

MELICOMO -
Metabolic Engineering
mit lichtkontrollierten Modulen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Jonathan Trauth

aus Mainz

Marburg, 2020

Die vorliegende Dissertation wurde von September 2017 bis Dezember 2020 in der Arbeitsgruppe von Herrn Priv. Doz. Dr. Christof Taxis am Fachbereich Biologie im Fachgebiet Molekulare Genetik der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Priv. Doz. Dr. Christof Taxis

Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der Disputation:

Erklärung

Ich erkläre, dass eine Promotion an noch keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, versucht wurde. Ich versichere, dass ich meine vorgelegte Dissertation

„MELICOMO- *Metabolic Engineering* mit lichtkontrollierten Modulen“

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nichts anderes als die in ihr angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet, sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Ort/Datum

Unterschrift

(Jonathan Trauth)

In diesem Zeitraum angefertigte Publikationen:

Trauth, Jonathan; Scheffer, Johannes; Hasenjäger, Sophia; Taxis, Christof (2019): Synthetic Control of Protein Degradation during Cell Proliferation and Developmental Processes. In: ACS Omega 4 (2), S. 2766–2778. DOI: 10.1021/acsomega.8b03011.

Hasenjäger, Sophia; Scheffer, Johannes; **Trauth**, Jonathan; Taxis, Christof (2019a): Lichtsignale für die Hefe. In: Biospektrum 25 (6), S. 628–630. DOI: 10.1007/s12268-019-0212-1.

Hasenjäger, Sophia; **Trauth**, Jonathan; Hepp, Sebastian; Goenrich, Juri; Essen, Lars-Oliver; Taxis, Christof (2019b): Optogenetic Downregulation of Protein Levels with an Ultrasensitive Switch. In: ACS synthetic biology 8 (5), S. 1026–1036. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00471.

Hepp, Sebastian; **Trauth**, Jonathan; Hasenjäger, Sophia; Bezold, Philipp; Essen, Lars-Oliver; Taxis, Christof (2020): An Optogenetic Tool for Induced Protein Stabilization Based on the *Phaeodactylum tricornutum* Aureochrome 1a Light-Oxygen-Voltage Domain. In: Journal of molecular biology 432 (7), S. 1880–1900. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.02.019.

Trauth, Jonathan; Scheffer, Johannes; Hasenjäger, Sophia; Taxis, Christof (2020): Strategies to investigate protein turnover with fluorescent protein reporters in eukaryotic organisms. In: AIMS Biophysics 7 (2), S. 90–118. DOI: 10.3934/biophy.2020008.

i. Zusammenfassung

Im Jahr 2018 wurden zum ersten Mal, von Zhao et al, optogenetische Module zur Regulation von biotechnologischen Produktionen verwendet. Mit Hilfe der Optogenetik wurde erfolgreich, zwischen einer Wachstums- und Produktionsphase, lichtinduziert geschaltet. Diese ersten Konstrukte stellten sich als äußerst vielversprechend dar, fokussierten sich jedoch hauptsächlich auf eine Kontrolle des heterologen Biosyntheseweges. Um die Biotechnologie lückenlos, als Anwendungsgebiet der Optogenetik, zu erschließen, fehlten Stammoptimierungen.

In dieser Arbeit wurden optogenetische Schalter, für „*Metabolic Engineering*“, in *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt und angewendet. Durch die Kombination einer lichtinduzierten Transkriptionsregulation und einem photosensitiven Degron (psd), gelang es, einen ultrasensitiven Schalter zu generieren. Diese synergistische, optogenetische und mehrstufige Kontrolle (SOMCo) ermöglicht eine komplette Aktivitätskontrolle auch bei sehr geringen Lichtintensitäten. Ein Vergleich mit dem gut charakterisierten *ADHI*-Promotor erlaubt es zukünftig noch leichter weitere Anwendungsgebiete zu finden. Zusätzlich wurde zum ersten Mal die Auswirkung einer lichtregulierten PKA-Aktivität auf heterologe Biosynthesewege untersucht. Hierfür wurden verschiedene Konstrukte der blaulichtregulierten Adenylylcyclase bPAC und eine Fusion der nativen Adenylylcyclase Cyr1 mit einem photosensitiven Degron verwendet und charakterisiert.

Diese unterschiedlichen Regulationsmodule ermöglichten es erste heterologe Prozesse zu verbessern. Durch Stammoptimierungen, mit den entwickelten und charakterisierten optogenetischen Konstrukten, konnte erfolgreich eine erhöhte β -Carotin, Cordycepin- und Betulinsäureproduktion erreicht werden.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Generieren eines Gibberellinsäure 4 produzierenden *S. cerevisiae* Stammes. Hierfür mussten insgesamt 8 heterologe Gene implementiert werden. Um die erfolgreiche Produktion *in vivo* verfolgen zu können, wurde ein Reporter, basierend auf der GA abhängige Interaktion von *AtGAI* und *AtGid1A*, entwickelt. Um diese Interaktion zu visualisieren, wurden die einzelnen Komponenten mit splitVenus-Sequenzen fusioniert, welche durch die entstehende Wechselbeziehung reassemblieren. Mit Hilfe dieses entwickelten „*Gibberellic Acid Venus*“-Reporters (GAVR), ließen sich unterschiedliche GA3-Konzentrationen im Medium bestimmen. Zusätzlich lieferte

GAVR in dem neuen GA4 produzierenden „Proof-of-Principle“ Stamm erste Hinweise auf eine erfolgreiche Produktion.

Während dieser Arbeit konnte durch die Entwicklung von neuen lichtabhängigen Modulen, wie SOMCo, den neuen bPAC-Konstrukten und dem GA-Reporter, der optogenetische Werkzeugkasten erweitert werden. Es konnte erfolgreich die heterologe Produktion von β -Carotin aus FPP, Betulinsäure aus 2,3-Oxidosqualen und Cordycepin aus 3'AMP erhöht und die GA4-Produktion aus FPP visualisiert werden. Dies wurde durch photosensitive Proteindegradation, der Steuerung einer zentralen Proteinkinase durch Blaulicht und einem fluoreszierenden Reporter für ein spezifisches Produkt ermöglicht. Durch erfolgreiche Anwendungen dieser optogenetischen Module ließ sich die Biotechnologie als Anwendungsgebiet der Optogenetik weiter erschließen.

ii. Summary

For the first time in 2018, Zhao et al applied optogenetic modules to regulate biotechnological productions. These tools allowed to switch between growth- and production-phase using light, but focused only on the control of the heterologous biosynthesis. Until this thesis, optimizations of heterologous production were missing to completely acquire the biotechnology as optogenetic field of use.

During this thesis, optogenetic switches were developed and applied in *Saccharomyces cerevisiae*, in context of metabolic engineering. With the combination of light controlled transcription and photosensitive degradation, a new ultrasensitive switch was generated. This synergistic optogenetic multistep control (SOMCo) allowed full control over the activity, even under low blue light intensities. Thanks to the comparison with the well-studied *ADHI* promotor, new applications will be easy to discover. For the first time, the impact of light regulated PKA activity, on heterologous biosynthesis, was investigated. This was accomplished by fusing a psd module to the native adenylyl cyclase Cyr1 or different constructs, expressing the photosensitive adenylyl cyclase bPAC. Both approaches were characterized prior.

All these different regulatory modules allowed to improve heterologous processes. With the help of different optogenetic constructs, improved production of β -Carotene, Cordycepin and Betulinic acid was achieved.

A different part of this thesis dealt with the generation of a gibberellic acid producing *S. cerevisiae* strain. Therefore, 8 heterologous genes had to be implemented. To monitor the production, a new in vivo reporter, based on the GA dependent interaction of *AtGAI* and *AtGID1A*, was developed. To track this interaction, each component was fused with a different split-Venus sequence, which is able to reassemble with their fusion partners in close proximity. With the help of this newly developed „*Gibberellic Acid Venus Reporter*” (GAVR), different GA3 concentrations could be detected within the yeast media. Additionally, GAVR lead to the first promising results of successful GA4 production in yeast.

Thanks to the development of new light controlled modules, during this thesis, the optogenetic toolbox was enriched with the SOMCo module, the novel bPAC constructs and the GA reporter GAVR. An increased production of β -Carotene from FPP, Betulinic acid from 2,3-Oxidosqualene and Cordycepin from 3'AMP could be reached. Additionally, the GA4 production was visualized. All this was made possible by photosensitive protein

degradation, control of a central protein kinase by blue light and a fluorescent reporter for a specific product. The application of these modules allowed acquiring the biotechnology as optogenetic field of application.

iii. Abkürzungen

dH ₂ O	entsalztes Wasser
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
C-Terminus	Carboxyterminus
N-Terminus	Aminoterminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
et al.	„und andere“
EtOH	Ethanol
Gal	Galaktose
YFP	„yellow-fluorescent-protein“
RFP	„red-fluorescent-protein“
PKA	Protein Kinase A
min	Minute
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	Potentia hydrogenii
Primer	Oligonukleotid
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Ub	Ubiquitin
GA	Gibberellinsäure
ZVPd	Zdk1-VP16-3myc-psd ³
tRAL	HA-tetR-AsLOV2

Inhaltsverzeichnis

i.	Zusammenfassung.....	i
ii.	Summary.....	iii
iii.	Abkürzungen.....	v
1	Einleitung.....	1
1.1	„Metabolic Engineering“ von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.3	Optogenetik.....	8
1.2.1	LOV-Domänen.....	10
1.2.2	BLUF-Domänen.....	11
1.2.3	Optogenetische Regulation der Proteinstabilität und der Proteinbiosynthese.....	12
1.2.4	Die LOV-Domäne aus dem <i>Phaeodactylum tricornutum</i> Aureochrome 1a als optogenetisches Modul	18
1.2.5	Optogenetische Manipulation der PKA-Aktivität in <i>S. cerevisiae</i>	19
2	Ergebnisse.....	22
2.1	Entwicklung und Charakterisierung eines ultrasensitiven optogenetischen Schalters	22
2.1.1	Kombination von chemisch kontrollierter Biosynthese und lichtkontrollierter Stabilität	22
2.1.2	Aktivität des synthetischen photosensitiven Transkriptionsfaktors (psTF) im Vergleich zum <i>ADHI</i> -Promotor	24
2.1.3	Charakterisierung einer synergistischen, optogenetischen und mehrschrittigen Kontrolle durch Licht	26
2.1.4	Lichtsensitivitätscharakterisierung der optogenetischen Module.....	28
2.2	Charakterisierung und Anwendung eines optogenetischen Tools für induzierte Proteinstabilität	29
2.2.1	Kinetiken der AuLOV ^{V254M V349W} -Mutante.....	29
2.2.2	Charakterisierung lichtkontrollierter PKA-Aktivität in <i>S. cerevisiae</i> Zellen.....	31
2.3	Anwendung der optimierten Module an biotechnologisch relevanten Zielen	33
2.3.1	Optimierung eines β -Carotin produzierenden Hefestamms mit optogenetische Modulen	36
2.3.2	Optimierung eines Cordycepin-produzierenden <i>S. cerevisiae</i> Stammes.....	41
2.3.3	Optimierung eines Betulinsäure produzierenden <i>S. cerevisiae</i> Stammes	42
2.4	Entwicklung, Charakterisierung und Anwendung eines Gibberellinsäurereporters.....	45
2.4.1	Entwicklung und Verhalten eines Gibberellinsäurereporterstammes.....	45
2.4.2	Charakterisierung eines Gibberellinsäurereporterextrakts	49
2.4.3	Anwendung des Gibberellinsäurereporters in einem GA4 produzierenden <i>S. cerevisiae</i> Stamm	50
3	Diskussion.....	53

3.1	Charakterisierung der verwendeten Module	54
3.1.1	Entwicklung und Charakterisierung eines ultrasensitiven Schalters	54
3.1.2	Ein optogenetisches Werkzeug für induzierte Proteinstabilität	59
3.2	„Metabolic Engineering“ mit lichtgesteuerten Modulen	61
3.2.1	Lichtregulierte Proteinstabilisierung von biotechnologierelevanten Beispielen	61
3.2.2	Optimierung eines β -Carotin produzierenden <i>S. cerevisiae</i> Stammes	64
3.2.3	Optimierung eines Cordycepin produzierenden <i>S. cerevisiae</i> Stammes	67
3.2.4	Optimierung eines Betulinsäure produzierenden Hefestammes	69
3.3	Entwicklung und Anwendung eines Gibberelinsäurereporters	70
4	Material	75
4.1	Chemikalien	75
4.1.1	Nährmedien	75
4.1.2	Puffer und Lösungen	76
4.1.3	Antibiotika	78
4.1.4	Antikörper	78
4.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	79
4.3	<i>Escherichia coli</i> -Stamm	82
4.4	Verwendete Plasmide	82
4.5	Verwendete synthetische Oligonukleotide	83
5	Methoden	86
5.1	Kultivierung von Mikroorganismen	86
5.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	86
5.1.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	86
5.1.3	Anlegen von Dauerkulturen	86
5.2	DNA Präparation	86
5.2.1	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	86
5.2.2	Isolation der gesamten DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	87
5.3	Manipulation von DNA	87
5.3.1	Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)	87
5.3.1.1	PCR mit Hilfe der Phusion-Polymerase	88
5.3.1.2	PCR mit Hilfe der OneTaq-Polymerasen	89
5.3.1.3	pYM-PCR	89
5.3.2	Restriktion von DNA	90
5.3.3	In vivo Ligation in <i>S. cerevisiae</i>	90
5.3.4	Fällung von DNA mit Ethanol	90

5.3.5	DNA-Analysen.....	90
5.3.5.1	Sequenzierung.....	90
5.3.5.2	Gelelektrophorese mittels Agarosegel.....	90
5.4	Transformationstechniken.....	91
5.4.1	Transformation von elektrokompenten <i>Escherichia coli</i>	91
5.4.2	Transformation von chemischkompetenten <i>E. coli</i>	91
5.4.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	92
5.5	Integration des heterologen GA4 Biosynthesewegs in <i>S. cerevisiae</i>	92
5.6	Protein-Analyse.....	93
5.6.1	Herstellung eines Proteinextraktes aus <i>S. cerevisiae</i>	93
5.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	94
5.6.3	Western-Blot.....	94
5.6.4	Cycloheximidchase.....	95
5.7	Analyse von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	96
5.7.1	Einzelzellanalyse mittels Durchflusszytometrie.....	96
5.7.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	96
5.7.3	Wachstumstest.....	97
5.7.4	Jod-Dampf-Färbung von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	97
5.8	Tetradendisektion.....	98
5.9	Extraktion und Quantifizierung von sekundären Metaboliten in <i>S. cerevisiae</i>	98
5.9.1	β -Carotin-Detektion mittels HPLC.....	98
5.9.2	Gibberellinsäure.....	99
5.9.3	Terpenoide.....	99
5.9.4	Cordycepin.....	100
5.10	Anpassung der Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Kurve durch die Hill-Gleichung.....	100
6	Literaturverzeichnis.....	101
7	Anhang.....	118

1 Einleitung

1.1 „Metabolic Engineering“ von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäcker- und Brauhefe *S. cerevisiae* wird schon seit Jahrtausenden von Menschen alltäglich verwendet, um Lebensmittel wie Brot, Bier und Wein herzustellen (Cavalieri et al. 2003; Fiechter et al. 1981; McGovern et al. 2004). Dies wird traditionell als einer der ersten Erfindungen der Biotechnologie bezeichnet (Mattanovich et al. 2014). Durch die Entwicklung von genetischen Manipulationen 1970 wurde es ermöglicht, heterologe Prozesse in Mikroorganismen zu etablieren. Die Gentechnik erlaubte außerdem, Mikroorganismen in sogenannte „Zellfabriken“ für bestimmte Chemikalien zu wandeln (Hong und Nielsen 2012). Dieser Prozess wird als „Metabolic Engineering“ bezeichnet und umfasst heutzutage ein gesamtes Forschungsfeld welches sich als Ziel gesetzt hat, günstige Nährstoffe wie Glukose und andere Zucker in wertvolle Chemikalien und Biostoffe umzuwandeln (Abb. 1) (Nielsen 2001; Nielsen und Keasling 2011; Tyo et al. 2007). Die Bäckerhefe gehört zu einer der ältesten und meist genutzten Mikroorganismen, welche erfolgreich für diese Art von Produktion verwendet werden (Kavšček et al. 2015; Mattanovich et al. 2014).

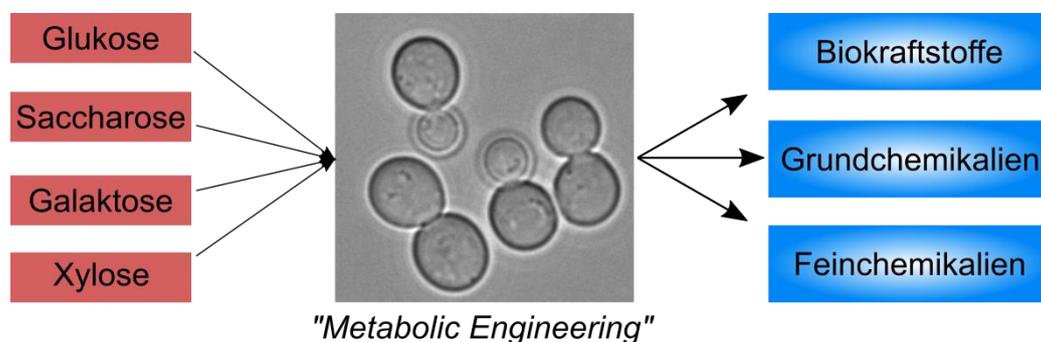


Abbildung 1: Ziel von „Metabolic Engineering“. Das Ziel von „Metabolic Engineering“ ist es, durch Manipulationen von Mikroorganismen aus einem günstigen Ausgangsstoff wie z.B. Glukose, Saccharose, Galaktose oder Xylose wertvollere Produkte zu generieren. Die verwendeten Mikroorganismen werden als Zellfabriken gesehen und sollen z.B. Biotkraftstoffe, Grundchemikalien oder Feinchemikalien herstellen. Durch diesen Prozess sollen herkömmliche, auf fossilen Brennstoffen basierende Verfahren ersetzt werden. Abbildung modifiziert aus (Hong und Nielsen 2012).

Bei der Etablierung neuer Produktionsstämme müssen immer die gleichen Hürden überwunden werden: Es muss eine geeignete Abzweigung ausgehend von einem endogenen Syntheseweg gefunden, ein neuer heterologer Biosyntheseweg implementiert und der Zellmetabolismus für die Produktion der Zielsubstanz optimiert werden. Ein Beispiel hierfür wäre die Abzweigung aus der endogenen Aminosäurenbiosynthese für die heterologe Produktion von Vanillin. Für die Optimierung dieses Herstellungsverfahrens wurden durch *in silico* design zwei vielversprechende Knockout-Ziele, *PDC1* und *GDH1*, identifiziert. Eine

Implementierung dieser Modifikation verüffachte die Vanillin Produktion (Brochado et al. 2010).

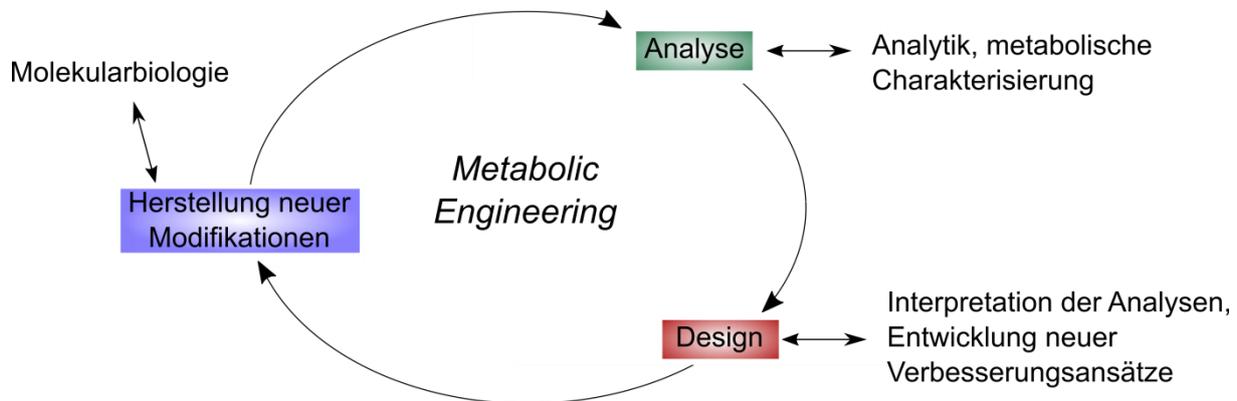


Abbildung 2: Darstellung des Arbeitszyklus von „Metabolic Engineering“. Während der Entwicklung oder Optimierung eines neuen Produktionsstammes mittels „Metabolic Engineering“ werden drei Arbeitsschritte mehrmals durchlaufen. Zu Beginn werden neue Modifikationen durch molekularbiologische Techniken implementiert. Die Auswirkung dieser wird dann durch die Analytik und die Charakterisierung der vorhandenen Metaboliten analysiert. Anschließend folgt die Interpretation der erhaltenen Analysen. Neue Optimierungsansätze und weitere Design-Möglichkeiten werden entwickelt. Diese müssen wieder wie zuvor im ersten Schritt implementiert werden. Dieser Zyklus wird mehrmals durchlaufen, da mit jedem Durchlauf neue Erkenntnisse gewonnen werden und diese fortlaufend zu neuen möglichen Implementationen führen. Aufgrund der Komplexität des Metabolismus gibt es meistens mehrere potenzielle Optimierungen. Modifizierte Abbildung aus (Nielsen 2001).

Die Etablierung komplexer Modifikationen wurde durch die große und ständige wachsende Anzahl an Werkzeugen für die Manipulation auf chromosomaler Ebene in der Bäckerhefe ermöglicht. „Metabolic Engineering“ ist ein fortlaufender Zyklus, da mit neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen immer wieder neue Optimierungsansätze entdeckt werden (Abb. 2). Dieser besteht aus der Konstruktion eines rekombinanten Stammes, der Analyse der Auswirkungen der neuen Modifikationen im Vergleich zum Ausgangsstamm und des Designs von neuen weiteren Verbesserungsansätzen (Nielsen 2001). Letzteres bedeutet nicht nur das Einfügen weiterer genetischer Manipulationen, sondern beinhaltet auch den Einsatz von verbesserten Regulationswerkzeugen für bereits verwendete Modifikationen. Dieser Zyklus ist sehr zeitaufwendig. Bis ein Produktionsstamm im industriellen Maßstab zum Einsatz kommt müssen, nach der Integration des heterologen Syntheseweges, noch mehrere Optimierungen vorgenommen werden. Es muss unter anderem die Ausbeute, die Produktion und der Titer des gewünschten Produkts maximiert werden. Neue Technologien, die es ermöglichen diesen Prozess zu beschleunigen, sind daher von großem Interesse (Abb. 3). Diese beinhalten zum Beispiel neue Genexpressions-Regulatoren und schnellere Integrationstechniken, aber auch neue enzymatische Funktionen (Krivoruchko et al. 2011).

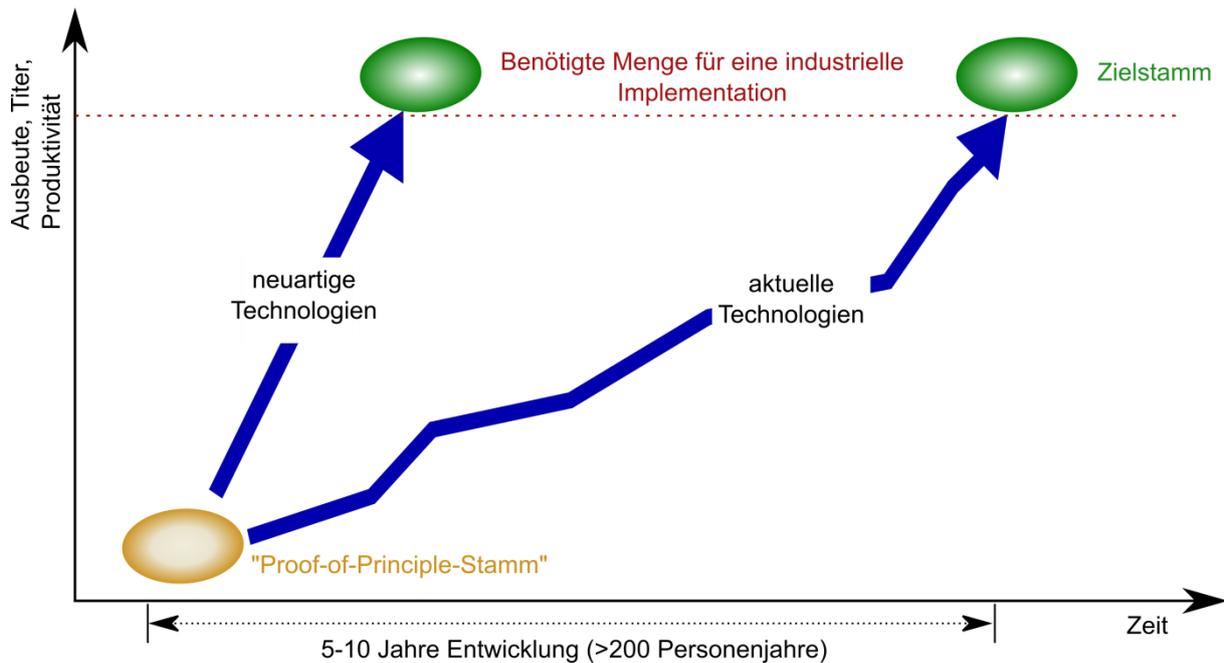


Abbildung 3: Darstellung der Entwicklungszeit einer neuen industriell-implementierten Zellfabrik. Die Entwicklung einer neuen Zellfabrik benötigt sehr viel Zeit um die Ausbeute, Titer und die Produktivität eines „Proof-of-Principle“-Stamms so zu erhöhen, dass es aus finanzieller Sicht mit den ursprünglichen Verfahren konkurrieren kann. Es ist von großem Interesse diese Zeit durch die Entwicklung neuartiger Technologien zu verkürzen. Diese Zeitersparnis würde sich auch finanziell deutlich bemerkbar machen. Modifizierte Abbildung aus (Nielsen und Keasling 2016).

Als „Proof-of-Principle-Stamm“ bezeichnet man einen Stamm, der das gewünschte Produkt unabhängig von der Menge herstellt. Es wurden noch keine Optimierungen durchgeführt, sondern lediglich der gewünschte heterologe Biosyntheseweg erfolgreich implementiert. Dadurch soll gezeigt werden, dass es grundsätzlich möglich ist das gewünschte Produkt in dem verwendeten Organismus zu produzieren. Beispiele für Proof-of-Principle-Stämme in *S. cerevisiae* gibt es viele. So konnte zum Beispiel durch die Integration der Gene *cns1* und *cns2* aus *Cordyceps militaris* erfolgreich Galaktose-induziert Cordycepin in der Bäckerhefe produziert werden (Xia et al. 2017). Hierbei handelt es sich um ein Produkt, welches unter anderem antitumoröse, antidiabetische und antibakterielle Effekte aufweist und daher von großem pharmazeutischen Interesse ist (Jiapeng et al. 2014). Cordycepin wird zurzeit hauptsächlich aus *Cordyceps militaris* gewonnen und es wird versucht, die Extraktion, die Kultivierung und den Ausgangsstamm zu optimieren (Chamyuang et al. 2019). Aufgrund des steigenden Bedarfs an Cordycepin in der Pharmazie gibt es ein großes wissen- und wirtschaftliches Interesse an einer Implementierung der Produktion im Industriemaßstab. Dies würde durch eine Produktion in einem einzelligen Organismus wie der Bäckerhefe deutlich vereinfacht werden. Es müsste jedoch eine Lösung für die Toxizität von überproduziertem Cordycepin gefunden werden (Chamyuang et al. 2019). Bei dieser beschriebenen Fabrikation handelt es sich um eine vergleichsweise einfachere Synthese, da lediglich zwei heterologe

Gene integriert werden müssen. Durch die Entdeckung und der Implementation von CRISPR-Cas9 ist es in den letzten Jahren deutlich leichter geworden, mehrere Gene markerlos in das Hefegenom zu integrieren. Durch diese Methode wird es ermöglicht, auch komplexere Synthesewege in *S. cerevisiae* zu etablieren.

1.2 Heterologe Produktion von Terpenoiden aus dem Mevalonatbiosyntheseweg

Der Mevalonatbiosyntheseweg der Bäckerhefe ist ein beliebtes Ziel für „*Metabolic Engineering*“, da sich aus diesem die heterologe Produktion von unterschiedlichen Terpenoide abzweigen lässt (Abb. 4). Der hefeeigene Syntheseweg beginnt mit der Biosynthese von Acetoacetyl Coenzym A aus zwei Acetyl CoA Molekülen, welche von Erg10 katalysiert wird. Durch eine weitere Reaktion mit einem dritten Acetyl CoA entsteht mit Hilfe von Erg13 HMG-CoA, welches durch Hmg1 und Hmg2 zu Mevalonat (MVA) gewandelt wird. Diese Reaktion benötigt zwei NADPH reduzierende Schritte. Die darauffolgende Phosphorylierung von MVA zu 5-Dihpospho-R-Mevalonat wird durch die Kinasen Erg12 und Erg8 durchgeführt. Eine anschließende Decarboxylierung unter ATP Verbrauch lässt mit Hilfe von Mvd1/Erg19 Isopentenylpyrophosphat (IPP) entstehen. IPP kann daraufhin durch Idi1 zu Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) isomerisiert werden (Kuranda et al. 2009; Vranová et al. 2013). Anschließend erfolgt eine Katalysation in zwei Schritten durch Erg20 zu Farnesylprohosphat (FPP). Im ersten Schritt kondensiert Erg20 IPP und DMAPP zu Geranylpyrophosphat (GPP). Im zweiten Schritt wird ein weiteres IPP Molekül hinzugefügt und es entsteht FPP (Anderson et al. 1989; Kuranda et al. 2009). Dieses Produkt des Mevalonatbiosynthesewegs wird anschließend in 16 weiteren enzymatischen Reaktionen zu Ergosterol umgewandelt, welches in den Zellen akkumuliert. Dieser Weg wird durch die Reaktion von FPP zu Squalene durch Erg9 eingeleitet. Durch eine weitere Reaktion mit Hilfe von Erg1 entsteht zunächst 2,3-Oxidosqualene, welches durch Erg7 zu Lanosterol katalysiert wird. Die folgenden Reaktionen bis zu Ergosterol werden durch 10 unterschiedliche *ERG*-Gene ermöglicht (Leber et al. 2003).

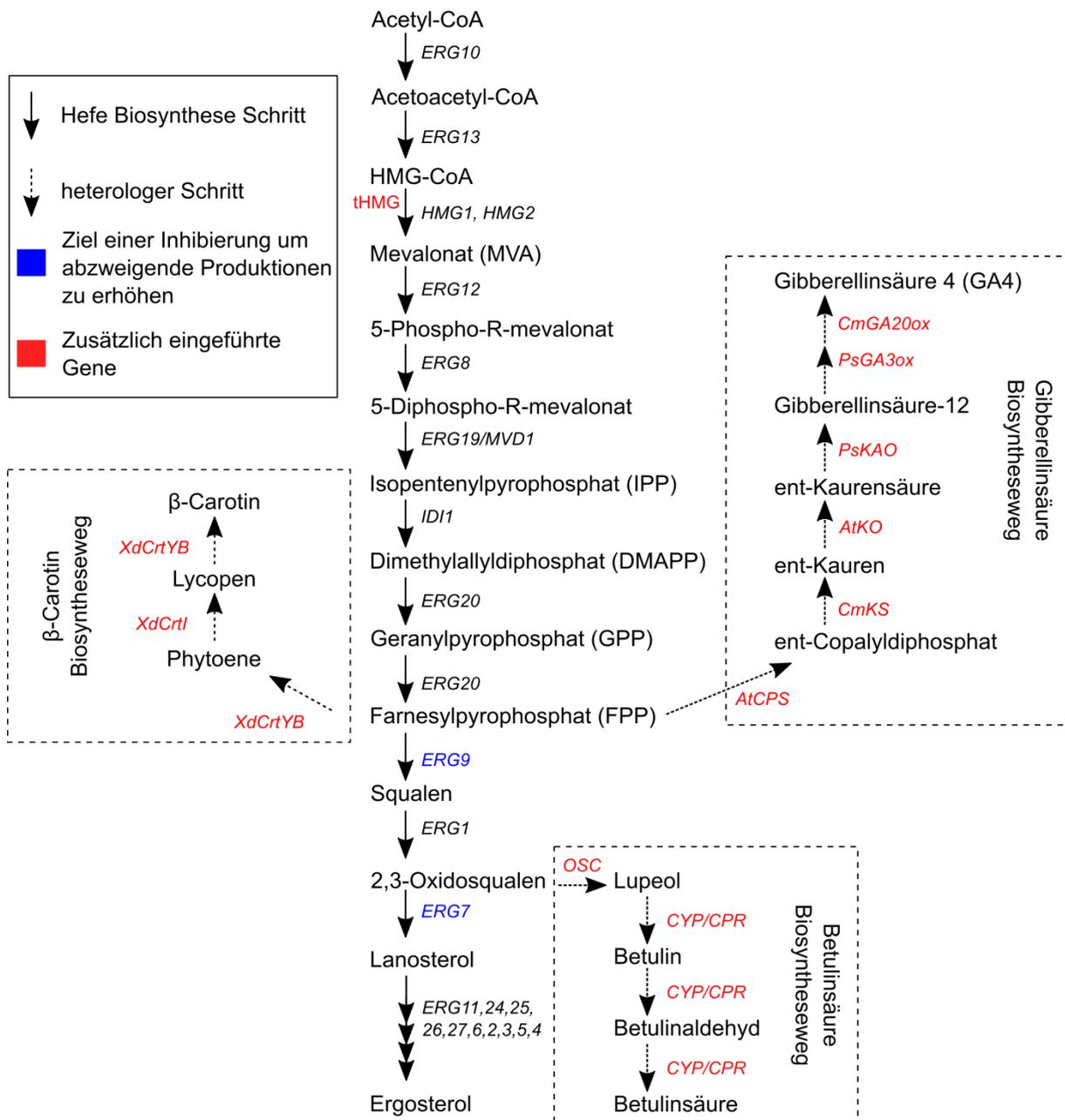


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Mevalonat- und des darauffolgenden Ergosterolbiosyntheseweges mit möglichen abzweigenden heterologen Terpenoidsynthesen. Der Mevalonatsyntheseweg beginnt mit der Katalysierung von Acetoacetyl-CoA aus Acetyl-CoA und endet mit FPP. Erg9 leitet mit der Umwandlung von FPP zu Squalen den Ergosterolweg ein. Die Produktion von β -Carotin und GA4 verwendet das gleiche Kernintermediat FPP. Die Fabrikation von Betulinsäure hingegen verwendet 2,3-Oxidosqualen. In Rot sind die zusätzlichen eingeführten Gene für die heterologen Systeme angezeigt und die benötigten Gene für einen erhöhten metabolischen Fluss in den Mevalonatweg. Nicht dargestellt ist UPC2-1, da es nicht direkt Teil des Mevalonatsyntheseweges ist. In Blau sind die Ziele einer möglichen Inhibierung dargestellt. Dadurch würden die an dieser Stelle abzweigenden Produktionen erhöht werden.

Aus diesem hefeeigenen Syntheseweg lassen sich mehrere heterologe Biosynthesen von unterschiedlichen Terpenoiden abzweigen. So konnte unter anderem die Produktion für Betulinsäure, Linalool, β -Amyrin und β -Carotin erfolgreich aus dem Mevalonatweg abzweigend werden (Czarnotta et al. 2017; Madsen et al. 2011; Rico et al. 2010; Yan et al. 2012). Die Produktion von Betulinsäure und β -Amyrin verwendet zum Beispiel 2,3-

Oxidosqualene als Kernintermediat, während β -Carotin auf FPP basiert und Linalool aus GPP hergestellt wird.

Der metabolische Fluss zu Gunsten des Mevalonatweges lässt sich mit wenigen genetischen Modifikationen steigern (Ro et al. 2006; Shiba et al. 2007). Dadurch können nach der Etablierung eines heterologen Biosyntheseweges einfache erste Optimierungen vorgenommen werden. Diese Modifikationen beinhalten die Überexpression des Mevalonat-Biosyntheseweges durch, zum Beispiel, der Integration einer verkürzten Variante von HMG1 (tHMG1), einer zusätzlichen Expression des Allels Upc2-1 und eine Aktivitätsverringerng des weiterführenden Ergosterol-Biosyntheseweges. Für β -Carotin zum Beispiel kann die Aktivitätsverringerng des weiterführenden Ergosterol-Biosyntheseweges durch eine Destabilisierung von Erg9 oder einer Transkriptionskontrolle hervorgerufen werden. Dadurch wird der Verbrauch des Kernintermediats FPP deutlich verringert und der metabolische Fluss zu Gunsten des gewünschten Produktes erhöht sich (Yan et al. 2012; Asadollahi et al. 2008; Peng et al. 2017). Dieser angestrebte Effekt wurde in der Vergangenheit zum Beispiel durch eine Fusion von Erg9 mit dem C-terminus des G1 Cyclin Proteins (*CLN2^{PEST}*) hervorgerufen. Die dadurch entstandene Destabilisierung von Erg9 führte zu einer Reduzierung der Proteinmengen auf ca. 30% des WT-Levels (Peng et al. 2017). Durch Modifikationen dieser Art konnte die β -Carotin-Produktion deutlich gesteigert werden.

Eine weitere Synthese, die sich aus dem Mevalonat/Ergosterolweg abzweigt ermöglicht es, in *S. cerevisiae* das bereits gegen HIV eingesetzte Triterpenoid Betulinsäure zu produzieren. (Huang et al. 2012). Hierbei handelt es sich um eine Chemikalie, welche nachweislich eine inhibierende Wirkung auf bestimmte Krebszellen hat (Valentina Zuco et al. 2002; Wick et al. 1999; Fulda et al. 1997). Zur Zeit beruht die kommerzielle Produktion von Betulinsäure (BA) noch immer auf die traditionelle Extraktion aus Birkenrinde oder der semisynthetischen Produktion aus dem Vorläufer Betulin, welches in höheren Mengen aus Pflanzen extrahiert werden kann (René Csuk et al. 2006; Ressmann et al. 2017; Šiman et al. 2016; Krasutsky et al. 2003). Da sich der heterologe Biosyntheseweg der Betulinsäure aus dem hefeeigenen Mevalonatsyntheseweg abzweigt, wurden bereits zuvor beschriebene Optimierungen durchgeführt (Li und Zhang 2014, 2015; Czarnotta et al. 2017). Die konkurrierende Katalyse von 2,3-Oxidosqualen zu Lanosterol durch Erg7 wurde durch einen methioninabhängigen Promotor inhibiert. Es wurden für diese Synthese auch erste Fermentationsoptimierungen untersucht (Czarnotta et al. 2017).

Eine Möglichkeit, welche bis zu dieser Arbeit noch nicht von der Wissenschaft aufgegriffen wurde, wäre der Gibberellinsäure-Biosyntheseweg. Dieser zweigt sich an der gleichen Stelle wie β -Carotin aus dem Mevalonatweg ab und benötigt die Insertion von 8 heterologen Genen. Die Expression und Aktivität der einzelnen benötigten Gene, welche aus den Pflanzen *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum* und *Cucurbita maxima* stammen, konnten bereits in *Escherichia coli* (*AtCPS*, *CmKS*, *CmGA20ox*, *PsGA3ox*), *Saccharomyces cerevisiae* (*CmKO1*, *PsKAO2*) oder in *Pichia pastoris* (*GA13ox AtCYP714B1*) untersucht werden (Davidson et al. 2003; Helliwell et al. 2001; Köksal et al. 2014; Lange et al. 1994; Lester et al. 1997; Magome et al. 2013; Yamaguchi et al. 1996). Die Produktion von Gibberellinsäure ist äußerst lukrativ, da zurzeit lediglich GA3 unter relativ hohen Kosten durch Fermentation des Pilzes *Fusarium moniliforme* zugänglich ist (Rodrigues et al. 2012). Die anderen bioaktiven Gibberellinsäurederivate wie z.B. GA4 sind nicht direkt in größeren Mengen verfügbar. Bioaktive Gibberellinsäuren wie GA3 oder GA4 sind Pflanzenwachstumshormone und beeinflussen die Samengermination, das Längenwachstum, die Blütenentwicklung und die Fruchtbildung der Pflanzen (Bömke und Tudzynski 2009). Für die Optimierungen einer Gibberellinsäureproduktion könnte ein funktionaler Assay, beruhend auf der Interaktion von *AtGID1* und *AtDELLA* in Anwesenheit eines bioaktiven Gibberellinsäurederivates, entwickelt und verwendet werden (Nakajima et al. 2006; Ueguchi-Tanaka et al. 2007). Diese Interaktion müsste für die Wandlung in ein Reportersystem sichtbar gemacht werden. Hierzu gibt es bereits verschiedene Ansätze. Zum Beispiel wurde eine Hefe-Zwei-Hybrid ähnliches System entwickelt, welches unter Anwesenheit von GA ein auslesbares Signal produziert. In diesem Fall wurde die Expression von β -Galactosidase kontrolliert (Nakajima et al. 2006). Durch dieses System kann jedoch die Anwesenheit von GA nur qualitativ bestimmt werden. Andere publizierte *in vivo* Reporter nutzen die gleiche Interaktion zwischen *AtGAI* und *AtGid1A*, aber induzieren dadurch eine Degradation. Für dieses System wurde *AtGAI* mit einem mCherry und einer Ubiquitin-ähnlichen Domäne (UbL: ubiquitin-like Domain) fusioniert (Wilmington und Matouschek 2016). Diese Chimäre interagiert mit dem Proteasom durch die UbL-Domäne, wird aber nicht von diesem abgebaut. *AtGid1A* ist mit einem GFP markiert und dient als Substrat. Durch GA in der Zelle findet die bereits beschriebene Interaktion statt und *AtGid1A*-GFP wird in die Nähe des Proteasoms gebracht und dadurch abgebaut. UbL-RFP-*AtGAI* hingegen wird recycelt. Dieses System reagierte erfolgreich auf unterschiedliche GA3-Konzentrationen in Säugetierzellen. Die Degradation eines Reportersignals ist jedoch sehr anfällig für falsch positive Ergebnisse. Durch eine fehlerhafte Expression könnte von einer erhöhten Produktion ausgegangen werden. Bis zu dieser Arbeit wurde noch nicht das

Prinzip eines „Protein-fragment Complementation Assays“ für diesen Reporter aufgegriffen. Bei diesem Assay kann ein zuvor geteilter Reporter durch die Interaktion seines fusionierten Partners reassemblieren. Hierfür könnte ein fluoreszierendes Protein verwendet werden (Blakeley et al. 2012; Feng et al. 2017).

1.3 Optogenetik

Die Optogenetik bezeichnet ein Forschungsgebiet, in dem biologische Prozesse durch optische Signale in Form von Licht beeinflusst und manipuliert werden. Diese Forschung hat ihren Ursprung in der Neurobiologie. Durch die Entdeckung der lichtsensitiven Proteinfamilie der Channelrhodopsine wurde es erstmals möglich Neuronen temporär, gezielt und, mit minimalen Kreuzauswirkungen auf die Zellen, zu aktivieren (Boyden et al. 2005; Oesterhelt und Stoeckenius 1971). Die genannten Vorteile wurden in den letzten Jahren auch von anderen Forschungsrichtungen wie zum Beispiel in der molekularen (Gradinaru et al. 2010), zellulären (Toettcher et al. 2011) und der synthetischen Biologie (Schmidt und Cho 2015) erkannt und entsprechende Module kommen in diesen bereits regelmäßig zum Einsatz. Es entstehen aktuell auch erste optogenetische Anwendungen in der Biotechnologie, da durch Licht günstig, genau und sehr schnell Prozesse reguliert werden können. (Zhao et al. 2018). Dieses breitgefächerte Anwendungsgebiet führt dazu, dass optogenetische Module bei unterschiedlichsten Fragestellungen zum Einsatz kommen. Seit mehreren Jahren wird sich hierbei nicht mehr ausschließlich an den in der Natur entstandenen Modulen bedient, sondern ebenfalls neue synthetisch hergestellt (Schmidt und Cho 2015). Der dadurch immer größer werdende „Werkzeugkasten“ beinhaltet mittlerweile eine Vielzahl an Modulen. Dieser Werkzeugkasten muss jedoch aufgrund der wachsenden Anwendungsgebiete und der neuen Fragestellungen immer mehr erweitert und optimiert werden.

Es etablierten sich schon verschiedenste optogenetische Module, welche durch Licht zelluläre Prozesse kontrollieren, wie zum Beispiel die Proteinaktivität durch die Kontrolle der Proteininstabilität (Renicke et al. 2013; Hasenjäger et al. 2019b; Hepp et al. 2020), die Transkription (Kennedy et al. 2010), die Proteinlokalisierung (Yazawa et al. 2009; Wang et al. 2016), Proteininteraktionen (Wang et al. 2016), den Ionentransport (Hegemann und Möglich 2011) und noch vieles mehr. Sie sind meistens modular aufgebaut und bestehen aus einem Photorezeptor, der an eine Effektor-domäne fusioniert wurde (Abb. 5).

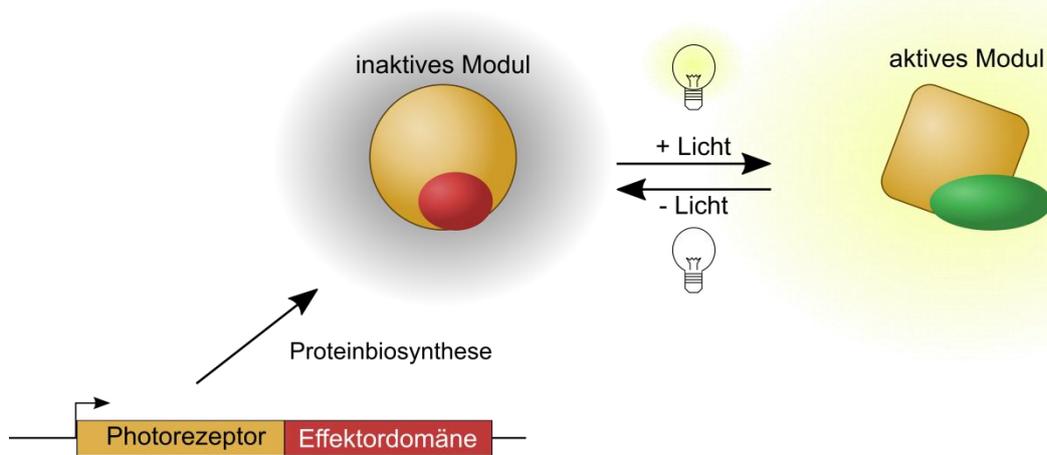


Abbildung 5: Schematische Darstellung von optogenetischen Werkzeugen. Diese modular aufgebauten Schalter bestehen aus einer Fusion eines Lichtrezeptors mit einer Effektor-domäne. Die Effektor-domäne bestimmt, welche zelluläre Funktion mit dem Werkzeug kontrolliert wird. In Dunkelheit befindet sich das Modul im Allgemeinen in einem inaktiven Zustand. Die Anregung des Photorezeptors mit Licht einer passenden Wellenlänge führt zu einer reversiblen, strukturellen Änderung im Photorezeptor, und die zuvor blockierte Effektor-domäne wird aktiviert (Hasenjäger et al. 2019a).

Von Ersterem hängt ab auf welche Lichtwellenlänge und wie sensitiv das Konstrukt auf das Signal reagiert. Hierbei gibt es eine große Anzahl an möglichen Rezeptoren, die das gesamte Lichtspektrum abdecken. Als klassische Blaulichtrezeptoren sind die LOV- und BLUF-Domänen, aber auch die Cryptochrome zu nennen. Für Rotlicht erwiesen sich Phytochrome als vielversprechend und diese werden für die unterschiedlichsten optogenetischen Werkzeuge verwendet (O'Banion und Lawrence 2018).

Von den gewählten Effektor-domänen hängt die zu kontrollierende Funktion ab. Effektor-domänen beinhalten zum Beispiel: Degradationssequenzen (Renicke et al. 2013; Usherenko et al. 2014; Hasenjäger et al. 2019b), DNA-Bindedomänen (Kennedy et al. 2010), Transkriptionsaktivator-domänen (Kennedy et al. 2010), Ionenkanäle (Hegemann und Möglich 2011), Adenylylcyclasen-Domänen (Stierl et al. 2011) und Rekombinasen (Duplus-Bottin et al. 2020). Sie werden letztendlich der gewünschten Funktion angepasst und deren Aktivität an die verschiedenen Konformationen der Photorezeptoren gekoppelt (Schmidt und Cho 2015). Diese Kopplung entscheidet darüber wie gut ein Schalter funktioniert. Das entstehende Modul kann jedoch nur so gut sein wie das Schaltverhalten des Photorezeptors selbst, da dieser nicht beliebig gesteigert werden kann. Von einem Proof-of-Principle-Werkzeug zu einem leicht einsetzbaren sind daher meistens noch mehrere Optimierungen nötig. Diese beinhalten eine verbesserte Kopplung des Photorezeptors mit der Effektor-domäne oder das verwenden anderer oder verbesserter Photorezeptoren, da die Eigenschaften dieser auch stark über das Verhalten des Moduls, wie die Dunkelaktivität, entscheidet (Hasenjäger et al. 2019b).

Als Beispiel für ein synthetisches optogenetisches Modul eignet sich der blaulicht-sensitive Transkriptionsfaktor. Das System basiert auf der lichtabhängigen Interaktion zwischen dem Photorezeptor Cryptochrom 2 (Cry2) und dessen Interaktionspartner Cib1 aus *Arabidopsis thaliana* (Kennedy et al. 2010). Als Effektor-domänen wurde eine DNA-Bindedomäne an Cry2 fusioniert und eine Aktivator-domäne an Cib1 (Abb. 6).

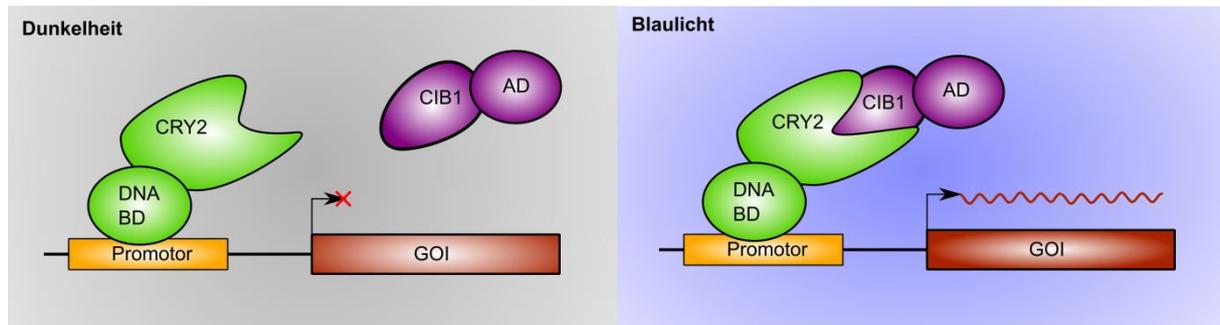


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines auf der CRY2 und CIB1 Interaktion basierendem optogenetischen Promotorsystems. CRY ist mit einer DNA-Bindedomäne (DNA-BD) fusioniert und ist daher Licht unabhängig an die DNA gebunden. CIB1 liegt frei vor und ist mit einer Aktivator-domäne (AD) fusioniert. In Dunkelheit interagieren die beiden Partner nicht und es kann keine Transkription initiiert werden. In Blaulicht hingegen wird die Interaktion ermöglicht und es reassembliert sich ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor. Die Transkription kann eingeleitet werden.

Bei diesem Hefe-Zwei-Hybrid ähnlichem System ist der lichtregulierte Transkriptionsfaktor in Dunkelheit dissoziiert. Durch die Bestrahlung mit Blaulicht wird die Interaktion zwischen Cry2 und Cib1 induziert und der Transkriptionsfaktor reassembliert sich (Kennedy et al. 2010; Trauth 2017). Durch diese Proteinfusionen konnte erfolgreich die Aktivität der Effektor-domänen an das Schaltverhalten des Photorezeptors gekoppelt werden.

1.2.1 LOV-Domänen

Es gibt über 7000 bekannte LOV(light oxygen voltage)-Domänen. Sie sind weit verbreitet und in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen zu finden (Glantz et al. 2016). Zum ersten Mal entdeckt wurden sie in den Phototropinen. Hierbei handelt es sich um eine blaulichtaktivierbare Serin/Threonin-Kinase aus Pflanzen und Algen, welche eine wichtige Rolle im Phototropismus spielt (Huala et al. 1997; Christie et al. 1998).

Die LOV-Domänen gehören zu der PAS (Period-ARNT-Single-minded) Domänenfamilie (Möglich et al. 2009). Diese Domänen bestehen in ihrer Minimalform aus ca. 110 Aminosäuren. Das PAS-typische Faltungsmotiv besteht aus fünf antiparallelen β -Faltblättern und vier α -Helices ($A\beta$ - $B\beta$ - $C\alpha$ - $D\alpha$ - $E\alpha$ - $F\alpha$ - $G\beta$ - $H\beta$ - $I\beta$)(Abb. 7) (Crosson und Moffat 2001; Banerjee et al. 2016a). Der Kern der LOV-Domänen wird durch zwei Helices flankiert: der

N-terminalen A' α und der C-terminalen J α -Helix (Harper et al. 2003; Halavaty und Moffat 2007).

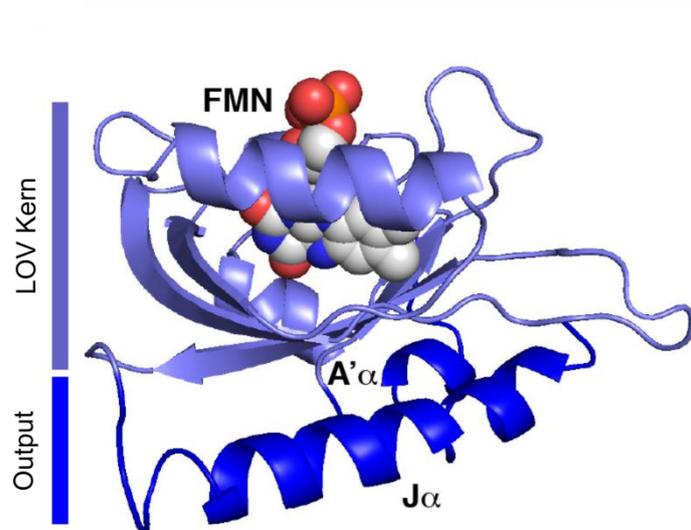


Abbildung 7: Struktur der AsLOV2-Domäne. Dargestellt ist der LOV-Kern, welcher den FMN Chromophor umgibt. Die Effektor- bzw. Output-Helices A' α und J α grenzen an das konservierte PAS-Faltungsmotiv an. Die A' α -Helix befindet sich N-Terminus und die J α -Helix am C-Terminus. Die modifizierte Abbildung stammt aus (Losi et al. 2018) und basiert auf den Strukturen aus (Harper et al. 2003; Halavaty und Moffat 2007).

Die photosensorische Funktion der LOV-Domänen wird durch das Binden des spezifischen Flavin-Chromophors ermöglicht. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um FMN. Es wurden aber auch Proteine beschrieben, die FAD oder Riboflavin als Cofaktor gebunden haben (Zoltowski et al. 2007). In Dunkelheit ist der Cofaktor nicht-kovalent gebunden und wird durch die Helices eingebettet. Durch Blaulichtabsorption des Cofaktors bildet sich das C4(a)-Addukt zwischen dem konservierten Cystein aus der E α -Helix und dem C4a-Atom des Cofaktors. Diese Adduktformation führt zu einer Störung der Interaktionen im Kern der Domäne, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt. Durch die Interaktionsunterbrechung lösen und entfalten sich die A' α - und die J α -Helix (Harper et al. 2003; Zayner et al. 2012; Halavaty und Moffat 2007). Der Dunkelzustand regeneriert sich durch den spontanen Zerfall des Adduktes.

1.2.2 BLUF-Domänen

BLUF steht für „blue light receptor using FAD“. Hierbei handelt es sich um eine Proteinfamilie, die wie die LOV-Domänen durch eine Konformationsänderung auf Blaulicht reagiert. Als Cofaktor enthält sie einen nicht-kovalent gebundenen Flavin-Chromophor. Auch hier wird das im Kern gebundene Chromophor des Proteins durch β -Faltblätter und α -Helices

flankiert. Die BLUF-typische Struktur besteht aus zwei α -Helices auf einer Seite eines anti-parallel β -Faltblatts (Abb. 8) (Yuan und Bauer 2008; Wu und Gardner 2009).

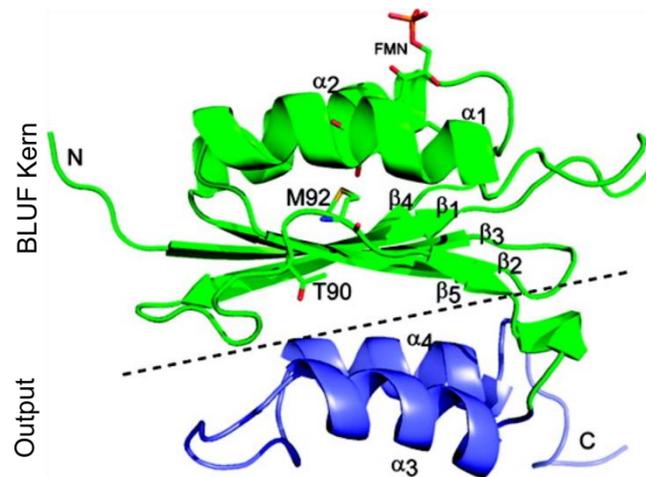


Abbildung 8: Struktur der BLUF-Domäne aus *Klebsiella pneumoniae* BlrP1. Diese Struktur dient als Beispiel für den Aufbau einer BLUF-Domäne. In grün ist der Kern dargestellt mit dem gebundenen Flavin-Chromophor. Ebenfalls markiert sind die konservierten Aminosäuren T90 (in den meisten BLUF-Domänen befindet sich hier ein W) und M92. Am C-Terminus befinden sich die Effektor- bzw. Output-Helices. Abbildung stammt aus (Wu und Gardner 2009).

Die Photoreaktion und der Ursprung der Domänen unterscheiden sich deutlich von dem der LOV-Domänen. Der Mechanismus der Photoreaktion ist noch nicht genau geklärt. In beiden postulierten Mechanismen wird jedoch die Veränderung des Chromophors durch ein konserviertes Glutamin weitergeleitet (Stelling et al. 2007; Gauden et al. 2005; Gauden et al. 2007; Domratcheva et al. 2016; Domratcheva et al. 2008). Zur Zeit sind ~900 BLUF-Domänen bekannt, welche hauptsächlich aus Proteobakterien, Pilzen und Flagellaten stammen (Finn et al. 2006; Losi et al. 2018).

1.2.3 Optogenetische Regulation der Proteininstabilität und der Proteinbiosynthese

Für Pflanzen ist es unverzichtbar auf bestimmte Lichtsignale zu reagieren. Diese Reaktion beinhaltet oft die Proteolyse von Schlüssel-Transkriptionsregulatoren (Renicke et al. 2013). In Eukaryoten wird der regulierte Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) durchgeführt. Dieses System nutzt das aus 76 Aminosäuren bestehende Protein Ubiquitin (Ub) als posttranslationale Modifikation, welches das Schicksal des Ziels beeinflusst. Es wird meistens an Lysin-Seitenketten gebunden und besitzt selbst 6 Lysine, an die weitere Ubiquitin-Proteine gebunden werden können (Peng et al. 2003). Eine Markierung mit diesem induziert unter anderem eine Degradation durch das Proteasom. Bei diesem Prozess ist eine Enzym-Kaskade, welche letzten Endes zum Abbau des Substratproteins führt, beteiligt.

Diese Kaskade besteht aus einem Ubiquitin-aktivierendem Enzym (E1), einem Ubiquitin-konjugiertem Enzym (E2) und einer Ubiquitin-Ligase (E3). Ersteres benötigt für seine Funktion ATP und bildet eine Thioester-Verbindung zwischen dem aktiven Cystein des E1 und dem terminalen Glycin von Ub. Dieses aktivierte Ub wird dann auf ein E2 übertragen. Die Ubiquitin-Ligase ist für die Substraterkennung zuständig und bindet dieses. Zusammen mit dem E2 wird dann der Transfer von Ub auf das Ziel katalysiert (Hershko und Ciechanover 1998; Varshavsky 1991; Finley et al. 2012; Trauth et al. 2019). Hierbei entsteht in den meisten Fällen eine Isopeptid-Bindung zwischen dem terminalen Glycin von Ub und der Seitenkette eines Substrat-Lysins. Weitere Ubiquitin-Übertragungen dieser Art führen zu einer Ubiquitin-Kette, welche als Abbausignal von dem Proteasom erkannt wird. Das Proteasom besteht aus mehreren Einheiten: dem proteolytischen Kern, einem AAA-ATPase Ring, welcher für das Entfalten des Substrates verantwortlich ist, und einem Deckel-Komplex (Abb. 9).

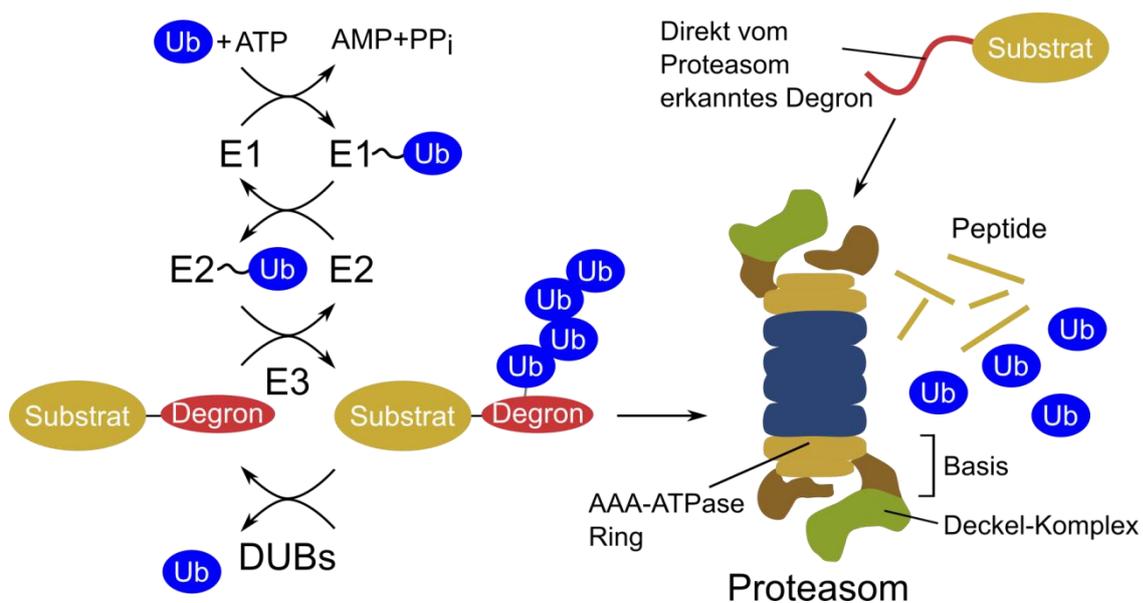


Abbildung 9: Das Ubiquitin-Proteasom-System. Ubiquitin (Ub) wird unter ATP-Verbrauch an das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) gebunden. Dieses aktivierte Ub wird auf das Ubiquitin-konjugierte Enzym (E2) übertragen. Zusammen mit dem E2 katalysiert die Ubiquitin-Ligase (E3) den Transfer des Ubs an das Substrat. Mehrere Durchläufe dieser Kaskade führen zu einer Ubiquitin-Kette. Diese wird von dem Proteasom erkannt, wodurch das Substrat abgebaut wird. Die Ubs werden dabei durch den Deckel-Komplex und den rekrutierten deubiquitilierenden Enzymen (DUBs) recycelt. Der AAA-ATPase Ring entfaltet das Substrat und zieht dieses in den proteolytischen Kern. Dort befinden sich Peptidasen, die das Substrat in kurze Peptide spalten. Abbildung aus (Trauth et al. 2019, 2020).

Letzteres bindet die Polyubiquitin-Kette und rekrutiert ein Deubiquitilierendes Enzym (DUB), um Ub zu recyceln. Wird ein polyubiquitiliertes-Substratprotein an das Proteasom gebracht, entfaltet der AAA-ATPase Ring dieses und zieht es in den proteolytischen Kern. Hier wird durch die Aktivität der Peptidasen das Protein in kleine Peptide gespalten. Währenddessen werden die Ubiquitine von dem Substrat entfernt. Manche Sequenzen, wie zum Beispiel der

C-Terminus der Maus Ornithin Decarboxylase (ODC), können auch direkt von Proteasom ubiquitinunabhängig erkannt werden (Finley et al. 2012; Inobe und Matouschek 2014; Ravid und Hochstrasser 2008; Hershko und Ciechanover 1998; Takeuchi et al. 2008).

Als Degron bezeichnet man eine kurze, übertragbare Minimalsequenz in einem Substrat, welche direkt von einem E3-Enzym erkannt wird und zu einer Degradation führen kann. In den meisten Fällen besteht dieses aus zwei Teilen: einer Polyubiquitin-Zielsequenz und einer ungefalteten Region im Substrat (Hershko und Ciechanover 1998; Ravid und Hochstrasser 2008; Varshavsky 1991). In den lichtregulierten Degradationsmodulen wird eine synthetisch hergestellte C-terminale Degronssequenz, welche von der Ornithin Decarboxylase (cODC) aus der Maus abstammt, verwendet (Jungbluth et al. 2010). Die Aktivität dieser Effektordomäne ist an das Schaltverhalten eines blaublichtsensitiven Photorezeptors gekoppelt (Abb. 10). Es dienen unterschiedliche optimierte LOV-Domänen (light oxygen voltage) als Blaublichtrezeptor. Die Aktivität des Degrons ist an mehrere Bedingungen gekoppelt. Unter anderem benötigt es eine mindestens 16-aminosäurenlange, unstrukturierte Sequenz flussaufwärts des Cystein-Alanin (CA) Motivs. Dies ist nur unter Blaublicht durch das Entfalten der α -Helix gegeben, wodurch eine blaublichtinduzierte Aktivierung ermöglicht wurde (Renicke et al. 2013).

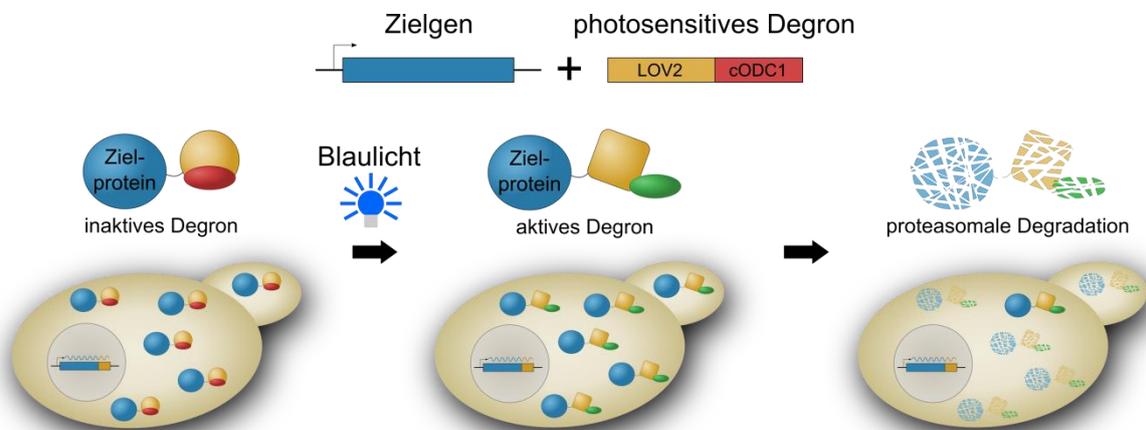


Abbildung 10: Schematische Darstellung des photosensitiven Degrons. Durch die Fusion des Zielgens mit dem psd-Modul kann das Genprodukt blaublichtabhängig destabilisiert werden. Blaublicht regt den Photorezeptor LOV2 an, wodurch es zur Entfaltung der α -Helix kommt. Diese strukturelle Veränderung aktiviert die zuvor blockierte Degradationssequenz, welche dadurch vom Proteasom erkannt werden kann. Modifizierte Abbildung aus (Renicke et al. 2013).

Das Schaltverhalten ist von diesem Mechanismus abhängig. Es gibt mehrere Optimierungsansätze die versuchen, den Photorezeptor modulunspezifisch zu verbessern (Zayner et al. 2012; Zayner et al. 2013; Zayner und Sosnick 2014; Lungu et al. 2012; Guntas et al. 2015). Diese Ansätze fließen unter anderem in die Entwicklung des psd-Moduls mit ein.

In dem ersten entwickelten photosensitiven Degradationsmodul (psd) wurde die LOV2-Domäne aus *Arabidopsis thaliana* des Phototropins 1 verwendet. Dieses Modul kam bei mehreren Zielen in der Bäckerhefe und in weiteren höheren Eukaryoten bereits zum Einsatz (Renicke et al. 2013). Aufgrund der vergleichsweise niedrigen Schaltrate und den hohen Halbwertszeiten (Tabelle 1) wurden unterschiedliche Optimierungen durchgeführt. Zum einen wurden LOV2-Domänen aus anderen Organismen verwendet und zum anderen zufällige und gezielte Mutationen zur Manipulation des Photozyklus eingefügt (Hasenjäger 2018; Goenrich 2019; Hasenjäger et al. 2019b; Usherenko et al. 2014). So entstand zum Beispiel durch das Einführen von Mutationen in die J α -Helix die zweite Generation der photosensitiven Degradationsmodule. Durch dieses Vorgehen bildeten sich fünf signifikant verbesserte Varianten im Vergleich zum ursprünglichen Modul. Die Mutationen K92R, E132A und E155G ermöglichten es, die Schaltrate von 4 auf 10 zu erhöhen (Usherenko et al. 2014). Das psd-Modul mit der *At*LOV2^{K92R E132A E155G} wird daher auch als photosensitives Degron der zweiten Generation bezeichnet (psd²). Um die Auswirkungen anderer LOV2-Domänen zu untersuchen wurden Versionen aus anderen Organismen im Kontext des Degradationsmoduls verwendet. Dadurch konnten mehrere natürliche Photorezeptoren der Phototropin-LOV2-Proteinfamilie charakterisiert werden. Diese Domänen stammten aus unterschiedlichen Organismen wie zum Beispiel: *Aegilops tauschii*, *Avena sativa*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cucumis melo*, *Gossypium reinmondii* und *Zea mays*. Die meisten Varianten führten zu einer ähnlichen Schaltrate wie das psd-Modul mit der *At*LOV2 (Hasenjäger et al. 2019b). Es wurde zusätzlich auch eine bereits modifizierte *As*LOV2, welche die iLID-Mutationen trug (M398-A543 aus *AsNP1*), verwendet. Diese Version wurde entwickelt um eine verbesserte Protein-Protein-Interaktion hervorzurufen. (Guntas et al. 2015). Jedoch führte auch diese Version nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Glücklicherweise entstand bei dem Klonierungsprozess dieses Konstrukts eine Mutante, bei der ein Alanin-Kodon deletiert wurde (A146). Diese Variante führte zu einer Schaltrate im Kontext des psd-Moduls von über 40 und wird als photosensitives Degron der dritten Generation bezeichnet (psd³) (Hasenjäger et al. 2019b). Diese enorme Schaltrate kommt durch die hohe destabilisierende Wirkung in Blaulicht zustande (Tabelle 1). Die aktuellste Version der vierten Generation beruht auf dem psd³-Modul. Es wurde jedoch nicht versucht die Schaltrate weiter zu erhöhen oder die Halbwertszeiten zu verringern, sondern ein lichtsensitiveres System zu erhalten. Dies konnte durch eine Photozyklus-Mutante erreicht werden. Dafür wurde in dem Photorezeptor vom psd³ das Valin 416 mit einem Leucin ausgetauscht, wodurch der Photozyklus verlangsamt wurde. Durch diese Mutation konnte bereits in anderen optogenetischen Modulen die

Lichtsensibilität deutlich erhöht werden (Wang et al. 2016; Goenrich 2019). Die Implementation dieser in das photosensitive Degronmodul führte wie erwartet zu einer deutlichen Erhöhung der Lichtsensibilität und wird als Modul der vierten Generation (psd⁴) bezeichnet (Bastian Pook, unpublizierte Daten).

Tabelle 1: Vergleich der unterschiedlichen Versionen des photosensitiven Degrons. Die Halbwertszeiten und die Schaltrate wurden immer in *S. cerevisiae* bestimmt und beziehen sich auf die RFP/GFP-Ratio aus (Hasenjäger et al. 2019b). Für die Halbwertszeiten diente tRFP als Reporter.

psd-Modul	Photorezeptor	Schaltrate Dunkel/Blaulicht	Halbwertszeit [min]		Quelle
			Dunkelheit	Blaulicht	
psd	<i>AtLOV2</i>	~4	123 +/- 21	20 +/- 1	(Renicke et al. 2013)
psd ^{AS}	<i>AsLOV2</i>	~6	43	7	(Hasenjäger 2018)
psd ²	<i>AtLOV2</i> ^{K92R E132A E155G}	~10	102 +/- 41	12 +/- 1	(Usherenko et al. 2014)
psd ³	<i>AsLOV2</i> ^{iLIDA146Δ}	~42	44 +/-6	5 +/- 0,2	(Hasenjäger et al. 2019b)
psd ⁴	<i>AsLOV2</i> ^{iLIDA146Δ V416L}	~42*	Nicht Bestimmt	Nicht Bestimmt	(Goenrich 2019) *Pook, Bastian; unpublizierte Daten

Ein weiteres optogenetisches Modul, welches die Protein-Level herabreguliert, ist der photosensitive Transkriptionsfaktor (psTF). Dieser erlaubt eine Proteinbiosynthese in Dunkelheit, welche unter Blaulicht jedoch stark reduziert wird. Hierbei wird die Interaktion der *AsLOV2*-Domäne mit dem kleinen Peptid Zdark (Zdk) ausgenutzt, welche für das LOVtrap-System entwickelt wurde. Der Interaktionspartner der *AsLOV2*-Domäne des Phototropins 1 konnte mittels „mRNA-Display-Screening“ identifiziert werden und basiert auf der Z-Domäne des immunoglobulinbindenden Proteins A aus *Staphylococcus aureus*. Das Zdk bindet nur spezifisch an den Dunkelzustand der *AsLOV2* (Wang et al. 2016). Dieses System wurde ursprünglich als optogenetisches Rekrutierungssystem verwendet um, zum Beispiel, Proteine in Säugetierzellen an die mitochondrialen Membran (Shcherbakova et al. 2018; Wang et al. 2016) oder die Cytoplasmamembran (Yumerefendi et al. 2018) lichtabhängig zu bringen. Als optogenetischer Transkriptionsfaktor wurde es erstmalig in der Bäckerhefe verwendet. Hierfür wurde der Photorezeptor *AsLOV2* an eine DNA-Bindedomäne fusioniert (HA-tetR-*AsLOV2*; tRAL) und das Peptid Zdk1 an eine

Transkriptionsaktivator-Domäne VP16 mit einem psd³-Modul (Zdk1-VP16-3myc-psd³; ZVPd). Dieser photosensitive Transkriptionsfaktor wird als psTF bezeichnet. Er ermöglicht durch seine Reassemblierung? in Dunkelheit eine Transkription des Zielgens. In Blaulicht dissoziiert der Transkriptionsfaktor und die Transkription wird gestoppt (Hasenjäger et al. 2019b). Es handelt sich hierbei um ein umgekehrtes Schaltverhalten im Vergleich zu dem bereits beschriebenen Cry2-Cib1 blaulichtsensitivem System.

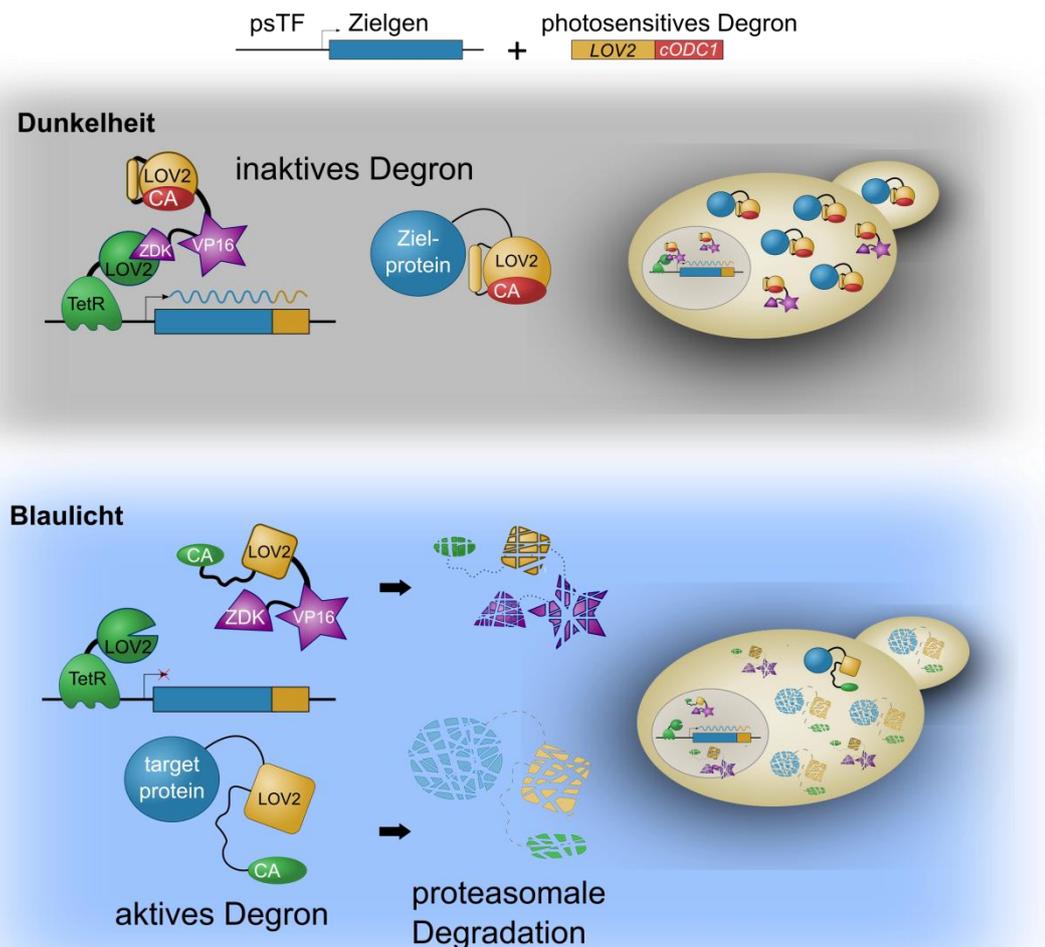


Abbildung 11: Schematische Darstellung der synergistischen- mehrschrittigen-optogenetischen Protein-Level Kontrolle (SOMCo). Der psTF besteht aus einem Photorezeptor (AsLOV2), an den eine DNA-Bindedomäne (HA-tetR-AsLOV2; tRAL) fusioniert wurde, und aus dem Peptid Zdk1, an eine Transkriptionsaktivator-Domäne VP16 mit einem psd³-Modul (Zdk1-VP16-3myc-psd³; ZVPd) fusioniert wurde. Das photosensitive Degron der dritten Generation (psd³) verwendet die AsLOV2^{iLIDA146Δ}-Mutante als Photorezeptor. In Dunkelheit ist der psTF assembliert und das psd-Modul im nicht aktiven Zustand. Dadurch liegt das Zielprotein stabil vor. Durch Blaulichtbestrahlung dissoziiert der Transkriptionsfaktor und die lichtregulierten Degrons werden aktiviert. Das SOMCo-Modul reguliert mittels Blaulicht auf drei unterschiedlichen Ebenen die Substratproteinverfügbarkeit: i) Aktivität des Transkriptionsfaktors, ii) Stabilität eines Teils des Transkriptionsfaktors und iii) Proteolyse des Substrats. Durch die Kombination des psTF und des psd³-Moduls konnte ein Dunkel/Blaulicht-Schaltfaktor von über 300 erreicht werden (Hasenjäger et al. 2019b).

Durch den psTF konnte ein Schaltfaktor von 2,5-5 erzielt werden. Da dieser an einer anderen Stelle als die photosensitiven Degrons agiert, waren beide Systeme kombinierbar (Abb. 11).

Die Implementation beider optogenetischen Module führte zu einer synergistischen mehrschrittigen Kontrolle der Proteinmenge durch Blaulicht (synergistic optogenetic multistep control; SOMCo). Diese lichtabhängige Kontrolle der Transkription und Proteinstabilität führte zu einem Dunkel/Blaulicht-Schaltfaktor von über 300 (Hasenjäger et al. 2019b).

1.2.4 Die LOV-Domäne aus dem *Phaeodactylum tricornutum* Aureochrome 1a als optogenetisches Modul

Die Proteinfamilie der sogenannten Aureochrome beinhaltet Transkriptionsfaktoren, welche aus einer N-terminalen bZIP DNA-Bindedomäne fusioniert an eine C-terminale LOV-Domäne bestehen (Takahashi 2016; Essen et al. 2017). Aureochrome kommen in photosynthetischen Stramenopilien vor (Takahashi 2016). Die LOV-Domänen typische lichtabhängige Entfaltung einer Helix konnte auch in den Aureochrome LOV-Domänen (AuLOV) durch biophysikalische Untersuchungen gezeigt werden (Heintz et al. 2016; Banerjee et al. 2016b; Banerjee et al. 2016a). Im Vergleich zu anderen LOV-Domänen tragenden Proteinen ist die Domänenanordnung in Aureochromen invers. In zum Beispiel dem Phototropin 1 aus *Arabidopsis thaliana* befindet sich die Sensordomäne am N-Terminus und am C-Terminus die Effektordomäne. Bei den Aureochromen hingegen befindet sich die Effektordomäne in Form des bZIPs am N-Terminus und die AuLOV-Domäne am C-Terminus (Herman et al. 2013). Für diese Photorezeptoren konnten durch strukturelle Untersuchungen zwei Strukturen im Dunkelzustand gelöst werden. Bei beiden war ein antiparalleler AuLOV-Dimer in den Proteinkristallen vorhanden (Heintz et al. 2016; Banerjee et al. 2016a).

Basierend auf der LOV-Domäne aus dem Kieselalgen *Phaeodactylum tricornutum* Aureochrome 1a wurden erfolgreich in *S. cerevisiae* unterschiedliche optogenetische Werkzeuge hergestellt (Abb. 12). Mit Hilfe dieses Photorezeptors konnte erfolgreich ein in Dunkelheit destabilisierendes und in Blaulicht stabilisierendes optogenetisches Modul hergestellt werden (Hepp et al. 2020).

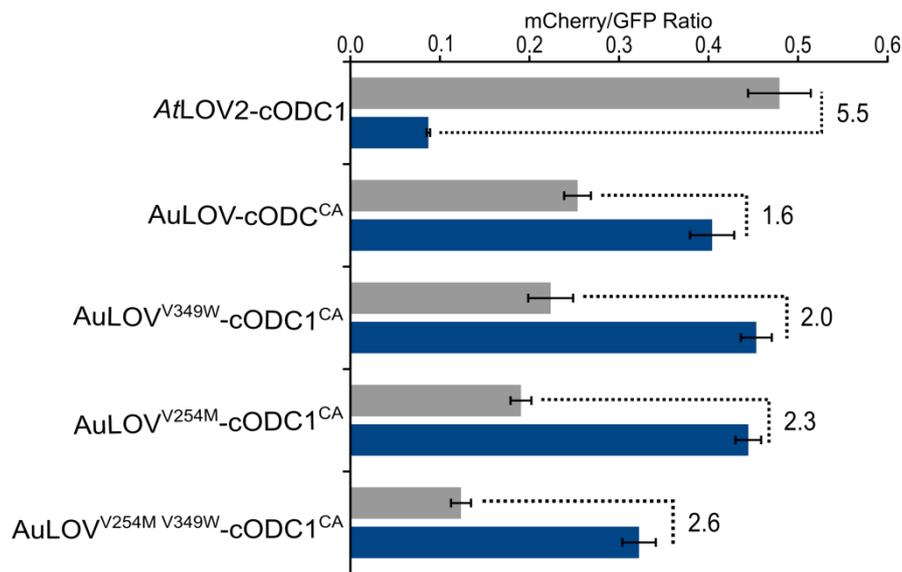


Abbildung 12: Ein in Blaulicht stabilisierendes optogenetisches Modul. Das besondere Schaltverhalten der *AuLOV*-Domäne konnte durch das Einführen der V254M und V349W-Mutante erhöht werden. Es handelt sich jedoch weiterhin um einen geringeren Schalfaktor als beim ursprünglichen psd-Modul (*AtLOV2-cODC1*). Abbildung aus (Hepp et al. 2020).

Dieses besondere Schaltverhalten wurde durch das Einführen von Mutationen in der Dimerisierungsschnittstelle verstärkt. Diese verbesserte Variante (*AuLOV^{V254M V349W}*) erlaubte in Kombination mit einer blaulichtaktivierbaren Adenylylzyklase (bPAC) eine synergistische lichtabhängige Kontrolle der PKA (*AuPAC*) (Hepp et al. 2020).

1.2.5 Optogenetische Manipulation der PKA-Aktivität in *S. cerevisiae*

Die Proteinkinase A in *Saccharomyces cerevisiae* ist ein Tetramer, welches aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten besteht. Die cAMP bindende regulatorische Untereinheit wird durch das Gen *BCY1* codiert und die katalytischen durch die Gene *TPK1*, *TPK2* und *TPK3* (Takashi Toda et al. 1987). In Abwesenheit von cAMP bindet Bcy1 die Tpk's, wodurch diese inaktiviert werden. Der cAMP-PKA Signaltransduktionsweg kontrolliert eine Vielzahl an zellulären Prozessen. Eine aktive PKA inhibiert zum Beispiel die Sporulation, die Kohlenhydratspeicherung, die Stressantwort-Gene und die Gene der stationären Phase. Zusätzlich aktiviert sie die Expression der Gene der ribosomalen Proteine und der Ribosomenbiogenese-Gene (Palecek et al. 2002; Gancedo 2008; Santangelo 2006). cAMP wird in *S. cerevisiae* durch die Adenylylcyklase Cyr1 aus ATP synthetisiert (Tohru Kataoka et al. 1985). Diese wird hauptsächlich durch extra- und intrazellulären fermentierbaren Zucker indirekt aktiviert (Thevelein und Winde 1999). Es wird davon ausgegangen, dass extrazellulär vorhandene Glukose über Gpa2 und intrazelluläre Glukose über Ras1 und Ras2 die Adenylylcyklase aktiviert. Ersteres wird durch den plasmamembrangebundenen G-Protein-gekoppelten Rezeptor Gpr1 erkannt (Lorenz et al. 2000; Rolland et al.

2000). Gpr1 interagiert mit Gpa2, wodurch es zu einem Austausch von GDP zu GTP kommt. Das GTP-gebundene Gpa2 aktiviert die cAMP-Synthase (Rolland et al. 2000). Die Aktivierung durch intrazelluläre Glukose findet durch die Proteine Ras1 und Ras2 statt. Hierbei handelt es sich um GTPasen. In ihrer GDP-gebundenen Form sind sie inaktiv (Broach 1991). In ihrer GTP-gebundenen Form aktivieren sie die Adenylylcyclase Cyr1. Der Austausch von GDP zu GTP und umgekehrt wird durch die Guanosin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF) und die GTPase-aktivierenden Proteine (GAP) reguliert. Als GEFs agieren Cdc25 und Sdc25. Sie aktivieren Ras1/2 durch Stimulierung des Austauschs von GDP durch GTP (Boy-Marcotte et al. 1996; Crechet et al. 1990). Die GAPs Ira1 und Ira2 hingegen führen zu einer Aktivierung der intrinsischen GTPase-Aktivität der Ras-Proteine, wodurch es zu einer Hydrolyse von GTP zu GDP kommt (Tanaka et al. 1989; Tanaka et al. 1990).

Die PKA-Aktivität in *S. cerevisiae* wurde bereits erfolgreich durch optogenetische Module reguliert. Hierfür verwendete man photoaktivierbare Adenylylcyclasen („photoactivated adenylate cyclase: PAC). Es wurden unterschiedliche PACs entdeckt. Für die Anwendung als optogenetisches Modul erwies sich bPAC als am vielversprechendsten. Im Vergleich zu anderen PACs ist diese klein, wird effektiver durch Blaulicht kontrolliert und der aktive Zustand kann länger aufrechterhalten werden (Stierl et al. 2011). Bei bPAC verwendet eine einzelne BLUF-Domäne, fusioniert an eine Typ III-Adenylylcyclase. Sie stammt aus dem Bakterium *Beggiatoa* und wurde bereits erfolgreich zur Produktion von cAMP in Bakterien, Pilzen und höheren Eukaryoten eingesetzt (Wagner Steuer Costa et al. 2017; Stewart-Ornstein et al. 2017; Jansen et al. 2015).

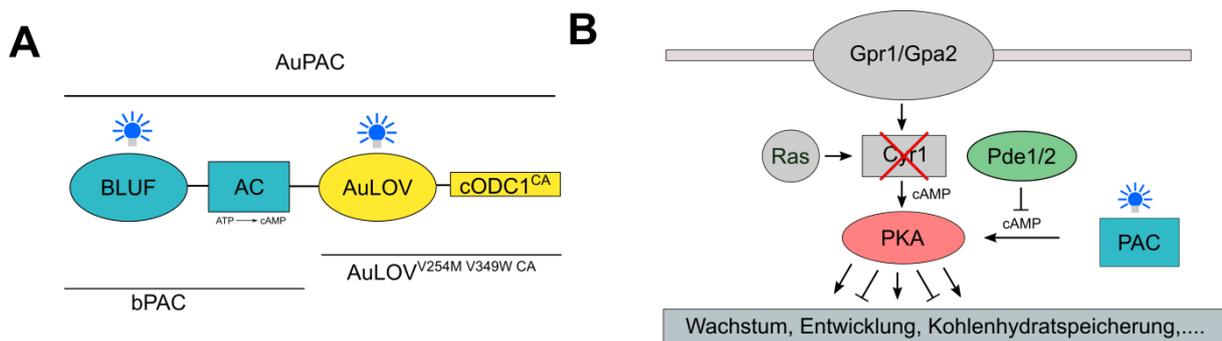


Abbildung 13: Aufbau und Auswirkung der verwendeten photosensitiven Adenylylcyclasen. **A:** Aufbau von AuPAC, einer Blaulicht kontrollierten Adenylylcyclase basierend auf einem AuLOV-cODC1CA Konstrukt und bPAC. bPAC besteht aus einer N-terminalen BLUF-Domäne, welche als Photorezeptor fungiert. C-Terminus befindet sich die Adenylylcyclasendomäne. Um eine spezifischere Kontrolle der Enzymaktivität zu erhalten fusionierten wir das AuLOV-Konstrukt an den C-Terminus von bPAC. **B:** Die PACs wurden verwendet um die endogene Adenylylcyclase Cyr1 in *S. cerevisiae* zu ersetzen. Dadurch wurde ermöglicht PKA-abhängige Zellantworten wie z.B. Wachstum, Entwicklung und die Speicherung von Kohlenhydraten durch Licht zu kontrollieren. A und B sind modifizierte Versionen aus Hepp, Trauth et al. 2020 (Hepp et al. 2020).

Durch die Fusion eines lichtdestabilisierenden optogenetischen Moduls (AuLOV^{V254M V349W}) an die bPAC entstand eine neuartige photosensitive Adenylylcyclusase (Abb. 13A). Diese wird durch zwei optogenetische Module an unterschiedlichen aber unidirektionalen regulatorischen Schritten durch Licht beeinflusst (Hepp et al. 2020). AuPAC wurde in *S. cerevisiae* entwickelt und erfolgreich angewendet, um PKA-abhängige Prozesse zu manipulieren. Um diese ausschließlich durch Blaulicht zu kontrollieren wurden in dem verwendeten Hefestamm die natürliche Adenylylcyclusase Cyr1 deletiert (Abb. 13B).

2 Ergebnisse

2.1 Entwicklung und Charakterisierung eines ultrasensitiven optogenetischen Schalters

Im Rahmen dieser Arbeit sind mehrere optogenetische Schalter zum Einsatz gekommen. Um diese an biotechnologisch relevanten Zielen anwenden zu können wurden zunächst wichtige fehlende Charakterisierungen und Optimierungen der Module durchgeführt. Dabei diente rotfluoreszierendes Protein (RFP) als Reporter, wodurch Fluoreszenzmessungen mittels Durchflusszytometer als auch Westernblot-Analysen möglich waren.

Um einen Eindruck der tatsächlichen Proteinmenge zu erhalten erfolgte im folgenden Teil ein Vergleich der Proteinmengen im induzierten als auch im nicht induzierten Zustand zwischen den unterschiedlichen Modulen, dem *ADHI*- und einem synthetischen doxycyclinabhängigen Promotor. Dies veranschaulicht die Aktivität der verwendeten Promotoren, da für viele Anwendungen nicht nur die Schaltrate von großem Interesse ist.

Des Weiteren wurde die Kombination einer Transkriptionskontrolle und einer Proteinstabilitätskontrolle untersucht. Die Sensitivität der Module ist für die Anwendung in der Biotechnologie sehr relevant, weshalb eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt wurde. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind im folgenden Teil beschrieben.

2.1.1 Kombination von chemisch kontrollierter Biosynthese und lichtkontrollierter Stabilität

Durch eine Kombination des *psd³*-Moduls (*iLID^{ΔA}-cODCc*) und einer chemisch kontrollierten Transkription wurde versucht eine verbesserte Kontrolle der Proteinmengen zu erhalten. Hierfür wurde eine modifizierte Version des tet-off Systems verwendet: der Core-Promotor des tetO6-Konstrukts wurde durch den *GALI* Core-Promotor ausgetauscht, der Tetracycline Transaktivator (tTA) stand unter Kontrolle des *ADHI* Promotors und wurde mit *psd³* (*iLID^{ΔA}-cODCc*) fusioniert. Dieses Expressionsmodul wurde verwendet, um das Fusionsprotein aus einem RFP (mCherry) mit einem *psd³*-tag zu kontrollieren (Abb. 14A) und mit dem gut charakterisierten *ADHI*-Promotor zu vergleichen

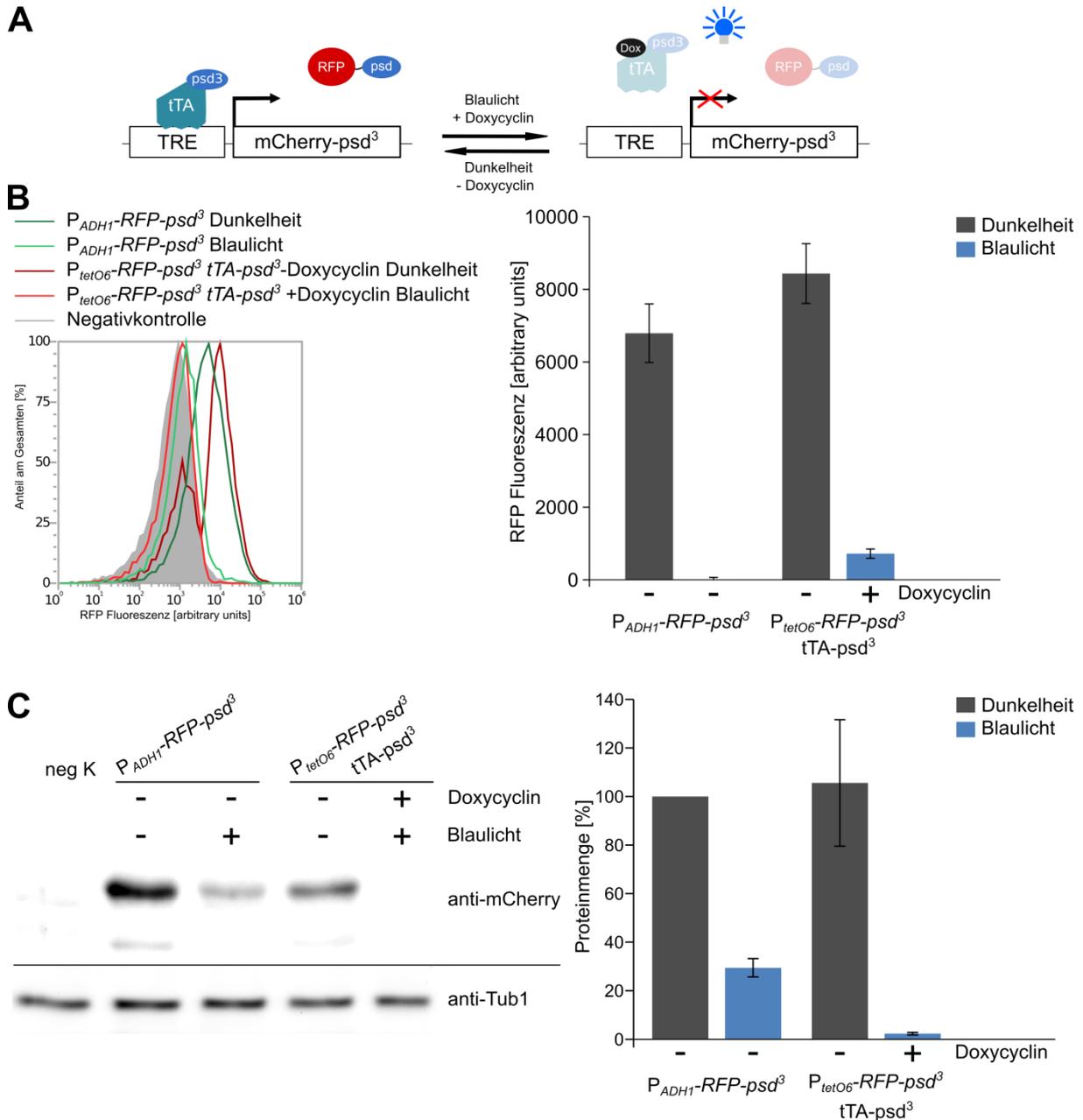


Abbildung 14: Vergleich des synthetischen doxycyclinabhängigen Promotors mit dem *ADH1*-Promotor (Hasenjäger et al. 2019b). Die RFP-Fluoreszenz der Hefezellen (P_{ADH1} : ESM356 + pSH25; P_{tetO6} : ESM356 + pDS239) wurde in Anwesenheit und Abwesenheit von Doxycyclin und Blaulicht (465nm; $30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bestimmt. Dies diente dazu, die Promotorstärken unter den jeweiligen Bedingungen zu charakterisieren. **A:** Schematische Darstellung des tet-off Systems in Kombination mit dem psd³-Modul. Der Transkriptionsfaktor tTA ist mit einem psd³-Modul fusioniert. Durch die Zugabe von Doxycyclin dissoziiert der TF von der DNA. Durch Blaulicht wird die Degradation des TFs und RFP induziert. **B:** Durchflusszytometermessungen der beschriebenen Bedingungen. Die Promotorstärken ohne Blaulicht und ohne Doxycyclin sind vergleichbar. Die Zellen wurden 5h unter entsprechenden Bedingungen in TC-Flaschen wachsen gelassen bevor sie vermessen wurden. Dargestellt ist eine Überlagerung von den Messungen der einzelnen Bedingungen und die dazugehörige Quantifizierung. Diese besteht aus 6 unabhängigen Messungen und der Fehlerbalken stellt den Standardfehler dar. **C:** Westernblot-Analyse der in **B** verwendeten Stämme. Hierbei konnten ähnliche RFP-Signale in beiden Hefestämmen in Dunkelheit und ohne Doxycyclin bestimmt werden. Die Zellen wuchsen unter den angegebenen Bedingungen in TC-Flaschen für 5h bevor sie durch eine TCA-Präzipitation aufgeschlossen wurden. Die verwendeten Antikörper waren spezifisch für mCherry bzw. Tub1. Dargestellt sind 4 unabhängige Messungen und der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler.

Eine Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie ergab für beide Konstrukte ohne Doxycyclin und in Dunkelheit eine ähnliche Fluoreszenz (Abb. 14B). Durch eine Induktion des *ADHI*-Konstruktes mit Blaulicht entsprach die gemessene Fluoreszenz dem Hintergrund. Die Induktion des modifizierten tet-off Systems mit Blaulicht und Doxycyclin resultierte in einer sehr geringen RFP Fluoreszenz, welche jedoch im Vergleich zum *ADHI*-Konstrukt noch eindeutig über der Hintergrundfluoreszenz lag. Eine Westernblot-Analyse ermöglichte eine zusätzliche maturierungsunabhängige Quantifizierung der beschriebenen Konstrukte (Abb. 14C). Diese Messung wird im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Bestimmungen der Fluoreszenzintensität von mCherry nicht durch dessen Maturierungszeit beeinflusst. Hier konnten ähnliche RFP Signale in beiden Stämmen in Dunkelheit und ohne Doxycyclin bestimmt werden. Eine Induktion des *ADHI*-Konstruktes mit Blaulicht führte zu einer Reduktion des RFP Signals auf knapp über 20%. Durch die Induktion des tet-off Systems mittels Blaulicht und Doxycyclin reduzierte sich das RFP Signal auf unter 5%. Bei beiden Methoden ließen sich ähnliche RFP Signalstärken für die beiden Konstrukte im nicht-induzierten Zustand messen.

2.1.2 Aktivität des synthetischen photosensitiven Transkriptionsfaktors (psTF) im Vergleich zum *ADHI*-Promotor

Für den synthetischen photosensitiven Transkriptionsfaktor wurde die durch Dunkelheit verstärkte Interaktion zwischen dem Photorezeptor *AsLOV2* und dem Peptid *Zdk1* ausgenutzt. Um aus diesen Komponenten einen synthetischen Transkriptionsfaktor herzustellen fusionierte man an *AsLOV2* eine tetR DNA-Bindedomäne und an *Zdk1* eine Aktivierungsdomäne VP16 (Abb. 15A). Zur Verstärkung der Regulation durch Licht wurde zusätzlich ein photosensitives Degron (psd³) an die Aktivierungsdomäne angebracht. Die dadurch entstandenen Fusionsproteine (HA-tetR-*AsLOV2*: tRAL; *Zdk1*-VP16-3myc-psd³: ZVPd) interagieren in Dunkelheit wodurch ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor entsteht. Unter Blaulicht wird diese Interaktion gestört und zusätzlich ZVPd abgebaut, aufgrund dessen es zu einer verringerten Aktivität des Promotorsystems kommt. Dieser photosensitive Transkriptionsfaktor wird als psTF bezeichnet.

Um die Stärke des psTFs genauer zu charakterisieren wurde dieser mit dem *ADHI*-Promotor verglichen. Beide Promotoren kontrollierten das stabile Fusionsprotein CFP-TDegF-RFP. Dieses besteht aus einem Cyan-fluoreszierenden Protein, welches mit einer modifizierten *tobacco etch virus* (TEV)-Proteasen Erkennungssequenz an das Rot fluoreszierende Protein mKate fusioniert wurde.

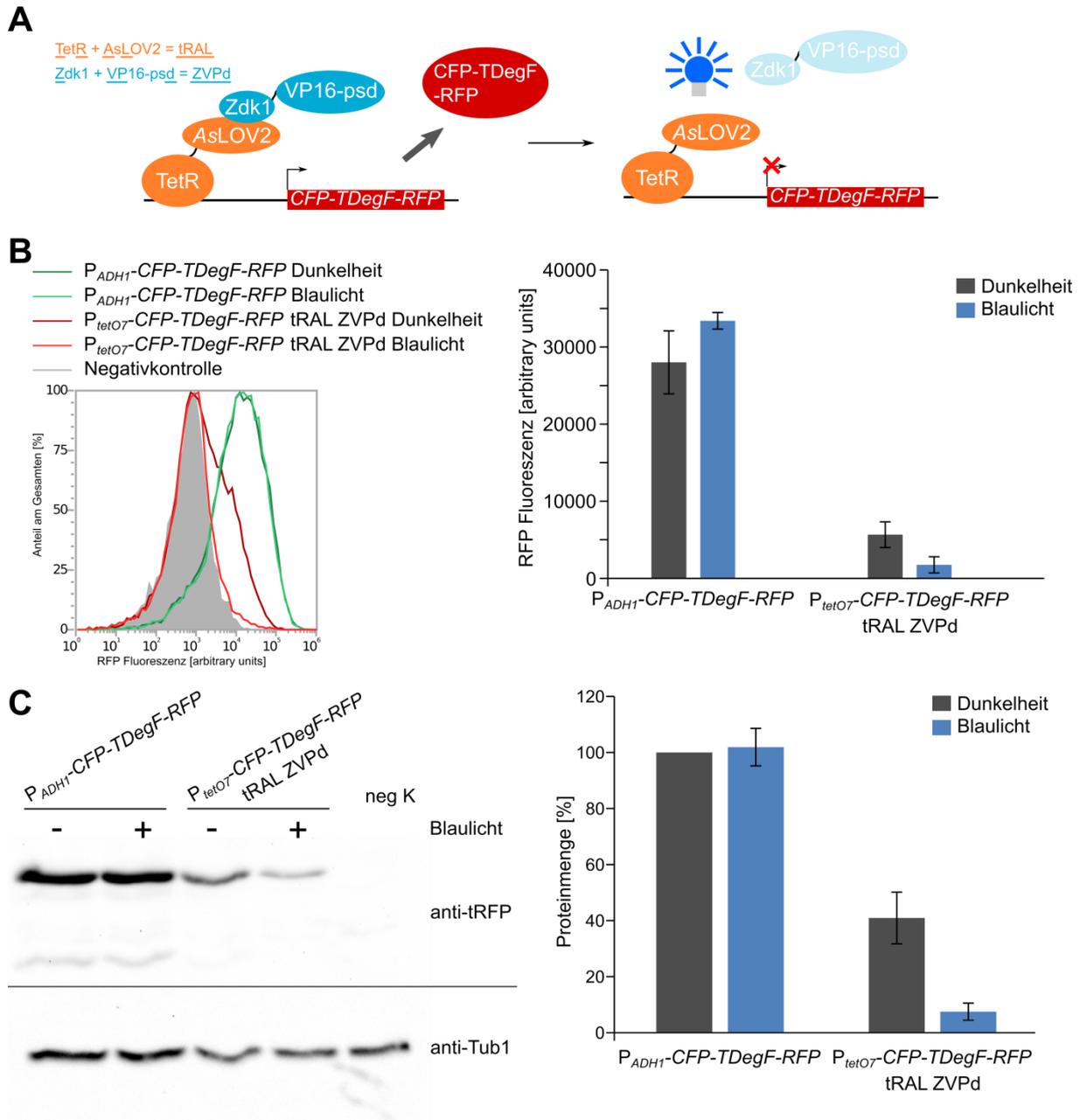


Abbildung 15: Kontrolle der CFP-TDdegF-RFP Menge durch den psTF regulierten Promotor im Vergleich zum ADHI-Promotor (Hasenjäger et al. 2019b). Die RFP-Fluoreszenz der Hefezellen (P_{ADH1} : ESM356 + pDS7; P_{tetO6} : ESM356 + pSH32) wurde in Anwesenheit und Abwesenheit von Blaulicht quantifiziert. Dadurch konnte die Promotorstärke in Abwesenheit des Induktors bestimmt werden. **A:** Schematische Darstellung des photosensitiven Transkriptionsfaktors psTF. Dieser besteht aus einer Fusion zwischen der DNA-Bindedomäne tetR und dem Photorezeptor AsLOV2 und einer zusätzlichen Fusion aus dem Peptid Zdk1 mit einer VP16 Aktivierungsdomäne und einem psd³-Modul. **B:** Durchflusszytometermessung der beschriebenen Konstrukte und Bedingungen. Hierbei wurde eine 20% reduzierte RFP-Fluoreszenz in den Zellen mit psTF-Konstrukt in Dunkelheit im Vergleich zum ADHI-Promotor beobachtet. Das Experiment wurde wie in Abb. 14B beschrieben durchgeführt. Dargestellt sind Überlagerungen von den Messungen der einzelnen Bedingungen und die dazugehörige Quantifizierung. Diese besteht aus 6 unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. **C:** Westernblot-Analyse der beschriebenen Konstrukte und Bedingungen. Hierbei konnte in Dunkelheit eine 40% reduzierte RFP-Signalstärke für die Proben mit psTF Konstrukt im Vergleich zu den ADHI-Promotorproben beobachtet werden. Das Experiment wurde wie in Abb. 14C beschrieben durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 4 unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Messungen mittels Durchflusszytometrie als auch Westernblot-Analyse zeigten eine deutlich geringere Aktivität des synthetischen lichtabhängigen Promotors im Vergleich zum ADHI-

Promotor (Abb. 15B, C). Im Durchflusszytometer konnte selbst in Dunkelheit nur ca. 20% der RFP Fluoreszenz im Vergleich zum *ADHI*-Promotor gemessen werden. Die Westernblot-Analyse hingegen ergab in Dunkelheit eine RFP Signalstärke von 40% des *ADHI*-Promotors (Abb. 15C). Dies lässt auf eine 2,5- bis 5-fach geringere Aktivität des synthetischen Promotors schließen. Bei beiden Methoden ließ sich mit Blaulicht die durch den psTF kontrollierte Proteinmenge deutlich reduzieren. Vergleicht man das RFP Signal in Dunkelheit mit dem in Blaulicht lässt sich eine Reduzierung um einen Faktor von 4-5 beobachten.

2.1.3 Charakterisierung einer synergistischen, optogenetischen und mehrschrittigen Kontrolle durch Licht

Durch die Kombination des psTF mit einer zusätzlichen lichtinduzierten Destabilisation des Zielproteins sollte eine synergistische, optogenetische und mehrstufige Kontrolle (SOMCo) durch lichtregulierte Module erzielt werden. Hierbei reguliert Licht nicht nur die Transkription oder die Proteinstabilität, sondern beides (Abb. 16A).

Um die Auswirkungen dieser Kontrolle zu charakterisieren wurde ein RFP-psd³ Konstrukt unter Kontrolle des psTF oder des *ADHI*-Promotors gebracht. In Dunkelheit lag die Produktion von RFP-psd³, kontrolliert durch den psTF, in den Durchflusszytometermessungen auf 50% (Abb. 16B) und in den Westernblot-Analysen auf 36% des Levels des *ADHI*-Promotorkonstrukts (Abb. 16C). Durch eine Aktivierung der Module durch Blaulicht wurden die entsprechenden RFP-Signale deutlich reduziert. Im Durchflusszytometer hob sich die Fluoreszenz von RFP-psd³ unter Kontrolle des *ADHI*-Promotors noch eindeutig vom Hintergrund ab. Die Kontrolle durch SOMCo hingegen führte zu Fluoreszenzwerten die der Hintergrundfluoreszenz entsprach. Die Immunodetektion von mCherry ergab ein ähnliches Bild. Durch die Induktion mit Blaulicht konnte dabei das Signal durch das *P_{ADHI}-RFP-psd³* Konstrukt im Vergleich zur Dunkelheit auf 36% reduziert werden und durch SOMCo auf ca. 5%.

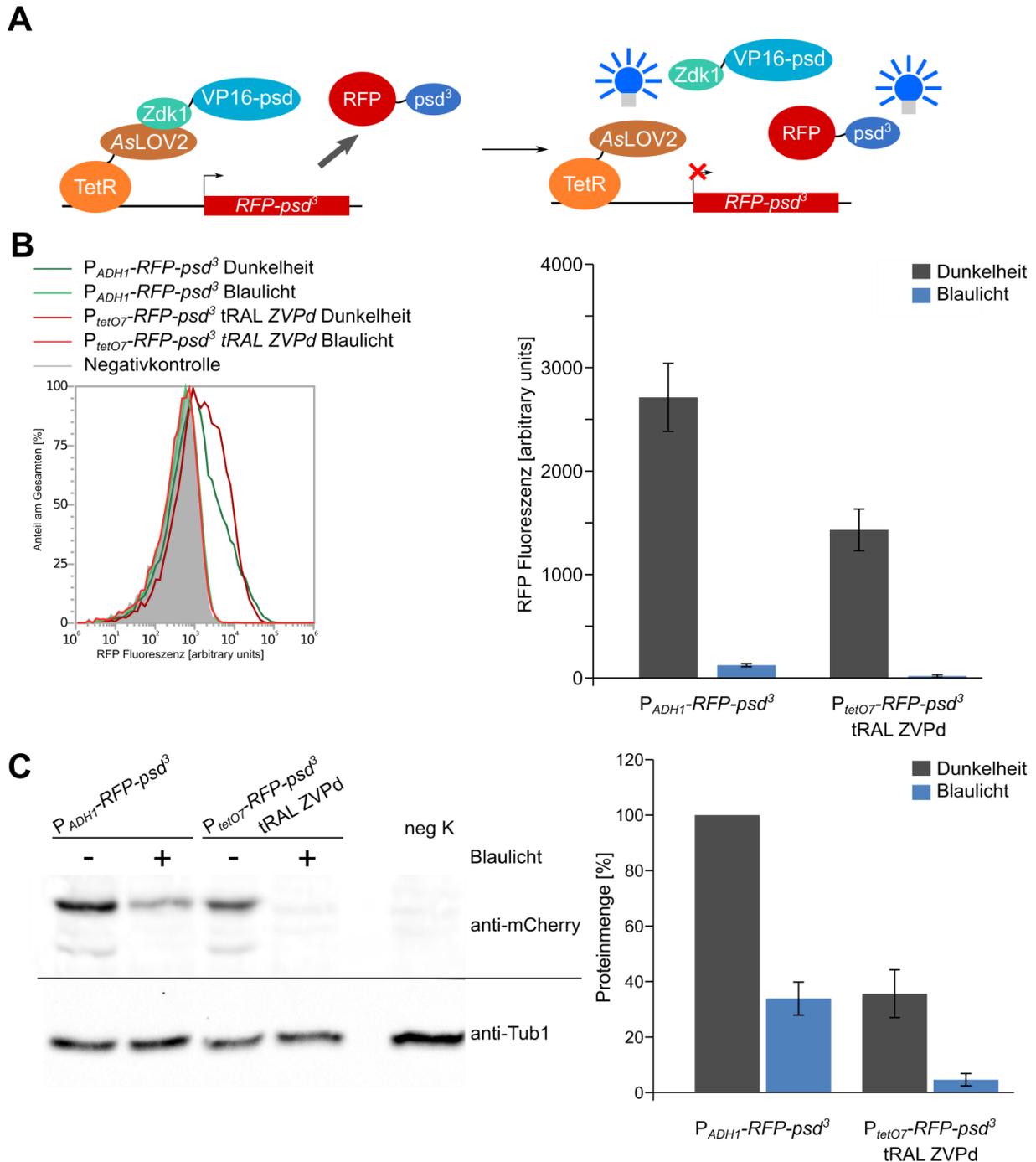


Abbildung 16: Kontrolle der RFP-psd³ Menge durch den psTF im Vergleich zum ADH1-Promotor.
A: Schematische Darstellung der Kontrolle von RFP-psd³ durch den psTF. **B:** Durchflusszytometermessung der Konstrukte nach Zellwachstum in Dunkelheit oder Blaulicht. Die RFP-Fluoreszenz der Hefezellen (P_{ADH1} : ESM356+ pSH25; P_{tetO7} : ESM356 + pSH33) wurde in Anwesenheit und Abwesenheit von Blaulicht (465nm; 30 μ mol*m⁻²*s⁻¹) quantifiziert und die Promotorstärken ohne Induktor miteinander verglichen. Hierbei konnte eine 50% reduzierte RFP-Fluoreszenz in den Proben mit dem psTF-Konstrukt im Vergleich zum *ADH1*-Promotor beobachtet werden. Dargestellt sind Überlagerungen von den Messungen der einzelnen Bedingungen und die dazugehörige Quantifizierung. Diese besteht aus 6 unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Das Experiment wurde wie in Abb. 14B beschrieben durchgeführt. **C:** Westernblot-Analyse der beschriebenen Konstrukte nach Zellwachstum in Dunkelheit oder Blaulicht. Durchführung mit den Stämmen und experimentellen Bedingungen wie unter **B** beschrieben. Hierbei konnte eine um 36% reduzierte RFP-Fluoreszenz in den Proben mit psTF-Konstrukt im Vergleich zum *ADH1*-Promotor beobachtet werden. Das Experiment wurde wie in Abb. 14C beschrieben durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 4 unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

2.1.4 Lichtsensitivitätscharakterisierung der optogenetischen Module

Zur Überprüfung der durch das photosensitive Degron (psd^3), dem photosensitiven Transkriptionsfaktor ($psTF$) oder der Kombination der beiden Module kontrollierten RFP-Fluoreszenz wurden Durchflusszytometermessungen durchgeführt. Dabei wird, im Vergleich zu den einzelnen Modulen, durch die Kombination eine synergistische, optogenetische und mehrstufige Kontrolle (SOMCo) erzielt (Abb. 17A).

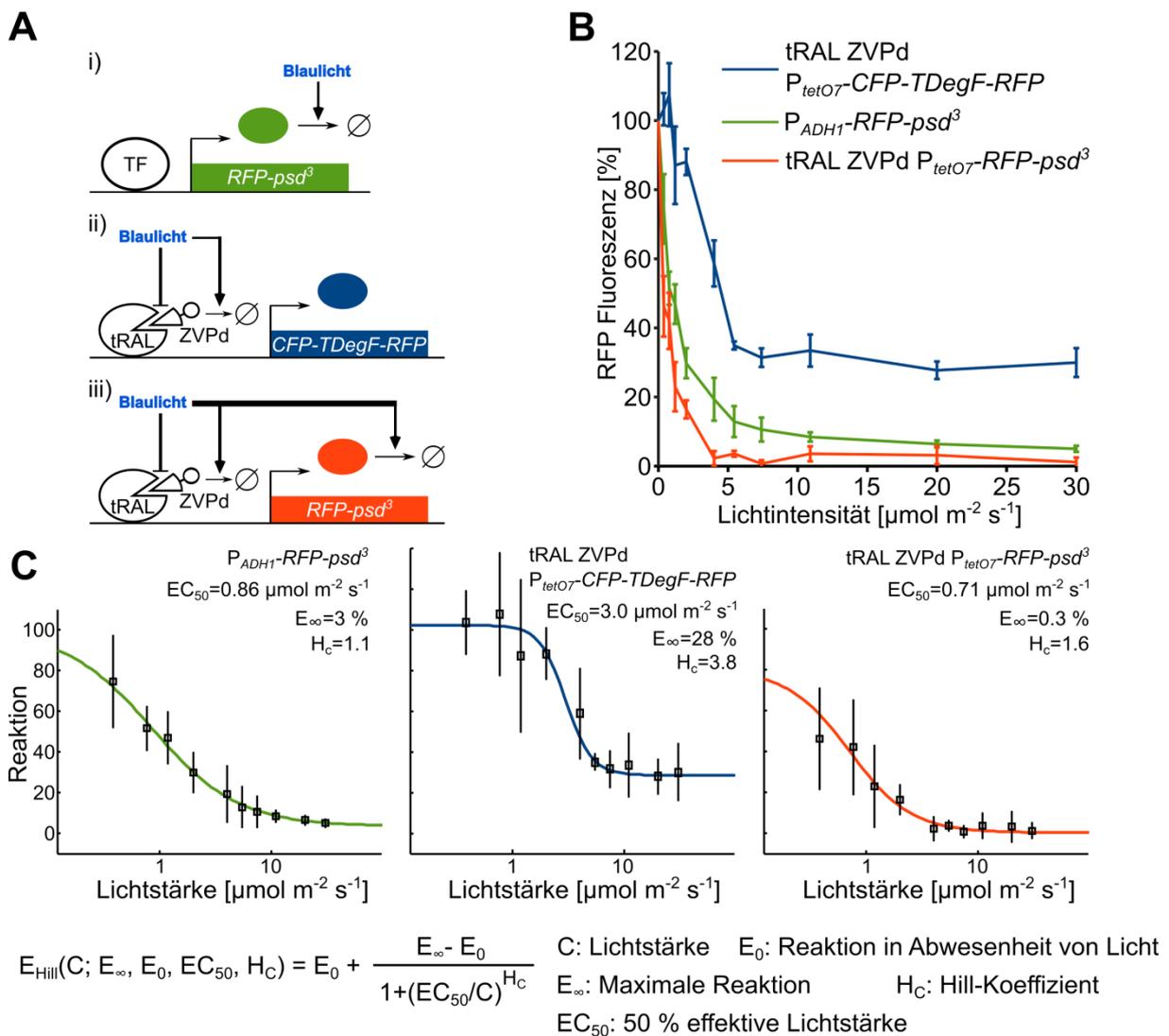


Abbildung 17: Synergistische mehrstufige Signalweiterleitung mit Blaulicht (Hasenjäger et al. 2019b). **A:** Schematische Darstellung der unterschiedlichen lichtkontrollierten Module i) Photosensitives Degron (psd^3), ii) lichtsensitiver Transkriptionsfaktor ($psTF$), iii) Lichtkontrollierte Genexpression durch den $psTF$ und lichtkontrollierte Proteinstabilität durch psd^3 . **B:** Dosis-Wirkungs-Kurve der optogenetischen Module, welche durch die Transkriptionsfaktoraktivität ($tRAL ZVPd P_{tetO6}-RFP$), der Proteinstabilität ($P_{ADH1}-RFP-psd^3$) oder der Kombination aus beiden Modulen ($tRAL ZVPd P_{tetO6}-RFP-psd^3$) reguliert wird. Bei den verwendeten Hefestämmen handelt es sich um ES356 mit den entsprechenden Plasmiden pSH32, pSH25 oder pSH33. Die Zellen wurden unter Blaulichtintensitäten von 0 bis $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ in 6-Well-Platten angezogen. Dargestellt sind mehr als 6 unabhängige Messungen und die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. **C:** Semilogarithmische Darstellung der experimentellen Daten aus C und deren nichtlineare Anpassung durch die Hill-Gleichung. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Die Auswirkung der 3 Module bei unterschiedlichen Blaulichtintensitäten auf die RFP Fluoreszenz wurde bestimmt und somit eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt (Abb. 17B). Die beiden Module, bei denen das Zielprotein ein psd³ trug, wurden bereits signifikant von Lichtintensitäten unter $1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ beeinflusst. Hingegen benötigte der psTF $4\text{-}5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ um eine Reduzierung der RFP Fluoreszenz zu erzielen. Für alle 3 Konstrukte reichten $5\text{-}10\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Blaulicht aus um eine komplette Aktivierung der Module zu erzielen. Im stationären Zustand erzielte der psTF eine um 30% reduzierte RFP Fluoreszenz im Vergleich zum nicht-induzierten Dunkelzustand. Die Degradation durch das psd³ ermöglichte eine Reduktion unter 10% und durch die Kontrolle mit SOMCo sogar unter 5%. Eine Anpassung der Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Kurve durch die Hill-Gleichung ergab für das psd-Modul einen Hill-Koeffizienten von 1,1, für den psTF einen von 3,8 und für SOMCo von 1,6 (Abb. 17C). Dies deutet auf eine ultrasensitive Regulation durch das psTF- und dem SOMCo-Modul hin.

2.2 Charakterisierung und Anwendung eines optogenetischen Tools für induzierte Proteinstabilität

2.2.1 Kinetiken der AuLOV^{V254M V349W} –Mutante

Die LOV-Domäne aus dem *Phaeodactylum tricornutum* Aureochrome 1a führt in der Bäckerhefe zu einer Destabilisierung in Dunkelheit und einer Stabilisierung in Blaulicht (Hepp et al. 2020). Dieser Effekt der AuLOV-Domäne wurde durch die Einführung der V254M V349W Mutationen verstärkt. Die Auswirkung dieser Domäne wurde zuvor nur im steady state betrachtet (Hepp et al. 2020). Aus diesem Grund erfolgte eine Charakterisierung der Proteinstabilisierungs bzw. –degradations-Kinetik. Dafür wurde ein Cycloheximidchase durchgeführt. Mit Hilfe dieses Experiments konnte die Stabilität der Zielproteine genauer untersucht werden, da die Translation in den Zellen durch die Zugabe von Cycloheximid gestoppt wurde. Es diente ein GFP-P2A-mCherry-Konstrukt oder nur mCherry als Reporter, um die Proteindegradation zu quantifizieren. Zunächst wurde das Schaltverhalten von Blaulicht zu Dunkelheit mittels Immunoblotting von Konstrukten mit einer aktiven cODC1 Sequenz betrachtet (Abb. 18A). Die gleichen Experimente erfolgten auch mit der inaktiven cODC1^{CA}-Mutante. Mit aktivem Degron konnte eine leicht stärkere destabilisierende Wirkung bei Blaulicht-exponierten Zellen beobachtet werden (Abb. 18A).

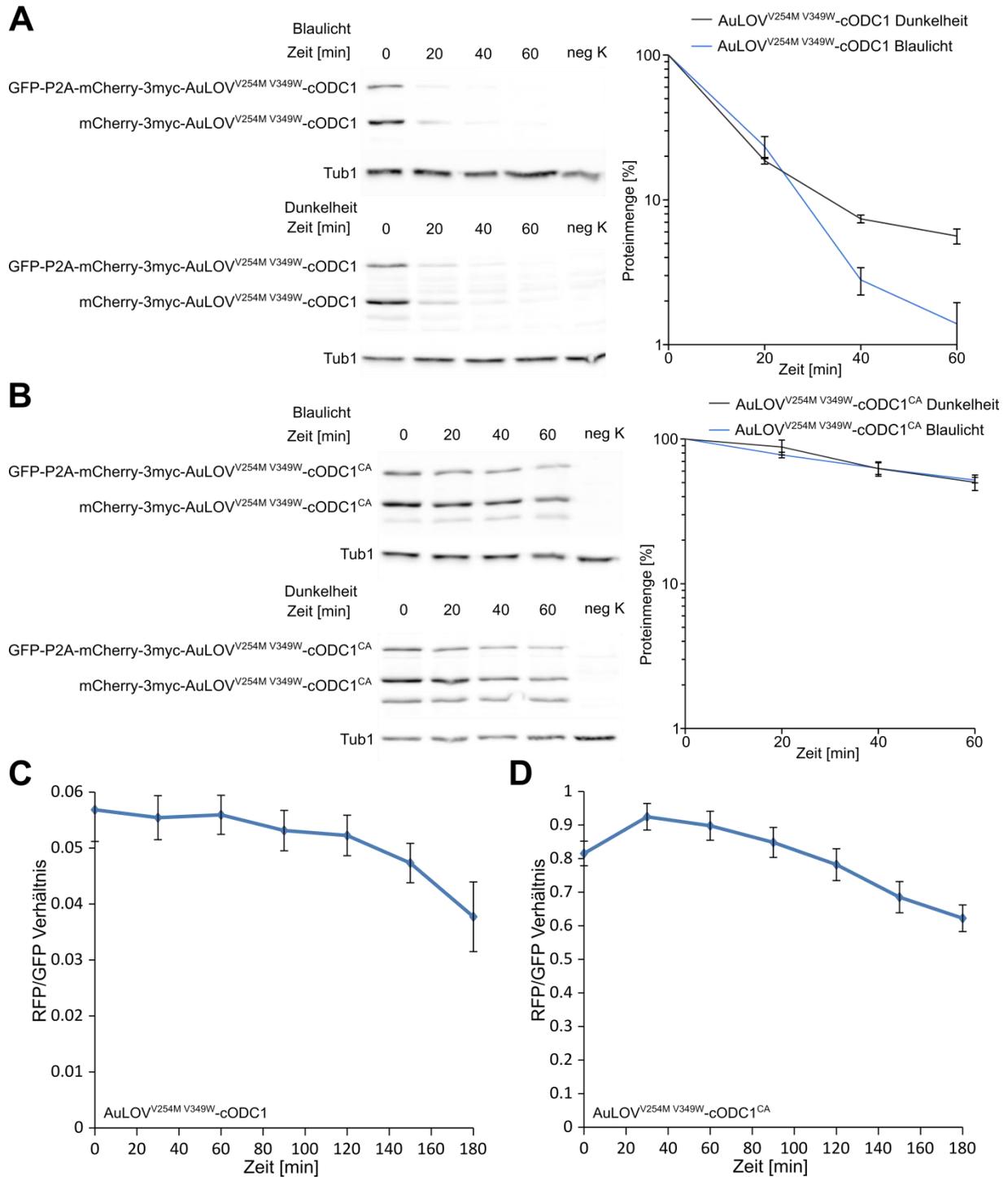


Abbildung 18: Charakterisierung der AuLOV-Mutanten. **A:** Cycloheximide-chase von Hefezellen mit dem mutierten Konstrukt *GFP-P2A-3mCherry-3myc-AuLOV^{V254M V349W}-cODC1*. Die Zellen wurden vor Beginn der Probenentnahme unter Blaulicht (465nm; $30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) wachsen gelassen und nach der Entnahme der ersten Probe ($t=0\text{min}$) ins Dunkle gebracht. Die Graphik stellt den Durchschnitt aus vier unabhängigen Messungen dar (die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler). **B:** Cycloheximide-chase mit einem Konstrukt, welches ein inaktiviertes Degron trägt (*GFP-P2A-3mCherry-3myc-AuLOV^{V254M V349W}-cODC1^{CA}*). Der Ablauf des Experiments wurde wie in A beschrieben durchgeführt. **C:** Messung der RFP/GFP-Ratio von Zellen mit *GFP-P2A-3mCherry-3myc-AuLOV^{V254M V349W}-cODC1* Konstrukt, nachdem sie von Blaulicht (465 nm ; $30\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) ins Dunkle gebracht wurden, mittels Durchflusszytometrie. Die erste Probe wurde vor dem Wechsel der Lichtbedingungen entnommen ($t=0\text{min}$). Die Ergebnisse entstammen 8 unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. **D:** Messung der RFP/GFP -Ratio von Zellen mit einem *GFP-P2A-3mCherry-3mycAuLOV^{V254M V349W}-cODC1^{CA}* Konstrukt, nachdem sie vom Blaulicht (465nm ; $30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ins Dunkle gebracht wurden, mittels Durchflusszytometrie. Die Experimentbedingungen entsprechen C. Dargestellt sind 8 unabhängige Messungen und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Durch die Inaktivierung des Degrons war über den gemessenen Zeitraum kein Unterschied zu beobachten (Abb. 18B). Verfolgt man das RFP/GFP-Ratio der GFP-P2A-mCherry Konstrukte in Zellen, die von Blaulicht in Dunkelheit gebracht wurden mittels Durchflusszytometrie über 3h, verringert sich diese mit aktivem Degron (Abb. 18C) und inaktivem Degron (Abb. 18D) nur sehr langsam. Diese Experimente zeigten, dass kein deutlicher Unterschied in der Proteinstabilität zwischen Zellen in Blaulicht im Vergleich zu Zellen in Dunkelheit während des Beobachtungszeitraums zu erkennen ist. Zusätzlich konnten nur sehr langsame Änderungen in der Proteinmenge durch das Schalten von Blaulicht zu Dunkelheit beobachtet werden.

2.2.2 Charakterisierung lichtkontrollierter PKA-Aktivität in *S. cerevisiae* Zellen

Um die Anwendbarkeit in *S. cerevisiae* der zuvor charakterisierten AuLOV-Mutante zu demonstrieren wurde eine synergistische, lichtkontrollierte Adenylylcyclase entwickelt. Diese besteht aus der lichtsensitiven Adenylylcyclase bPAC und dem AuLOV^{V254M V349W}-cODC^{CA} Konstrukt. Dadurch entstand ein optogenetisches Tool mit zwei Blaulichtrezeptoren, die unidirektional agieren (Abb. 13A).

Für die folgenden Charakterisierungen wurde ein *S. cerevisiae*-Stamm verwendet, in dem das endogene Adenylylcyclasegen *CYR1* deletiert ist. Dies ermöglichte es, die PKA-Aktivität ausschließlich über PACs zu kontrollieren, wodurch die damit zusammenhängenden phänotypischen Veränderungen lediglich auf die photokontrollierten Adenylylcyclasen zurückzuführen sind. Die Auswirkung des Fusionsproteins aus bPAC und der AuLOV^{V254M V349W}-cODC^{CA} auf das Wachstum sollte im Vergleich zu zwei unterschiedlichen bPAC-Konstrukten untersucht werden. Hierfür wurde bPAC unter Kontrolle zweier unterschiedlich starker Promotoren verwendet. In einem Konstrukt wurde die Expression durch den starken *ADHI*- kontrolliert und im anderen durch den deutlich schwächeren *CYCI*-Promotor. Die Auswirkung der unterschiedlich starken Expression von bPAC konnte dadurch untersucht werden. Es folgte eine Aufnahme einer Wachstumskurve über 16h in Flüssigmedium und bei unterschiedlichen Lichtbedingungen (Abb. 19). Dabei wurde lediglich für das *P_{ADHI}-tagRFP-bPAC*-Konstrukt ein geringes Wachstum in Dunkelheit beobachtet. Bei $0,5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Blaulicht konnten die Zellen mit den bPAC-Konstrukten am besten wachsen, während beim Stamm mit dem AuPAC-Konstrukt nur ein geringes Wachstum auftrat. Die Zellen mit dem AuPAC-Konstrukt zeigten bei $5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ihr stärkstes Wachstum. Interessanterweise wurde auch bei WT-Zellen ein stärkeres Wachstum bei mittleren Blaulichtintensitäten beobachtet ($0,5$ - $5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). 5 und $30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Blaulicht führte bei den bPAC-exprimierenden Zellen zu einem Wachstumsdefizit. Bei der höchsten Blaulichtintensität wuchsen alle Stämme etwas langsamer.

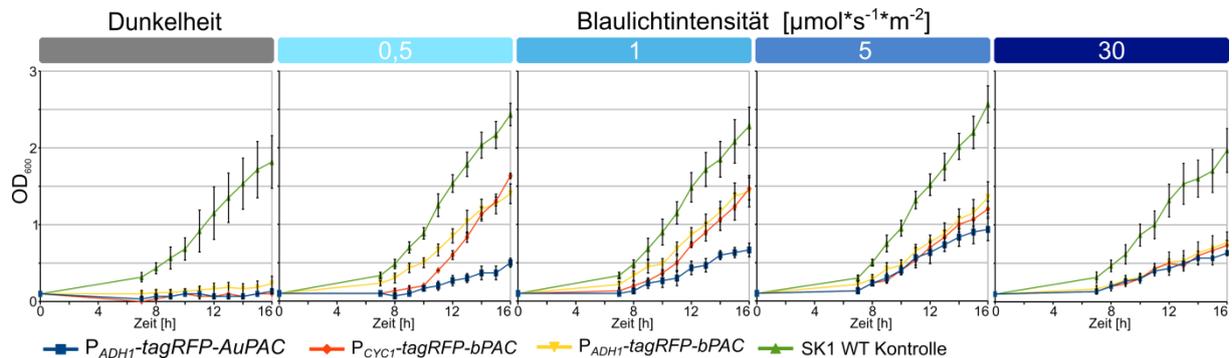


Abbildung 19: Auswirkungen der PACs auf das Zellwachstum. Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Hefestämme, in denen die natürliche Adenylylcyclase Cyr1 durch eine blaulichtaktivierbare Adenylylcyclase ausgetauscht wurde, im Vergleich zum WT (P_{ADHI}-AuPAC: ySEB5/ ySEB6; P_{ADHI}-bPAC: yJT14; P_{CYCI}-bPAC: ySEB38; WT: YCR75). In diesem Wachstumstest in flüssigem Medium zeigten fast alle Stämme mit blaulichtsensitiver Adenylylcyclase in Dunkelheit kein Wachstum. Lediglich der Stamm mit dem P_{ADHI}-bPAC-Konstrukt zeigte schwaches Wachstum. Bereits geringste Blaulichtintensität reicht aus um eine Reaktion der lichtsensitiven Stämme in Form von Wachstum zu erhalten. Hohe Lichtintensitäten verlangsamten bei allen Stämmen das Wachstum. Dieses Experiment wurde aufgrund der langen Messzeiten in Zusammenarbeit mit Sebastian Hepp durchgeführt und ist daher auch Teil seiner Doktorarbeit (Sebastian Hepp, 2020).

Aufgrund der geringen Aktivität in Dunkelheit und des vergleichsweise guten Wachstums unter geringen Blaulichtintensitäten erwies sich das P_{CYCI}-tagRFP-bPAC Konstrukt als vielversprechend um weitere PKA abhängige Zellantworten zu untersuchen, weshalb mit diesem Stamm eine Jod-Dampf-Färbung durchgeführt wurde (Abb. 20).

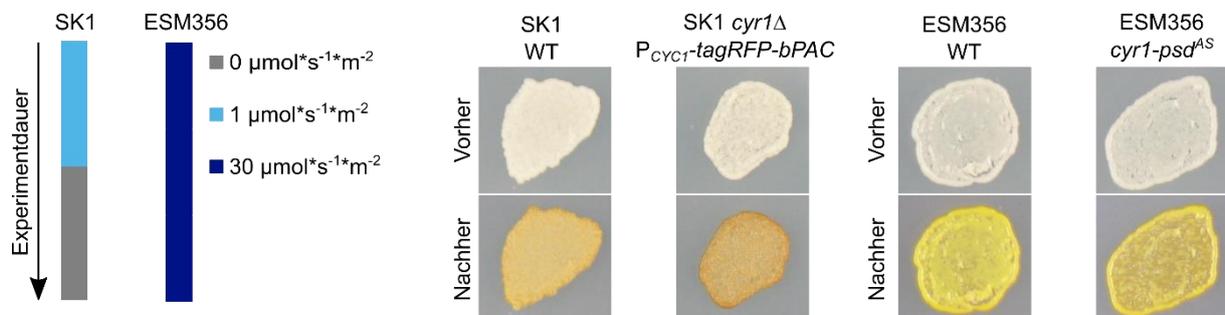


Abbildung 20: Auswirkung einer verringerten PKA-Aktivität auf die Kohlenhydratspeicherung mittels optogenetischer Module. Schematische Darstellung der Wachstumsbedingungen vor der Jod-Dampf-Färbung und die entsprechenden Ergebnisse. Es wurden immer vor und nach der Jod-Dampf-Färbung Fotos von den Zell-Patches gemacht. Da der Stamm ySEB38 (*cyr1Δ* P_{CYCI}-tagRFP-bPAC) den größten Unterschied im Vergleich Dunkelheit- zu Blaulichtwachstum aufwies (Abb. 19), wurde dieser weiter charakterisiert. Dabei wurde der Stamm zunächst unter geringen Blaulichtintensitäten (465nm; 0,5µmol*m⁻²*s⁻¹) angezogen und anschließend ins Dunkle transferiert. Im Vergleich zum WT konnte eine deutlich dunklere Färbung des Zellpatches nach der Jod-Dampf-Behandlung beobachtet werden. Es wurde versucht dieses Ergebnis mit einer *cyr1-psd^{AS}*-Mutante (ySH21) zu replizieren und dieses Verhalten lichtabhängig (465m; 30µmol*m⁻²*s⁻¹) zu ermöglichen. Hierbei konnte nur ein sehr geringer Färbungsunterschied im Vergleich zum WT beobachtet werden.

Zusätzlich erfolgte eine Charakterisierung einer *cyr1-psd^{AS}*-Mutante. Diese sollte zu einer ähnlich reduzierten PKA-Aktivität führen, welche jedoch durch Blaulicht reduziert wird. Dies

würde eine Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten der optogenetischen PKA-Steuerung darstellen.

Um zu überprüfen ob eine verringerte PKA-Aktivität hervorgerufen werden konnte wurde der Stamm mit dem bPAC-Konstrukt zunächst unter geringen Blaulichtintensitäten angezogen und anschließend ins Dunkle transferiert. Der Stamm mit der modifizierten Cyr1 hingegen wurde durchgehend in starkem Blaulicht inkubiert. Bei beiden Stämmen ließ sich eine dunklere Färbung im Vergleich zu dem entsprechenden Wildtyp beobachten. Dieser Unterschied war bei dem bPAC-Stamm ausgeprägter.

2.3 Anwendung der optimierten Module an biotechnologisch relevanten Zielen

Um die Anwendung von unterschiedlichen psd-Modulen und dem SOMCo-Modul an ökonomisch-relevanten Biosynthesewegen zu testen wurden zwei unterschiedliche Zielproteine ausgewählt: zum einen das essenzielle und membranständige Protein Erg9 und zum anderen das im Zytosol vorliegende nicht essenzielle Gdh1.

Die entsprechenden Gene wurden mit den optogenetischen Degradationsmodulen und einem myc3-Tag versehen und der Proteinabbau mittels Immunoblotting quantifiziert (Abb. 21A). Die Erg9-3myc-Proteinlevel verringerten sich überraschenderweise im Blaulicht leicht (Abb. 21B). Die photosensitiven Degron-Module der zweiten (AsLOV-cODC1) und der dritten Generation (iLID^{AA}-cODC1) verhielten sich ähnlich. In Dunkelheit als auch in Blaulicht wurde eine starke Reduzierung der Proteinmengen beobachtet, die Verringerung war in Blaulicht-exponierten Zellen verstärkt. Es konnte mit den Modulen die Erg9-Menge auf ~20% der Erg9-3myc-Menge reduziert werden. Eine eindeutige Schaltbarkeit blieb aus. Die synergistische Kontrolle hingegen zeigte aufgrund der zusätzlichen Transkriptionsregulation ein eindeutiges Dunkel zu Blaulicht Schaltverhalten. Ohne die Induktion mit Blaulicht wurden im Vergleich zur nicht modifizierten Variante erhöhte Erg9-Mengen detektiert. Eine Blaulichtbestrahlung reduzierte diese jedoch stark. Allerdings wurden ähnlich niedrige Proteinlevel wie bei den psd-Modulen beobachtet. Alles in allem betrachtet erwiesen sich alle Module als vielversprechend, alle getesteten Module erreichten durch die Induktion der Zielproteindegradation deutlich reduzierte Proteinmengen.

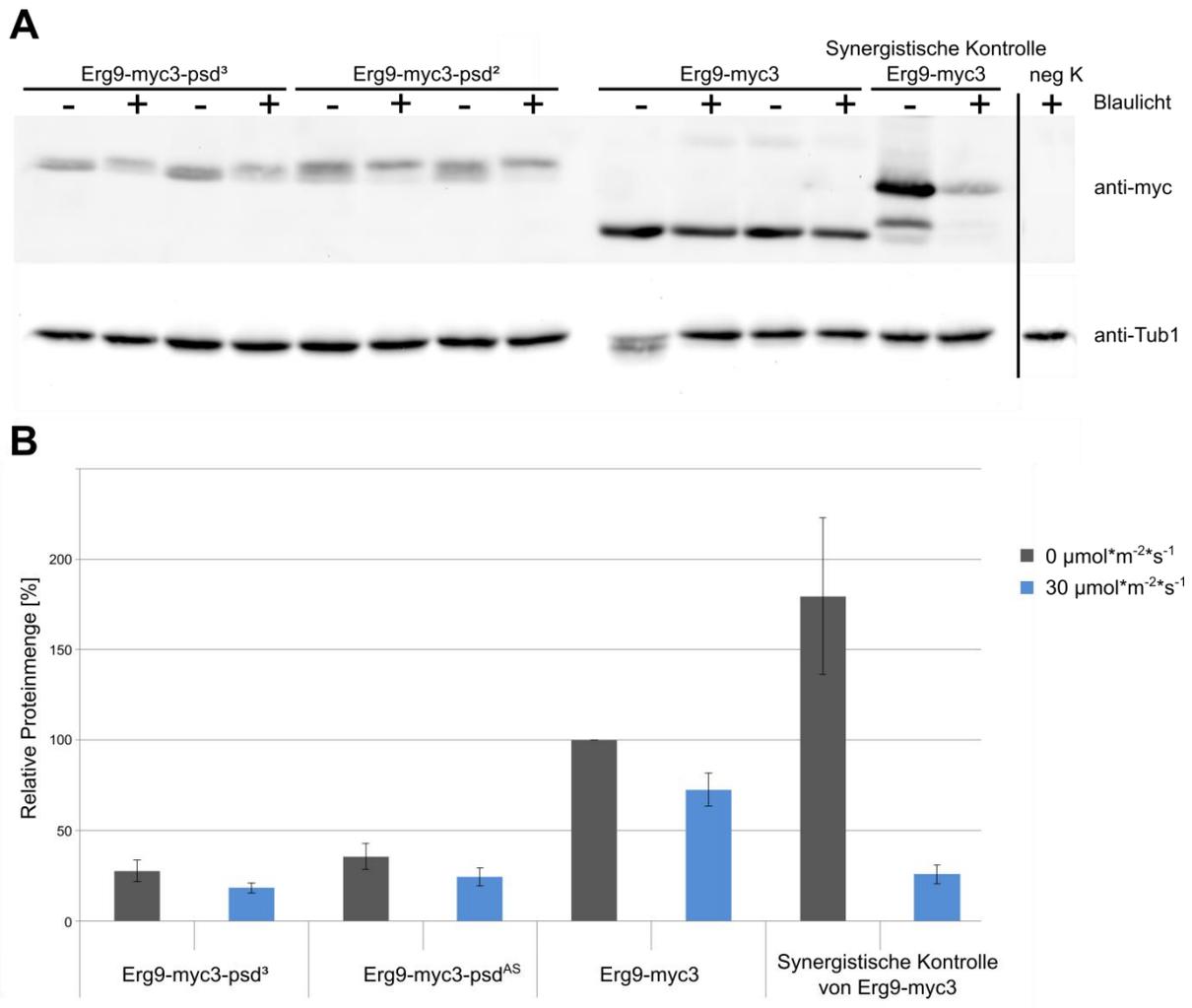


Abbildung 21: Lichtkontrolle der Erg9-Mengen. Die Erg9 Verfügbarkeit in den Hefezellen wurde durch verschiedene lichtkontrollierte Module beeinflusst und mit Hilfe des 3myc-Tags durch Immunodetektion quantifiziert (Erg9-myc3-psd³: ySH3; Erg9-3myc-psd^{AS}: ySH4; Erg9-myc3: yDS527; Synergistische Kontrolle von Erg9: yJT35). **A:** Beispieldetektion einer Westernblot-Analyse mit den beschriebenen Hefestämmen. Die Zellen wurden entweder in Dunkelheit oder bei Blaulicht (465nm; $30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) für 24h angezogen bevor Proben für die anschließende TCA-Präzipitation gezogen wurden. Die Immunodetektion erfolgte durch spezifische Tub1- und myc-Antikörper. Tub1 dient hierbei als Ladekontrolle. **B:** Quantifizierung der Erg9 Westernblots. Die Erg9-3myc-Menge in dunkeladaptierten Zellen wurde als Referenz verwendet (100%). Die beiden lichtregulierten Degrons verhalten sich ähnlich und verringern bereits in Dunkelheit die Erg9-Menge. Die synergistische Kontrolle ermöglicht eine gute Schaltbarkeit der Proteinmengen. In Dunkelheit wird dabei jedoch der WT-Level deutlich überschritten. Durch die verwendeten Module lassen sich die Erg9-Mengen auf ca. 20% des Wildtyps reduzieren. Dargestellt sind 3 unabhängige Messungen und die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Das zweite Zielprotein Gdh1 liegt im Gegensatz zu Erg9 im Zytoplasma vor und ist daher leichter zugänglich für proteasomalen Abbau, der durch das psd-Modul induziert wird. Im Kontrast zu Erg9 blieb die Gdh1-3myc Menge in Blaulicht und Dunkelheit gleich (Abb. 22A). Durch die Regulation mit den psd-Modulen wurden die Proteine bereits in Dunkelheit destabilisiert. Es wurden Gdh1-Mengen von 40% für das psd³-Modul und 60% für das psd^{AS}-Modul des Wildtyps detektiert. Durch die Induktion mit $30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Blaulicht erhöhte

sich die Degradation und es konnten bei beiden Modulen nur noch ca. 8% der Wildtyp Gdh1-Menge detektiert werden (Abb. 22B).

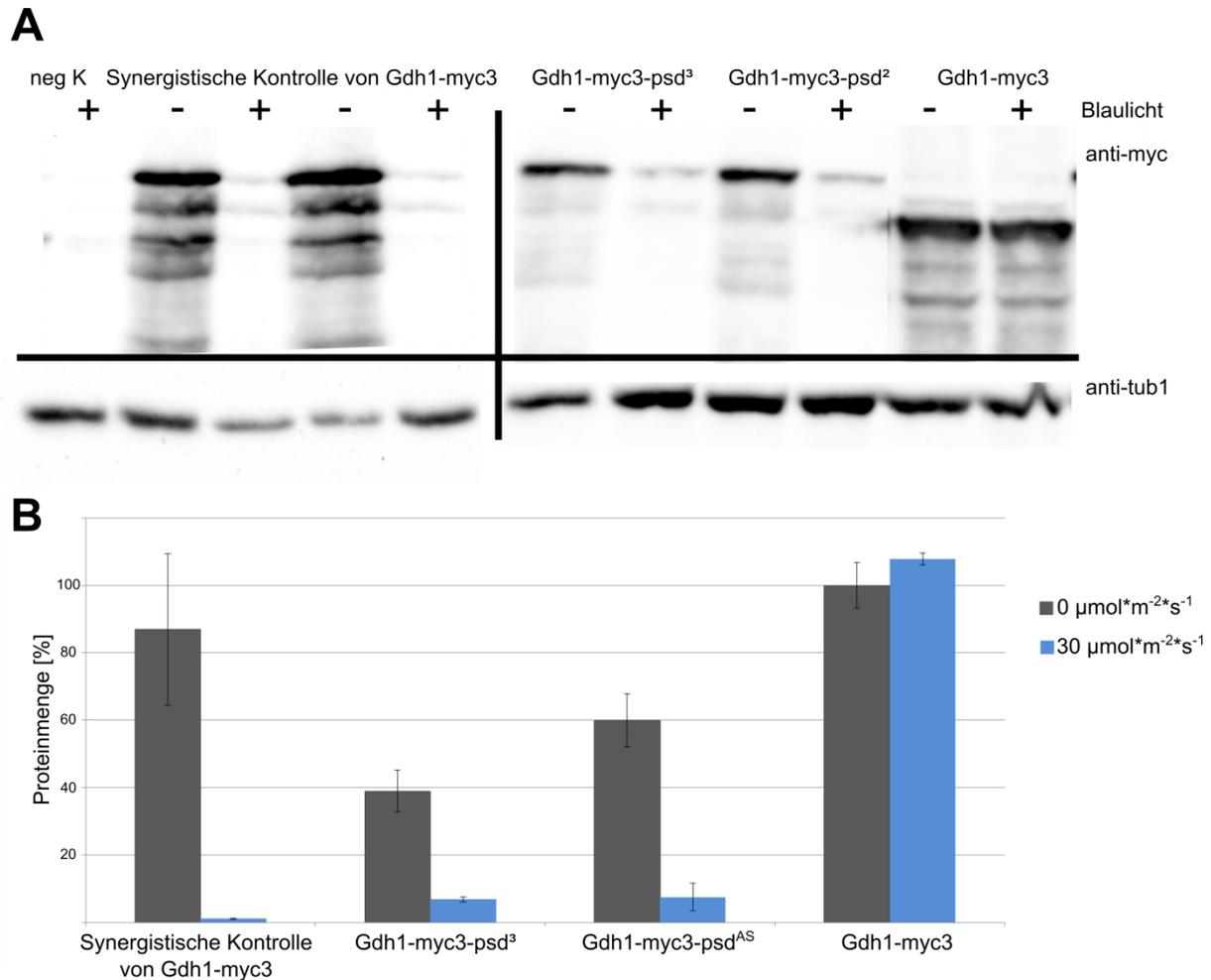


Abbildung 22: Lichtkontrolle der Gdh1-Menge. Die Gdh1 Verfügbarkeit in den Hefezellen sollte durch verschiedene lichtkontrollierte Module beeinflusst und mit Hilfe des 3myc-Tags durch Immunodetektion quantifiziert werden (Gdh1-myc3-psd³: yDS488; Gdh1-3myc-psd^{AS}: yDS487; Gdh1-myc3: yJT21; Synergistische Kontrolle von Gdh1: yJT40). **A:** Beispieldetektion einer Westernblot-Analyse mit den beschriebenen Hefestämmen. Das Experiment wurde wie in Abb. 17A beschrieben durchgeführt. Die Immunodetektion erfolgte durch spezifische Tub1- und myc-Antikörper. Tub1 dient hierbei als Ladekontrolle. **B:** Quantifizierung der Gdh1 Westernblots. Die Gdh1-myc3 Menge in dunkeladaptierten Zellen wurde als Referenz verwendet (100%). Die beiden lichtregulierten Degrons verhalten sich ähnlich und beeinflussen bereits in Dunkelheit die Gdh1 Menge. Die synergistische Kontrolle ermöglicht eine gute Schaltbarkeit der Proteinmengen. In Dunkelheit werden dabei Gdh1-3myc-ähnliche Mengen erreicht. Durch die verwendeten Module lassen sich die Gdh1-Mengen auf unter 5% des Wildtyps reduzieren. Dargestellt sind 3 unabhängige Messungen und die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Die synergistische Kontrolle erwies sich für die Gdh1 Kontrolle als nahezu optimal. Die detektierten Mengen in Dunkelheit entsprachen dem Wildtyp-Niveau. Durch die Induktion der Degradation und der reduzierten Promotoraktivität durch Blaulicht blieben nur noch geringste Mengen an Gdh1 übrig (Abb. 22B).

2.3.1 Optimierung eines β -Carotin produzierenden Hefestamms mit optogenetische Modulen

Um die Auswirkungen durch optogenetische Regulationen auf die Produktion eines heterologen Metabolits zu untersuchen, wurde die Biosynthese von β -Carotin als Model verwendet. Für die Implementierung des Biosyntheseweges müssen lediglich 3 heterologe Gene in *S. cerevisiae* exprimiert werden. Der Biosyntheseweg zweigt sich dem Mevalonatsynthesewegs ab, dieser ist Ausgangspunkt für die Produktion unzähliger biotechnologisch relevanter Sekundärmetaboliten. Ein weiteres Argument für die Verwendung von β -Carotin ist die Fluoreszenz dieses Produktes, die eine Massenspektrometrie-unabhängige Detektion ermöglicht.

Zunächst wurde der Biosyntheseweg von β -Carotin in *S. cerevisiae*-Zellen mit Hilfe eines Plasmids (pUDE269) implementiert. Anschließend erfolgten erste β -Carotin-Quantifizierungen mittels Durchflusszytometrie in unterschiedlichen Medien. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Medien verwendet und die Produktion in diesen verglichen.

Das Low-Fluoreszenz-Medium (LFM) wird oft für Fluoreszenzmessungen in *S. cerevisiae* verwendet und WM8 ist ein für die Fermentation in großen Volumina optimiertes synthetisches Medium. Die Fluoreszenz wurde alle 24h für insgesamt 72h mittels Durchflusszytometrie gemessen (Abb. 23A).

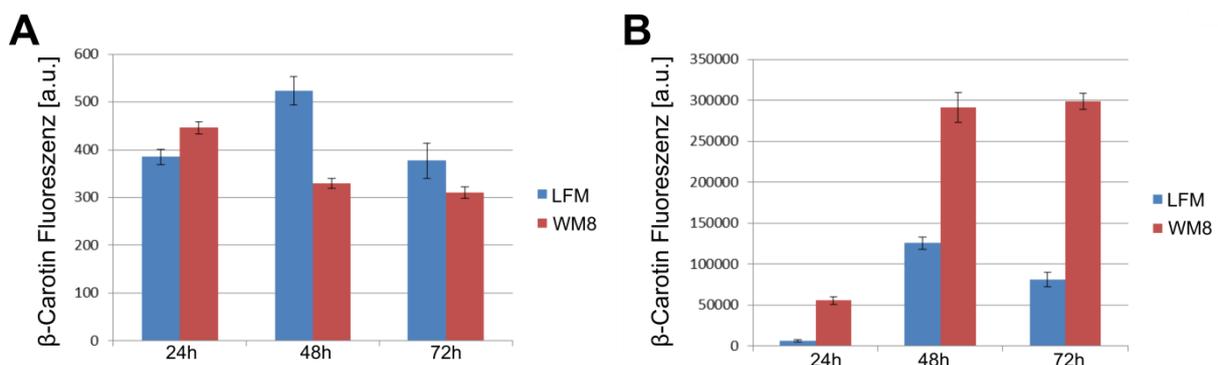


Abbildung 23: Vergleich der β -Carotin Fluoreszenz zwischen Zellen die in LFM oder WM8 gewachsen sind. A: β -Carotin-Fluoreszenz auf Einzel-Zell-Ebene. Die β -Carotin produzierenden Zellen (ESM356 + pUDE269) wurden für 72h in dem entsprechendem Medium angezogen und alle 24h Proben für eine Durchflusszytometrie-Messung entnommen. Dargestellt sind 8 unabhängige Messungen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. B: Vergleich der β -Carotin-Fluoreszenz zwischen einer Hefekultur die in LFM bzw. WM8 gewachsen ist. Das Experiment wurde wie in A beschrieben durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde mit der Anzahl detektierten Zellen multipliziert. Dadurch wurde die Fluoreszenz der gesamten Kultur berechnet. Dargestellt sind 8 unabhängige Messungen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Nach 24h verhielt sich die β -Carotin-Fluoreszenz in beiden Medien ähnlich. Nach 48h erreichte die Fluoreszenz pro Zelle im LFM den höchsten Wert, während sie im WM8 sank.

Nach insgesamt 72h reduzierte sich die Fluoreszenz im LFM pro Zelle um ca. 20%, während sie im WM8 auf einem konstanten Level blieb. Insgesamt konnte im LFM mehr Fluoreszenz pro Zelle gemessen werden. Berücksichtigt man jedoch zusätzlich die Zahl der Zellteilungen in den entsprechenden Medien ergibt sich ein anderes Bild. Durch den Nährstoffreichtum im WM8 wird ein stärkeres und längeres Wachstum ermöglicht. Berechnet man die β -Carotin-Fluoreszenz pro Kultur wurde im LFM bei allen Zeitpunkten weniger Fluoreszenz im Vergleich zum WM8 gemessen (Abb. 23B). Nach 24h haben pro Kultur die Zellen im WM8 bereits deutlich mehr Fluoreszenz. In LFM erreicht die Kultur nach 48h ihr Fluoreszenzmaximum.

Diese Ergebnisse spiegeln die Erwartungen wieder. WM8 führt durch den Nährstoffreichtum zu einer erhöhten Produktion. Für die Charakterisierung zellulärer Manipulationen auf die β -Carotin-Synthese auf Einzelzellebene ist LFM jedoch besser geeignet. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Charakterisierungen das Low-Fluoreszenz-Medium verwendet.

2.3.1.1 Auswirkungen einer optogenetischen Kontrolle von Erg9 auf die β -Carotin-Produktion

Für die Optimierung der β -Carotin-Produktion mit optogenetischen Modulen wurden die bereits beschriebenen lichtregulierten Module *psd^{AS}* (AsLOV2-cODC1), *psd³* (iLID^{ΔA}-cODC1), und die SOMCo verwendet. Zum einen wurde die Aktivität des konkurrierenden Ergosterolsyntheseweges reduziert. Hierbei wird das Schlüsselintermediat Farnesylpyrophosphat (FPP) durch Erg9 in Squalen und dann in weiteren Schritten zu Ergosterol umgesetzt. Durch Blaulichtkontrollierte Degradation von Erg9 soll die Verfügbarkeit von FPP für die β -Carotin-Produktion erhöht werden. Zusätzlich wurde eine verkürzte Version von *HMG1* (*tHMG1*) lichtunabhängig exprimiert. Dadurch soll ein Feedback-Loop unterbrochen werden, der ansonsten der erhöhten FPP-Konzentration entgegenwirken könnte (Abb 24A). Bei diesem Loop wird normalerweise durch eine erhöhte FPP-Verfügbarkeit Hmg1 inhibiert. Durch eine Verkürzung dieses Enzyms wird diese Regulation verhindert (Dimster-Denk et al. 1994; Burg und Espenshade 2011; Bröker et al. 2018).

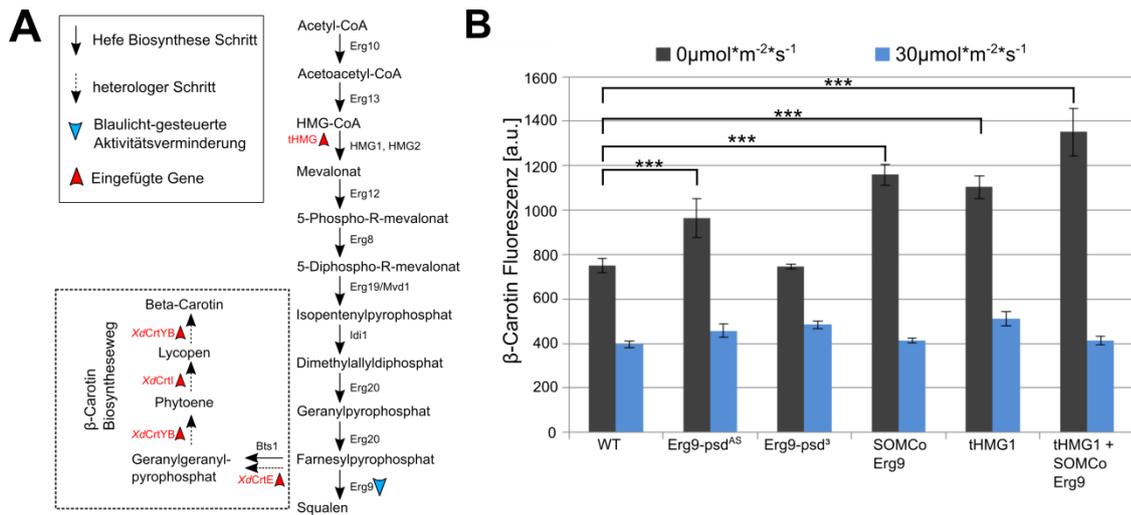


Abbildung 24: Optimierung eines β -Carotin produzierenden Hefestamms durch blauchtgesteuerte Aktivitätsverminderung. **A:** Schematische Darstellung der heterologen β -Carotin-Biosynthese in *S. cerevisiae*. Die Produktion von β -Carotin wird durch das Einführen der 3 Gene *CrtE*, *CrtI* und *CrtYB* aus *Xanthophyllomyces dendrorhous* ermöglicht. Dieser Syntheseweg zweigt sich aus dem Mevalonatweg ab. Durch die Einführung einer blauchtgesteuerten Aktivitätsverminderung für *Erg9* soll der Verbrauch des Schlüsselintermediats FPP reduziert werden. Zusätzlich soll der Einfluss einer verkürzten Version von *HMG1* (tHMG1) überprüft werden. **B:** Quantifizierung der Fluoreszenz in den β -Carotin produzierenden *S. cerevisiae*-Stämme mittels Durchflusszytometrie. Die blauchtgesteuerte Aktivitätsverminderung von *Erg9* wurde durch unterschiedliche optogenetische Module hervorgerufen (*Erg9-psd^{AS}*: *ySH4*, *Erg9-psd³*: *ySH3*, SOMCo *Erg9*: *yJT35*) und die Produktion von β -Carotin durch ein Plasmid (*pUDE269*) ermöglicht. Zusätzlich wurde der Einfluss von tHMG1 auf die Fluoreszenz überprüft (tHMG1: *yJT31*, tHMG1 + SOMCo *Erg9*: *yJT39*). Dargestellt sind 8 unabhängige Messungen und die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Die beobachteten Unterschiede im Vergleich zum WT erwiesen sich als sehr signifikant (***)= $p < 0,001$).

Um die Auswirkungen der Modifikationen zu überprüfen wurde die Fluoreszenz von β -Carotin im Durchflusszytometer quantifiziert. Bei allen Messungen wurde in Blaulicht 40-60% weniger Fluoreszenz als in Dunkelheit detektiert. Im Gegensatz zu den anderen getesteten Modulen war lediglich für *Erg9-psd³* in Dunkelheit keine Erhöhung der Produktion im Vergleich zum WT zu beobachten. Die höchste Fluoreszenz wurde in dem Stamm in Dunkelheit gemessen, in dem *Erg9* durch SOMCo reguliert und tHMG1 exprimiert wird (Abb. 24B). Relevante β -Carotin-Produktionsveränderungen in Blaulicht blieben aufgrund der deutlich reduzierten Fluoreszenz aus; dies wurde bei allen Stämmen beobachtet. Auf Grund dieser blauchtinduzierten Verringerung der β -Carotin-Menge eignet es sich nicht als optimales Modelprodukt für die verwendeten Module (Giorgio Scita 1992). Diese Reduktion kommt vermutlich durch eine Reaktion des π -Elektronensystems von β -Carotin zustande.

2.3.1.2 Auswirkungen einer lichtregulierten PKA-Aktivität auf die Produktion von β -Carotin

Als nächstes wurde der Einfluss einer blaublichtregulierten PKA-Aktivität auf die β -Carotin Produktion untersucht. Verwendet wurde das Konstrukt $P_{CYCI}\text{-tagRFP-bPAC } \Delta\text{cyr1}$, da dieses in dem Wachstumstest in flüssigem Medium die beste Regulation der PKA andeutete.

Zunächst wurde der vermutete Einfluss der PKA auf die β -Carotin Produktion durch Variationen der PKA-Aktivität getestet. Hierfür wurde mit dem genannten Konstrukt und einem Wildtyp eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit unterschiedlichen Blaublichtintensitäten aufgenommen (Abb. 25A). Die verwendeten Intensitäten reichten von 0 bis $30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Sobald der Stamm mit der photoregulierten Adenylylcyclase unter Blaublicht wuchs, wurde eine reduzierte β -Carotin-Fluoreszenz im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Blaublichtintensitäten oberhalb von $10\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ führten wie erwartet bei beiden Stämmen zu einer Reduzierung der gemessenen Fluoreszenz. In Dunkelheit konnte jedoch eine deutlich erhöhte Fluoreszenz in den bPAC-regulierten Zellen detektiert werden. Diese Bedingungen führten bei der Jod-Dampf-Färbung bereits zu einer reduzierten PKA-Aktivität (Abb. 20).

Um die Erhöhung der β -Carotin-Produktion bei niedriger PKA-Aktivität weiter zu charakterisieren wurde zusätzlich eine β -Carotin-Extraktion mit anschließender HPLC zur Quantifizierung der Mengen durchgeführt. Zusätzlich wurde versucht den gleichen Effekt zu erzielen, indem die natürliche Adenylylcyclase mit einem psd^{AS} -tag versehen wurde. Damit sollte in Blaublicht die PKA-Aktivität verringert werden. Eine HPLC ermöglichte die Bestimmung der β -Carotin-Menge pro Kultur und pro mg Trockenhefe (Abb. 25B und C). Der bPAC-exprimierende Stamm zeigte in Dunkelheit wie erwartet eine deutlich erhöhte Produktion im Vergleich zum Wildtyp. So konnten im Durchschnitt von den $P_{CYCI}\text{-bPAC}$ -Konstrukt tragenden Zellen ca. $6,5\mu\text{g}$ β -Carotin pro mg Trockenhefe extrahiert werden, während in dem entsprechenden Wildtyp gerade einmal $2,5\mu\text{g}$ pro mg Trockenhefe nachgewiesen wurde. Diese Daten bestätigten die Durchflusszytometer-Daten, dass eine Verringerung der PKA-Aktivität zu einer erhöhten β -Carotin-Produktion führt.

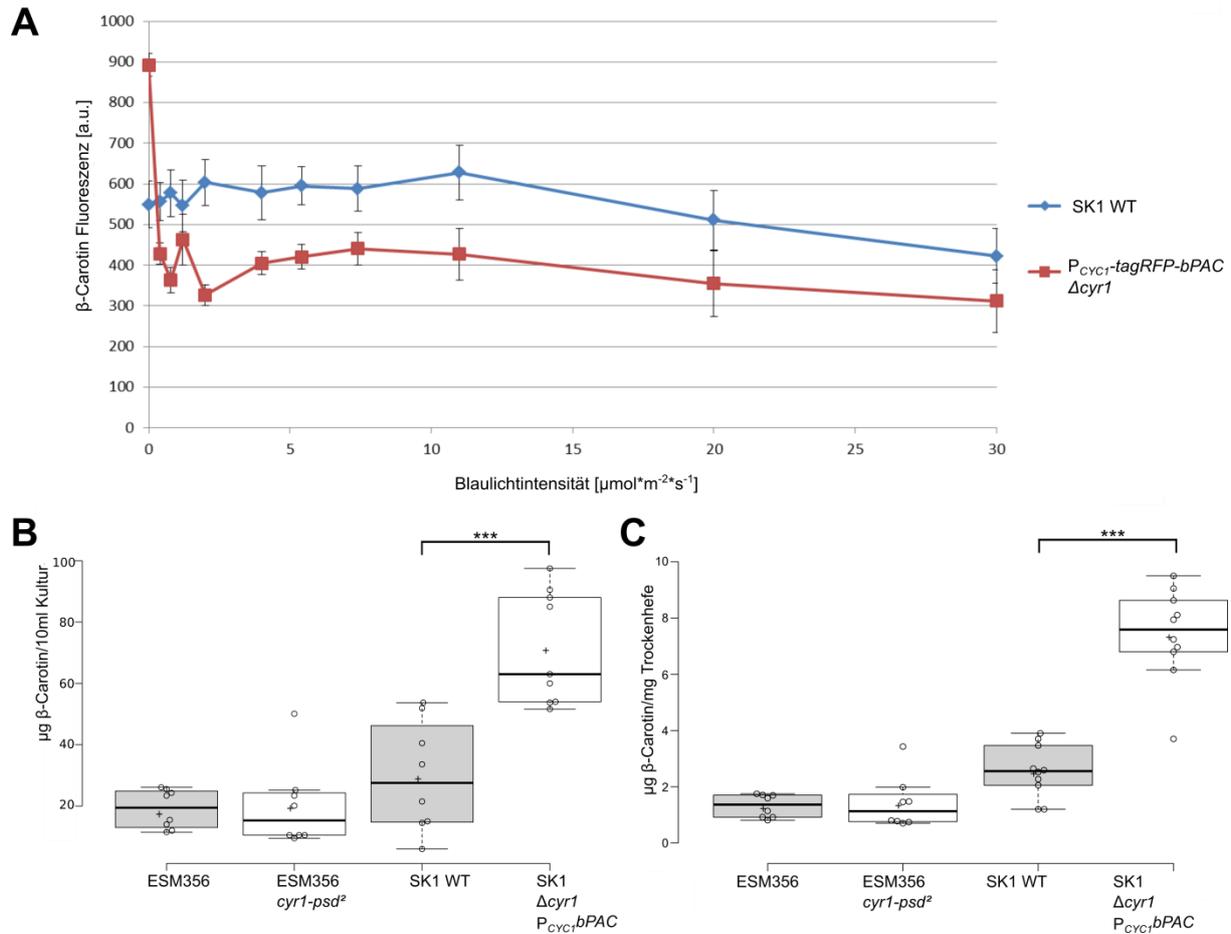


Abbildung 25: Auswirkungen der lichtregulierten PKA-Aktivität auf die β -Carotin Produktion. Die PKA-Aktivität wurde entweder durch bPAC (*ySEB38: $\Delta\text{cyr1 } P_{Cyc1-tRFP-bPAC}$*) oder mit Hilfe eines *psd*-Tags an der endogenen Adenyllylcyclase (*ySH21: *cyr1-myc-psd^{AS}**) beeinflusst. Als Kontrolle dienten die entsprechenden Wildtyp-Stämme ESM356 oder SK1. **A:** Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurve zwischen dem WT und *ySEB38*. Die Stämme zog man erst für 2h in TC-Flaschen unter $1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Blaulicht an um ein gutes Wachstum des bPAC-Stammes zu ermöglichen, bevor sie auf 6-Well-Platten aufgeteilt wurden und für weitere 5h unter entsprechenden Lichtbedingungen wuchsen. **B:** Darstellung der β -Carotin Menge in einer 10ml Hefekultur als Boxplot. Die SK1-Stämme wurden zunächst für 24h unter $1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Blaulicht angezogen bevor sie für 24h in Dunkelheit inkubierten. Die ESM356-Stämme hingegen wuchsen zuerst für 24h in Dunkelheit und anschließend 24h unter $30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Blaulicht. Auf die HPLC wurde eine 1:10 Verdünnung der zuvor durchgeführten Extraktion aufgetragen. Dargestellt sind immer mindestens 6 unabhängige Messungen. Das Kreuz zeigt den Mittelwert an, der Strich innerhalb der Boxen spiegelt den Median. **C:** Darstellung der β -Carotin-Menge pro mg Trockenhefe als Boxplot. Normierung der in **B** dargestellten Daten auf das Trockengewicht. Dargestellt sind immer mindestens 6 unabhängige Messungen. Das Kreuz zeigt den Mittelwert an, der Strich innerhalb der Boxen den Median. Die beobachteten Unterschiede erwiesen sich als sehr signifikant (***) ($p < 0,001$).

Die blaulichtinduzierte PKA-Aktivitätsverringern durch *Cyr1-psd^{AS}* führte leider nicht zu dem erwarteten Effekt. Diese Zellen wurden, um das *psd^{AS}*-Modul zu aktivieren, in Blaulicht inkubiert, während die Aktivitätsverringern in *ySEB38* durch eine Inkubation in Dunkelheit hervorgerufen werden konnte. Vermutlich wird der erwartete Effekt durch den bereits zuvor beobachteten negativen Einfluss von Blaulicht auf β -Carotin verringert.

2.3.2 Optimierung eines Cordycepin-produzierenden *S. cerevisiae* Stammes

Die optogenetische Kontrolle der PKA-Aktivität erwies sich bei der Produktion von β -Carotin als vielversprechend. Da dieses Produkt jedoch stark durch Licht beeinflusst wurde war keine klare Entscheidung möglich, ob sich ein Konstrukt wie die *cyr1-psd^{AS}*-Mutante zur Variation der PKA-Aktivität eignet. Aus diesem Grund wurde ein Stamm mit einem anderen heterologen Biosynthesewegs zur Klärung dieser Frage verwendet. Hierbei handelt es sich um die Biosynthese von Cordycepin in *S. cerevisiae*. Für die Etablierung dieses Synthesewegs sind im Minimalfall lediglich zwei heterologe Gene nötig. Cns2 katalysiert die Reaktion von 3'-AMP zu 2'-Carbonly-3'-Desoxyadenosin. Dieses wird in einen weiteren Schritt von Cns1 zu Cordycepin. 3'-AMP kommt natürlicherweise in der Bäckerhefe vor und entsteht durch den Abbau von mRNA (Abb. 26A) (Xia et al. 2017). Die Expression von Cns1 und 2 stand unter der Kontrolle eines blaulichtaktivierbaren Transkriptionsfaktors. Dadurch wurde die Herstellung dieses toxischen Produkts in Dunkelheit verringert und in Blaulicht ermöglicht. Bei dieser Expression handelt es sich um ein Hefe-Zwei-Hybrid-ähnliches System, welches die blaulichtaktivierbare Interaktion zwischen Cry2 und CIB1 nutzt. Cry2 ist mit einer DNA-Bindedomäne (LexA-BD) fusioniert und Cib1 mit einem Transkriptionsaktivator (VP16) (Trauth 2017).

Der Cns1 und Cns2 exprimierende Stamm wurde von Bastian Pook im Rahmen seiner Doktorarbeit hergestellt (Abb. 26A). Durch seine Analysen konnte er zeigen, dass sich der Großteil der produzierten Cordycepinmenge im Medium befindet, weshalb bei den folgenden Untersuchungen nur dies mittels Massenspektrometrie getestet wurde. Zusätzlich wurde überprüft ob eine zusätzliche Genkopie eines Transkriptionsfaktorteils (Cib1-VP16) zu einer erhöhten Produktion führt. Damit sollte getestet werden, ob die Verfügbarkeit des heterologen Transkriptionsfaktorteils limitierend für die Biosynthese von Cordycepin ist (Abb. 26B). Der Ausgangsstamm und die *cyr1-psd^{AS}*-Mutante produzierten in Dunkelheit gleiche Mengen an Cordycepin. Die Induktion mit Blaulicht führte wie erwartet zu einer deutlichen Konzentrationserhöhung. Hier konnte für den Ausgangsstamm eine Konzentration von 2,1 μ mol und für die *cyr1-psd^{AS}*-Mutante von 2,6 μ mol detektiert werden. Die Modifikation der Adenylylcyclase und die daraus resultierende verringerte PKA-Aktivität führte zu einer leicht erhöhten Cordycepinbiosynthese.

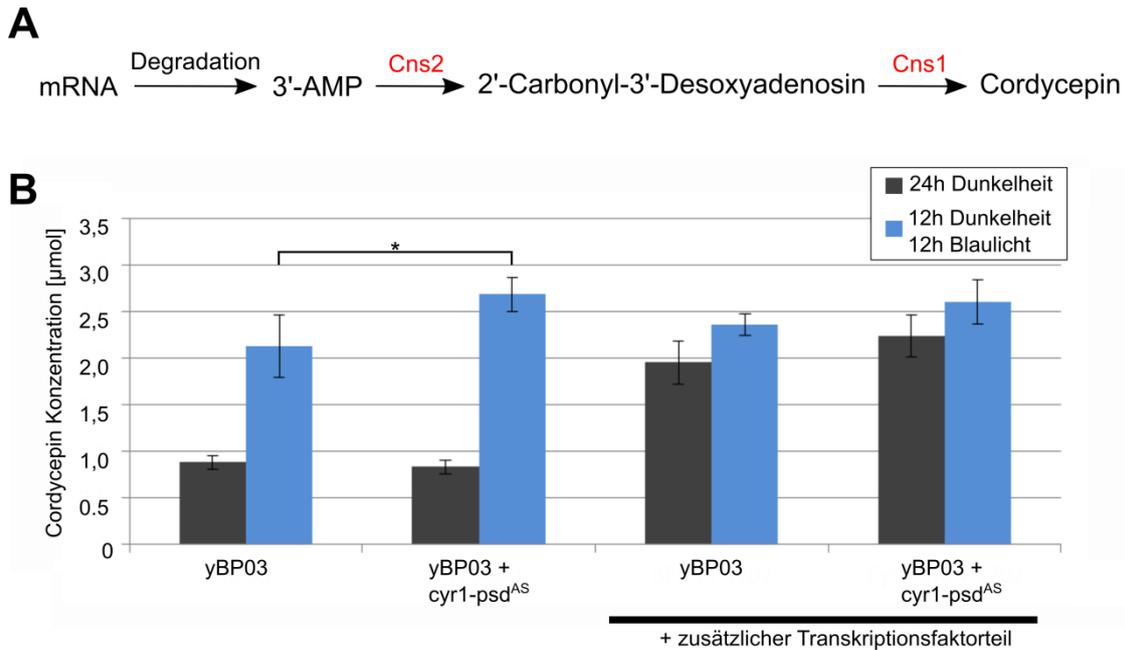


Abbildung 26: Auswirkungen einer verringerten PKA-Aktivität auf die Cordycepinproduktion. A: Darstellung des implementierten Cordycepinsynthesewegs. Die Gene *Cns1* und *Cns2* wurden lichtabhängig in den *S. cerevisiae* Zellen exprimiert. Dies wurde durch das verwendete Promotorsystem, beruhend auf der lichtabhängigen Interaktion zwischen LexABD-Cry2 und Cib1-VP16, ermöglicht. Dieser Ausgangsstamm (yBP03) wurde von Bastian Pook im Rahmen seiner Doktorarbeit hergestellt. **B:** Quantifizierung der gemessenen Cordycepinkonzentration im Kulturmedium. Die Zellen wurden entweder für 24h unter Ausschluss von Licht angezogen (schwarze Balken) oder für 12h in Dunkelheit und für weitere 12h unter 30µmol*m⁻²*s⁻¹ Blaulicht (blaue Balken). Zur Reduktion der PKA-Aktivität wurde die endogene Adenylylcyclase aus *S. cerevisiae* an ein psd-Modul (psd^{AS}) fusioniert. Durch Blaulicht konnte daher in diesem Stamm gleichzeitig Cyr1 destabilisiert und die Expression der für die Cordycepinproduktion benötigten Gene *CNS1* und *CNS2* initiiert werden (yBP03 + cyr1-psd^{AS}; yJT42). Zusätzlich wurde die Auswirkung eines zusätzlichen Transkriptionsfaktorteils auf die Cordycepinproduktion in beiden verwendeten Stämmen überprüft. Hierbei handelt es sich um eine zusätzliche Kopie des Gens, welches für CIB1-VP16 codiert. Dieses wurde basierend auf einem Plasmid exprimiert. Dargestellt sind mindestens 4 unabhängige Messungen, der Fehlerbalken stellt den Standardfehler dar. Die beobachteten Unterschiede erwiesen sich als signifikant (*=p<0,05).

Die Stämme mit dem zusätzlichen Transkriptionsfaktorteil zeigten kein eindeutiges Schaltverhalten zwischen Dunkelheit und Blaulicht. Es konnte unter Blaulicht keine erhöhte Konzentration im Vergleich zu den Stämmen ohne zusätzlichen Transkriptionsfaktorteil beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass die Cordycepinproduktion nicht durch die Verfügbarkeit des heterologen Transkriptionsfaktors CIB1-VP16 limitiert wird, sondern möglicherweise durch die Verfügbarkeit des Präkursors.

2.3.3 Optimierung eines Betulinsäure produzierenden *S. cerevisiae* Stamms

Der Betulinsäure-Biosyntheseweg wurde von einer Kollaborationspartnerin aus Aachen/Queensland, Birgitta Eberts, bereits in *S. cerevisiae* implementiert und erste Optimierungen durchgeführt (Czarnotta et al. 2017). Diese Optimierungen beinhalteten jedoch nicht eine Aktivitätsverminderung des konkurrierenden Ergosterolsynthesewegs, sondern das Einführen der verkürzten HMG1-Variante tHMG1 und die Überexpression der heterologen Gene.

Der Betulinsäure-Biosyntheseweg spaltet sich vom hefeeigenen Mevalonat-Syntheseweg ab. Natürlicherweise wird in *S. cerevisiae* 2,3-Oxidosqualen durch Erg7 zu Lanosterol katalysiert und später über mehrere Schritte zu Ergosterol. Der Betulinsäure-Biosyntheseweg nutzt das Intermediat 2,3-Oxidosqualen und wandelt dieses mit Hilfe einer heterologen Oxidosqualenecyclase (OSC) zu Lupeol. Die anschließende Umsetzung von Lupeol zu Betulinsäure wird durch die eine Cytochrome P450 Monooxygenase (CYP) und der dazugehörigen Cytochrome P450 Reduktase (CPR) katalysiert. Diese Hydroxylierung von Lupeol führt erst zu Betulin, durch Oxidation zum Betulinaldehyd und durch eine weitere Oxidation zur Betulinsäure. Um die Verfügbarkeit des Intermediates 2,3-Oxidosqualen zu erhöhen sollte die Synthese von Lanosterol inhibiert oder stark reduziert werden. Die dafür benötigte Destabilisierung von Erg7 (Abb. 27A) wurde daher im Rahmen dieser Arbeit realisiert und die Auswirkung auf die Verfügbarkeit der Zwischenprodukte und der Produktion von Betulinsäure charakterisiert.

Hierfür erfolgte eine Fusion von Erg7 mit einer modifizierten psd³-Version (psd⁴) in dem Betulinsäure-produzierendem Stamm. Dieses psd⁴-Modul trägt die Mutation V416L, wodurch der Photozyklus des Photorezeptors (iLID^{AA}) verlangsamt wird. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass diese Modifikation die Lichtsensitivität des Moduls, bei gleichbleibender Schaltrate, deutlich erhöht (Bastian Pook, unpublizierte Daten). Zusätzlich wurde eine weitere genetischer Veränderung durchgeführt und die Auswirkung überprüft. Aufgrund der Daten, die Johannes Scheffer im Rahmen seiner Doktorarbeit erhalten hat, wurde Cdc48 mit einem photosensitiven Degron (Cdc48-psd^{K92R E132A E155G}) versehen. Durch eine ähnliche Modifikation konnte eine erhöhte Produktion von β -Carotin und Cordycepin in *S. cerevisiae* beobachtet werden (persönliche Mitteilung von Johannes Scheffer). Diese zwei modifizierten Stämme und der Ausgangsstamm von Birgitta Ebert wurden unter Blaulichtbestrahlung oder in Dunkelheit inkubiert und anschließend die Triterpenoide extrahiert. Die Quantifizierung der einzelnen Metaboliten erfolgte in Queensland von Frau Ebert (Abb. 27B).

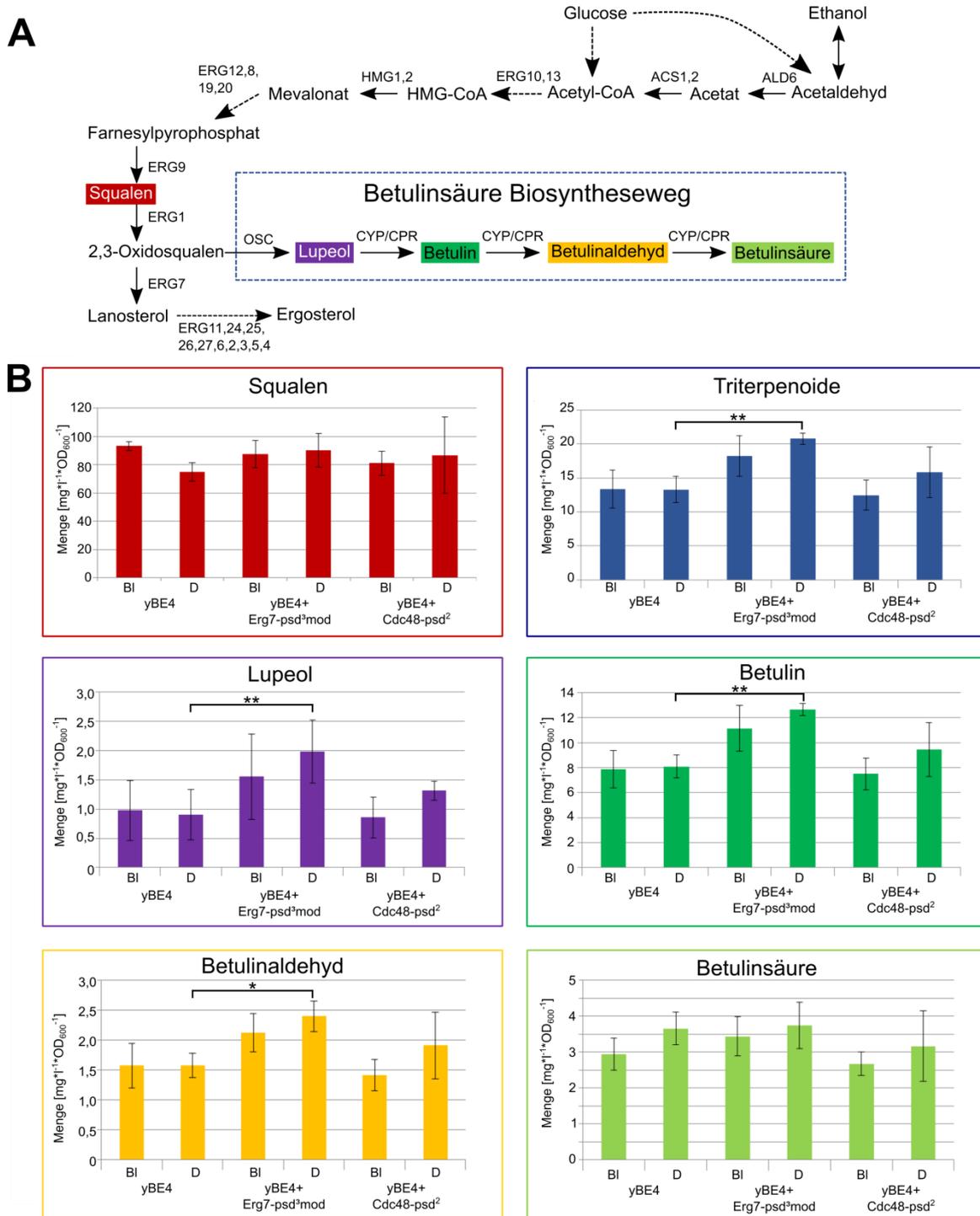


Abbildung 27: Optimierung eines Betulinensäure produzierenden *S. cerevisiae*-Stammes (yBE4). **A:** Schematische Darstellung des implementierten Betulinensäure-Biosynthesewegs, welcher sich aus dem Mevalonat-Syntheseweg abzweigt. Modifizierte Abbildung aus (Czarnotta et al. 2017). **B:** Charakterisierung des produzierenden Stammes mit und ohne Optimierung. Um einen genauen Überblick zu erhalten wie stark sich die verwendeten Modifikationen (yDS378: yBE4+Erg7-psd³mod; yDS580: yBE4+Cdc48-psd^{AS}) auf den Betulinensäure-Biosyntheseweg auswirken, wurde nicht nur die Produktion des Endprodukts überprüft, sondern auch sämtliche Zwischenprodukte und das Schlüsselintermediat Squalen. Als Kontrolle diente der Ausgangsstamm yBE4. Die Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit angezogen und die Proben entnommen. Die Auswertung wurde von einer Kollaborationspartnerin, Birgitta Ebert an der Universität von Queensland durchgeführt. Von dort stammte auch der ausgehende Stamm yBE4, welcher auch 2017 publiziert wurden (Czarnotta et al. 2017). Dargestellt sind 3 unabhängige Messungen und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Die beobachteten Unterschiede erwiesen sich als signifikant (*=p<0,05, **=p<0,01).

Es wurde der Präkursor Squalen, die gesamte Menge der Triterpenoide, die Zwischenprodukte Lupeol, Betulin und Betulinaldehyd und das Endprodukt Betulinsäure detektiert und quantifiziert (Abb. 27B).

Dies ermöglichte eine genauere Untersuchung des metabolischen Flusses. Die Squalenmenge blieb in allen Stämmen ähnlich. Die Modifikation Cdc48-psd^{K92R E132A E155G} führte nicht zu einer erhöhten Produktion von Betulinsäure oder eines der Zwischenprodukte. Zwischen dieser Mutante und yBE4 konnte unter beiden Lichtbedingungen kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Die yBE4-Mutante mit Erg7-psd⁴ hingegen zeigte erhöhte Lupeol-, Betulin- und Betulinaldehydmengen auf. Diese erhöhten Mengen spiegeln sich auch in der Gesamtheit der Triterpenoide wieder (Abb. 27B). Dieser positive Effekt ist jedoch lichtunabhängig, da keine wesentlichen Unterschiede zwischen Blaulichtexposition und Wachstum in Dunkelheit beobachtet werden konnte. Dies deutet auf eine bereits signifikante Destabilisierung von Erg7-psd⁴ in Dunkelheit hin. Die detektierte Betulinsäuremenge unterschied sich nicht zwischen der yBE4-Mutante mit Erg7-psd⁴ und dem unmodifizierten yBE4-Stamm, wodurch ein Engpass in der Umsetzung von Betulinaldehyd zu Betulinsäure offenbart wurde.

2.4 Entwicklung, Charakterisierung und Anwendung eines Gibberellinsäurereporters

2.4.1 Entwicklung und Verhalten eines Gibberellinsäurereporterstammes

Um einen Sensor zur Detektion von bioaktiven Gibberellinen herzustellen wurde die Interaktion von AtGAI und AtGid1A, die nur durch Anwesenheit von GA ermöglicht wird, ausgenutzt. Das Stattfinden dieser Interaktion sollte durch das Prinzip eines Protein-fragment Complementation Assays (PCA) sichtbar und quantifizierbar gemacht werden. Dafür erfolgte eine Fusion von Split-Venus-Sequenzen an die Interaktionspartner. Diese inaktiven Fluoreszenzproteinteile reassemblieren, sobald AtGAI und AtGid1A interagieren (Abb. 28A). Der daraus resultierende Report wird als „*Gibberellic Acid Venus*“-Reporter (GAVR) bezeichnet.

Um das Verhalten dieses *in vivo* Reporters zu charakterisieren wurden die entsprechenden Konstrukte in *S. cerevisiae* Zellen exprimiert, welche in Medien mit unterschiedlichen GA3 Konzentrationen angezogen wurden. Die Quantifizierung der entstanden Fluoreszenz des reassemblierten mVenus erfolgte mittels Durchflusszytometrie und Fluorimeter. In der Durchflusszytometermessung kamen GA3-Konzentrationen von 10⁻⁵ bis 10⁻²M im Medium zum Einsatz (Abb. 28B).

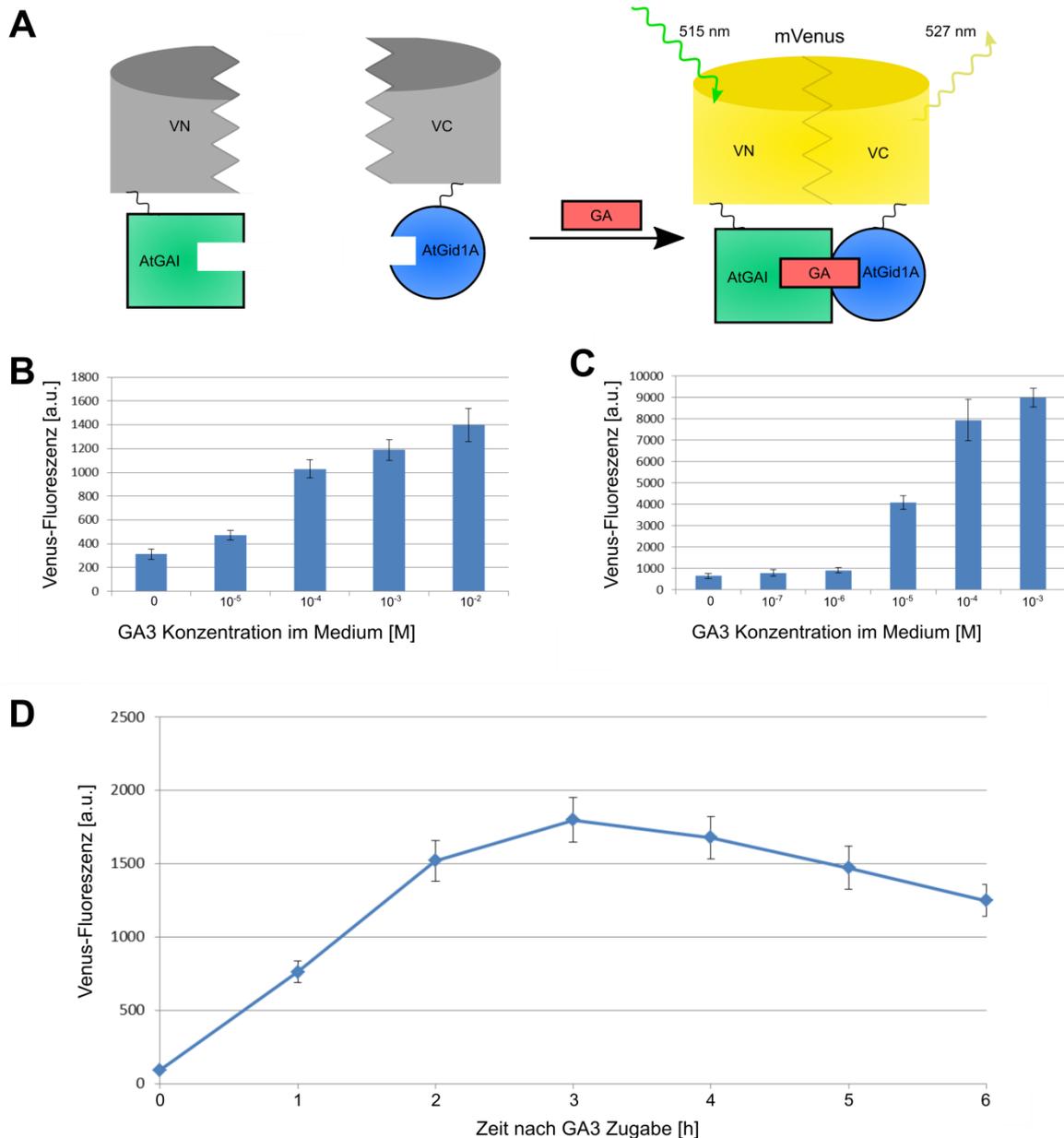


Abbildung 28: Charakterisierung des Gibberellinsäurereporters. **A:** Schematische Darstellung des „Gibberellic Acid Venus“-Reporters (GAVR) und dessen GA-abhängige Antwort. Ohne GA können die Proteine GAI und Gid1A nicht miteinander interagieren, wodurch sich die Split-Venus-Teile nicht reassemblieren und daher auch nicht fluoreszieren. Ist jedoch GA vorhanden, wird diese Interaktion ermöglicht, und die mVenus-Teile binden einander irreversibel aufgrund der räumlichen Nähe zueinander. Dadurch entsteht ein funktionsfähiges Fluoreszenzprotein. Die einzelnen Reporterteile wurden von 2 unterschiedlichen Plasmiden in ESM356 exprimiert (ESM356 + pMB1: P_{ADHI} -AtGAI-VN + pMB2: P_{ADHI} -AtGid1A-VC). Dargestellt ist der Mittelwert aus 4 unabhängigen Messungen, und die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. **B:** Quantifizierung der GA-abhängigen Venus-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden in dem GA-haltigen Medium für 5h angezogen. **C:** Quantifizierung der GA-abhängigen Venus-Fluoreszenz mittels Fluorimeter. Die Zellen wurden in dem GA-haltigen Medium für 5h angezogen. Es wird der Mittelwert aus 4 unabhängigen Messungen dargestellt, und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. **D:** Verhalten der GA-abhängigen Venus-Fluoreszenz über 6h. Die Messung wurde am Durchflusszytometer durchgeführt. Zum Zeitpunkt $t=0$ wurde das Medium mit einer Endkonzentration von 10^{-3} M GA3 versehen. Dargestellt ist immer jeweils der Mittelwert aus 6 unabhängigen Messungen, und der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dar.

Es konnte eine eindeutige Reaktion des Reporters bei allen verwendeten Konzentrationen beobachtet werden. Höhere GA3-Konzentrationen führten wie erwartet zu einer stärkeren Antwort. Zu ähnlichen Ergebnissen führte die Fluorimetermessung (Abb. 28C). Hier wurden

GA3 Konzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-3} M verwendet. Bei den niedrigen GA3 Konzentrationen von 10^{-7} und 10^{-6} M entsprach die gemessene YFP-Fluoreszenz der Hintergrundfluoreszenz. Ab einer Konzentration von 10^{-5} M GA3 im Medium konnte eine eindeutige Reaktion des Reporters detektiert werden. Bei beiden Messungen ließ sich eine geringe Fluoreszenz ohne GA3 beobachten. Um zusätzlich den Reporterstamm (ESM356 mit pMB1 und pMB2) genauer zu charakterisieren wurde das Verhalten von diesem in Anwesenheit von 10^{-3} M GA3 über 6h untersucht. Die Quantifizierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Abb. 28D). Die Zugabe von GA3 führte zu einem schnellen Anstieg der YFP-Fluoreszenz. Nach 3h erfolgte die stärkste Reaktion des Reporters. Ab diesem Zeitpunkt verringerte sich die YFP-Fluoreszenz langsam.

Die Untersuchung der Lokalisation von GAVR in Hefezellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Hierfür wurde der Reporterstamm mit und ohne GA3 im Medium angezogen und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert (Abb. 29). Ohne die Zugabe von GA3 ist kaum YFP-Fluoreszenz zu erkennen. Mit GA3 erhielt man ein schwaches YFP Signal in der gesamten Zelle, mit einer zusätzlichen Akkumulation im Zellkern.

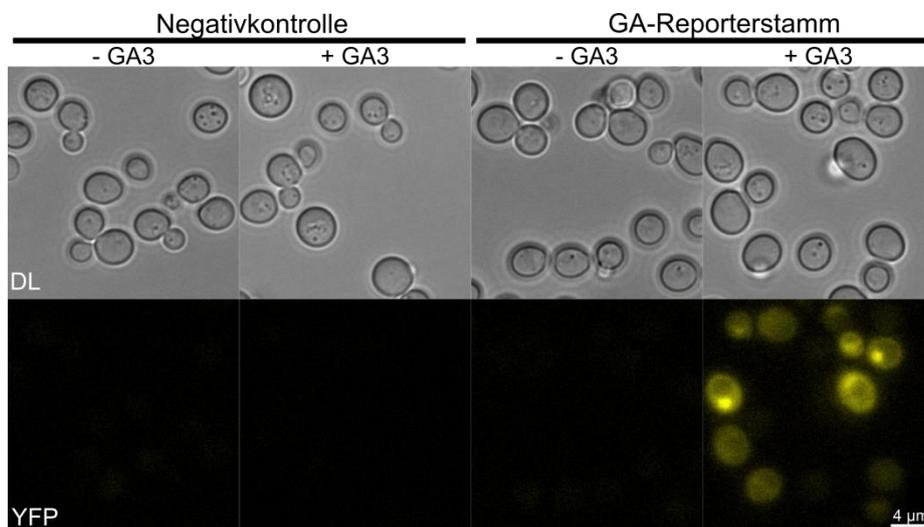


Abbildung 29: Mikroskopieaufnahmen des GA-Reporterstamms. Als Negativkontrolle diente ein Stamm ohne die Reporterkonstrukte aber mit den entsprechenden Leerplasmiden (ESM356 + pRS313: HIS3 + pRS314: TRP1). Der GA-Reporterstamm (ESM356 + pMB1: $P_{ADHI-AtGAI-VN}$ + pMB2: $P_{ADHI-AtGid1A-VC}$) und die Negativkontrolle wurden für 5h entweder mit oder ohne 10^{-3} M GA3 in LFM inkubiert.

Um die Lokalisierung des Reporters genauer zu untersuchen und zu überprüfen, ob dieser tatsächlich im Zellkern akkumulierte, wurde der Reporter in einem Stamm mit mScarlett-markierten Histonen exprimiert. Dies führt zu einer roten Fluoreszenz im gesamten Zellkern, wodurch dieser sichtbar wird und eine mögliche Co-Lokalisierung beobachtbar ist. Es konnte

mittels Mikroskopie-Aufnahmen überprüft werden ob das YFP-Signal des Reporters und das RFP-Signal der Histone sich am gleichen Ort befindet. Hierfür wurden beide Signale detektiert und anschließend die entsprechenden Kanäle verschmolzen (Abb. 30A).

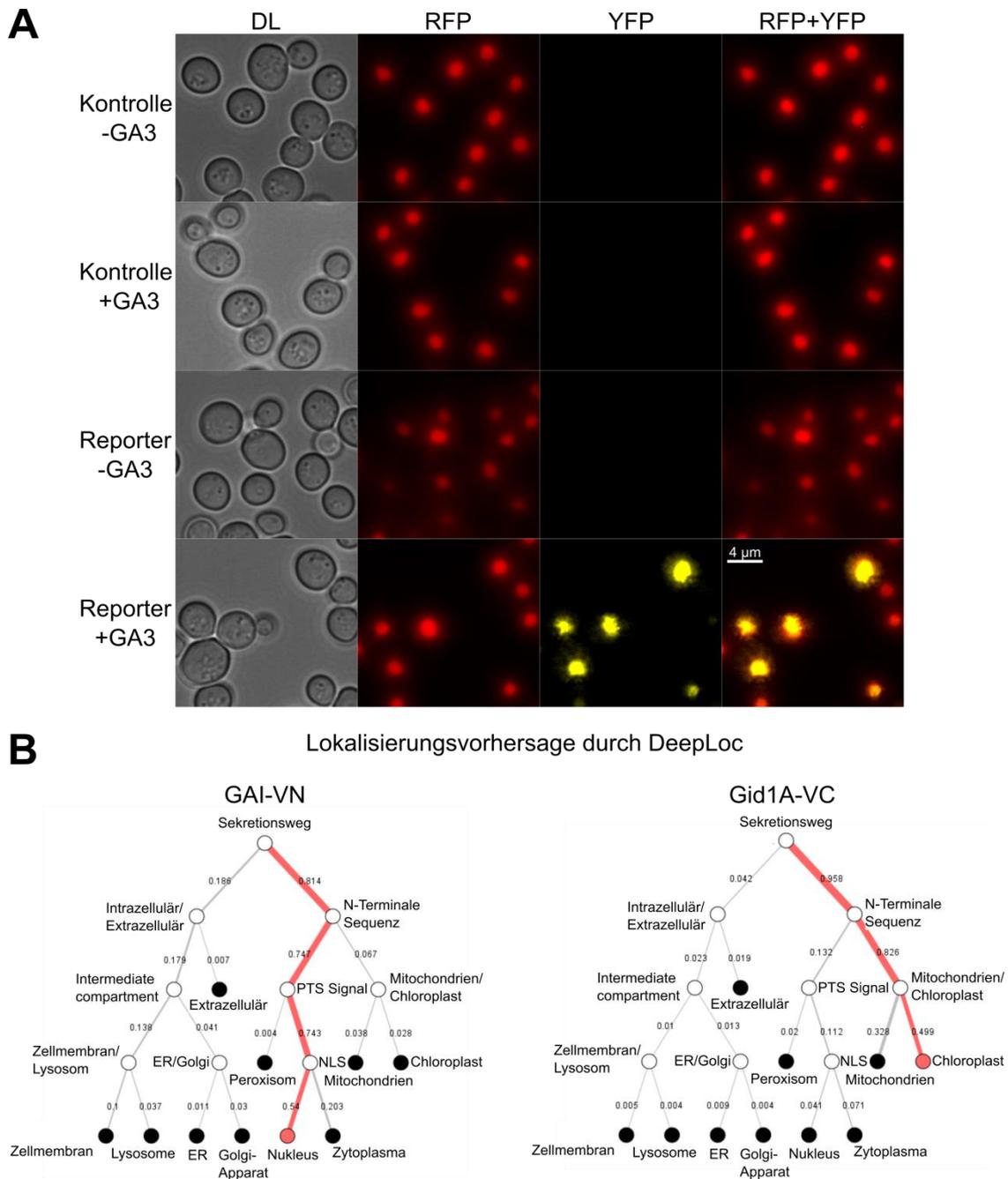


Abbildung 30: Lokalisierungsüberprüfung des GA-Reporters GAVR. A: Kolokalisierung des GA-Reporters und RFP-markierten Histonen. Um zu überprüfen ob der Reporter im Zellkern lokalisiert wurde dieser in einem Stamm mit RFP markierten Histonen (YDS534 + pMB1 + pMB2) exprimiert. Als Kontrolle diente der gleiche Stamm ohne die Reporterstrukture, aber mit den entsprechenden Leerplasmiden (yDS534 + pRS313 + pRS314). Beide Stämme wurden mit und ohne 10^{-3} M GA3 im LFM für 24h inkubiert. Es wurden die Lokalisierung des Reporters (YFP) und die mit mScarlett (RFP)-markierten Histone im Mikroskop verfolgt. **B:** Lokalisierungsvorhersage der Reporterkomponenten durch DeepLoc. Diese bioinformatische Analyse durch DeepLoc prognostiziert eine Lokalisierung von GAI-VN im Zellkern und von Gid1A-VC in den Mitochondrien / Chloroplasten. Da *S. cerevisiae*-Zellen keine Chloroplasten besitzt, ist eine Lokalisierung im Zytoplasma oder Zellkern wahrscheinlich.

Die RFP-markierten Histone führten zu einem kreisrunden Signal, welches einen Teil der Zelle einnahm. Zu einer ähnlichen räumlichen Verteilung führten die YFP markierten Proteine. Durch das Zusammenführen der beiden Fluoreszenzkanäle konnte bestätigt werden, dass das Reportersignal im Zellkern akkumuliert.

Eine Lokalisierungsvorhersage durch DeepLoc prognostizierte eine Lokalisierung von *AtGAI-VN* im Zellkern und für *AtGid1A-VC* in den Mitochondrien/Chloroplasten (Abb. 30B). Da *S. cerevisiae*-Zellen keine Chloroplasten besitzen, ist eine Lokalisierung im Zytoplasma oder Zellkern wahrscheinlich. Die Vorhersagen durch DeepLoc für *AtGAI-VN* passen sehr gut zu den Mikroskopie-Aufnahmen, da auch hier eine Lokalisierung im Zellkern beobachtet werden konnte.

2.4.2 Charakterisierung eines Gibberellinsäurereporterextrakts

Es wurde getestet ob die Sensitivität des Reporters durch einen Zellaufschluss erhöht werden kann. Dadurch liegen der Reporter und die Gibberellinsäure, welche nicht erst in die Zelle diffundieren muss, gelöst im Puffer vor. Hierfür wurde der Reporterstamm mit und ohne die Zugabe von unterschiedlichen GA3-Konzentrationen angezogen, die Zellen aufgeschlossen und das Lysat in einem Puffer (Lyselösung) aufgenommen. Dieses wurde anschließend mittels Fluorimeter gemessen (Abb. 31A). Das Verhalten des Reporterextraktes glich stark den zuvor erhaltenen *in vivo* Ergebnissen (Abb. 28C). Eine erhöhte Sensitivität konnte nicht beobachtet werden.

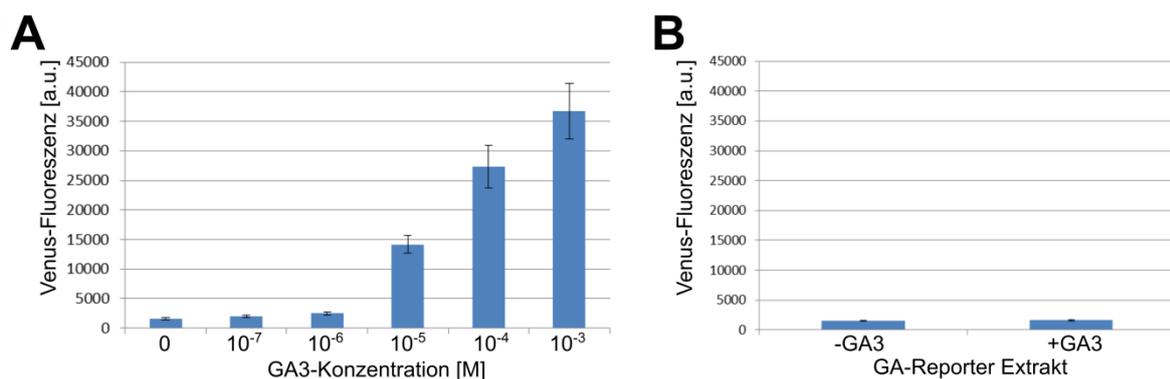


Abbildung 31: Charakterisierung eines GA-Reporter Extraktes. **A:** Aufschluss der Zellen aus Abbildung 28C und Quantifizierung der YFP-Fluoreszenz in Lyselösung. Die Reporterzellen wurden im Medium mit den angegebenen GA3-Konzentrationen für 5h angezogen und anschließend aufgeschlossen. Das Zelllysat wurde für ca. 1h auf RT inkubiert. Daraufhin folgte eine Quantifizierung der Venus-Fluoreszenz mittels Fluorimeter. Dargestellt sind 4 unabhängige Messungen und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. **B:** Die Reporterzellen wurden ohne Zugabe von GA3 angezogen und wie in A beschrieben behandelt. Zum Zelllysat wurden 10⁻³M GA3 zugegeben und danach erfolgte eine Inkubation für ca. 1h bei RT. Anschließend folgte die Quantifizierung der Venus-Fluoreszenz mittels Fluorimeter. Dargestellt sind 4 unabhängige Messungen, der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dar.

Es folgten Untersuchungen, ob der Reporter auch nach der Zellyse in dem verwendeten Puffer auf Gibberellinsäure reagieren kann. Dafür wurde der Reporterstamm ohne GA3-Zugabe angezogen und erst nach dem Aufschluss GA3 hinzugegeben. Die Quantifizierung des YFP-Signals erfolgte mittels Fluorimeter. Es konnten keine Fluoreszenzunterschiede zwischen dem Reporterextrakt mit und ohne GA3 bestimmt werden (Abb. 31B).

2.4.3 Anwendung des Gibberellinsäurereporters in einem GA4 produzierenden *S. cerevisiae* Stamm

Der zuvor charakterisierte GA-Reporter kam in einem *S. cerevisiae*-Stamm zum Einsatz, welcher alle nötigen Gene für die Produktion von GA4 exprimiert. Die Herstellung dieses Stammes wurde in Zusammenarbeit mit Johannes Scheffer durchgeführt. Dafür mussten alle benötigten Gene für die heterologe GA4-Produktion in einen ESM356 WT implementiert werden. Lediglich die Expression von 2 Genen (*AtKO*, *PsKAO*) erfolgte plasmidkodiert (pJS4, pJS24), während der Rest mittels CRISPR/Cas in das Hefegenom erfolgreich integriert wurde. Die für diesen Biosyntheseweg benötigten Enzyme stammten aus 3 unterschiedlichen Organismen: *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum* und *Cucurbita maxima*. Dieser zweigt sich aus dem Mevalonat-Syntheseweg an der gleichen Stelle wie der β -Carotin-Biosyntheseweg ab (Abb. 32A). Für die Herstellung dieses Stammes wurden im Rahmen dieser Arbeit 4 der 8 benötigten Gene integriert. Die Implementation der restlichen 4 Gene und das Zusammenführen der benötigten Integrationen führte Johannes Scheffer durch.

Um die Expression der heterologen Enzyme detektieren zu können wurden diese mit YFP fusioniert. Dies führte bereits zu einer starken Fluoreszenz. Bei Messung einer erhöhten Fluoreszenz kann von einer Assemblierung des Reporters und damit der Anwesenheit von GA4 ausgegangen werden. Rückschlüsse auf produzierte GA4-Mengen waren dadurch jedoch nicht möglich.

Für die Charakterisierung des Stammes wurde dieser mit den Reporter-Konstrukten oder mit den entsprechenden Leerplasmiden transformiert und im Durchflusszytometer untersucht. Hierbei konnte eine deutlich erhöhte YFP-Fluoreszenz in den GA4-produzierenden Zellen mit Reporter gemessen werden (Abb. 32B). Dies spricht für eine Reaktion des Reporters und einer erfolgreichen GA4-Produktion.

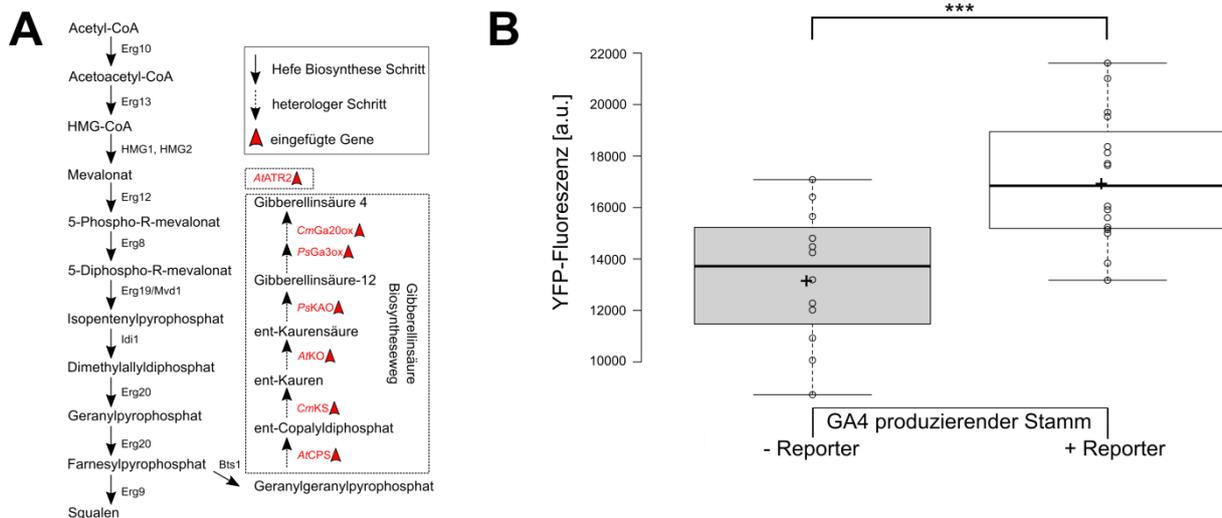


Abbildung 32: Charakterisierung des GA4 produzierenden *S. cerevisiae* Stammes mittels Durchflusszytometrie. **A:** Schematische Darstellung des implementierten heterologen GA4-Biosynthesewegs. Dieser zweigt sich aus dem Mevalonat-Biosyntheseweg ab. Als Schlüsselintermediat wird FPP bzw. GGPP verwendet und durch 6 enzymatische Reaktionen schließlich zu GA4 umgewandelt. Die hierfür benötigten heterologen Enzyme wurden mittels CRISPR/Cas9 in das Hefegenom integriert. Lediglich 2 Enzyme (*AtKO* + *PsKAO*) wurden plasmidbasiert exprimiert. Alle Gibberellinsäure-Biosynthesewegenzyme trugen einen YFP-Tag, wodurch die Expression verfolgt werden konnte. Dieser Stamm wurde in Zusammenarbeit mit Johannes Scheffer hergestellt (*yJS12* + *pJS4* + *pJS24*). **B:** Quantifizierung der GA-Reporter-Antwort in einem GA4-produzierenden Hefestammes mittels Durchflusszytometrie. Der GA4 produzierende Stamm (*yJS12* + *pJS4* + *pJS24*) wurde zusätzlich mit den GA-Reporterkonstrukten (*pMB1* und *pMB2*) oder mit den entsprechenden Leerplasmiden (*pRS313* und *pRS314*) transformiert. Diese Stämme wurden für 3h Stunden in LFM angezogen und anschließend im Durchflusszytometer vermessen. Aufgrund der YFP-Markierungen an den Gibberellinsäure-Biosynthesewegenzymen wurde im Stamm ohne Reporter eine starke Fluoreszenz im YFP-Kanal beobachtet. Die zusätzlich entstehende Venus-Fluoreszenz des Reporters führte zu einer erhöhten Gesamtfluoreszenz. Dargestellt sind immer mindestens 12 unabhängige Messungen. Das Kreuz zeigt den Mittelwert an. Der Strich in den Boxen gibt den Median wieder. Die beobachteten Unterschiede erwiesen sich als äußerst signifikant (***) ($p < 0,001$).

Um die Reaktion des Reporters nochmal genauer in dem GA4-produzierenden Stamm zu untersuchen wurden Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen erstellt und das YFP-Signal quantifiziert (Abb. 33). Dabei konnte keine Fluoreszenz in Zellen mit dem Reporter ohne den GA4-Biosyntheseweg beobachtet werden. Die GA4-produzierenden *S. cerevisiae*-Zellen ohne den Reporter zeigten wie erwartet eine deutliche YFP Fluoreszenz, die von den die YFP-makierten heterologen Enzymen stammt (Abb. 33A). Eine Expression des GA-Reporters in diesem Stamm führte zu einer erhöhten Signalstärke.

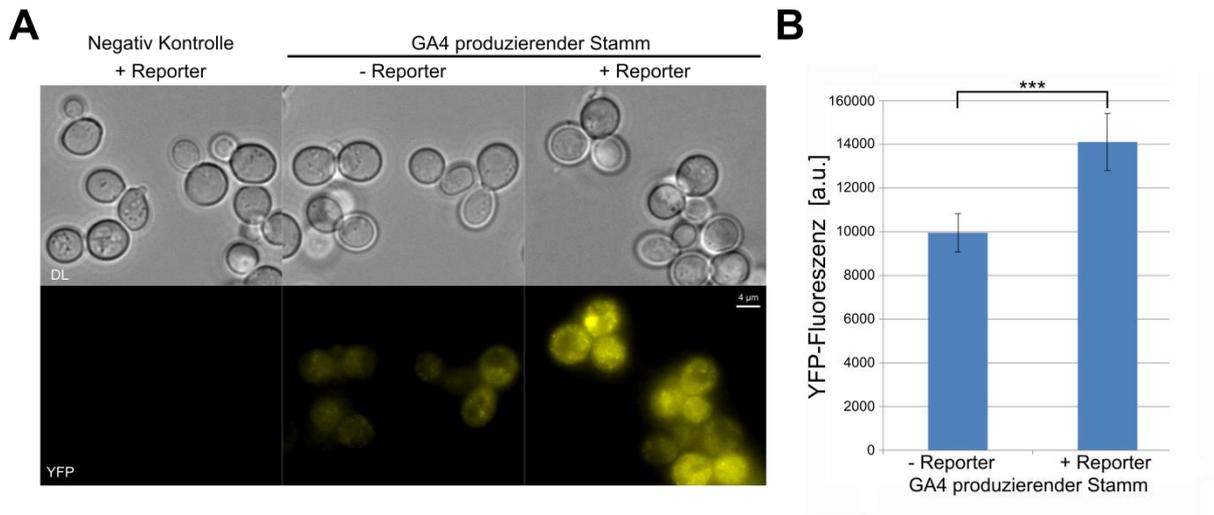


Abbildung 33: Mikroskopieaufnahmen des GA4 produzierenden *S. cerevisiae* Stammes. Der GA4-produzierende Stamm (yJS12 + pJS4 + pJS24) wurde zusätzlich mit dem GA-Reporterkonstrukten (pMB1 und pMB2) oder mit den entsprechenden Leerplasmiden (pRS313 und pRS314) transformiert. Diese Stämme wurden für 24h Stunden in LFM angezogen und anschließend Bilder mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops aufgenommen. Als Negativkontrolle diente ein ESM356-Wildtyp mit pMB1 und pMB2. **A:** Beispielhafte Mikroskopiebilder. Dargestellt sind ein Durchlichtbild und der YFP-Kanal. **B:** Quantifizierung der Mikroskopieaufnahmen. Die aufgenommenen Bilder wurden mittels ImageJ quantifiziert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Die beobachteten Unterschiede erwiesen sich als äußerst signifikant (***)= $p < 0,001$).

Zusätzlich trat eine YFP-Akkumulation im Zellkern auf; solche YFP-Signale waren in dem Stamm ohne Reporter nicht beobachtbar. Die Quantifizierung der Mikroskopiebilder zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen dem GA4-produzierenden Stamm mit und ohne Reporter. Hier wurde eine ca. 40% höhere Fluoreszenz in den Zellen mit dem Reporter erhalten. Dieses Ergebnis stützt zusätzlich eine erfolgreiche Produktion von GA4 in *S. cerevisiae* (Abb. 33B).

3 Diskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Anwendbarkeit der optogenetischen Module psd³, psTF, SOMCo, AuLOV^{CA}, bPAC und AuPAC für „Metabolic Engineering“ in *Saccharomyces cerevisiae* untersucht werden. Es wurde fehlende, für die Biotechnologie relevante Charakterisierungen durchgeführt. Zum einen sollte die tatsächliche erhaltene Proteinmenge eines Reporters, welcher durch die proteinstabilisierenden Module kontrolliert wird, mit der des gut untersuchten *ADHI*-Promotors verglichen und zum anderen die Lichtsensibilität dieser Module genau bestimmt werden. Dies ist für die Anwendung in der Biotechnologie von großem Interesse. Insbesondere zweites, da hier trotz einer Produktion im großen Maßstab und einer hohen optischen Dichte eine Aktivierung der verwendeten Module gewährleistet sein muss. Ein weiteres Bauteil, welches weiter untersucht wurde, war das unter Blaulicht stabilisierende AuLOV-Modul. Zuvor erfolgte eine Beobachtung von diesem Schaltverhalten immer nur im *steady state* und nie über einen bestimmten Zeitraum. Diese Information ist für zukünftige Anwendungen, die in einer kürzeren Kultivierungszeit stattfinden sollen, wichtig. Die auf diesem Modul basierende Adenylylcyclase AuPAC und die bereits in *S. cerevisiae* etablierte bPAC wurden zusätzlich untersucht. Hierbei war insbesondere das Wachstum im flüssigen Medium von großem Interesse. Es wurde nach der größten phänotypischen Veränderung in diesem Kontext gescreent und anschließend von dem vielversprechendsten Konstrukt (P_{CYCI}-bPAC) der Einfluss auf die PKA-Aktivität gezeigt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit galt es die zuvor charakterisierten Module im Kontext von „Metabolic Engineering“ einzusetzen. Als Ziel dienten unter anderem hefeeigene Gene, deren Expression in anderen Publikationen durch herkömmliche Modifikationen herabreguliert wurden. Mit den verwendeten optogenetischen Modulen sollte gezeigt werden, dass diese eine einfachere Schaltung erlauben und zu ähnlich reduzierten Proteinlevel führen wie die publizierten Modifikationen (Verwaal et al. 2007; Yan et al. 2012; Brochado et al. 2010; Peng et al. 2017). In einem späteren Abschnitt werden diese genauer beschrieben. Zusätzlich wurde der Einfluss der PKA-Aktivität auf die Produktion von heterologen Metaboliten in *S. cerevisiae* untersucht. Hierbei konnte erstmals gezeigt werden, dass eine reduzierte PKA-Aktivität eine erhöhte Produktion ermöglicht. Diese reduzierte Aktivität konnte durch die blaulichtregulierte Adenylylcyclase und durch eine modifizierte Cyr1-Variante (Cyr1-psd²) hervorgerufen werden.

Außerdem erfolgte eine Verbesserung der Ausbeute der β -Carotin-, Betulinsäure- und Cordycepin-produzierenden *S. cerevisiae*-Stämme mit Hilfe der zuvor charakterisierten

optogenetischen Module. Dies spricht für die vielseitige Anwendbarkeit dieser Bausteine im Kontext von „*Metabolic Engineering*“ und ebnet den Weg für zukünftige Anwendungen in diesem Gebiet.

Als drittes sollte ein „Proof-of-Principle“ *S. cerevisiae* Stamm hergestellt werden, der das Pflanzenwachstumshormon GA4 heterolog herstellt. Dabei handelt es sich um den ersten *S. cerevisiae*-Stamm mit dieser Fähigkeit. Die Untersuchung der Produktion dieser Zellen ermöglichte ein selbst-entwickelter *in vivo* Reporter. Hierfür wurde das Prinzip eines Protein-fragment Complementation Assays (PCA) und die GA-abhängige Interaktion von *AtGAI* und *AtGid1A* ausgenutzt. Dieser Reporter wurde zunächst genau charakterisiert und anschließend in dem GA4-produzierenden Stamm erfolgreich zum Nachweis der GA4-Produktion eingesetzt.

3.1 Charakterisierung der verwendeten Module

3.1.1 Entwicklung und Charakterisierung eines ultrasensitiven Schalters

Die Aktivitätskontrolle von Protein auf Ebene der Transkription oder durch induzierte Proteolyse ist eine weitverbreitete Technik. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete *psd³*-Modul hat, im Vergleich zu anderen optogenetischen Degradationswerkzeugen, einen deutlich höheren Schalfaktor (Hasenjäger et al. 2019b; Usherenko et al. 2014; Renicke et al. 2013). Dieser entsteht insbesondere durch eine sehr niedrige Halbwertszeit in Blaulicht und der dadurch einhergehende niedrigen Proteinmenge. Optogenetische Module leiden jedoch oft unter einer deutlichen Aktivität in Dunkelheit. Dadurch wird die Dunkel/Blaulicht-Schaltung verringert. Durch eine Regulation der Proteinlevel an mehreren Schaltstellen wird dieses Problem gelöst. Durch die Kombination einer Transkriptionskontrolle und des *psd³*-Moduls konnten im nicht-induzierten Zustand hohe Proteinlevel erreicht werden, während nach der Induktion nur nahezu Hintergrundmengen beobachtet wurden. Für diese Untersuchung wurden der synthetische Doxycyclin-abhängige Promotor und der *psTF* verwendet. Diese Module zur Transkriptionskontrolle verglich man mit dem bereits gut charakterisiertem *ADHI*-Promotor (Sun et al. 2012; Xiong et al. 2018). Dadurch konnte ein Eindruck auf die tatsächlich hergestellte Proteinmenge erhalten werden. Dies erlaubt eine leichtere Anwendung der beschriebenen Systeme auf andere Fragestellungen, da nicht lediglich nur der Schalfaktor als Charakteristikum ausgemessen wurde.

Durch die Kombination des modifizierten tet-Off-Systems mit dem *psd³*-Modul entstand eine Kontrollmöglichkeit auf mehreren Regulationsebenen durch zwei unterschiedliche Induktoren. In Dunkelheit und ohne Doxycyclin werden hier ähnlich hohe

Substratproteinmengen (RFP-psd³) erreicht wie bei einer Kontrolle durch den *ADHI*-Promotor. Da es sich hierbei um einen starken Promotor handelt (Xiong et al. 2018), zeigt dies auch eine vergleichsweise starke Transkriptionsaktivierung des verwendeten tet-Off-Reportersystems im uninduzierten Zustand an. Durch die Zugabe von Doxycyclin kommt es zur Bindung dieses durch das tTA-Protein, welches daraufhin seine Konformation verändert. Diese Reaktion führt zu einer Dissoziation des Transkriptionsfaktors von der DNA, wodurch eine weitere Transkription unterbunden wird (Orth et al. 1998). Durch die Induktion mit Blaulicht kommt es zu einer Aktivierung der beiden psd³-Module, welche sich an dem Substratprotein und dem tTA-Protein befinden. Die Kombination aus Blaulicht und Doxycyclin führt zu einer drastischen Reduzierung der Proteinmengen. Das duale System erwies sich durch die Messungen als sehr vielversprechend. Diese Art der dualen Proteinkontrolle führt im induzierten Zustand durch beide Induktoren zu sehr geringen Proteinmengen und ohne Induktion indizieren die erhaltenen Ergebnisse eine relativ starke Transkriptionsaktivierung.

Durch die Immunodetektion des Reporters konnte im Vergleich zur Durchflusszytometermessung bei dem *ADHI*-Konstrukt eine deutlich höhere RFP-Menge in Blaulicht beobachtet werden. Dies lässt sich durch die Maturierungszeit des verwendeten Fluoreszenzproteins mCherry erklären. Die eindeutig detektierbaren Proteine im Westernblot sind dadurch zum Zeitpunkt der Durchflusszytometermessung wegen eines nicht maturierten Reporters unsichtbar.

Aufgrund dieser neuen Daten lassen sich leichter Anwendungen auch in anderen nah verwandten Hefen oder bei anderen Fragestellungen finden, da nun die Proteinlevel mit einem bereits gut charakterisierten Promotor verglichen wurden. Diese Art von System ermöglicht eine gestaffelte Zellantwort, indem zum Beispiel die Zellen mit Blaulicht bestrahlt werden bevor es zur Zugabe von Doxycyclin kommt. Diese Stafflung erweitert das Anwendungsgebiet indem je nach Bedarf eine starke oder geringe Beeinflussung der Proteinverfügbarkeit stattfindet (Hasenjäger et al. 2019b). Für solch ein duales System wäre es jedoch von großem Interesse, die teure Induktion mittels Doxycyclin durch eine günstigere Variante auszutauschen. Diese müsste mit dem psd³-Modul kompatibel sein. Um zusätzlich die Vorteile einer optogenetischen Regulation nicht zu verlieren wäre eine Transkriptionskontrolle durch Rotlicht ideal. Hierfür müsste die bereits für das psd-Modul installierte Beleuchtungsvorrichtung lediglich um Rotlicht erweitert werden. In der Literatur lassen sich auch bereits vielversprechende Beispiele eines rotlichtgesteuerten

Transkriptionsfaktormoduls finden. Diese basieren auf dem Photorezeptor Phytochrom und konnten bereits in der Bäckerhefe etabliert werden (Shimizu-Sato et al. 2002).

Für viele Anwendungsgebiete, wie zum Beispiel für mehrere „*Metabolic Engineering*“-Ansätze wird nur eine starke Regulation durch einen Induktor benötigt, weshalb der ebenfalls blaulichregulierte Transkriptionsfaktor (psTF) weiter untersucht wurde. Dieser basiert auf der blaulichsensitiven Interaktion zwischen der AsLOV2, welche mit einer TetR-DNA-Bindedomäne fusioniert, und dem synthetischen Peptid Zdk1, welches mit einer VP16-Aktivator-domäne und einem psd³-Modul fusioniert wurde. Das Zusammenspiel der AsLOV2 und dem Zdk1 verwendete man ursprünglich in einem optogenetischen Lokalisierungssystem (Wang et al. 2016). In Dunkelheit kann die Wechselbeziehung der beiden Komponenten stattfinden und der funktionsfähige Transkriptionsfaktor die Transkription initiieren. Durch Blaulichtbestrahlung wird diese Interaktion gestört und der TF dissoziiert. Durch dieses Modul konnte erfolgreich mittels Blaulichtbestrahlung die Proteinmenge reduziert werden (Hasenjäger et al. 2019b). Für viele Anwendungen sind nicht nur ausschließlich die Schaltraten von großem Interesse, sondern auch die tatsächlich erhaltenen Proteinmengen. Um hier einen Eindruck zu erhalten erfolgte daher ein Vergleich mit *ADHI*-Promotor. Hierbei konnte für den psTF, abhängig von der Messmethode, in Dunkelheit eine 2,5-5-fach niedrigere Proteinmenge detektiert werden. Dies spricht noch immer für eine relativ hohe Aktivität, da dieses System nicht für die Überproduktion von heterologen Biosynthesewegen eingesetzt werden soll, sondern um, zum Beispiel, konkurrierende Synthesen zu inhibieren. Aufgrund der daraus resultierenden ausreichenden Transkription in Dunkelheit und der erfolgreichen Aktivitätsverringering in Blaulicht eignete sich dieses System sehr gut, um es mit dem psd³-Modul zu kombinieren. Eine Aktivierung des psTF führte zu einer Reduzierung des Protein-Levels auf ca. 20% der Menge in Dunkelheit. Dies indizierte, dass die Interaktion zwischen der AsLOV und dem Zdk1 auch noch unter Blaulicht in einem geringen Maße oder immer wieder für kurze Zeit stattfinden kann. Eine Möglichkeit dies zu verbessern wäre das Einführen von Photozyklus-Mutationen, die entweder diesen verlangsamen oder ein schnelleres Durchlaufen ermöglichen. Mögliche Mutationen wurden bereits in der Publikation des ursprünglichen LOVTrap-Systems beschrieben (Wang et al. 2016). Die Mutationen I427T, V416T und I427V führen zu einem schnelleren Photozyklus der AsLOV2, während die Mutationen V416I und V416L diesen deutlich verlangsamen. Diese Mutationen beeinflussen vermutlich aufgrund ihrer Lokalisation in dem β -Faltblatt in der Nähe der Chromophorbindetasche die Bindung des Chromophors (Halavaty und Moffat 2007). Diese beschriebenen Mutationen konnten im Rahmen einer Masterarbeit von Juri Goenrich bereits

eingefügt und untersucht werden. Er konnte zeigen, dass ein schnellerer Photozyklus zu einem niedrigeren und ein langsamerer Photozyklus zu einem höheren Schaltfaktor führt (Goenrich 2019). Dadurch kann, abhängig von der benötigten Proteinmenge, mit diesem System eine gewünschte Transkriptionsfaktoraktivität eingestellt werden. Zusätzlich führten diese Mutationen zu einer drastischen Veränderung der Lichtsensitivität, wodurch die Applikation in der Biotechnologie und für „*Metabolic Engineering*“ deutlich erleichtert wird.

Die Kombination des psTF und des psd³-Moduls ermöglicht es an mehreren Stellen durch einen Induktor Einfluss auf die Zielproteinmenge zu nehmen. Blaulicht führte bei diesem System zu einer starken Proteinmengenreduzierung. Es konnten Dunkel/Blaulicht-Schaltfaktoren von über 300 erreicht werden (Hasenjäger et al. 2019b). Dies zeigt die Effizienz der Proteinmengenregulation, wenn die Transkription und die Stabilität gleichzeitig beeinflusst werden. Die Kombination der zwei optogenetischen Module implementierte eine synergistische, optogenetische und mehrstufige Kontrolle (SOMCo). Im Vergleich zum *ADHI*-Promotor wurde die Produktion des RFP-psd³ Reporters durch die Kontrolle des psTF auf 50% (Durchflusszytometer) bzw. 36% (Immunoblotting) reduziert. Durch die Induktion mit Blaulicht lassen sich kaum noch Proteine nachweisen und die Signale verschwinden im Hintergrund. Optogenetische Module leiden oft unter einer geringen Aktivität in Dunkelheit, welche aufgrund des Reaktionsmechanismus der natürlich vorkommenden Photorezeptoren hervorgerufen wird. Dadurch wird die Dunkelheit/Blaulicht-Schaltung negativ beeinflusst, wodurch die Anwendungsmöglichkeiten von mehreren optogenetischen Modulen limitiert sind. Möglichkeiten dies zu umgehen sind, das Signal des Moduls in einem Netzwerk einzubauen wodurch ein natürlicher lichtsensitiver Schaltkreis imitiert wird (Grusch et al. 2014; Jansen et al. 2015), oder einen sich selbst verstärkenden Zwischenschritt zu implementieren, wodurch die Hintergrundaktivität des Photorezeptors wenig Auswirkungen hat und das eigentliche Signal erst in einem weiteren Schritt amplifiziert wird (Ohlendorf et al. 2012; Klapper et al. 2016). Leider sind diese Lösungsansätze nicht immer realisierbar. Mit SOMCo konnte das Problem durch eine einfache lineare Schaltung aus zwei lichtregulierten Schritten umgangen werden. Dies führte zu deutlich höheren Schaltfaktoren und verbesserte das gesamte Verhalten der einzelnen Module. Ähnliche Ansätze sollten auch für andere optogenetische Module verfügbar sein. So könnte zum Beispiel auch eine optogenetische Transkriptionskontrolle bei lichtkontrollierter Lokalisation zu vielversprechenden Ergebnissen führen.

Eine Dosis-Wirkungs-Kurve stellte insbesondere für das SOMCo-Modul fest, dass bereits sehr geringe Lichtintensitäten ausreichen um das System komplett zu aktivieren. Durch eine

folgende Anpassung der experimentellen Daten an die Hill-Funktion konnte eine ultrasensitive Antwort für den psTF und das SOMCo-Modul gezeigt werden. Ultrasensitive Schalter besitzen meistens die Fähigkeit ein kontinuierliches Signal, in diesem Fall Blaulicht, in eine Art „alles oder nichts“ Antwort umzuwandeln. Der dafür benötigte Schwellenwert ist äußerst gering (Zhang et al. 2013). Dieser liegt bei beiden Modulen unter $5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Blaulicht. Die Ultrasensitivität dieser beiden Module sollte die Anwendbarkeit in anderen Organismen, aber auch für strengere Regulationen, deutlich erleichtern. Dadurch können insbesondere bei längeren Belichtungszeiten schädliche Nebenwirkungen der Blaulichtbestrahlung vermieden werden. Zusätzlich wird dadurch eine leichtere Implementation dieser Module in der Biotechnologie ermöglicht. Gerade in größeren Produktionsvolumen und hohen optischen Dichten könnte es sein, dass nicht genug Licht die gesamte Kultur erreicht. Aus diesem Grund bevorzugten bereits publizierte optogenetische Applikationen in der Biotechnologie eine Produktionsphase in Dunkelheit und einer lichtinduzierten Wachstumsphase (Zhao et al. 2018). Sie vermuteten, dass eine ausreichende Lichtinduktion unter den beschriebenen Bedingungen, mit den von ihnen verwendeten Modulen, nicht gewährleistet werden kann. SOMCo hingegen benötigt nur geringste Mengen Blaulicht um das Modul vollständig zu aktivieren, wodurch eine lichtinduzierte Produktion ermöglicht wird.

Auch wenn das aktuelle Modul viele dieser Anwendungen bereits erlaubt ist es weiterhin von großem Interesse, den optogenetischen „Werkzeugkasten“ mit Variationen dieser Module zu füllen. Um eine optimale Regulierung zu ermöglichen gibt es leider nicht den „einen“ optimalen Baustein, der für jede Fragestellung eingesetzt werden kann. Wie bereits zuvor beschrieben führte das Einfügen von Photozyklus-Mutationen in der AsLOV der psTF zu einer deutlichen Verbesserung (Goenrich 2019; Wang et al. 2016). Ähnliche Änderungen könnten auch das psd³- und das SOMCo-Modul noch lichtsensitiver aufbauen. Insbesondere letzteres könnte dadurch deutlich mehr Variabilität zulassen, da es aus mehreren Photorezeptoren besteht. Jeder einzelne würde durch Mutationen beeinflusst werden, wodurch es bei jeder Modifikation zu einem anderen Verhalten des gesamten Systems käme. Zusätzlich könnte ein Austausch des Kernpromotors durch stärkeren, aber auch schwächeren, weitere Versionen entstehen lassen. Dies wird deutlich wenn zum Beispiel native schwächer exprimierte Gene durch Blaulicht inhibiert werden, aber in Dunkelheit Wildtyp-ähnlich vorliegen sollen. Ein Beispiel hierfür wäre *erg9*. Die Anwendung von SOMCo an diesem Ziel zeigt, dass noch weitere Modul-Variationen benötigt werden. Die natürlich schwache Expression von Erg9 konnte durch SOMCo nicht imitiert werden. Auf der anderen Seite

zeigten die Anwendungstests an Gdh1 bereits eine nahezu optimale Regulation. Es wird deutlich, dass für die meisten Anwendungsziele noch individuelle Modul-Anpassungen vorgenommen werden müssen. Durch den Vergleich mit dem *ADHI*-Promotor lässt sich in Zukunft leichter prognostizieren ob die aktuelle Version des Moduls die gewünschte Regulation in *S. cerevisiae* hervorruft.

Die während dieser Arbeit entwickelten und charakterisierten optogenetischen Module haben einen großen Teil von möglichen Anwendungsgebieten erschlossen und gleichzeitig weitere Möglichkeiten für Optimierungen und Erweiterungen aufgezeigt. Es ist deutlich, dass die Fortführung der Modulentwicklung auch in den kommenden Jahren von großem wissenschaftlichem Interesse ist. Durch weitergehende Veränderungen und Anpassungen werden neue Einsatzgebiete erschlossen.

3.1.2 Ein optogenetisches Werkzeug für induzierte Proteinstabilität

Die AuLOV-Domäne aus dem *Phaeodactylum tricornutum* Aureochrome 1a führt in der Bäckerhefe zu einer Destabilisierung in Dunkelheit und einer Stabilisierung in Blaulicht. Diese induzierte Proteolyse ist Ubiquitinabhängig und wird unter Blaulicht inhibiert. Durch das Einführen der V254M- und V349W-Mutationen konnte dieses Schaltverhalten verstärkt werden. Diese Mutationen befinden sich in der Dimerisierungsoberfläche der AuLOV-Domäne, wodurch diese im Vergleich zum Wildtyp durch einen hydrophoben Kern im Dunkelzustand dominiert wird (Hepp et al. 2020). Da es sich hierbei um ein neues optogenetisches Modul handelt war es von großem Interesse, die Degradations- bzw. Stabilisierungskinetik genauer zu untersuchen. Jedoch konnte hierdurch kein signifikanter Unterschied in der Proteinstabilität in Zellen unter Blaulichtbestrahlung im Vergleich zu Zellen in Dunkelheit beobachtet werden. Ein Umschalten von Blaulicht zu Dunkelheit führte auch nur zu sehr langsamen Veränderungen in der Proteinmenge. Diese Ergebnisse lassen sich vermutlich durch die sehr langsame Dunkelreversion der AuLOV^{V254M V349W}-Mutante erklären. Insbesondere in dem Cycloheximid-chase sind die meisten Proteine während der Experimentdauer noch in ihrer lichtinduzierten Konformation. Zuvor konnten Wiedergewinnungszeiten des Dunkelzustandes von über 5000s bei den verwendeten Konstrukten bestimmt werden (Hepp et al. 2020), während das Experiment lediglich 60min abdeckt. Diese Dunkelzustandsreversion von mehreren Stunden erlaubt es daher nicht dieses Modul einzusetzen, wenn ein dynamisches Schalten benötigt wird. Bei einem Transfer der Zellen von Blaulicht in Dunkelheit müssen daher längere Schaltzeiten berücksichtigt werden. Ein anderes optogenetisches Modul mit demselben Ziel wurde im letzten Jahr für

Säugerzellen entwickelt. Hierbei handelt es sich um das „*generalizable light-modulated protein stabilization system*“ GLIMPSe (Mondal et al. 2019). Es nutzt ein permanent aktives Degron, welches über eine LOV-Domäne an das Zielprotein fusioniert wird. Eine TEV- (*tobacco etch virus*)-Protease Erkennungssequenz wurde in die J α -Helix eingebaut, so dass diese unter Blaulicht freigesetzt wird. Dieses Signal führt gleichzeitig zum Export der zuvor im Zellkern lokalisierten TEV-Protease in das Zytoplasma. Für diesen Transport ist das lichtinduzierte-Nukleus-Export-System LEXY zum Einsatz gekommen (Niopek et al. 2016). Einen Transfer von GLIMPSe in andere Modelorganismen ist durchaus denkbar. Für dieses System müssten jedoch im Vergleich zur AuLOV weitere Komponenten, wie das TEV-Protease-LEXY Konstrukt, zuerst in den Zellen etabliert werden. Es handelt sich daher um ein deutlich komplexeres System. Die AuLOVV^{254M V349W} wurde bereits in *S. cerevisiae* verwendet um eine synergistische und optogenetische Kontrolle einer Adenylylcyclasenaktivität zu realisieren. Hierfür erfolgte eine Fusion der blaulichtsensitiven Adenylylcyclase bPAC mit der AuLOVV^{254M V349W}-Mutante. Das daraus entstandene Konstrukt, genannt AuPAC, konnte erfolgreich verwendet werden um unterschiedliche zelluläre Prozesse, wie zum Beispiel die Lokalisierung von Msn2, zu kontrollieren (Hepp et al. 2020). In Zusammenarbeit mit Sebastian Hepp wurden während dieser Arbeit die Auswirkungen unterschiedlicher bPAC-Konstrukte auf das Wachstumsverhalten von *S. cerevisiae*-Zellen in flüssigem Medium untersucht. Durch die Deletion des Gens der endogenen Adenylylcyclase Cyr1 konnte cAMP in diesen Zellen nur noch durch die bPACs synthetisiert werden. In anderen auf bPAC-basierten Untersuchungen in *S. cerevisiae* wurde stattdessen das dominant-negative RAS2 Allel (RAS2^{S23N}) exprimiert, um die Cyr1 Aktivität zu verringern (Stewart-Ornstein et al. 2017). Dieser Ansatz erlaubt es jedoch nicht die PKA-Aktivität ausschließlich über Blaulicht zu regulieren. In Dunkelheit konnte bei allen Konstrukten kein bis kaum Wachstum beobachtet werden. Dies lässt sich durch den PKA-abhängigen Übergang in eine Ruhephase erklären und indiziert eine reduzierte PKA-Aktivität (Virgilio 2012). Durch eine Induktion der bPACs mit geringen Blaulichtintensitäten konnten offensichtlich physiologisch relevante cAMP-Level erreicht werden, da dabei ein Wachstum ermöglicht wurde. Hohe Blaulichtintensitäten führten jedoch wieder zu einer reduzierten Zellproliferation. Dies lässt sich durch die PKA-abhängige Inhibition des „Anaphase-promoting-complex“ erklären (Irniger et al. 2000; Bolte et al. 2003). Den größten phänotypischen Unterschied bei diesem Experiment konnte durch das P_{CYCI}-bPAC-Konstrukt hervorgerufen werden, weshalb dies weiter untersucht wurde. Eine Jod-Dampf-Färbung zeigte, dass bei Zellen mit diesem Konstrukt in Dunkelheit eine erhöhte Menge an

Speicherkohlenhydraten vorliegt. Eine verringerte PKA-Aktivität führt bekanntermaßen zu diesem Effekt (François und Parrou 2001). Eine Cyr1-psd^{AS}-Mutante ermöglichte eine Imitierung dieses Effektes. Dies spricht ebenfalls für eine erfolgreiche Verringerung der PKA-Aktivität. Dabei fiel jedoch die dunklere Färbung weniger intensiv aus. Eine Erklärung dafür ist, dass Cyr1-psd^{AS} in Blaulicht lediglich reduziert wird. Diese Reduktion erlaubt es mehr cAMP zu produzieren als die bPAC-exprimierenden Stämme. Von Sophia Hasenjäger konnte für dieses Konstrukt eine Dunkel/Blaulicht-Schaltrate von lediglich ~2 für die Cyr1-psd^{AS} beobachtet werden (persönliche Kommunikation, Sophia Hasenjäger, Anhang 3). Für genauere Aussagen wäre jedoch ein Vergleich mit den Wildtyp-Proteinmengen nötig. Dafür müsste die Cyr1 zum Beispiel auch mit einem myc-Tag fusioniert werden um eine Westernblot-Analyse zu ermöglichen. Vor einer biotechnologischen Verwendung von Cyr1-psd^{AS} sollte diese Charakterisierung zum besseren Verständnis der Anwendungsmöglichkeiten durchgeführt werden.

3.2 „Metabolic Engineering“ mit lichtgesteuerten Modulen

3.2.1 Lichtregulierte Proteinstabilisierung von biotechnologierelevanten Beispielen

In den letzten Jahren sind zum ersten Mal genetische Module in diesem Kontext zum Einsatz gekommen. Es wurde sich jedoch zum Beispiel von Zhao et al. für eine dunkelinduzierte Produktionsphase und einer blaulichtinduzierten Wachstumsphase entschieden, da vermutet wurde, dass die verwendeten Genexpressionssysteme nicht lichtsensitiv genug sind (Zhao et al. 2018).

Während dieser Arbeit wurde ein ultrasensitives optogenetisches Modul für die Proteinstabilitätskontrolle hergestellt um eine Blaulichtaktivierung auch bei Produktionen im Industriemaßstab zu gewährleisten. Dieses Modul und Variationen des psd-Moduls wurden an biotechnologisch relevanten Zielen eingesetzt. Hierbei handelte sich um Ziele, deren Aktivität zuvor in verschiedenen Publikationen durch andere Module reduziert wurden (Brochado et al. 2010; Peng et al. 2017) wie zum Beispiel Erg9, welches mit dem C-terminus des G1 Cyclin Proteins (*CLN2^{PEST}*) fusioniert wurde. Die dadurch entstandene Destabilisierung von Erg9 führte zu einer Reduzierung der Proteinmengen auf ca. 30% des WT-Level (Peng et al. 2017). Diese Regulation sollten durch eine optogenetische Schaltung erreicht werden.

Erg9 ist Teil des Sterol-Biosynthesewegs in der Bäckerhefe und ist für die Synthese von Squalen verantwortlich (Jennings et al. 1991). Für mehrere Produktionen wird die Aktivität von Erg9 inhibiert um den metabolischen Fluss in einen an dieser Stelle abzweigenden heterologen Syntheseweg zu lenken (Asadollahi et al. 2008; Yan et al. 2012). Es lokalisiert

im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien (Huh et al. 2003). Aufgrund der „positive-inside“-Regel wird durch die Histidin- und Arginin-Reste am C-terminus indiziert, dass dieser Teil des Transmembranproteins im Zytosol vorliegt (Krogh et al. 2001; Goder et al. 2004). Die Fusion von Erg9 mit einem photosensitiven Degron führte zu einem ähnlichen Ergebnis wie die publizierte PEST-tag Variante. In Dunkelheit wurden die Proteinmengen bereits auf unter 30% reduziert. Die Induktion mit Blaulicht reduzierte diese Menge nur noch leicht. Die leichte blaulichtvermittelte Destabilisierung konnte jedoch auch bei dem WT Erg9 (Erg9-myc3) beobachtet werden, weshalb davon auszugehen ist, dass diese nicht durch die Aktivität des psd-Moduls hervorgerufen wird. Jene Daten indizieren, dass hier lichtunabhängig Erg9 deutlich durch die psd-Fusion destabilisiert wird. Es entstand eine reduzierte Proteinmengen, jedoch ohne eine optogenetische Kontrolle.

Ein anderes Bild lieferte die Regulation mit SOMCo. Hier entstand eine vernünftige Dunkel/Blaulicht-Schaltung. In Dunkelheit führte die Kontrolle durch den psTF zu einer erhöhten Erg9-Menge im Vergleich zum WT. Diese konnte jedoch durch eine Induktion mit Blaulicht auf unter 30% gebracht werden und erreichte dadurch ähnlich niedrige Protein-Level wie in dem bereits publizierten Ansatz ohne Lichtkontrolle (Peng et al. 2017). Im Vergleich zu den einzelnen psd-Modulen ermöglichte die zusätzliche Transkriptionskontrolle des SOMCo-Moduls eine Regulation der Erg9-Menge. In Zukunft wäre es von großem Interesse weitere Variationen dieses Moduls zu generieren. Ein schwächerer Kernpromotor könnte hier zum Beispiel die gesamten Proteinmengen noch weiter reduzieren, wodurch in Dunkelheit WT-ähnliche Mengen erreicht werden und es in Blaulicht fast schon zu einer konditionalen Null-Mutante kommen könnte. Zusätzlich muss noch geklärt werden, wieso durch die Fusion mit psd-Modulen und Erg9 die Lichtregulierbarkeit verloren geht.

Für andere ER-assoziierte Degradation (ERAD) regulierte Proteine konnte eine Schaltung beobachtet und nachgewiesen werden, dass der Abbau dieser durch ERAD-C vermittelt wird (Scheffer et al. 2019). ERAD-C reguliert ebenfalls die Degradation von Erg9-psd¹ (persönliche Mitteilung von Johannes Scheffer, Anhang 1). Warum jedoch die Blaulichtregulation verloren geht ist aktuell noch unklar. Eine Kinetik-Messung und ein Cycloheximid-chase würden zeigen, ob unter Blaulicht der Abbau schneller abläuft. Es ist davon auszugehen, dass die Maskierung des Degrons bei dieser Fusion nicht ausreichend ist. Mutationen in der J α -Helix könnten zu einer verstärkten Maskierung führen. Eine Alternative wäre das Verwenden einer anderen Degradationssequenz, die eine leichtere Maskierung erlaubt. Denkbar wäre auch eine photosensitive Modulvariante, die für ERAD regulierte Proteine optimiert wird. Ansonsten wäre eine Regulation ausschließlich durch eine

optogenetische Transkriptionskontrolle denkbar, da diese vielversprechend ist. Hierfür sollte zunächst Erg9 ohne ein psd-Modul unter Kontrolle des psTF gebracht werden um einen Eindruck zu erhalten, wie sich diese Kontrolle auswirkt. Die Photozyklus-Varianten von (Goenrich 2019) könnten zu einer so starken Transkriptionssinhibition führen, dass ein Nullmutanten-ähnlicher Zustand hervorgerufen wird.

Als leichteres Ziel für optogenetische Regulation erwies sich Gdh1. Hierbei handelt es sich um ein durch *in silico* Modellierung prognostiziertes Knock-out Ziel um die Vanillinproduktion in *S. cerevisiae* zu erhöhen. Dies führte zu einer 1,5-fach höheren Produktion, da in Kombination mit einer Überexpression von Gdh2 der hohe NADPH-Verbrauch des Glutamat-Synthesewegs unterbunden werden konnte (Brochado et al. 2010). Durch optogenetische Kontrolle sollte daher einen Knock-out ähnlicher Zustand von Gdh1 möglich sein, um somit diesen hohen NADPH-Verbrauch zu verringern. Die zuvor charakterisierten Module konnten an Reportern bereits zeigen, dass theoretisch eine so starke Regulation möglich ist.

Gdh1 eignete sich als Beispiel für ein biotechnologierelevantes Ziel, da es im Vergleich zu Erg9 nicht essenziell ist und im Zytoplasma vorliegt, wodurch es deutlich leichter abgebaut werden kann (Giaever et al. 2002). Durch die Kontrolle von SOMCo lagen in Dunkelheit WT-vergleichbare Gdh1-Mengen vor, welche durch Blaulichtbestrahlung zu einem nahezu Knock-out ähnlichem Zustand führten. SOMCo konnte erfolgreich der bereits im off-State geringen psd³ Aktivität entgegenwirken und im on-State den gewünschten Effekt der Proteinmengenregulation verstärken. Für dieses Ziel erwies sich daher dieses Modul bereits als ideal. In Zukunft wäre es daher von Interesse NADPH-abhängige Produktionen, wie zum Beispiel die heterologe Vanillinproduktion in *S. cerevisiae*, mit dieser optogenetischen Regulation zu ergänzen. Im Vergleich zu einem klassischen Knock-out erlaubt die SOMCo-Gdh1-Modifikation ein wildtypähnliches Verhalten der Zellen in Dunkelheit. Diese Art der konditionalen Null-Mutante erlaubt eine Zwei-Phasen-Produktion. Zunächst könnten die gewählten Zellfabriken zu einer bestimmten OD nahezu ungestört wachsen, bis eine Produktionsphase durch Blaulicht induziert wird. Um dies zu verwirklichen wäre es hierfür wichtig, zunächst die erhöhte NADPH-Verfügbarkeit zum Beispiel durch Massenspektrometrie nachzuweisen. Zusätzlich müsste die benötigte Überexpression von Gdh2 implementiert werden. Hierfür könnte auch eine optogenetische Kontrolle zum Beispiel durch den synthetischen Cry2-Cib1 Transkriptionsfaktor gewählt werden um dies gleichzeitig mit der Gdh1-Destabilisierung zu induzieren. Die erfolgreiche lichtregulierte Destabilisierung

von Gdh1 indiziert, dass SOMCo für bestimmte biotechnologierelevante Ziele ideal ist und dient daher als sehr gutes Beispiel für weitere Applikationen in diesem Gebiet.

3.2.2 Optimierung eines β -Carotin produzierenden *S. cerevisiae* Stammes

Um einen β -Carotin-produzierenden Hefestamm zu verbessern implementierte man die zuvor beschriebenen Erg9-Regulationen in diesen. Es wurde sich für diese heterologe Synthese entschieden, da sie genau wie der GA4-Biosyntheseweg aus dem Mevalonatweg abzweigt und aufgrund der Eigenfluoreszenz des Produktes eine leichte Detektion möglich ist. In viele Publikationen sind Optimierungen für solch einen Stamm beschrieben. Hauptsächlich beziehen sich diese auf die Überproduktion des verkürzten HMG1 (tHMG1) und der Aktivitätsverringern von Erg9 (Yan et al. 2012; Verwaal et al. 2007; Hong und Nielsen 2012). Diese Inhibition wurde durch optogenetische Kontrolle im Rahmen dieser durchgeführt.

β -Carotin erwies sich leider nicht als das optimale Modelprodukt, da es offensichtlich auf die Blaulichtbestrahlung reagierte und eine Art Bleichungs-Effekt zu beobachten war (Anhang 5). Aus diesem Grund kann unter Blaulichtbedingungen keine Aussage über die Folgen der Aktivitätsverringern gemacht werden. In Dunkelheit konnte wie erwartet eine erhöhte Produktion durch die Überexpression von tHMG1 beobachtet werden. Interessanterweise führte auch SOMCo in Dunkelheit zu einer erhöhten Biosynthese von β -Carotin. Unter diesen Bedingungen wird durch dieses Modul eine erhöhte Erg9-Menge im Vergleich zum WT hervorgerufen. Durch eine metabolische Fluss-Prognose basierend auf Transkriptomdaten, Biomassecharakterisierungen und „graph distance profiles“ von *S. cerevisiae* wurde diese Korrelation vorhergesagt (persönliche Kommunikation, Dr. Zahra Razaghi Moghadam und Filipp Bezold). Diese mathematische Modellierung wurde von Kollaborationspartnern durchgeführt und die Methode „GRADIS“ (*graph distance profil*) publiziert (Razaghi-Moghadam und Nikoloski 2020). Diese Prognose beinhaltet unter anderem eine Überexpression von Erg9 und soll zu einer erhöhten FPP-Verfügbarkeit führen (Anhang 2). Erklären ließe sich dies dadurch, dass obwohl FPP durch Erg9 verbraucht wird, auch gleichzeitig der metabolische Fluss zusätzlich in den Mevalonat-Syntheseweg gezogen wird. In weiteren Experimenten müsste diese Theorie überprüft werden. Hierfür wären Analytik-Daten der Zwischenprodukte hilfreich, um den Einfluss der einzelnen Modifikationen genauer betrachten zu können. Zusätzlich wäre es von großem Interesse die optogenetische Regulation von Erg9 an einem blaulichtunabhängigen Modelprodukt zu untersuchen. Denkbar wären auch Analysen der produzierten Squalen-Mengen um zu überprüfen, ob diese sich wie

erwartet durch die Inhibition verringern. Optimierungen von SOMCo sollten, wie bereits beschrieben, zusätzlich zu einer verbesserten Schaltung führen. Die Überexpression von tHMG1 und dem heterologen Syntheseweg sollte in folgenden Experimenten auch unter optogenetische Kontrolle gebracht werden um ein wildtypähnliches Verhalten in Dunkelheit zu garantieren und eine Produktionsphase ausschließlich in Blaulicht zu erhalten. Dies würde auch eine leichtere Implementierung von toxischen Produktionswegen ermöglichen. Zielführend könnte auch bereits das Anziehen der β -Carotin-produzierenden-Stämme unter einer verringerten Blaulichtintensität sein, um den negativen bleichungsähnlichen Effekt zu verringern. Da insbesondere SOMCo bereits bei deutlich geringeren Intensitäten vollständig aktiviert wird sollte dadurch dennoch eine ausreichende Inhibierung gewährleistet sein. Denkbar wäre auch das Verwenden der beschriebenen Photozyklus-Mutanten. Durch eine Verlangsamung des Photozyklus könnten auch leichter Lichtintervalle anstelle einer durchgehenden Bestrahlung zum Einsatz kommen, da deutlich geringere Lichtintensitäten benötigt und die verwendeten Module länger aktiv bleiben würden. In diesem Jahr wurde auch eine andere optogenetische Regulation der β -Carotin-Synthese in *S. cerevisiae*-Zellen publiziert. Verwendet wurde eine lichtinduzierte Cre-Rekombinase (LiCre) (Duplus-Bottin et al. 2020). Durch Blaulichtinduktion kommt es hierbei zu einer gezielten Rekombination, wodurch der heterologe Syntheseweg und tHMG1 exprimiert und gleichzeitig *erg9* deletiert wird. Vorteil dieses Vorgehens ist, dass lediglich eine kurze Induktion mit Blaulicht benötigt wird und es somit nicht zu einer negativen Beeinflussung von β -Carotin kommt. Für eine Anwendung in der Biotechnologie ist dieses System jedoch noch nicht ausgereift, da lediglich 23% der Zellen durch Lichtbestrahlung aktiviert werden konnten (Duplus-Bottin et al. 2020). Dieses Problem entsteht durch eine Regulation durch SOMCo nicht. Es handelt sich jedoch durchaus um ein schönes „*proof-of-concept*“ Beispiel und könnte durch weitere Verbesserungen in Zukunft in der Biotechnologie angewendet werden. Dieses aktuelle Beispiel zeigt jedoch das große Interesse, optogenetische Regulatoren in diesem Gebiet anzuwenden.

Ein weiteres optogenetisches Modul, welches in dieser Arbeit zum ersten Mal im Kontext von „*Metabolic Engineering*“ eingesetzt wurde, ist bPAC. Es wurden erstmalig die Auswirkungen der Proteinkinase A Aktivität auf die Produktion verschiedener heterologen Metaboliten untersucht. Die hierfür aufgenommene Dosis-Wirkungs-Kurve der β -Carotin Fluoreszenz eines bPAC kontrollierten *S. cerevisiae*-Stamms führte zu ersten Indizien, dass eine reduzierte PKA-Aktivität eine erhöhte Produktion ermöglicht. Eine Extraktion des Produkts und eine anschließende Quantifizierung mittels HPLC konnte dies bestätigen. Die Regulation der

bPAC konnte nicht durch eine Cyr1-psd^{AS}-Modifikation imitiert werden. Hierbei ist jedoch im Vergleich zu dem bPAC-Stamm eine Inkubation in Blaulicht nötig um eine reduzierte PKA-Aktivität hervorzurufen, welche sich negativ auf die β -Carotin-Menge auswirkt. Dieses Problem kann in dem bPAC-Stamm umgangen werden, da hier die Reduktion in Dunkelheit hervorgerufen wird. Die Inhibition der PKA ist auch stärker, da diese Bedingungen zu einem deutlichen Wachstumsdefizit führten (Hepp et al. 2020). Es konnten im Rahmen dieser Arbeit ca. 6,5mg β -Carotin pro mg Trockenhefe produziert werden. In anderen Publikationen produzierte ein Hefestamm, der *tHMG1* und *crtI* überexprimiert, 5,8mg pro mg Trockenhefe (Verwaal et al. 2007). Der Vergleich der Ergebnisse untermauert nochmal wie stark die Biosynthese erhöht werden konnte. Während dieser Arbeit konnte eine Methode zur Erhöhung der Biosynthese eines Produktes aus dem Mevalonatweg entdeckt werden. Eine Kombination der beiden Optimierungsansätze könnte die Produktion synergistisch steigern. Dies würde zu höherer Ausbeute führen.

Die Proteinkinase A ist ein globaler Regulator und kontrolliert die Ribosom-Biogenese, das Wachstum, die Stressantwort, den Zellzyklus und Teile des Metabolismus (Virgilio 2012). Ohne weitere Untersuchungen kann keine genaue Aussage getroffen werden welcher manipulierte Prozess sich letzten Endes positiv auf die β -Carotin-Produktion auswirkt. Reduktion der PKA-Aktivität führt insgesamt zu einer Erhöhung der β -Carotin-Synthese. Für weitere Untersuchungen wäre es spannend die einzelnen Prozesse zu manipulieren. Hierfür könnten „phosphorylation sites“ mutiert oder die Aktivität des gesamten Ziels durch eine lichtregulierte Destabilisierung kontrolliert werden. Durch Analysen des gesamten Proteoms könnte die Phosphorylierung einzelner Proteine im bPAC-Stamm bestimmt werden. Diese könnten dann mit einem WT verglichen werden um weitere Indizien zu erhalten. Ein mögliches Beispiel für dieses Vorgehen wäre zu überprüfen, ob die Glycogenspeicherung sich positiv auf die Produktion heterologer Biosynthesewege auswirkt. Wie in dieser Arbeit bereits nachgewiesen wird die Speicherung von Kohlenhydraten in dem bPAC-Stamm in Dunkelheit gefördert. Die PKA aktiviert die Glycogen-Phosphorylase Gph1 und inhibiert die Glycogen-Synthase Gsy2 (Hardy und Roach 1993; Lin et al. 1996; Wingender-Drissen und Becker 1983). Normalerweise kommt es unter Nährstoffmangel zu einer Akkumulierung dieses Kohlenhydrates (Wilson et al. 2002). Es dient unter diesen Hungerbedingungen als Energiedepot. Eine reduzierte PKA-Aktivität simuliert daher auch einen Nährstoffmangel. In diesem Zustand sind nur noch die nötigsten Prozesse aktiv. Heterologe Synthesewege sind von dieser Regulation vermutlich nicht betroffen, weshalb mehr Energie für diese zur Verfügung stehen könnte. Es wäre möglich in Folgeuntersuchungen diesen Effekt zu

imitieren, indem Gph1 lichtabhängig destabilisiert und Gsy2 lichtinduziert hergestellt wird. Durch diese Modifikationen könnte ebenfalls eine erhöhte Glycogenspeicherung erzielt und dadurch untersucht werden, ob sich diese positiv auf eine heterologe Produktion auswirkt. Durch Auftrennungen des gesamten PKA-regulierten Netzwerkes mit dieser beschriebenen Vorgehensweise wäre es möglich genauer zu klären, welcher PKA-regulierte Prozess sich positiv auf die Produktion von β -Carotin auswirkt.

Da es sich um eine so große Auswirkung handelt stellt sich die Frage, ob lediglich die Produktion von β -Carotin positiv beeinflusst wird. Es könnte sein, dass die Zellen in eine Art Produktionsphase übergehen, in der alle metabolischen Prozesse erhöhte Mengen an Energie zur Verfügung haben. Dieses überschüssige Potenzial würde normalerweise für das Wachstum benötigt werden, welches durch die reduzierte Aktivität jedoch inhibiert wird (Chen und Powers 2006; Jorgensen et al. 2004). Zusätzlich sind die Stressantwort-Gene nicht weiter inhibiert, wodurch die Zellen weiterhin überleben können (Virgilio 2012).

Es ist durchaus denkbar, dass diese Modifikation sich auch auf andere heterologe Produktion positiv auswirkt, da die Regulationen produktspezifisch sind. Ohne weitere Untersuchungen handelt es sich dabei um eine Hypothese, die es in Zukunft zu überprüfen gilt.

3.2.3 Optimierung eines Cordycepin produzierenden *S. cerevisiae* Stammes

Die lichtabhängige Cyr1-Degradation durch eine Fusion mit dem psd^{AS}-Modul konnte angewendet werden um die Produktion von Cordycepin leicht zu erhöhen. Im Vergleich zu β -Carotin reagiert dieses Produkt nicht auf Blaulicht und eignete sich daher besser für eine optogenetische Regulation mit einem psd-Modul. Eine Induktion des Cry2-Cib1-Expressionssystems führte wie erwartet zu einer deutlich erhöhten Produktion. Da es sich hierbei um ein toxisches Molekül handelt, ist eine Regulation dieser Art notwendig (Qin et al. 2019). Durch die lichtabhängige Kontrolle der hefenativen Adenylylcyclase konnte die Produktion leicht erhöht werden. Dies stimmt mit der Hypothese überein, dass eine reduzierte PKA-Aktivität nicht nur spezifisch eine erhöhte Synthese von β -Carotin ermöglicht, sondern auch auf andere heterologe Biosynthesen diesen positiven Effekt ausüben kann. Optogenetische Degradationsmodule mit einem höheren Schalfaktor, die zu geringeren Proteinmengen unter Blaulicht führen, könnten zu einer Verstärkung dieses Effekts führen. Denkbar wäre eine Implementation von SOMCo. Hierfür sollte jedoch ein Vergleich mit den Wildtyp-Cyr1-Mengen vorgenommen werden, da ansonsten bereits im off-State die Aktivität stark beeinflusst werden könnte.

Möglich wäre auch eine lichtabhängige Überexpression von Pde1 und Pde2. Diese Phosphodiesterasen führen zusätzlich zu einer Reduktion der cAMP-Mengen in den Zellen, wodurch auch die PKA-Aktivität reduziert wird (Namy et al. 2002; Ma et al. 1999; Butcher et al. 2006). Eine Implementation des lichtaktivierten Cordycepin-Biosyntheseweges in den bPAC-kontrollierten Stamm ist leider nicht möglich, da hier Blaulicht die PKA-Aktivität erhöht.

Aktuell ist der Ausgangsmetabolit für die Cordycepin-Biosynthese und dessen Ursprung in *S. cerevisiae* noch nicht genau geklärt. Es wird vermutet, dass es sich um 3'AMP handelt, welches über die Autophagie der RNA generiert werden kann (Xia et al. 2017; Huang et al. 2015; Welter und Elazar 2015). Sollte es sich um 3'AMP handeln könnte eine Implementierung des Gens *CNS3* eine aktive Herstellung des Ausgangsmetabolits ermöglichen. *Cns3* katalysiert die Reaktion von Adenosin zu 3'AMP unter ATP Verbrauch und konnte erfolgreich in *S. cerevisiae* exprimiert werden (Xia et al. 2017). Durch eine lichtabhängige Expression dieses Gens sollte es zu einer Verringerung von zuvor bestehenden Engpässen kommen. Dies würde vermutlich weitere Stammoptimierungen erleichtern und man kann eine deutlich stärkere Auswirkung von weiteren Stammveränderungen erwarten. Alternativ könnte die Nukleotidase *PHO8* deletiert werden. *Pho8* wandelt in der Vakuole 3'-NMPs in Nukleoside um. Eine Deletion von *pho8* führt zu einer Akkumulation von 3'-AMP und einer Diffusion von diesem aus der Vakuole in das Zytoplasma (Huang et al. 2015). Diese erhöhte Konzentration des Schlüsselintermediates des Cordycepin-Biosyntheseweges könnte zu einer erhöhten Ausbeute führen. Eine lichtkontrollierte Destabilisierung von *Pho8* wäre eine Möglichkeit um 3'-AMP lichtreguliert anreichern zu können.

Eine reduzierte PKA-Aktivität führt zu einer erhöhten Autophagie (Stephan et al. 2009). Diese Erhöhung entsteht, da normalerweise die PKA die für diesen Prozess benötigten Proteine *Atg1* und *Atg13* inhibiert. Da in *S. cerevisiae*-Zellen das vermeintliche Schlüsselintermediat 3'AMP lediglich durch die Degradation der RNA entsteht (Huang et al. 2015), wäre dies eine zusätzliche Erklärung warum die lichtabhängige Degradation von *Cyr1* eine erhöhte Cordycepinproduktion hervorruft. Diese verringert die PKA-Aktivität und ermöglicht dadurch eine erhöhte Autophagie, welche die 3'AMP-Verfügbarkeit anheben könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte die „phosphorylation site“ von *Atg1* und *Atg13* so mutiert werden, dass sie nicht mehr von der PKA erkannt wird. Dies sollte ebenfalls zu einer erhöhten Aktivität der beiden Enzyme führen und dadurch die Cordycepinproduktion erhöhen. Alternativ könnten direkt die 3'AMP-Mengen in den Zellen quantifiziert und mit einem WT verglichen werden.

Weitere Verbesserungen dieser Art der Biosynthese sind von großem wirtschaftlichem und wissenschaftlichem Interesse. Cordycepin wird zurzeit durch die Extraktion aus *Cordyceps militaris* gewonnen. Weitere „*Metabolic Engineering*“-Zyklen dieser Synthese in *S. cerevisiae* könnten eine deutlich billigere und einfachere Produktion ermöglichen. Die Realisierung dieses Vorhabens rückt dank dieser Charakterisierungen einen Stück näher.

3.2.4 Optimierung eines Betulinsäure produzierenden Hefestammes

Während dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Betulinsäure produzierender Stamm optimiert werden. Hierfür wurde die Aktivität des konkurrierenden Ergosterol-Biosynthesewegs durch eine Destabilisierung von Erg7 verringert. Durch metabolische Analysen der einzelnen Intermediate konnte gezeigt werden, dass durch eine Fusion von Erg7 mit einem photosensitiven Degron der metabolische Fluss durch den heterologen Syntheseweg verstärkt wird. Alle Zwischenprodukte, wie Lupeol, Betulin und Betulinaldehyd, wurden in höheren Mengen gefunden als in dem Stamm ohne eine Erg7-Modifikation. Eine eindeutig erhöhte Betulinsäureproduktion blieb hingegen aus. Diese Analysen deckten daher eine Schwachstelle des Syntheseweges auf. Offensichtlich ist die Katalyse von Betulinaldehyd zu Betulinsäure ein potenzieller Flaschenhals, der durch weitere Stammmodifikationen beseitigt werden sollte. Denkbar wäre eine weitere Erhöhung der Anzahl der *CYP/CPS*-Gene um eine effektivere Umwandlung zu ermöglichen. Bioinformatische Analysen könnten mögliche effektivere orthologe Gene offenbaren. Deutlich aufwändiger wären Strukturanalysen der *CYP* und *CPR*, wodurch potenziell mögliche Mutationen aufgedeckt werden könnten, die eine höhere Aktivität ermöglichen. Aktuell erfolgt die Katalyse von Lupeol über zwei weitere Schritte zu Betulinsäure durch diese beiden Enzyme. Denkbar wäre durch Strukturanalysen und anschließender Mutagenese eine Variante der Enzyme zu generieren, die lediglich die Umwandlung von Betulinaldehyd zu Betulinsäure katalysieren. Diese Mutanten ständen dadurch ausschließlich für die zurzeit limitierende Katalyse zur Verfügung und das Problem des potenziellen Flaschenhalses könnte gelöst werden.

Es befand sich noch eine hohe Menge von Squalen in der Kultur. Eine Akkumulierung dieser Art entsteht sobald die Glukose im Medium aufgebraucht ist und die Zellen beginnen Ethanol zu verstoffwechseln (Czarnotta et al. 2017). Sobald Ethanol ebenfalls komplett verbraucht ist und die Zellen in ihre stationäre Phase übergehen reduziert sich diese Akkumulation wieder. Kulturanalysen nach dem Experiment deuteten auf eine nahezu komplette Verstoffwechslung von Ethanol und Glukose durch die *S. cerevisiae*-Zellen hin (persönliche Mitteilung von Filipp Bezold), weshalb es eine andere Ursache für die Akkumulierung von Squalen geben

muss. Naheliegender wäre eine nicht ausreichende Umsetzung von Squalen zu 2,3-Oxidosqualen. Dieser mögliche Flaschenhals könnte durch eine Überexpression von Erg1 entfernt werden. Im aktuellen Setup wird Erg1 durch seinen natürlichen Promotor reguliert. Ein Austausch dieses Promotors durch einen stärkeren könnte bereits zu einer erhöhten Umwandlung von Squalen zu 2,3-Oxidosqualen führen. Diese erhöhte Verfügbarkeit des Schlüsselmetabolits des Betulinsäurebiosyntheseweges könnte eine erhöhte Ausbeute des Endproduktes ermöglichen.

Eine Induktion der psd-Module durch Blaulicht beeinflusste die detektierten Metabolitmengen nicht. Die Modifikation von Erg7 führte belichtungsunabhängig zu einer erhöhten Produktion, wodurch eine bereits starke Destabilisierung in Dunkelheit indiziert wird. Dieses bekannte Problem könnte durch eine zusätzliche Transkriptionskontrolle behoben werden. Wie bereits bei Erg9 beobachtet eignet sich eine Regulation durch SOMCo vermutlich am besten. Ziel wäre es in Dunkelheit vergleichbare Erg7-Mengen wie im Wildtyp zu erhalten. Dadurch könnte die Produktion in zwei Phasen geteilt werden: eine Wachstumsphase und eine Produktionsphase. Zweites könnte durch Blaulicht induziert werden.

Eine blaulichtinduzierte Destabilisierung von CDC48 führte bei der heterologen Produktion von β -Carotin und Cordycepin in *S. cerevisiae* zu einer erhöhten Synthese (persönliche Mitteilung von Johannes Scheffer). Daher ließ sich vermuten, dass durch eine ähnliche Modifikation eine erhöhte Produktion von Betulinsäure hervorgerufen werden kann. Durch die Destabilisierung von CDC48 kommt es lichtinduziert zu einer Arretierung des Zellzyklus (Hasenjäger et al. 2019b). Für die Ergebnisse von Johannes Scheffer wurde CDC48 jedoch durch ein psd³-Modul kontrolliert und nicht, wie während dieser Arbeit, durch psd^{AS}. Zusätzlich erfolgte eine Induktion durch Lichtintervalle anstatt einer durchgehenden Blaulichtbestrahlung. Es ist daher durchaus möglich, dass das erhoffte Ergebnis aufgrund dieser Unterschiede ausblieb.

3.3 Entwicklung und Anwendung eines Gibberelinsäurereporters

Ein weiteres Ziel war es einen „Proof-of-Principle“-Stamm herzustellen, der das Pflanzenwachstumshormon GA4 produziert. Um dieses *in vivo* nachweisen zu können wurde ein Reporter entwickelt, der die GA-abhängige Interaktion von AtGAI und AtGid1A ausnutzt. Durch die Fusion dieser Proteine jeweils mit einer gegengesetzten Split-Venus-Sequenz konnte erfolgreich das YFP-Reportersignal durch Zugabe von GA3 in *S. cerevisiae* Zellen nachgewiesen werden. Eine Analyse der Zellen müsste in Folgeexperimenten noch klären wieviel GA3 wirklich in die Zellen diffundieren konnte. In Säugetierzellen können nur

geringe Mengen diffundieren, da GA3 bei neutralen pH negativ geladen ist (Wilmington und Matouschek 2016). GA3 hat einen pKA-Wert von 4, wodurch indiziert wird, dass es bei einem pH-Wert von 5-9 nahezu komplett als Anion vorliegt (National Center for Biotechnology Information). Da Hefemedien leicht sauer sind sollte GA3 leichter in *S. cerevisiae* Zellen eindringen können als in Säugetierzellen. Diese Mengen reichen aus den Reporter zu aktivieren.

Des Weiteren konnte eine Reportersignal-Akkumulierung eindeutig im Zellkern beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass diese durch eine erhöhte Reporterkonzentration im Zellkern zustande kommt, da *AtGid1* in *Arabidopsis thaliana* als Zellkernrezeptor fungiert (Miyamoto et al. 2012; Murase et al. 2008). Lokalisationsvorhersagen der Reporter-Konstrukte mittels DeepLoc bekräftigen diese Vermutung. Durch eine Fusion von *AtGid1A* und *AtGAI* mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen könnte die Lokalisierung durch Fluoreszenzmikroskopie in folgenden Experimenten genau geklärt werden.

Die Herstellung eines Reporterextraktes erwies sich als nicht zielführend. GAVR ließ sich nach der Extraktion nicht mehr aktivieren. Dieser konnte jedoch in den Zellen vor einer Extraktion aktiviert werden und führte dann nach einem anschließenden Zellaufschluss zu einer Reaktion. Daraus lässt sich schließen, dass die Fluoreszenzproteine zwar noch funktionsfähig sind, aber in dem gewählten Puffer nicht nachträglich maturieren können. Durch ein Screening mehrerer Puffersysteme könnte ein geeigneteres System gefunden werden. Im Vergleich zu dem induzierten Degradationssystem basierend auf einer Gibberellinsäure CID (Wilmington und Matouschek 2016) reagiert GAVR direkt auf in den Zellen vorliegende aktive Gibberellinsäure. Der bereits publizierte *in vivo* Reporter nutzt die gleiche Interaktion zwischen *AtGAI* und *AtGid1A*, aber induziert dadurch die Degradation eines Fluoreszenzproteins. Für dieses System wurde *AtGAI* mit einem mCherry und einer Ubiquitin-ähnlichen Domäne (UbL: ubiquitin-like Domain) fusioniert (Wilmington und Matouschek 2016). Diese Chimäre interagiert mit dem Proteasom durch die UbL-Domäne, wird aber nicht von diesem abgebaut. *AtGid1A* ist mit einem GFP markiert und dient als Substrat. Durch GA3 in der Zelle findet die bereits beschriebene Interaktion statt und *AtGid1A*-GFP wird in die Nähe des Proteasoms gebracht und dadurch abgebaut. UbL-RFP-*AtGAI* wird hierbei nicht abgebaut und recycelt. Dieses System reagierte erfolgreich auf unterschiedliche GA3-Konzentrationen in Säugetierzellen und eignet sich daher für bestimmte Fragestellungen auch als Reporter. Im Vergleich zu dem Aufbau aus dieser Arbeit wird Fluoreszenz durch die Zugabe von GA verringert anstatt erhöht. Dies ist jedoch für die Anwendung in einem Gibberellinsäure-produzierenden Stamm nicht optimal, da durch einen

fehlerhaften Reporter, zum Beispiel durch ein Rekombination-Ereignis, fälschlicherweise von einer stark erhöhten Produktion ausgegangen würde. Des Weiteren ist für diesen publizierten Aufbau die Information nötig, wie viel Fluoreszenz vor der Produktion vorhanden war um vernünftig Rückschlüsse auf produzierte Mengen schließen zu können. Es handelt sich also durchaus um ein spannendes System, welches jedoch für die Anwendung als GA4-Biosynthesereporter nicht sonderlich gut geeignet ist.

Die Interaktion von *AtGAI* und *AtGid1A* reagiert deutlich sensitiver auf GA4 als auf GA3 (Nakajima et al. 2006), weshalb davon ausgegangen wurde, dass der in dieser Arbeit entwickelte Reporter auch geringe Mengen GA4 im „*Proof-of-Principle*“-Stamm detektieren könnte. Dieser Stamm konnte erfolgreich in Zusammenarbeit mit Johannes Scheffer hergestellt werden. Die Expression der integrierten heterologen Gene bestätigten entweder Westernblot- oder Durchflusszytometer-Messungen sowie Proteomanalysen (persönliche Mitteilung Johannes Scheffer und Philipp Bezold). Mit Hilfe des entwickelten Reporters konnte durch Durchflusszytometermessungen und Fluoreszenzmikroskopie eine Reaktion des Reporters detektiert werden. Dies indiziert durch zwei unterschiedliche Methoden eine erfolgreiche GA4 Produktion. Zurzeit gibt es keinen publizierten *S. cerevisiae* Stamm mit dieser Fähigkeit. Die Fluoreszenzmarkierung der GA4-Biosynthesewegenzyme, welche für eine Expressionskontrolle benötigt wurde, ist nicht optimal für den entwickelten Reporter. Für diese Markierung musste sich aufgrund des Ausfallens eines Kooperationspartners kurzfristig entschieden werden. Eine einfache Detektion der heterologen Enzyme hatte Priorität, weshalb dieser Kompromiss eingegangen wurde. Da alle Expressionen erfolgreich nachgewiesen werden konnten wäre es von Interesse, die Gene ohne diesen Fluoreszenz-Tag zu integrieren. Alternativ ist die Expressionskontrolle auch durch eine andere Markierung, wie zum Beispiel durch einen myc-tag, möglich. Es könnte auch die Split-Venus-Sequenzen durch ein anderes geteiltes Fluoreszenzprotein ausgetauscht werden. Ein rotfluoreszierendes Protein würde sich dafür sehr gut eignen (Feng et al. 2017). Durch diesen Austausch müsste sich das Reportersignal nicht mehr von dem YFP-Hintergrund der exprimierten Biosyntheseproteine abheben. Durch diesen *in vivo* Reporter ließen sich sehr einfach die Auswirkungen zukünftiger Produktionsoptimierungen untereinander vergleichen. Ein Hochdurchsatz-Screening (HTS) in 96-Well-Platten wäre realisierbar. Die bereits vielversprechenden optogenetischen Regulationen aus dieser Arbeit sind ein sehr guter Anfang, um einen Stamm mit erhöhter Produktion zu entwickeln. Für Analysen durch Massenspektrometrie ist die Entwicklung eines geeigneten Extraktionsverfahrens nötig. Aufgrund der hohen Löslichkeit von GA4 in Methanol oder Ethylacetat könnten diese als organisches Lösungsmittel

verwendet werden (Wu et al. 2015). Zurzeit gibt es nur etablierte Protokolle für die Extraktion aus Pflanzenzellen (Shengjie Hou et al. 2008). Ob diese auf *S. cerevisiae* Zellen übertragbar sind gilt es zu überprüfen.

3.4 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, optogenetische Module für die Biotechnologie zu entwickeln und ihre Relevanz zu demonstrieren. Da insbesondere die Lichtsensitivität von optogenetischen Modulen nicht ausreichend war um eine Regulationsfähigkeit auch bei höheren optischen Dichten zu gewährleisten, wurde ein ultrasensitiver Schalter entwickelt. Die Kombination aus lichtsensitiver Transkriptionskontrolle und Proteinstabilität führte zu einem synergistischen Verhalten welches die zuvor bestandenen Nachteile dieser Module, wie zum Beispiel eine zu starke Dunkelaktivität, drastisch verringerte. In dieser Arbeit beispielhaft durchgeführten Regulationen der Proteinstabilität von biotechnologisch relevanten Zielen wie Erg9 und Gdh1 wiesen darauf hin, dass das psd-Modul allein nicht ausreichend ist um eine optimale Balance zwischen Dunkelaktivität und blaulichtinduzierter Degradation für jedes Ziel zu erhalten. Durch die beschriebene Kombination aus lichtregulierter Transkription und lichtaktivierten Degradation und dem daraus resultierenden SOMCo-Modul konnte gezeigt werden, dass optogenetische Module für „*Metabolic Engineering*“ geeignet sind. Weitere Variationen, basierend auf dem SOMCo-Modul, werden den optogenetischen Werkzeugkasten deutlich vergrößern, wodurch für viele gewünschte Proteinaktivitätsregulationen ein optimales Regulationswerkzeug verfügbar sein sollte. Dies wird durch das während dieser Arbeit gelegte Fundament ermöglicht. Die aktuell verfügbaren optogenetischen Module führten zu einer erhöhten Produktion von β -Carotin, Betulinsäure und Cordycepin. Dies zeigt die Relevanz von optogenetischen Modulen dieser Art in der Biotechnologie. Zusätzlich wurde zum ersten Mal die positive Auswirkung einer reduzierten PKA-Aktivität auf die Produktion von heterologen Metaboliten in *S. cerevisiae* gezeigt. Diese konnte erfolgreich durch optogenetische Kontrolle hervorgerufen werden und führte zu einer gesteigerten Produktion von β -Carotin und Cordycepin. Diese beiden heterologen Biosynthesewege verwenden unterschiedlichen Ausgangsmetabolite weshalb durchaus anzunehmen ist, dass es sich um eine produktunspezifische Optimierung handelt. Sollte sich dies in Zukunft bestätigen könnte im Rahmen dieser Arbeit eine neue potenzielle Verbesserung für viele weitere bereits in der Industrie etablierte Prozesse identifiziert werden. Es ist noch abschließend zu klären wodurch genau dieser Effekt zustande kommt. Untersuchungen in diese Richtung könnten zu einer Verstärkung des gewünschten Verhaltens führen. Spannend wäre es auch diese Art der Modifikation in anderen in der Biotechnologie verwendeten Organismen zu testen. Aktuell ist

die Optogenetik in der Biotechnologie noch unterrepräsentiert. Aufgrund der Vorteile im Vergleich zu chemischen Induktoren ist es durchaus denkbar, dass die kostengünstigere Regulation durch Licht auch im industriellen Maßstab eingesetzt wird.

Des Weiteren glückte in dieser Arbeit erstmalig eine Etablierung eines GA4-Biosynthesewegs in *S. cerevisiae*. Der entwickelte *in vivo* Reporter GAVR bestätigte eine erfolgreiche Biosynthese. Bis zu einer Produktion von GA4 im großen Maßstab ist es noch ein weiter Weg, aber der erste und sehr wichtige Schritt, die Herstellung eines „Proof-of-Principle“-Stammes, ist im Rahmen dieser Arbeit und dank der guten Zusammenarbeit mit Johannes Scheffer gelungen.

In Zukunft muss nun die genau produzierte Menge bestimmt und die Produktion maximiert werden. Ausgehend von diesem Stamm folgen nun mehrere „*Metabolic Engineering*“-Zyklen. Zu Beginn können die während dieser Arbeit beschriebenen Modifikationen, die eine erhöhte β -Carotin-Produktion ermöglichen, angewandt werden. Sobald die YFP-Markierungen an den heterologen Genen entfernt wurden, lassen sich durch den entwickelten GA-Reporter auch Screens im großen Maßstab durchführen und schnell zielführende Klone isolieren.

Durch diese Forschung konnte der optogenetische Werkzeugkasten um für Biotechnologie relevanten Module erweitert werden. Erste Applikationen bestätigten die Anwendbarkeit und die Vorteile von Licht als Induktor für Prozesse dieser Art. Weitere Optimierungen in diese Richtung ermöglichen es in Zukunft durch lichtgesteuerte Regulatoren ganze Prozesse zu kontrollieren. Und anstelle von teurer Induktion durch die Zugabe von Chemikalien benötigt es nur die Betätigung eines Lichtschalters.

4 Material

4.1 Chemikalien

4.1.1 Nährmedien

Tabelle 2: Verwendete Nährmedien zur Kultivierung von Mikroorganismen

Name	Zusammensetzung
LB (Lysogeny Broth)	1% (w/v) Pepton aus tryptisch verdaulichem Casein 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl
YPD	2% (w/v) Pepton aus tryptisch verdaulichem Casein 1% (w/v) Hefeextrakt 2% (w/v) Glucose
LFM („Low Fluorescence Medium“)	10% (v/v) LFM-Salz-Stammlösung 0,1% (v/v) LFM-Spurenelemente-Stammlösung 0,1% (v/v) LFM-Vitamin-Stammlösung 0,2% (w/v) Aminosäure-Mix 2% (w/v) Glucose
LFM-Salz-Stammlösung	5% (w/v) Ammoniumsulfat 1% (w/v) KH_2PO_4 0,5% (w/v) MgSO_4 0,1% (w/v) NaCl 0,1% (w/v) Ca_2Cl
LFM-Spurenelemente- Stammlösung	0,05% (w/v) H_3BO_4 0,004% (w/v) CuSO_4 0,01% (w/v) KI 0,02% (w/v) FeCl_3 0,04% (w/v) MnSO_4
LFM-Vitamin-Stammlösung	0,0002% (w/v) Biotin 0,04% (w/v) Calcium Pantothenat 0,2% (w/v) Inositol 0,04% (w/v) Niacin 0,02% (w/v) Para-amino Benzoat 0,04% (w/v) Pyridoxin HCl 0,04% (w/v) Thiamin HCl
Aminosäure-Mix	20g aller Standardamino-säuren +/- Uracil, Leucin, Tryptophan und Histidin (je Mix) 2g p-Aminobenzoat 5g Adenin
WM8	10% (v/v) 10x WM8-Salz-Stammlösung 1% (v/v) 100x WM8-Spurenelemente-Stammlösung 1% (v/v) 100x WM8-Vitamin-Stammlösung 0,2% (w/v) Aminosäure-Mix 5% (w/v) Glucose 1% (w/v) Natriumglutamat

10x WM8-Salz-Stammlösung	1% (w/v) KH_2PO_4 0,25% (w/v) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01% (w/v) NaCl 0,01% (w/v) CaCl_2 2,8% (w/v) NH_4Cl
100x WM8-Spurenelemente-Stammlösung	0,01% (w/v) H_3BO_3 0,004% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,003% (w/v) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,001% (w/v) KI 0,035% (w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02% (w/v) $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,005% (w/v) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0625% (w/v) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
100x WM8-Vitamin-Stammlösung	0,0255% (w/v) Biotin 0,51% (w/v) Calcium Pantothenat 0,001% (w/v) Myo-Inositol 0,11% (w/v) Nicotinsäure 0,002% (w/v) p-Aminobenzoesäure 0,26% (w/v) Pyridoxin HCl 0,11% (w/v) Thiamin HCl

4.1.2 Puffer und Lösungen

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt. Diese wurden, soweit nicht anders vermerkt, in deioniertem Wasser angesetzt.

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
DNA-Probenpuffer (6 x)	10mM Tris-HCl pH 7,6 0.03% (w/v) Bromphenolblau 0.03% (w/v) Xylencyanol FF 0.15% (w/v) Orange G 60% (v/v) Glycerin 60mM EDTA
ECL-Lösung	100mM Tris HCl pH 9,2 2,5mM 3-Aminophthalhydrazid (Luminol) 0,45mM p-Cumarsäure 5,4mM H_2O_2
LiPEG	1mM EDTA 100mM Lithium-Acetat 40% PEG4000 10mM Tris auf pH 8,0 mit Essigsäure sterilfiltriert

LiSORB	1mM EDTA 100mM Lithium-Acetat 1M Sorbitol 10mM Tris auf pH 8,0 mit Essigsäure sterilfiltriert
pfu-Puffer (10 x)	200mM Tris HCl pH 8,8 100mM KCl 100mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20mM MgSO ₄ 1% Triton X-100 1mg/ml BSA
1X OneTaq® Standard Reaktionspuffer	20mM Tris-HCl 22mM NH ₄ Cl 22mM KCl 1.8mM MgCl ₂ 0.06% IGEPAL® CA-630 0.05% Tween® 20 (pH 8.9 @ 25°C)
10x SM Phusion Puffer	200mM Tris-HCl pH 8,8 100mM KCl 100mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 40mM MgSO ₄ 1% (v/v) Triton X-100 1mg/ml BSA
SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer	25mM TrisBase 192mM Glycin 1% (w/v) SDS
Transfer-Puffer	25mM Tris-Base 192mM Glycin 20% (v/v) Methanol
TBST	1,4M NaCl 200mM Tris Base pH 7,6 0,1% (v/v) Tween 20
8 M Harnstoffpuffer (HU-Puffer)	0,03% (w/v) Bromphenolblau 1,5% (w/v) Dithiothreitol 0,1mM EDTA 8M Harnstoff 200mM Phosphat-Puffer pH 6,8 5% (w/v) SDS
Lyselösung	20mM Tris-HCL, pH 7,8 200mM NaCl 2mM EDTA 5% Glycerin 1mM PMSF 1x cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

Breaking Buffer	2% TritonX 100 1% SDS 100mM Tris Base, pH 8 1mM EDTA
Alkalischer Lyse Puffer	2M NaOH 7,5% 2-Mercaptoethanol

4.1.3 Antibiotika

Tabelle 4: Verwendete Antibiotika

Name	Stammlösung	Endkonzentration	Herkunft
Ampicillin	100mg/ml	100µg/ml	Carl ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, DE)
Kanamycin	35mg/ml	35µg/ml	Carl ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, DE)
ClonNat (Nourseothricin)	200mg/ml	100µg/ml	Carl ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, DE)
Gentamicin	200mg/ml	200µg/ml	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DE)
Hygromycin B	300mg/ml	300µg/ml	neoFroxx GmbH (Einhausen, DE)
Doxycyclin	50mg/ml	50µg/ml	Carl ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, DE)
Cycloheximid	100mg/ml	100µg/ml	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DE)

4.1.4 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete primär und sekundär Antikörper

Name	Verdünnung	Herkunft
Mouse anti-MYC	1:5000	CELL SIGNALING (Danvers, MA, USA)
Rabbit anti-Tub1	1:2000	Abcam (Cambridge, UK)
Rabbit anti-GFP	1:5000	OriGene Technologies, Inc. (Rockville, USA); originally produced by Torrey Pines labs, Inc. (New Jersey, USA)

Rabbit anti-tRFP	1:2000	EVROGEN JOINT STOCK COMPANY (Moskau, RU)
Rabbit anti-mCherry	1:1000	BioVision (San Francisco, USA)
Goat anti-rabbit	1:3000	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGIES (Santa Cruz, USA)
Goat anti-mouse	1:2000	Jackson Immuno Research (Pennsylvania, USA)

4.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Tabelle 6: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Name	Genotyp	Referenz
ESM356	S288C MATa <i>ura3-53 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ6</i>	PEREIRA et al. 2001
ESM357	S288C MATa <i>ura3-53 leu2Δ1 trp1Δ63</i>	PEREIRA et al. 2001
YCR75	SK1 MATa <i>ho::LYS2 his3 leu2 trp1ΔFA ura3</i>	Stammsammlung C. Taxis
YBE4	Cen.PK MATa <i>ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his3 Δ1 MAL2-8C SUC2 P_{TEF1}-iHMG1-TADH1::P_{PGK1}-MTR(AtATR2)-TCYC1::KILEU2</i> , integrated with <i>KILEU2</i> marker gene into chromosome X; <i>P_{PGK1}-OEW-TCYC1::P_{TEF1}-CYP716A15-TADH1::KIURA3</i> , integrated with <i>KIURA3</i> marker gene into chromosomes XI; <i>P_{PGK1}-OEW-TCYC1::P_{TEF1}-CYP716A15-TADH1::DpHIS3</i> , integrated with <i>SpHIS3</i> marker gene into chromosomes XII	Stammsammlung und Beschreibung des Genotyps von B. Eberts Universität Aachen/Queensland
YDS487	ESM357 <i>gdh1-3myc-LOV2^{K92R E132A E155G}-cODC1::kanMX6</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS488	ESM357 <i>gdh1-3myc-iLIDA-cODC1::kanMX</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS527	ESM356 <i>erg9-3myc::kanMX6</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS534	ESM356-1 <i>HTB2-mScarlett-I::kanMX4</i>	Stammsammlung C. Taxis
YSH3	ESM356 <i>erg9-myc-iLIDdeltaA-cODC1::kanMX6</i>	Stammsammlung C. Taxis
YSH4	ESM356 <i>erg9-myc-AsLOV-cODC1::kanMX6</i>	Stammsammlung C. Taxis
YSH21	ESM356 <i>cyr1-myc-AsLOV-cODC1::kanMX6</i>	Stammsammlung C. Taxis

YSEB5/6	YCR75 <i>cyr1Δ::hphNT1</i> , PSEB19: P _{ADHI} - <i>tagRFP-bPAC-AuLOV^{V254M V349W}-cODC^{CA}LEU2</i>	Stammsammlung C. Taxis
YSEB12	YCR75 <i>cyr1Δ::hphNT1</i> , pSEB23: P _{ADHI} - <i>bPAC-AuLOV^{V254M V349W}-cODC^{CA}LEU2</i>	Stammsammlung C. Taxis
YSEB19	EMS356 <i>cyr1Δ::hphNT1</i> , pSEB12: P _{ADHI} - <i>GFP-P2A-mCherry-AuLOV^{V254MV349W}-cODC^{CA}LEU2</i>	Stammsammlung C. Taxis
YSEB20	EMS356 <i>cyr1Δ::hphNT1</i> , pSEB11: P _{ADHI} - <i>GFP-P2A-mCherry-AuLOV^{V254M V349W}-cODC^{CA}LEU2</i>	Stammsammlung C. Taxis
YSEB38	YCR75 Background <i>cyr1Δ::hphNT1</i> , pDS312: P _{CYC1} - <i>tagRFP-bPAC LEU2</i>	Stammsammlung C. Taxis
YBP01	ESM356 <i>HIS3::hphNT1::P_{ADHI}-VP16-CIB1::HIS3</i> <i>URA3::natNT2::P_{ADHI}-LexA-BD-Cry2::URA3</i> <i>LEU2::P_{LexA}-myCitrine-Cns2::LEU2</i>	Stammsammlung C. Taxis
YBP03	<i>HIS3::hphNT1::P_{ADHI}-VP16-CIB1::HIS3</i> <i>URA3::natNT2::P_{ADHI}-LexA-BD-Cry2::URA3</i> <i>LEU2::P_{LexA}-myCitrine-Cns2::LEU2</i> pDS261: P _{LexA} - <i>myCitrine-Cns1, URA3</i>	Stammsammlung C. Taxis
YJS12	ESM356 <i>911b::Tdit1-GA3ox-YFP-P_{LexA}-Spacer-P_{LexA}-YFP-GA20ox-Tdit1::911b</i> <i>LEU2::Tdit1-ATR2-YFP-P_{LexA}-P_{ADHI}-LexA-EDLL::leu2</i> <i>URA3::Tdit1-KS-YFP-P_{LexA}-Spacer-P_{LexA}-YFP-CPS-Tdit1::URA3</i>	Stammsammlung C. Taxis
YJT14	YCR75 <i>cyr1Δ::hphNT1</i> , pDS181	Stammsammlung C. Taxis
YJT21	ESM356 <i>gdh1-myc::kanMX6</i>	Diese Arbeit
YJT30	ESM356 <i>LEU2::P_{LexA}-myCitrine-NADPH reductase-Tdit1 P_{ADHI}-LexA-EDLL::LEU2</i>	Diese Arbeit
YJT31	ESM356 <i>URA3::P_{LexA}-myCitrine-KS-Tdit1 P_{LexA}-myCitrine-CPS-Tdit1::URA3</i>	Diese Arbeit
YJT32	ESM356 x yBE4 <i>P_{TEF1}-tHMG1-TADH1::P_{PGK1}-MTR(A_tATR2)-TCYC1::KILEU2</i> , integrated with <i>KILEU2</i> marker gene into chromosome X	Diese Arbeit

YJT33	ESM356 x yBE4 <i>P_{TEF1}-tHMG1-TADH1::P_{PGK1}-MTR(AtATR2)-TCYC1::KILEU2</i> <i>erg9-myc-iLIDdeltaA-cODC1::kanMX6</i>	Diese Arbeit
YJT34	ESM356 MATa <i>ergΔ9::natNT2</i> + pJT20 (<i>HA-tetR-AsLOV2 Zdk1-VP16-psd3</i> <i>P_{tetO}-Erg9-psd^{AS} TRP1</i>)	Diese Arbeit
YJT35	ESM356 Mata <i>erg9Δ::natNT2</i> + pJT20 (<i>HA-tetR-AsLOV2 Zdk1-VP16-psd3</i> <i>P_{tetO}-Erg9-psd^{AS} TRP1</i>)	Diese Arbeit
YJT36	ESM356 x yBE4 MATa <i>P_{TEF1}-tHMG1-TADH1::P_{PGK1}-MTR(AtATR2)-TCYC1::KILEU2</i>	Diese Arbeit
YJT37	ESM356 x yBE4 MATa <i>P_{TEF1}-tHMG1-TADH1::P_{PGK1}-MTR(AtATR2)-TCYC1::KILEU2</i>	Diese Arbeit
YJT38	ESM356 x yBE4 MATa <i>P_{TEF1}-tHMG1-TADH1::P_{PGK1}-MTR(AtATR2)-TCYC1::KILEU2</i> , integrated with KILEU2 marker gene into chromosome X <i>erg9Δ::NatNT2</i> + pJT20 (<i>HA-tetR-AsLOV2 Zdk1-VP16-psd3 P_{tetO}-erg9-psd^{AS} TRP1</i>)	Diese Arbeit
YJT39	ESM356 x yBE4 MATa <i>P_{TEF1}-tHMG1-TADH1::P_{PGK1}-MTR(AtATR2)-TCYC1::KILEU2</i> <i>erg9Δ::NatNT2</i> + pJT20 (<i>HA-tetR-AsLOV2 Zdk1-VP16-psd3 P_{tetO}-erg9-psd^{AS} TRP1</i>)	Diese Arbeit
YJT40	ESM356 x yBE4 MATa <i>gdh1Δ</i> + pJT15	Diese Arbeit
YJT41	ESM356 x yBE4 <i>P_{TEF1}-tHMG1-TADH1::P_{PGK1}-MTR(AtATR2)-TCYC1::KILEU2</i> <i>erg9-myc-AsLOV-cODC1::kanMX6</i>	Diese Arbeit
YJT42	ESM356 <i>cyr1-myc-AsLOV-cODC1::kanMX6</i> <i>HIS3::hphNT1::P_{ADH1}-VP16-CIB1::HIS3</i> <i>URA3::natNT2::P_{ADH1}-LexA-BD-Cry2::URA3</i> <i>LEU2::P_{LexA}-myCitrine-Cns2::LEU2</i> pDS261: <i>P_{LexA}-myCitrine-Cns1, URA3</i>	Diese Arbeit

4.3 *Escherichia coli*-Stamm

Tabelle 7: Verwendeter *Escherichia coli*-Stamm

Name	Genotyp	Referenz
TOP10	Amp / F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i></i>	INVITROGEN (Life Technologies GmbH, Darmstadt, D)

4.4 Verwendete Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Alle Plasmide trugen, falls kein Kan-Gen angegeben wurde, das *Amp^R*-Gen als *E. coli* Selektionsmarker.

Tabelle 8: Verwendete und hergestellte Plasmide während dieser Arbeit

Name	Genotyp	Referenz
pRS313	<i>CEN6 ARSH4 HIS3</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pRS314	<i>CEN6 ARSH4 TRP1</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pRS315	<i>CEN6 ARSH4 LEU2</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pRS316	<i>CEN6 ARSH4 URA3</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pET28-AtGid1A	<i>AtGid1A Kan</i>	Biocat AG Heidelberg
pET28-GAI	<i>GAI Kan</i>	Biocat AG Heidelberg
P414	<i>P_{TEF1}-Cas9-Tcycl1 TRP1</i>	(DiCarlo et al. 2013)
pUDE269	<i>P_{TDH3}-crtYB-T2A1-crtI-T2A2-crtE-tTEF URA3</i>	(Beekwilder et al. 2014)
pDS7	<i>P_{ADH1}-yeCFP-TEVdeg-F-SF3B-mKATE TRP1</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS23	<i>P_{ADH1}-myeCFP-TEVdeg-F-SF3B-mKATE HIS3</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS232	<i>VC::kanMX6</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS233	<i>VN::kanMX6</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS239	<i>P_{HIS3}-tTA-psd³ P_{tetO6galcore}-mCherry-psd³ TRP1</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS261	<i>P_{LexA}-YFP-CNS1-Tdit1 URA3 CEN6 ARSH4</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS275	<i>gRNA-URA3 KILEU2</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS280	<i>gRNA-LEU2 KIURA3</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS312	<i>P_{CYC1}-tagRFP-bPAC LEU2</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS319	<i>P_{ADH1}-LexABD-EDLL P_{LexA}-YFP-pTEV LEU2</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pSH25	<i>P_{ADH1}-mCherry-iLID^A-cODC1 LEU2</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pSH32	<i>P_{CYC1}-HA-tetR-AsLOV2 P_{HIS3}-Zdk1-VP16-psd³ P_{tetO7galcore}-CFP-TDegF-mKate TRP1</i>	Plasmidsammlung C. Taxis

pSH33	<i>P_{CYC1}-HA-tetR-AsLOV2 P_{HIS3}-Zdk1-VP16-psd³ P_{tet07galcore}-mCherry-psd³ TRP1</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pSEB11	<i>P_{ADH1}-GFP-P2A-mCherry-AuLOV^{V254M} V349W-cODC1 LEU2</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pSEB12	<i>P_{ADH1}-sfGFP-P2A-mCherry-aurLOVmut-cODC1 LEU2</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pSEB19	<i>P_{ADH1}-tagRFP-bPAC-AuLOV^{V254M} V349W-cODC1^{CA} LEU2</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pSEB23	<i>P_{ADH1}-bPAC-AuLOV^{V254M} V349W-cODC1^{CA} LEU2</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pJS4	<i>P_{LexA}-YFP-KO-Tdit1 URA3</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pJS8	<i>P_{LexA}-YFP-ATR2-Tdit1 URA3</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pJS9	<i>P_{LexA}-YFP-KS-Tdit1 URA3</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pJS10	<i>P_{LexA}-YFP-CPS-Tdit1 URA3</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pJS24	<i>P_{LexA}-YFP-KAO-Tdit1 Leu2</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pMB1	<i>P_{ADH1}-GAI-VN HIS3</i>	Diese Arbeit
pMB2	<i>P_{ADH1}-AtGid1A-VC TRP1</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pJT15	<i>P_{HIS3}-ZDK1-VP16 P_{tet06galcore}-GDH1-myc-psd³ TRP1</i>	Diese Arbeit
pJT20	<i>P_{CYC1}-HA-tetR-AsLOV2 P_{HIS3}-Zdk1-VP16-psd³ P_{tet07galcore}-Erg9-psd^{AS} TRP1</i>	Diese Arbeit
pJT21	<i>P_{CYC1}-HA-tetR-AsLOV2 P_{HIS3}-Zdk1-VP16-psd³ P_{tet07galcore}-Erg9-psd³ TRP1</i>	Diese Arbeit
pJT23	<i>P_{CYC1}-HA-tetR-AsLOV2 P_{HIS3}-Zdk1-VP16-psd3 P_{tet07galcore}-GDH1-psdAS TRP1</i>	Diese Arbeit
pJT24	<i>P_{CYC1}-HA-tetR-AsLOV2 P_{HIS3}-Zdk1-VP16-psd³ P_{tet07galcore}-Gdh1-psd³ TRP1</i>	Diese Arbeit

4.5 Verwendete synthetische Oligonukleotide

Die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Primer wurden für Sequenzierungen, Polymerase-Kettenreaktionen und zur Klonierung von Plasmiden verwendet.

Tabelle 9: Verwendete synthetische Oligonukleotide

Name	Sequenz
Erg9_s1	CGTATACACGTCACATATCACACACACAATGCGTACGCTGC AGGTCGAC
Erg9_ko	GAGCGTGTCCCGGTGG
Gdh1_s1	TAACAGTTAGGAGACCAAAAAGAAAAGAAATGCGTACGCTG CAGGTCGAC
Gdh1_ko	GCTGTTATCAGCTGCTGC
tetR4C_S4_downrev	CATCGATGAATTCTCTGTCGTCGCGAATAGGCCACTAGTTATA GTTTTTTC
sacI_tetR4C_up	TTGTAATCGAGCTCTGTAATAGCTCGAGTTTACCAC
pJS9int_test_rev	TTTGGAATTTGATGTCCATCG

pJS10int_test_fw	CAAGTCTATGGAAAAGGAAATG
pJS10int_Seq_rev	GTCATTATAGAAATCATTACG
pJS9int_seqfw	AATGTAGCGCTCTTACTTTAG
Padh1_AtGid1A_fw	AAGCATACAATCAACTCCAAGCTGGCCGCTCTAGAACTAGTAT GGGCAGCAGCCATCATC
Ter-VenusC_rev	AAATTCGCTTATTTAGAAGTGGCGCGCCTTGTACAGCTCGTCC ATGC
VC-AtGid1A_rev	ACCCGGGGATACCGTCGACCTGCAGCGTACGACATTCAGCGTT AACAAAAGC
VenusC_fw	CGTACGCTGCAGGTTCGAC
pDS23(padh1)-GAI_fw	TACAATCAACTCCAAGCTGGCCGCTCTAGAACTAGTATGGGCA GCAGCCATCATC
pDS23_ter-VenusN_rev	TAAGAAATTCGCTTATTTAGAAGTGGCGCGCCTACTCGATGTT GTGGCGG
VenusN_fw	CGTACGCTGCAGGTTCGAC
VenusN-GAI_rev	ACCCGGGGATACCGTCGACCTGCAGCGTACGGTTGGTAGACAA CTTCCAAGC
GDH1_dg fw	GGCCGGCTTCTTGTAAAGC
GDH1_dg rv	AGCCTGGTGTCCAATCGATG
GDH1_repair oligo fw	TATTCTAATATAACAGTTAGGAGACCAAAAAGAAAAGAAAT AGTCTAAAAGAAAAGAAAAGAGGAAAGTTTAAAAAAG
GDH1_repair oligo rv	CTTTTTATGAACTTTCTCTTTTCTTTCTTTTAGACTATTTCTTTT TCTTTTTGGTCTCCTAACTGTTATATTAGAATA
GDH1_targetRNA FW	GTTCGAAACTTCTCCGAGTGAAAGATAAATGATCTAATATCG CAAGTTTCATCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATA AGG
GDH1_targetRNA RV	CCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAGTATGAAACT TGCGATATTAGATCATTTATCTTTCACTGCGGAGAAGTTTCGAA C
PTETO_GDH1_INT_FW	GAAGAATATACTAAAAAATGAGCAGGCAAGATAAACGAAGGC AAAGGCCGCAAATTAAGCCTTCG
PTETO_GDH1_INT_REV	CACATGTATATATATCGTATGCTGCAGCTTTAAATAATCGGTGT CACGTCCCAAACCTTCTCAAG
Pcyc1-Erg9_fw	ATCAATTCGGGGATCCGTTTATCAGATCCACTAGTGGCCTAT ATGGGAAAGCTATTACAATTGG
ter_psd ³ _rev	AATCATAAGAAATTCGCTTATTTAGAAGTGGCGCGCTTATTGG AAGTACAAGTTTTTCAG
PlexA-mCherry	CTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAACGGATCCCCCGG AATGATGCGTAGAGATCTGATG
Tdit_pde2_fw	CGATAAGCTTGATGCGCCGGAATTCCTATTGTGGTTTCTTGTGT TTC
PLexA_pde2_downrev	AGGAGAAAAACGGATCCCCCGGAATGTCCACCCTTTTTCT GATTG
PErg7_PpDS241_rev	GAACCATGATAATTTCTAGCTTTCTCTCCACCTCGAGTTACCA CTCCCTG
Erg7_PpDS241_fw	ACCGATTGTGTCAGAATAAAATTCTGTCATATAGGCCACTAGT TATAGTTTTTTC
S1-Erg7	CGTCGCCACAAAGAAAGTACAAAACAGATGCGTACGCTGCA GGTCGAC
S2-Erg7	AGCCTCTAACAACACTTATAAATAAAACTTAATCGATGAATTC GAGCTCG
S3-Erg7	GTACAGCAGGGCATATGAAACACATACGCTTCGTACGCTGCAG GTCGAC
S4-Erg7	GTAGACCGATTGTGTCAGAATAAAATTCTGTCATCGATGAATT CTCTGTTCG
Padh_pDS319int_seq rev	AGCATACAATCAACTCCAAGC
P_pJS8int_seqfw	ATCAACAAAAAATTGTTAATATACC

pJS8int_P_seq rev	CATCACCTTCACCTTCACCG
pDS319int_Padh1_seqfw	AGATCAAACACCTCTTGTTGC
pJS8_intseq_rev	TCCATTTTGTAAATTCGTGTCG
Erg9-pJT9_primer	AGAAAAGTGAAAGTCGAGGTAGGCGTGTACGGTGGGCAGAGA AAAGTGAAAGTCGAG
Erg9-PtetO_seq	TCAAAGCTGCCTTCATCTCG
PtetO-erg9_seq	CAGAGAAAAGTGAAAGTCGAG
pJT9_ERG9-1	TCTCGACCGGATGCAATGCCAATTGTAATAGCTTTCCCATTTCG GTGGGAGGCCTATATAAG
PtetO_Gdh1_seqrev	ACCTCTATACTTTAACGTCAAG
Ter_GDH1_seqfw	GGTATCGATAAGCTTGATTACAC
GDH1INT_fw	GCCTTGGCTTCTTCACCGCTGACTTCATTTTGG
GDH1INT_rev	CCAAAATGAAGTCAGCGGTGAAGAAGCCAAGGC
INTGDH1_pSH32_fw	ATGACAGAGCAGAAAGCCCTAGTAAAGCGTATTACCCAAAAC CTTCTCAAGCAAG
INTGDH1_pSH32_rev	ATATATCGTATGCTGCAGCTTTAAATAATCGGTGTCTTAAAGC CTTCGAGCGTCCC
GDH1_in_HIS_seq-fw	CGGCATTAGTCAGGGAAGTC
GDH1_in_HIS_SEQ_rv	ATGGAGCAAAAGTACATTTAGG
Erg9_CYCcore_seq	CGTGGACTGATCATAGATGG
pMB1-2_seq_up	ATCAACTCCAAGCTGGCCG
pMB1-2_seq_down	TTAATAATAAAAATCATAAATCATAAG
AtGAI-VN_up	CTTGTCCATACTTGAAGTTCG
Gid1A_seq	CTTGGTTGAAGTCCAAGAAGG
Erg9-psd_seq	GGTTTTATCTATCATCTTGTC
CYR1-S2	ATGAAACGAGTAACAGGGTGGTACATAATTTACGAACAGAAC TCAATCGATGAATTCGAGCTCG
CYR1-S3	GACGAACTTTTACAAATGGTTAAGAACGCAAAGGATTTATCAA CTCGTACGCTGCAGGTGCAC

5 Methoden

5.1 Kultivierung von Mikroorganismen

5.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Zellen wurden in LB-Medium bzw. auf LB-Platten über Nacht bei 37° inkubiert. Dem Medium wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100µg/ml zugegeben falls die Zellen ein Plasmid trugen.

5.1.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die verwendeten *S. cerevisiae*-Zellen wurde entweder abhängig vom Experiment in YPD-, SC-, WM8 oder LFM-Medium bzw. auf den entsprechenden Platten bei 30°C für zwei bis 4 Tage inkubiert. Für Messungen wurden die Zellen zunächst von einer Platte aus in einer sogenannten Vorkultur über Nacht bei 30°C in Flüssigmedium angezogen. Am nächsten Tag erfolgt das Umsetzen dieser Kultur zu einer Hauptkultur. Dabei wird ein Teil der Vorkultur 1:20 mit frischen Medium verdünnt. Dies ermöglichte, dass während des Experiments nur junge Zellen gemessen wurden und sie je nach Experiment sich noch in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die Hauptkultur wurde dann abhängig vom Experiment weitere 5-72h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Bei allen Experimenten, bei denen eine Inkubation unter bestimmten Lichtbedingungen benötigt wurde, wurden die Kulturen in TC-Flaschen oder in 6-Well-Platten inkubiert. Die verwendeten Lichtverhältnisse werden bei jedem Ergebnis genauer beschrieben. Wurde eine spezifischere Kultivierung durchgeführt wird im Ergebnisteil darauf hingewiesen.

5.1.3 Anlegen von Dauerkulturen

Um eine langfristige Lagerung zu ermöglichen wurden Dauerkulturen der verwendeten Mikroorganismen hergestellt. Diese wurden bei -80°C gelagert. Für die *E. coli*-Stämme wurden 800µl einer über Nachtkultur mit 200µl 50% Glycerin gemischt. Bei *S. cerevisiae* hingegen erfolgte zunächst ein Ausstrich des gewünschten Stammes auf eine entsprechende Platte für 2-4 Tage unter den für den Stamm benötigten Bedingungen. Von dieser Platte wurden dann die Zellen abgekratzt und in 1ml 15% Glycerin resuspendiert und auf -80°C gelagert.

5.2 DNA Präparation

5.2.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die DNA- aus *E. coli* wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit und einer Tischmikrozentrifuge isoliert. Dabei werden die Zellen mit einer alkalischen Lyse

aufgeschlossen und die DNA später an einer Silica-Membran gebunden. Zu Beginn wurden 1,5ml über Nacht Kultur der gewünschten Zellen in einem Mikroreaktionsgefäß geerntet. Diese wurden daraufhin in 250ml P1 resuspendiert. Durch die Zugabe von 250µl P2 wurde dann die Lyse eingeleitet und das Gemisch 4-6-mal invertiert. Daraufhin wurde der Puffer N3 dazu gegeben und wieder mehrmals vorsichtig invertiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10min bei 13000rpm. Der Überstand wurde dann auf die Quiaprep 2.0 spin Säule gekippt. Um das Gemisch über die Membran zu spülen folgte ein Zentrifugationsschritt von 1min bei 13000rpm. Der Durchfluss wurde verworfen und die Membran mit 750µl PE-Puffer gewaschen. Daraufhin wurde für 1min bei 13000rpm die Säule trocken zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein neues Mikroreaktionsgefäß gestellt, mit 50µl dH₂O oder EB-Puffer beladen und für eine Minute ruhen gelassen. Danach erfolgte eine letzte Zentrifugation von 1min bei 13000rpm um die isolierte DNA von der Membran zu waschen und in dem neuen Gefäß aufzufangen.

5.2.2 Isolation der gesamten DNA aus *S. cerevisiae*

Die DNA aus *S. cerevisiae* wurde mit Hilfe von Rotiphenol isoliert. Dafür wurden zunächst die gewünschten Zellen von einer Platte abgekratzt und in 300µl dH₂O resuspendiert. Daraufhin erfolgte eine Zugabe von 400µl Breaking-Puffer, eine Menge Glasperlen die 200µl entsprechen und 300µl Rotiphenol. Dieses Gemisch wurde dann für 40s bei 6,5m/s im „FastPrep®-24 Classic Instrument“ (MP Biomedicals) geschüttelt um die Zellen aufzubrechen. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 13000rpm für 10 min. 500µl der wässrigen Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eine Zugabe von 1ml 100% Ethanol und eine Inkubation bei -20°C ermöglichte das Ausfallen der DNA. Eine 10 min Zentrifugation bei 13000rpm diente dazu die DNA zu pelletieren. Es wurde dann vorsichtig 1ml 70% Ethanol hinzugefügt ohne das Pellet zu resuspendieren. In derselben Orientierung wie zuvor wurde dann das Reaktionsgefäß 1min bei 13000rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde dann für 5min trocken gelassen und anschließend in 50µl dH₂O aufgenommen.

5.3 Manipulation von DNA

5.3.1 Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasen-Kettenreaktion dient dazu gezielt gewünschte DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Dafür werden spezifische Oligonukleotide benötigt. Diese müssen komplementär zum 3'-Ende oder revers komplementär zum 5'-Ende des gewünschten DNA-Bereichs sein. Als Templat-DNA wurde Plasmid-DNA oder die gesamte DNA von

S. cerevisiae verwendet. Die benötigte Temperatur für den Hybridisierungs-Schritt im PCR-Programm musste an den GC/AT-Gehalt der Primer angepasst werden. Die Primer wurden falls möglich so designt, dass eine Hybridisierung bei 60°C möglich war. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass sich am 3'-Ende der Primer ein Cytosin (C) oder ein Guanin (G) befindet. Falls möglich wurde die in unserer AG hergestellte Phusion-Polymerase verwendet, da diese die Eigenschaft besitzt Korrektur zu lesen. Lediglich für Test-PCR wurde die *OneTaq*-Polymerase verwendet, da in diesen Ansätzen zu viel nicht benötigte DNA vorliegt. Die Phusion-Polymerase besitzt eine zusätzliche dsDNA-bindende Proteindomäne und würde sich daher zu stark an falsche DNA-Abschnitte binden. Dies hätte bei der Verwendung von der Gesamt-DNA zu falschen Amplifikationen führen können.

5.3.1.1 PCR mit Hilfe der Phusion-Polymerase

Mit Hilfe dieser Standard-PCR wurden unkomplizierte und bis zu 4kb große Fragmente von Plasmiden amplifiziert. Diese dienten meistens zur Klonierung neuer Plasmide oder um gezielt einzelne Mutationen in einen DNA-Abschnitt einzufügen.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:		PCR-Programm			
10µl	10x Phusion SM buffer	98°C	10''	Denaturierung	
3.5µl	dNTPs (10mM)	98°C	Pause	Zugabe der Polymerase	
6.5µl	Primer 1 (10mM)	98°C	3'	Initial Denaturierung	
6.5µl	Primer 2 (10mM)	30x — [98°C	20''	Denaturierung
1µl	Template DNA		60°C	45''	Hybridisierung
3µl	DMSO		72°C	30''/kb	Elongation
68.5µl	dH ₂ O	8°C	∞	Aufbewahrung	
2µl	Phusion-Polymerase				

5.3.1.2 PCR mit Hilfe der *OneTaq*-Polymerasen

Um Integrationen, Deletionen oder chromosomale Taggings zu überprüfen wurde eine Test-PCR durchgeführt. Der verwendete Puffer und die Polymerase stammten von NEB. Mit dieser PCR wurden meistens nur kurze Fragmente direkt vom Hefe-Chromosom amplifiziert.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:		PCR-Programm			
5µl	10x NEB <i>OneTaq</i> Puffer	98°C	10''	Denaturierung	
0.5µl	dNTPs (10mM)	98°C	Pause	Zugabe der Polymerase	
0,5µl	Primer 1 (10mM)	98°C	30''	Initial Denaturierung	
0.5µl	Primer 2 (10mM)	30x	98°C	30''	Denaturierung
1µl	Template DNA		60°C	30''	Hybridisierung
18µl	dH ₂ O		68°C	1'/kb	Elongation
0,1µl	<i>OneTaq</i> ® DNA Polymerase		68°C	5'	Finale Elongation
		8°C	∞	Aufbewahrung	

5.3.1.3 pYM-PCR

Dieses Protokoll entstand ursprünglich um die tagging-Plasmide der pYM-Reihe zu amplifizieren. Um längere PCR-Fragmente herzustellen wurde im Laufe der PCR die Elongationszeit erhöht. Mit Hilfe dieser PCR wurden Integrations-, Deletions- und Taggingkassetten amplifiziert, um diese in *S. cerevisiae* zu integrieren. Die dafür benötigten homologen Bereiche befanden sich meistens auf den Primern und flankierten dadurch das PCR-Fragment.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:		PCR-Programm			
10µl	10x Phusion SM buffer	98°C	10''	Denaturierung	
3.5µl	dNTPs (10mM)	98°C	Pause	Zugabe der Polymerase	
6.5µl	Primer 1 (10mM)	98°C	3'	Initial Denaturierung	
6.5µl	Primer 2 (10mM)	10x	98°C	45''	Denaturierung
1µl	Template DNA		60°C	45''	Hybridisierung
20µl	Betaine (5M)		68°C	1'/kb	Elongation
50.5µl	dH ₂ O	20x	98°C	45''	Denaturierung
2µl	Phusion-Polymerase		58°C	45''	Hybridisierung
			68°C	1'/kb + 5''/Zyklus	Elongation
		8°C	∞	Aufbewahrung	

5.3.2 Restriktion von DNA

Plasmid-DNA wurde in einem 20µl Ansatz verdaut. In diesem Ansatz wurden 0,3µl. der benötigten Restriktionsenzyme, 2µl des entsprechenden Puffers und 8µl der Plasmid-DNA gemischt. Das Volumen wurde mit dH₂O auf 20µl aufgefüllt. Die Inkubation fand bei einer für das Enzym laut Hersteller optimalen Temperatur 30min bis 1h statt.

5.3.3 In vivo Ligation in *S. cerevisiae*

Mit Hilfe der *in vivo* Ligation konnten enzymfreie DNA-Fragmente zusammengebaut werden. Dies geschieht direkt in der Hefe und funktioniert durch Homologe-Rekombination. Die dafür benötigten 25-35bp langen homologen Bereiche wurden durch eine PCR mit Hilfe der Primer an das gewünschte Insert angebracht. Wenn ein Plasmid Teil dieser Ligation war, wurde es in dem Zielbereich aufgeschnitten. Es konnten mehrere Fragmente gleichzeitig zusammengeführt werden. Von den zu ligierenden DNA-Fragmenten wurden 5-15µl direkt in kompetente *S. cerevisiae*-Zellen transformiert. Aus den daraus entstandenen Kolonien wurde die DNA isoliert und 2µl in elektrokompente *E. coli* transformiert. Die nach der Elektroporation entstandenen *E. coli*-Kolonien enthielten das gewünschte Plasmid.

5.3.4 Fällung von DNA mit Ethanol

Die DNA wurde durch Einsatz von Ethanol gefällt. Dafür muss die zu fällende DNA mit 2,5Vol. 100% Ethanol gemischt und bei -20°C für 20min inkubiert werden. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 13000rpm für 10min. Von dem daraus entstandenen DNA-Pellet wurde vorsichtig das Ethanol abgegossen und mit 1ml 70% Ethanol bedeckt. Das Reaktionsgefäß wurde nochmals in derselben Orientierung für 1min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das DNA-Pellet für 5-10min getrocknet. Die DNA wurde dann in 50µl dH₂O aufgenommen.

5.3.5 DNA-Analysen

5.3.5.1 Sequenzierung

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurden 2,5µl DNA, 2,5µl Oligonukleotid-Lösung (10mM) und 5µl dH₂O gemischt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC (später Eurofins).

5.3.5.2 Gelelektrophorese mittels Agarosegel

Um die Größe von DNA-Fragmenten zu bestimmen, eine PCR oder einen enzymatischen Verdau zu überprüfen wurde eine Gelelektrophorese mittels Agarosegel durchgeführt. Dafür

wurde eine Gelkammer mit 1xTAE Puffer gefüllt und das 1% Agarosegel, welches auch mit TAE Puffer angesetzt wurde, hineingegeben. Die Proben wurden vor der Beladung mit 6x Ladepuffer gemischt. Als Größenstandard diente der „Gene Ruler™ DNA Ladder Mix“ von FERMENTAS. Das Gel lief für 30min bei 130V. Anschließend erfolgte eine Inkubation in einem Wasserbad mit GelRed (700ml H₂O + 70µl GelRed) für 15min. Nach einer Entfärbung in einem Wasserbad ohne GelRed wurden die DNA-Banden mit einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254nm sichtbar gemacht und mit einer digitalen CCD-Kamera fotografiert.

5.4 Transformationstechniken

5.4.1 Transformation von elektrokompenten *Escherichia coli*

Für die Transformationen wurde der *E.coli*-Stamm TOP10 verwendet. Um die Zellen kompetent zu machen wurden 5ml einer über Nacht Kultur in 210ml vorgewärmtes LB-Medium gegeben und 4h inkubiert bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 30min auf Eis. Die weiteren Schritte wurden ebenfalls auf Eis durchgeführt. Nach der Zellernte in einem 50ml Reaktionsgefäß bei 5000rpm für 5min folgten drei Waschschrte mit 2,5Vol. gekühlten dH₂O und einem mit eiskalten 10% Glycerin. Anschließend wurde das Zellpellet in 400µl 10% Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 50µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Ein Aliquot elektrokompenter Zellen wurde mit 1-2µl Plasmid-DNA gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Dieses Gemisch wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und anschließend in die Elektroporationsmaschine gesetzt. Es wurde eine Spannung von 2,5kV, ein von Widerstand 200Ω und eine Kapazität von 25µF eingestellt. Die Zeitkonstante lag zwischen 4,8 bis 5,2ms. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1ml LB-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C regeneriert. Die Zellen wurden danach bei 5000rpm für 1min pelletiert und nach dem dekantieren in ca. 200µl LB-Restmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Transformation auf LB+Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.4.2 Transformation von chemischkompetenten *E. coli*

Für die Transformation von chemischkompetenten *E. coli*-Zellen wurde ein 50µl Aliquot kompetenter TOP10-Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 2-5µl Plasmid-DNA hinzugegeben und der Ansatz vorsichtig durchmischt. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock auf 42°C für 45s. Anschließend wurden die Zellen für weitere 5min auf Eis ruhen gelassen und in 1ml LB ohne Antibiotikum

resuspendiert. Es folgte eine Regenerationszeit von bis zu 1h auf 37°C bevor die Zellen für 3min bei 8000rpm pelletiert wurden. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und die Zellen in ca. 200µl LB resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Ausplattierung auf LB-Platten mit dem gewünschten Selektionsmarker.

5.4.3 Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen

Eine *S. cerevisiae*-Kolonie wurde, abhängig vom Stamm, entweder in 2ml YPD oder LFM über Nacht bei 30°C unter den benötigten Lichtbedingungen angezogen. Am nächsten Tag erfolgte einer Verdünnung mit 48ml des entsprechenden Mediums und eine weitere Inkubation für ~6h. Danach wurden die Zellen in 50ml Reaktionsgefäßen bei 2000rpm für 4min geerntet. Es folgten zwei Waschschrte mit 2,5Vol. dH₂O und einem mit 5ml SORB-Puffer. Die Zellen wurden dann in 450µl SORB-Puffer aufgenommen und 50µl, zuvor frisch bei 100°C aufgekochte, Heringsspermien-DNA (10 mg/ml) zugegeben. Die kompetenten Hefezellen wurden in 50µl-Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden 5-15µl PCR-Fragment bzw. 5-15µl Plasmid-DNA und 300µl PEG-Puffer zu den Zellen gegeben und gut durchmischt. Nach einer 30min Inkubation bei RT erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C in einem Wasserbad für 15min. Anschließend wurden die Zellen bei 2000rpm für 3min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Wurde durch die Transformation eine neue Resistenz in die Zellen eingebracht, erfolgte eine Regeneration über Nacht bei 30°C in YPD. Ohne Resistenzintegration konnten die Zellen direkt mit YPD gewaschen werden und anschließend auf den entsprechenden Platten ausplattiert werden. Nach 2-4 Tagen konnte der Erfolg der Transformation überprüft werden.

5.5 Integration des heterologen GA4 Biosynthesewegs in *S. cerevisiae*

Die Integration des GA4-Biosyntheseweges in *S. cerevisiae* wurde durch CRISPR-Cas9 ermöglicht. Zunächst wurden die benötigten Integrationskassetten durch eine PYM-PCR amplifiziert. Diese dienten später als DNA-Reparatur-Templat. Es erfolgte eine Transformation der gewünschten *S. cerevisiae*-Zellen mit den Guide-RNA-Plasmiden (pDS275 oder pDS280). Durch diese Guide-RNAs wird angegeben an welcher Stelle die Cas9 die DNA schneidet. Eine weitere Transformation dieser Zellen mit den bereits amplifizierten Kassetten und dem Cas9-Plasmid (P414) ermöglichte eine Integration in den LEU oder URA Locus. Die Cas9 führt an dieser Stelle einen Doppelstrangbruch ein, der durch homologe Rekombination mit den Integrationskassetten repariert wird (Abb. 34).

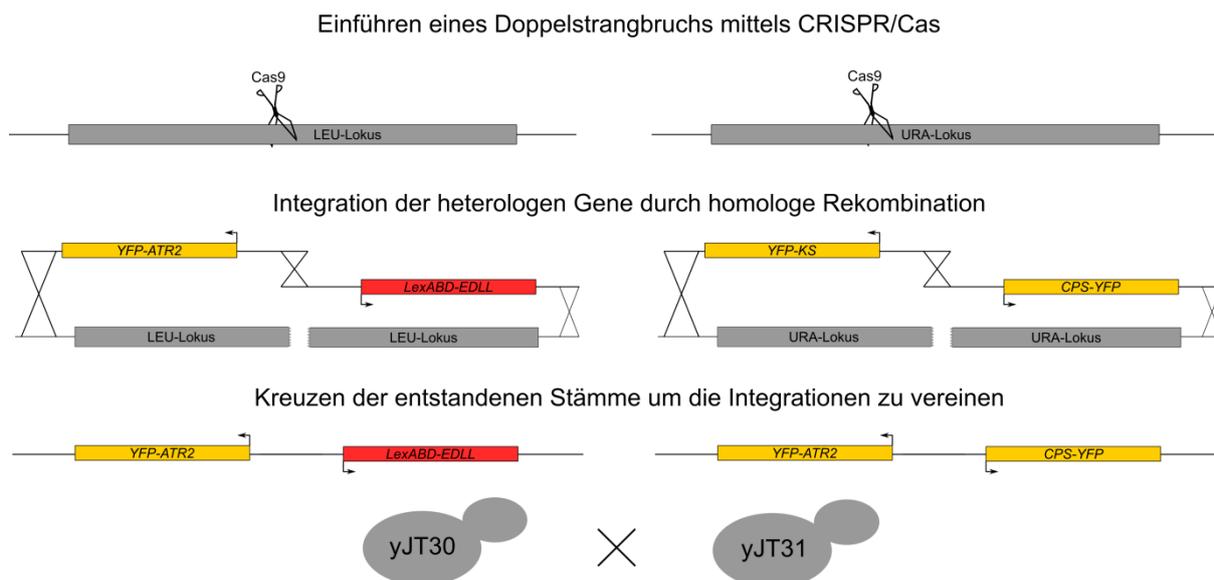


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Integrationen des GA4-Biosynthesewegs. Durch die Expression von Cas9 und den entsprechenden Guide-RNAs wurde ein Doppelstrangbruch in dem gewünschten Locus eingeführt. Dieser Bruch wurde durch den endogenen Reparaturmechanismus mit Hilfe einer folgenden homologen Rekombination repariert. Dabei kommt es zur Deletion des zuvor geschnittenen Auxotrophiemarkergens. Eine weitere homologe Rekombination verknüpft die zwei integrierten heterologen Gene am jeweiligen Anfang des Promotors. Die folgenden Kreuzungen und Tetradendissectionen der entstandenen Stämme wurden von Johannes Scheffer durchgeführt um den heterologen GA4-Biosyntheseweg zu vereinen.

Der Erfolg dieser Methode konnte durch eine anschließende Test-PCR überprüft werden. Durch dieses Verfahren wurden immer zwei heterologe Gene Rücken an Rücken in einen Stamm integriert. Anschließend führte Johannes Scheffer mehrere Kreuzungen und Tetradendissectionen durch, wodurch der gesamte GA4-Biosyntheseweg vereint wurde.

5.6 Protein-Analyse

5.6.1 Herstellung eines Proteinextraktes aus *S. cerevisiae*

Um ein Proteinextrakt aus *S. cerevisiae* herzustellen wurde eine Zellsuspension mit einer OD600 von 1 mit 150µl alkalischem Lysis-Puffer gemischt und für 10min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 150µl (w/v) TCA und einer erneuten Durchmischung mit anschließender Inkubation auf Eis für weitere 10min. Dieses Gemisch wurde dann bei 13000rpm für 10min zentrifugiert. Die dadurch pelletierten Proteine und Zellreste wurden in 50µl HU-Puffer aufgenommen. Um die Proteine von den Zellresten zu trennen erfolgte eine Erhitzung auf 65°C für 10min. Durch eine anschließende Zentrifugation für 3min bei 13000rpm bildet sich ein Pellet der Zellreste und die Proteine befinden sich weiterhin in Lösung.

5.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-Page wurden selbstgegossene 10% SDS-Gele verwendet die mit einem Sammelgel mit Taschen übergossen wurden. Die Proteine wurden nach ihrer relativen Molekularmasse unter denaturierenden und diskontinuierlichen Bedingungen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit Elektrophorese-Puffer gefüllten Mini Protean 3 Apparatur (BIORAD). Es wurden selbst hergestellte 10%-ige SDS-Gele verwendet.

Tabelle 10: Herstellung 10%-iger SDS-Gele

Reagenz	Trenngel (10%)	Sammelgel
Tris/HCl	3,75ml 1M Tris/HCl pH 8.8	2,5ml 0,5M Tris/HCl pH 6,8
H ₂ O	2,6ml	6,2ml
Rotiphorese Gel 30	3,4ml	1,3ml
10% SDS	100µl	100µl
TEMED	50µl	20µl
10% APS	100µl	100µl
Total	10ml	10ml

Es wurden 10µl Proteinextrakt aufgetragen. Als Größenstandard wurden 3µl Pageruler™ Prestained Protein Ladder von FERMENTAS verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 200V für ca. 1h.

5.6.3 Western-Blot

Die zuvor während einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Membran überführt. Dies ermöglicht einen Mengennachweis bestimmter Proteine. Es wurde eine Tank-Blot-Apparatur von BIORAD für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran verwendet. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut:

Kathode
Faserstoffpolster
Mit Blotting-Puffer getränktes „Blotting“-Papier
SDS-Gel mit aufgetrennten Proteinen
Nitrocellulose-Membran
Mit Transfer-Puffer getränktes „Blotting“-Papier
Faserstoffpolster
Anode

Der Blot wurde in die Apparatur eingespannt und mit 1l Blotting-Puffer übergossen. Das Blotten erfolgte bei 20V für 12h und wird durch eine Kühleinheit rührend temperiert. Anschließend wurde die Membran mit TBST mehrmals gewaschen. Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren folgte eine Inkubation in TBST mit 5% (w/v) Milchpulver für 30min. Nach einem weiteren Waschschriff mit TBST konnte der Blot mit einem TBST+ 3% Milchpulver + Primärantikörper Gemisch für 1-4h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Es folgten mehrere Waschschriffe mit TBST und einer anschließenden Inkubation mit dem TBST + 3% Milchpulver + Sekundärantikörper Gemisch für 1h bei RT. Nach weiteren Waschschriffen mit TBST wurde die Membran entwickelt. Dafür wurde die Membran in der ECL-Lösung für 1min inkubiert und anschließend auf eine reflektionsarme Platte gelegt. Das Abdecken der Platte mit einer Folie verhinderte den Kontakt mit der Luft. Die Chemolumineszenz wurde mit einer Chemostar Professional Apparatur (INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GMBH, Göttingen, D) detektiert. Die Expositionszeit korrelierte mit der Signalstärke. Die Signalstärken wurden mit Hilfe der Software ImageJ quantifiziert.

Um weitere Detektionen von derselben Membran zu ermöglichen folgte nach mehreren Waschschriffen in TBST eine 1h Inkubation bei 70°C in Stripping-Puffer. Dadurch konnten die verwendeten Antikörper von den Proteinen auf der Membran gelöst werden. Die Membran inklusive Proteine konnte nach mehreren Waschschriffen mit TBST für weitere Immunodetektionen verwendet werden.

5.6.4 Cycloheximidchase

Die Hauptkultur der *S. cerevisiae*-Stämme wurde in LFM-Medium unter Blaulicht oder in Dunkelheit für ca. 5h wachsen gelassen, bis sie in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Dann wurde die erste Probe (t = 0h) entnommen und der Translationsinhibitor Cycloheximid mit einer Endkonzentration von 100µg/ml zu der restlichen Kultur hinzugegeben, um die Proteinsynthese zu stoppen. Die entnommene Zellmenge entsprach einer OD₆₀₀ von 1 und wurde mit Natriumazid (Endkonzentration 10mM) behandelt und anschließend auf 4°C in Dunkelheit gelagert. Die Kultur wurde weiterhin in den für das Experiment benötigten Lichtbedingungen inkubiert. Bei den späteren Zeitpunkten wurde die gleiche Menge an Zellen entnommen. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Durchfluscytometrie oder Western-Blot.

5.7 Analyse von *S. cerevisiae*-Zellen

5.7.1 Einzelzellanalyse mittels Durchflusszytometrie

Mit Hilfe des Durchflusszytometers Attune NxT von ThermoFisher wurden Einzelzellanalysen von *S. cerevisiae*-Kulturen durchgeführt. Für diese Analyse wurden die Zellen in eine 96-Well-Plate abhängig von der Kultur bis zu 1:20 verdünnt und mit Natriumazid behandelt. Durch die Verdünnung wurde die Chance verringert, dass mehrere Zellen gleichzeitig die Laser passieren und somit größtenteils Einzelzellevents vermessen wurden (Abb. 35).

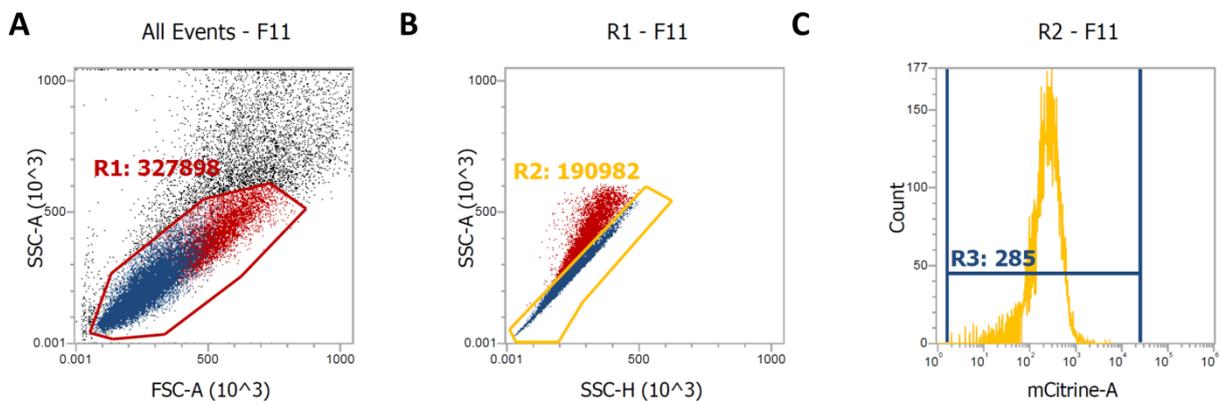


Abbildung 35: Beispiel Einstellung für das Durchflusszytometer Attune NxT. A: Dot-Blot der gesamten gemessenen Events (Sidewards-Scatter-Area/Forward-Scatter-Area). Es wurden SSC- und FSC-Laser stärken gewählt, sodass sich die Ereignisse gut sichtbar in der Mitte dieses Blots verteilen. Mit dem Gate R1 wurde der Großteil der gemessenen Zellen, die Hauptpopulation, markiert. B: Dot-Blot der Zellen die sich im Gate R1 befinden (Sidewards-Scatter-Area/Sidewards-Scatter-Height). Mit dem Gate R2 wurden die Einzelzellereignisse markiert. Diese haben eine lineare Korrelation zwischen dem Height-Signal und dem Area-Signal. C: Histogramm-Blot der Einzelzellereignisse die sich im Gate R2 befinden. In diesem Beispielblot wurde eine Negativkontrolle vermessen. Die entsprechende Laserstärke wurde so gewählt, dass der Großteil der Population eine Signalstärke zwischen 10^2 und 10^3 hat. Im Falle dieser Kontrolle handelt es sich dabei ausschließlich um die Autofluoreszenz der Zellen. Wurde etwas Fluoreszierendes in den Zellen hergestellt, konnte eine Verschiebung der Signalstärke beobachtet werden. Dies ermöglichte es Unterschiede in der Produktion von fluoreszierenden Molekülen innerhalb der Zellen genau zu charakterisieren. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Ereignisse im Gate 3 wurde von der Attune NxT Software berechnet und für spätere Analysen verwendet. An hand dieses Wertes ließen sich Kulturunterschiede bestimmen. Die gewählten Laserstärken und gesetzten Gates wurden für jedes Experiment neu eingestellt um eine optimale Messgenauigkeit zu gewährleisten.

Abhängig vom Experiment wurden Fluoreszenzprotein markierte Proteine oder fluoreszierende Metaboliten beobachtet. Diese konnten dank ihrer Fluoreszenz mit dem richtigen Laser und Detektor pro Zelle quantifiziert werden. In der Abbildung 35 wird an einem Beispiel die Einstellung des Durchflusszytometers beschrieben (Abb. 35).

5.7.2 Fluoreszenzmikroskopie

5.7.2.1 Zellpräparierung für die Fluoreszenzmikroskopie

Zur Mikroskopie von Hefezellen wurden Hefezellen dem Experiment entsprechend inkubiert. Es wurden für die Mikroskopie Kulturschalen mit Glasboden verwendet. Zuerst wurde ein Tropfen 0,5%-iger Concanavalin A-Lösung auf den Glasboden der Kulturschale gegeben,

nach fünf Minuten entfernt und mit dH₂O gewaschen. Anschließend wurde ein Tropfen einer *S. cerevisiae* Kultur auf den Boden aufgetragen. Nach einigen Minuten Absetzzeit wurde der Tropfen entfernt. Die Schalen wurden mit LFM-Medium gewaschen und zum Schluss 2 ml LFM in die Kulturschalen gegeben.

5.7.2.2 Bildaufnahme

Bei der mikroskopischen Untersuchung der präparierten Zellen wurde das inverse „Axiovert 200 M“ Lichtmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D), unter Verwendung eines 63x Öl-Objektiv und einer Digitalkamera (Hamamatsu, Herrsching, D.), eingesetzt. Einstellungen des Mikroskopes und der Kamera wurden über das Programm Volocity (Improvision, Coventry, UK) vorgenommen. Es wurden Bilder im Durchlicht und Fluoreszenzfilter erstellt. Für die weitere Auswertung wurden die Bilder als TIF-Datei aus Volocity exportiert und mit der Software ImageJ bearbeitet.

5.7.3 Wachstumstest

Die OD₆₀₀ der Hauptkultur wurde auf 0,1 in einem gesamt Volumen von 10ml LFM-Medium eingestellt. Um eine Beleuchtung der Zellen zu ermöglichen wurden die Kulturen in TC25-Flaschen überführt. Die Inkubation wurde bei 30°C, 90rpm und den entsprechenden Lichtbedingungen durchgeführt. Nach 7h wurde mit der Aufnahme der Wachstumskurve begonnen. 9 Stunden lang wurde jede Stunde 100µl der Kulturen entnommen und die OD₆₀₀ gemessen. Dadurch konnte eine Wachstumskurve über den Zeitraum des gesamten Experiments erstellt werden.

5.7.4 Jod-Dampf-Färbung von *S. cerevisiae*-Zellen

Für die Jod-Dampf-Färbung wurde eine Vorkultur, in für den verwendeten Stamm entsprechendes Medium, über Nacht in einem Rollinkubator bei 30°C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde zunächst die OD₆₀₀ bestimmt und anschließend eine OD₆₀₀ von 0,1 entnommen und mit Nährmedium auf 1ml aufgefüllt. Von dieser Verdünnung wurden 10µl auf eine Agar-Platte desselben Typs getropft und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Die verwendeten Lichtbedingungen wurden an den zu untersuchenden Hefestamm angepasst. Für die Jodfärbung wurde kugelförmiges, resublimiertes Jod (≥99,8%, p.a., ACS, resublimiert; CARL ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, D)) in den Deckel der Agar-Platten Petrischale gegeben und die Zellen so lange über die entstehenden Joddämpfe gehalten, bis es zu einer deutlichen Gelb- bzw. Braunfärbung gekommen ist. Die Platte wurde vor und nach der Jodfärbung fotografiert.

5.8 Tetradendisektion

Die Tetradendisektion wurde durchgeführt um aus diploiden *S. cerevisiae*-Stämmen haploide Sporen zu isolieren. Sie dient des Weiteren dafür die Verteilung der molekularen Marker zu überprüfen. Für die Tetradendisektion wurden diploide Zellen zunächst auf SPO-Platten mit 1% KOAc für 2-9 Tage bei 30°C inkubiert. Um die Zellwand zu verdauen wurden die sporulierten Zellen in einer Mischung aus 10µl dH₂O und 10µl Lyticase-Lösung mit 500Units/ml (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, D) für 10min bei 30°C inkubiert. Die Sporen werden aufgrund ihrer Zellwandbeschaffenheit nicht beeinflusst. 10µl der angedauten Zellen wurden anschließend auf eine YPD-Platte getropft und leicht gekippt, bis sich die Zellen in einem waagrechten, schmalen Streifen verteilten. Für die Tetradendisektion wurde das Mikroskop ECLIPSE 50i (NIKON), mit einem montierten Mikromanipulator benutzt. Der Mikromanipulator trägt eine Glasfasernadel (SCHUETTLABORTECHNIK, Göttingen, D), mit deren Hilfe die vier Sporen einer Tetrade auf der YPD-Platte in einem Abstand von wenigen cm ausgelegt wurden. Anschließend wurde die Platte bei den für den verwendeten Stamm optimalen Bedingungen inkubiert, bis aus den einzelnen Sporen gut erkennbare Kolonien entstanden. Zur Überprüfung auf molekulare Marker wurden die Kolonien auf entsprechende Selektionsplatten mit Hilfe von Samt-Tüchern überstempelt.

5.9 Extraktion und Quantifizierung von sekundären Metaboliten in *S. cerevisiae*

5.9.1 β -Carotin-Detektion mittels HPLC

Für die Isolation der Carotinoide wurde die Produktionskultur zunächst bei 13000rpm für 5min sedimentiert und einmal mit dH₂O gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen mit flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einer Gefriertrocknungsanlage über Nacht lyophilisiert. Von den getrockneten Zellen wurde dann die Masse bestimmt. Anschließend folgte der Zellaufschluss. Dafür wurde das getrocknete Zellpellet in einem 2ml Eppendorfcup mit 200µl Glasperlen und mit 1ml Acetonitril-Methanol (50:50, v/v) zusammengeführt. Durch eine 45s langen Behandlung im „FastPrep®-24 Classic Instrument“ (MP Biomedicals) bei 6,5m/s erfolgte das Aufbrechen der Zellen. Anschließend wurde dieser Aufschluss für 5min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert, die orange gefärbte organische Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wieder mit 1ml Acetonitril-Methanol (50:50, v/v) aufgefüllt. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt bis das Zellpellet keine starke gelb/orange Färbung mehr aufwies. Die entnommenen Extrakte wurden zusammengeführt und davon 200µl in Glasvials gegeben und für die Quantifizierung

mittels „high-performance liquid chromatography“ durchgeführt. Für die Analyse der β -Carotin-Extrakte wurde ein Agilent 1260 HPLC-System (Agilent Technologies), bestehend aus Entgaser, bi-närer Pumpe, Säulenofen und MWD-Detektor eingesetzt und die Trennsäule EC 250/4 NUCLEOSIL 100-5 C18 (Macherey-Nagel) verwendet. Die Auftrennung der Probe erfolgte isokratisch mit 50% v/v Methanol, 50% v/v Acetonitril als Laufmittel bei einer Flussrate von 1mL/min. Das Injektionsvolumen betrug 25 μ L und die Trennsäule wurde während der Analyse auf 25°C temperiert. Die Proben wurden in Triplikaten vermessen, β -Carotin bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert und mittels Standards quantifiziert. Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit der Software OpenLab CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies) ausgewertet.

5.9.2 Gibberellinsäure

Für die Extraktion von Gibberellinsäuren wurden 10ml einer Produktionskultur in einem 15ml Falcon bei 5000rpm für 5min pelletiert. Der Überstand wurde bis auf 200 μ l verworfen. Das Zellpellet wurde im restlichen Medium resuspendiert und in ein 2ml Eppendorfcup überführt. Es folgte eine Zugabe von ca. 200 μ l Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,5mm und 800 μ l Essigsäureethylester. Durch eine 2min Behandlung bei 6,5m/s im „FastPrep®-24 Classic Instrument“ (MP Biomedicals) wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 13000rpm für 10min, wodurch eine Trennung der Phasen entstand. Die obere Phase wurde in ein frisches Eppendorfcup überführt und in einer SpeedVac innerhalb von 30min evaporiert. Das entstandene Extrakt wurde abhängig vom darauf folgenden Experiment entweder in frischem Medium oder in einem Lösungsmittel resuspendiert.

5.9.3 Terpene

Für die Quantifizierung der Terpene wurden 800 μ l der Produktionskultur in ein frisches 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für den Zellaufschluss und der Extraktion der Terpene wurden 200 μ l Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,5mm, 80 μ l 1M HCL und 800 μ l eines 80:20 Chloroform:Methanol-Gemischs zu den 800 μ l der Kultur hinzugegeben und in einem „FastPrep®-24 Classic Instrument“ (MP Biomedicals) für 2min bei 6,5m/s behandelt. Das Reaktionsgefäß wurde danach für 10min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend 500 μ l von der unteren organischen Phase in ein neues 2ml Eppendorfcup überführt. Das organische Lösungsmittel wurde daraufhin in einer SpeedVac innerhalb 30min evaporiert. Die getrockneten Terpene lagerten bei -80°C. Die Quantifizierung mittels HPLC wurde von Kollaborationspartnern aus Aachen/Queensland (AG Ebert) durchgeführt.

5.9.4 Cordycepin

Für die Quantifizierung der Cordycepinkonzentration im Kulturmedium wurden 2ml der Cordycepin produzierenden Kultur bei 13000rpm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2ml Eppendorfcup überführt und anschließend für 15min bei 95°C erhitzt. Nach einer 10-minütigen Ruhezeit konnte das abgekühlte Kulturmedium 1 zu 10 in HPLC-Phiolen verdünnt werden. Die entsprechenden Standards wurden ausgehend von einer 300µmol Cordycepinlösung in ddH₂O hergestellt um eine anschließende Quantifizierung zu ermöglichen. Die Analyse selbst wurde von der Serviceabteilung Massenspektrometrie und Elementanalytik (MarMass: Small Molecules) mittels LC/MS durchgeführt. Für eine anschließende Quantifizierung wurde eine Eichgerade durch die vermessenen Standards angefertigt und somit die produzierte Cordycepinkonzentration bestimmt.

5.10 Anpassung der Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Kurve durch die Hill-Gleichung

Die Anpassung der Dosis-Wirkungs-Kurve durch die Hill-Gleichung wurde mit der Software Dr Fit durchgeführt (Di Veroli et al. 2015). Es wurden Standardeinstellungen verwendet um die experimentellen Daten an die Hill-Funktion anzupassen.

5.11 Lokalisierungsvorhersage durch DeepLoc

Mit Hilfe von DeepLoc lässt sich die Lokalisierung von Proteinen anhand der Proteinsequenz vorhersagen (Almagro Armenteros et al. 2017). Mit diesem Online-Tool wurden Vorhersagen für die Komponenten des GA-Reporters gemacht. Es wurden Standardeinstellungen verwendet.

6 Literaturverzeichnis

Almagro Armenteros, José Juan; Sønderby, Casper Kaae; Sønderby, Søren Kaae; Nielsen, Henrik; Winther, Ole (2017): DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. In: *Bioinformatics* 33 (21), S. 3387–3395. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx431.

Anderson, M. S.; Yarger, J. G.; Burck, C. L.; Poulter, C. D. (1989): Farnesyl diphosphate synthetase. Molecular cloning, sequence, and expression of an essential gene from *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Journal of Biological Chemistry* 264 (32), S. 19176–19184.

Asadollahi, Mohammad A.; Maury, Jérôme; Møller, Kasper; Nielsen, Kristian Fog; Schalk, Michel; Clark, Anthony; Nielsen, Jens (2008): Production of plant sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ERG9 repression on sesquiterpene biosynthesis. In: *Biotechnology and bioengineering* 99 (3), S. 666–677. DOI: 10.1002/bit.21581.

Banerjee, Ankan; Herman, Elena; Kottke, Tilman; Essen, Lars-Oliver (2016a): Structure of a Native-like Aureochrome 1a LOV Domain Dimer from *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Structure (London, England : 1993)* 24 (1), S. 171–178. DOI: 10.1016/j.str.2015.10.022.

Banerjee, Ankan; Herman, Elena; Serif, Manuel; Maestre-Reyna, Manuel; Hepp, Sebastian; Pokorny, Richard et al. (2016b): Allosteric communication between DNA-binding and light-responsive domains of diatom class I aureochromes. In: *Nucleic acids research* 44 (12), S. 5957–5970. DOI: 10.1093/nar/gkw420.

Beekwilder, Jules; van Rossum, Harmen M.; Koopman, Frank; Sonntag, Frank; Buchhaupt, Markus; Schrader, Jens et al. (2014): Polycistronic expression of a β -carotene biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* coupled to β -ionone production. In: *Journal of biotechnology* 192 Pt B, S. 383–392. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.12.016.

Blakeley, Brett D.; Chapman, Alex M.; McNaughton, Brian R. (2012): Split-superpositive GFP reassembly is a fast, efficient, and robust method for detecting protein-protein interactions in vivo. In: *Molecular bioSystems* 8 (8), S. 2036–2040. DOI: 10.1039/c2mb25130b.

Bolte, Melanie; Dieckhoff, Patrick; Krause, Cindy; Braus, Gerhard H.; Irniger, Stefan (2003): Synergistic inhibition of APC/C by glucose and activated Ras proteins can be mediated by each of the Tpk1–3 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Microbiology (Reading, England)* 149 (5), S. 1205–1216. DOI: 10.1099/mic.0.26062-0.

Bömke, Christiane; Tudzynski, Bettina (2009): Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. In: *Phytochemistry* 70 (15-16), S. 1876–1893. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.05.020.

- Boyden, Edward S.; Zhang, Feng; Bamberg, Ernst; Nagel, Georg; Deisseroth, Karl (2005): Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. In: *Nature neuroscience* 8 (9), S. 1263–1268. DOI: 10.1038/nn1525.
- Boy-Marcotte, E.; Tadi, D.; Perrot, M.; Boucherie, H.; Jacquet, M. (1996): High cAMP levels antagonize the reprogramming of gene expression that occurs at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Microbiology (Reading, England)* 142 (Pt 3), S. 459–467. DOI: 10.1099/13500872-142-3-459.
- Broach, J. R. (1991): RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. In: *Trends in genetics : TIG* 7 (1), S. 28–33. DOI: 10.1016/0168-9525(91)90018-1.
- Brochado, Ana Rita; Matos, Claudia; Møller, Birger L.; Hansen, Jørgen; Mortensen, Uffe H.; Patil, Kiran Raosaheb (2010): Improved vanillin production in baker's yeast through in silico design. In: *Microbial cell factories* 9, S. 84. DOI: 10.1186/1475-2859-9-84.
- Bröker, Jan Niklas; Müller, Boje; van Deenen, Nicole; Prüfer, Dirk; Schulze Gronover, Christian (2018): Upregulating the mevalonate pathway and repressing sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* enhances the production of triterpenes. In: *Applied microbiology and biotechnology* 102 (16), S. 6923–6934. DOI: 10.1007/s00253-018-9154-7.
- Burg, John S.; Espenshade, Peter J. (2011): Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. In: *Prog Lipid Res* 50 (4), S. 403–410. DOI: 10.1016/j.plipres.2011.07.002.
- Butcher, Rebecca A.; Bhullar, Bhupinder S.; Perlstein, Ethan O.; Marsischky, Gerald; LaBaer, Joshua; Schreiber, Stuart L. (2006): Microarray-based method for monitoring yeast overexpression strains reveals small-molecule targets in TOR pathway. In: *Nature chemical biology* 2 (2), S. 103–109. DOI: 10.1038/nchembio762.
- Cavaliere, Duccio; McGovern, Patrick E.; Hartl, Daniel L.; Mortimer, Robert; Polsinelli, Mario (2003): Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. In: *Journal of molecular evolution* 57 Suppl 1, S226-32. DOI: 10.1007/s00239-003-0031-2.
- Chamyuang, Sunita; Owatworakit, Amorn; Honda, Yoichi (2019): New insights into cordycepin production in *Cordyceps militaris* and applications. In: *Annals of translational medicine* 7 (Suppl 3), S78. DOI: 10.21037/atm.2019.04.12.
- Chen, Jenny C-Y; Powers, Ted (2006): Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*. In: *Current genetics* 49 (5), S. 281–293. DOI: 10.1007/s00294-005-0055-9.
- Christie, John M.; Reymond, Philippe; Powell, Gary K.; Bernasconi, Paul; Raibekas, Andrei A.; Liscum, Emmanuel; Briggs, Winslow R. (1998): Arabidopsis NPH1: A Flavoprotein with the Properties of a Photoreceptor for Phototropism. In: *Science* 282 (5394), S. 1698–1701. DOI: 10.1126/science.282.5394.1698.

- Crechet, J. B.; Poulet, P.; Mistou, M. Y.; Parmeggiani, A.; Camonis, J.; Boy-Marcotte, E. et al. (1990): Enhancement of the GDP-GTP exchange of RAS proteins by the carboxyl-terminal domain of SCD25. In: *Science* 248 (4957), S. 866–868. DOI: 10.1126/science.2188363.
- Crosson, S.; Moffat, K. (2001): Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (6), S. 2995–3000. DOI: 10.1073/pnas.051520298.
- Czarnotta, E.; Dianat, M.; Korf, M.; Granica, F.; Merz, J.; Maury, J. et al. (2017): Fermentation and purification strategies for the production of betulinic acid and its lupane-type precursors in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biotechnology and bioengineering* 114 (11), S. 2528–2538. DOI: 10.1002/bit.26377.
- Davidson, S. E.; Elliott, R. C.; Helliwell, C. A.; Poole, A. T.; Reid, J. B. (2003): The pea gene NA encodes ent-kaurenoic acid oxidase. In: *Plant physiology* 131 (1), S. 335–344. DOI: 10.1104/pp.012963.
- Di Veroli, G.; Fornari, C.; Goldlust, I.; Mills, G.; Koh, S. B.; Bramhall, J. L. et al. (2015): An automated fitting procedure and software for dose-response curves with multiphasic features. In: *Sci Rep* 5, S. 14701. DOI: 10.1038/srep14701.
- DiCarlo, J. E.; Norville, J. E.; Mali, P.; Rios, X.; Aach, J.; Church, G. M. (2013): Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. In: *Nucleic acids research* 41 (7), S. 4336–4343. DOI: 10.1093/nar/gkt135.
- Dimster-Denk, D.; Thorsness, M. K.; Rine, J. (1994): Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Mol Biol Cell* 5 (6), S. 655–665. DOI: 10.1091/mbc.5.6.655.
- Domratcheva, T.; Grigorenko, B. L.; Schlichting, I.; Nemukhin, A. V. (2008): Molecular models predict light-induced glutamine tautomerization in BLUF photoreceptors. In: *Biophys J* 94 (10), S. 3872–3879. DOI: 10.1529/biophysj.107.124172.
- Domratcheva, T.; Hartmann, E.; Schlichting, I.; Kottke, T. (2016): Evidence for Tautomerisation of Glutamine in BLUF Blue Light Receptors by Vibrational Spectroscopy and Computational Chemistry. In: *Sci Rep* 6, S. 22669. DOI: 10.1038/srep22669.
- Duplus-Bottin, H.; Spichy, M.; Triqueneaux, G.; Place, C.; Mangeot, P.; Ohlmann, T. et al. (2020): A monogenic and fast-responding Light-Inducible Cre recombinase as a novel optogenetic switch (10).
- Essen, L.-O.; Franz, S.; Banerjee, A. (2017): Structural and evolutionary aspects of algal blue light receptors of the cryptochrome and aureochrome type. In: *Journal of plant physiology* 217, S. 27–37. DOI: 10.1016/j.jplph.2017.07.005.

- Feng, Siyu; Sekine, Sayaka; Pessino, Veronica; Li, Han; Leonetti, Manuel D.; Huang, Bo (2017): Improved split fluorescent proteins for endogenous protein labeling. In: *Nature communications* 8 (1), S. 370. DOI: 10.1038/s41467-017-00494-8.
- Fiechter, A.; Fuhrmann, G. F.; Käppeli, O. (1981): Regulation of Glucose Metabolism in Growing Yeast Cells: Elsevier.
- Finley, Daniel; Ulrich, Helle D.; Sommer, Thomas; Kaiser, Peter (2012): The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genetics* 192 (2), S. 319–360. DOI: 10.1534/genetics.112.140467.
- Finn, Robert D.; Mistry, Jaina; Schuster-Böckler, Benjamin; Griffiths-Jones, Sam; Hollich, Volker; Lassmann, Timo et al. (2006): Pfam: clans, web tools and services. In: *Nucleic acids research* 34 (Database issue), D247-51. DOI: 10.1093/nar/gkj149.
- François, J.; Parrou, J. L. (2001): Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *FEMS microbiology reviews* 25 (1), S. 125–145. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00574.x.
- Fulda, Simone; Friesen, Claudia; Los, Marek; Scaffidi, Carsten; Mier, Walter; Benedict, Mary et al. (1997): Betulinic Acid Triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent Apoptosis via Activation of Caspases in Neuroectodermal Tumors. In: *Cancer Research* 57 (21), S. 4956–4964. Online verfügbar unter <https://cancerres.aacrjournals.org/content/57/21/4956>.
- Gancedo, Juana M. (2008): The early steps of glucose signalling in yeast. In: *FEMS microbiology reviews* 32 (4), S. 673–704. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00117.x.
- Gauden, Magdalena; Grinstead, Jeffrey S.; Laan, Wouter; van Stokkum, Ivo H. M.; Avila-Perez, Marcela; Toh, K. C. et al. (2007): On the role of aromatic side chains in the photoactivation of BLUF domains. In: *Biochemistry* 46 (25), S. 7405–7415. DOI: 10.1021/bi7006433.
- Gauden, Magdalena; Yermenko, Sergey; Laan, Wouter; van Stokkum, Ivo H. M.; Ihalainen, Janne A.; van Grondelle, Rienk et al. (2005): Photocycle of the Flavin-Binding Photoreceptor AppA, a Bacterial Transcriptional Antirepressor of Photosynthesis Genes. In: *Biochemistry* 44 (10), S. 3653–3662. DOI: 10.1021/bi047359a.
- Giaever, Guri; Chu, Angela M.; Ni, Li; Connelly, Carla; Riles, Linda; Véronneau, Steeve et al. (2002): Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. In: *Nature* 418 (6896), S. 387–391. DOI: 10.1038/nature00935.
- Giorgio Scita (1992): The stability of β -carotene under different laboratory conditions. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry* 3 (3), S. 124–128. DOI: 10.1016/0955-2863(92)90104-Q.
- Glantz, Spencer T.; Carpenter, Eric J.; Melkonian, Michael; Gardner, Kevin H.; Boyden, Edward S.; Wong, Kane Ka-Shu; Chow, Brian Y. (2016): Functional and topological diversity of LOV domain photoreceptors. In: *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America 113 (11), E1442-51. DOI: 10.1073/pnas.1509428113.

Goder, Veit; Junne, Tina; Spiess, Martin (2004): Sec61p contributes to signal sequence orientation according to the positive-inside rule. In: *Mol Biol Cell* 15 (3), S. 1470–1478. DOI: 10.1091/mbc.e03-08-0599.

Goenrich, Juri (2019): Development of optogenetic tools for the regulation of protein stability and site-directed proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Masterarbeit, Philipps-Universität Marburg 2019.

Gradinaru, Viviana; Zhang, Feng; Ramakrishnan, Charu; Mattis, Joanna; Prakash, Rohit; Diester, Ilka et al. (2010): Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. In: *Cell* 141 (1), S. 154–165. DOI: 10.1016/j.cell.2010.02.037.

Grusch, Michael; Schelch, Karin; Riedler, Robert; Reichhart, Eva; Differ, Christopher; Berger, Walter et al. (2014): Spatio-temporally precise activation of engineered receptor tyrosine kinases by light. In: *The EMBO journal* 33 (15), S. 1713–1726. DOI: 10.15252/embj.201387695.

Guntas, Gurkan; Hallett, Ryan A.; Zimmerman, Seth P.; Williams, Tishan; Yumerefendi, Hayretin; Bear, James E.; Kuhlman, Brian (2015): Engineering an improved light-induced dimer (iLID) for controlling the localization and activity of signaling proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (1), S. 112–117. DOI: 10.1073/pnas.1417910112.

Halavaty, Andrei S.; Moffat, Keith (2007): N- and C-terminal flanking regions modulate light-induced signal transduction in the LOV2 domain of the blue light sensor phototropin 1 from *Avena sativa*. In: *Biochemistry* 46 (49), S. 14001–14009. DOI: 10.1021/bi701543e.

Hardy, T. A.; Roach, P. J. (1993): Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (32), S. 23799–23805.

Harper, Shannon; Neil, Lori; Gardner, Kevin (2003): Structural basis of a phototropin light switch. *Science* 301, 1541-1544. In: *Science (New York, N.Y.)* 301, S. 1541–1544. DOI: 10.1126/science.1086810.

Hasenjäger, Sophia (2018): Entwicklung eines ultrasensitiven optogenetischen Schalters zur Kontrolle der Proteinmenge. Masterarbeit, Philipps-Universität Marburg 2018.

Hasenjäger, Sophia; Scheffer, Johannes; Trauth, Jonathan; Taxis, Christof (2019a): Lichtsignale für die Hefe. In: *Biospektrum* 25 (6), S. 628–630. DOI: 10.1007/s12268-019-0212-1.

Hasenjäger, Sophia; Trauth, Jonathan; Hepp, Sebastian; Goenrich, Juri; Essen, Lars-Oliver; Taxis, Christof (2019b): Optogenetic Downregulation of Protein Levels with an Ultrasensitive Switch. In: *ACS synthetic biology* 8 (5), S. 1026–1036. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00471.

- Hegemann, Peter; Möglich, Andreas (2011): Channelrhodopsin engineering and exploration of new optogenetic tools. In: *Nature methods* 8 (1), S. 39–42. DOI: 10.1038/nmeth.f.327.
- Heintz, Udo; Schlichting, Ilme; Dötsch, Volker (2016): Blue light-induced LOV domain dimerization enhances the affinity of Aureochrome 1a for its target DNA sequence. In: *eLife* 5, e11860. DOI: 10.7554/eLife.11860.
- Helliwell, Chris A.; Chandler, Peter M.; Poole, Andrew; Dennis, Elizabeth S.; Peacock, W. James (2001): The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (4), S. 2065–2070. DOI: 10.1073/pnas.98.4.2065.
- Hepp, Sebastian; Trauth, Jonathan; Hasenjäger, Sophia; Bezold, Filipp; Essen, Lars-Oliver; Taxis, Christof (2020): An Optogenetic Tool for Induced Protein Stabilization Based on the *Phaeodactylum tricornutum* Aureochrome 1a Light-Oxygen-Voltage Domain. In: *Journal of molecular biology* 432 (7), S. 1880–1900. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.02.019.
- Herman, Elena; Sachse, Matthias; Kroth, Peter G.; Kottke, Tilman (2013): Blue-light-induced unfolding of the α helix allows for the dimerization of aureochrome-LOV from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Biochemistry* 52 (18), S. 3094–3101. DOI: 10.1021/bi400197u.
- Hershko, Avram; Ciechanover, Aaron (1998): THE UBIQUITIN SYSTEM. In: *Annual Review of Biochemistry* 67 (1), S. 425–479. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.425.
- Hong, Kuk-Ki; Nielsen, Jens (2012): Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69 (16), S. 2671–2690. DOI: 10.1007/s00018-012-0945-1.
- Huala, E.; Oeller, P. W.; Liscum, E.; Han, I. S.; Larsen, E.; Briggs, W. R. (1997): Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. In: *Science* 278 (5346), S. 2120–2123. DOI: 10.1126/science.278.5346.2120.
- Huang, Hanghang; Kawamata, Tomoko; Horie, Tetsuro; Tsugawa, Hiroshi; Nakayama, Yasumune; Ohsumi, Yoshinori; Fukusaki, Eiichiro (2015): Bulk RNA degradation by nitrogen starvation-induced autophagy in yeast. In: *The EMBO journal* 34 (2), S. 154–168. DOI: 10.15252/embj.201489083.
- Huang, Lili; Li, Jia; Ye, Hechun; Li, Changfu; Wang, Hong; Liu, Benye; Zhang, Yansheng (2012): Molecular characterization of the pentacyclic triterpenoid biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus*. In: *Planta* 236 (5), S. 1571–1581. DOI: 10.1007/s00425-012-1712-0.
- Huh, Won-Ki; Falvo, James V.; Gerke, Luke C.; Carroll, Adam S.; Howson, Russell W.; Weissman, Jonathan S.; O'Shea, Erin K. (2003): Global analysis of protein localization in budding yeast. In: *Nature* 425 (6959), S. 686–691. DOI: 10.1038/nature02026.

- Inobe, Tomonao; Matouschek, Andreas (2014): Paradigms of protein degradation by the proteasome. In: *Current opinion in structural biology* 24, S. 156–164. DOI: 10.1016/j.sbi.2014.02.002.
- Irniger, S.; Bäumer, M.; Braus, G. H. (2000): Glucose and ras activity influence the ubiquitin ligases APC/C and SCF in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genetics* 154 (4), S. 1509–1521.
- Jansen, Vera; Alvarez, Luis; Balbach, Melanie; Strünker, Timo; Hegemann, Peter; Kaupp, U. Benjamin et al. (2015): Controlling fertilization and cAMP signaling in sperm by optogenetics. In: *eLife* 4, e05161. DOI: 10.7554/eLife.05161.
- Jennings, S. M.; Tsay, Y. H.; Fisch, T. M.; Robinson, G. W. (1991): Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (14), S. 6038–6042. DOI: 10.1073/pnas.88.14.6038.
- Jiapeng, Tang; Yiting, Liu; Li, Zhu (2014): Optimization of fermentation conditions and purification of cordycepin from *Cordyceps militaris*. In: *Preparative biochemistry & biotechnology* 44 (1), S. 90–106. DOI: 10.1080/10826068.2013.833111.
- Jorgensen, Paul; Rupes, Ivan; Sharom, Jeffrey R.; Schneper, Lisa; Broach, James R.; Tyers, Mike (2004): A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. In: *Genes & development* 18 (20), S. 2491–2505. DOI: 10.1101/gad.1228804.
- Jungbluth, Marc; Renicke, Christian; Taxis, Christof (2010): Targeted protein depletion in *Saccharomyces cerevisiae* by activation of a bidirectional degenron. In: *BMC systems biology* 4 (1), S. 176. DOI: 10.1186/1752-0509-4-176.
- Kavšček, Martin; Stražar, Martin; Curk, Tomaž; Natter, Klaus; Petrovič, Uroš (2015): Yeast as a cell factory: current state and perspectives. In: *Microbial cell factories* 14, S. 94. DOI: 10.1186/s12934-015-0281-x.
- Kennedy, Matthew J.; Hughes, Robert M.; Peteya, Leslie A.; Schwartz, Joel W.; Ehlers, Michael D.; Tucker, Chandra L. (2010): Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. In: *Nature methods* 7 (12), S. 973–975. DOI: 10.1038/nmeth.1524.
- Klapper, Simon D.; Swiersy, Anka; Bamberg, Ernst; Busskamp, Volker (2016): Biophysical Properties of Optogenetic Tools and Their Application for Vision Restoration Approaches. In: *Frontiers in systems neuroscience* 10, S. 74. DOI: 10.3389/fnsys.2016.00074.
- Köksal, Mustafa; Potter, Kevin; Peters, Reuben J.; Christianson, David W. (2014): 1.55Å-resolution structure of ent-copalyl diphosphate synthase and exploration of general acid function by site-directed mutagenesis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1840 (1), S. 184–190. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.09.004.

- Krasutsky, P. A.; Carlson, R. M.; Nesterenko, V. V.; Im Kolomitsyn; Edwardson, C. F. (2003): Birch bark processing and the isolation of natural products from birch bark. Veröffentlichungsnr: No US 6,634,575 B2.
- Krivoruchko, Anastasia; Siewers, Verena; Nielsen, Jens (2011): Opportunities for yeast metabolic engineering: Lessons from synthetic biology. In: *Biotechnology journal* 6 (3), S. 262–276. DOI: 10.1002/biot.201000308.
- Krogh, A.; Larsson, B.; Heijne, G. von; Sonnhammer, E. L. (2001): Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. In: *Journal of molecular biology* 305 (3), S. 567–580. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4315.
- Kuranda, Klaudia; François, Jean; Palamarczyk, Grażyna (2009): The isoprenoid pathway and transcriptional response to its inhibitors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *FEMS Yeast Research* 10 (1), S. 14–27. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2009.00560.x.
- Lange, T.; Hedden, P.; Graebe, J. E. (1994): Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (18), S. 8552–8556. DOI: 10.1073/pnas.91.18.8552.
- Leber, Regina; Fuchsbichler, Sandra; Klobučníková, Vlasta; Schweighofer, Natascha; Pitters, Eva; Wohlfarter, Kathrin et al. (2003): Molecular mechanism of terbinafine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 47 (12), S. 3890–3900. DOI: 10.1128/aac.47.12.3890-3900.2003.
- Lester, D. R.; Ross, J. J.; Davies, P. J.; Reid, J. B. (1997): Mendel's stem length gene (*Le*) encodes a gibberellin 3 beta-hydroxylase. In: *The Plant cell* 9 (8), S. 1435–1443. DOI: 10.1105/tpc.9.8.1435.
- Li, Jing; Zhang, Yansheng (2014): Increase of betulinic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by balancing fatty acids and betulinic acid forming pathways. In: *Applied microbiology and biotechnology* 98 (7), S. 3081–3089. DOI: 10.1007/s00253-013-5461-1.
- Li, Jing; Zhang, Yansheng (2015): Modulating betulinic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by managing the intracellular supplies of the co-factor NADPH and oxygen. In: *Journal of bioscience and bioengineering* 119 (1), S. 77–81. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.06.013.
- Lin, K.; Rath, V. L.; Dai, S. C.; Fletterick, R. J.; Hwang, P. K. (1996): A protein phosphorylation switch at the conserved allosteric site in GP. In: *Science* 273 (5281), S. 1539–1542. DOI: 10.1126/science.273.5281.1539.
- Lorenz, M. C.; Pan, X.; Harashima, T.; Cardenas, M. E.; Xue, Y.; Hirsch, J. P.; Heitman, J. (2000): The G protein-coupled receptor *gpr1* is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal

differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genetics* 154 (2), S. 609–622. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10655215>.

Losi, Aba; Gardner, Kevin H.; Möglich, Andreas (2018): Blue-Light Receptors for Optogenetics. In: *Chemical reviews* 118 (21), S. 10659–10709. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00163.

Lungu, Oana I.; Hallett, Ryan A.; Choi, Eun Jung; Aiken, Mary J.; Hahn, Klaus M.; Kuhlman, Brian (2012): Designing photoswitchable peptides using the AsLOV2 domain. In: *Chemistry & biology* 19 (4), S. 507–517. DOI: 10.1016/j.chembiol.2012.02.006.

Ma, P.; Wera, S.; van Dijck, P.; Thevelein, J. M. (1999): The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. In: *Mol Biol Cell* 10 (1), S. 91–104. DOI: 10.1091/mbc.10.1.91.

Madsen, Karina M.; Udatha, Gupta D. B. R. K.; Semba, Saori; Otero, Jose M.; Koetter, Peter; Nielsen, Jens et al. (2011): Linking genotype and phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals metabolic engineering targets and leads to triterpene hyper-producers. In: *PLoS one* 6 (3), e14763. DOI: 10.1371/journal.pone.0014763.

Magome, Hiroshi; Nomura, Takahito; Hanada, Atsushi; Takeda-Kamiya, Noriko; Ohnishi, Toshiyuki; Shinma, Yuko et al. (2013): CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (5), S. 1947–1952. DOI: 10.1073/pnas.1215788110.

Mattanovich, Diethard; Sauer, Michael; Gasser, Brigitte (2014): Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. In: *Microbial cell factories* 13 (1), S. 34. DOI: 10.1186/1475-2859-13-34.

McGovern, Patrick E.; Zhang, Juzhong; Tang, Jigen; Zhang, Zhiqing; Hall, Gretchen R.; Moreau, Robert A. et al. (2004): Fermented beverages of pre- and proto-historic China. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (51), S. 17593–17598. DOI: 10.1073/pnas.0407921102.

Miyamoto, Takafumi; DeRose, Robert; Suarez, Allison; Ueno, Tasuku; Chen, Melinda; Sun, Tai-ping et al. (2012): Rapid and orthogonal logic gating with a gibberellin-induced dimerization system. In: *Nature chemical biology* 8 (5), S. 465–470. DOI: 10.1038/nchembio.922.

Möglich, Andreas; Ayers, Rebecca A.; Moffat, Keith (2009): Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. In: *Structure (London, England : 1993)* 17 (10), S. 1282–1294. DOI: 10.1016/j.str.2009.08.011.

- Mondal, Payel; Krishnamurthy, Vishnu V.; Sharum, Savanna R.; Haack, Neeka; Zhou, Huiwen; Cheng, Jennifer et al. (2019): Repurposing Protein Degradation for Optogenetic Modulation of Protein Activities. In: *ACS synthetic biology* 8 (11), S. 2585–2592. DOI: 10.1021/acssynbio.9b00285.
- Murase, Kohji; Hirano, Yoshinori; Sun, Tai-ping; Hakoshima, Toshio (2008): Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. In: *Nature* 456 (7221), S. 459–463. DOI: 10.1038/nature07519.
- Nakajima, Masatoshi; Shimada, Asako; Takashi, Yoshiyuki; Kim, Young-Cheon; Park, Seung-Hyun; Ueguchi-Tanaka, Miyako et al. (2006): Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 46 (5), S. 880–889. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02748.x.
- Namy, Olivier; Duchateau-Nguyen, Guillemette; Rousset, Jean-Pierre (2002): Translational readthrough of the PDE2 stop codon modulates cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular Microbiology* 43 (3), S. 641–652. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02770.x.
- National Center for Biotechnology Information: PubChem Annotation Record for GIBBERELLIC ACID, Source: Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Hg. v. PubChem. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/712#section=Mechanism-of-Action>, zuletzt geprüft am 6 December, 2020.
- Nielsen, J. (2001): Metabolic engineering. In: *Applied microbiology and biotechnology* 55 (3), S. 263–283. DOI: 10.1007/s002530000511.
- Nielsen, Jens; Keasling, Jay D. (2011): Synergies between synthetic biology and metabolic engineering. In: *Nature biotechnology* 29 (8), S. 693–695. DOI: 10.1038/nbt.1937.
- Nielsen, Jens; Keasling, Jay D. (2016): Engineering Cellular Metabolism. In: *Cell* 164 (6), S. 1185–1197. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.004.
- Niopek, Dominik; Wehler, Pierre; Roensch, Julia; Eils, Roland; Di Ventura, Barbara (2016): Optogenetic control of nuclear protein export. In: *Nature communications* 7, S. 10624. DOI: 10.1038/ncomms10624.
- O’Banion, Colin P.; Lawrence, David S. (2018): Optogenetics: A Primer for Chemists. In: *ChemBioChem* 19 (12), S. 1201–1216. DOI: 10.1002/cbic.201800013.
- Oesterhelt, D.; StoECKenius, W. (1971): Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. In: *Nature: New biology* 233 (39), S. 149–152. DOI: 10.1038/newbio233149a0.
- Ohlendorf, Robert; Vidavski, Roee R.; Eldar, Avigdor; Moffat, Keith; Möglich, Andreas (2012): From dusk till dawn: one-plasmid systems for light-regulated gene expression. In: *Journal of molecular biology* 416 (4), S. 534–542. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.01.001.

- Orth, P.; Cordes, F.; Schnappinger, D.; Hillen, W.; Saenger, W.; Hinrichs, W. (1998): Conformational changes of the Tet repressor induced by tetracycline trapping. In: *Journal of molecular biology* 279 (2), S. 439–447. DOI: 10.1006/jmbi.1998.1775.
- Palecek, Sean P.; Parikh, Archita S.; Kron, Stephen J. (2002): Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. In: *Microbiology (Reading, England)* 148 (Pt 4), S. 893–907. DOI: 10.1099/00221287-148-4-893.
- Peng, Bingyin; Plan, Manuel R.; Chrysanthopoulos, Panagiotis; Hodson, Mark P.; Nielsen, Lars K.; Vickers, Claudia E. (2017): A squalene synthase protein degradation method for improved sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Metabolic engineering* 39, S. 209–219. DOI: 10.1016/j.ymben.2016.12.003.
- Peng, Junmin; Schwartz, Daniel; Elias, Joshua E.; Thoreen, Carson C.; Cheng, Dongmei; Marsischky, Gerald et al. (2003): A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. In: *Nature biotechnology* 21 (8), S. 921–926. DOI: 10.1038/nbt849.
- Qin, Peng; Li, XiangKai; Yang, Hui; Wang, Zhi-Ye; Lu, DengXue (2019): Therapeutic Potential and Biological Applications of Cordycepin and Metabolic Mechanisms in Cordycepin-Producing Fungi. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (12). DOI: 10.3390/molecules24122231.
- Ravid, Tommer; Hochstrasser, Mark (2008): Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (9), S. 679–690. DOI: 10.1038/nrm2468.
- Razaghi-Moghadam, Zahra; Nikoloski, Zoran (2020): Supervised learning of gene-regulatory networks based on graph distance profiles of transcriptomics data. In: *NPJ Syst Biol Appl* 6 (1), S. 21. DOI: 10.1038/s41540-020-0140-1.
- René Csuk; Kianga Schmuck; Renate Schäfer (2006): A practical synthesis of betulinic acid. In: *Tetrahedron Letters* 47 (49), S. 8769–8770. DOI: 10.1016/j.tetlet.2006.10.004.
- Renicke, Christian; Schuster, Daniel; Usherenko, Svetlana; Essen, Lars-Oliver; Taxis, Christof (2013): A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function. In: *Chemistry & biology* 20 (4), S. 619–626. DOI: 10.1016/j.chembiol.2013.03.005.
- Ressmann, Anna K.; Kremsmayr, Thomas; Gaertner, Peter; Zirbs, Ronald; Bica, Katharina (2017): Toward a benign strategy for the manufacturing of betulinic acid. In: *Green Chem* 19 (4), S. 1014–1022. DOI: 10.1039/C6GC02641A.
- Rico, Juan; Pardo, Ester; Orejas, Margarita (2010): Enhanced production of a plant monoterpene by overexpression of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase

catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Applied and environmental microbiology* 76 (19), S. 6449–6454. DOI: 10.1128/AEM.02987-09.

Ro, Dae-Kyun; Paradise, Eric M.; Ouellet, Mario; Fisher, Karl J.; Newman, Karyn L.; Ndungu, John M. et al. (2006): Production of the antimalarial drug precursor artemisinin acid in engineered yeast. In: *Nature* 440 (7086), S. 940–943. DOI: 10.1038/nature04640.

Rodrigues, Cristine; Vandenberghe, Luciana Porto de Souza; Oliveira, Juliana de; Soccol, Carlos Ricardo (2012): New perspectives of gibberellic acid production: a review. In: *Critical reviews in biotechnology* 32 (3), S. 263–273. DOI: 10.3109/07388551.2011.615297.

Rolland, F.; Winde, J. H. de; Lemaire, K.; Boles, E.; Thevelein, J. M.; Winderickx, J. (2000): Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. In: *Molecular Microbiology* 38 (2), S. 348–358. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02125.x.

Santangelo, George M. (2006): Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (1), S. 253–282. DOI: 10.1128/MMBR.70.1.253-282.2006.

Scheffer, Johannes; Hasenjäger, Sophia; Taxis, Christof (2019): Degradation of integral membrane proteins modified with the photosensitive degron module requires the cytosolic endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. In: *Mol Biol Cell* 30 (20), S. 2558–2570. DOI: 10.1091/mbc.E18-12-0754.

Schmidt, Daniel; Cho, Yong Ku (2015): Natural photoreceptors and their application to synthetic biology. In: *Trends in biotechnology* 33 (2), S. 80–91. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.10.007.

Shcherbakova, Daria M.; Cox Cammer, Natasha; Huisman, Tsipora M.; Verkhusha, Vladislav V.; Hodgson, Louis (2018): Direct multiplex imaging and optogenetics of Rho GTPases enabled by near-infrared FRET. In: *Nature chemical biology* 14 (6), S. 591–600. DOI: 10.1038/s41589-018-0044-1.

Shengjie Hou; Jiang Zhu; Mingyu Ding; Guohua Lv (2008): Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. In: *Talanta* 76 (4), S. 798–802. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.04.041.

Shiba, Yoichiro; Paradise, Eric M.; Kirby, James; Ro, Dae-Kyun; Keasling, Jay D. (2007): Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids. In: *Metabolic engineering* 9 (2), S. 160–168. DOI: 10.1016/j.ymben.2006.10.005.

- Shimizu-Sato, Sae; Huq, Enamul; Tepperman, James M.; Quail, Peter H. (2002): A light-switchable gene promoter system. In: *Nature biotechnology* 20 (10), S. 1041–1044. DOI: 10.1038/nbt734.
- Šiman, Pavel; Filipová, Alžběta; Tichá, Alena; Niang, Mohamed; Bezrouk, Aleš; Havelek, Radim (2016): Effective Method of Purification of Betulin from Birch Bark: The Importance of Its Purity for Scientific and Medicinal Use. In: *PloS one* 11 (5), e0154933-e0154933. DOI: 10.1371/journal.pone.0154933.
- Stelling, Allison L.; Ronayne, Kate L.; Nappa, Jérôme; Tonge, Peter J.; Meech, Stephen R. (2007): Ultrafast Structural Dynamics in BLUF Domains: Transient Infrared Spectroscopy of AppA and Its Mutants. In: *Journal of the American Chemical Society* 129 (50), S. 15556–15564. DOI: 10.1021/ja074074n.
- Stephan, Joseph S.; Yeh, Yuh-Ying; Ramachandran, Vidhya; Deminoff, Stephen J.; Herman, Paul K. (2009): The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (40), S. 17049–17054. DOI: 10.1073/pnas.0903316106.
- Stewart-Ornstein, Jacob; Chen, Susan; Bhatnagar, Rajat; Weissman, Jonathan S.; El-Samad, Hana (2017): Model-guided optogenetic study of PKA signaling in budding yeast. In: *Mol Biol Cell* 28 (1), S. 221–227. DOI: 10.1091/mbc.E16-06-0354.
- Stierl, Manuela; Stumpf, Patrick; Udvari, Daniel; Gueta, Ronnie; Hagedorn, Rolf; Losi, Aba et al. (2011): Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa*. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (2), S. 1181–1188. DOI: 10.1074/jbc.M110.185496.
- Sun, Jie; Shao, Zengyi; Zhao, Hua; Nair, Nikhil; Wen, Fei; Xu, Jian-He; Zhao, Huimin (2012): Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biotechnology and bioengineering* 109 (8), S. 2082–2092. DOI: 10.1002/bit.24481.
- Takahashi, Fumio (2016): Blue-light-regulated transcription factor, Aureochrome, in photosynthetic stramenopiles. In: *Journal of plant research* 129 (2), S. 189–197. DOI: 10.1007/s10265-016-0784-5.
- Takashi Toda; Scott Cameron; Philip Sass; Mark Zoller; Michael Wigler (1987): Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. In: *Cell* 50 (2), S. 277–287. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90223-6.
- Takeuchi, Junko; Chen, Hui; Hoyt, Martin A.; Coffino, Philip (2008): Structural elements of the ubiquitin-independent proteasome degron of ornithine decarboxylase. In: *The Biochemical journal* 410 (2), S. 401–407. DOI: 10.1042/BJ20071239.

- Tanaka, K.; Matsumoto, K.; Toh-E, A. (1989): IRA1, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular and cellular biology* 9 (2), S. 757–768. DOI: 10.1128/mcb.9.2.757.
- Tanaka, K.; Nakafuku, M.; Tamanoi, F.; Kaziro, Y.; Matsumoto, K.; Toh-E, A. (1990): IRA2, a second gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein with a domain homologous to mammalian ras GTPase-activating protein. In: *Molecular and cellular biology* 10 (8), S. 4303–4313. DOI: 10.1128/mcb.10.8.4303.
- Thevelein, Johan M.; Winde, Johannes H. de (1999): Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP–protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular Microbiology* 33 (5), S. 904–918. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01538.x.
- Toettcher, Jared E.; Voigt, Christopher A.; Weiner, Orion D.; Lim, Wendell A. (2011): The promise of optogenetics in cell biology: interrogating molecular circuits in space and time. In: *Nature methods* 8 (1), S. 35–38. DOI: 10.1038/nmeth.f.326.
- Tohru Kataoka; Daniel Broek; Michael Wigler (1985): DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. In: *Cell* 43 (2, Part 1), S. 493–505. DOI: 10.1016/0092-8674(85)90179-5.
- Trauth, Jonathan (2017): Entwicklung und Charakterisierung von optogenetischen Modulen in *Saccharomyces cerevisiae*. Masterarbeit, Philipps-Universität Marburg 2017.
- Trauth, Jonathan; Scheffer, Johannes; Hasenjäger, Sophia; Taxis, Christof (2019): Synthetic Control of Protein Degradation during Cell Proliferation and Developmental Processes. In: *ACS Omega* 4 (2), S. 2766–2778. DOI: 10.1021/acsomega.8b03011.
- Trauth, Jonathan; Scheffer, Johannes; Hasenjäger, Sophia; Taxis, Christof (2020): Strategies to investigate protein turnover with fluorescent protein reporters in eukaryotic organisms. In: *AIMS Biophysics* 7 (2), S. 90–118. DOI: 10.3934/biophy.2020008.
- Tyo, Keith E.; Alper, Hal S.; Stephanopoulos, Gregory N. (2007): Expanding the metabolic engineering toolbox: more options to engineer cells. In: *Trends in biotechnology* 25 (3), S. 132–137. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.01.003.
- Ueguchi-Tanaka, Miyako; Nakajima, Masatoshi; Katoh, Etsuko; Ohmiya, Hiroko; Asano, Kenji; Saji, Shoko et al. (2007): Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, *GID1*, with a rice *DELLA* protein, *SLR1*, and gibberellin. In: *The Plant cell* 19 (7), S. 2140–2155. DOI: 10.1105/tpc.106.043729.
- Usherenko, Svetlana; Stibbe, Hilke; Musco, Massimiliano; Essen, Lars-Oliver; Kostina, Ekaterina A.; Taxis, Christof (2014): Photo-sensitive degron variants for tuning protein stability by light. In: *BMC systems biology* 8, S. 128. DOI: 10.1186/s12918-014-0128-9.
- Valentina Zuco; Rosanna Supino; Sabina C Righetti; Loredana Cleris; Edoardo Marchesi; Carlo Gambacorti-Passerini; Franca Formelli (2002): Selective cytotoxicity of betulinic acid

- on tumor cell lines, but not on normal cells. In: *Cancer Letters* 175 (1), S. 17–25. DOI: 10.1016/S0304-3835(01)00718-2.
- Varshavsky, A. (1991): Naming a targeting signal. In: *Cell* 64 (1), S. 13–15. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90202-a.
- Verwaal, René; Wang, Jing; Meijnen, Jean-Paul; Visser, Hans; Sandmann, Gerhard; van den Berg, Johan A.; van Ooyen, Albert J. J. (2007): High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. In: *Applied and environmental microbiology* 73 (13), S. 4342–4350. DOI: 10.1128/AEM.02759-06.
- Virgilio, Claudio de (2012): The essence of yeast quiescence. In: *FEMS microbiology reviews* 36 (2), S. 306–339. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00287.x.
- Vranová, Eva; Coman, Diana; Gruissem, Wilhelm (2013): Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. In: *Annual review of plant biology* 64, S. 665–700. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120116.
- Wagner Steuer Costa; Szi-chieh Yu; Jana F. Liewald; Alexander Gottschalk (2017): Fast cAMP Modulation of Neurotransmission via Neuropeptide Signals and Vesicle Loading. In: *Current Biology* 27 (4), S. 495–507. DOI: 10.1016/j.cub.2016.12.055.
- Wang, Hui; Vilela, Marco; Winkler, Andreas; Tarnawski, Mirosław; Schlichting, Ilme; Yumerefendi, Hayretin et al. (2016): LOVTRAP: an optogenetic system for photoinduced protein dissociation. In: *Nature methods* 13 (9), S. 755–758. DOI: 10.1038/nmeth.3926.
- Welter, Evelyn; Elazar, Zvulun (2015): Autophagy mediates nonselective RNA degradation in starving yeast. In: *The EMBO journal* 34 (2), S. 131–133. DOI: 10.15252/embj.201490621.
- Wick, W.; Grimmel, C.; Wagenknecht, B.; Dichgans, J.; Weller, M. (1999): Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 289 (3), S. 1306–1312.
- Wilmington, Shameika R.; Matouschek, Andreas (2016): An Inducible System for Rapid Degradation of Specific Cellular Proteins Using Proteasome Adaptors. In: *PloS one* 11 (4), e0152679. DOI: 10.1371/journal.pone.0152679.
- Wilson, Wayne A.; Wang, Zhong; Roach, Peter J. (2002): Systematic identification of the genes affecting glycogen storage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: implication of the vacuole as a determinant of glycogen level. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 1 (3), S. 232–242. DOI: 10.1074/mcp.m100024-mcp200.
- Wingender-Drissen, R.; Becker, J. U. (1983): Characterization of phosphoprotein phosphatases and phosphorylase phosphatase from yeast. In: *Biochimica et biophysica acta* 743 (3), S. 343–350. DOI: 10.1016/0167-4838(83)90392-8.

Wu, Gang; Hu, Yonghong; Gu, Pengfei; Yang, Wenge; Ding, Zhiwen; Wang, Chunxiao; Qian, Yonggen (2015): Solubility and Solution Thermodynamics of Gibberellin A 4 in Different Organic Solvents from 278.15 K to 333.15 K. In: *J. Chem. Eng. Data* 60 (7), S. 2104–2109. DOI: 10.1021/acs.jced.5b00190.

Wu, Qiong; Gardner, Kevin H. (2009): Structure and insight into blue light-induced changes in the BlrP1 BLUF domain. In: *Biochemistry* 48 (12), S. 2620–2629. DOI: 10.1021/bi802237r.

Xia, Yongliang; Luo, Feifei; Shang, Yanfang; Chen, Peilin; Lu, Yuzhen; Wang, Chengshu (2017): Fungal Cordycepin Biosynthesis Is Coupled with the Production of the Safeguard Molecule Pentostatin. In: *Cell chemical biology* 24 (12), 1479-1489.e4. DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.09.001.

Xiong, Liang; Zeng, Yu; Tang, Rui-Qi; Alper, Hal S.; Bai, Feng-Wu; Zhao, Xin-Qing (2018): Condition-specific promoter activities in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Microbial cell factories* 17 (1), S. 58. DOI: 10.1186/s12934-018-0899-6.

Yamaguchi, S.; Saito, T.; Abe, H.; Yamane, H.; Murofushi, N.; Kamiya, Y. (1996): Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme entkaurene synthase B from pumpkin (*Cucurbita maxima* L.). In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 10 (2), S. 203–213. DOI: 10.1046/j.1365-313x.1996.10020203.x.

Yan, Guo-liang; Wen, Ke-rui; Duan, Chang-qing (2012): Enhancement of β -carotene production by over-expression of HMG-CoA reductase coupled with addition of ergosterol biosynthesis inhibitors in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Current microbiology* 64 (2), S. 159–163. DOI: 10.1007/s00284-011-0044-9.

Yazawa, Masayuki; Sadaghiani, Amir M.; Hsueh, Brian; Dolmetsch, Ricardo E. (2009): Induction of protein-protein interactions in live cells using light. In: *Nature biotechnology* 27 (10), S. 941–945. DOI: 10.1038/nbt.1569.

Yuan, Hua; Bauer, Carl E. (2008): PixE promotes dark oligomerization of the BLUF photoreceptor PixD. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (33), S. 11715–11719. DOI: 10.1073/pnas.0802149105.

Yumerefendi, Hayretin; Wang, Hui; Dickinson, Daniel J.; Lerner, Andrew M.; Malkus, Per; Goldstein, Bob et al. (2018): Light-Dependent Cytoplasmic Recruitment Enhances the Dynamic Range of a Nuclear Import Photoswitch. In: *ChemBioChem* 19 (12), S. 1319–1325. DOI: 10.1002/cbic.201700681.

Zayner, Josiah P.; Antoniou, Chloe; French, Alexander R.; Hause, Ronald J, Jr; Sosnick, Tobin R. (2013): Investigating models of protein function and allostery with a widespread mutational analysis of a light-activated protein. In: *Biophys J* 105 (4), S. 1027–1036. DOI: 10.1016/j.bpj.2013.07.010.

Zayner, Josiah P.; Antoniou, Chloe; Sosnick, Tobin R. (2012): The amino-terminal helix modulates light-activated conformational changes in AsLOV2. In: *Journal of molecular biology* 419 (1-2), S. 61–74. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.02.037.

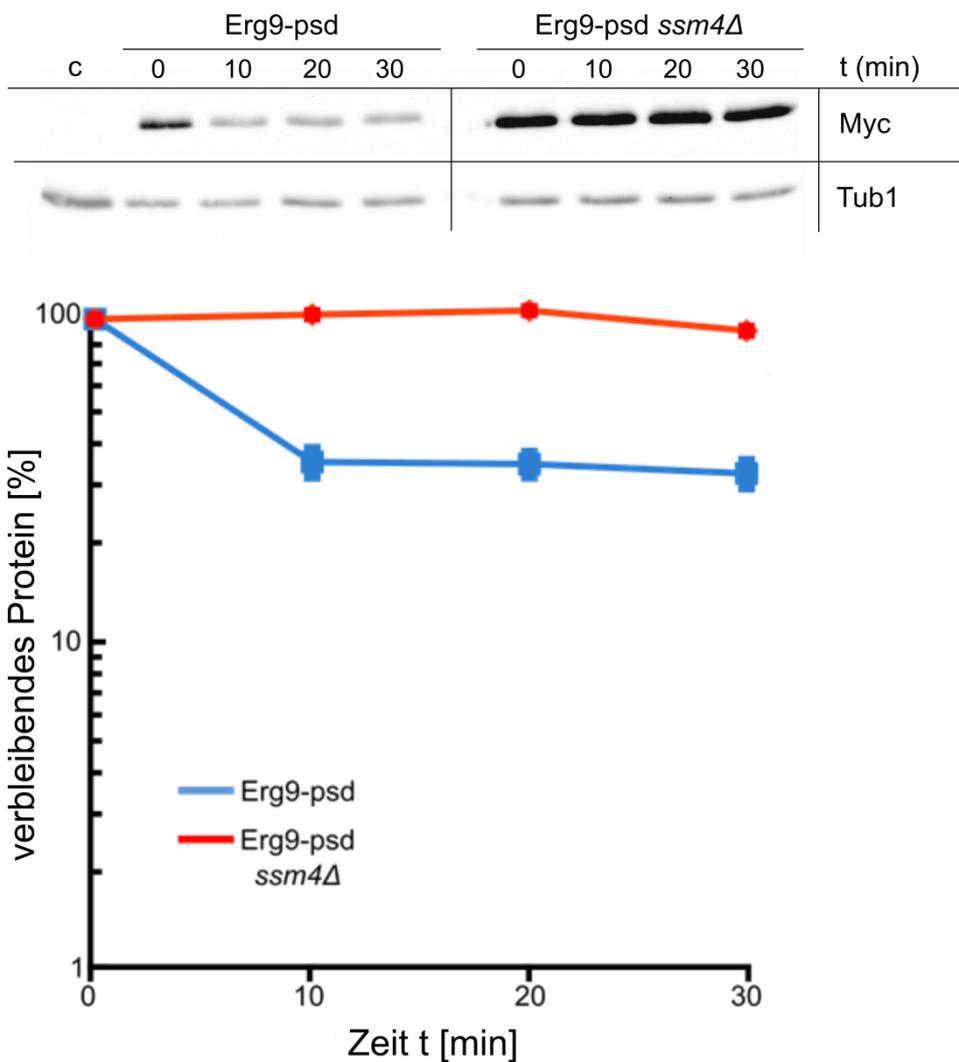
Zayner, Josiah P.; Sosnick, Tobin R. (2014): Factors That Control the Chemistry of the LOV Domain Photocycle. In: *PloS one* 9 (1), e87074. DOI: 10.1371/journal.pone.0087074.

Zhang, Qiang; Bhattacharya, Sudin; Andersen, Melvin E. (2013): Ultrasensitive response motifs: basic amplifiers in molecular signalling networks. In: *Open biology* 3 (4), S. 130031. DOI: 10.1098/rsob.130031.

Zhao, Evan M.; Zhang, Yanfei; Mehl, Justin; Park, Helen; Lalwani, Makoto A.; Toettcher, Jared E.; Avalos, José L. (2018): Optogenetic regulation of engineered cellular metabolism for microbial chemical production. In: *Nature* 555 (7698), S. 683–687. DOI: 10.1038/nature26141.

Zoltowski, Brian D.; Schwerdtfeger, Carsten; Widom, Joanne; Loros, Jennifer J.; Bilwes, Alexandrine M.; Dunlap, Jay C.; Crane, Brian R. (2007): Conformational switching in the fungal light sensor Vivid. In: *Science* 316 (5827), S. 1054–1057. DOI: 10.1126/science.1137128.

7 Anhang



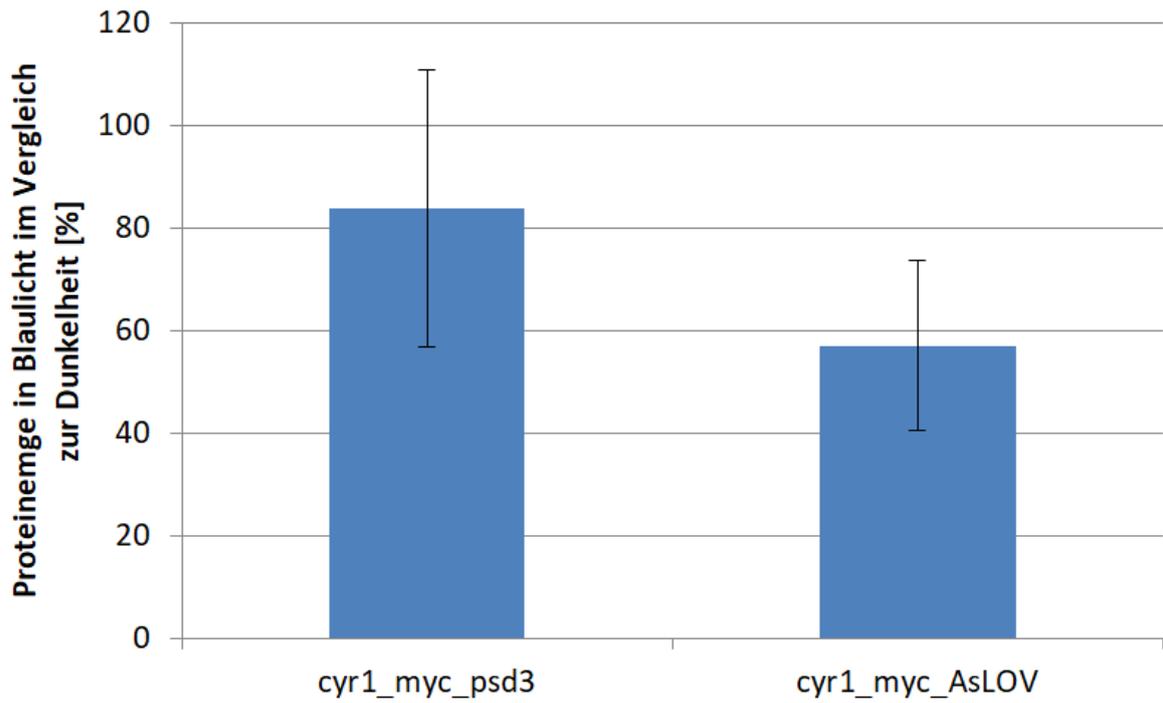
Anhang 1: Vergleich des psd induzierten Abbaus von Erg9 in einem *ssm4Δ*-Stamm und einem Wildtypstamm.

Anhang 2: Ergebnisse der mathematischen Modellierung des Hefemetabolismus. Beschriebene Regulationen sollen zu einer erhöhten FPP Verfügbarkeit führen.

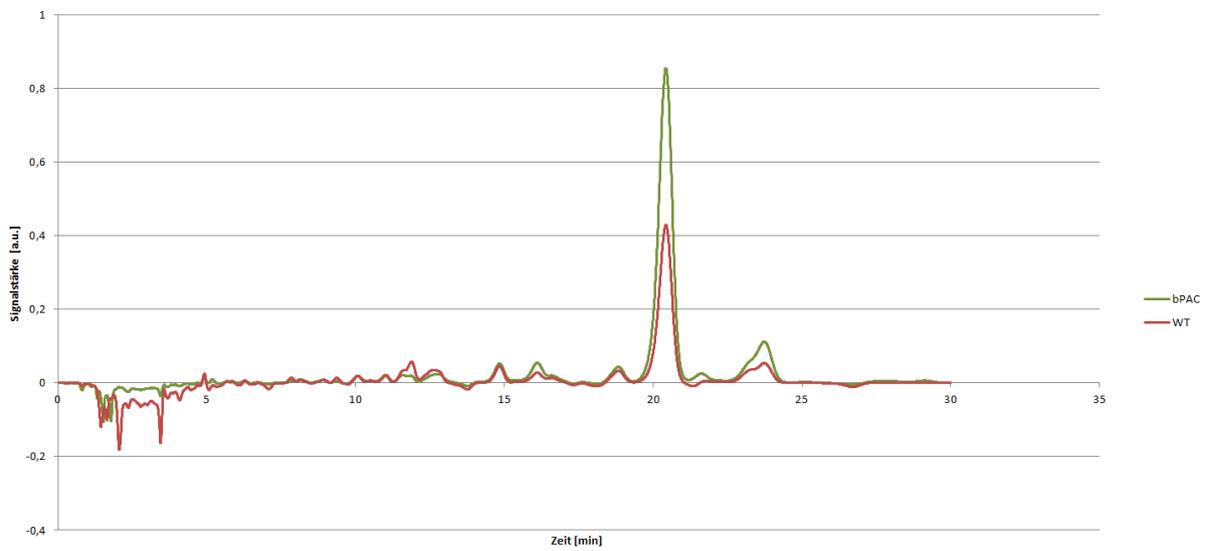
Systematischer Genname	Beschreibung	Regulation
YIL078W	threonine--tRNA ligase THS1(THS1)	down
YDR341C	arginine--tRNA ligase(YDR341C)	down
YDR037W	lysine--tRNA ligase KRS1(KRS1)	down
YPR033C	histidine--tRNA ligase(HTS1)	down
YBR121C	glycine--tRNA ligase(GRS1)	down
YBL076C	isoleucine--tRNA ligase ILS1(ILS1)	down
YGR264C	methionine--tRNA ligase MES1(MES1)	down

YPR081C	putative glycine--tRNA ligase(GRS2)	down
YLR060W	phenylalanine--tRNA ligase subunit beta(FRS1)	down
YOR168W	glutamine--tRNA ligase(GLN4)	down
YGR094W	valine--tRNA ligase(VAS1)	down
YHR011W	putative serine--tRNA ligase DIA4(DIA4)	down
YOL097C	tryptophan--tRNA ligase WRS1(WRS1)	down
YNL247W	cysteine--tRNA ligase(YNL247W)	down
YLL018C	aspartate--tRNA ligase DPS1(DPS1)	down
YGR185C	tyrosine--tRNA ligase TYS1(TYS1)	down
YHR019C	asparagine--tRNA ligase DED81(DED81)	down
YDR023W	serine--tRNA ligase SES1(SES1)	down
YOR335C	alanine--tRNA ligase(ALA1)	down
YHR020W	proline--tRNA ligase(YHR020W)	down
YPL160W	leucine--tRNA ligase CDC60(CDC60)	down
YGL245W	glutamate--tRNA ligase GUS1(GUS1)	down
YPR183W	dolichyl-phosphate beta-D-mannosyltransferase(DPM1)	down
YDR487C	3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase RIB3(RIB3)	down
YOR321W	dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase PMT3(PMT3)	down
YLR342W	1,3-beta-D-glucan synthase(FKS1)	down
YJR143C	dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase(PMT4)	down
YPR159W	beta-glucan synthesis-associated protein KRE6(KRE6)	down
YOL066C	bifunctional DRAP deaminase/tRNA pseudouridine synthase RIB2(RIB2)	down
YGR032W	1,3-beta-glucan synthase GSC2(GSC2)	down

YGR143W	beta-glucan synthesis-associated protein SKN1(SK1)	down
YBL033C	GTP cyclohydrolase II(RIB1)	down
YOL143C	lumazine synthase RIB4(RIB4)	down
YAL023C	dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase PMT2(PMT2)	down
YBR153W	2,5-diamino-6-(ribosylamino)-4(3H)-pyrimidinone 5'-phosphate reductase(RIB7)	down
YDL093W	putative dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase PMT5(PMT5)	down
YBR256C	riboflavin synthase(RIB5)	down
YDL055C	mannose-1-phosphate guanylyltransferase(PSA1)	down
YMR220W	phosphomevalonate kinase(ERG8)	up
YNR043W	diphosphomevalonate decarboxylase MVD1(MVD1)	up
YJL167W	bifunctional (2E,6E)-farnesyl diphosphate synthase/dimethylallyltranstransferase(ERG20)	up
YHR190W	bifunctional farnesyl-diphosphate farnesyltransferase/squalene synthase(ERG9)	up
YGR175C	squalene monooxygenase(ERG1)	up
YHR072W	lanosterol synthase ERG7(ERG7)	up

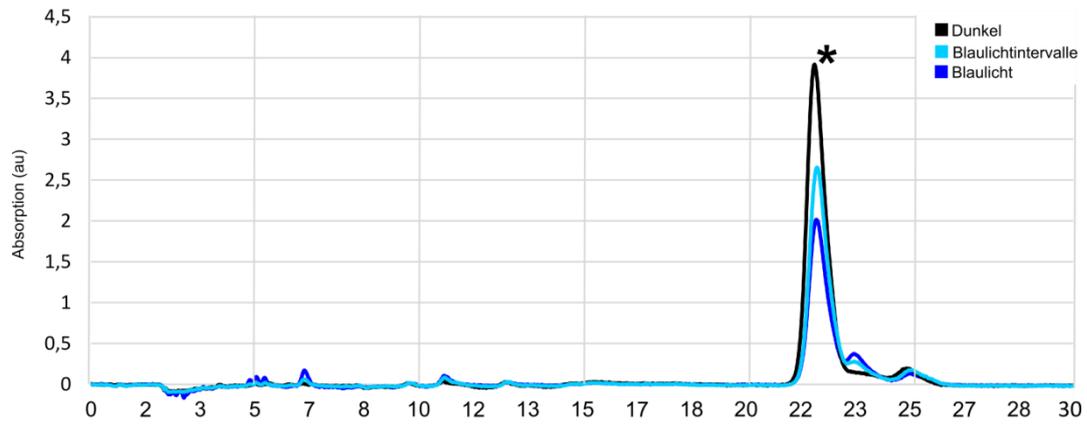


Anhang 3: Vergleich der cyr1 Menge in Blaulicht vs Dunkelheit. Diese Quantifizierung einer Immunodetektion wurde von Sophia Hasenjäger durchgeführt.



Anhang 4: Beispiel HPLC einer β -Carotin Produktion eines bPAC kontrollierten Stamms mit dem entsprechenden WT.

Beta-Carotin-Standard 4 mg/l



Anhang 5: Auswirkungen von Blaulicht auf eine bestimmte β -Carotinmenge. Quantifizierung per HPLC. Die Proben wurden für wenige Stunden unter den entsprechenden Lichtbedingungen inkubiert. Daten von Johannes Scheffer.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen und Priv. Doz. Dr. Christof Taxis danke ich für die Unterstützung und Diskussionsrunden während meiner Promotion. Vielen Dank für die Möglichkeit an so einem spannenden Projekt mitzuarbeiten und dafür, dass ich an vielen Konferenzen teilnehmen durfte.

Meinen Kollegen aus der AG Essen danke ich für die gemeinsame Zeit und insbesondere dafür, dass ihr mich im KWT nicht habt verdursten lassen.

Filipp Bezold danke ich für die erstklassige Unterstützung und Geduld bei allen HPLC/MS-Analysen und der Vielzahl an organisierten Magic-Drafts.

Sophia möchte ich für die super Zusammenarbeit und der 24/7 Unterstützung bei auch der kleinsten Frage danken.

„Der Bio“ danke ich insbesondere für den einmaligen Spüldienst und der erstklassigen Labororganisation. Mit euch verflog die Zeit. Ich werde die gemeinsamen Kaffeepausen und die Gesellschaft draußen vermissen. Ich hoffe wir bleiben auch weiterhin in Kontakt. Basti, Hajo, Johannes, Mr. Martin Saft, Seb Hepp, Sophie, Leonie, Nam.

Als letztes danke ich noch meiner Familie für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht.