

Institut für Biologie I (Botanik und Molekulargenetik)

Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen

Rekombinante Biosynthese von p-Cumarylalkohol in *E. 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-Biologe

Frank Jansen

aus Mönchengladbach

Berichter:

Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Fritz M. Kreuzaler
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Ulrich Schwaneberg

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2011

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Abstract	7
1. Einleitung	8
1.1. Biokonversion nachwachsender Rohstoffe	8
1.2. Lignin als Quelle von Aromaten	12
1.3. Der Aufbau pflanzlicher Zellwände	13
1.4. Die Ligninbiosynthese	15
1.5. Transport und Lignifizierung der Ligninvorstufen	19
1.6. Biodegradation von Lignin	22
1.7. Die rekombinante Biosynthese von p-Cumarylalkohol	23
1.8. Ziel der Arbeit	27
2. Material	29
2.1. Bakterienstämme	29
2.2. Verwendete Nukleinsäuren	29
2.3. Synthetische Oligomere	30
2.4. Plasmide	31
2.5. Enzyme und Reaktionskits	33
2.6. Marker	34
2.7. Antikörper und enzymkonjugierte Antikörper	35
2.8. Materialien zur Chromatographie	35
2.9. Medien, Puffer und Lösungen	35
2.10. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	36
2.11. Geräte und Apparaturen	36
3. Methoden	38
3.1. Mikrobiologische Methoden	38
3.1.1. Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> Stämmen	38

3.1.2. Herstellung elektrokompenter Zellen	38
3.1.3. Elektrottransformation.....	38
3.2. Molekularbiologische Methoden	39
3.2.1. Polymerase chain reaction (PCR)	39
3.2.2. Kolonie-PCR	40
3.2.3. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	41
3.2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	41
3.2.5. Restriktionsverdau.....	42
3.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten	42
3.2.7. Dephosphorylierung restriktionsverdauter Plasmid-DNA	43
3.2.8. DNA-Präzipitation	43
3.2.9. Isolation von Plasmid-DNA	43
3.2.10. Sequenzierung von Plasmid-DNA	44
3.3. Physiologische und proteinchemische Methoden.....	44
3.3.1. Heterologe Proteinexpression	44
3.3.2. Heterologe Proteinexpression zur <i>in vivo</i> Aktivitätsbestimmung	45
3.3.3. Denaturierende Proteingelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.3.4. Immunoblot-Analyse.....	46
3.3.5. Zellaufschluss.....	47
3.3.6. Aufreinigung von Proteinen über eine Ni ²⁺ -NTA Matrix	47
3.3.7. Gewinnung nativer Pc4CL aus einer Suspensionskultur	48
3.3.8. Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford	48
3.3.9. Enzymtests	49
3.3.10. Enzymatische Herstellung von p-Cumaryl-CoA.....	50
3.4. Analytik	51
3.4.1. Dünnschichtchromatographie.....	51
3.4.2. Festphasenextraktion.....	51
3.4.3. Flüssig-Flüssig Extraktion.....	52
3.4.4. HPLC.....	53
3.4.5. Wellenlängenscan.....	53
3.4.6. Lyophilisation.....	53
3.4.7. Auftragsanalytik	54

4. Ergebnisse	56
4.1. Biosynthese von p-Cumarat durch TAL-vermittelte Desaminierung.....	56
4.1.1. Klonierung der TAL aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (RsTAL)	56
4.1.2. Expression, Aufreinigung und <i>in vitro</i> Aktivitätsanalyse von RsTAL	56
4.1.3. Produktion von p-Cumarat in transgenen <i>E. coli</i> Zellen.....	57
4.2. Aktivierung aromatischer Säuren	59
4.2.1. Klonierung der 4-Cumarat:CoA Reduktase aus <i>Petroselinum crispum</i>	59
4.2.2. Expression und Aufreinigung der Pc4CL	60
4.2.3. <i>In vitro</i> Aktivitätsanalyse rekombinanter Pc4CL.....	61
4.2.4. <i>In vitro</i> Produktion aktivierter Phenylpropanoid-Thioester	65
4.2.5. Gekoppelter <i>in vitro</i> Aktivitätstest mit RsTAL und Pc4CL.....	69
4.3. Analyse von CCR und CAD in <i>E. coli</i>	73
4.3.1. Klonierung der Cinnamoyl-CoA Reduktase aus <i>Zea mays</i> (ZmCCR).....	73
4.3.2. Expression, Aufreinigung und <i>in vitro</i> Aktivität der ZmCCR	73
4.3.3. Klonierung der Cinnamylalkohol Dehydrogenase aus <i>Zea mays</i> (ZmCAD)	77
4.3.4. Expression, Aufreinigung und <i>in vitro</i> Aktivität der ZmCAD	77
4.4. Verknüpfung von Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese	79
4.4.1. Koexpression von Pc4CL und ZmCCR in <i>E. coli</i>	80
4.4.2. Identifizierung von p-Cumarylalkohol.....	84
4.5. Koexpression von Pc4CL, ZmCCR und ZmCAD	87
4.6. Etablierung des vollständigen artifiziellen Biosyntheseweges in <i>E. coli</i>	88
4.7. Fermentation in LB-Medium	92
5. Diskussion	95
5.1. Biosynthese von p-Cumarat.....	95
5.2. Aktivierung aromatischer Säuren	99
5.3. Analyse von ZmCCR und ZmCAD.....	103
5.4. <i>In vivo</i> Kopplung von Pc4CL und ZmCCR.....	106
5.5. Etablierung des vollständigen Monolignolbiosyntheseweges in <i>E. coli</i>	110

6. Fazit	118
7. Literatur	120
8. Anhang	130
8.1. Abkürzungsverzeichnis.....	130
8.2. Abbildungsverzeichnis.....	132
8.3. Tabellenverzeichnis	132
8.4. Veränderte Sequenz der <i>R_sTAL</i> -ORF (nach Gensynthese durch GenScript)	134
8.5. Plasmidkarten von erzeugten Konstrukten	135
Danksagung	138
Lebenslauf	139

Zusammenfassung

Die Verknappung fossiler Rohstoffe erfordert die Entwicklung alternativer Strategien für eine nachhaltige Versorgung mit Energieträgern und zur Gewinnung von Synthesebausteinen. Energetische und stoffliche Biokonversionsprozesse nachwachsender Rohstoffe können dazu beitragen, die Abhängigkeit von fossilen Rohstoffen zu verringern und die künftige Versorgungslücke zu schließen. Dabei kann jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht der Anspruch auf vollständigen Ersatz der fossilen Rohstoffe durch nachwachsende Rohstoffe erhoben werden. Vielmehr ist das Konzept der Nutzung nachwachsender Rohstoffe als Chance zu verstehen, etablierte Verfahren in der Petrochemie zu ergänzen oder in diese integriert zu werden.

Aromatische Verbindungen sind Synthesebausteine für eine Vielzahl von chemischen Produkten. Vorwiegend werden Aromaten in Chemiefasern, in Kunststoffen, in Synthesekautschuk aber auch in Lösungsmitteln verarbeitet. Die Gewinnung von Aromaten erfolgt bislang ausschließlich durch thermische und katalytische Prozesse aus Kohle und Erdöl. Lignin ist nach Zellulose das zweithäufigste Biopolymer in der Natur, etwa 25 % des organisch gebundenen Kohlenstoffs ist in diesem natürlichen Polymer enthalten. Lignin ist Bestandteil pflanzlicher Zellwände und kann als natürliche Ressource aromatischer Verbindungen gesehen werden. Derzeit wird Lignin allerdings aufgrund erheblicher technischer und biotechnologischer Hindernisse kaum stofflich verwertet. Dieses komplexe Heteropolymer inkrustiert pflanzliche Zellwände und besteht hauptsächlich aus den Monolignolen p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol. Zusätzlich zu den Monolignolen sind Derivate dieser in unterschiedlicher Weise im Lignin verknüpft, so dass der enzymatische Zugang zu aromatischen Monomeren heute noch nicht möglich ist. Es existieren weder chemische noch physikalische Methoden, um aus diesem heterogen aufgebauten Makromolekül effektiv monomere aromatische Synthesebausteine zu gewinnen.

Alternativ zur enzymatischen Spaltung wurde in dieser Arbeit die umgekehrte Strategie verfolgt. Die rekombinante Biosynthese von p-Cumarylalkohol, eines der Hauptbestandteile von Lignin, wurde dabei durch die Verknüpfung einzelner Reaktionen aus Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese erreicht. Verschiedene Gene mikrobiellen und pflanzlichen Ursprungs wurden dazu kombiniert. *E. coli* als Wirt für diesen künstlich erzeugten Biosyntheseweg zu verwenden, hatte den Vorteil, dass eine effektive Ausschleusung der Reaktionsprodukte erreicht wurde. Zudem kann in bakteriellen Zellwänden keine Verholzung stattfinden, so dass

die Produkte des artifiziellen Stoffwechselweges nahezu verlustfrei ins Medium ausgeschleust wurden und dort akkumulierten. Erstmals ist es damit gelungen p-Cumarylalkohol - Hauptbestandteil des Lignins - im Rahmen eines „Metabolic Engineering“ Ansatzes in *E. coli* herzustellen.

Abstract

The increasingly scarce availability of fossil raw materials calls for the development of new strategies to ensure the sustainable supply with energy and components for synthesis. Energy and mass bioconversion processes of renewable raw materials can contribute in minimizing the dependence on fossil raw materials and close the gap in energy supply. Currently though, renewable raw materials cannot completely replace fossil raw materials. The emphasis lies more on the concept of using renewable raw materials as a complement to other established petrochemical methods, or to integrate them into these. Aromatic compounds are components used in the synthesis of many chemical products. They are mainly applied in the production of chemical fibers, plastics, synthetic rubber, as well as solvents.

Until now, aromatic compounds are mainly produced through the catalytic or thermal processing of coal and petroleum. Lignin is after cellulose the second most available biopolymer in nature, incorporating around 25 % of all organically bound carbon. Lignin forms a component of the plant cell wall and can be considered as a natural resource for aromatic compounds. So far though, lignin can hardly be exploited as such a resource, due to significant technical and biotechnological obstacles. This complex heteropolymer is incrustated in plant cell walls and consists mainly of the monolignols p-cumarylalcohol, coniferylalcohol and sinapylalcohol. Additionally, derivatives of these monolignols can also be found. They are linked in a variety of ways within the lignin molecule, which has, so far, made it impossible to yield aromatic monomers from lignin by enzymatic means. Up to now, there are no physical or chemical methods available to extract any aromatic monomers as compounds for synthesis from this heterogenically structured macromolecule.

In this thesis, an alternative strategy is presented, by following the opposite route. The recombinant biosynthesis of p-cumarylalcohol, one of the main components of lignin, was achieved by combining single reactions from phenylpropanoid- and lignin biosynthesis pathways. Different genes from microbial and plant origin were combined for this procedure. The use of *E. coli* as a host in this artificial synthesis pathway provided the advantage that the reaction products could be effectively excreted and accumulated into the medium with practically no losses, as the bacterial cell wall cannot be lignified. With the presentation of this work, it is now possible for the first time to produce p-cumarylalcohol, one of the main components of lignin, by means of a "metabolic engineering".

1. Einleitung

1.1. Biokonversion nachwachsender Rohstoffe

Nachwachsende Rohstoffe energetisch und stofflich zu nutzen ist vor dem Hintergrund einer zunehmenden Verknappung der fossilen Rohstoffe, dem Treibhauseffekt und dem Bevölkerungswachstum ins Interesse aktueller Forschung gerückt. Pflanzliche Biomasse stofflich und energetisch zu verwerten, könnte dabei eine nachhaltige und ressourcenschonende Versorgung mit Feinchemikalien, Plattformchemikalien und sich daraus ableitenden Produkten ermöglichen. Zu einer Zeit, in der die globale Klimaerwärmung infolge der weltweiten CO₂-Emissionen und die begrenzte Verfügbarkeit fossiler Rohstoffe im Fokus der Öffentlichkeit stehen, wird die Nutzung alternativer Energiequellen immer wichtiger. Prognosen zufolge ist zu befürchten, dass fossile Reserven noch in diesem Jahrhundert zur Neige gehen (FNR, Fachagentur nachwachsender Rohstoffe e.V.). Der Bedarf an Primärenergie, damit werden alle handelsüblichen Formen von Energie definiert (Erdöl, Kohle, Erdgas, Wasserkraft und Kernenergie), wächst aber stetig an. Von 1980 bis 2009 stieg der weltweite Verbrauch von 6.650,0 Mio. Tonnen (Rohöläquivalenz) auf 11.164,3 Mio. Tonnen an. Dabei entfallen allein 3882,1 Mio. Tonnen auf Erdöl, 2653,1 Mio. Tonnen auf Erdgas und 3278,3 Mio. Tonnen auf Kohle. Wasserkraft und Kernenergie machen einen Anteil von 1.350,8 Mio. Tonnen aus. Innerhalb von 28 Jahren ist der Gesamtzuwachs im Verbrauch um 67 % gestiegen (BP, Statistical Review of world energy 2010). Gleichzeitig vergegenwärtigt die weltweite Verteilung der Erdölreserven die Abhängigkeit der Industrienationen vom Nahen Osten und die Notwendigkeit des Importes aus anderen, zum Teil konfliktbehafteten Ländern. 61 % der Erdöl-Reserven befinden sich im Nahen Osten, 11,6 % in Europa und Asien, 9,5 % in Afrika, 9 % in Mittel- und Südamerika, 5,6 % in Nordamerika und 3,3 % im asiatisch-pazifischen Raum (BP, Statistical Review of world energy 2010). Durch Verbrennung fossiler Brennstoffe und die damit einhergehende Emission von CO₂ hat sich die durchschnittliche globale Temperatur seit dem 19. Jahrhundert um fast ein Grad erhöht ([http://www.bpb.de/Bundeszentrale für politische Bildung](http://www.bpb.de/Bundeszentrale_für_politische_Bildung)), die Folgen dieser klimatischen Veränderung sind weitreichend. Die Bundesregierung in Deutschland verfolgt in verschiedenen Forschungsprogrammen das Ziel dieser komplexen Problematik zu entgegnen, indem u.a. gezielt die energetische und stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe unterstützt wird. Zurzeit werden 5,3 % des Primärenergieverbrauchs in Deutschland durch erneuerbare Energien gedeckt. Mit 70 % unter den erneuerbaren Energien liefert heute die Nutzung von Biomasse den größten Beitrag zur Strom-, Wärme-

und Kraftstoffgewinnung. Europäische Ziele geben sogar vor, den Anteil von erneuerbaren Energien bis 2020 von 5,3 % auf 20,0 % zu steigern (EU-Gipfel im März 2007). Nachhaltig aus pflanzlicher Biomasse Energie in Form von Biokraftstoffen zu generieren, stellt eine klimafreundliche Chance dar, die dem ökologischen Zweck dient nur den Kohlenstoff zu verbrennen, der zuvor während des pflanzlichen Wachstums fixiert wurde (Fortman et al., 2008). Dadurch soll die Umweltbelastung durch verminderte Kohlenstoffdioxidemissionen erheblich gesenkt werden, da die Verbrennung dieser biobasierten Energieträger CO₂-neutral ist.

Energetische Nutzungskonzepte basieren zum Teil auf direkten Verbrennungsprozessen von Biomasse, dazu zählen auch pyrolytische und thermochemische Konversionsverfahren. Die Gewinnung flüssiger, biogener Energieträger beruht hingegen auf der Verwertung von Zuckern, die in Zellulose und Hemizellulose pflanzlicher Zellwände in großen Mengen gespeichert sind. Um diese Zucker aus der Biomasse zu gewinnen, sind hydrolytische Spaltungsprozesse notwendig, aus denen die Monomerbausteine hervorgehen. Im Rahmen fermentativer Prozesse werden aus den Monomeren Energieträger generiert, die als Kraftstoffe eingesetzt werden können. Die erste Generation von Biokraftstoffen umfasste die Erzeugung von Biodiesel aus Raps und Soja oder von Bioethanol aus Zuckern und Stärke. Aus Raps oder Soja gewonnene pflanzliche Öle werden mit Methanol zu Rapsmethylestern (RME) modifiziert. Dieses Gemisch aus Methylestern wird als Biodiesel bezeichnet und kann in geeigneten Motoren als Kraftstoff genutzt werden. Vor allem saccharosehaltige Rohstoffe wie Zuckerrüben und Zuckerrohr, aber auch stärkehaltige Rohstoffe wie Weizen, Roggen, Mais und andere Getreidesorten werden in Bioethanolanlagen großtechnisch zu Bioethanol fermentiert. Biokraftstoffe der ersten Generation werden allerdings aufgrund von Flächennutzungskonkurrenzen teilweise durch Biokraftstoffe der zweiten Generation ersetzt. Biokraftstoffe der zweiten Generation basieren auf der Nutzung bislang nur beschränkt zugänglicher Kohlenstoffquellen wie Lignozellulose. Der Vorteil gegenüber Biokraftstoffen der ersten Generation liegt darin, dass fast jede feste Biomasse verwertet werden kann. Abfälle wie Stroh, Holzreste, Abfallprodukte aus der Agrarwirtschaft, Altholz, Sägerestholz und minderwertiges Waldholz können dabei zu Bioethanol umgesetzt werden. Aber die Nutzung der Biomasse ist auch bei Kraftstoffen der zweiten Generation nicht vollständig. Als Reststoff bleibt nach hydrolytischer Behandlung der Biomasse eine Ligninfraktion übrig, die nicht weiter verwertet werden kann, obwohl hochwertige aromatische Verbindungen im Lignin zu großen Anteilen vorkommen. Lignin ist neben Zellulose Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände. Während Zellulose einheitlich aus verschiedenen verknüpften Zuckermolekülen aufgebaut ist, besteht Lignin

aus heterogen verknüpften aromatischen Bestandteilen (1.3). Die Nutzung von Lignin erweist sich derzeit noch als Hürde bei der nachhaltigen Nutzung pflanzlicher Rohstoffe, weil noch keine Möglichkeiten existieren, dieses komplexe Heteropolymer in einzelne Aromaten zu zerlegen. Daher werden alternative Nutzungskonzepte zur Ligninverwertung bearbeitet, die auf physikalischen und chemischen Konversionsprozessen basieren. Effektive enzymatische Abbauprozesse werden momentan als nicht zielführend betrachtet. In der Praxis laufender Bioethanolkonzepte werden daher die anfallenden ligninhaltigen Reststoffe verbrannt, um die dabei freiwerdende Energie teilweise wieder in den großtechnischen Prozess zu integrieren. Um den Ligningehalt zu reduzieren werden Strategien entwickelt, die Einfluss auf die Ligninbiosynthese nehmen und durch Modifikation der Ligninzusammensetzung eine verbesserte Zugänglichkeit zu den Zuckern ermöglichen könnten (Chapple et al., 2007; Chen and Dixon, 2007; Weng et al., 2008). Das detaillierte Verständnis der natürlichen Lignindegradation durch spezielle Mikroorganismen könnte dabei von großer Bedeutung sein. Es existieren nur sehr wenige Mikroorganismen, die in der Lage sind das Lignin-heteropolymer anzugreifen. Die Inkrustierung der Zellwände durch Lignin schützt die Pflanze vor pathogenem Befall und Abbau durch Biodegradation. Hauptsächlich Vertreter der Basidiomyceten können Lignin aufgrund multienzymatischer Prozesse abbauen. Besonders effektiv scheint dabei der Weißfäulepilz Lignin zu mineralisieren. Einige Weißfäulepilze können sogar selektiv nur Lignin abbauen, ohne die das Lignin umgebende Zellulose anzugreifen (Akhtar, 1998). An diesen Abbauvorgängen sind Laccasen, Peroxidasen, und Oxidasen beteiligt (Martinez et al., 2005), die von den Pilzen als Enzymgemisch sekretiert werden. Die Mechanismen der einzelnen Reaktionen und die komplexe Zusammenarbeit der am Abbau beteiligten Enzyme sind Gegenstand aktueller Forschung.

Einsatzmöglichkeiten von nachwachsenden Rohstoffen zur stofflichen Nutzung sind breit gestreut und werden sich künftig weiter ausdehnen. Etwa 10 % der chemischen Grundstoffe werden bereits jetzt aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen. Dabei reicht das Spektrum von Tensiden und Bioschmierstoffen bis zu Basischemikalien wie Zitronensäure, Milchsäure, Lävulinsäure, Sorbit und Cellulosederivaten (Oertel, 2007). Im Vordergrund aktueller Entwicklungen steht das Ziel, die stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe in bestehende stoffliche Nutzungskonzepte der Erdölraffinerien zu integrieren. Völlig von der Petrochemie losgelöste Konzepte der biogenen Biomassennutzung zur Gewinnung von Synthesebausteinen für weitere Stoffgruppen erscheinen unrealistisch. Zellulose, Hemizellulose und Lignin sind die drei Hauptbestandteile der pflanzlichen Zellwand und bieten das Potential daraus weitere

chemische Produkte zu generieren. Im Wesentlichen dienen Zellulose und Hemizellulose als Glukose- und Xylose-Quellen. Für Lignin gibt es bislang kaum stoffliche Verwendungszwecke. Zellulose liefert 40 % des organisch gebundenen Kohlenstoffs, Lignin 15-25 % (Mooney, 2009). Lignin als Quelle zur Aromatengewinnung zu verwerten, findet keine Anwendung, obwohl dieser Rohstoff etwa 30 % der Trockenmasse verholzter Pflanzen ausmacht. Die hohe Komplexität des Ligninpolymers liegt in den vielfältigen Verknüpfungsmöglichkeiten der Monomere untereinander begründet. Eine Spaltung von Lignin in Einzelbestandteile unter Erhalt der funktionellen Strukturen ist zum jetzigen Zeitpunkt unmöglich. Da die Spaltung von Lignin in Einzelbausteine nicht zu realisieren ist, sind biotechnologische Verfahren zur Gewinnung von Aromaten aus nachwachsenden Rohstoffen interessante Alternativen. Der Versuch durch biotechnologische Ansätze aromatische Verbindungen oder Monomere aufzubauen, die sich zur Herstellung neuartiger biobasierter Polymere eignen, rückt daher immer weiter in den Vordergrund aktueller Forschung (Persönliche Mitteilung mit Prof. T. Hirth, IGB Stuttgart). Auch wenn Lignin heute noch keine große Rolle zur Herstellung von Bulk- oder Feinchemikalien spielt, prognostiziert man diesem nachwachsenden Rohstoff ein enormes Potential. (Holladay et al. 2007; Kamm et al. 2006). Diese Nutzungslücke zu schließen und das Potential dieses ubiquitären Rohstoffes auszuschöpfen, darin besteht die künftige Herausforderung für Industrie und Forschung im Rahmen einer stofflichen Nutzung von Lignin.

Die vielfältigen Nutzungsmöglichkeiten von Biomasse hinsichtlich einer energetischen und stofflichen Verwertung spiegeln sich in aktuellen Forschungsinitiativen wieder. Im Rahmen von Bioraffineriekonzepten soll eine ganzheitliche Verwertung pflanzlicher Biomasse verwirklicht werden. Die Etablierung von Bioraffinerien soll dabei zur integrierten Produktion einer Vielzahl unterschiedlicher Produkte führen. Nachwachsende Rohstoffe, vor allem pflanzliche Biomasse, sollen diesem Konzept zufolge ganzheitlich entlang einer Wertschöpfungskette verwertet werden. Produkte entlang der Wertschöpfungskette können Futtermittel, Werkstoffe, Kraftstoffe, Plattformchemikalien und Feinchemikalien sein (Oertel, 2007). Dabei können stoffliche und energetische Nutzungskonzepte in Konzepte der Petrochemie integriert werden. Im Gegensatz zur Petrochemie steckt das Konzept der Nutzung nachwachsender Rohstoffe noch in der Entwicklungs- und Testphase. Daher erscheint eine Integration des Bioraffineriekonzeptes in schon bestehende erdölbasierte Verfahren sinnvoll.

1.2. Lignin als Quelle von Aromaten

Lignin kann eine wichtige Rolle bei der Gewinnung von aromatischen Basischemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen einnehmen. Aromaten gehören zu den wichtigsten Ausgangssubstanzen in der Kunststoff-, Synthesekautschuk- und Synthesefaserproduktion. Derzeit bilden Erdöl und Kohle die Basis von Aromaten. Durch destillative Trennungsprozesse werden dabei aus Rohöl unterschiedlich schwere Fraktionen generiert, aus denen Ausgangsstoffe für die Synthese von aromatischen Polymeren hergestellt werden. Die Verfahren zur Gewinnung der Basischemikalien aus Erdöl stellen eine enorme Belastung für die Umwelt dar. Neben den hohen Schwefeldioxid- und Kohlenstoffdioxid-Emissionen werden hochgiftige Schwermetalle und Destillationsrückstände in großen Mengen akkumuliert, deren Entsorgung sehr kostenintensiv ist. Eine direkte Isolierung primär vorhandener Aromaten aus Kohle oder Erdöl ist zwar möglich, hat in der Industrie jedoch keine technische und ökonomische Bedeutung. Nach derzeitigem Stand der Technik werden Aromaten ausschließlich durch thermische und katalytische Prozesse mit anschließender Isolierung generiert. Aus Rohöl gewonnene Basissubstanzen wie Benzol oder p-Xylol können je nach Bedarf über bestimmte katalytische Modifikationen am aromatischen Ring zu einer Vielzahl von unterschiedlichen aromatischen Derivaten umgewandelt werden (Arpe, 2007). Neben den fossilen Rohstoffen stellt das natürlich vorkommende Lignin eine Quelle für Aromaten dar. Lignin ist aber aufgrund der Struktur und seiner natürlichen Funktionen in Pflanzen enorm widerstandsfähig gegen thermische, chemische und biologische Einwirkungen. Daher stellt die Konversion von Lignin eine große methodische und technische Herausforderung dar. Etablierte hydrolytische Verfahren zur Gewinnung von Aromaten aus Lignin sind z.B. aus der Papierherstellung bekannt. In diesen Prozessen entstehende Sulfitablaugen enthalten Ligninsulfonsäuren, die bei erhöhter Temperatur und erhöhtem Druck alkalisch unter Einsatz von Oxidationsmitteln zu Vanillin hydrolysiert werden. Eine basenkatalysierte Depolymerisierung von Lignin zur Gewinnung von Aromaten wurde von Vigneault (2006) beschrieben. Bei Temperaturen von 290-340 °C und 270 bar werden dabei aus Lignin verschiedene aromatische Verbindungen erzeugt. Dieses Verfahren liefert mehrere Fraktionen unterschiedlicher Zusammensetzung, 7-11 % kleine Moleküle (Methanol), 10-15 % monomerreiche Fraktion (Phenol, Catechol, Guajacol, Vanillin und Syringole), 38-52 % oligomerreiche Fraktion und 15-42 % fester Rückstand. Auch hydrothermolytische Spaltungsversuche, Hydrogenolysen und pyrolytische Versuche zur Spaltung von Lignin führen in der Regel zu einem sehr heterogenen Gemisch aus Mono- und Oligomeren, deren Trennung in reine homogene Fraktionen technisch nicht zu bewerkstelligen ist. Die Aufschlussprozesse, aber auch die Prozesse der Separation und Abtrennung, sind

bei weitem noch nicht optimiert und bieten erhebliches Optimierungspotential (Gülzower Fachgespräche, Stoffliche Nutzung von Lignin, 2009).

Den chemischen und physikalischen Methoden zur Herstellung von Aromaten aus fossilen Rohstoffen steht Lignin als natürliche Quelle aromatischer Verbindungen gegenüber. Allerdings ist die Resistenz dieses Makromoleküls gegen enzymatischen Abbau entscheidender Faktor dafür, dass Lignin nicht wirtschaftlich verwertet werden kann. Im Rahmen thermischer und hydrolytisch thermischer Verfahren ist zwar eine Aufspaltung von Lignin möglich, aber selektive enzymatische Abbauprozesse zur Gewinnung von Aromaten existieren nicht.

1.3. Der Aufbau pflanzlicher Zellwände

Die Zellwand begrenzt den lebenden Inhalt der pflanzlichen Zelle und umgibt den Protoplasten. Pflanzenzellwände bestehen aus mehreren unterschiedlich zusammengesetzten Schichten, nach außen hin wird die Zelle durch die Primärwand begrenzt. Die sich anschließende Sekundärwand besteht aus 2-3 Schichten (S1, S2 und S3).

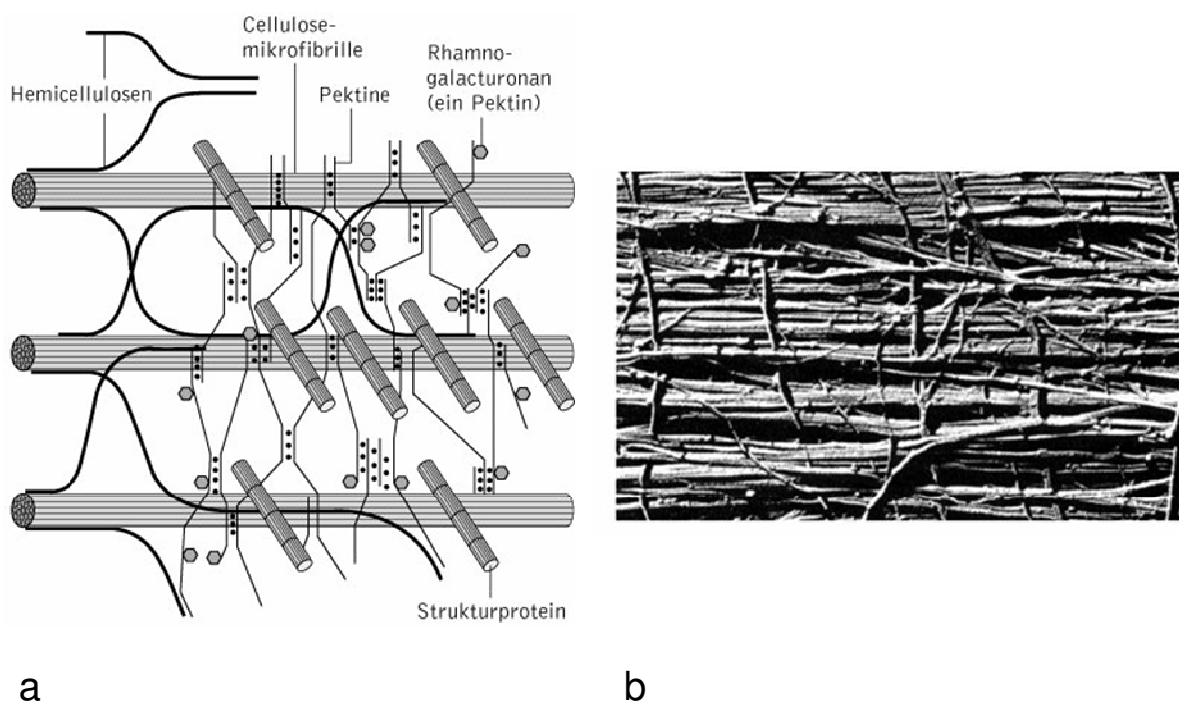


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Zellwandorganisation. Die einzelnen Zellwandbestandteile vernetzen sich zu einer strukturellen Organisationseinheit (a), wie sie in pflanzlichen Zellwänden vorzufinden ist. In der Abbildung ist das die Zellwand inkrustierende Lignin jedoch nicht dargestellt. Die mikroskopische Aufnahme zeigt sehr deutlich die fibrillären Strukturen der Zellulosefasern (b), (Abbildung stammt aus www.wissenschaft-online.de, Copyright Spektrum Akademischer Verlag).

Außerhalb der Primärwand sind die Zellen durch eine Mittellamelle miteinander verbunden. Die Festigung der Zellwände wird durch Zellulose- und Lignineinlagerung erreicht und bietet nicht nur Schutz vor Pathogenen, sondern ermöglicht auch den Ferntransport von Wasser und stabilisiert den gesamten Vegetationskörper. Die Festigkeit der Wand verhindert zusätzlich, dass die Zelle infolge von Wasseraufnahme platzt und wirkt somit dem osmotischen Druck entgegen. Hauptbestandteile der Zellwände sind Zellulose, Hemizellulose, Pektine und Lignin. Die Anteile der genannten Komponenten variieren innerhalb der einzelnen Schichten. Zellulose ist einheitlich aus unverzweigten β -1,4-glykosidisch verknüpften Glukosebausteinen aufgebaut. Lange lineare Molekülketten aus Zellulose bilden fädige Elementarfibrillen, welche sich wiederum zu Mikrofibrillen und diese zu Makrofibrillen vereinigen. Makrofibrillen können sich ebenfalls mehr oder weniger geordnet zusammen lagern (Abb. 1.1). Inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen sind für eine dichte Packung der Zellulosefasern verantwortlich. Diese fibrillären Strukturen sind in einer Matrix aus Hemizellulose, Pektin und anderen Kohlenwasserstoffen eingelagert und bilden das Grundgerüst pflanzlicher Zellwandschichten (Munk, 2001).

Als Hemizellulosen werden pflanzliche Polysaccharide bezeichnet, die im Gegensatz zu Zellulose verzweigte Ketten bilden. Die auch als Polyosen bezeichneten Zuckerketten sind meist vergleichsweise kurz. Hauptsächlich kommen Xylosen, Mannosen und Galaktosen vor. Die stabilisierende Funktion von Zellulose wird durch Hemizellulosen unterstützt.

Pektine sind Polysaccharide, die aus α -1,4-glykosidisch verknüpften D-Galacturonsäureeinheiten aufgebaut sind, die Carboxylseitengruppen können dabei verestert sein. Pektine bilden zusammen mit Hemizellulosen eine Matrix, in die die Zellulose eingebettet ist. Als Kittsubstanzen übernehmen sie die Stützfunktion für das Zellgerüst der Pflanzen. Sie sind besonders am Aufbau der Mittellamellen und Primärwände beteiligt. Aufgrund der hydrophilen Seitengruppen besitzen diese Substanzen ein hohes Potential Wasser zu binden.

Lignin ist nach Zellulose das zweithäufigste Biopolymer in der Natur, etwa 25 % des organisch gebundenen Kohlenstoffs ist in diesem natürlichen Polymer gespeichert. Die Angaben der geschätzten Jahresproduktion an Lignin schwanken, werden aber zu ca. 2×10^{10} t/a gegenüber 10^{12} t/a an Zellulose angegeben (Strasburger, 1991). Im Gegensatz zur fibrillären Zellulose bildet Lignin, heterogen aus aromatischen Grundbausteinen aufgebaut, ein amorphes dreidimensionales Netzwerk, das die Zellwände inkrustiert und die Zelle dadurch ver-

holzt. Durch Verholzung von Zelltypen des Vegetationskörpers - also Tracheen, Tracheiden und Holzfasern - ist die Pflanze mit einer hohen Zug- und Bruchfestigkeit ausgestattet. Vor allem die Einlagerung von Lignin und Zellulose in die pflanzlichen Zellwände während des sekundären Dickenwachstums dikotyler Pflanzen ist für die Zunahme an Biomasse durch Verholzung verantwortlich.

1.4. Die Ligninbiosynthese

Über einen Großteil der biochemischen Prozesse und der einzelnen Reaktionen der Ligninbiosynthese sind sich die Forscher einig, so dass darauf aufbauend ein allgemeiner Syntheseweg abgeleitet werden kann, der nachfolgend eingehender beschrieben wird. Im Allgemeinen kann man die Prozesse, die innerhalb der Pflanze in die Biosynthese von Ligninbausteinen münden, zum Sekundärstoffwechsel zählen. Aromatische Verbindungen, zu denen die Monomere des Lignins, Flavonoide, Stilbene und die aromatischen Aminosäuren zu zählen sind, finden ihren Ursprung im Shikimatweg. Der Shikimatweg ist der wichtigste Weg für die Bildung aromatischer Verbindungen in der Pflanzenzelle überhaupt. Ausgangsstoffe sind dabei Intermediate der Kohlenstofffixierung. Aus Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat entsteht Shikimat, das über Chorismat weiter zu den aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin umgesetzt werden kann (Whetten and Sederoff, 1995; Lewis, 1999). Dabei stellt Chorismat ein wichtiges Zwischenprodukt dar. Die Biosynthese von Ligninvorstufen beginnt - definiert als Phenylpropanoidbiosynthese (Abb. 1.2) - mit der Desaminierung der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin.

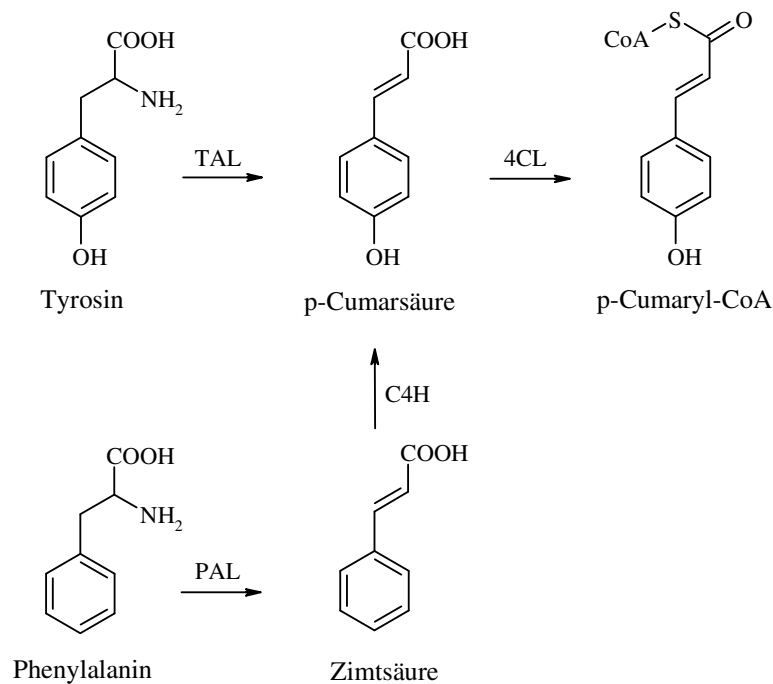


Abb. 1.2: Die Phenylpropanoidbiosynthese. Die Darstellung beschreibt den Biosyntheseweg ausgehend von den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin. In monokotylen Pflanzen wird Tyrosin in einem Schritt durch eine Tyrosin Ammoniak Lyase (TAL) zu p-Cumarsäure umgesetzt. In dikotylen Pflanzen werden zwei Reaktionen dazu benötigt. Zuerst wird Phenylalanin durch eine Phenylalanin Ammoniak Lyase (PAL) zu Zimtsäure umgewandelt. Im Anschluss daran findet eine Monooxygenase (C4H) vermittelte Hydroxylierung zu p-Cumarsäure statt. p-Cumarsäure wird in einem weiteren Reaktionsschritt durch eine 4-Cumarat:CoA Ligase (4CL) zu p-Cumaryl-CoA aktiviert.

Die Biosynthese der Ligninvorstufen (Abb. 1.3) beginnt mit der Hydroxylierung von p-Cumarsäure an der 3'-Position durch eine p-Cumarat-3 Hydroxylase (C3H, EC 1.14.14.1). Die Kaffeesäure, das Produkt dieser Reaktion, wird durch eine Kaffeesäure O-Methyltransferase (COMT, EC 2.1.1.6) an dieser Hydroxygruppe methyliert. Die daraus resultierende Ferulasäure wiederum kann erneut in 5'-Stellung durch eine Ferulasäure-5 Hydroxylase (F5H, EC 1.14.14.x) hydroxyliert werden. Daraus entsteht 5-Hydroxyferulasäure. Eine wiederholte Methylierung dieser OH-Gruppe durch eine COMT erzeugt Sinapinsäure. Die Ausbildung der Methoxygruppen wird also sequentiell durch Hydroxylierung und anschließende Methylierung erreicht, dabei geht der Methylierung immer eine Hydroxylierung voraus. Die Hydroxyzimtsäuren können durch die Aktivität einer 4CL zu entsprechenden Thioestern aktiviert werden. Nicht nur p-Cumarsäure, sondern auch alle anderen Intermediate, die hydroxyliert oder hydroxyliert und methoxyliert vorliegen, können ebenfalls durch dieses Enzym mit Coenzym A verknüpft werden. Die weiteren Reaktionsschritte basieren auf der reduzierenden Wirkung der Cinnamoyl-CoA Reduktase (CCR, EC

1.2.1.44), wodurch die genannten Thioester unter Abspaltung des CoA zu entsprechenden Aldehydstufen umgesetzt werden. Cinnamyl Alkohol Dehydrogenasen (CAD, EC 1.1.1.195) reduzieren die Aldehyde zu Alkoholen, wobei sowohl die Reaktionen der CCR als auch die der CAD NADPH als Elektronendonator benötigen. Die resultierende Monolignole - p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol - sind die Hauptbestandteile des Lignins. Die Menge und die Zusammensetzung von Lignin variiert innerhalb der Taxa, Zelltypen und sogar innerhalb einzelner Zellwandschichten (Campbell and Sederoff, 1996). Dikotyle Angiospermen (Hartholz) bestehen hauptsächlich aus Coniferyl- und Sinapylalkoholeinheiten mit Spuren von p-Cumarylalkohol, bei Gymnospermen (Weichholz) verhält es sich anders, dort findet man hauptsächlich Coniferylalkohol und p-Cumarylalkohol. Das Lignin von monokotylen Gräsern ist zu gleichen Teilen aus Coniferyl- und Sinapylalkohol zusammengesetzt, enthält allerdings mehr p-Cumarylalkoholeinheiten als dikotyle Pflanzen (Baucher et al., 1998). Die Monolignoleinheiten werden nach ihrer cytoplasmatischen Synthese durch Glykosylierung modifiziert. Die Glykosylierung der Ligninvorstufen erfolgt durch Uridin Diphosphat Glukose Coniferyl Alkohol (UDPG) Glykosyltransferasen (CAGT, EC 2.4.1.111). Man geht davon aus, dass die Modifikation der Monolignole zur Lagerung oder dem Transport zur Zellwand dient (Whetten and Sederoff, 1995). Die Ligninbiosynthese ist kein starres Reaktionsschema, sondern ein dynamisches System aus eng miteinander gekoppelten enzymatischen Umsetzungsreaktionen, welche komplexen Regulationsmechanismen unterliegen. Man beginnt erst allmählich zu verstehen, wie transskriptionale und posttranslationale Mechanismen den Stofffluss regulieren. Zimtsäure beispielsweise inhibiert die Aktivität der PAL auf transskriptionaler und posttranslationaler Ebene (Bolwell, 1986; Mavandad et al., 1990; Blount et al., 2002).

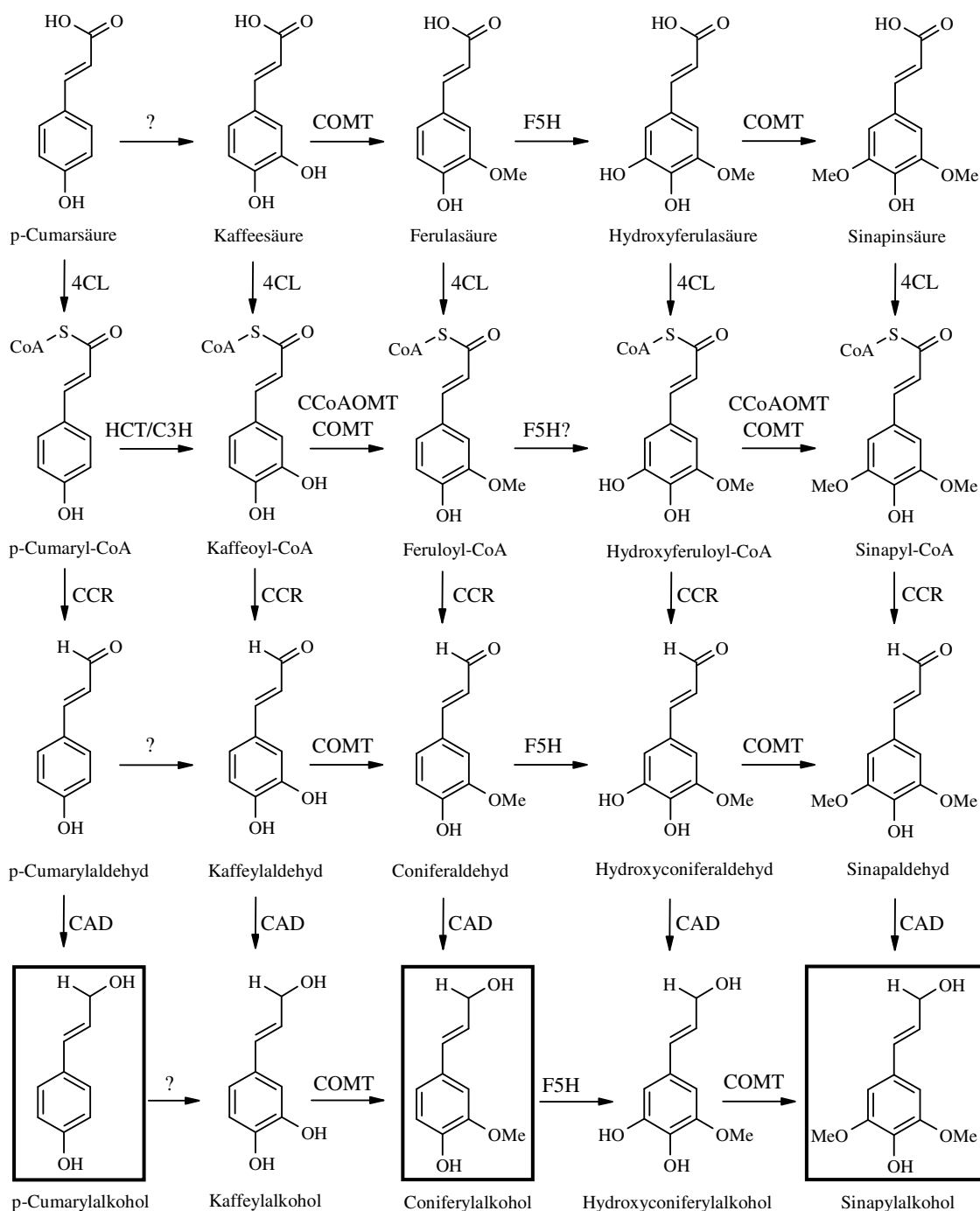


Abb. 1.3: Die Monolignolbiosynthese. Dargestellt sind die einzelnen Biosyntheseschritte, die in die Bildung der drei Monolignole p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol münden. CAD, Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase; 4CL, 4-Cumarat:CoA Ligase; C3H, p-Cumarat 3-Hydroxylase; CCoAOMT, Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase; CCR, Cinnamyl-CoA Reduktase; COMT, Kaffeoyl-CoA O-Methyltransferase; HCT, Hydroxycinnamyl-CoA Shikimat/Chinat O-Methoxycinnamyl-transferase; F5H, Ferulasäure 5-Hydroxylase. Die detaillierten Reaktionen der einzelnen Enzyme sind im Abschnitt 1.2. erläutert.

1.5. Transport und Lignifizierung der Ligninvorstufen

Derzeit wird ein Modell angenommen demnach die Hauptkomponenten des Lignins - die Monolignole - im Cytoplasma der pflanzlichen Zelle synthetisiert werden. Dabei gibt es Hinweise, dass einige Enzyme der Phenylpropanoidbiosynthese als membranassoziierte Proteinkomplexe vorkommen und in enger Nachbarschaft durch „Metabolic channeling“ einen zügigen Stofffluss begünstigen (Rasmussen and Dixon, 1999; Winkel-Shirley, 1999). In Gymnospermen und einigen Angiospermen akkumulieren Monolignole als 4-O- β -D-Glykoside im Kambium (Steeves et al., 2001) und werden in dieser Form gespeichert oder zum Transport vorbereitet. Die Glykosylierungen werden von UDP-Glykosyltransferasen kontrolliert. In glykosylierter Form werden diese Monolignole wahrscheinlich in Vesikeln zur Zellwand (Meyer et al., 1991; Baucher et al., 2003; Boerjan et al., 2003) transportiert und dort in den Apoplasten entlassen. Studien konnten zeigen, dass der Golgiapparat und das glatte endoplasmatische Retikulum an dem Transport beteiligt sind. Die Lignifizierung, also die Verknüpfung der Monomere zum Polymer, findet im pflanzlichen Gewebe außerhalb des Protoplasten (Apoplast) statt. Wie aber genau die Monomere aus der Zelle zum Apoplasten gelangen ist unklar. Bevor die Monolignole zu einem dreidimensionalen Ligninnetzwerk polymerisieren, werden die Glukoseeinheiten mit Hilfe von Coniferin- β -Glukosidasen abgespalten. Die biochemischen Prozesse der Polymerisierung innerhalb der Zellwand sind noch nicht abschließend erforscht. Man geht zwar von einem radikalischen dehydrogenativen Mechanismus aus, an dem Peroxidasen, Laccasen und Phenoloxidasen beteiligt sind, eine funktionale Zuordnung der einzelnen Enzyme scheint jedoch schwierig zu sein (Onnerud et al., 2002; Blee et al., 2003; Boerjan et al., 2003). Als mögliches Modell wird eine „Redox-shuttle“ vorgeschlagen, an dem die genannten Enzyme beteiligt sind. Man stellt sich den Mechanismus so vor, dass Peroxidasen H_2O_2 zu H_2O reduzieren. Gleichzeitig wird dabei Mn^{2+} zu Mn^{3+} oxidiert, welches wiederum den Monolignolen Elektronen entzieht und diese dadurch zu Radikalen formt. Dabei wird Mn^{3+} wieder zu Mn^{2+} zurückreduziert. Die Monolignole, welche nun als Radikale vorliegen, werden dann mit dem bestehenden Ligninpolymer vernetzt und Mn^{2+} kann erneut in einen derartigen radikalischen Polymerisierungszyklus eintreten (Westermarck, 1982; Onnerud et al., 2002). Die Meinung Lignin würde zufällig aus den entsprechenden Monomeren aufgebaut (Freudenberg, 1968) ist mittlerweile nicht mehr aktuell. Man geht heute davon aus, dass dirigierende Proteine an den radikalischen Kopplungsprozessen beteiligt sind und dass einzelne Ligninbausteine spezifisch markiert werden und daraufhin zu den vorgesehenen Zellregionen der Zellwand gelangen (1982; Terashima, 1986, 1988; Fukushima, 1991). Die Lignifizierung der Monolignole ba-

siert, wie schon erwähnt, auf einem radikalischen Mechanismus, bei dem das neue Monomer mit dem wachsenden Polymer verbunden wird. Die bei der Polymerisierung entstehenden Verknüpfungen können dabei sehr unterschiedlich sein. Das ist darauf zurückzuführen, dass bei der Bildung der Monolignolradikale auch mesomer stabilisierte Zwischenstufen (Abb. 1.4) Bindungen eingehen können, so dass dem Lignin keine einheitliche chemische Struktur zugeordnet werden kann.

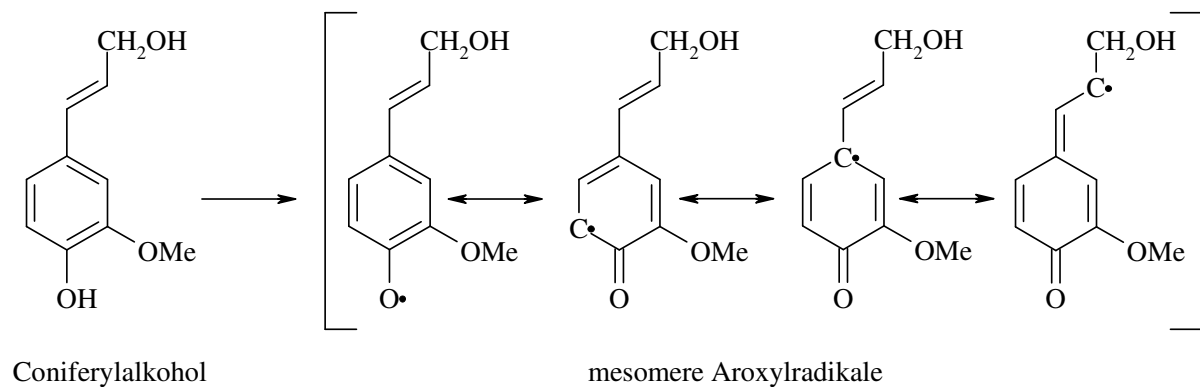


Abb. 1.4: Mesomer stabilisierte Strukturen von Coniferylalkohol. Nach Angriff der Peroxidase auf die p-Hydroxygruppe des Coniferylalkohols entstehen Radikale, die mesomeri stabilisiert sind. Die Verknüpfung zum Lignin kann an den Atomen ungepaarter Elektronen stattfinden.

Die häufigste Verknüpfung zwischen einem neuen Monomer und dem wachsenden Polymer stellt die β -O-4-Verknüpfung dar. Dabei wird das β -C-Atom des Monomers mit der p-Hydroxygruppe des vorhandenen Polymers kovalent verbunden. Diese sogenannten β -Aryl Etherverbindungen sind innerhalb eines Ligninpolymers chemisch am leichtesten anzugreifen und zu spalten. Neben dieser β -O-4-Verknüpfung findet man in Lignin aber auch viele andere Verknüpfungen (Abb. 1.5). Vielfach ist an diesen kovalenten Verbindungen das β -C-Atom des Monomers beteiligt, welches entweder mit Hydroxygruppen in 5'-Stellung oder auch mit β -C-Atomen des vorliegenden Polymers assoziieren kann. Daraus entstehen z.B. β -5-, β - β -, 5-5- und 4-O-5-Verknüpfungen, die chemisch sehr schwierig aufzuspalten sind. Die β - β -Verknüpfung zwischen den Reaktanten radikalischer Polymerisierungen stellt das größte Hindernis bei der Degradation von Lignin dar (Boerjan et al., 2003).

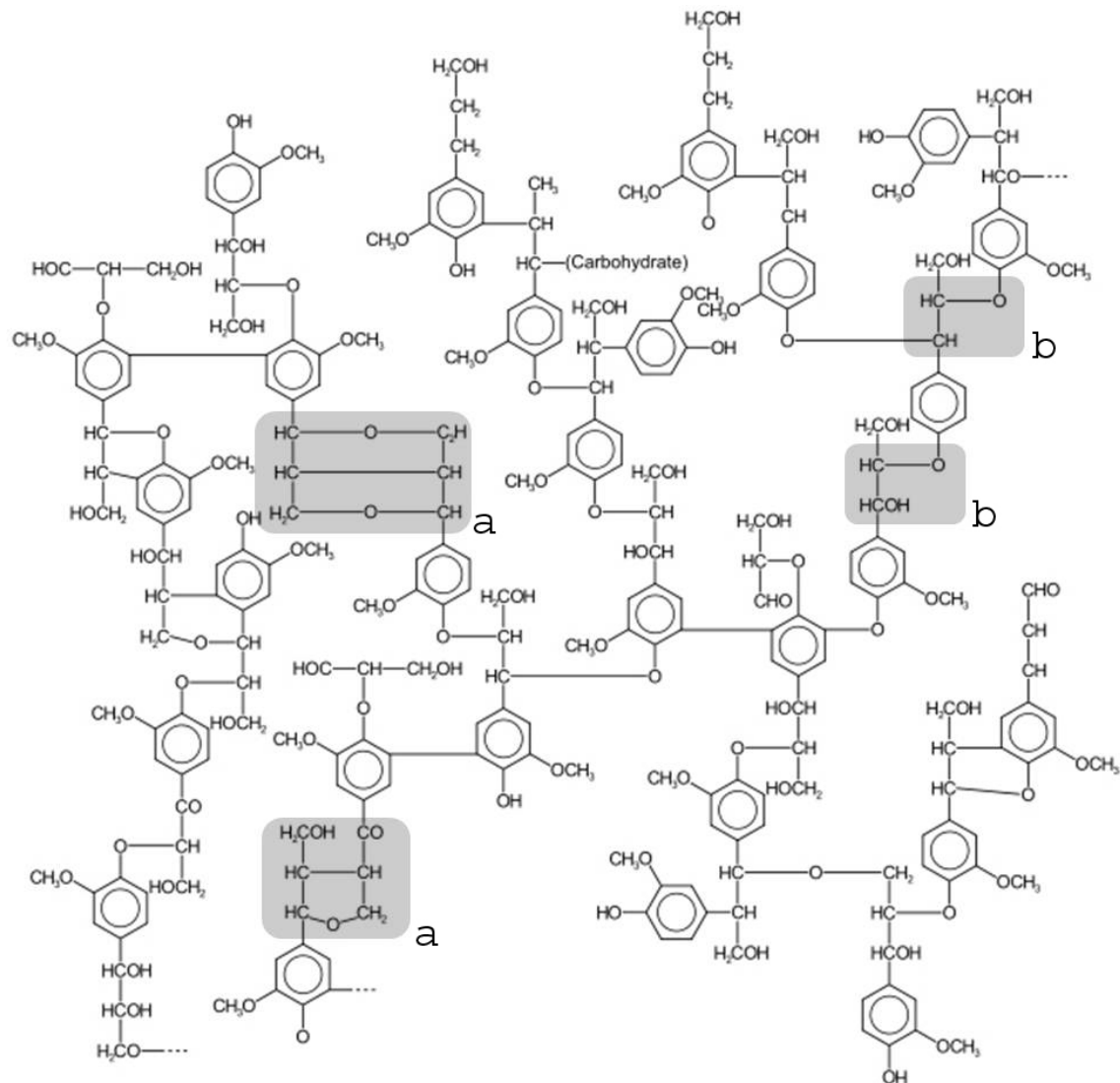


Abb. 1.5: Schematischer Ausschnitt aus einem Ligninpolymer. Die im Text beschriebene Heterogenität des Polymers beruht auf den unterschiedlichen Verknüpfungen der einzelnen Ligninbestandteile untereinander. Exemplarisch sind β - β -Verknüpfungen (a) und β -O-4-Verknüpfungen (b) markiert. (Abbildung stammt aus dem Internet, <http://de.wikipedia.org/wiki/Lignin>)

Die Vielfalt der Bindungsmöglichkeiten, die sich ergeben, weil zusätzlich zu den drei Monolignolen auch Derivate dieser ins Ligninpolymer integriert werden, erklären die damit verbundene komplexe Heterogenität des Lignins und machen dieses Polymer zu einem außergewöhnlich widerstandsfähigen Naturstoff. Die Verknüpfung von Lignin mit Zellulose und Hemizellulose wirkt als weitere Barriere beim Abbau. Dies hat Konsequenzen für die papierverarbeitende Industrie, dort wirkt sich das in Holz enthaltene Lignin auf die Güte des Papiers aus, ein zu hoher Ligninanteil führt zu unerwünschten Vergilbungen. Erst kostenintensive chemische Koch- und Bleichverfahren minimieren den Gehalt an Lignin in den Holzfasern (Baucher et al., 2003). Das derzeit am häufigsten genutzte Kraft-Verfahren zur Minimierung des Ligningehaltes in Zellstoff, dem Rohstoff für die Papierherstellung, basiert auf mehrstün-

digem Aufschluss mit Natronlauge (NaOH) und Natriumsulfid (Na₂S) und ist mit hohen Kosten und Belastungen für die Umwelt infolge der chemischen Abfälle verbunden. Etwa 40-50 Mio. Tonnen an Lignin werden jährlich als Nebenprodukt in der Papierindustrie produziert, 95 % davon wird verbrannt und 5 % als Lignosulfonate oder Kraftlignin weiterverkauft (Wünning, 2001). Um ökologisch besser verträgliche Verfahren zu entwickeln, wurde versucht, die Ligninzusammensetzung in Pflanzen zu Gunsten einer leichteren Spaltbarkeit zu verändern. Zudem könnte eine verbesserte Zugänglichkeit zur Zellulose für die Herstellung biobasierter Energieträger nützlich sein. Antisense-Versuche zur Ausschaltung von CAD und COMT führten zwar auch zu stark verminderter CAD Aktivität, allerdings wurde der Ligningehalt davon kaum beeinflusst. Anstelle einer Verminderung des Ligninanteils in den betroffenen Pflanzen infolge der Unterbrechung der Ligninbiosynthese durch die Antisense-Technik, transportierten die Pflanzen akkumulierenden Aldehyde zur Zellwand und integrierten diese in das bestehende Polymer. Das Wachstum und die Entwicklung blieben davon unbeeinflusst (Halpin, 1994; Hibino, 1995; Baucher et al., 1996; Lapierre et al., 1999; Pilate et al., 2002).

1.6. Biodegradation von Lignin

Es gibt nur sehr wenige Mikroorganismen, die Lignin abbauen können. Lignin enthält keine hydrolysierbaren Verbindungen, so dass der Abbauvorgang nur durch oxidative Vorgänge stattfinden kann. Bereits im 19. Jahrhundert wurden Pilze, die bevorzugt lignifiziertes Gewebe befallen und abbauen können, identifiziert. Diese zu den Basidiomyceten gehörigen Pilze wurden aufgrund der Farbe des befallenen Holzes als Weißfäulepilze und Braunfäulepilze bezeichnet. Der Holzabbau durch Weiß- und Braunfäulepilze wurde vielfach von Forschergruppen aus der ganzen Welt beschrieben (Kirk and Farrell, 1987; Eriksson et al., 1990; Hammel and Cullen, 2008). Auf diesen Untersuchungen basierend konnten zwei Abbaustrategien der Weißfäulepilze gefunden werden. Entweder bauen die Pilze gleichzeitig Lignin und Kohlenhydrate in der verholzten Zellwand ab, oder sie beginnen zuerst mit dem Abbau von Lignin, bevor die Kohlenhydrate angegriffen werden. Um diese Stoffe aus der Zellwand zu lösen, sekretieren Weißfäulepilze bestimmte Enzyme, welche bei Verdau von Ligninmodelsubstanzen identifiziert werden konnten (Joseleau et al., 1994). Aus *Phanerochaete chrysosporium* wurde eine Peroxidase isoliert, die relativ unspezifisch Seitenketten und Benzolringe von Ligninmodelsubstanzen oxidierte (Glenn et al., 1983; Tien and Kirk, 1983). Der Mechanismus der gefundenen Ligninperoxidase basierte auf einer Ein-

Elektron Oxidation der Ligninmodelsubstanz gefolgt von weiteren radikalischen Reaktionen der dabei entstehenden kationischen Radikale (Kersten et al., 1985). Eine andere Peroxidase wurde im extrazellulären Medium von *Phanerochaete chrysosporium* Kulturen nachgewiesen, welche zur Oxidation phenolischer Modellsubstanzen Mn(II) und H₂O₂ benötigte. Mn(II) wurde durch dieses Enzym zu Mn(III) oxidiert, dieses komplexierte mit einer organischen Säure und oxidierte seinerseits das phenolische Substrat (Glenn and Gold, 1985). Als letztes Enzym, welches wahrscheinlich indirekt an der Lignindegradation beteiligt ist, konnte in Kulturen vieler Weißfäulepilze eine sauerstoffabhängige Phenoloxidase (Laccase) gefunden werden, die ähnlich wie die Mn(II)-abhängige Peroxidase Radikale erzeugt, die ihrerseits das Polymer angreifen (Kersten et al., 1990; Archibald and Roy, 1992). Zusätzlich hat man Proteine gefunden, die an der Produktion des von Peroxidasen benötigten H₂O₂ beteiligt sind. Glyoxaloxidasen (GLOX) werden beispielsweise von *Phanerochaete chrysosporium* sekretiert und katalysieren die Oxidation von Glyoxal zu Glyoxalat. Dabei wird die Aldehydfunktion des Glyoxal unter Freisetzung von H₂O₂ zu einer Carboxygruppe umfunktioniert. Das freiwerdende H₂O₂ kann von Peroxidasen zur Lignindegradation genutzt werden. Glyoxalat konnte als Cofaktor für Mn(II)-abhängige Peroxidasen identifiziert werden (Kuan and Tien, 1993). Obwohl viele der sekretierten Enzyme zur Lignindegradation bekannt sind, kann an dieser Stelle konstatiert werden, dass die Mechanismen und die Regulation der Produktion einzelner ligninolytischer Enzyme sehr komplex sind. Alle Ergebnisse basieren auf Laboruntersuchungen und können in dieser Form nicht auf den natürlichen Abbau übertragen werden.

1.7. Die rekombinante Biosynthese von p-Cumarylalkohol

Wie in Abschnitten zuvor erläutert, ist Lignin als Makromolekül der pflanzlichen Zellwand kaum angreifbar, die Biosynthese von Lignin ist höchst komplex und die biologische Abbaubarkeit dieses heterogen aufgebauten Moleküls ist nur sehr wenigen Destruenten möglich. Lignin ist als Bestandteil der Zellwand im Vergleich zu Zellulose und Hemizellulose viel komplexer zusammengesetzt und die Verknüpfungen der aromatischen Bestandteile sind sehr vielfältig. Bemühungen Lignin als Quelle aromatischer Verbindungen aufzuspalten und daraus aromatische Monomere zu gewinnen sind bislang gescheitert. Die einzelnen aromatischen Bestandteile gezielt aus diesem Molekül herauslösen zu können, wäre wissenschaftlich ein Durchbruch, da somit aromatische Bestandteile aus Biomasse gewonnen werden könnten, die als Ausgangssubstanzen für weitere hochwertige Stoffklassen genutzt werden könnten.

Alternativ zum selektiven enzymatischen Abbau, der sich aufgrund verschiedener oben aufgeführter Hindernisse nicht verwirklichen lässt, wurde über eine Strategie im Rahmen dieser Arbeit nachgedacht, pflanzliche Zellkulturen genetisch verändern. Diese sollten in erhöhtem Maße aromatische Alkohole im Rahmen einer modifizierten Monolignolbiosynthese produzieren. Grundsätzlich besitzen pflanzliche Zellen den dazu benötigten Biosyntheseweg, es bleibt aber unklar, ob bei der hohen Komplexität der Ligninbiosynthese (1.4) genetische Eingriffe zu dem gewünschten Ziel führen, aromatische Substanzen zu produzieren. Zudem ist nicht eindeutig belegt, dass pflanzliche Zellkulturen keine Lignifizierung mehr vornehmen. Aus wissenschaftlicher Sicht könnte die Kenntnis des Abbauvorgangs durch Destruenten hilfreich sein, die Prozesse im Einzelnen zu verstehen. Aber *in natura* sind diese Abbauvorgänge sehr langsam und die Vorgänge hochspezifisch. Wie unter 1.6 dargestellt, greifen Reaktionen verschiedener Enzyme ineinander. Peroxidasen und Laccasen agieren in spezifischer Abfolge und ermöglichen nur unter radikalischen Katalyseschritten eine Freisetzung der Ligninbausteine. Es ist wenig bekannt über die Regulation und die Koordinierung dieser Abbauvorgänge, daher bleibt die Fähigkeit Lignin zu verwerten nur wenigen Mikroorganismen vorbehalten. Um der Problematik zu entgegnen einerseits Lignin als Ressource für aromatische Verbindungen nutzen zu wollen und andererseits durch die Resistenz des Makromoleküls gegen den Abbau beschränkt zu sein, bietet sich das Metabolic Engineering von Bakterienzellen an. *E. coli* genetisch im Rahmen eines Metabolic Engineering so mit Teilen des Monolignolbiosyntheseweges aus Pflanzen auszustatten, dass die Zellen aromatische Alkohole herstellen, könnte die Unabhängigkeit von Lignin als Quelle für aromatische Alkohole aus nachwachsenden Rohstoffen bedeuten. Der Versuch Bakterien als Wirtssystem zu nutzen, um einen verkürzten Monolignolbiosyntheseweg aufzubauen, wurde bislang nicht unternommen. Als besonderer Vorteil bakterieller Zellen gegenüber pflanzlichen Zellen ist die Tatsache zu bewerten, dass Bakterien keine Verholzung ihrer Zellwände vornehmen können. Bakterielle Zellwände bestehen in der Hauptsache aus Mureinschichten. Struktur und Aufbau der Bakterienzellwand unterscheidet sich also grundsätzlich von der pflanzlichen Zellwand. Es ist daher nicht zu erwarten, dass produzierte aromatische Alkohole zwecks Stabilisierung in die Zellwand integriert werden. Auch die den Lignifizierungsprozess steuernden Enzyme sind nicht vorhanden. Stattdessen würde man erwarten, dass aromatische Alkohole toxisch sind und vermutlich aus der Zelle ausgeschleust werden. Dies ist wiederum ein entscheidender Vorteil dieser Strategie, da das gewünschte Produkt der enzymatischen Umsetzungen nicht aus den Zellen isoliert und aufgereinigt werden muss. Der Versuch die Eigenschaften bakterieller Systeme zu nutzen, um durch „Metabolic Engineering“ hochwertige Reaktionsprodukte zu ge-

winnen, stellt eine erfolgsversprechende Alternative dar. „Metabolic Engineering“ bedeutet in diesem Zusammenhang eine Verbesserung der Produktbildung von biotechnischen Prozessen durch Modifikation biochemischer Reaktionen oder die Erstellung neuer Reaktionswege unter Zuhilfenahme rekombinanter DNA Technologien (Bailey, 1991). Die Strategien zur Etablierung neuer Biosynthesewege können dabei sehr unterschiedlich gestaltet werden und umfassen die Kombination von existierenden Biosynthesewegen aus verschiedenen Organismen, die Modifikation von bereits vorhandenen Biosynthesewegen und den Aufbau völlig neuer Stoffwechselwege (Prather and Martin, 2008). Aufgrund der Fortschritte auf dem Gebiet des „Metabolic Engineering“ konnte eine Reihe von biotechnologischen Prozessen zur mikrobiellen Produktion wichtiger Metabolite etabliert werden. Klassische Beispiele umfassen die mikrobielle Produktion von Antibiotika und aromatischen Aminosäuren (Lee et al., 2007; Lutke-Eversloh et al., 2007; Lutke-Eversloh and Stephanopoulos, 2007; Rokem et al., 2007; Sprenger, 2007). Neben aromatischen Aminosäuren wurden auch andere aromatische Verbindungen in *E. coli* hergestellt. Flavonoide, Stilbene und Hydroxystyrene zählen zu diesen hochwertigen Feinchemikalien hinzu (Hwang et al., 2003; Watts et al., 2004, 2006a; Qi et al., 2007; Sariaslani, 2007). In einem direkten Vergleich mit eukaryotischen Systemen stellte sich sogar heraus, dass *E. coli* zur Herstellung von Resveratrol, einem aromatischen Stilbenderivat, besser geeignet ist als beispielsweise einzellige Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* (Becker et al., 2003). Dies unterstreicht nochmals den vielseitigen Einsatz dieses Prokaryoten. Desweiteren sind Untersuchungen beschrieben, aus denen hervorgeht, dass genetisch veränderte *E. coli* K12 Derivate nicht mehr befähigt sind aromatische Verbindungen abzubauen (Diaz et al., 2001), so dass mögliche aromatische Syntheseprodukte eines artifiziellen Ligninbiosyntheseweges ohne Verluste akkumulieren könnten. Zu den weiteren Vorzügen von *E. coli* zählen neben der einfachen Kultivierung auch die hohen Wachstumsraten, die sich möglicherweise positiv auf die Produktausbeuten auswirken. Die in dieser Arbeit vorgesehene Nutzung pflanzlicher und mikrobieller Gene, die aus der Phenylpropanoid Biosynthese und der Ligninbiosynthese bekannt sind, entspricht einer Nutzung existierender Biosynthesewege, die miteinander kombiniert werden. Diese Vorgehensweise erlaubt theoretisch den Aufbau von pflanzlichen Ligninvorstufen in bakteriellen Zellkulturen.

Eine dieser Ligninvorstufen, der p-Cumarylalkohol, ist Zielprodukt dieses Metabolic Engineering und besteht aus einem aromatischen Grundkörper, dessen C₁-Atom eine Prop-2-en-1-ol-Gruppe trägt. Das C₄-Atom des Ringes ist mit einer Hydroxylgruppe substituiert. Zusätzlich findet sich eine Doppelbindung innerhalb der Prop-2-en-1-ol-Gruppe. Die weiteren bei-

den Monolignole, Coniferyl- und Sinapylalkohol, sind zudem am C₃- oder am C₃- und am C₅-Atom methoxyliert (Abb. 1.3). Dieses Molekül verfügt über zwei funktionale Hydroxygruppen. Diese Bifunktionalität ist ein gutes Charakteristikum, um die einzelnen Monomere zu polymerisieren. Um p-Cumarylalkohol enzymatisch zu synthetisieren, müssen vier Transgene aus unterschiedlichen Spenderorganismen funktional in *E. coli* BL21 eingebracht werden. Durch den zellulären Shikimatweg bereitgestelltes Chorismat wird durch Aktivitäten einer Chorismat Mutase (CM), einer Prephenat Dehydratase (PDT) oder Dehydrogenase (PDH) zu Phenylalanin und Tyrosin umgesetzt. Die rekombinante Biosynthese von p-Cumarylalkohol in *E. coli* beginnt mit der funktionalen Integration einer TAL aus *Rhodobacter sphaeroides* (*RsTAL*). Dadurch erhält die Zelle die Fähigkeit intrazellulär gebildetes Tyrosin zu desaminieren. Im Anschluss soll die bei der TAL-Umsetzung entstehende p-Cumarsäure durch enzymatische Umsetzung einer 4-Cumarat:CoA Ligase aus *Petroselinum crispum* (*Pc4CL*) zu p-Cumaryl-CoA aktiviert werden. In Pflanzen handelt es sich bei dieser Reaktion um eine wichtige Schnittstelle im Stoffwechsel, da das Produkt der 4CL-Umsetzung entweder zur Biosynthese von Ligninvorstufen genutzt wird oder in andere für die Pflanze essentielle Biosynthesewege abfließen kann. In Bakterien gibt es diese Stoffwechselabzweigung nicht, so dass hier keine Verluste durch Abfluss in andere Biosynthesewege erwartet werden. Der Aktivierung der p-Cumarsäure durch eine 4-Cumarat:CoA Ligase soll eine Reduktion des Thioesters zum p-Cumarylaldehyd folgen. Diesem Zweck soll die intrazelluläre Bereitstellung einer Cinnamoyl-CoA Reduktase aus *Zea mays* (*ZmCCR*) dienen. Dabei erfolgt die Ausbildung einer Aldehydfunktion unter Abspaltung von Coenzym A. Im letzten Schritt des künstlich erzeugten Biosyntheseweges soll p-Cumarylaldehyd durch Expression einer Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase aus *Zea mays* (*ZmCAD*) weiter zu p-Cumarylalkohol reduziert werden. Basierend auf früheren Arbeiten (Watts et al., 2004) wird angenommen, dass p-Cumarylalkohol, das Reaktionsprodukt dieser künstlich erzeugten Enzymkaskade, aus den Zellen in das Medium sekretiert wird.

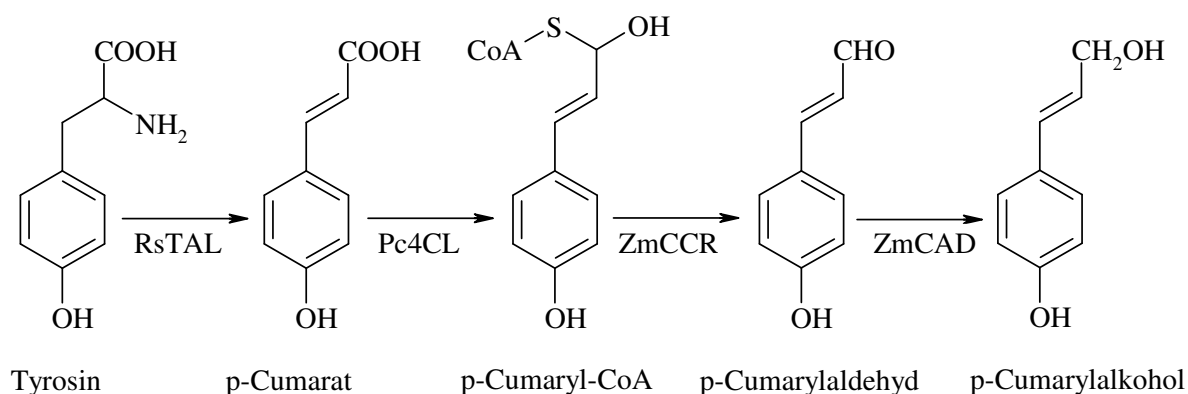


Abb. 1.6: Rekombinante Biosynthese von p-Cumarylalkohol. Die dargestellte rekombinante Reaktionsfolge zeigt die Biosynthese von p-Cumarylalkohol. Der künstliche Biosyntheseweg startet mit der intrazellulären Desaminierung der aromatischen Aminosäure Tyrosin infolge der Expression einer TAL aus *Rhodobacter sphaeroides* (RsTAL). Die weitere sequentielle Umsetzung zum p-Cumarylalkohol erfolgt durch aktive Expression einer 4CL aus *Petroselinum crispum* (Pc4CL), einer CCR aus *Zea mays* (ZmCCR) und einer CAD ebenfalls aus *Zea mays* (ZmCAD).

1.8. Ziel der Arbeit

Lignin ist als hochkomplexes Heteropolymer in der Natur weitverbreitet, der chemische und enzymatische Abbau gestaltet sich als sehr aufwändig. Aufgrund der vielfältigen Verknüpfungen innerhalb des Makromoleküls Lignin ist die Gewinnung von reinen Monomerströmen bislang unmöglich. Daher soll nun im Rahmen dieser Arbeit die umgekehrte Strategie verfolgt werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die rekombinante Biosynthese von p-Cumarylalkohol in *E. coli*. Die Herstellung von p-Cumarylalkohol, eines der ligninspezifischen Monolignole, soll durch Etablierung eines artifiziellen Biosyntheseweges in bakterieller Zellkultur verwirklicht werden. Diese Substanz könnte dann als Vorstufe für weitere chemische Synthese dienen.

Die genetische Ausstattung von *E. coli* macht die Biosynthese von Monolignolen unter natürlichen Bedingungen unmöglich. Erst die Transformation mit entsprechenden genetischen Elementen kann dazu beitragen *E. coli* derart zu modifizieren, dass aromatische Alkohole produziert und ausgeschleust werden. Diese Strategie umzusetzen basiert darauf, vier Transgene pflanzlichen und mikrobiellen Ursprungs funktional in *E. coli* zu exprimieren, um dadurch den künstlichen Biosyntheseweg zu etablieren. In einem ersten Katalyseschritt soll die Integration einer Tyrosinammoniak Lyase aus *Rhodobacter sphaeroides* (RsTAL) dazu dienen, intrazelluläres oder zugeführtes Tyrosin zu p-Cumarat zu desaminieren. Daran schließt sich eine Aktivierung des durch die RsTAL-Reaktion entstandenen p-Cumarates an. Um diese

Aktivierung der Säure zu realisieren, soll zusätzlich eine 4-Cumarat:CoA Ligase aus *Petroselinum crispum* (*Pc4CL*) in bakterieller Zellkultur aktiv exprimiert werden. Der entstehende aktivierte Thioester - p-Cumaryl-CoA - wird in nacheinander ablaufenden Reaktionen über eine Aldehydzwischenstufe letztlich zum p-Cumarylalkohol reduziert. An diesen Prozessen sind in Pflanzen Cinnamyl-CoA Reduktasen und Cinnamylalkoholdehydrogenasen beteiligt. In dieser Arbeit sollen dazu Gene aus *Zea mays* genutzt werden (*ZmCCR* und *ZmCAD*). Die gleichzeitige plasmidvermittelte Koexpression von *RsTAL* und *Pc4CL* einerseits und die von *ZmCCR* und *ZmCAD* andererseits soll die bakterielle Zelle dazu befähigen die aromatische Aminosäure Tyrosin unter sequentiellen Umlagerungs- und Abspaltungsreaktionen zu p-Cumarylalkohol umzuwandeln.

Dazu müssen die Gene *TAL*, *4CL*, *CCR* und *CAD* amplifiziert, kloniert und exprimiert werden. Nach Expression der einzelnen Enzyme werden diese aufgereinigt und bezüglich ihrer Aktivität *in vitro* analysiert. Anschliessend werden die vier Gene in geeigneter Kombination in *E. coli* eingebracht. Durch Expression der vier Transgene wird der Monolignolbiosyntheseweg in *E. coli* etabliert. Bei erfolgreicher Integration der genetischen Elemente und bei funktionaler Installation des Syntheseweges wird erwartet, dass infolge der enzymatischen Umsetzungsreaktionen p-Cumarylalkohol aus Tyrosin gebildet und ins Medium ausgeschleust wird.

2. Material

2.1. Bakterienstämme

Zur Vervielfältigung von Plasmid DNA wurde *E. coli* DH5α verwendet. Um eine optimale Proteinexpression in den Zellen zu gewährleisten wurde *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene, Heidelberg) ausgewählt, da dieser Stamm eine hohe Expression T7-Promotor-kontrollierter Gene durch Stabilisierung der mRNA möglich macht. Die in diesem modifizierten Stamm exprimierte T7-RNA-Polymerase arbeitet schneller als das *E. coli* eigene Derivat. Zusätzlich enthält dieser BL21 Stamm Kopien der *argU*, *ileY* und *leuW* tRNA Gene kodiert auf einem pACYCDuet-basierten Vektor. Diese Gene kodieren tRNAs, welche seltene Arginin Codons wie AGA und AGG, Isoleucin Codons wie AUA und Leucin Codons wie CUA erkennen können. Dieser BL21 Stamm verfügt über tRNAs, welche sonst bei Translation AT-reicher Genome limitierend wären. Als Rezipienten für rekombinante DNA, zur Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA sowie zur Proteinexpression wurden die in Tabelle 2.1 aufgelistete *E. coli*-Stämme verwendet.

Tab. 2.1: *E. coli* Stämme und zugehörige Genotypen

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> (DE3)-RIL	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> _B (<i>r</i> _B ⁻ <i>m</i> _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte (argU, ileY, leuW, Cam ^r)
<i>E. coli</i> ER2566	<i>fhuA2</i> <i>lacZ</i> ::T7 <i>gene1</i> (<i>lon</i>) <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>sul</i> A11 R(<i>mcr</i> -73::miniTn10-TetS)2(<i>dcm</i>) R(<i>zgb</i> -210::Tn10-TetS) <i>end</i> A1 Δ(<i>mcrC-mrr</i>)114::IS10
<i>E. coli</i> DH5α	Fϕ80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA</i> 1 <i>end</i> A1 <i>hsdR</i> 17(<i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁺) <i>phoA</i> <i>sup</i> E44 <i>thi</i> -1 <i>gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1λ ⁻

2.2. Verwendete Nukleinsäuren

Ausgehend von verschiedenen Template Plasmiden, welche in folgender Tabelle aufgeführt sind, wurden ORFs (ORF, Open Reading Frame) der *Pc4CL*, der *ZmCCR* und der *ZmCAD* unter Zuhilfenahme nachfolgend beschriebener Oligonukleotide spezifisch durch PCR (3.2.1.)

vervielfältigt. Die Anfangsbuchstaben der Spenderstämme wurden den ORF-Bezeichnungen vorangestellt. Mittels der in den Primern kodierten Schnittstellen wurden die PCR-Amplifikate in andere Zielvektoren integriert. Der ORF der TAL aus *Rhodobacter sphaeroides* (*RsTAL*) wurde durch die Firma Genscript (Piscataway, USA) synthetisiert. Das „Codon usage“ der *RsTAL* wurde modifiziert und C-terminal ein His-Tag angefügt. Genauere Information über die Änderungen der Sequenz und den Angleich der Sequenz an die Expression in *E. coli* sind entsprechender Arbeit zu entnehmen (Gilleßen, 2009).

Tab. 2.2: Verwendete Template DNA

Konstrukt	ORF	Spenderstamm	E.C.-Nr.	Quelle
pUC9	<i>Pc4CL</i>	<i>Petroselinum crispum</i>	6.2.1.12	Conrath, U., RWTH-Aachen, GER
pBluescript	<i>ZmCCR</i>	<i>Zea mays</i>	1.2.1.44	Rigau, J., CSIC IRTA, Barcelona, ESP
pBluescript	<i>ZmCAD</i>	<i>Zea mays</i>	1.1.1.195	Rigau, J., CSIC IRTA, Barcelona, ESP
pUC57	<i>RsTAL</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	4.3.1.23	Genscript (Piscataway, USA)

2.3. Synthetische Oligomere

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion in einer Konzentration von jeweils 100 µM synthetisiert. Zur Lagerung wurden die Primer bei -20 °C aufbewahrt. Die jeweilige Arbeitskonzentration wurde aus diesen Stammlösungen durch geeignete Verdünnung mit destilliertem Wasser (dH₂O) hergestellt. Nachfolgend sind die zur spezifischen Amplifikation, Detektion und Sequenzierung dienenden Oligonukleotide sowie deren Sequenzen aufgelistet (Schnittstellen sind kursiv gekennzeichnet).

Tab. 2.3: Primer zur Amplifikation der gewünschten ORFs

Primer	Sequenz (Schnittstelle)		T _M
Pc4CL-fw	GTCAAGATCTCATGGGAGATTGTGTAGCACC	(BglII)	61 °C
Pc4CL-rev	TAGCACTCGAGTTTGGGAAGATCACCGGATGC	(XhoI)	61 °C
ZmCCR-fw	GCTAGAATTCCATGACCGTCGTCGACGCC	(EcoRI)	61 °C
ZmCCR-rev	ATTGAGTGCGGCCGCGGCACGGATGGCGAT CC	(NotI)	60 °C
ZmCAD-fw	GCTAGAATTCCATGGGGAGCCTGGCGTC	(EcoRI)	60 °C
ZmCAD-rev	AGTCTCGAGGTTGCTGGCCGCATCCG	(XhoI)	60 °C

Tab. 2.4: Oligonukleotide zur Detektion und Sequenzierung

Primer	Sequenz	Funktion
DuetMCS1fw	ATGCGTCCGGCGTAGA	Sequenzierung/ Detektion
DuetMCS1rev	GATTATGCGGCCGTGTACAA	Sequenzierung/ Detektion
DuetMCS2fw	TTGTACACGGCCGCATAATC	Sequenzierung/ Detektion
DuetMCS2rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierung/ Detektion
ACYCDuetUP1	GGATCTCGACGCTCTCCCT	Sequenzierung/ Detektion
TALcheck	ACAGTGCCAGAATAGCCA	Detektion von TAL
4CLcheck	TTTTCGCAATTGCCAACAC	Detektion von 4CL
CCRcheck	GGGCATCCTTGTCGG	Detektion von CCR
CADcheck	GCTGATCACCGTCACG	Detektion von CAD
TAL/4CLfw	GAGGGAACAATCGCTC	Detektion von TAL/4CL
TAL/4CLrev	AGTCTTTCACTTTGTCTACG	Detektion von TAL/4CL
CCR/CADfw	GTGGTGAACCCCGTG	Detektion von CCR/CAD
CCR/CADrev	TGGTGCACGGGCACC	Detektion von CCR/CAD

2.4. Plasmide

Molekularbiologisches Arbeiten basiert oftmals auf der Verwendung von Plasmid-DNA. Diese zirkulären genetischen Elemente besitzen Funktionen und Eigenschaften, die zur Vervielfältigung und Integration von DNA dienen können. Durch Replikationsprozesse am sogenannten Replikationsursprung werden diese genetischen Elemente vervielfältigt, ebenfalls auf dem Plasmid kodierte Regionen verleihen den mit diesen Elementen transformierten Zellen Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika. Zur Integration genetischen Materials dienen mul-

multiple Klonierungsstellen (MCS, multiple cloning site), die Erkennungssequenzen gängiger Restriktionsenzyme kodieren. Zusätzlich zu diesen allgemeinen beschriebenen Funktionen sind je nach Plasmid weitere Eigenschaften auf diesen genetischen Elementen kodiert, die je nach Art und Einsatz der Plasmide variieren. In dieser Arbeit wurde zum Aufbau eines künstlichen Ligninbiosyntheseweges in bakterieller Zellkultur maßgeblich das Duet-Vektorsystem (Novagen) verwendet. Zusätzlich kam pET-22b(+) als Expressionsvektor zum Einsatz. Das Duet-System besteht aus vier Vektoren, die jeweils eine gleichzeitige Expression zweier ORFs erlauben. Die Integration der ORFs erfolgt dabei in eine der zwei multiplen Klonierungsstellen. Bei Zugabe von IPTG werden die unter Kontrolle des lac-Promotors stehenden ORFs exprimiert. Die Kopienzahl der einzelnen Duet-Vektoren variieren zwischen 10 und mehr als 100 pro Zelle. Exprimierte Proteine können entweder C-terminal mit einem His-Tag oder N-terminal mit einem S-Tag fusioniert werden. Dies erleichtert eine spezifische Detektion der getaggtten Proteine und ist bei der Aufreinigung der Proteine sehr hilfreich. In dieser Arbeit wurden pETDuet-1, pRSFDuet-1 und pET-22b(+) eingesetzt. Die Plasmidkarten der Leervektoren sind nachfolgend aufgeführt. Die Klonierungen der benötigten Konstrukte werden im Ergebnisteil erläutert, die entsprechend konstruierten Vektorkarten sind im Anhang (8.3.) aufgeführt.

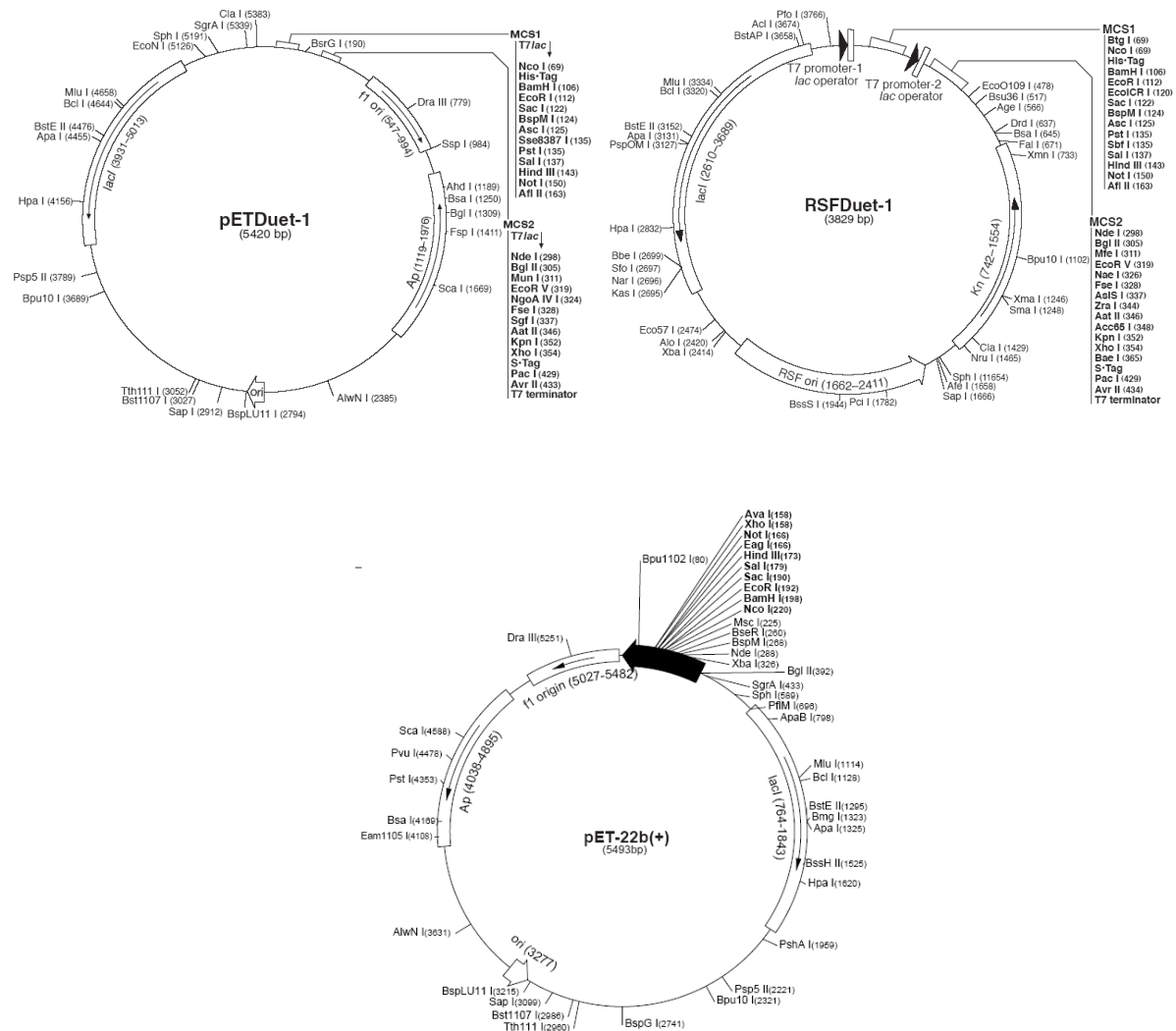


Abb. 2.1: Plasmidkarten der Leervektoren. Schematische Darstellung der Plasmidkarten aller eingesetzter Vektoren (pETDuet-1, pRSFDuet-1 und pET-22b(+)). Die Abbildungen wurden aus den Beschreibungen der Hersteller entnommen. Dabei sind die wichtigsten Restriktionsschnittstellen der multiplen Klonierungsstellen sowie einige charakteristische genetische Elemente eingetragen.

2.5. Enzyme und Reaktionskits

Zur Restriktion, Amplifikation und Modifikation von DNA wurden Enzyme der Hersteller MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt), Roche Diagnostics (Mannheim), Qiagen (Hilden) und Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt. Desweiteren wurden zur Isolation, Aufreinigung und Konzentrierung genetischen Materials fertige Reaktionskits eingesetzt, welche alle benötigten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien beinhalteten. Die Experimente wurden wie in den Handbüchern dieser Kits gefordert ausgeführt.

Folgende Kits kamen dabei zum Einsatz:

- Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Invitex, Berlin)
- MSB Spin PCRapace (Invitex, Berlin)
- Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren)

2.6. Marker

Nachfolgende Größenstandards wurden während der Gelelektrophoresen von Nukleinsäuren und Proteinen verwendet. λ -DNA (*Pst*I verdaut), GeneRuler DNA Ladder 100 bp und GeneRuler DNA Ladder 50 bp (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Zur Größenabschätzung von Proteinen während der geleelektrophoretischen Auftrennung in Polyacrylamidgelen wurde Prestained Protein Ladder 10-180 kDa (MBI Fermentas) genutzt. Die Größenstandards sind in Abbildung 2.2 dargestellt.

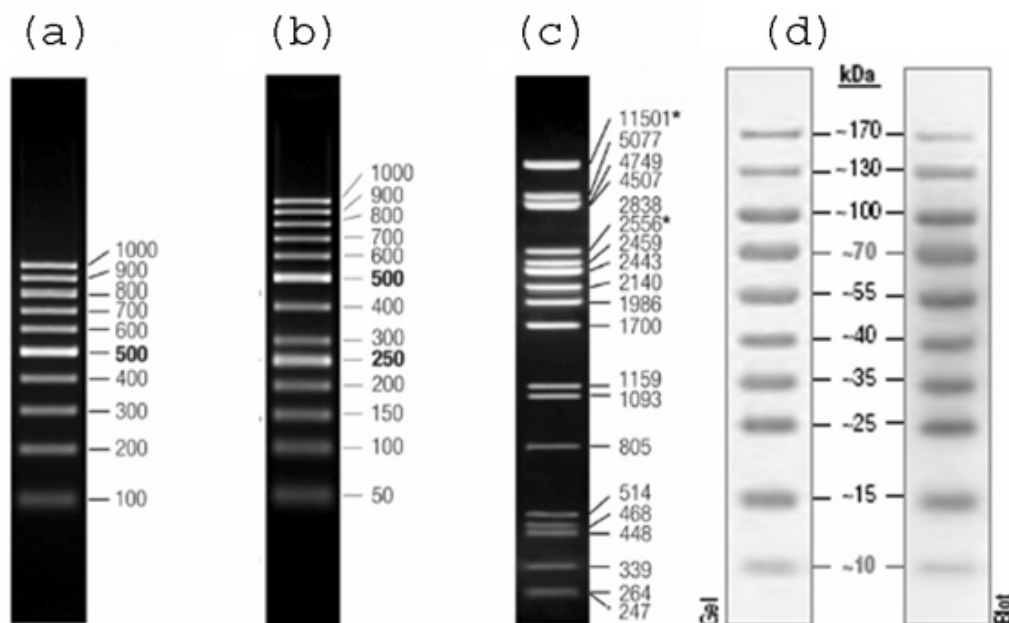


Abb. 2.2: DNA und Proteinmarker. Dargestellt sind alle in der Arbeit eingesetzten Marker der Firma Fermentas (St. Leon). (a) GeneRuler 100 bp DNA Ladder in 2,5% Agarose, (b) GeneRuler 50 bp DNA Ladder in 1,7 % Agarose, (c) λ Marker (*Pst*I verdaut) in 1,5 % Agarose; (d) PageRuler Prestained Protein Ladder 10-170 kDa. DNA Marker sind in bp, Proteinmarker in kDa angegeben.

2.7. Antikörper und enzymkonjugierte Antikörper

Die spezifische Detektion markierter Proteine erfolgte im Immunoblot Verfahren (3.3.4.) mit folgenden Antikörpern. Die Antikörper wurden den Herstellerangaben entsprechend verdünnt.

- Penta His-Antibody (Qiagen, Hilden); monoklonaler Maus Antikörper zur Detektion eines pentameren His Motivs
- GAM_{Fc}^{AP} (Dianova, Hamburg); polyklonaler Ziegen Antikörper, dient zur Detektion des Fc-Teils muriner Immunglobuline der Klasse G und ist mit einer Alkalischen Phosphatase verknüpft
- Anti S-Peptid Antikörper (Dianova, Hamburg); monoklonaler Maus Antikörper zur Detektion des synthetischen Peptids KETAAAKFERQHMDSC

2.8. Materialien zur Chromatographie

Es wurden innerhalb dieser Arbeit verschiedene Techniken der Chromatographie angewandt. Neben Dünnschichtchromatographie (3.4.1.) und HPLC (3.4.4.) diente die Festphasenextraktion (3.4.2.) dazu Metabolite spezifisch aus dem Kulturmedium aufzureinigen. Dazu benötigte Materialien sind nachfolgend aufgelistet.

- Dünnschicht Chromatographie: ALUGRAM SIL G/UV254 Größe 20 x 20 cm (Macherey-Nagel, Düren)
- Festphasenextraktion: SPE Strata X-AW SPE Säule (5 g/60 ml, Phenomenex, Torrence, CA, USA)
- HPLC: 250-4 LiChrospher 100 RP18 Säule (Merck, Darmstadt) mit RP-18 4 x 4 mm Vorsäule (Merck, Darmstadt)

2.9. Medien, Puffer und Lösungen

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden nach Sambrook (Sambrook and David, 2001) gefertigt. Bei Abweichungen dieser Vorgaben wird dies in der jeweiligen Methode vermerkt. Die Standardlösungen wurden mit deionisiertem H₂O (dH₂O) angesetzt. Der pH-Wert wurde mit 37 % HCl oder 5 M NaOH eingestellt. Die Lösungen wurden bei 121 °C 25 min autoklaviert. Thermisch instabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit Porengröße von 0,2 µm).

Benötigte Kultivierungsmedien:

- LB-Medium: 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, ad 1l dH₂O
- M9-Medium: 6,78 g/l Na₂HPO₄, 3 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l NaCl, 0,24 g/l MgSO₄, 1 g/l NH₄Cl, 0,01g/l CaCl₂, 2 % (v/v) Glycerin, ad 1l dH₂O
- SOC-Medium: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glukose, ad 1l dH₂O

2.10. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die für diese Arbeit benötigten Chemikalien wurden von folgenden Firmen mit Reinheitsgrad p.a. bezogen: BioRad (München), Boehringer (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Fermentas (St. Leon-Rot), Fluka (Neu Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Metabion (Martinsried), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Pharmacia (Erlangen), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma Aldrich (Steinheim).

Die übrigen Verbrauchsmaterialien stammten von den Herstellern Amersham Pharmacia Biotech (Upsalla, Schweden), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Solingen), Invitek (Berlin), Macherey Nagel (Düren), Millipore (Eschborn), Phenomenex (Torrence, CA, USA), Schott (Mainz), Qiagen (Hilden), Sarstedt (Nümbrecht), Schott (Mainz) und Whatman (Maidstone, England).

2.11. Geräte und Apparaturen

- Elektroporator: Multiporator (Eppendorf, Hamburg)
- BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
- Gelelektrophoresekammern, Gelträger, Kämme, Power-Supply (BioRad, München)
- Geldokumentation: Herolab UVT-20 M (Herolab, Wiesloch), E.A.S.Y. store Win 32 Software (Herolab, Wiesloch)
- Zentrifuge, Heraeus Biofuge pico (Kendro Laboratory Products, Langenselbold)
- Zentrifuge, Beckman Avanti J 30 I (Beckman, Fullerton, USA)
- Inkubatoren: Innova 4430 incubator shaker (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA)
- Waage, Feinwaage (Sartorius, Göttingen)

- Rotationsverdampfer: Laborota 4000-efficient (Heidolph instruments, Schwabach)
- Vakuumpumpe: Ilmvac LVS 301 Zp (Ilmvac, Ilmenau)
- Spectrophotometer Spectramax 340 (Molecular Devices)
- Sequenzierautomat: ABI Prism 3700 Sequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Cleanbench, Hera Safe HS9 (Kendro, Hanau)
- Thermocycler: MWG Primus 96 plus (MWG Biotech, München)
- Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau)
- Thermomixer: Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)
- Scanner: HP Scanjet 4890 (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, USA)
- Autoklav (H+P,)
- pH-Meter (Hanna Instruments,)
- Rührer RCT-Basic (IKA Labortechnik, Staufen)
- Trans Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München)
- Ultraschall: Labsonic U (B. Braun AG, Melsungen)
- Vortex: Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)
- HPLC: System Gold, programmable solvent module 126, scanning detector module 167 (Beckmann Coulter, Fullerton, USA)

3. Methoden

3.1. Mikrobiologische Methoden

3.1.1. Kultivierung und Lagerung von *E. coli* Stämmen

Die Anzucht der *E. coli* Zellen erfolgte bei Bedarf in flüssigen Medien (2.9.) schüttelnd bei 37 °C. Bei Anzucht auf festen Medien wurden 15 g/l Agar hinzugegeben. Zusätzlich wurde den Medien bei Bedarf zu den einzelnen Bestandteilen Ampicillin (50 µg/ml), Kanamycin (34 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C im Brutschrank oder in Inkubatoren, welche zur besseren Durchmischung des Mediums mit 110 rpm rotierten. War die Expression von Proteinen notwendig, wurde bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,6 – 1,0 IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt. Dauerkulturen der transgenen *E. coli* Stämme wurden erstellt, indem zu den zuvor über Nacht kultivierten Bakteriensuspensionen Glycerol in einer Endkonzentration von 50 % (v/v) hinzugefügt wurde. Die in Kryogefäße abgefüllten Zellsuspensionen wurden beschriftet und bei -80 °C gelagert. Bei Bedarf konnten die tiefgefrorenen Kulturen langsam auf Eis aufgetaut werden und erneut zum Wachstum in entsprechendem Medium kultiviert werden.

3.1.2. Herstellung elektrokompenter Zellen

Als Vorkultur wurden 50 ml LB-Medium mit dem entsprechenden *E. coli* Stamm aus einer Dauerkultur steril angeimpft, über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (Inkubator, 100 UpM, 37 °C) kultiviert und am nächsten Morgen 1:50 verdünnt in 500 ml LB-Hauptkultur überimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 - 1,0 bei 37 °C inkubiert und dann durch Zentrifugation pelletiert (6000 x g, 4 °C, 10 min). Das Zellpellet wurde vorsichtig in 150 ml eiskaltem 10 %igem Glycerol resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen in 2 ml kaltem 10 %igem Glycerol aufgenommen und zu 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zügig bei -80 °C gelagert.

3.1.3. Elektrotransformation

Die Technik der Elektrotransformation erzielt eine erhöhte Transformationsrate gegenüber der klassischen Hitzeschocktransformation. Dazu wurden 2 µl eines Ligationsansatzes oder 10-100 ng reine Plasmid-DNA zu 100 µl elektrokompenten *E. coli* -Zellen pipettiert. Nach fünf

Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Anlegen einer kurzweiligen Spannung (2500 V, 5 ms) transformiert und sofort mit 1 ml SOC-Medium überschichtet (Sambrook and David, 2001). Zur Regeneration wurden die Zellen dann 1 h bei 37 °C inkubiert. Die sich dabei regenerierenden Transformanden wurden anschließend auf LB-Platten supplementiert mit Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (34 µg/ml) sowie mit Ampicillin (50 µg/ml) und Kanamycin (34 µg/ml) über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Morgen wurden gewachsene Bakterienkolonien entweder mittels Kolonie-PCR (3.2.2.) direkt oder nach erneuter Kultivierung und Isolation der Plasmid-DNA mittels Restriktionsverdau (3.2.6.) durch ausgewählte Enzyme analysiert.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Polymerase chain reaction (PCR)

Zur Bildung und Vervielfältigung spezifischer DNA Fragmente wurde die Technik der PCR (Polymerase-Chain-Reaction) angewandt. Unter Verwendung der dabei benötigten dNTPs (dATP, dGTP, dCTP und dTTP), des MgCl₂, eines für die entsprechende Polymerase optimierten Reaktionspuffers, der Matrize sowie der Oligonukleotide wird die Ziel DNA spezifisch vervielfältigt. Dabei erfolgt eine initiale Denaturierung der Matrize bei 95 °C. Bei dieser Temperatur schmilzt die DNA-Doppelhelix auf. Eine sich anschließende Anlagerung der die Zielregion flankierenden Oligonukleotide findet bei 55 °C statt. Die darauffolgende Aneinanderknüpfung der dNTPs der Matrize entsprechend geschieht bei 72 °C. Die *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* hat bei 72 °C ein Temperaturoptimum. Die freien 3'-OH Enden der an die Matrize angelagerten Oligonukleotide dienen als Startpunkt der Polymerisierung durch die *Taq*-Polymerase. Es wird dabei ein neuer komplementärer DNA Strang zur Matrizen DNA gebildet. Die *Taq*-Polymerase verfügt zwar nicht über eine 3'-5' Exonukleaseaktivität (Proof-reading), bietet aber im Gegenzug dafür eine schnelle und sehr prozessive Polymerisierung. Diese Prozesse werden 20-30 x wiederholt, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung der gewünschten DNA erreicht wird. Neben der Standard *Taq*-Polymerase wurde eine *GoTaq* Hot Start Polymerase (Promega, Mannheim) verwendet. Diese ist mit einem Antikörper verknüpft, der zunächst die Aktivität der Polymerase blockiert. Dies soll verhindern, dass schon während der Aufwärmphase unspezifische PCR Produkte gebildet werden. Bei der ersten Denaturierung bei 94-95 °C wird die Aktivität wieder hergestellt. Hierbei wurde wie im Handbuch des Kits der Firma Promega beschrieben vorgegangen. Im

Folgenden sind detailliert die einzelnen Standardschritte der spezifischen Amplifikation dargestellt.

Tab. 3.1: Standard-PCR Bedingungen

Schritt	Temp (°C)	Zeit (min)
Initiale PCR-Aktivierung	95°C	3
Initiale zyklische Denaturierung	95°C	0,5
Anlagerung der Oligonukleotide	55°C	1
Elongation	72°C	1/kb
Finale Elongation	72°C	5

Tab. 3.2: PCR-Bedingungen unter Verwendung der Go Taq Hot Start Polymerase

Schritt	Temp (°C)	Zeit (min)
Initiale PCR-Aktivierung	95 °C	2
Initiale zyklische Denaturierung	95 °C	1
Anlagerung der Oligonukleotide	50 °C	1
Elongation	72 °C	1,5
Finale Elongation	72 °C	5

3.2.2. Kolonie-PCR

Neben der Standard-PCR wurde die Kolonie-PCR dazu verwendet möglichst schnell gewachsene Bakterienkolonien zu analysieren. Um dies zu bewerkstelligen, wurde etwas Zellmaterial der zu untersuchenden Bakterienkolonie in den schon vorgefertigten vollständigen PCR Mix überführt und dort resuspendiert. Um genetisches Material aus den Zellen freizusetzen wurde dem Standard-PCR Programm ein weiterer Schritt vorangestellt. Durch anfängliches Erhitzen platzen die Zellen auf und genetisches Material wird freigesetzt. Im Anschluss an das initiale Aufkochen erfolgt die PCR nach bekannter Vorgehensweise. Durch dieses Verfahren kann innerhalb kurzer Zeit kontrolliert werden ob die gewachsenen Zellen das transgene Konstrukt enthalten, mit welchem diese zuvor transformiert worden sind.

Tab. 3.3: Kolonie-PCR

Schritt	Temp (°C)	Zeit (min)
Anfängliche Erhitzung	95°C	10
Initiale PCR-Aktivierung	95°C	3
Initiale zyklische Denaturierung	95°C	0,5
Anlagerung der Oligonukleotide	55°C	1
Elongation	72°C	1/kb
Finale Elongation	72°C	5

3.2.3. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte nach Sambrook (Sambrook and David, 2001). DNAs und RNAs sind aufgrund ihres Phosphatrückgrates negativ geladen und können im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden. Als Trennmatrix diente Agarose zwischen 0,8 % (w/v) und 2,5 % (w/v) Agarose in 1 x TAE- oder 1 x TBE-Puffer. Durch Aufkochen wurde die Agarose aufgelöst und sobald die Lösung auf ca. 65 °C abgekühlt war mit Ethidiumbromid (3 µg/100 ml) versetzt, das zwischen die DNA-Bausteine interkaliert. Mit einem UV-Transilluminator (Herolab) kann der interkalierende Farbstoff und somit die Nukleinsäuren bei 260 nm detektiert werden. Um Konzentration und Größe von DNA-Fragmenten abzuschätzen, wurden verschiedene vorgefertigte Standardmarker (2.5) verwendet.

Benötigte Puffer:

- 1 x TAE-Puffer: 40 mM Tris/Acetat, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8,5 mit Essigsäure einstellen
- 1 x TBE-Puffer: 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA

3.2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten das der richtigen Größe zu isolieren und weiter zu verarbeiten, wurden als Bande sichtbar werdende DNA-Moleküle nach gelelektrophoretischer Trennung mit einem Skalpell aus dem Gel entfernt. Durch chaotrope Salzlösung als Lösungsbestandteile des Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Invitek, Berlin) wird die Agarose aufgelöst. Die aus der Agarose gelöste DNA wurde über weitere sich anschließende Reini-

gungsschritte isoliert. Die einzelnen Schritte der weiteren Aufreinigung sind dem Handbuch des Kits zu entnehmen.

3.2.5. Restriktionsverdau

DNA wird durch Restriktionsendonukleasen geschnitten, dabei erkennen diese spezifisch eine für das entsprechende Enzym charakteristische Nukleotidsequenz und spalten die doppelsträngige DNA an dieser Stelle auf. Dabei entstehen glatte (blunt) oder klebrige (sticky) Enden an der DNA, welche von Restriktionsenzym zu Restriktionsenzym variieren. Die in dieser Arbeit genutzten Restriktionsenzyme wurden von der Firma NEB oder Fermentas bezogen. Die Inkubationsbedingungen der einzelnen Enzyme wurden den Herstellerempfehlungen entsprechend eingehalten. Nach Standardbedingungen wurde die zu verdauende Plasmid-DNA 2 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde 1-3 Units pro µg Plasmid-DNA eingesetzt. Das Volumen an Restriktionsenzym sollte 10 % des Gesamtvolumens nicht überschreiten, um unspezifisches Schneiden (Staraktivität) der Enzyme zu vermeiden.

Tab. 3.4: Exemplarischer Standardrestriktionsverdau

Komponente	Menge (ng)
DNA	100-1000
10x Puffer	1/10 Volumen
10x BSA	1/10 Volumen
Restriktionsendonuklease	1 U pro µg DNA
dH ₂ O	Ad 1 Volumen

3.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten

Restringierte Vektor- und Insert-DNA wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft. Das dazu benötigte Enzym, die T4-DNA-Ligase (Invitrogen), wurde den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Um eine möglichst große Ausbeute an erfolgreich ligierten Vektorkonstrukten zu erlangen, wurden Vektor zu Insert in molaren Verhältnissen von 1:3, 3:1 und 1:1 in unterschiedlichen Ansätzen miteinander verknüpft. Die Reaktion wurde über Nacht bei 16 °C ausgeführt.

Tab. 3.5: Exemplarischer Ligationsansatzes

Komponente	Menge
Vektor-DNA	200 ng
Insert-DNA	Entspr. Menge an Insert-DNA
T4-DNA-Ligase-Puffer	1/10 Volumen
T4-DNA-Ligase	1 μ l (5 U)
dH ₂ O	Ad 10 μ l

3.2.7. Dephosphorylierung restriktionsverdauter Plasmid-DNA

Zur Verbesserung der Ligationseffizienz wurden die terminalen Phosphatgruppen der restringierten Plasmid-DNA mit dem Enzym „Calf intestine phosphatase“ (CIP) der Firma NEB entfernt. Dies verhindert die Religation des Vektors und erhöht die Ausbeute an rekombinanten Plasmiden. Restringierte Vektor-DNA wurde dephosphoryliert, durch Elektrophorese gereinigt und gegebenenfalls mit Ethanol gefällt.

3.2.8. DNA-Präzipitation

Zur Reinigung, Konzentrierung und Umpufferung restringierter DNA wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Dazu wurde nach dem Restriktionsverdau 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumeneinheiten 96 % Ethanol zu den DNA-haltigen Proben gegeben, um die DNA zu fällen. Diese Ansätze wurden für 30 Minuten bei -20 °C gelagert und danach 15 Minuten bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nochmals 300 μ l 70 % Ethanol zugegeben. Wiederum wurde der Ansatz 15 Minuten bei 4 °C und 13.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das kaum sichtbare DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 50 μ l dH₂O resuspendiert.

3.2.9. Isolation von Plasmid-DNA

Zur Klonierung, Transformation und Restriktion wurde eine größere Menge an Plasmid DNA benötigt. Zuvor in den Zellen vielfach kopierte Plasmid DNA wurde durch Verwendung kommerzieller Plasmid Isolations Kits isoliert und aufgereinigt, so dass DNA in ausreichend hoher Konzentration und Reinheit vorlag. Es wurde mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren) gearbeitet. Die Angaben des Herstellers wurden befolgt. Wahlweise erfolgte die Elution der Plasmide mit 50 μ l dH₂O oder Elutionspuffer. Dazu wurden ent-

sprechende *E. coli* Zellen steril mit Hilfe von Zahnstochern oder weißen Pipettenspitzen in 5 ml LB-Medium überführt. Entsprechend der Konstrukte, mit welchen die Zellen transformiert waren, wurde Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (34 µg/ml) hinzugefügt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C auf dem Roller inkubiert und am nächsten Morgen zentrifugiert (12000 x g, 5 min, Raumtemperatur). Die Zellpellets wurden dann entsprechend den Herstellerangaben der Plasmidisolationskits weiter verarbeitet.

3.2.10. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierungen wurden durch den Sequenzierservice des Fraunhofer Institut für Molekulare Biotechnologie und angewandte Ökologie durchgeführt. Dazu diente ein Applied Biosystems 3700 DNA Analyser und das „Big-Dye cyclesequencing terminator“ Kit. Alle Sequenzierungen erfolgten nach der von Sanger (Sanger et al., 1977) beschriebenen Methode, die auf dem zufälligen Einbau eines 2',3'-Dideoxyribonukleotids und dem darauffolgenden statistischen Kettenabbruch aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am 3'-Ende während der Polymerisierungsreaktion beruht. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines Plasmidisolationskits der Firma Invisorb isoliert. Nach Konzentrationsabschätzung wurde die Reinheit der Präparation auf einem Agarosegel überprüft und die DNA direkt für die Sequenzierung genutzt. Zur Sequenzierung der verschiedenen ORFs wurden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Die Mengen zu sequenzierender DNA, sowie die Konzentration der einzusetzenden Sequenzierprimer wurden entsprechend den Empfehlungen des Sequenzierdienstes eingehalten.

3.3. Physiologische und proteinchemische Methoden

3.3.1. Heterologe Proteinexpression

Zur Überexpression von zuvor in geeignete Expressionsvektoren klonierten ORFs wurden die das entsprechende Überexpressionsplasmid enthaltenden *E. coli* BL21 Zellen in 1 l Hauptkultur (LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin) angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Expression durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Um die dadurch hervorgerufene Expression der Proteine zu dokumentieren, wurden nach konstanten Zeitintervallen 1 ml Zellsuspension entnommen und abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden anschließend aufgekocht und der proteinhaltige Überstand mittels SDS-PAGE (3.3.3.) und Immunoblotverfahren (3.3.4.) analysiert.

3.3.2. Heterologe Proteinexpression zur *in vivo* Aktivitätsbestimmung

Um *in vivo* die Aktivität der am artifiziellen Biosyntheseweg beteiligten Proteine zu untersuchen, wurde ein ähnliches Verfahren wie unter 3.3.1. beschrieben angewandt. Die mit unterschiedlichen Expressionsplasmiden ausgestatteten *E. coli* BL21 Zellen wurden in einem Medium, das den Versuchszwecken angepasst wurde, angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei einer OD₆₀₀ von 1 zur Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 h Inkubation unter identischen Bedingungen wurden entsprechende Vorstufensubstanzen der Kultur zugefügt. In konstanten Zeitintervallen wurden Proben entnommen, die Zellen abzentrifugiert und die erhaltenen zellfreien Überstände durch HPLC analysiert, um die Ausschleusung möglicher Metabolite oder Endprodukte zu beobachten.

3.3.3. Denaturierende Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli entsprechend ihrer Größe getrennt werden. Dazu wurde 1 ml der Zellkultur zentrifugiert (12000 x g, 5 min). Das Zellpellet 1 x SDS-Probenpuffers resuspendiert und 10 Minuten gekocht. Durch Zentrifugation (12000 x g, 5 min) wurden die Zelltrümmer pelletiert. Der proteinhaltige Überstand, welcher die denaturierten Proteine enthält, wurden dann in die Taschen des vorbereiteten Poly-Acryl-Amid-Gel (Sammelgel: T = 4 %, C = 2,7 %, pH 6,8; Trenngel: T = 12 %, C = 2,7 %, pH 8,8) gefüllt und in der „Mini Protean“-Apparatur (BioRad) elektrophoretisch aufgetrennt. Die elektrophoretische Trennung wurde bei 110-120 V für 1-1,5 h durchgeführt. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blau G-250 für ca. 10 min bei Raumtemperatur gefärbt. Die Entfärbung des Gels erfolgte in Entfärberlösung unter häufigem Wechsel der Lösung. Erst nach der Entfärbung werden die Proteinbanden sichtbar.

Benötigte Puffer und Lösungen:

- 10 x Tris Glycin Puffer: 250 mM Tris/HCl, 1,93 M Glycin, 1 % Sodiumdodecylsulfat (SDS), pH 8,3 mit HCl einstellen
- Comassie-Färbelösung: 0,25 % (w/v) Comassie-Brilliant-Blue G-250, 30 % (w/v) Methanol, 10 % (w/v) Essigsäure
- Entfärbelösung: 30 % (w/v) Methanol, 10 % (w/v) Essigsäure
- 5 x Laemmli Ladepuffer: 100 mM Tris/HCl, 10 % (w/v) Saccharose, 4 % (w/v) SDS, 0,4 M β -Mercaptoethanol, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau

3.3.4. Immunoblot-Analyse

Geringe Mengen an Protein können über die sehr sensitive Methode der Immunoblot-Analyse nachgewiesen werden. Die unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrophoretoblotting auf eine Hybond-C-Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotech) übertragen (Mini Transblot Apparatur, BioRad). Die vertikale Elektrophorese wurde in Transferpuffer durchgeführt. Als Größenstandard wurde der „Prestained Protein Marker“ (NEB) verwendet. Die Detektion der transferierten Proteine erfolgte nach folgendem Schema:

1. Absättigen der Membran mit 1 x PBS + 0,5 % (w/v) BSA für 30 Minuten bei RT
2. 3 x waschen mit 1 x PBS + 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST)
3. Inkubation der Membran für 1 h mit 1:5000 verdünntem primären Antikörper in 1 x PBS + 0,5 % (w/v) BSA
4. 3 x waschen mit 1 x PBS + 0,05 % (v/v) Tween 20
5. Inkubation der Membran für 1 h mit 1:5000 verdünntem sekundären Antikörper in 1 x PBS + 0,5 % (w/v) BSA
6. 2 x waschen mit 1 x PBS + 0,05 % (v/v) Tween 20 und 2 x waschen mit Alkalische Phosphatase Puffer (AP-Puffer)
7. Zugabe von ca. 15 ml NBT/BCIP und 10-20 Minuten Inkubation
8. Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von dH₂O
9. Trocknung und Scannen der Membran

Benötigte Puffer und Lösungen:

- Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl, 193 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
- PBST-Puffer: 10 mM Na_3PO_4 , 2 mM K_3PO_4 , 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,1 % (v/v) Tween 20
- AP-Puffer: 100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2
- NBT/BCIP Lösung: 3,33 % (w/v) NBT, 1,65 % (w/v) BCIP, gelöst in Dimethylformamid

3.3.5. Zellaufschluss

Nach Transformation zu untersuchender Einzelkonstrukte in *E. coli* wurde die Expression mittels 1 mM IPTG induziert (3.3.1.). 24 h nach weiterer Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen abzentrifugiert (6000 x g, 10 min, RT). Die in den Zellen befindlichen Enzyme wurden durch Zerstörung der Zellwände freigesetzt. Dazu wurden die Zellpellets zunächst in Lysepuffer (3.3.5.) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallanwendung (15 Zyklen, Frequenz $0,5\text{-}1\text{ s}^{-1}$ bei 100 W, 30 sec, LABSONIC U, B. Braun, Melsungen, Germany). Zwischen den Schallanwendungen wurden die Zellen für 15 sec auf Eis gehalten. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (17000 x g, 15 min) von dem proteinhaltigen Überstand separiert. Die Proteine wurden dann mittels IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) durch Ni^{2+} -NTA aufgereinigt.

3.3.6. Aufreinigung von Proteinen über eine Ni^{2+} -NTA Matrix

Zur Aufreinigung von Proteinen, die C- oder N-terminal eine Hexahistidin Sequenz tragen, wurden Poly-Prep-Chromatographie Säulchen (BIO-RAD) verwendet. In dem als IMAC bezeichneten Verfahren werden Proteine aufgrund ihrer Wechselwirkung mit einer Ni^{2+} -NTA Matrix spezifisch getrennt.

Die Säule wurde zunächst mit 1-2 ml Ni-NTA (QIAGEN) beladen. Zur Äquilibration diente der Lysepuffer, nach Äquilibration wurde das Proteinlysate aus dem Zellaufschluss (3.3.5.) auf die äquilibrierte Ni^{2+} -NTA Matrix aufgetragen. Mit steigender Imidazolkonzentration im Puffer wurden zunächst unspezifisch bindende Proteine ausgewaschen. Die Elution der über His-Tag an die Matrix gebundenen Enzyme erfolgte durch Elutionspuffer, der 300 mM Imidazol enthielt. Die Eluate, sowie alle gesammelten Durchflüsse wurden anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt. Die Identifikation der Histidin

markierten Proteine erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper (2.7.) in dem als Immunoblot-Analyse (3.3.4.) bezeichneten Verfahren. Der Proteingehalt der Proteinfractionen wurde mit Bradford-Reagenz bestimmt. Die am stärksten konzentrierten Proteineluate wurden für die Aktivitätstests verwendet.

Benötigte Puffer:

- Lysepuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,5, 10 % (v/v) Glycerin, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol
- Waschpuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,5, 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol
- Elutionspuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,5, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol

3.3.7. Gewinnung nativer *Pc4CL* aus einer Suspensionskultur

Zur Gewinnung nativer 4-Cumarat-CoA Ligase aus einer *Petroselinum crispum* Zellkultur wurden 1,2 g gefrorener Zellen in 3,5 ml 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 versetzt mit 14 mM β -Mercaptoethanol aufgenommen. Dieses Gemisch wurde 30 Minuten auf Eis gerührt. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 13.000 Upm 15 Minuten zentrifugiert. Zu 3,8 ml des Überstandes wurde tropfenweise unter ständigem Rühren 2,53 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung (> 70 % w/v) langsam hinzugefügt. Daran schloss sich erneut eine Zentrifugation bei 13.000 Upm für 5 Minuten an. Der erhaltene Überstand wurde mit 0,836 g festem Ammoniumsulfat versetzt, dabei wurde wiederum auf Eis gerührt. Hieraus wurden bei Bedarf 400 μ l entnommen, 5 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert und das Proteinpellet in 30 μ l 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 (+ 50 % Glycerin w/v) resuspendiert. 15 μ l wurden dann im Aktivitätstest eingesetzt.

3.3.8. Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes der durch IMAC aufgereinigten Proteine erfolgte durch die Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurden 5 μ l der zu untersuchenden proteinhaltigen Proben mit 295 μ l Bradford-Reagenz (BIORAD, 1:5 mit dH₂O verdünnt) vermischt. Photometrisch wurde der Proteingehalt bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Leerwert mit dH₂O gemessen. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. Mittels geeignet verdünnter BSA-Standardlösungen wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer der Proteingehalt der Proben ermittelt wurde.

3.3.9. Enzymtests

Tyrosin Ammoniak-Lyase (TAL) Aktivitätstest

Die Aktivität der Tyrosinammoniak Lyase (TAL) wurde *in vitro* nach Isolation aus *E. coli* bestimmt. Nachdem die mit Histidin getaggtten TAL Proteine mittels IMAC aufgereinigt wurden (3.3.5.), wurde der Proteingehalt (3.3.6.) ermittelt. Die TAL Aktivität wurde nach der Methode von Watts bestimmt (Watts et al., 2006b), wurde jedoch bezüglich der Pufferzusammensetzung modifiziert. Die bei der Desaminierung entstehende p-Cumarsäure wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 310 nm in einem UV/VIS Spektrophotometer detektiert. Dabei wurde in 150 mM bis-Tris-Propan Puffer pH 8,5 bei 35 °C mit Tyrosinkonzentrationen von 1 bis 1,5 mM gemessen.

4-Cumarat-CoA :Ligase (4CL) Aktivitätstest

Auch die Messung der 4-Cumarat-CoA Ligase (4CL) Aktivität wurde ebenfalls *in vitro* nach Isolation mittels IMAC vorgenommen. Die Aktivität der aufgereinigten Proteine wurden dann nach Vorgabe von Knobloch (Knobloch and Hahlbrock, 1975, 1977) analysiert. Die Temperatur während der Messung betrug 30 °C und als Puffer wurde 50 mM Kaliumphosphate Puffer pH 7,8 verwendet. Zudem enthielt der Test 350 µM Coenzym A (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) und 100 µM p-Cumarsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). Die Menge aufgereinigter 4CL betrug zwischen 2,5 und 20 µg/ml. Der enzymatische Umsatz von p-Cumarsäure zu p-Cumaryl-CoA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm im ELISA-Reader (Spektrophotometer Spectramax 340, Molecular Devices) gemessen. Auch p-Aminozimtsäure, ein in p-Stellung aminosubstituiertes Derivat der Cumarsäure, wurde unter identischen Bedingungen ebenfalls in diesem Enzymtest eingesetzt, um die Substratspezifität des Enzyms zu untersuchen.

Cinnamoyl-CoA-Reduktase (CCR) Aktivitätstest

Nach Zellaufschluss und Proteinkonzentrierung wurde auch die Aktivität der Cinnamoyl-CoA-Reduktase (CCR) analysiert. Dabei wurde vorgegangen wie von Luderitz (Luderitz and Grisebach, 1981; Luderitz et al., 1982) beschrieben. Der Enzymtest wurde in 100 mM Na/K-Phosphatpuffer pH 6,25 durchgeführt. 70 µM p-Cumaryl-CoA, 100 µM NADPH und 7 µg/ml bis 40 µg/ml aufgereinigte CCR vervollständigten diesen Enzymtest. Die Bildung des Reaktionsproduktes wurde bei 366 nm im ELISA-Reader (Spektrophotometer Spectramax 340, Molecular Devices) verfolgt.

Cinnamoyl-Alkohol Dehydrogenase (CAD) Aktivitätstest

Die Aktivität der durch IMAC aufgereinigten Cinnamoyl-Alkohol Dehydrogenase (CAD) wurde in 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 bestimmt. Der Assay wurde nach Wyrambik (Wyrambik and Grisebach, 1975) mit folgenden Modifikationen durchgeführt. Es wurden 200 μ M NADPH und 50 μ M Coniferylaldehyd gelöst in 2-Methoxyethanol sowie 1,25 μ g/ml aufgereinigten Proteins eingesetzt. Die Messungen erfolgten bei 30 °C im ELISA-Reader (Spectrophotometer Spectramax 340, Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

3.3.10. Enzymatische Herstellung von p-Cumaryl-CoA

In Anlehnung an den von Knobloch entwickelten Enzymtest zur Bestimmung der 4CL-Aktivität fand eine enzymatische Herstellung von p-Cumaryl-CoA statt. Die Generierung dieser Substanz war notwendig, da eine kommerzielle Verfügbarkeit dieses Stoffes nicht gegeben war. Zudem basiert die Bestimmung der CCR Aktivität auf der Verfügbarkeit des aktivierten Thioesters, so dass ohne p-Cumaryl-CoA diese *in vitro* nicht hätte bestimmt werden können. Zu diesem Zwecke wurden 385 μ g aufgereinigter 4-Cumarat-CoA Ligase, 360 μ l 1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,8, 360 μ l 100 mM ATP, 36 μ l 1 M $MgCl_2$, 700 μ l 10 mM p-Cumarat und 240 μ l 10 mM CoenzymA pipettiert.

Die enzymatische Umsetzung erfolgte über einen Zeitraum von ca. 24 h bei RT und wurde durch Zugabe von 4 % (w/v) Ammoniumacetat abgestoppt. Die Aufarbeitung des Reaktionsproduktes erfolgte nach bekannter Methode (Beuerle and Pichersky, 2002). Die Technik der Festphasenextraktion (3.4.2.) mit Hilfe von C18 ec-Säulen der Firma Macherey-Nagel kam dabei zum Einsatz, um den entstandenen aktivierten Thioester von den übrigen Bestandteilen und dem übrigen Edukt spezifisch zu isolieren und konzentrieren. Der Thioester wurde mit dH_2O von der Säule eluiert und die einzelnen Eluate durch Wellenlängenscan (3.4.5.) in einem Spektrum von 200 nm bis 400 nm untersucht, um ein charakteristisches Absorptionsspektrum zu erhalten. Nach Analyse der Eluate wurden die den Thioester enthaltenden Fraktionen der Festphasenextraktion vereinigt und lyophilisiert (3.4.6.) mit dem Ziel das überschüssige Lösungsmittel Wasser zu eliminieren und den Thioester zu konzentrieren. Das Lyophilisat wurde in 200 μ l dH_2O aufgenommen und erneut einem Wellenlängenscan unterzogen. Anschließend wurde das Lyophilisat mittels HPLC (3.4.4.) untersucht, um die Reinheit

des Produktes bei 333 nm zu überprüfen. Abschließend erfolgte eine Verifizierung über Massenspektroskopie (3.4.7.).

3.4. Analytik

3.4.1. Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographische Verfahren dienen der schnellen Identifikation von p-Cumarylalkohol, nachdem dieser über NMR identifiziert worden war. Dabei wurden 20 x 20 cm Kieselgelplatten von Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Das Laufmittel war aus einem Gemisch von Toluol, Isoamylalkohol und Essigsäure zusammengesetzt in einem Mischungsverhältnis von 80:40:4 (v/v). Nach erfolgter Trennung wurden die getrockneten Kieselgelplatten bei einer Wellenlänge von 254 nm analysiert und die Banden angezeichnet. Anhand der R_f -Werte konnten die Substanzen identifiziert werden.

Neben der qualitativen Stoffanalyse diente dieses Verfahren zur quantitativen Produktisolierung bei der Herstellung von p-Cumarylalkohol aus 10 l Kultur (3.4.2.). Dazu wurden 300 µl Aliquots der aufgereinigten Isolate über die ganze Breite der Kieselgelplatten aufgetragen und unter identischen Bedingungen chromatographiert. Nach der Identifikation der Banden wurden die Kieselgelbanden entsprechender Substanzen mit einem Spatel von der Aluminiumoberfläche abgekratzt und mit einem Pistill feingemahlen. Das so erhaltene feinkörnige Silikat wurde wie unter 3.4.3. mit Ethylacetat extrahiert, das Retentat in geeignetem Lösungsmittel aufgenommen.

3.4.2. Festphasenextraktion

Aufreinigung des p-Cumaryl-CoA

Die enzymatische Herstellung von p-Cumaryl-CoA wurde unter 3.3.8. beschrieben, die Aufreinigung des Thioesters erfolgte nach der Methode von Beuerle (Beuerle and Pichersky, 2002). Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 4 % (w/v) Ammoniumacetat wurde eine C18 ec-Säule (Macherey-Nagel, Düren) vorbereitet. Zunächst musste das Material der Matrix durch 5 Säulenvolumen Methanol aktiviert werden. Darauf folgten 5 Säulenvolumen dH₂O gefolgt von ebenfalls 5 Säulenvolumen 4 % (w/v) Ammoniumacetat, bevor das Reaktionsgemisch, welches wie unter 3.3.8. zusammenpipettiert wurde, auf die äquilibrierte C18 ec-Säule aufgetragen wurde. Mit Hilfe eines Spritzenstemples wurde die Lösung über die Säule

gepresst. Überschüssiges CoenzymA und Protein ließ sich durch Waschen mit 4 % (w/v) Ammoniumacetat eliminieren. Die Elution des p-Cumaryl-CoA erfolgte mit dH₂O in 10 x 2 ml Fraktionen, deren Absorptionsspektren anschließend untersucht wurden. Die Fraktionen, die das gewünschte Produkt enthielten, wurden anschließend lyophilisiert (3.4.6.).

Aufreinigung von p-Cumaryl Alkohol

p-Cumarylalkohol, das Produkt der vollständigen Enzymkaskade unter Einwirkung der TAL, 4CL, CCR und CAD, war kommerziell nicht erhältlich. Dies führte dazu, dass auch dieser Stoff enzymatisch synthetisiert, aufgereinigt und identifiziert werden musste. Dazu wurden 10 l eines wässrigen den Alkohol enthaltenden Kulturüberstandes am Rotationsverdampfer schrittweise eingengt. Das Retentat wurde 6 x mit gleichem Volumenanteil an Ethylacetat extrahiert (3.4.3.). Die organische Phase wurde erneut am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 aufgenommen. Zur Isolation des p-Cumarylalkohols diente eine Anionenaustauschersäule (Strata-X-AW SPE, 5 g/60 ml, Phenomenex, Torrence, CA, USA). Nachdem die Säule mit 50 ml Puffer und 10 ml dH₂O gewaschen wurde, konnte das das Reaktionsprodukt enthaltende Retentat mit Methanol eluiert werden. Als weitere Isolationsschritte schlossen sich präparative Dünnschichtchromatographien (3.4.1.) an. Eine Identifikation und gleichzeitige Quantifizierung des Isolates erfolgte am Fraunhofer ITEM durch Aufnahme eines ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektrum (Dr. A. Preiss, Fraunhofer ITEM, Hannover).

3.4.3. Flüssig-Flüssig Extraktion

Diese Art der Extraktion diente dazu aus wässrigen Kulturüberständen hydrophobe Substanzen in die organische Phase zu überführen und diese dadurch selektiv anzureichern. Dazu wurde der zellfreie, wässrige Überstand 3 x mit gleichem Volumenanteil Ethylacetat in einem Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt. Restwasser wurde durch Zugabe von NaSO₄ aus dem Lösungsmittel eliminiert. Das feste NaSO₄ wurde über einen Faltenfilter abgetrennt und das das Produkt enthaltende Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (Laborota 4000-efficient, Heidolph instruments, Schwabach) bei Unterdruck bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde zu Analysezwecken in Methanol aufgenommen.

3.4.4. HPLC

Kulturüberstände, welche die synthetisierten Phenylpropanoide enthielten wurden mit einer Beckman System Gold HPLC (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) untersucht. Die Reaktionsprodukte wurden auf einer 250-4 LiChrospher 100 RP 18 Säule der Firma Merck (Darmstadt) getrennt, welcher eine RP-18 4 x 4 mm Vorsäule vorgeschaltet war. 50-100 µl der wässrigen zellfreien Kulturüberstände wurden unverdünnt und verdünnt direkt injiziert. Es wurde bei einer Wellenlänge von 275 nm gemessen. Die Trennung erfolgte in einem Gradient aus 100 mM Natriumacetatpuffer pH 4,75 (Laufmittel A) und Methanol (Laufmittel B). Dabei wurde nachfolgender Gradient programmiert.

HPLC-Programm:

1. 0-5 min, 0 % B (100 % A)
2. 5-15 min, 50 % B (50 % A)
3. 15-20 min, 100 % B (0 % A)
4. 20-22 min, 100 % B (0 % A)
5. 22-30 min, 0 % B (100 % A)
6. 30-32 min, 0 % B (100 % A)

3.4.5. Wellenlängenscan

Es wurden von allen Substanzen, welche in den Aktivitätstest als Substrat eingesetzt wurden oder als Produkt der enzymatischen Umsetzungen entstanden, Absorptionsspektren aufgenommen. Dabei wurde die Absorption zwischen 200 nm und 400 nm im UV/VIS Spektrophotometer gemessen. Ziel dieser Wellenlängenscans war es die Absorptionsmaxima der verschiedenen Metabolite zu erfassen, um dann geeignete Detektionsparameter für die HPLC daraus abzuleiten.

3.4.6. Lyophilisation

Unter Gefriertrocknung, auch Lyophilisation genannt, versteht man das Trocknen einer Substanz in gefrorenem Zustand, bei der die Feuchte aus dem gefrorenen Produkt im Vakuum direkt aus dem festen in den gasförmigen Zustand übergeht und somit entzogen wird. Das Eis verdampft dabei unter Umgehung des flüssigen Aggregatzustandes, es sublimiert. Die Gefriertrocknung findet als Verdampfungstrocknung immer im Vakuum statt, wobei die Subli-

mationstemperatur nach dem Dampfdruckverhalten von der Höhe des Vakuums abhängt. Das zurückbleibende feste Lyophilisat kann in geeignetem Lösungsmittel erneut gelöst werden. Diese Art der Trocknung stellt eine schonende Art der Konzentrierung bei temperatursensitiven Produkten dar und wurde bei der Herstellung von p-Cumaryl-CoA angewandt (3.4.2.).

3.4.7. Auftragsanalytik

Massenspektroskopie

Von p-Cumaryl-CoA und p-Aminocinnamyl-CoA wurden nach der Aufreinigung Massenspektren aufgenommen. Die Durchführung der FT-MS/ESI-MS Analyse wurde freundlicherweise von Dr. W. Gebhardt (ISA, RWTH Aachen) übernommen. Diese Analysetechnik erlaubt es Aussagen über die Molmassen organischer Substanzen zu treffen und dadurch die Strukturformel aufzuklären. Die Massenspektrometrie ist keine spektroskopische Analysemethode, da die untersuchten Atome und Moleküle keine Wechselwirkungen mit elektromagnetischer Strahlung eingehen. Vielmehr kommt ein Massenspektrum dadurch zustande, dass die zu untersuchenden Teilchen bei der Passage durch ein magnetisches Feld von der geraden Bahn abgelenkt werden. Je leichter ein Teilchen ist und je höher es geladen ist, desto größer ist auch die Ablenkung. Das Ausmaß der Ablenkung von der geraden Bahn ist abhängig vom Quotienten m/z (Masse/Ladung). Zu diesem Zweck wird die Substanz zunächst verdampft, dann werden die Moleküle durch einen Elektronenstrahl bestimmter Intensität geleitet. Beim Auftreffen von Elektronen auf die injizierten Moleküle wird so viel Energie übertragen, dass einige der Moleküle ein Elektron abstoßen und damit zu einem Kation radikalisiert werden. Das dabei entstehende Molekül-Ion wird beschleunigt und im magnetischen Feld abgelenkt. Die Stärke des magnetischen Feldes lässt sich so variieren, dass nur Ionen eines bestimmten m/z Verhältnisses (Molarer Masse) am Kollektor ankommen und dort detektiert werden. Dies wird elektronisch in ein Signal umgewandelt, welches als Peak aufgezeichnet wird. In einem Massenspektrum wird der m/z -Wert (Abszisse) gegen die Peakhöhe (Ordinate) aufgetragen, was einer relativen Häufigkeit von Ionen dieser Art entspricht. Der höchste Peak wird als Basis-Peak bezeichnet und dessen relative Häufigkeit gleich 100 gesetzt. Die übrigen Peaks eines Massenspektrums werden dazu in Relation gesetzt. Molekül-Ionen können durch die Einwirkung der Elektronenstrahlen auch noch weiter fragmentieren und dabei alle möglichen Bruchstücke erzeugen, die als Peaks geringerer m/z -Verhältnisse im Massenspektrum in Erscheinung treten. Aus dem Fragmentierungsmuster lassen sich weitere Aufschlüsse über die Struktureinheit ableiten.

^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die Analyse der Stoffe, die als Produkt des vollständigen künstlichen Ligninbiosyntheseweges in *E. coli* gebildet und ausgeschleust wurden, erfolgte am Fraunhofer Institut ITEM in Hannover unter Aufsicht von Dr. A. Preiss. Nach Isolation aus 10 l Kulturmedium wurde das Retentat (3.4.2.) in 2 ml Acetonitril gelöst und 1 ml davon zur Identifikation und Quantifizierung eingeschickt. Die NMR-Spektroskopie (NMR = nuclear magnetic resonance) liefert ebenfalls Informationen über den strukturellen Aufbau eines Moleküls. Diese Methode beruht im Gegensatz zur Massenspektroskopie auf der Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch die zu untersuchenden Moleküle.

4. Ergebnisse

4.1. Biosynthese von p-Cumarat durch TAL-vermittelte Desaminierung

4.1.1. Klonierung der TAL aus *Rhodobacter sphaeroides* (*RsTAL*)

Die Tyrosin Ammoniak-Lyase stellt das initiale Enzym bei der Etablierung eines artifiziellen Phenylpropanoid-Biosyntheseweges in *E. coli* dar. In monokotylen Pflanzen desaminiert dieses Protein intrazelluläres L-Tyrosin unter Freisetzung von p-Cumarat und Ammoniak. Um dieses Protein funktional in *E. coli* zu etablieren, wurde der offene Leserahmen des Enzyms aus *Rhodobacter sphaeroides* dem Codon Usage von *E. coli* angepasst und die Nukleotidsequenz entsprechend modifiziert, zusätzlich wurde an die Sequenz ein His-Tag angehängt. Die Sequenz der veränderten *RsTAL* ist im Anhang (8.2.) aufgeführt. Die synthetische Herstellung des modifizierten ORF erfolgte durch die Firma GenScript Corp. (Piscataway, NJ, USA). Es wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Nco*I eingefügt, um den offenen Leserahmen in einen geeigneten Zielvektor zu integrieren, viele der anderen Schnittstellen wurden eliminiert. Die modifizierte *RsTAL* wurde in einem pUC57 Vektor integriert geliefert. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Nco*I wurde das Fragment aus dem pUC57 Vektor ausgeschnitten. Das Fragment konnte dann in den passend dazu geschnittenen pETDuet-1 Vektor ligiert werden. Zur Integration diente die erste MCS des Vektors. Zur Kontrolle wurde das hergestellte Konstrukt mit ausgewählten Restriktionsenzymen (3.2.5.) geschnitten. Auf eine Sequenzierung wurde verzichtet, da der klonierte ORF zuvor synthetisch hergestellt wurde. Nach der Klonierung wurde *E. coli* ER2566 transformiert. Die Plasmidkarte des pETDuet-*RsTAL* Konstruktes ist im Anhang (8.3.) dargestellt.

4.1.2. Expression, Aufreinigung und *in vitro* Aktivitätsanalyse von *RsTAL*

Die Transformation des pETDuet-*RsTAL* Konstruktes in *E. coli* ER2566 Zellen hatte das Ziel aktives Protein zu erzeugen und nach Expression und Zellaufschluss aus den Zellen mittels IMAC zu isolieren. Einer gut angewachsenen Hauptkultur wurde dazu IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt, um die Expression der *RsTAL* Proteine zu induzieren (3.3.1.). Nach Expression und Aufreinigung (3.3.6.) der Enzyme wurden die Fraktionen, welche den Hauptanteil aufgereinigten TAL-Proteins enthielten, zur *in vitro* Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Das Molekulargewicht der exprimierten und aufgereinigten Proteine stimmte mit dem zuvor berechneten für TAL-Proteine überein und betrug etwa 55 kDa (Angabe der Masse in-

klusive His-Tag, berechnet mit CloneManager). Es stellte sich heraus, dass sich die isolierbaren Proteinmengen vergleichbarer Kulturen bei unterschiedlichen Temperaturen variierten. Bei 16 °C wurden bis zu 1,0 µg/µl aufgereinigt, unter identischen Bedingungen lieferte die Isolierung von TAL-Proteinen aus bei 37 °C kultivierten Zellen maximal 0,1 µg/µl Protein (Zusammenarbeit mit B. Gilleßen). Daher wurde in diesem Fall zur Gewinnung grösserer Proteinmengen bei 16 °C kultiviert. Für sich anschliessende Aktivitätstests war diese Temperatur allerdings ungeeignet.

Die *in vitro* Aktivitätsbestimmung der genetisch veränderten RsTAL lieferten einen K_m -Wert für das Substrat von 120 µM, während der K_{kat} -Wert zu $5,2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ bestimmt wurde. Diese Messungen wurden in Kooperation mit B. Gilleßen (2009) vorgenommen. Untersuchungen der Tyrosin Ammoniak-Lyase aus *Rhodobacter sphaeroides* sind in der Literatur bereits beschrieben (Watts et al., 2004; Watts et al., 2006b). In diesen Arbeiten setzte Wildtyp RsTAL effizient L-Tyrosin zu p-Cumarat *in vitro* um. Der niedrige K_m -Wert von $31,4 \pm 3,3 \text{ µM}$ (Watts et al., 2006b) spiegelt die hohe Affinität zu Tyrosin wieder. Da aber keine eindeutigen Daten bezüglich der K_m -Werte für dieses Protein aus *Rhodobacter sphaeroides* in der Literatur zu finden sind - andere Angaben gemessener K_m -Werte für Wildtyp RsTAL schwanken sehr stark und liegen zwischen $301 \pm 48 \text{ µM}$ (Schroeder et al., 2008), 60 µM (Xue et al., 2007) und $31,4 \pm 3,3 \text{ µM}$ (Watts et al., 2006b) - ist es schwierig die gemessenen Werte einzuordnen. Die gemessenen Werte liegen im Bereich der Daten in der Literatur.

4.1.3. Produktion von p-Cumarat in transgenen *E. coli* Zellen

Basierend auf Untersuchungen von Diaz (2001) konnte vorausgesetzt werden, dass aromatische Verbindungen effektiv aus *E. coli* ausgeschleust und nicht abgebaut werden. Auch aus früheren Arbeiten von Watts (2004) ging hervor, dass aromatische Verbindungen, die den Flavonoiden zuzuordnen sind, zu 95 % aus *E. coli* ins Medium sekretiert werden. Vor diesem Hintergrund wurde erwartet, dass bei funktionaler Expression der RsTAL zugefüttertes Tyrosin aufgenommen, in der Zelle zu p-Cumarat desaminiert und das Produkt aus der Zelle ins Medium geschleust wird.

Zur Analyse der *in vivo* Aktivität wurden mit pETDuet-RsTAL transformierte *E. coli* BL21 Zellen in M9-Medium kultiviert. Nach Induktion der Expression wurde Tyrosin zu 1 mM hinzugegeben. Die induzierten Zellen wurden weiter bei 37 °C inkubiert und der zellfreie

Überstand wurde durch HPLC-Analyse (3.4.4.) untersucht. Dabei konnte im Medium eine Substanz detektiert werden, die mit einer Retentionszeit von etwa 17,0 Minuten mehr als 90 % der Peakfläche des Chromatogramms einnimmt (Abb. 4.1). Zusätzlich tauchten weitere sehr schwache Signale nach 2,0, 4,5, 11,0 und 14,5 Minuten auf, die nicht identifiziert werden konnten. Tyrosin als eingesetztes Substrat absorbiert nicht bei einer Wellenlänge von 275 nm, daher konnte dem Substrat der TAL-vermittelten Umsetzung kein Signal im HPLC-Chromatogramm zugeordnet werden. Die HPLC-Analyse eines authentischen p-Cumaratstandards (Einsatz) lieferte eine Retentionszeit von 17,0 Minuten unter identischen Bedingungen. Das Hauptsignal im Chromatogramm konnte aufgrund identischer Retentionszeit als p-Cumarat identifiziert werden.

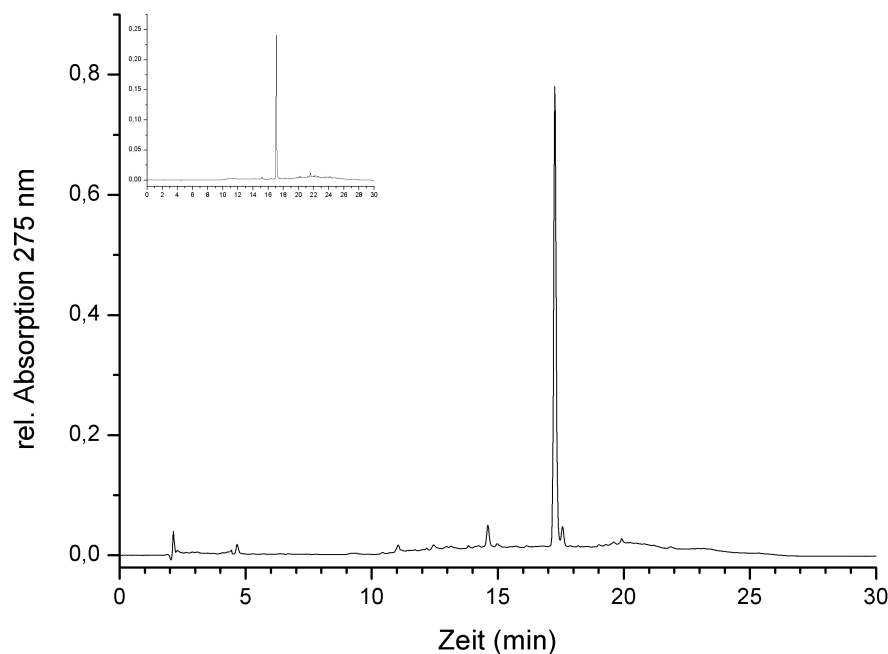


Abb. 4.1: HPLC-Analyse *RsTAL* exprimierender *E. coli* Zellen. *RsTAL* exprimierende *E. coli* Zellen wurden in M9-Medium kultiviert, die Proteinexpression der *RsTAL* wurde bei einer OD_{600} von 0,5 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde 1 mM Tyrosin zugefügt, weitere 2 h später wurde der Kulturüberstand mittels HPLC bei 275 nm analysiert. Der Einsatz gibt ein entsprechendes Chromatogramm für einen p-Cumaratstandard an.

Bei Verwendung von komplexem LB-Medium führte die Kultivierung TAL exprimierender Zellen unter identischen Kultivierungsbedingungen ebenfalls zu einer Akkumulation von p-Cumarat, auch wenn kein zusätzliches Tyrosin gefüttert wurde (nicht dargestellt). Das Komplexmedium scheint folglich in ausreichender Menge Tyrosin zu enthalten. Dieses wird scheinbar in die Zelle aufgenommen und TAL-vermittelt zu p-Cumarat desaminiert. Die Iden-

tifikation des Reaktionsproduktes erfolgte durch vergleichende HPLC-Analyse des Kulturüberstandes mit einem p-Cumaratstandard. Die TAL war somit das erste Enzym, das in aktiver Form innerhalb der Zelle exprimiert werden konnte.

4.2. Aktivierung aromatischer Säuren

4.2.1. Klonierung der 4-Cumarat:CoA Reduktase aus *Petroselinum crispum*

Das zweite Enzym der in *E. coli* zu etablierenden Enzymkaskade stellt die 4-Cumarat-CoA Ligase aus *Petroselinum crispum* (Pc4CL) dar. Das zuvor durch Desaminierung von Tyrosin entstandene p-Cumarat sollte in *E. coli* durch die Aktivität dieser CoA-Ligase in einen aktivierten Thioester überführt werden.

Dazu wurde der offene Leserahmen dieses Enzyms mittels PCR (3.2.1.) vervielfältigt, um das PCR-Fragment in den pETDuet-1 Vektor zu integrieren. Zur Amplifikation des Pc4CL ORF diente ein pUC9 Vektor mit integrierter 4-Cumarat-CoA Ligase aus *Petroselinum crispum* als Matrize. Dieser pUC9 Vektor wurde aus dem Plasmidstock von Herrn Professor Uwe Conrath (RWTH-Aachen, Institut für Pflanzenphysiologie) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Nach erfolgreicher PCR und Isolierung der gewünschten Fragmente wurde das mit *Bgl*II und *Xho*I restringierte Fragment mit einer Größe von 1639 bp sowohl in die erste als auch in die zweite MCS des pETDuet-1 Vektors integriert. Die Klonierung in die erste MCS erfolgte mittels *Bam*HI und *Sal*I, um rekombinant 4CL-Proteine zu erzeugen und diese über den C-terminal assoziierten His-Tag im Zuge einer IMAC (3.3.6.) aufzureinigen. Die Klonierung in die zweite MCS erfolgte über *Bgl*II und *Xho*I und diente dazu, die Pc4CL später mit der TAL auf einem Vektor zu kombinieren. Die Plasmidkarten der beiden pETDuet-Pc4CL Konstrukte sind im Anhang (8.3.) aufgeführt.

Das pETDuet-Pc4CL (MCSI) Konstrukt wurde zur Transformation von *E. coli* DH5 α verwendet. Positive Klone wurden mit den unter 2.3. aufgeführten Primern zur Sequenzanalyse abgegeben. Durch Vergleich mit der Sequenz, die bei NCBI für diesen ORF (Pc4CL, X13324) eingetragen ist, konnte festgestellt werden, dass bei den drei näher untersuchten sonst isogenen Klonen an Position 125 und 1558 Punktmutationen auftauchten (A $\rightarrow$ G), die zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen. Die Mutation an Position 125 führt dazu, dass Lysin statt Arginin in das Protein eingebaut wird. Die Mutation an Position 1558 ruft einen Wechsel von Isoleucin zu Valin hervor. Die genannten Mutationen tauchten bei fast

allen untersuchten Klonen auf. Es wurde trotz dieser Mutationen mit der DNA dieser drei isogenen Klone weitergearbeitet. Möglicherweise waren diese Mutationen schon in der Template DNA vorhanden. Die Wiederholung dieser Versuche bestätigte, dass die Template DNA die gleichen Mutationen zeigte.

4.2.2. Expression und Aufreinigung der *Pc4CL*

E. coli BL21 Zellen wurden mit dem pETDuet-*Pc4CL* (MCSI) Konstrukt transformiert. Zur Expression wurden die transgenen *E. coli* BL21 Zellen in 2 l LB-Medium kultiviert und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 zur Proteinexpression induziert. Nach weiteren 3 h des Wachstums unter identischen Bedingungen wurden die Zellen zentrifugiert und aufgeschlossen (3.3.5.). Der proteinhaltige Zellüberstand wurde zur Isolation der rekombinanten *Pc4CL* Proteine über eine Ni²⁺-NTA Matrix (3.3.6.) aufgetrennt. Lysat, Durchfluss, Wasch- und Elutionsfraktionen wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE (3.3.3.) analysiert, parallel dazu erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradfordreagenz.

Die aus pETDuet-*Pc4CL* (MCSI) exprimierten *Pc4CL* Proteine hatten ein Molekulargewicht von 62 kDa. Das Protein besteht aus 565 Aminosäuren (Angaben der Masse inklusive Überhänge und C-terminalem His-Tag, berechnet mit CloneManager). Im Zelllysat waren erwartungsgemäß viele Proteine unterschiedlicher Größe zu detektieren (Abb. 4.2). Zwischen der 70 kDa und der 55 kDa Bande des Proteinmarkers war in allen Proben eine deutlicher hervortretende Proteinbande zu bemerken. Das Waschen der Säulenmatrix und der daran gebundenen Proteine mit Waschpuffer bewirkte, dass mit steigenden Waschzyklen (Spur 4, 5, 6) ein Großteil der unspezifisch gebundenen Proteine ausgewaschen werden konnte, erkennbar an der schwächer werdenden Intensität der übrigen Proteinbanden. Allerdings ist auch zu erkennen, dass die rekombinanten Proteine mit einer Größe von 62 kDa zwar an der Ni²⁺-NTA-Matrix binden, zum Teil aber auch bei Verwendung des imidazolhaltigen Waschpuffers von der Matrix eluiert werden. Eine andere Erklärung hierfür könnte die Überladung der Säulenmatrix sein. Eluat 2 enthielt mit 4 µg/µl Protein den größten Anteil aufgereinigter *Pc4CL*. Neben dieser Hauptproteinbande sind auch weitere Proteinbanden zu erkennen, so dass die angegebene Konzentration nicht ausschließlich durch reines *Pc4CL* Protein erreicht wurde. Diese Fraktion (Eluat 2) wurde für weitere Aktivitätsanalysen verwendet. Damit konnte eine erfolgreiche Expression und Aufreinigung der exprimierten *Pc4CL* Enzyme dokumentiert werden, es wurde jedoch keine reine Isolation des exprimierten Proteins erreicht.

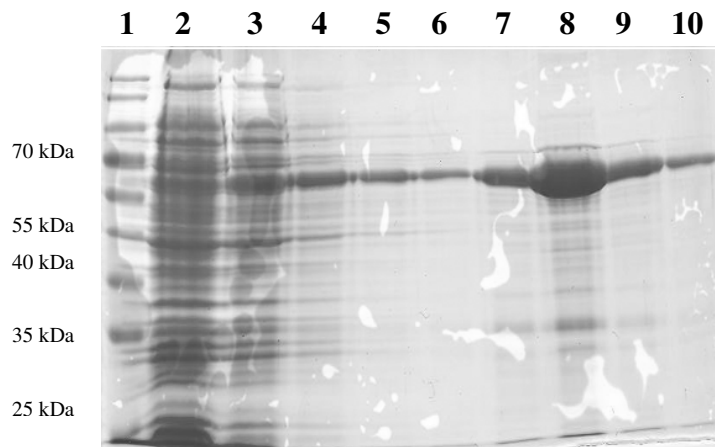


Abb. 4.2: Gelelektrophoretische Auftrennung von *Pc4CL*. Alle Fraktionen wurden in einem 12 % PAA-Gel aufgetrennt. Aufgetragen sind Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen nach Zellaufschluss und Aufreinigung über IMAC. Es wurden jeweils 20 µl der erhaltenen Fraktionen mit 5 µl 5 x Lämmli-puffer vermischt und nach Aufkochen 20 µl davon in die Taschen des Gels pipettiert. Spur 1, 5 µl Prestained Protein Marker; Spur 2, Lysat; Spur 3, Durchfluss; Spur 4-6, Waschfraktion 1-3; Spur 7-10, Elutionsfraktionen 1-4.

4.2.3. *In vitro* Aktivitätsanalyse rekombinanter *Pc4CL*

Die Aktivitätsbestimmung der zuvor aufgereinigten rekombinanten *Pc4CL* Enzyme wurde wie von Knobloch beschrieben durchgeführt (Knobloch and Hahlbrock, 1975; Knobloch, 1976; Knobloch and Hahlbrock, 1977). Neben der in p-Stellung hydroxylierten p-Cumarsäure wurden auch Derivate untersucht, die entweder in m- oder o-Stellung hydroxyliert oder zusätzlich neben der genannten Hydroxygruppe mit einer oder zwei weiteren Methoxygruppen substituiert waren. Ergebnis dieser Studien war, dass die *Pc4CL* ein sehr breites Substratspektrum besitzt und viele der Hydroxyzimtsäurederivate zu entsprechenden Thioestern umsetzt, p-Cumarat allerdings als Substrat bevorzugt (Knobloch and Hahlbrock, 1977). Um diese Untersuchungen zu verifizieren und auszuweiten, sollte die Aktivität von in *E. coli* hergestellter *Pc4CL* *in vitro* unter identischen Bedingungen untersucht werden. Als Substrate für den *in vitro* Aktivitätstest sollten p-Cumarsäure aber auch p-Aminozimtsäure, ein in p-Stellung aminosubstituiertes Derivat der Cumarsäure, verwendet werden. Dieses für die *Pc4CL* unnatürliche Substrat in einem Aktivitätstest zu verwenden, sollte dazu dienen, die Affinität dieses Enzyms zu einem Substrat zu analysieren, das in p-Stellung des aromatischen Rings keine Hydroxygruppe, sondern eine Aminogruppe besitzt. Eine aminosubstituierte Säure durch enzymatische Reaktion zu einem aminosubstituierten Thioester umzusetzen, wurde zwar in der Arbeit von Gilleßen (2009) kurz erwähnt, jedoch nicht weiter beschrieben, da dies in der hier

vorliegenden Arbeit behandelt wurde. Auf die Analyse weiterer Substrate wurde an dieser Stelle verzichtet, da dies schon ausführlich in der Literatur beschrieben ist.

Für die gereinigten *Pc4CL*-Proteine konnte zunächst unter Verwendung eines 0,1 M Tris/HCl Puffer Systems keine Aktivität detektiert werden. Um den His-Tag der rekombinanten Proteine als Ursache für den Aktivitätsverlust auszuschließen, wurde der Enzymtest zur Kontrolle mit nativer 4-Cumarat:CoA Ligase unter identischen Bedingungen aus einer Zellkultur von *Petroselinum crispum* durchgeführt. Eine Suspensionskultur wurde von Herrn Professor Uwe Conrath (RWTH-Aachen, Institut für Pflanzenphysiologie) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Nach Zellaufschluss und sich anschließender fraktionierter Ammoniumsulfatfällung konnte native 4-Cumarat:CoA Ligase aus der Suspensionskultur angereichert werden (3.3.6.). Erst die Verwendung eines Kaliumphosphatpuffersystems anstelle eines Tris-Puffersystems führte zu einer messbaren Aktivität der nativen *Pc4CL* Proteine. In den Arbeiten von Knobloch (Knobloch and Hahlbrock, 1977) wurden sowohl Kaliumphosphatpuffer als auch Tris-HCl Puffer innerhalb der enzymatischen Tests eingesetzt, mit beiden Puffersystemen wurden messbare Aktivitäten gemessen. Das Kaliumphosphatpuffersystem wurde anschließend bei der *in vitro* Aktivitätsanalyse rekombinanter *Pc4CL* berücksichtigt und zur Messung eingesetzt. Es wurden 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml und 20 µg/ml aufgereinigter *Pc4CL* für die Aktivitätstests verwendet. Als Substrat wurde 100 µM p-Cumarat (Abb. 4.3a) und 100 µM p-Aminozimtsäure (Abb. 4.3b) eingesetzt. Durch photometrische Messungen wurde die Änderung der Absorption als Maß der Bildung des entstehenden Thioesters im UV/VIS-Reader bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt. Aus den früheren Arbeiten von Knobloch war bekannt, dass p-Cumaryl-CoA - das Reaktionsprodukt der enzymatischen Umsetzung von p-Cumarat durch die 4-Cumarat:CoA Ligase - bei 333 nm eines von zwei Absorptionsmaxima besitzt. Aus technischen Gründen wurde im UV/VIS-Reader bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Die leichte Verschiebung in den länger welligen Bereich sollte keinen erheblichen Einfluss auf die Absorptionsänderung haben. Auch die enzymatische Umsetzung von p-Aminozimtsäure durch die 4-Cumarat:CoA Reduktase wurde bei 340 nm analysiert. Da es bezüglich des Absorptionsspektrums für das möglicherweise entstehende p-Aminocinnamyl-CoA keine Literaturquellen gab, wurde bei derselben Wellenlänge gemessen.

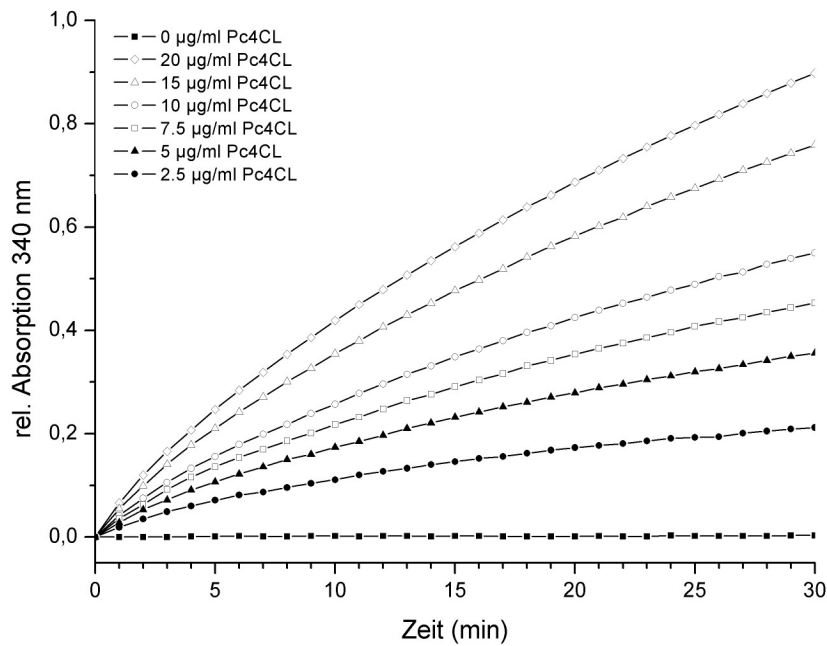
Die Umsetzung des p-Cumarats begann direkt nach Zugabe des Proteins. Zum Vergleich wurde ein weiterer Versuchsansatz ohne Protein unter identischen Bedingungen analysiert, um zu prüfen, ob die Änderung der Absorption durch die Aktivität des zugefügten Enzyms

hervorgerufen wird. Wie erwartet zeigte sich in diesem negativen Kontrollansatz keine Absorptionsänderung. Hingegen führte eine Erhöhung der eingesetzten Proteinmengen zu einer schnelleren Änderung der Absorption, allerdings konnte keine Linearität zwischen der Absorptionsänderung und der eingesetzten Proteinmenge festgestellt werden. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden mehrfach *Pc4CL* Proteine aus erneut kultivierten Zellen isoliert und unter identischen Bedingungen in vergleichbaren Aktivitätstest analysiert (nicht dargestellt). Die Ergebnisse dieser wiederholten Experimente waren nahezu vergleichbar, so dass von einer gut detektierbaren Aktivität der isolierten Enzyme ausgegangen werden konnte. Den einzelnen Graphen der photometrischen Aktivitätsmessung in Abb. 4.3a/b ist zu entnehmen, dass nach 30 Minuten Reaktionszeit noch keine Sättigung erreicht wurde.

Auch p-Aminozimtsäure scheint ebenfalls durch die *Pc4CL* umgesetzt zu werden, was anhand der Absorptionsänderung im Verlauf des Aktivitätstest deutlich zu erkennen ist. Auch hier ist zu bemerken, dass ohne Protein keine Aktivität zu verzeichnen war. Die Absorptionsänderung, die in diesen Experimenten als Indiz für eine enzymatische Umsetzung gewertet wurde, entspricht in absoluten Absorptionseinheiten zwar nicht der p-Cumaratumsatzung, aber die aufgezeichneten Daten weisen deutlich auf eine Bildung eines Produktes infolge einer enzymatischen Umsetzung des eingesetzten Substrates hin. Als Ursache der im Vergleich zur p-Cumaratumsatzung geringeren Absorptionsänderung könnte ein gegen p-Cumaryl-CoA verschobenes Absorptionsmaximum des möglicherweise entstehenden p-Aminocinnamyl-CoAs gesehen werden. Diese Vermutung sollte in weiterführenden Experimenten näher untersucht werden, die eine enzymatische Herstellung und eine sich anschließende Analyse der Absorptionsspektren entsprechender Thioester zum Ziel hatten (4.2.4).

Auf die Erstellung reaktionskinetischer Daten wurde an dieser Stelle verzichtet, da diesbezüglich ausführliche Studien in den 80er Jahren für p-Cumarat unternommen wurden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl p-Cumarat als auch p-Aminozimtsäure durch das in *E. coli* exprimierte, aufgereinigte Protein (*Pc4CL*) zum Thioester aktiviert werden. Das Enzym scheint nicht zu differenzieren, ob die Säure in p-Stellung des aromatischen Ringes mit einer Hydroxylgruppe oder einer Aminogruppe substituiert ist.

a



b

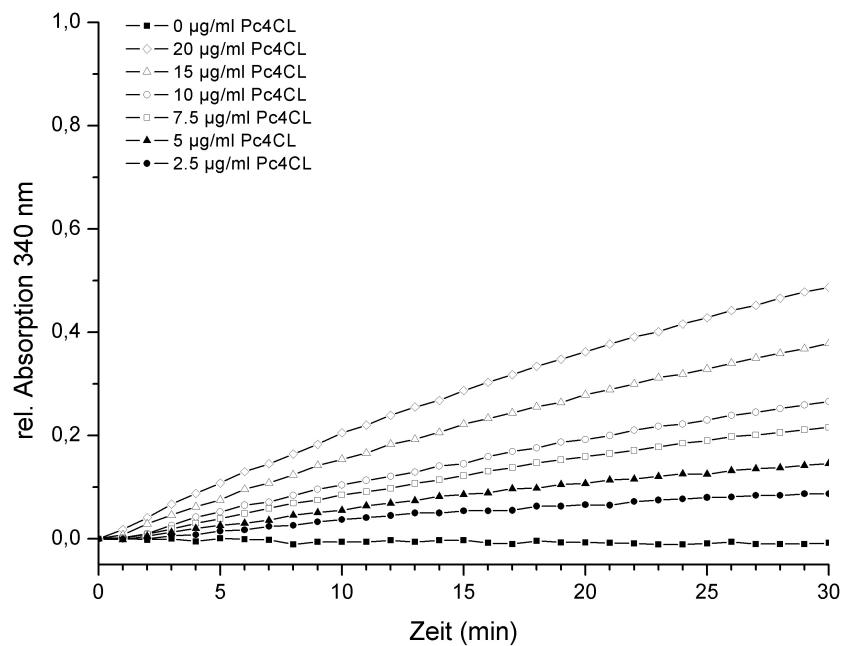


Abb. 4.3: Aktivitätsmessung aufgereinigter Pc4CL. Eingesetzt wurden 100 µM p-Cumarat (a) und 100 µM p-Aminozimtsäure (b). Es wurden unterschiedliche Mengen aufgereinigten Proteins eingesetzt (2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml und 20 µg/ml). Als Maß der Aktivität wurde die Änderung der Absorption bei 340 nm photometrisch im UV/VIS Spektrophotometer beobachtet.

4.2.4. *In vitro* Produktion aktivierter Phenylpropanoid-Thioester

Das dritte Enzym des künstlich zu erstellenden Biosyntheseweges stellt die Cinnamoyl-CoA Reduktase aus *Zea mays* (*ZmCCR*) dar. In der von diesem Enzym katalysierten Reaktion wird der Thioester abgespalten und die zuvor aktivierte Säuregruppe dabei zu einer Aldehydgruppe umfunktioniert. Die Bestimmung der *in vitro* Aktivität dieses Enzyms basiert allerdings auf der Verfügbarkeit der aktivierten Thioester, die als Substrate für dieses Enzym eingesetzt werden. Da sowohl p-Cumaryl-CoA als auch p-Aminocinnamyl-CoA kommerziell nicht zu erwerben waren, mussten diese Substanzen unter Zuhilfenahme der zuvor rekombinant exprimierten *Pc4CL* enzymatisch aus den entsprechenden Säuren hergestellt werden. Wie zuvor gezeigt (4.2.3) wird p-Cumarsäure, aber auch p-Aminozimtsäure durch die *Pc4CL* scheinbar erfolgreich zu den Thioestern aktiviert. Die Herstellung von p-Cumaryl-CoA und von p-Aminocinnamyl-CoA sollte zum einen dazu dienen, von diesen zum Teil neuen Substanzen Absorptionsspektren zu erstellen. Zum anderen sollte untersucht werden, ob später auch p-Aminocinnamyl-CoA durch die Aktivität einer rekombinant erzeugten *ZmCCR* zu einem entsprechenden Aldehyd konvertiert wird (Gilleßen, 2009). Unter Zugabe der für diese enzymatischen Umsetzungsreaktionen benötigten Reagenzien (3.3.10.) wurde versucht, die genannten Thioester herzustellen. Die Aufreinigung der bei den *in vitro* Reaktionen entstehenden Thioester erfolgte unter Verwendung von SPE-Säulen (3.4.2.). Bekannte Festphasenextraktionsverfahren zur Isolation von aromatischen CoenzymA Estern (Beuerle and Pichersky, 2002) wurden genutzt, um die enzymatisch hergestellten Thioester zu isolieren. Die an der Säulenmatrix gebundenen Thioester wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ eluiert. Im Anschluss daran wurden von den einzelnen Eluaten Absorptionsspektren zwischen 200 nm und 400 nm aufgenommen. Exemplarisch sind von den Eluaten 7, 13 und 15 der p-Cumaratumsatzung und von den Eluaten 6, 9 und 12 der p-Aminozimtsäureumsatzung Absorptionsspektren dargestellt, um daraus die Absorptionsmaxima der beiden synthetisierten Substanzen abzuleiten. Diese Untersuchungen haben ergeben, dass die hergestellten Thioester jeweils zwei Absorptionsmaxima besitzen. p-Cumaryl-CoA absorbiert maximal bei 262 nm und 333 nm (Abb. 4.4a) - wie in der Literatur beschrieben - während p-Aminocinnamyl-CoA bei 256 nm und 362 nm maximale Absorption aufweist (Abb. 4.4b). Dies könnte die geringere Absorptionsänderung während der Aktivitätsmessung für p-Aminozimtsäure bei 340 nm erklären (4.2.3). Deutlich anhand der Abb. 4.4b ist zu erkennen, dass diese Substanz bei 340 nm nicht maximal absorbiert. Den Spektren der beiden Substanzen ist zu entnehmen, dass die Absorption unterhalb von 225 nm steil ansteigt. Dies ist wahrscheinlich auf eine starke Eigenabsorption im kurzwelligen UV-Bereich zurückzuführen.

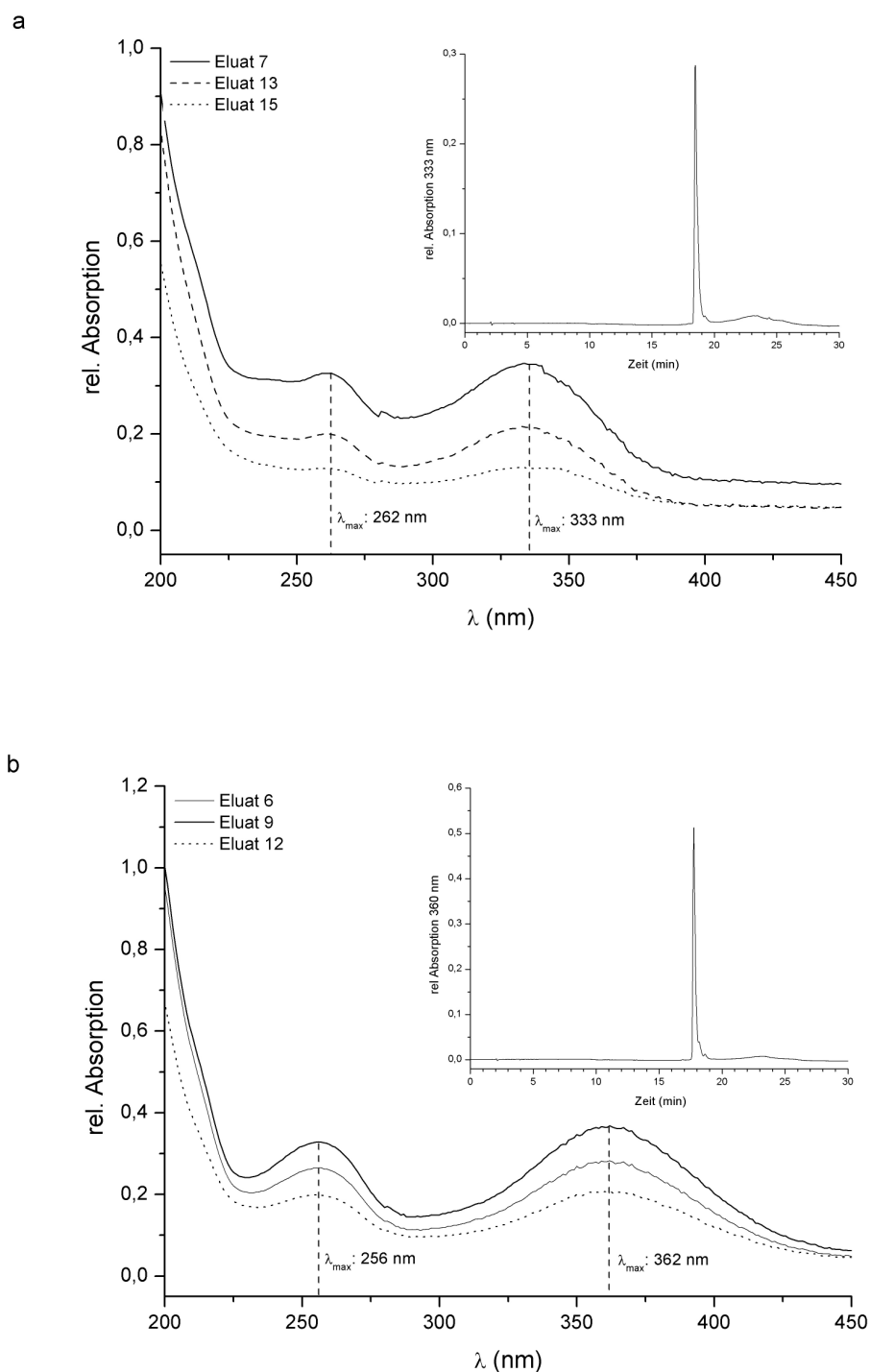


Abb. 4.4: Absorptionsspektren enzymatisch generierter Thioester. Die Spektren wurden zwischen 200 nm und 400 nm aufgenommen. (a) Spektrum von aufgereinigten p-Cumaryl-CoA Eluaten 7, 13, 15 aus Versuch 4.2.4.; (b) Spektrum von aufgereinigten p-Aminocinnamyl-CoA Eluaten 6, 9, 12 aus Versuch 4.2.4.; Die Chromatogramme zeigen die Retentionszeiten von enzymatisch hergestelltem p-Cumaryl-CoA und p-Aminocinnamyl-CoA, gemessen wurde beim jeweiligen Absorptionsmaximum der untersuchten Substanz.

Nachdem exemplarisch von verschiedenen wässrigen Eluaten Absorptionsspektren aufgenommen werden konnten, wurden jeweils alle Eluate vereinigt und lyophilisiert, um überschüssiges Wasser schonend zu eliminieren und das Reaktionsprodukt zu konzentrieren. Die Lyophilisate wurden erneut in 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgenommen. Basierend auf einem molaren Extinktionskoeffizienten für p-Cumaryl-CoA von $\varepsilon_{333} = 23 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ (Knobloch, 1976) ließ sich eine Konzentration von 1,15 mM in der analysierten Probe annähernd bestimmen. Da für p-Aminocinnamyl-CoA kein molarer Extinktionskoeffizient bekannt war, errechnete sich für diesen Thioester unter Verwendung desselben molaren Extinktionskoeffizienten eine ungefähre Konzentration von 1,75 mM. Um die Reinheit der Reaktionsprodukte zu prüfen, wurden geeignet verdünnte Proben der Lyophilisate bei den zuvor ermittelten Absorptionsmaxima mittels HPLC (3.4.4.) analysiert. p-Cumaryl-CoA wurde bei 333 nm, p-Aminocinnamyl-CoA bei 360 nm gemessen. Die Retentionszeit von p-Cumaryl-CoA liegt unter diesen Messbedingungen bei 18,5 min, während die Retentionszeit von p-Aminocinnamyl-CoA 18,0 min beträgt (Abb. 4.4a/b). Die Spektren und HPLC-Diagramme in Abbildung 4.4 weisen auf eine hohe Reinheit der hergestellten Thioester bei diesen Wellenlängen hin. Die Analyse der Lyophilisate mittels HPLC zeigte, dass bei Messung am Absorptionsmaximum der Substanz lediglich jeweils eine Verbindung detektiert werden konnte.

Um die erfolgreiche Herstellung von p-Cumaryl-CoA und p-Aminocinnamyl-CoA abschließend zu verifizieren, wurden von den einzelnen Lyophilisaten massenspektrometrische Untersuchungen vorgenommen. Die aus den massenspektrometrischen Analysen erhaltenen Daten (Abb. 4.5) geben die Molekulargewichte der analysierten Substanzen wieder. In den Massenspektren tauchten die Signale der untersuchten Thioester als H^+ - und Na^+ -Addukte auf. Die Bildung von Na^+ -Addukten wird durch Lösungsmittelbestandteile hervorgerufen. Für p-Cumaryl-CoA + H^+ bzw. p-Cumaryl-CoA + Na^+ ergaben sich Molekulargewichte von 914 g/mol bzw. 936 g/mol, p-Aminocinnamyl-CoA + H^+ und p-Aminocinnamyl-CoA + Na^+ hatten der MS-Analyse zufolge Molekulargewichte von 913 g/mol und 935 g/mol. Zusätzlich zu den genannten Hauptsignalen tauchten weitere Signale auf. Infolge der hohen Energie des Elektronenstrahls, der während der MS-Analyse auf die injizierten Substanzen einwirkt, können die untersuchten Stoffe weiter fragmentieren, so dass Bruchstücke unterschiedlicher Größe entstehen, die nicht ohne Weiteres zu identifizieren sind. Anhand der Verteilung der relativen Häufigkeiten in Abbildung 4.5 kann man absehen, dass die synthetisierten Thioester hauptsächlich als H^+ -Addukte in der untersuchten Probe nachgewiesen werden konnten, in deutlich geringerem Maße wurden Na^+ -Addukte der Thioester detektiert. Hiermit konnte zweifelsfrei bewiesen werden, dass p-Cumaryl-CoA aus p-Cumarat und p-Aminocinnamyl-

CoA aus p-Aminozimtsäure unter Verwendung von rekombinant erzeugten *Pc4CL* Protein enzymatisch hergestellt werden konnten.

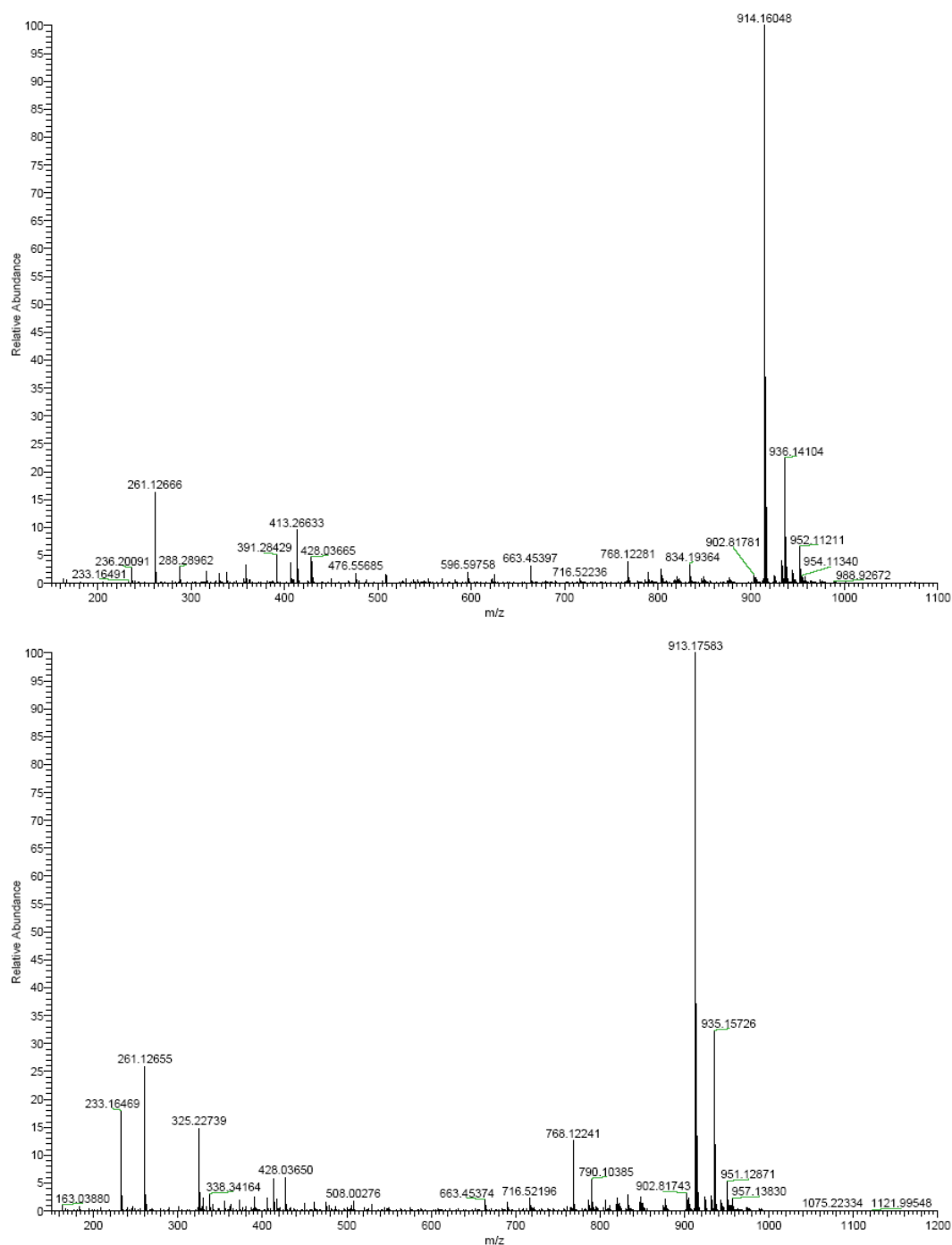


Abb. 4.5: FT-MS/ESI-MS Spektren synthetisierter Phenylpropanoid-Thioester. (a) p-Cumaryl-CoA [m/z: 914.15 (M+H)⁺ und 936.13 (M+Na)⁺] und (b) p-Aminocinnamyl-CoA [m/z: 913.17 (M+H)⁺ und 935.16 (M+Na)⁺]. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) gegen die relative Häufigkeit.

Summenformeln und m/z-Verhältnisse der detektierten Addukte sind in Tabelle 4.1 wiedergegeben.

Tab. 4.1: Formale und physikalische Parameter der Thioester

Substanz	Summenformel	m/z
p-Cumaryl-CoA + H ⁺	C ₃₀ H ₄₂ N ₇ O ₁₈ P ₃ S + H ⁺	914,67
p-Cumaryl-CoA + Na ⁺	C ₃₀ H ₄₂ N ₇ O ₁₈ P ₃ S + Na ⁺	936,67
p-Aminocinnamyl-CoA + H ⁺	C ₃₀ H ₄₃ N ₈ O ₁₇ P ₃ S + H ⁺	913,68
p-Aminocinnamyl-CoA + Na ⁺	C ₃₀ H ₄₃ N ₈ O ₁₇ P ₃ S + Na ⁺	935,68

4.2.5. Gekoppelter *in vitro* Aktivitätstest mit *R*sTAL und *P*c4CL

Es konnte gezeigt werden, dass aufgereinigte *P*c4CL Proteine *in vitro* aktiv sind und in p-Stellung hydroxylierte sowie aminosubstituierte Derivate der Zimtsäure zu aktivierten Thioestern umsetzen. Der Aufbau des intrazellulären Biosyntheseweges zur Produktion aromatischer Alkohole setzt voraus, dass die am Syntheseweg beteiligten Enzyme in der Zelle unter den dort gegebenen Bedingungen ebenfalls aktiv sind. Für die *R*sTAL konnte dies *in vivo* bereits bestätigt werden (4.1.4.), das Produkt der TAL-Umsetzung konnte im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Eine *in vivo* Aktivitätsanalyse der in *E. coli* exprimierten 4CL war an dieser Stelle nicht sinnvoll, da intrazelluläre Thioesterasen eine Akkumulation von aromatischen CoA Estern und damit auch von p-Cumaryl-CoA verhindern (Beuerle and Pichersky, 2002; Watts et al., 2004). Deshalb wurden Versuche unternommen die Aktivitäten rekombinant exprimierter und aufgereinigter *R*sTAL und *P*c4CL *in vitro* miteinander zu koppeln. Dazu wurden *E. coli* BL21 Zellen mit pETDuet-*R*sTAL und pETDuet-*P*c4CL transformiert und die Proteinexpression durch IPTG Zugabe induziert. Die Gewinnung rekombinanter *R*sTAL und *P*c4CL erfolgte nach Zellaufschluss (3.3.5.) durch Proteinisolation mittels Ni²⁺-NTA (3.3.6.). Die Aktivität beider miteinander kombinierter Enzyme wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen, diese Wellenlänge liegt sehr nah am zuvor bestimmten Absorptionsmaximum des p-Cumaryl-CoAs. Dazu wurde Tyrosin zu 0 µM, 50 µM, 250 µM und 1000 µM eingesetzt, die Mengen an Protein betrugen 15 µg/ml 4CL und 20 µg/ml TAL. Die Messungen wurden abweichend von den für die einzelnen Enzyme geeigneten Pufferbedingungen in einem 100 mM Tris/HCl-Puffer durchgeführt. Das für den gekoppelten Aktivitätstest benötigte Tyrosin absorbiert nur geringfügig bei 340 nm und auch p-Cumarat, das erste Zwischenprodukt der Enzymkette, zeigt bei dieser Wellenlänge kaum Absorption. Die Erfas-

sung der Enzymaktivität bei 340 nm basiert fast ausschließlich auf der Absorption des bei der Reaktion entstehenden p-Cumaryl-CoA, welches als Endprodukt nur gebildet wird, wenn beide Enzyme in ihrer aktiven Form vorhanden sind. Dabei liefert die TAL das Edukt für die nachfolgende enzymatische Umsetzung durch die 4CL. Abbildung 4.6 gibt den Verlauf der p-Cumaryl-CoA Bildung infolge der *in vitro* Nutzung der beiden genannten Proteine wider.

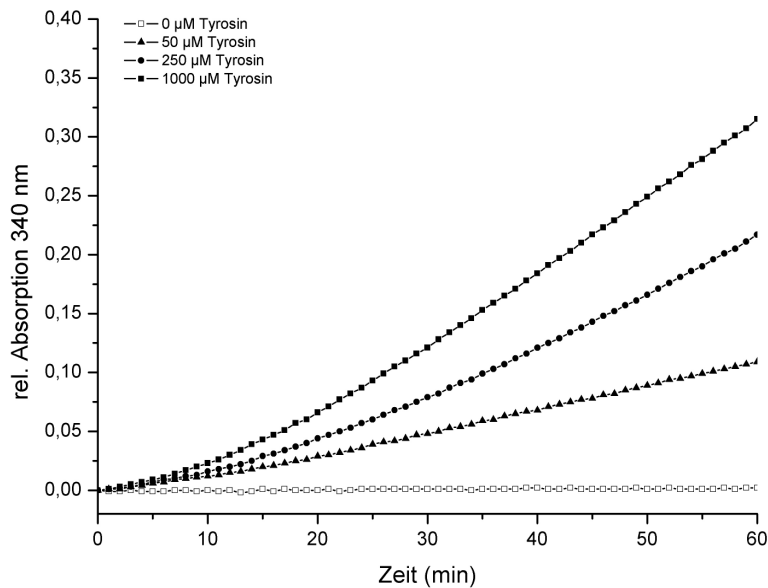


Abb. 4.6: Gekoppelter Aktivitätstest mit *RsTAL* / *Pc4CL*. In diesem Versuchsansatz wurden *RsTAL* (20 µg/ml) und *Pc4CL* (15 µg/ml) in einem gekoppelten Aktivitätstest miteinander kombiniert. Als Substrat wurde Tyrosin zu 50 µM, 250 µM und 1000 µM eingesetzt. Die Detektion der Absorptionsänderung als Folge der Aktivität beider Enzyme erfolgte photometrisch bei 340 nm.

Beim Vergleich der Kurvenverläufe fällt auf, dass bei Zugabe von 50 µM Tyrosin sich die Absorption nur sehr langsam änderte, innerhalb der gemessenen 60 Minuten blieb die Änderung der Absorption nahezu konstant. Die Reaktion war nach einer Stunde noch nicht beendet, die Steigung der Absorptionsänderung blieb weiter linear. Wurde Tyrosin in einer Konzentration von 250 µM eingesetzt, war erwartungsgemäß eine schnellere Änderung der Absorption innerhalb der ersten 20 Minuten im Vergleich zur 50 µM Tyrosinkonzentration festzustellen. Der Verlauf der Absorptionsänderung war anfangs leicht exponentiell, nach etwa 25 Minuten blieb auch hier die Absorptionsänderung stetig ansteigend. Bei Zugabe von Tyrosin zu 1000 µM konnte ein ähnlicher Reaktionsverlauf beobachtet werden. Der zu Beginn leicht exponentielle Reaktionsverlauf knickt nach etwa 25 Minuten ins Lineare ab. Allgemein konnte konstatiert werden, dass eine Erhöhung der Tyrosinkonzentration eine schnellere Absorpti-

onsänderung innerhalb der ersten 20 Minuten zur Folge hatte, nach 25 Minuten konnte ein lineares Verhältnis zwischen der Änderung der Absorption und der Reaktionszeit beobachtet werden. Diese Ergebnisse lieferten erste Hinweise dafür, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieses gekoppelten Aktivitätstests die Desaminierung von Tyrosin darstellt. Durch die *RsTAL* wird erst das Substrat für die *Pc4CL* bereit gestellt. Der Negativkontrolle wurde kein Tyrosin zugesetzt, um zu zeigen dass nur bei Zugabe von Tyrosin das detektierbare Reaktionsprodukt generiert wird.

Die *Pc4CL*-Enzyme setzen, wie in früheren Versuchen gezeigt werden konnte, sowohl p-Cumarsäure, aber auch p-Aminozimtsäure zum aminosubstituierten Thioester um (4.2.3.). Auf diesen Untersuchungen aufbauend sollte untersucht werden, ob es auch möglich ist durch funktionale Kopplung der *RsTAL* und der *Pc4CL* unter Zugabe von p-Aminophenylalanin, analog zur Tyrosinzugabe, den entsprechenden aminosubstituierten Thioester zu gewinnen. *TAL*-Enzyme bevorzugen zwar die Desaminierung von Tyrosin unter Freisetzung von p-Cumarat, können aber auch in geringem Maße Phenylalanin zu Zimtsäure umsetzen (Watts et al., 2006b; Xue et al., 2007; Schroeder et al., 2008). Analog dazu würde möglicherweise die Desaminierung von unnatürlichem p-Aminophenylalanin durch die *TAL* zu einer Akkumulation von p-Aminozimtsäure führen. p-Aminozimtsäure könnte anschließend über die bereits beschriebene *4CL* katalysierte Reaktion zum entsprechenden p-Aminocinnamyl-CoA umgesetzt werden.

Der Verlauf der enzymatischen Reaktionen erfolgte durch photometrische Messung bei 360 nm. Bei dieser Wellenlänge konnte zuvor ein Absorptionsmaximum für p-Aminocinnamyl-CoA, dem bei dieser Versuchsanordnung erwarteten Reaktionsprodukt, festgestellt werden. Bei gleichzeitiger Inkubation von p-Aminophenylalanin mit *RsTAL* und *Pc4CL* war zunächst keine Absorptionsänderung infolge einer enzymatischen Umsetzungsreaktion zu beobachten (nicht dargestellt). Wurde allerdings zunächst p-Aminophenylalanin mit 15 µg/ml der *RsTAL* über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend *Pc4CL* (10 µg/ml) diesem Versuchsansatz beigefügt, zeigte sich eine zügige Änderung der Absorption bei 360 nm, wahrscheinlich als Folge der Bildung des aminosubstituierten Thioesters (Abb. 4.7). In den ersten 20 Minuten dieser Reaktion diente vermutlich zuvor durch die *TAL*-Reaktion bereitgestellte aminosubstituierte Säure in ausreichenden Mengen als Substrat für eine nachfolgende *4CL* Katalyse. Nach 20 Minuten schien das Substrat verbraucht zu sein, erkennbar an der konstant bleibenden Absorption bei 360 nm. Zur Kontrolle wurden unter identischen Versuchsbedin-

gungen bei einem weiteren Versuchsansatz *RsTAL*-Enzyme weggelassen mit dem Ergebnis, dass keine Absorptionsänderung festzustellen war. Diese Ergebnisse wurden als Indiz dafür gewertet, dass über Nacht durch die *TAL* angereicherte p-Aminozimtsäure bei anschließender Zugabe von 4CL-Enzymen in den aminosubstituierten Thioester umgesetzt wurde.

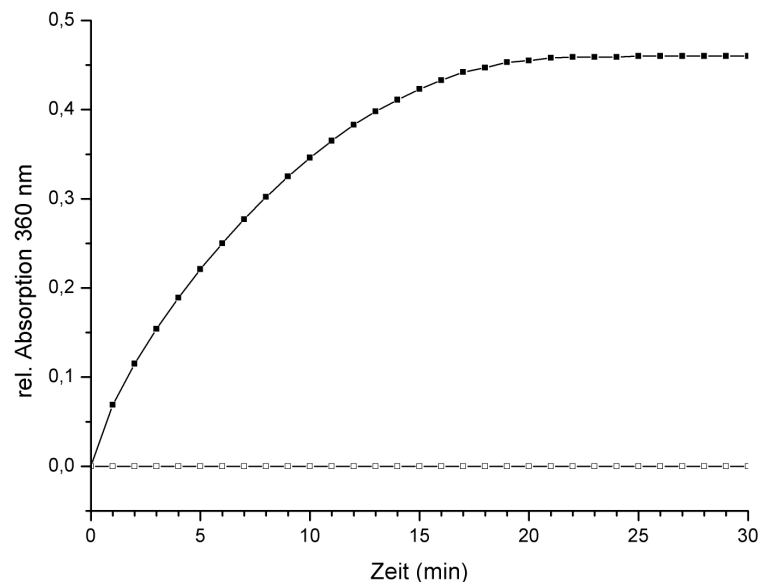


Abb. 4.7: Gekoppelter Aktivitätstest mit *RsTAL* / *Pc4CL*. Aufgereinigte *RsTAL* (20 µg/ml) wurden verwendet, um über Nacht p-Aminophenylalanin (8 mM) umzusetzen. Am nächsten Tag wurde *Pc4CL* (10 µg/ml) dem Enzymassay hinzugefügt. Die Detektion des Produktes der Enzymkette wurde bei 360 nm vorgenommen.

Daraus konnte geschlossen werden, dass die *RsTAL* in geringem Maße p-Aminophenylalanin desaminieren kann und bei ausreichend langer Inkubation genügend p-Aminozimtsäure akkumuliert, welches nachfolgend durch die Aktivität der zugefügten *Pc4CL* zu p-Aminocinnamyl-CoA umgesetzt werden kann. Dies deckt sich mit den Resultaten, die sich aus den Untersuchungen an der *RsTAL* bezüglich ihrer Affinität zu p-Aminophenylalanin ergeben haben (Gilleßen, 2009). Analysen zur Erstellung reaktionskinetischer Daten wurden an dieser Stelle nicht vorgenommen, da dies nicht zu den primären Zielen dieser Arbeit zählte.

4.3. Analyse von CCR und CAD in *E. coli*

4.3.1. Klonierung der Cinnamoyl-CoA Reduktase aus *Zea mays* (*ZmCCR*)

Mit Hilfe der Oligonukleotide *ZmCCR*-fw und *ZmCCR*-rev (Tab. 2.3) wurde der *ZmCCR*-ORF amplifiziert. Als Matrize diente das Plasmid pBluescript-*ZmCCR*, welches freundlicherweise von Herrn Professor J. Rigau (CSIC IRTA, Barcelona, ESP) zur Verfügung gestellt wurde. Das durch PCR gebildete DNA Fragment der Größe 1139 bp wurde vorläufig über *EcoRI* und *NotI* in den passend geschnittenen pET22b(+)-Vektor integriert. Mittels Kolonie-PCR (3.2.2.) und Kontrollverdaus (3.2.5.) konnte die Richtigkeit der Klone bestätigt werden. Die DNA zweier Klone wurde zur Sequenzierung abgegeben. Durch Vergleich mit der Sequenz, die bei NCBI für diesen ORF (*ZmCCR*, Y13734) angegeben ist, ergab sich, dass bei beiden analysierten Klonen an Position 567 eine Punktmutation (C → G) zu finden war. Ansonsten waren beide Klone isogen. Diese Mutation führt dazu, dass an dieser Stelle Glu statt His in die wachsende Aminosäurekette eingebaut wird. Trotz dieser Punktmutation wurde mit der DNA dieser isogenen Klone weitergearbeitet. Über *EcoRI* und *NotI* wurde das Fragment erneut aus dem pET22b(+)-Vektor ausgeschnitten und über diese schnittstellen in die MCS1 des pRSFDuet-Vektor subkloniert. Der so erstellte pRSFDuet-*ZmCCR* Vektor wurde zwecks Kontrolle mit ausgewählten Restriktionsenzymen geschnitten (3.2.5.). Daraus ergab sich, dass das hergestellte pRSFDuet-*ZmCCR* Konstrukt korrekt war. Durch Transformation von *E. coli* BL21 wurde diese Klonierung abgeschlossen. Die Plasmidkarte des pRSFDuet-*ZmCCR* Konstruktes ist im Anhang (8.3) dargestellt.

4.3.2. Expression, Aufreinigung und *in vitro* Aktivität der *ZmCCR*

Um *in vitro* die Aktivität der *ZmCCR* zu überprüfen, wurden *E. coli* BL21 mit pRSFDuet-*ZmCCR* transformiert. Positive Klone wurden in 1 l LB-Medium kultiviert und die Expression der Hauptkultur bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 mit 1 mM IPTG induziert. Die Kultivierung erfolgte bei 16 °C, da sich herausstellte, dass bei dieser Temperatur die größte Ausbeute rekombinanter CCR Proteine erzielen lies. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und anschliessend aufgeschlossen (3.3.5.). Die Aufreinigung der rekombinant erzeugten *ZmCCR* Proteine erfolgte über Ni²⁺-NTA (3.3.6.). Das Zelllysate, Durchfluss- und Waschfraktionen, sowie die Eluate der Proteinaufreinigung wurden mittels SDS-PAGE (3.3.3.) und Immunoblotanalyse (3.3.4.) untersucht. Zur Identifizierung rekombinanter *ZmCCR* Proteine

wurden im Westernblot ein primärer Anti-His Antikörper (2.7.) verwendet. Für den späteren AP-basierten Nachweis wurde ein sekundärer Maus-anti-Ziege Antikörper eingesetzt.

Die aus dem pRSFDuet-*ZmCCR* exprimierte Cinnamoyl-CoA Reduktase hat ein Molekulargewicht von 42 kDa und besteht aus 390 Aminosäuren (Angabe der Masse inklusive Überhänge und C-terminalem His-Tag, berechnet mit CloneManager). In allen untersuchten Fraktionen konnte sowohl im SDS-Gel als auch in der Immunoblotanalyse ein starkes Proteinsignal oberhalb der 40 kDa Bande des Proteinmarkers detektiert werden. Erwartungsgemäß war im Zelllysate eine Vielzahl anderer Proteine unterschiedlicher Größe festzustellen, was sich in der Vielzahl der Proteinbanden im SDS-Gel widerspiegelte. Im Durchfluss und auch in der Waschfraktion war ebenfalls eine deutliche Proteinbande oberhalb der 40 kDa Markerbande zu bemerken. Die Verwendung von Äquilibrierungs- und Waschpuffern, die 10-20 mM Imidazol enthielten, könnte dazu geführt haben, dass spezifisch gebundene Proteine mit schwacher Affinität zur Säulenmatrix ausgewaschen werden. In den Eluat 1 und 2 (Spur 5 und 6 in Abb. 4.8) konnte der Hauptanteil rekombinant erzeugten *ZmCCR* Proteins festgestellt werden. Durch die Immunoblotanalyse konnte bestätigt werden, dass die im SDS-Gel oberhalb der 40 kDa Markerbande detektierten Proteine rekombinanten Ursprungs waren. Abweichend vom berechneten Molekulargewicht von 42 kDa ist in der Enzymdatenbank (BRENDA) ein Molekulargewicht von 38 kDa für dieses Enzym aus *Zea mays* angegeben. Dieser Gewichtsunterschied könnte durch den zusätzlichen C-terminalen His-Tag zu erklären sein. Das Startkodon des Fusionsproteins auf dem pRSFDuet-Vektor liegt 48 bp vor dem Startkodon des *ZmCCR* ORF. Die zusätzlichen sechzehn Aminosäuren haben ein Molekulargewicht von etwa 1,7 kDa.

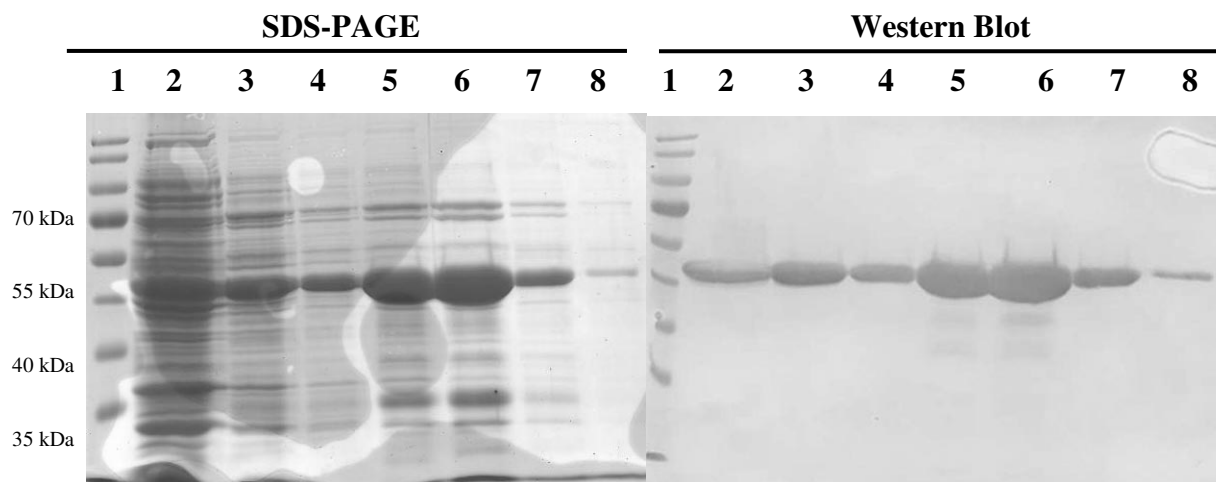


Abb. 4.8: SDS-PAGE und Westernblot von *ZmCCR*. Aufgetragen wurden alle Proteinfraktionen nach Aufreinigung über Ni^{2+} -NTA. 12 % SDS-PAA-Gel (links), Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Analyse mittels Westernblot (rechts). Spur 1, 5 μl Prestained Protein Marker; Spur 2, Lysat; Spur 3, Durchfluss; Spur 4, Waschfraktion (20 mM Imidazol); Spur 5-8, Elutionsfraktionen (300 mM Imidazol)

Die Aktivität zuvor aufgereinigter *ZmCCR* wurde *in vitro* nach bekannter Methode untersucht (Luderitz and Grisebach, 1981). Dabei wurden 0 $\mu\text{g/ml}$, 7 $\mu\text{g/ml}$, 14 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ und 40 $\mu\text{g/ml}$ aufgereinigten Enzyms eingesetzt. Enzymatisch synthetisiertes und aufgereinigtes p-Cumaryl-CoA (4.1.9.) diente als Substrat und wurde in allen Enzymtests in einer Konzentration von 70 μM eingesetzt. Die Änderung der Absorption durch die enzymatische Umsetzung von p-Cumaryl-CoA wurde bei 333 nm - ein Absorptionsmaximum des p-Cumaryl-CoAs - photometrisch gemessen. Zu Kontrollzwecken wurde hier einem Ansatz kein Protein hinzugefügt. Bei Zugabe des aufgereinigten Proteins konnte in allen Versuchsansätzen infolge der enzymatischen Reaktion eine negative Absorptionsänderung durch den Verbrauch an p-Cumaryl-CoA festgestellt werden. Erwartungsgemäß hatte die Erhöhung der eingesetzten Proteinmenge zur Folge, dass ein schnellerer Verbrauch an p-Cumaryl-CoA stattfand, erkennbar an einem steileren Kurvenverlauf für die Versuchsansätze mit 20 und 40 $\mu\text{g/ml}$ *ZmCCR*. Es konnte kein lineares Verhältnis zwischen der Menge eingesetzten Proteins und Änderung der Absorption beobachtet werden.

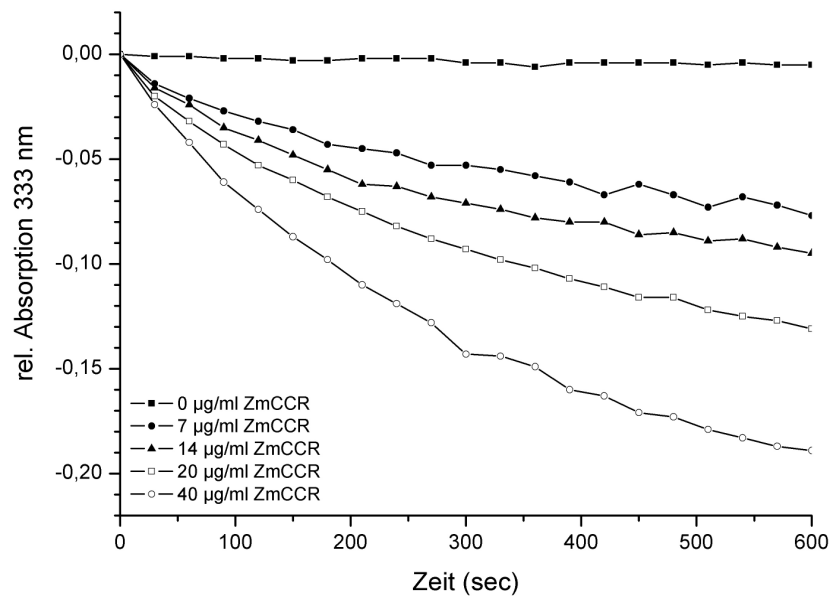


Abb. 4.9: Enzymatische Umsetzung von p-Cumaryl-CoA. Als Substrat wurden 70 μM p-Cumaryl-CoA eingesetzt, es wurden 0 $\mu\text{g/ml}$, 7 $\mu\text{g/ml}$, 14 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ und 40 $\mu\text{g/ml}$ ZmCCR verwendet. Die Messung der photometrischen Aktivitätsbestimmung erfolgte bei 333 nm.

Aufgrund begrenzter Verfügbarkeit von enzymatisch hergestelltem p-Cumaryl-CoA musste darauf verzichtet werden, die Aktivität der ZmCCR *in vivo* zu untersuchen. Eine Aufnahme des p-Cumaryl-CoA über spezielle Membrantransporter in das Zellinnere ist bei einem Molekulargewicht von 913,67 g/mol aber eher nicht anzunehmen. Aus diesen Gründen sollte alternativ in späteren *in vivo* Experimenten untersucht werden, ob bei gleichzeitiger Koexpression von Pc4CL und ZmCCR unter Zugabe von p-Cumarsäure ein entsprechendes Reaktionsprodukt im Medium als Folge der Aktivität beider Enzyme nachzuweisen ist (4.4.2.). Dass p-Cumarsäure über die Zellmembran von *E. coli* transferiert wird, konnte in Versuchen zur Bestimmung der TAL-Aktivität in *E. coli* gezeigt werden (4.1.3.). In den genannten Experimenten zeichnete sich ab, dass nach Zugabe von Tyrosin, welches intrazellulär TAL-vermittelt desaminiert wurde, das Reaktionsprodukt p-Cumarsäure im Zellüberstand detektiert werden konnte. Ob der Transport dieser Säure über die Membran hinweg ins Medium auch bidirektional stattfindet, also ob auch die Aufnahme ins Zellinnere möglich ist, konnte aber an dieser Stelle nicht vorhergesagt werden.

4.3.3. Klonierung der Cinnamylalkohol Dehydrogenase aus *Zea mays* (*ZmCAD*)

Als Matrize zur Amplifikation des *ZmCAD* ORF diente pBluescript-*ZmCAD*. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Herrn Professor J. Rigau (CSIC IRTA, Barcelona, ESP) zur Verfügung gestellt. Unter Verwendung der Oligonukleotide *ZmCAD*-fw und *ZmCAD*-rev (Tab. 2.3) konnte die zu klonierende DNA mittels PCR (3.2.1.) vervielfältigt werden. Die gereinigte DNA wurde mit *EcoRI* und *XhoI* verdaut, erneut gereinigt (MSB Spin PCRapace, Invitex, Berlin) und in den passend dazu restringierten pET22b(+)-Vektor integriert. Nach Transformation von *E. coli* DH5 α Zellen mit diesem Konstrukt wurden die Zellen auf geeigneten Selektionsmedien kultiviert. Von den gewachsenen Bakterienkolonien wurden zufällig Klone gepickt und mittels Kolonie-PCR (3.2.2.) untersucht. Positive Klone wurden mit Hilfe der in Tabelle 2.4 aufgeführten Oligonukleotide sequenziert. Nach Sequenzanalyse und Vergleich mit der bei NCBI hinterlegten Sequenz für diesen ORF (*ZmCAD*, Y13733) konnten für die analysierten Klone an Position 243 (A $\rightarrow$ G) und 536 (A $\rightarrow$ C) Punktmutationen festgestellt werden. Ansonsten waren die untersuchten Klone isogen. Die Mutation an Position 243 hat keinerlei Auswirkung, es handelt sich um eine stille Mutation. An Position 536 ändert sich die Aminosäuresequenz, anstelle von Asn wird Thr in die Aminosäurekette eingebaut. Trotz dieser Mutationen wurde mit der DNA dieser isogenen Klone weitergearbeitet. Die Plasmidkarte des pET22b-*ZmCAD* Konstruktes ist im Anhang (8.3.) dargestellt.

4.3.4. Expression, Aufreinigung und *in vitro* Aktivität der *ZmCAD*

Zur Expression wurde das pET22b-*ZmCAD* Konstrukt in *E. coli* ER2566 transformiert. Nach Anzucht in 500 ml LB-Medium und Induktion der Expression bei einer OD₆₀₀ von 0,5 mit 1 mM IPTG wuchsen die Zellen weitere 24 h bei 16 °C. Die Zellen wurden pelletiert, durch Zellaufschluss (3.3.5.) und Ni²⁺-NTA Aufreinigung (3.3.6.) sollte rekombinant hergestelltes *ZmCAD* Protein isoliert werden. Durch Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (3.3.3.) wurde die Konzentration der aufgereinigten Proteine bestimmt, um anschließend die Aktivität zu untersuchen. Das Zelllysate, Durchfluss- und Waschfraktionen, sowie die Eluate der Proteinaufreinigung wurden mittels SDS-PAGE (3.3.3.) und Immunoblotanalyse (3.3.4.) untersucht. Zur Identifizierung rekombinanter *ZmCAD* Proteine wurde im Westernblot ein primärer Anti-His Antikörper (2.7.) verwendet. Für den späteren AP-basierten Nachweis wurde ein sekundärer Maus-anti-Ziege Antikörper eingesetzt.

Die aus dem pET22b-*ZmCAD* exprimierte Cinnamylalkohol Dehydrogenase aus *Zea mays* hat ein Molekulargewicht von 40 kDa (Angabe der Masse inklusive N-terminalem His-Tag, berechnet mit CloneManager). In allen untersuchten Fraktionen konnten, wie der Westernblot verdeutlicht (Abb. 4.10), Proteine nachgewiesen werden, die spezifisch über die beim Immunoblot eingesetzten Antikörper detektiert wurden. Auch im SDS-Gel (Abb. 4.10) wird deutlich, dass Proteine aufgereinigt und eluiert werden konnten, die in ihrer Größe zwischen der 55 kDa und 40 kDa Bande des Proteinmarkers einzuordnen waren.

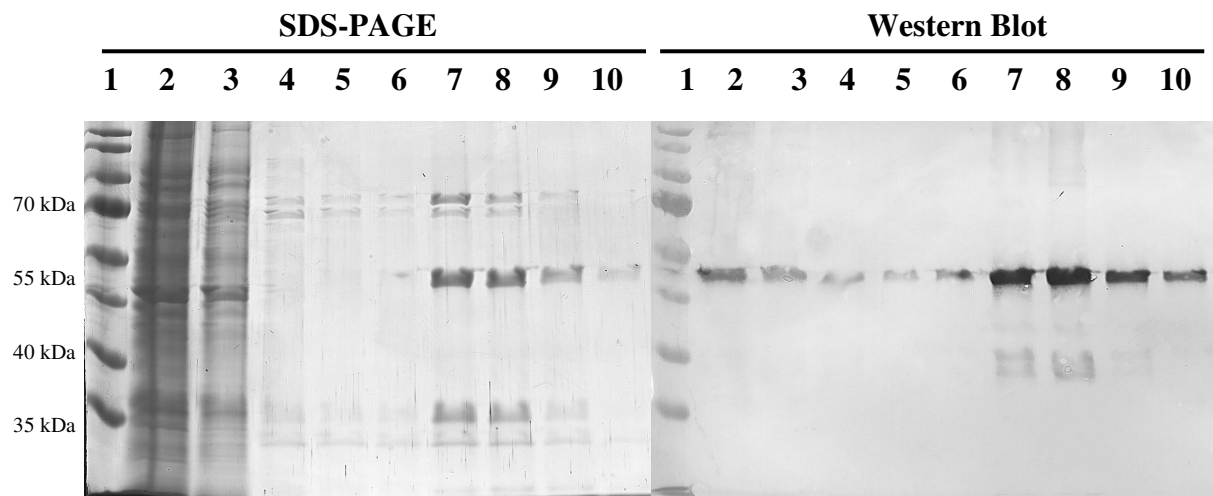


Abb. 4.10: SDS-PAGE und Westernblot von *ZmCAD*. Aufgetragen wurden alle Proteinfractionen nach Reinigung über Ni^{2+} -NTA. 12 % SDS-PAA-Gel (links), Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Analyse mittels Westernblot (rechts). Spur 1, 5 μl Prestained Protein Marker; Spur 2, Lysat; Spur 3, Durchfluss; Spur 4-6, Waschfraktion 1-3 (20 mM Imidazol); Spur 7-10, Elutionsfraktionen 1-4 (300 mM Imidazol).

Die Aktivität der rekombinant exprimierten und aufgereinigten *ZmCAD* Proteine wurde nach bekannter Methode untersucht (Wyrambik and Grisebach, 1975). Aus diesen Arbeiten war bekannt, dass die Cinnamylalkohol Dehydrogenase aus *Glycine max* neben p-Cumarylaldehyd auch Coniferylaldehyd, ein in m-Stellung methoxyliertes Derivat von p-Cumarylaldehyd, bevorzugt umsetzt. Im Gegensatz zu Coniferylaldehyd ist p-Cumarylaldehyd kommerziell nicht zu erwerben, so dass zur Untersuchung der enzymatischen Umsetzung das methoxylierte Derivat verwendet wurde. Im Enzymtest wurden 4 $\mu\text{g/ml}$ aufgereinigten Proteins verwendet. Die Änderung der Absorption infolge des bei der Reduktion von Coniferylaldehyd verbrauchten NADPH wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm und einer Temperatur von 30 °C verfolgt (Abb. 4.11). Aus den dargestellten Messungen ging hervor, dass sich die Umsetzungsreaktionen der rekombinanten *ZmCAD* in einer Abnahme der Absorption bei eingestellter Wellen-

länge äußerten. Damit wurde gezeigt, dass die rekombinant erzeugte *ZmCAD* in aktiver Form exprimiert und isoliert werden konnte.

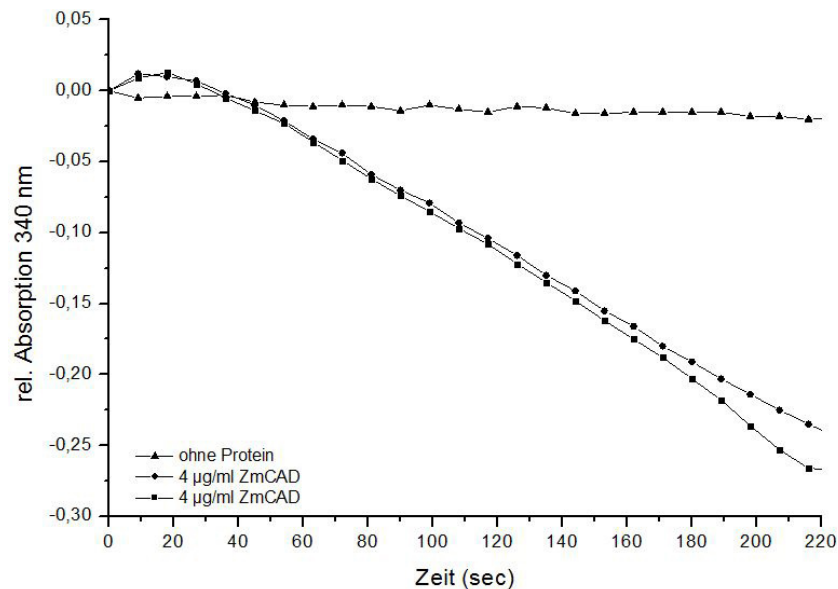


Abb. 4.11: Enzymatische Umsetzung von Coniferylaldehyd. Als Substrat wurden 50 µM Coniferylaldehyd eingesetzt, es wurden 4 µg/ml *ZmCAD* verwendet. Die Messung der photometrischen Aktivitätsbestimmung erfolgte bei 340 nm.

4.4. Verknüpfung von Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese

Die Installation eines artifiziellen Biosyntheseweges in *E. coli* beruht auf der gleichzeitigen Koexpression aller am Biosyntheseweg beteiligten Proteine. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die *RsTAL*, die *Pc4CL*, die *ZmCCR* und die *ZmCAD* einzeln exprimiert und in aktiver Form aus den Zellen isoliert werden können. *In vivo* konnte zunächst für *RsTAL* exprimierende Zellen demonstriert werden, dass diese extrazellulär supplementiertes Tyrosin aufnehmen, dieses zu p-Cumarat desaminieren und das Reaktionsprodukt effektiv ins Medium ausschleusen (4.1.3.). Die *in vivo* Reaktivität der übrigen genannten Enzyme konnte einzeln nicht untersucht werden. Dies ist zum Teil durch eine schlechte Erfassbarkeit entstehender Metabolite und zum Teil durch mangelnde Substratverfügbarkeit begründet. Das Reaktionsprodukt einer intrazellulären 4CL katalysierten Umsetzung würde durch vorhandene Thioesterasen degradiert und wäre damit nicht mehr zu detektieren (Beuerle and Pichersky, 2002; Watts et al., 2004). Eine *in vivo* Analyse der *ZmCCR* und *ZmCAD* Aktivität in *E.coli* scheiterte an der Verfügbarkeit geeigneter Vorstufen.

Folglich sollte in weiterführenden Versuchen durch Koexpression geeigneter Proteinkombinationen untersucht werden, ob die gewählten Enzyme *in vivo* kooperieren und den Aufbau des Ligninbiosyntheseweges in *E. coli* ermöglichen können. Zunächst wurden dazu die Enzyme *Pc4CL* und *ZmCCR* miteinander kombiniert. Die Schlüsselenzyme *Pc4CL* und *ZmCCR* gleichzeitig in *E. coli* zu exprimieren, würde bedeuten, dass eine wichtige Schnittstelle des künftigen Biosyntheseweges hin zum p-Cumarylalkohol in *E. coli* funktioniert. In Pflanzen wird der Syntheseweg bis hin zum p-Cumaryl-CoA als Phenylpropanoidweg bezeichnet, während die Reaktionen der CCR und der CAD als Monolignolbiosynthese bezeichnet werden. Die Expression von *Pc4CL* und *ZmCCR* verknüpft beide Teile des Stoffwechselweges miteinander. Im Anschluss daran sollte diese Enzymkette, bestehend aus *Pc4CL* und *ZmCCR*, schrittweise zunächst um die *ZmCAD* erweitert werden, bevor durch Koexpression aller vier ORFs (*RsTAL*, *Pc4CL*, *ZmCCR* und *ZmCAD*) der vollständige künstlich in *E. coli* erzeugte Monolignolbiosyntheseweg etabliert werden sollte.

4.4.1. Koexpression von *Pc4CL* und *ZmCCR* in *E. coli*

Der Koexpression der beiden Enzyme *Pc4CL* und *ZmCCR* ging die geeignete Klonierung des pETDuet-Vektors voraus. Die Klonierung basierte auf der Integration des *ZmCCR* ORF in die MCSI des pETDuet-*Pc4CL* (MCSII) Konstruktes. Dazu wurde das Fragment, das über *EcoRI* und *NotI* aus pRSFDuet-*ZmCCR* ausgeschnitten wurde, in die MCSI des pETDuet-*Pc4CL* (MCSII) integriert. Das daraus resultierende Konstrukt pETDuet-*ZmCCR-Pc4CL*, welches mittels Kontrollverdaus (3.2.5.) und Kolonie-PCR (3.2.2.) auf Richtigkeit überprüft wurde, wurde in *E. coli* BL21 transformiert. Mit den transformierten Zellen wurden Expressionsversuche unternommen, um die intrazelluläre Funktionalität und den damit verbundenen Erfolg der Kopplung von Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese zu prüfen. Das der Koexpression von *Pc4CL* und *ZmCCR* zugrunde liegende Konstrukt ist im Anhang (8.3.) dargestellt. Für die folgenden Untersuchungen war es wichtig eine Messmethode zu etablieren, die es ermöglichte gleichzeitig Edukte, Intermediate und Reaktionsprodukte zu erfassen. Zu diesem Zweck wurden zunächst die Absorptionsmaxima von t-Ferulasäure, Coniferylaldehyd und Coniferylalkohol mittels Wellenlängenscan zwischen 210 nm und 450 nm bestimmt. Diese Referenzsubstanzen waren in ausreichendem Maße verfügbar und unterscheiden sich von p-Cumarsäure, Cumarylaldehyd und Cumarylalkohol nur durch eine zusätzliche Methoxygruppe in m-Stellung des aromatischen Rings. Während Ferulasäure und Coniferylaldehyd ein ähnliches Absorptionsspektrum zeigten und maximal zwischen 270 nm

und 390 nm absorbierten, lag das Absorptionsmaximum von Coniferylalkohol zwischen 230 nm und 270 nm, wobei zwischen 270 nm und 310 nm eine zusätzliche Schulter in der Absorptionskurve zu verzeichnen war (Abb. 4.12). Anschließend wurden die Referenzsubstanzen *t*-Ferulasäure, Coniferylaldehyd und Coniferylalkohol über HPLC getrennt, die Messung erfolgte bei 275 nm. Die Retentionszeiten der untersuchten Stoffe unterschieden sich signifikant, so dass eine Trennung der Substanzen möglich war.

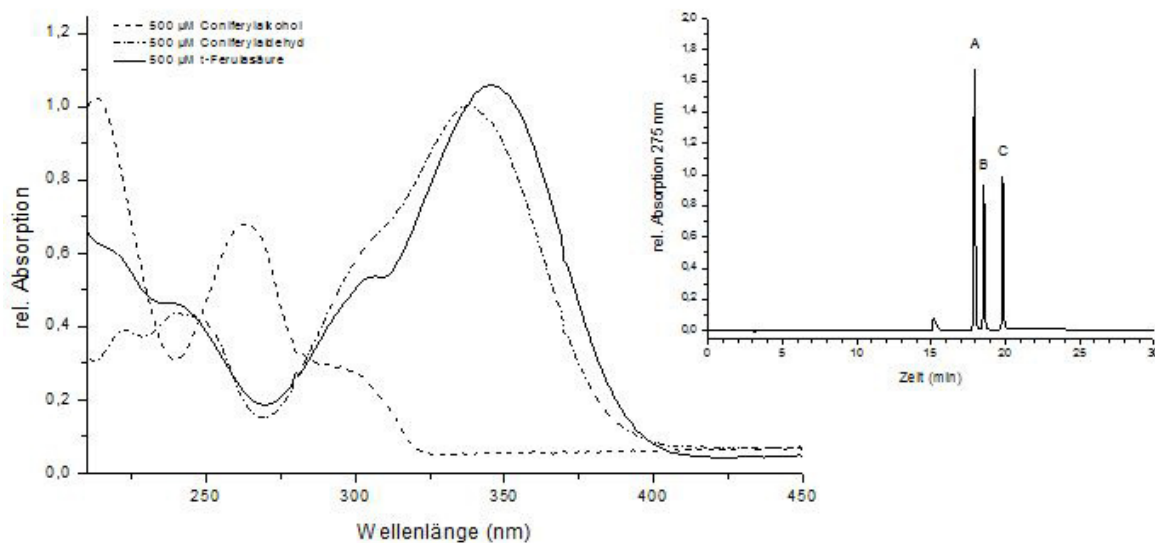


Abb. 4.12: Absorptionsspektren und HPLC-Analyse. Zur Bestimmung der Absorptionsmaxima wurde die Absorption von *t*-Ferulasäure, Coniferylaldehyd und Coniferylalkohol zwischen 210 nm und 450 nm bestimmt (links). Die Konzentration betrug jeweils 500 µM. Anschließend wurde ein Gemisch aus *t*-Ferulasäure, Coniferylaldehyd und Coniferylalkohol zu jeweils 500 µM auf die HPLC-Säule aufgetragen, um die gleichzeitige Trennbarkeit und Detektion der Substanzen bei 275 nm zu prüfen. *t*-Ferulasäure eluierte nach 18,0 Minuten von der Säule (Peak A), Coniferylalkohol hatte eine Retentionszeit von 18,5 Minuten (Peak B) und Coniferylaldehyd (Peak C) eluierte nach etwa 19,8 Minuten.

Nachdem die Wellenlänge zur Detektion der Edukte, Intermediate und Produkte festgelegt wurde, konnte mit den Expressionsstudien begonnen werden. Mit pETDuet-*ZmCCR-Pc4CL* transformierte *E. coli* BL21 Zellen wurden in LB-Medium kultiviert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Zellen zur Proteinexpression induziert. Die gleichzeitige Expression der beiden Enzyme wurde mittels Westernblotanalyse dokumentiert (nicht dargestellt), die plasmidkodierte His- und S-Tags ermöglichten eine Detektion über entsprechend verwendete Antikörper (2.7.). Nach 1 h weiterer Inkubation wurde die Hauptkultur aufgeteilt und jeweils mit 2 mM Cumarsäure, 2 mM Ferulasäure oder 2 mM Sinapinsäure supplementiert. Zur Kontrolle wurde eine weitere Kultur ohne Zugabe von zusätzlichem Substrat kultiviert. Der Zeit-

punkt der Substrataddition wurde als Nullwert definiert. Nach 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 20 h wurden 1 ml Probe entnommen, die Zellen durch Zentrifugation separiert und die zellfreien Überstände mittels HPLC bei einer Wellenlänge von 275 nm analysiert. Zu den Fütterungsversuchen sind exemplarisch jeweils Chromatogramme der 0 h Probe und der 4 h Probe dargestellt (Abb. 4.13). Die zugefütterten Säuren p-Cumarsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure konnten im Medium nachgewiesen werden und eluierten alle unter gegebenen Bedingungen nach 17,5 Minuten von der HPLC Säule, unabhängig davon, dass sich die Substanzen strukturell voneinander unterschieden. Zusätzlich zu den gefütterten Säuren war in allen drei Kulturüberständen eine Vielzahl anderer Substanzen nachzuweisen, die durch Bestandteile des verwendeten Komplexmediums erklärt werden können, jedoch nicht identifiziert wurden. Um die Signale der relevanten Substanzen besser einordnen zu können, wurde in den Chromatogrammen lediglich der Zeitintervall zwischen 15,0 und 30,0 Minuten dargestellt. Bereits kurze Zeit nach Zugabe der Vorstufen konnte die Akkumulation relevanter Substanzen im Medium festgestellt werden. 4CL und CCR exprimierende Zellen, denen kein Substrat zugefügt wurde, akkumulierten nachweislich keine Substanzen, die den Retentionszeiten der Referenzsubstanzen zugeordnet werden konnten.

Die Fütterung der Zellen mit p-Cumarsäure (Abb. 4.13.I.) führte zur Akkumulation einer Substanz, die nach Vergleich mit authentischem Standard (Coniferylaldehyd) zunächst als p-Cumarylaldehyd ($R_t = 19,5$ min) definiert wurde. Eine weitere Substanz eluierte nach 18,0 Minuten und wurde vorläufig als p-Cumarylalkohol identifiziert, da die Retentionszeit identisch zu der des Coniferylalkohols in der Referenz war. Das dritte Signal konnte als nicht umgesetzte p-Cumarsäure identifiziert werden ($R_t = 17,5$ Minuten). Auch bei Zugabe von Ferulasäure (Abb. 4.13.II.) konnte festgestellt werden, dass nach 4 h Inkubationszeit zusätzliche Substanzen im Medium zu detektieren waren. Coniferylaldehyd ($R_t = 19,5$ Minuten) konnte nur in geringen Mengen im Medium angereichert werden. Die Peakhöhe weist auf eine sehr niedrige Konzentration des Coniferylaldehydes hin. Im Gegensatz dazu konnte eine weitaus größere Menge an Coniferylalkohol ($R_t = 18,5$ Minuten) detektiert werden. Nicht umgesetzte Ferulasäure konnte auch in dem Überstand dieses Versuchsansatzes nachgewiesen werden. Die Zugabe von Sinapinsäure (Abb. 4.13.III.) scheint nicht zu einer Bildung und Ausschleusung entsprechender Aldehyd- oder Alkoholstufen zu führen, es konnten keine Signale für entsprechende Substanzen mit identischen Retentionszeiten beobachtet werden. Das Signal der Sinapinsäure im Chromatogramm konnte nach 4 h Inkubation mit scheinbar unveränderter Intensität wiedergefunden werden. Sinapinsäure schien als Substrat für eine intrazell-

luläre 4CL-CCR-Enzymkette ungeeignet zu sein. In allen Versuchsansätzen konnte nach etwa 21,0 Minuten ein deutliches Signal im Chromatogramm beobachtet werden, das jedoch keiner bestimmten Substanz zugeordnet werden konnte und vermutlich durch Medienbestandteile hervorgerufen wurde. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass einerseits in jedem der dargestellten Chromatogramme ein Signal mit dieser Retentionszeit zu verzeichnen war und andererseits dieses Signal auch bei der Negativkontrolle auftauchte (nicht dargestellt).

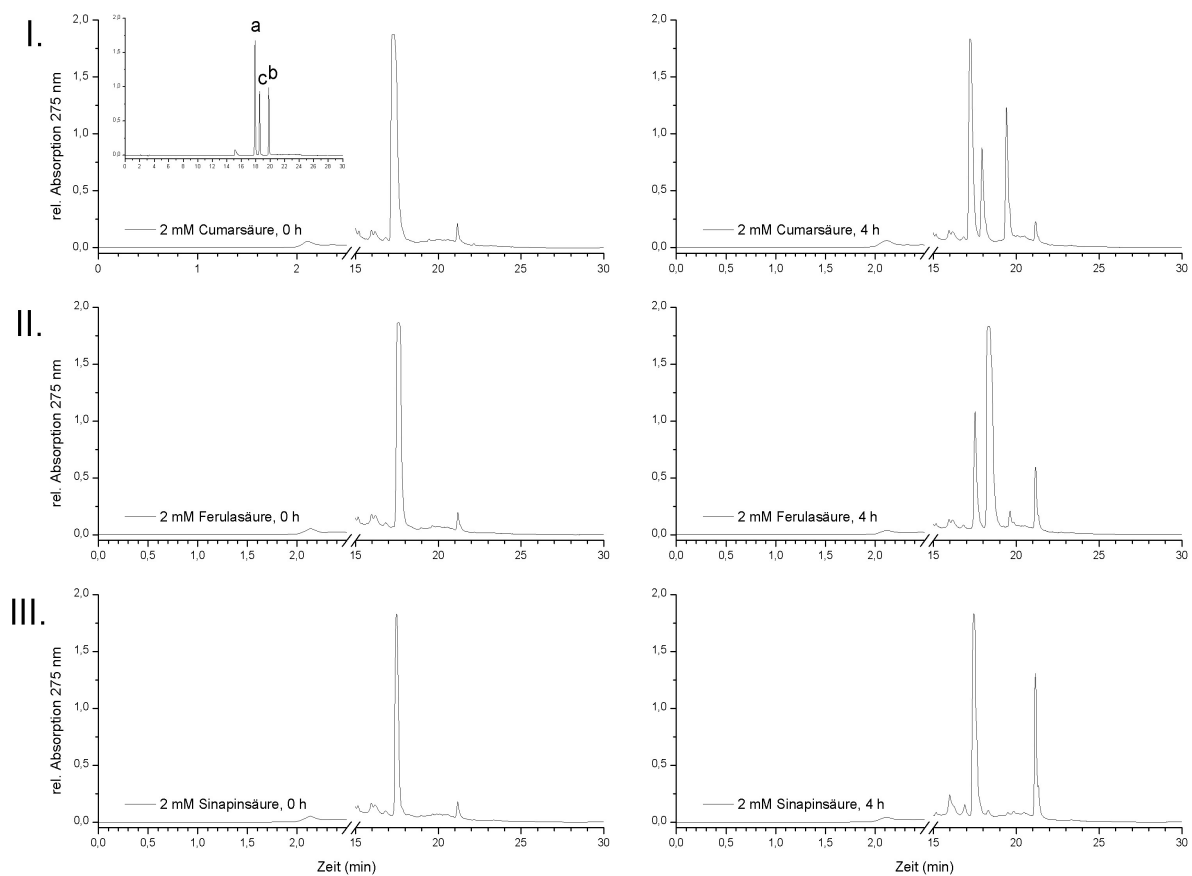


Abb. 4.13: HPLC-Analyse *ZmCCR* und *Pc4CL* koexprimierender Zellen. CCR und 4CL exprimierende Zellen wurden mit 2 mM Cumarsäure (I.), 2 mM Ferulasäure (II.) oder 2 mM Sinapinsäure (III.) supplementiert. Exemplarisch sind Chromatogramme der Überstände nach 0 h und 4 h Inkubationszeit dargestellt. Die Messung erfolgte bei 275 nm. (Referenzen: a, 500 µM Ferulasäure; b, 500 µM Coniferylaldehyd; c, 500 µM Coniferylalkohol).

Ziel der 4CL-CCR Koexpression war die intrazelluläre Umsetzung zugeführter Säuren zu entsprechenden Aldehydstufen. Die unerwartete Akkumulation von p-Cumarylalkohol und Coniferylalkohol im Medium der koexprimierenden Zellen bei Fütterung mit entsprechenden Säuren deutet darauf hin, dass entweder unspezifische intrazellulär vorliegende Dehydrogenasen die entstehenden Aldehydintermediate reduzieren oder dass eine weitere Reduktion der Aldehyde durch andere biochemische Prozesse begünstigt wird. Der Beweis, dass es sich bei

der p-Cumarsäureumsetzung zweifelsfrei um den gewünschten Alkohol handelte, musste durch aussagekräftige NMR-Analysen erbracht werden.

4.4.2. Identifizierung von p-Cumarylalkohol

Dass es sich bei der gebildeten Substanz mit einer Retentionszeit von 18,0 Minuten um p-Cumarylalkohol handelte, sollte durch NMR-Analyse bestätigt werden. Kommerziell ist diese Substanz nicht zu erwerben, wodurch eine Quantifizierung durch Vergleich mit authentischem Standard zunächst nicht möglich war. Die enzymatische Herstellung des p-Cumarylalkohols war daher unumgänglich.

Um dieses Ziel zu verfolgen, wurden *Pc4CL* und *ZmCCR* exprimierende Zellen in einer 10 Liter Zellkultur unter Zugabe von p-Cumarat fermentiert. Wie unter 4.4.1. beschrieben ist die enzymatische Umsetzung von der Säure über den Aldehyd zum Alkohol auch ohne Einwirkung zusätzlich exprimierter *ZmCAD* möglich. Der mit pETDuet-*ZmCCR-Pc4CL* transformierte *E. coli* Stamm wurde in Minimalmedium bis zu einer OD_{600} von 0,5 kultiviert und dann zur Proteinexpression induziert. Weitere 3 h später erfolgte eine Zugabe von 1 mM p-Cumarsäure. Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen separiert und 10 l des zellfreien Kulturüberstandes am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde in organischem Lösungsmittel (Essigsäureethylester) aufgenommen und durch Flüssig-Flüssigextraktion größtenteils in die organische Phase überführt. Diese konnte am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand in Methanol aufgenommen werden. Eine anschließende Festphasenextraktion dieser Lösung lieferte mehrere Fraktionen, in denen die Zielsubstanz angereichert werden konnte. Die einzelnen Fraktionen der Festphasenextraktion wurden mittels Dünnschichtchromatographie (3.4.1.) untersucht, um Fraktionen mit der höchsten Produktausbeute zu ermitteln. Nach Trennung der Proben wurde die getrocknete DC-Platte unter einen UV-Tisch gelegt und bei einer Wellenlänge von 254 nm analysiert. Die bei dieser Chromatographie getrennten Substanzen wurden als fluoreszierende Banden sichtbar und konnten markiert werden (Abb. 4.14). Im Anschluss erfolgte die Ermittlung der R_f -Werte durch Bildung des Quotienten aus Wanderstrecke des Substanzfleckes (S) zur Wanderstrecke des Lösungsmittels (L).

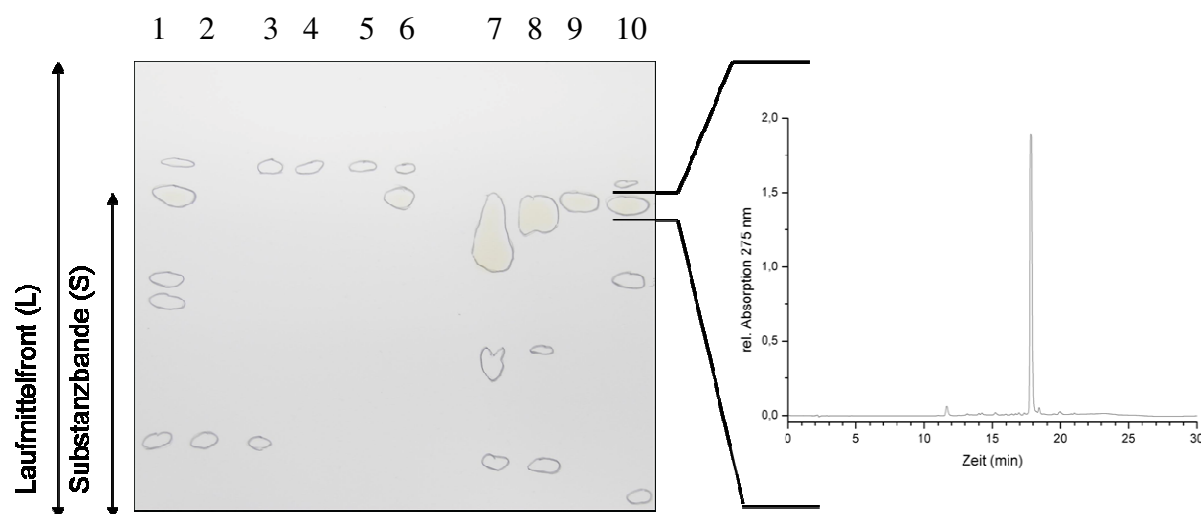


Abb. 4.14: Dünnschichtchromatographie nach Festphasenextraktion. Aufgetragen wurden alle Eluate einer SPE-Aufreinigung eines Kulturüberstandes *Pc4CL* und *ZmCCR* koexprimierender *E. coli* BL21 Zellen, die mit 1 mM p-Cumarat gefüttert wurden. Von den einzelnen Fraktionen wurden jeweils 5 µl auf die DC-Platte aufgetragen. Die Trennung erfolgte für 1,5 h in einem Gemisch aus Toluol, Isoamylalkohol und Essigsäure (80:40:4). Spur 1, Auftrag vor Extraktion; Spur 2, Durchfluss; Spur 3, Waschfraktion; Spur 4-6, Eluat 1-3; Spur 7-10, Eluate 4-7. Das HPLC-Chromatogramm (rechts) zeigt die Reinheit und die Retentionszeit der isolierten Substanz, die einen R_f -Wert von 0,6 aufwies.

Für die auf der DC-Platte gelbliche erscheinende Substanz (Abb. 4.14), welche vermutlich den p-Cumarylalkohol darstellte, errechnete sich ein R_f -Wert von 0,6. Die Gelbfärbung konnte erst nach einem Tag Verweilzeit beobachtet werden, woraus geschlossen werden konnte, dass die Färbung oxidationsbedingt war. In den Eluaten 4-7 (Abb. 4.14, Spur 7-10) konnte der Hauptanteil der Substanz detektiert werden. Nach dieser DC-Analyse wurden die Eluate 4-7 vereinigt und nochmals einer präparativen DC (3.4.1.) unterzogen. Die Bande mit einem R_f -Wert von 0,6 wurde isoliert und die darin enthaltene Substanz mit Methanol extrahiert. Der Extrakt wurde zur Analyse nach Hannover an das Fraunhofer ITEM verschickt, parallel dazu wurde die isolierte Substanz mittels HPLC untersucht (Abb. 4.14). Nach Auswertung der HPLC-Analyse resultierte für den p-Cumarylalkohol eine Retentionszeit von 18,0 Minuten, Coniferylalkohol eluiert zur gleichen Zeit.

Am Fraunhofer ITEM wurde diese isolierte Substanz durch ^1H -NMR, ^{13}C -NMR und 2D-NMR analysiert und quantifiziert. Die analysierte Substanz, die nach dünnschichtchromatographischer Analyse einen R_f -Wert von 0,6 ergab und bei HPLC-Analyse eine Retentionszeit von 18,0 Minuten zeigte, konnte zweifelsfrei als p-Cumarylalkohol identifiziert werden, der Gehalt an p-Cumarylalkohol in der analysierten Probe wurde zu $2,97 \pm 10 \%$

mg/ml bestimmt. Das in Abbildung 4.15 dargestellte ^1H -NMR-Spektrum zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen am ITEM. Dargestellt ist die chemische Verschiebung (δ) in ppm, die Multiplizität und die Anzahl der Protonen an der jeweiligen Position des Moleküls. Neben p-Cumarylalkohol waren noch weitere Komponenten in der analysierten Lösung zu finden. Die Signale zwischen 0 und 1,8 ppm sind langkettigen aliphatischen Verbindungen zuzuordnen, die strukturelle Ähnlichkeit zum p-Cumarylalkohol aufweisen. Als Lösungsmittel wurde deuteriertes Acetonitril eingesetzt, dessen Signal bei 1,97 ppm zu detektieren war. Das Signal bei 2,25 ppm konnte dem in der Probe befindlichen Restwasser zugeordnet werden. Die chemischen Verschiebungen der Hydroxy-Wasserstoffatome und die der übrigen H-Atome des analysierten p-Cumarylalkohols sind nachfolgend dargestellt (Tab. 4.2). Die Identifizierung des enzymatisch generierten p-Cumarylalkohol mittels ^1H -NMR, ^{13}C -NMR und 2D-NMR war wichtige Grundlage weiterer Untersuchungen, die eine Quantifizierung des Reaktionsproduktes zum Ziel hatten.

Tab. 4.2: Chemische Verschiebung der H-Atome von p-Cumarylalkohol

H-Atome (Position am Ring)	Chemische Verschiebung
3, 5	7,3 ppm
7 (OH)	7,07 ppm
2, 6	6,8 ppm
8	6,5 ppm
9	6,2 ppm
10	4,2 ppm
11 (OH)	2,84 ppm

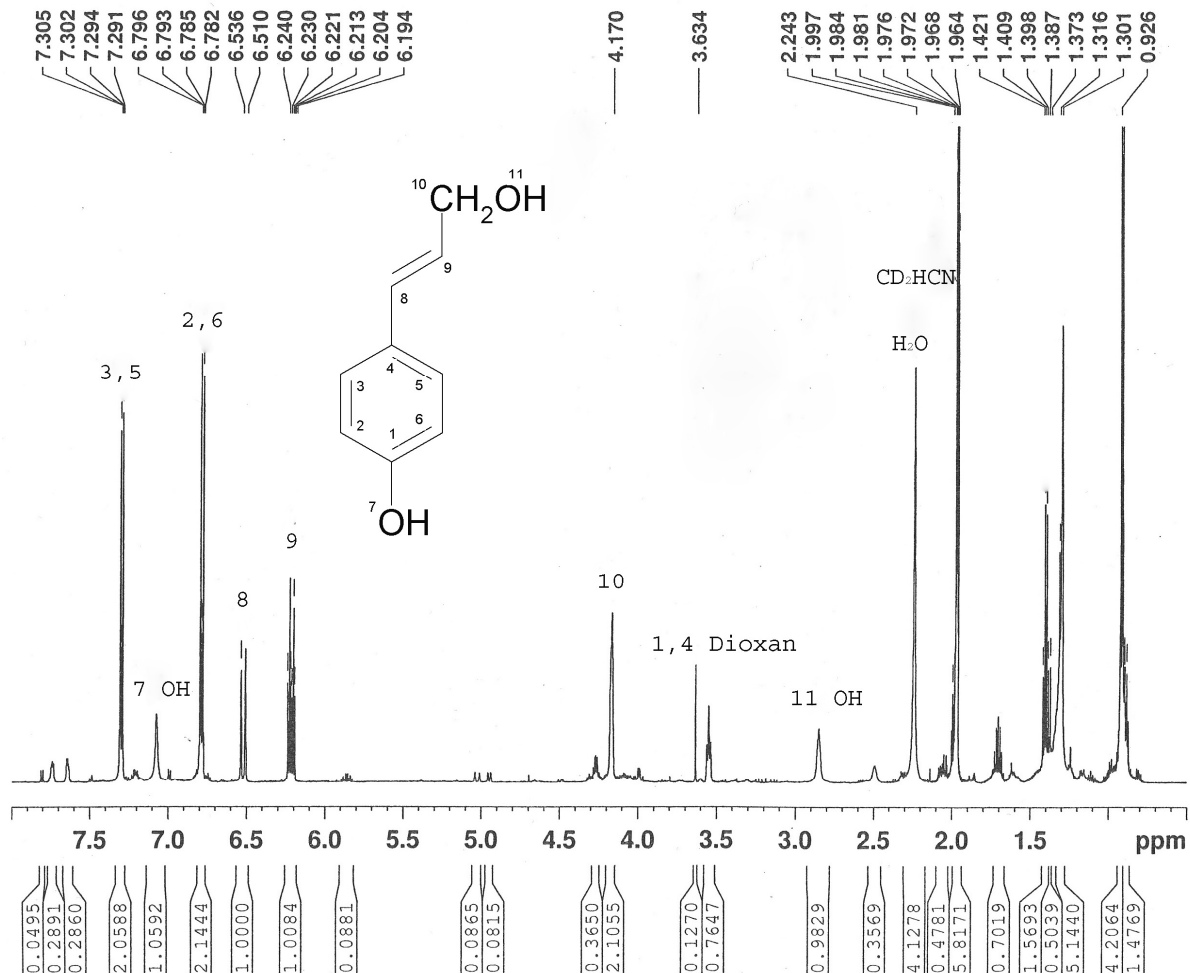


Abb. 4.15: ^1H -NMR Spektrum von p-Cumarylalkohol. p-Cumarylalkohol wurde enzymatisch unter Verwendung 4CL und CCR exprimierender Zellen synthetisiert und aus dem Kulturmedium durch Flüssig- und Festphasenextraktionsverfahren isoliert. Die Zuordnung der H-Atome zu den einzelnen Signalen des Spektrums erfolgte am Fraunhofer ITEM.

4.5. Koexpression von *Pc4CL*, *ZmCCR* und *ZmCAD*

Die Verknüpfung von Phenylpropanoid- und Ligninbiosynthese konnte durch Expression von *Pc4CL* und *ZmCCR* erfolgreich in *E. coli* etabliert werden (4.4.1.). Den Biosyntheseweg weiter zu vervollständigen beruhte auf der funktionalen Koexpression von *Pc4CL*, *ZmCCR* und *ZmCAD*. Dazu wurde zusätzlich zu pETDuet-*Pc4CL*-*ZmCCR* ein weiteres Konstrukt - pRSFDuet-*ZmCAD* - in *E. coli* BL21 transformiert. Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde *ZmCAD* mittels *EcoRI* und *XhoI* aus pET22b-*ZmCAD* ausgeschnitten. Das etwa 1100 bp große Fragment konnte dann in den mit *MfeI* und *XhoI* restringierten pRSFDuet-Vektor integriert werden, um das pRSFDuet-*ZmCAD* Konstrukt zu bilden. Das isoschizomere Enzym *MfeI* erzeugt die gleichen Überhänge wie *EcoRI*, nach Integration ist diese Schnittstelle je-

doch defekt. Doppeltransformanten, die mit pETDuet-*Pc4CL-ZmCCR* und pRSFDuet-*ZmCAD* transformiert waren, konnten auf entsprechenden Selektionsmedien kultiviert werden. Erhaltene transgene *E. coli* Zellen wurden ähnlich wie unter 4.4.2. beschrieben unter Zugabe der drei Säuren p-Cumarsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure kultiviert. Nach konstanten Zeitintervallen wurden Proben entnommen und die Zellen vom Medium separiert. Diese Zellüberstände wurden dann mittels HPLC analysiert (Daten nicht dargestellt). In diesen Versuchen konnte erneut gezeigt werden, dass es zwar nicht zwingend erforderlich ist die *ZmCAD* zusätzlich zu exprimieren, um den Alkohol zu generieren, dass es sich als vorteilhaft erwies die Reaktionskette durch zusätzliche Expression dieses Enzyms zu erweitern, da das Vorhandensein der *ZmCAD* den Umsetzungsprozess zum Alkohol beschleunigte. Die zusätzliche Expression der *ZmCAD* hatte zwar keine Auswirkungen auf die Produktmenge, bewirkte allerdings eine schnellere Akkumulation der entstehenden Alkohole.

4.6. Etablierung des vollständigen artifiziellen Biosyntheseweges in *E. coli*

Durch gleichzeitige Koexpression der Enzyme *RsTAL*, *Pc4CL*, *ZmCCR* und *ZmCAD* sollte es möglich sein ohne Zugabe von Vorstufen intrazellulär gebildetes Tyrosin durch die künstlich etablierte Enzymkaskade p-Cumarylalkohol zu produzieren und im Medium anzureichern. Dazu wurden die Duet-Vektoren derart konstruiert, dass auf dem pETDuet-Vektor die *RsTAL* und die *Pc4CL* sowie auf dem pRSFDuet-Vektor die *ZmCCR* und die *ZmCAD* gleichzeitig exprimiert werden konnten. Die Plasmidkarten der resultierenden Konstrukte - pETDuet-*RsTAL-Pc4CL* und pRSFDuet-*ZmCCR-ZmCAD* - sind im Anhang (8.3.) aufgeführt. Der mit diesen Konstrukten transformierte *E. coli* Stamm war dadurch mit genetischen Elementen ausgestattet, um den künstlichen Biosyntheseweg, startend mit der Desaminierung von Tyrosin durch die *TAL*, mündend in die Produktion von p-Cumarylalkohol durch reduzierende Wirkung von exprimierten Reduktasen und Dehydrogenasen, funktional aufzubauen. Nach Transformation der beiden genannten Konstrukte in *E. coli* BL21 wurden die erzeugten Doppeltransformanten auf entsprechenden Selektionsplatten kultiviert. Zusätzliche Absicherung wurde durch Kontroll-PCRs (3.2.2.) zum Nachweis der einzelnen ORFs erreicht. Um die Funktionalität des Biosyntheseweges zu prüfen, erfolgte die Kultivierung der Doppeltransformanten in Minimalmedium mit 2 % (v/v) Glycerin. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,0 wurden die Zellen unter Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Zur Proteinexpression induzierte Zellen wurden entweder mit 1 mM Tyrosin oder mit 1 mM p-Cumarat supplementiert. Eine weitere Kultur wurde ohne Zugabe von Vorstufen kultiviert, um zu prüfen, ob den Zellen die

intrazellulär verfügbare Menge an Tyrosin ausreicht einen detektierbaren Ertrag an p-Cumarylalkohol zu produzieren. 24 h nach Zugabe der Vorstufen wurden die Überstände dieser drei Zellkulturen nach Zellseparation durch HPLC analysiert.

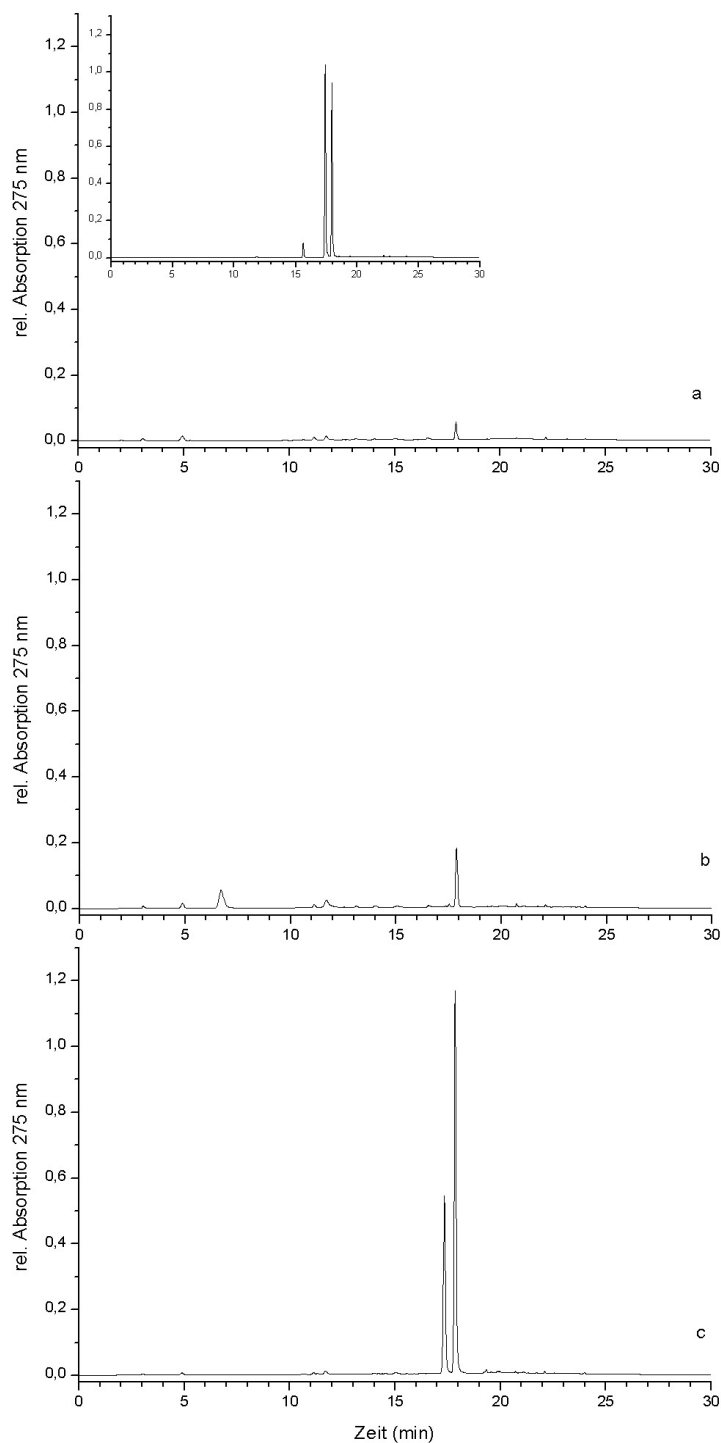


Abb. 4.16: HPLC-Analyse TAL, 4CL, CCR und CAD exprimierender Zellen. Die Zellen wurden mit 1 mM Tyrosin (b), 1 mM p-Cumarsäure (c) supplementiert oder ohne Zugabe von Substrat (a) kultiviert. Dargestellt sind die Proben nach 24 h Inkubation. Das zusätzliche Chromatogramm in (a) zeigt die Trennung von p-Cumarat ($R_t = 17,5$ min) und enzymatisch synthetisiertem p-Cumarylalkohol Standard ($R_t = 18,0$ min).

Deutlich zu beobachten war, dass alle drei Zellkulturen das gewünschte Reaktionsprodukt p-Cumarylalkohol ($R_t = 18,0$ Minuten) produzieren und ausschleusen. Damit wurde gezeigt, dass *E. coli* mit einem artifiziellen Biosyntheseweg zur Herstellung aromatischer Alkohole ausgestattet werden konnte. Die Etablierung des aus dem pflanzlichen Sekundärmetabolismus bekannten Stoffwechselweges in bakterieller Zellkultur wurde in dieser Form bislang nicht beschrieben.

Zellen, denen keine zusätzliche Vorstufe beigefügt wurde (Abb. 4.16, a), bildeten und sekretierten nur sehr wenig p-Cumarylalkohol. Das verwendete Minimalmedium enthielt neben Nährsalzen und Glycerin keine weiteren Zusätze, so dass wahrscheinlich der intrazelluläre Tyrosinpool die Produktbildung durch diese enzymatische Reaktionskette limitierte.

Die Fütterung mit 1 mM Tyrosin resultierte demgegenüber in einer etwas erhöhten Akkumulation an p-Cumarylalkohol im Medium (Abb. 4.16, b). Das Signal der Substanz, die nach 7 Minuten von der HPLC-Säule eluierte, konnte gefüttertem Tyrosin zugeordnet werden, allerdings absorbiert Tyrosin nur sehr schwach bei dieser Wellenlänge. Die Menge verfügbaren Tyrosins wurde zwar durch extrazelluläre Fütterung erheblich gesteigert worden, allerdings führte dies nicht zu einer deutlich erhöhten p-Cumarylalkohol Ausbeute. Dies konnte als Indiz gewertet werden, dass die niedrige Produktausbeute hierbei nicht mit der geringen Substratverfügbarkeit zusammenhing. Eine ineffiziente Tyrosinaufnahme konnte aber ausgeschlossen werden, wie aus den Versuchen zur *in vivo* TAL Aktivitätsbestimmungen hervorgeht (4.1.3.). Wurde der Biosyntheseweg allerdings um die Reaktion der *R*sTAL abgekürzt, was durch Zufütterung von p-Cumarsäure erreicht wurde, dann zeigte sich, dass die Ausbeute an p-Cumarylalkohol ($R_t = 18,0$ Minuten) im Vergleich sehr stark anstieg (Abb. 4.16, c). Die zuge setzte Säure ($R_t = 17,5$ Minuten) wurde durch Aktivitäten der 4CL, der CCR und der CAD zu p-Cumarylalkohol umgesetzt. Auch nicht umgesetzte Säure konnte nach 24 stündiger Inkubation im Medium nachgewiesen werden. Dies deutete auf eine mögliche Toxizität der p-Cumarsäure oder des p-Cumarylalkohols hin. Durch den direkten Vergleich der mit Tyrosin und p-Cumarsäure gefütterten Zellen wurde klar, dass eine geringe Reaktivität der Tyrosinammoniak Lyase aus *Rhodobacter sphaeroides* die Produktivität des gesamten Biosyntheseweges in hohem Maße limitiert. Die geringe Reaktivität der *R*sTAL kombiniert mit der intrazellulär begrenzten Verfügbarkeit von Tyrosin könnten die minimale Produktausbeute verdeutlichen, die bei Kultivierung von bakteriellen Zellen in Minimalmedium ohne Zugabe von zusätzlicher Tyrosinquelle erreicht wurden (Abb. 4.16, a).

4.7. Fermentation in LB-Medium

Die Funktionalität der rekombinant erzeugten Enzymkaskade zur Produktion von Monolignolen in *E. coli* konnte erfolgreich demonstriert werden (4.4.4.). Die fermentative Produktion dieser aromatischen Alkohole sollte diese Arbeit abschließen und Hinweise zur Produktivität des erzeugten *E. coli* Stammes liefern.

Um die Produktivität des rekombinanten Bakterienstammes zu prüfen wurden Zellkulturen, die mit den Konstrukten pETDuet-*RsTAL-Pc4CL* und pRSFDuet-*ZmCCR-ZmCAD* transformierte waren, in nährstoffreichen Komplexmedien kultiviert. Die Expression der zum Aufbau des Biosyntheseweges benötigten Enzyme wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG erreicht. Während einer ersten Hauptkultur keine zusätzlichen Vorstufen zugefügt wurden (Abb. 4.17), wurde eine zweite Bakterienkultur nach Induktion der Expression mit 1 mM p-Cumarsäure (Abb. 4.18) versetzt. Die weitere Inkubation erfolgte unter identischen Bedingungen. Um die Produktivität der beiden Kulturen zu analysieren, wurden in regelmäßigen Zeitintervallen Proben entnommen. Von diesen Proben wurde sowohl die Zelldichte bestimmt, als auch die Menge des im Kulturüberstand enthaltenen Reaktionsproduktes mittels HPLC gemessen.

Die Bildung messbarer Mengen an p-Cumarylalkohol TAL, 4CL, CCR und CAD exprimierender Zellen in LB-Medium ohne Zufütterung jeglicher Vorstufen begann 6 h nach Induktion der Expression (Abb. 4.16). Nach weiteren 14 h waren maximal 22 mg/l an p-Cumarylalkohol im Medium zu detektieren, bevor die Menge an detektierbarem Reaktionsprodukt in den folgenden 10 h wieder leicht abnahm. Die Zelldichte stieg über die gesamte Fermentationszeit stetig an, bis nach 30 h eine Zelldichte von $OD_{600} = 6$ erreicht wurde. Das deutete darauf hin, dass das Reaktionsprodukt in diesen Konzentrationen nicht inhibierend für das Wachstum der Zellen zu sein scheint. LB-Medium enthält Hefeextrakt (5 g/l) und Trypton (10 g/l) in hoher Dosis. Trypton als Bestandteil des Komplexmediums ist das Produkt tryptisch verdauter Proteine und enthält entsprechend viele Aminosäuren. Hefeextrakt ist ein Autolysat von Hefezellen, das ebenfalls reich an Peptiden und freien Aminosäuren ist und sich daher als Nährmedium eignet. Zellen, die in Komplexmedium wachsen, können entsprechend Aminosäuren aus dem Medium aufnehmen ohne sie selbst produzieren zu müssen, auch Tyrosin wird in LB-Medium enthalten sein. Im Vergleich erzeugten Fermentationen TAL, 4CL, CCR und CAD exprimierender Zellen in Minimalmedium mit 2 % (v/v) Glycerin ohne Zusatz von Vorstufen erwartungsgemäß kaum detektierbare Mengen an p-Cumarylalkohol (Daten nicht gezeigt).

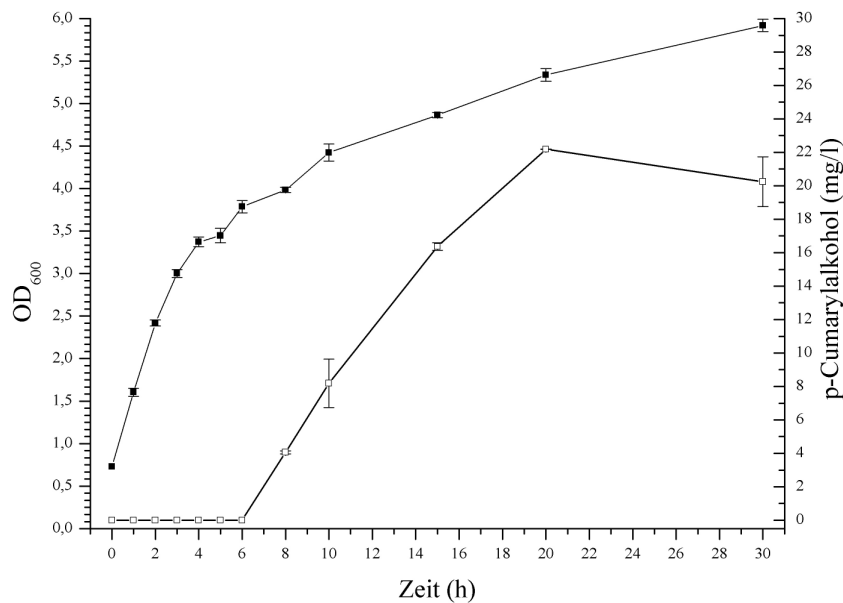


Abb. 4.17: p-Cumarylalcohol Biosynthese ohne Vorstufenzusatz. Dargestellt sind Ausbeuten an p-Cumarylalcohol TAL, 4CL, CCR und CAD exprimierender Zellen, sowie die Zelldichte über einen Zeitraum von 30 h ohne Zusatz von Vorstufen. Diese Versuchsreihe wurde als Triplikat durchgeführt, Standardabweichungen sind durch vertikale Balken gekennzeichnet. (■) Zelldichte OD₆₀₀, (□) Produktausbeute (mg/l).

Die Kultivierung und Fermentation TAL, 4CL, CCR und CAD exprimierender Zellen in LB-Medium (Abb. 4.18), das nach Induktion der Proteinexpression mit 1 mM p-Cumarat versetzt wurde, führte ebenfalls zu einer Akkumulation von p-Cumarylalcohol. Die Zugabe von p-Cumarsäure sollte den Biosyntheseweg um das Enzym *RsTAL* verkürzen, welches stark limitierend auf die Produktivität einwirkt (4.4.4.). Bereits 3 h nach Induktion und Zugabe von p-Cumarsäure konnte das Reaktionsprodukt im Medium nachgewiesen werden. Nach weiteren 17 h akkumulierte p-Cumarylalcohol bis zu einer Konzentration von 110 mg/l im Kulturmedium. Damit konnte der Ertrag um ein Fünffaches gesteigert werden, bevor auch hier die Menge detektierbaren Alkohols nach weiteren 6 h leicht abnahm.

Die Zelldichte stieg bis 6 h nach Induktion auf etwa 2,7 an und blieb für weitere 9 h konstant. 15 h nach Induktion nahm die Zelldichte langsam wieder ab. Obwohl die wachstumsinhibierende Wirkung von zugesetzter p-Cumarsäure erst bei Konzentrationen über 2 mM einsetzen soll (Watts et al., 2006a), scheint die Fütterung mit p-Cumarsäure das Wachstum zu beeinflussen. Möglicherweise ist der entstehende Alkohol in dieser Konzentration für die Zellen

toxisch. Die Abnahme der Zelldichte war allerdings nicht mit einer Abnahme an detektierbaren p-Cumarylalkohol verbunden.

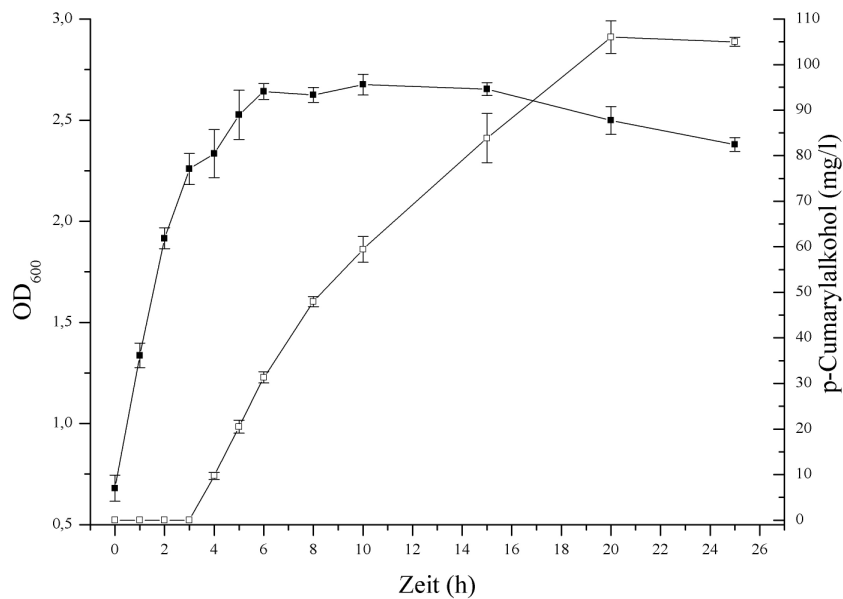


Abb. 4.18: p-Cumarylalkohol Biosynthese mit Vorstufenzusatz. Dargestellt sind Ausbeuten an p-Cumarylalkohol TAL, 4CL, CCR und CAD exprimierender Zellen, sowie die Zelldichte über einen Zeitraum von 25 h. Nach Induktion der Expression wurde p-Cumarat in einer Konzentration von 1 mM zugefügt. Diese Versuchsreihe wurde als Triplikat durchgeführt, Standardabweichungen sind durch vertikale Balken gekennzeichnet. (■) Zelldichte OD₆₀₀, (□) Produktausbeute (mg/l)

5. Diskussion

5.1. Biosynthese von p-Cumarat

Das erste Enzym des in *E. coli* zu etablierenden artifiziellen Biosyntheseweges stellt eine Tyrosinammoniak Lyase aus *Rhodobacter sphaeroides* (*RsTAL*) dar. Dieses Enzym desaminiert Tyrosin unter Freisetzung von p-Cumarsäure. *E. coli* verfügt in der Natur nicht über die genetische Konstitution Tyrosin katalytisch unter Freisetzung der dabei entstehenden Säure zu desaminieren. Die Integration dieses Enzyms in das bestehende Metabolom der Bakterienzelle sollte die Möglichkeit schaffen, den intrazellulären Tyrosinpool als Quelle für die p-Cumarsäurebildung zu nutzen.

In Zusammenarbeit mit B. Gilleßen (2009) konnte herausgestellt werden, dass der synthetische *RsTAL*-ORF aus dem von GenScript gelieferten Plasmid-Konstrukt isoliert und in den pETDuet-Vektor integriert werden konnte. Die Expression der *RsTAL* lieferte ausreichend viel Protein, um mit gereinigten Proteinen *in vitro* Aktivitätsanalysen durchzuführen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Inkubation bei niedrigeren Temperaturen (16 °C) mehr aktives Protein lieferte als die Inkubation bei höheren Temperaturen (37 °C). Die Proteinisolation bei 16 °C lieferte nach Aufreinigung Proteine in Konzentrationen bis über 1 µg/µl, während nach Aufreinigung aus bei 37 °C kultivierten Zellen nur maximal 0,1 µg/µl *RsTAL* isoliert werden konnte (Gilleßen, 2009). Die Bildung von „inclusion bodies“ konnte als Ursache für die geringe Proteinmenge jedoch ausgeschlossen werden. Inclusion bodies entstehen oft durch unkorrekte Proteinfaltung (Sorensen and Mortensen, 2005), gerade wenn hohe Proteinkonzentrationen im Cytoplasma von *E. coli* vorliegen. Mit aufgereinigten TAL-Proteinen wurden Experimente zur Bestimmung der *in vitro* Aktivität durchgeführt, die einen K_m -Wert von 120 µM für L-Tyrosin lieferten (Gilleßen, 2009). In der Literatur wurden mit Wildtyp-*RsTAL* ebenfalls kinetische Daten erzeugt, die dort angegebenen K_m -Werte schwanken sehr stark und werden zwischen 301 ± 48 µM (Schroeder et al., 2008), 60 µM (Xue et al., 2007) und $31,4 \pm 3,3$ µM (Watts et al., 2006b) angegeben. Als Ursache für die unterschiedlichen Aktivitäten in der Literatur wurden die eingesetzten Puffersysteme vermutet (Gilleßen, 2009). Zudem verwendeten Schröder und Watts jeweils Proteine mit His-Tag, ähnlich wie in diesen Studien, Xue hingegen arbeitete ohne His-Tag. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass keine einheitlichen kinetischen Daten über die *RsTAL* existieren. Tyrosinammoniak Lyasen (TAL), Phenylalaninammoniak Lyasen (PAL) und Histidinammoniak Lyasen (HAL) gehören der aromatischen Aminosäure Lyase Familie an. Diese Enzyme desaminieren die entspre-

chenden aromatischen Aminosäuren und bilden dabei ungesättigte trans-2,3 Propensäuren und Ammoniak. HALs und PALs sind im Gegensatz zu TALs weit in der Natur verbreitet und erfüllen verschiedenen Funktionen. HALs sind an der Histidindegradation beteiligt und desaminieren Histidin (Poppe and Retey, 2005), PALs aus Bakterien und Pflanzen desaminieren Phenylalanin und bilden dabei Zimtsäure, welches in Pflanzen zu anderen essentiellen Sekundärmetaboliten wie Cumarinen oder Flavonoiden (Winkel-Shirley, 2001), in Bakterien zu antibiotisch wirksamen Substanzen umgewandelt wird (Xiang and Moore, 2002; Williams et al., 2005). Im Gegensatz zu den genannten HALs und PALs sind TALs weniger weit verbreitet, man hat diese Enzyme bislang in *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodobacter sphaeroides* gefunden. In *Rhodobacter sphaeroides* dient die TAL vermittelte Tyrosin Desaminierung in erster Linie zur Bereitstellung von p-Cumarsäure, welche als Cofaktor zur Bildung eines photoaktiven gelben Proteins (PYP, photoactive yellow protein), einem Photorezeptor, dient (Cusanovich and Meyer, 2003). Einzigartig unter den aromatischen Aminosäure Lyasen ist, dass sich aus der wachsenden Polypeptidkette autokatalytisch durch Zyklisierung ein 3-er Loop aus dem Aminosäuremotiv Ala-Ser-Gly bildet, der als Cofaktor namens MIO (4-Methyliden-Imidazol-5-on) an der Desaminierung des eintretenden Substrates beteiligt ist (Baedeker and Schulz, 2002; Watts et al., 2006b). Weiterhin hat man konservierte Regionen gefunden, die bei der Selektion des umzusetzenden Substrates eine wichtige Stellung einnehmen. Jede der genannten aromatischen Ammoniak Lyasen ist spezifisch für ihr individuelles Substrat. TALs aus *Rhodobacter capsulatus* haben viel höhere Affinität zu Tyrosin als zu Phenylalanin, das sich nur durch eine Hydroxygruppe von Tyrosin unterscheidet (Kyndt et al., 2002). PALs aus *Arabidopsis thaliana* oder *Petroselinum crispum* bevorzugen die katalytische Desaminierung von Phenylalanin gegenüber Tyrosin (Appert et al., 1994; Cochrane et al., 2004). Unter vielen monokotyledonen Pflanzen findet man hingegen PALs, die bifunktional sind und sowohl Tyrosin als auch Phenylalanin desaminieren. Am deutlichsten konnte diese Bifunktionalität bei der PAL aus *Zea mays* nachgewiesen werden (Rosler et al., 1997), aber auch PALs aus Weizen, Reis oder Hefen sind bifunktional.

Die Bindung von Tyrosin in das aktive Zentrum des TAL Proteins aus *Rhodobacter sphaeroides* basiert auf der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe des eintretenden Tyrosinmoleküls und einem Histidinrest an Position 89 des Proteins. Modifikationen der TAL aus *Rhodobacter sphaeroides* konnten zeigen, dass ein Austausch des His89 gegen Phenylalanin die Substratspezifität dieses Proteins veränderte (Louie et al., 2006; Watts et al., 2006b). Durch eine einzelne Punktmutation konnte ein Substratswitch er-

reicht werden mit der Folge, dass die Tyrosinammoniak Lyase vollständig in eine Phenylalaninammoniak Lyase umgewandelt wurde.

Ergebnis einer sehr ähnlichen Studie an TAL-Mutanten war, dass durch Austausch des His89 gegen Asp89, Asn89, Gln89, Met89 und Thr89 bei entsprechenden Proteinen ein umgekehrter Effekt beobachtet wurde, die TAL-Mutanten entwickelten Aktivität für Phenylalanin. Besonders der Austausch gegen Gln89 resultierte in einer sehr guten PAL-Aktivität. Bei Austausch gegen Glu89, Ser89, Tyr89 und Pro89 konnte keine Aktivität mehr detektiert werden (Gilleßen, 2009). Dies zeigte, dass durch geeignete Substitution der Aminosäure His89 auch innerhalb der TAL die Substrataffinität verändert werden kann. Wurde die Aktivität der Mutanten für Tyrosin bestimmt, konnte keine Verbesserung beobachtet werden, lediglich die Wildtyp TAL akzeptierte Tyrosin als Substrat, die übrigen Mutanten zeigten nur noch sehr geringe Aktivitäten.

Nach den *in vitro* Studien wurde die Aktivität der RsTAL innerhalb der Zelle untersucht. Dazu wurde das pETDuet-RsTAL Konstrukt in *E. coli* ER2566 transformiert und die Proteinexpression der rekombinanten RsTAL induziert, gleichzeitig wurden die induzierten Zellen mit 1 mM Tyrosin gefüttert. Das Temperaturoptimum der TAL liegt bei 35 °C (Kyndt et al., 2002), die Zellen wurden aber zur Proteinexpression bei 37 °C inkubiert, obwohl bekannt war, dass bei erhöhten Temperaturen im Vergleich zu niedrigeren Temperaturen weniger TAL-Protein gebildet wird. Trotz dieser Einschränkung zeigten die über HPLC analysierten Zellüberstände sehr deutlich, dass p-Cumarat, das Reaktionsprodukt der intrazellulären TAL-Umsetzung in gut detektierbaren Mengen ins Kulturmedium ausgeschleust wird. Dies konnte herausstellen, dass die RsTAL Tyrosin bevorzugt umsetzt. Eine Desaminierung intrazellulär vorliegenden Phenylalanins hätte zu der Akkumulation von Zimtsäure geführt, die nicht als weiteres Reaktionsprodukt nachgewiesen werden konnte. Die Aufnahme des Tyrosins, die Desaminierung durch die RsTAL und die Ausschleusung des Reaktionsproduktes scheinen sehr effizient ineinander zu greifen. Zugewetztes Tyrosin muss aus dem Medium in die Zelle gelangen, um intrazellulär TAL vermittelt desaminiert zu werden. Bei hohen extrazellulären Tyrosinkonzentrationen ist zu geringen Teilen eine passive Diffusion entlang des Gradienten über die Zellmembran zu erwarten, ein aktiver Transportprozess würde intrazelluläre Verfügbarkeit des Substrates rasch steigern. Dass es in *E. coli* spezifische Transportsysteme für aromatische Verbindungen gibt, ist grundlegend erforscht. Transportmechanismen für aromatische Verbindungen wurden schon von Upgraff (1949) vermutet, später hat man allgemeine

aromatische Aminosäure Permeasen (aroP), aber auch spezifische Permeasen für Phenylalanin (pheP) und Tyrosin (tyrP) gefunden und identifiziert (Diaz et al., 2001). Unklar ist, ob das Produkt der TAL vermittelten Umsetzung über die gleichen Transportproteine aus der Zelle ins Medium geschleust wird. Möglicherweise folgt der Ausstrom des Reaktionsproduktes ebenfalls zu geringen Teilen einem passiven Transport. Eine Degradation von p-Cumarat konnte nicht festgestellt werden, die Messergebnisse weisen deutlich darauf hin, dass das Reaktionsprodukt im Medium anreichert wird.

Das Ziel Kulturen zu erzeugen, die ohne Zusatz von Tyrosin aromatische Alkohole produzieren, könnte durch einen niedrigen intrazellulären Tyrosinpool limitiert werden. Aromatische Aminosäuren werden über den Shikimatweg (Bentley, 1990; Herrmann, 1995) gebildet. Die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan ist ausführlich untersucht, wobei die einzelnen Reaktionsschritte der Biosynthese komplexen Regulationsmechanismen (Sprenger, 2007) unterliegen. Der initiale Schritt der aromatischen Aminosäurebiosynthese basiert auf der Kondensation von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat zu 3-Desoxy-d-Arabinoseheptulose-7-Phosphat (DAHP) durch DAHP-Synthasen. In *E. coli* gibt es drei DAHP-Synthase Isoformen, die als AroF (Tyrosin sensitive DAHP-Synthase), AroG (Phenylalanin sensitive DAHP-Synthase) und AroH (Tryptophan sensitive DAHP-Synthase) bezeichnet werden (Pittard, 1996). DAHP wird weiter über Shikimsäure zu Chorismat umgesetzt. Eine bifunktionale Chorismat Mutase/Prephenat Dehydratase (PheA) ist für die Bildung der aromatischen Aminosäuren zuständig. Tyrosin und Phenylalanin inhibieren als mögliche Endprodukte dieser Reaktionskette die DAHP-Synthase-Isoformen AroF und AroG und damit ihre eigene Biosynthese mit der Folge, dass der intrazelluläre Tyrosinlevel niedrig ist. Diese Art der Hemmung wird allgemein als Feedback Inhibition bezeichnet. Gentechnische Eingriffe in die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren konnten diese Inhibition aufheben. Die Erzeugung Feedback resistenter Mutanten diente der Generierung von Stämmen, die sich beispielsweise zur biotechnologischen Herstellung von L-Phenylalanin eignen (Ikeda, 2006). Eine Entthemmung der Tyrosinbiosynthese könnte entsprechend für einen gesteigerten Tyrosinspiegel innerhalb der Zelle sorgen und dadurch die Produktivität erhöhen. Dem gegenüber steht, dass vermutlich bei einer erfolgreichen Installation des gesamten Monolignolbiosyntheseweges das Gleichgewicht auf der Seite des gewünschten p-Cumarylalkohols liegt und daher die intrazelluläre Tyrosinkonzentration aufgrund des Fluxes hin zum Reaktionsprodukt niedrig bleiben wird.

Dadurch könnte der künstlich erzeugte Stoffwechselweg in *E. coli* selbst regulierend wirken, wodurch die Problematik der Feedbackinhibition teilweise entschärft würde.

5.2. Aktivierung aromatischer Säuren

Bei der Installation des künstlichen Biosyntheseweges zur Gewinnung aromatischer Alkohole in *E. coli* folgte nach Integration der Tyrosinammoniak Lyase die funktionelle Bereitstellung einer p-Cumarat:CoA Ligase aus *Petroselinum crispum*. Das aus der TAL-Reaktion resultierende Produkt soll intrazellulär durch Aktivität dieser CoA Ligase zu einem Thioester aktiviert werden. Die Aktivierung aromatischer Säuren wird in Pflanzen in erster Linie dazu genutzt, um wichtige Sekundärmetabolite zu generieren, die in die Flavonoid- und Monolignolbiosynthese münden. Die aus diesen Sekundärmetabolismen hervorgehenden Substanzen spielen für das Wachstum, die Entwicklung, die Bestäubung durch Insekten oder die Pathogenabwehr eine wichtige Rolle und sind für die Pflanze essentiell. Die p-Cumarat:CoA Ligase katalysiert in pflanzlichen Zellen die Aktivierung der p-Cumarsäure, der Kaffeesäure und der Sinapinsäure zu den entsprechenden Thioestern. Der katalytische Prozess besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Erst wird ein Cumaryl Adenylat Intermediat gebildet, welches nachfolgend zum CoA Ester konvertiert wird (Schneider et al., 2003). *Escherichia coli* besitzt natürlicherweise nicht die genetische Konstitution Cumarsäure zu aktivieren.

Die Versuche zur Expression rekombinanter p-Cumarat:CoA Ligase aus *Petroselinum crispum* in *E. coli* zeigten, dass dieses pflanzliche Enzym in Bakterien exprimiert wird. Nach Expression und Aufreinigung der auf dem pETDuet-*Pc4CL* (MCSI) kodierten *Pc4CL* konnte im SDS-Gel gezeigt werden, dass Proteine einer Größe von 62 kDa inklusive His-Tag isoliert werden konnten. Aufgereinigte Proteine setzten in Enzymtests, die wie von Knobloch (Knobloch and Hahlbrock, 1975, 1977) beschrieben durchgeführt wurden, sehr effizient p-Cumarsäure zu p-Cumaryl-CoA um. Die Detektion des bei der Reaktion entstehenden Thioesters erfolgte dabei photometrisch. Neben p-Cumarsäure wurde auch p-Aminozimtsäure, ein in p-Stellung aminosubstituiertes Derivat der p-Cumarsäure, in den Enzymtests eingesetzt. Die photometrischen Enzymassays lieferten deutliche Hinweise, dass sowohl p-Cumarsäure als auch das unnatürliche Substrat p-Aminozimtsäure zu den entsprechenden Thioestern aktiviert werden. Um dies zu beweisen einerseits und um die entsprechenden Thioester für die Untersuchung der CCR-Aktivität in größerer Menge bereitzustellen andererseits, wurde die rekombinante p-Cumarat:CoA Ligase aus *Petroselinum crispum* in

größerem Maßstab aufgereinigt und anschließend für die enzymatische Produktion der Thioester genutzt. Eine Aufreinigung der Thioester durch Festphasenextraktion nach Beuerle und Pichersky (2002) lieferte p-Cumaryl-CoA und p-Aminocinnamyl-CoA in hochreiner Form. Beide Substanzen zeigten jeweils zwei charakteristische Absorptionsmaxima. Die Reinheit der Substanzen äußerte sich in der Beobachtung, dass die HPLC-Messung der Lyophilisate bei den entsprechenden Absorptionsmaxima lediglich ein einzelnes Signal lieferte. Abschließend diente die Massenspektrometrie zur zweifelsfreien Identifikation der Thioester. Die MS-Analyse lieferte ein Molekulargewicht von 914,67 g/mol für p-Cumaryl-CoA als H^+ -Addukt, zusätzlich tauchte ein weiteres weitaus schwächeres Signal mit einem Molekulargewicht von 936,67 g/mol auf, das dem Na^+ -Addukt zuzuordnen war. Auch für p-Aminocinnamyl-CoA konnten zwei Hauptsignale festgestellt werden, die entsprechend als H^+ - (913,68 g/mol) und Na^+ -Addukt (935,68 g/mol) identifiziert wurden. Die Identifikation der Substanzen beruhte darauf, dass Fragmentmuster entsprechender Referenzen identisch waren, wobei die Fragmentierung der Referenzen lediglich simuliert wurde. Erst weitere Fragmentierungen und entsprechende Aufnahmen von MS-MS- sowie von MS-MS-MS-Spektren konnten die untersuchten Substanzen eindeutig verifizieren. Die Auswertung erfolgte im umweltanalytischen Laboratorium am Institut für Siedlungswasserwirtschaft durch Herrn Dr. Gebhardt.

In Pflanzen werden unterschiedlich methoxylierte Säuren wie Kaffeesäure, p-Cumarsäure und Sinapinsäure durch die 4CL zu den korrespondierenden Thioestern umgesetzt. Die Arbeitsgruppe um Knobloch (Knobloch and Hahlbrock, 1975, 1977) analysierte das Substratspektrum einer nativen 4CL aus *Petroselinum crispum* ausgiebig. Bei den untersuchten Substraten handelte es sich um die unhydroxylierte Zimtsäure, o-, m- und p-Cumarat, sowie Kaffeesäure, Ferulasäure und Sinapinsäure. Zusätzlich wurden noch mehrfach methoxylierte Substanzen in den Enzymtests verwendet. Ergebnis der kinetischen Studie war, dass die untersuchte Pc4CL in folgender Reihenfolge sinkende Substratspezifität zu den aufgeführten Substraten zeigte: p-Cumarat > Kaffeesäure > Isoferulasäure > m-Cumarat > Ferulasäure > o-Cumarat >> Zimtsäure (Knobloch and Hahlbrock, 1977). Der vergleichsweise hohe K_m -Wert für Zimtsäure und der niedrige K_m -Wert für p-Cumarat lassen vermuten, dass die Hydroxygruppe am aromatischen Ring scheinbar ein wichtiges Kriterium für die 4CL Umsetzung ist. Weiterhin konnte aus den kinetischen Daten geschlossen werden, dass in p-Stellung hydroxylierte Säurederivate bessere Substrate darstellen, als in m-Stellung und o-Stellung hydroxylierte Varianten.

Aus Arbeiten von Douglas (1987) und Lozoya (1988) geht hervor, dass in *Petroselinum crispum* zwei 4CL Isoformen vorkommen, die in ihrer Nukleotidsequenz zu 97-99 % identisch sind. Der Unterschied von lediglich 10 Nukleotiden verteilt sich über die gesamte Sequenz und führt zu nur drei Aminosäureaustauschen. Das deutet auf eine Duplikation der genetischen Information hin, die noch nicht allzu lange zurückliegen kann. Die hohe genetische Identität findet sich auch beim Substratspektrum der gefundenen Isoenzyme aus *Petroselinum crispum* wieder. Die Affinitäten der beiden Isoenzyme zu den untersuchten Substanzen waren nahezu gleich. Auch hier wurde die höchste Substratkonversionsrate für p-Cumarat gefunden, gefolgt von o-Cumarat. Im Vergleich zu p-Cumarat wurde Zimtsäure mit einer Konversionsrate von 19-21 % umgesetzt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten von Knobloch und Mitarbeitern. Aufgrund der identischen Sequenz und Substratspektren konnte davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Isoenzyme *Pc4CL-1* und *Pc4CL-2* zu ähnlich waren, um verschiedene möglicherweise gewebespezifische Aufgaben innerhalb der Phenylpropanoidbiosynthese zu erfüllen. Auch hier scheint die Hydroxygruppe in p-Stellung einen wichtigen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme zu haben. Mehr Klarheit über diese Beobachtungen konnte die Entwicklung neuer Techniken und Modellierungen am Computer schaffen, wie aus Arbeiten an *Arabidopsis thaliana* deutlich wurde. Dort hat man vier 4CL Isoformen identifiziert, *At4CL-1*, *At4CL-2*, *At4CL-3* und *At4CL-4* (Ehlting et al., 1999; Ehlting et al., 2001; Schneider et al., 2003; Hamberger and Hahlbrock, 2004). *At4CL-1* und *At4CL-3* zeigten *in vitro* hohe Konversionsraten mit p-Cumarsäure, Ferulasäure und Kaffeesäure. *At4CL-2* grenzt sich funktionell von diesen beiden Isoformen ab und bevorzugt Kaffeesäure vor p-Cumarsäure, die strukturell ähnliche Ferulasäure wird nicht umgesetzt. Zimtsäure ist ein schlechtes Substrat für alle drei Isoformen, Sinapinsäure wird überhaupt nicht aktiviert (Schneider et al., 2003). Im Gegensatz dazu hat man *in vitro* für *At4CL-4* abweichend von den übrigen Isoformen eine hohe Affinität zu Sinapinsäure und Ferulasäure gefunden (Hamberger and Hahlbrock, 2004). Zimtsäure und weitere Zimtsäurederivate, denen die Hydroxygruppe in p-Stellung fehlten, wurden auch von dieser Isoform kaum konvertiert. Vergleichende Sequenzanalysen konnten den Verwandtschaftsgrad der Isoformen untereinander herausstellen. Es zeigte sich, dass *At4CL-1* und *At4CL-2* nah miteinander verwandt sind, *At4CL-4* eher eine intermediäre Position hat, während *At4CL-3* strukturell am weitesten von den übrigen Isoformen entfernt ist.

Genaue Sequenz- und Modellanalysen der Isoformen haben herausstellen können, dass ein aus 12 Aminosäuren bestehendes Motiv die Substratdetermination der *At4CL* Isoformen be-

stimmt. Modifikationen der *At4CL-2* Isoform an bestimmten Positionen dieses Aminosäuremotiv (Val-355 und Leu-356) resultierten in einer Veränderung des Substratspektrums (Schneider et al., 2003). Aufgrund sterischer Behinderungen innerhalb der Substratbindungstasche von Wildtyp *At4CL-2* wird Ferulasäure und Sinapinsäure nicht konvertiert, es findet eine Art Größenausschluss statt, der eine Bindung dieser Substrate nicht zulässt. Wenn durch gezielte Mutation des genannten Aminosäuremotivs mehr Raum innerhalb der Substratbindungstasche von *At4CL-2* geschaffen wurde, führte das auch zu der Umsetzung von Ferulasäure und Sinapinsäure. Eine Erhöhung der Hydrophobizität durch derartige Eingriffe resultierte sogar in einer Akzeptanz von Zimtsäure.

Ähnliche Überlegungen und Erkenntnissen aus weiteren Modellierungen konnten zeigen, dass ein hochkonservierter Asn-256 Rest, der in allen 4CL Isoformen von *Arabidopsis thaliana* innerhalb des genannten Motivs vorzufinden ist, mit der 4-Hydroxygruppe der p-Cumarsäure oder anderen in p-Stellung hydroxylierten Derivaten interagiert und eine Wasserstoffbrücke ausbildet. Dies verdeutlicht, weshalb die nicht hydroxylierte Zimtsäure von allen drei Wildtyp 4CL Isoformen nur schlecht umgesetzt wird.

Die in dieser Arbeit beschriebene Umsetzung von p-Cumarsäure und p-Aminozimtsäure durch die rekombinante 4CL aus *Petroselinum crispum* könnte basierend auf diesen Ergebnissen gut erklärt werden. Dass die in p-Stellung aminosubstituierte Säure ebenfalls durch Aktivität der 4CL zu einem aminosubstituierten Thioester umgewandelt wurde, zeigt in diesem Fall, dass eine Hydroxygruppe in p-Stellung nicht ausschließliche Bedingung für eine Katalyse durch die rekombinante 4CL aus *Petroselinum crispum* ist. Ähnlich wie das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe des eintretenden p-Cumarates verfügt auch das Stickstoffatom der Aminogruppe der eintretenden p-Aminozimtsäure über eine hohe Elektronegativität und damit über die Fähigkeit eine Wasserstoffbrückenbindung innerhalb der Substratbindungstasche des Proteins auszubilden. Dies könnte bei der Substratdetermination in der katalytischen Domäne des Enzyms eine Rolle spielen.

Die beschriebenen Aktivitätstests und die Erfassung der Substratspektren beziehen sich ausschließlich auf *in vitro* Analysen. Lee (1996) konnte zeigen, dass die Substratspezifität zweier 4CL Isoenzymen aus *Nicotiana tabacum* von bestimmten internen Parametern beeinflusst wird. Die Klonierung der beiden genannten Isoenzyme aus Tabak und eine rekombinante Produktion dieser in *E. coli* lieferte aktive Proteine, die p-Cumarsäure, Ferulasäure und Kaf-

feesäure als Substrat akzeptierten, ähnlich wie die 4CL Isoformen aus Petersilie (Lozoya et al., 1988). Wurde die Aktivität derselben rekombinanten Enzyme hingegen in einem aus Tabak gewonnen Zellextrakt untersucht, so nutzten beide Enzyme effizient auch nicht hydroxylierte Zimtsäure. Daher wurde angenommen, dass posttranslational modifizierende Faktoren für die Suppression der Aktivität der rekombinanten Enzyme aus *E. coli* verantwortlich waren. Solche Faktoren scheinen die Aktivität der Enzyme innerhalb der lebenden Zelle zu dirigieren. Eine intrazelluläre Untersuchung der 4CL Aktivität in *E. coli* wurde aus verschiedenen Gründen nicht durchgeführt. Zum einen ist die Wahrscheinlichkeit, dass aktivierte Thioester als Produkte der intrazellulären 4CL-Umsetzung aus der Zelle geschleust werden, aufgrund des hohen gespeicherten Energiegehaltes in den Thioestern, sehr gering. Beispielsweise beträgt die freiwerdende Energie bei Hydrolyse von Acetyl-CoA -32,2 kJ/mol (Lehninger et al., 1998). Zum anderen werden gebildete Thioester von intrazellulären Thioesterasen abgebaut (Beuerle and Pichersky, 2002). Aus den genannten Gründen wurde alternativ eine *in vitro* Kopplung von *RsTAL* und *Pc4CL* analysiert. Dabei zeigte sich, dass beide Enzyme in aufgereinigter Form gut miteinander kooperieren. Die *RsTAL* desaminierte zugesetztes Tyrosin zu p-Cumarat, welches als Substrat für die p-Cumarat:CoA Ligase diente und durch diese zum Thioester aktiviert wurde. Die Bildung des Thioesters wurde durch photometrische Messung bei entsprechender Wellenlänge verfolgt. Der Reaktionsverlauf bei der photometrischen Messung deutete auf eine Limitierung durch die TAL vermittelte Desaminierung des Tyrosins hin. Zunächst änderte sich die Absorption, die auf der Bildung des Thioesters basierte, nur sehr langsam. Die TAL musste zugesetztes Tyrosin erst desaminieren, bevor das Produkt dieser Umsetzung durch die CoA-Ligase zum Thioester umgewandelt werden konnte. Bei weiterem Reaktionsverlauf änderte sich die Absorption rascher, was an einem steileren Kurvenverlauf zu erkennen war. Diese Beobachtungen waren für den weiteren Verlauf der Arbeit von hoher Bedeutung, da diese Enzyme wichtige Schnittstellen des artifiziellen Monolignolbiosyntheseweges in bakterieller Zellkultur darstellen.

5.3. Analyse von *ZmCCR* und *ZmCAD*

Bei den letzten Enzymen, die benötigt wurden, um den Biosyntheseweg zur Produktion aromatischer Alkohole in *E. coli* zu verwirklichen, handelte es sich um eine Cinnamoyl-CoA Reduktase (CCR) und eine Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase (CAD) aus *Zea mays*. Die Cinnamoyl-CoA Reduktase ist in Pflanzen ein wichtiges Enzym, das die Konversion von Cinnamoyl-CoA Estern zu den entsprechenden Aldehydstufen katalysiert. In einem weiteren

sich anschließenden Schritt werden die Aldehydstufen letztlich durch eine Dehydrogenase zum Alkohol reduziert. Diese reduzierten Alkoholformen werden als Monolignole radikalisch in das bestehende Ligninpolymer integriert. Die CCR ist das Eingangsenzym der pflanzlichen Monolignolbiosynthese und stellt eine Art Kontrollpunkt dar, der den Kohlenstofffluss hin zum Lignin reguliert (Lacombe et al., 1997). Viele Versuche zur Veränderung der Ligninzusammensetzung wurden daher an diesem Enzym vorgenommen. Die Ligninbiosynthese herabzusetzen und dadurch den Ligninanteil zu verändern, wurde vielfach durch Herunterregulierung der CCR untersucht (Anterola and Lewis, 2002). Versuche dazu in *Solanum lycopersicum* L. (Tomate) hatten einen starken Einfluss auf den Ligningehalt. In den entsprechenden transgenen Tomatenpflanzen war der Ligningehalt in vegetativen Pflanzenorganen bis zu 20-35 % niedriger als in den Kontrollpflanzen (Van der Rest et al., 2006). In den Früchten hingegen konnte der Ligningehalt aus technischen Gründen nicht quantifiziert werden. Demgegenüber steht, dass der Gehalt an löslichen phenolischen Komponenten in Stengeln und Blättern der transgenen Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen anstieg. Das deutete darauf hin, dass der ungenutzte Pool an Ligninvorstufen, hervorgerufen durch den genetischen Eingriff, innerhalb der transgenen Pflanze zur Synthese anderer phenolischer Substanzen verwendet wurde. In den Früchten war dies nicht der Fall, wahrscheinlich weil dieses Organ kaum lignifiziert. Ähnliche Ergebnisse wurden mit *Arabidopsis thaliana* erreicht (Goujon et al., 2003), in transgenen *Nicotiana tabacum* Pflanzen war der Ligningehalt sogar 50 % niedriger als in den Kontrollpflanzen, wenn eine Herunterregulierung der CCR vorgenommen wurde (Piquemal et al., 1998). Diese Beispiele zeigen, welche wichtige Stellung dieses Enzym innerhalb der pflanzlichen Ligninbiosynthese einnimmt und unterstreichen die Kontrollfunktion dieses Enzyms bei der Regulation der Monolignolbiosynthese in Pflanzen. Eine Cinnamoyl-CoA Reduktase ist in *E. coli* natürlicherweise nicht vorhanden. *Zea mays* wurde als Spenderstamm verwendet, um das genannte Enzym aus diesem Organismus in *E. coli* rekombinant herzustellen. In *Zea mays* hat man für die Reduktase zwei Isoformen, *ZmCCR1* und *ZmCCR2*, gefunden (Pichon et al., 1998). *ZmCCR1* ist als weitverbreitete Form in vielen Pflanzenorganen an dem Lignifizierungsprozess beteiligt, die Funktion von *ZmCCR2*, welche ausschließlich in Wurzeln vorzufinden ist und nur zu geringen Mengen exprimiert wird, ist noch ungeklärt. Das in der Arbeit mit *ZmCCR* bezeichnete und in *E. coli* exprimierte Enzym entspricht sequentiell und funktionell der *ZmCCR1* Isoform. Die *ZmCCR* konnte in *E. coli* erzeugt und mittels Affinitätschromatographie in aktiver Form isoliert werden. Aus der Abbildung des SDS-Gels und des Westernblots (Abb. 4.8) geht hervor, dass die isolierten Enzyme ein Molekulargewicht von 42 kDa aufweisen und in gut detektierbaren

Mengen aus den Bakterienzellen isoliert werden können. Da Cinnamoyl-CoA Ester, die natürlichen Substrate der pflanzlichen *ZmCCR*, kommerziell nicht erhältlich waren, musste p-Cumaryl-CoA für die *in vitro* Aktivitätsmessungen der *ZmCCR* enzymatisch unter Verwendung der rekombinanten 4CL aus *Petroselinum crispum* synthetisiert werden. Die Aufreinigung der entstandenen Thioester nach Beuerle und Pichersky (2002) lieferte reines p-Cumaryl-CoA, welches als Substrat in Enzymtests für die rekombinante *ZmCCR* verwendet werden konnte. Die Aktivität der aufgereinigten *ZmCCR* Enzyme wurde nach Lüderitz und Grisebach (1981) bestimmt. Das in dem Enzymtest eingesetzte p-Cumaryl-CoA besitzt zwei Absorptionsmaxima, eines davon liegt bei 333 nm das zweite liegt bei 262 nm. Die Abnahme der Absorption bei 333 nm während der Enzymtests wurde als Ergebnis aktiv isolierter Reduktasen gewertet. Auf die Erzeugung kinetischer Daten wurde verzichtet, da zum einen der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Erstellung eines artifiziellen Biosyntheseweges in bakterieller Zellkultur zu sehen ist und zum anderen genügend Veröffentlichungen über die Erstellung kinetischer Daten zur Verfügung stehen.

Auch das letzte Enzym des zu etablierenden Stoffwechselweges, eine Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase (CAD) aus *Zea mays*, spielt in Pflanzen eine wichtige Rolle, da die Reaktion dieses Enzyms letztlich die Monolignole liefert, die im Weiteren mittels radikalischer Polymerisierungsreaktionen innerhalb der Zellwand in das bestehende Ligninmakromolekül integriert werden. Neben der bedeutenden Rolle für die Lignifizierung der Zellwände hat dieses Enzym eine weitere wichtige Funktion bei der pflanzlichen Pathogenantwort (Kiedrowski et al., 1992; Tronchet et al., 2010). Die Bildung von Lignin während der Pflanzen-Pathogen Interaktion ist eine wichtige Funktion, da dadurch eine physische Barriere gegen eine Infektion aufgebaut wird. Gleichzeitig haben auch unpolymerisierte Monolignole eine antimikrobielle Wirkung. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass CAD-Proteine in *Arabidopsis thaliana* durch eine komplexe Genfamilie kodiert werden (Boerjan 2003, Sibout 2003). Exemplarisch wurden in *Arabidopsis thaliana* neun Mitglieder innerhalb der Genfamilie identifiziert. Sechs davon hatten katalytische Funktionen, die übrigen drei hatten sehr geringe Enzymaktivitäten (Kim et al., 2004). Daher lag die Vermutung nahe, dass einige CADs andere metabolische Funktionen besitzen. In weiterführenden neueren Experimenten konnte Tronchet (Tronchet et al., 2010) zeigen, dass namentlich CAD-C und CAD-D aus *Arabidopsis thaliana* essentielle Komponenten bei der Pflanzenabwehr gegen das bakterielle Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* sind. Eine Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase (CAD) ist ebenfalls in *E. coli* natürlicherweise nicht vorhanden. *Zea mays* wurde auch für dieses Enzym als Spenderstamm ver-

wendet, um die *ZmCAD* in *E. coli* rekombinant herzustellen. Die *ZmCAD* konnte in gut detektierbaren Mengen in *E. coli* erzeugt und mittels Affinitätschromatographie in aktiver Form isoliert werden. Die Abbildungen des SDS-Gels und des Westernblots (Abb. 4.10) zeigen deutlich, dass die isolierten Enzyme ein Molekulargewicht von etwa 42 kDa aufweisen. Bei der Bestimmung der *in vitro* Aktivität der rekombinanten *ZmCAD* wurde Coniferylaldehyd als Substrat eingesetzt. Die Abnahme der Absorption bei 340 nm wurde als Indiz aktiv isolierten Enzyms gewertet. Die Erzeugung kinetischer Daten wurde nicht beabsichtigt, da genügend Informationen diesbezüglich verfügbar sind.

5.4. *In vivo* Kopplung von *Pc4CL* und *ZmCCR*

Vor dem Hintergrund, dass alle vier Enzyme in aktiver Form aus *E. coli* isoliert werden konnten, galt es verschiedene Kombinationen der Proteine innerhalb der bakteriellen Zelle zu exprimieren und die Etablierung des gewünschten künstlichen Biosyntheseweges zu initiieren. Zu diesem Zweck wurde mit der Koexpression von *Pc4CL* und *ZmCCR* begonnen. Die intrazelluläre Bereitstellung der beiden genannten Enzyme versetzt die bakterielle Zelle in die Lage, vorausgesetzt die Funktionalität der Enzyme bleibt *in vivo* vorhanden, zugeführte Säuren zunächst durch rekombinante CoA-Ligase Aktivität zu Thioestern zu aktivieren. In der sich anschließenden Reaktion erfolgt die intrazelluläre Umsetzung zu Aldehyden, wenn die rekombinante Reduktase in aktiver Form das zuvor entstandene *Pc4CL*-Produkt akzeptiert. Als Reaktionsprodukt wurden die korrespondierenden Aldehydstufen der eingesetzten Säuren erwartet. Intrazelluläre Thioesterasen könnten zwar den Abbau des entstehenden Thioesters hervorrufen (Beuerle and Pichersky, 2002), durch gleichzeitige Expression der beiden genannten Enzyme sollte jedoch das Reaktionsprodukt der ersten Reaktion direkt entzogen werden und als Substrat für die Umsetzung durch die Reduktase dienen. Dadurch sollten entstehende Thioester schnell dem möglichen Abbau durch Thioesterasen entzogen werden. Die Kultivierung der koexprimierenden Zellen in Komplexmedien wurde unter Zugabe von p-Cumarsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure vorgenommen. Die Fütterung mit p-Cumarsäure und Ferulasäure führte zu einer Akkumulation von Substanzen, die bei Vergleich mit den Retentionszeiten der Standards als Aldehyde identifiziert wurden und in der flüssigen Umgebung der Zelle akkumulierten. Dies bedeutete eine effektive Aufnahme über die Zellmembran, einen Umsatz der Säuren über die Thioester zum Aldehyd und die Ausschleusung der Reaktionsprodukte. Zusätzlich wurden im Medium aber auch die korrespondierenden Alkoholstufen (Vergleich mit Retentionszeit des Coniferylalkohols) der eingesetzten Säuren detektiert, ob-

wohl eine Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase zur spezifischen Reduktion der Aldehyde nicht exprimiert wurde. Weitere Versuche haben zeigen können, dass die zusätzliche Expression von *ZmCAD* eine Akkumulation von p-Cumarylalkohol und Coniferylalkohol im Medium beschleunigte. Experimente zur Klärungen für die Beobachtung, dass auch ohne Expression einer spezifischen Dehydrogenase Alkoholstufen identifiziert werden konnten, waren aus Zeitgründen nicht mehr zu realisieren. Vermutlich wurde diese Reaktion durch unspezifische intrazelluläre Dehydrogenaseaktivität hervorgerufen. Eine weitere interessante Feststellung war, dass Sinapinsäure als Substrat schlecht geeignet war. Dieses Substrat konnte nach einer Reaktionszeit von 4 h in scheinbar unveränderter Menge im Kulturmedium wiedergefunden werden. Die Beobachtung, dass die Fütterung der *Pc4CL* und *ZmCCR* exprimierenden Zellen mit Sinapinsäure nicht zu einer Akkumulation korrespondierender Aldehyd- und Alkoholstufen führte, deckt sich mit Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Untersuchungen mehrerer p-Cumarat-CoA Ligasen aus verschiedenen Angio- und Gymnospermen konnten herausstellen, dass die Affinität entsprechender Enzyme zu Sinapinsäure im Vergleich zu p-Cumarat und Ferulasäure sehr niedrig ist (Knobloch and Hahlbrock, 1977; Kutsuki et al., 1982; Lozoya et al., 1988; Ehling et al., 1999). Daher kann an dieser Stelle angenommen werden, dass die CoA-Ligase bei der Zugabe von Sinapinsäure limitierend wirkt und nicht die *ZmCCR*. Im Gegensatz dazu waren die Mengen an detektierbarer p-Cumarsäure und Ferulasäure nach 4 h Reaktionszeit infolge der Enzymaktivitäten verringert worden (Abb. 4.13). Widersprüchlich scheint jedoch zu sein, dass entgegen der Enzymmessungen von Knobloch und Mitarbeitern (Knobloch and Hahlbrock, 1977) bei diesen *in vivo* Untersuchungen die Umsetzung von Ferulasäure scheinbar schneller ablief, als die Umsetzung von p-Cumarsäure. Anlass zu dieser Annahme war, dass bei einer eingestellten Wellenlänge von 275 nm nach 4 h Reaktionszeit die Peakhöhe des entstehenden Coniferylaldehydes deutlich höher war als die des Cumarylaldehydes (Abb. 4.13). Gleichzeitig konnte auch festgestellt werden, dass die Konzentration des eingesetzten Substrates im Falle der Ferulasäure scheinbar stärker abgenommen hatte als die der p-Cumarsäure im gleichen Zeitintervall. Knobloch hatte in seinen Untersuchungen festgestellt, dass die *Pc4CL in vitro* eine höhere Affinität zu p-Cumarat hat als zu Ferulasäure. In diesen *in vivo* Versuchen scheint es umgekehrt zu sein. Ferulasäure scheint schneller über die Stufe des Thioesters und des Aldehyds zum Alkohol umgesetzt zu werden als p-Cumarsäure (Abb. 4.13). Möglicherweise liegt die Erklärung für diese Beobachtung bei der Aktivität der *ZmCCR*. Wenn die verwendete *ZmCCR* eine höhere Affinität zu Feruloyl-CoA hat als zu Cumaryl-CoA, so ist vermutlich auch die Geschwindigkeit, mit der der entsprechende Aldehyd und später auch der Alkohol im Medium akkumuliert

größer. Folglich wäre nach dieser Annahme nach 4 h Inkubationszeit mehr Coniferylalkohol als Cumarylalkohol zu detektieren, dies war auch der Fall. Beachtet man jedoch, dass Enzymkinetiken *in vitro* aufgenommen werden, wird klar, dass bei *in vivo* Untersuchungen andere Faktoren Einfluss auf Reaktivitäten einzelner Enzyme haben können. Wenn bei einer intrazellulären Reaktion ein toxisches Produkt entsteht, ist auch ein inhibierender Effekt auf die Enzymkette denkbar. Unter Umständen ist p-Cumarylalkohol toxischer als Coniferylalkohol, so dass sich die Akkumulation des p-Cumarylalkohols negativ auf den Allgemeinzustand der Zelle auswirkt. In Untersuchungen von Watts (Watts et al., 2006a) konnte diese Vermutung bekräftigend herausgestellt werden, dass p-Cumarsäure, also die korrespondierende Säure zum p-Cumarylalkohol, ab einer Konzentration von 2 mM negativen Einfluss auf das Zellwachstum hat. Auch die Expressionsrate der einzelnen Enzyme könnte bei der Umsetzung der Substrate eine Rolle spielen. Der pETDuet-Vektor, der bei diesen Expressionsstudien verwendet wurde, war derart konstruiert, dass die Expression der *Pc4CL* und der *ZmCCR* unter Kontrolle desselben T7-Promotors stand. Daher sollte die Expressionsrate beider Enzyme identisch sein. Auch die Überlegung, es handle sich um unterschiedlich stark gewachsene Kulturen, die sich in verschiedenen Wachstumsphasen befinden und daher möglicherweise voneinander differierende Proteinmengen produzieren, konnte als Ursache ausgeschlossen werden, da die Induktion der Proteinexpression ausgehend von einer Hauptkultur initiiert wurde. Die gewachsene Hauptkultur wurde erst nach Induktion und drei stündiger Inkubation in mehrere Kulturen aufgeteilt. Eine letzte mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass diese Abweichungen aufgrund der eingestellten Wellenlänge bei 275 nm zustandekommen. Diese Wellenlänge wurde gewählt, da in vorherigen Versuchen festgestellt werden konnte, dass Ferulasäure, Coniferylaldehyd und Coniferylalkohol voneinander differierende Absorptionsmaxima besitzen (Abb. 4.12). Die Säure und den Aldehyd hätte man besser bei 350 nm detektieren können, den Alkohol hingegen bei etwa 260 nm. Um alle drei Substanzen gleichzeitig zu erfassen, wurde der Kompromiss eingegangen, zu Gunsten einer besseren Absorption des Reaktionsproduktes bei 275 nm zu messen. Eine abschließende Erklärung für diese Ergebnisse kann an dieser Stelle nicht geliefert werden.

Diese ersten Versuche durch Koexpression von *Pc4CL* und *ZmCCR* den Aufbau des Monolignolbiosyntheseweges zu initiieren, konnten erfolgreich absolviert werden. Voraussetzung für diese Fütterungsversuche war, dass die Bakterienzelle gefütterte aromatische Verbindungen aufnimmt und die Reaktionsprodukte ins Medium ausschleust. Arbeiten von Watts (2004) konnten diesbezüglich herausstellen, dass über die Zellmembran von *E. coli*

hinweg eine Aufnahme und Ausschleusung aromatischer Verbindungen stattfindet. Es zeigte sich in diesen Untersuchungen, dass bis zu 95 % rekombinant entstandener Phenylpropanoide nach Ausschleusung im Medium wiederzufinden waren, der Transport muss also bidirektional stattfinden. Für Hydroxyphenylacetat, ein dem p-Cumarylalkohol gleichenden Derivat, das gegenüber p-Cumarylalkohol um ein C-Atom verkürzt ist, wurde z.B. HpaX als Transportprotein in *E. coli* identifiziert. HpaX kommt in einem als *hpa* und *hpc* bezeichneten chromosomalen Gencluster vor. Die einzelnen Enzyme des *hpa* und *hpc* Clusters sorgen dafür, dass 3-Hydroxyphenylacetat und 4-Hydroxyphenylacetat in die Zelle aufgenommen und durch Enzyme der Gencluster zunächst am Ring gespalten und schließlich zu Pyruvat und Succinat katabolisiert werden (Prieto et al., 1996; Prieto and Garcia, 1997). Eine Aufnahme von p-Cumarat durch die genannten HpaX Transportproteine kann in diesem Fall jedoch ausgeschlossen werden, da die verwendeten *E. coli* K12 Laborstämme das *hpa*-Cluster, auf dem auch dieses Transportprotein kodiert ist, nicht mehr besitzen. Auch andere Transporter aromatischer Verbindungen könnten an der Aufnahme von p-Cumarat und der Ausschleusung von p-Cumarylalkohol beteiligt sein. Das *mhp* Cluster in *E. coli* kodiert Gene, die zur Aufnahme und dem Abbau von 3-Hydroxyphenylpropionat dienen (Ferrandez et al., 1997), als Transportprotein wurde bei dieser katabolen Reaktionskette ein Proteins namens MhpT identifiziert. Um aktiv toxische Substanzen aus der Zelle zu transportieren besitzt *E. coli* sogenannte Effluxpumpen. Diese bestehen aus drei Komponenten (AcrAB-TolC System), die die innere und äußere Zellmembran durchdringen. Durch diesen Kanal kann die gramnegative Zelle chemische Verbindungen wie Antibiotika, Lösungsmittel und andere toxischen Stoffe transportieren (Zgurskaya and Nikaido, 1999; Ramos et al., 2002; Nicolaou et al., 2010). Welches Transportsystem die Translokation von p-Cumarat, Ferulasäure, p-Cumarylalkohol und Coniferylalkohol sowie die korrespondierenden Aldehyde über die Zellmembran ermöglicht, kann an dieser Stelle jedoch nicht abschließend beantwortet werden. Möglicherweise sind auch unspezifische Translokatoren am Transport beteiligt. Diesbezüglich könnte die Identifikation und Überexpression verantwortlicher Transportproteine in weiterführenden Experimenten die Effizienz des Transmembranübergangs verbessern. In pflanzlichen Zellen werden die Monolignole in glykosylierter Form vesikelvermittelt zur Zellwand transportiert und dort in den Apoplasten entlassen. Wie aber die Monomere aus der Zelle zum Apoplasten gelangen ist auch hierbei noch unklar.

Das Reaktionsprodukt der p-Cumarsäureumsetzung, welches durch Vergleich mit den eingesetzten Standards zunächst als p-Cumarylalkohol identifiziert wurde, hatte eine ähnliche Re-

tentionszeit wie der als Standard eingesetzte Coniferylalkohol. Da p-Cumarsäure zugefüttert wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass auch der korrespondierende Alkohol freigesetzt wurde. Obwohl sich Coniferylalkohol und p-Cumarylalkohol strukturell durch eine weitere Methoxygruppe unterscheiden (Abb. 1.3), hatten die Substanzen keine unterschiedlichen Retentionszeiten auf der Säulenmatrix (Abb. 4.13). Die Identifikation von p-Cumarylalkohol war daher zwingend erforderlich, um auch in sich anschließenden Fermentationen qualitative und quantitative Messungen vornehmen zu können. Aus diesem Grund wurde durch Koexpression von *Pc4CL/ZmCCR* und Fermentation im 10 Liter Maßstab unter Zugabe von p-Cumarsäure das aus dieser *in vivo* Reaktionskette hervorgehende Produkt aufkonzentriert, in geeignetem Lösungsmittel aufgenommen und chromatographisch getrennt. Die aufgetrennte Substanz wurde zur NMR-Auftragsanalyse verschickt. Als Ergebnis dieser NMR-Analyse stellte sich heraus, dass es sich bei der eingereichten Probe um p-Cumarylalkohol handelte. p-Cumarylalkohol wurde zu $2,97 \pm 10 \%$ mg/ml in der eingereichten Probe bestimmt. Allerdings waren noch weitere Stoffe in dieser Probe nachgewiesen worden. Restwasser, andere langkettige aliphatische Verbindungen, die nicht weiter identifiziert wurden, und deuteriertes Acetonitril waren in der Probe in untergeordnetem Maße enthalten. Auch wenn der isolierte p-Cumarylalkohol nicht absolut rein war, wurde basierend auf diesen Untersuchungen weiter gearbeitet werden. Diese Probe wurde von nun an neben p-Cumarsäure als Standard verwendet, da die zweifelsfreie Identifikation des p-Cumarylalkohols gegeben war. Die Konzentrationsangabe war für quantitative Messungen sich anschließender Fermentationen erforderlich.

5.5. Etablierung des vollständigen Monolignolbiosyntheseweges in *E. coli*

Basierend auf den Untersuchungen, die zeigten, dass es grundsätzlich in *E. coli* möglich ist pflanzliche Ligninbiosynthesegene zu exprimieren und in aktiver Form zu isolieren wurden zunächst *Pc4CL* und *ZmCCR* koexprimiert. Damit wurde gezeigt, dass diese für Pflanzen wichtige Schnittstelle zwischen Phenylpropanoidbiosynthese einerseits und Monolignolbiosynthese andererseits auch in bakterieller Zellkultur funktioniert (Abb. 4.13). Dadurch konnte ein Grundstein für den weiteren Aufbau des gesamten Biosyntheseweges gelegt werden. Die zusätzliche Bereitstellung einer Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase führte dazu, dass die Bildung des p-Cumarylalkohols beschleunigt werden konnte. Der letzte Schritt zur Etablierung des vollständigen Monolignolbiosyntheseweges bestand in der Kombination von *RsTAL*, *Pc4CL*, *ZmCCR* und *ZmCAD*. Dazu wurde *E. coli* BL21 mit den genetischen Elementen *pETDuet-RsTAL-Pc4CL* und *pRSFDuet-ZmCCR-ZmCAD* ausgestattet. Die

Koexpression aller vier Proteine sollte die bakterielle Zelle in die Lage versetzen Tyrosin zum gewünschten Reaktionsprodukt p-Cumarylalkohol umzusetzen. Um die Zellen nur mit dem Nötigsten zu versorgen, wurde zunächst Minimalmedium mit 2 % Glycerinzusatz eingesetzt. In allen Versuchen wuchsen die Zellen an, wurden zur Proteinexpression induziert und weiter kultiviert. 24 h später wurden die Zellüberstände analysiert. Im ersten Versuch zeigte sich, dass ohne Substrataddition p-Cumarylalkohol in geringer Konzentration produziert wurde (Abb. 4.16 a). Der zweite Versuch sollte die Ausbeute an p-Cumarylalkohol steigern, indem 1 mM Tyrosin nach Proteinexpression zugefügt wurde. Ebenfalls nach 24 h zeigte sich zwar, dass mehr p-Cumarylalkohol gebildet wurde, jedoch nicht in dem Maße wie man es erwartet hätte aufgrund der eingesetzten Tyrosinmenge (Abb. 4.16 b). Gleichzeitig kann eine ineffiziente Tyrosinaufnahme über die Zellmembran als Ursache für die geringe p-Cumarylalkohol ausbeute ausgeschlossen werden, da die Ergebnisse der *in vivo* Analyse der RsTAL (4.1.3.) dies widerlegt. Das deutete darauf hin, dass limitierende Faktoren innerhalb der etablierten Enzymkaskade die Produktausbeute beeinflussen. Erst im dritten Versuch konnte herausgestellt werden, dass das Enzym RsTAL den Biosyntheseweg limitiert. Durch Zugabe von p-Cumarsäure wurde die Reaktion der RsTAL umgangen. Die eingesetzte Säure wurde über den um die RsTAL verkürzten Reaktionsweg zu p-Cumarylalkohol umgesetzt. Zwar wurde die Säure nicht vollständig verwertet, p-Cumarsäure konnte nach 24 h noch im Medium detektiert werden, aber die Produktausbeute war deutlich erhöht gegenüber den beiden übrigen Versuchsansätzen (Abb. 4.16 a und b). Hierdurch konnte deutlich gezeigt werden, wie die Produktivität von den Aktivitäten der einzelnen Enzyme abhängt. Betrachtet man die *in vivo* Umsetzung von Tyrosin durch die RsTAL (Abb. 5.1), bei der schon nach drei Stunden Reaktionszeit ebenfalls in Minimalmedium p-Cumarsäure in gut detektierbaren Mengen vorzufinden war, erscheint es widersprüchlich, dass die geringe Ausbeute an p-Cumarylalkohol innerhalb der vollständigen Enzymkaskade durch die schwache Reaktivität der RsTAL begründet ist. Die Ergebnisse der genannten Versuchsreihe (Abb. 4.16 a-c) stellten die RsTAL jedoch deutlich als limitierenden Faktor heraus. *In vitro* wurde für dieses Enzym ein K_m -Wert von 120 μ M für L-Tyrosin ermittelt (Gilleßen, 2009). Unter vielen monokotyledonen Pflanzen gibt es hingegen PALs, die bifunktional sind und sowohl Tyrosin als auch Phenylalanin desaminieren. Diese Bifunktionalität konnte bei der PAL aus *Zea mays* nachgewiesen werden (Rosler et al., 1997). In den genannten Arbeiten wurde gefunden, dass ZmPAL K_m -Werte zwischen 19 und 41 μ M für L-Tyrosin lieferten. Vor diesem Hintergrund scheint die Möglichkeit ein ZmPAL anstelle der RsTAL zu verwenden, um Tyrosin zu desaminieren durchaus eine gute Alternative zu sein. Möglicherweise hätte man durch den Ersatz der

RsTAL gegen eine *ZmPAL* den Bottleneck eliminieren können, so dass die gesamte künstlich etablierte Enzymkaskade schneller und effizienter das Reaktionsprodukt akkumuliert. In Pflanzen hat man bezüglich der Effizienz herausgefunden, dass bestimmte Enzyme des Phenylpropanoidbiosyntheseweges als membranassoziierte Proteinkomplexe vorkommen und in enger Nachbarschaft durch „Metabolic channeling“ einen zügigen Stofffluss begünstigen (Rasmussen and Dixon, 1999; Winkel-Shirley, 1999). Um künstlich in *E. coli* die Generierung eines funktionalen Proteinkomplexes zu erzeugen, der eine schnelle und effiziente Weiterleitung genutzter Substrate und entstehender Intermediate sicherstellt, wäre die Herstellung von Fusionsproteinen denkbar. Die geeignete Kombination aktiver Domänen ist jedoch nicht trivial und setzt die Kenntnis der räumlichen Struktur beteiligter Proteine voraus. Insgesamt sind einige Ansätze möglich, die nach weiterer Validierung angestrebt werden können, um den etablierten Monolignolbiosyntheseweg zu optimieren. Die Arbeiten, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, dienten vorwiegend dem „proof of concept“. Die weiteren Möglichkeiten, die sich daraus entwickelten sind vielversprechend, konnten aber aufgrund der begrenzten Zeit nicht verfolgt werden.

Nachdem die Etablierung der vollständigen Reaktionskette *RsTAL-Pc4CL-ZmCCR-ZmCAD* die Produktion von p-Cumarylalkohol in *E. coli* BL21 ermöglichte, galt es die Zellen über einen Zeitraum von 24-30 h kontinuierlich zu kultivieren. Während dieser Fermentationen wurden die Zelldichte und die Produktausbeute bestimmt. Aus den Versuchen zuvor war bekannt, dass die *RsTAL* limitierenden Einfluss auf die Produktausbeute hat. Trotz dieser Erkenntnisse wurden zwei verschiedenen Fermentationen parallel gefahren. Die Fermentationen wurden in 5 l-Maßstab in Erlenmeyerkolben schüttelnd durchgeführt. Während eine Zellkultur ohne Zusatz von Substrat fermentiert wurde, wurde der zweiten Kultur nach Induktion der Proteinexpression p-Cumarsäure in einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt. Sonst wurden die Fermentationen unter identischen Bedingungen gehalten. Auffällig war zunächst, dass das Zellwachstum durch die Zugabe von p-Cumarsäure im Vergleich zur Kultur ohne Zugabe von Substrat stark inhibiert wurde. Während bei dem Ansatz ohne Vorstufenfütterung die Zellen eine OD₆₀₀ von fast 6,0 nach 30 h erreichten, so wurde bei dem Versuchsansatz mit Zugabe von p-Cumarsäure nur eine OD₆₀₀ von 2,5 erreicht, die Zelldichte nahm sogar nach etwa 15 h leicht ab. Im Gegensatz dazu wuchsen die Zellen ohne Substratzugabe weiter. Auch nach 30 h war das Zellwachstum nicht beendet, zwar war die Zunahme der Zelldichte nicht mehr so ausgeprägt wie in der exponentiellen Phase, aber die stationäre Phase war auch nach 30 h noch nicht erreicht. In diesem Zusammenhang muss jedoch darauf hingewiesen werden,

dass die Bestimmung der optischen Dichte sowohl lebende als auch abgestorbene Zellen umfasst. Eine Bestimmung der Lebendzellzahl wäre sicherlich hilfreich gewesen, um detaillierte Aussagen über das Zellwachstum machen zu können. Durch die zusätzliche Substrataddition konnte die Produktausbeute auf ein Fünffaches gesteigert werden, ohne Zugabe von Vorstufen wurden maximal 22 mg/l p-Cumarylalkohol produziert, die Addition von 1 mM p-Cumarsäure lieferte maximal 110 mg/l p-Cumarylalkohol. Dies stellte, wie sich schon in vorherigen Untersuchungen andeutete, die Reaktion der RsTAL als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Gesamtreaktion heraus.

Die kultivierten Zellen sind während der Fermentation verschiedenen Faktoren ausgesetzt, die jeweils negative Auswirkung auf die Organismen haben können. Ein erheblicher Stressfaktor stellt die mögliche Toxizität von Substrat und Produkt dar. Die Toxizität der zugegebenen p-Cumarsäure wurde bereits in früheren Arbeiten festgestellt (Watts et al., 2006a), allerdings wurde dort ein wachstumshemmender Effekt erst ab einer Konzentration von 6 mM beobachtet, 1-2 mM p-Cumaratzugabe hatte in dem Fall keine negativen Auswirkungen auf das Zellwachstum. Torres und Mitarbeiter (2007) haben vor diesem Hintergrund herausgefunden, dass die Permeabilität der Zellmembran von bestimmten Milchsäurebakterien besonders durch Hydroxyzimtsäuren wie p-Cumarat, Ferulasäure und Kaffeesäure beeinträchtigt wird. Es wurde eine erhebliche Steigerung des Phosphateffluxes aus der Zelle infolge einer Behandlung mit den genannten Säuren detektiert. Die Hydroxyzimtsäuren scheinen die Zellwände als membranaktive Substanzen derart zu beschädigen, dass die Zellmembranen löchrig werden und die chemosmotische Balance verloren geht. Möglicherweise spielen solche Effekte auch bei gramnegativen *E. coli* Zellen eine Rolle. Damit ließe sich auch erklären, weshalb das Zellwachstum bei Zufütterung von p-Cumarat vergleichsweise schwächer ausfällt.

Auch p-Cumarylalkohol könnte als entstehendes Reaktionsprodukt inhibierende Auswirkungen auf das Wachstum und die Fitness der Zellen haben. Unter Umständen ist p-Cumarylalkohol nicht nur für die Zellwände schädlich, sondern auch für die vier rekombinanten Proteine. Scheinbar hat p-Cumarylalkohol keine sichtbar negativen Effekte auf die Effizienz der Enzymkette *Pc4CL-ZmCCR-ZmCAD*, da gerade die Umgehung der RsTAL zu einer erhöhten p-Cumarylalkohol ausbeute führte. Tyrosin hemmt z.B. als Endprodukt innerhalb einer Feedbackinhibition die eigene Biosynthese (Sprenger, 2007). Möglicherweise hemmt p-Cumarylalkohol als Produkt dieser künstlichen Monolignolbiosynthese die RsTAL in ähnlicher Weise. Da die Produktausbeute bei Fütterung mit p-Cumarsäure bedeutend höher ausfiel,

gleichzeitig aber auch gezeigt wurde, wie schnell *in vivo* durch Zugabe von Tyrosin in *RsTAL* exprimierenden Zellen p-Cumarsäure akkumuliert werden konnte, verdichten sich diese Vermutungen. Klar zu sein scheint jedoch, dass in irgendeiner Weise die Reaktivität der *RsTAL* durch p-Cumarylalkohol beeinträchtigt wird. Um dieses Problem zu lösen, wäre es sinnvoll, das Reaktionsprodukt direkt aus der Fermentationsbrühe abzuziehen. Einerseits würden mögliche inhibierende Effekte dadurch verhindert, dass das Reaktionsprodukt nicht akkumuliert, gleichzeitig könnte dadurch das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des Produktes verlagert werden. Um das Reaktionsprodukt aus der Fermentationsbrühe zu entfernen, könnte man ein flüssiges Zweiphasensystem verwenden. Bei geeigneter Wahl des organischen Lösungsmittels könnte an der Grenzfläche zwischen der wässrigen und organischen Phase ein Übergang des gewünschten Produktes aus der wässrigen in die organische Phase erzwungen werden. In früheren Arbeiten wurde dieses Verfahren erfolgreich angewandt (Lee, 1998; Ben-Bassat et al., 2007). In den genannten Arbeiten wurde der Einfluss des Extraktionsprozesses auf die Produktausbeute in wässrig-organischen Zweiphasenkulturen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Überschichtung einer wässrigen Zellkultur mit Toluol eine kontinuierlich Extraktion von 4-Vinylphenol aus dem wässrigen Medium ermöglichte. Voraussetzung für diese Art der Extraktion ist die Löslichkeit der zu akkumulierenden Substanz in einem geeigneten organischen Lösungsmittel. Organische Lösungsmittel haben aber den Nachteil, dass sie oft lipophil sind und daher schädlich für Lipidmembranen sein können. Zellmembranen bestehen aus Lipiddoppelschichten, die von Proteinen durchsetzt sind. Die Wirkung von Alkoholen, Aldehyden und lipophilen Solventien auf Zellmembranen wurde in der Vergangenheit intensiv analysiert (Ingram, 1977; Bernal et al., 2007; Nicolaou et al., 2010). Diese Solventien interkalieren in die Membran und zerstören das Membranpotential. Eine der ersten Zellantworten auf solche Lösungsmittel ist die cis zu trans Isomerisierung der Phospholipide (Ramos et al., 2002; Nicolaou et al., 2010). Dadurch wird es der Zelle möglich durch dichtere Packung die Fluidität der Membran herabzusetzen. Hochkettige Alkohole und phenolische Substanzen bewirken, dass das Verhältnis von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren herabgesetzt wird (Weber and de Bont, 1996; Nicolaou et al., 2010). Die Möglichkeiten der Zelle auf solche Lösungsmittel zu reagieren und Toleranzen zu entwickeln, können jedoch nicht von Dauer sein. Auch wenn es im Falle der Zweiphasenextraktion nur an den Grenzflächen der beiden flüssigen Phasen zu einem Kontakt zwischen den Zellen und dem Extraktionsmittel kommt, kann die Zelle nicht dauerhaft dieser Stresssituation entgegen ohne Schaden zu nehmen.

Zusätzlich zur toxischen Belastung durch zugesetztes Substrat und entstehendes Reaktionsprodukt ist der Stoffwechsel der bakteriellen Zelle bedingt durch die gleichzeitige Expression von vier rekombinanten Enzymen stark beansprucht. Die Anwesenheit eines einzelnen Plasmides ruft schon eine Stressantwort in der Zelle hervor, sobald rekombinante Proteine hochgradig exprimiert werden (Hoffmann and Rinas, 2004). Auch die Anzahl der Plasmide (high-copy oder low-copy) wirkt sich auf den Allgemeinzustand der Zelle aus (Bailey, 1993). Die eingesetzten Plasmide pETDuet-*RsTAL-Pc4CL* und pRSFDuet-*ZmCCR-ZmCAD* kommen in mehreren Kopien pro Zelle vor. Während pETDuet laut Herstellerangaben zu 40 Kopien je Zelle vorkommt, ist pRSFDuet mit mehr als 100 Kopien pro Zelle vertreten. Einige rekombinant exprimierte Proteine können zudem den Wirtsmetabolismus direkt aufgrund spezifischer Proteineigenschaften beeinflussen. Generell stellt die Expression mehrerer rekombinanter heterologer Enzyme eine extreme Belastung für den Stoffwechsel dar (Sorensen und Mortensen 2005). Die zur Verfügung stehenden Ressourcen müssen demnach sowohl für den Metabolismus als auch für die hohen Expressionsraten der Fremd-DNA eingeteilt werden. Um dies bewerkstelligen zu können, wird in der Regel die spezifische Wachstumsrate zu Gunsten der Proteinexpression heruntergefahren (Dong et al., 1995; Hoffmann and Rinas, 2004), dies bedeutet gleichzeitig auch einen geringeren Biomassezuwachs. Durch rekombinante Proteinexpression wird die Proteinsynthese bedeutend erhöht, gleichzeitig werden „Houskeeping Genes“ und deren Proteinsynthese Maschinerie herunter reguliert (Hoffmann et al., 2002). Die Zellen sind dann vorwiegend mit der Proteinsynthese beschäftigt.

Die Abstimmung der Auswahl welche ORFs gemeinsam auf den genannten genetischen Elementen exprimiert wurden, war durch die zur Verfügung stehenden Schnittstellen bestimmt, so dass lediglich die oben aufgeführten Proteinkombinationen möglich waren. Messungen auf m-RNA Ebene zur Quantifizierung der Transkripte und zur Bestimmung der Expressionslevel hätten möglicherweise Aufschluss über die jeweiligen Proteinmengen innerhalb der Zelle liefern können, aus Zeitgründen wurden diese Experimente jedoch nicht durchgeführt. Die transiente Expression von Stoffwechselproteinen ist vor dem Hintergrund Stämme zu generieren, die zur Produktion bestimmter Targetmoleküle dienen, unbefriedigend. Nachteilig bei der transienten Expression ist, dass die plasmidvermittelte Expression nicht dauerhaft Bestand hat und dass die Zugabe von Induktoren erforderlich ist, um die Expression der gewünschten Gene zu gewährleisten. Die Zugabe von Antibiotika ist notwendig, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten und den Plasmidverlust möglichst zu verhindern. Die Integration der ORFs in das Genom der bakteriellen Zelle ist hingegen eine Möglichkeit dauerhaft stabil transgene

Bakterienzellen zu erzeugen. Dabei könnte die Verwendung geeigneter konstitutiver Promotoren aufeinander abgestimmte Expressionslevel bewirken. Es wäre auch denkbar eine Promotorbibliothek ausgehend von einem geeigneten Promotor derart zu generieren, dass bestimmte Sequenzabschnitte der Promotorregion genetisch modifiziert werden, um dadurch eine hohe Promotordiversität und eine erhöhte Promotorstärke zu erreichen. Alper und Mitarbeiter (Alper et al., 2005) konnten mittels error-prone PCR Veränderungen in Promotorsequenzen einführen, die zu der angesprochenen Veränderung der Promotoraktivität führte. In anderen Arbeiten (Jensen and Hammer, 1998) konnte in *Lactococcus lactis* durch Verwendung veränderter Promotorelemente das 400-fache an Aktivität im Vergleich zur ursprünglichen Promotorsequenz hervorgerufen werden.

Ein letzter Punkt, der im Rahmen der Diskussion über die Produktivität der generierten *E. coli* Stämme ein hohes Optimierungspotential verspricht, ist die Verwendung von speziell angepassten Wachstumsmedien. Betrachtet man die in dieser Arbeit erreichten Zelldichten während der Fermentationen, wird schnell klar, dass der Prozess bei weitem noch nicht optimiert ist. Die OD₆₀₀-Werte lagen zwischen 3 und 6, dies ist noch weit entfernt von Zelldichten industrieller Prozesse. In sogenannten Hochzelldichtefermentationen sind deutlich höhere Zelldichten zu erzielen. Beispielsweise werden in einem von der Firma Wacker etablierten Prozess namens DENSTEC Zellerträge für speziell veränderte *E. coli* K12 Stämme in Höhe von 50 g/L Kultur erreicht, das entspricht etwa einer OD₆₀₀ von 100. Um solche Zelldichten zu erreichen, müssen viele verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. Einerseits sind Wachstumskinetiken, Ertragskoeffizienten und Produktbildungskinetiken zu berücksichtigen, andererseits müssen speziell angepasste Wachstumsmedien verwendet werden, Temperatur und Belüftung der Prozessführung sind ebenfalls anzupassen. In die Entwicklung solcher industrieller Hochleistungsstämme fließen viele Jahre Forschung und Anwendungstests in der Praxis. Daher ist das Ziel solch hohe Zelldichten und Erträge zu erreichen im Rahmen dieser Arbeit, die als Machbarkeitsstudie ausgelegt war, nicht zu realisieren.

Insgesamt steckt in diesem Prozess, der erstmals den Aufbau eines künstlich in bakterieller Zellkultur etablierten Monolignolbiosyntheseweges beschreibt, sehr viel Entwicklungspotential, um daraus einen industriellen Prozess zu generieren. Wie innerhalb erster Arbeiten am Fraunhofer Institut für Chemische Technologie (ICT) herausgestellt werden konnte, scheint sich p-Cumarylalkohol in aufgereinigter und konzentrierter Form dazu zu eignen, Flüssigkristalle zu generieren, deren chemische und physikalische Eigenschaften jedoch noch weiter

untersucht werden müssen. Für Anwendungen im Bereich vom thermoplastischen Polymeren ist p-Cumarylalkohol allerdings ungeeignet.

6. Fazit

Ziel der Arbeit war es einen artifiziellen rekombinanten Biosyntheseweg in *E. coli* zu etablieren, der die Zelle dazu befähigt p-Cumarylalkohol zu produzieren. p-Cumarylalkohol stellt eines der drei Monolignole dar, die im Pflanzenreich als wesentliche Bestandteile des komplex aufgebauten Lignins gesehen werden. Lignin ist eines der am häufigsten vorkommenden natürlichen Biopolymere. Der chemische und enzymatische Abbau dieses Polymers liefert allerdings nur geringe Ausbeuten an aromatischen Monomeren für industrielle Zwecke. Zum einen ist dies durch die Vielzahl an entstehenden Nebenprodukten zu erklären, zum anderen ist wenig bekannt über lignocellulytische Proteomic. Aus diesem Grund war die Etablierung eines künstlichen Phenylpropanoidbiosyntheseweges zur Herstellung von p-Cumarylalkohol vielversprechend. Während diese Monolignole in pflanzlichen Zellen durch radikalische Reaktionen zu einem heterogen komplex aufgebauten Makromolekül polymerisiert werden, das letztlich zur Inkrustierung und damit weiteren Verhärtung der Zellwand dient, waren in *E. coli* aufgrund der bakteriellen Zellwandstruktur keine lignifizierenden Reaktionen entstehender Monolignole zu erwarten, so dass auch keine Verluste infolge eines Abfließens in andere Reaktionswege zu befürchten war.

Es wurden verschiedene Gene pflanzlichen und mikrobiellen Ursprungs genutzt, um einen chimären Stoffwechselweg in *E. coli* aufzubauen. Zunächst galt es die Enzyme einzeln hinsichtlich ihrer Exprimierbarkeit und Aktivität zu überprüfen. Beginnend mit der Klonierung und Expression einer TAL aus *Rhodobacter sphaeroides* wurde die Desaminierung von Tyrosin untersucht. Als Produkt der *in vitro* Umsetzung konnte p-Cumarat identifiziert werden. Die Kultivierung RsTAL exprimierender *E. coli* Zellen führte bei Zugabe von Tyrosin dazu, dass nach wenigen Stunden das Reaktionsprodukt p-Cumarat im Medium akkumulierte. Dies war der Grundstein des zu etablierenden Biosyntheseweges. Als nächstes wurde die enzymatische Umsetzung von p-Cumarat durch eine 4CL aus *Petroselinum crispum* vorgenommen. Die Aktivität und Exprimierbarkeit dieses Enzyms konnte bestätigen, was vielfach zuvor bereits untersucht wurde. Basierend auf der *in vitro* Aktivität der 4CL wurde für nachfolgende Untersuchungen p-Cumaryl-CoA enzymatisch hergestellt. Dieses war die Basis für die Aktivitätsanalyse des nachfolgenden Enzyms CCR aus *Zea mays*. Auch die CCR aus *Zea mays* konnte im Rahmen von Expressionsstudien und Aktivitätsmessungen in aktiver Form aus *E. coli* isoliert werden. Die enzymatische Reduktion des p-Cumaryl-CoA zu p-Cumarylaldehyd konnte diesem Enzym zugeordnet werden. Ebenfalls aus *Zea mays* wurde als letztes Enzym

eine Cinnamylalkohol Dehydrogenase in *E. coli* exprimiert und aktiv isoliert. Diese Ergebnisse waren bedeutungsvoll für das weitere Vorgehen im Rahmen dieser Arbeit. Nachdem alle relevanten Enzyme für sich gesehen enzymatisch aktiv waren, galt es den artifiziellen Biosyntheseweg durch Koexpression verschiedener Proteinkombinationen vollständig zu etablieren. Zunächst wurden *Pc4CL* und *ZmCCR* miteinander kombiniert. Um genügend Substrat zur Verfügung zu stellen, wurden p-Cumarsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure nach Induktion der Proteinexpression hinzugefügt. Kurze Zeit später wurden entsprechende Aldehyde im Medium nachgewiesen. Dies war zum einen der Beweis für die Funktionalität der Enzymkette und zum anderen zeigte dies, dass die Substrate durch die Zellmembran aufgenommen werden, intrazellulär enzymatisch umgesetzt und als Reaktionsprodukt aus der Zelle transportiert werden. Sinapinsäure wurde erwartungsgemäß nicht zu entsprechenden Produkten umgesetzt. Allerdings konnten im Medium auch die Alkoholstufen nachgewiesen werden, dies ist wahrscheinlich durch unspezifische Dehydrogenaseaktivität innerhalb der Zelle zu begründen. Im Anschluss daran wurden *Pc4CL*, *ZmCCR* und *ZmCAD* miteinander kombiniert. Ergebnis dieser Erweiterung der Enzymkette um die *ZmCAD* war, dass die Alkoholstufen schneller im Medium akkumulierten. Der vollständige Monolignolbiosyntheseweg basierte letztlich auf der Koexpression aller Enzyme. *RsTAL*, *Pc4CL*, *ZmCCR* und *ZmCAD* gemeinsam zu exprimieren, stattete die Zelle mit der Fähigkeit aus p-Cumarylalkohol aus Tyrosin herzustellen. Es konnte allerdings herausgestellt werden, dass die Reaktionskette durch die *RsTAL* limitiert wird. Dies ergaben Studien, in denen durch Zugabe von p-Cumarat die Reaktion der *RsTAL* umgangen wurde. Entsprechend waren die Produktausbeuten an p-Cumarylalkohol gesteigert gegenüber den Ausbeuten bei Zugabe von Tyrosin. Durch die gemeinsame Expression aller vier Transgene – *RsTAL*, *Pc4CL*, *ZmCCR* und *ZmCAD* - konnte ohne Zugabe von Vorstufen maximal 22 mg/l p-Cumarylalkohol produziert, durch Zugabe von p-Cumarat wurde die Ausbeute auf 110 mg/l gesteigert. Damit wurde gezeigt, dass ein künstlich erzeugter rekombinanter Reaktionsweg erfolgreich in *E. coli* etabliert wurde, um p-Cumarylalkohol bakteriell herzustellen.

7. Literatur

- Akhtar, M., Blanchette, R.A., Kirk, T.K. (1998)** An overview of biomechanical pulping research. (John Wiley & Sons, New York).
- Alper, H., Fischer, C., Nevoigt, E. and Stephanopoulos, G. (2005)** Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 12678-12683.
- Anterola, A.M. and Lewis, N.G. (2002)** Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61, 221-294.
- Appert, C., Logemann, E., Hahlbrock, K., Schmid, J. and Amrhein, N. (1994)** Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.). *Eur. J. Biochem.* 225, 491-499.
- Archibald, F., and Roy, B. (1992)** Production of manganic chelates by laccase from the lignin-degrading fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1496-1499.
- Arpe, H.-J. (2007)** Industrielle Organische Chemie. Wiley-VCH, Weinheim.
- Baedeker, M. and Schulz, G.E. (2002)** Autocatalytic peptide cyclization during chain folding of histidine ammonia-lyase. *Structure* 10, 61-67.
- Bailey, J.E. (1991)** Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252, 1668-1675.
- Bailey, J.E. (1993)** Host-vector interactions in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 48, 29-52.
- Baucher, M., Monties, B., Van Montagou, M. and Boerjan, W. (1998)** Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 125-197.
- Baucher, M., Halpin, C., Petit-Conil, M., and Boerjan, W. (2003)** Lignin: genetic engineering and impact on pulping. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38, 305-350.
- Baucher, M., Chabbert, B., Pilate, G., Van Doorselaere, J., Tollier, M.T., Petit-Conil, M., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., Inze, D., Jouanin, L. and Boerjan, W. (1996)** Red Xylem and Higher Lignin Extractability by Down-Regulating a Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase in Poplar. *Plant Physiol.* 112, 1479-1490.
- Becker, J.V., Armstrong, G.O., van der Merwe, M.J., Lambrechts, M.G., Vivier, M.A. and Pretorius, I.S. (2003)** Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res.* 4, 79-85.
- Ben-Bassat, A., Breinig, S., Crum, G.A., Huang, L., Altenbaugh, A.L.B., Rizzo, N., Trotman, R.J., Vannelli, T., Sariaslani, F.S. and Haynie, S.L. (2007)** Preparation of 4-Vinylphenol Using pHCA Decarboxylase in a Two-Solvent Medium. *Org. Process Res. Dev.* 11, 278-285.

- Bentley, R. (1990)** The shikimate pathway - a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 307-384.
- Bernal, P., Segura, A. and Ramos, J.L. (2007)** Compensatory role of the cis-trans-isomerase and cardiolipin synthase in the membrane fluidity of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environ. Microbiol.* 9, 1658-1664.
- Beuerle, T. and Pichersky, E. (2002)** Enzymatic synthesis and purification of aromatic coenzyme A esters. *Anal. Biochem.* 302, 305-312.
- Blee, K.A., Choi, J.W., O'Connell, A.P., Schuch, W., Lewis, N.G. and Bolwell, G.P. (2003)** A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. *Phytochemistry* 64, 163-176.
- Blount, J.W., Masoud, S., Sumner, L.W., Huhman, D. and Dixon, R.A. (2002)** Overexpression of cinnamate 4-hydroxylase leads to increased accumulation of acetosyringone in elicited tobacco cell-suspension cultures. *Planta* 214, 902-910.
- Boerjan, W., Ralph, J. and Baucher, M. (2003)** Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 519-546.
- Bolwell, G.P. (1986)** L-Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*: Modulation of the levels of active enzyme by trans-cinnamic acid. *Planta* 169, 97-107.
- BP Statistical Energy Review of World Energy (2010).**
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Campbell, M.M. and Sederoff, R.R. (1996)** Variation in Lignin Content and Composition (Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants). *Plant Physiol.* 110, 3-13.
- Chapple, C., Ladisch, M. and Meilan, R. (2007)** Loosening lignin's grip on biofuel production. *Nat. Biotechnol.* 25, 746-748.
- Chen, F. and Dixon, R.A. (2007)** Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nat. Biotechnol.* 25, 759-761.
- Cochrane, F.C., Davin, L.B. and Lewis, N.G. (2004)** The Arabidopsis phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* 65, 1557-1564.
- Cusanovich, M.A. and Meyer, T.E. (2003)** Photoactive yellow protein: a prototypic PAS domain sensory protein and development of a common signaling mechanism. *Biochemistry* 42, 4759-4770.
- Diaz, E., Ferrandez, A., Prieto, M.A. and Garcia, J.L. (2001)** Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 523-569.

- Dong, H., Nilsson, L. and Kurland, C.G. (1995)** Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J. Bacteriol.* 177, 1497-1504.
- Douglas, C., Hoffmann, H., Schulz, W. and Hahlbrock, K. (1987)** Structure and elicitor or u.v.-light-stimulated expression of two 4-coumarate:CoA ligase genes in parsley. *EMBO J.* 6, 1189-1195.
- Ehlting, J., Shin, J.J. and Douglas, C.J. (2001)** Identification of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains. *Plant J.* 27, 455-465.
- Ehlting, J., Buttner, D., Wang, Q., Douglas, C.J., Somssich, I.E. and Kombrink, E. (1999)** Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J.* 19, 9-20.
- Eriksson, K.-E.L., Blanchette, R.A. and Ander, P. (1990)** Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg).
- Ferrandez, A., Garcia, J.L. and Diaz, E. (1997)** Genetic characterization and expression in heterologous hosts of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionate catabolic pathway of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 179, 2573-2581.
- Fortman, J.L., Chhabra, S., Mukhopadhyay, A., Chou, H., Lee, T.S., Steen, E. and Keasling, J.D. (2008)** Biofuel alternatives to ethanol: pumping the microbial well. *Trends Biotechnol.* 26, 375-381.
- Freudenberg, K. (1968)** The constitution and biosynthesis of lignin. (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg).
- Fukushima, K., Terashima, N. (1991)** Heterogeneity in formation of lignin. XIV. Formation and structure of lignin in differentiating xylem of *Ginkgo biloba*. *Holzforschung* 45, 87-94.
- Gilleßen, B. (2009).** Rekombinante Biosynthese amino-substituierter Phenylpropanoide in *E. coli*. (Dissertation, RWTH-Aachen).
- Glenn, J.K. and Gold, M.H. (1985)** Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 242, 329-341.
- Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M. and Gold, M.H. (1983)** An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114, 1077-1083.
- Goujon, T., Ferret, V., Mila, I., Pollet, B., Ruel, K., Burlat, V., Joseleau, J.P., Barriere, Y., Lapierre, C. and Jouanin, L. (2003)** Down-regulation of the AtCCR1 gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. *Planta* 217, 218-228.
- Gülzower Fachgespräche, Stoffliche Nutzung von Lignin (2009)**

- Halpin, C. (1994)** Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *The Plant Journal* 6, 339-350.
- Hamberger, B. and Hahlbrock, K. (2004)** The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2209-2214.
- Hammel, K.E. and Cullen, D. (2008)** Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 349-355.
- Herrmann, K.M. (1995)** The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell* 7, 907-919.
- Hibino, T. (1995)** Increase of Cinnamaldehyde Groups in Lignin of Transgenic Tobacco Plants Carrying an Antisense Gene for Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase. *Bioscience, biotechnology and biochemistry* 59, 929-931.
- Hoffmann, F. and Rinas, U. (2004)** Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 89, 73-92.
- Hoffmann, F., Weber, J. and Rinas, U. (2002)** Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 1. Readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 80, 313-319.
- Holladay J., Bozell J., White J. and Johnson D. (2007)** Top Value-Added Chemicals from Biomass. Volume II—Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin. PNNL-16983.
- Hwang, E.I., Kaneko, M., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S. (2003)** Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2699-2706.
- Ikeda, M. (2006)** Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 615-626.
- Ingram, L.O. (1977)** Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1233-1236.
- Jensen, P.R. and Hammer, K. (1998)** Artificial promoters for metabolic optimization. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 191-195.
- Joseleau, J.P., Chambat, G., Cortelazzo, A., Faik, A. and Ruel, K. (1994)** Putative biological action of oligosaccharides on enzymes involved in cell-wall development. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 403-407.
- Kamm, B., Gruber P.R. and Kamm, M. (2006)** Biorefineries - industrial processes and products. Status quo and future directions. Wiley-VCH, Weinheim.
- Kersten, P.J., Tien, M., Kalyanaraman, B. and Kirk, T.K. (1985)** The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *J. Biol. Chem.* 260, 2609-2612.

- Kersten, P.J., Kalyanaraman, B., Hammel, K.E., Reinhammar, B. and Kirk, T.K. (1990)** Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochem. J.* 268, 475-480.
- Kiedrowski, S., Kawalleck, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. and Dangel, J.L. (1992)** Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the Arabidopsis RPM1 disease resistance locus. *EMBO J.* 11, 4677-4684.
- Kim, S.J., Kim, M.R., Bedgar, D.L., Moinuddin, S.G., Cardenas, C.L., Davin, L.B., Kang, C. and Lewis, N.G. (2004)** Functional reclassification of the putative cinnamyl alcohol dehydrogenase multigene family in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 1455-1460.
- Kirk, T.K. and Farrell, R.L. (1987)** Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 465-505.
- Knobloch, K.-H. (1976)** Zur enzymatischen Aktivierung von Zimtsäuren im Phenylpropanstoffwechsel höherer Pflanzen. Reinigung und Charakterisierung von 4-Cumarat: CoA Ligasen (E.C. 6.2.1.12) aus Zellsuspensionskulturen von *Glycine max* L. u. *Petroselinum hortense* Hoffm. (Dissertation).
- Knobloch, K.H. and Hahlbrock, K. (1975)** Isoenzymes of p-coumarate: CoA ligase from cell suspension cultures of *Glycine max*. *Eur. J. Biochem.* 52, 311-320.
- Knobloch, K.H. and Hahlbrock, K. (1977)** 4-Coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* Hoffm. Partial purification, substrate specificity, and further properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 184, 237-248.
- Kuan, I.C. and Tien, M. (1993)** Stimulation of Mn peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1242-1246.
- Kutsuki, H., Shimada, M. and Higuchi, T. (1982)** Distribution and roles of p-hydroxycinnamate: CoA ligase in lignin biosynthesis. *Phytochemistry* 21, 267.
- Kyndt, J.A., Meyer, T.E., Cusanovich, M.A. and Van Beeumen, J.J. (2002)** Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. *FEBS Lett.* 512, 240-244.
- Lacombe, E., Hawkins, S., Van Doorselaere, J., Piquemal, J., Goffner, D., Poeydomege, O., Boudet, A.M. and Grima-Pettenati, J. (1997)** Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J.* 11, 429-441.
- Lapierre, C., Pollet, B., Petit-Conil, M., Toval, G., Romero, J., Pilate, G., Leple, J.C., Boerjan, W., Ferret, V.V., De Nadai, V. and Jouanin, L. (1999)** Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiol.* 119, 153-164.

- Lee, D. and Douglas, C.J. (1996)** Two divergent members of a tobacco 4-Coumarate:Coenzyme A ligase (4CL) gene family. cDNA structure, gene inheritance and expression, and properties of recombinant proteins. *Plant Physiol.* 112, 193-205.
- Lee, K.H., Park, J.H., Kim, T.Y., Kim, H.U. and Lee, S.Y. (2007)** Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Mol. Syst. Biol.* 3, 149.
- Lee, I.Y. (1998)** Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Bacillus pumilus* in aqueous-organic solvent two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology* 23, 261–266.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M. (1998)** Prinzipien der Biochemie. (Spektrum Akademischer Verlag).
- Lewis, N.G. (1999)** A 20(th) century roller coaster ride: a short account of lignification. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 153-162.
- Louie, G.V., Bowman, M.E., Moffitt, M.C., Baiga, T.J., Moore, B.S. and Noel, J.P. (2006)** Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases. *Chem. Biol.* 13, 1327-1338.
- Lozoya, E., Hoffmann, H., Douglas, C., Schulz, W., Scheel, D. and Hahlbrock, K. (1988)** Primary structures and catalytic properties of isoenzymes encoded by the two 4-coumarate: CoA ligase genes in parsley. *Eur. J. Biochem.* 176, 661-667.
- Luderitz, T. and Grisebach, H. (1981)** Enzymic synthesis of lignin precursors. Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol:NADP⁺ dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Biochem.* 119, 115-124.
- Luderitz, T., Schatz, G. and Grisebach, H. (1982)** Enzymic synthesis of lignin precursors. Purification and properties of 4-coumarate:CoA ligase from cambial sap of spruce (*Picea abies* L.). *Eur. J. Biochem.* 123, 583-586.
- Lutke-Eversloh, T. and Stephanopoulos, G. (2007)** L- Tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 103-110.
- Lutke-Eversloh, T., Santos, C.N. and Stephanopoulos, G. (2007)** Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 751-762.
- Martinez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M.J., Gutierrez, A. and Del Rio, J.C. (2005)** Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* 8, 195-204.
- Mavandad, M., Edwards, R., Liang, X., Lamb, C.J. and Dixon, R.A. (1990)** Effects of trans-Cinnamic Acid on Expression of the Bean Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family. *Plant Physiol.* 94, 671-680.
- Meyer, K., Kohler, A. and Kauss, H. (1991)** Biosynthesis of ferulic acid esters of plant cell wall polysaccharides in endomembranes from parsley cells. *FEBS Lett.* 290, 209-212.

- Mooney, B.P. (2009)** The second green revolution? Production of plant-based biodegradable plastics. *Biochem. J.* 418, 219-232.
- Munk, K. (2001)** Botanik. (Spektrum Verlag).
- Nicolaou, S.A., Gaida, S.M. and Papoutsakis, E.T. (2010)** A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metab. Eng.* 12, 307-331.
- Oertel, D. (2007)** Industrielle Nutzung nachwachsender Rohstoffe, Sachstandsbericht zum Monitoring »Nachwachsende Rohstoffe«. TAB Büro für Technikfolgen Abschätzung beim Deutschen Bundestag.
- Onnerud, H., Zhang, L., Gellerstedt, G. and Henriksson, G. (2002)** Polymerization of Monolignols by Redox Shuttle-Mediated Enzymatic Oxidation: A New Model in Lignin Biosynthesis I. *Plant Cell* 14, 1953-1962.
- Pichon, M., Courbou, I., Beckert, M., Boudet, A.M. and Grima-Pettenati, J. (1998)** Cloning and characterization of two maize cDNAs encoding cinnamoyl-CoA reductase (CCR) and differential expression of the corresponding genes. *Plant Mol. Biol.* 38, 671-676.
- Pilate, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., Leple, J.C., Pollet, B., Mila, I., Webster, E.A., Marstorp, H.G., Hopkins, D.W., Jouanin, L., Boerjan, W., Schuch, W., Cornu, D. and Halpin, C. (2002)** Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nat. Biotechnol.* 20, 607-612.
- Piquemal, J., Lapierre, C., Myton, K., O'Connell, A., Schuch, W., Grima-Pettenati, J. and Boudet, A.M. (1998)** Downregulation of Cinnamoyl CoA Reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *The Plant Journal* 13, 71-83.
- Pittard, J. (1996)** Biosynthesis of the aromatic amino acids. (Washington DC: ASM Press).
- Poppe, L. and Retey, J. (2005)** Friedel-Crafts-type mechanism for the enzymatic elimination of ammonia from histidine and phenylalanine. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44, 3668-3688.
- Prather, K.L.J. and Martin, C.H. (2008)** De novo biosynthetic pathways: rational design of microbial chemical factories. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 468.
- Prieto, M.A. and Garcia, J.L. (1997)** Identification of the 4-hydroxyphenylacetate transport gene of *Escherichia coli* W: construction of a highly sensitive cellular biosensor. *FEBS Lett.* 414, 293-297.
- Prieto, M.A., Diaz, E. and Garcia, J.L. (1996)** Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster. *J. Bacteriol.* 178, 111-120.
- Qi, W.W., Vannelli, T., Breinig, S., Ben-Bassat, A., Gatenby, A.A., Haynie, S.L. and Sarraslani, F.S. (2007)** Functional expression of prokaryotic and eukaryotic genes in *Escherichia coli* for conversion of glucose to p-hydroxystyrene. *Metab. Eng.* 9, 268-276.

- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M.I., Rojas, A., Teran, W. and Segura, A. (2002)** Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 743-768.
- Rasmussen, S. and Dixon, R.A. (1999)** Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 11, 1537-1552.
- Rokem, J.S., Lantz, A.E. and Nielsen, J. (2007)** Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* 24, 1262-1287.
- Rosler, J., Krekel, F., Amrhein, N. and Schmid, J. (1997)** Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol.* 113, 175-179.
- Sambrook, J. and David, W.R. (2001)** *Molecular Cloning*. 3rd Edition. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Sariaslani, F.S. (2007)** Development of a combined biological and chemical process for production of industrial aromatics from renewable resources. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 51-69.
- Schneider, K., Hovel, K., Witzel, K., Hamberger, B., Schomburg, D., Kombrink, E. and Stuible, H.P. (2003)** The substrate specificity-determining amino acid code of 4-coumarate:CoA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8601-8606.
- Schroeder, A.C., Kumaran, S., Hicks, L.M., Cahoon, R.E., Halls, C., Yu, O. and Jez, J.M. (2008)** Contributions of conserved serine and tyrosine residues to catalysis, ligand binding, and cofactor processing in the active site of tyrosine ammonia lyase. *Phytochemistry* 69, 1496-506
- Sorensen, H.P. and Mortensen, K.K. (2005)** Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol* 115, 113-128.
- Sprenger, G.A. (2007)** From scratch to value: engineering *Escherichia coli* wild type cells to the production of L: -phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 739-749
- Steeves, C.L., Lane, M., Bavister, B.D., Phillips, K.P. and Baltz, J.M. (2001)** Differences in intracellular pH regulation by Na(+)/H(+) antiporter among two-cell mouse embryos derived from females of different strains. *Biol. Reprod.* 65, 14-22.
- Strasburger, E. (1991)** *Lehrbuch der Botanik*. (Gustav Fischer Verlag).
- Terashima, N., Fukushima, K. and Takabe, K. (1986)** Heterogeneity in formation of lignin. VIII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in *Magnolia kobus* DC. *Holzforschung* 40, 101-105.

- Terashima, N., Fukushima, K. and Takabe, K. (1988)** Heterogeneity in formation of lignin. XI. An autoradiographic study of the heterogeneous formation and structure of pine lignin. *Wood Sci. Technol.* 22, 259-270.
- Tien, M. and Kirk, T.K. (1983)** Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221, 661-663.
- Torres, A.F (2007)** Development of a flow injection method for monitoring cell membrane damage of wine lactic acid bacteria. *Microchim. Acta* (2007) 159, 87–93
- Tronchet, M., Balague, C., Kroj, T., Jouanin, L. and Roby, D. (2010)** Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Pathol.* 11, 83-92.
- Updegraff, D.M. (1949)** The production of phenol and para-cresol by marine bacteria. *J. Bacteriol.* 57, 555-564.
- Van der Rest, B., Danoun, S., Boudet, A.M. and Rochange, S.F. (2006)** Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools. *J. Exp. Bot.* 57, 1399-1411.
- Vigneault, A., Johnson, D.K. and Chornet, E. (2006)** Advance in the Thermal Depolymerization of Lignin via Base-Catalysis. CPL Press, 1401-1419.
- Watts, K.T., Lee, P.C. and Schmidt-Dannert, C. (2004)** Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chembiochem.* 5, 500-507.
- Watts, K.T., Lee, P.C. and Schmidt-Dannert, C. (2006a)** Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* 6, 22.
- Watts, K.T., Mijts, B.N., Lee, P.C., Manning, A.J. and Schmidt-Dannert, C. (2006b)** Discovery of a substrate selectivity switch in tyrosine ammonia-lyase, a member of the aromatic amino Acid lyase family. *Chem. Biol.* 13, 1317-1326.
- Weber, F.J. and de Bont, J.A. (1996)** Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1286, 225-245.
- Weng, J.K., Li, X., Bonawitz, N.D. and Chapple, C. (2008)** Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 166-172.
- Westermarck, U. (1982)** Calcium promoted phenolic coupling by superoxide radical: A possible lignification reaction in wood. *Wood Sci. Technol.* 16, 71–78.
- Whetten, R. and Sederoff, R. (1995)** Lignin Biosynthesis. *Plant Cell* 7, 1001-1013.
- Whiting, P. (1982)** Chemical characterization of tissue fractions from the middle lamella and secondary wall of black spruce tracheids. *Wood Sci. Technol.* 16, 261-267.
- Williams, J.S., Thomas, M., and Clarke, D.J. (2005)** The gene *stlA* encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Photobacterium luminescens* TT01. *Microbiology* 151, 2543-2550.

- Winkel-Shirley, B. (1999)** Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum* 107, 142-149.
- Winkel-Shirley, B. (2001)** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 126, 485-493.
- Wüning, P. (2001)** Application and Use of Lignin as Raw Material. (Wiley-VCH).
- Wyrambik, D. and Grisebach, H. (1975)** Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl-alcohol dehydrogenase from soybean-cell-suspension cultures. *Eur. J. Biochem.* 59, 9-15.
- Xiang, L. and Moore, B.S. (2002)** Inactivation, complementation, and heterologous expression of encP, a novel bacterial phenylalanine ammonia-lyase gene. *J. Biol. Chem.* 277, 32505-32509.
- Xue, Z., McCluskey, M., Cantera, K., Sariaslani, F.S. and Huang, L. (2007)** Identification, characterization and functional expression of a tyrosine ammonia-lyase and its mutants from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 599-604.
- Zgurskaya, H.I. and Nikaido, H. (1999)** AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. *J. Mol. Biol.* 285, 409-420.

8. Anhang

8.1. Abürzungverzeichnis

µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C-terminal	carboxyterminal
ca.	circa
CIP	calf instestinal alkaline phosphatase
cm	Zentimeter
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
His	Histidin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Molar
MCS	multiple cloning site (Polylinker)
mg	Milligramm
mmol	Millimol

ml	Milliliter
mol	Anzahl der Teilchen
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
ori	origin of replication (Ursprungspunkt der Replikation)
ORF	„open reading frame“
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekunde
spec.	species
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _M	Schmelztemperatur
TP	Anlagerungstemperatur
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
U	Unit
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	ultraviolettes Licht
v/v	volume to volume (Volumenverhältnis)
w/v	weight to volume (Masse-Volumenverhältnis)

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Zellwandorganisation.....	13
Abb. 1.2: Die Phenylpropanoidbiosynthese.	16
Abb. 1.3: Die Monolignolbiosynthese.....	18
Abb. 1.4: Mesomer stabilisierte Strukturen von Coniferylalkohol.....	20
Abb. 1.5: Schematischer Ausschnitt aus einem Ligninpolymer	21
Abb. 1.6: Rekombinante Biosynthese von p-Cumarylalkohol.	27
Abb. 2.1: Plasmidkarten der Leervektoren	33
Abb. 2.2: DNA und Proteinmarker	34
Abb. 4.1: HPLC-Analyse <i>RsTAL</i> exprimierender <i>E. coli</i> Zellen	58
Abb. 4.2: Gelelektrophoretische Auftrennung von <i>Pc4CL</i>	61
Abb. 4.3: Aktivitätsmessung aufgereinigter <i>Pc4CL</i>	64
Abb. 4.4: Absorptionsspektren enzymatisch generierter Thioester.	66
Abb. 4.5: FT-MS/ESI-MS Spektren synthetisierter Phenylpropanoid-Thioester	68
Abb. 4.6: Gekoppelter Aktivitätstest mit <i>RsTAL</i> / <i>Pc4CL</i>	70
Abb. 4.7: Gekoppelter Aktivitätstest mit <i>RsTAL</i> / <i>Pc4CL</i>	72
Abb. 4.8: SDS-PAGE und Westernblot von <i>ZmCCR</i>	75
Abb. 4.9: Enzymatische Umsetzung von p-Cumaryl-CoA.....	76
Abb. 4.10: SDS-PAGE und Westernblot von <i>ZmCAD</i>	78
Abb. 4.11: Enzymatische Umsetzung von Coniferylaldehyd.....	79
Abb. 4.12: Absorptionsspektren und HPLC-Analyse.....	81
Abb. 4.13: HPLC-Analyse <i>ZmCCR</i> und <i>Pc4CL</i> koexprimierender Zellen.....	83
Abb. 4.14: Dünnschichtchromatographie nach Festphasenextraktion.....	85
Abb. 4.15: ¹ H-NMR Spektrum von p-Cumarylalkohol	87
Abb. 4.16: HPLC-Analyse <i>TAL</i> , <i>4CL</i> , <i>CCR</i> und <i>CAD</i> exprimierender Zellen	90
Abb. 4.17: p-Cumarylalkohol Biosynthese ohne Vorstufenzusatz.....	93
Abb. 4.18: p-Cumarylalkohol Biosynthese mit Vorstufenzusatz	94
Abb. 8.1: Plasmidkarten der pETDuet-Konstrukte.....	135
Abb. 8.2: Plasmidkarten der pRSFDuet-Konstrukte	136
Abb. 8.3: Plasmidkarte der pET22b-Konstrukte.....	137

8.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: <i>E. coli</i> Stämme und zugehörige Genotypen	29
Tab. 2.2: Verwendete Template DNA	30
Tab. 2.3: Primer zur Amplifikation der gewünschten ORFs	31
Tab. 2.4: Oligonukleotide zur Detektion und Sequenzierung.....	31
Tab. 3.1: Standard-PCR Bedingungen.....	40
Tab. 3.2: PCR-Bedingungen unter Verwendung der Go Taq Hot Start Polymerase.....	40
Tab. 3.3: Kolonie-PCR	41
Tab. 3.4: Exemplarischer Standardrestriktionsverdau.....	42
Tab. 3.5: Exemplarischer Ligationsansatzes.....	43
Tab. 4.1: Formale und physikalische Parameter der Thioester.....	69
Tab. 4.2: Chemische Verschiebung der H-Atome von p-Cumarylalkohol.....	86

8.4. Veränderte Sequenz der *RsTAL*-ORF (nach Gensynthese durch GenScript)

RsTAL ORF:

```
CCATGGCTCTGGCTATGAGTCCTCCTAAGCCAGCCGTGGAACCTGGACCGTCACATAGACCTGGATCAAGCTCATG
CTGTTGCCAGCGGAGGGGCTCGTATCGTTCTGGCTCCTCCTGCACGTGATCGTTGTCGTGCATCAGAGGCCCGTC
TGGGTGCTGTTATTTCGTGAGGCCCGTCATGTTTACGGGCTGACAACAGGCTTTGGACCACTGGCTAATCGTCTGA
TTAGTGGTGAAAATGTTTGAACCCTCCAGGCTAATCTTGTACACCATCTAGCCTCCGGAGTCGGTCCTGTGCTGG
ACTGGACTACCGCCCGTGCAATGGTTCTGGCCCGTCTGGTGTCTATTGCTCAGGGGGCATCCGGTGCTTCTGAGG
GAACAATCGCTCGTCTGATTGACCTGCTGAACAGCGAGCTGGCACCAGCAGTTCCTTCTCGTGGAACCTGTGGGTG
CATCAGGAGACCTGACCCCACTGGCTCACATGGTTCTGTGCCTGCAAGGCCGTGGTGACTTTCTGGATCGTGATG
GAACGCGTCTGGATGGGGCTGAGGGTCTGCGTCGTGGGCGTCTCCAGCCACTGGATCTGTCACATCGGGATGCAC
TGGCACTGGTTAATGGAACCTCAGCTATGACTGGTATTGCTCTGGTCAATGCTCATGCTTGTCTGCTCACCTGGGCA
ACTGGGCCGTGCGCCTGACTGCTCTGCTGGCTGAGTGCCTGCGTGGACGTAAGGATGAGGCATGGGCTGCTGCACTGT
CTGATCTGCGTCCTCATCCAGGTCAAAAGGATGCTGCTGCTCGTCTGCGTGCTCGTGTGATGGATCAGCTCGTG
TTGTGCGTCACGTTATTGCCGAACGTCGTCTGGACGCCGGAGATATTGGCACAGAACCAGAAGCTGGACAGGACG
CATATTCCTGCGTTGTGCCCCCTCAGGTTCTGGGAGCTGGATTTGATACACTGGCATGGCAGCAGCCGTGTTCTGA
CAATCGAACTGAACGCTGTGACTGATAATCCTGTTTTCCCTCCTGATGGATCAGTGCCTGCTCTGCATGGTGGGA
ACTTCATGGGTGAGCAGCTGGCACTGACTAGTGACGCACTGGCTACTGCTGTTACTGTCTGCTGGCTGGTCTGGCAG
AGCGTCAGATTGCTCGTCTGACAGATGAACGCTCTGAATCGTGGACTGCCTCCTTTCTGTCATCGTGGGCCTGCTG
GTCTGAACTCTGGTTTTATGGGGGCTCAGGTTACAGCAACTGCTCTGCTGGCAGAGATGCGTGCTACTGGACCTG
CCAGTATTCATTCAATTAGTACCAATGCAGCAAATCAGGACGTAGTTTCACTGGGAACAATCGCAGCACGTCTGT
GTCGTGAAAAGATTGATCGTTGGGCTGAAATACTGGCTATTCTGGCACTGTGTCTGGCTCAGGCAGCCGAGCTGC
GTTGTGGATCTGGTCTGGATGGCGTTTCTCCAGCAGGAAAGAAGCTGGTTCAAGCACTGCGGGAGCAATTCCTC
CACTGGAGACTGATCGTCCTCTGGGTCAAGAGATTGCCGCTCTGGCTACTCATCTGCTGCAACAGAGTCCAGTTC
ACCATCACCATCACCATTAAGGATC
```

8.5. Plasmidkarten von erzeugten Konstrukten

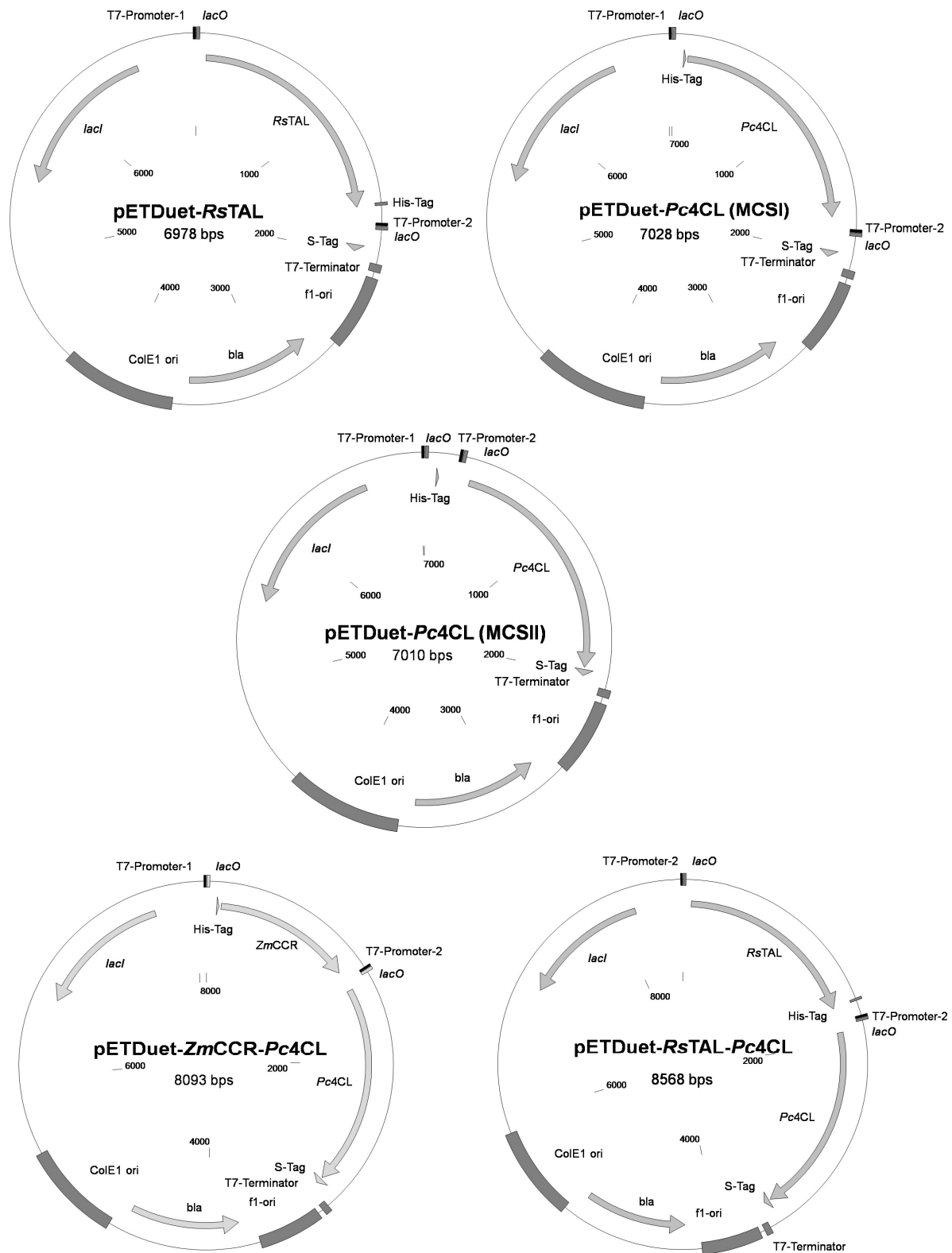


Abb. 8.1: Plasmidkarten der pETDuet-Konstrukte. Die Integrationen der ORFs in die jeweilige MCS sind den Klonierungsbeschreibungen zu entnehmen.

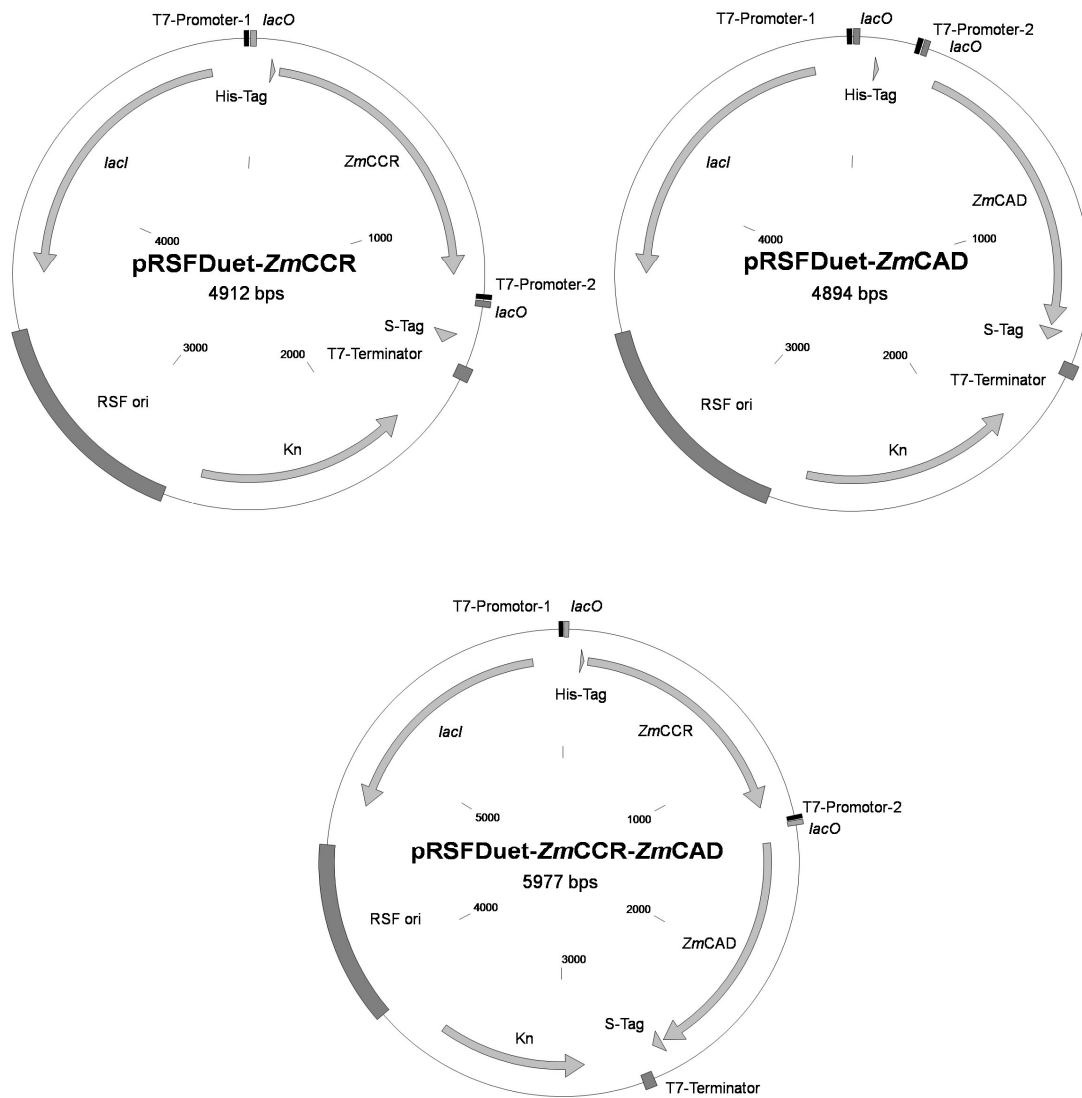


Abb. 8.2: Plasmidkarten der pRSFDuet-Konstrukte. Die Integrationen der ORFs in die multiplen Klonierungsstellen sind den Beschreibungen der Klonierungen zu entnehmen.

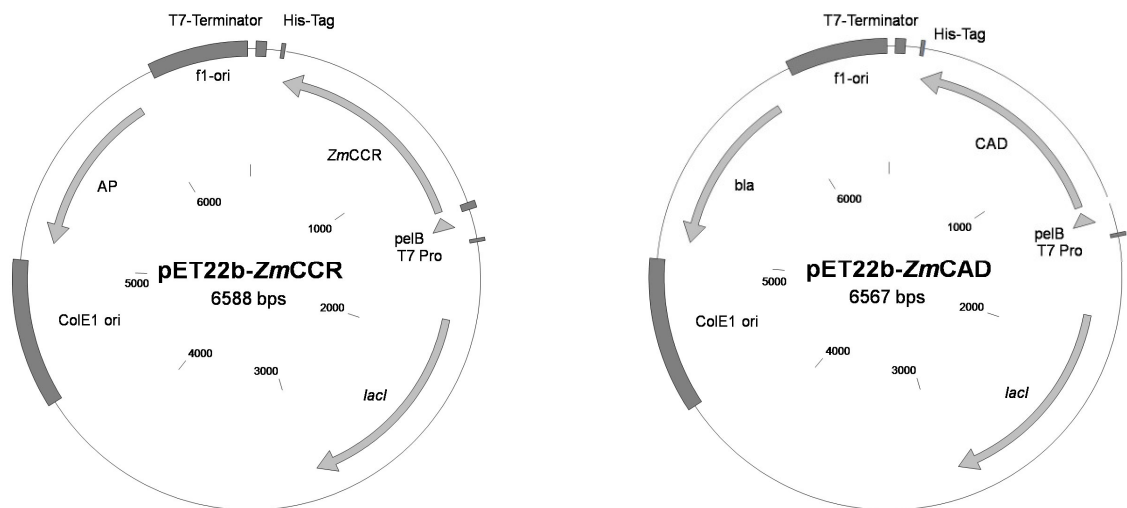


Abb. 8.3: Plasmidkarte der pET22b-Konstrukte. Die Integrationen der ORFs in die multiplen Klonierungsstellen sind den Beschreibungen der Klonierungen zu entnehmen.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. F. Kreuzaler für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Übernahme des Hauptreferates und für die vielen Abende, die wir über Wissenschaft, Don Camillo und Peppone und über sonstiges Erzählenswertes diskutiert haben. Das war insgesamt wirklich ein krönender Abschluss an der RWTH-Aachen.

Herrn Prof. Dr. U. Schwaneberg danke ich für die Übernahme des Koreferates und die hilfsbereite Mitwirkung.

Bei Dr. Frank Müller, Dr. U. Commandeur, Karolin Richter und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Biologie VII und Biologie I möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre und für die wertvollen Tips bedanken.

Für wertvolle Tipps, interessante Diskussionen und besondere Hilfe an der HPLC danke ich Dr. Martin Zimmermann.

Bei Bernhard Gillessen möchte ich mich für das tolle konstruktive Arbeitsklima, die während dieser Zeit entstandene Freundschaft und die Unterstützung in jeder Phase der Arbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in der ganzen Zeit unterstützt haben und die mir immer wieder ein starker Rückhalt waren.

Ich möchte besonders meiner Freundin Anne danken, die an mich geglaubt hat und mir die Motivation und Kraft gab, die Arbeit abzuschließen.

Ich widme diese Arbeit meiner verstorbenen Mutter. Schade, dass du diesen Moment nicht mehr miterleben kannst.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Frank Jansen
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Geburtsdatum	18.09.1976
Geburtsort	Mönchengladbach

Promotion

Datum	Seit 03/2006
Arbeitgeber	RWTH-Aachen, Institut für Biologie I
Thema	Rekombinante Biosynthese von p-Cumarylalkohol in <i>E. coli</i>

Studium

Datum	10/1997 bis 11/2005
Studienrichtung	Biologie
Abschluss	Diplom
Note	Sehr gut
Thema der Abschlussarbeit	Generierung von scFv-Antikörperfragmenten gegen das von <i>Fusarium sp.</i> produzierte T-2 Toxin via Phagen Display Technologie

Staatsdienst

Tätigkeit	Ersatzdienst in der Jugendherberge Brüggen 08/1996 bis 09/1997
-----------	---

Schulausbildung

Grundschule	Gemeinschaftsgrundschule Wildenrath 07/1983 bis 07/1987
Gymnasium	Maximilian-Kolbe-Gymnasium Wegberg 08/1987 bis 05/1996
Abschluss	Allgemeine Hochschulreife