert werden. Durch Verwendung unterschiedlicher Arabinosekonzentrationen können mit Hilfe von pBADN in einigen Fällen verschieden starke Expressionslevel erreicht werden. Beide Plasmide besitzen den pBR322 Replikationsursprung, was die spätere Coexpression von CYP154C5 mit pIT2 und Pdx/PdR mit pACYCDuet™-1 ermöglicht. pET-28a(+) wurde zur Expression der Elicitine mit His-tag und pBADN zur Expression ohne His-tag gesucht. Zunächst wurde nur die Expression der beiden besseren Steroltransporter β -Cinnamomin und β -Cryptogein getestet, um zu ermitteln, ob sich eines der beiden Plasmide als signifikant besser zur Expression der Elicitine herausstellte und um die optimalen Expressionsbedingungen zu etablieren.

2.2.1.1 Expression mit pBADN

Die Expression der beiden β -Elicitine mit pBADN wurde in beiden SHuffle®-Stämmen ohne His-tag getestet.

2.2.1.1.1 Klonierung der Plasmide pBADNCin und pBADNCry

Die synthetischen Gene *cin* und *cry* der Elicitine β -Cinnamomin und β -Cryptogein konnten mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *EcoRI* erfolgreich aus dem pMA-TCin- und dem pMA-TCry-Plasmid in pBADN (siehe Abbildung 62 in Abschnitt 7.3) kloniert werden. Die Konstrukte pBADNCin und pBADNCry wurden in *E. coli* Top10 transformiert, die Plasmide durch einen Kontrollverdau mit *NdeI* und *EcoRI* überprüft, anschließend sequenziert und zur Expression in chemisch kompetente *E. coli* SHuffle® T7- und SHuffle® T7 Express-Zellen transformiert.

2.2.1.1.2 Testexpression im Schüttelkolben

Um die Expression der beiden β -Elicitine mit pBADN im *E. coli* Cytoplasma zu testen, wurde die Expression von β -Cinnamomin und β -Cryptogein in beiden SHuffle®-Stämmen in 25 mL *terrific broth* (TB)-Medium im Schüttelkolben mit 0,2 % Arabinose induziert und bei 30 °C bzw. 37 °C für 41 bzw. 44 h exprimiert und anschließend geerntet. Von den Expressionen bei beiden Temperaturen wurde direkt vor der Induktion eine Probe genommen. Während der Expression der 30 °C-Kulturen wurden nach 1,5, 16, 25,5 und 41 h jeweils eine weitere Proben genommen. Bei den 37 °C-Kulturen wurden die Proben nach 4,5, 19, 28,5 und 44 h genommen. Die Proben wurden aufgeschlossen und über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12).

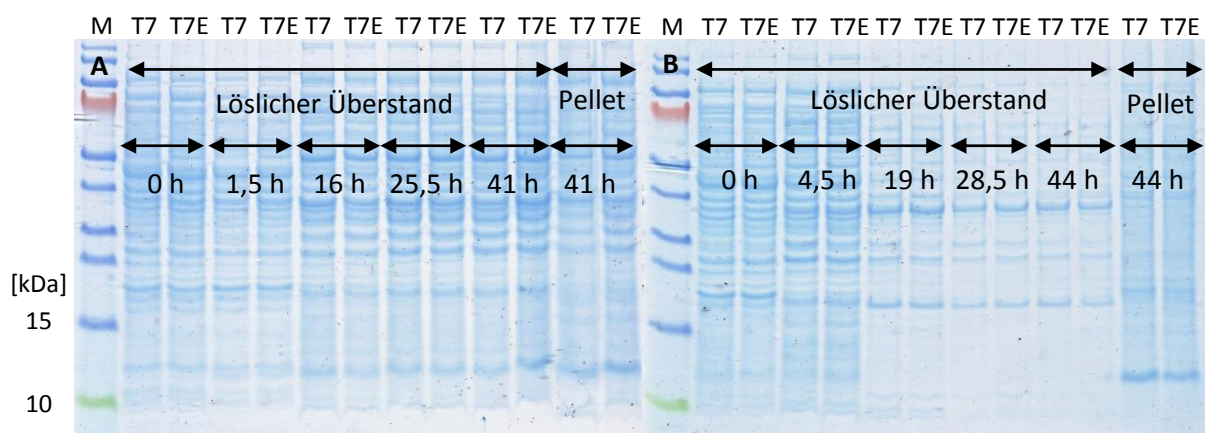


Abbildung 11. Cytoplasmatische Expression von β -Cinnamomin mit pBADN in *E. coli* SHuffle® T7 und SHuffle® T7 Express bei 30 °C (A) und 37 °C (B): M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. T7: SHuffle® T7. T7E: SHuffle® T7 Express.

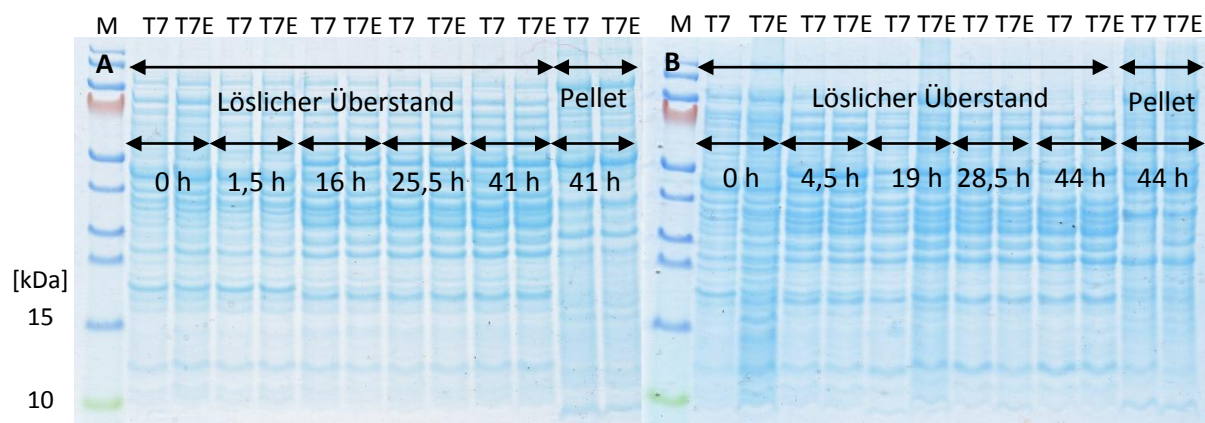


Abbildung 12. Cytoplasmatische Expression von β -Cryptogein mit pBADN in *E. coli* SHuffle® T7 und SHuffle® T7 Express bei 30 °C (A) und 37 °C (B): M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. T7: SHuffle® T7. T7E: SHuffle® T7 Express.

Bei der erwarteten Höhe von 10 kDa war auf keinem der Gele eine Expression der Elicitine nachweisbar, jedoch waren schwache Banden auf einer Höhe von 12 kDa erkennbar. Obwohl β -Cinnamomin und β -Cryptogein ein theoretisches Molekulargewicht von 10,3 kDa besitzen, laufen ihre Banden vermutlich auf einer Höhe von ca. 12 kDa. Bereits in der Publikation von O'Donohue *et al.* [83] be-

fand sich die Bande des aufgereinigten β -Cryptogeinwildtyps auf einer Höhe von ca. 11 bis 12 kDa, weshalb die Banden auf dieser Höhe in den Gelen in Abbildung 11 und Abbildung 12 den beiden Elicitinen zugeordnet werden konnten. In den löslichen Fraktionen der Kulturen der vier Expressionsstämme bei 30 °C und 37 °C sind von der Induktion bis zum Ende der Expression zu jedem Zeitpunkt unterschiedlich intensive Proteinbanden bei 12 kDa zu erkennen, die auf eine schwache Expression der Elicitine hindeuten. Die Expression von löslichem β -Cinnamomin mit pBADNCin bei 30 °C funktionierte in beiden *E. coli*-Stämmen deutlich besser als bei 37 °C, obwohl die Kulturen bei 30 °C sogar vier Stunden kürzer exprimiert worden waren. Abgesehen von der Temperatur scheint sich *E. coli* SHuffle® T7 Express besser zur Expression von β -Cinnamomin zu eignen. Bei Vergleich der Proteinbanden zum Zeitpunkt 41 bzw. 44 h erweist sich die Expression von pBADNCin in *E. coli* SHuffle® T7 Express bei 30 °C als am stärksten. Für die Expression mit pBADNCry scheint die Wahl des Expressionsstammes keinen Unterschied zu machen, die Expression bei 37 °C schien jedoch ein minimal besseres Expressionsergebnis zu erzielen, als die Expression bei 30 °C. Die Banden in den Pelletfraktionen der beiden Expressionen mit pBADNCin, insbesondere der 37 °C Expression, weisen auf eine relativ hohe Expression von β -Cinnamomin in Form von *inclusion bodies* hin. β -Cryptogein auf der anderen Seite scheint fast gar nicht in Form von *inclusion bodies* exprimiert worden zu sein, da in Abbildung 12 weder in den Pelletfraktionen bei 30 °C noch bei 37 °C signifikante Banden identifiziert werden konnten. Auch fällt die Expression von löslichem Protein im direkten Vergleich mit der β -Cinnamominexpression bei 30 °C deutlich schwächer aus.

2.2.1.1.3 pBADNCin Pilotexpression

Da mit *E. coli* SHuffle® T7 Express pBADNCin die höchste Expression von allen vier Varianten erzielt werden konnte, wurde dieser Stamm für eine Pilotexpression mit unterschiedlich starker Induktion ausgewählt, um den Einfluss der Induktorkonzentration auf das Expressionsniveau und die lösliche Expression der Elicitine zu untersuchen. Der Pilotexpressionsversuch wurde in drei parallelen Ansätzen durchgeführt, die in jeweils 25 mL Luria-Bertani-Medium (LB) mit 0,2, 0,02 oder 0,002 % Arabinose induziert und anschließend für 4 h bei 37 °C exprimiert wurden. Von jeder der drei Kulturen wurden Proben nach dem Animpfen der Kulturen, unmittelbar vor der Induktion und nach der Expression genommen. Die Proben wurden aufgeschossen und sowohl der lösliche Überstand, als auch die Pelletfraktion mit dem unlöslichen Protein auf dem SDS-Gel analysiert (siehe Abbildung 13).

Auch in dem Pilotexpressionsversuch mit variierenden Induktorkonzentrationen konnte β -Cinnamomin nicht überexprimiert werden. In Abbildung 13 war zwar auf Gel A zum Zeitpunkt der Induktion in den Fraktionen mit dem löslichen Protein eine schwache Bande bei 12 kDa in allen drei Kulturen erkennbar. Da diese jedoch im Anschluss in der 4 h Expressionsprobe nicht mehr auffindbar war und es sich bei dem pBAD-Promotor außerdem um einen sehr stark regulierten Promotor handelt, musste diese Bande vermutlich *E. coli* Protein zugeordnet werden. In den Pelletfraktionen auf Gel B war bei

einer Induktion mit 0,2 % Arabinose im Gegensatz zu dem voran gegangenen Experiment nur eine sehr schwache Expression in Form von *inclusion bodies* zu beobachten, bei der Induktion mit 0,02 % und 0,002 % Arabinose war nach 4 h jeweils eine etwas deutlichere Bande zu erkennen. Weil die Expression des Elicitins daher auch durch die Variation der Induktorkonzentration nicht verbessert werden konnte, das exprimierte Elicitin keinen His-tag besaß und sich die parallel getestete Expression mit pET-28a(+) als signifikant besser erwies (siehe Abschnitt 2.2.1.2), wurde daher die Strategie zur Expression der Elicitine mit Hilfe der pBADN-Plasmide nicht weiter verfolgt. Aus diesem Grund wurde auch die Expression der beiden α -Elicitine mit pBADN nicht getestet.

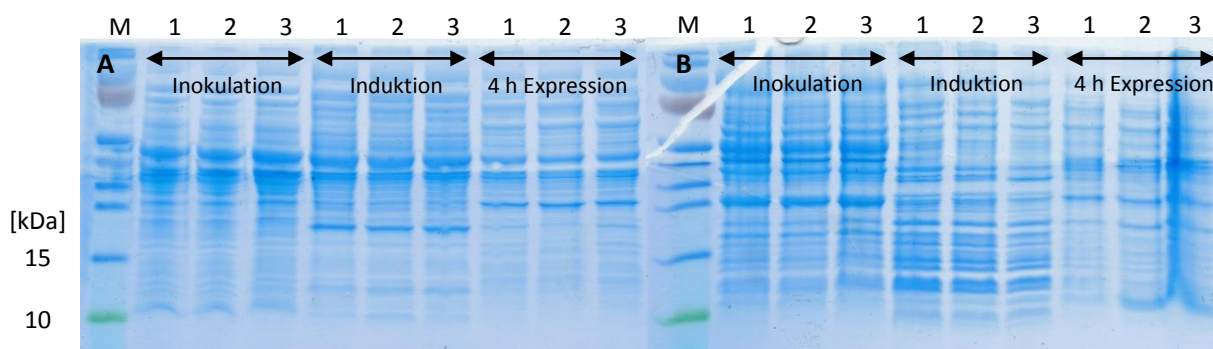


Abbildung 13. Löslicher Überstand (A) und Pelletfraktionen (B) der Pilotexpression mit pBADNCin in *E. coli* SHuffle® T7 Express bei 37 °C: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 1: 0,2 % Arabinose. 2: 0,02 % Arabinose. 3: 0,002 % Arabinose.

2.2.1.2 Expression mit pET-28a(+)

Die Expression der Elicitine mit pET-28a(+) wurde in *E. coli* SHuffle® T7 und SHuffle® T7 Express mit N-terminalen His-tag getestet.

2.2.1.2.1 Klonierung

Die Gene der vier Elicitine *cin*, *cry*, *cap* und *meg* wurden mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *EcoRI* inklusive des N-terminalen His-tags und der TEV-Schnittstelle erfolgreich aus den pMA-T-Plasmiden in das pET-28a(+)-Plasmid (siehe Abbildung 63 in Abschnitt 7.3) kloniert. Die resultierenden pET-28a(+)-HisCin-, pET-28a(+)-HisCry-, pET-28a(+)-HisCap- und pET-28a(+)-HisMeg-Plasmide wurden in *E. coli* Top10 transformiert und der Erfolg der Ligation durch einen Kontrollverdau mit *NcoI* und *EcoRI* untersucht. Anschließend wurden die Plasmide durch Sequenzierung auf Mutationen überprüft und zur cytoplasmatischen Expression in chemisch kompetente Zellen der *E. coli*-Stämme SHuffle® T7 und SHuffle® T7 Express transformiert.

2.2.1.2.2 Testexpression im Schüttelkolben

Parallel zu der Testexpression der β -Elicitine mit pBADNCin und pBADNCry wurde die cytoplasmatische Expression der beiden Elicitine mit pET-28a(+) in *E. coli* SHuffle® T7 und SHuffle® T7 Express durchgeführt. Dazu wurde die Expression der beiden Elicitine in jeweils 25 mL TB mit 0,8 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und die Kulturen anschließend bei 15, 30 und 37 °C

inkubiert. Vor der Induktion der Expression sowie nach 5, 21, 29 und 45 h Expression wurde jeweils eine Probe genommen und aufgeschossen. Die löslichen Überstände aller Proben und die Pelletfraktionen der 45 h-Probe wurden über SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 14 bis Abbildung 16).

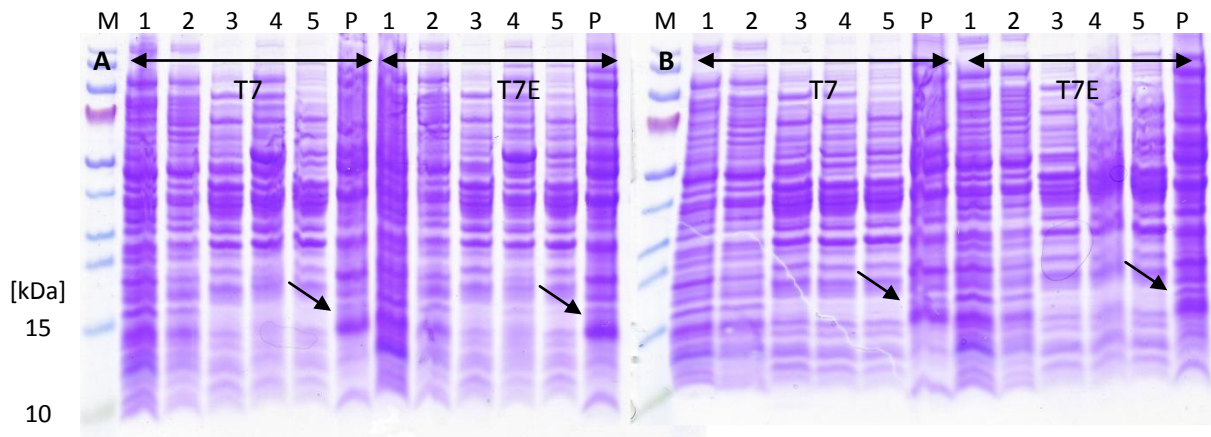


Abbildung 14. Cytoplasmatische Expression von β -Cinnamomin (A) und β -Cryptogein (B) von pET-28a(+) in *E. coli* SHuffle® T7 und SHuffle® T7 Express bei 37 °C: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 1: 0 h löslicher Überstand (ÜS). 2: 5 h ÜS. 3: 21 h ÜS. 4: 29 h ÜS. 5: 45 h ÜS. P: 45 h Pelletfraktion. T7: SHuffle® T7. T7E: SHuffle® T7 Express.

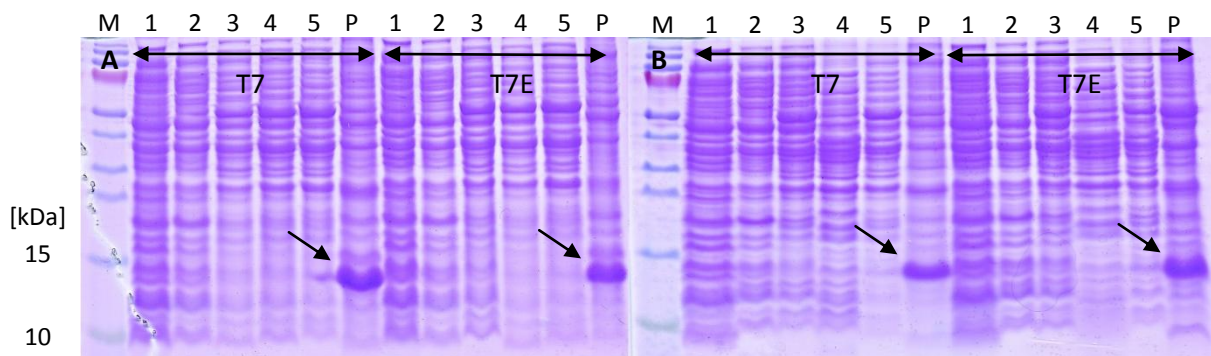


Abbildung 15. Cytoplasmatische Expression von β -Cinnamomin (A) und β -Cryptogein (B) von pET-28a(+) in *E. coli* SHuffle® T7 und SHuffle® T7 Express bei 30 °C: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 1: 0 h löslicher Überstand (ÜS). 2: 5 h ÜS. 3: 21 h ÜS. 4: 29 h ÜS. 5: 45 h ÜS. P: 45 h Pelletfraktion. T7: SHuffle® T7. T7E: SHuffle® T7 Express.

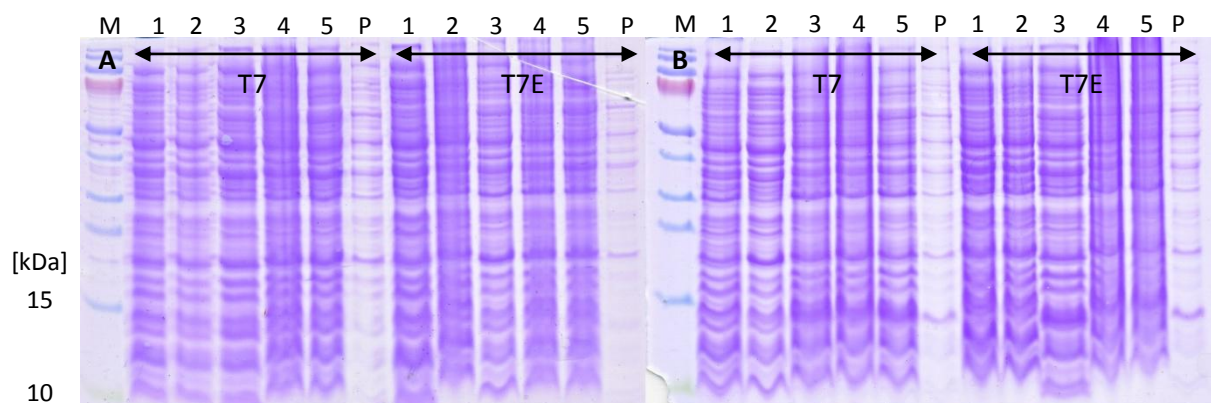


Abbildung 16. Cytoplasmatische Expression von β -Cinnamomin (A) und β -Cryptogein (B) von pET-28a(+) in *E. coli* SHuffle® T7 und SHuffle® T7 Express bei 15 °C: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 1: 0 h löslicher Überstand (ÜS). 2: 5 h ÜS. 3: 21 h ÜS. 4: 29 h ÜS. 5: 45 h ÜS. P: 45 h Pelletfraktion. T7: SHuffle® T7. T7E: SHuffle® T7 Express.

Bereits in diesem ersten Expressionsversuch mit pET-28a(+)HisCin und pET-28a(+)HisCry konnte eine Überexpression der beiden Elicitine nachgewiesen werden. Bei einer Expressionstemperatur von 37 °C führte die Expression von β -Cinnamomin und β -Cryptogein mit pET-28a(+) in *E. coli* T7 und SHuffle® T7 Express zu einer Überexpression in Form von *inclusion bodies*, wenn auch keine Expression in löslicher Form nachgewiesen werden konnte. Das Expressionsniveau von β -Cinnamomin lag dabei leicht höher, als das von β -Cryptogein. Die Banden der *inclusion bodies* lagen bei der Expression mit dem pET-28a(+)-Plasmid auf einer Höhe von ca. 14 kDa. Das Senken der Expressionstemperatur auf 30 °C führte, sowohl in *E. coli* SHuffle® T7, als auch in *E. coli* SHuffle® T7 Express, zu einer signifikant erhöhten Expression von beiden Elicitinen in Form von *inclusion bodies*, ohne jedoch die Expression in löslicher Form zu verbessern. Weder β -Cinnamomin noch β -Cryptogein konnten in *E. coli* SHuffle® T7 oder SHuffle® T7 Express bei 15 °C überexprimiert werden. Zwar konnten schwache Banden für die Expression mit pET-28a(+)HisCry und sehr schwache Banden für die Expression mit pET-28a(+)HisCin in Form von *inclusion bodies* auf dem SDS-Gel in den Pelletfraktionen nachgewiesen werden, jedoch konnte keine Expression in löslicher Form festgestellt werden. Zwischen 12 und 15 kDa befanden sich zwar mehrere Proteinbanden, von denen jedoch keine eindeutig einem der beiden Elicitine zugeordnet werden konnte. Da sowohl das Expressionsniveau in *E. coli* SHuffle® T7 Express, als auch das Wachstum der *E. coli*-Kulturen im Vergleich zu *E. coli* SHuffle® T7 geringfügig besser war, wurden die folgenden cytoplasmatischen Expressionsversuche mit *E. coli* SHuffle® T7 Express durchgeführt.

2.2.1.2.3 Expression aller Elicitine in TBS-Medium

Um die Expression der beiden β -Elicitine in löslicher Form zu verbessern und gleichzeitig die Expression der beiden anderen Elicitine, α -Capsicein und α -Megaspermin, zu testen, wurde die Expression der vier Elicitine mit pET-28a(+)HisCin, pET-28a(+)HisCry, pET-28a(+)HisCap und pET-28a(+)HisMeg in TB-Medium mit Sorbitol (TBS-Medium) getestet. Das in dem Medium enthaltene Sorbitol wirkt sich verlangsamernd auf den Prozess der Translation aus, so dass den Proteinen mehr Zeit bleibt, um die korrekte Faltung einzunehmen. Die Expression der Elicitine wurde in *E. coli* SHuffle® T7 Express in je 25 mL TBS-Medium mit 0,8 mM IPTG induziert und 24 h bei 30 °C bzw. 37 °C exprimiert. Nach der Expression wurde eine Probe genommen, aufgeschlossen und über SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 17).

Die Kultivierung in TBS-Medium zeigte keinen positiven Einfluss auf das Expressionslevel der Elicitine in löslicher Form. Die vier Elicitine wurden bei 30 und 37 °C auch weiterhin in *inclusion bodies* überexprimiert, ohne dass jedoch eine Verbesserung der löslichen Expression auf dem SDS-Gel erkennbar gewesen wäre. Auch in diesem Experiment zeigte sich bei 30 °C grundsätzlich eine höhere Expression als bei 37 °C, mit Ausnahme von α -Megaspermin, das bei 37 °C am besten in *inclusion bodies* exprimiert wurde. Von allen vier verschiedenen Elicitinen wies β -Cinnamomin die höchste Expression

auf. Da aber auch in diesem Expressionsexperiment keine Banden in den löslichen Überständen sichtbar waren, sollte der Nachweis von löslichem Protein im nächsten Versuch durch His-tag-Aufreinigung erbracht werden.

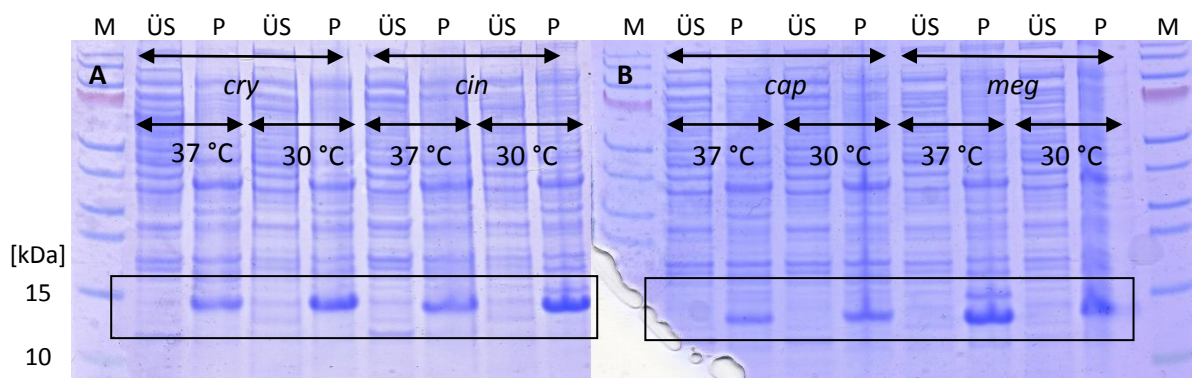


Abbildung 17. Cytoplasmatische Expression von β -Cinnamomin und β -Cryptogein (A) und α -Capsicein und α -Megaspermin (B) in *E. coli* SHuffle® T7 Express bei 30 °C und 37 °C in TB-Medium: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. ÜS: Löslicher Überstand 24 h-Probe. P: Pelletfraktion 24 h-Probe.

2.2.1.2.4 Protino-Aufreinigung der löslichen Überstände der Expressionen aller vier Elicitine

Um löslich exprimiertes Elicitin im Überstand der Expressionen nach dem Zellaufschluss aufzureinigen und somit nachzuweisen, wurden die vier Elicitine zunächst mit pET-28a(+) in *E. coli* SHuffle® T7 Express in jeweils 250 mL TB exprimiert. Die Expression wurde mit 0,4 mM IPTG induziert und die Kulturen für 24 h bei 30 °C exprimiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, aufgeschlossen und die löslichen Überstände anschließend mit dem Protino Ni-IDA Kit aufgereinigt. Die gebundenen Elicitine wurden jeweils in drei Elutionsfraktionen eluiert, die im Anschluss auf einem SDS-Gel analysiert wurden (siehe Abbildung 18).

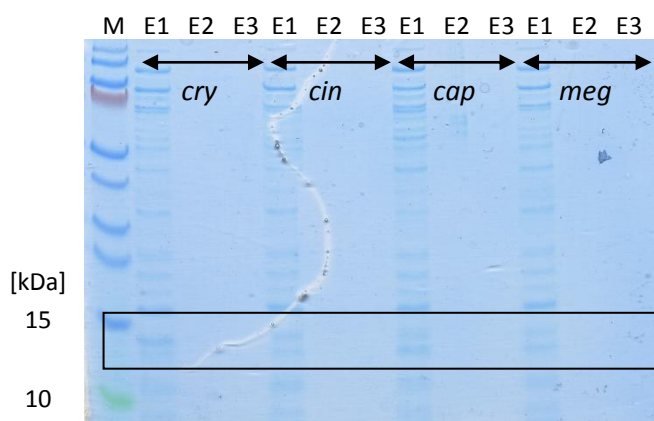


Abbildung 18. Aufreinigung der Expression der vier Elicitine mit pET-28a(+)HisCin, pET-28a(+)HisCry pET-28a(+)HisCap und pET-28a(+)HisMeg in *E. coli* SHuffle® T7 Express in je 250 mL TB über Protino Ni-IDA 2000-Säulen: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. E1: Elutionsfraktion 1. E2: Elutionsfraktion 2. E3: Elutionsfraktion 3.

Wie in der Abbildung zu sehen, funktionierte die Aufreinigung über die Protinosäulen nur sehr eingeschränkt. Zum einen war der Reinheitsgrad sehr niedrig, zum anderen konnten die Bande bei ca.

14 kDa nicht eindeutig den Elicitinen zugewiesen werden. Zwar waren in den ersten Elutionsfraktionen der Elicitine bei ca. 14 kDa ein bis zwei schwache Banden erkennbar, von denen eine auf eine schwache Expression in löslicher Form hätte hinweisen können. Allerdings waren außer diesen Banden viele weitere Proteinbanden unterschiedlicher Größen auf dem SDS-Gel vorhanden, von denen die meisten genauso stark oder sogar stärker ausgeprägt waren, als die Banden bei 14 kDa. Da mindestens eine der beiden Banden einem *E. coli*-Protein zugeordnet werden musste, konnte keine klare Aussage über die erfolgreiche Expression von löslichem Elicitin getroffen werden. Allerdings wäre die Expression sehr niedrig ausgefallen, selbst wenn es sich bei einer der beiden Banden um lösliches Elicitin gehandelt haben sollte. Um die Expression von löslichem Elicitin zu verbessern, sollten daher die Expressionsparameter optimiert werden. Um möglichst viele Parameter gleichzeitig testen zu können, wurde die Optimierung der cytoplasmatischen Elicitinexpression nur noch mit β -Cinnamomin durchgeführt. Die Expression der anderen drei Elicitine wurde solange zurückgestellt, bis anhand der Expression von β -Cinnamomin die Expressionsbedingungen optimiert und lösliche Expression erzielt werden konnte.

2.2.1.2.5 Optimierung der Expressionsbedingungen von pET-28a(+)HisCin

Um einen besseren Überblick über den Einfluss der Expressionsparameter Temperatur, Expressionszeit und IPTG-Konzentration auf die lösliche Expression von β -Cinnamomin mit pET-28a(+)HisCin in *E. coli* SHuffle® T7 Express in löslicher Form zu bekommen, wurden zwölf verschiedene Kombinationen der drei Parameter in je 50 mL-Maßstab im Schüttelkolben getestet. Zwölf Kulturen mit TB-Medium wurden mit Übernachtskulturen angeimpft und die Expression mit 0,2, 0,5 und 0,8 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Kulturen für 16, 32 und 48 h und bei Raumtemperatur (RT), 30 °C und 37 °C exprimiert. Im Anschluss an die Expression wurde von jeder Kultur jeweils eine Probe genommen, aufgeschlossen und der lösliche Überstand über SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 19).

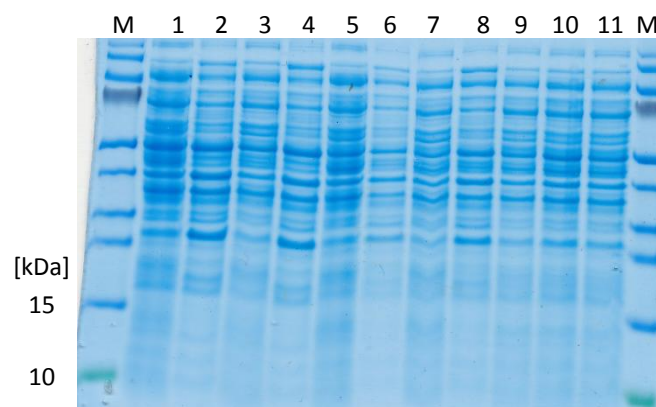


Abbildung 19. SDS-PAGE mit den löslichen Überständen der Testexpressionen von β -Cinnamomin mit pET-28a(+)HisCin in *E. coli* SHuffle® T7 Express unter Variation von Temperatur, Expressionszeit und Induktorkonzentration: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 1: RT, 16 h, 0,2 mM IPTG. 2: 37 °C, 16 h, 0,2 mM IPTG. 3: RT, 48 h, 0,2 mM IPTG. 4: 37, 48 h, 0,2 mM IPTG. 5: RT, 16 h, 0,8 mM IPTG. 6: 37 °C, 16 h, 0,8 mM IPTG. 7: RT, 48 h, 0,8 mM IPTG. 8: 37 °C, 48 h, 0,8 mM IPTG. 9: 30 °C, 32 h, 0,5 mM IPTG. 10: 30 °C, 32 h, 0,5 mM IPTG. 11: 30 °C, 32 h, 0,5 mM IPTG.

In keiner der zwölf verschiedenen Expressionskulturen mit *E. coli* SHuffle® T7 Express pET-28a(+)HisCin konnte eine Verbesserung des Expressionslevels von löslich exprimiertem β -Cinnamomin festgestellt werden. Weder die Variation der Expressionszeit oder der Temperatur, bei der die Kulturen inkubiert wurden, noch die Konzentration des IPTG, mit dem die Expression des Elicitins induziert wurde, machte einen Unterschied. In keiner einzigen Kultur konnte lösliche Expression von β -Cinnamomin mit Sicherheit festgestellt werden.

2.2.1.2.6 Rückfaltung von β -Cinnamomin aus *inclusion bodies*

Da die lösliche Expression von β -Cinnamomin im Cytoplasma nicht optimiert werden konnte, sollte als nächstes die Rückfaltung von β -Cinnamomin aus *inclusion bodies* getestet werden, um dennoch ausreichend Elicitin für erste biokatalytische Versuche zu gewinnen. Die Rückfaltung von exprimiertem β -Cinnamomin aus *inclusion bodies* in die native Proteinform war interessant, da das Elicitin im *E. coli* Cytoplasma in hohen Mengen in Form von *inclusion bodies* exprimiert wurde und weil bereits zuvor die erfolgreiche Rückfaltung eines ähnlichen Elicitins von O'Donohue *et al.* gezeigt werden konnte [83]. Die Expression in *inclusion bodies* von β -Cinnamomin mit pET-28a(+)HisCin in *E. coli* SHuffle® T7 Express wurde in vier parallelen Ansätzen mit je 250 mL TB-Medium durchgeführt, mit 0,8 mM IPTG induziert und die Kulturen 48 h bei 30 °C exprimiert. Unmittelbar vor der Induktion, nach 24 h Expression und nach 48 h Expression wurde jeweils eine Probe genommen, die anschließend aufgeschlossen und über SDS-PAGE analysiert wurde. Um auch kleinste Mengen an löslichem Elicitin auf den SDS-Gelen nachweisen zu können, wurde zusätzlich eine Western-Blot Methode etabliert. Die Kulturen wurden geerntet und unter denaturierenden Bedingungen in Resolubilisierungspuffer aufgeschlossen. β -Cinnamomin wurde direkt aus den *inclusion bodies* resolubilisiert, da die direkt im Anschluss folgende His-tag-Aufreinigung eine separate Isolierung der *inclusion bodies* unnötig machte. Die Zelltrümmer wurden abgetrennt und die resolubilisierte β -Cinnamominlösung in zwei Schritten unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Jeweils die Hälfte der Lösung wurde auf eine mit Lysispuffer pH 7,4 mit 6 M Harnstoff equilibrierte Poly-Prep®-Chromatographiesäule, gepackt mit 2,5 mL Ni Sepharose™ 6 Fast Flow, geladen. Das unspezifisch gebundene Protein wurde mit Waschpuffer pH 7,4 mit 6 M Harnstoff von der Säule gewaschen und β -Cinnamomin anschließend mit Elutionspuffer pH 7,4 mit 6 M Harnstoff in ein bzw. zwei Elutionsfraktionen zu je 3 mL eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und durch Dialyse gegen 0,4 M Tris-HCl pH 8,5 mit 1,5 mM reduziertem Glutathion und 0,3 mM oxidiertem Glutathion dialysiert, um das β -Cinnamomin über Nacht langsam in seine native Form zurückzufalten. Anschließend wurde die Proteinlösung aufkonzentriert, in 3,5 mL PBS-Puffer pH 7,4 umgepuffert und die Konzentration an β -Cinnamomin über das Experion™ Pro260 mit 125 µg/mL Rinderserumalbumin (BSA) als internem Standard bestimmt. In Abbildung 20 A sind das SDS-Gel und der Western-Blot der Expression, in Abbildung 19 B das SDS-Gel und der Western-Blot der Aufreinigung dargestellt.

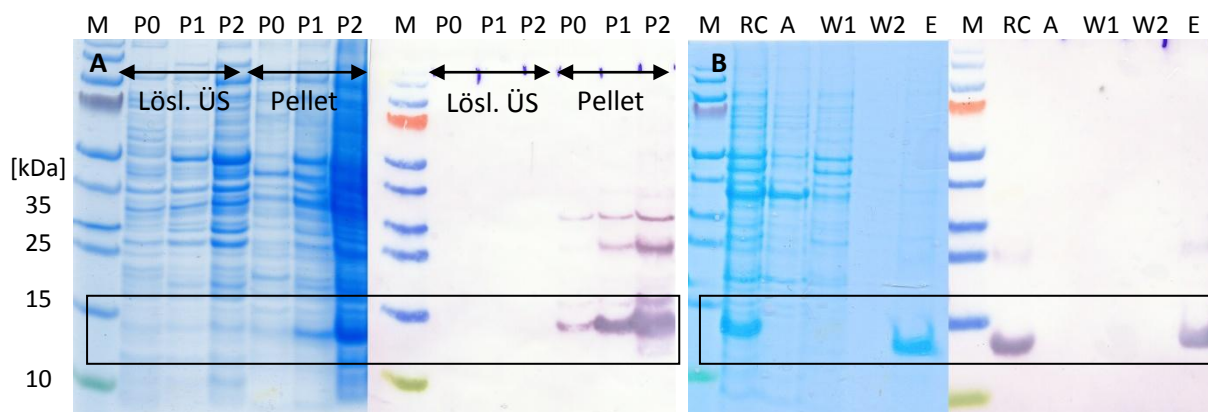


Abbildung 20. A: Expression von β -Cinnamomin mit pET-28a(+)-HisCin in *E. coli* SHuffle® T7 Express bei 30 °C im 250 mL Maßstab: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. P0: Probe vor der Induktion. P1: 24 h-Probe. P2: 48 h-Probe. B: Aufreinigung des resolubilisierten β -Cinnamomins: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. RC: Resolubilisierte β -Cinnamomin-lösung. A: Durchfluss des Auftrags. W1: Waschfraktion 1. W2: Waschfraktion 2. E: Elutionsfraktion.

Mit Hilfe des Western-Blots der Expression konnte die Proteinbande bei ca. 14 kDa eindeutig β -Cinnamomin zugeordnet werden. Außer dieser Bande waren drei weitere Banden zu erkennen, bei ca. 16, 25 und 35 kDa. Bei der Bande auf Höhe von 35 kDa handelte es sich um *E. coli*-Protein mit einem hohen Histidinanteil, da die Bande in fast allen Western-Blots auftauchte, auf die zellfreie *E. coli*-Extrakt aufgetragen worden war, und in allen Proben eine ähnliche Intensität besaß. Bei der Bande um 25 kDa könnte es sich rein von der Größe β -Cinnamomin mit N-terminalem His-tag (MW = 12831 g/mol) um das Dimer von β -Cinnamomin gehandelt haben. Obwohl die Bande auch nach der Aufreinigung noch vorhanden war, kann es sich aber nicht um das Dimer gehandelt haben, da durch die denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE-Methode mögliche Dimere zu Monomeren reduziert worden wären. Abgesehen davon liegt β -Cinnamomin (PDB: 2aib) laut der PDBePDA Datenbank (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/) monomerisch vor. Woher die Bande stammt und weshalb sie auch nach der Aufreinigung vorhanden war, bleibt daher zu erklären. Die Bande bei ca. 16 kDa entspricht wahrscheinlich *E. coli*-Protein, da sie im Anschluss der Aufreinigung nicht mehr auftrat. Dass bereits zum Zeitpunkt der Induktion exprimiertes β -Cinnamomin in *inclusion bodies* vorlag, kann auf die schwache Repression des lacUV5-Promotors der T7-Polymerase zurückgeführt werden. Die Resolubilisierung des Elicitins und die IMAC unter denaturierenden Bedingungen konnten erfolgreich durchgeführt und das Protein zu fast 100 % Reinheit aufgereinigt werden. Nach dem Aufkonzentrieren und Umpuffern konnte eine Gesamtausbeute von 2,5 mg oder bezogen auf das Gesamtvolumen der Expressionskulturen 2,5 mg pro Liter Kulturvolumen bestimmt werden.

Die Sterolbindeaktivität der rückgefalteten β -Cinnamominlösung wurde mit dem DHE-Assay überprüft. Abweichend von dem Protokoll in Abschnitt 5.3.9 wurde der Assay mit einem *gain* von 255 durchgeführt. Unmittelbar nach der Zugabe von DHE zu der β -Cinnamominlösung wies sie eine mehr als doppelt so hohe Fluoreszenz wie das reine DHE oder die Negativkontrolle mit BSA auf. Nach fünf Minuten war die Fluoreszenz des Ansatzes mit β -Cinnamomin 3 x so hoch wie reines DHE und noch

1,7 x so hoch wie die Negativkontrolle mit BSA. Da jedoch keine Positivkontrolle zur Verfügung stand und man unmöglich mit Sicherheit sagen konnte, ob nicht ein Teil des Proteins zwar löslich, aber immer noch falsch gefaltet vorlag, konnte keine eindeutige Aussage über den Wirkungsgrad der erfolgreichen Rückfaltung getroffen werden. Aus diesem Grund wurde das rückgefaltete Elicitin nicht zur Biokatalyse eingesetzt.

Insgesamt betrachtet konnte β -Cinnamomin in *E. coli* nicht zufriedenstellend cytoplasmatisch exprimiert werden. Durch die Analyse der Proben auf dem Western Blot in Abbildung 20 konnte schließlich eindeutig nachgewiesen werden, dass durch die β -Cinnamominexpression in dem Cytoplasma der *E. coli* SHuffle®-Stämme kein lösliches Elicitin erhalten werden kann.

2.2.2 Konstitutive Expression in *Pichia pastoris*

Da keine ausreichende lösliche Expression β -Cinnamomins oder eines der anderen drei Elicitine erreicht werden konnte, die Rückfaltung des unlöslich exprimierten Proteins nur sehr geringe Ausbeuten erzielte und der Grad der Aktivität nicht eingeschätzt werden konnte, wurden parallel die Expression in *P. pastoris* und die periplasmatische Expression in *E. coli* (siehe Abschnitt 2.2.3) getestet. In *P. pastoris* X-33 sollte die Sekretion von β -Cinnamomin mit und ohne His-tag in das umgebende Kulturmedium mit Hilfe der α -mating factor Signalsequenz von *Saccharomyces cerevisiae* getestet werden, um so ausreichend Elicitin für die ersten biokatalytischen Versuche zu gewinnen.

2.2.2.1 Expression mit pGAPZ α A in *Pichia pastoris* X-33

Zur Expression von β -Cinnamomin mit und ohne His-tag in *P. pastoris* X-33 wurde das pGAPZ α A-Plasmid mit dem konstitutiven Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP)-Promotor verwendet.

2.2.2.1.1 Klonierung von pGAPZ α ACin und pGAPZ α AHisCin

Um pGAPZ α ACin und pGAPZ α AHisCin zu generieren, wurde zunächst erfolgreich das β -Cinnamomingen *cin* über PCR von pET-28a(+)HisCin amplifiziert. Mit den Primern PpHisFwd und PpCinRev (siehe Tabelle 5 in Abschnitt 5.1.2) wurde das vollständige synthetische Gen für die Expression mit His-tag amplifiziert. Mit den Primern PpCinFwd und PpCinRev (siehe Tabelle 5 in Abschnitt 5.1.2) wurde nur das eigentliche β -Cinnamomingen amplifiziert. Über die PCR-Primer wurden jeweils N-terminal eine KEX2 Schnittstelle sowie eine *Xho*I-Restriktionsschnittstelle und C-terminal eine *Not*I-Restriktionsschnittstelle angefügt. Die PCR-Produkte wurden jeweils über die Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Not*I in pGAPZ α A (Abbildung 64, siehe Abschnitt 7.3) kloniert. Die ligierten Plasmide pGAPZ α ACin und pGAPZ α AHisCin wurden in chemisch kompetente *E. coli* Top10-Zellen transformiert und anschließend durch Sequenzierung auf Mutationen überprüft. Die Plasmide wurden in elektrokompente *P. pastoris* X-33-Zellen transformiert. Um die homolog integrierten Plasmide in *P. pastoris* nachzuweisen,

wurde die chromosomale DNA mehrerer *P. pastoris*-Kolonien isoliert und mit den oben genannten Primern durch Kolonie-PCR überprüft.

2.2.2.1.2 Testexpression

Die Expression mit pGAPZ α ACin und pGAPZ α AHisCin in *P. pastoris* wurde im 50 mL-Maßstab in *yeast extract peptone dextrose* (YPD)-Medium getestet. Die Kulturen wurden mit einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,1 inokuliert und anschließend für 96 h bei 30 °C inkubiert. Unmittelbar nach dem Animpfen, sowie nach 24 h und 96 h Expression wurde je eine Probe genommen und auf dem SDS-Gel analysiert. Im Anschluss an die Expression wurden die Kulturen geerntet, der Kulturüberstand beider Kulturen durch Mischen mit vier Volumenteilen gesättigter Ammoniumsulfatlösung über Nacht gefällt und je eine Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe Abbildung 21).

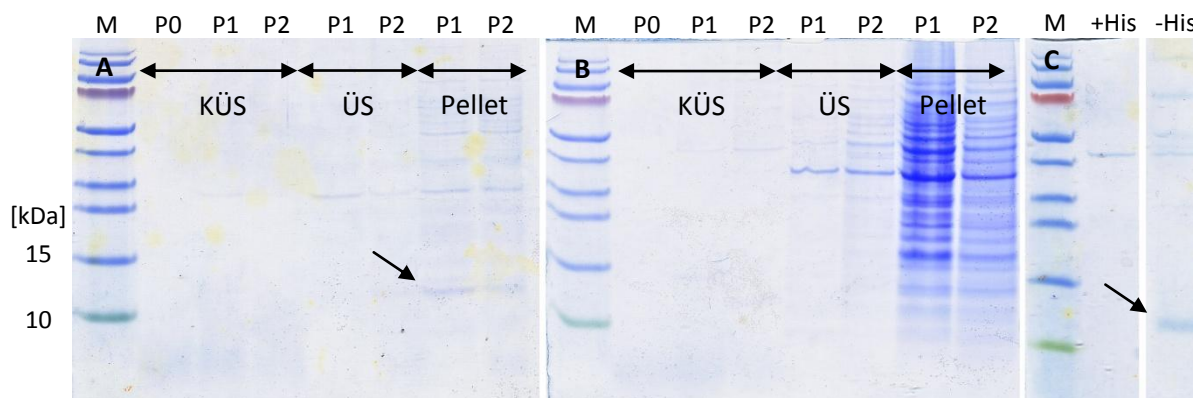


Abbildung 21. Expression mit pGAPZ α ACin (A) und pGAPZ α AHisCin (B) in *P. pastoris* X-33 in YPD Medium bei 30 °C und Ammoniumsulfatfällung des Kulturüberstands beider Expressionskulturen (C): M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. P0: Probe vor der Induktion. P1: 24 h-Probe. P2: 96 h-Probe. KÜS: Kulturüberstand. ÜS: Löslicher Überstand des Zellaufschlusses. Pellet: Pelletfraktion des Zellaufschlusses. +His: Expression von pGAPZ α AHisCin. -His: Expression von pGAPZ α ACin.

Weder in dem Kulturüberstand der Expression von pGAPZ α ACin (siehe Abbildung 21 Gel A), noch von pGAPZ α AHisCin (siehe Abbildung 21 Gel B), konnte sekretiertes β -Cinnamomin nachgewiesen werden. Einzig in den Pelletfraktionen der 24 und 96 h-Proben der Expression von pGAPZ α ACin war eine schwache Bande bei ca. 12 kDa zu erkennen (theoretisches Molekulares Gewicht des exprimierten β -Cinnamomin ohne His-tag: MW = 10,4 kDa), was auf eine nicht korrekt ablaufende Sekretion hindeuten könnte. Im Gegensatz dazu ist nach der Ammoniumsulfatfällung auf Gel C in der Lösung mit den aufkonzentrierten möglichen Proteinen aus dem Kulturüberstand der pGAPZ α ACin-Expression eine relativ deutliche Bande bei 10 - 12 kDa zu erkennen.

In weiteren Experimenten wurde die Expression von β -Cinnamomin ausschließlich mit pGAPZ α ACin getestet, da in der Lösung mit den aufkonzentrierten möglichen Proteinen aus dem Kulturüberstand der pGAPZ α AHisCin-Expression keine Expression nachgewiesen werden konnte. Außerdem wuchsen die *P. pastoris*-Zellen mit pGAPZ α ACin besser, als die Zellen mit dem pGAPZ α AHisCin-Plasmid. Die

Expression wurde in YPD und in *yeast nitrogen base* (YNB)-Medium wiederholt und die Proteine im Kulturüberstand anschließend mit Ammoniumsulfat gefällt. Jedoch konnte in keinem der folgenden Experimente bei 12 kDa eine so deutliche Bande wie in Abbildung 21 Gel C reproduziert werden, sondern nur ein Proteinschmier (siehe Abbildung 21 Gel A und B bei ca. 6 kDa und Abbildung 22 Gel B im nächsten Abschnitt), der β -Cinnamomin nicht eindeutig zugeordnet werden konnte.

2.2.2.1.3 Aufreinigung über Kationenaustauschchromatographie

Da durch Ammoniumsulfatfällung des Kulturüberstands mögliches β -Cinnamomin nicht reproduzierbar nachgewiesen werden konnte, sollte es aus dem Kulturüberstand einer Expression von *P. pastoris* X-33 pGAPZ α ACin im Anschluss an eine Ammoniumsulfatfällung über Kationenaustauschchromatographie isoliert und aufgereinigt werden. Dazu wurde eine 50 mL YPD-Kultur mit *P. pastoris* X-33 pGAPZ α ACin angeimpft, 72 h bei 30 °C kultiviert und anschließend geerntet. Der Kulturüberstand wurde durch gesättigte Ammoniumsulfatlösung gefällt, das Präzipitat in 1,5 mL PBS-Puffer pH 7,4 resuspendiert und auf dem SDS-Gel untersucht (siehe Abbildung 22 Gel A und B). Das Konzentrat des Kulturüberstandes wurde mit 20 mM MES-Puffer pH 6,5 auf 40 mL aufgefüllt und auf eine an eine ÄKTaprime™ angeschlossene Kationenaustauschersäule (25 mL Toyopearl Super SP-650c) geladen und das gebundene Protein in 100 mL 20 mM MES-Puffer pH 6,5 mit 1 M NaCl über einen Gradienten eluiert. Proben des Durchflusses der Auftragsfraktion und der Elutionsfraktionen, bei denen ein leichter Anstieg der Absorption bei $\lambda = 280$ nm (A_{280}) gemessen wurde, wurden mittels SDS-PAGE analysiert und auf β -Cinnamomin untersucht (siehe Abbildung 22 Gel C).

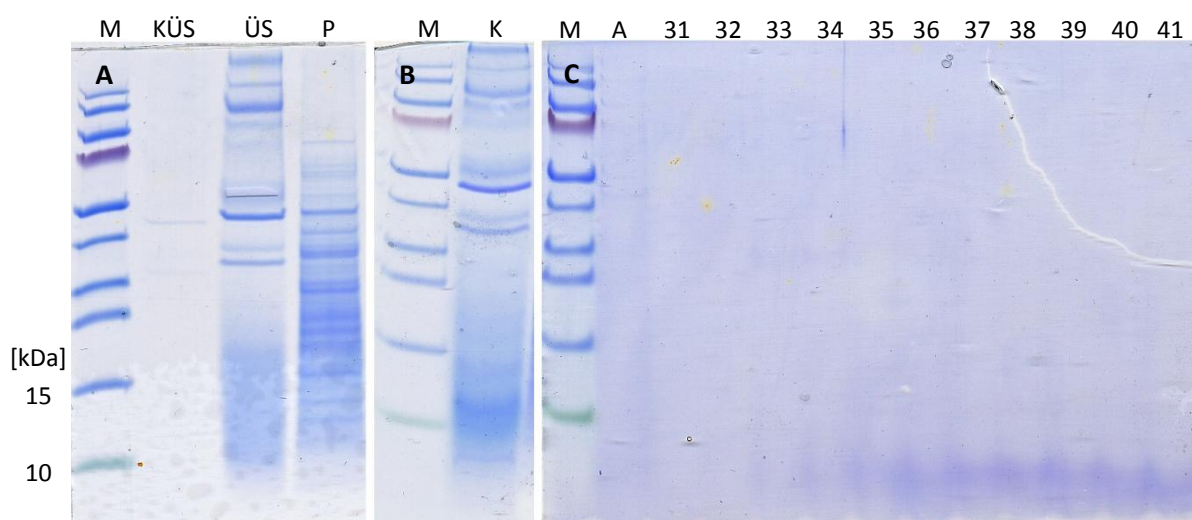


Abbildung 22. Expression mit pGAPZ α ACin in *P. pastoris* bei 30 °C (A), Ammoniumsulfatfällung des möglichen Proteins des Kulturüberstandes (B) und die chromatographische Aufreinigung des aufkonzentrierten Proteins des Kulturüberstandes (C): M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. (A): KÜS: Kulturüberstand der Expression. ÜS: Zellfreier Extrakt des Zellaufschlusses. P: Pelletfraktion des Zellaufschlusses. (B): K: Aufkonzentriertes Protein des KÜS. (C): A: Durchfluss der Auftragsfraktion. 31 - 41: Elutionsfraktionen 31 bis 41.

Auch durch die Aufreinigung des Kulturüberstandes der Expression von β -Cinnamomin mit pGAPZ α Cin in *P. pastoris* konnte keine Überexpression des Elicitins nachgewiesen werden. In Abbildung 22 waren weder im löslichen Überstand, noch in der Pelletfraktion auf Gel A signifikante Proteinbanden auf einer Höhe von 12 kDa sichtbar, nur zwei sehr schwache Banden in der Pelletfraktion bei ca. 12 und 14 kDa. In dem aufkonzentrierten Kulturüberstand konnte zwar eine verstärkte Intensität des „Schmiers“ auf einer Höhe von ca. 11 kDa festgestellt werden, jedoch war in keiner der Elutionsfraktionen ausreichend Protein enthalten, um als klar erkennbare Bande auf dem SDS-Gel sichtbar zu sein.

Da in *P. pastoris* nicht ausreichend lösliches β -Cinnamomin exprimiert werden konnte, um als spezifische Bande auf dem Gel nachgewiesen werden zu können, wurde die Expression in *P. pastoris* nicht weiter verfolgt.

2.2.3 Periplasmatische Expression in *Escherichia coli*

Die periplasmatische Expression von β -Cinnamomin in *E. coli* sollte getestet werden, um sich so unter anderem das oxidierende Milieu des Periplasmas für die korrekte Faltung des Elicitins zu Nutze zu machen. Um eine möglichst gute Sekretion zu erreichen, wurden die drei Sekretionssignalsequenzen der Proteine PelB, DsbA und MalE getestet. Puertas und Betton beschrieben 2009 die periplasmatische Expression des *leech carboxypeptidase inhibitor* (LCI) mit Hilfe der Sec-Sekretionssignalsequenzen MalEss des Maltosebindepoteins E und DsbAss des Disulfidbindepoteins A [92]. Da die erfolgreiche Sekretion immer stark abhängig von der individuellen Paarung eines Proteins und einer Sekretionssignalsequenz ist [8,47], wurde die Sec-Sekretionssignalsequenz PelBss der Pektatlyase PelB [68] als eine dritte Sekretionssignalsequenz ausgesucht. Bei MalEss und PelBss handelt es sich um Sec-abhängige Sekretionssignalsequenzen [42], mit Hilfe der DsbAss werden Proteine dagegen über den SRP-abhängigen Sekretionsweg in das Periplasma dirigiert [106].

2.2.3.1 Expression mit pET-22b(+)

Zunächst wurde die Expression von β -Cinnamomin mit pET-22b(+) in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt, da mit dem pET-22b(+)-Plasmid bereits ein fertiges Expressionsplasmid mit der Sekretionssignalsequenz von PelB (PelBss) vorhanden war und so direkt mit der Optimierung der periplasmatischen Expression von β -Cinnamomin begonnen werden konnte, noch während die Klonierung der pET-28a(+)-Expressionsplasmide mit allen drei Sekretionssignalsequenzen durchgeführt wurde.

2.2.3.1.1 Klonierung pET-22b(+)-HisCin

Das β -Cinnamomingen *cin* wurde inklusive des N-terminalen His-tags und der TEV-Schnittstelle mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Eco*RI aus dem Plasmid pET-28a(+)-HisCin ausgeschnitten und direkt hinter die PelB Sekretionssignalsequenz von pET-22b(+) (Abbildung 65, siehe Abschnitt 7.3) kloniert. Das resultierende Plasmid pET-22b(+)-HisCin wurden in chemisch kompetente *E. coli* Top10

transformiert und sequenziert. Anschließend wurde das Plasmid in elektrokompente Zellen des *E. coli*-Expressionsstammes BL21(DE3) transformiert.

2.2.3.1.2 Vergleichsexpression mit pET-22a(+)HisCin und pET-28a(+)HisCin

Die Expression von *E. coli* BL21(DE3) pET-22b(+)HisCin wurde direkt im Vergleich mit der Expression von *E. coli* SHuffle® T7 Express pET-28a(+)HisCin durchgeführt, um den direkten Vergleich mit der cytoplasmatischen Expression zu sehen. Beide Expressionen wurden in 250 mL in TB-Medium durchgeführt, mit 0,4 mM IPTG induziert und anschließend 48 h bei 30 °C inkubiert. Nach der Expression wurde je eine Probe genommen, aufgeschossen und auf dem SDS-Gel analysiert (siehe Abbildung 23).

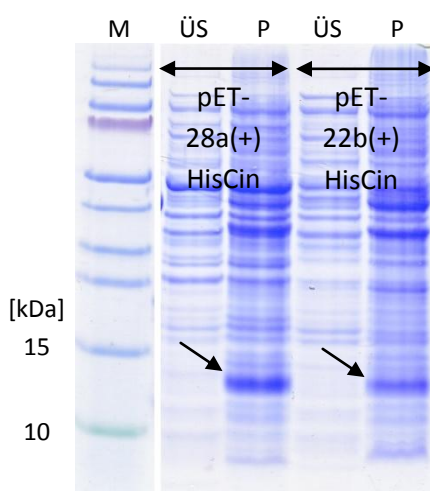


Abbildung 23. Vergleich der Expression von β -Cinnamomin mit pET-22b(+)HisCin in *E. coli* BL21(DE3) und pET-28a(+)HisCin in *E. coli* SHuffle® T7 Express in jeweils 250 mL TB bei 30 °C: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. ÜS: Löslicher Überstand nach 24 h Expression. P: Pelletfraktion nach 24 h Expression.

Wie in der Abbildung zu sehen, wurde β -Cinnamomin von *E. coli* pET-22b(+) zwar exprimiert, jedoch genau wie mit dem pET-28a(+)-Plasmid nahezu ausschließlich in unlöslicher Form in *inclusion bodies*. Beim direkten Vergleich der Banden der Expression mit dem pET-22b-Plasmid und mit dem pET-28a(+)-Plasmid zeigt sich für die periplasmatische Expression eine leicht schwächere Gesamtexpression. Diese war jedoch wahrscheinlich auf versuchsbedingte Schwankungen zurückzuführen, da auch die Expressionen von *E. coli* SHuffle® T7 Express pET-28a(+)HisCin immer minimal unterschiedliche Expressionsniveaus von Versuch zu Versuch zeigten. Da mit pET-22b(+)HisCin keine signifikant bessere lösliche Expression erreicht wurde, konnten durch die Expression von *E. coli* BL21(DE3) pET-22b(+)Cin auch keine optimierten Expressionsbedingungen bestimmt werden, mit denen ein quantifizierbarer Vergleich aller drei Sekretionssignalsequenzen möglich gewesen wäre.

2.2.3.2 Expression mit pET-28a(+)MalEssCin und pET-28a(+)DsbAssCin

Als nächstes wurde die Expression mit pET-28a(+)MalEssCin und pET-28a(+)DsbAssCin getestet um einen Anhaltspunkt für die Optimierung der periplasmatischen Expression zu finden. Die beiden Sek-

retionssignalsequenzen der Proteine MalE (MalEss) und DsbA (DsbAss) wurden N-terminal vor dem β -Cinnamomigen in das pET-28a(+)-Plasmid eingefügt, um so die Sekretion β -Cinnamomins in das Periplasma mit den beiden anderen Sekretionssignalsequenzen testen zu können. Da durch die Expression in *E. coli* BL21(DE3) mit der ersten Sekretionssignalsequenz keine gute lösliche Expression erreicht wurde, wurde neben der Expression in *E. coli* BL21(DE3) auch direkt die Expression in *E. coli* C43(DE3) untersucht.

2.2.3.2.1 Klonierung von pET-28a(+)-MalEssCin und pET-28a(+)-DsbAssCin

Das Genfragment für die MalEss-Variante wurde mit den Primern MalEssFwd und CinEcoRIRev, das Genfragment für DsbAss-Variante mit den Primern DsbAssFwd und CinEcoRIRev (Primer siehe Tabelle 5, Abschnitt 5.1.2) von dem pET-28a(+)-HisCin-Plasmid durch PCR amplifiziert. Über den Forward-PCR-Primer wurden der N-terminale His-tag und die TEV-Schnittstelle durch die jeweilige Sekretionssignalsequenz MalEss bzw. DsbAss ersetzt. Zusätzlich wurde im selben Schritt die *Nco*I-Restriktionsschnittstelle mit seinem Isocaudomer *Bsp*HI ausgetauscht werden, da beide Restriktionsschnittstellen bereits das Startcodon und das erste Nucleotid des folgenden Gens enthalten, welches sich in His-tag und den Sekretionssignalsequenzen jedoch unterscheiden. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden erfolgreich über die beiden Restriktionsenzyme *Bsp*HI und *Eco*RI in das mit *Nco*I und *Eco*RI verdaute pET-28a(+)-Plasmid (siehe Abbildung 63 in Abschnitt 7.3) kloniert. Die resultierenden Konstrukte pET-28a(+)-MalEssCin und pET-28a(+)-DsbAssCin wurden in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Die Transformanten wurden durch Kolonie-PCR mit den oben genannten Primern überprüft und anschließend sequenziert. Die Plasmide wurden zur periplasmatischen Expression in elektrokompetente Zellen der *E. coli*-Stämme BL21(DE3) und C43(DE3) transformiert.

2.2.3.2.2 Testexpression mit pET-28a(+)-MalEssCin und pET-28a(+)-DsbAssCin

Die Expression mit den beiden Plasmiden pET-28a(+)-MalEssCin und pET-28a(+)-DsbAssCin wurde in beiden *E. coli*-Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3) jeweils im 50 mL-Maßstab in TB-Medium durchgeführt. Die Expression wurde mit 0,4 mM IPTG induziert und die Kulturen anschließend für 24 h bei 30 °C exprimiert. Unmittelbar vor der Induktion und direkt nach der Expression wurde je eine Probe genommen, abzentrifugiert und aufgeschlossen. Da bei Puertas und Betton ein großer Teil des Proteins im Kulturüberstand statt im Periplasma zu finden war [92], wurde der Kulturüberstand nicht verworfen, sondern aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen der Kulturen geerntet und aufgeschlossen. Die Pelletfraktionen und der lösliche Überstand aller Proben und der Kulturüberstand der 24 h-Probe wurden über SDS-PAGE untersucht (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25).

Auf den SDS-Gelen in Abbildung 24 konnte in *E. coli* BL21(DE3) weder mit pET-28a(+)-DsbAssCin (Gel A) noch mit pET-28a(+)-MalEssCin (Gel B) Expression nachgewiesen werden. Weder wurde lösliches Protein in den Kulturüberstand sekretiert, noch waren Banden in den löslichen Überständen oder

den Pelletfraktionen eindeutig β -Cinnamomin zuzuordnen. Ausschließlich ist in den Nullstundenproben jeweils wieder eine schwache Bande bei 12 kDa zu erkennen, die jedoch in den 24 h-Proben fehlte. Wie aber auf dem SDS-Gel der Negativkontrolle mit leerem pET-28a(+)-Plasmid in Abbildung 26 (siehe Abschnitt 2.2.3.2.3) gesehen werden kann, handelt es sich hierbei um die Bande eines *E. coli*-Proteins mit einer Größe von ca. 12 kDa, das zwar in jeder Expression in den Nullproben auftauchte, jedoch nach spätestens ca. 4 h Expression wieder abgebaut wurde.

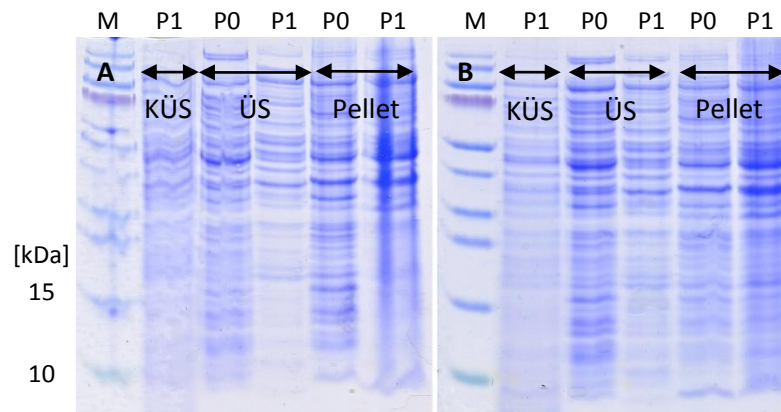


Abbildung 24. Expression von β -Cinnamomin mit pET-28a(+)-DsbAssCin (A) und pET-28a(+)-MalEssCin (B) in *E. coli* BL21(DE3) für 24 h bei 30 °C: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. P0: Probe vor der Induktion P1: 24 h-Probe. KÜS: Kulturüberstand. ÜS: Löslicher Überstand. Pellet: Pelletfraktion.

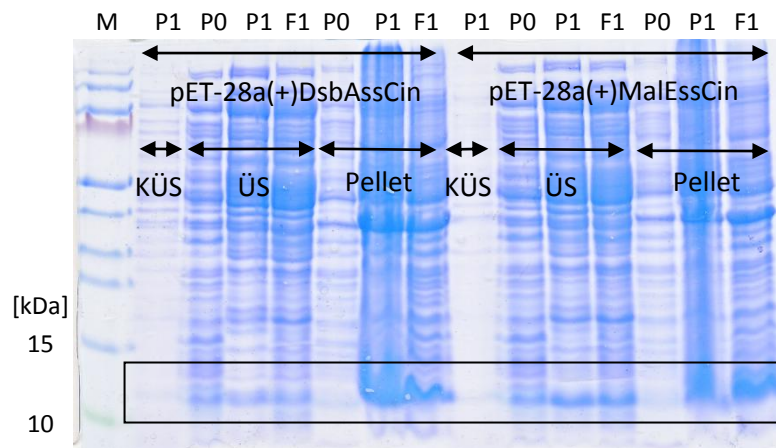


Abbildung 25. Expression von β -Cinnamomin mit pET-28a(+)-DsbAssCin und pET-28a(+)-MalEssCin in *E. coli* C43(DE3): M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. P0: Probe vor der Induktion P1: 24 h-Probe. F1: 24 h-Probe mit der French Press aufgeschlossen. KÜS: Kulturüberstand. ÜS: Löslicher Überstand. Pellet: Pelletfraktion.

Auf den Gelen in Abbildung 25 konnte in *E. coli* C43(DE3) mit Hilfe der beiden Plasmide pET-28a(+)-DsbAssCin und pET-28a(+)-MalEssCin schließlich das erste Mal erfolgreich signifikante Mengen von löslichem β -Cinnamomin nachgewiesen werden (MW = 10,4 kDa). In den Proben der beiden unterschiedlichen Expressionen war neben einer Überexpression in Form von *inclusion bodies* auch die Expression in löslicher Form sichtbar, wobei das Expressionsniveau mit pET-28a(+)-MalEssCin-Plasmid leicht höher war als das Expressionsniveau mit pET-28a(+)-DsbAssCin. Die Proteinbanden bei ca.

12 kDa Höhe in den löslichen Überständen der Nullproben beider Expressionen konnten wieder *E. coli*-Protein zugeordnet werden (vergleiche Abschnitt 2.2.3.2.3), da in den Pelletfraktionen der Nullproben keine *inclusion bodies* festgestellt werden konnten.

Um letztlich einen quantifizierbaren Vergleich aller drei Sekretionssignalsequenzen zu ermöglichen, musste als nächstens eine Aufreinigungsmethode etabliert werden. Da mit Hilfe der MalEss mehr lösliches Protein gebildet wurde, sollte daher die Aufreinigung des β -Cinnamomins aus der Expression von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCin durch Isolierung der periplasmatischen Fraktion mit anschließender Kationenaustauschchromatographie untersucht werden. Durch die vorherige Isolierung der periplasmatischen Fraktion, sollten Verunreinigungen durch cytoplasmatische Proteine verhindert werden.

2.2.3.2.3 Aufreinigung über Kationenaustauschchromatographie

Um die Aufreinigung von β -Cinnamomin exprimiert mit der pET-28a(+)MalEssCin-Variante zu testen, wurde die Expression von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCin in zwei Erlenmeyerkolben mit je 250 mL TB-Medium durchgeführt, mit 0,4 mM IPTG induziert und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Vor der Induktion und nach 24 h Expression wurde jeweils eine Probe genommen und aufgeschossen. Parallel wurde *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+) in einem Kolben mit 250 mL TB-Medium als Negativkontrolle auf identische Weise kultiviert und gemeinsam mit den Proben der *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)-MalEssCin-Expression über SDS-PAGE untersucht (siehe Abbildung 26). Im Anschluss an die Expression wurden beide pET-28a(+)MalEssCin-Kulturen vereinigt und geerntet, das Zellpellet in 35 mL Spheroplastpuffer pH 8,0 resuspendiert und die periplasmatische Fraktion isoliert. Danach wurde die periplasmatische Fraktion über Nacht gegen 20 mM MES-Puffer pH 6,5 dialysiert, damit β -Cinnamomin ($pI = 7,75$) die richtige Ladung für die Kationenaustauschchromatographie hatte. Je eine Probe der dialysierten periplasmatischen, der cytoplasmatischen und der Pelletfraktion wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Da während der Dialyse relativ viel Protein präzipitierte, wurde das Präzipitat in 1 mL 20 mM MES-Puffer pH 6,5 resuspendiert und zusammen mit den anderen Proben auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Periplasmatische Fraktion wurde anschließend über eine Kationenaustauschersäule (25 mL Toyopearl Super SP-650c) aufgereinigt. Das gebundene Protein wurde in 100 mL 20 mM MES-Puffer pH 6,5 mit einem Gradienten von 0 bis 1 M NaCl eluiert. Die Elution der Proteine wurde über die A_{280} verfolgt und die Elutionsfraktionen auf einem SDS-Gel auf Elicitin hin untersucht (siehe Abbildung 27).

In Abbildung 26 ist zunächst zu erkennen, dass in der Wiederholung der Expression von β -Cinnamomin mit *E. coli* C43 (DE3) pET-28a(+)MalEssCin die Bande des Elicitins im löslichen Überstand nach 24 h Expression nicht mehr so stark war, wie auf dem Gel des ersten Versuchs zur Expression β -Cinnamomins in Abbildung 25 (siehe oben). Dennoch konnte eine schwache Bande bei ca. 12 kDa

identifiziert werden, die im direkten Vergleich mit den löslichen Überständen der Kontrollexpression zweifelsfrei β -Cinnamomin zugeordnet werden konnte. Die intensive Bande bei 12 kDa in der Nullprobe der Expression konnte wieder *E. coli*-Protein zugeordnet werden. In der 24 h-Probe der Pelletfraktion der Expression mit pET-28a(+)MalEssCin waren zwei Banden auf einer Höhe von ca. 12 und 13 kDa sichtbar. Das theoretische Molekulargewicht von β -Cinnamomin mit der MalE Sekretionssignalsequenz beträgt ca. 13,2 kDa im Gegensatz zu 10,4 kDa für das vollständig prozessierten β -Cinnamomin ohne Sekretionssignalsequenz. Bei der Proteinbande bei ca. 13 kDa handelte es sich vermutlich um β -Cinnamomin, dass nicht sekretiert wurde und somit immer noch die MalE Sekretionssignalsequenz trägt.

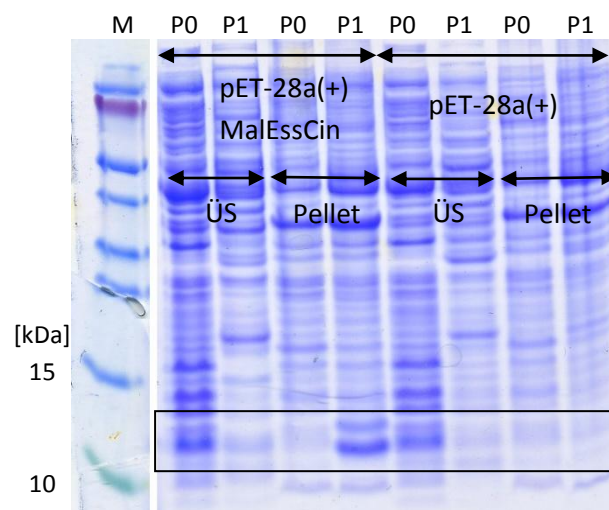


Abbildung 26. Expression von β -Cinnamomin mit pET-28a(+)MalEssCin und Negativkontrolle mit pET-28a(+) in *E. coli* C43(DE3): M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. P0: 0 h-Probe. P1: 24 h-Probe. ÜS: Löslicher Überstand. Pellet: Pelletfraktion.

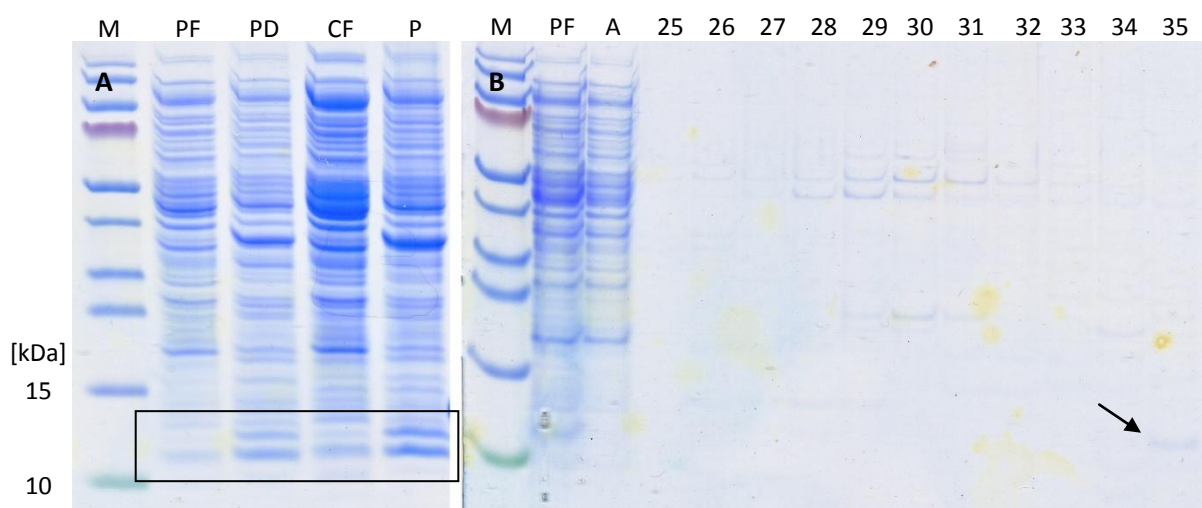


Abbildung 27. Isolierung der periplasmatischen Fraktion (A) und Aufreinigung über Kationenaustauschchromatographie (B) der Expression von β -Cinnamomin mit pET-28a(+)MalEssCin in *E. coli* C43(DE3) bei 30 °C: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. PF: Periplasmatische Fraktion. PD: Präzipitat der Dialyse. CF: Cytoplasmatische Fraktion. P: Pelletfraktion. A: Vereinigter Durchfluss der Auftragsfraktionen. 25 - 35: Elutionsfraktionen der Kationenaustauschchromatographie.

In Abbildung 27 A ist zu erkennen, dass β -Cinnamomin in geringen Mengen aus dem *E. coli* Periplasma isoliert werden konnte. Da ein großer Teil des β -Cinnamomins während der Dialyse präzipitierte, konnte jedoch nur sehr wenig Protein isoliert werden. In dem resuspendierten, aufkonzentrierten Präzipitat waren zwei deutliche Banden für β -Cinnamomin bei 12 und 13 kDa zu erkennen, wodurch der Verlust des Proteins in der periplasmatischen Fraktion erklärt werden kann. Auch wurde wieder verhältnismäßig viel Protein in *inclusion bodies* exprimiert. In Abbildung 27 B ist die Aufreinigung der periplasmatischen Fraktion über Kationenaustauschchromatographie dargestellt. β -Cinnamomin konnte erfolgreich an die Säule gebunden werden, was durch den Vergleich der Probe der isolierten periplasmatischen Fraktion mit der Probe des Durchflusses der Auftragsfraktionen gut zu erkennen ist. Die Ausbeute der Aufreinigung fiel jedoch äußerst gering aus. Obwohl eine Kultur von insgesamt 500 mL für die Aufreinigung verwendet wurde, war die lösliche Expression so schwach und es ging so viel Protein während der Probenvorbereitung verloren, dass auf dem Gel der Aufreinigung nur noch eine sehr schwache Bande für das aufgereinigte β -Cinnamomin zu erkennen war. Zusammengefasst konnte festgestellt werden, dass zwar die Aufreinigung über die Kationenaustauschchromatographie prinzipiell funktionierte, aber die Probenvorbereitung und das Expressionsniveau des löslichen β -Cinnamomin weiter verbessert werden mussten. Da in der Probenvorbereitung viel β -Cinnamomin verloren ging und die Expression immer noch relativ schlecht funktionierte, konnte keine nennenswerte Menge an aufgereinigtem löslichem Protein erhalten werden.

Damit aber ausreichende Mengen β -Cinnamomins exprimiert werden konnten, musste daher auch weiterhin zunächst die lösliche Expression von β -Cinnamomin mit den Sekretionssignalsequenzen verbessert werden. Zum einen sollte die Expression von pET-28a(+)-DsbAssCin und pET-28a(+)-MalEssCin in *E. coli* C43(DE3) in TBS-Medium getestet werden. Zum anderen sollten drei pET-28a(+)-Varianten generiert werden, in denen jeweils eine der drei N-terminalen Sekretionssignalsequenzen PelBss, DsbAss und MalEss und ein C-terminaler His-tag kombiniert werden sollten. Dieser besitzt den Vorteil, dass Aufreinigungen über einen His-tag häufig einen besseren Aufreinigungsfaktor liefern und so die separate Isolierung der periplasmatischen Fraktion und vor allen Dingen die Dialyse überflüssig macht.

2.2.3.2.4 Expression in TBS-Medium

Die Expression von β -Cinnamomin mit pET-28a(+)-DsbAssCin und pET-28a(+)-MalEssCin in *E. coli* C43(DE3) wurde jeweils in 100 mL TBS-Medium mit 0,4 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Kulturen für 24 h bei 30 °C exprimiert. Vor Induktion und nach 24 h Expression wurde jeweils eine Probe genommen, aufgeschlossen und über SDS-PAGE analysiert. Zusätzlich wurde eine weitere Probe im Anschluss an die Expression genommen, von der die periplasmatische Fraktionen isoliert und gemeinsam mit der cytoplasmatischen und der Pelletfraktion auf dem SDS-Gel untersucht wurden (siehe Abbildung 28).

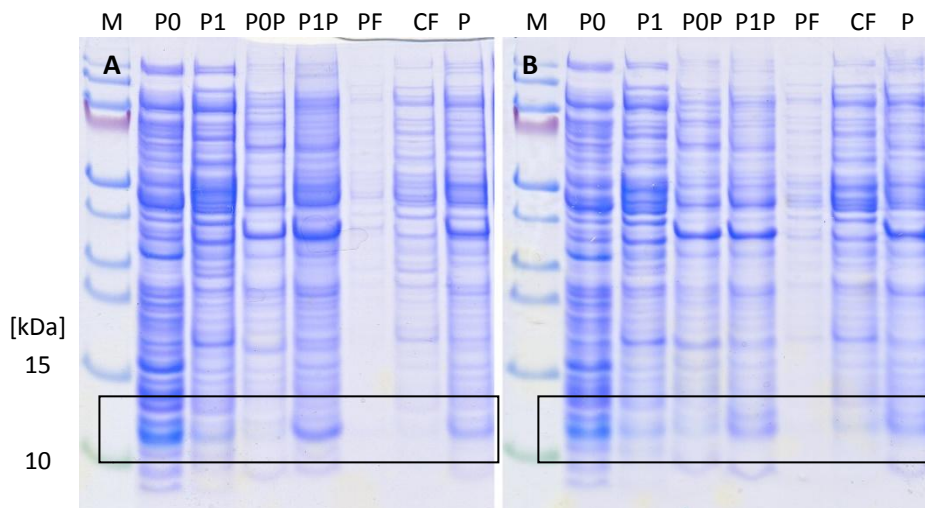


Abbildung 28. Expression von β -Cinnamomin mit pET-28a(+)-DsbAssCin (A) und pET-28a(+)-MalEssCin (B) in *E. coli* C43(DE3) in TBS-Medium: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. PO 0 h-Probe Löslicher Überstand. P1 24 h-Probe Löslicher Überstand. POP 0 h-Probe Pelletfraktion. P1P: 24 h-Probe Pelletfraktion. PF: Periplasmatische Fraktion. CF: Cytoplasmatische Fraktion. P: Pelletfraktion nach Isolierung der periplasmatischen und cytosolischen Fraktion.

Wie in den vorangegangenen Expressionen in *E. coli* C43(DE3) (Abbildung 25 und Abbildung 26, siehe oben) wurde β -Cinnamomin mit beiden Plasmiden zu einem großen Teil in Form von *inclusion bodies* exprimiert und es konnte kaum eine Verbesserung der Expression und Sekretion des β -Elicitins in löslicher Form festgestellt werden. β -Cinnamomin, exprimiert mit pET-28a(+)-MalEssCin, wurde erneut nicht vollständig prozessiert und lag zum Teil in ungespaltener Form mit der MalE Sekretionssignalsequenz vor. Im Gegensatz zu der Expression mit pET-28a(+)-MalEssCin wurde das exprimierte β -Cinnamomin der Expression mit pET-28a(+)-DsbAssCin-Expression vermutlich fast vollständig prozessiert, da auf dem SDS-Gel nur eine Bande auf Höhe des geschnittenen Produktes sichtbar war. Die Isolierung der periplasmatischen Fraktion im kleinen 500 μ L-Maßstab für die SDS-PAGE in diesem Experiment (Durchführung siehe Abschnitt 5.2.17.2) funktionierte noch schlechter als zuvor im größeren 35 mL-Maßstab für die Aufreinigung (siehe vorheriger Abschnitt 2.2.3.2.3), da sie vergleichsweise signifikant weniger Protein enthielt. In Folge dessen konnte im Periplasma kein β -Cinnamomin spezifisch nachgewiesen werden.

Vergleicht man die Expression β -Cinnamomins im TB- und im TBS-Medium, kann keine Verbesserung des Expressionsniveaus festgestellt werden. Im Gegenteil scheint die Expression in TBS-Medium sogar minimal schlechter zu funktionieren. Da schließlich auch durch die Kultivierung in TBS-Medium keine verbesserte lösliche Expression erreicht werden konnte und sich die periplasmatische Expression und Aufreinigung von β -Cinnamomin mit C-terminalem His-tag als wesentlich effektiver erwies, wurde die Expression von pET-28a(+)-DsbAssCin und pET-28a(+)-MalEssCin ohne His-tag nicht weiter optimiert.

2.2.3.3 Expression mit pET-28a(+)*DsbAssCinHis*, pET-28a(+)*MalEssCinHis* und pET-28a(+)*PelBssCinHis*

Um die Aufreinigung β -Cinnamomins wesentlich zu vereinfachen, wurden drei weitere pET-28a(+)-Varianten mit His-tag generiert. Das β -Cinnamomingen wurde mit jeweils einer der drei N-terminalen Sekretionssignalsequenzen PelBss, DsbAss und MalEss ohne Stoppcodon unmittelbar vor den pET-28a(+)-eigenen C-terminalen His-tag kloniert.

2.2.3.3.1 Klonierung

Zur Expression von β -Cinnamomin mit den drei N-terminalen Sekretionssignalsequenzen DsbAss, MalEss und PelBss und einem C-terminalen His-tag wurden die drei Plasmide pET-28a(+)*MalEssCinHis*, pET-28a(+)*DsbAssCinHis* und pET-28a(+)*PelBssCinHis* generiert. Für die Plasmide pET-28a(+)*DsbAssCinHis* und pET-28a(+)*MalEssCinHis* wurde das β -Cinnamomingen jeweils inklusive der DsbAss bzw. der MalEss, jedoch ohne Stoppcodon, von pET-28a(+)*HisCin* amplifiziert. Die PCR wurde mit den Primern PeriCinHisFwd und PeriCinHisRev (siehe Tabelle 5 in Abschnitt 5.1.2) durchgeführt. Der PeriCinHisFwd-Primer war identisch mit der parentalen DNA-Sequenz, da er ausschließlich zur Amplifikation des Gens und der *NdeI*-Restriktionsschnittstelle diente. Mit Hilfe des verwendeten PeriCinHisRev-Primers wurden beide Genfragmente ohne Stoppcodon amplifiziert und eine *XhoI*-Restriktionsschnittstelle angehängt. Die PCR-Produkte wurde jeweils über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in die beiden Plasmide pET-28a(+)*MalEssCin* und pET-28a(+)*DsbAssCin* direkt hinter die jeweilige Sekretionssignalsequenz und direkt vor die C-terminale His-tag-Sequenz des pET-28a(+)-Plasmids kloniert.

Für pET-28a(+)*PelBssCinHis* wurde nur das β -Cinnamomingen ohne Stoppcodon von pET-28a(+)*HisCin* mit den beiden Primern PelBssFwd und PeriCinHisRev (siehe Tabelle 5 in Abschnitt 5.1.2) amplifiziert. Mit PelBssFwd wurde N-terminal die PelB Sekretionssignalsequenz an das β -Cinnamomingen angefügt und eine *BspHI*-Restriktionsschnittstelle angehängt. Mit PeriCinHisRev wurden das Gen ohne Stoppcodon amplifiziert und eine *XhoI*-Restriktionsschnittstelle angehängt. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *BspHI* und *XhoI* in pET-28a(+)*HisCin* kloniert, welches mit *NcoI* und *XhoI* verdaut worden war. Die Plasmide wurden anschließend in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert und durch Sequenzierung auf Mutationen überprüft. Die Plasmide wurden dann anschließend zur Expression in elektrokompente *E. coli* C43(DE) transformiert.

2.2.3.3.2 Testexpression mit pET-28a(+)*MalEssCinHis* und pET-28a(+)*DsbAssCinHis* im Schüttelkolben

Da vor der quantitativen Analyse der Expression mit allen drei Sekretionssignalsequenzen zuerst die Aufreinigung über den His-tag etabliert und geeignete Expressionsbedingungen gefunden werden sollten, wurde die Expression mit den Plasmiden direkt in der Reihenfolge getestet, in der die Klonie-

rung gelang. Zunächst wurde die Expression von β -Cinnamomin mit dem pET-28a(+)-DsbAssCinHis Plasmid in *E. coli* C43(DE3) in 250 mL TB-Medium getestet, da dieses Plasmid zuerst erfolgreich kloniert werden konnte. Die Expression von β -Cinnamomin wurde mit 0,8 mM IPTG induziert, die Kulturen für 24 h bei 30 °C exprimiert, im Anschluss geerntet und die Zellpellets bei -20 °C eingefroren. Vor der Induktion und nach 24 h Expression wurde je eine Probe genommen, aufgeschlossen und über SDS-PAGE auf Expression von β -Cinnamomin überprüft. Anschließend wurde auch die Expression mit pET-28a(+)-MalEssCinHis auf dieselbe Weise getestet und über SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 29).

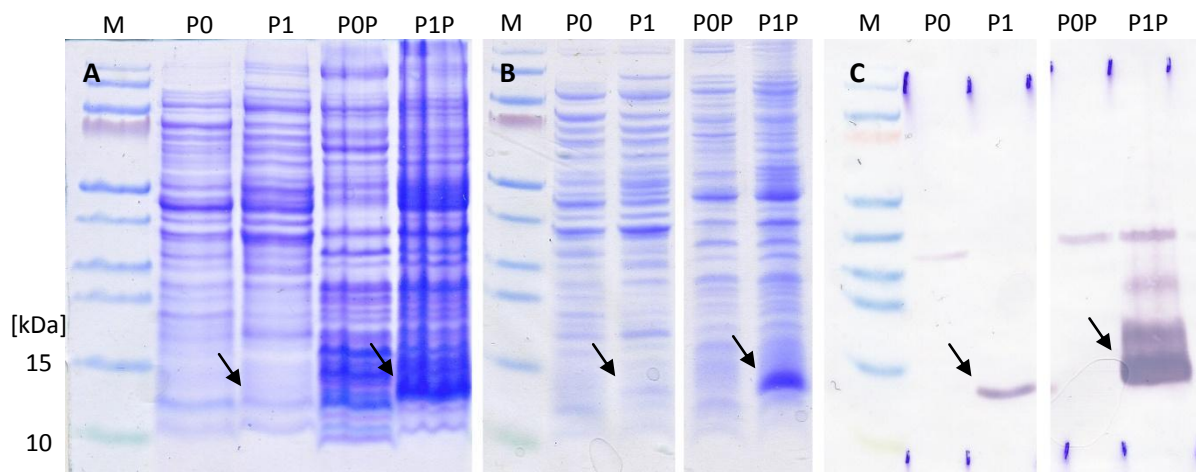


Abbildung 29. SDS-Gel der Expression von β -Cinnamomin in *E. coli* C43(DE3) mit pET-28a(+)-DsbAssCinHis (A), SDS-Gel (B) und Western-Blot (C) der Expression von β -Cinnamomin in *E. coli* C43(DE3) mit pET-28a(+)-MalEssCinHis: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. PO 0 h-Probe Löslicher Überstand. P1 24 h-Probe Löslicher Überstand. POP 0 h-Probe Pelletfraktion. P1P: 24 h-Probe Pelletfraktion.

Wie in Abbildung 29 A und B zu erkennen, fiel die lösliche Expression β -Cinnamomins erneut verhältnismäßig niedrig aus. Die Elicitinbande bei 12 kDa in den 24 h-Proben beider Plasmidvarianten war nur sehr schwach auf den SDS-Gelen zu erkennen. Aus diesem Grund wurde nachträglich eine Western-Blot Analyse der Proben der Expression von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)-MalEssCinHis durchgeführt, um zu überprüfen, ob überhaupt lösliches Elicitin exprimiert worden war. Obwohl die Expression augenscheinlich relativ niedrig ausfiel, konnte sie zweifelsfrei mit Hilfe des Western-Blots nachgewiesen werden. Der Hauptteil des Proteins wurde aber auch weiterhin in Form von unlöslichen *inclusion bodies* exprimiert.

2.2.3.3.3 Aufreinigung β -Cinnamomins exprimiert mit pET-28a(+)-MalEssCinHis

Da die Aufreinigung zunächst anhand einer Variante optimiert werden sollte, die Klonierung von pET-28a(+)-PelBssCinHis noch nicht erfolgreich abgeschlossen war und die Expressionsniveaus mit den beiden anderen Plasmiden abgeschätzt vom SDS-Gel vermutlich sehr ähnlich waren, wurde zunächst die Aufreinigung von β -Cinnamomin exprimiert von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)-MalEssCinHis getestet. Um die His-tag-Aufreinigung zu testen, wurde das mit *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)-MalEssCinHis

exprimierte β -Cinnamomin mit Hilfe des C-terminalen His-tags durch IMAC aufgereinigt. Das Zellpellet einer 500 mL-Expression wurde in Lysispuffer I pH 7,0 resuspendiert und aufgeschossen. Der zellfreie Extrakt wurde auf eine mit Lysispuffer I pH 7,0 equilibrierte 5 mL HisTrap™ HP-Säule aufgetragen und das ungebundene Protein mit Waschpuffer I pH 7,0 von der Säule gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit einem Gradienten in Elutionspuffer I pH 7,0 eluiert und in 3 mL-Fractionen gesammelt. Die Elution der Proteine wurde durch Messung der A_{280} verfolgt und die Elutionsfraktionen und das zellfreie Extrakt über SDS-PAGE und Western-Blot untersucht (siehe Abbildung 30). Die Elutionsfraktionen 6, 7 und 8 wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration (3 kDa *cut-off*) aufkonzentriert und anschließend über eine PD-10-Säule in 3,5 mL 20 mM MES-Puffer pH 6,5 umgepuffert. Die Konzentration der umgepufferten Proteinlösung wurde über die A_{280} bestimmt.

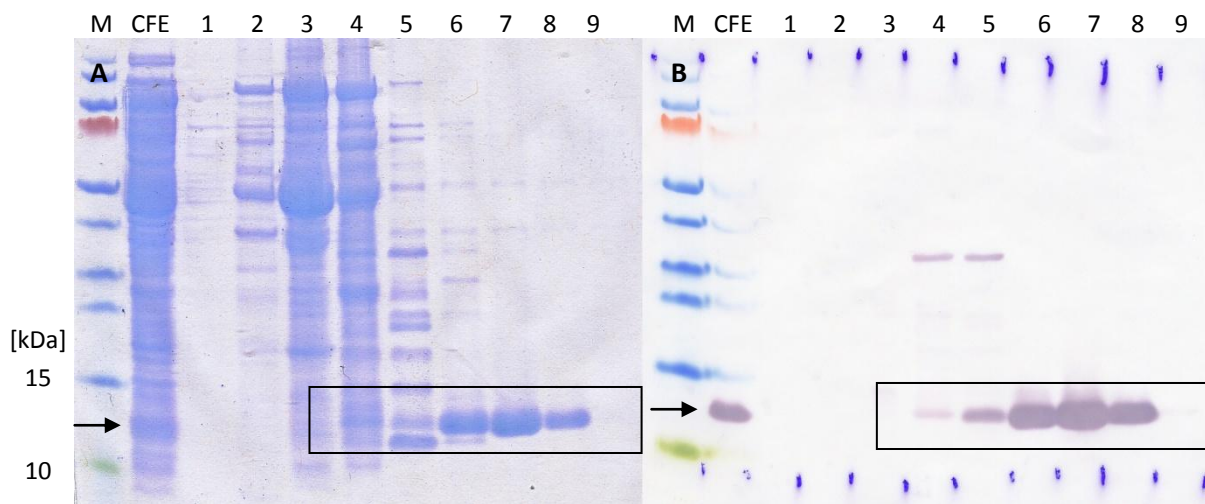


Abbildung 30. SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B) der Aufreinigung der Expression mit pET-28a(+)MalEssCinHis in *E. coli* C43(DE3) bei 30 °C über immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. CFE: Zellfreier Extrakt. 1 - 9: Elutionsfraktionen 1 bis 9.

β -Cinnamomin konnte mit Hilfe des C-terminalen His-tags in hoher Reinheit mittels IMAC aufgereinigt werden. Auf dem SDS-Gel und Western-Blot in Abbildung 30 konnte in den Elutionsfraktionen 6, 7 und 8 aufgereinigtes β -Cinnamomin in hoher Konzentration nachgewiesen werden. Bei der Bande bei ca. 35 kDa handelt es sich, wie bereits in Abschnitt 2.2.1.2.6 erwähnt, um ein vermutlich Histidinreiches *E. coli*-Protein, das auf fast allen Western-Blot zu finden war (siehe Abbildung 20 A in Abschnitt 2.2.1.2.6). Nach dem Vereinigen, Aufkonzentrieren und Umpuffern der Elutionsfraktionen konnte für die 500 mL-Expression mit pET-28a(+)MalEssCinHis in *E. coli* C43(DE3) eine Gesamtausbeute von 4,4 mg β -Cinnamomin oder 8,8 mg β -Cinnamomin pro Liter Kultur bestimmt werden. Nach Lagerung der Proteinlösung bei 4°C über Nacht konnte jedoch eine starke Präzipitation festgestellt werden. Dies war wahrscheinlich auf den isoelektrischen Punkt zurückzuführen, da dieser für das vollständig prozessierte Protein ohne MalE Sekretionssignalsequenz mit C-terminalen His-tag bei $pI = 7,18$ und somit sehr nahe an dem pH-Wert des 20 mM MES-Puffers pH 7,0 lag.

Im Vergleich zur Aufreinigung von β -Cinnamomin durch Isolierung der periplasmatischen Fraktion mit anschließender Kationenaustauschchromatographie konnte eine deutliche Verbesserung der Ausbeute an löslich exprimiertem Elicitin erreicht werden. Bereits im zellfreien Extrakt konnte im Vergleich zu der Probe des zellfreien Extraktes der Aufreinigung über Kationenaustauschchromatographie (siehe Abbildung 27 in Abschnitt 2.2.3.2.3) eine höhere β -Cinnamominkonzentration nachgewiesen werden. Da die Aufreinigung über His-tag sehr gut funktionierte, wurde die lösliche Expression von β -Cinnamomin weiter optimiert.

2.2.3.3.4 Expression mit pET-28a(+)MalEssCinHis im 10 L-Maßstab

Um die relativ unkontrollierten Bedingungen der Schüttelkolbenexpression mit den wesentlich besser kontrollierten Bedingungen der Expression im Fermenter zu vergleichen, sollte die Expression von β -Cinnamomin mit *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCinHis im Fermenter getestet werden. Die Expression sollte bei konstantem pH, Sauerstoffeintrag und Rührerdrehzahl getestet werden. Die Expression wurde dazu in einem 15 L-Biostat® ED Fermenter in 10 L TB-Medium durchgeführt. Der Fermenter wurde mit 500 mL einer Übernachtskultur von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCinHis angeimpft und bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 1$ bei 37 °C, 300 rpm und einer Begasung mit 5 L Luft pro Minute inkubiert. Der pH wurde während der gesamten Fermentation auf einen Wert von 6,5 eingestellt. Bei $OD_{600} = 1$ wurde die Expression der Kultur mit 0,4 mM IPTG induziert und anschließend für 24 h bei 30 °C und 300 rpm exprimiert. Das Wachstum wurde durch regelmäßige OD_{600} -Messungen überwacht. Nach der Expression wurden die 10 L-Kultur geerntet, die Zellmasse auf zwei Pellets mit Zellnassgewichten von $m = 29,09$ g und $m = 29,15$ g aufgeteilt und bei -20 °C eingefroren. Vor der Induktion und zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation wurde je eine Probe zur Analyse über SDS-PAGE genommen (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32). Die Zellpellets wurden in Lysispuffer II pH 6,5 resuspendiert, aufgeschlossen und in zwei separaten Aufreinigungen unmittelbar hintereinander mittels His-tag-Aufreinigung aufgereinigt. Der zellfreie Extrakt jedes Zellpellets wurde dazu auf eine XK-26-Säule (25 mL Ni Sepharose™ 6 Fast Flow) geladen. Das ungebundene Protein wurde mit Waschpuffer II pH 6,5 von der Säule gewaschen und die gebundenen Proteine mit einem Gradienten in 100 mL Elutionspuffer I pH 6,5 eluiert. Die Elution wurde durch Messung der A_{280} verfolgt, das Eluat in 3 mL-Fractionen aufgefangen und über SDS-PAGE sowie Western-Blot untersucht (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32). Die Fractionen beider Aufreinigungen, die sauberes β -Cinnamomin enthielten, wurden vereinigt und über Ultrafiltration in 20 mM MOPS-Puffer pH 6,5 umgepuffert und gleichzeitig aufkonzentriert.

In den beiden Abbildungen sind das SDS-Gel und der Western-Blot der Expression im 10 L-Maßstab und, exemplarisch für die beiden Aufreinigungen, die SDS-Gele und Western-Blots der Aufreinigung des ersten Zellpellets abgebildet. Auf dem Western-Blot konnte im löslichen Überstand der Proben die Zunahme der Expression von β -Cinnamomin in löslicher Form durch kontinuierliche Zunahme der

Banden sehr gut nachverfolgt werden. In den Pelletfraktionen konnte zudem die Bildung von unlöslichem β -Cinnamomin in Form von *inclusion bodies* bei ca. 12 kDa nachgewiesen werden. Auffällig war die zweite Bande bei ca. 12,5 kDa, die von der Größe her exakt β -Cinnamomin mit der Sekretionssignalsequenz entsprach. Die beiden Banden lieferten einen starken Hinweis darauf, dass β -Cinnamomin einerseits unter Abspaltung der Sekretionssignalsequenz erfolgreich in das Periplasma sekretiert wurde und dort *inclusion bodies* bildete, gleichzeitig aber auch zum Teil nicht vollständig prozessiert worden ist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit lag dies an einem Engpass in der Sekretion des Elicitins oder Problemen mit der Abspaltung der Sekretionssignalsequenz, weshalb dieser Teil des Proteins nicht korrekt sekretiert wurde und es zu weiterer Bildung von *inclusion bodies* im Cytoplasma *E. coli* kam. Nach Aufreinigung über den C-terminalem His-tag konnte β -Cinnamomin in hoher Reinheit in einer Ausbeute von 61,3 mg bzw. 6,1 mg β -Cinnamomin pro Liter Kultur erhalten werden.

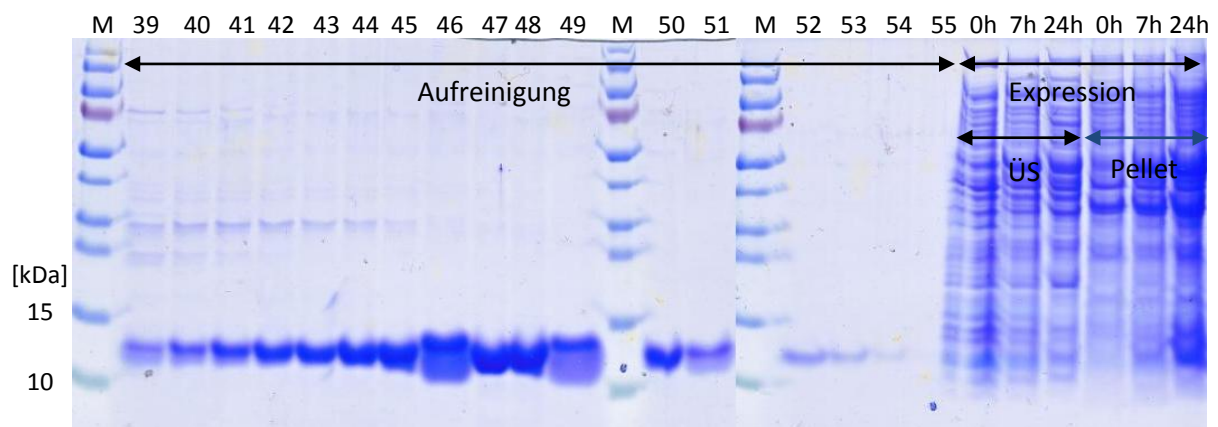


Abbildung 31. SDS-PAGE der Aufreinigung der 10 L-Expression mit pET-28a(+)MalEssCinHis über immobilisierte Metallionenaффinitätschromatographie: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 39 - 55: Elutionsfraktionen 39 bis 55. ÜS: Löslicher Überstand. Pellet: Pelletfraktion.

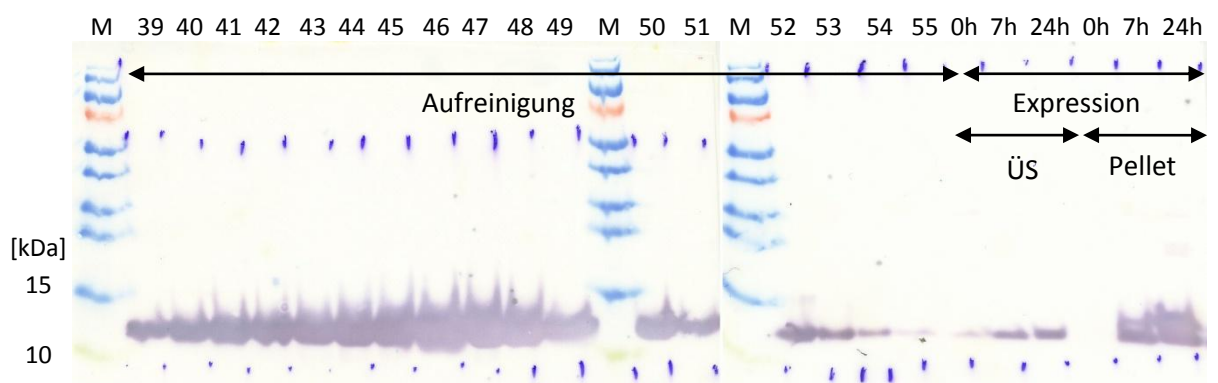


Abbildung 32. Western-Blots der Aufreinigung der 10 L-Expression mit pET-28a(+)MalEssCinHis über immobilisierte Metallionenaффinitätschromatographie: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 39 - 55: Elutionsfraktionen 39 bis 55. ÜS: Löslicher Überstand. Pellet: Pelletfraktion.

Auch in weiteren Fermentationsversuchen in 10 L-Maßstab und in 4,5 L-Maßstab konnten keine besseren Ausbeuten erzielt werden, weshalb die Expression im Schüttelkolben die geeignetere Methode zur Expression β -Cinnamomin darstellte.

2.2.3.3.5 Optimierung der Zusammensetzung des TB-Mediums

Da in mehreren Experimenten drastische Unterschiede in Wachstum und Expression durch die Verwendung verschiedener Hefeextrakte und Tryptone/Peptone von unterschiedlichen Herstellern oder Chargen beobachtet werden konnten, wurde die Expression von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCinHis in TB-Medien, hergestellt aus verschiedenen Kombinationen aller im Labor verwendeten Hefeextrakte und Tryptone/Peptone, getestet. Insgesamt wurden 12 unterschiedliche TB-Medien, hergestellt aus drei verschiedenen Hefeextrakten und vier verschiedenen Tryptonen/Peptonen, eingesetzt (siehe Tabelle 1). Zwölf Kulturen mit jeweils 50 mL eines der 12 TB-Medien wurde mit *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCinHis angeimpft und die Expression der Kulturen mit 0,4 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Kulturen für 24 h bei einer Temperatur von 30 °C exprimiert. Vor der Induktion und nach der Expression wurde je eine Probe genommen, aufgeschlossen und über SDS-PAGE untersucht (siehe Abbildung 33).

Tabelle 1. Tryptone/Peptone und Hefeextrakte, die in den 12 verschiedenen TB-Medienvarianten zur Optimierung der löslichen β -Cinnamominexpression mit pET-28a(+)MalEssCinHis in *E. coli* C43(DE3) eingesetzt wurden

Kürzel	Bezeichnung	Art.-Nr.	Charge	Hersteller
<i>Hefeextrakt</i>				
1	Hefeextrakt BioChemica	A1552,1000	1P008856	AppliChem
2	Hefeextrakt pulv., für die Bakteriologie	2363.2	041167072	Carl Roth
3	Hefeextrakt für die Biotechnologie Fermtech®	111926	VM331726	Merck
<i>Trypton/Pepton</i>				
A	Tryptone BioChemica aus Casein	A1553,1000	1J001570	AppliChem
B	Pepton aus Sojabohne (Enzymatisch verdaut)	A2206,1000	92008164	AppliChem
C	Peptone from meat, peptic digest	70174	1242416	Fluka
D	Pepton from casein, acid digest	70171	1391305	Fluka

Bei der Auswertung des in Abbildung 33 dargestellten SDS-Gels der Testexpressionen mit den 12 TB-Medien konnte für die getesteten Varianten 1A, 1C und 2C die höchste Expression pro Zelle festgestellt werden. Das beste Wachstum der drei Kulturen wies Variante 2C mit einer OD₆₀₀ von 8,1 nach 24 h Expression auf. Im Gegensatz dazu wiesen Variante 1A nach der Expression eine OD₆₀₀ = 6,7 und Variante 1C eine OD₆₀₀ = 7,0 auf. Da diese drei Varianten das höchste Expressionsniveau aufwiesen und gut angewachsen waren, wurden sie ausgewählt, um mit ihnen die Expression in einer Doppelbestimmung zu wiederholen. Das SDS-Gel der Wiederholung der Expression in den drei TB-Medien ist in Abbildung 34 dargestellt.

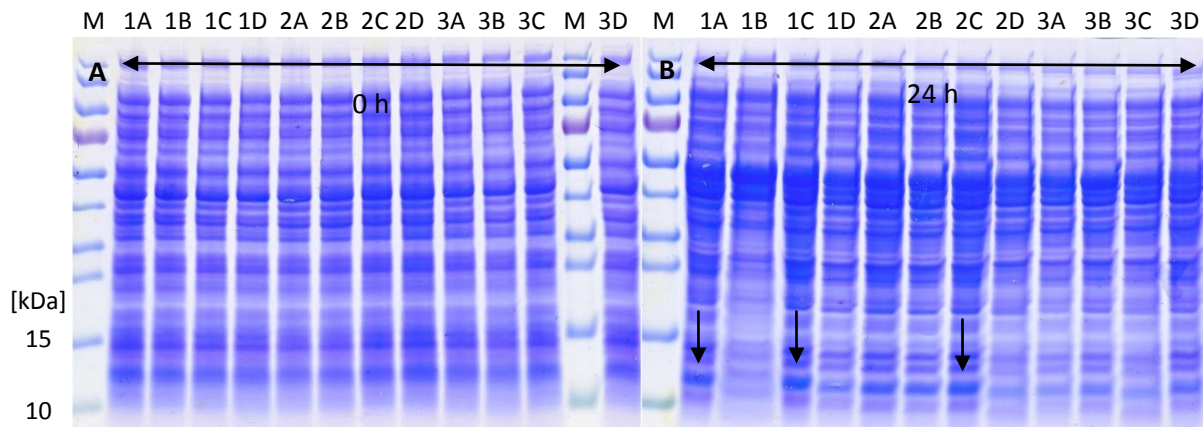


Abbildung 33. Optimierung der Zusammensetzung des TB-Mediums anhand der Expression von *E. coli* C43(DE) pET-28a(+)-MalEssCinHis: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. A: Löslicher Überstand zu dem Zeitpunkt der Induktion. B: Löslicher Überstand nach 24 h Expression. 1A - 3D: TB-Medienkombination aus einem der Hefeextrakte 1 - 3 und Tryptone/Peptone A - D (siehe Tabelle 1).

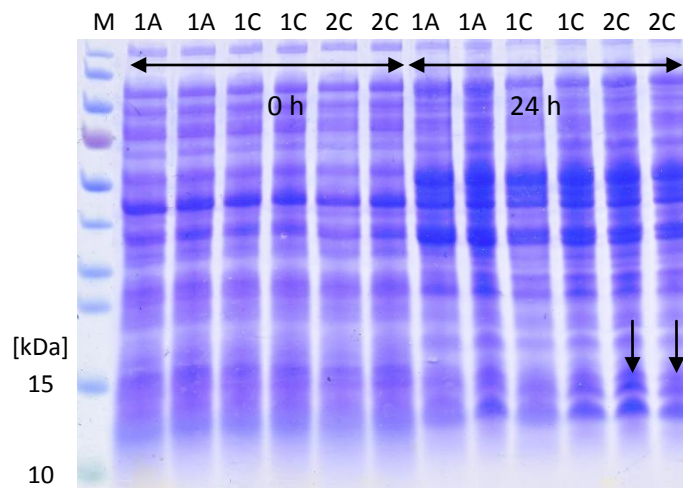


Abbildung 34. Wiederholung der Expression mit pET-28a(+)-MalEssCinHis in *E. coli* C43(DE) zur Optimierung der Zusammensetzung des TB-Mediums: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 1A: Hefeextrakt (AppliChem)/Trypton (AppliChem). 1C: Hefeextrakt (AppliChem)/Peptone from meat (Fluka). 2C: Hefeextrakt (Carl Roth)/Peptone from meat (Fluka).

Die beste Expression zeigte Variante 2C, da für beide Kulturen dieses TB-Mediums intensive Proteinbanden bei 12 kDa festgestellt werden konnten. Zusätzlich wiesen die 2C-Kulturen auch das beste Wachstum auf. Die beiden 2C-Kulturen wuchsen nach 24 h Expression bis zu einer OD_{600} von 7,9 und 7,8 an. Die beiden 1A-Kulturen erreichten beide nur $OD_{600} = 6,3$, die 1C-Kulturen ebenfalls nur $OD_{600} = 6,5$ und $OD_{600} = 6,9$. Für die weitere Arbeit wurde daher die Kombination des Hefeextrakts von Carl Roth und des *Peptone from meat* von Fluka ausgewählt.

2.2.3.3.6 Expression mit pET-28a(+)-MalEssCinHis in „optimierten“ TB-Medium

Die Verbesserung der löslichen Expression durch das so erhaltene „optimierte“ TB-Medium mit Hefeextrakt und Pepton von ausgesuchten Herstellern sollte anschließend durch His-tag-Aufreinigung der Expression von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)-MalEssCinHis quantifiziert werden. Fünf Erlenmeyerkolben mit je 200 mL „optimiertem“ TB-Medium wurden mit *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)-MalEssCinHis

angepflegt. Die Expression von β -Cinnamomin wurde mit 0,4 mM IPTG induziert und die Kulturen bei 30 °C inkubiert. Nach 24 h Expression wurde jeweils eine Probe genommen, aufgeschlossen und über SDS-PAGE analysiert. Die Kulturen wurden im Anschluss an die Expression vereinigt und die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde mit Lysispuffer III pH 6,5 resuspendiert, aufgeschlossen und der zellfreie Überstand mit Hilfe des His-tags über Metallionenaffinitätschromatographie aufgereinigt. Der zellfreie Extrakt wurde dazu auf eine equilibrierte XK-26-Säule (25 mL Ni Sepharose™ 6 Fast Flow) geladen. Da der Aufreinigungsgrad des β -Cinnamomins in allen voraus gegangenen Aufreinigungen mit dem ÄKTA™-System sehr hoch gewesen war, wurde auf einen zusätzlichen Waschpuffer verzichtet und der anschließende Waschschrift mit Lysispuffer III pH 6,5 durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden über SDS-PAGE überprüft (siehe Abbildung 35) und die Fraktionen, welche β -Cinnamomin enthielten, vereinigt. Die aufgereinigte β -Cinnamomin-Lösung wurde über Ultrafiltration auf ein Endvolumen von 10 mL aufkonzentriert und in vier Schritten über eine PD-10-Säule in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5 umgepuffert.

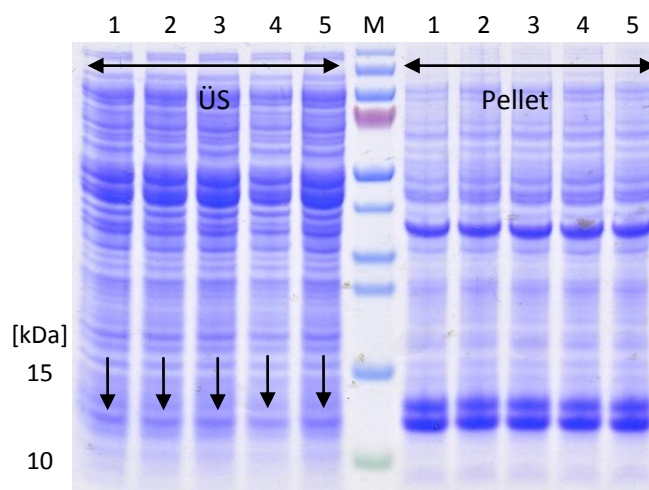


Abbildung 35. Test der Expression von β -Cinnamomin mit pET-28a(+)MalEssCinHis in *E. coli* C43(DE3) in „optimiertem“ TB-Medium bei 30 °C M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 1 - 5: Kolben 1 bis 5 mit je 200 mL Kultur. ÜS: Löslicher Überstand nach 24 h Expression. Pellet: Pelletfraktion nach 24 h Expression.

Auf dem SDS-Gel konnte in den löslichen Überständen aller fünf Kulturen nach 24 h eine signifikante Bande auf einer Höhe von 12 kDa festgestellt werden, die im Vergleich zu voran gegangenen Expressionen mit pET-28a(+) wesentlich intensiver war. Wiederum wurde je eine Bande für das vollständig prozessierte Protein und β -Cinnamomin mit ungespaltener MalE Sekretionssignalsequenz detektiert, die auch schon in der Expression im 10 L Fermenter beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 32 in Abschnitt 2.2.3.3.4). Insgesamt konnte eine Gesamtausbeute von 13,9 mg Protein bzw. 13,9 g Protein pro Liter Kultur, bezogen auf das Kulturvolumen von 1 L bestimmt werden. Im Vergleich zu der Expression im Schüttelkolben vor der Optimierung der Zusammensetzung des TB-Mediums konnte die Expression somit durch die Auswahl von Hefextrakt und Pepton bestimmter Hersteller um einen

Faktor von ca. 1,6 gesteigert werden. Weil mit diesem Versuch nun neben der etablierten His-tag-Aufreinigung auch alle Expressionsbedingungen für einen quantitativen Vergleich der drei Sekretionssignalsequenzen ausreichend optimiert worden waren, wurde dieser schließlich durchgeführt.

2.2.3.3.7 Quantitativer Vergleich der drei Sekretionssignalsequenzen

Um zu bestimmen, welche der drei Sekretionssignalsequenzen der Proteine DsbA, MalE und PelB sich am effektivsten zur Sekretion von β -Cinnamomin ins Periplasma erweist, wurde die Expression von β -Cinnamomin mit pET-28a(+)-DsbAssCinHis, pET-28a(+)-MalEssCinHis und pET-28a(+)-PelBssCinHis in *E. coli* C43(DE3) im 200 mL-Maßstab in 2 L-Erlenmeyerkolben getestet. Jeweils zweimal 200 mL TB-Medium wurden mit einem *E. coli* C43(DE3)-Stamm mit einem der Plasmide pET-28a(+)-MalEssCinHis, pET-28a(+)-DsbAssCinHis oder pET-28a(+)-PelBssCinHis angeimpft, die Expression des Elicitins mit 0,4 mM IPTG induziert und die Kulturen für 24 h bei 30 °C inkubiert. Vor Induktion und nach 24 h Expression wurde jeweils eine Probe genommen, aufgeschlossen und über SDS-PAGE und Western-Blot untersucht (siehe Abbildung 36). Im Anschluss an die Expression wurden die Zellen geerntet. Die Zellpellets wurden in Lysispuffer IV pH 6,5 resuspendiert und mittels French Press aufgeschlossen. Anschließend wurden die zellfreien Extrakte über IMAC (5 mL HisTrap™ HP-Säule, GE Healthcare) aufgereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden über SDS-PAGE überprüft, die β -Cinnamomin enthaltenden Fraktionen vereinigt, mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 umgepuffert.

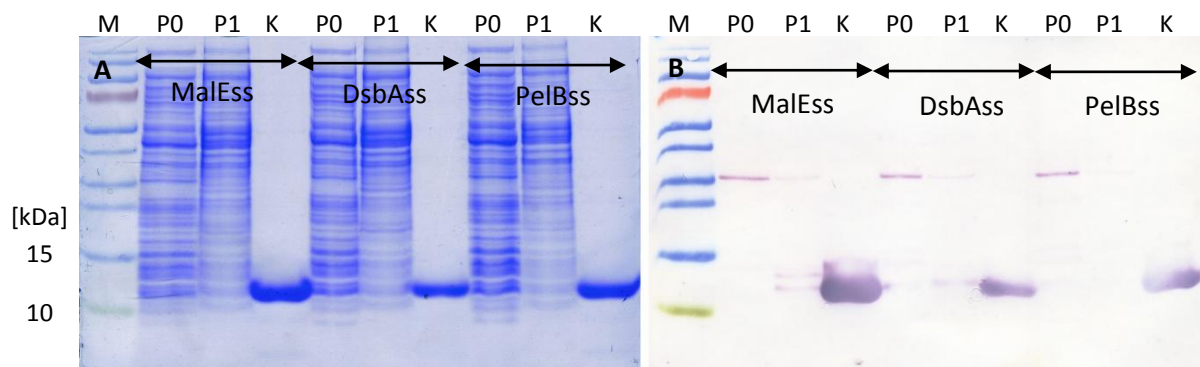


Abbildung 36. SDS-Gel (A) und Western-Blot (B) der Vergleichsexpressionen mit pET-28a(+)-MalEssCinHis, pET-28a(+)-DsbAssCinHis und pET-28a(+)-PelBssCinHis in *E. coli* C43(DE3) bei 30 °C [50]: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. PO: Löslicher Überstand 0 h-Probe. P1: Löslicher Überstand nach 24 h Expression. K: Aufgereinigte β -Cinnamomin-Lösung.

In Abbildung 36 sind das SDS-Gel und der Western-Blot der Vergleichsexpressionen der drei Sekretionssignalsequenzen dargestellt. Für die Expression mit der MalE Sekretionssignalsequenz kann im Western Blot erneut β -Cinnamomin mit und ohne abgespaltener Signalsequenz detektiert werden, während für die Expression mit der DsbAss nur eine Bande für vollständig prozessiertes Protein zu sehen ist. Im Zellextrakt der Expression von β -Cinnamomin mit der PelBss konnte dagegen auf dem Western-Blot überhaupt keine Bande nachgewiesen werden, obwohl für das aufgereinigte Protein

eine deutliche Bande vorhanden ist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit lag dies an einer mangelhaften Übertragung des Proteins von SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran, zum Beispiel durch eine kleine Luftblase, da auch die linke Hälfte der Bande der Pelletfraktion offensichtlich durch ein schlechtes *blotten* beeinträchtigt wurde. Nach dem SDS-Gel in Abbildung 38 zu schließen, konnte β -Cinnamomin jeweils in mehr als 95 % Reinheit erhalten werden. Über Absorptionsmessung bei 280 nm wurde jeweils die Proteinkonzentration der aufgereinigten β -Cinnamominlösungen in Dreifachbestimmung ermittelt und darüber die Ausbeuten bestimmt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2. Ausbeute der Vergleichsexpression mit pET-28a(+)-DsbAssCinHis, pET-28a(+)-PelBssCinHis und pET-28a(+)-MalEssCinHis in *E. coli* C43(DE3) in *E. coli* C43(DE3) in 24 h bei einer Expressionstemperatur von 30 °C.

	MalEss	DsbAss	PelBss
Kulturvolumen der Expression	400 mL	400 mL	400 mL
Zellnassgewicht Pellet	7,2 g	8,8 g	7,3 g
Ausbeute (g Pellet/L Kultur)	18,1 g/L	22,0 g/L	18,2 g/L
Ausbeute (mg Cin/L Kultur)	17,6 mg/L	8,2 mg/L	13,3 mg/L
Gesamtausbeute	7,0 mg	3,3 mg	5,3 mg

In der Expression von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)-MalEssCinHis wurde die größte Menge β -Cinnamomin gebildet. Bezogen auf das Kulturvolumen von 400 mL wurden Ausbeuten von 17,6 mg β -Cinnamomin pro Liter Kultur für die Expression mit der MalE Sekretionssignalsequenz, 8,2 mg β -Cinnamomin pro Liter Kultur für die Expression mit der DsbA Sekretionssignalsequenz und 13,3 mg β -Cinnamomin pro Liter Kultur für die Expression mit der PelB Sekretionssignalsequenz erhalten. Die Expression mit pET-28a(+)-MalEssCinHis lieferte damit mehr als doppelt so viel aufgereinigtes Elicitin, wie die Expression mit pET-28a(+)-DsbAssCinHis und ca. 30 % mehr als die Expression mit pET-28a(+)-PelBssCinHis. Zusammengefasst konnte somit gezeigt werden, dass sich MalEss am besten für die Sekretion von β -Cinnamomin in *E. coli* eignet. Bei einer späteren Expression im Rahmen der biokatalytischen Versuche konnte mit *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)-MalEssCinHis schließlich sogar eine Ausbeute von 25,5 mg β -Cinnamomin pro Liter Kultur erreicht werden.

2.2.3.4 Expression mit pET-28a(+)-MalEssCryHis

Um die Expression eines weiteren Elicitins mit den optimierten Expressionsbedingungen zu testen, wurde β -Cryptogein unter den gleichen Bedingungen exprimiert.

2.2.3.4.1 Klonierung

Um β -Cryptogein mit pET-28a(+) (siehe Abbildung 63 in siehe Abschnitt 7.3) im Periplasma von *E. coli* C43(DE3) zu exprimieren, wurde die Plasmidvariante pET-28a(+)-MalEssCryHis generiert. Dazu wurde das *cry* Gen mit den PCR-Primern MalEssCryFwd und MalEssCryRev über PCR amplifiziert und das aufgereinigte PCR-Produkt über die Restriktionsenzyme *Bsp*HI und *Xho*I in pET-28a(+)-HisCin, welches mit *Nco*I und *Xho*I verdaut worden war, kloniert. Über den Primer MalEssCryFwd wurden dabei die

MalE Sekretionssignalsequenz sowie die *Bsp*HI-Restriktionsschnittstelle an das Gen angefügt. Über den Primer MalEssCryRev wurde das *cry* Gen ohne Stoppcodon amplifiziert sowie die *Xho*I-Restriktionsschnittstelle angefügt. Das durch Ligation erhaltene Plasmid pET-28a(+)/MalEssCryHis wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und durch Sequenzierung auf Mutationen überprüft. Anschließend wurde das Plasmid zur Expression in *E. coli* C43(DE3) transformiert.

2.2.3.4.2 Periplasmatische Expression von β -Cryptogein mit pET-28a(+)/MalEssCryHis

Die Expression von β -Cryptogein mit pET-28a(+)/MalEssCryHis in *E. coli* C43(DE3) wurde unter denselben Bedingungen durchgeführt, die als optimal für die Expression von β -Cinnamomin mit pET-28a(+)/MalEssCin identifiziert worden waren. Zwei Erlenmeyerkolben mit je 200 mL TB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)/MalEssCryHis angeimpft und die Expression bei OD₆₀₀ = 1 mit 0,4 mM IPTG induziert. Die Kulturen wurden für 24 h bei einer Temperatur von 30 °C exprimiert und die Zellen anschließend geerntet. Vor Induktion, sowie während der Expression, wurden außerdem zu mehreren Zeitpunkten Proben genommen, aufgeschlossen und anschließend auf einem SDS-Gel untersucht (siehe Abbildung 37).

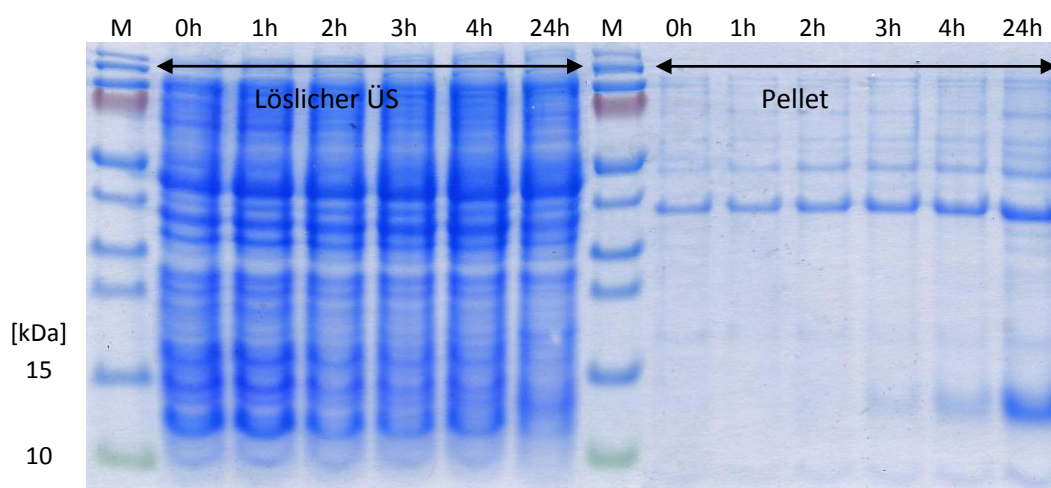


Abbildung 37. Expression von β -Cryptogein mit pET-28a(+)/MalEssCryHis in *E. coli* C43(DE3) im Schüttelkolben für 24 h bei 30 °C: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. Löslicher ÜS: Löslicher Überstand. Pellet: Pelletfraktion.

Wie in der Abbildung zu sehen ist, wurde auch β -Cryptogein mit den optimierten Expressionsbedingungen vor allen Dingen in unlöslicher Form in *inclusion bodies* gebildet. Die Zunahme konnte sehr gut über den gesamten Verlauf der Expression verfolgt werden. Im Gegensatz zu β -Cinnamomin wurde β -Cryptogein jedoch ausschließlich in vollständig prozessierter Form exprimiert. Die Expression in löslicher Form konnte allein über das Gel allerdings nur schwer abgeschätzt werden.

Das Zellpellet der Expression wurde daher in Lysispuffer IV pH 6,5 resuspendiert und mittels French Press aufgeschlossen. Der zellfreie Extrakt wurde anschließend über eine 5 mL HisTrap™ HP-Säule aufgereinigt und die Elutionsfraktionen über SDS-PAGE auf β -Cryptogein untersucht (siehe Abbildung

38). Bereits in der Probe des zellfreien Extrakts in Abbildung 38 war ein signifikant höheres Expressionsniveau von β -Cryptogein im Vergleich zu den voraus gegangenen Expressionen von β -Cinnamomin zu erkennen. Die Elutionsfraktionen E3 bis E13 wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 umgepuffert. Durch Absorptionsmessung bei 280 nm konnte die Konzentration der aufgereinigten β -Cryptogeinlösung bestimmt und damit die Ausbeute an β -Cryptogein berechnet werden.

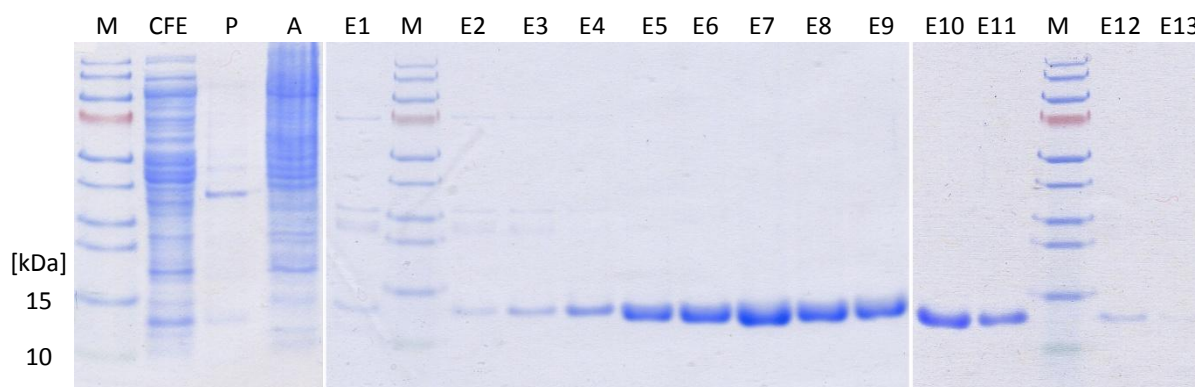


Abbildung 38. Aufreinigung der Expression von β -Cryptogein in *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCryHis im Schüttelkolben für 24 h bei 30 °C: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. CFE: Zellfreier Extrakt. P: Pelletfraktion. A: Durchfluss der Auftragsfraktion. E1 - E13: Elutionsfraktionen 1 - 13.

Insgesamt wurden 17,5 mg sauberes β -Cryptogein erhalten, was einer Ausbeute von 43,8 mg pro Liter Kultur entspricht. Damit konnte β -Cryptogein über periplasmatische Expression mit Hilfe der MalE Signalsequenz in mehr als doppelt so hoher Ausbeute wie β -Cinnamomin hergestellt werden. Die aufkonzentrierte β -Cryptogeinlösung wurde anschließend zur Verbesserung des Substratumsatzes in Ganzzellbiokatalysen getestet (siehe Abschnitt 2.4.4). Zusammengefasst konnte die Expression von β -Cryptogein und β -Cinnamomin erfolgreich durch Sekretion und Expression im Periplasma von *E. coli* realisiert werden.

2.2.4 Dehydroergosterolassay

Um die Funktionalität des exprimierten β -Cinnamomin zu überprüfen, wurde das exprimierte und aufgereinigte β -Cinnamomin der verschiedenen Expressionen zunächst mit dem von Mikes *et al.* beschriebenen DHE-Assay getestet [76]. Bei DHE handelt es sich um ein fluoreszentes Sterol, welches in hohen Konzentrationen die eigene Fluoreszenz unterdrückt [104]. Je stärker DHE mit β -Cinnamomin interagiert, desto schwächer wird die Interaktion der DHE-Moleküle untereinander und desto höher der Anstieg der Fluoreszenz. Um eine unspezifische Bindung des fluoreszenten Sterols am β -Cinnamomin auszuschließen, wurde BSA als Negativkontrolle eingesetzt, da dieses viele unpolare Stoffe, inklusive DHE, unspezifisch binden kann [76]. Beispielhaft ist hier der DHE-Assay einer der β -Cinnamominexpression im 10 L-Maßstab gezeigt (siehe Abbildung 39).

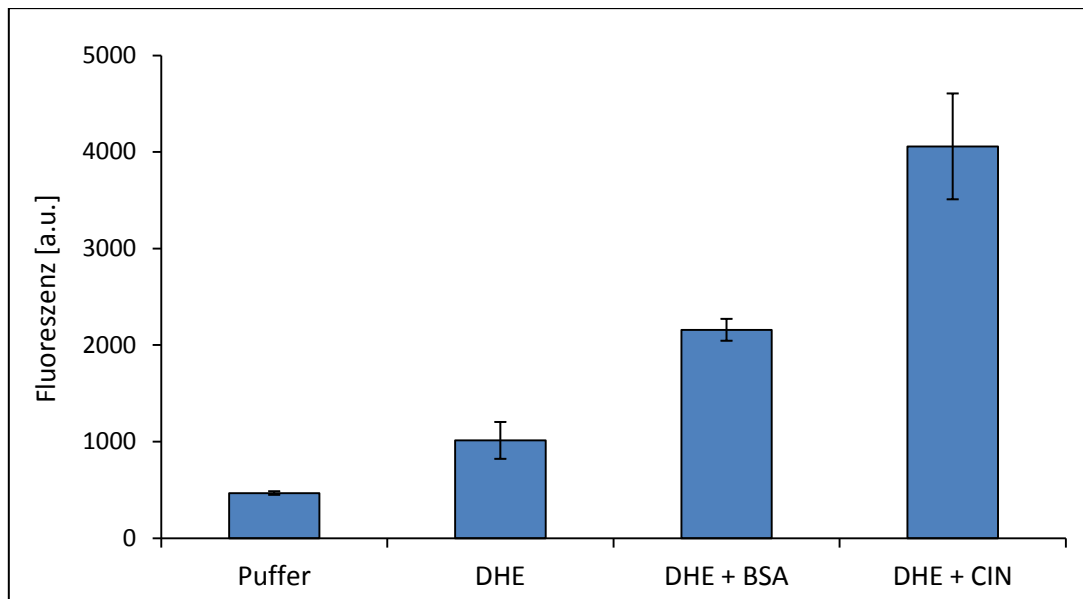


Abbildung 39. DHE-Assay von β -Cinnamomin im Vergleich mit der BSA-Negativkontrolle, DHE und Puffer nach 30 s Reaktionsdauer [50].

Der DHE-Assay wurde in Vierfachbestimmung, wie in Abschnitt 5.3.9 beschrieben, durchgeführt. Pro Reaktionsansatz wurden 2,5 μ M β -Cinnamomin bzw. 2,5 μ M BSA mit 2,5 μ M DHE in Assaypuffer gemischt. Zur Kontrolle wurden einerseits 2,5 μ M DHE in Assaypuffer und andererseits reiner Assaypuffer ohne DHE gemessen. Die Ansätze wurden in Mikrotiterplatten im Fluoreszenzspektrophotometer gemessen. Während der Messung über 5 min nahm die Fluoreszenz zwar leicht zu, die Differenz zwischen den verschiedenen Proben veränderte sich jedoch nicht. Somit wurden nur die Fluoreszenzwerte zu Beginn der Messung herangezogen und die Mittelwerte der Vierfachbestimmungen berechnet.

Wie in der Abbildung zu sehen ist, resultierte die Bindung von DHE an β -Cinnamomin in einer deutlich höheren Fluoreszenz als die Bindung von DHE an BSA. Aus diesem Grund kann auf eine spezifische Bindung zwischen DHE und β -Cinnamomin geschlossen werden. Insgesamt betrachtet konnte mit Hilfe des DHE-Assays zwar nachgewiesen werden, dass das getestete β -Cinnamomin jeder einzelnen untersuchten Expression DHE besser binden konnte, als die unspezifische Kontrolle. Allerdings konnte kein Vergleich zwischen den einzelnen Expressionen gezogen werden oder eine Aussage über den Grad der korrekten Faltung des exprimierten β -Cinnamomins getroffen werden, da die Messwerte, trotz gleicher Geräteeinstellung, von Messung zu Messung versuchsbedingt sehr stark schwankten. Da diese Schwankungen auch mit ein und derselben Elicitinlösung auftraten, wenn an aufeinanderfolgenden Tagen gemessen wurde, konnte daher auch über das Verhältnis (DHE + Puffer):(DHE + Elicitin) bzw. (DHE + Puffer):(DHE + BSA) keine Aussage über eine bessere oder schlechtere Bindspezifität der einzelnen Elicitinchargen getroffen werden.

2.2.5 Test der Steroidbindekapazität

Um dennoch einen Nachweis für korrekte Faltung und Aktivität des exprimierten β -Cinnamomins zu erbringen, sollte die Steroidbindekapazität von β -Cinnamomin bestimmt werden. Laut Mikes *et al.* besitzen Elicitine im Durchschnitt ca. eine Bindestelle für Steroide pro Molekül Elicitin [75,76]. Ausgehend von dieser Zahl müsste korrekt gefaltetes β -Cinnamomin in der Lage sein eine ca. äquimolare Menge Steroid zu binden. Um dies zu testen, wurden 0,4 μ mol von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCinHis exprimiertes und aufgereinigtes β -Cinnamomin mit einem 5-fachen Überschuss Progesteron gemischt. Nach einer kurzen Inkubationsphase wurde das überschüssige Progesteron, welches von β -Cinnamomin nicht gebunden wurde, durch Aufreinigung des Elicitins mittels IMAC entfernt. Das durch β -Cinnamomin gebundene Progesteron wurde aus den Elutionsfraktionen extrahiert, vereint und die Konzentration mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Mit Hilfe der Kalibrationsgeraden wurde in der Probe eine Konzentration von 0,38 μ mol Progesteron bestimmt. Das Verhältnis von Progesteron zu β -Cinnamomin entspricht somit mit einem Wert von 0,95 ziemlich exakt der Anzahl von Bindestellen für Steroide in Elicitinen. Damit konnte von einer wahrscheinlich nahezu 100 %-igen Aktivität und korrekten Faltung des von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCinHis exprimierten β -Cinnamomins ausgegangen werden.

2.3 Rationales Proteindesign von β -Cinnamomin

Zwar konnte die Expression β -Cinnamomins erfolgreich in *E. coli* etabliert werden, da jedoch auch weiterhin noch ein großer Teil des exprimierten Proteins unlöslich in *inclusion bodies* gebildet wurde, sollte die lösliche Expression durch rationales Proteindesign verbessert werden. Daher sollten Doppelmutanten generiert werden, in denen jeweils eine der drei Disulfidbrücken (C3/C71, C27/C56, C51/C95) durch Austausch mit anderen Aminosäuren eliminiert wurde. Anschließend wurde ihre Expression unter den optimierten Expressionsbedingungen von β -Cinnamomin mit *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCinHis getestet.

2.3.1 Rationales Proteindesign

Die Doppelmutanten wurden mit der YASARA Software Version 12.11.25 mit dem Plug-in FoldX Version 3.0 Beta 5.1 (c) [36,103] *in silico* erstellt. Um die energetisch sinnvollsten Doppelmutanten zu finden, wurde jeweils eines der beiden Cysteine von einer der drei Disulfidbrücken durch eine ausgesuchte Anzahl Aminosäuren und das zweite durch alle 20 verschiedenen Aminosäuren ersetzt. Anschließend wurden die $\Delta\Delta G$ -Werte der generierten Varianten im Vergleich zu der Wildtypstruktur mit den beiden Cysteinen berechnet. Die fünf Doppelmutanten mit den niedrigsten $\Delta\Delta G$ -Werten wurden für die Expression in *E. coli* ausgesucht, da ein niedriger Wert auf einen geringeren Stabilitätsverlust hindeutete. Die ausgewählten Doppelmutanten wurden in zwei aufeinander folgenden ortsspezifischen Mutagenesen (Primer siehe Tabelle 16 in Abschnitt 5.2.10) generiert und in *E. coli* DH5 α trans-

formiert. Die transformierten Plasmide wurden jeweils von einer ausgewählten Anzahl Kolonien isoliert und durch Sequenzierung überprüft. Vier der fünf ausgewählten Doppelmutanten C3M/C71S, C3M/C71N, C27M/C56A und C51M/C95L konnten erfolgreich generiert werden. Trotz mehrfacher Wiederholung der PCR-Reaktionen zur Generierung der fünften Doppelmutante C27M/C56S konnte jedoch kein Klon isoliert werden, der die gewünschte Mutation an Position C56 trug. Die Plasmide der vier erfolgreich generierten Doppelmutanten pET-28a(+)MalEssCinHis_C3M_C71S, pET-28a(+)MalEssCinHis_C3M_C71N, pET-28a(+)MalEssCinHis_C27M_C56A und pET-28a(+)MalEssCinHis_C51M_C95L wurden anschließend zur Expression der Doppelmutanten in *E. coli* C43(DE3) transformiert.

2.3.2 Expression und Aufreinigung der Doppelmutanten

Von jeder der vier Doppelmutanten wurde eine Übernachtskultur hergestellt, mit der jeweils zweimal 200 mL TB-Medium in 2 L Erlenmeyerkolben angeimpft wurden. Die Expression der Doppelmutanten wurde mit 0,4 mM IPTG induziert und die Kulturen anschließend für 24 h bei 30 °C inkubiert. Vor der Induktion und nach 24 h Expression wurde jeweils von einem der beiden Kolben der Doppelmutantenexpressionen eine Probe genommen, aufgeschlossen und der lösliche Überstand und die Pelletfraktion über SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 40). Die Zellen der Kulturen wurden durch Zentrifugieren geerntet und die Zellpellets bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert. Die Zellpellets wurden hierfür in Lysispuffer IV pH 6,5 resuspendiert und durch Ultraschall auf Eis aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert, der zellfreie Extrakt filtriert, über eine 5 mL HisTrap™ HP-Säule aufgereinigt und mittels SDS-PAGE untersucht (siehe Abbildung 41).

In Abbildung 40 konnte in den Proben des löslichen Überstandes nach 24 h Expression der vier Doppelmutanten keine signifikant verbesserte Expression nachgewiesen werden. Stattdessen waren nach 24 h nur sehr schwache, teils diffuse Banden auf der Höhe von β -Cinnamomin zu erkennen. Im Vergleich zu der Expression des Wildtyps mit pET-28a(+)MalEssCinHis in *E. coli* C43 (DE3) hatte das gesamte Expressionsniveau deutlich abgenommen. Die Banden des unlöslichen β -Cinnamomins in den Pelletfraktionen waren wesentlich kleiner, als auf den SDS-Gelen der Expressionen des Wildtyps (siehe z.B. Abbildung 35 in Abschnitt 2.2.3.3.6). Die Doppelmutante C51M/C95L scheint sogar fast gar nicht exprimiert worden zu sein, da selbst für unlösliches β -Cinnamomin in der 24 h-Pelletprobe kaum eine Bande zu erkennen war. Insgesamt war das Expressionsniveau der vier Doppelmutanten so gering, dass auch durch Aufreinigung über den C-terminalen His-tag kaum β -Cinnamomin isoliert oder nachgewiesen werden konnte. Lediglich für die Doppelmutante C3M/C71N konnte in einer der Elutionsfraktionen der His-tag-Aufreinigung eine schwache Bande auf Höhe von 12,5 kDa β -Cinnamomin zugeordnet werden (siehe Abbildung 41). Allerdings war diese Fraktion zusätzlich mit anderen *E. coli*-Proteinen verunreinigt, so dass eine genaue Ausbeute der Doppelmutante nicht berechnet werden konnte. Zusammengefasst musste also festgestellt werden, dass die Menge an lösli-

chem β -Cinnamomin während der Expression in *E. coli* nicht durch Reduktion der Anzahl von Disulfidbrücken erhöht werden konnte.

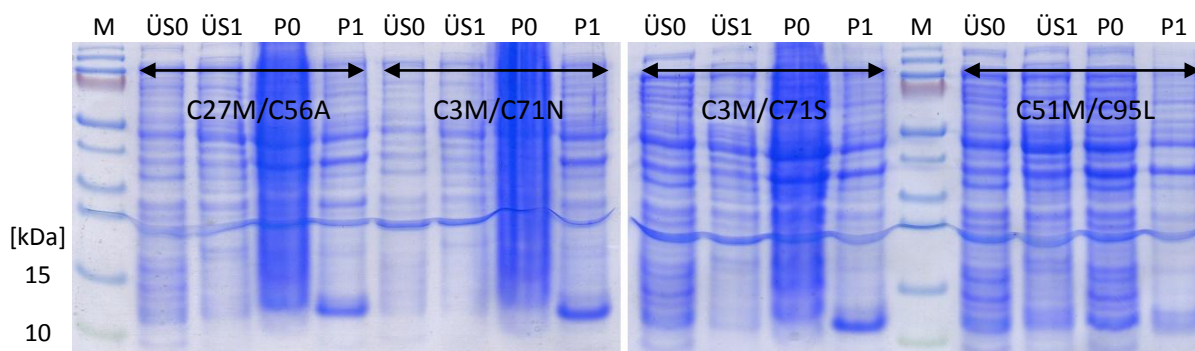


Abbildung 40. Expression der vier Doppelmutanten C3M/C71S, C3M/C71N, C27M/C56A und C51M/C95L in *E. coli* C43(DE3) im Schüttelkolben bei 30 °C: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. ÜS0: Löslicher Überstand vor der Induktion. ÜS1: Löslicher Überstand nach 24 h Expression. P0: Pelletfraktion vor der Induktion. P1: Pelletfraktion nach 24 h Expression.

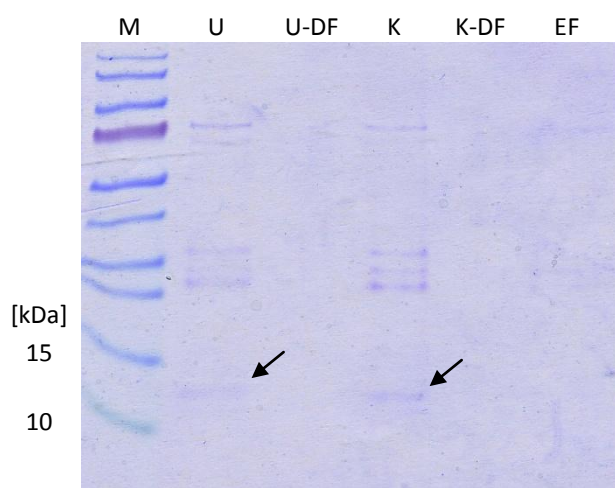


Abbildung 41. Proben der einzelnen Arbeitsschritte aus Umpuffern und Aufkonzentrieren der Elutionsfraktion der His-tag-Aufreinigung der Doppelmutante C3M/C71N: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. U: Umgepufferte Lösung. U-DF: Durchfluss der Umpufferung. K: Konzentrat. K-DF: Durchfluss der Aufkonzentrierung. EF: Elutionsfraktion vor dem Umpuffern und Aufkonzentrieren.

2.4 Ganzzellbiokatalyse

Um den Beweis zu erbringen, dass β -Cinnamomin einen positiven Einfluss auf den Substratumsatz von Steroiden in der Ganzzellbiokatalysen ausübt, wurden Reaktionen mit ruhenden Zellen von *E. coli* C43(DE3), die rekombinant die P450 Monooxygenase CYP154C5 aus *N. farcinica* in Kombination mit den ETK Pdx und PdR aus *P. putida* trägt, durchgeführt. Um den Einfluss des Elicitins auf die Biokatalyse zu untersuchen, wurden Reaktionen verschiedener Steroidsubstrate gelöst in Methanol bzw. gelöst in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin mit und ohne Zusatz von β -Cinnamomin verglichen. Dabei wurden folgende Steroide eingesetzt: Pregnenolon (**1**), Testosteron (**2**), Progesteron (**3**), Dehydroepiandrosteron (**4**), Androstendion (**5**) und Nandrolon (**6**) (siehe Abbildung 10 in Abschnitt 1.9).

2.4.1 Vorversuche zur Optimierung der Prozessparameter

Zunächst wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für die Ganzzellbiokatalysen zu bestimmen.

2.4.1.1 Expression des Ganzzellbiokatalysators für die Vorversuche

Für die Vorversuche wurden *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB-Zellen als Ganzzellbiokatalysator eingesetzt. Die Expression erfolgte dabei im 10 L Fermenter in TB-Medium bei 30 °C für 24 h. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 gewaschen, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Vor Einsatz der Zellen in der Biokatalyse wurden die Konzentration der CYP154C5 und die spezifische Aktivität der ETK Pdx und PdR eines der resuspendierten Zellpellets in einem Volumen von 25 mL mit einer Zelldichte von $OD_{600} = 40$ bestimmt. Der Gesamtproteingehalt betrug 4,6 mg/mL, die Konzentration der CYP154C5 lag bei 2,2 μ M, was ca. 22 μ g CYP154C5 pro mg Totalprotein entspricht. Die spezifische Aktivität der ETK betrug 0,4 U/mg.

2.4.1.2 Umsatz von 2 mM Pregnenolon und 2 mM Testosteron

Im ersten Versuch wurde der Umsatz von 2 mM Pregnenolon und 2 mM Testosteron durch ruhende Zellen von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB in 50 mM MES-Puffer pH 6,5 mit 2,2 μ M CYP154C5 und einer spezifischen Aktivität der ETK von 0,4 U/mg mit und ohne Zusatz von 37 μ M β -Cinnamomin getestet. Pro Substrat wurden drei Ansätze mit je 1 mL Volumen in 15 mL-Teströhrchen angesetzt. Für jeden Ansatz wurden Zellen des Ganzzellbiokatalysators so mit einer 37 μ M β -Cinnamominlösung in 50 mM MES-Puffer pH 6,5 resuspendiert, das nach Zugabe von 10 μ L 3 M Glucose und jeweils 20 μ L der 100 mM Substratstammlösungen in Methanol eine Zelldichte von $OD_{600} = 40$ eingestellt war. Zur Kontrolle wurden pro Substrat drei Kontrollansätze ohne β -Cinnamomin angesetzt, in denen die Zellen in 50 mM MES-Puffer pH 6,5 statt in der β -Cinnamominlösung resuspendiert wurden. Die Reaktionsansätze wurden anschließend bei 30 °C inkubiert und nach 2, 5 und 8 h wurde je einer der drei Reaktionsansätze mit und einer der drei Kontrollansätze ohne β -Cinnamomin jedes Substrats in drei Schritten mit 1 x 700 μ L Ethylacetat (EtOAc), 1 x 500 μ L EtOAc und 1 x 500 μ L $CHCl_3$ extrahiert. Die extrahierten Proben wurden anschließend, wie in Abschnitt 5.4.1.3 beschrieben, weiter aufgearbeitet und mittels GC bzw. HPLC gemessen. Über die integrierten Peakflächen wurde mit den Kalibrationsgeraden in Abbildung 79 und Abbildung 80 (siehe Abschnitt 7.6.1) der Umsatz bestimmt.

Wie in Abbildung 42 zu sehen ist, konnte der Umsatz von 2 mM Pregnenolon durch den Zusatz von β -Cinnamomin verbessert werden konnte. Zu jedem der drei Probenahmezeitpunkte konnte in den Reaktionsansätzen mit β -Cinnamomin ein höherer Umsatz nachgewiesen werden, als in den Kontrollansätze ohne β -Cinnamomin. Auffällig war allerdings, dass der Umsatz von Pregnenolon nach 5 und 8 h Reaktionszeit kaum noch zunahm. Sowohl für die Ganzzellbiokatalysen mit β -Cinnamomin als

auch für die Kontrollen stagnierte der Umsatz bereits nach 2 h. Außerdem fällt auf, dass der Umsatz von Pregnenolon in der 5 h-Probe mit β -Cinnamomin 2 % niedriger war als in der Probe zum Zeitpunkt 2 h. Diese Schwankungen konnten jedoch auf mehrere Faktoren bei der Durchführung der biokatalytischen Ganzzellumsätze zurückgeführt werden, wie beispielsweise zu kurze Extraktionszeit oder schlechte Löslichkeit der Substrate in Methanol.

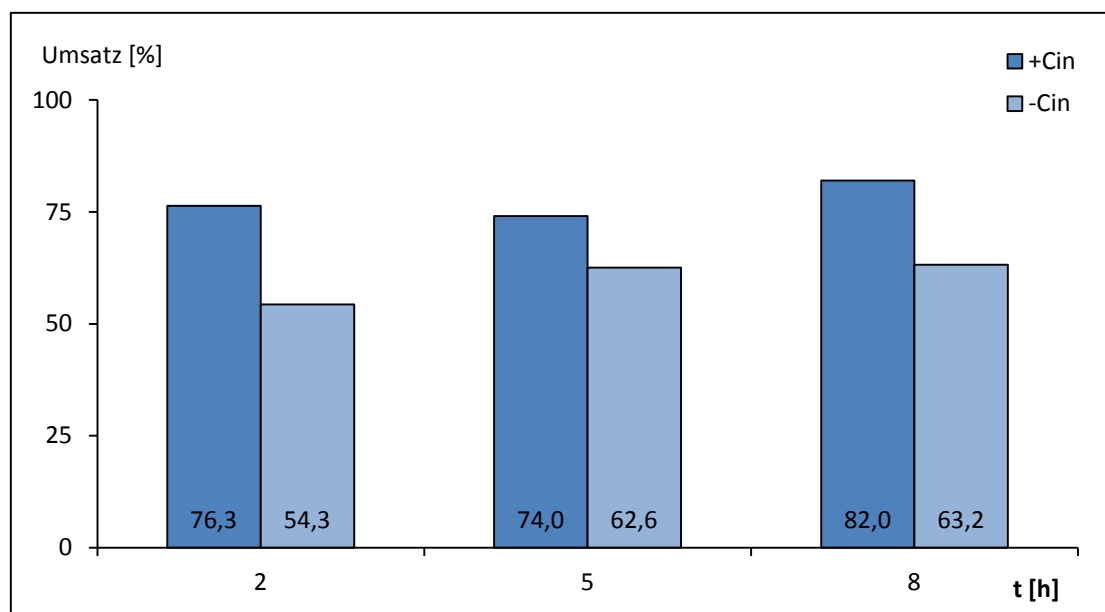


Abbildung 42. Umsatz von 2 mM Pregnenolon (**1**) mit (+Cin) und ohne Zusatz (-Cin) von 37 μ M β -Cinnamomin im Verlauf von acht Stunden Reaktionszeit durch Ganzzellbiokatalyse mit ruhenden Zellen von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB. Die Zelldichte in den Reaktionsansätzen betrug jeweils $OD_{600} = 40$, entsprechend einer Konzentration von CYP154C5 von 2,2 μ M und einer spezifischen Aktivität der ETK von 0,4 U/mg.

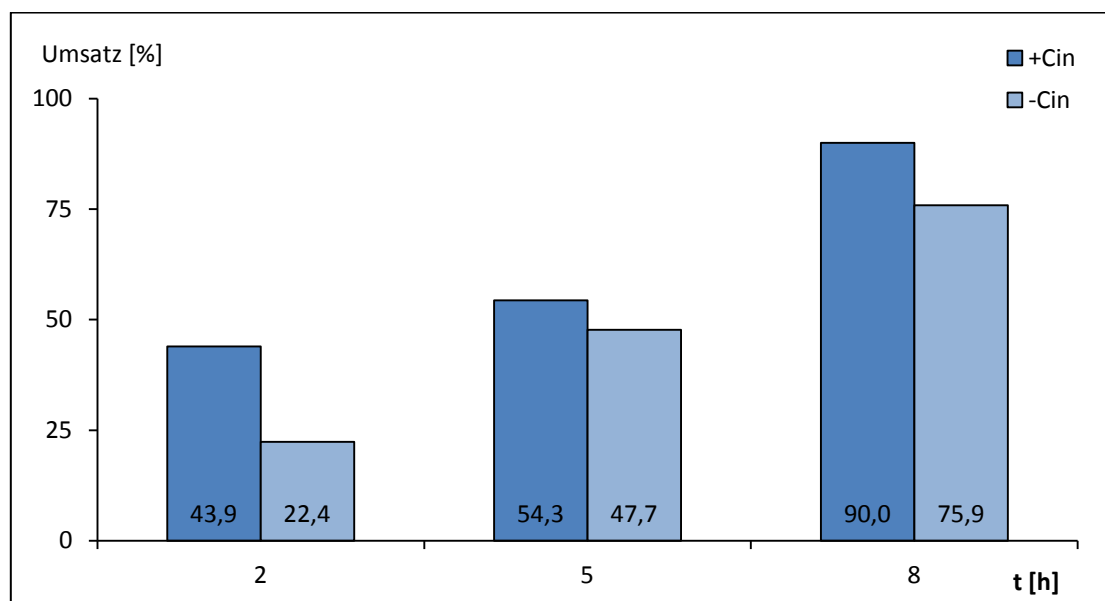


Abbildung 43. Umsatz von 2 mM Testosteron (**2**) mit (+Cin) und ohne Zusatz (-Cin) von 37 μ M β -Cinnamomin im Verlauf von acht Stunden Reaktionszeit durch Ganzzellbiokatalyse mit ruhenden Zellen von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB. Die Zelldichte in den Reaktionsansätzen betrug jeweils $OD_{600} = 40$, entsprechend einer Konzentration von CYP154C5 von 2,2 μ M und einer spezifischen Aktivität der ETK von 0,4 U/mg.

Im Diagramm in Abbildung 43 ist der Umsatz der Reaktionsansätze von 2 mM Testosteron in Abhängigkeit von der Reaktionszeit aufgetragen. Auch in diesen Ansätzen konnte eine signifikante Verbesserung des Substratumsatzes durch Zugabe von β -Cinnamomin festgestellt werden. Nach 2 h Reaktionszeit war der Unterschied am größten mit ca. 2-fach höherem Umsatz im Reaktionsansatz mit β -Cinnamomin als in der Kontrolle ohne Elicitin. Im Gegensatz zu den Reaktionen mit Pregnenolon stiegen hier die Umsätze während der Reaktionszeit jedoch weiter an.

2.4.1.3 Optimierung der Prozessparameter der Ganzzellbiokatalyse

Bei Wiederholung der Reaktionen konnte das Ergebnis mehrfach bestätigt werden: Reaktionsansätze, die β -Cinnamomin enthielten, wiesen einen besseren Umsatz von Pregnenolon und Testosteron auf, als die Kontrollen, die ohne Elicitin angesetzt wurden. Während der Versuche fiel jedoch auf, dass die Messwerte relativ starken Schwankungen unterlagen, die auf eine Reihe von Faktoren bei der Durchführung der biokatalytischen Reaktionen zurückgeführt werden konnten. Einerseits waren 100 mM Pregnenolon in Methanol nur sehr schlecht löslich, weshalb die Stammlösung vor jeder Verwendung zunächst durch Ultraschall behandelt und auf 40 °C erwärmt werden musste, damit das Pregnenolon vollständig gelöst war. Dies hatte zur Folge, dass die Stammlösung kaum reproduzierbar zu pipettieren war. Desweiteren fiel Pregnenolon wieder sehr rasch aus, sobald die Stammlösung aus dem Ultraschallbad genommen wurde. Auch musste die Extraktion optimiert werden, damit das Substrat vollständig aus den Reaktionen extrahiert werden konnte. Ein weiteres Problem war die Bestimmung der OD_{600} der resuspendierten Zellsuspension in so hohen Zelldichten ($OD_{600} = 100+$), da bereits kleine Fehler zu signifikanten Schwankungen der eingesetzten Menge Ganzzellbiokatalysators in verschiedenen Messungen führen können. Außerdem musste die Qualität der Substratstammlösungen bedacht werden, da diese durch Lagerung über längere Zeiträume Veränderungen unterliegen konnte. Schließlich wurden in den ersten Versuchen zu wenige Kontrollen eingesetzt um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Im Verlauf mehrerer Versuche wurden daher die Prozessbedingungen optimiert, mit denen die biokatalytischen Ganzzellumsätze der Steroidsubstrate durchgeführt wurden. Um die Probleme mit der schlechten Pregnenolonlöslichkeit zu vermeiden, wurden die Stammlösungen in späteren Versuchen mit 50 mM hergestellt und die Versuche nur noch mit maximal 1 mM Pregnenolon durchgeführt, da nicht mehr als 2 % Methanol dem Reaktionsansatz hinzugefügt werden konnte, ohne eine Permeabilisierung des Ganzzellbiokatalysators hervorzurufen. Um die Reproduzierbarkeit aller Reaktionsansätze weiter zu verbessern, wurden statt Eppendorf Research Plus 2 Pipetten Microliter™ Spritzen der Firma Hamilton Messtechnik GmbH verwendet, um das Pipettieren von Lösungsmitteln μ L-genau zu ermöglichen. Um die Extraktion der Reaktionsansätze zu verbessern, wurde die Zeit jedes einzelnen Extraktionsschrittes mittels Vortex von 30 auf 90 s erhöht und ein Adapter für bis zu 30 Eppendorfreaktionsgefäße für den Vortex verwendet, damit alle Ansätze identisch extrahiert werden konnten. Für die OD_{600} -Messung der resuspendierten *E. coli*

C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB-Zellen wurden die Zellen in mehreren kleinen Schritten verdünnt und die Messung in Dreifachbestimmung durchgeführt, damit pro Reaktion immer dieselbe Menge Ganzzellbiokatalysator eingesetzt werden konnte. Um Fehler durch ungenaue Substratstammlösungen oder lange Lagerung der Stammlösungen bei 4 °C auszuschließen, wurde für jede Messung ein Substratstandard in Dreifachbestimmung in Puffer angesetzt, ebenfalls extrahiert und mit den Proben in der GC bzw. HPLC gemessen. Zudem wurden alle Reaktionsansätze der Ganzzellbiokatalysen in Dreifachbestimmung durchgeführt und anschließend Mittelwerte bestimmt. Die Extrakte der Reaktionsansätze wurden im Anschluss an die Extraktion entweder sofort gemessen oder ausschließlich in getrockneter Form, nach Entfernen des Lösungsmittels, bei -20 °C gelagert, um ein mögliches Zersetzen der Substrate bzw. Produkte auszuschließen.

2.4.2 Ganzzellbiokatalysen mit Zusatz von aufgereinigtem β -Cinnamomin

Um die Ergebnisse der einzelnen biokatalytischen Umsätze besser miteinander vergleichen zu können, wurden die Versuche mit neu hergestelltem Ganzzellbiokatalysator, neu hergestelltem β -Cinnamomin und neuen Substratstammlösungen unter optimierten Bedingungen wiederholt.

2.4.2.1 Expression des Ganzzellbiokatalysators

Um ausreichend Zellen für die Wiederholung aller Umsätze mit und ohne β -Cinnamomin zur Verfügung zu haben, wurde wieder eine 10 L-Fermentation von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB, wie in Abschnitt 5.2.15.3 beschrieben, durchgeführt. Die geernteten Zellen der Fermentation wurden in Aliquots bei -20 °C gelagert. Vor Einsatz der Zellen in Biokatalysen wurde eine Zellpellet mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 in einem Gesamtvolumen von 36 mL ($OD_{600} = 40$) resuspendiert und die Konzentration der CYP154C5 und die spezifische Aktivität der ETK bestimmt. Der Gesamtproteingehalt wurde mit 4,5 mg/mL, die CYP154C5-Konzentration mit 3,4 μ M (entsprechend ca. 35 μ g CYP154C5 pro mg Totalprotein) bestimmt. Die spezifische Aktivität der ETK lag bei 1,0 U/mg.

2.4.2.2 Expression des β -Cinnamomins

Damit die Ganzzellbiokatalysen der Vorversuche für alle Steroidsubstrate mit der gleichen Charge β -Cinnamomin wiederholt werden konnten, musste auch das Elicitin zunächst im großen Maßstab exprimiert und aufgereinigt werden. Für die Expression wurden dazu 42 Schüttelkolben mit je 200 mL TB-Medium sowie zwei Fermenter mit je 4,5 L TB-Medium eingesetzt. Die Expression und die Aufreinigung des β -Cinnamomins erfolgten wie in Abschnitt 2.2.3.3.3 und Abschnitt 2.2.3.3.4 beschrieben. Die β -Cinnamominstammlösung wurde bis zum Einsatz in der Ganzzellbiokatalyse bei 4 °C gelagert. Im Vergleich zu den vorausgegangenen Schüttelkolbenexpressionen konnte für die Schüttelkolbenexpressionen eine Ausbeute von 25,5 mg β -Cinnamomin pro Liter Kultur erreicht werden. Da jedoch in der Zeit Protein präzipitierte, wurde das Präzipitat durch Zentrifugation abgetrennt und die Kon-

zentration der β -Cinnamominstammlösung unmittelbar vor den Biokatalyseversuchen erneut bestimmt. Die eingesetzte β -Cinnamominstammlösung besaß eine Konzentration von 218 μM bzw. 2,5 mg/mL bei einem Volumen von ca. 74 mL.

2.4.2.3 Kalibrationsgeraden

Da auch die Konzentration der Substratstammlösungen in Methanol über längere Zeiträume Veränderungen unterliegen, wurden neue Substratstammlösungen in Methanol und in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin in Wasser hergestellt und damit ebenfalls neue Kalibrationsgeraden bestimmt. Die erhaltenen Kalibrationsgeraden der sechs Substrate Pregnenolon, Testosteron, Progesteron, Dehydroepiandrosteron, Androstendion und Nandrolon in Methanol sowie in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, welche für die Hauptversuche der Ganzzellbiokatalysen verwendet wurden, sind in Abbildung 81 bis Abbildung 92 in Abschnitt 7.6.2 dargestellt.

2.4.2.4 Ganzzellbiokatalysen mit Zusatz von 100 μM β -Cinnamomin

Um den Einfluss von β -Cinnamomin auf die Ganzzellbiokatalyse aller sechs Substrate, Pregnenolon, Testosteron, Progesteron, Dehydroepiandrosteron, Androstendion und Nandrolon, zu untersuchen, wurden Reaktionen mit den sechs Steroiden, gelöst in Methanol, und ruhenden Zellen von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB in Gegenwart von 100 μM β -Cinnamomin getestet. Parallel dazu wurden Ganzzellbiokatalysen ohne Elicitin mit den sechs Substraten gelöst in Methanol bzw. 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin als Vergleichskontrollen durchgeführt. Für jedes Substrat wurden 1 mL-Ansätze in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 mit 30 mM Glucose und *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB-Zellen in einer Zelldichte von $\text{OD}_{600} = 40$ (entsprechend 3,4 μM P450 Monooxygenase und 1,0 U/mg spezifischer Aktivität der ETK) durchgeführt. Die Substrate Testosteron, Progesteron, Dehydroepiandrosteron, Androstendion und Nandrolon wurden in Konzentrationen von je 2 mM eingesetzt, Pregnenolon dagegen, aufgrund seiner geringen Löslichkeit in Methanol, nur in einer Konzentration von 1 mM. Pro Substrat wurden je drei Ansätze mit 100 μM β -Cinnamomin und drei Kontrollansätze ohne Elicitin jeweils mit Steroid gelöst in Methanol, sowie drei weitere Kontrollansätze ohne Elicitin, aber mit Substrat gelöst in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, angesetzt. Die insgesamt neun Ansätze pro Substrat wurden für 3 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert, anschließend extrahiert und in der GC bzw. HPLC analysiert. Mit Hilfe der Kalibrationsgeraden wurden jeweils die Umsätze bestimmt, gemittelt und zusammen mit den Standardabweichungen aus den Dreifachansätzen in Abbildung 44 aufgetragen.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, konnte für vier der sechs Substrate (Pregnenolon, Testosteron, Progesteron und Dehydroepiandrosteron) eine Verbesserung des Umsatzes durch Zusatz von β -Cinnamomin in den Reaktionsansätzen nachgewiesen werden. Für die Substrate 1 bis 3 konnte der Umsatz um 9 bis 14 % im Vergleich zu den Kontrollansätzen mit Substrat gelöst in Methanol bzw.

Cyclodextrin gesteigert werden. Für Dehydroepiandrosteron betrug die Umsatzsteigerung im Vergleich zur Probe ohne β -Elicitin und Substrat gelöst in Methanol 5 %. Der Umsatz von Dehydroepiandrosteron mit Cyclodextrin zeigte einen um weitere 4 % schlechteren Umsatz, als der Umsatz der Ansätze mit den Methanolstammlösungen. Für Androstendion und Nandrolon konnte dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben mit und ohne Elicitin festgestellt werden.

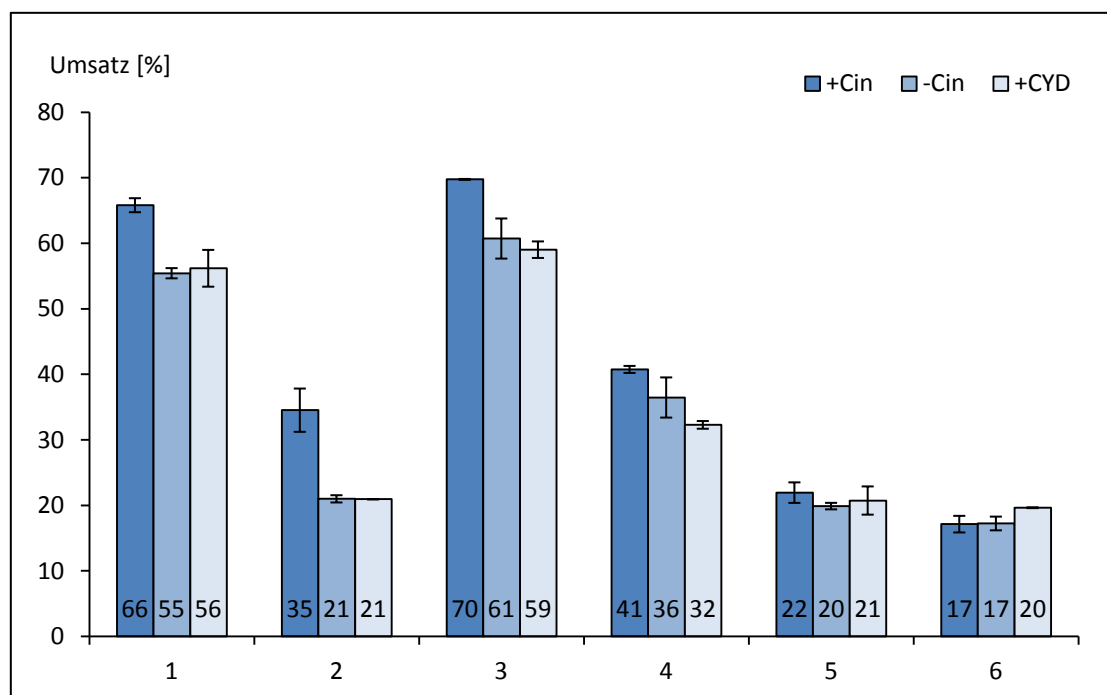


Abbildung 44. Umsatz von 1 mM Pregnenolon (1) und von je 2 mM Testosteron (2), Progesteron (3), Dehydroepiandrosteron (4), Androstendion (5) und Nandrolon (6) mit und ohne Zusatz von 100 μ M β -Cinnamomin in Ganzzellbiokatalysen mit ruhenden Zellen von *E. coli* C43(DE3) pT2cyp154C5 pACYCcamAB in je 3 h Reaktionszeit. Die Zelldichte in den Reaktionsansätzen betrug jeweils $OD_{600} = 40$, entsprechend einer Konzentration von CYP154C5 von 3,4 μ M und einer spezifischen Aktivität der ETK von 1,0 U/mg. Die Steroidssubstrate wurden entweder gelöst in Methanol (+Cin und -Cin) bzw. als Stammlösung in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin in Wasser (+CYD) eingesetzt.

2.4.2.5 Ganzzellbiokatalysen mit Zusatz von 200 μ M β -Cinnamomin

Da erfolgreich nachgewiesen werden konnte, dass der Umsatz der Steroide in Ganzzellbiokatalysen mit CYP154C5 durch Zusatz von β -Cinnamomin reproduzierbar verbessert werden kann, wurde als nächstes der Einfluss der β -Cinnamominkonzentration auf den Umsatz der Steroidssubstrate untersucht. Dazu wurden biokatalytische Reaktionsansätze der vier Substrate Pregnenolon, Testosteron, Progesteron und Dehydroepiandrosteron in Gegenwart und Abwesenheit von 200 μ M β -Cinnamomin durchgeführt. Um β -Cinnamomin in einer Endkonzentration von 200 μ M einsetzen zu können, musste zunächst die β -Cinnamominstammlösung mittels Ultrafiltration aufkonzentriert werden. Die Ganzzellbiokatalysen wurden jeweils wieder mit C43(DE3) pT2cyp154C5 pACYCcamAB-Zellen in einer Zelldichte von $OD_{600} = 40$ und 30 mM Glucose in einem Volumen von 1 mL in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 angesetzt. Pro Substrat wurden je drei Reaktionsansätze mit 200 μ M β -

Cinnamomin und drei Kontrollansätze ohne β -Cinnamomin jeweils mit Substrat gelöst in Methanol angesetzt und für eine Reaktionszeit von 3 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Reaktionsansätze extrahiert und in der GC bzw. der HPLC analysiert. Über den Substratverbrauch wurden jeweils die Umsätze bestimmt, gemittelt und in einem Diagramm aufgetragen (siehe Abbildung 45).

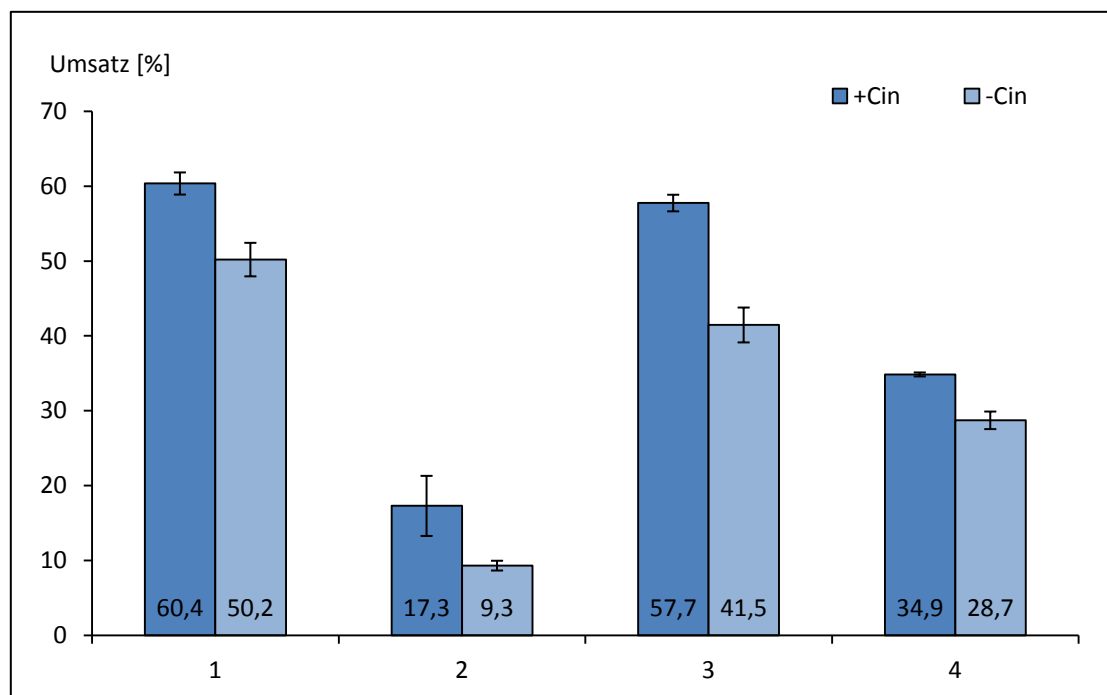


Abbildung 45. Umsatz von 1 mM Pregnenolon (1) und je von 2 mM Testosteron (2), Progesteron (3), Dehydroepiandrosteron (4), mit (+Cin) und ohne (-Cin) Zusatz von 200 μ M β -Cinnamomin in Ganzzellbiokatalysen mit ruhenden Zellen von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB in je 3 h Reaktionszeit. Die Zelldichte in den Reaktionsansätzen betrug jeweils $OD_{600} = 40$. Die Steroidsubstrate wurden gelöst in Methanol als Stammlösung angesetzt.

Auch in diesem Versuch konnte bestätigt werden, dass β -Cinnamomin den Umsatz der Steroidsubstrate in Ganzzellbiokatalysen signifikant erhöht. Jedes der vier Substrate wurde mit Elicitinzusatz wesentlich besser umgesetzt. So konnte für Pregnenolon eine Umsatzsteigerung von 10,2 %, für Testosteron von 8,0 %, für Progesteron von 16,2 % und für Dehydroepiandrosteron von 6,2 % bestimmt werden. Allerdings können die Ergebnisse nicht direkt mit den Umsätzen der Ganzzellbiokatalysen mit Zusatz von 100 μ M β -Cinnamomin (siehe Abbildung 44) verglichen werden, da der Gesamtumsatz diesmal deutlich niedriger ausfiel. Die schlechteren Werte sind möglicherweise auf eine reduzierte Aktivität der CYP154C5 bzw. der ETK durch die Lagerung der Zellen bei -20°C über einen längeren Zeitraum zurückzuführen. Auch β -Cinnamomin verlor durch die Lagerung bei 4 °C über einen längeren Zeitraum an Aktivität, so dass kein direkter Vergleich möglich war.

2.4.2.6 Ganzzellbiokatalysen mit aufgereinigtem β -Cinnamomin im Zeitverlauf

Um den Einfluss von β -Cinnamomin auf den Umsatz der Steroide in Ganzzellbiokatalysen mit CYP154C5 im Zeitverlauf genauer zu untersuchen, wurden erneut Reaktionen mit Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron durchgeführt und jeweils Proben über einen Zeitraum von fünf bzw. acht Stunden genommen. Von jedem der beiden Substrate wurden drei Parallelansätze mit einem Volumen von 7 mL in 25 mL Erlenmeyerkolben mit *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB-Zellen mit einer Zelldichte von $OD_{600} = 40$, 30 mM Glucose und 100 μ M β -Cinnamomin in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 angesetzt. Pregnenolon wurde in einer Konzentration von 1 mM und Dehydroepiandrosteron in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt. Zur Kontrolle wurden jeweils drei weitere Reaktionsansätze ohne β -Cinnamomin angesetzt und die Ganzzellbiokatalysen bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Von den Dehydroepiandrosteronansätzen wurden jeweils 1 mL Proben nach 3, 5 und 8 h genommen. Von den Pregnenolonreaktionen wurden jeweils 1 mL Proben nach 2, 3, 4 und 5 h genommen, da Pregnenolon in den vorangegangenen Experimenten schneller umgesetzt worden war als Dehydroepiandrosteron. Die Proben wurden extrahiert und die Umsätze über Substratabnahme mittels GC bestimmt (siehe Abbildung 46).

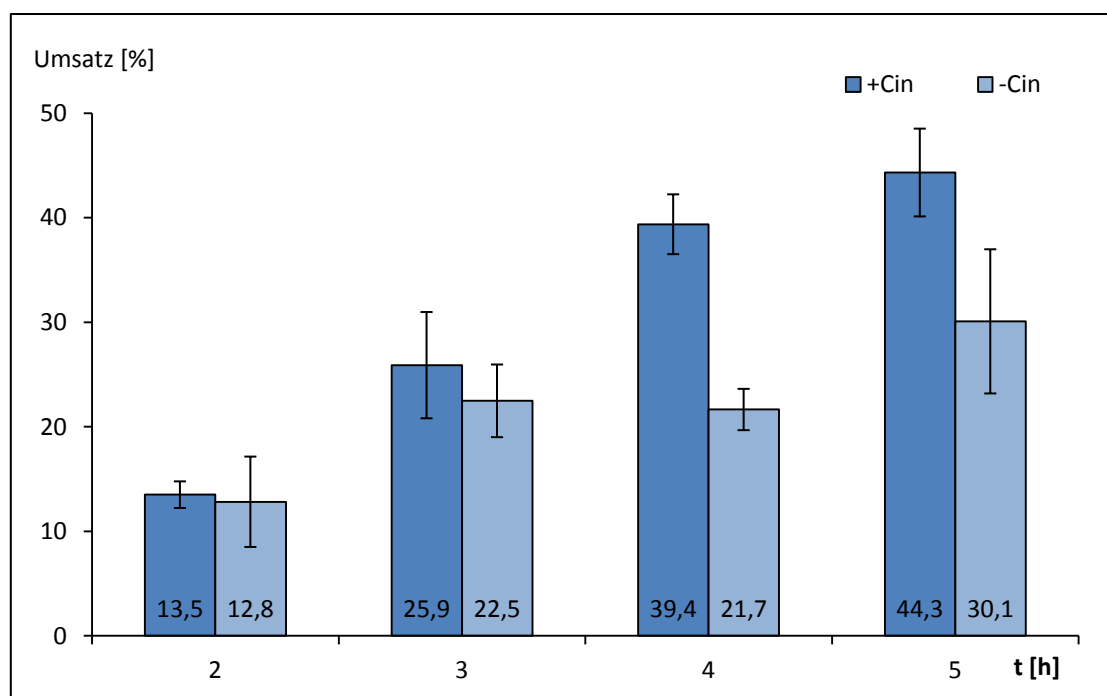


Abbildung 46. Umsatz von 2 mM Pregnenolon (1) mit (+Cin) und ohne Zusatz (-Cin) von 100 μ M β -Cinnamomin im Verlauf von fünf Stunden Reaktionszeit durch Ganzzellbiokatalyse mit ruhenden Zellen von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB. Die Zelldichte in den Reaktionsansätzen betrug jeweils $OD_{600} = 40$. Die Steroids substrate wurden gelöst in Methanol als Stammlösung angesetzt.

In Abbildung 46 sind die gemittelten Umsätze von Pregnenolon in Ganzzellbiokatalysen mit und ohne Zusatz von 100 μ M β -Cinnamomin aufgetragen. Zwar konnte für jeden Probenahmezeitpunkt im Mittel ein besserer Umsatz mit Elicitin nachgewiesen werden, doch wurden im Vergleich zu den bei-

den vorausgegangenen Versuchen erneut niedrigere Umsätze von Pregnenolon erhalten. Diese sind wahrscheinlich ebenfalls auf den lagerungsbedingten Rückgang der Aktivität von sowohl den *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB-Zellen, als auch von β -Cinnamomin zurückzuführen. Für Dehydroepiandrosteron konnte ein ähnliches Ergebnis erzielt werden. Die Reaktionen mit β -Cinnamomin lieferten zu allen Probenahmezeitpunkte erneut höhere Umsätze als die Kontrollreaktionen ohne Elicitin, allerdings lagen auch hier die Umsätze insgesamt niedriger, als in den Reaktionen der Versuche zuvor.

2.4.3 Ganzzellbiokatalysen mit coexprimiertem β -Cinnamomin

Als nächstes wurde der zweite Ansatz zur Verbesserung des Substratumsatzes, die Verwendung eines Ganzzellbiokatalysators mit coexprimiertem Elicitin, getestet, da es nicht nur das Ziel war ein Elicitin extern zuzugeben, sondern auch, das Elicitin auch in den Ganzzellbiokatalysatorzellen selbst zu exprimieren. Durch die Coexpression des Elicitins kann einerseits der Aufwand reduziert werden, da eine Aufreinigung des Elicitins unnötig wird. Andererseits kann der Einfluss des Elicitins auch innerhalb der Zelle auf den Substratumsatz untersucht werden. Um die Ganzzellbiokatalyse der Steroide mit coexprimiertem β -Cinnamomin zu testen, wurde zunächst die Effizienz der Coexpression der vier Komponenten CYP154C5, Pdx, PdR und β -Cinnamomin in *E. coli* getestet.

2.4.3.1 Coexpression von CYP154C5, Pdx, PdR und β -Cinnamomin in *Escherichia coli* C43(DE3)

Um die vier Komponenten, CYP154C5, Pdx, PdR und β -Cinnamomin, coexprimieren zu können, wurde ein *E. coli* C43(DE3)-Stamm generiert, der die Plasmide pIT2cyp154C5, pACYCcamAB und pET-28a(+)MalEssCinHis enthielt. Die drei Plasmide besitzen, abgesehen von den verschiedenen Genen für die vier Proteine, unterschiedliche Replikationsursprünge und verschiedene Antibiotikaresistenzmarker und erlauben somit die Coexpression in einem einzigen *E. coli*-Stamm. Zunächst wurden elektrokompetente Zellen von *E. coli* C43(DE3) pITcyp154C5 pACYCcamAB, wie in Abschnitt 5.2.13.2 beschrieben, hergestellt und diese anschließend mit dem pET-28a(+)MalEssCinHis-Plasmid transformiert. Um die Coexpression zu testen, wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)MalEssCinHis hergestellt und zum Animpfen einer 500 mL TB-Kultur in einem 2 L-Erlenmeyerkolben verwendet. Die Expression der vier Komponenten wurde mit 0,4 mM IPTG induziert und die Kultur anschließend für 48 h bei 30 °C inkubiert. Gleichzeitig mit der Induktion wurden 500 μ L 1000 x Spurenelementlösung und 0,5 mM 5-Aminolävulinsäure (δ -Ala) hinzugegeben. Zur Kontrolle wurde eine Kultur von *E. coli* C43(DE3) pIT-2cyp154C5 pACYCcamAB in 500 mL TB-Medium angesetzt. Nach 48 h wurde jeweils eine Probe genommen, aufgeschlossen und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (siehe Abbildung 47). Die Zellen der Kulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und in Aliquots bei -20 °C eingefroren. Zum Einsatz der Zellen in der

Biokatalyse wurden die Konzentration der CYP154C5 und die spezifische Aktivität der ETK der Zellsuspension bestimmt.

Zunächst fiel auf, dass die *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)-MalEssCinHis-Kultur zu einer deutlich niedrigeren Zelldichte herangewachsen war. So erreichten die Kontrollkulturen, in denen nur CYP154C5, Pdx und PdR coexprimiert wurden eine Zelldichte in Höhe von $OD_{600} = 8,8$, während die Kultur in der alle vier Proteine coexprimiert wurden nur zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 4,6$ heranwuchs. Alle vier Proteine, β -Cinnamomin, CYP154C5, Pdx und PdR, konnten jedoch erfolgreich in *E. coli* C43(DE3) coexprimiert werden. In Abbildung 47A sind zwei deutliche Banden auf einer Höhe von 11 bis 12 kDa und ca. 45 kDa erkennbar. Da sich sowohl die Molekulargewichte von CYP154C5 (MW = 45,3 kDa) und PdR (MW = 45,5 kDa), als auch die molekularen Massen von β -Cryptogein (MW = 11,6 kDa) und Pdx (MW = 11,6 kDa) nur minimal unterscheiden, konnte die Coexpression aller vier Komponenten nicht allein durch das SDS-Gel nachgewiesen werden. Zum Nachweis des β -Cinnamomins über den C-terminalen His-tag wurde ein Western Blot durchgeführt (Abbildung 47B). Im zellfreien Überstand sowie in der Pelletfraktion ist jeweils bei 12 kDa eine intensive Bande zu erkennen. Zudem konnte in der Pelletfraktion die charakteristische Bande des unprozessierten β -Cinnamomins bei ca. 13 kDa identifiziert werden. Die erfolgreiche Expression von CYP154C5, Pdx und PdR in den Zellen der Coexpression mit β -Cinnamomin konnte dagegen durch Bestimmung der Konzentration der CYP154C5 und der spezifischen Aktivität der ETK nachgewiesen werden. Die berechneten Werte, die OD_{600} und das Volumen der zellfreien Extrakte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

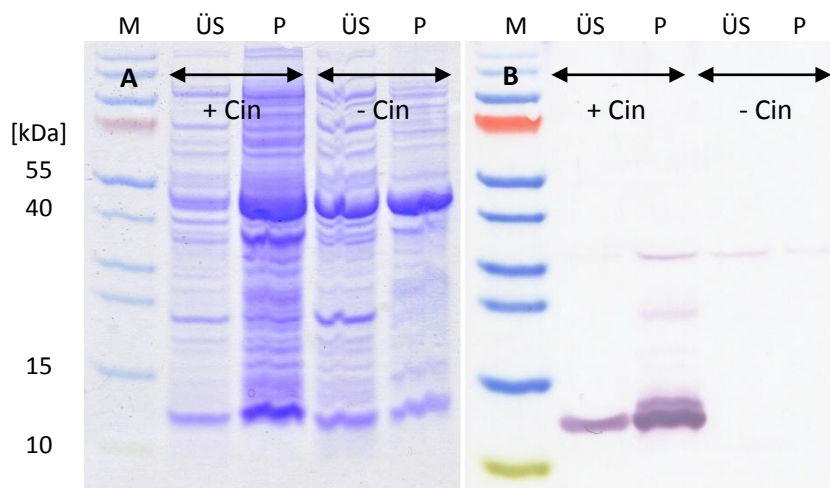


Abbildung 47. SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B) der Coexpression von β -Cinnamomin mit CYP154C5, Pdx und PdR in *E. coli* C43(DE3): M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. ÜS: Löslicher Überstand nach 48 h Expression. P: Pelletfraktion nach 48 h Expression. +Cin: Expression von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)-MalEssCinHis. -Cin: Expression von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB.

Insgesamt betrachtet fiel die Expression des Elicitins vermutlich relativ gut aus, da die Bande im Western Blot sehr deutlich zu sehen ist. Eine genaue Analyse der Höhe der β -Cinnamominexpression mittels SDS-PAGE und Western-Blot war jedoch nicht möglich. Die Expression der anderen drei Kom-

ponenten, CYP154C5, Pdx und PdR, fiel schlechter aus, als in *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB zuvor, was aber auf die Mehrbelastung der *E. coli*- Transkriptions- und Translationsmaschine durch die Expression eines weiteren heterologen Proteins zurückzuführen war.

Tabelle 3. Vergleich der Konzentration der CYP154C5 und der spezifischen Aktivität der ETK der Expression von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)MalEssCinHis (+Cin) und der Expression von der Kontrolle *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB (-Cin) in jeweils 500 mL TB-Medium für 48 h bei 30 °C. ZFE: Zellfreier Extrakt. c (TP): Gesamtproteingehalt. c (P450): CYP154C5-Konzentration. akt (ETK): Aktivität der ETK. spez.akt. (ETK): spezifische Aktivität der ETK.

	Volumen ZFE [mL]	OD ₆₀₀ ZFE	c (TP) [mg/mL]	c (P450) [μM]	P450:TP [μg/mg]	akt (ETK) [U/mL]	spez.akt. (ETK) [U/mg]
+ Cin	12,5	26	3,9	0,3	4	1,2	0,3
- Cin	12,5	59	2,4	1,5	29	3,2	1,4

2.4.3.2 Ganzzellbiokatalyse mit coexprimiertem β -Cinnamomin

Um den Ganzzellbiokatalysator mit coexprimiertem β -Cinnamomin in der Biokatalyse zu testen, wurden zunächst Reaktionen mit den vier am besten umgesetzten Substraten Pregnenolon, Testosteron, Progesteron und Dehydroepiandrosteron durchgeführt. Zellen von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)MalEssCinHis wurden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 resuspendiert und pro Substrat jeweils drei Reaktionsansätze von je 1 mL mit einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 40 entsprechend einer CYP154C5 Konzentration von 0,5 μM und einer volumetrischen Aktivität der ETK von 1,8 U/mL (0,3 U/mg spezifische Aktivität) hergestellt und mit 30 mM Glucose und 1 (Pregnenolon) bzw. 2 mM (Testosteron, Progesteron und Dehydroepiandrosteron) Substrat versetzt. Zur Kontrolle wurden jeweils drei Reaktionen mit *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB mit einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 20 entsprechend einer CYP154C5 Konzentration von 0,5 μM und einer volumetrischen Aktivität der ETK von 1,1 U/mL (1,4 U/mg spezifische Aktivität) angesetzt. Die Ganzzellbiokatalysen wurden für 6 h bei 30 °C inkubiert, extrahiert und in der GC bzw. HPLC analysiert. Der daraus berechnete Umsatz wurde im Diagramm in Abbildung 48 aufgetragen.

Wie dem Diagramm zu entnehmen ist, führte die Verwendung von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)MalEssCinHis-Zellen zur Ganzzellbiotransformation der vier Steroidsubstrate zu einem verbesserten Umsatz im Vergleich zu den Kontrollen mit dem Ganzzellbiokatalysator ohne β -Cinnamomincoexpression. Insbesondere für Pregnenolon, Progesteron und Dehydroepiandrosteron konnte eine deutliche Verbesserung gezeigt werden. So wurden mit Elicitincoexpression 50,4 % mehr Pregnenolon, 35,7 % mehr Progesteron und 32,4 % mehr Dehydroepiandrosteron umgesetzt. Für Testosteron konnte immer noch eine Steigerung des Umsatzes von 25,7 % auf 34,4 % erreicht werden. Allerdings muss beim Vergleich der Ergebnisse bedacht werden, dass in den Reaktionen mit coexprimiertem β -Cinnamomin (OD₆₀₀ = 40) und den Kontrollreaktionen (OD₆₀₀ = 20) unterschiedlich hohe Zelldichten eingesetzt wurden, welche die Ergebnisse verfälschen können. Eine doppelt so hohe Zelldichte führt möglicherweise zu einer geringeren Substratlimitierung, da auf die gleiche Menge

Enzym mehr Zelloberfläche kommt. Andererseits ist aber auch der Sauerstoffeintrag der höher konzentrierten Zellsuspension schlechter, als in der Zellsuspensionen mit der niedrigeren Zelldichte. Ein weiterer wichtiger Faktor, der nicht außer Acht gelassen werden darf, ist die volumetrische Aktivität der ETK in den Reaktionen mit β -Cinnamomin, die mit 1,8 U/mL deutlich höher als in den Kontrollreaktionen mit 1,1 U/mL war.

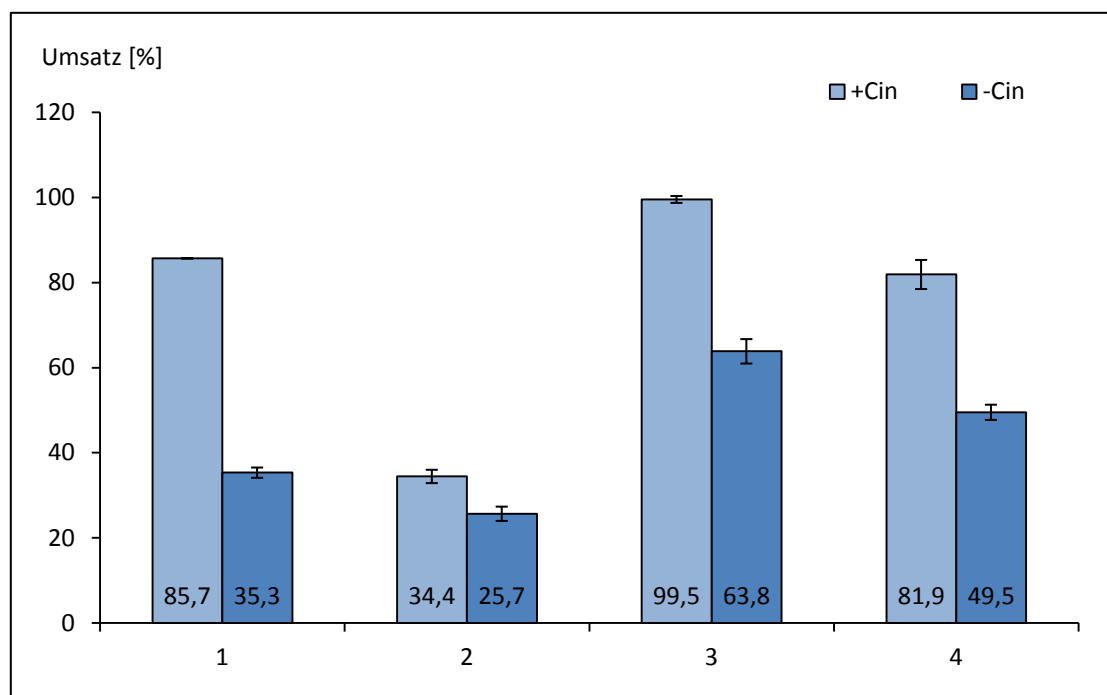


Abbildung 48. Vergleich des Umsatzes von 1 mM Pregnenolon (1) und von je 2 mM Testosteron (2), Progesteron (3), Dehydroepiandrosteron (4), mit ruhenden Zellen von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)MalEssCinHis (+Cin) und des Umsatzes der vier Substrate mit *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB (-Cin). Die *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)MalEssCinHis-Zelldichte in den Reaktionsansätzen betrug jeweils $OD_{600} = 40$, entsprechend einer Konzentration von CYP154C5 von 0,5 μ M und einer spezifischen Aktivität der ETK von 0,3 U/mg bzw. einer Aktivität von 1,8 U/mL. Die *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB-Zelldichte in den Reaktionsansätzen betrug jeweils $OD_{600} = 20$, entsprechend einer Konzentration von CYP154C5 von 0,5 μ M und einer spezifischen Aktivität der ETK von 1,4 U/mg bzw. einer Aktivität von 1,1 U/mL.

Um auch unter Berücksichtigung all dieser Faktoren nachzuweisen, dass der Substratumsatz durch Coexpression von β -Cinnamomin verbessert werden kann, wurde eine weitere Reihe Ganzzellbiotransformationen aller sechs Substrate durchgeführt. Dazu wurden die Reaktionen mit coexprimiertem β -Cinnamomin gleichzeitig mit Kontrollen mit gleicher Zelldichte und mit Kontrollen mit ähnlicher CYP154C5-Konzentration verglichen. *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB und *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)MalEssCinHis wurden erneut exprimiert und die Konzentration der P450 Monooxygenase und die spezifische Aktivität der ETK bestimmt. Für jedes der sechs Substrate wurden je drei Reaktionen mit coexprimiertem β -Cinnamomin mit einer Zelldichte von $OD_{600} = 40$ (0,73 μ M CYP154C5, 2,7 U/mL Aktivität sowie 0,5 U/mg spezifischer Aktivität der ETK) in 1 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 30 mM Glucose angesetzt und bei 30 °C inkubiert. Die

Substrate wurden, mit Ausnahme von Pregnenolon, in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt. Pregnenolon wurde wie zuvor in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Zur Kontrolle mit ähnlicher P450 Konzentration wurden pro Substrat jeweils drei Reaktionen mit *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB-Zellen mit einer OD₆₀₀ von 15 (0,75 µM CYP154C5, 3,7 U/mL Aktivität sowie 2,4 U/mg spezifischer Aktivität der ETK) hergestellt. Zur Kontrolle mit gleicher Zelldichte wurden pro Substrat je drei Reaktionen mit einer OD₆₀₀ von 40 (2,0 µM CYP154C5, 10,0 U/mL Aktivität sowie 2,4 U/mg spezifischer Aktivität der ETK) durchgeführt. Weil die Substrate unterschiedlich schnell umgesetzt werden, wurden die Reaktionsansätze zu unterschiedlichen Zeiten extrahiert. Progesteron und Pregnenolon wurden nach 2 h, Testosteron und Dehydroepiandrosteron nach 3 h und Androstendion und Nandrolon nach 5 h Reaktionszeit extrahiert. Anschließend wurden die Extrakte aufgearbeitet und mittels GC bzw. HPLC analysiert. In Abbildung 49 sind die erhaltenen Umsätze für die verschiedenen Steroidsustate aufgetragen.

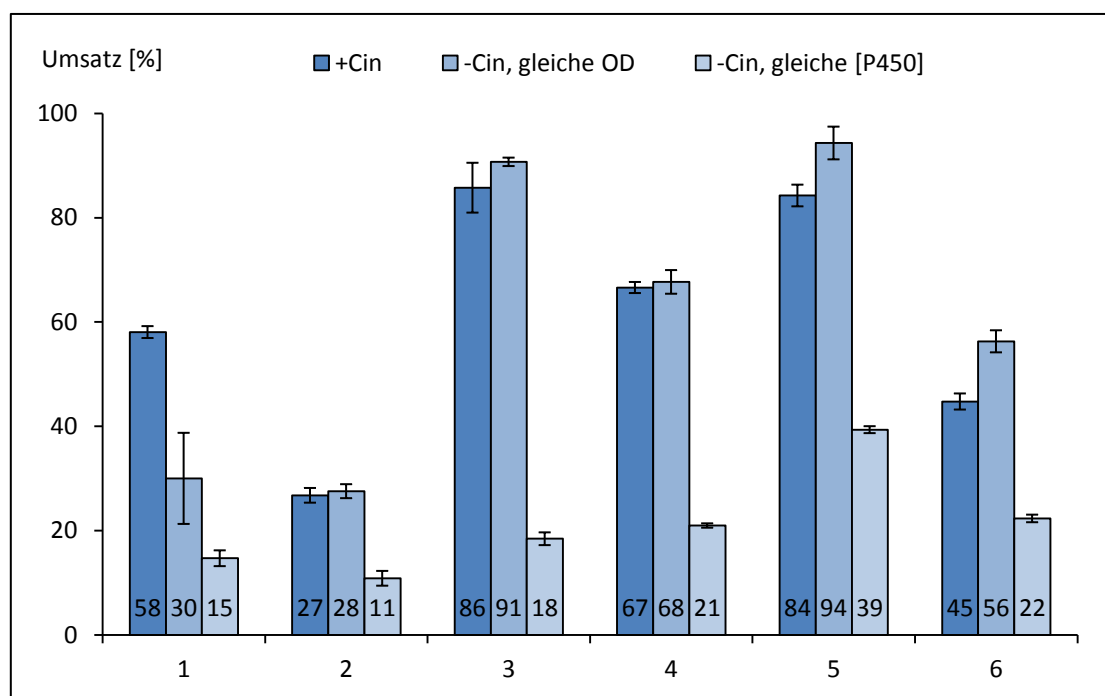


Abbildung 49. Vergleich der Umsätze der Ganzzellbiokatalysen von 1 mM Pregnenolon (**1**) und je 2 mM Testosteron (**2**), Progesteron (**3**), Dehydroepiandrosteron (**4**), Androstendion (**5**) und Nandrolon (**6**). Reaktionszeiten: **1** (2 h), **2** (3 h), **3** (2 h), **4** (3 h), **5** (5 h), **6** (5h). +Cin: Reaktionen mit Zellen mit coexprimiertem β -Cinnamomin (OD₆₀₀ = 40, 0,7 µM CYP154C5, 2,7 U/mL ETK Aktivität). -Cin, gleiche OD: Reaktionen mit Zellen ohne Elicitin bei gleicher OD₆₀₀ wie Zellen mit coexprimiertem β -Cinnamomin (OD₆₀₀ = 40, 2,0 µM CYP154C5, 10,0 U/mL Aktivität). -Cin, gleiche [P450]: Reaktionen mit Zellen ohne Elicitin bei gleicher CYP154C5 Konzentration (OD₆₀₀ = 15, 0,8 µM CYP154C5, 3,7 U/mL Aktivität).

Im Diagramm in Abbildung 49 ist zu erkennen, dass die Umsätze aller Substrate der Ganzzellbiokatalysen mit coexprimiertem Elicitin im Vergleich zu den Kontrollen mit OD₆₀₀ = 15 und einer ähnlichen P450-Konzentration signifikant höher waren. Selbst im Vergleich mit den Kontrollen mit gleicher Zelldichte (OD₆₀₀ = 40) wurden, durch die Coexpression von β -Cinnamomin, für fünf der sechs Substrate

fast so hohe Umsätze erzielt, wie mit den Kontrollen, obwohl diese eine mehr als doppelt so hohe CYP154C5-Konzentration und eine mehr als dreimal so hohe Aktivität der ETK besaßen. Pregnenolon wurde mit coexprimiertem β -Cinnamomin sogar fast doppelt so gut umgesetzt, wie in der Kontrolle ohne Elicitin. In Abbildung 50 ist das Verhältnis der umgesetzten Menge Substrat (in μmol) pro μmol CYP154C5 aufgetragen, um die Ergebnisse unabhängig von der Zelldichte und der eingesetzten Menge P450 vergleichen zu können.

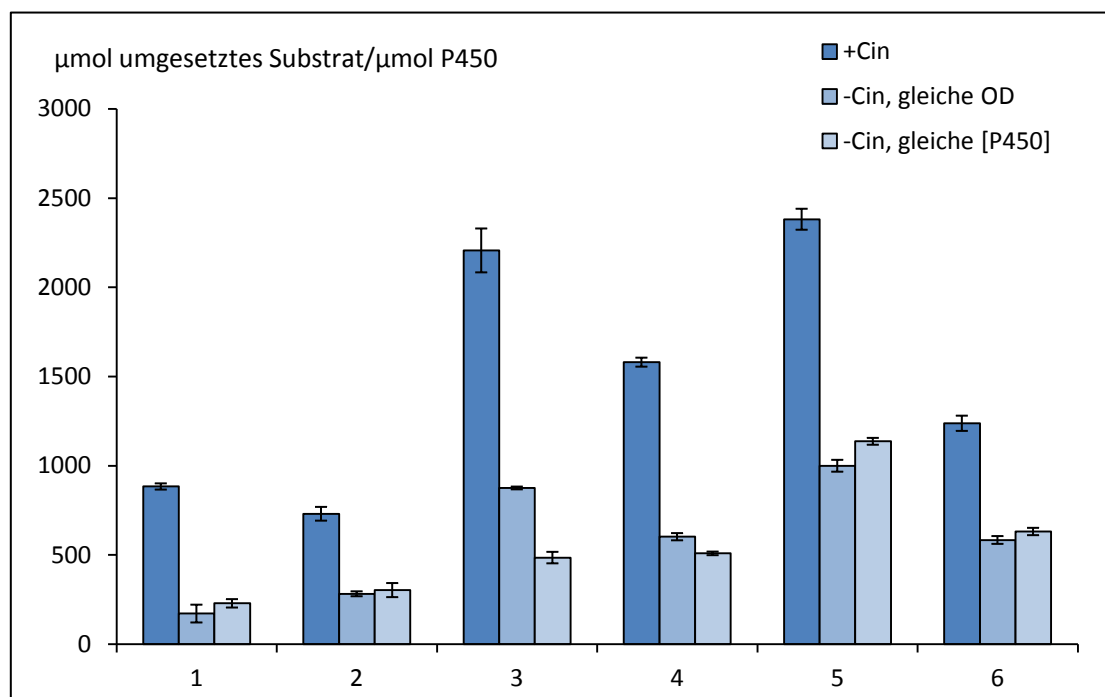


Abbildung 50. Vergleich der umgesetzten Menge Substrat pro μmol CYP154C5 der Ganzzellbiokatalysen von 1 mM Pregnenolon (1) und je 2 mM Testosteron (2), Progesteron (3), Dehydroepiandrosteron (4), Androstendion (5) und Nandrolon (6). Reaktionszeiten: 1 (2 h), 2 (3 h), 3 (2 h), 4 (3 h), 5 (5 h), 6 (5h). +Cin: Reaktionen mit Zellen mit coexprimiertem β -Cinnamomin ($\text{OD}_{600} = 40$, $0,7 \mu\text{M}$ CYP154C5, $2,7 \text{ U/mL}$ ETK Aktivität). -Cin, gleiche OD: Reaktionen mit Zellen ohne Elicitin bei gleicher OD_{600} wie Zellen mit coexprimiertem β -Cinnamomin ($\text{OD}_{600} = 40$, $2,0 \mu\text{M}$ CYP154C5, $10,0 \text{ U/mL}$ Aktivität). -Cin, gleiche [P450]: Reaktionen mit Zellen ohne Elicitin bei gleicher CYP154C5 Konzentration ($\text{OD}_{600} = 15$, $0,8 \mu\text{M}$ CYP154C5, $3,7 \text{ U/mL}$ Aktivität).

Ähnlich wie in dem Diagramm in Abbildung 49 ist im Diagramm in Abbildung 50 gut zu erkennen, dass der Substratumsatz durch die Coexpression β -Cinnamins wesentlich verbessert werden konnte. In beiden Kontrollen wurden von allen Steroiden außer von Progesteron eine ähnliche Menge Substrat pro μmol CYP154C5 umgesetzt, von Progesteron wurde in der Kontrolle mit gleicher Zelldichte ($\text{OD}_{600} = 40$) etwa doppelt so viel Substrat pro μmol P450 Monooxygenase umgesetzt, wie in der Kontrolle mit $\text{OD}_{600} = 15$. Eindeutig höher als in allen Kontrollansätze lag die umgesetzte Menge Substrat pro eingesetzter Menge P450 jedoch in den Ganzzellbiotransformationen mit coexprimiertem β -Cinnamomin. Durch die Zellen mit dem coexprimiertem Elicitin wurde, im Vergleich mit den Kontrollen, wesentlich mehr Substrat pro μmol CYP154C5 umgesetzt, je nach Steroid zwischen 2- und 5-mal. Unter Berücksichtigung der Elektronentransferkomponentenaktivität, die in beiden Kontrollen

ohne Elicitin höher lag, fällt der Unterschied sogar noch größer aus. Somit konnte schließlich eindeutig nachgewiesen werden, dass der Substratumsatz der hydrophoben Steroids substrate in der Ganzzellbiokatalyse mit rekombinanten *E. coli* durch Einsatz von β -Cinnamomin signifikant verbessert werden kann.

2.4.4 Ganzzellbiokatalysen mit Zusatz von 100 μ M β -Cryptogein

Um den Effekt eines weiteren Elicitins auf den Substratumsatz der Steroide in Ganzzellbiokatalysen zu testen, wurde der Umsatz der vier Substrate Pregnenolon, Testosteron, Progesteron und Dehydroepiandrosteron auch mit Zusatz von aufgereinigtem β -Cryptogein durchgeführt. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 1 mL in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 mit *E. coli* C43(DE3) pT2cyp154C5 pACYCcamAB-Zellen in einer Zelldichte von $OD_{600} = 20$ (entsprechend einer CYP154C5-Konzentration von 0,5 μ M und einer spezifischen Aktivität der ETK von 1,4 U/mg), 30 mM Glucose, 100 μ M β -Cryptogein und Substrat durchgeführt. Die verwendete β -Cryptogeinstammlösung (Expression und Aufreinigung siehe Abschnitt 2.2.3.4.2) besaß eine Konzentration von 429 μ M. Abgesehen von Pregnenolon, das in 1 mM eingesetzt wurde, wurden die Substrate alle mit 2 mM eingesetzt. Jeweils drei Reaktionsansätze wurden für 6 h bei 30 °C inkubiert, extrahiert und mittels GC bzw. HPLC analysiert. Zur Kontrolle wurden pro Substrat je drei Ganzzellbiokatalysen ohne Zugabe von β -Cryptogein durchgeführt. In Abbildung 51 sind die ermittelten Umsätze aufgetragen.

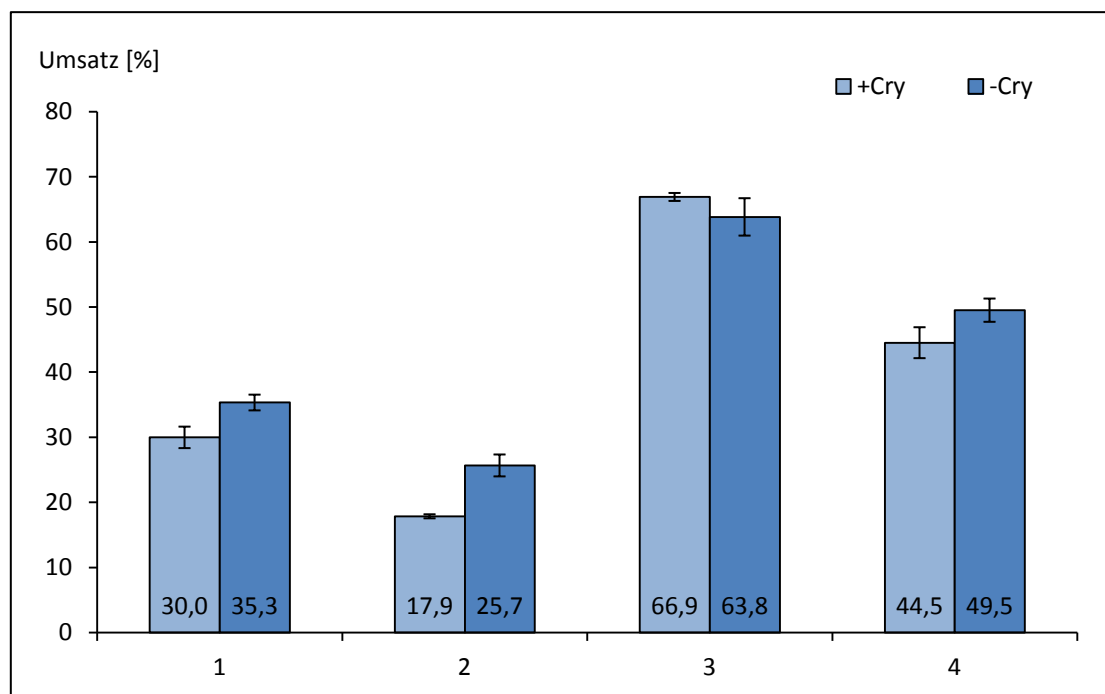


Abbildung 51. Umsatz von 1 mM Pregnenolon (1) und je von 2 mM Testosteron (2), Progesteron (3), Dehydroepiandrosteron (4), mit (+Cry) und ohne (-Cry) Zusatz von 100 μ M β -Cryptogein in Ganzzellbiokatalysen mit ruhenden Zellen von *E. coli* C43(DE3) pT2cyp154C5 pACYCcamAB. Die Zelldichte in den Reaktionsansätzen betrug jeweils $OD_{600} = 20$ entsprechend einer Konzentration von CYP154C5 von 0,5 μ M und einer spezifischen Aktivität der ETK von 1,4 U/mg.

Das Diagramm zeigt eindeutig, dass durch den Zusatz von 100 μM β -Cryptogein für drei der Substrate keine Verbesserung des Umsatzes der vier Substrate in Ganzzellbiokatalysen erzielt werden konnte. Im Gegenteil fiel der Umsatz von Pregnenolon, Testosteron und Dehydroepiandrosteron sogar geringfügig schlechter aus, als in den Kontrollen ohne Elicitin. Nur für Progesteron konnte eine minimale Steigerung des Umsatzes festgestellt werden.

3 Diskussion

3.1 Expression und Proteinaufreinigung

3.1.1 Cytoplasmatische Expression in *Escherichia coli*

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die lösliche Expression der Elicitine in *E. coli* zu etablieren. Als erstes wurde dazu die cytoplasmatische Expression von α -Capsicein, α -Megaspermin, β -Cinnamomin und β -Cryptogein in *E. coli* getestet. Die Expression wurde dafür mit den Plasmiden pET-28a(+) und pBADN in den *E. coli* SHuffle®-Stämmen T7 und T7 Express der Firma New England BioLabs® Inc. untersucht. Da die Expression von Disulfidbrücken-haltigen Proteinen im Cytoplasma von *E. coli* ein relativ großes Problem dargestellt [9], wurden Stämme verwendet, die für die Expression von Disulfidbrückenproteinen in *E. coli* optimiert wurden. Die beiden verwendeten SHuffle®-Stämme sind TrxB und Gor-defizient und exprimieren zusätzlich im Cytoplasma konstitutiv eine chromosomale Kopie der Disulfidbrückenisomerase DsbC, welche zur korrekten Bildung von Disulfidbrücken beiträgt. Durch den *knockout* von TrxB und Gor werden die Cysteine der gebildeten Disulfidbrücken nicht mehr so schnell reduziert.

Letztendlich konnte aber mit keinem der beiden Plasmide, weder durch Variation der Induktorkonzentration, der Expressionszeit oder -temperatur, noch durch Expression mit und ohne His-tag, die lösliche Expression eines Elicitins im Cytoplasma der beiden SHuffle®-Stämme erreicht werden. Insgesamt wurden allerdings sehr hohe Expressionsniveaus von unlöslich gebildeten Elicitinen erzielt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein hohes Expressionslevel gewesen sein, da vor allem mit pET-28a(+), das einen starken T7-Promotor besitzt [8], sehr viel Elicitin in *inclusion bodies* überexprimiert wurde. Falls die exprimierten Proteine nicht schnell genug gefaltet werden konnten, hätte die Expression der Elicitine daher in der Bildung von *inclusion bodies* resultiert. Diese Erklärung kann jedoch vermutlich ausgeschlossen werden, weil die meisten Methoden, die Faltung der Elicitine zu unterstützen, in dieser Arbeit genutzt worden sind. Da es sich bei den Elicitinen auch um sehr kleine Proteine (< 100 Aminosäuren) handelt, sollte die restliche Faltung relativ problemlos ablaufen, sobald die Disulfidbrücken korrekt gebildet werden. Aus diesem Grund ist die Expression der Elicitine, trotz der optimierten Stämme und der variierenden Expressionsparameter, mit hoher Wahrscheinlichkeit an den Disulfidbrücken gescheitert.

Um die cytoplasmatische Expression trotzdem zu ermöglichen, hätte noch die Coexpression von Chaperonen wie beispielsweise DnaK-DnaJ-GrpE, dem *trigger factor* (TF) oder GroEL-GroES getestet werden können. Bei all diesen Chaperonen handelt es sich um *E. coli*-Hitzeschockproteine, die in Stresssituationen die Faltung von wichtigen Proteinen, teils unter ATP-Verbrauch, begünstigen und gewährleisten sollen [8,9]. Eine weitere Möglichkeit wäre die Induktion der Expression der T7-

Polymerase mit IPTG-Konzentrationen unter 100 μM , um so das gesamte Expressionsniveau zu senken [9]. Man hätte auch versuchen können, die Expression bei Temperaturen unter 15 °C mit einem Kälte-induzierbaren Promotor, wie dem des *E. coli* Kälteschockgens *cspA*, zu testen [9]. All diese Methoden haben jedoch gemein, dass sie zwar die Faltung der Proteine verbessern, aber nicht spezifisch die korrekte Bildung der Disulfidbrücken fördern. Da das Hauptproblem die Disulfidbrücken zu sein schienen und mit DsbC bereits eines der entscheidenden Chaperone für die Faltung von Disulfidbrücken coexprimiert wurde, hätten auch weitere Tests wahrscheinlich zu keinem besseren Ergebnis geführt.

Als nächstes wurde die Rückfaltung von β -Cinnamomin aus den *inclusion bodies* getestet, da das Elicitin zumindest in *inclusion bodies* in großen Mengen exprimiert werden konnten. Trotz Optimierung der Parameter konnte allerdings lediglich eine geringe Ausbeute von maximal 2,5 mg löslichem β -Cinnamomin pro Liter Kulturmedium gewonnen werden. Damit liegt die Ausbeute deutlich unter denen der Expressionen in *P. pastoris* und ist höchstens mit den schlechteren Expressionen der *Phytophthora*-Stämme vergleichbar [5,14,17,82,98].

Theoretisch hätten noch viele weitere Parameter, wie eine separate Isolierung der *inclusion bodies*, Guanidiniumchlorid statt Harnstoff im Resolubilisierungspuffer, unterschiedliche Drücke, variierende Proteinkonzentrationen, weitere Temperaturen, chemische Zusätze wie L-Arginin, Glycerin, Polyethylenglycol oder sogar Chaperone im Rückfaltungspuffer, getestet werden können [11,44,95,112]. Auch eine Rückfaltung β -Cinnamomins immobilisiert über den His-tag auf einer Ni-Sepharosesäule, die Rückfaltung durch Größenausschlusschromatographie (SEC), eine Matrix-assoziierte Rückfaltung, hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) oder sogar eine Resolubilisierung β -Cinnamomins mit milden Bedingungen unter Beibehaltung der *nativ-ähnlichen* Sekundärstruktur wären denkbar gewesen [112]. Da aber, abgesehen von der geringen Ausbeute, mit Hilfe des DHE-Assays auch nicht bestimmt werden konnte, ob und zu welchem Grad β -Cinnamomin korrekt zurückgefaltet wurde, sind auch keine weiteren Versuche zur Optimierung der Rückfaltung β -Cinnamomins unternommen worden.

3.1.2 Konstitutive Expression in *Pichia pastoris*

Da β -Cinnamomin im Cytoplasma von *E. coli* nicht exprimiert werden konnte, wurde die Expression, parallel zur periplasmatischen Expression in *E. coli*, auch in *P. pastoris* getestet, um ausreichend Elicitin für erste biokatalytische Tests zu gewinnen. *P. pastoris* wurde ausgewählt, da die Hefe ein sehr erfolgreiches Expressionssystem ist, welches im Gegensatz zu *E. coli* zur korrekten Bildung von Disulfidbrücken fähig ist [29] und bereits zuvor erfolgreich zur Expression von Elicitinen eingesetzt wurde [33,82,97]. Auch β -Cinnamomin konnte schon erfolgreich mit dem pPIC9K-Plasmid mit Ausbeuten von 48 bis 100 mg Protein pro Liter Kultur exprimiert werden [5,98]. In dieser Arbeit wurde die Ex-

pression von β -Cinnamomin in *P. pastoris* X-33 mit pGAPZ α A mit und ohne N-terminalen His-tag getestet. pGAPZ α A wurde gewählt, da der konstitutive Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP)-Promotor ähnlich hohe Expressionsniveaus wie der Alkoholoxidase (AOX1)-Promotor erreicht, jedoch nicht mit Methanol induziert werden muss [29]. Zusätzlich bot sich die Sekretion β -Cinnamomins in den Kulturüberstand an, da es auch in seinem natürlichen Wirt sekretiert wird. Die Sekretion bietet den Vorteil, dass die anschließende Aufreinigung wesentlich vereinfacht wird, weil *P. pastoris* nur sehr wenig eigenes Protein in das Kulturmedium sekretiert [30,110]. Um eine gute Sekretion zu erreichen, wurde das β -Cinnamomingen daher unmittelbar hinter die α -mating factor Signalsequenz aus *S. cerevisiae* kloniert, die auf dem pGAPZ α A-Plasmid enthalten ist.

Doch obwohl zuvor mehrere Elicitine erfolgreich in *P. pastoris* exprimiert werden konnten, wurde weder mittels pGAPZ α ACin, noch mit pGAPZ α AHisCin ausreichend lösliches β -Cinnamomin exprimiert, um es auf dem SDS-Gel erkennen zu können. Die Expression war so schwach, dass β -Cinnamomin selbst nach Aufreinigung durch Kationenaustauschchromatographie nicht durch SDS-PAGE nachgewiesen werden konnte. Da die Expression von β -Cinnamomin mit pPIC9K in *P. pastoris* grundsätzlich funktionierte, können nur die unterschiedlich gewählten Expressionsbedingungen, die für *E. coli* optimierte β -Cinnamomingensequenz, die Klone, die zur Expression ausgewählt wurden, oder die Art der Expression zum Scheitern der Expression geführt haben. Einerseits erfolgte die Expression durch Archer *et al.* und Rodrigues *et al.* im Fermenter unter kontrollierten Bedingungen, während die Expression von *P. pastoris* X-33 pGAPZ α ACin und *P. pastoris* X-33 pGAPZ α AHisCin im Schüttelkolben ohne Kontrolle des pH-Wertes oder der Luftzufuhr durchgeführt wurde. Andererseits wurde von jeder Variante jeweils nur ein Klon zur Expression getestet. Zur Identifizierung von *P. pastoris*-Stämmen, in denen ein Plasmid mehrfach integriert wurde und die somit eine höhere Expression aufweisen [71], ist jedoch das ausgiebige Durchmustern von Transformanten notwendig. Der Codongebrauch könnte eine weitere Rolle gespielt haben, da das β -Cinnamomingen von Archer *et al.* für die Expression in *P. pastoris*, das synthetische Gen in dieser Arbeit aber für die Expression in *E. coli* optimiert worden war. Der größte Unterschied und damit vermutlich das Hauptproblem der Expression in dieser Arbeit lag wahrscheinlich jedoch vor allen Dingen in der Art der Expression: konstitutive Expression mit pGAPZ α A in dieser Arbeit auf der einen Seite, induzierte Expression mit pPIC9K in den Arbeiten von Archer *et al.* und Rodrigues *et al.* auf der anderen Seite.

Der Abbau von β -Cinnamomin durch Proteasen in *P. pastoris* kann hingegen ausgeschlossen werden. Zwar hat in einigen anderen Fällen der Abbau heterolog exprimierter Proteine durch *P. pastoris*-Proteasen ein Problem dargestellt [29,71], allerdings wurde in keiner der drei Publikation, in der die Expression von β -Cinnamomin in *P. pastoris* beschrieben wurde, auf Schwierigkeiten in dieser Richtung hingewiesen [5,97,98]. Desweiteren waren die diffusen Banden bei ca. 5 - 6 kDa auf fast allen Gelen zu sehen, weshalb es sich sehr wahrscheinlich um Medienbestandteile und nicht um Ab-

bauprodukte β -Cinnamomins gehandelt haben wird. Auch können Probleme mit der Sekretion mittels *α -mating factor* Signalsequenz oder der Faltung der Disulfidbrücken ausgeschlossen werden, da beides zuvor erfolgreich durch Archer *et al.* und Rodrigues *et al.* gezeigt werden konnte.

Um β -Cinnamomin daher dennoch löslich in *P. pastoris* zu exprimieren, wäre die sinnvollste Möglichkeit gewesen, statt des konstitutiven pGAPZ α A-Plasmids ein Expressionsplasmid mit induzierbarem AOX1-Promotor zu verwenden und die Expressionsbedingungen an Rodrigues *et al.* [98] anzulehnen. Wäre auch dies gescheitert, hätte ein neues synthetisches Gen im Codongebrauch von *P. pastoris* designt werden können. Weil β -Cinnamomin zu diesem Zeitpunkt aber bereits im Periplasma *E. coli* löslich exprimiert werden konnte, wurde die Expression in *P. pastoris* nicht weiter getestet.

3.1.3 Periplasmatische Expression in *Escherichia coli*

3.1.3.1 Expression von β -Cinnamomin

Da die Expression von β -Cinnamomin im Cytoplasma von *E. coli* wahrscheinlich an den drei konservierten Disulfidbrücken scheiterte, wurde die Expression des Elicitins im Periplasma getestet. So werden beispielsweise auch alle *E. coli*-eigenen Disulfidbrückenproteine in das Periplasma sekretiert, weil hier Bedingungen herrschen, die die Faltung von Disulfidbrücken unterstützen [74]. Zur Sekretion β -Cinnamomins ins Periplasma wurden insgesamt drei verschiedene Sekretionssignalsequenzen getestet, welche die Sekretion über zwei verschiedene Sekretionswege erlauben. MalEss und PelBss sind Sec-abhängige Sekretionssignalsequenzen [42], Proteine mit einer DsbAss werden dagegen über den SRP-abhängigen Sekretionsweg sekretiert [106]. Bevor jedoch die Ausbeute mit allen drei Sekretionssignalsequenzen unter identischen Bedingungen verglichen wurde, wurden zunächst die Expression und Aufreinigung etabliert. Die Expression wurde mit den Plasmiden pET-22b(+) und pET-28a(+) in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3) und C43(DE3) getestet. Erfolgreich konnte β -Cinnamomin schließlich nur in *E. coli* C43(DE3) löslich exprimiert werden. Die Aufreinigung des Elicitins erfolgte über einen C-terminalen His-tag, da sich die zunächst getestete Aufreinigung durch Isolierung der periplasmatischen Fraktion, mit anschließender Kationenaustauschchromatographie, als problematisch herausgestellt hatte.

Die lösliche Expression der *E. coli* BL21(DE3)-Varianten scheiterte an dem starken Expressionsniveau des Stammes, weil der Sec-Sekretionsapparat durch die schnelle Expression hoher Mengen rekombinanten β -Cinnamomins überfordert wurde. Dies führte dazu, dass das Elicitin in *inclusion bodies* aggregierte, statt ins Periplasma sekretiert und dort korrekt gefaltet zu werden [74]. Bestätigt wurde die Annahme durch die erfolgreiche Expression in dem *E. coli* C43(DE3)-Stamm. Dieser ist eine BL21(DE3)-Variante, welche aufgrund von mindestens einer Mutation eine langsamere Expression aufweist [77]. Die besten Expressionsergebnisse wurden im Schüttelkolbenmaßstab erzielt. Keine der Fermentationen im Rührkesselreaktor konnte ein ähnlich gutes Ergebnis liefern. Da diese jedoch nur

mit einem einzigen Satz Parameter (30 °C, 300 rpm, Begasung mit 5 L Luft pro Minute und pH 6,5) durchgeführt worden waren, sind die Fermentationsbedingungen nicht ausreichend optimiert worden. Um geeignete Bedingungen zur Expression von β -Cinnamomin im Fermenter zu finden, müssten daher weitere Expressionsbedingungen getestet werden. So konnten zum Beispiel Puertas und Betton durch Optimierung einer Hochzelldichtefermentation Proteinkonzentrationen von bis zu 470 mg *leech carboxypeptidase inhibitor* pro Liter Kulturmedium erreichen [92]. Da die Ausbeuten im Schüttelkolben jedoch für die biokatalytischen Tests ausreichten, wurde die Expression im Fermenter nicht weiter optimiert. Schließlich wurde auch die Zusammensetzung des TB-Mediums „optimiert“, da die Verwendung von Pepton/Trypton und Hefeextrakt verschiedener Hersteller die reproduzierbare Expression von β -Cinnamomin sehr erschwerte. Weil je nach Hersteller (und teilweise sogar Charge) Verarbeitungsweise und Ausgangsmaterialien variieren, unterscheidet sich auch jeweils die genaue Zusammensetzung der Komponenten. Dies kann wiederum zu unterschiedlichen Wachstums- und Expressionsraten führen. Durch Bestimmung der besten Kombination zur Expression von β -Cinnamomin in *E. coli* konnte die Raum-Zeit-Ausbeute verschiedener β -Cinnamominexpressionen annähernd vereinheitlicht werden.

Abgesehen von der Expression konnte auch die Aufreinigung von β -Cinnamomin erfolgreich optimiert werden, obwohl die Ausbeute der Aufreinigung durch Isolierung der periplasmatischen Fraktion mit anschließender Kationenaustauschchromatographie zunächst sehr niedrig ausfiel. Da bereits in dem Umpufferungsschritt der isolierten periplasmatischen Fraktion durch Dialyse fast das gesamte Elicitin präzipitierte, konnte somit fast kein Protein auf die Säule geladen werden. Weil der pH des Resolubilisierungspuffer jedoch über dem isoelektrischen Punkt von β -Cinnamomin liegt, muss die periplasmatische Fraktion für eine anschließende Kationenaustauschchromatographie in einen Puffer mit einem niedrigeren pH ($\leq$ pH 6,5) umgepuffert werden. Da sich aufgereinigtes β -Cinnamomin während der späteren Lagerung als stabil erwies, kann die starke Präzipitation während der Dialyse vermutlich auf hydrophoben Wechselwirkungen β -Cinnamomins mit der Dialysemembran zurückgeführt werden. Um eine Dialyse der isolierten periplasmatischen Fraktion zu vermeiden, könnte der Umpufferungsschritt daher beispielsweise mittels PD-10 Entsalzungssäulen durchgeführt werden. Nachdem sich aber die Aufreinigung β -Cinnamomins durch Verwendung eines C-terminalen His-tag in einem einzigen Schritt sehr erfolgreich durchführen ließ, machte dies die Optimierung der Prozedur zur Isolierung der periplasmatischen Fraktion für die Kationenaustauschchromatographie überflüssig.

Nach der Optimierung der Expression und Aufreinigung von β -Cinnamomin wurde schließlich die Expression und Sekretion mit MalEss, DsbAss und PelBss verglichen. Durch die Verwendung der drei Sekretionssignalsequenzen unter optimierten Expressionsbedingungen konnten Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt werden, die wesentlich über denen lagen, die durch Expression in *P. cinnamomi* erreicht

werden konnten [14,17]. So lag die Raum-Zeit-Ausbeute der Expression mit DsbAss bei 0,30 mg Protein pro Liter und Stunde, mit PelBss bei 0,49 mg Protein pro Liter und Stunde und mit MalEss sogar bei 0,65 mg Protein pro Liter und Stunde. Die Elicitinexpressionen in *P. pastoris* lagen zwar höher als die Expression mit der DsbAss, mit den beiden Sec-abhängigen Sekretionssignalsequenzen konnte aber eine mindestens genau so hohe bzw. sogar höhere Raum-Zeit-Ausbeute erreicht werden, als in *P. pastoris* [5,82]. Im Vergleich dazu erreichte nur die Expression von Rodrigues *et al.* [98] in *P. pastoris* eine höhere Ausbeute als die periplasmatischen Expressionen in *E. coli* (siehe Abbildung 52). Die beste Expression von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCinHis im Rahmen der biokatalytischen Versuche ergab schließlich sogar eine Raum-Zeit-Ausbeute von 0,95 mg β -Cinnamomin pro Liter und Stunde und erreichte damit fast die höchste in *P. pastoris* erzielte Ausbeute.

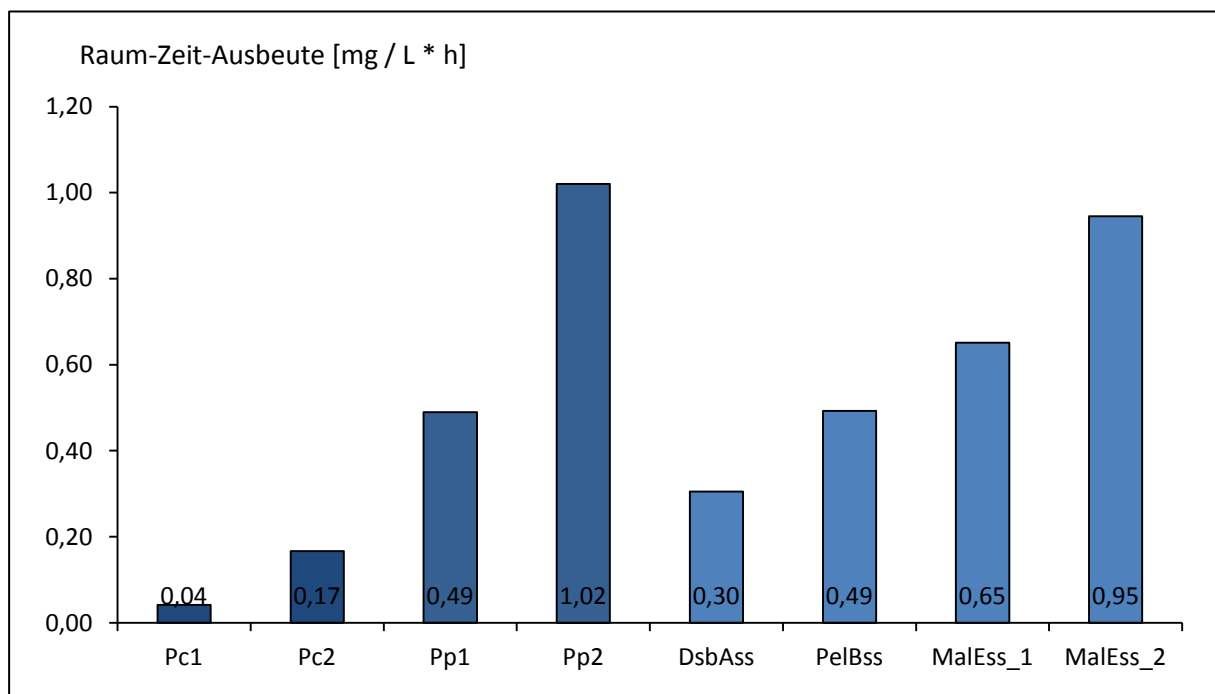


Abbildung 52. Vergleich der Raum-Zeit-Ausbeuten der drei Vergleichsexpressionen in *E. coli* C43(DE3) mit pET-28a(+)MalEssCinHis (MalEss_1), pET-28a(+)DsbAssCinHis (DsbAss) und pET-28a(+)PelBssCinHis (PelBss) mit den Raum-Zeit-Ausbeute der besten Expression von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCinHis (MalEss_2), zwei Expressionen in *P. cinnamomi* (Pc1: Billard *et al.* [14]; Pc2: Bonnet *et al.* [17]) und zwei Expressionen in *P. pastoris* (Pp1: Archer *et al.* [5]; Pp2: Rodrigues *et al.* [98]).

Obwohl mit MalEss die höchste Ausbeute der Expressionen mit den drei Sekretionssignalsequenzen in *E. coli* erzielt wurde, war sie die einzige Sekretionssignalsequenz, die nicht vollständig abgespalten wurde. Dies kann hauptsächlich, ebenso wie die gescheiterte Expression in *E. coli* Bl21(DE3), auf die Überlastung der Sekretionsmaschinerie zurückgeführt werden. Trotz Verwendung des C43(DE3)-Stammes wird immer noch zu viel β -Cinnamomin zu schnell exprimiert, als dass es mittels der MalEss problemlos ins Periplasma transportiert werden könnte. Dementsprechend bildet der Überschuss an Protein *inclusion bodies* im Cytoplasma [74], was die zweite Bande in den Pelletfraktionen der SDS-

Gele erklärt. Die unvollständige Abspaltung der MalEss im Periplasma, auf welche die zweite Bande in den Fraktionen des löslichen Proteins in Abbildung 36 (siehe Abschnitt 2.2.3.3.7) hinweist, kann durch die Sequenzen von β -Cinnamomin und die Sequenz der Sekretionssignalsequenz erklärt werden. Die Sequenzen eines Preproteins und seiner Sekretionssignalsequenz, insbesondere der polaren C-terminalen Schnittstelle, spielen beide eine Rolle für die Effizienz der Abspaltung. Die Effizienz kann sich daher von Sekretionssignalsequenz zu Sekretionssignalsequenz und von Protein zu Protein unterscheiden [74]. Da die Proteinaufreinigung im Anschluss an die Expression mittels C-terminalen His-tags durchgeführt wurde, hätte das Preprotein mit der N-terminalen MalEss in hoher Konzentration auf dem SDS-Gel nachweisbar gewesen sein müssen, wenn es in hohen Mengen vorgelegen hätte. Weil diese Bande jedoch nur auf diesem einen Western Blot (vergleiche Abbildung 36) nachgewiesen werden konnte und im Anschluss an alle anderen Aufreinigungen immer ausschließlich vollständig prozessiertes β -Cinnamomin nachgewiesen werden konnte, scheint das Problem nur in sehr geringem Maße aufgetreten zu sein.

Der Unterschied der Ausbeute der Expressionen mit den beiden Sec-abhängigen Sekretionssignalsequenzen ist ebenfalls auf die Aminosäuresequenz der Sekretionssignalsequenzen zurückzuführen. Sec-Sekretionssignalsequenzen bestehen aus drei kurzen Regionen. Die N-terminale Region beeinflusst die Effizienz des Transports des Preproteins zum Translocon und die Bindung an die negativ geladene Oberfläche der Lipiddoppelschicht. Die Länge und Hydrophobizität der folgenden kurzen hydrophoben Region entscheidet über die Effizienz des eigentlichen Transports durch das Translocon ins Periplasma. Gefolgt werden beide Regionen von der bereits angesprochenen polaren Schnittstelle. Je nach Beschaffenheit der drei Regionen wirken sich zwei verschiedene Sec-Sekretionssignalsequenzen daher entsprechend unterschiedlich auf die Sekretion ein und desselben Proteins aus [74].

Im Gegensatz zu dieser Arbeit konnten Puertas und Betton die höchste Ausbeute in der Expression des LCI mit der DsbAss erzielen [92]. Die cotranslationale Sekretion mit DsbAss über den SRP-Weg ist vor allem für Proteine von Vorteil, die sich rasch im Cytoplasma falten. Der Vorteil des posttranslationalen Sec-abhängigen Sekretionsweges hingegen liegt in einer schnelleren Sekretion, weil sie unabhängig von dem langsamen Prozess der Translation stattfinden kann [47]. Die besseren Ergebnisse mit der MalEss und der PelBss weisen somit auf eine langsame Faltung β -Cinnamomins im Cytoplasma von *E. coli* hin, weshalb höhere Ausbeuten mit den Sec-abhängigen Sekretionssignalsequenzen erzielt werden konnten.

3.1.3.2 Expression von β -Cryptogein

Im Anschluss an die Optimierung der Expressionsbedingungen von β -Cinnamomin sollte die Expression eines weiteren Elicitins unter optimierten Bedingungen getestet werden. Als nächstes wurde daher die periplasmatische Expression von β -Cryptogein, dem zweiten β -Elicitin, durchgeführt. Auch β -

Cryptogein konnte exprimiert werden und es konnte eine Raum-Zeit-Ausbeute von 1,62 mg Protein pro Stunde und Liter Kulturmedium für die Expression von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCryHis erzielt werden. Dies stellt bezogen auf die beste Expression von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCinHis eine 1,7-fache höhere Ausbeute dar. In Bezug auf die erste Expression von β -Cryptogein in *P. pastoris* ist es eine 4,9-fache Steigerung [82], verglichen mit der besten Expression eines Elicitins (β -Cinnamomin) in *P. pastoris* in der Literatur lag die Ausbeute 1,6-mal höher [98]. Da die Expressionsbedingungen der beiden β -Elicitine in *E. coli* identisch waren und der Codongebrauch beider Gene gleichermaßen für die Expression in *E. coli* optimiert worden war, können daher nur die Unterschiede in der Proteinsequenz zur besseren Expression β -Cryptogeins geführt haben. Die wahrscheinlichste Möglichkeit, weshalb β -Cryptogein das höhere Expressionsniveau zeigte, ist, dass sich β -Cryptogein, trotz der hohen Sequenzidentität, vermutlich allgemein besser faltet als β -Cinnamomin.

Weil die Expressionsbedingungen zudem nur für β -Cinnamomin und nicht für β -Cryptogein optimiert wurden, kann die Ausbeute vermutlich sogar noch weiter gesteigert werden, wenn die Bedingungen für β -Cryptogein optimiert werden würden.

3.1.3.3 Dehydroergosterolassay und Test der Sterolbindekapazität

Um die Funktionalität und Faltung des exprimierten β -Cinnamomins zu überprüfen, wurde der Dehydroergosterolassay durchgeführt, sowie die Sterolbindekapazität des Elicitins getestet. Der Dehydroergosterolassay basiert auf der Methode von Mikes *et al.* [76], die zeigten, dass Dehydroergosterol durch Elicitine besser gebunden wird, als durch eine unspezifische Negativkontrolle. Da Dehydroergosterolmoleküle durch Wechselwirkung untereinander die eigene Fluoreszenz unterdrücken, kann ein höherer Anstieg der Fluoreszenz nachgewiesen werden, je besser die Moleküle durch ein Elicitin gebunden werden. Allerdings lieferte der Dehydroergosterolassay in dieser Arbeit kein zufriedenstellendes Ergebnis, da nach Messung verschiedener β -Cinnamominlösungen festgestellt wurde, dass die Messwerte der einzelnen Versuche nicht verglichen werden konnten.

Zwar konnte für jede Lösung nachgewiesen werden, dass β -Cinnamomin das fluoreszente Sterol besser band als die Negativkontrolle, allerdings konnte aufgrund der starken Schwankungen zwischen den einzelnen Messungen kein Vergleich zwischen einzelnen Expressionen gezogen werden. Ein weiteres Problem bei der Durchführung des DHE-Assays war auch der Zeitraum bis zum Start der Fluoreszenzmessung. Der interessanteste Teil des Assays, die Fluoreszenzzunahme direkt nach Zugabe des Elicitins zum DHE, läuft bereits in den ersten 20 bis 30 s ab [75,76,113]. Bei dem in dieser Arbeit zur Messung in Mikrotiterplatten eingesetzten Fluoreszenzspektrometer (Infinite® M-1000, Tecan) beginnt die eigentliche Messung der Fluoreszenz jedoch erst ca. 20 s nach dem Start des Programmes. Zwar konnten mittels Mikrotiterplatten mehrere Reaktionen gleichzeitig gemessen werden,

jedoch machten die geringen Volumina der Stammlösungen ein Pipettieren mit Multikanalpipetten unmöglich. Dies führte zu weiteren Verzögerungen, wenn mehr als ein Reaktionsansatz gemessen werden sollte. Die Beschaffenheit der DHE-Stammlösung war ein weiteres Problem. Da sie in Ethanol hergestellt werden musste und nur recht kleine Volumina zu pipettieren waren, kann nicht sichergestellt werden, dass immer exakt die gleiche Menge DHE zu jedem Ansatz gegeben wurde. Das größte Problem war jedoch, dass keine Positivkontrolle zur Verfügung stand, und die Sterolbindefähigkeit der getesteten Chargen daher nicht einmal grob abgeschätzt werden konnte. Durch die stark schwankenden Werte auch innerhalb einzelner Messreihen wurde der Vergleich der unterschiedlichen Lösungen somit unmöglich. Auch die Literatur bietet keine Möglichkeit zum Vergleich. Zum einen schwanken auch in den Publikationen die Verhältnisse der Fluoreszenzen der einzelnen gemessenen Komponenten von Publikation zu Publikation zueinander (z.B. das Verhältnis der Fluoreszenz von β -Cryptogein zu der Fluoreszenz von BSA) [75,76,113]. Zum anderen wurde der Assay bislang für β -Cinnamomin noch nicht durchgeführt, weshalb auch keine Werte zum Vergleich bereit standen.

Erst durch den Test der Bindekapazität des Elicitins für Progesteron konnte die Funktionalität des in *E. coli* exprimierten β -Cinnamomins quantifizierbar nachgewiesen werden. Weil der ermittelte Bindungskoeffizient von 0,95 ziemlich genau mit der in der Literatur angegebenen Anzahl an Bindungsstellen der Elicitine für Sterole (eine Bindestelle für ein Sterolmolekül pro Molekül Elicitin) übereinstimmt [75,76], kann von einer fast 100 %-igen Funktionalität des Proteins ausgegangen werden. Durch den erfolgreichen Nachweis kann somit sehr wahrscheinlich auch auf die korrekte Faltung des Proteins geschlossen werden, da sonst ein niedrigerer Koeffizient zu erwarten gewesen wäre.

3.2 Rationales Proteindesign und Expression der Doppelmutanten

Wie bereits mehrfach angesprochen, enthält β -Cinnamomin ebenso wie alle anderen Elicitine drei konservierte Disulfidbrücken (siehe Abbildung 53). Da die Expression heterologer Proteine mit mehreren Disulfidbrücken in *E. coli* deutlich erschwert ist, wurde daher versucht, die Expression von β -Cinnamomin durch Verringerung der Anzahl der vorhandenen Disulfidbrücken zu verbessern. Mit Hilfe des Plug-ins FoldX der Software YASARA wurden zunächst die $\Delta\Delta G$ -Werte für alle möglichen Aminosäureaustausche berechnet, um die zwei Cysteine jeweils einer der drei Disulfidbrücken zu ersetzen. Als Ergebnis wurden die vier energetisch sinnvollsten und somit theoretisch stabilsten Doppelmutanten (C3M/C71S, C3M/C71N, C27M/C56A und C51M/C95L) ausgewählt und durch ortsspezifische Mutagenese generiert.

Obwohl die ersten drei Doppelmutanten in *inclusion bodies* exprimiert werden konnten, wurden nur für eine einzige (C3M/C71N) geringe Mengen an löslichem Protein erhalten. Das Gesamtexpressionsniveau der drei Mutanten lag jedoch auch in *inclusion bodies* deutlich unter dem des Wildtyps. Die vierte Doppelmutante (C51M/C95L) ließ sich dagegen fast gar nicht, auch nicht in *inclusion bodies*,

exprimieren. Somit konnte für keine der vier Doppelmutanten eine Verbesserung der Expression nachgewiesen werden. Daraus muss geschlossen werden, dass die drei Disulfidverbindungen scheinbar essentiell für die korrekte Faltung des Elicitins sind. Die drei Disulfidbrücken in β -Cinnamomin verbinden und fixieren den N-Terminus mit dem β -Faltblatt, α -Helix 2 mit α -Helix 4 und α -Helix 3 mit α -Helix 6. So stabilisieren sie die einzigartige Tertiärstruktur der Elicitine. Die Eliminierung bereits einer der drei Disulfidbrücken, ohne für einen ausreichend stabilisierenden Ersatz zu sorgen, führte daher zur falschen Faltung des Proteins. Insbesondere für die Eliminierung der dritten Disulfidbrücke (C51/C95) konnten durch FoldX nur verhältnismäßig hohe $\Delta\Delta G$ -Werte, gleichzusetzen mit einer geringen Stabilität, berechnet werden. Deshalb ist es auch nicht überraschend, dass für die Doppelmutante C51M/C95L nahezu keinerlei Expression nachgewiesen werden konnte. Durch die Eliminierung der dritten Disulfidbrücke waren die α -Helices 3 und 6 nicht mehr stabil miteinander verbunden, so dass sich der C-Terminus frei bewegen konnte.

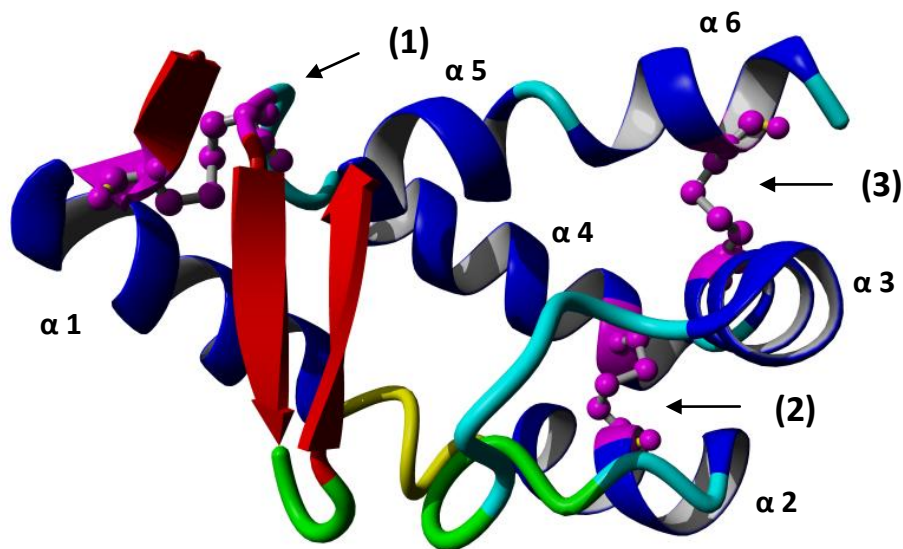


Abbildung 53. Disulfidbrücken in β -Cinnamomin (PDB: 2aib). Die Disulfidbrücken sind in „ball & stick“-Darstellung in magenta und durch Bezifferung (1, 2, 3) gekennzeichnet. Dargestellt ist β -Cinnamomin mit den drei Disulfidbrücken Cys3-Cys71 (1), Cys27-Cys56 (2) und Cys51-Cys95 (3). $\alpha 1 - \alpha 6$: α -Helices 1 - 6.

Die kaum vorhandene lösliche Expression, aber auch die deutlich reduzierte Expression in unlöslicher Form, weisen auf proteolytischen Verdau der gebildeten Proteine durch *E. coli* Proteasen hin. Im Fall von Faltungsproblemen aggregieren Proteine normalerweise und werden in *inclusion bodies* eingelagert [9]. Somit hätten theoretisch mehr *inclusion bodies* auf den SDS-Gelen zu sehen sein müssen. Stattdessen wurde aber wesentlich weniger unlösliches β -Cinnamomin nachgewiesen als beim Wildtyp. Sehr wahrscheinlich wurde daher ein Teil des unvollständig und falsch gefalteten Proteins wieder abgebaut, bevor es in Form von *inclusion bodies* aggregieren konnte. Das Hauptproblem bei der Berechnung der Doppelmutanten lag vermutlich an dem verwendeten Programm selbst, weil FoldX

das Proteinrückgrat als statisch betrachtet und die Moleküldynamik somit vollständig außer Acht lässt. Stattdessen wurden die Cysteine in dem durchgeführten Versuch durch FoldX lediglich durch die Aminosäuren ausgetauscht, die in ihrer eigenen unmittelbaren Umgebung am energetisch sinnvollsten waren. Wäre die Moleküldynamik in die Berechnungen mit einbezogen worden, wäre vermutlich sofort aufgefallen, dass das Protein durch die berechneten Aminosäureaustausche seine korrekte Struktur verliert. Derartige Berechnungen unter Berücksichtigung der Moleküldynamik sind jedoch deutlich aufwendiger, vor allem im Hinblick auf die benötigte Rechenleistung. Bei einem erneuten Versuch, eine der Disulfidbrücken zu eliminieren, wäre zum Beispiel der Austausch gegen eine Salzbrücke denkbar, um so den Verlust der kovalenten Bindung zumindest etwas zu kompensieren und ein gewisses Maß an Stabilität zurückzugewinnen.

3.3 Biokatalyse

3.3.1 Ganzzellbiokatalyse mit Zusatz von β -Cinnamomin

Das Hauptziel dieser Arbeit war der Nachweis der Verbesserung der Umsätze hydrophober Substrate in Ganzzellbiokatalysen durch den Einsatz von Elicitinen. Dies sollte anhand des Beispiels der Hydroxylierung von sechs Steroids substraten (Pregnenolon, Testosteron, Progesteron, Dehydroepiandrosteron, Androstendion und Nandrolon) in Ganzzellbiokatalysen mit *E. coli*-Zellen gezeigt werden, die die P450 Monooxygenase CYP154C5 und die Elektronentransferkomponenten Pdx und PdR coexprimieren. Durch den Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen an β -Cinnamomin konnte gezeigt werden, dass durch Elicitinzugabe signifikant höhere Umsätze erzielt werden können als in den Kontrollen. Somit scheint das Elicitin die Aufnahme der Steroide in die *E. coli* Zellen zu verbessern. In Vorversuchen mit Pregnenolon und Testosteron wurden dabei zunächst die Prozessparameter und die Durchführung der Ganzzellbiokatalysen optimiert. Mit der optimierten Versuchsführung konnte anschließend für die vier Steroide Pregnenolon, Testosteron, Progesteron und Dehydroepiandrosteron reproduzierbar eine deutliche Verbesserung des Substratumsatzes nachgewiesen werden. In Abbildung 54 ist das Verhältnis der Umsätze mit β -Cinnamomin im Vergleich zu den Umsätzen der Kontrollen ohne Elicitin aufgetragen. Für die beiden anderen Substrate, Androstendion und Nandrolon, konnte dagegen keine Verbesserung des Substratumsatzes durch Zusatz von β -Cinnamomin nachgewiesen werden.

Im Diagramm in Abbildung 54 ist das Verhältnis der erzielten Umsätze in Reaktionen von Pregnenolon, Testosteron, Progesteron und Dehydroepiandrosteron zu den erhaltenen Umsätzen der Kontrollreaktionen aufgetragen. Deutlich ist zu erkennen, dass für die Reaktionen von Testosteron und Dehydroepiandrosteron mit Zusatz von 200 μ M β -Cinnamomin eine geringere Verbesserung des Umsatzes pro eingesetzter Menge Elicitin im Vergleich zu den Ganzzellbiokatalysen mit Zusatz von 100 μ M Elicitin zu erkennen war. Für Pregnenolon wurde der Substratumsatz unabhängig vom Gesamtumsatz

trotz unterschiedlicher Elicitinkonzentrationen sogar nur gleich gut verbessert. Ausschließlich für Progesteron war die relative Umsatzerhöhung durch doppelt so viel Elicitin auch tatsächlich ca. doppelt so hoch. Weil der Substratumsatz der meisten Substrate durch den Einsatz der doppelt so hohen Elicitinkonzentration kaum weiter verbessert wurde, als durch 100 μM β -Cinnamomin, wäre es möglich gewesen, dass der Substratumsatz nicht mehr durch die Substrataufnahme in die Zelle, sondern durch die Limitierung des Transports innerhalb der Zelle oder durch die CYP154C5-Konzentration limitiert wurde. Wenn durch einen bestehenden Engpass im intrazellulären Substrattransport nur eine gewisse Menge Substrat in einem gewissen Zeitraum transportiert werden konnte, hätte ein noch schnellerer Transport in die Zelle nur wenig zu einem verbesserten Umsatz beigetragen. Ebenso wenig hätte eine noch schneller stattfindende Substrataufnahme zu einer besseren Ausbeute geführt, wenn die Kapazität der P450 Monooxygenase erschöpft gewesen wäre. Wäre die Substratlimitierung aufgrund der Zellwand daher bereits durch 100 μM β -Cinnamomin auf ein Minimum reduziert worden, wäre auch dann nicht wesentlich mehr Substrat umgesetzt worden, wenn mehr Elicitin außerhalb der Zellen eingesetzt worden wäre.

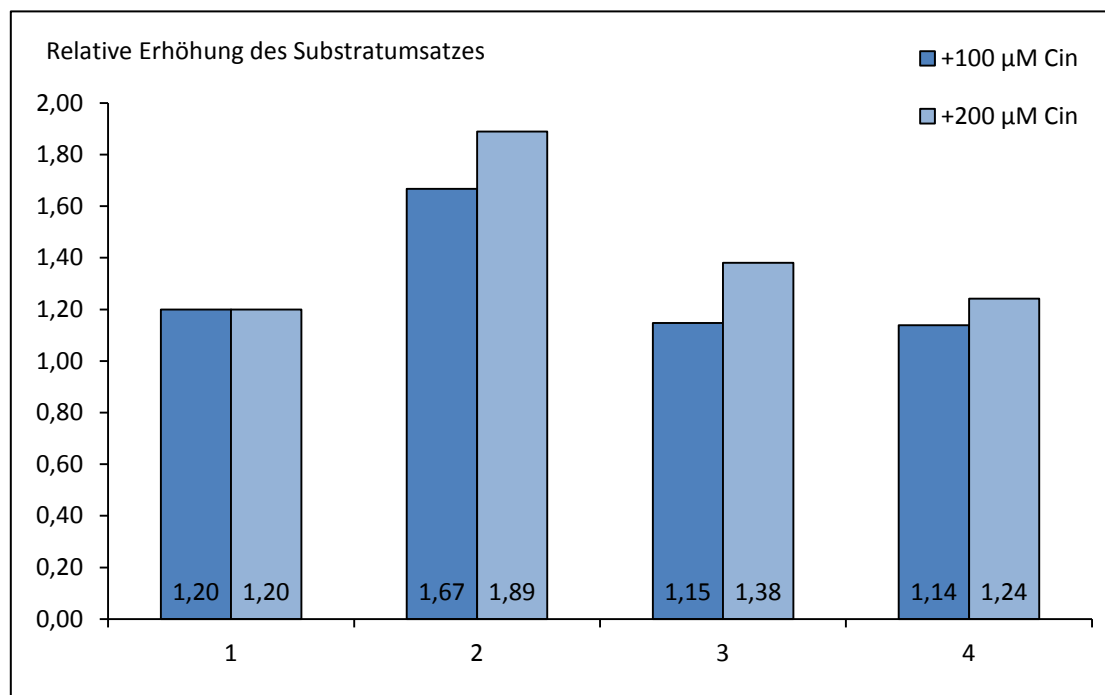


Abbildung 54. Relative Erhöhung des Substratumsatzes durch Zusatz von β -Cinnamomin in Ganzzellbiokatalysen von Pregnenolon (1), Testosteron (2), Progesteron (3) und Dehydroepiandrosteron (4) mit ruhenden Zellen von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB. +100 μM Cin: Reaktionen mit Zusatz von 100 μM β -Cinnamomin. +200 μM Cin: Reaktionen mit Zusatz von 200 μM β -Cinnamomin.

Das Ergebnis des ersten Versuchs mit Zusatz von 100 μM β -Cinnamomin lässt somit den Schluss zu, dass einerseits eine Substratlimitierung vorhanden ist und dass sie andererseits durch den Zusatz von β -Cinnamomin reduziert werden kann. Der zweite Versuch mit 200 μM β -Cinnamomin lässt sogar die Vermutung zu, dass die Substratlimitierung aufgrund der LPS-Schicht, abhängig vom Substrat, viel-

leicht sogar auf ein Minimum beschränkt werden konnte, so dass nur noch eine Substratlimitierung durch den intrazellulären Substrattransport oder die Konzentration der CYP154C5 eine Rolle gespielt haben könnten. Um diese Ergebnisse genauer zu untersuchen, müssten weitere Versuche mit höherer β -Cinnamominkonzentration und unterschiedlichen CYP154C5-Konzentrationen durchgeführt werden. Weshalb der Umsatz von Androstendion und Nandrolon durch Zugabe von β -Cinnamomin nicht verbessert werden konnte, ist aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit mit den anderen vier Steroiden nicht ohne Weiteres zu erklären. Möglicherweise werden beide Substrate wesentlich schlechter durch β -Cinnamomin gebunden, weshalb weniger Substrat in die Zellen transportiert wurde.

Der exakte Einfluss des Elicitins auf die Aufnahme der einzelnen Substrate lässt sich mit Hilfe der ermittelten Umsätze jedoch nicht abschätzen und vergleichen, da nicht nur die Verringerung der Substratlimitierung durch β -Cinnamomin eine Rolle spielt. Jedes der Substrate wird bereits von sich aus unterschiedlich gut von den *E. coli*-Zellen aufgenommen und wird auch unterschiedlich gut bzw. schnell durch die P450 Monooxygenase umgesetzt. Eine Möglichkeit, die Spezifität β -Cinnamomins gegenüber den verschiedenen Substraten zu bestimmen, wäre, den Test der Sterolbindekazapazität für alle sechs Substrate durchzuführen. Dazu müssten jedoch zunächst die Menge des eingesetzten Substrats im Verhältnis zu der Menge des Elicitins und die Inkubationszeit vor der Entfernung des überschüssigen Steroids optimiert werden. Sonst könnte es passieren, dass auch bei einer unspezifischen und damit langsameren Bindung eines Substrats jedem Elicitinmolekül ausreichend Zeit bleibt ein Substratmolekül zu binden. Die geeignetere Methode wäre die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC), eine quantitative biophysikalische Methode, mit deren Hilfe die Bindungsaffinität K_D , die Bindungsenthalpie ΔH und die Bindungsstöchiometrie n der beteiligten Teilchen einer untersuchten Interaktion bestimmt werden können [55]. Aber auch durch diese beiden Methoden könnte nur die Affinität von β -Cinnamomin zur Bindung der einzelnen Steroide, aber nicht zum Transport in *E. coli* bestimmt werden.

Neben dem Vergleich der Ganzzellbiokatalysen mit und ohne Zugabe von Cinnamomin, wobei die Steroide jeweils als Stammlösung in Methanol zugesetzt wurden, wurden weitere Reaktionen ohne Elicitinzugabe, jedoch mit Steroid gelöst in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin durchgeführt. In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass Cyclodextrine einen positiven Effekt auf die Substrataufnahme in Ganzzellbiokatalysen mit hydrophoben Substraten ausüben können [43]. Aus diesem Grund bestand auch in unserem Fall die Möglichkeit, dass Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, welches standardmäßig zum Lösen von Steroiden in wässrigen Medien eingesetzt wird, bereits die Aufnahme der Steroide in die *E. coli* Zellen verbessern könnte. Allerdings wurden in diesen Reaktionen nur vergleichbare Umsätze wie in den Reaktionen ohne Elicitin, mit Substrat gelöst in Methanol, er-

halten. Das Cyclodextrin verbesserte die Substrataufnahme der Steroide in den Ganzzellbiokatalysen somit nicht.

Abgesehen von der Verbesserung des Substratumsatzes durch β -Cinnamomin fiel ein Rückgang des Gesamtumsatzes aller sechs Substrate im Verlauf der Versuche auf. Dieser war aber weniger auf das Elicitin als vielmehr auf die sinkende Aktivität des Ganzzellbiokatalysators zurückzuführen. Um alle Versuche mit denselben *E. coli* Zellen durchführen zu können, wurden diese über den gesamten Versuchszeitraum bei -20 °C gelagert. Dadurch wurde möglicherweise die Aktivität der P450 Monooxygenase bzw. der Redoxpartner Pdx und PdR mit der Zeit beeinträchtigt. Zwar präzipitierte auch ein kleiner Teil des β -Cinnamomins während der Lagerung bei 4 °C, jedoch gingen die Umsätze der Ganzzellbiokatalysen ohne Elicitin während der Versuche im selben Maße zurück. Auch die Substratstammlösungen in Methanol wurden über einen längeren Zeitraum gelagert, jedoch konnte durch die parallel zu jedem Versuch angesetzten, extrahierten und gemessenen Substratstandards die Qualität der Stammlösungen gewährleistet werden. Daher war das Problem am wahrscheinlichsten auf die sinkende Aktivität der *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB-Zellen zurückzuführen. Um dieses Problem zu umgehen, dürfte nicht die gleiche Charge an Zellen über einen längeren Zeitraum verwendet werden. Stattdessen müssten regelmäßig frische Zellen für die Ganzzellbiokatalyse exprimiert werden. Allerdings ergibt sich hier das Problem, dass eine gleich hohe Ausbeute und damit Aktivität der P450 sowie der Redoxpartner von Expression zu Expression nicht gewährleistet werden kann. Damit würden sich automatisch ebenfalls Schwankungen in den erzielten Werten verschiedener Versuche ergeben.

3.3.2 Ganzzellbiokatalyse mit Coexpression von β -Cinnamomin

Da der positive Einfluss des β -Cinnamomins auf die Ganzzellbiokatalyse mit ruhenden Zellen erfolgreich gezeigt werden konnte, wurde als nächstes die Coexpression des Elicitins mit CYP154C5, Pdx und PdR im Ganzzellbiokatalysator getestet. Dafür wurden *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)MalEssCinHis-Zellen hergestellt und in Ganzzellbiokatalysen der sechs Steroide eingesetzt. Durch Vergleichsreaktionen mit *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB ohne coexprimiertes β -Cinnamomin konnte dabei erfolgreich gezeigt werden, dass der Substratumsatz durch β -Cinnamomincoexpression noch stärker verbessert werden konnte, als durch bloßen Zusatz des aufgereinigten Proteins.

Alle vier Proteine konnten erfolgreich in *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)MalEssCinHis exprimiert werden, allerdings war das Expressionslevel jedes einzelnen Proteins geringer als in *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB. Zu erklären war die schwächere Expression von CYP154C5, Pdx und PdR durch die Coexpression des vierten heterologen Proteins, β -Cinnamomin. Weil insgesamt mehr Proteine exprimiert wurden, konnte durch die zusätzliche Belas-

tung der Zellmaschinerie von jedem einzelnen nur weniger exprimiert werden als zuvor. Daher besaßen die Zellen mit coexprimiertem β -Cinnamomin niedrige Werte von 4 μg CYP154C5 pro mg Totalprotein und 0,3 U/mg spezifischer Aktivität der Elektronentransferkomponenten (ETK), während die Kontrolle eine Ausbeute von 29 μg CYP154C5 pro mg Totalprotein und eine spezifische Aktivität der ETK von 1,4 U/mg aufwies. Auch das schwächere Wachstum der Zellen mit coexprimierten β -Cinnamomin kann auf die Coexpression des Elicitins zurückgeführt werden. Die Ausbeute an Elicitin in den Coexpressionen wurde durch Western Bot analysiert. Die Bande des β -Cinnamomins auf dem Western-Blot war zwar ziemlich dick, was auf eine sehr gute Expression schließen lässt, um aber eine genaue Ausbeute zu erhalten, müsste das Elicitin in einem weiteren Versuch durch immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie aufgereinigt werden.

Anschließend wurden Reaktionen mit den hergestellten Ganzellbiokatalysatorzellen mit coexprimiertem β -Cinnamomin mit Kontrollen ohne Elicitin mit einer gleichen CYP154C5-Konzentration (0,5 μM) verglichen. Zwar konnte für alle eingesetzten Substrate (Pregnenolon, Testosteron, Progesteron und Dehydroepiandrosteron) eine sogar noch deutlichere Steigerung des Umsatzes nachgewiesen werden, als in den Versuchen mit zugesetztem aufgereinigtem β -Cinnamomin, allerdings musste berücksichtigt werden, dass die Reaktionen mit coexprimiertem Elicitin und ihre Kontrollen ohne Elicitin nicht ohne Weiteres miteinander verglichen werden konnten. Da sich das Expressionsniveau von P450, Pdx und PdR unter Coexpression von β -Cinnamomin von dem ohne Elicitincoexpression deutlich unterschied, musste in den Reaktionen mit β -Cinnamomin deutlich mehr Zellmaterial eingesetzt werden, um die gleiche Konzentrationen an CYP154C5 zu erhalten. Da so einerseits zwar dieselbe Menge P450, andererseits jedoch deutlich mehr Zellmaterial in den Reaktionen mit Elicitin eingesetzt wurde, war die Konzentration der P450 Monooxygenase pro *E. coli*-Zelle daher in den Reaktionen mit Elicitin niedriger, als in den Kontrollen ohne Elicitin. Aus diesem Grund könnte sich wiederum die Substratlimitierung weniger stark auf die Effizienz der Biokatalyse ausgewirkt haben, als in den Kontrollreaktionen, da in den Reaktionen mit coexprimiertem Elicitin bei gleicher P450-Konzentration mehr Zelloberfläche für die Aufnahme der Steroide zur Verfügung stand. Da in den Reaktionen außerdem nur die P450-Konzentration oder die ETK-Aktivität fixiert werden konnte, war zudem die Aktivität der ETK in den Reaktionsansätzen mit coexprimiertem β -Cinnamomin höher (1,8 U/mL), als in den Kontrollen (1,1 U/mL). Beide Punkte verbessern zusätzlich den Substratumsatz durch den Ganzellbiokatalysator mit coexprimiertem β -Cinnamomin, weshalb der höhere Substratumsatz nicht allein auf das coexprimierte Elicitin zurückgeführt werden darf.

Ein weiterer Punkt, der durch eine unterschiedliche Zelldichte beeinflusst wird, sich jedoch negativ auf dem Umsatz der Reaktionen mit coexprimiertem Elicitin ausgewirkt haben könnte, ist der Sauerstoffeintrag. Da es sich bei der Hydroxylierung der Steroide durch CYP154C5 um eine sauerstoffabhängige Reaktion handelt, ist dieser ein weiterer wichtiger Faktor, der beim Vergleich der Ergebnisse

bedacht werden muss. Baldwin und Woodley zeigten beispielsweise die Abhängigkeit des Umsatzes von Ketonen vom Sauerstoffeintrag in Korrelation mit der Zelldichte in Ganzzellbiokatalysen mit Baeyer-Villiger Monooxygenasen [7]. Bis zu einer Konzentration von 2 g Zelltrockenmasse pro Liter stieg die Reaktionsgeschwindigkeit linear mit steigender Zelldichte an, ab Zelltrockenmassen von über 2 g pro Liter sank die Aktivität jedoch stetig mit wachsender Zelldichte [7]. Aus diesem Grund könnte sich die Zelldichte der Ganzzellbiokatalysen mit coexprimiertem β -Cinnamomin, im Vergleich zu den Kontrollen, negativ auf die Reaktionsgeschwindigkeit ausgewirkt haben, wenn der Sauerstoffeintrag schlechter, als in den Reaktionen ohne Elicitin gewesen wäre.

Um den positiven Einfluss von coexprimiertem β -Cinnamomin auf die Ganzzellbiokatalyse daher zweifelsfrei nachweisen zu können, wurde ein weiterer Versuch mit allen sechs Steroids substraten durchgeführt, in dem Reaktionen mit coexprimiertem β -Cinnamomin mit zwei unterschiedlichen Kontrollen verglichen wurden. Einerseits wurden die Reaktionen mit Elicitin mit einer Kontrolle verglichen, die dieselbe Zelldichte besaß, andererseits mit einer Kontrolle, die eine ähnliche CYP154C5-Konzentration besaß. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass diesmal die Kontrollen die bessere ETK-Aktivität im Vergleich zu den Reaktionen mit Elicitin aufwiesen. In Abbildung 55 sind die Verhältnisse der erzielten Umsätze in Reaktionen aller sechs Substrate mit Zellen unter Elicitincoexpression im Vergleich zu Kontrollreaktionen mit Zellen ohne β -Cinnamomin aufgetragen.

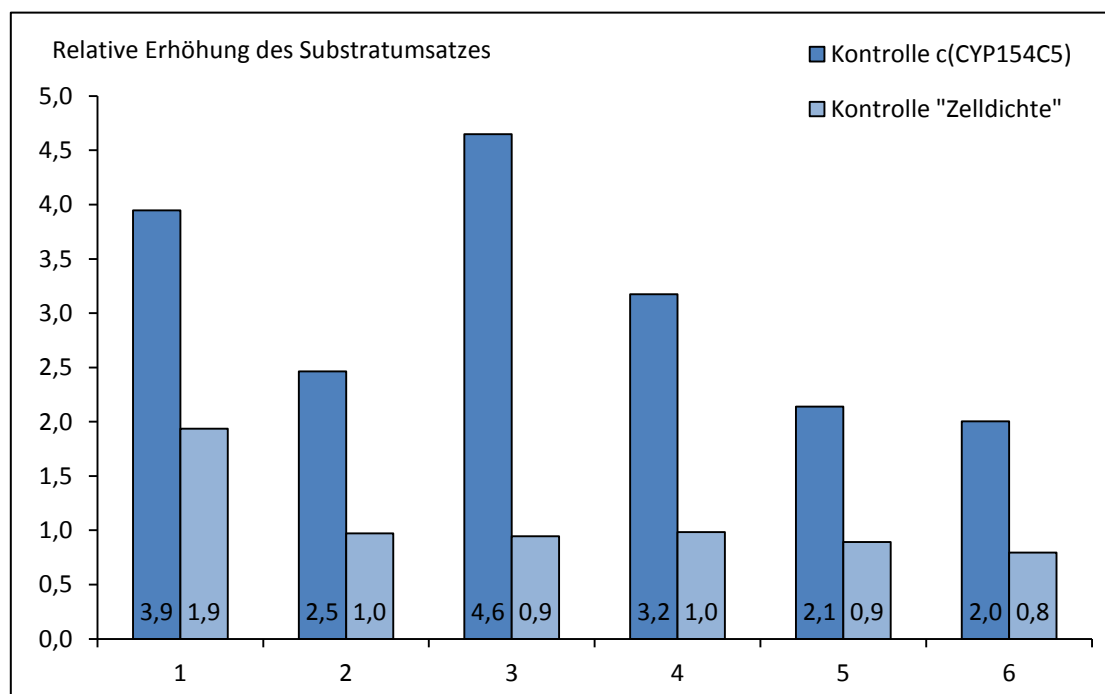


Abbildung 55. Relative Erhöhung des Substratumsatzes von Pregnenolon (1), Testosteron (2), Progesteron (3), Dehydroepiandrosteron (4), Androstendion (5) und Nandrolon (6) in Reaktionen mit ruhenden Zellen von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCinHis pIT2cyp154C5 pACYCcamAB durch Coexpression von β -Cinnamomin mit CYP154C5, Pdx und PdR im Vergleich zu Reaktionen ohne Elicitincoexpression. Kontrolle c(CYP154C5): Umsatzerhöhung bezogen auf Kontrollreaktionen mit gleicher CYP154C5-Konzentration (0,73 μ M). Kontrolle „Zelldichte“: Umsatzerhöhung bezogen auf Kontrollreaktionen mit gleicher Zelldichte an *E. coli*-Zellen ($OD_{600} = 40$).

Wie in dem Diagramm zu erkennen ist, konnte in dem Versuch mit coexprimiertem β -Cinnamomin, im Vergleich zu den Reaktionen ohne Elicitin mit gleicher P450 Monooxygenasenkonzentration, erneut eine höhere relative Umsatzerhöhung nachgewiesen werden, als in den Versuchen, in denen β -Cinnamomin extern zu den Reaktionsansätzen zugegeben wurde (siehe Abbildung 54 im voran gegangenen Abschnitt 3.3.1). So lagen die relativen Umsatzerhöhungen der Reaktionen mit coexprimiertem Elicitin (2,0 bis 4,6) für alle Substrate deutlich höher, als in den Versuchen mit dem extern hinzugefügten β -Cinnamomin (1,1 bis 1,9). Im Vergleich zu den Kontrollen mit gleicher Zelldichte konnte der Umsatz für alle Substrate, mit Ausnahme von Pregnenolon, durch Coexpression von β -Cinnamomin trotz einer mehr als doppelt so hohen CYP154C5-Konzentration und einer mehr als dreimal so hohen ETK-Aktivität der Kontrollen, auf ein ähnlich hohes Niveau verbessert werden. Für Pregnenolon konnte im Vergleich zur Kontrolle ohne Elicitin sogar hier eine Steigerung des Umsatzes nachgewiesen werden.

Auffällig ist, dass der Umsatz, im Vergleich zum Versuch mit dem hinzugefügten β -Cinnamomin, nicht nur insgesamt stärker verbessert wurde, sondern dass in diesem Experiment sogar der Umsatz von Androstendion und Nandrolon signifikant verbessert werden konnte. Allein durch den Zusatz des aufgereinigten Elicitins konnte für beide Steroide zuvor keine Verbesserung nachgewiesen werden. Dies ist insbesondere interessant, wenn man bedenkt, dass in dem Versuch mit dem zugesetzten Elicitin eine sechs- bis siebenmal höhere P450-Konzentration pro *E. coli*-Zelle eingesetzt worden war und der Einfluss des Elicitins im Coexpressionsversuchs, daher aufgrund der geringeren Substratlimitierung, somit eigentlich sogar hätte kleiner werden müssen. Da die Umsätze aller sechs Substrate durch die Coexpression β -Cinnamomins aber noch stärker verbessert werden konnten, ist die Verbesserung des Umsatzes vermutlich nicht nur durch eine Verbesserung der Substrataufnahme zu erklären.

Eine mögliche Erklärung könnte ein zusätzlich schneller stattfindender Transport der Substrate innerhalb der Zelle von der äußeren zur inneren Membran liefern. Weil β -Cinnamomin im Periplasma exprimiert wurde und nicht nur, wie in dem Versuch zuvor, außerhalb der Zelle vorlag, könnten die β -Cinnamominmoleküle auch innerhalb der Zellen für einen schnelleren Transport der Steroide gesorgt haben. Damit die Substrataufnahme durch die LPS-Schicht, wie auch zuvor, verbessert werden hätte können, müsste β -Cinnamomin zudem aus den Zellen heraus gelangt sein. Zum einen wurden die Ganzzellbiokatalysezellen jedoch eingefroren und aufgetaut, weshalb sie zum Teil permeabilisiert worden sein könnten, zum anderen wurde bereits zuvor gezeigt, dass kleine ins Periplasma sekretierte Proteine regelmäßig zum Teil in den Kulturüberstand gelangen können [26,92]. Der stark verbesserte Substratumsatz könnte somit möglicherweise auf eine Kombination aus einer verbesserten Substrataufnahme durch die Zellwand und einem schnelleren Transport innerhalb der Zellen durch β -Cinnamomin zurückgeführt werden.

Zweifelsfrei konnte jedoch nachgewiesen werden, dass der Umsatz der sechs getesteten Steroide in den Ganzzellbiokatalysen mit *E. coli* durch die Coexpression von β -Cinnamomin mit der P450 Monoxygenase und den ETK signifikant verbessert werden konnte. Da grundsätzlich auch alle anderen gramnegativen Mikroorganismen Probleme mit der Substrataufnahme aufweisen, nicht nur *E. coli* [25], wäre es daher unter Umständen denkbar, dass β -Cinnamomin auch genutzt werden könnte, um den Substratumsatz von Ganzzellbiokatalysen mit anderen gramnegativen Mikroorganismen zu verbessern. So werden außer *E. coli* eine Reihe weiterer gramnegativer Bakterien industriell zur Ganzzellbiokatalyse eingesetzt, wie zum Beispiel einige *Pseudomonas sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Erwinia sp.*, *Klebsiella sp.* oder einige *Sphingomonas*-Arten [52]. Auch die Verbesserung des Umsatzes von anderen Substraten als Steroiden könnte getestet werden. Osman *et al.* zeigten, dass Elicitine zum Beispiel nicht nur Steroide, sondern auch Fettsäuren binden können, wenn auch mit einer geringeren Affinität [85]. Das Ergebnis zeigt, dass somit nicht nur der Substratumsatz von Steroiden, sondern vielleicht auch von Fettsäuren verbessert werden könnte.

Zusammengefasst konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Verringerung der Substratlimitierung durch Coexpression eines Transporterproteins in den Ganzzellbiokatalysatorzellen eine sehr effektive Methode zur Verbesserung des Substratumsatzes in der Ganzzellbiokatalyse darstellt. Bestätigt wird dies auch durch die kürzlich publizierten Ergebnisse von Jelsing *et al.*, die durch Coexpression des Proteins AlkL aus *Pseudomonas putida* in Ganzzellbiokatalysen mit *E. coli*-Zellen die Oxygenierung von Dodecansäuremethylestern sogar um einen Faktor von 28 verbessern konnten [57].

3.3.3 Ganzzellbiokatalyse mit Zusatz von β -Cryptogein

Weil der Umsatz der Steroide durch β -Cinnamomin so deutlich verbessert werden konnte, wurde als nächstes der Einfluss eines weiteren Elicitins auf die Ganzzellbiokatalyse durch CYP154C5 untersucht. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob es sich bei der Verbesserung der Umsätze der Ganzzellbiokatalyse speziell um eine Fähigkeit β -Cinnamomins handelt oder ob auch andere Elicitine dazu in der Lage sind. Hierfür wurde der Umsatz von Pregnenolon, Testosteron, Progesteron und Dehydroepiandrosteron mit Zusatz von 100 μ M aufgereinigtem β -Cryptogein getestet und mit Kontrollen ohne Elicitinzusatz verglichen.

Der Umsatz der Steroidsubstrate konnte jedoch mit Hilfe des β -Cryptogeins nicht verbessert werden. Dies bestätigt die bereits zuvor in der Bachelorarbeit von Louisa Engel erhaltenen Ergebnisse zu Ganzzellbiokatalysen mit *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB unter Zugabe von β -Cryptogein [38]. Das Ergebnis ist insofern überraschend, da in der Literatur mehrfach gezeigt wurde, dass β -Cryptogein ein guter Steroltransporter ist [75,76,113]. In unserem Fall scheint der Umsatz der Steroide mit β -Cryptogein im Vergleich zu den Kontrollen ohne Elicitine eher etwas schlechter auszufallen. Aufgrund der versuchsbedingten Schwankungen ist dies jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die

Versuchsdurchführung zurückzuführen. Für Pregnenolon konnte zwar ein um 3,1 % höherer Umsatz gemessen werden, allerdings liegt dies noch im Bereich der Standardabweichung der Kontrolle (2,9 %). Um zu verstehen, warum der Steroidumsatz mit β -Cinnamomin, aber nicht mit β -Cryptogein verbessert werden kann, müssen beide Proteine genauer miteinander verglichen werden. Beide Elicitine besitzen eine sehr hohe Proteinsequenzidentität von 88 % und unterscheiden sich in nur 12 ihrer insgesamt 98 Aminosäuren. Die Sequenzunterschiede, die Polarität und die Hydrophobizität der Aminosäuren an den betreffenden Positionen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Bei Vergleich der unterschiedlichen Aminosäurereste fällt jedoch auf, dass sie sich kaum in Hydrophobizität und Polarität unterscheiden. Daher kann hier auf den ersten Blick keine eindeutige Erklärung für die Unterschiede in der Steroidtransportfähigkeit in der Ganzzellbiokatalyse gefunden werden.

Tabelle 4. Unterschiede in den Aminosäuresequenzen von β -Cinnamomin und β -Cryptogein inklusive der Polarität und Hydrophobizität (K_{ow}) der betreffenden Aminosäuren

Pos.	β -Cin	Polarität	K_{ow}	β -Cry	Polarität	K_{ow}
21	Glu	polar, geladen	-3.5	Asp	polar, geladen	-3.5
22	Ser	polar	-0.8	Ala	unpolar	+1,8
25	Ser	polar	-0.8	Asn	polar	-3.5
29	Lys	polar, geladen	-3.9	Thr	polar	-0,7
39	Thr	polar	-0,7	Lys	polar, geladen	-3.9
44	Asn	polar	-3.5	Thr	polar	-0,7
65	Ala	unpolar	+1,8	Thr	polar	-0,7
70	Asp	polar, geladen	-3.5	Asn	polar	-3.5
83	Asp	polar, geladen	-3.5	Asn	polar	-3.5
86	Thr	polar	-0,7	Ser	polar	-0.8
93	Ser	polar	-0.8	Asn	polar	-3.5
96	Ala	unpolar	+1,8	Ser	polar	-0.8

Ein Grund für das schlechtere Ergebnis von β -Cryptogein könnte eine unterschiedliche Affinität der beiden Elicitine für die Steroide sein. Da jedoch keine der zwölf unterschiedlichen Aminosäuren Bestandteil der hydrophoben Bindetasche im Inneren der Elicitine ist, kann dies relativ sicher ausgeschlossen werden. Die Bindetasche sowie das sie stabilisierende *beak-like motif* sind stark konserviert, mit Ausnahme der Position 39 im Ω -loop, an der β -Cryptogein ein Lysin, β -Cinnamomin aber, wie die meisten Elicitine, ein Threonin trägt [97]. Der hydrophobe Kern der Elicitine besteht hauptsächlich aus den drei Methioninen Met35, Met50 und Met59, der Disulfidbrücke Cys27-Cys56, den Ile60 und Ile63 Seitenketten und den aromatischen Ringen von Tyr87 und Phe91 [15]. Die zwölf unterschiedlichen Aminosäuren liegen stattdessen allesamt auf der Oberfläche des Proteins und stehen

daher nicht in direktem Kontakt zum Substrat (siehe Abbildung 56). Obwohl einige der unterschiedlichen Aminosäuren (Aminosäuren 22, 25, 39, 70 und 93) auch eine Rolle für die nekrotische Aktivität spielen [15,97], ist ein Zusammenhang mit der Steroidbinde- und Steroidtransporteraktivität eher unwahrscheinlich. Bereits zuvor wurde gezeigt, dass β -Cinnamomin und β -Cryptogein zwar signifikante Unterschiede beim Auslösen der frühen Abwehrmechanismen in Tabak zeigen [19], trotzdem aber sehr ähnliche Bindungseigenschaften für Sterole aufweisen [98]. Außerdem konnten Dokládal *et al.* keinen Zusammenhang zwischen der Höhe der Steroltransporteraktivität und der Ausbildung der frühen Abwehrreaktionen der Pflanze oder der Nekrose der Pflanzen erkennen [33]. Es ist somit sehr unwahrscheinlich, dass β -Cryptogein eine so viel schlechtere Steroidbindeaktivität β -Cryptogeins aufweist, dass es überhaupt keinen Effekt auf die Ganzzellbiokatalyse zeigt.

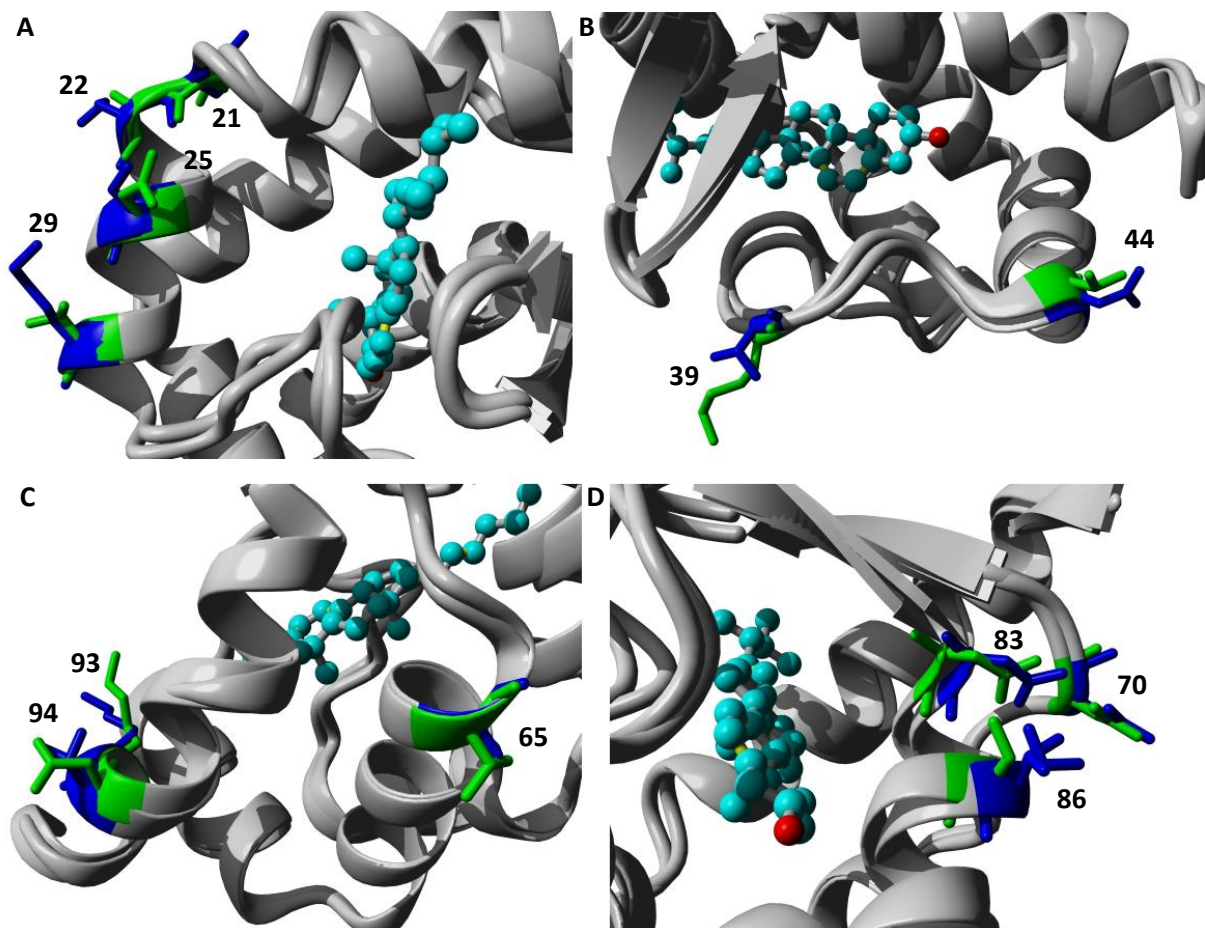


Abbildung 56. Position der 12 unterschiedlichen Aminosäuren in den Kristallstrukturen von β -Cinnamomin (2aib, grau-blau, mit gebundenem Ergosterol) und β -Cryptogein (1beo, grau-grün). A: Aminosäurepositionen 21, 22, 25 und 29. B: Aminosäurepositionen 39 und 44. C: Aminosäurepositionen 70, 83 und 86. D: Aminosäurepositionen 65, 93 und 94.

Ein möglicher Grund könnte dennoch die Aminosäure an Position 39 sein, an der β -Cryptogein im Gegensatz zu β -Cinnamomin eine geladene Aminosäure trägt. Ω -loop und *beak-like motif* sind beides Strukturen, die in der Literatur immer wieder mit der Funktion der Elicitine in Verbindung gebracht wurden [86,98]. So ist es laut Boissy *et al.* denkbar, dass das *beak-like motif* aufklappen und als eine

Art Deckel für die Bindetasche fungieren könnte [15]. Di Russo *et al.* wiederum zeigten, dass manche Proteine mit zwei stabilen Konformationen in Abhängigkeit vom pH-Wert zwischen diesen Konformationen wechseln können, wenn bestimmte ionisierbare Aminosäuren durch unterschiedliche pH-Werte protoniert bzw. deprotoniert werden [99]. Vielleicht wäre es daher denkbar, dass die Konformation mit geöffnetem Deckel bei dem gewählten pH-Wert von β -Cryptogein nicht so stabil war wie bei β -Cinnamomin, weil Lys39 die falsche Ladung besaß. Wäre der Deckel bei einem Teil der β -Cryptogeinmoleküle geschlossen gewesen, wären die Steroide daher insgesamt schlechter gebunden worden. Dies könnte durch eine Reihe Ganzzellbiokatalysen mit unterschiedlichen pH-Werten untersucht werden.

Eine weitere mögliche Erklärung könnte die unterschiedliche Ladungsverteilung auf der Oberfläche der beiden Proteine liefern. Diese ist in Abbildung 57 für die Kristallstrukturen von β -Cinnamomin und β -Cryptogein dargestellt.

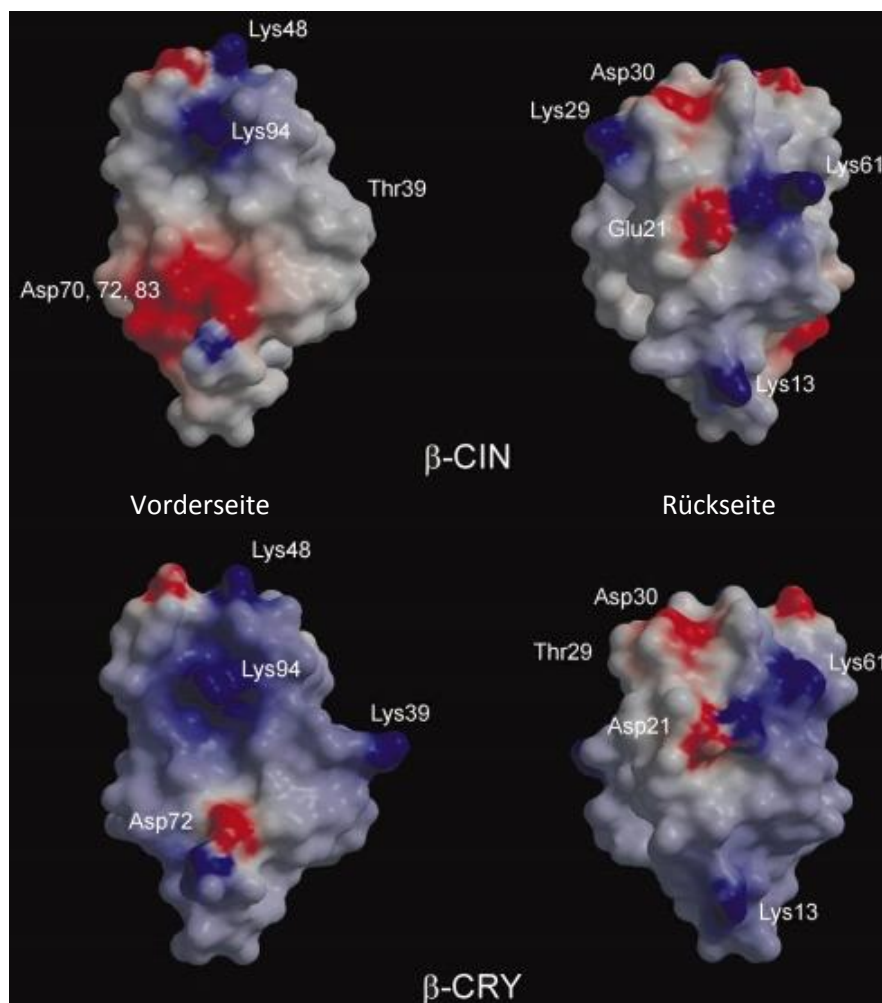


Abbildung 57. Elektrostatisches Potential der Oberflächen von β -Cinnamomin und β -Cryptogein. Negativ geladene Regionen sind in Rot, positiv geladene Regionen in Blau dargestellt. Die Abbildung wurde Rodrigues *et al.* [97] entnommen.

β -Cryptogein ist wesentlich positiver geladen, da es, durch die beiden zusätzlichen Asparaginsäurereste von β -Cinnamomin an Position 70 und 83, insgesamt zwei negative Ladungen auf der Oberfläche weniger besitzt (β -Cinnamomin: fünf positive Ladungen und fünf negative Ladungen, β -Cryptogein: fünf positive Ladungen und drei negative Ladungen). Dies könnte sich unter Umständen auf die Wechselwirkung von Elicitin und *E. coli* auswirken. So ist zum Beispiel die äußere Membran durch die LPS-Schicht zu einem großen Teil negativ geladen, weshalb die Geschwindigkeit der passiven Diffusion unter anderem durch elektrische Ladung und Polarität eines Moleküls beeinflusst wird. Je neutraler die Ladung eines Moleküls, desto besser kann es die Zellmembran durchdringen.

Die einfachste Erklärung dafür, dass der Substratumsatz der Steroide durch Zusatz von β -Cryptogein nicht verbessert werden konnte, wäre jedoch, dass es zwar in hohen Mengen löslich exprimiert wurde, aber trotzdem nicht korrekt gefaltet vorlag. Um dies genauer zu untersuchen, müsste die Steroidbindekapazität von β -Cryptogein mit verschiedenen Steroiden getestet werden.

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass der Umsatz von sechs Steroidsubstraten in Ganzzellbiokatalysen mit *Escherichia coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB durch den Einsatz des Elicitins β -Cinnamomin aus *Phytophthora cinnamomi* verbessert werden kann. Als Modellreaktion diente die Hydroxylierung der Steroide durch ruhende *E. coli* C43(DE3)-Zellen, welche die CYP154C5 aus *Nocardia farcinica* und die Elektronentransferkomponenten Putidaredoxin (Pdx) und Putidaredoxinreduktase (Pdr) aus *Pseudomonas putida* coexprimieren.

Dazu wurde im ersten Teil der Arbeit die rekombinante Expression von β -Cinnamomin in *E. coli* etabliert. Die zunächst getestete Expression im Cytoplasma scheiterte an den drei konservierten Disulfidbrücken. β -Cinnamomin aggregierte in Form von *inclusion bodies* und konnte nur mit geringer Ausbeute zurückgefaltet werden. Auch die getestete Expression des Elicitins in *Pichia pastoris* war nicht erfolgreich, da sie aufgrund des für *E. coli* angepassten Codongebrauchs des synthetischen β -Cinnamomins und der konstitutiven Expression des Elicitins fehlschlug. Die lösliche Expression von β -Cinnamomin konnte schließlich in *E. coli* durch die posttranslationale Sekretion des ungefalteten Proteins ins Periplasma erzielt werden. Zur Sekretion wurden drei Sekretionssignalsequenzen getestet und verglichen. Das beste Ergebnis wurde dabei mit der N-terminalen Sekretionssignalsequenz des Maltosebindoproteins E aus *E. coli* erzielt. Die erhaltenen Raum-Zeit-Ausbeuten für lösliches β -Cinnamomin lagen deutlich über den Ausbeuten für *P. cinnamomi* und erreichten fast die beste in *P. pastoris* erzielte Ausbeute von Rodrigues *et al.* [98]. Dieses Ergebnis bestätigt erneut, wie stark sich der gewählte Sekretionsweg und insbesondere auch die gewählte Sekretionssignalsequenz auf die Ausbeute auswirken können [47,78,106]. Um die Ausbeute weiter zu steigern, wurden vier Doppelmutanten erzeugt, in denen jeweils die Anzahl der Disulfidbrücken verringert wurde. Allerdings konnte keine der Mutanten in löslicher Form exprimiert werden, so dass geschlossen werden muss, dass alle drei Disulfidbrücken für die korrekte Faltung β -Cinnamomins essentiell sind.

Neben der Expression konnte auch die Aufreinigung des β -Cinnamomins über einen C-terminalen His-tag erfolgreich durchgeführt werden. Wurden zuvor in der Literatur immer mindestens zwei chromatographische Aufreinigungsschritte benötigt, konnte β -Cinnamomin nun mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie in einem einzigen chromatographischen Schritt in hoher Reinheit erhalten werden. Die native Faltung β -Cinnamomins konnte anschließend durch Nachweis der Funktionalität des exprimierten und aufgereinigten Proteins gezeigt werden. Mit Hilfe des Tests der Steroidbindekazapazität konnte für das Steroid Progesteron eine Bindestelle pro β -Cinnamominmolekül nachgewiesen werden und somit, dass das aufgereinigte β -Cinnamomin fast zu 100 % aktiv vorlag [75,76].

Im Anschluss wurde unter den gleichen Expressionsbedingungen ebenfalls die Expression des Elicitins β -Cryptogein aus *Phytophthora cryptogea* erfolgreich durchgeführt. Für dieses Elicitin konnte bezogen auf die Expression in *P. pastoris* eine 1,6 bis 4,9-fache Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute erreicht werden [82,98]. Durch weitere Optimierung der Expressionsbedingungen bzw. durch Hochzeldichtefermentation könnte die Ausbeute beider Elicitine, β -Cryptogein und β -Cinnamomin, noch weiter verbessert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde schließlich der umsatzsteigernde Einfluss des β -Cinnamomins auf die Ganzzellbiokatalyse der Steroids substrate, Pregnenolon (**1**), Testosteron (**2**), Progesteron (**3**), Dehydroepiandrosteron (**4**), Androstendione (**5**) und Nandrolon (**6**), durch CYP154C5 und die Elektronentransferkomponenten Pdx und PdR gezeigt. Durch Zusatz von aufgereinigtem β -Cinnamomin zu ganzen Zellen von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB konnte für vier der sechs getesteten Substrate (**1**, **2**, **3** und **4**) eine signifikante Verbesserung des Umsatzes im Vergleich zu Reaktionen ohne Elicitin nachgewiesen werden. Durch die anschließende Coexpression β -Cinnamomins in *E. coli* C43(DE3) mit CYP154C5, Pdx und PdR konnte die Steigerung des Umsatzes noch weiter verbessert werden. So wurden für Reaktionen mit coexprimiertem β -Cinnamomin im Vergleich zu Kontrollen ohne Elicitin mit gleicher P450-Konzentration und zu Kontrollen ohne Elicitin mit einer höheren P450-Konzentration, aber einer gleich hohen Zelldichte, diesmal sogar für alle sechs Steroide wesentlich höhere Substratumsätze pro eingesetzter Menge P450 gemessen. Wahrscheinlich wurde durch die Coexpression des Elicitins nicht nur die Substrataufnahme der hydrophoben Substrate durch die Zellwand, sondern auch der intrazelluläre Transport verbessert. Durch die periplasmatische Expression des Elicitins wurde dieses in der Zelle verfügbar und konnte so möglicherweise zusätzlich den Transport der Substratmoleküle durch das Periplasma in die innere Membran der *E. coli*-Zellwand beschleunigen, was schließlich zu einer signifikant Verbesserung des Umsatzes führte. Zweifelfrei wurde bewiesen, dass β -Cinnamomin den Substratumsatz hydrophober Substrate in der Ganzzellbiokatalyse wesentlich beschleunigen kann.

Als zweites Elicitin wurde ebenfalls das aufgereinigte β -Cryptogein in Ganzzellbiokatalysen der Steroide mit *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB getestet. Doch obwohl β -Cryptogein und β -Cinnamomin eine Proteinsequenzidentität von 88 % besitzen, konnte für β -Cryptogein keine Umsatzverbesserung nachgewiesen werden. Möglicherweise ist dies auf die unterschiedliche Oberflächenladung der beiden Elicitine zurück zu führen oder das aufgereinigte β -Cryptogein lag zwar löslich, aber dennoch nicht in seiner nativen und damit aktiven Form vor.

Zusammengefasst konnte im ersten Teil der Arbeit ein schnelles und einfaches System zur Expression von Elicitinen in *E. coli* etabliert werden, welches die zeitraubende Expression in *P. pastoris* oder den natürlichen *Phytophthora*-Wirten unnötig macht. Zur weiteren Verbesserung der Expression könnten

in Zukunft zum Beispiel Hochdruckfermentationen durchgeführt werden. Auch sollte das System durch die Expression weiterer Elicitine, unter anderem der beiden α -Elicitine α -Capsicein und α -Megaspermin, getestet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte sehr erfolgreich gezeigt werden, dass der Umsatz aller getesteten Substrate in Ganzzellbiotransformationen mit *E. coli* durch die Verwendung von β -Cinnamomin signifikant verbessert werden konnte. Die nächsten Schritte in der Zukunft wären die weitere Charakterisierung des etablierten Ganzzellsystems durch Reaktionen mit mehr variierenden Elicitinkonzentrationen und mehr Reaktionen mit Probenahmen über längere Zeiträume. Zusätzlich sollten weitere Elicitine, Substrate, Enzyme und Mikroorganismen getestet werden. Insbesondere unter Berücksichtigung der Ergebnisse von *Julsing et al.* [57] bietet diese Arbeit einen guten Ansatzpunkt für weitere Forschung, um eine Lösung für die Substratlimitierung in zukünftigen industriellen Ganzzellbiokatalyseprozessen mit gramnegativen Bakterien zu finden.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Gene

α -Capsicein

Die *cap* Gensequenz wurde mit Hilfe der Gene Designer Software der Firma DNA 2.0 (Version 1.1.4.1) von der α -Capsicein Proteinsequenz aus *Phytophthora capsici* abgeleitet und für die Expression in *E. coli* codonoptimiert. Die Proteinsequenz von α -Capsicein (Accession: [Q547Q9](#)) wurde der NCBI-Proteindatenbank entnommen und besteht aus 98 Aminosäuren (AS). Das Gen besteht aus 371 Basenpaaren (bp). Die Protein- und Gensequenz sind in Abbildung 68 (siehe Abschnitt 7.4) dargestellt.

α -Megaspermin

Die *meg* Gensequenz wurde mit Hilfe der Gene Designer Software der Firma DNA 2.0 (Version 1.1.4.1) von der α -Megaspermin Proteinsequenz aus *Phytophthora megasperma* abgeleitet und für die Expression in *E. coli* codonoptimiert. Die Proteinsequenz von α -Megaspermin (Accession: [Q8L691](#)) wurde der NCBI-Proteindatenbank entnommen und besteht aus 98 AS. Das Gen besteht aus 371 bp. Protein- und Gensequenz sind in Abbildung 69 (siehe Abschnitt 7.4) dargestellt.

β -Cinnamomin

Die *cin* Gensequenz wurde mit Hilfe der Gene Designer Software der Firma DNA 2.0 (Version 1.1.4.1) von der β -Cinnamomin Proteinsequenz aus *Phytophthora cinnamomi* abgeleitet und für die Expression in *E. coli* codonoptimiert. Die Proteinsequenz von β -Cinnamomin (Accession: [Q9T0M7](#)) wurde der NCBI-Proteindatenbank entnommen und besteht aus 98 AS. Das Gen besteht aus 371 bp. Protein- und Gensequenz sind in Abbildung 70 (siehe Abschnitt 7.4) dargestellt.

β -Cryptogein

Die *cry* Gensequenz wurde mit Hilfe der Gene Designer Software der Firma DNA 2.0 (Version 1.1.4.1) von der β -Cryptogein Proteinsequenz aus *Phytophthora cryptogea* abgeleitet und für die Expression in *E. coli* codonoptimiert. Die Proteinsequenz von β -Cryptogein (Accession: [P15570](#)) wurde der NCBI-Proteindatenbank entnommen und besteht aus 98 AS. Das Gen besteht aus 371 bp. Protein- und Gensequenz sind in Abbildung 71 (siehe Abschnitt 7.4) dargestellt.

CYP154C5

Die Klonierung der P450 Monooxygenase CYP154C5 aus *N. farcinica* (410 AS, Accession: [Q5YNS8](#)) in das pIT2-Plasmid erfolgte wie von Bracco *et al.* beschrieben [20]. Protein- und Gensequenz sind in Abbildung 72 (siehe Abschnitt 7.4) dargestellt.

Elektronentransferkomponenten

Die Redoxproteine Putidaredoxinreduktase PdR (422 AS, Accession: [P16640](#)) und Putidaredoxin Pdx (107 AS, Accession: [P00259](#)) aus *P. putida* wurden von Schallmey *et al.* zur Coexpression in *E. coli* in das pACYCDuet™-1 Plasmid kloniert [101] und der resultierende Vektor pACYCcamAB zur Verfügung gestellt. Ihre Protein- und Gensequenzen sind in Abbildung 73 und Abbildung 74 (siehe Abschnitt 7.4) enthalten.

Sekretionssignalsequenzen

MalEss (26 AS) ist die Sekretionssignalsequenz des periplasmatischen *E. coli* Maltosebindeproteins E (Accession: [P0AEX9](#)), DsbAss (19 AS) die Sekretionssignalsequenz des periplasmatischen *E. coli* Disulfidbindeproteins A (Accession: [P0AEG4](#)). PelBss (22 AS) ist die Sekretionssignalsequenz der Pektatlyase PelB aus *Erwinia carotovora* (Accession: [P0C1C1](#)), die auch im kommerziellen pET-22b(+)-Plasmid verwendet wird. Die Protein- und Gensequenzen sind in Abbildung 75 bis Abbildung 77 (siehe Abschnitt 7.4) gezeigt.

5.1.2 Primer

Alle verwendeten Primer (siehe Tabelle 5) wurden bei Sigma Aldrich bestellt.

Tabelle 5. Verwendete PCR-Primer

Nr.	Name	Nucleotidsequenz	n	Tm
1	MalEssFwd	5'-CAT AGA TCA TGA AAA TAA AAA CAG GTG CAC GCA TCC TCG CAT TAT CCG CAT TAA CGA CGA TGA TGT TTT CCG CCT CGG CTC TCG CCC ATA TGA CTG CGT GTA CTG CAA CCC AAC-3'	114	95,0 °C
2	DsbAssFwd	5'-AGT AGA TCA TGA AAA AGA TTT GGC TGG CGC TGG CTG GTT TAG TTT TAG CGT TTA GCG CAT CGG CGC ATA TGA CTG CGT GTA CTG CAA CCC AAC-3'	93	93,6 °C
3	PelBssFwd	5'-CTC GAA TCA TGA AAT ACC TGC TGC CGA CCG CTG CTG CTG GTC TGC TGC TCC TCG CTG CCC AGC CGG CGA TGG CCC ATA TGA CTG CGT GTA CTG CAA CCC AAC-3'	102	95,0 °C
4	CinEcoRIRev	5'-GAG CTC GAA TTC TTA CAG GGA AGC GCA TTT AGA AGA GAA GC-3'	41	79,3 °C
5	PeriCinHisFwd	5'-CAG GGC CAT ATG ACT GCG TGT AC-3'	23	69,6 °C
6	PeriCinHisRev	5'-CTC GAA CTC GAG CAG GGA AGC GCA TTT AGA AGA GAA G-3'	37	80,3 °C
7	PpHisCinFwd	5'-ATT AAT CTC GAG AAA AGA GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT C-3'	40	79,7 °C
8	PpCinFwd	5'-ATT AAT CTC GAG AAA AGA ACT GCG TGT ACT GCA ACC CAA C-3'	40	78,2 °C
9	PpCinRev	5'-TTA TTA GCG GCC GCT TAC AGG GAA GCG CAT TTA GAA G-3'	37	80,0 °C
10	MalEssCryFwd	5'-CAG GGC CAT ATG ACT GCG TGT ACT GCA ACT CAG-3'	33	79,9 °C
11	MalEssCryRev	5'-CTC GAA CTC GAG CAG AGA GGA ACA TTT ATT GCT GAA ACC GTT AG-3'	44	80,7 °C
12	C3MFwd	5'-GCC CAT ATG ACT GCG <u>ATG</u> ACT GCA ACC CAA CAA ACT GCC-3'	39	79,0 °C
13	C3MRev	5'-GGC AGT TTG TTG GGT TGC AGT <u>CAT</u> CGC AGT	39	79,0 °C

		CAT ATG GGC-3'			
14	C71SFwd	5'-CTC TGA ATC CGC CGG ATT <u>CTG</u> ATC TGA CCG	38	79,0 °C	
		TAC CGA CC-3'			
15	C71SRev	5'-GGT CGG TAC GGT CAG ATC <u>AGA</u> ATC CGG CGG	38	79,0 °C	
		ATT CAG AG-3'			
16	C71NFwd	5'-CTC TGA ATC CGC CGG ATA <u>ACG</u> ATC TGA CCG	38	79,0 °C	
		TAC CGA CC-3'			
17	C71NRev	5'-GGT CGG TAC GGT CAG ATC <u>GTT</u> ATC CGG CGG	38	79,0 °C	
		ATT CAG AG-3'			
18	C27MFwd	5'-GTC TGA GTC CAG CTT CTC CCA <u>GAT</u> <u>GTC</u> CAA	45	78,0 °C	
		AGA CTC CGG TTA TTC-3'			
19	C27MRev	5'-GAA TAA CCG GAG TCT TTG <u>GAC</u> <u>ATC</u> TGG GAG	45	78,0 °C	
		AAG CTG GAC TCA GAC-3'			
20	C56AFw	5'-GAT GTG CGC GAG CAC CGC <u>TGC</u> <u>GAA</u> CAC CAT	43	79,0 °C	
		GAT TAA GAA AAT C-3'			
21	C56ARev	5'-GAT TTT CTT AAT CAT GGT GTT <u>CGC</u> AGC GGT	43	79,0 °C	
		GCT CGC GCA CAT C-3'			
22	C56SFwd	5'-CTG ATG TGC GCG AGC ACC GCT <u>TCT</u> AAC ACC	45	77,0 °C	
		ATG ATT AAG AAA ATC-3'			
23	C56SRev	5'-GAT TTT CTT AAT CAT GGT GTT <u>AGA</u> AGC GGT	45	77,0 °C	
		GCT CGC GCA CAT CAG-3'			
24	C51MFwd	5'-CTC AGT ACA AAC TGA TGA <u>TGG</u> CGA GCA CCG	41	79,0 °C	
		CTT GCA ACA CC -3'			
25	C51MRev	5'-GGT GTT GCA AGC GGT GCT CGC <u>CAT</u> CAT CAG	41	79,0 °C	
		TTT GTA CTG AG-3'			
26	C95LFwd	5'-GGC TTC TCT TCT AAA <u>CTG</u> GCT TCC CTG CTC	37	79,0 °C	
		GAG CAC C-3'			
27	C95LRev	5'-GGT GCT CGA GCA GGG AAG <u>CCA</u> <u>GTT</u> TAG AAG	37	79,0 °C	
		AGA AGC C-3'			

5.1.3 Plasmide

In Tabelle 6 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide inklusive ihres Selektionsmarkers und ihrer Herkunft aufgeführt:

Tabelle 6. Verwendete Klonierungs- und Expressionsplasmide

Plasmide	Resistenz	Herkunft
pMA-T	Ampicillin	Mr.Gene
pBADN	Ampicillin	Jin <i>et al.</i> 2008 [56]
pET-22b(+)	Ampicillin	Merck Millipore
pET-28a(+)	Kanamycin	Merck Millipore
pACYCDuet™-1	Chloramphenicol	Schallmeyer <i>et al.</i> 2011 [101]
pIT2	Tetracyclin	Bracco <i>et al.</i> 2013 [20]
pGAPZαA	Zeocin	Invitrogen

pMA-T besitzt eine Ampicillinresistenz und diente ausschließlich zur Auslieferung der synthetischen Gene von Mr. Gene. pBADN mit Ampicillinresistenzgen und einem Arabinosepromotor ist eine Plasmidvariante des pBAD/myc-HisA Plasmids von Invitrogen (Carlsbad, USA), in dem die *NcoI* Restriktionsschnittstelle gegen eine *NdeI* Restriktionsschnittstelle ausgetauscht wurde [56]. pBADN wurde für die cytoplasmatischen Expressionstests der vier Elicitingene ohne N-terminalen His-tag verwendet. Das Plasmid pET-22b(+) mit Ampicillinresistenzgen wurde für erste periplasmatische Expressionsversuche genutzt und besitzt einen T7-Promotor. Das pET-28a(+) Plasmid mit Kanamycinresistenz

und T7-Promotor wurde sowohl für die cytoplasmatischen Expressionsversuche mit N-terminalem His-tag, als auch für die periplasmatische Expression mit den MalEss-, DsbAss- und PelBss-Sekretionssignalsequenzen verwendet. Das pIT2 Plasmid wurde von Schallmeyer *et al.* generiert [101] und besitzt neben dem Tetracyclinresistenzgen einen T7-Promotor. Das pACYCDuet™-1 Plasmid besitzt eine Chloramphenicolresistenz und zwei T7-Promotoren, mit denen zwei Gene coexprimiert werden können. pIT2 und pACYCDuet™-1 wurden zur Coexpression der CYP154C5 aus *N. farcinica* und der Redoxpartner PdR und Pdx aus *P. putida* eingesetzt. pGAPZαA besitzt ein Zeocinresistenzgen, einen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP)-Promotor und diente zur konstitutiven Expression von *cin* in *P. pastoris*.

5.1.4 Mikroorganismen

Die *E. coli*-Stämme Top10 und DH5α wurden zur Stammhaltung und Amplifikation von Plasmiden verwendet. Zur Expression der Elicitine im Cytoplasma wurden die Stämme *E. coli* SHuffle® T7 und *E. coli* SHuffle® T7 Express verwendet. *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* C43(DE3) wurden für die Expression und Sekretion der Elicitine ins Periplasma eingesetzt. *E. coli* C43(DE3) wurde ebenfalls zur Coexpression von CYP154C5, Pdx und PdR verwendet. *P. pastoris* X-33 wurde zur Sekretion der Elicitine in das Kulturmedium getestet.

Tabelle 7. Verwendete Klonierungs- und Expressionsstämme

Spezies	Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i>	DH5α	F- ϕ 80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen
<i>E. coli</i>	Top10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 galU galK Δ(ara-leu)7697 rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen
<i>E. coli</i>	SHuffle® T7	F' <i>lac</i> , <i>pro</i> , <i>lacI</i> ^Q / Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1</i> Δ(<i>phoA</i>) <i>PvuII phoR ahpC* galE (or U) galK</i> λ att::pNEB3-r1-cDsbC (Spec ^R , <i>lacI</i> ^Q) Δ <i>trxB rpsL150(Str^R)</i> Δ <i>gor</i> Δ(<i>malF</i>)3	New England Bio-Labs® Inc.
<i>E. coli</i>	SHuffle® T7 Express	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal</i> λ att::pNEB3-r1-cDsbC (Spec ^R , <i>lacI</i> ^Q) Δ <i>trxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --Tet^S) endA1</i> Δ <i>gor</i> Δ(<i>mcrC-mrr</i>)114::IS10	New England Bio-Labs® Inc.
<i>E. coli</i>	BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i>	C43(DE3)	F - <i>ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm</i> (DE3)	Lucigen
<i>P. pastoris</i>	X-33	Wildtyp	Invitrogen

5.1.5 Medien

LB-Medium

10 g/L NaCl

10 g/L Trypton/Pepton

5 g/L Hefeextrakt

Die Medienbestandteile werden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Um LB-Agarplatten herzustellen, werden vor dem Autoklavieren 10 g/L Agar zum Medium hinzugegeben. Antibiotika werden bei Bedarf nach Abkühlen auf unter 50 °C vor dem Gießen der Platten hinzugegeben.

SOB-Medium

0,5 g/L NaCl

20 g/L Trypton/Pepton

5 g/L Hefeextrakt

Die Medienbestandteile werden in 450 mL destilliertem Wasser gelöst. Anschließend werden 5 mL 250 mM KCl-Lösung hinzu pipettiert und der pH-Wert mit 5 M NaOH auf pH 7 eingestellt. Danach wird das Medium mit destilliertem Wasser auf 500 mL aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf unter 50 °C werden 2,5 mL sterile 2 M MgCl₂-Lösung hinzugegeben.

TB-Medium

4 mL/L Glycerin

12 g/L Pepton

24 g/L Hefeextrakt

Die Medienbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend werden 100 mL steriler „Kaliumphosphatpuffer für TB-Medium“ (0,17 M KH₂PO₄, 0,74 M K₂HPO₄) hinzugegeben.

TBS-Medium

182,2 g/L Sorbitol (c_f = 1 M)

4 mL/L Glycerin

12 g/L Pepton

24 g/L Hefeextrakt

Das Sorbitol wird in 500 mL destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Die restlichen Medienbestandteile werden in 400 mL destilliertem Wasser gelöst und separat autoklaviert. Die 1 M Sorbitollösung wird anschließend mit den restlichen Medienbestandteilen und 100 mL sterilem „Kaliumphosphatpuffer für TB-Medium“ (0,17 M KH₂PO₄, 0,74 M K₂HPO₄) gemischt.

YNB-Medium

13,4 g/L YNB

2 mL/L 500 x Biotin

20 g/L Glucose

YNB wird in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, autoklaviert und mit 2 mL steriler 500 x Biotin-stammlösung gemischt. Die Glucose wird in 100 mL destilliertem Wasser gelöst, separat autoklaviert und hinzugefügt.

YPD-Medium

10 g/L	Hefeextrakt
20 g/L	Pepton
20 g/L	Glucose

Hefeextrakt und Pepton werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Die Glucose wird in 100 mL destilliertem Wasser gelöst und separat autoklaviert. Beide Lösungen werden unter sterilen Bedingungen gemischt.

5.1.6 Puffer und Lösungen

Agarosegelelektrophorese

5 %-Farbstoff AGE-Ladepuffer

50 mg/mL	Xylencyanol FF
50 mg/mL	Bromphenolblau R250

Die Farbstoffe werden in 1 mL destilliertem Wasser gelöst.

6 x AGE-Ladepuffer

120 µL	50 x TAE-Puffer	(c_f (Tris) = 0,24 M, c_f (Essigsäure) = 0,12 M, c_f (EDTA) = 60 mM)
600 µL	Glycerin	
5 µL	5%-Farbstoff	

Die Bestandteile werden gemischt und mit 275 µL destilliertem Wasser auf 1 mL aufgefüllt.

50 x TAE-Puffer

242,28 g/L	Tris-HCl	(c_f = 2 M)
57,1 mL/L	Essigsäure	(c_f = 1 M)

Die Pufferbestandteile werden in 800 mL destilliertem Wasser gelöst, 100 mL 0,5 M EDTA-Lösung werden hinzugefügt, der pH-Wert auf 8,5 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

Herstellung kompetenter Zellen

BEDS ohne DTT

0,082 g	Bicin	(c_f = 10 mM)
9,11 g	Sorbitol	(c_f = 1 M)

1,5 mL Ethylenglycol

2,5 mL DMSO

Bicin und Sorbitol werden in 40 mL destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 8,3 eingestellt. Anschließend werden Ethylenglycol und DMSO hinzugegeben und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 50 mL aufgefüllt. Der Puffer wird mittels eines Spritzenfilters (Porenweite $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) steril filtriert.

BEDS mit DTT

0,082 g Bicin ($c_f = 10 \text{ mM}$)

9,11 g Sorbitol ($c_f = 1 \text{ M}$)

7,71 g DTT ($c_f = 1 \text{ M}$)

1,5 mL Ethylenglycol

2,5 mL DMSO

Bicin, Sorbitol und DTT werden in 40 mL destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 8,3 eingestellt. Anschließend werden Ethylenglycol und DMSO hinzugegeben und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 50 mL aufgefüllt. Der Puffer wird mittels eines Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) steril filtriert.

RF1-Puffer

0,48 g RbCl_2 ($c_f = 100 \text{ mM}$)

0,117 g Kaliumacetat ($c_f = 30 \text{ mM}$)

0,0588g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ($c_f = 10 \text{ mM}$)

0,3958g $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ ($c_f = 50 \text{ mM}$)

6 g Glycerin

Die Pufferbestandteile werden in 40 mL destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Essigsäure auf 5,8 eingestellt und der Puffer anschließend mit einem Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) steril filtriert.

RF2-Puffer

0,083 g MOPS ($c_f = 10 \text{ mM}$)

0,048 g RbCl_2 ($c_f = 10 \text{ mM}$)

0,441 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ($c_f = 75 \text{ mM}$)

6 g Glycerin

Die Pufferbestandteile werden in 40 mL destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Essigsäure auf 5,8 eingestellt und die Lösung anschließend mit einem Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) steril filtriert.

*Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie**Lysispuffer I pH 7,0*

4,18 g/L	MOPS	($c_f = 20 \text{ mM}$)
29,22 g/L	NaCl	($c_f = 500 \text{ mM}$)
0,34 g/L	Imidazol	($c_f = 5 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Der Puffer wird mittels Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,4 \mu\text{m}$) filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Waschpuffer I pH 7,0

4,18 g/L	MOPS	($c_f = 20 \text{ mM}$)
29,22 g/L	NaCl	($c_f = 500 \text{ mM}$)
1,36 g/L	Imidazol	($c_f = 20 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Der Puffer wird mittels Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,4 \mu\text{m}$) filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Elutionspuffer I pH 7.0

4,18 g/L	MOPS	($c_f = 20 \text{ mM}$)
29,22 g/L	NaCl	($c_f = 500 \text{ mM}$)
34,04 g/L	Imidazol	($c_f = 500 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Der Puffer wird mittels Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,4 \mu\text{m}$) filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Lysispuffer II pH 6.5

4,18 g/L	MOPS	($c_f = 20 \text{ mM}$)
29,22 g/L	NaCl	($c_f = 500 \text{ mM}$)
1,36 g/L	Imidazol	($c_f = 20 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Der Puffer wird mittels Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,4 \mu\text{m}$) filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Waschpuffer II pH 6,5

4,18 g/L	MOPS	($c_f = 20 \text{ mM}$)
29,22 g/L	NaCl	($c_f = 500 \text{ mM}$)

2,72 g/L Imidazol ($c_f = 40 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Der Puffer wird mittels Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,4 \mu\text{m}$) filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Lysispuffer III pH 6,5

1,92 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ($c_f = 12,3 \text{ mM}$)

1,08 g/L Na_2HPO_4 ($c_f = 7,6 \text{ mM}$)

29,22 g/L NaCl ($c_f = 500 \text{ mM}$)

0,68 g/L Imidazol ($c_f = 10 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Der Puffer wird mittels Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,4 \mu\text{m}$) filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Elutionspuffer II pH 6,5

1,92 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ($c_f = 12,3 \text{ mM}$)

1,08 g/L Na_2HPO_4 ($c_f = 7,6 \text{ mM}$)

29,22 g/L NaCl ($c_f = 500 \text{ mM}$)

34,04 g/L Imidazol ($c_f = 500 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Der Puffer wird mittels Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,4 \mu\text{m}$) filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Lysispuffer IV pH 6.5

1,67 g/L KH_2PO_4 ($c_f = 12,3 \text{ mM}$)

1,32 g/L K_2HPO_4 ($c_f = 7,6 \text{ mM}$)

29,22 g/L NaCl ($c_f = 500 \text{ mM}$)

0,68 g/L Imidazol ($c_f = 10 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Der Puffer wird mittels Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,4 \mu\text{m}$) filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Elutionspuffer III pH 6,5

1,67 g/L KH_2PO_4 ($c_f = 12,3 \text{ mM}$)

1,32 g/L K_2HPO_4 ($c_f = 7,6 \text{ mM}$)

29,22 g/L NaCl ($c_f = 500 \text{ mM}$)

34,04 g/L Imidazol ($c_f = 500 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Der Puffer wird mittels Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,4 \text{ }\mu\text{m}$) filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Denaturierende immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie

Lysispuffer pH 7,4 mit 6 M Harnstoff

0,89 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	($c_f = 20 \text{ mM}$)
120,12 g	Harnstoff	($c_f = 6 \text{ M}$)
7,31 g	NaCl	($c_f = 0,5 \text{ M}$)
0,17 g	Imidazol	($c_f = 10 \text{ mM}$)
250 μL	1 M DTT	($c_f = 1 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile bis auf DTT werden in 240 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, 250 μL einer 1 M DTT-Lösung hinzugefügt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 250 mL aufgefüllt. Der Puffer wird mittels Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,4 \text{ }\mu\text{m}$) filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Waschpuffer pH 7,4 mit 6 M Harnstoff

0,89 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	($c_f = 20 \text{ mM}$)
120,12 g	Harnstoff	($c_f = 6 \text{ M}$)
7,31 g	NaCl	($c_f = 0,5 \text{ M}$)
0,51 g	Imidazol	($c_f = 30 \text{ mM}$)
250 μL	1 M DTT	($c_f = 1 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 240 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, 250 μL einer 1 M DTT-Lösung hinzugefügt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 250 mL aufgefüllt. Der Puffer wird mittels Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,4 \text{ }\mu\text{m}$) filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Elutionspuffer pH 7,4 mit 6 M Harnstoff

0,18 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	($c_f = 20 \text{ mM}$)
24,02 g	Harnstoff	($c_f = 6 \text{ M}$)
1,46 g	NaCl	($c_f = 0,5 \text{ M}$)
2,55 g	Imidazol	($c_f = 500 \text{ mM}$)
50 μL	1 M TT	($c_f = 1 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 40 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, 50 μL einer 1 M DTT-Lösung hinzugefügt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 50 mL aufge-

füllt. Der Puffer wird mittels Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,4 \mu\text{m}$) filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Kationenaustauschchromatographie

Bindepuffer pH 6,5

4,3 g/L MES · H₂O ($c_f = 20 \text{ mM}$)

Das MES wird in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt. Anschließend wird der Puffer filtriert (Porenweite $\varnothing = 0,4 \mu\text{m}$) und im Ultraschallbad entgast.

Elutionspuffer pH 6,5

4,3 g/L MES · H₂O ($c_f = 20 \text{ mM}$)

58,4 g/L NaCl ($c_f = 1 \text{ M}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt. Anschließend wird der Puffer filtriert (Porenweite $\varnothing = 0,4 \mu\text{m}$) und im Ultraschallbad entgast.

Proteinexpression

500 x Biotinstammlösung

20 mg Biotin

Das Biotin wird in 100 mL destilliertem Wasser gelöst und die Lösung durch einen Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) steril filtriert.

1000 x δ -ALA

0,837 g δ -ALA ($c_f = 0,5 \text{ M}$)

Das δ -ALA wird in 10 mL destilliertem Wasser gelöst und durch einen Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) steril filtriert.

1000 x Spurenelementlösung

0,1 g/L MnSO₄ · H₂O ($c_f = 0,59 \text{ mM}$)

0,16 g/L CuSO₄ · 5 H₂O ($c_f = 0,64 \text{ mM}$)

0,18 g/L ZnSO₄ · 7 H₂O ($c_f = 0,63 \text{ mM}$)

0,18 g/L CoCl₂ · 6 H₂O ($c_f = 0,78 \text{ mM}$)

0,5 g/L CaCl₂ · 2 H₂O ($c_f = 3,40 \text{ mM}$)

16,7 g/L FeCl₃ · 6 H₂O ($c_f = 61,79 \text{ mM}$)

20,1 g/L Na₂-EDTA ($c_f = 54,00 \text{ mM}$)

Die Bestandteile der Spurenelementlösung werden in 1 L destilliertem Wasser gelöst und die Lösung durch einen Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) steril filtriert.

Kaliumphosphatpuffer für TB-Medium

2,3 g	KH_2PO_4	($c_f = 0,17 \text{ M}$)
12,95 g	K_2HPO_4	($c_f = 0,74 \text{ M}$)

Die Pufferbestandteile werden in 100 mL destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert.

Puffer

Assaypuffer für den DHE-Assay

3,09 g	Mannitol	($c_f = 170 \text{ mM}$)
0,0074 g	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	($c_f = 0,5 \text{ mM}$)
0,0087 g	K_2SO_4	($c_f = 0,5 \text{ mM}$)
0,0976 g	$\text{MES} \cdot \text{H}_2\text{O}$	($c_f = 5 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 90 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 100 mL aufgefüllt.

50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5

5,54 g	KH_2PO_4	($c_f = 40,7 \text{ mM}$)
1,60 g	K_2HPO_4	($c_f = 9,2 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5

6,35 g	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	($c_f = 40,7 \text{ mM}$)
1,31 g	Na_2HPO_4	($c_f = 9,2 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

PBS-Puffer pH 7,4

8,18 g/L	NaCl	($c_f = 140 \text{ mM}$)
0,201 g/L	KCl	($c_f = 2,7 \text{ mM}$)
1,74 g/L	K_2HPO_4	($c_f = 10 \text{ mM}$)
0,245 g/L	KH_2PO_4	($c_f = 1,8 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf pH 7,4 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

Resolubilisierungspuffer pH 7,3

2,05 g	NaCl	($c_f = 140 \text{ mM}$)
0,05 g	KCl	($c_f = 2,7 \text{ mM}$)
0,44 g	K_2HPO_4	($c_f = 10 \text{ mM}$)
0,06 g	KH_2PO_4	($c_f = 1,8 \text{ mM}$)
120,12 g	Harnstoff	($c_f = 8 \text{ M}$)
250 μL	1 M DTT	($c_f = 1 \text{ mM}$)

Die Pufferbestandteile werden in 200 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,3 eingestellt, 250 μL einer 1 M DTT-Lösung hinzu gegeben und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 250 mL aufgefüllt.

*SDS-PAGE**4x SDS-PAGE Ladepuffer*

1,82 g	Tris-HCl	($c_f = 1 \text{ M}$)
1,5 mL	Glycerin	
0,30 g	SDS	
0,15 g	Bromphenolblau R250	
0,23 g	DTT	($c_f = 0,1 \text{ M}$)

Die Pufferbestandteile werden in 15 mL destilliertem Wasser gelöst. Der Ladepuffer wird zu je 1 mL in Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

SDS-PAGE Gelpuffer pH 6.8

121,14 g/L	Tris-HCl	($c_f = 1 \text{ M}$)
------------	----------	-------------------------

Tris-HCl wird in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf einen Wert von 6,8 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

SDS-PAGE Gelpuffer pH 8.45

363,3 g/L	Tris-HCl	($c_f = 3 \text{ M}$)
3 g/L	SDS	

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 8,45 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

Anodenpuffer

22,42 g/L	Tris-HCl	($c_f = 0,2 \text{ M}$)
-----------	----------	---------------------------

22,42 g Tris-HCl werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 8,9 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

Kathodenpuffer

12,11 g/L Tris-HCl ($c_f = 0,1 \text{ M}$)

17,92 g/L Tricine ($c_f = 0,1 \text{ M}$)

1 g/L SDS

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

SDS-PAGE Färbelösung

0,2 g Bromphenolblau R250

0,2 g Bromphenolblau G250

20 mL Essigsäure

100 mL Methanol

Coomassie Brilliant Blue R-250 und G-250 werden in 100 mL Methanol gelöst. Dann werden 20 mL Essigsäure hinzu gemischt und die Lösung mit destilliertem Wasser auf 200 mL aufgefüllt.

*Western blot**10 x TBS-Puffer pH 7,4*

60,57 g/L Tris-HCl ($c_f = 0,5 \text{ M}$)

87,66 g/L NaCl ($c_f = 1,5 \text{ M}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

1 x TBS-Puffer

100 mL/L 10 x TBS-Puffer pH 7,4 ($c_f(\text{Tris}) = 50 \text{ mM}$, $c_f(\text{NaCl}) = 150 \text{ mM}$)

100 mL 10 x TBS-Puffer pH 7,4 werden mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

1 x TBST-Puffer

100 mL/L 10 x TBS-Puffer pH 7,4 ($c_f(\text{Tris}) = 50 \text{ mM}$, $c_f(\text{NaCl}) = 150 \text{ mM}$)

0,5 mL/L Tween 20

100 mL 10 x TBS-Puffer pH 7,4 werden mit 0,5 mL Tween 20 versetzt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

10 x Transferpuffer

30,29 g/L Tris-HCl ($c_f = 0,25 \text{ M}$)

144,13 g/L Glycine ($c_f = 1,92 \text{ M}$)

Die Pufferbestandteile werden in 900 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 8,9 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

1 x Transferpuffer

100 mL/L 10 x Transferpuffer (c_f (Tris) = 25 mM, c_f (Glycine) = 192 mM)

200 mL/L Methanol

100 mL 10 x Transferpuffer werden mit 200 mL Methanol gemischt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

*Zellaufschluss**Spheroblastpuffer*

2,67 g MES · H₂O (c_f = 50 mM)

0,037 g CaCl₂ · 2 H₂O (c_f = 1 mM)

45 g Sucrose

0,37 g EDTA (c_f = 5 mM)

1,25 g Lysozym

Die Pufferbestandteile werden in 200 mL destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 250 mL aufgefüllt.

TEN-Puffer

0,3 g Tris-HCl (c_f = 10 mM)

0,073 g EDTA (c_f = 1 mM)

2,19 g NaCl (c_f = 150 mM)

Die Pufferbestandteile werden in 250 mL destilliertem Wasser gelöst.

TENST-Puffer

0,3 g Tris-HCl (c_f = 10 mM)

0,073 g EDTA (c_f = 1 mM)

2,19 g NaCl (c_f = 150 mM)

0,6 mL Triton X-100

8 g Sarkosyl NL

Die Pufferbestandteile werden in 250 mL destilliertem Wasser gelöst.

5.1.7 Substratstammlösungen für die Biokatalyse*Substratstammlösungen in Methanol**50 mM Pregnenolon (1) in Methanol*

0,0791 g Pregnenolon (1) (c_f = 50 mM)

Pregnenolon (**1**) wird in 4 mL Methanol auf 35 °C erwärmt, im Ultraschallbad gelöst, mit Methanol auf 5 mL aufgefüllt und anschließend bei 4 °C gelagert.

100 mM Testosteron (2) in Methanol

0,1442 g Testosteron (**2**) ($c_f = 100 \text{ mM}$)

Das Testosteron (**2**) wird in 4 mL Methanol auf 35 °C erwärmt, im Ultraschallbad gelöst, mit Methanol auf 5 mL aufgefüllt und anschließend bei 4 °C gelagert.

100 mM Progesteron (3) in Methanol

0,1572 g Progesteron (**3**) ($c_f = 100 \text{ mM}$)

Das Progesteron (**3**) wird in 4 mL Methanol auf 35 °C erwärmt, im Ultraschallbad gelöst, mit Methanol auf 5 mL aufgefüllt und anschließend bei 4 °C gelagert.

100 mM Dehydroepiandrosteron (4) in Methanol

0,1442 g Dehydroepiandrosteron (**4**) ($c_f = 100 \text{ mM}$)

Das Dehydroepiandrosteron (**4**) wird in 4 mL Methanol auf 35 °C erwärmt, im Ultraschallbad gelöst, mit Methanol auf 5 mL aufgefüllt und anschließend bei 4 °C gelagert.

100 mM Androstendion (5) in Methanol

0,1432 g Androstendion (**5**) ($c_f = 100 \text{ mM}$)

Das Androstendion (**5**) wird in 4 mL Methanol auf 35 °C erwärmt, im Ultraschallbad gelöst, mit Methanol auf 5 mL aufgefüllt und anschließend bei 4 °C gelagert.

100 mM Nandrolon (6) in Methanol

0,1372 g Nandrolon (**6**) ($c_f = 100 \text{ mM}$)

Das Nandrolon (**6**) wird in 4 mL Methanol auf 35 °C erwärmt, im Ultraschallbad gelöst, mit Methanol auf 5 mL aufgefüllt und anschließend bei 4 °C gelagert.

Substratstammlösungen in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

50 mM Pregnenolon (1) in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

0,0396 g Pregnenolon (**1**) ($c_f = 50 \text{ mM}$)

Das Pregnenolon (**1**) wird in 2 mL 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf 35 °C erwärmt, im Ultraschallbad gelöst, mit 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf 2,5 mL aufgefüllt und anschließend bei 4 °C gelagert.

50 mM Testosteron (2) in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

0,0366 g Testosteron (**2**) ($c_f = 50 \text{ mM}$)

Das Testosteron (**2**) wird in 2 mL 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf 35 °C erwärmt, im Ultraschallbad gelöst, mit 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf 2,5 mL aufgefüllt und anschließend bei 4 °C gelagert.

*50 mM Progesteron (**3**) in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin*

0,0394 g Progesteron (**3**) ($c_f = 50$ mM)

Das Progesteron (**3**) wird in 2 mL 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf 35 °C erwärmt, im Ultraschallbad gelöst, mit 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf 2,5 mL aufgefüllt und anschließend bei 4 °C gelagert.

*50 mM Dehydroepiandrosteron (**4**) in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin*

0,0368 g Dehydroepiandrosteron (**4**) ($c_f = 50$ mM)

Das Dehydroepiandrosteron (**4**) wird in 2 mL 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf 35 °C erwärmt, im Ultraschallbad gelöst, mit 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf 2,5 mL aufgefüllt und anschließend bei 4 °C gelagert.

*50 mM Androstendion (**5**) in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin*

0,0362 g Androstendion (**5**) ($c_f = 50$ mM)

Das Androstendion (**5**) wird in 2 mL 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf 35 °C erwärmt, im Ultraschallbad gelöst, mit 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf 2,5 mL aufgefüllt und anschließend bei 4 °C gelagert.

*50 mM Nandrolon (**6**) in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin*

0,0343 g Nandrolon (**6**) ($c_f = 50$ mM)

Das Nandrolon (**6**) wird in 2 mL 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf 35 °C erwärmt, im Ultraschallbad gelöst, mit 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf 2,5 mL aufgefüllt und anschließend bei 4 °C gelagert.

5.1.8 Antibiotika

1000 x-Ampicillin Stammlösung

1 g Ampicillin

Das Ampicillin wird in 10 mL destilliertem Wasser gelöst und mit einem Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

2000 x-Kanamycin Stammlösung

1 g Kanamycin

Das Kanamycin wird in 10 mL destilliertem Wasser gelöst und mit einem Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) steril filtriert und bei -20°C gelagert.

1000 x-Chloramphenicol Stammlösung

0,25 g Chloramphenicol

Das Chloramphenicol wird in 10 mL 70 % Ethanol gelöst, mit einem Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) steril filtriert und bei -20°C gelagert.

1000 x-Tetracyclin Stammlösung

0,1 g Tetracyclin

Das Tetracyclin werden in 10 mL 70 % Ethanol Wasser gelöst und mit einem Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) steril filtriert und bei -20°C gelagert.

1000 x-Zeocin Stammlösung

Das Zeocin™ Selection Reagent wird in einer Konzentration von 100 mg/mL geliefert und wird zu je 1 mL in Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert. Die Zeocinstammlösungen werden vor Licht geschützt bei -20°C aufbewahrt.

5.1.9 Enzyme

Enzym

<i>Bsp</i> HI	(10 U/ μL)
<i>Eco</i> RI-HF™	(20 U/ μL)
<i>Dpn</i> I	(20 U/ μL)
<i>Nco</i> I-HF™	(20 U/ μL)
<i>Nde</i> I	(20 U/ μL)
<i>Not</i> I-HF™	(20 U/ μL)
<i>Xho</i> I	(20 U/ μL)
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	(2 U/ μL)
Taq DNA Polymerase	(5 U/ μL)
T4 DNA Ligase	(400 U/ μL)

Herkunft

New England BioLabs® Inc.
New England BioLabs® Inc.
New England BioLabs® Inc.
New England BioLabs® Inc.
New England BioLabs® Inc.
New England BioLabs® Inc.
New England BioLabs® Inc.
New England BioLabs® Inc.
New England BioLabs® Inc.
New England BioLabs® Inc.

5.1.10 DNA- und Proteinmarker

Marker

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use
Quick-Load® 2-Log DNA Ladder(0.1-10.0 kb)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder

Herkunft

Thermo Scientific
New England BioLabs® Inc.
Fermentas

5.1.11 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in ihrer höchsten Reinheit von den Firmen Sigma Aldrich (Taufkirchen), AppliChem (Darmstadt) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

Chemikalie

δ-ALA HCl
 Androstendion (4-Androsten-3,17-dione, Substrat 5)
 Antifoam 204
 BCIP/NBT Purple Liquid
 B-Per® Bacterial Protein Extraction Reagent
 Cholesterol
 Cytochrome c vom Pferdeherz
 Dehydroepiandrosteron (5-Androsten-3β-ol-17-one, Substrat 4)
 Dehydroergosterol (Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol)
 Ni Sepharose™ 6 Fast Flow
 Hydroxypropyl-β-cyclodextrin
 Nandrolon (4-Estren-17β-ol-3-one, Substrat 6)
 Ponceau S Lösung
 Pregnenolon (5-Pregnen-3β-ol-20-one, Substrat 1)
 Progesteron (Pregn-4-en-3,20-dione, Substrat 3)
 Roti®-Safe GelStain
 Roti®-Quant 5 x Konzentrat
 Testosteron (4-Androsten-17β-ol-3-one, Substrat 2)
 Toyopearl Super SP-650c

Herkunft

Sigma Aldrich
 Steraloids
 Sigma Aldrich
 Sigma Aldrich
 Thermo Scientific
 Sigma Aldrich
 Sigma Aldrich
 Steraloids
 Sigma Aldrich
 GE Healthcare
 Sigma Aldrich
 Steraloids
 Sigma Aldrich
 Sigma Aldrich
 Sigma Aldrich
 Carl Roth
 Carl Roth
 Sigma Aldrich
 Tosoh Bioscience GmbH

5.1.12 Geräte und Zubehör

Agarosegelelektrophorese

Electrophoresis Power Supply EV243
 MIDI 1 und MINI Geltrageschalen
 U:Genius Compact Gel Imaging System

Consort
 Carl Roth
 Syngene

Biokatalyse

Sonorex Super RK 106 (Ultraschallbad)
 Speed Vac® SC 110
 Vortex-Genie® 2
 Microliter™ Spritzen Modelle 710 und 750 (100 und 500 µL)

Bandellin
 Savant
 ROTH
 Hamilton Messtechnik GmbH

Expression & Transformation

Biostat® ED und Biostat® M

Electroporator 2510

Thermomixer 5436

Filtration

Amicon Ultra-15 Centrifugal Filtereinheit mit Ultracel-3 Membran

Spectra/Por Dialysemembran MWCO 3500 Da, 45 mm Schlüsselfläche

Rührzelle Modell 8200, 200 ml (Filterdurchmesser: 63,5 mm)

Ultracel Ultrafiltration Disc, 3 kDa NWML, 63,5 mm (PLBC06210)

GC

GC2010 plus mit AOC-20i-Injektor

Optima 17 MS (30 m x 0,25 ID, 0,4 mm OD)

HPLC

Prominence UFLC (Module: CBM-20A, SPD-M20A, CTO-20AC, SIL-20AC HT, 2 x LC-20AD)

Nucleosil 100, 5 C18 (250 x 4,5 mm)

Molekularbiologie

BioView-Transilluminator (USDF-20ML-8R)

Mastercycler® personal

Thermostat plus

Photometer

Biophotometer plus

CARY 50 Bio UV-VIS Spektrophotometer

Infinite® M-1000 Fluoreszenzspektrometer

NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer

Proteinaufreinigung

ÄKTAprime™ und ÄKTApurifier™

EmulsiFlex-C3 (French Press)

His-Trap HP, 5 ml

PD-10 Desalting Columns

Poly-Prep® Chromatographiesäulen

Protino® Ni-IDA Packed columns

Vibra-Cell™ VCX130 (Sonifikator)

XK26 Chromatographiesäule

B. Braun Biotech International

Eppendorf

Eppendorf

Millipore

Spectrum Laboratories, Inc.

Millipore

Millipore

Shimadzu

Macherey-Nagel

Shimadzu

CS-Chromatographie Service GmbH

Biostep

Eppendorf

Eppendorf

Eppendorf

Varian

Tecan

peqlab

GE Healthcare

Avestin Europe GmbH

GE Healthcare

GE Healthcare

Bio-Rad

Macherey-Nagel

Sonics

GE Healthcare

SDS-PAGE

Electrophoresis Power Supply EV243

Mini PROTEAN® Tetra Cell

Mini PROTEAN® short plates und spacer plates

Mini PROTEAN® comb, 10 wells und comb, 15 wells

Consort

Bio-Rad

Bio-Rad

Bio-Rad

Western blot

Pure Nitrocellulose 0,45 µm Transfer membrane (30 cm x 3m)

Semi Dry Mini-Blotting System

Whatman Gel Blotting Papier

AppliChem

BiocomDirect

Sigma Aldrich

Zentrifugen

Eppendorf Centrifuge 5424 (FA-45-24-11)

Eppendorf Centrifuge 5810R (Rotor: A-4-81)

Eppendorf Centrifuge 5810R (Rotor: F-34-6-38)

Sorvall RC6+ Centrifuge (Rotoren: SS34 und F10S-6X500Y)

Eppendorf

Eppendorf

Eppendorf

Sorvall

5.1.13 Kits

NucleoSpin® Extract II

NucleoSpin® Plasmid

PfuTurbo® Hotstart PCR Master Mix

QIAexpress Detection and Assay Kit (Ni-NTA-AP Conjugate)

Macherey-Nagel

Macherey-Nagel

Stratagene

Qiagen

5.2 Molekular- und mikrobiologische Methoden**5.2.1 Übernachtskulturen von *Escherichia coli***

Um *E. coli*-Stämme für die Expression, eine Plasmidisolierung oder eine Gefrierkultur heranzuziehen, wurde eine Übernachtskultur hergestellt. Entsprechend Tabelle 8 wurden 5 mL LB-Medium mit Antibiotika versetzt und mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm von einer LB-Agarplatte oder einer Gefrierkultur angeimpft. Die Übernachtskulturen wurden für ca. 16 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert.

Tabelle 8. Endkonzentrationen der Antibiotika

Plasmid	Antibiotikum	C _f
pMA-T	Ampicillin	100 µg/mL
pBADN	Ampicillin	100 µg/mL
pET-22b(+)	Ampicillin	100 µg/mL
pET-28a(+)	Kanamycin	50 µg/mL
pACYCDuet™-1	Chloramphenicol	25 µg/mL
pGAPZα	Zeocin	100 µg/mL
pIT2	Tetracyclin	10 µg/mL

5.2.2 Übernachtskulturen von *Pichia pastoris*

Um *P. pastoris* X-33 für eine Expression, Isolierung von chromosomaler DNA oder eine Transformation heranzuziehen, wurden 10 mL YPD-Medium mit dem entsprechenden rekombinanten Stamm oder Wildtyp inokuliert und für ca. 16 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Zur Kultivierung der rekombinanten, Zeocin-resistenten Stämme wurde Zeocin in einer Endkonzentration von 100 µg/mL hinzugegeben.

5.2.3 Gefrierkulturen

Zur dauerhaften Aufbewahrung der verwendeten Stämme wurden Gefrierkulturen hergestellt. Von den *E. coli*-Stämmen wurden Übernachtskulturen hergestellt, von denen jeweils 900 µL in einem sterilen Eppendorfreaktionsgefäß mit 68 µL DMSO gemischt und bei -80 °C eingefroren wurden.

5.2.4 Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Zur Plasmidisolation aus *E. coli* wurde eine Übernachtskultur hergestellt und das Plasmid mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit entsprechend den Herstellerangaben mit folgenden Ausnahmen isoliert. Abweichend von dem Standardprotokoll wurde der optionale Waschschrift mit dem Waschpuffer AW durchgeführt und die Plasmid-DNA in 35 µL auf 70 °C erwärmtem Elutionspuffer EB eluiert. Plasmide, die für die Transformation in elektrokompente Zellen oder zur Sequenzierung vorgesehen waren, wurden in 35 µL auf 70 °C erwärmtem destilliertem Wasser eluiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration bestimmt und die Plasmidlösungen bei -20 °C gelagert.

5.2.5 Isolierung chromosomaler DNA aus *Pichia pastoris*

Zur Isolierung der chromosomalen DNA wurden zunächst 2 mL einer Übernachtskultur eines rekombinanten *P. pastoris* X-33-Stammes 1 min mit 20238 x g (Eppendorf Centrifuge 5424) in ein Eppendorfreaktionsgefäß abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250 µL TEN-Puffer resuspendiert, mit 250 µL TENST-Puffer gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Suspension in regelmäßigen Abständen kurz mit einem Vortex-Genie® 2 gevortext, um den Aufschluss zu verbessern. Langes Vortexen wurde vermieden, um eine zu starke Fragmentierung der DNA zu verhindern. Anschließend wurden 500 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24: 24: 1) zu der aufgeschlossenen Zellsuspension hinzu pipettiert und 90 s gevortext, um die chromosomale DNA zu extrahieren. Die Emulsion wurde 10 min mit 20238 x g zentrifugiert, um die Phasen wieder zu trennen. Die organische Phase (unten) wurde in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt und der Extraktionsschritt mit der wässrigen Phase wiederholt. Die wässrige Phase wurde verworfen, die organische Phase wurde mit 50 µL einer 3 M Natriumacetatlösung und 500 µL eiskaltem Isopropanol gemischt und 5 min bei -20 °C inkubiert, damit die isolierte DNA präzipitierte. Anschließend wurde die Mischung 30 min mit 20238 x g bei 4 °C zentrifugiert, um die präzipitierte DNA zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und die DNA in 1 mL eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde

erneut 30 min mit 20238 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, verworfen und das Pellet bei RT an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die chromosomale DNA in 50 µL destilliertem Wasser gelöst, die Konzentration bestimmt und bei -20 °C gelagert.

5.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mit einem NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer bei $\lambda = 260$ nm bestimmt. Die Reinheit der Lösung wurde über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm kontrolliert. Der optimale Wert liegt bei 1,8.

5.2.7 Agarosegelelektrophorese

Restriktionsverdau und PCRs wurden durch Agarosegelelektrophorese (AGE) in einem Agarosegelelektrophoresesystem der Firma Carl Roth überprüft. DNA-Moleküle wurden ihrer Größe nach über ein 1 %-Agarosegel in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Zur Vorbereitung der Proben wurden 1 bis 3 µL DNA-Lösung mit 2 µL 6 x AGE-Ladepuffer gemischt und mit destilliertem Wasser auf 12 µL aufgefüllt. Die vorbereiteten Proben wurden auf das Gel aufgetragen und 30 bis 35 min mit 100 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurden jeweils 3 µL DNA-Marker, gemischt mit 2 µL 6 x AGE-Ladepuffer und 7 µL destilliertem Wasser, aufgetragen. Zum Detektieren der DNA wurde das Gel im Anschluss an die Auftrennung 10 bis 15 min in einem Ethidiumbromidbad (0,05 µg/mL Ethidiumbromid) angefärbt und anschließend ein Bild mit einem U:Genius Compact Gel Imaging System aufgenommen. Alternativ wurde das Gel bereits beim Gießen mit 0,01 % Roti®-Safe GelStain versetzt, so dass das Bild direkt im Anschluss an die AGE aufgenommen werden konnte.

Um einen Restriktions- oder PCR-Ansatz über präparative Agarosegelelektrophorese aufzureinigen, wurde zunächst der gesamte Ansatz mit 6 x AGE-Ladepuffer versetzt und über ein Agarosegel aufgetrennt. Die Banden mit den aufzureinigenden Fragmenten wurden auf einem BioView-Transilluminator mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde dann mittels des Nucleo-Spin® Extract II-Kit entsprechend den Herstellerangaben isoliert und in 35 µL auf 70 °C erwärmtem Elutionspuffer eluiert. Die DNA-Konzentration wurde bestimmt und die Lösung bei -20 °C gelagert.

5.2.8 Restriktionsverdau

Um die Elicitingene in die Expressionsplasmide zu klonieren, wurden Gene und Plasmide zunächst unter Einsatz von Restriktionsenzymen der New England BioLabs® Inc verdaut. Der Standardansatz eines Restriktionsverdau mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen enthielt 1 - 5 µg DNA, jeweils 10 U von beiden Restriktionsenzymen und 5 µL 10 x NEBuffer 4. Das Gemisch wurde anschließend mit destilliertem Wasser auf 50 µL aufgefüllt und für 4 h in einem Thermostat plus bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Restriktionsenzyme entsprechend Herstellerangaben Hitze-inaktiviert und die

Ansätze über präparative Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Zur Linearisierung der pGAPZαA-Plasmide wurde *Bsp*HI eingesetzt und das Volumen des zweiten Enzyms durch destilliertes Wasser substituiert.

5.2.9 Ligation

Um die Elicitine schließlich in die Expressionsplasmide zu klonieren, wurden die verdauten Genfragmente und Plasmide mit einer T4 DNA Ligase ligiert. Um eine optimale Ligation zu gewährleisten, wurde das Gen in 5-fachem Überschuss zum Plasmid eingesetzt. Pro Ligationsansatz wurden 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die Menge des Gens wurde über folgende Formel berechnet:

$$m \text{ [ng]} = \frac{L \text{ Gen}}{L \text{ Plasmid}} * 5 * 100 \text{ ng}$$

Formel 1. Berechnung der benötigten Masse eines Gens zur Ligation mit 100 ng Plasmid-DNA.

<i>m</i>	Masse Gen [ng]
<i>L Gen</i>	Länge DNA-Fragment Gen [bp]
<i>L Plasmid</i>	Länge DNA-Fragment Plasmid [bp]

Der Ligationsansatz wurde entsprechend Tabelle 9 angesetzt und für 2 h in einem Thermostat plus bei 16 °C inkubiert. Zusätzlich zu den Ligationsansätzen wurde für jedes Plasmid eine Religationskontrolle angesetzt, in der statt des Genfragments destilliertes Wasser eingesetzt wurde. Nach 2 h Reaktionszeit wurde die Ligase durch 10 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert und die Ligationsansätze und Religationskontrollen direkt im Anschluss in *E. coli* Top10 oder *E. coli* DH5α transformiert (siehe Abschnitt 5.2.14.1).

Tabelle 9. Zusammensetzung eines Ligationsansatzes

Komponente	Volumen
Gen	<i>m</i> ng
Plasmid	100 ng
10 x T4-Ligase-Puffer	1 µL
T4 DNA Ligase	200 U
destilliertes Wasser	auf 10 µL auffüllen

5.2.10 Polymerasekettenreaktion

Um eine Gensequenz von einem Plasmid zu amplifizieren, wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) in einem Mastercycler® personal durchgeführt. Um Fehler während der Replikation der DNA auf ein Minimum zu reduzieren, wurde die *proof reading* Phusion-Polymerase von New England Biolabs® Inc. (Frankfurt) eingesetzt. Die PCR wurde mit den Reaktionsbedingungen durchgeführt, welche in Tabelle 11 eingesehen werden können. Der Ansatz wurde entsprechend Tabelle 10 angesetzt und die PCR gestartet. Als Reaktionspuffer diente gewöhnlich HF-Puffer, außer es wurde anders

vermerkt. Im Anschluss an die PCR wurden die Ansätze über präparative Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. War die Schmelztemperatur (T_m) der PCR-Primer unterschiedlich, wurde die niedrigere der beiden Schmelztemperaturen zur Berechnung der Hybridisierungstemperatur verwendet. Lag die Schmelztemperatur beider Primer über 72 °C, wurde die PCR in einem zweistufigen Temperaturprogramm durchgeführt, in dem der Hybridisierungsschritt zu Gunsten einer verlängerten Elongation von 30 s übersprungen wurde.

Tabelle 10. Zusammensetzung des Ansatzes einer Polymerasekettenreaktion

Komponente	C_f
5 x Phusion® HF/GC Puffer	1 x
parentale DNA	100 ng
10 mM dNTPs	200 μ M
5 μ M Primer A	0,5 μ M
5 μ M Primer B	0,5 μ M
Phusion Polymerase (2 U/ μ L)	1 U
(DMSO, optional)	0,02 %
destilliertes Wasser	auf das Endvolumen auffüllen

Tabelle 11. Reaktionsbedingungen einer Polymerasekettenreaktion

Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	98 °C	30 s
35	Denaturierung	98 °C	10 s
	Hybridisierung	T_m Primer - 2 °C	15-30 s
	Elongation	72 °C	15-30 s/kb
1	Elongation	72 °C	7 min

5.2.11 Kolonie-PCR

Um Gene in rekombinanten Plasmiden in *E. coli* und das β -Cinnamoylgen *cin* in der chromosomalen DNA von *P. pastoris* nachzuweisen, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Da die Amplifikation ausschließlich der Überprüfung der korrekten Klonierung diene, konnte eine Taq-Polymerase verwendet werden. Für die Kolonie-PCR eines Plasmids aus *E. coli* wurde ein wenig Zellmaterial einer einzelnen Kolonie von einer LB-Agarplatte mit einer Pipettenspitze in 10 μ L destilliertem Wasser in einem Eppendorfreaktionsgefäß resuspendiert. Die Proben wurden für 10 min in einem Thermostat plus bei 95 °C denaturiert und anschließend für 10 s mit 20238 x g abzentrifugiert. Für die folgende Kolonie-PCR wurden 3 μ L des Überstandes als parentale DNA eingesetzt. Als parentale DNA für die Kontrolle der *P. pastoris*-Klone dienten 3 μ L der isolierten chromosomalen DNA-Lösungen. Die Ansätze wurden, wie in Tabelle 12 beschrieben, angesetzt und die PCR mit den Reaktionsbedingungen aus Tabelle 13 durchgeführt. Im Anschluss an die Kolonie-PCR wurden die Ansätze mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

Tabelle 12. Zusammensetzung des Ansatzes einer Kolonie-PCR

Komponente	C _f
10 x Taq-Puffer	1 x
parentale DNA	3 µL isolierte DNA-Lösung
10 mM dNTPs	0,2 mM
5 mM Primer A	0,5 mM
5 mM Primer B	0,5 mM
Taq-Polymerase (5U/µL)	2,5 U
destilliertes Wasser	auf das Endvolumen auffüllen

Tabelle 13. Reaktionsbedingungen einer Kolonie-PCR

Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95 °C	3 min
35	Denaturierung	95 °C	10 s
	Elongation	72 °C	30 s
1	Elongation	72 °C	7 min

5.2.12 Rationales Proteindesign

Zur Berechnung der Doppelmutanten von β -Cinnamomin mit reduzierter Disulfidbrückenanzahl (Disulfidbrücken: Cys27/Cys56, Cys3/Cys71 und Cys51/Cys95) wurde YASARA mit der Versionsnummer 12.11.25 mit dem Plug-in FoldX Version 3.0 Beta 5.1 (c) [36,103] verwendet. Als Grundlage wurde dafür die PDB-Datei 2aib mit der β -Cinnamominkristallstruktur verwendet. In der PDB-Datei ist β -Cinnamomin als Dimer dargestellt [98], zur Berechnung wurde jedoch nur Monomer A benutzt. Die Struktur wurde über die FoldX-Funktion „Repair Object“ überarbeitet, um jede Aminosäure in die Standardrotamere-Konformation zu setzen. Anschließend wurden mittels der FoldX-Funktion „Mutate multiple residues“ 27 Basismutanten generiert, in denen jeweils das erste Cystein von einer der drei Disulfidbrücken (Cys56, Cys71 oder Cys95) durch eine der Aminosäuren Alanin, Serin, Threonin, Valin, Leucin, Isoleucin oder Asparagin ausgetauscht und das zweite Cystein der jeweiligen Disulfidbrücke (Cys27, Cys3 bzw. Cys51) durch Alanin ersetzt wurde. Dann wurde das zweite Cystein in jeder der Basismutanten durch die Funktion „Mutate residue“ gegen alle 20 verschiedenen Aminosäuren ausgetauscht und die Energiedifferenz $\Delta\Delta G$ (kcal/mol) der generierten Doppelmutanten zur jeweiligen Basismutante notiert. Im Anschluss wurden die energetisch sinnvollsten Doppelmutanten ausgewählt, die ausgetauschten Aminosäuren durch die FoldX-Funktion „Mutate multiple residues“ wieder gegen Cystein ausgetauscht und so die Energiedifferenz $\Delta\Delta G$ der Doppelmutanten zum Wildtypprotein berechnet. Die Varianten mit den niedrigsten Werten für $\Delta\Delta G$ waren die Varianten mit dem geringsten Stabilitätsverlust und wurden für die ortsspezifische Mutagenese ausgesucht.

Die ortsspezifische Mutagenese wurde mit dem PfuTurbo® Hotstart PCR Master Mix der Firma Stratagene durchgeführt. In einer PCR-Reaktion wurden 50 bis 100 ng pET-28a(+)MalEssCinHis-Plasmid-

DNA mit den Primern aus Tabelle 16 amplifiziert. Die Primer wurden entsprechend der Anleitung des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene designt (Sequenzen siehe Tabelle 5 in Abschnitt 5.1.2) und die PCR entsprechend den Herstellerangaben mit dem Temperaturprogramm aus Tabelle 15 durchgeführt. Die methylierte parentale DNA wurde mittels *DpnI* verdaut (50 µL PCR-Ansatz + 20 U *DpnI*, 3 h bei 37 °C), der Ansatz anschließend aufgereinigt und in *E. coli* DH5α transformiert (siehe Abschnitt 5.2.14.1). Alle Kolonien von jeweils einer Agarplatte wurden in 5 mL LB-Medium resuspendiert und die Plasmide der Suspensionen isoliert (siehe Abschnitt 5.2.4). Die isolierten Plasmidlösungen dienten als parentale DNA für die zweite ortsspezifische Mutagenese, in der die zweiten Cysteine C71, C56 und C95 ausgetauscht werden sollten. Der Ansatz wurde im Anschluss wieder mit *DpnI* verdaut und die Plasmide mit der Doppelmutation in *E. coli* DH5α transformiert (siehe Abschnitt 5.2.14.1).

Tabelle 14. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes einer ortsspezifischen Mutagenese

Komponente	C _f
Mastermix	1 x
pET-28a(+)MalEssCinHis	50 - 100 ng
5 mM Primer A	0,2 mM
5 mM Primer B	0,2 mM
Destilliertes Wasser	Auf Endvolumen auffüllen

Tabelle 15. Temperaturprogramm einer ortsspezifischen Mutagenese

Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95 °C	2 min
16	Denaturierung	95 °C	30 s
	Hybridisierung	55 °C	60 s
	Elongation	68 °C	5 min 30 s

Tabelle 16. Primer für die ortsspezifische Mutagenese zur Generierung der Doppelmutanten von β-Cinnamomin

Mutation	Forward-Primer	Reverse-Primer
C3M	C3MFwd	C3MRev
C27M	C27MFwd	C27MRev
C51M	C51MFwd	C51MRev
C71S	C71SFwd	C71SRev
C71N	C71NFwd	C71NRev
C56A	C56AFwd	C56ARev
C56S	C56SFwd	C56SRev
C95L	C95LFwd	C95LRev

5.2.13 Herstellung kompetenter Zellen

5.2.13.1 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Methode von Hanahan hergestellt [45]. Alle Materialien und Gebrauchsgegenstände wurden vor Beginn bei 4 °C gelagert. Zunächst wurden 100 mL SOB-Medium mit 1 mL einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm bis zu $OD_{600} = 0,5$ inkubiert. Die Kultur wurde auf zwei gekühlte 50 mL Falcons aufgeteilt und 15 min auf Eis inkubiert. Die *E. coli*-Zellen wurden 25 min mit 3220 x g bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets vorsichtig auf Eis in 8 mL kaltem RF1-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min auf Eis inkubiert, mit 3220 x g bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden auf Eis vorsichtig in 2 mL kaltem RF2-Puffer resuspendiert und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden dann zu je 80 µl in sterile gekühlte Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.2.13.2 Herstellung von elektrokompetenten *Escherichia coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen wurden alle Materialien und Gebrauchsgegenstände vor Beginn der Arbeiten auf 4 °C gekühlt. Eine Kultur mit 250 mL LB-Medium wurde mit 2 mL einer *E. coli* Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ herangezogen. Die Kultur wurde in einen gekühlten Zentrifugenbecher überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min mit 4424 x g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 250 mL eiskaltem, sterilem destilliertem Wasser resuspendiert und erneut für 10 min mit 4424 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Zellpellet in 125 mL eiskaltem, sterilem destilliertem Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min bei 4 °C und 4424 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 20 mL eiskaltem sterilen 10 % Glycerin resuspendiert und die Kultur in gekühlte 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden 15 min bei 4 °C mit 11952 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets in 2 mL eiskaltem sterilem 10 %-Glycerin resuspendiert und die kompetenten Zellen zu je 40 µl in gekühlte sterile Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.2.13.3 Herstellung elektrokompetenter *Pichia pastoris*-Zellen

P. pastoris X-33 wurde nach dem *condensed protocol* von Lin-Cereghino *et al.* hergestellt [24]. Eine Übernachtskultur von *P. pastoris* X-33 wurde hergestellt und damit 50 mL YPD-Medium mit einer OD_{600} von 0,15 bis 0,2 inokuliert. Anschließend wurde die Kultur bei 30 °C und 250 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,8 bis 1,0 wachsen gelassen. Die Kultur wurde in ein 50 mL Falcon überführt und 5 min mit 500 x g bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 9 mL eiskaltem sterilen BEDS mit 1 M DTT resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 30 °C und

100 rpm inkubiert und erneut 5 min mit 500 x g bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 mL BEDS ohne DTT resuspendiert. Die elektrokompenten Zellen wurden zu je 80 µL in eiskalte sterile Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert und direkt im Anschluss für die Transformation der pGAPZαA-Plasmide verwendet.

5.2.14 Transformation

5.2.14.1 Transformation in chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen

Zunächst wurden 1-5 µL Plasmidlösung (ca. 100 ng) oder 10 µL Ligationsansatz in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und 5 min auf Eis gestellt. Die DNA-Lösung wurde mit 80 µL kompetenten *E. coli*-Zellen, die zuvor auf Eis aufgetaut wurden, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz in einem Thermostat plus für 90 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Sofort im Anschluss wurden 900 µL LB-Medium hinzupipettiert und der Ansatz für 1 h in einem Thermomixer 5436 bei 37 °C und 750 rpm inkubiert, um die Antibiotikaresistenzen auszubilden. Anschließend wurde der Ansatz auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Dazu wurden 100 µL Ansatz direkt ausplattiert und der Rest 1 min mit 20238 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 100 µL verworfen, das Zellpellet resuspendiert und ausgestrichen. Antibiotika wurden dem transformierten Plasmid entsprechend eingesetzt (siehe Tabelle 8 in Abschnitt 5.2.1). Die LB-Agarplatten wurden für ca. 16 h bei 37 °C über Nacht inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

5.2.14.2 Transformation in elektrokompente *Escherichia coli*-Zellen

Ein Aliquot mit 40 µL elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µL Plasmidlösung (ca. 100 ng) gemischt. Die Mischung wurde in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand $d = 2$ mm) überführt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Küvette mit einem Papiertuch von Eis und Kondenswasser befreit und der Transformationsansatz zügig in einem Elektroporator 2510 mit 2500V für 5 ms elektroporiert. Direkt danach wurden 900 µL LB-Medium hinzupipettiert und der Transformationsansatz 1 h in einem Thermomixer 5436 bei 37 °C und 750 rpm inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz, wie in Abschnitt 5.2.14.1 beschrieben, auf LB-Agarplatten ausgestrichen.

5.2.14.3 Transformation elektrokompenter *Pichia pastoris*-Zellen

P. pastoris X-33 wurde nach dem *condensed protocol* von Lin-Cereghino *et al.* transformiert, indem das Expressionsplasmid linearisiert und vollständig durch homologe Rekombination in die chromosomale DNA von *P. pastoris* integriert wurde [24].

Um die Plasmide pGAPZαACin und pGAPZαAHiscin zu linearisieren, wurde jeweils ca. 2 µg Plasmid-DNA, wie in Abschnitt 5.2.8 beschrieben, mit *Bsp*HI verdaut. Um die linearisierte Plasmid-DNA zu entsalzen, wurde die DNA im Anschluss aus dem Restriktionsansatz gefällt. Dazu wurden 3 µL 3 M

Natriumacetat und 30 µL Isopropanol mit dem Ansatz gemischt. Die Mischung wurde für 1 h bei -80 °C inkubiert und 30 min mit 20238 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit 50 µL eiskaltem 70 %-Ethanol gewaschen und erneut 30 min mit 20238 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, verworfen und das Pellet bei RT an der Luft getrocknet, bevor es in 35 µL destilliertem Wasser resuspendiert wurde. Anschließend wurde die Konzentration mittels NanoDrop™ 1000 bestimmt und die entsalzte linearisierte Plasmidlösung bei -20 °C gelagert, bis sie transformiert wurde.

Zur Transformation in *P. pastoris* wurden 1-2 µL der linearisierten Plasmidlösung (ca. 300 ng) mit 80 µL elektrokompenten *P. pastoris* X-33-Zellen gemischt, in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand $d = 2$ mm) gefüllt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Küvette wurde mit einem Tuch von Eistrückständen und Kondenswasser befreit und die Lösung im Elektroporator 2510 bei 1500 V für 5 ms elektroporiert. Direkt im Anschluss wurden 0,5 mL YPD-Medium und 0,5 mL sterile 1 M Sorbitollösung hinzugegeben und die Zellen durch langsames Invertieren vorsichtig gemischt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 2 h in einem Thermomixer 5436 bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Danach wurden die transformierten *P. pastoris*-Zellen wie in Abschnitt 5.2.14.1 beschrieben auf YPD-Agarplatten mit 100 µg/mL Zeocin ausplattiert. Die Agarplatten wurden 72 h bei 30 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

5.2.15 Expression in *Escherichia coli*

In *E. coli* wurde die Expression der vier Elicitine mit und ohne His-tag im Cytoplasma der *E. coli*-Stämme SHuffle® T7 und SHuffle® T7 Express getestet und die Expression und Sekretion der β -Elicitine in das Periplasma der *E. coli*-Stämme BL21(DE3) und C43(DE3) untersucht. Zudem wurden sowohl CYP154C5, Pdx und PdR, als auch CYP154C5, Pdx, PdR und β -Cinnamomin in *E. coli* C43(DE) coexprimiert.

5.2.15.1 Expression der Elicitine im Schüttelkolben

Zunächst wurde eine Übernachtskultur eines *E. coli*-Stammes, transformiert mit einem der Expressionsplasmide, hergestellt. Mit dieser wurden 25 - 250 mL TB-, TBS- oder LB-Medium mit Antibiotika entsprechend Tabelle 8 (siehe Abschnitt 5.2.1) in einem Erlenmeyerkolben mit einer OD_{600} von 0,05 bis 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm bis $OD_{600} = 1$ inkubiert. Bei Erreichen von $OD_{600} = 1$ wurde die Expression der Elicitine mit pET-28a(+) und pET-22b(+) durch 0,2 - 0,8 mM IPTG und die Expression der Elicitine mit pBADN durch 0,002 - 0,2 % Arabinose induziert und die Kulturen für 24 - 48 h bei Temperaturen von 15-37 °C und 250 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch 20 - 30 min Zentrifugation mit 17696 x g bei 4 °C geerntet und die Zellpellets bis zur Proteinaufreinigung bei -20 °C gelagert. Um die Expression der Elicitine zu überprüfen, wurden während der Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben zur Analyse mittels SDS-PAGE genommen.

5.2.15.2 Expression von β -Cinnamomin im Fermenter

Die Expressionen im 4,5 L- und 10 L-Maßstab wurden in einem Biostat® M bzw. Biostat® ED nach dem *Batch*-Prinzip durchgeführt. Eine Übernachtskultur von *E. coli* C43(DE3), transformiert mit pET-28a(+)MalEssCinHis, wurde hergestellt. Eine bzw. zwei Vorkulturen mit je 250 mL TB-Medium mit 50 µg/mL Kanamycin wurden mit der Übernachtskultur angeimpft und über Nacht für ca. 16 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Der Fermenter wurde mit 4,05 bzw. 8,55 L TB-Medium autoklaviert und das Medium anschließend mit 450 mL bzw. 950 mL Kaliumphosphatpuffer für TB-Medium auf das Endvolumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde vor Start der Fermentation mit 5 M NaOH und 5 M H₃PO₄ auf pH 7,0 geregelt. Ein bis drei Tropfen Antifoam 204 und 50 µg/mL Kanamycin wurden steril hinzugefügt und die Begasung auf 2 bzw. 5 L/min eingestellt. Der Fermenter wurde jeweils mit der gesamten Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 300 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 1 inkubiert. Die β -Cinnamominexpression wurde mit 0,4 mM IPTG induziert und die Kultur für 24 h bei 30 °C und 300 rpm bei konstanter Begasung inkubiert. Das Wachstum der Kulturen wurde durch OD₆₀₀-Messung kontrolliert. Während der Expression wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen, damit die Expression auf dem SDS-Gel analysiert werden konnte.

5.2.15.3 Coexpression von CYP154C5, Pdx, PdR und β -Cinnamomin im Schüttelkolben

Zur Coexpression von CYP154C5, Pdx, PdR und β -Cinnamomin wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)MalEssCinHis hergestellt. Mit der Übernachtskultur wurden 500 mL TB-Medium in einem 2 L-Erlenmeyerkolben mit 10 µg/mL Tetracyclin, 25 µg/mL Chloramphenicol und 50 µg/mL Kanamycin angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 1 herangezogen, anschließend die Expression aller vier Proteine mit 0,4 mM IPTG induziert und die Kultur für 48 h bei 30 °C und 250 rpm weiter inkubiert. Gleichzeitig mit der Induktion wurden 500 µL 1000 x Spurenelementlösung und 0,5 mM δ -Ala hinzugegeben. Nach 48 h wurde eine Probe genommen, die Zellen durch Zentrifugation mit 11325 x g und 4 °C für 20 min geerntet und in drei Zellpellets bei -20 °C gelagert.

5.2.15.4 Coexpression von CYP154C5, Pdx und PdR im Fermenter

Die Expressionen von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB im 10 L-Maßstab zur Lagerung bei -20 °C wurde in einem Biostat® ED nach dem *Batch*-Prinzip durchgeführt. Eine Übernachtskultur von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB wurde hergestellt und zwei Vorkulturen mit je 250 mL TB-Medium mit 10 µg/mL Tetracyclin und 25 µg/mL Chloramphenicol mit der Übernachtskultur angeimpft. Die Vorkulturen wurden über Nacht für ca. 16 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Der Fermenter wurde mit 8,55 L TB-Medium autoklaviert, das Medium anschließend mit 950 mL Kaliumphosphatpuffer für TB-Medium aufgefüllt und der pH-Wert mit 5 M NaOH und 5 M H₃PO₄ auf pH 7,4 eingestellt. Ein bis drei Tropfen Antifoam 204, 10 µg/mL Tetracyclin, 25 µg/mL Chloramphenicol,

10 mL 1000 x Spurenelementlösung und 0,5 mM δ -ALA wurden steril hinzugefügt und die Begasung auf 5 L/min eingestellt. Die Hauptkultur im Fermenter wurde anschließend mit beiden Vorkulturen angeimpft, bis zu $OD_{600} = 1$ bei 30 °C und 300 rpm inkubiert und dann die Expression mit 0,8 mM IPTG induziert. Anschließend wurde die Kultur für 24 h mit 300 rpm bei 30 °C weiter inkubiert. Nach 24 h wurden eine Probe genommen, die Hauptkultur anschließend in mehreren Schritten durch Zentrifugation bei 11325 x g und 4 °C für 20 min geerntet und in mehreren Zellpellets bei -20 °C gelagert.

5.2.16 Expression in *Pichia pastoris* im Schüttelkolben

P. pastoris X-33 wurde zur konstitutiven Expression des Elicitins β -Cinnamomin getestet. Eine Übernachtskultur von *P. pastoris* X-33, transformiert mit pGAPZ α ACin oder pGAPZ α AHisCin, wurde hergestellt und eine Kultur mit 50 mL YPD- oder YNB-Medium mit 100 μ g/mL Zeocin mit einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,1$ angeimpft. Da pGAPZ α A ein Plasmid mit konstitutivem GAP-Promotor ist, wurden die Zellen im Anschluss 72 - 96 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert, ohne dass die Expression zusätzlich induziert werden musste. Im Anschluss an die Expression wurden die Zellen durch 30 min Zentrifugation bei 17696 x g bei 4 °C geerntet. Der Kulturüberstand wurde in ein frisches Gefäß überführt, die Proteine durch Ammoniumsulfatfällung oder Filtration aufkonzentriert und auf dem SDS-Gel analysiert. Zusätzlich wurde direkt nach dem Animpfen der Hauptkultur und zu verschiedenen Zeitpunkten der Expression jeweils zusätzlich eine Probe genommen, die mittels SDS-PAGE untersucht wurde.

5.2.17 Probenahme zur Analyse der Expressionen mittels SDS-PAGE

5.2.17.1 Probenahme der *Escherichia coli*-Expressionen

Zur Analyse der Expressionen mittels SDS-PAGE und Western-Blot wurden alle Proben mit einer gleichen Menge an Zellen genommen, damit die Expression pro Zelle unabhängig von der Zelldichte untersucht werden und immer dieselbe Menge Protein auf die SDS-Gele aufgetragen werden konnte. Um die Zellemenge der Proben zu vereinheitlichen, wurden jeweils eine Probe mit einer Zellmenge genommen, die einer Probe mit 1 mL Volumen und einer Zelldichte von $OD_{600} = 5$ entsprach. Die Proben wurden 1 min mit 20238 x g abzentrifugiert, mit destilliertem Wasser in einer Zelldichte von $OD_{600} = 20$ resuspendiert und durch Ultraschall mit einem Vibra-Cell™ VCX130 Sonifikator durch drei Zyklen von je 30 s Dauer und 45 s Pause mit einer Amplitude von 45 % auf Eis aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden 10 min mit 20238 x g abzentrifugiert, der Überstand mit dem löslichen Protein in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt und das Zellpellet in demselben Volumen wieder resuspendiert.

5.2.17.2 Isolierung der periplasmatischen Fraktion von *Escherichia coli*-Proben

Eine Probe einer *E. coli*-Expression wurde, wie im vorherigen Abschnitt 5.2.17.1 beschrieben, genommen. Das Zellpellet wurde in 500 μ L Spheroblastpuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inku-

biert. Die Zelltrümmer und die cytoplasmatische Fraktion wurden 10 min mit 1150 x g abzentrifugiert und der Überstand mit der periplasmatischen Fraktion in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in 500 µL 50 mM MES-Puffer pH 6,5 resuspendiert und 90 s mit einem Vortex-Genie® 2 gevortext, um die cytoplasmatische Fraktion von den Zelltrümmern zu lösen. Die Suspension wurde 5 min mit 20238 x g abzentrifugiert, der Überstand mit der cytoplasmatischen Fraktion in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt und das Pellet mit den Zelltrümmern in 500 µL 50 mM MES-Puffer pH 6,5 resuspendiert.

5.2.17.3 Probenahme der *Pichia pastoris*-Expressionen

Um die Expression der *P. pastoris*-Expressionen zu untersuchen, wurde jeweils 1 mL Probe genommen und 1 min bei 20238 x g abzentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt, die Zellpellets in 500 µL PBS-Puffer pH 7,4 resuspendiert und durch drei Zyklen von je 30 s Dauer sowie 30 s Pause auf Eis durch Ultraschall mit dem Vibra-Cell™ VCX130 mit einer Amplitude von 65 % aufgeschlossen. Die Proben wurden 30 min mit 20238 x g abzentrifugiert, der zellfreie Extrakt in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt und das Zellpellet in 500 µL PBS-Puffer pH 7,4 resuspendiert.

5.2.18 Isolierung der periplasmatischen Fraktion von *Escherichia coli*

Das Zellpellet einer 500 mL Expression von *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+)MalEssCin wurde in 35 mL Spheroblastpuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer und die cytoplasmatische Fraktion wurden 3,5 h mit 3220 x g abzentrifugiert und der Überstand mit der periplasmatischen Fraktion in ein frisches Falcon überführt. Das Pellet wurde in 35 mL 50 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert, 5 min mit einem Vortex-Genie® 2 gevortext und 30 min mit 47808 x g abzentrifugiert. Der Überstand mit der cytoplasmatischen Fraktion wurde in ein frisches Falcon überführt und das Pellet mit den Zelltrümmern in 35 mL 50 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert. Die Periplasmatische Fraktion wurde über Nacht in einem Spectra/Por Dialyseschlauch mit einem *molecular weight cut off* (MWCO) von 3,5 kDa bei 4 °C gegen 20 mM MES pH 6,5 dialysiert und im Anschluss filtriert (Porenweite $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$).

5.2.19 Zellaufschluss

Das Zellpellet einer Elicitinexpression wurde in 2 - 3 mL/g_{Pellet} Puffer resuspendiert, 60 s mit dem Vibra-Cell™ VCX130 Sonifikator mit 45 % Amplitude homogenisiert und in fünf Zyklen mit 1500 bar in der EmulsiFlex-C3 French-Press auf Eis aufgeschlossen. Alternativ wurden das Zellpellet durch zehn Zyklen mit je 30 s Sonifikation mit einer Amplitude von 65 % und je 45 s Pause zwischen den Pulsen auf Eis aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch 30 min Zentrifugation mit 47808 x g bei 4 °C pelletiert. Der zellfreie Überstand wurde in 50 mL Falcons überführt und mit einem Spritzenfilter (Porenweite $\varnothing = 0,45 - 0,8 \mu\text{m}$) filtriert.

5.3 Biochemische Methoden

5.3.1 Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Tris-Tricin-SDS-PAGE wurde nach der Methode von Schägger und von Jagow durchgeführt [100], die an das Mini PROTEAN® Tetra Cell SDS-PAGE System der Firma Bio-Rad angepasst wurde.

Um Proben für die SDS-PAGE vorzubereiten, wurden 18 μL Probe mit 6 μL 4 x SDS-PAGE Ladepuffer gemischt und für 5 min bei 95 $^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Die Proben wurden für 5 s in einer Tischzentrifuge mit 9391 x g anzentrifugiert und anschließend direkt für die SDS-PAGE verwendet oder bei -20 $^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17. Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für ein Gel der SDS-PAGE

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Destilliertes Wasser	1,295 mL	720 μL
40 % Acrylamid-Lösung	1,180 mL	130 μL
SDS-PAGE-Gelpuffer pH 8,45	1,575 mL	-
SDS-PAGE-Gelpuffer pH 6,8	-	125 μL
Glycerin	600 μL	-
10 % SDS-Lösung	-	10 μL
10 % APS-Lösung	40 μL	10 μL
TEMED	10 μL	1 μL

Nach dem Polymerisieren wurde das SDS-Gel in die Mini PROTEAN® Tetra Cell-Kammer eingesetzt. Die innere Kammer zwischen zwei Gelen wurde mit 1 x Kathodenpuffer und die äußere Kammer mit 1 x Anodenpuffer gefüllt. Die Proben wurden aufgetragen und das Gel 10 min bei 90 V laufen gelassen, bis die Proben aus dem Sammelgel in das Trenngel gelaufen waren. Anschließend wurde die SDS-PAGE für 70 bis 80 min bei 150 V fortgesetzt, bis der blaue Farbstoff des SDS-PAGE Ladepuffers aus dem Gel diffundierte. Das Gel wurde für 10 min in SDS-PAGE Färbelösung gefärbt und anschließend 1 h in 10 % Essigsäure entfärbt.

5.3.2 Western Blot

Um β -Cinnamomin spezifisch auf SDS-Gelen nachzuweisen, wurden Western Blots mit dem Semi-Dry Western Blot System durchgeführt. Zur Detektion von β -Cinnamomin wurde das QIAexpress Detection and Assay Kit verwendet, welches ein Konjugat aus Ni-NTA und Alkalischer Phosphatase enthält, das spezifisch an den His-tag bindet.

Nitrozellulosemembran und zwei Stücke Whatman Gel Blotting-Papier wurden auf die Größe des SDS-Gels zurechtgeschnitten, die Nitrozellulosemembran 10 min in 1 x Transferpuffer aktiviert und das Whatman Papier in 1x Transferpuffer getränkt. Ein SDS-Gel wurde, wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben, hergestellt, im Anschluss an die Elektrophorese jedoch nicht gefärbt, sondern 1 min in Transferpuffer gewaschen. Eines der beiden Whatman-Papierstücke wurde auf die Kathode gelegt.

Darauf folgten die Nitrozellulosefolie, das SDS-Gel und das zweite Stück Whatman Papier, wie in Abbildung 58 dargestellt. Abschließend wurde die Anode befestigt und der Western Blot 80-90 min mit 60 mA pro Gel laufen gelassen.

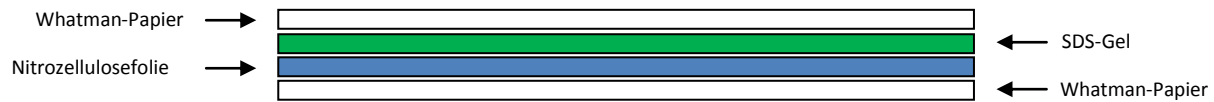


Abbildung 58. Aufbau eines Western Blots im Semi-Dry Western Blot System

Nach dem Blotten wurde die Membran 5 min in TBS-Puffer gewaschen und mit Ponceau-Rot anfärbt. Die Laufspuren wurden mit einem Stift markiert und die Membran in TBS-Puffer wieder entfärbt. Anschließend wurde die Membran 1 h in 3 % BSA, gelöst in TBS-Puffer, geblockt. Die Membran wurde einmal für 10 min in TBS-Puffer und zweimal für je 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Im folgenden Schritt wurde die Membran für 1 h mit dem 1:1000 in TBS-Puffer verdünnten Ni-NTA-AP Konjugat inkubiert. Anschließend wurden die drei Waschschrte, einmal für 10 min in TBS- und zweimal für je 10 min in TBST-Puffer, wiederholt. Zur Sichtbarmachung der β -Cinnamomin-Banden wurde die Membran in 1 mL BCIP/NBT Purple Liquid-Substrat im Dunkeln für 1 - 5 min inkubiert, bis die Banden deutlich zu erkennen waren. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurde die Membran in destilliertem Wasser gewaschen.

5.3.3 Ammoniumsulfatfällung

Um den Kulturüberstand der *P. pastoris*-Expressionen auf sekretiertes β -Cinnamomin zu untersuchen, wurden die Proteine des Kulturüberstandes zunächst durch Ammoniumsulfatfällung aufkonzentriert, bevor sie über Kationenaustauschchromatographie aufgereinigt werden konnten. Dazu wurde der Kulturüberstand einer 50 mL *P. pastoris*-Expression mit 200 mL einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung gemischt und die Mischung über Nacht für ca. 16 h bei 4 °C inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch 45 min Zentrifugation mit 17696 x g bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 mL PBS-Puffer pH 7,4 resuspendiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

5.3.4 Kationenaustauschchromatographie

Die Kationenaustauschchromatographien wurden über eine an eine ÄKTaprime™ angeschlossene XK26 Säule mit 25 mL Toyopearl Super SP-650c durchgeführt.

5.3.4.1 Aufreinigung der gefällten Proteine des Kulturüberstandes der *Pichia pastoris*-Expression

Das Konzentrat einer Ammoniumsulfatfällung des Kulturüberstandes einer 50 mL *P. pastoris*-Expression wurde mit Bindepuffer pH 6,5 auf ein Volumen von 40 mL aufgefüllt und auf eine mit 5 SV

20 mM MES pH 6,5 equilibrierte Säule aufgetragen. Das gebundene Protein wurde in 100 mL Elutionspuffer pH 6,5 durch einen Gradienten von 0 bis 100 % Elutionspuffer pH 6,5 über 100 mL eluiert. Während des Auftrags der Probe und während der Elution wurde der Durchfluss in 5 mL-Fractionen gesammelt, die im Anschluss an die Aufreinigung mittels SDS-PAGE auf β -Cinnamomin untersucht wurden.

5.3.4.2 Aufreinigung der periplasmatischen Fraktion *Escherichia coli*

Die isolierte periplasmatische Fraktion einer 500 mL Expression von *E. coli* C43(DE3) wurde auf eine mit 5 SV 20 mM MES pH 6,5 equilibrierte Säule aufgetragen und, wie im voran gegangenen Abschnitt 5.3.4.1 beschrieben, mittels Kationenaustauschchromatographie aufgereinigt.

5.3.5 Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie

5.3.5.1 Aufreinigung von α -Capsicein, α -Megaspermin, β -Cinnamomin und β -Cryptogein mittels Protino® Ni-IDA-Säulen

Für die Aufreinigung der vier Elicitine mittels His-tag im kleinen Testmaßstab wurden Protino Ni-IDA 2000-Säulen verwendet. Die Zellpellets von 250 mL Expressionen der vier Elicitine mit pET-28a(+) in *E. coli* SHuffle® T7 Express wurden in jeweils 2 mL 1 x LEW Buffer resuspendiert. Lysozym wurde in einer Konzentration von 1 mg/mL hinzugefügt und die Zellsuspensionen 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen 3 x 30 s mit dem Vibra-Cell™ VCX130 Sonifikator mit 50 % Amplitude aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch 30 min Zentrifugation mit 20238 x g bei 4 °C abgetrennt. Vier Protino Ni-IDA 2000-Säulen wurde mit je 4 mL 1 x LEW Puffer equilibriert, das zellfreie Lysat eines der vier Elicitins auf jeweils eine der Säule aufgetragen und die Elicitine im Anschluss mit drei mal 3 mL 1 x Elution Buffer in je drei Fraktionen eluiert.

5.3.5.2 Aufreinigung der resolubilisierten β -Cinnamominlösung

Die Aufreinigung der resolubilisierten β -Cinnamominlösung unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach dem *Gravity flow*-Prinzip über eine Poly-Prep®-Chromatographiesäule mit 2,5 mL Ni Sepharose™ 6 Fast Flow. Die Säule wurde mit 5 SV gefiltertem und entgastem destilliertem Wasser gewaschen und mit 10 SV Lysisbuffer pH 7,4 mit 6 M Harnstoff equilibriert. Danach wurde die β -Cinnamominlösung auf die Säule geladen und zweimal mit 5 SV Waschpuffer pH 7,4 mit 6 M Harnstoff gewaschen. Anschließend wurde das Protein in ein bis vier Elutionsfraktionen mit je 3 - 5 mL Elutionspuffer pH 7,4 mit 6 M Harnstoff eluiert. Die Säule wurde anschließend jeweils mit 10 SV destilliertem Wasser gespült und in 20 % Ethanol gelagert. Von dem Durchfluss der aufgetragenen Elicitinlösung, den Waschschritten und den Elutionsfraktionen wurden jeweils Proben genommen und auf dem SDS-Gel analysiert.

5.3.5.3 Aufreinigung der periplasmatischen β -Cinnamomin- und β -Cryptogein-expressionen

Zur Aufreinigung der Expressionen der beiden periplasmatisch über IMAC wurden 5 mL HisTrap™ HP-Säulen und eine XK26 Chromatographiesäule mit 25 mL Ni Sepharose™ 6 Fast Flow verwendet, die an die ÄKTAprime™ oder den ÄKTApurifier™ angeschlossen waren. *Stripping* und *Cleaning-in-place* der Säulen wurde laut Ni Sepharose™ 6 Fast Flow-Herstellerhandbuch durchgeführt.

Das destillierte Wasser und die Puffer, die zur Aufreinigung verwendet wurden, wurden vor Verwendung filtriert (Porenweite $\varnothing = 0,4 \mu\text{m}$) und entgast. Die chromatographische Aufreinigung wurde über die Leitfähigkeit verfolgt und der Proteingehalt über die A_{280} detektiert. Die Säulen wurden mit 10 - 15 SV destilliertem Wasser gespült, bis sich die gemessene Leitfähigkeit und die A_{280} stabilisierten. Im Anschluss wurden die Säulen mit 10 - 15 SV Lysispuffer equilibriert bis sich die Leitfähigkeit und die Absorption bei 280 nm wieder stabilisierten. Das zellfreie Extrakt wurde auf die Säule geladen und die Säule anschließend mit 10 - 15 SV Lysispuffer gespült, bis das ungebundene Protein von der Säule gewaschen war. Alternativ wurde die Säule mit 10 - 15 SV Waschpuffer mit einer erhöhten Imidazolkonzentration gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein schneller zu eluieren. Anschließend wurde das Protein mit einem Gradienten von 0 auf 100% Elutionspuffer in 100 mL eluiert. Im Anschluss an die Elution wurde die Säule mit 10 - 15 SV destilliertem Wasser gewaschen, mit 10 SV 20 % Ethanol gespült und bei 4 °C gelagert. Mittels eines Fraktionssammlers wurden während des Probenauftrags ein bis drei Fraktionen von je ca. 1 mL Probenvolumen und während der gesamten Elution Fraktionen von je 3 mL Volumen gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

5.3.6 Rückfaltung von β -Cinnamomin aus *inclusion bodies*

Zur Isolierung der *inclusion bodies* und der Resolubilisierung β -Cinnamomins wurde das Zellpellet einer 1 L-Expression von *E. coli* SHuffle® T7 Express pET-28a(+)HisCin in 35 mL Resolubilisierungspuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch fünf Zyklen mit 1500 bar in der EmulsiFlex-C3 French-Press auf Eis aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch 30 min Zentrifugation mit 47808 x g abzentrifugiert. Der zellfreie Überstand mit dem resolubilierten β -Cinnamomin wurde entnommen, das Pellet in 35 mL Resolubilisierungspuffer resuspendiert und jeweils eine Probe des Überstandes und des Pellets für die SDS-PAGE genommen. Der Überstand wurde im Anschluss in zwei Schritten mittels IMAC unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt (siehe Abschnitt 5.3.5.2) und die Elutionsfraktionen, die β -Cinnamomin enthielten, vereinigt. Um das resolubilierte und aufgereinigte β -Cinnamomin zurückzufalten, wurden die vereinigten Elutionsfraktionen in einem Spectra/Por-Dialyseschlauch mit einem MWCO von 3,5 kDa gegen 0,4 M Tris-HCl pH 8,5 mit 1,5 mM reduziertem Glutathion und 0,3 mM oxidiertem Glutathion dialysiert. Dazu wurde die β -Cinnamominlösung in den vorgequollenen Dialyseschlauch gefüllt, Luft entfernt und der Beutel ver-

geschlossen. Die Elicitinlösung wurde dann über Nacht für ca. 16 h bei 4 °C und langsamem Rühren gegen den Tris-Puffer dialysiert. Das Volumen des Tris-Puffers betrug 100 x das Volumen der zu dialysierenden Elicitinlösung.

5.3.7 Aufkonzentrieren und Umpuffern der aufgereinigten Elicitinlösungen

5.3.7.1 Aufkonzentrieren

Elicitinlösungen mit einem Volumen bis 50 mL wurden mittels Ultrafiltration in Amicon Ultra-15 Centrifugal-Filtern mit einem MWCO von 3 kDa in mehreren Zentrifugationsschritten von je 10 min bei 3220 x g und 4 °C aufkonzentriert. Für Volumina von mehr als 50 mL wurde eine 200 mL-Rührzelle Modell 8200 (Zellendurchmesser $\varnothing = 63,5$ mm) mit einer Ultracel Ultrafiltrationsmembran mit einem *nominal molecular weight limit* (NMWL) von 3 kDa (Filterdurchmesser $\varnothing = 63,5$ mm) mit einem Vor- druck von 20 psi und einer Flussrate von ca. 0,5 mL/min bei RT eingesetzt.

5.3.7.2 Umpuffern

Um Elicitinlösungen in den Lagerpuffer umzupuffern, wurden sie über eine PD-10 Säule aufgereinigt. Die PD-10-Säule wurde mit 5 SV destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit 5 SV Zielpuffer equilibriert, bevor 2,5 mL Elicitinlösung auf die Säule aufgetragen wurden. Das gebundene Protein wurde anschließend in 3,5 mL Zielpuffer eluiert. Von jedem Teilschritt wurde eine Probe genommen, die durch SDS-PAGE analysiert wurde.

Alternativ wurde die Elicitinlösung mit Hilfe einer 200 mL-Rührzelle Modell 8200 in den Lagerpuffer umpuffert. Um die Lösung mittels der 200 mL-Rührzelle Modell 8200 umzupuffern, wurden die konzentriert Lösung in mehreren Zyklen mit Lagerpuffer aufgefüllt und, wie im voran gegangenen Abschnitt 5.3.7.1 beschrieben, wieder aufkonzentriert.

5.3.8 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

5.3.8.1 Bradfordassay

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts der zellfreien Extrakte der Elicitinexpressionen und der Expression von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB bzw. *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)MalEssCinHis wurde ein Bradfordassay, entsprechend dem Mikroansatz der Roti®-Quant Gebrauchsanweisung von Carl ROTH, durchgeführt. Dazu wurden 200 μ L Roti®-Quant 5 x Konzentratlösung mit 800 μ L Probe gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Reaktionsansätze im Biophotometer plus bei $\lambda = 595$ nm bestimmt, wobei ein Reaktionsansatz mit Puffer als Blindwert diente. Anschließend konnte die Konzentration der Proteinlösungen mit Hilfe der ermittelten Absorption über eine BSA-Kalibrationsgerade bestimmt werden.

Zur Herstellung der BSA-Kalibrationsgerade wurde eine BSA-Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 2, 5, 10, und 20 µg/mL in je 1 mL destilliertem Wasser hergestellt. Ein Reaktionsansatz mit destilliertem Wasser diente dabei als Blindwert. Zum Erstellen der Kalibrationsgeraden wurde die Konzentration der Verdünnungsreihe gegen die Absorption bei 595 nm aufgetragen (siehe Abbildung 78 in Abschnitt 7.4).

5.3.8.2 Experion

Die Konzentration der rückgefalteten β-Cinnamominlösungen wurde durch das Experion™ Pro260 Analysis Kit entsprechend den Herstellerangaben mit internem BSA-Standard bestimmt. Die durch die Probenpräparation erfolgte Verdünnung der Elicitinlösung wurde durch die folgende Formel herausgerechnet:

$$c \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = D * \frac{c(\text{BSA})_{\text{Soll}}}{c(\text{BSA})_{\text{Ist}}} * \frac{c(\text{Cin})}{1000}$$

Formel 2. Berechnung der β-Cinnamominkonzentration der rückgefalteten β-Cinnamominlösungen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors durch die Probenvorbereitung.

c	β-Cinnamominkonzentration (mg/mL)
D	Verdünnungsfaktor ($D = \frac{8}{7}$)
$c(\text{BSA})_{\text{Soll}}$	BSA-Konzentration Sollwert in der Probe [ng/µL]
$c(\text{BSA})_{\text{Ist}}$	Durch das Experion bestimmte BSA-Konzentration [ng/µL]
$c(\text{Cin})$	Durch das Experion bestimmte β-Cinnamominkonzentration [ng/µL]

5.3.8.3 Absorption bei einer Wellenlänge von λ = 280 nm

Zur Bestimmung der Konzentration der aufgereinigten Elicitinlösungen wurde die Absorption bei λ = 280 nm im NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer mit einer simulierten Schichtdicke von d = 1 cm bestimmt. Die Konzentration der Lösung konnte anschließend über den theoretischen Extinktionskoeffizienten ε und die Molare Masse M mit der folgenden Formel berechnet werden:

$$c \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = \frac{A_{280} * D}{\epsilon * d} * M$$

Formel 3. Berechnung einer Proteinkonzentration mittels der Absorption bei λ = 280 nm.

c	Elicitinkonzentration (mg/mL)
A_{280}	Absorption bei λ = 280 nm
D	Verdünnungsfaktor
ϵ	Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
d	Schichtdicke (cm)
M	Molare Masse des Elicitins (g/mol)

Zur Berechnung der Konzentration der aufgereinigten und umgepufferten β -Cinnamominlösungen der periplasmatischen Expressionen mit C-terminalem His-tag wurden der Extinktionskoeffizient $\epsilon = 7825 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und eine Molare Masse von 11627 g/mol benutzt. Zur Berechnung der Konzentration der aufgereinigten β -Cryptogeinlösung wurden der Extinktionskoeffizient $\epsilon = 7825 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und eine molare Masse von $M = 11668 \text{ g/mol}$ verwendet.

5.3.9 Dehydroergosterolassay

Der DHE-Assay wurde basierend auf der Methode von Mikes *et al.* [76] durchgeführt. Der Anstieg der Fluoreszenz des DHEs durch die Zugabe von Elicitin wurde mit dem Anstieg der Fluoreszenz verglichen, der gemessen werden konnte, wenn BSA mit DHE gemischt wurde. DHE (Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol, CAS Nummer: 516-85-8) wurde von Sigma Aldrich erworben, in einer Konzentration von 500 μM in Ethanol gelöst und vor Licht geschützt in einem Glasbehälter bei -20°C gelagert. Von dieser Stammlösung wurden 50 μM Arbeitsstammlösungen für die Messungen in 15 mL Falcons angesetzt, die anschließend ebenfalls vor Licht geschützt bei -20°C gelagert wurden. Die Fluoreszenz der Reaktionsansätze wurde in einem Infinite® M-1000 Fluorenspektrometer mit einer Extinktionswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$ angeregt und bei einer Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 370 \text{ nm}$ mit einem fixen *gain* von 200, einer z-Position von 20000 und einer Amplitude von 2 nm bei 30°C in Mikrotiterplatten gemessen. Assaypuffer mit 2,5 μM DHE wurde mit 2,5 μM Elicitin in einem Gesamtvolumen von 100 μL gemischt und die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 5 min konstant alle 10 s gemessen. Als Negativkontrollen dienten Assaypuffer mit 2,5 μM DHE bzw. Assaypuffer mit 2,5 μM DHE, der mit 2,5 μM BSA gemischt wurde.

5.3.10 Test der Steroidbindekapazität

Um die Bindekapazität von β -Cinnamomin zu testen, wurden 0,4 mM aufgereinigtes β -Cinnamomin in 1 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 mit einem fünffachen Überschuss Progesteron gemischt und für 10 min bei RT gevortext. Anschließend wurde das ausgefallene Steroid durch 1 min Zentrifugation mit 20238 x g abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Eine Poly-Prep®-Chromatographiesäule mit 0,5 mL Ni Sepharose™ 6 Fast Flow wurde mit 5 mL ddH₂O gewaschen und anschließend mit 5 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer equilibriert. Die Proteinlösung wurde auf die Säule geladen und überschüssiges Progesteron mit 5 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 von der Säule gewaschen. Das über den His-tag gebundene β -Cinnamomin wurde in 3 mL Elutionspuffer IV pH 6,5 eluiert und in drei Fraktionen zu je 1 mL aufgefangen. Das Progesteron aus den Fraktionen wurde anschließend, wie in Abschnitt 5.4.1.3 beschrieben, wieder extrahiert. Das Lösungsmittel der Extrakte wurde in einer Speed Vac® SC110 verdampft, in insgesamt 1 mL Acetonitril: Wasser (60:40) wieder gelöst und die Progesteronkonzentration durch Analyse mittels HPLC, wie in Abschnitt 5.4.1.4.2 beschrieben, bestimmt.

5.3.11 Bestimmung der CYP154C5-Konzentration und der spezifischen Aktivität der Elektronentransferkomponenten

Ein Zellpellet *E. coli* C43(DE3)-Zellen mit coexprimierter CYP154C5, Pdx und PdR wurde in einer Zelldichte von OD = 25 - 115 mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 resuspendiert, mittels French Press aufgeschlossen (siehe Abschnitt 5.2.19) und der zellfreie Extrakt zur Bestimmung der CYP154C5-Konzentration und der Aktivität der ETK verwendet.

5.3.11.1 Bestimmung der Konzentration der CYP154C5

Die Konzentration der CYP154C5 wurde über das CO-Differenzspektrum nach der Methode von Omura und Sato [84] bestimmt. Dazu wird das Spektrum von reduzierter, CO-gebundener P450 Monooxygenase im Wellenlängenbereich von 400 bis 500 nm aufgenommen, wobei ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei $\lambda = 450$ nm für die reduzierte und CO-gebundene Cytochrom P450 Monooxygenase nachgewiesen werden kann. Zur Durchführung wurde eine Spatelspitze $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$ in 500 μL Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 gelöst und mit 500 μL zellfreiem Extrakt gemischt. Dann wurde das Spektrum der reduzierten P450 in einem CARY 50 Bio UV-VIS Spektrophotometer von 400 bis 500 nm aufgenommen, als Blindwert diente 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4. Anschließend wurde die Mischung für 2 min mit CO begast und das Spektrum der reduzierten CO-gebundenen P450 von 400 bis 500 nm aufgenommen. Durch Subtraktion des Spektrums der reduzierten P450 vom Spektrum der reduzierten CO-gebundenen P450 wurde das Differenzspektrum erhalten. Die Absorptionswerte des Maximums bei $\lambda = 450$ nm und der Wellenlänge von $\lambda = 490$ nm wurden notiert und die Konzentration der CYP154C5 mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$c(P450) \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = \frac{(A_{450} - A_{490}) * D * M}{\epsilon * d}$$

Formel 4. Berechnung der P450 Monooxygenasenkonzentration mittels CO-Differenzspektrum.

$c(P450)$	Konzentration der CYP154C5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
A_{450}	Absorption bei $\lambda = 450$ nm
A_{490}	Absorption bei $\lambda = 490$ nm
D	Verdünnungsfaktor
M	Molare Masse der P450 Monooxygenase ($M(\text{CYP154C5}) = 45860$ g/mol)
ϵ	Extinktionskoeffizient $\epsilon(\text{CYP154C5}) = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
d	Schichtdicke der Küvette $d = 1$ cm

5.3.11.2 Bestimmung der Aktivität der Elektronentransferkomponenten

Die Aktivität der ETK Pdx und PdR wurde über den Cytochrom c-Assay bestimmt, der von Lacour *et al.* beschrieben wurde [66]. Dazu wurden 930 μL 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 40 μL 10 mg/mL Cytochrom c, 10 μL zellfreiem Extrakt und 20 μL 5 mM NADH-Lösung zügig gemischt. An-

schließlich wurde direkt die Zunahme der Absorption bei $\lambda = 550 \text{ nm}$ über 2 min in einem CARY 50 Bio UV-VIS Spektrophotometer gemessen. Als Blindwert diente 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4. Die resultierende Steigung wurde notiert und zur Berechnung der Aktivität der ETK über folgende Formel genutzt.

$$\text{Aktivität (ETK)} \left[\frac{U}{\text{mL}} \right] = \frac{\Delta A * D}{\epsilon * d}$$

Formel 5. Berechnung der Aktivität der Elektronentransferkomponenten mittels Cytochrom c-Assay.

Aktivität (ETK)	Aktivität der ETK (U/mL)
ΔA	Zunahme der Absorption bei 550 nm pro Minute [min^{-1}]
D	Verdünnungsfaktor
ϵ	Extinktionskoeffizient von reduziertem Cytochrom c, $\epsilon = 19 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
d	Schichtdicke der Küvette $d = 1 \text{ cm}$

Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde der Quotient aus der volumetrischen Aktivität und dem Gesamtproteingehalt des zellfreien Extraktes gebildet.

5.4 Ganzzellbiokatalyse mit ruhenden Zellen

Die Konzentration der Substratstammlösungen der fünf Substrate Testosteron (**2**), Progesteron (**3**), Dehydroepiandrosteron (**4**), Androstendion (**5**) und Nandrolon (**6**) in Methanol lag bei 100 mM, die der Pregnenolonstammlösung in Methanol (**1**) aufgrund seiner geringeren Löslichkeit nur bei 50 mM. Die Substratstammlösungen in 36 % Hydroxypropyl- β -cyclodextrin besaßen alle eine Konzentration von 50 mM.

5.4.1.1 Kalibrationsgeraden

Zur Herstellung der Kalibrationsgeraden für die Substrate der Ganzzellbiokatalyse wurden Verdünnungsreihen der Substratstammlösungen in Methanol und in 36 % Hydroxypropyl- β -cyclodextrin mit jeweils drei Konzentrationen (0,4, 1,2 und 2,0 mM) hergestellt. Jede Konzentration wurde in Dreifachbestimmung gemessen. Die Konzentrationen wurden in 1 mL Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 angesetzt, extrahiert, mittels GC bzw. HPLC analysiert und anschließend die Integrationsparameter der detektierten Peaks in den Methoden optimiert.

5.4.1.2 Ganzzellbiokatalyse mit ruhenden Zellen

Ein gefrorenes Zellpellet der Expression von *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB bzw. *E. coli* C43(DE3) pIT2cyp154C5 pACYCcamAB pET-28a(+)MalEssCinHis wurde aufgetaut, in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 resuspendiert und die OD bestimmt. Pro Reaktionsansatz wurden ein bis drei Parallelansätze entweder in je 1 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 in 15 mL-Reagenzgläsern oder in je 7 mL in 25 mL Erlenmeyerkolben angesetzt. Außer den *E. coli* C43(DE3)-Zellen mit einer

CYP154C5-Konzentrationen von 0,5 - 3,4 μM und einer spezifischen Aktivität der ETK von 0,3 - 1,4 U/mg wurden 30 mM Glucose, Substrat aus Methanol- bzw. Hydroxypropyl- β -cyclodextrinstammlösungen und β -Cinnamomin bzw. β -Cryptogein in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Pregnenolon wurde in 1 mM und 2 mM Substratkonzentration getestet, die weiteren fünf Substrate Testosteron, Progesteron, Dehydroepiandrosteron, Androstendion und Nandrolon wurden in Konzentrationen von 2 mM eingesetzt. β -Cinnamomin wurde in Konzentrationen von 37 - 200 μM und β -Cryptogein in einer Konzentration von 100 μM getestet. Für jeden Reaktionsansatz mit Elicitin wurde ebenfalls ein Kontrollansatz ohne Elicitin hergestellt. Die Reaktionsansätze und die Kontrollen wurden bei einer Temperatur von 30 °C und 250 rpm inkubiert, nach 2 - 8 h extrahiert und mittels GC bzw. HPLC analysiert.

5.4.1.3 Extraktion der Steroide

Reaktionsansätze, Standards und die Kalibrationsgeraden wurden jeweils in zwei Extraktionsschritten mit EtOAc und einem Extraktionsschritt mit CHCl_3 extrahiert, da die Substrate besser in EtOAc und die Produkte besser in CHCl_3 löslich sind. Die Proben wurden in 2 mL Eppendorfreaktionsgefäße überführt und je 700 μL Ethylacetat hinzu pipettiert. Das 2-Phasensystem wurde 90 s gevortext und dann 1 min mit 20238 x g zentrifugiert, um die Phasen wieder zu trennen. Die organische Phase (oben) wurde vorsichtig mit der Pipette in ein frisches 2 mL Eppendorfreaktionsgefäß überführt, ohne die Interphase mit den denaturierten Proteinen zu berühren. Der Extraktionsschritt wurde mit je 500 μL Ethylacetat wiederholt und die organische Phase mit der vorher entnommenen organischen Phase vereinigt. Anschließend wurde die wässrige Phase ein drittes Mal mit je 500 μL Chloroform extrahiert. Es folgten wieder 90 s Vortexen und 1 min Zentrifugation mit 20238 x g. Die organische Phase (unten) wurde mit der Pipette entnommen und mit den Extrakten der vorherigen Extraktionsschritte vereinigt. Die Proben der Substrate Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron wurden mit Na_2SO_4 getrocknet. Dafür wurden ein bis zwei Spatelspitzen Na_2SO_4 zum Extrakt hinzugegeben und 30 s gevortext. Zur Sedimentation des Na_2SO_4 wurde 1 min bei 20238 x g zentrifugiert und das Extrakt in ein frisches 2 mL Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Lösungsmittel aller Extrakte in einer Speed Vac® SC110 entfernt und die festen Rückstände bis zur chromatographischen Analyse bei -20 °C gelagert.

5.4.1.4 Analyse der biokatalytischen Umsätze

5.4.1.4.1 Gaschromatographie

Da Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron nicht UV-aktiv sind, wurden die Proben dieser Substrate gaschromatographisch in einer GC 2010 über eine Optima 17 MS-Säule (30 m x 0,25 ID, 0,4 mm OD) analysiert. Als Trägergas wurde H_2 verwendet, als Detektor diente ein Flammenionisationsdetektor (FID). Die vorbereiteten Proben der Biokatalysen (siehe Abschnitt 5.4.1.3) wurden in 300 μL Chloro-

form mit internem Standard (ISTD) gelöst, in GC-Gefäße überführt und in der GC mit der Methode in Tabelle 18 analysiert. Als interner Standard (ISTD) wurden 30 mM Cholesterol eingesetzt.

Tabelle 18. GC-Methode für Pregnenolon (1) und Dehydroepiandrosteron (4)

Parameter	Einstellung
Injektionsvolumen	1 µL
Split	10:1
Injektionstemperatur	350 °C
Detektortemperatur	300 °C
Säulenflussrate	1,2 mL/min
Temperaturprogramm	1 min bei 250 °C, mit 10 °C/min bis 300 °C, 10 min bei 300 °C

Tabelle 19. Retentionszeiten von Pregnenolon (1) und Dehydroepiandrosteron (4)

Substrat	Retentionszeit
Pregnenolon (1)	9,4 min
Dehydroepiandrosteron (4)	7,7 min
Cholesterol (ISTD)	12,5 min

5.4.1.4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Substrate Testosteron, Progesteron, Androstendion und Nandrolon absorbieren im UV-Bereich mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 242$ nm und konnten daher durch HPLC analysiert werden. Als Detektor wurde ein Diodenarraydetektor verwendet. Die Proben wurden in einer Prominence UFLC über eine Nucleosil 100, 5 C18-Säule (250 x 4,5 mm) mit den Methoden aus Tabelle 20 aufgetrennt. Die vorbereiteten Proben der Biokatalyse (Abschnitt 5.4.1.3) wurden in je 1 mL Laufmittel bei 40 °C im Ultraschall gelöst, anschließend 1:5 mit Laufmittel verdünnt, in HPLC-Gefäße überführt und mittels HPLC analysiert. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus Acetonitril: Wasser (60: 40) verwendet.

Tabelle 20. Verwendete HPLC-Methoden für Testosteron (2), Progesteron (3), Androstendion (5) und Nandrolon (6)

Parameter	Testosteron	Progesteron	Androstendion	Nandrolon
Injektionsvolumen	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
Ofentemperatur	50 °C	50 °C	50 °C	50 °C
Flussrate	1,2 mL/min	1,2 mL/min	1,2 mL/min	1,2 mL/min
Dauer	8,5 min	13,5 min	9 min	8 min

Tabelle 21. Retentionszeiten von Testosteron (2), Progesteron (3), Androstendion (5) und Nandrolon (6)

Substrat	Retentionszeit
Testosteron (2)	5,9 min
Progesteron (3)	10,9 min
Androstendion (4)	6,4 min
Nandrolon (6)	5,4 min

6 Literaturverzeichnis

- [1] H. Agematu, N. Matsumoto, Y. Fujii, H. Kabumoto, S. Doi, K. Machida, *et al.*, Hydroxylation of testosterone by bacterial cytochromes P450 using the *Escherichia coli* expression system, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (2006) 307-311.
- [2] A. Aharoni, A.D. Griffiths, D.S. Tawfik, High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9 (2005) 210-216.
- [3] A.K. Ahmed, S.W. Schaffer, D.B. Wetlaufer, Nonenzymic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffers, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 8477-8482.
- [4] E. Altman, C.A. Kumamoto, S.D. Emr, Heat-shock proteins can substitute for SecB function during protein export in *Escherichia coli*, *EMBO J.* 10 (1991) 239-245.
- [5] M. Archer, M.L. Rodrigues, M. Aurélio, R. Biemans, A. Cravador, M.A. Carrondo, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of β -cinnamomin, an elicitor secreted by the phytopathogenic fungus *Phytophthora cinnamomin*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56 (2000) 363-365.
- [6] F. Baillieul, P. de Ruffray, S. Kauffmann, Molecular Cloning and Biological Activity of α -, β -, and γ -megaspermin, three elicitors secreted by *Phytophthora megasperma* H20, *Plant Physiol.* 131 (2003) 155 -166.
- [7] C.V.F. Baldwin, J.M. Woodley, On oxygen limitation in a whole cell biocatalytic Baeyer-Villiger Oxidation process, *Biotechnol. Bioeng.* 95 (2006) 362-369.
- [8] F. Baneyx, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999) 411-421.
- [9] F. Baneyx, M. Mujacic, Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 1399-1408.
- [10] B. van den Berg, Going forward laterally: transmembrane passage of hydrophobic molecules through protein channel walls, *ChemBioChem.* 11 (2010) 1339-1343.
- [11] E. De Bernardez Clark, E. Schwarz, R. Rudolph, Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding, in: R. Wetzel (Ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press. (1999) 217-236.
- [12] R. Bernhardt, Cytochromes P450 as versatile biocatalysts, *J. Biotechnol.* 124 (2006) 128-145.
- [13] P.H. Bessette, F. Åslund, J. Beckwith, G. Georgiou, Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 13703-13708.
- [14] V. Billard, M. Bruneteau, P. Bonnet, P. Ricci, J.C. Pernollet, J.C. Huet, *et al.*, Chromatographic purification and characterization of elicitors of necrosis on tobacco produced by incompatible *Phytophthora* species, *J. Chromatogr.* 440 (1988) 87-94.
- [15] G. Boissy, E. de L. Fortelle, R. Kahn, J.-C. Huet, G. Bricogne, J.-C. Pernollet, *et al.*, Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins, *Structure.* 4 (1996) 1429-1439.
- [16] G. Boissy, M. O'Donohue, O. Gaudemer, V. Perez, J.-C. Pernollet, S. Brunie, The 2.1 Å structure of an elicitor-ergosterol complex: a recent addition to the sterol carrier protein family, *Protein Sci.* 8 (1999) 1191-1199.
- [17] P. Bonnet, E. Bourdon, M. Ponchet, J.-P. Blein, P. Ricci, Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants, *Eur. J. Plant Pathol.* 102 (1996) 181-192.
- [18] U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Zweite Auflage (2006).
- [19] S. Bourque, M. Ponchet, M.-N. Binet, P. Ricci, A. Pugin, A. Lebrun-Garcia, Comparison of binding properties and early biological effects of elicitors in tobacco cells, *Plant Physiol.* 118 (1998) 1317-1326.
- [20] P. Bracco, D.B. Janssen, A. Schallmeyer, Selective steroid oxyfunctionalisation by CYP154C5, a bacterial cytochrome P450, (voraussichtlich 2013). Manuskript eingereicht.
- [21] C.M. Brasier, Oak tree mortality in Iberia, *Nature.* 360 (1992) 539-539.

- [22] C.M. Brasier, F. Robredo, J.F.P. Ferraz, Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline, *Plant Physiol.* 42 (1993) 140-145.
- [23] M. Bureik, R. Bernhardt, Steroid hydroxylation: microbial steroid biotransformations using cytochrome P450 enzymes, in: R.D. Schmidt, V.B. Urlacher (Eds.), *Modern Biooxidation*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. (2007) 155-176.
- [24] J. Lin-Cereghino, W.W. Wong, S. Xiong, W. Giang, L.T. Luong, J. Vu, *et al.*, Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *BioTechniques*. 38 (2005) 44-48.
- [25] R.R. Chen, Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74 (2007) 730-738.
- [26] J.H. Choi, S.Y. Lee, Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64 (2004) 625-635.
- [27] P.C. Cirino, K.M. Mayer, D. Umeno, Generating mutant libraries using error-prone PCR, in: F.H. Arnold, G. Georgiou (Eds.), *Directed Evolution Library Creation*, Humana Press. (2003) 3-9.
- [28] E.D.B. Clark, Protein refolding for industrial processes, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001) 202-207.
- [29] J.M. Cregg, J.L. Cereghino, J. Shi, D.R. Higgins, Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*, *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 23-52.
- [30] J.M. Cregg, T.S. Vedvick, W.C. Raschke, Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*, *Biotechnology (N.Y.)*. 11 (1993) 905-910.
- [31] I.G. Denisov, T.M. Makris, S.G. Sligar, I. Schlichting, Structure and chemistry of cytochrome P450, *Chem. Rev.* 105 (2005) 2253-2278.
- [32] A.I. Derman, J. Beckwith, *Escherichia coli* alkaline phosphatase localized to the cytoplasm slowly acquires enzymatic activity in cells whose growth has been suspended: a caution for gene fusion studies., *J. Bacteriol.* 177 (1995) 3764-3770.
- [33] L. Dokládal, M. Obořil, K. Stejskal, Z. Zdráhal, N. Ptáčková, R. Chaloupková, *et al.*, Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance, *J. Exp. Bot.* 63 (2012) 2203-2215.
- [34] M.V. Donova, O.V. Egorova, Microbial steroid transformations: current state and prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94 (2012) 1423-1447.
- [35] A.J. Driessen, P. Fekkes, J.P. van der Wolk, The Sec system, *Curr. Opin. Microbiol.* 1 (1998) 216-222.
- [36] J.V. Durme, J. Delgado, F. Stricher, L. Serrano, J. Schymkowitz, F. Rousseau, A graphical interface for the FoldX forcefield, *Bioinformatics*. 27 (2011) 1711-1712.
- [37] A. Economou, Bacterial preprotein translocase: mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme, *Mol. Microbiol.* 27 (1998) 511-518.
- [38] L. Engel, Expression und Charakterisierung von β -Cryptogein aus *Phytophthora cryptogea* in *Escherichia coli*, Bachelorarbeit, 2012.
- [39] S. Fefeu, S. Bouaziz, E. Guittet, J.-C. Huet, J.-C. Pernollet, Three-dimensional solution structure of β cryptogein, a β elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*, *Protein Sci.* 6 (1997) 2279-2284.
- [40] P. Fernandes, A. Cruz, B. Angelova, H. Pinheiro, J.M. Cabral, Microbial conversion of steroid compounds: recent developments, *Enzyme Microb. Technol.* 32 (2003) 688-705.
- [41] A.G. Fragkaki, Y.S. Angelis, M. Koupparis, A. Tsantili-Kakoulidou, G. Kokotos, C. Georgakopoulos, Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities: applied modifications in the steroidal structure, *Steroids*. 74 (2009) 172-197.
- [42] P.M. Gannon, P. Li, C.A. Kumamoto, The mature portion of *Escherichia coli* maltose-binding protein (MBP) determines the dependence of MBP on SecB for export., *J. Bacteriol.* 171 (1989) 813-818.
- [43] K. Geitner, A. Kirschner, J. Rehdorf, M. Schmidt, M.D. Mihovilovic, U.T. Bornscheuer, Enantioselective kinetic resolution of 3-phenyl-2-ketones using Baeyer-Villiger monooxygenases, *Tetrahedron: Asymmetry*. 18 (2007) 892-895.

- [44] G. Georgiou, P. Valax, Isolating inclusion bodies from bacteria, in: Ronald Wetzel (Ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press. (1999) 48-58.
- [45] D. Hanahan, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.* 166 (1983) 557-580.
- [46] F. Hannemann, A. Bichet, K.M. Ewen, R. Bernhardt, Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains, *Biochim. Biophys. Acta.* 1770 (2007) 330-344.
- [47] R.S. Hegde, H.D. Bernstein, The surprising complexity of signal sequences, *Trends Biochem. Sci.* 31 (2006) 563-571.
- [48] J.W. Hendrix, Sterols in growth and reproduction of fungi, *Annu. Rev. Phytopathol.* 8 (1970) 111-130.
- [49] D. Hilvert, S.V. Taylor, P. Kast, Using evolutionary strategies to investigate the structure and function of chorismate mutases, in: S. Brakmann, K. Johnsson (Eds.), *Directed Molecular Evolution of Proteins*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003: pp. 29-62.
- [50] S. Hofzumahaus, A. Schallmeyer, *Escherichia coli*-based expression system for the heterologous expression and purification of the elicitor β -cinnamomin from *Phytophthora cinnamomi*, *Protein Express. Purif.* 90 (2013) 117-123.
- [51] J.-C. Huet, J.-C. Pernollet, Amino acid sequence of cinnamomin, a new member of the elicitor family, and its comparison to cryptogein and capsaicin, *FEBS Lett.* 257 (1989) 302-306.
- [52] T. Ishige, K. Honda, S. Shimizu, Whole organism biocatalysis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9 (2005) 174-180.
- [53] J. Ishikawa, A. Yamashita, Y. Mikami, Y. Hoshino, H. Kurita, K. Hotta, *et al.*, The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 14925-14930.
- [54] E.M. Isin, F.P. Guengerich, Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1770 (2007) 314-329.
- [55] I. Jelesarov, H.R. Bosshard, Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition, *J. Mol. Recognit.* 12 (1999) 3-18.
- [56] J. Jin, H. Mazon, R.H.H. van den Heuvel, A.J. Heck, D.B. Janssen, M.W. Fraaije, Covalent flavinylation of vanillyl-alcohol oxidase is an autocatalytic process, *FEBS J.* 275 (2008) 5191-5200.
- [57] M.K. Julsing, M. Schrewe, S. Cornelissen, I. Hermann, A. Schmid, B. Buhler, Outer membrane protein AlkL boosts biocatalytic oxyfunctionalization of hydrophobic substrates in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (2012) 5724-5733.
- [58] P. Jurado, D. Ritz, J. Beckwith, V. de Lorenzo, L.A. Fernández, Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* 320 (2002) 1-10.
- [59] S. Kamoun, Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens, *Mol. Plant Microbe Interact.* 6 (1993) 15.
- [60] S. Kamoun, Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem, *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 (2001) 295-300.
- [61] S. Kamoun, Molecular genetics of pathogenic oomycetes, *Eukaryotic Cell.* 2 (2003) 191-199.
- [62] S. Kamoun, H. Lindqvist, F. Govers, A novel class of elicitor-like genes from *Phytophthora infestans*, *Mol. Plant Microbe. In.* 10 (1997) 1028-1030.
- [63] K.C. Keiler, K.R. Silber, R.T. Sauer, K.M. Downard, I.A. Papayannopoulos, K. Biemann, C-terminal specific protein degradation: activity and substrate specificity of the Tsp protease, *Protein Sci.* 4 (1995) 1507-1515.
- [64] H. Keller, J.P. Blein, P. Bonnet, P. Ricci, Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco, *Plant Physiol.* 110 (1996) 365-376.
- [65] W. Knogge, Fungal infection of plants, *Plant Cell.* 8 (1996) 1711-1722.
- [66] T. Lacour, T. Achstetter, B. Dumas, Characterization of recombinant adrenodoxin reductase homologue (Arh1p) from yeast - implication in in vitro cytochrome P45011 β monooxygenase system, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 23984-23992.

- [67] M.B. Lascombe, M. Ponchet, P. Venard, M.L. Milat, J.P. Blein, T. Prangé, The 1.45 Å resolution structure of the cryptogein-cholesterol complex: a close-up view of a sterol carrier protein (SCP) active site, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58 (2002) 1442-1447.
- [68] S.P. Lei, H.C. Lin, S.S. Wang, J. Callaway, G. Wilcox, Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase, *J. Bacteriol.* 169 (1987) 4379-4383.
- [69] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, eds., *Industrial biotransformations*, second edition, 2006.
- [70] J. Lochman, T. Kasparovsky, J. Damborsky, H. Osman, A. Marais, R. Chaloupkova, *et al.*, Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora*, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells, *Biochemistry.* 44 (2005) 6565-6572.
- [71] S. Macauley-Patrick, M.L. Fazenda, B. McNeil, L.M. Harvey, Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system, *Yeast.* 22 (2005) 249-270.
- [72] A. Manosroi, S. Saowakhon, J. Manosroi, Enhancement of androstadienedione production from progesterone by biotransformation using the hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation technique, *J. Steroid Biochem.* 108 (2008) 132-136.
- [73] A.M. McIver, S.J. Garikipati, K.S. Bankole, M. Gyamerah, T.L. Peebles, Microbial oxidation of naphthalene to cis-1,2-naphthalene dihydrodiol using naphthalene dioxygenase in biphasic media, *Biotechnol. Progr.* 24 (2008) 593-598.
- [74] F.J.M. Mergulhão, D.K. Summers, G.A. Monteiro, Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Adv.* 23 (2005) 177-202.
- [75] V. Mikes, M.-L. Milat, M. Ponchet, F. Panabières, P. Ricci, J.-P. Blein, Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245 (1998) 133-139.
- [76] V. Mikes, M.-L. Milat, M. Ponchet, P. Ricci, J.-P. Blein, The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein, *FEBS Lett.* 416 (1997) 190-192.
- [77] B. Miroux, J.E. Walker, Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels, *J. Mol. Biol.* 260 (1996) 289-298.
- [78] A. Monegal, A. Olichon, N. Bery, T. Filleron, G. Favre, A. de Marco, Single domain antibodies with VH hallmarks are positively selected during panning of llama (*Lama glama*) naïve libraries, *Dev. Comp. Immunol.* 36 (2012) 150-156.
- [79] P.R.O. de Montellano, *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Springer. Dritte Auflage (2004).
- [80] C. Nespoulous, J.-C. Huet, J.-C. Pernollet, Structure-function relationships of α and β elicitors, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction, *Planta.* 186 (1992) 551-557.
- [81] H. Nikaido, Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2003) 593-656.
- [82] M.J. O'Donohue, G. Boissy, J.-C. Huet, C. Nespoulous, S. Brunie, J.-C. Pernollet, Overexpression in *Pichia pastoris* and crystallization of an elicitor protein secreted by the phytopathogenic fungus, *Phytophthora cryptogea*, *Protein Express. Purif.* 8 (1996) 254-261.
- [83] M.J. O'Donohue, H. Gousseau, J.-C. Huet, D. Tepfer, J.-C. Pernollet, Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding β -cryptogein, an elicitor produced by *Phytophthora cryptogea*, *Plant Mol. Biol.* 27 (1995) 577-586.
- [84] T. Omura, R. Sato, The Carbon Monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2370-2378.
- [85] H. Osman, V. Mikes, M.-L. Milat, M. Ponchet, D. Marion, T. Prangé, *et al.*, Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols, *FEBS Lett.* 489 (2001) 55-58.
- [86] H. Osman, S. Vauthrin, V. Mikes, M.-L. Milat, F. Panabières, A. Marais, *et al.*, Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes, *Mol. Biol. Cell.* 12 (2001) 2825-2834.
- [87] F. Panabières, M. Ponchet, V. Allasia, L. Cardin, P. Ricci, Characterization of border species among *Pythiaceae*: several *Pythium* isolates produce elicitors, typical proteins from *Phytophthora* spp., *Mycol. Res.* 101 (1997) 1459-1468.

- [88] J.-C. Pernollet, M. Sallantin, M. Sallé-Tourne, J.-C. Huet, Elicitin isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species, *Physiol. Mol. Plant P.* 42 (1993) 53-67.
- [89] J.A. Peterson, M.C. Lorence, B. Amarneh, Putidaredoxin reductase and putidaredoxin. Cloning, sequence determination, and heterologous expression of the proteins., *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 6066-6073.
- [90] M. Ponchet, F. Panabières, M.-L. Milat, V. Mikes, J.L. Montillet, L. Suty, *et al.*, Are elicitors cryptograms in plant-oomycete communications?, *Cell. Mol. Life Sci.* 56 (1999) 1020-1047.
- [91] T.L. Poulos, B.C. Finzel, I.C. Gunsalus, G.C. Wagner, J. Kraut, The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450., *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 16122-16130.
- [92] J.-M. Puertas, J.-M. Betton, Engineering an efficient secretion of leech carboxypeptidase inhibitor in *Escherichia coli*, *Microb. Cell Fact.* 8 (2009) 57.
- [93] K.G. Ravichandran, S.S. Boddupalli, C.A. Hasermann, J.A. Peterson, J. Deisenhofer, Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's, *Science*. 261 (1993) 731-736.
- [94] P. Ricci, P. Bonnet, J.-C. Huet, M. Sallantin, F. Beauvais-Cante, M. Bruneteau, *et al.*, Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco, *Eur. J. Biochem.* 183 (1989) 555-563.
- [95] U. Rinas, J.E. Bailey, Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37 (1992) 609-614.
- [96] D. Ritz, J. Beckwith, Roles of thiol-redox pathways in bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* 55 (2001) 21-48.
- [97] M.L. Rodrigues, M. Archer, P. Martel, A. Jacquet, A. Cravador, M.A. Carrondo, Structure of β -cinnamomin, a protein toxic to some plant species, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58 (2002) 1314-1321.
- [98] M.L. Rodrigues, M. Archer, P. Martel, S. Miranda, M. Thomaz, F.J. Enguita, *et al.*, Crystal structures of the free and sterol-bound forms of β -cinnamomin, *Biochim. Biophys. Acta.* 1764 (2006) 110-121.
- [99] N.V. Di Russo, D.A. Estrin, M.A. Marti, A.E. Roitberg, pH-Dependent conformational changes in proteins and their effect on experimental pKas: the case of nitrophorin 4, *PLoS Comput. Biol.* 8 (2012).
- [100] H. Schägger, G. von Jagow, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* 166 (1987) 368-379.
- [101] A. Schallmeyer, G. den Besten, I.G.P. Teune, R.F. Kembaren, D.B. Janssen, Characterization of cytochrome P450 monooxygenase CYP154H1 from the thermophilic soil bacterium *Thermobifida fusca*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (2011) 1475-1485.
- [102] E.L. Schneider, J.G. Thomas, J.A. Bassuk, E.H. Sage, F. Baneyx, Manipulating the aggregation and oxidation of human SPARC in the cytoplasm of *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 581-585.
- [103] J. Schymkowitz, J. Borg, F. Stricher, R. Nys, F. Rousseau, L. Serrano, The FoldX web server: an online force field, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) W382-388.
- [104] G. Smutzer, B.F. Crawford, P.L. Yeagle, Physical properties of the fluorescent sterol probe dehydroergosterol, *Biochim. Biophys. Acta.* 862 (1986) 361-371.
- [105] C. Spiess, A. Beil, M. Ehrmann, A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein, *Cell.* 97 (1999) 339-347.
- [106] D. Steiner, P. Forrer, M.T. Stumpp, A. Plückthun, Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 823-831.
- [107] W.P. Stemmer, DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 10747-10751.
- [108] A.J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, The production of fine chemicals by biotransformations, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 548-556.

- [109] Tavernier E., Stallaert V., Blein J.-P., Pugin A., Changes in lipid composition in tobacco cells treated with cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*, Plant Sci. 104 (1995) 117-125.
- [110] J.F. Tschopp, G. Sverlow, R. Kosson, W. Craig, L. Grinna, High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia Pastoris*, Nat. Biotechnol. 5 (1987) 1305-1308.
- [111] Q.A. Valent, P.A. Scotti, S. High, J.W. de Gier, G. von Heijne, G. Lentzen, *et al.*, The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon., EMBO J. 17 (1998) 2504-2512.
- [112] L.F. Vallejo, U. Rinas, Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins, Microb. Cell Fact. 3 (2004) 11.
- [113] S. Vauthrin, V. Mikes, M.-L. Milat, M. Ponchet, B. Maume, H. Osman, *et al.*, Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes, Biochim. Biophys. Acta. 1419 (1999) 335-342.
- [114] T.A. Walton, M.C. Sousa, Crystal Structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation, Mol. Cell. 15 (2004) 367-374.
- [115] J.D. Weete, Structure and function of sterols in fungi, Adv. Lipid Res. 23 (1989) 115-167.
- [116] S.M. West, J.B. Chaudhuri, J.A. Howell, Improved protein refolding using hollow-fibre membrane dialysis, Biotechnol. Bioeng. 57 (1998) 590-599.
- [117] T.S. Wong, K.L. Tee, B. Hauer, U. Schwaneberg, Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution, Nucleic Acids Res. 32 (2004) e26.
- [118] J.M. Woodley, Microbial biocatalytic processes and their development, in: A.I. Laskin, S. Sariaslani, G.M. Gadd (Eds.), Advances in Applied Microbiology, Academic Press. (2006) 1-15.
- [119] H. Yoshii, T. Furuta, T. Yonehara, D. Ito, Y.-Y. Linko, P. Linko, Refolding of denatured/reduced lysozyme at high concentration with diafiltration, Biosci., Biotechnol., Biochem. 64 (2000) 1159-1165.
- [120] L.F. Yousef, A.F. Yousef, J.S. Mymryk, W.A. Dick, R.P. Dick, Stigmasterol and cholesterol regulate the expression of elicitor genes in *Phytophthora sojae*, J. Chem. Ecol. 35 (2009) 824-832.
- [121] M. Zaccolo, D.M. Williams, D.M. Brown, E. Gherardi, An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues, J. Mol. Biol. 255 (1996) 589-603.
- [122] D. Zehentgruber, F. Hannemann, S. Bleif, R. Bernhardt, S. Lütz, Towards preparative scale steroid hydroxylation with cytochrome P450 monooxygenase CYP106A2, ChemBioChem. 11 (2010) 713-721.

7 Anhang

7.1 DNA-Marker

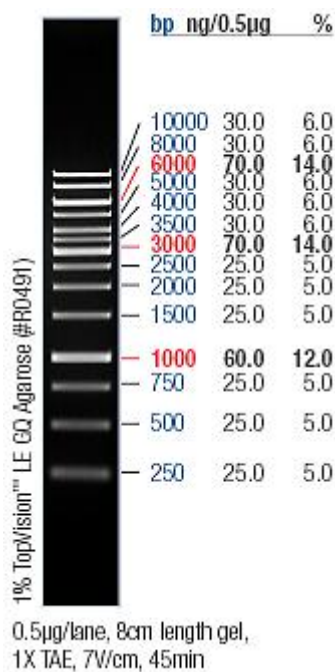


Abbildung 59. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas).

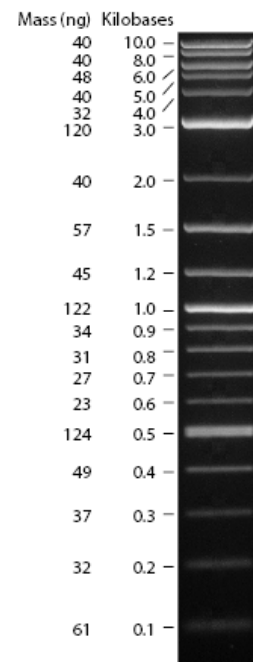


Abbildung 60. Quick-Load® 2-Log DNA Ladder(0.1-10.0 kb) (New England BioLabs® Inc.)

7.2 Proteinmarker

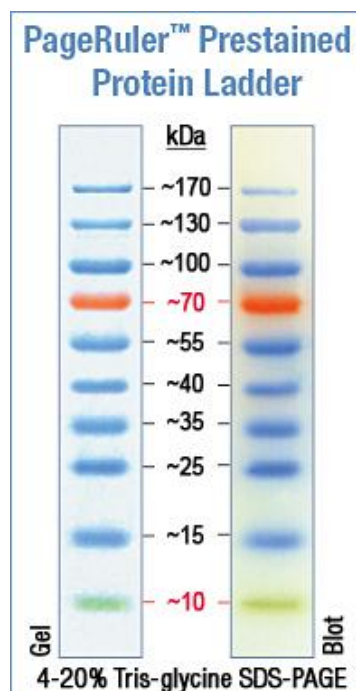


Abbildung 61. PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas).

7.3 Vektorkarten

7.3.1 pBADN

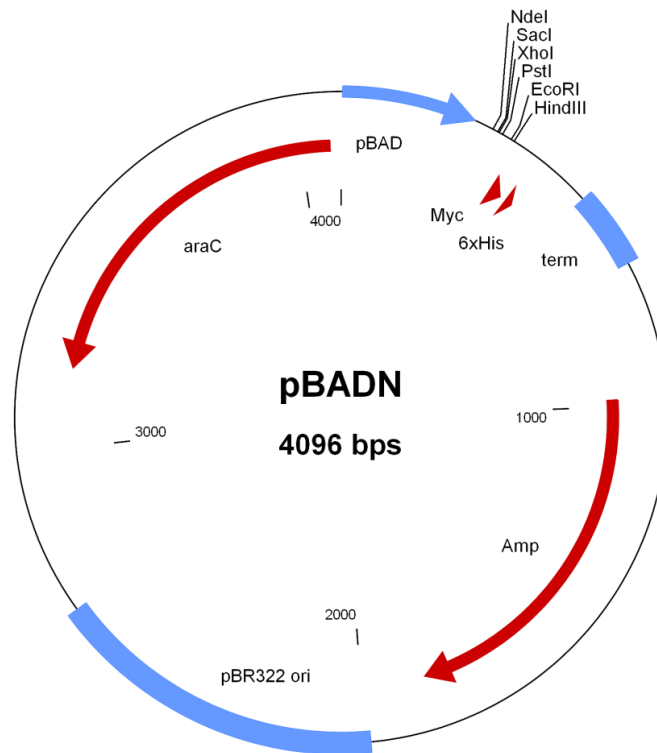


Abbildung 62. Vektorkarte des verwendeten pBADN-Plasmids (Jin *et al.* [56])

7.3.2 pET-28a(+)

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (BamHI - XhoI)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond BamHI at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond BamHI at 198.

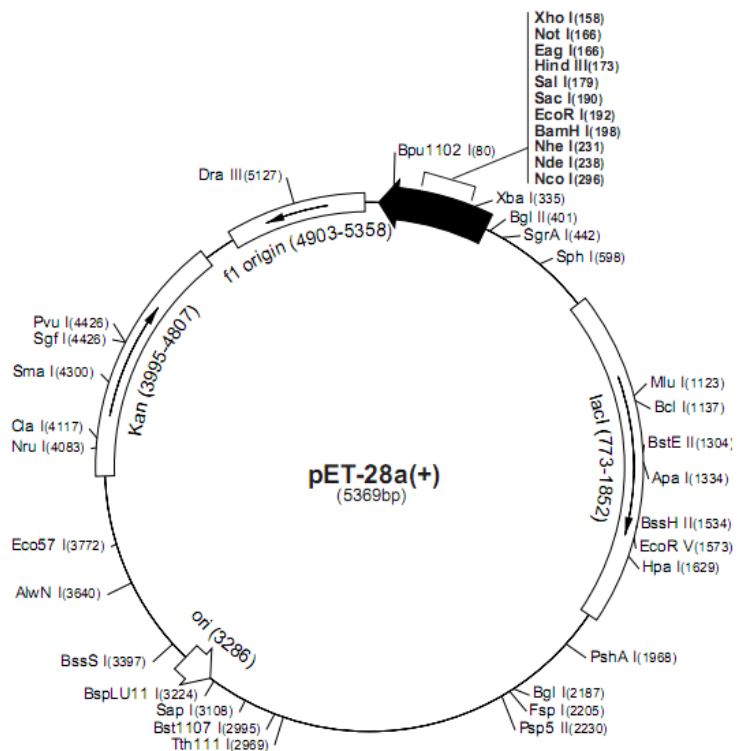


Abbildung 63. Vektorkarte des verwendeten pET-28a(+)-Plasmids (Merck Millipore)

7.3.3 pGAPZαA

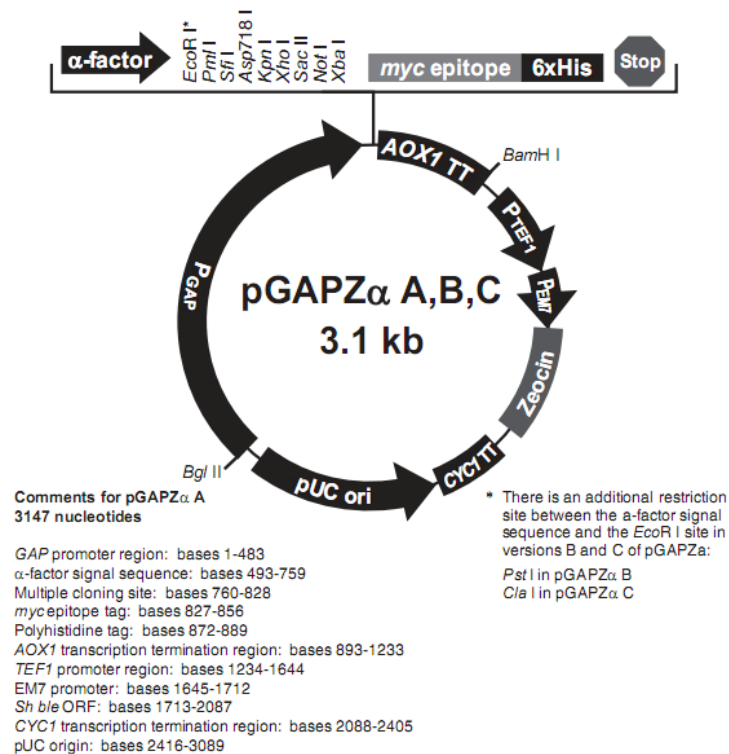


Abbildung 64. Vektorkarte des verwendeten pGAPZαA-Plasmids (Invitrogen)

7.3.4 pET-22b(+)

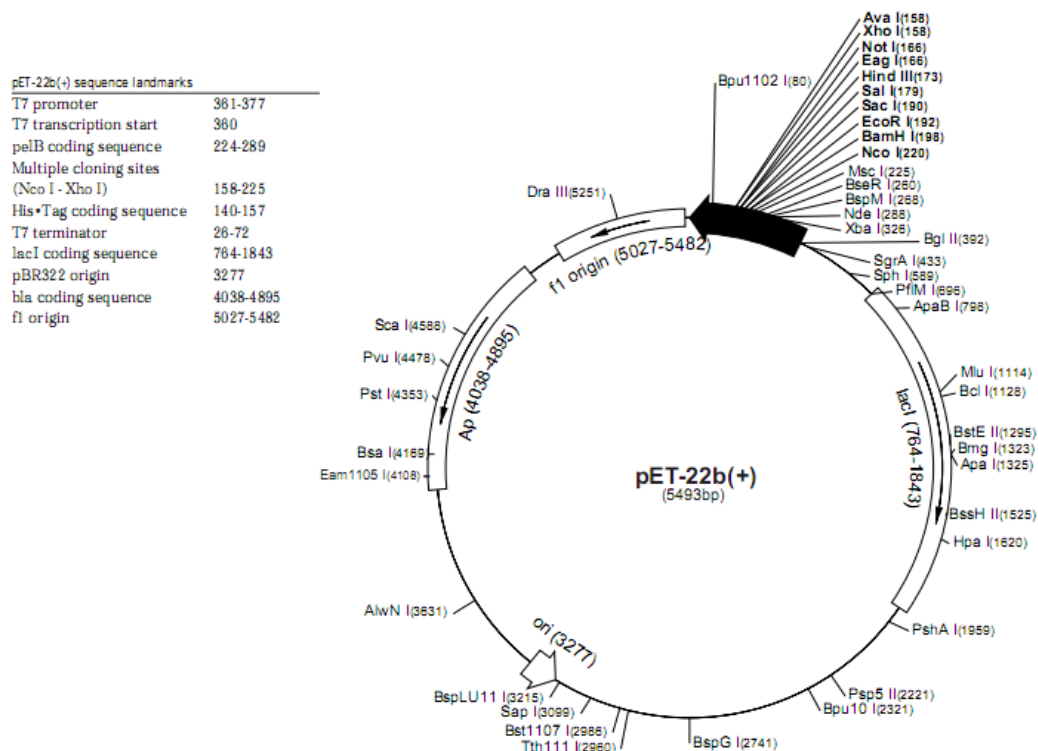


Abbildung 65. Vektorkarte des verwendeten pET-22b(+)-Plasmids (Merck Millipore)

7.3.5 pIT2

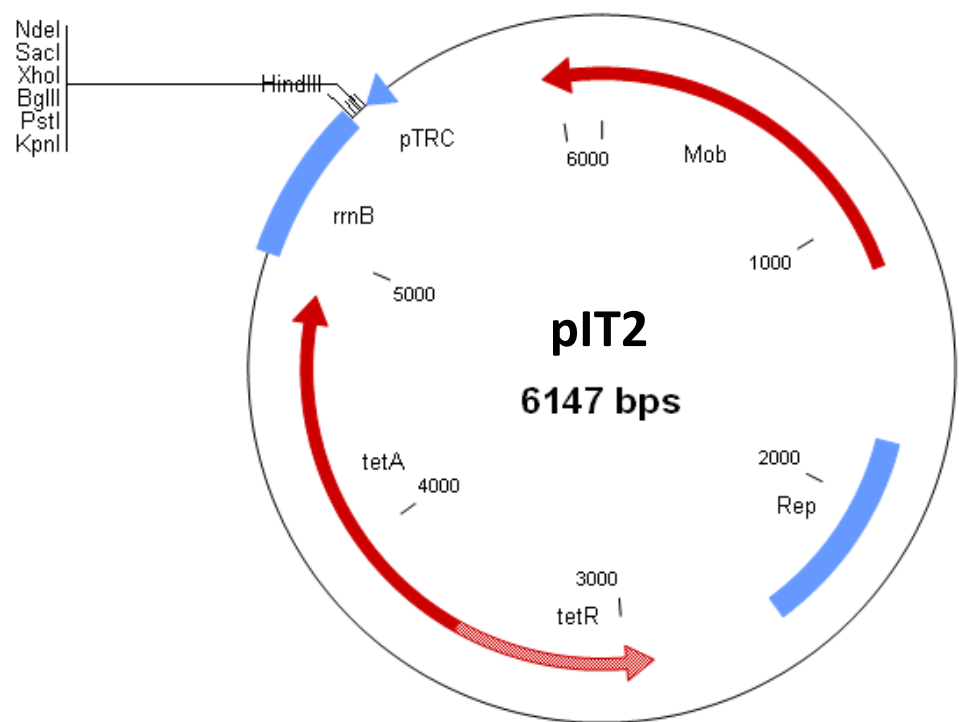


Abbildung 66. Vektorkarte des verwendeten pIT2-Plasmids (Bracco *et al.* [20])

7.3.6 pACYCDuet™-1

	Cat. No.
pACYCDuet-1 DNA	71147-3
pACYCDuet-1 sequence landmarks	
T7 promoter-1	3992-4008
T7 transcription start-1	1
His•Tag [®] coding sequence	83-100
Multiple cloning sites-1 (Nco I-Afl II)	69-168
T7 promoter-2	214-230
T7 transcription start-2	231
Multiple cloning sites-2 (Nde I-Avr II)	297-438
S•Tag [™] coding sequence	366-410
T7 terminator	462-509
P15A origin	1750-2662
cat (Cm ^r) coding sequence	732-1388
lacI coding sequence	2789-3868

pACYCDuet™-1 is designed for the coexpression of two target genes. The vector contains two multiple cloning sites (MCS), each of which is preceded by a T7 promoter/*lac* operator and ribosome binding site (rbs). The vector also carries the P15A replicon, *lacI* gene and chloramphenicol resistance gene. This vector can be used in combination with pETDuet™-1 (Cat. No. 71146-3) in an appropriate host strain for the coexpression of up to 4 target genes. Genes inserted into MCS1 can be sequenced using the ACYCDuetUP1 Primer (Cat. No. 71178-3) and DuetDOWN1 Primer (Cat. No. 71179-3). Genes inserted into MCS2 can be sequenced using the DuetUP2 Primer (Cat. No. 71180-3) and T7 Terminator Primer (Cat. No. 69337-3).

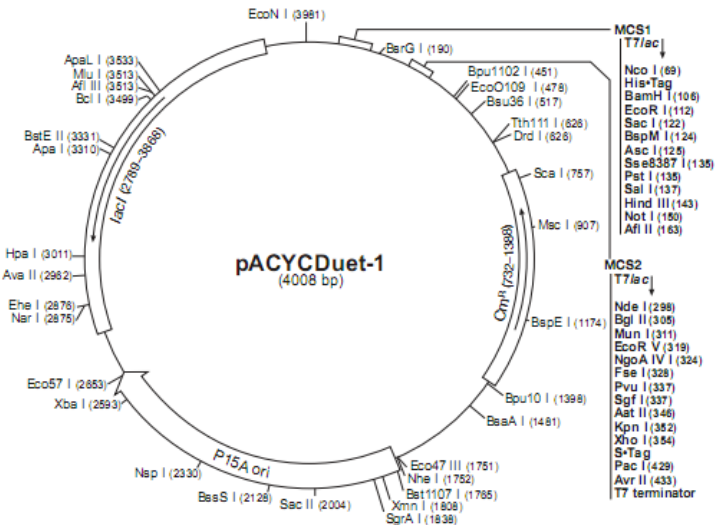


Abbildung 67. Vektorkarte des verwendeten pACYCDuet™-1-Plasmids (Schallmeyer *et al.* [101])

7.4 Gen- und Proteinsequenzen

7.4.1 α -Capsicein

Cap:

ATCTTTQQTAAAYVALVSILSDSSFNQCATDSGYSMILTATALPTTAQYKLMCASTACNTMITKIVSL
NPPDCELTVPSTGLVLNVYSYANGFSATCASL

cap:

CCATGGGCGAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATA
TGCGCGACTTGACTACCACTCAACAGACTGCTGCTTATGTGGCACTGGTTAGCATTCTGTCTGATT
CCTCCTTCAACCAGTGCGCTACCGATTCCGGTTATTCCATGCTGACCGCGACCGCTCTGCCGACCA
CCGCACAGTATAAGCTGATGTGCGCGTCCACCGCTTGCAACACTATGATCACTAAAATCGTTTCCC
TGAACCCACCGGACTGTGAAGTACCGTTCCGACTAGCGGTCTGGTGCTGAATGTTTACTCTTATG
CAAACGGCTTCAGCGCGACTTGCGCGAGCCTGTAAGAATTC
(*NcoI*, 6x-His-Tag, TEV-Erkennungssequenz, *NdeI*, α -Capsicein, *EcoRI*)

Abbildung 68. α -Capsiceinproteinsequenz (Cap) und die Sequenz des synthetischen Gens *cap*

7.4.2 α -Megaspermin

Meg:

MNFRALFAATVAALVGSTSAATTCTTTQQTAAAYVALVSILSDASFNQCATDSGYSMILTATSLPTTDQ
YKLMCASTACNSMIAKIIITLNAPDCELTVPSTGLVLNVYSYANGFSATCASL
(α -Megaspermin Sekretionssignalsequenz)

meg:

CCATGGGCGAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATA
TGACCACTTGACTACCACTCAGCAGACTGCGGCTTATGTTGCTCTGGTTTCCATCCTGAGCGACG
CGAGCTTCAACCAGTGCGCAACTGACTCCGGCTATTCTATGCTGACTGCTACCTCCCTGCCGACCA
CCGATCAGTACAACTGATGTGCGCTTCTACTGCGTGTAACAGCATGATCGAAAAATCATTACTC
TGAATGCGCCAGATTGTGAAGTACCGTTCCAACCTCTGGCCTGGTTCTGAACGTTTATAGCTACG
CGAACGGTTTCTCTGCGACCTGTGCAAGCCTGTAAGAATTC
(*NcoI*, 6x-His-Tag, TEV-Erkennungssequenz, *NdeI*, α -Megaspermin, *EcoRI*)

Abbildung 69. α -Megasperminproteinsequenz (Meg) und die Sequenz des synthetischen Gens *meg*

7.4.3 β -Cinnamomin

Cin:

MNFTALLAAVAALVGSANATACTATQQTAAAYKTLVSILSESSFSQCSKDSGYSMILTATALPTNAQ
YKLMCASTACNTMIKKIVALNPPDCDLTVPTSGLVLDVYTYANGFSSKCSL
(β -Cinnamomin Signalsequenz)

cin:

CCATGGGCGAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATA
TGACTGCGTGTACTGCAACCAACAACTGCCGCTTATAAACTCTGGTTAGCATTCTGTCTGAGT
CCAGCTTCTCCAGTGCTCCAAAGACTCCGGTTATTCTATGCTGACCGCAACCGCGCTGCCGACCA
ACGCTCAGTACAACTGATGTGCGCGAGCACCCTTGCAACACCATGATTAAGAAAATCGTAGCTC
TGAATCCGCCGATTGCGATCTGACCGTACCGACCTCTGGCCTGGTGCTGGATGTTTACACTTACG
CAAACGGCTTCTTCTTAAATGCGCTTCCCTGTAAGAATTC
(*NcoI*, 6x-His-Tag, TEV-Erkennungssequenz, *NdeI*, β -Cinnamomin, *EcoRI*)

Abbildung 70. β -Cinnamominproteinsequenz (Cin) und die Sequenz des synthetischen Gens *cin*

7.4.4 β -Cryptogein

Cry:

MNFTALLAAVAAALVGSANATACTATQQTAAKYTLVSI LSDASFNQ CSTDSGY SMLTAKALPTTAQ
YKLMCASTACNTMIKKIVTLNPPNCDLTVPTSGLV LNVYSYANGFSNKCSSL

(β -Cryptogein Signalsequenz)

cry:

CCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATA
TGACTGCGTGTACTGCAACTCAGCAAAC TCGGCATATAAACTCTGGTTTCTATCCTGTCCGACG
CTAGCTTCAACCAATGTTCTACTGACTCCGGTTACTCTATGCTGACTGCGAAAGCCCTGCCGACCA
CCGCTCAATATAAACTGATGTGCGCTAGCACC GCGTGCAACACTATGATCAAAAAGATTGTGACCC
TGAACCCGCCAAATTGCGATCTGACCGTGCCGACTAGCGGTCTGGTTCTGAATGTATACTCCTACG
CTAACGGTTTCAGCAATAAATGTTCTCTCTGTGA GAATTC

(NcoI, 6x-His-Tag, TEV-Erkennungssequenz, NdeI, β -Cryptogein, EcoRI)

Abbildung 71. β -Cryptogeinproteinsequenz (Cry) und die Sequenz des synthetischen Gens cry

7.4.5 CYP154C5

CYP154C5:

MNACPHSDTLTIDPMITDLAGETSRLRAAGPLTRIDLLGVPALAVTGHTLARQLLTDTRLVKDINA
WSLWQSGTVTRQWPLIGMIDVDRSMFTVDGPEHRRRLRIKTTQALTRRRLDALKPTIERYVAELLDD
LERAGADGAVVDLKS VFAYPLPMRVISALMGVPSEDQEQLLTWYKAFFSILTPQDERLRVIDEMHG
YFTEMVRRKTAEPGDDLTSALIYATDGETPLTEEEVIGNLQALVAAGHETT VSLILTAVRALLSHP
EQLRLVRDGEIGWETAIEETLRWDGPVIHLLMRFATEDIDLGDAVIPRGEVVMVS YRAIGRDITVH
GADADDFDITRATAARHISFGHGPHICPGAALARLEAAIALPALFTRFPHLHPALPLDQIPNLVPL
TQNDLSHFPIHLGR

cyp154C5:

ATGAACGCCTGCCCCCATTCGGACACCCTCACCATCGACCCGATGATCACCGACCTGGCCGGGGAG
ACCAGCCGCCTGCGCGCGGCGCGCCGCTCACCAGGATCGACCTGCTCGGCGTTCCCGCCCTCGCC
GTCACCGGCCACACGCTGGCCAGGCAGCTGCTCACCAGACACCAGGCTGGTCAAGGACATCAACGCC
TGGTCACTGTGGCAGTCCGGCACGGTGACCAGGCAGTGGCCGCTGATCGGCATGATCGACGTGGAC
CGCTCGATGTTTACCCTGGACGGCCCGGAACACCGCCGACTGCGCATCAAGACCACCCAGGCGCTG
ACCCGGCGCCGCCCTCGACGCGCTGAAGCCGACCATCGAACGTTACGTGCGCGAGCTGCTCGACGAC
CTCGAGCGCGCGGGCGCCGACGGCGCGGTGGTGGATCTGAAATCGGTGTTTCGCCTACCCGCTGCCG
ATGCGGGTGATCAGCGCGCTGATGGGGGTGCCGAGCGAGGACCAGGAACAGCTGCTCACCTGGTAC
AAGGCGTTCTTCTCGATCCTCACCCTCGCAGGACGAGCGGCTGCGGGTGATCGACGAGATGCACGGG
TACTTCACCGAGATGGTGCCTCGCAAGACCGCCGAACCCGGCGACGACCTCACCTCCGCGCTCATC
TACGCCACCGACGGGGAGACGCCGCTCACCAGGAGGAGGTGATCGGCAATCTCCAGGCGCTCGTC
GCCGCGGGCCACGAACACCGTGAGCCTGATCCTGACCGCGGTGCGCGCGCTGCTGTGCGATCCC
GAGCAGCTGCGGCTGGTCCGCGACGGCGAGATCGGCTGGGAGACCGCCATCGAAGAGACCTGCGC
TGAGACGGGCGCGTATCCATCTGCTGATGCGCTTCGCCACCGAGGACATCGACCTCGGCGACGCC
GTGATCCCGCGCGGCGAGGGCGTGGTCATGTCTACCGCGCGATCGGCGCGCATCACCGTGCAC
GGTGCCGACGCCGACGACTTCGACATCACCCGCGCCACCGCCGCCCGGCACATCTCCTTCGGCCAC
GGCCCGCACATCTGCCCCGGCGCGCCCTGGCCCGCTGGAAGCCGCCATCGCCCTCCCCGCCCTG
TTCACCCGCTTCCCCACCTCCACCCCGCCCTCCCCCTCGACCAGATCCCCAACCTCCCCGTCTC
ACCCAGAACGACCTGTCCACTTCCCCATCCACCTGGGCAGGTGA

Abbildung 72. Protein- (CYP154C5) und Gensequenz (cyp154C5) der CYP154C5 P450 Monooxygenase aus *N. farcinica*

7.4.6 Elektronentransferkomponenten

PdR:

MNANDNVVIVGTGLAGVEVAFGLRASGWEGNIRLVGDATVIPHHLPLPSKAYLAGKATAESLYLRT
PDAYAAQNIQLLGGTQVTAINRDRQQVILSDGRALDYDRLVLATGGRPRPLPVASGAVGKANNFRY
LRTLEDAECIRRLIADNRLVVIGGGYIGLEVAATAIKANMHVTLTDAARVLERV TAPPVSAFYE
HLHREAGVDIRTGTQVCGFEMSTDQKQVTA VLCEDGTRL PADLVIAGIGLIPNCELASAAGLQVDN
GIVINEHMQTSDPLIMAVGDCARFHSQLYDRWVRIESVPNALEQARKIAAILCGKVP RDEAAPFWF

SDQYEIGLKMVGLSEGYDRIIVRGSLAQPDFSVFYLGDRVLAVDTVNRPFVEFNQSKQIIITDRLPV
EPNLLGDESVPLEKIIIAAKAELSSA

camA:

GTGAACGCAAACGACAACGTGGTCATCGTCGGTACCGGACTGGCTGGCGTTGAGGTCGCCTTCGGC
CTGCGCGCCAGCGGCTGGGAAGGCAATATCCGGTTGGTGGGGGATGCGACGGTAATTCCCCATCAC
CTACCACCGCTATCCAAAGCTTACTTGGCCGGCAAAGCCACAGCGAAAGCCTGTACCTGAGAACC
CCAGATGCCTATGCAGCGCAGAACATCCAACACTCGGAGGCACACAGGTAACGGCTATCAACCGC
GACCGACAGCAAGTAATCCTATCGGATGGCCGGGCACTGGATTACGACCGGCTGGTATTGGCTACC
GGAGGGCGTCCAAGACCCCTACCGGTGGCCAGTGGCGCAGTTGGAAAGGCGAACAACCTTTCGATAC
CTGCGCACACTCGAGGACGCCGAGTGCATTGCCGGCAGCTGATTGCGGATAACCGTCTGGTGGTG
ATTGGTGGCGGCTACATTGGCCTTGAAGTGGCTGCCACCGCCATCAAGGCGAACATGCACGTCACC
CTGCTTGATACGGCAGCCCGGGTTCTGGAGCGGGTTACCGCCCCGCCGGTATCGGCCTTTTACGAG
CACCTACACCGCGAAGCCGGCGTTGACATACGAACCGGCACGCAGGTGTGCGGGTTTCGAGATGTGCG
ACCGACCAACAGAAGGTTACTGCCGTCCTCTGCGAGGACGGCACAAGGCTGCCAGCGGATCTGGTA
ATCGCCGGGATTGGCCTGATACCAAACCTGCGAGTTGGCCAGTGCAGGCCGGCCTGCAGGTTGATAAC
GGCATCGTGATCAACGAACACATGCAGACCTCTGATCCCTTGATCATGGCCGTCGGCGACTGTGCC
CGATTTACAGTCAGCTCTATGACCGCTGGGTGCGTATCGAATCGGTGCCCAATGCCTTGGAGCAG
GCACGAAAGATCGCCGCCATCCTCTGTGGCAAGGTGCCACGCGATGAGGCGGCGCCCTGGTTCTGG
TCCGATCAGTATGAGATCGGATTGAAGATGGTCGGACTGTCCGAAGGGTACGACCGGATCATTGTC
CGCGGCTCTTTGGCGCAACCCGACTTCAGCGTTTTCTACCTGCAGGGAGACCGGGTATTGGCGGTC
GATACAGTGAACCGTCCAGTGGAGTTCAACAGTCAAAACAAATAATCACGGATCGTTTGCCGGTT
GAACCAACCTACTCGGTGACGAAAGCGTGCCGTTAAAGGAAATCATCGCCGCCGCAAGCTGAA
CTGAGTAGTGCTGA

Abbildung 73. Protein- (Pdx) und Gensequenz (*camA*) der Putidaredoxinreduktase aus *P. putida*

Pdx:

MSKVYVYSHDGTRELDVADGVSLMQAAVSNGIYDIVGDCGGSASCATCHVYVNEAFTDKVPAANE
REIGMLECVTAELKPNRLCCQIIMTPELDGIVVDVPDRQW

camB:

ATGTCTAAAGTAGTGTATGTGTACATGATGGAACGCGTCGCGAACTGGATGTGGCGGATGGCGTC
AGCCTGATGCAGGCTGCAGTCTCCAATGGTATCTACGATATTGTGCGGTGATTGTGGCGGCAGCGCC
AGCTGTGCCACCTGCCATGTCTATGTGAACGAAGCGTTCACGGACAAGGTGCCCCGCCCAACGAG
CGGGAAATCGGCATGCTGGAGTGCCTCACGGCCGAAGTGAAGCCGAACAGCAGGCTCTGCTGCCAG
ATCATCATGACCCCCGAGCTGGATGGCATCGTGGTTCGATGTTCCCGATAGGCAATGGTAA

Abbildung 74. Protein- (Pdx) und Gensequenz (*camB*) des Putidaredoxin aus *P. putida*

7.4.7 Sekretionssignalsequenzen

MalEss:

MKIKTGARILALSALT'TMMFSASALA

malEss:

ATGAAAATAAAAACAGGTGCACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAACGACGATGATGTTTTCCGCC
TCGGCTCTCGCC

Abbildung 75. Protein- (MalEss) und Gensequenz (*malEss*) der Sekretionssignalsequenz von MalE aus *E. coli*

DsbAss:

MKKIWLALAGLVLAFSASA

dsbAss:

ATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAGCGCATCGGCG

Abbildung 76. Protein- (DsbAss) und Gensequenz (*dsbAss*) der Sekretionssignalsequenz von DsbA aus *E. coli*

PelBss:

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMA

pelBss:

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGCCGGCGATGGCC

Abbildung 77. Protein- (PelBss) und Gensequenz (*pelBss*) der Sekretionssignalsequenz von PelB E aus *E. carotovora*

7.5 BSA Standardgerade

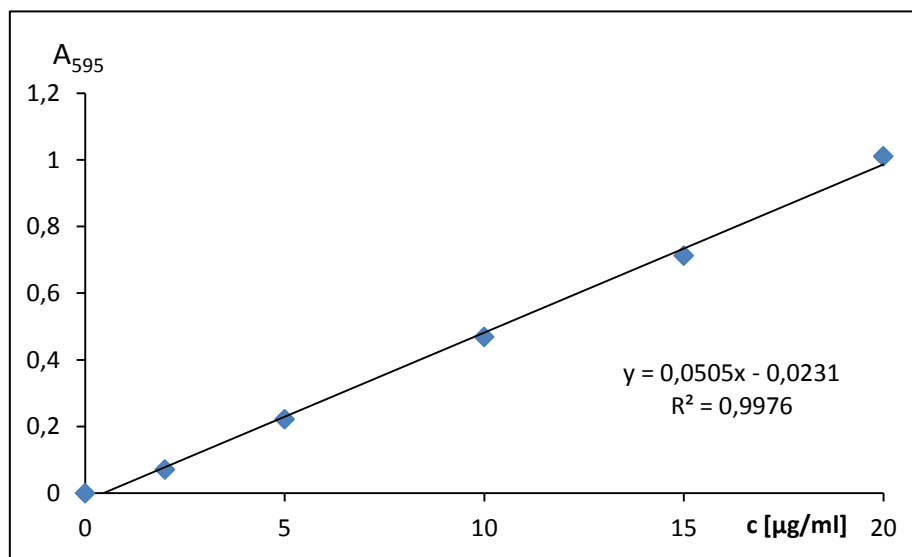


Abbildung 78. BSA Standardgerade

7.6 Ganzzellbiokatalysekalibrationsgeraden

7.6.1 Kalibrationsgeraden der Vorversuche

7.6.1.1 Pregnenolon in Methanol

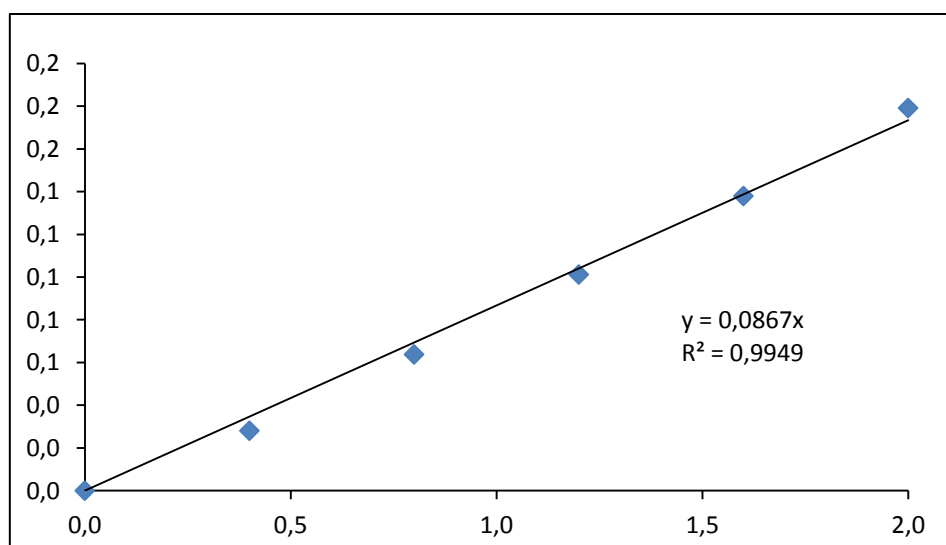


Abbildung 79. Kalibrationsgerade Pregnenolon (1) Vorversuch

7.6.1.2 Testosteron in Methanol

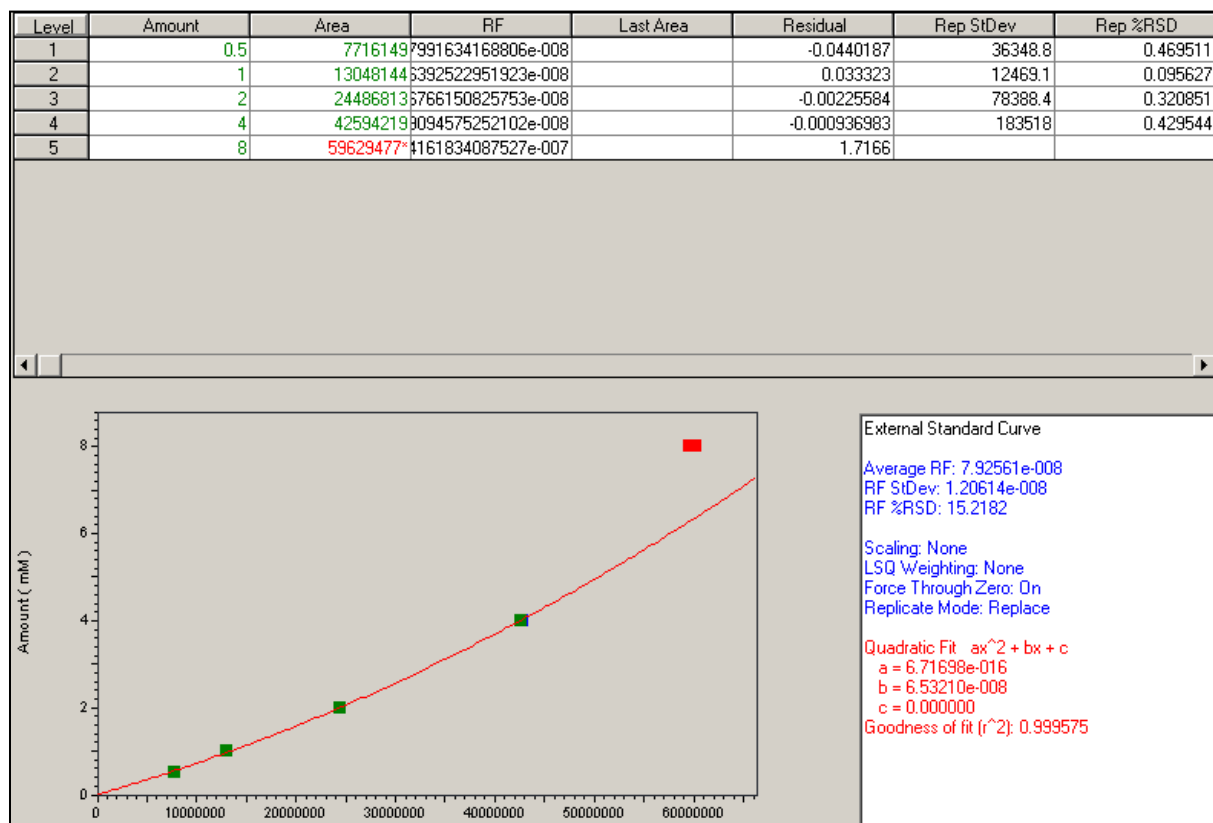


Abbildung 80. Kalibrationsgerade Testosteron (2) Vorversuch

7.6.2 Kalibrationsgeraden der Hauptversuche

7.6.2.1 Pregnenolon in Methanol

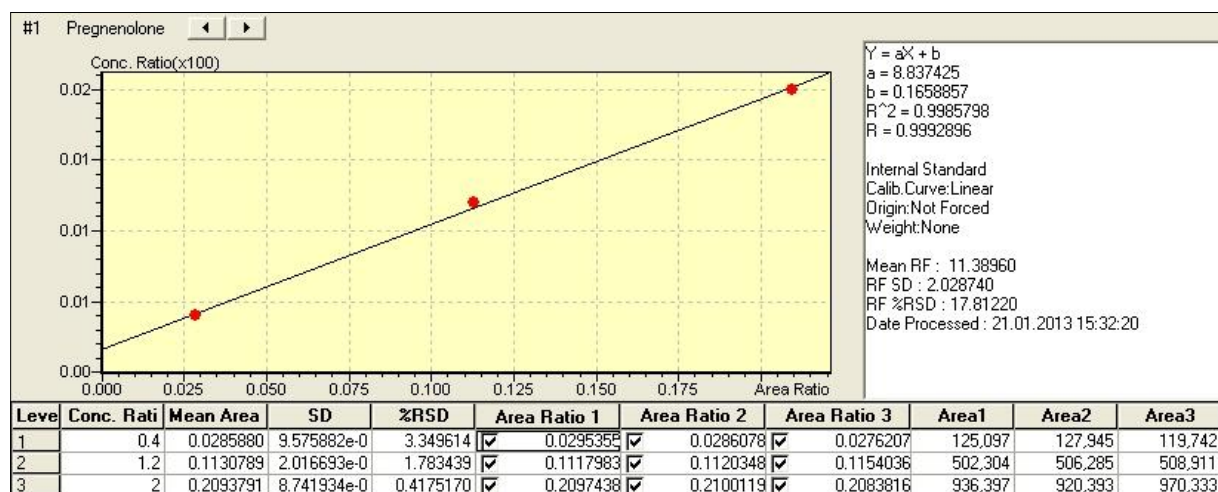


Abbildung 81. Kalibrationsgerade der Pregnenolon (1)-Stammlösung gelöst in Methanol

7.6.2.2 Pregnenolon in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

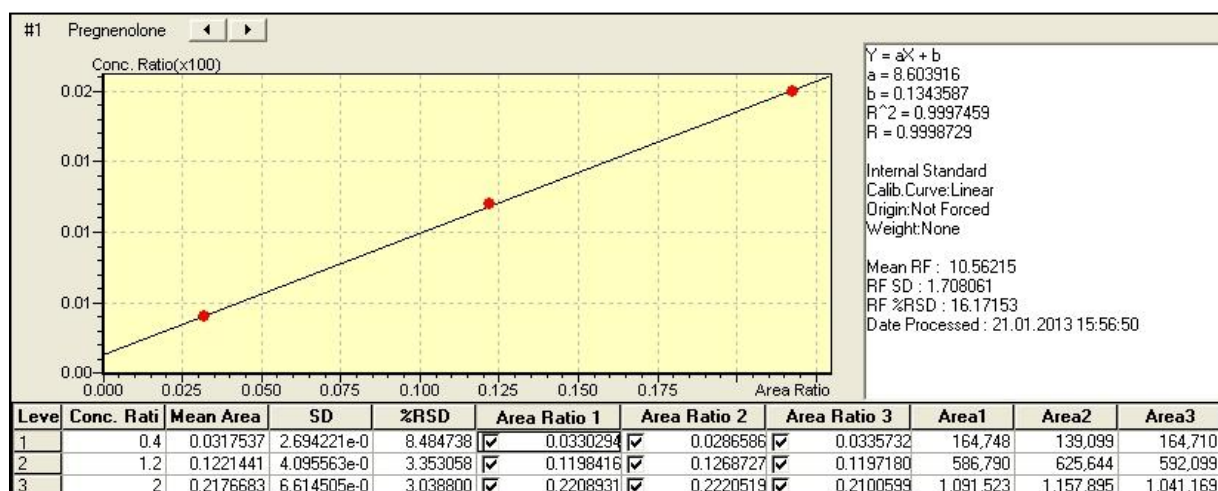


Abbildung 82. Kalibrationsgerade der Pregnenolon (1)-Stammlösung gelöst in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

7.6.2.3 Testosteron in Methanol

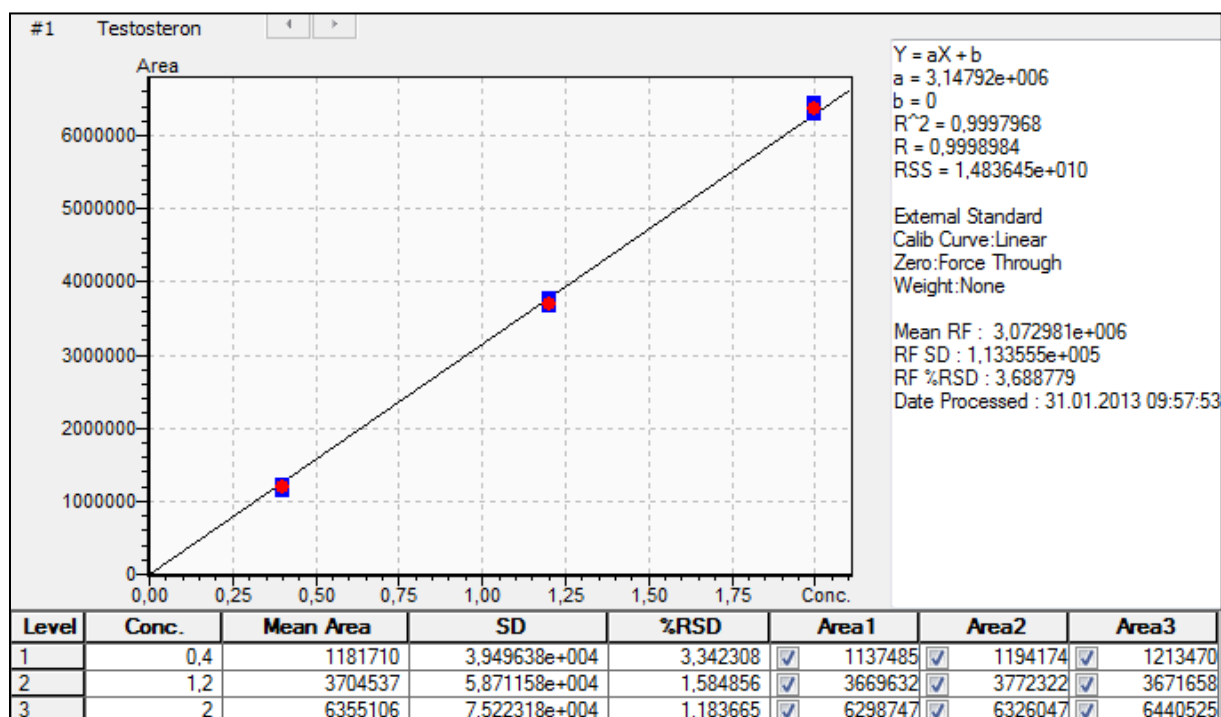


Abbildung 83. Kalibrationsgerade der Testosteron (2)-Stammlösung gelöst in Methanol

7.6.2.4 Testosteron in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

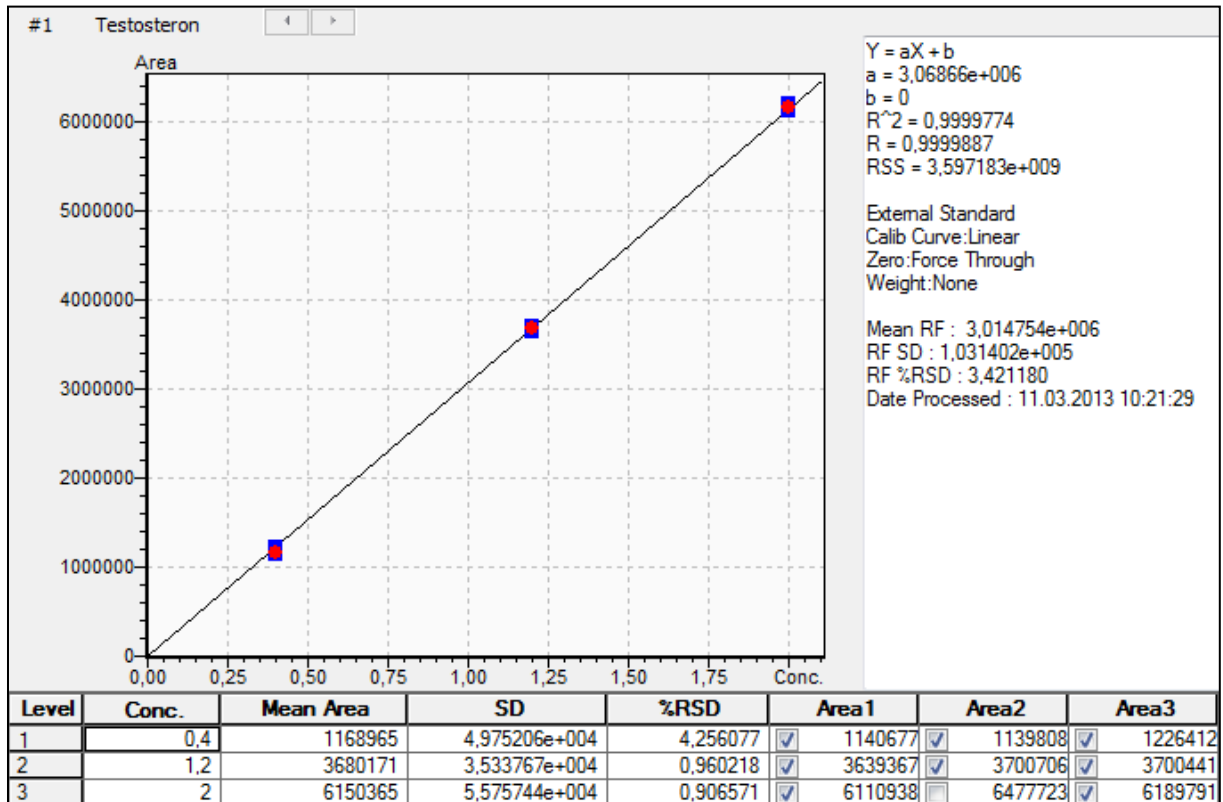


Abbildung 84. Kalibrationsgerade der Testosteron (2)-Stammlösung gelöst in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

7.6.2.5 Progesteron in Methanol

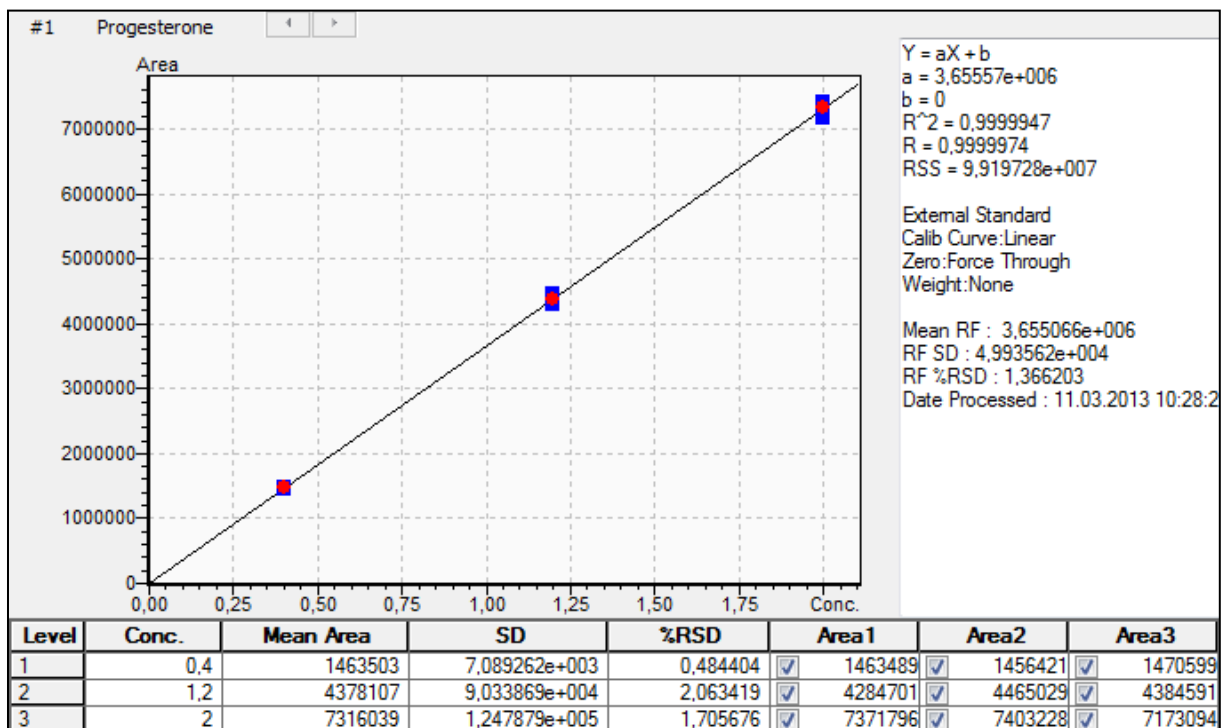


Abbildung 85. Kalibrationsgerade der Progesteron (3)-Stammlösung gelöst in Methanol

7.6.2.6 Progesteron in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

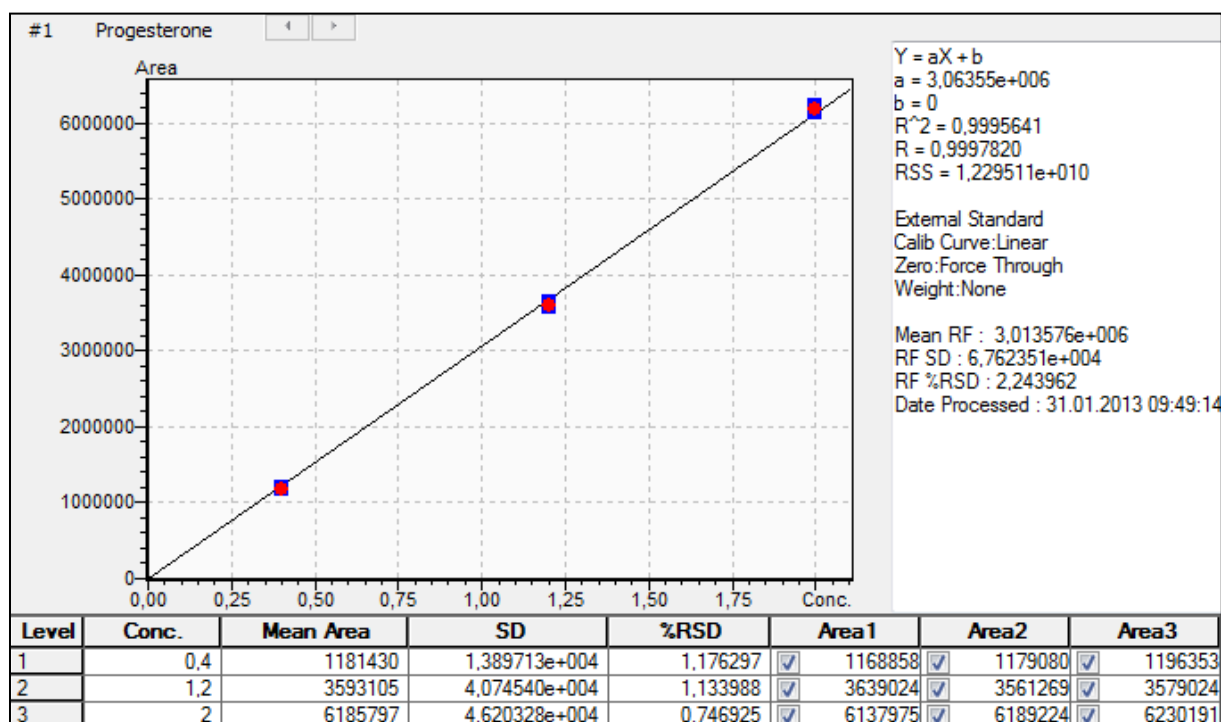


Abbildung 86. Kalibrationsgerade der Progesteron (3)-Stammlösung gelöst in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

7.6.2.7 Dehydroepiandrosteron in Methanol

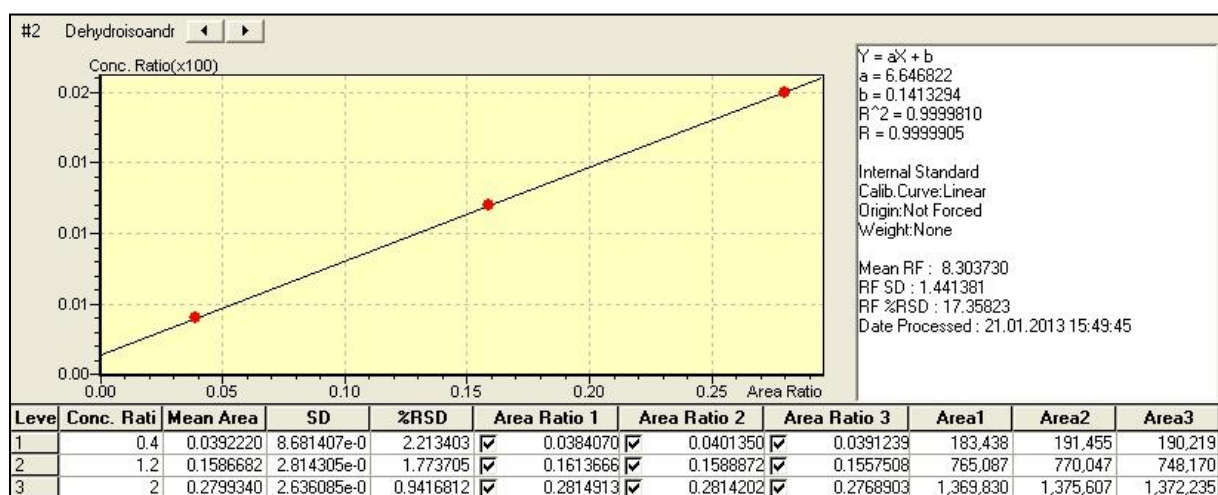


Abbildung 87. Kalibrationsgerade der Dehydroepiandrosteron (4)-Stammlösung gelöst in Methanol

7.6.2.8 Dehydroepiandrosteron in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

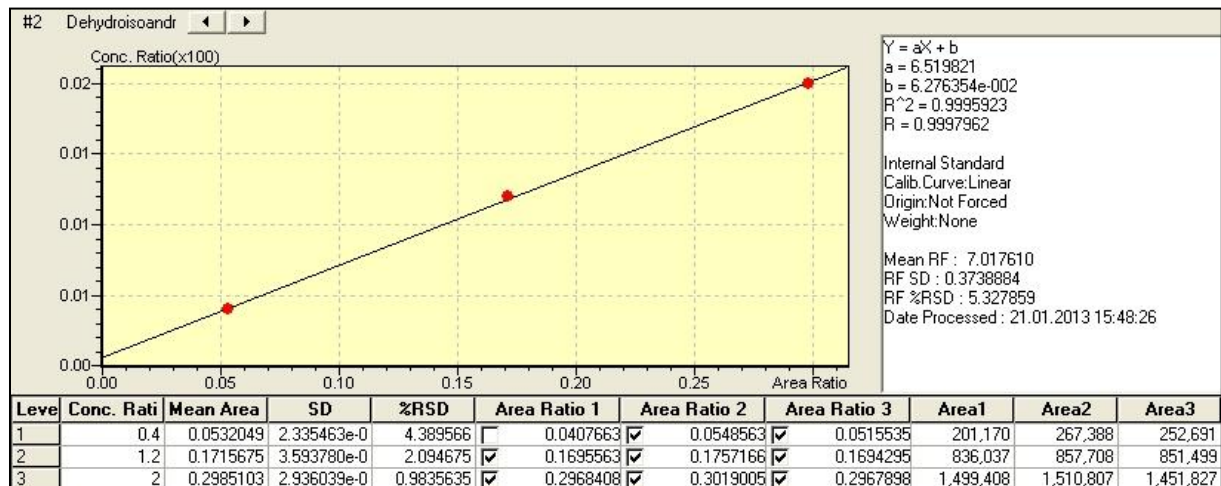


Abbildung 88. Kalibrationsgerade der Dehydroepiandrosteron (4)-Stammlösung gelöst in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

7.6.2.9 Androstendion in Methanol

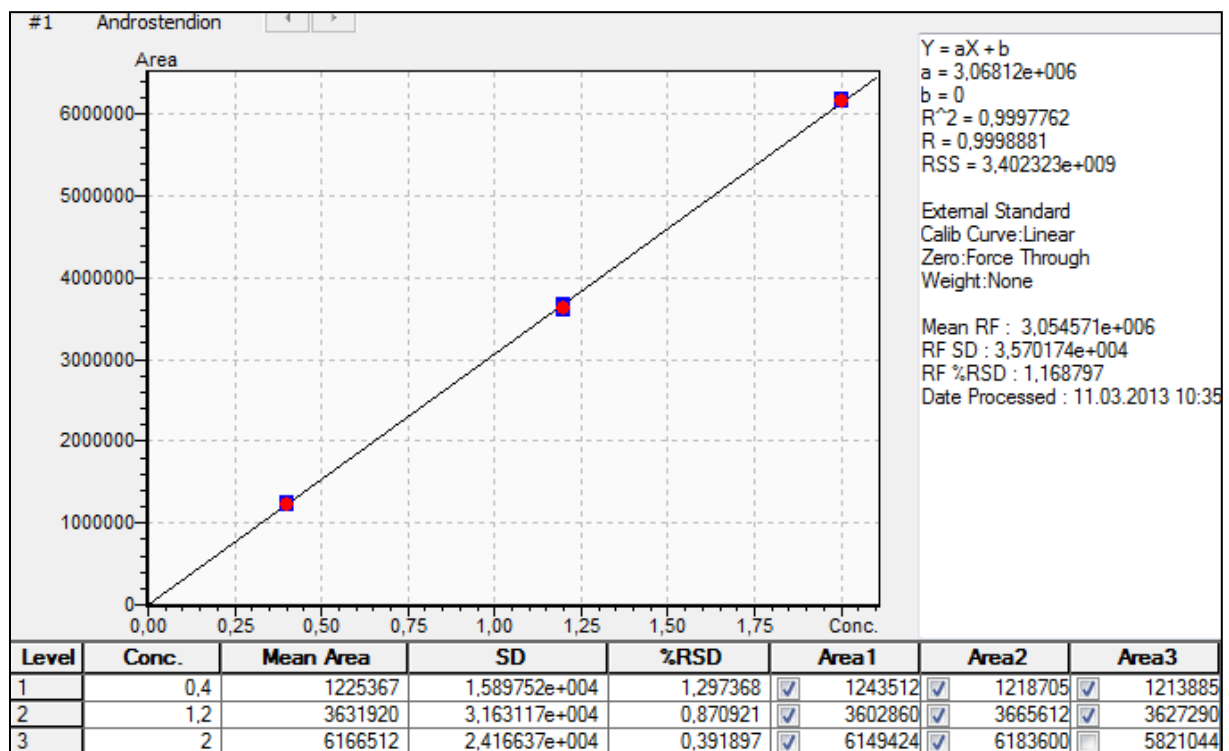


Abbildung 89. Kalibrationsgerade der Androstendion (5)-Stammlösung gelöst in Methanol

7.6.2.10 Androstendion in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

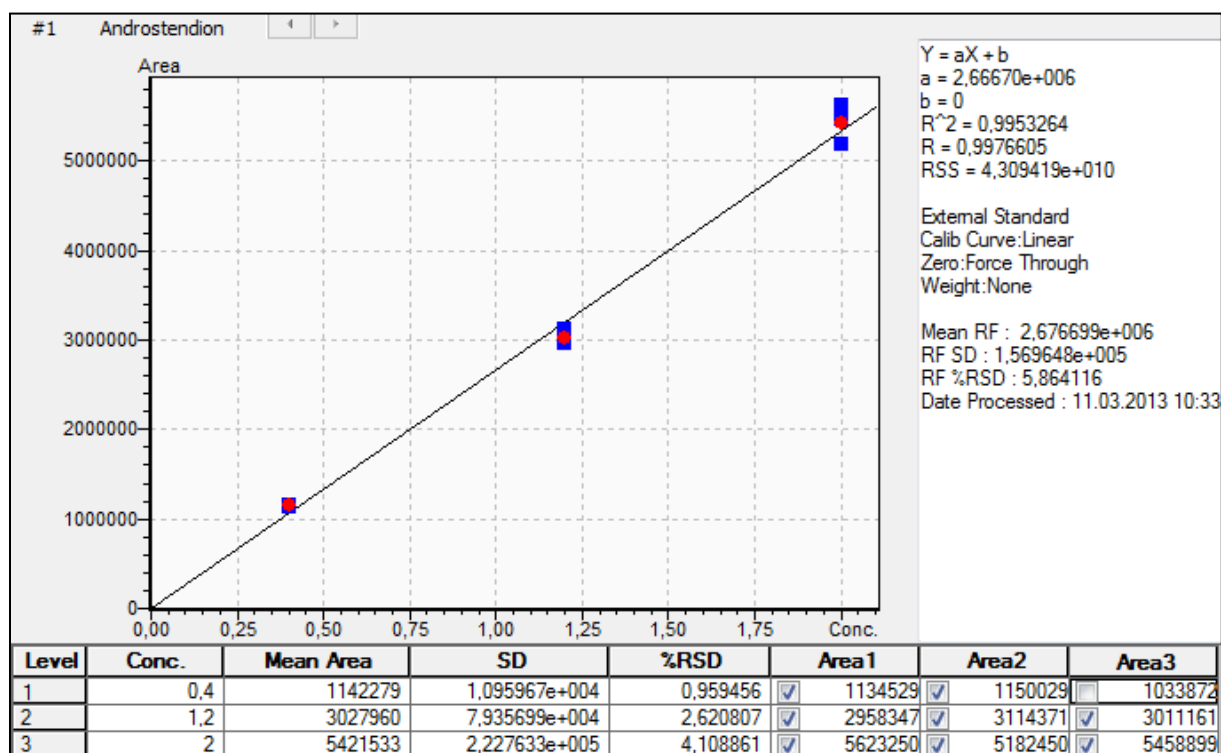


Abbildung 90. Kalibrationsgerade der Androstendion (5)-Stammlösung gelöst in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

7.6.2.11 Nandrolon in Methanol

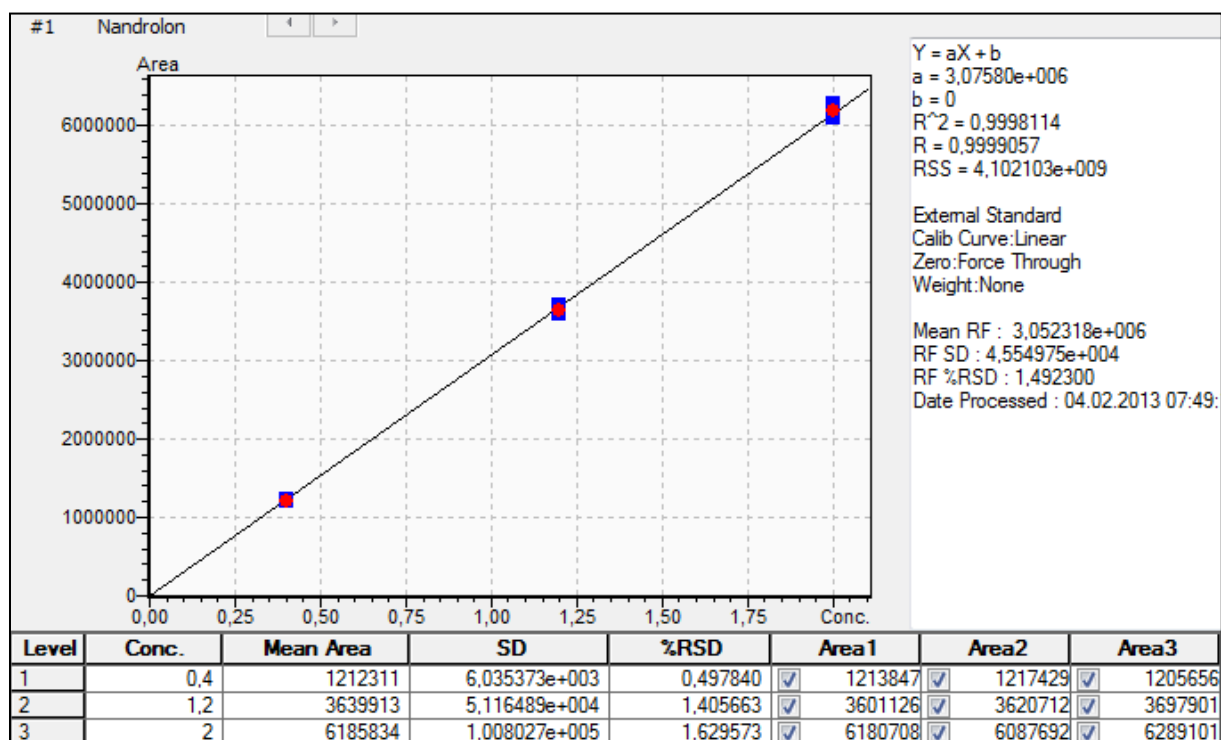
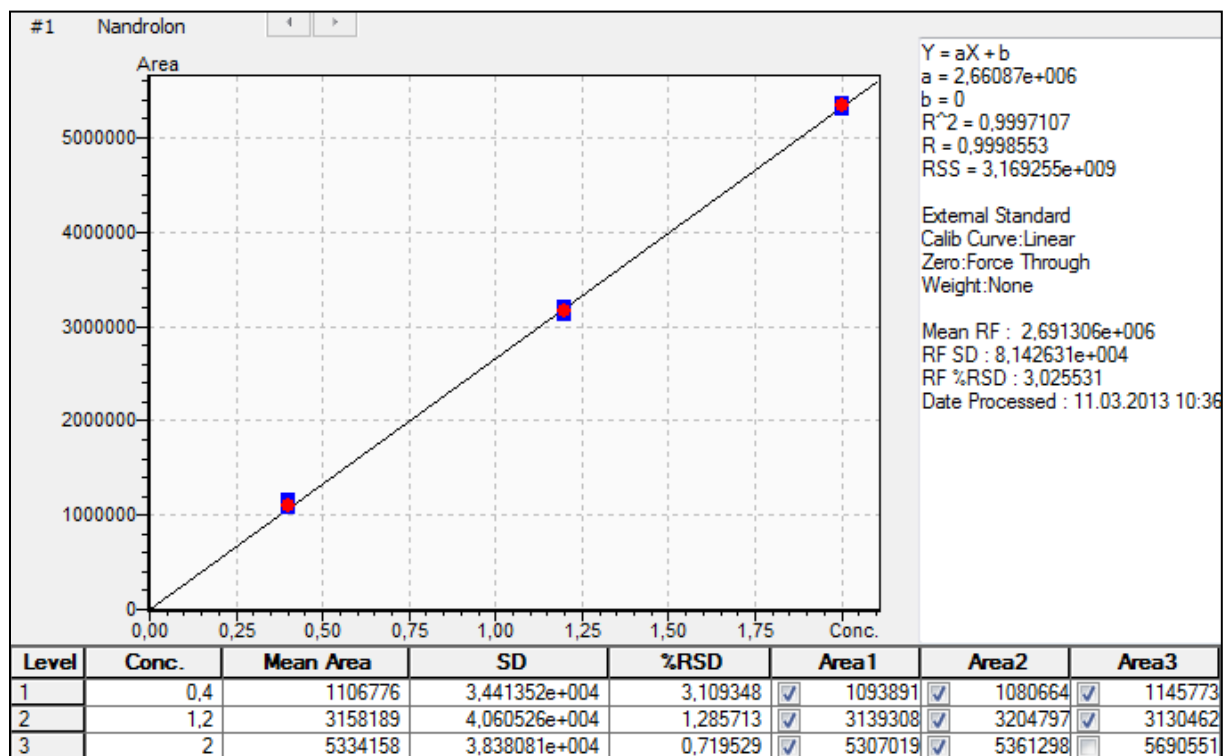


Abbildung 91. Kalibrationsgerade der Nandrolon (6)-Stammlösung gelöst in Methanol

7.6.2.12 Nandrolon in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrinAbbildung 92. Kalibrationsgerade der Nandrolon (6)-Stammlösung gelöst in 36 % w/v Hydroxypropyl- β -cyclodextrin