

**Konstruktion synthetischer Stoffwechselwege  
zur Produktion von  
(R)-Benzylsuccinat und weiteren aromatischen Metaboliten**



**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Johanna Mock**  
aus Leinefelde

Marburg/Lahn 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2010 bis März 2013 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Heider durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180) als Dissertation am 17.05.2013 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. J. Heider

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2013

*„Am Ende wird alles Gut. Und wenn es nicht gut wird, ist es noch nicht das Ende.“*

*Oscar Wilde*

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	8
Summary .....	10
1. Einleitung.....	12
1.1.    Anwendungen in der industriellen Biotechnologie.....	12
1.2.    Anaerober Toluolabbau.....	14
1.3.    Potential von ( <i>R</i> )-Benzylsuccinat für biotechnologische und pharmazeutische Anwendungen .....	20
1.4.    Geplanter Stoffwechselweg zur bakteriellen Produktion von ( <i>R</i> )-Benzylsuccinat.....	21
1.4.1.    Die Benzoat-CoA Ligase .....	22
1.4.2.    Die Succinyl-CoA: Benzoat CoA-Transferase .....	24
1.4.3.    Benzoataufnahme in <i>A. aromaticum</i> .....	25
1.4.4.    Export organischer Säuren und die Rolle des „small conductance mechanosensitive channel“ MscS .....	26
1.5.    Biphenyl-Metaboliten in der Natur und ihre Anwendungsmöglichkeiten.....	27
1.6.    Geplanter Stoffwechselweg zur bakteriellen Produktion von Biphenylen .....	28
1.6.1.    Die Biphenylsynthase .....	29
1.6.2.    Die Malonyl-CoA Synthetase .....	30
1.7.    Ziel der Arbeit .....	32
2. Material und Methoden .....	33
2.1.    Materialien .....	33
2.1.1.    Chemikalien, Biochemikalien und Gase .....	33
2.1.2.    Chromatographiematerial.....	33
2.2.    Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.....	33
2.3.    Medien .....	36
2.4.    Kultivierung von Mikroorganismen, <i>in vivo</i> – Expression plasmidkodierter Gene, Herstellung von Zellextrakten und Benzylsuccinatproduktion .....	39
2.5.    Molekularbiologische und Genetische Methoden.....	40

2.5.1.	Isolierung chromosomaler DNA .....	40
2.5.2.	Isolierung von Plasmid-DNA.....	40
2.5.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
2.5.4.	Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	43
2.5.5.	Klonierungstechniken.....	43
2.5.5.1.	Kombinatorisches Klonieren.....	43
2.5.5.2.	Konstruktion von Expressionsplasmiden mittels klassischer Strategien.....	45
2.5.6.	Herstellung chemisch- und elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	47
2.5.7.	Transformation chemisch- und elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	47
2.5.8.	Sequenzanalyse .....	48
2.6.	Biochemische Methoden.....	49
2.6.1.	Reinigung von Enzymen .....	49
2.6.1.1.	Reinigung der Benzoat-CoA Ligase .....	49
2.6.1.2.	Reinigung der Biphenylsynthase zusammen mit der Benzoat-CoA Ligase .....	49
2.6.1.3.	Reinigung Strep-getagter Proteine.....	50
2.6.1.4.	Reinigung der Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase .....	50
2.6.2.	Proteinbestimmung.....	50
2.6.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	50
2.6.4.	Enzymatische Tests.....	52
2.6.4.1.	Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Benzoat-CoA Ligase.....	52
2.6.4.2.	Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Malonyl-CoA Synthase .....	52
2.6.4.3.	Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Succinyl-CoA: Benzoat CoATransferase .....	53
2.6.4.4.	Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase .....	53
2.6.4.5.	Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Biphenylsynthase .....	54
2.6.5.	Chemische Synthese von CoA-Thioestern.....	54
2.7.	Analytische Methoden .....	55
2.7.1.	Metallanalyse mittels ICP-OES .....	55
2.7.2.	Konzentrationsbestimmung von Benzylsuccinat.....	55

2.7.3.	Analyse von Biphenylen aus <i>in vivo</i> Proben .....	56
2.7.4.	Einsatz von <sup>14</sup> C Malonat und Chromatographie zur <i>in vivo</i> Analytik von Biphenylen ...	56
3.	Ergebnisse.....	58
3.1.	Biosynthetisches Modul zur Synthese von Benzoyl-CoA.....	58
3.1.1.	Benzoataufnahme durch Expression des Benzoattransporter-Gens <i>benK</i> .....	58
3.1.2.	Benzoyl-CoA Synthese durch Benzoat-CoA Ligase .....	61
3.1.3.	Benzoyl-CoA Synthese durch Succinyl-CoA:Benzoat CoA-Transferase .....	63
3.1.4.	Klonierung des biosynthetischen Moduls zur Produktion von Benzoyl-CoA .....	66
3.2.	Biosynthetisches Modul der Benzylsuccinatproduktion .....	66
3.3.	Biosynthetisches Modul der Biphenylproduktion.....	75
3.3.1.	Coexpression des Biphenylsynthase-Gens mit dem Benzoyl-CoA Modul in <i>E. coli</i> .....	75
3.3.2.	Koexpression des Biphenylsynthase-Gens mit dem Benzoyl-CoA Modul in <i>Shimwellia blattae</i> .....	80
3.3.3.	Die Malonyl-CoA Synthetase als zusätzliches biosynthetisches Modul .....	84
3.3.4.	<i>In vivo</i> Produktion von Biphenyl.....	85
3.4.	Untersuchungen zur Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase.....	89
3.5.	Reinigung der Succinyl-CoA: ( <i>R</i> )-Benzylsuccinat CoA-Transferase.....	93
4.	Diskussion.....	95
4.1.	Bausteine zur Synthese von Benzoyl-CoA .....	95
4.1.1.	Benzoataufnahme über den Benzoattransporter BenK.....	95
4.1.2.	Benzoyl-CoA-Bildung durch Benzoat-CoA Ligase BclA oder Benzoat-CoA: Succinat CoA-Transferase .....	95
4.2.	Biosynthetisches Modul zur Synthese von Benzoyl-CoA.....	96
4.3.	Benzylsuccinatproduktion .....	96
4.4.	Biphenylproduktion.....	102
4.5.	Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase.....	105
4.6.	Struktur der Succinyl-CoA: ( <i>R</i> )-Benzylsuccinat CoA-Transferase .....	107
Literatur.....		109
Abkürzungsverzeichnis.....		119

Anhang .....	121
Danksagung .....	123
Erklärung .....	124
Lebenslauf .....	125

---

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden „synthetische“ anaerobe Bakterien konstruiert, die über Veränderungen ihrer Gärungswege neuartige Fermentationsprodukte herstellen. In einem ersten Schritt wurde ein Synthese-Modul für die Produktion von Benzoyl-CoA als biosynthetisches Startermolekül in *Escherichia coli* entwickelt, das aus einem Benzoattransporter (kodiert durch *benK* aus dem Benzoat-abbauenden Bakterium *Aromatoleum aromaticum*) und einer Benzoat-CoA Ligase (kodiert durch *bclA* aus *A. aromaticum*) besteht. In dieser Arbeit wurde dieses Synthese-Modul zur Entwicklung von Stoffwechselwegen zur (*R*)-Benzylsuccinat-Synthese oder zur Synthese pflanzlicher Biphenyle in Bakterien eingesetzt. Das Synthese-Modul kann darüber hinaus zur Biosynthese vieler weiterer interessanter Naturstoffe eingesetzt werden, bei denen Benzoyl-CoA als Baustein benötigt wird.

- i) Die aromatische Dicarbonsäure Benzylsuccinat ist ein Intermediat des anaeroben Toluolabbaus mit potentiellen biotechnologischen Anwendungen, z.B. zur Synthese von Bio-Polymeren. Für die biologische Produktion von Benzylsuccinat wurde ein zweites biosynthetisches Modul generiert, das aus den Genen für sieben Enzyme aus *Geobacter metallireducens* besteht, die am anaeroben Toluol-Abbau beteiligt sind. Diese Enzyme katalysieren normalerweise den Abbau des ersten Intermediats Benzylsuccinat zu Benzoyl-CoA und Succinat über eine modifizierte  $\beta$ -Oxidation. Durch gleichzeitige Expression beider Biosynthese-Module in *E. coli* und durch Zufütterung von Benzoat war es tatsächlich möglich, durch das Umkehren der  $\beta$ -Oxidation Benzylsuccinat in signifikanten Mengen zu produzieren. Die Ausbeute wurde ca. 1000-fach gesteigert durch anaerobe Anzucht unter Gärungs- und Fumaratatmungsbedingungen (von ca. 3 nM auf bisher max. 5  $\mu$ M). Dies belegt, dass die Projektidee zur Schaffung „synthetischer Anaerobier“ tatsächlich funktioniert. Außerdem wurde gezeigt, dass die zusätzliche Expression eines Gens für ein unspezifisches Exportkanal-Protein die Ausbeute an produziertem Benzylsuccinat um den Faktor 3,5 steigern kann. Dieses System kann nun über weitere genetische Veränderungen in Verbindung mit Modellrechnungen auf gesteigerte Produktivität bis hin zu einer möglichen industriellen Anwendung optimiert werden.
- ii) Für die Synthese des pflanzlichen Sekundärmetaboliten 3,5-Dihydroxybiphenyl wurden zusätzlich zum „Benzoyl-CoA-Modul“ Gene für die entsprechende Biphenyl-Synthase aus der Vogelbeere (lat. *Sorbus aucuparia*) sowie für eine Malonyl-CoA Synthetase aus *Paracoccus denitrificans* in die Wirtsorganismen *E. coli* und *Shimwellia blattae* eingeführt. Die Malonyl-CoA Synthetase diente hierbei zur besseren Versorgung mit dem

zweiten notwendigen Biosynthesebaustein Malonyl-CoA. Obwohl alle Enzyme in ausreichender Aktivität produziert wurden, wurde hier bisher noch keine Biphenyl-Produktion beobachtet. Stattdessen produzierten die konstruierten Zellen große Mengen an Indol, das in Enterobakterien als Stress-Metabolit bekannt ist. Neben Indol wurden in den rekombinanten Zellen auch einige unbekannte Verbindungen detektiert. Eine dieser Verbindungen beinhaltet Malonat als Synthesebaustein. Weitere Untersuchungen sind daher nötig, um die Identität dieser Malonat-abhängigen Verbindung aufzuklären und um zu zeigen, in welchem Zusammenhang diese Substanz mit dem synthetischen Biphenyl-Stoffwechselweg steht.

---

## Summary

The aim of this work was the generation of a synthetic bacterial production strain, which produces new fermentation products via modified anaerobic pathways. In a first step a synthetic module for the production of benzoyl-CoA as biosynthetic precursor was established in the host organism *Escherichia coli*. Therefore a benzoate transporter (encoded in the *benK* gene from the benzoate degrading bacterium *Aromatoleum aromaticum*) and a benzoate-CoA ligase (encoded in the *bclA* gene from *A. aromaticum*) were linked. In this work this biosynthetic module for benzoyl-CoA formation was used for the development of bacterial pathways for (*R*)-benzylsuccinate synthesis or for the synthesis of biphenyls, which occur in nature as secondary plant metabolites. The usage of this benzoyl-CoA biosynthesis module can be more expanded by using it as a building block for further synthetic pathways, which are benzoyl-CoA depending. Hence, it can be used for the synthesis of many useful natural products, which are produced via a benzoyl-CoA intermediate.

- i) Benzylsuccinate, an aromatic dicarboxylic acid, formed as first intermediate during anaerobic toluene degradation, is of potential biotechnological interest e. g. for the formation of bio-polymers. For the biological production of benzylsuccinate a second biosynthetic module was generated. This module contains genes coding for seven enzymes from *Geobacter metallireducens*, which occur in anaerobic toluene degradation. Normally these enzymes catalyse the degradation of the first intermediate benzylsuccinate to benzoyl-CoA and succinate via a modified  $\beta$ -oxidation pathway. During co-expression of both biosynthetic modules in *E. coli* and feeding with benzoate indeed benzylsuccinate was formed by the reversed  $\beta$ -oxidation pathway in significant amounts. The yield was increased 1000-fold by switching from aerobic respiration to anaerobic mixed acid fermentation and fumarate respiration (from 3 nM up to 5  $\mu$ M). This result verifies the idea of the project, to form synthetic anaerobic production strains. The production could be further increased by a factor of 3.5 by the addition of a gene coding for an unspecific mechanosensitive channel, which exports the formed metabolite into the medium. This system can now be further optimized by genetical modifications supported by mathematical modelling of the pathway and by optimization of the production conditions to increase the production up to a possible industrial application.
- ii) For the synthesis of the secondary plant metabolite 3,5-dihydroxybiphenyl the biosynthetic module for benzoyl-CoA formation was combined with genes coding for a biphenyl synthase from the rowan berry (lat. *Sorbus aucuparia*) and a malonyl-CoA synthetase from *Paracoccus denitrificans*. These genes were coexpressed in the host

organisms *E. coli* and *Shimwellia blattae*. The malonyl-CoA synthetase was added to ensure the supply of the second precursor malonyl-CoA. Although all enzymes necessary for this pathway were produced with sufficient activities, no biphenyl formation was detected so far. Instead the generated synthetic bacteria produced large amounts of indole, which is known as a stress metabolite in enterobacteria. In addition to indole some further yet unknown metabolites were detected. One of these metabolites is formed from malonate. Further investigations are necessary to identify this metabolite and to figure out how it is linked to the synthetic biphenyl pathway.

## 1. Einleitung

### 1.1. Anwendungen in der industriellen Biotechnologie

Die Verknappung und die daraus resultierende Verteuerung fossiler Energieträger sowie der Klimawandel motivieren zu Bestrebungen, Alternativen für die Energie- und Rohstoffversorgung aufzuzeigen und zu entwickeln. Zudem gibt es immerwährende Bestrebungen neuartige Produkte wie z.B. Polymere mit bestimmten Eigenschaften für entsprechende Anwendungen oder neue pharmazeutische Präparate herzustellen, die bestimmte Vorteile gegenüber den bisher verfügbaren Medikamenten haben. Dabei ist die Idee nicht neu, Chemikalien biologisch herzustellen. In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden eine Vielzahl von Chemikalien wie Ethanol, Butanol, Essigsäure und Milchsäure fermentativ hergestellt. Der steigende Preis für Zucker und der damals sinkende Preis für Rohöl bewirkten eine Wende von der biologischen zur chemischen Synthese. Inzwischen spielen aber nicht nur der steigende Erdölpreis, sondern auch die Umweltbelastung während der Herstellung der Chemikalien eine entscheidende Rolle für Überlegungen zur Umstellung vieler Verfahren (Dodds & Gross, 2007).

Biologische Verfahren haben oft den Vorteil, dass sie unter milden Bedingungen ablaufen und Biokatalysator, Substrate, Intermediate und Produkte biologisch abbaubar sind. Die Enzymkatalysierten Reaktionen sind meist sehr regio- und stereospezifisch und es können enantiomerenreine Produkte hergestellt werden.

Fortschritte in der mikrobiellen Biochemie, Molekularbiologie, Genanalyse und Bioinformatik ermöglichen, bestehende Verfahren zu verbessern oder neue synthetische Stoffwechselwege zu erstellen, sodass neuartige Produkte erzeugt werden können. Potentielle Anwendungsgebiete für biotechnologische Prozesse gibt es in vielen Bereichen:

- Polymeren (Monomere, Funktionelle Additive)
- Krafstoffe und Lösungsmittel
- Bauindustrie (Isoliermittel, Lacke, Klebstoffe, Bindemittel)
- Papierindustrie (Druckerfarben, Lösungsmittel)
- Textilindustrie (High-tech-Fasern, Farben, Zusätze)
- Wasch und Putzmittel (Enzyme, Biodetergentien, Polycarbonsäuren, Polyaminosäuren)
- Medizin, Pharmazie, Kosmetik (Pharmaka, Fruchtsäuren, Spezialagentien)
- Nahrungs- und Futtermittel (Aminosäuren, Vitamine, Aromen, Farbstoffe)

(Willke & Vorlop, 2004).

Mit einer Produktionsmenge von 12,6 Mio Tonnen/Jahr ist Ethanol das im größten Maße durch Mikroorganismen hergestellte Erzeugnis (Willke & Vorlop, 2004). Ethanol wird als Biotreibstoff eingesetzt und hauptsächlich durch Fermentation mit Hefen gewonnen (Farrell et al., 2006).

Mikroorganismen produzieren in industriellen Prozessen eine Vielzahl an Produkten im Großmaßstab. *Corynebacterium glutamicum* ist ein sehr effizienter Erzeuger von Glutaminsäure. Lysin, Valin, Isoleucin und Threonin werden ebenfalls in Corynebakterien produziert (Hermann, 2003). Die biotechnologische Herstellung von Vitamin B<sub>2</sub> (Riboflavin) hat sich gegenüber der chemischen Synthese aufgrund von geringeren Produktionskosten und besserer Umweltverträglichkeit durchgesetzt. Verschiedene Mikroorganismen wie Pilze (*Ashbya gossypii*), Hefen (*Candida famata*) und Bakterien (*Bacillus subtilis*) werden zur Herstellung weiterer Massenprodukte eingesetzt (Stahmann et al., 2000). Der Chemiekonzern BASF hat den Purin-Stoffwechselweg in *A. gossypii* so manipuliert, dass die Riboflavin-Produktion im Vergleich zum Wildtyp zehnfach erhöht wurde (Jimenez et al., 2005).

Auch Vitamin C und Antibiotika werden durch biotechnische Verfahren erzeugt. Milchsäure wird hauptsächlich durch Lactobacillen produziert. Diese findet Anwendung in der Lebensmittelproduktion oder wird als Monomer für die Produktion von Polymilchsäure (PLA), einem biologisch abbaubaren Polyester verwendet. PLA und ihre Kopolymere können bereits komplett in rekombinanten *E. coli*-Stämmen produziert werden. Durch zielgerichtete Knockouts wurden Nebenprodukte reduziert und dadurch die Produktivität gesteigert (Jung & Lee, 2011). Polyhydroxybutyrat (PHB) kann als „Bioplastik“ ebenfalls durch mikrobielle Biosynthese erzeugt werden. 3-Polyhydroxybutyrat ist der am weitesten verbreitete Typ der Polyhydroxyalkanoate, doch es gibt etliche andere Polymere dieser Klasse, die durch eine Vielzahl von Organismen produziert werden, wie Poly-4-hydroxybutyrat, Polyhydroxyvalerat (PHV), Polyhydroxyhexanoat (PHH) und Polyhydroxyoctanoat (PHO) (Chanprateep, 2010).

Bernsteinsäure, ein Intermediat des Zitronensäurezyklus, ist ein Endprodukt anaerober Stoffwechselwege in vielen Bakterien. Es gibt Bestrebungen, die durch Mikroorganismen produzierte Bernsteinsäure als Plattformchemikalie zu nutzen, um Derivate wie Butandiol oder Tetrahydrofuran herzustellen und die aus nachwachsenden Rohstoffen erzeugte Bernsteinsäure als Monomer für die Synthese von Polymeren wie Polyamid 4-4 und Polybutylensuccinat zu verwenden (Bechthold et al., 2008; Werpy et al., 2004).

Für die bio-basierte Produktion von Bernsteinsäure wurden bereits verschiedene Mikroorganismen genetisch modifiziert und die Kulturbedingungen optimiert. Neben Mikroorganismen, die aus dem Pansen von Rindern isoliert wurden (*Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Basfia succiniciproducens*), wurden auch Stämme

wie *Corynebacterium glutamicum* und *Zymomonas mobilis* ZM4 sowie die säure- und osmotolerante Hefe *S. cerevisiae* für die Produktion von Bernsteinsäure optimiert (Thakker et al., 2012a). Bemerkenswerte Mengen an Bernsteinsäure konnten ebenfalls durch *E. coli*-Stämme produziert werden, die durch „*Metabolic Engineering*“ zur Produktion von Bernsteinsäure optimiert wurden (Lee et al., 2011).

Neben Bernsteinsäure werden auch Itaconsäure, Glutarsäure und Isopren durch Mikroorganismen im industriellen Maßstab produziert, die als Monomere für die Erzeugung verschiedener Polymere Anwendung finden (Lee et al., 2011). Zudem können die Metabolite des bakteriellen Stoffwechsels neben der Produktion von Polymeren auch zur Herstellung von organischen Lösungsmitteln, Farbstoffen, Pharmazeutika und Lebensmittelzusätzen dienen. Eine besondere Rolle spielen hier die aromatischen Verbindungen, die bisher aus Rohöl erzeugt wurden. Durch gezieltes „*Metabolic Engineering*“, „*Metabolic-Flux*“-Analysen, den Eingriff in regulatorische Prozesse und den Einsatz synthetischer Codon-optimierter Gene können diese Verbindungen nun vermehrt durch mikrobiologische Prozesse aus nachwachsenden Rohstoffen erzeugt werden (Berry, 1996; Gosset, 2009).

## 1.2. Anaerober Toluolabbau

Toluol und einige andere aromatische Kohlenwasserstoffe können auch in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff von Bakterien abgebaut werden (Vogel & Grbić-Galić, 1986; Zeyer et al., 1986). Es existiert keine phylogenetisch einheitliche Gruppe, der die Toluol-abbauenden Bakterien angehören. Nach ihren Stoffwechsel-Typen werden sie in denitrifizierende, Eisen(III)-reduzierende, Sulfat-reduzierende, Protonen-reduzierende und phototrophe Bakterien unterteilt. Zu den Organismen, die Toluol unter denitrifizierenden Bedingungen abbauen, gehören  $\beta$ -Proteobakterien der Gattungen *Thauera* und „*Aromatoleum*“ (bisher Candidatus-Stufe), die häufig in der Natur im Boden vorkommen. Zu ihnen gehören die Gattungen *Thauera aromatica* Stamm K172 (Anders et al., 1995) und „*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1 (Rabus & Widdel, 1995). Neben diesen nitratreduzierenden Gattungen sind toluolabbauende Vertreter aus der Gruppe der  $\delta$ -Proteobakterien gefunden worden, die Sulfat (Beller et al., 1996; Rabus & Widdel, 1995) oder Eisen(III) (Lovley & Lonergan, 1990) als terminalen Elektronenakzeptor verwenden. Die sulfatreduzierende Art *Desulfobacula toluolica* oxidiert zum Beispiel verschiedene aromatische Verbindungen zu CO<sub>2</sub>, einschließlich Toluol. Ihr natürliches Habitat sind marine Sedimente. Ein bekannter Vertreter der Eisen(III)-reduzierenden Bakterien ist *Geobacter metallireducens*, der auch Toluol als Elektronendonator verwenden kann. Außer den Toluol-abbauenden Bakteriengattungen, die

ihre Energie über Elektronentransport und Atmung gewinnen, wurden Organismen gefunden, die Aromaten zu CO<sub>2</sub> und Wasserstoff vergären können. Sie wachsen allerdings nur in Kokultur mit sulfatreduzierenden Bakterien oder methanogenen Archaeen, welche die Wasserstoffkonzentrationen niedrig halten (Vogel & Grbic-Galic, 1986). Neben den genannten chemotrophen Organismen ist auch ein phototrophes Bakterium entdeckt worden, das Toluol abbaut, *Blastochloris sulfoviridis* (Zengler et al., 1999).

### Stoffwechselweg des anaeroben Toluolabbaus

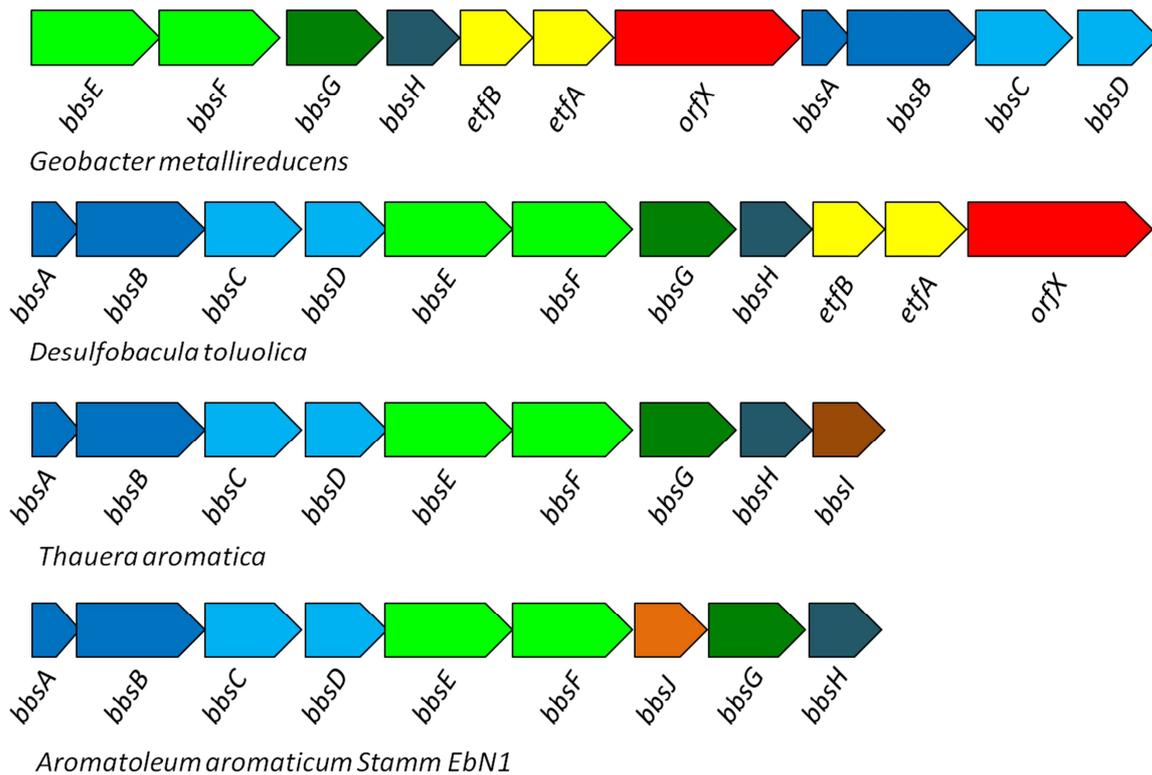
Die initiale Reaktion des anaeroben Toluolabbaus ist die stereospezifische Addition der Methylgruppe des Toluols an die Doppelbindung eines Fumarat-Kosubstrates, wobei (*R*)-Benzylsuccinat entsteht (Leuthner & Heider, 2000). Diese Reaktion wird durch ein Glycyl-Radikalenzym, die (*R*)-Benzylsuccinat Synthase, katalysiert. Die (*R*)-Benzylsuccinat Synthase aus *T. aromatica* ist aus einer großen  $\alpha$ -Untereinheit (98 kDa) und zwei kleinen Untereinheiten  $\beta$  (8,5 kDa) und  $\gamma$  (6,4 kDa) aufgebaut und setzt sich als Heterohexamer in einer  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Komposition zusammen, sodass das native Enzym eine Molekülmasse von 220 kDa hat. Das Glycyl-Radikal ist wie bei allen Vertretern der Glycyl-Radikalenzym-Familie in der großen Untereinheit konserviert, während die kleinen Untereinheiten je ein konserviertes Cystein-Motiv besitzen und offenbar je ein Eisen-Schwefel-Cluster koordinieren (Feil, 2006; Hilberg et al., 2012). Die drei Untereinheiten der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aus *T. aromatica* werden durch die Gene *bssCAB* im *bss*-Operon (Benzylsuccinat Synthase-Operon) kodiert (Leuthner & Heider, 1998). Neben den Genen für die Benzylsuccinat Synthase wird im *bss*-Operon auch ihr aktivierendes Enzym durch das Gen *bssD* kodiert (Leuthner & Heider, 1998). Wie alle Glycyl-Radikalenzyme wird auch die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase posttranslational durch dieses aktivierende Enzym BssD in die katalytisch aktive Form überführt. Hierbei handelt es sich um ein S-Adenosylmethionin-abhängiges Radikal-Enzym (SAM-Radikal-Enzym) mit einem ungewöhnlich koordinierten [4Fe4S]-Cluster im aktiven Zentrum. Statt eines vierten konservierten Cysteins wird das Kosubstrat S-Adenosylmethionin (SAM) gebunden und zur Generierung des Glycylradikals verwendet. Nach Bindung des Kosubstrats (C-Terminus des Glycylradikal-Enzyms) wird vom Eisen-Schwefel-Cluster ein Elektron auf das gebundene SAM übertragen und dieses dadurch homolytisch gespalten. Neben Methionin entsteht daraus ein S-Adenosylradikal, welches dann von einem konservierten Glycin in der C-terminalen Domäne der Benzylsuccinat Synthase ein Wasserstoffatom abstrahiert und so das Glycylradikal des aktiven Zentrums generiert.

Das *bss*-Operon enthält stromabwärts von *bssB* bis zu vier weitere Gene (*bssEFGH*), die kotranskribiert werden und deren Produkte teilweise als Toluol-induzierte Proteine nachgewiesen

wurden (Abbildung 1) (Leuthner & Heider, 1998). Das *bssE*-Gen kodiert für ein Protein mit hoher Sequenzähnlichkeit zu einer Klasse von ATP-bindenden Proteinen (NirQ, NorQ, CbbQ, RbcX), die für die Aktivität der Stickstoffmonoxid Reduktase bzw. der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase notwendig sind (Igarashi et al., 1999; Neuwald et al., 1999; Saschenbrecker et al., 2007). Orthologe der folgenden Gene *bssF* und *bssG* werden in den *bss*-Operons weiterer Toluol-abbauender Stämme gefunden, jedoch konnte beiden Genprodukten bisher keine Funktion zugeordnet werden. Das *bssH*-Gen kodiert für ein membranständiges Transport-Protein. Da Toluol membrangängig ist, könnte es sich um ein Efflux-System handeln, das toxische Toluol-Konzentrationen entgiftet (Kube et al., 2004).

### **β-Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat**

(*R*)-Benzylsuccinat wird über eine modifizierte β-Oxidation weiter zu Benzoyl-CoA abgebaut (Leutwein & Heider, 1999; Leutwein & Heider, 2001; Lippert, 2009), einem zentralem Intermediat im anaeroben Abbau zahlreicher aromatischer Verbindungen (Harwood et al., 1998). Die Gene aller beteiligten Enzyme werden im *bbs*-Operon (βeta-Oxidation von Benzylsuccinat) kodiert (Leuthner & Heider, 2000). Ein Vergleich des *bbs*-Operons aus unterschiedlichen Organismen zeigt, dass es zu einem Unterschiede in der Anordnung der Gene gibt und dass zum anderen teilweise zusätzliche Gene kodiert sind (Aklujkar et al., 2009; Kölzer, 2012; Kube et al., 2004).



**Abbildung 1:** Vergleich der *bbs*-Operons aus verschiedenen Organismen. Dargestellt ist die Anordnung der einzelnen Gene des *bbs*-Operons in den fakultativ aeroben Organismen *T. aromatica* und *A. aromaticum* und den obligat anaeroben Organismen *G. metallireducens* und *D. toluolica*.

Dabei enthalten die *bbs*-Operons aus obligat anaeroben Organismen wie *G. metallireducens* oder *D. toluolica* drei zusätzliche Gene. Während die beiden Gene *etfB* und *etfA* für ein Elektronen transferierendes Flavoprotein (ETF) kodieren, haben *in silico* -Untersuchungen gezeigt, dass das Gen *orfX* für ein Membranprotein kodiert, welches zwei Bindemotive für Eisen-Schwefel-Cluster besitzt (Kölzer, 2012). Den Genen *bbsI* und *bbsJ* in den *bbs*-Operons der fakultativ aeroben Organismen *T. aromatica* und *A. aromaticum* konnten bisher keine Funktion zugeordnet werden (Leuthner & Heider, 2000).

Im ersten Schritt der  $\beta$ -Oxidation wird Benzylsuccinat durch eine Succinyl-CoA: (*R*)-Benzylsuccinat CoA-Transferase (BbsEF) zu (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA aktiviert. Dieses Enzym aus *T. aromatica* besteht aus zwei Untereinheiten mit einer Molekülmasse von 44 kDa und 45 kDa, die untereinander hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen und ein Heterotetramer aus  $\alpha_2\beta_2$  bilden (Leutwein & Heider, 2001). Das Enzym gehört zu der Familie III der CoA-Transferasen, bei denen sich der Reaktionsmechanismus grundlegend von dem der CoA-Transferase der Familie I unterscheidet (Heider, 2001). Die Reaktion über die Bildung eines ternären Komplexes zwischen Enzym und beiden Substraten findet nach neueren Erkenntnissen aber dennoch über einen Ping-Pong-Mechanismus statt (Berthold et al., 2008).

Im nächsten Schritt der  $\beta$ -Oxidation wird (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA durch die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase (BbsG) zu (*E*)-Phenylitaconyl-CoA oxidiert. Die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenasen aus *T. aromatica*, *G. metallireducens* und *D. toluolica* wurden bereits heterolog in *E. coli* überproduziert, gereinigt und charakterisiert (Kölzer, 2012; Leutwein & Heider, 2001). Das Flavinhaltige Enzym bildet ein Homotetramer aus 45 kDa-Untereinheiten und besitzt eine spezifische Aktivität von 6,47 U/mg. Interessanterweise ist die spezifische Aktivität der Rückreaktion (mit Viologenen als künstlichen Elektronendonatoren) zwanzig- bis fünfzigfach höher, als die Aktivität der Hinreaktion mit Ferricenium als Elektronenakzeptor (Kölzer, 2012). Die Elektronen aus der Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA werden auf ein „Elektronen-transferierendes Flavoprotein“ (ETF) übertragen und über eine membranständige ETF:Chinon Oxidoreduktase auf Chinone übertragen. Bei den obligat anaeroben Eisen(III)- und Sulfatreduzierenden Organismen erfolgt die Übertragung auf Menachinon vermutlich über das im Operon kodierte Membranprotein (OrfX).

(*E*)-Phenylitaconyl-CoA wird anschließend durch die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase (BbsH) zu 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA umgesetzt. In *T. aromatica* besitzt dieses Enzym eine apparente Molekülmasse von 28 kDa und liegt als Homotetramer vor. Für das Enzym wurde ein apparenter  $K_m$ -Wert von  $109 \pm 7 \mu\text{M}$  und eine spezifische Aktivität von  $32 \pm 3 \text{ U/mg}$  ermittelt (Lippert, 2009).

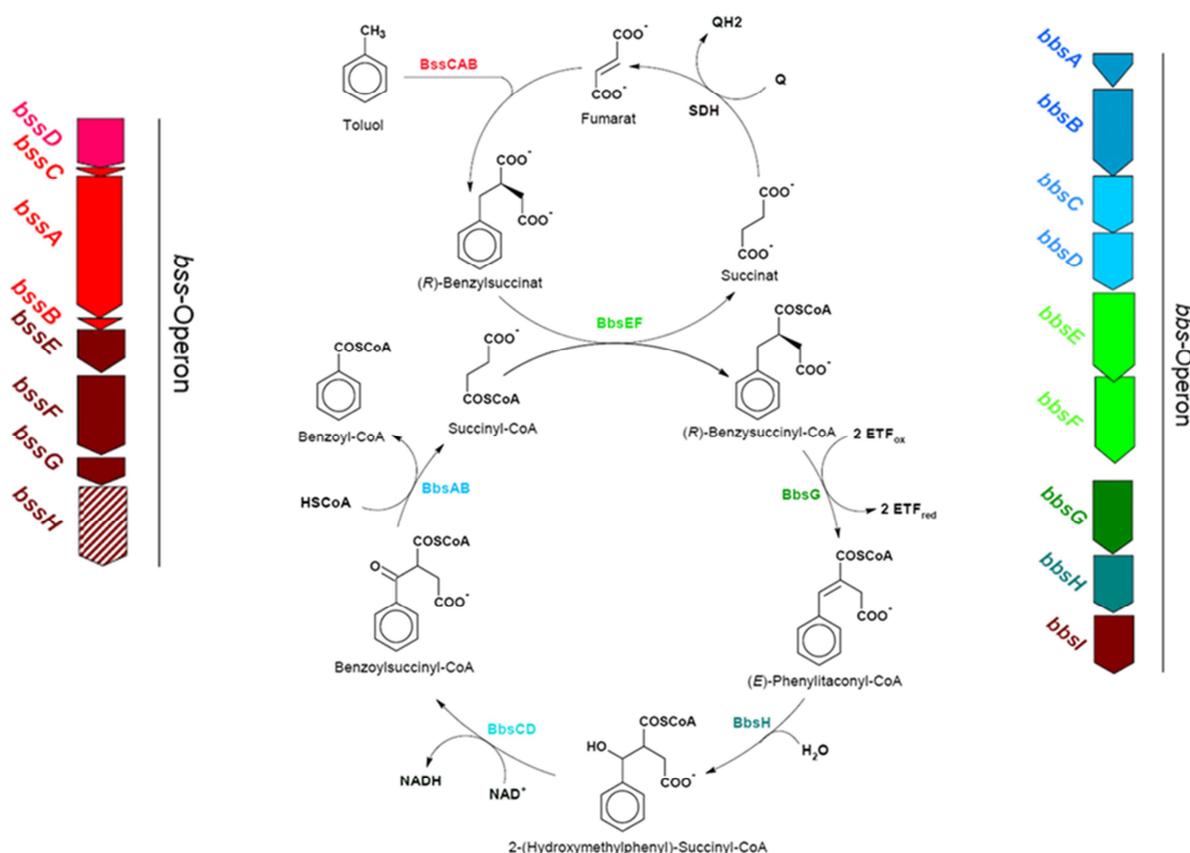
Die letzten beiden enzymatischen Schritte bis zum Intermediat Benzoyl-CoA folgen den Reaktionen analog zur bekannten  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren.

2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA wird durch die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase (BbsCD) in einer NAD-abhängigen Reaktion zu Benzoylsuccinyl-CoA oxidiert. Das Enzym aus *T. aromatica* setzt sich aus zwei Untereinheiten mit den apparenten Molekülmassen von 26 kDa (BbsC) und 28 kDa (BbsD) zusammen und bildet in aktiver Form ein Heterodimer. Das Enzym wurde biochemisch über die Rückreaktion mit 2,4-Dichloracetophenon als Surrogatsubstrat charakterisiert. Der apparente  $K_m$ -Wert lag hier bei  $301 \pm 21 \mu\text{M}$  und die spezifische Aktivität betrug  $9 \pm 1 \text{ U/mg}$  für dieses Substrat (Lippert, 2009).

Im letzten Schritt wird Benzoylsuccinyl-CoA durch die Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase (BbsAB) thiolytisch gespalten. Dabei entstehen das zentrale Intermediat Benzoyl-CoA und der CoA-Donor Succinyl-CoA. Die  $\beta$ -Thiolase aus *T. aromatica* besteht aus zwei Untereinheiten mit den apparenten Molekülmassen von 41 kDa (BbsB) und 16 kDa (BbsA) und bildet in aktiver Form ein Heterotetramer ( $\alpha_2\beta_2$ ) aus. Das Enzym benötigt Zink als Kofaktor für seine katalytische Aktivität, welches durch das Zinkfingermotiv (CXXC-X<sub>n</sub>-CXXC) in der kleinen Untereinheit BbsA (ein Zink-Ion/Monomer) gebunden wird (Kölschbach, 2011; Lippert, 2009). Das Enzym wurde biochemisch anhand der Rückreaktion charakterisiert. Dabei wurde eine spezifische Aktivität von  $8 \pm 1 \text{ U/mg}$  sowie apparente  $K_m$ -Werte von  $155 \pm 12 \mu\text{M}$  für Benzoyl-CoA bzw.  $190 \pm 6 \mu\text{M}$  für Succinyl-CoA ermittelt.

Der weitere Abbau von Benzoyl-CoA in fakultativ anaeroben Organismen wie *T. aromatica* findet durch eine ATP-abhängige Benzoyl-CoA Reduktase statt (Boll & Fuchs, 1995; Boll et al., 2000). Im Gegensatz dazu wird in obligat anaeroben Organismen wie *Desulfococcus multivorans* oder *Geobacter metallireducens* Benzoyl-CoA in einer ATP-unabhängigen Reaktion reduziert (Boll, 2005). In *G. metallireducens* konnte gezeigt werden, dass hier die ATP-unabhängige Benzoyl-CoA Reduktase neben Eisen-Schwefel-Clustern auch Wolfram enthält (Kung et al., 2009; Wischgoll et al., 2005).

Das entstehende Succinat wird durch die Succinat Dehydrogenase zu Fumarat oxidiert, welches der (R)-Benzylsuccinat Synthase dann wieder als Kosubstrat zur Verfügung steht.



**Abbildung 2: Anaerober Abbau von Toluol in *T. aromatica*.** A: Bildung von (R)-Benzylsuccinat aus Toluol und Fumarat und weiterer Abbauweg des ersten Intermediates über eine modifizierte β- Oxidation. Die beteiligten Enzyme sind: (R)-Benzylsuccinat-Synthase (BssCAB), Succinyl-CoA:Benzy succinat CoA-Transferase (BbsEF), Benzoylsuccinyl-CoA Dehydrogenase (BbsG), (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase (BbsH), 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase (BbsCD), Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase (BbsAB) und die Succinat-Dehydrogenase (SDH). B: Die am Toluolabbau beteiligten Gene sind in zwei Operons organisiert. Das *bss*-Operon kodiert für die drei Untereinheiten der (R)-Benzylsuccinat-Synthase (BssCAB), ihr aktivierendes Enzym (BssD) sowie für vier weitere Genprodukte unbekannter Funktion (BssEFGH). Im *bbs*-Operon sind Gene kodiert, deren Produkte an der β-Oxidation von (R)-Benzylsuccinat zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA beteiligt sind (*bbsABCDEFGHI*). Die Funktion von *bbsI* ist bisher unbekannt.

### 1.3. Potential von (*R*)-Benzylsuccinat für biotechnologische und pharmazeutische Anwendungen

Aromatische Verbindungen wie Tryptophan, Phenylalanin, *p*-Hydroxystyrol, *p*-Hydroxybenzoat und Anthranilinsäure können bereits durch Mikroorganismen produziert werden, die durch „*Metabolic Engineering*“ zu Produktionsstämmen entwickelt wurden (Gosset, 2009). (*R*)-Benzylsuccinat, ein Metabolit des anaeroben Toluol-Abbaus, ist eine weitere aromatische Verbindung, die in dieser Arbeit durch einen maßgeschneiderten Produktionsstamm synthetisiert werden soll. Diese Dicarbonsäure ist potentiell wertvoll, da sie zum einen als Monomer für die Herstellung von Polyestern eingesetzt werden kann und zum anderen für die Herstellung von Pharmazeutika dienen kann.

Polybutylensuccinat ist ein biologisch abbaubarer Polyester, der aus den Monomeren Succinat und Butandiol synthetisiert wird. Diese Monomere wiederum können aus nachwachsenden Rohstoffen durch Mikroorganismen produziert werden (Guo & Xu, 2010; Lee et al., 2011; Yim et al., 2011). Durch Kopolymerisation mit Zusatz verschiedener Anteile modifizierter Monomere können Polymere mit unterschiedlichen Eigenschaften erzeugen werden, die für unterschiedliche Anwendungen benötigt werden. Polybutylen[Benzyl]-succinat ist ein Beispiel für ein solches Kopolymer, in dem alternativ zu den Succinat-Molekülen auch Benzylsuccinat-Bausteine vorhanden sind (Abbildung 3). Durch Einbau von Benzylsuccinat in den Polyester wird seine Transformations-Temperatur in den Glas-ähnlichen Zustand erhöht. Eine Erhöhung der Benzylsuccinatanteile über 10 mol% führt jedoch zu einer langsameren Kristallisationsrate und wirkt sich negativ auf die Verarbeitung aus (Guo & Xu, 2010).

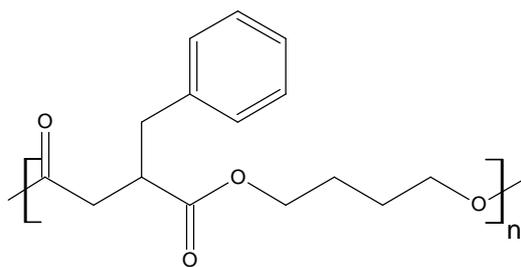


Abbildung 3: Polybutylen[Benzyl]succinat hergestellt aus den Monomeren Benzylsuccinat und Butandiol.

Potenzielle Relevanz hat Benzylsuccinat außerdem in der Pharmaindustrie, z. B. als Carboxypeptidase-Inhibitor (Palmer et al., 1982) oder für die Produktion komplexer Medikamente, wie z.B. Mitiglinid-Calcium (Abbildung 4), welches in der Diabetes-Therapie Anwendung findet.

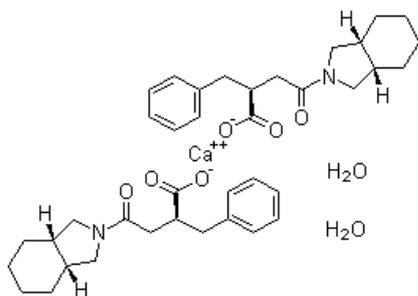
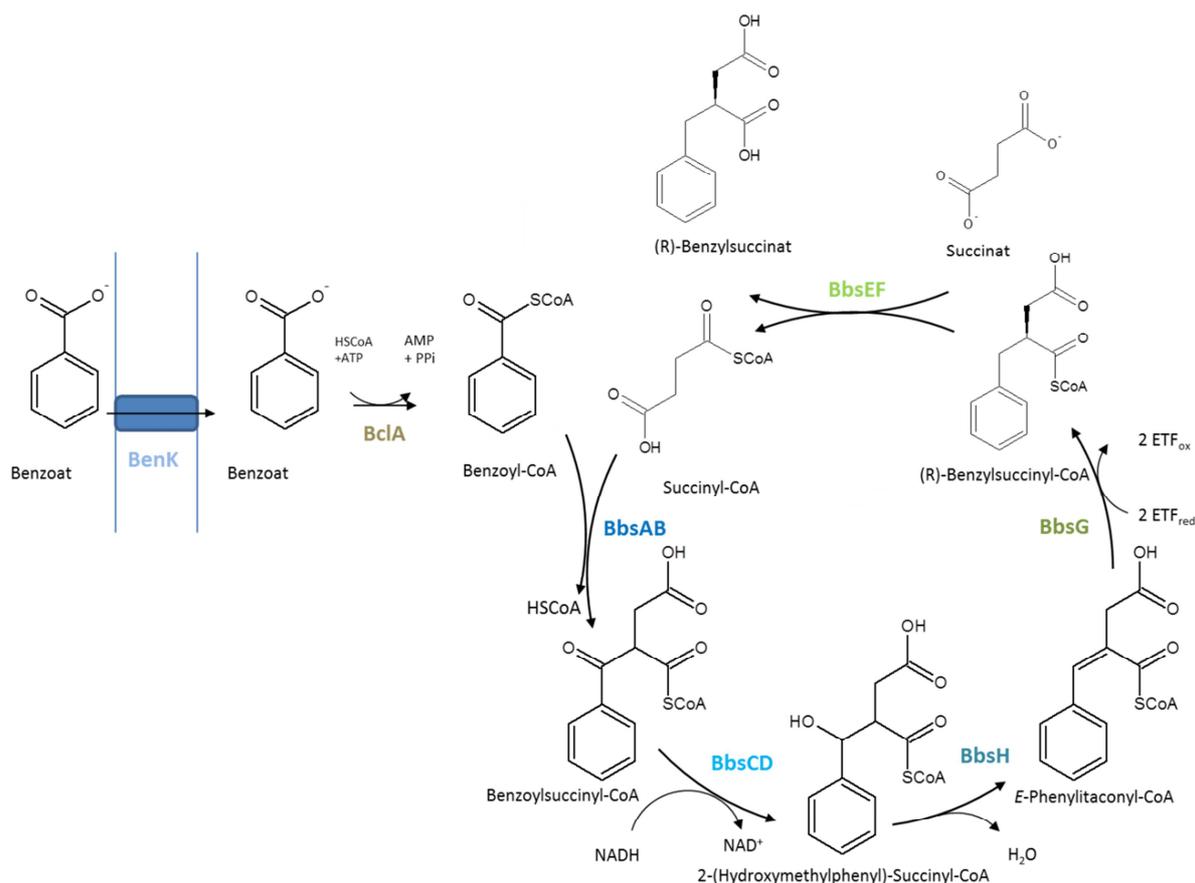


Abbildung 4: Mitiglinid-Calcium.

#### 1.4. Geplanter Stoffwechselweg zur bakteriellen Produktion von (*R*)-Benzylsuccinat

Da Benzylsuccinat ein hohes Anwendungspotential z. B. bei der Herstellung von Pharmaka und Biopolymeren besitzt, soll diese Dicarbonsäure biotechnologisch erzeugt werden. Dazu wurde für die bakterielle Produktion von (*R*)-Benzylsuccinat der  $\beta$ -Oxidationszyklus des Benzylsuccinats in reverser Richtung genutzt. Hierfür wurden die Gene des *bbs*-Operons *bbsA-H* des anaeroben Toluolabbaus aus *G. metallireducens* in *E. coli* kloniert. Als Precursor für die Produktion von (*R*)-Benzylsuccinat dient dabei zunächst zugefüttertes Succinat und Benzoat, später soll Succinat als Gärungsendprodukt von *E. coli* selbst bereitgestellt werden. Während Succinat ein Intermediat im Citratzyklus bzw. ein Endprodukt der gemischten Säuregärung in *E. coli* ist, ist Benzoat nicht verwertbar, muss aber für das Funktionieren des geplanten synthetischen Wegs zunächst durch die Zellen aufgenommen und zu Benzoyl-CoA aktiviert werden. Dazu werden dem konstruierten *E. coli*-Stamm zwei weitere Gene aus *A. aromaticum* für die Benzoataufnahme und die Bildung des Coenzym A (CoA)-Thioesters zusätzlich zugefügt.

Für die Exkretion des Produkts Benzylsuccinat ist kein spezifischer Transporter bekannt. Daher wird ein weiteres Gen hinzugefügt, das für ein mutiertes mechanosensitives Kanalprotein kodiert, welches eine unspezifische Exkretion der überproduzierten Metabolite erlauben soll.

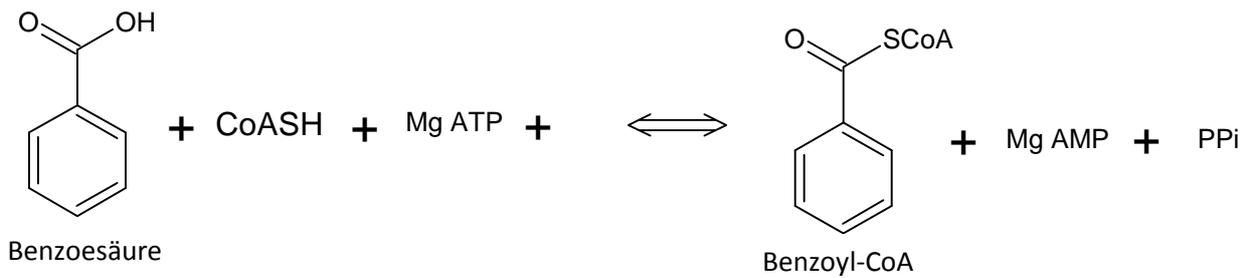


**Abbildung 5:** Geplanter Stoffwechselweg zur Produktion von (*R*)-Benzylsuccinat. Das Startermolekül Benzoat wird zunächst über den Transporter BenK in die Zelle aufgenommen und durch die Benzoat-CoA Ligase BclA zu Benzoyl-CoA umgesetzt. Die Enzyme der  $\beta$ -Oxidation katalysieren anschließend verschiedene Reaktionen, sodass als Endprodukt (*R*)-Benzylsuccinat entsteht.

#### 1.4.1. Die Benzoat-CoA Ligase

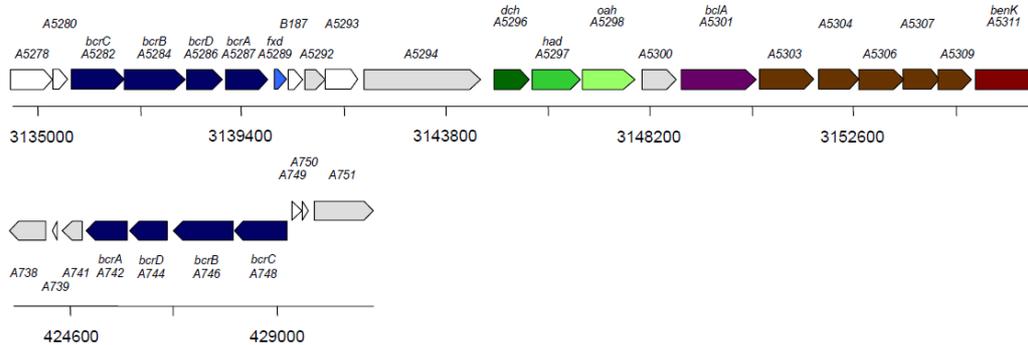
Die Benzoat-CoA Ligase (EC 6.2.1.25) wurde bereits aus verschiedenen fakultativ anaeroben denitrifizierenden, phototrophen und obligat anaeroben Eisen- und Schwefelreduzierenden, Mikroorganismen gereinigt und charakterisiert (Tabelle 1), (Bains & Boulanger, 2007; Geissler et al., 1988; Kawaguchi et al., 2006; López Barragán et al., 2004; Peters et al., 2004; Schühle et al., 2003; Wischgoll et al., 2005).

Sie katalysiert den initialen Schritt des Benzoatabbaus sowohl im aeroben, als auch im anaeroben Stoffwechsel. Dabei wird die Aktivierung von Benzoat zu Benzoyl-CoA an die Hydrolyse von ATP zu AMP und Pyrophosphat gekoppelt (Abbildung 6). Neben Benzoat werden auch 2-Aminobenzoat und 2, 3- bzw. 4-Fluorobenzoat als Substrat akzeptiert.

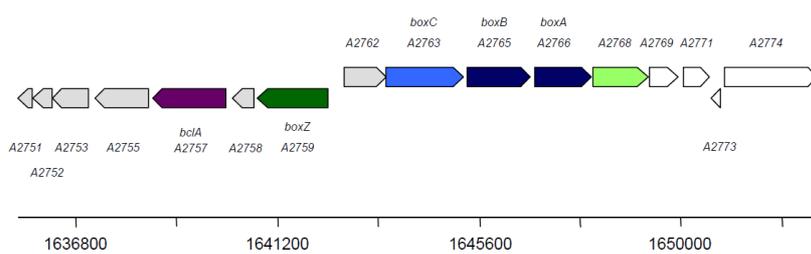


**Abbildung 6:** Ligation von Benzoessäure und Coenzym A (CoA) zu Benzoyl-CoA unter Bildung von AMP und PP<sub>i</sub>, katalisiert durch die Benzoat-CoA Ligase.

Zwei Gene für Benzoat-CoA Ligasen (*bclA*) sind im Genom von *A. aromaticum* kodiert, eines im Gencluster des aeroben, das andere im Gencluster des anaeroben Benzoatabbaus (Abbildung 7 und Abbildung 8) (Rabus et al., 2005).



**Abbildung 7:** Gencluster des anaeroben Benzoatabbaus. Gene: *benK* (H<sup>+</sup>:Benzoatsymporter), *bclA* (Benzoat-CoA Ligase), BcrCBAD (Benzoyl-CoA Reduktase), *Dch* (Cyclohexa-1,5-dien-1-carbonyl-CoA Hydratase), *Had* (6-Hydroxycyclohexa-1-en-1-carbonyl-CoA Dehydrogenase), *Oah* (6-Oxocyclohex-1-en-1-carbonyl-CoA Hydrolase).



**Abbildung 8:** Gencluster des aeroben Benzoatabbaus. Gene: *bclA* (Benzoat-CoA Ligase), *boxAB* (Benzoyl-CoA Oxidationskomplex).

In *T. aromatica* wurden ähnlich wie in *A. aromaticum* bisher zwei Gene gefunden, die für Benzoat-CoA Ligasen kodieren. Es wurde aber festgestellt, dass nur die CoA Ligase aus dem Gencluster des aeroben Benzoatabbaus induziert wird, unabhängig davon, ob die Zellen aerob oder anaerob auf Benzoat wachsen (Schühle et al., 2003). Die Benzoat-CoA Ligase des aeroben Genclusters aus

*A. aromaticum* weist hohe Sequenzähnlichkeit zu bereits charakterisierten Benzoat-CoA Ligasen auf (Tabelle 1). Im Genom von *A. aromaticum* ist sie durch ein Gen mit 1605 Nukleotiden kodiert.

**Tabelle 1: Benzoat-CoA Ligasen im Vergleich.**

Organismus	Accession	Query cover	Max. Ident. im Vgl. zu BclA aus <i>A. aromaticum</i>	Spez. Aktivität [U/mg]	$K_m$ – Werte [ $\mu$ M] für Benzoat	Größe/ Komp.	Referenz
<i>Thauera aromatica</i>	YP_002890110.1	99 %	76 %	16,5	16	57 kDa, $\alpha$	Schühle et al., 2003
<i>Desulfococcus multivoras</i>	-	-	-	8,2	25	59 kDa, $\alpha$	Peters et al., 2004
<i>Burkholderia xenovorans</i>	YP_559588.1	93%	61 %	27,1	120	Nd, $\alpha_2$	Bains and Boulanger 2007
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	YP_568017.1	98%	56 %	25	0,6	60 kDa, $\alpha$	Geissler et al., 1988
<i>Magnetospirillum magneticum</i>	YP_422232.1	98%	59 %	13,4	30	120 kDa, $\alpha_2$	Kawagouchi et al., 2006
<i>Geobacter metallireducens</i>	YP_006721104.1	96%	50 %	16	30	58,5 kDa, $\alpha$	Wischgoll et al., 2005
<i>Azoarcus sp.</i>	YP_934555.1	98%	76 %	8,9	nd	57,4 kDa, $\alpha$	Lopez et al., 2004

(nach <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>.)

#### 1.4.2. Die Succinyl-CoA: Benzoat CoA-Transferase

Die Succinyl-CoA:Benzoat CoA-Transferase (Bct) aus *G. metallireducens* gehört zu der Familie Ia der CoA-Transferasen. Charakteristisch für diese Familie ist ein konserviertes Glutamat im aktiven Zentrum, welches während der Katalyse an der Bildung eines kovalent gebundenen gemischten Anhydrid-Intermediats beteiligt ist (Heider, 2001; Sofia et al., 2009). Das Enzym wurde bereits heterolog in *E. coli* überproduziert, gereinigt und charakterisiert (Oberender et al., 2012). Die Transferase ist spezifisch für Succinat und akzeptiert neben Benzoat nur Cyclohex-1-en-1-carboxylat als CoA Akzeptor. Die katalysierte Reaktion (Abbildung 9) ist komplett reversibel und Hin- und Rückreaktion befinden sich im Gleichgewicht. Die spezifische Aktivität beträgt 265 mU/mg. Der  $K_m$ -Wert für Benzoat beträgt  $55 \pm 5 \mu$ M. Die molekulare Masse des denaturierten Proteins beträgt ca. 50 kDa. Die native molekulare Masse, bestimmt durch Gelfiltration, beträgt ca. 90 kDa, was auf ein Homodimer ( $\alpha_2$ ) hindeutet.

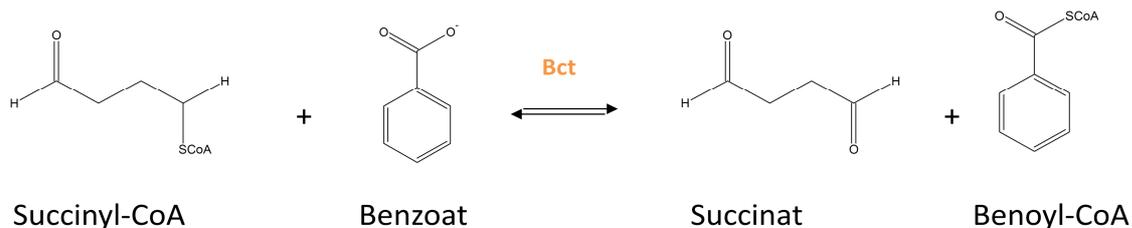


Abbildung 9: CoA-Transferase-Reaktion katalysiert durch die Succinyl-CoA:Benzoat CoA Transferase (Bct).

Wurde *G. metallireducens* auf Benzoat kultiviert, so wurde beobachtet, dass die Succinyl-CoA:Benzoat CoA-Transferase zusammen mit einer Succinyl-CoA Synthetase koinduziert ist. Dadurch wird der Citratzyklus mit dem Abbau von Benzoyl-CoA verknüpft. Im Genom von *G. metallireducens* ist das Gen der Succinyl-CoA:Benzoat CoA-Transferase (gi 78194516) in einem Gencluster zusammen mit Genen nicht spezieller Stoffwechselwege und mit Genen für die  $\beta$ -Oxidation kodiert (Abbildung 10). Durch BLAST-Analysen wurden homologe *bct*-Gene mit einer Sequenzidentität von mindestens 75 % nur in Aromaten-abbauenden Spezies der *Geobacteraceae* gefunden.

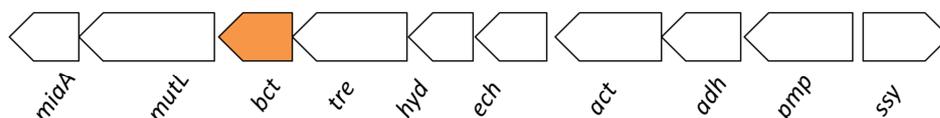


Abbildung 10: Gencluster des *bct*-Gens, das für die Succinyl-CoA:Benzoat CoA-Transferase kodiert (orange unterlegt). Abkürzungen für die annotierten Vorhersagen der Genprodukte: *miaA*, DNA mismatch repair Protein; *mutL*, tRNS Isopentenyl Transferase; *tre*, Transcriptional Regulator mit PAS Sensor; *hyd*, Hydrolase; *ech*, Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase; *act*, Acetyl-CoA Transferase; *adh*, Short-Chain Dehydrogenase; *pmp*, Fusarinsäureresistenzprotein; *ssy*, Natriumsymporter

### 1.4.3. Benzoataufnahme in *A. aromaticum*

Um Benzoat als Kohlenstoff- und Energiequelle zugänglich zu machen, benötigen Mikroorganismen ein entsprechendes Aufnahmesystem. Im Genom von *A. aromaticum* sind zwei putative Benzoattransporter kodiert (Rabus et al., 2005). Sie wurden als ATP-abhängiger ABC-Transporter bzw. als Benzoat:H<sup>+</sup>Symporter (BenK) annotiert. Der ABC-Transporter ist durch ein Operon aus fünf Genen (EbA5303-09) kodiert, das eine Gesamtlänge von 4587 Nukleotiden hat, während der Symporter durch das nur 1502 Nukleotide lange *benK* Gen kodiert ist. Beide Transporter liegen direkt hintereinander im Genom (Abbildung 7). Durch Proteomanalysen konnte gezeigt werden, dass die Synthese beider Benzoattransporter während des Wachstums auf Benzoat induziert wird, unabhängig davon, ob die Wachstumsrate niedrig oder hoch ist (Trautwein et al., 2012).

Der Benzoat:H<sup>+</sup> Symporter BenK gehört aufgrund seiner 12 Transmembranhelices zur „major facilitator superfamily“ (MFS). Die Aminosäuresequenz von BenK aus *A. aromaticum* wurde mit zwei molekularbiologisch und biochemisch charakterisierten BenK-Proteinen verglichen (Tabelle 2). Für das BenK-Ortholog des aeroben benzoatabbauenden Bakteriums *Acinetobacter sp.* ADP1 wurde eine Benzoataufnahmerate von 13 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> bestimmt (Collier et al., 1997), und ein *benK*-Gen aus *Pseudomonas putida* wurde bereits heterolog in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert. Das HA-(influenza virus hemagglutinin) fusionierte Genprodukt BenK zeigte im Westernblot eine Größe von 50 kDa. Hefezellen, die BenK rekombinant produzierten, zeigten ein vermindertes Wachstum in Benzoathaltigem Medium (Nishikawa et al., 2008). Dies lässt sich durch einen pH-Abfall in der Zelle nach Aufnahme von Benzoat erklären (Krebs et al., 1983).

**Tabelle 2: Benzoattransporter BenK im Vergleich.**

Organismus	Acession	Query coverage	Max. Identität zu BenK aus <i>A. aromaticum</i>
<i>Acinetobacter sp.</i>	ZP_09141824.1	98 %	59 %
<i>Pseudomonas putida</i>	YP_001669814.1	94 %	66 %

(nach <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

#### 1.4.4. Export organischer Säuren und die Rolle des „small conductance mechanosensitive channel“ MscS

Die Charakterisierung neuer Exporter für Aminosäuren und anderer kommerziell wichtiger Metaboliten ist zurzeit von besonderem Interesse. Verschiedene Aminosäure-Transporter wurden bereits identifiziert, die zur Steigerung der Produktion von industriellen *E. coli* und *Corynebacterium glutamicum*-Stämmen beitragen können (Burkovski & Krämer, 2002). So wurde der ABC-Transporter Pdr12p in der Hefe *S. cerevisiae* für den Export kleiner organischer Säuren und YddG als Exporter für aromatische Aminosäuren in *E. coli* identifiziert (Doroshenko et al., 2007; Hazelwood et al., 2006). In einem industriellen *E. coli*-Produktionsstamm wurde eine Export-Pumpe der „major facilitator protein family“ identifiziert, die für die Cysteinüberproduktion verantwortlich ist (Daßler et al., 2000). Der Transport von C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren ist in *E. coli* stark reguliert. Unter aeroben Bedingungen katalysieren Dicarboxylat-Transporter der DctA Familie die Aufnahme von Succinat, welches im Citratzyklus ein wichtiges Intermediat ist. Unter anaeroben Bedingungen hingegen entsteht Succinat als Endprodukt während der Fermentation wobei Fumarat als alternativer Elektronenakzeptor fungiert. Daher werden unter anaeroben Bedingungen Transporter der Decarboxylat-Aufnahme-

Familie (Dcu)AB zum Fumarat:Succinat Antiport benutzt und der DcuC Transporter katalysiert zusätzlich den Succinat-Efflux während der Gärung (Janausch et al., 2002).

**Mechanosensitive Kanäle (MscS).** In *C. glutamicum* ist das NCgl1221-Genprodukt, ein mechanosensitiver Efflux-Kanal vom MscS-Typ, verantwortlich für den Export von überproduziertem Glutamat (Nakamura et al., 2007). Ein homologes Protein aus *E. coli* wurde bereits auf seine strukturellen und funktionellen Eigenschaften hin untersucht.

Mechanosensitive Kanäle werden von der Zelle benötigt, um auf hypoosmotischen Stress zu antworten. Sie reagieren auf Spannung der Zellmembran, indem sie sich öffnen, um Ionen ausströmen zu lassen und dadurch das hypoosmotische Ungleichgewicht wieder auszugleichen (Perozo, 2006). Mechanosensitive Kanäle werden nach ihren Eigenschaften eingeteilt in MscL, MscS oder MscM, wobei L für große, S für kleine und M für sehr kleine („minuscle“) Leitfähigkeit steht.

Durch Lösung der Kristallstruktur wurde gezeigt, dass MscS ein Homoheptamer bildet, in dem jede Untereinheit drei Transmembranssegmente und eine große C-terminale cytoplasmatische Domäne besitzt. Die C-terminalen Domänen spielen eine wichtige Rolle für die Stabilität des Proteins. Durch zielgerichtete Mutationen wurden „gain of function“ (GOF) und „lost of function“ (LOF) -Mutanten erhalten. So führt bei MscS von *E. coli* der Austausch der Aminosäure Lysin109 zu Serin zu einem stets geöffneten Kanal (Miller et al., 2003). Diese Mutante wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um eventuell die Exkretion von Benzylsuccinat zu verbessern.

### 1.5. Biphenyl-Metaboliten in der Natur und ihre Anwendungsmöglichkeiten

Biphenyle sind pflanzliche Sekundärmetabolite, die als Phytoalexine zum Schutz vor Mikroorganismen produziert werden. Bisher wurden 10 verschiedene Biphenyle aus 14 von 30 bekannten Pflanzen des Untertribus *Pyrinae* der Rosengewächse isoliert. Das Schlüsselenzym zur Bildung des Biphenylgrundgerüsts ist die Biphenylsynthase, die zu dem Chalkon-Synthetasen gehört (Chizzali & Beerhues, 2012).

Anwendung findet Biphenyl z. B. als Konservierungsmittel für Zitrusfrüchte in der Lebensmittelindustrie (Fuchs, 2006). Weiterhin befinden sich Biphenylstrukturen in verschiedenen Pharmazeutika wie dem Schmerzmittel Flurbiprofen oder dem Blutdruck-senkendem Medikament Valsarten (Bright et al., 2013). Eine weitere mögliche Anwendung könnte das Biphenyl-Derivat N-Biphenyl-Phthalamid künftig in der Stammzell-basierten Therapie von Osteoarthritis finden (Abbildung 11) (Johnson et al., 2012).

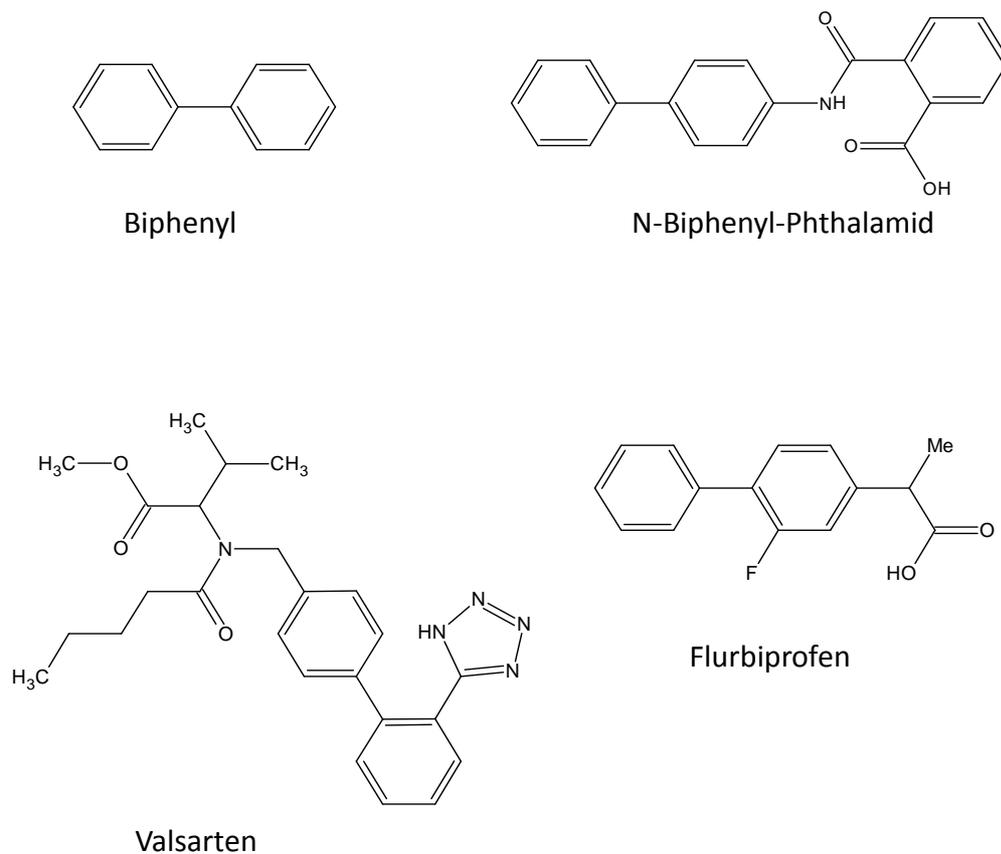
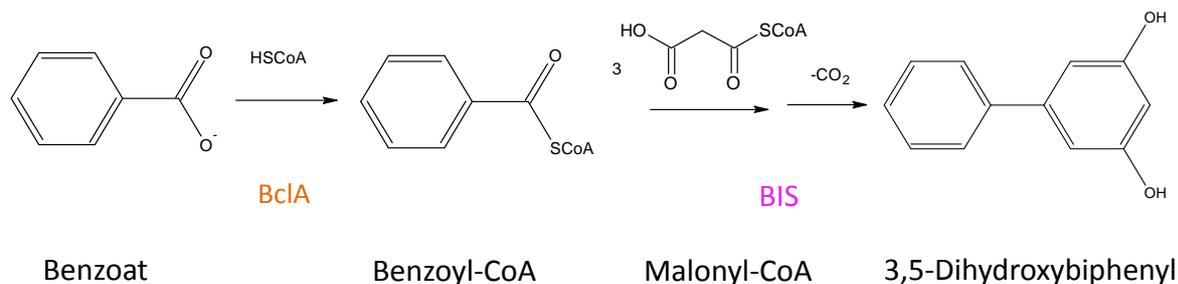


Abbildung 11: Biphenyl und Biphenyl-enhaltende Pharmazeutika.

### 1.6. Geplanter Stoffwechselweg zur bakteriellen Produktion von Biphenylen

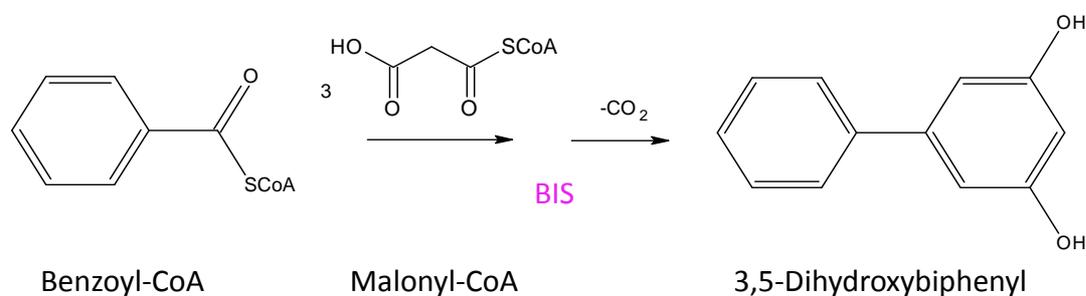
Für die bakterielle Produktion von Biphenyl-Metaboliten soll die Biphenylsynthase (BIS) aus der Vogelbeere (lat. *Sorbus aucuparia*) zusammen mit einem Benzoattransporter (BenK) und einer Benzoat-CoA Ligase (BclA) aus *A. aromaticum* in einem Wirtsorganismus wie *E. coli* oder *S. blattae* überproduziert werden (Abbildung 12). Optional soll zusätzlich eine Malonyl-CoA Synthetase aus *P. denitrificans* dem Produktionsstamm hinzugefügt werden, um ggf. einer Limitierung des zweiten Precursors Malonyl-CoA entgegenzuwirken.



**Abbildung 12:** Geplanter Stoffwechselweg zur Produktion von Biphenylen. Das Startermolekül Benzoat wird zunächst über den Transporter BenK in die Zelle aufgenommen und durch die Benzoat-CoA Ligase BclA zu Benzoyl-CoA umgesetzt. Anschließend katalysiert die Biphenylsynthase BIS die Kondensation von Benzoyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu 3,5-Dihydroxybiphenyl.

### 1.6.1. Die Biphenylsynthase

Die Biphenylsynthase (BIS) gehört zur Familie der Typ III Polyketid Synthetasen (PKS). Sie wurde zuerst entdeckt in Hefeextrakt-behandelten Zellkulturen der Vogelbeere (*Sorbus aucuparia*) (Liu et al., 2004) und dann in *E. coli* rekombinant überproduziert, gereinigt und charakterisiert (Liu et al., 2007). Das Enzym katalysiert die Aldol-Kondensation von Benzoyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA und die anschließende intramolekulare Konversion und Decarboxylierung zu 3,5-Dihydroxybiphenyl.



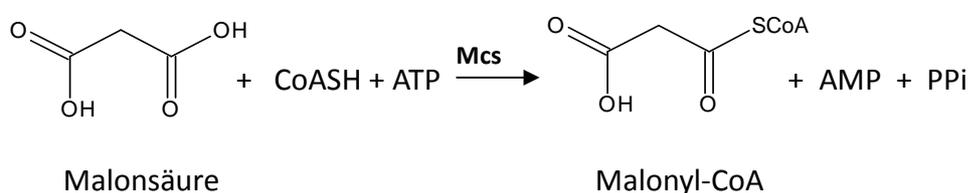
**Abbildung 13:** Reaktion katalysiert durch die Biphenylsynthase aus *S. aucuparia* (BIS).

Die molekulare Masse des nativ gereinigten Proteins beträgt 85 kDa, was auf ein Homodimer schließen lässt. Die apparenten  $K_m$ -Werte für Benzoyl-CoA und Malonyl-CoA betragen  $0,7 \mu\text{M}$  und  $6,5 \mu\text{M}$  und die Wechselzahl beträgt  $0,43 \text{ min}^{-1}$ . Das Enzym erlangt seine maximale Aktivität bei einem pH-Wert von 6,5 bis 7 und einem Temperaturoptimum von  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Reaktion verläuft über eine katalytische Triade, bei der die Aminosäurereste von Cystein, Histidin und Asparagin im aktiven Zentrum des Enzyms beteiligt sind (Ferrer et al., 1999).

Die antibakterielle Aktivität von Phytoalexinen gegen das Feuerbrand-auslösende Bakterium *Erwinia amylovora* wurde kürzlich getestet. Die stärkste Wirkung wurde mit 3,5-Dihydroxybiphenyl bei einer minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) von 115 µg/ml erzielt (Chizzali et al., 2012).

### 1.6.2. Die Malonyl-CoA Synthetase

Die Malonyl-CoA Synthetase (Mcs) gehört zur Familie der AMP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen. Das Enzym katalysiert die Aktivierung von Malonat zu Malonyl-CoA durch Kopplung der Reaktion an die Hydrolyse von ATP zu AMP und Pyrophosphat (Abbildung 1).



**Abbildung 14:** Ligation von Malonsäure und Coenzym A (CoA) zu Malonyl-CoA unter Bildung von AMP und PP<sub>i</sub>, katalisiert durch die Malonyl-CoA Synthetase (Mcs).

Das Enzym wurde bereits aus verschiedenen Organismen, darunter Bakterien, Pflanzen- und Säugetierzellen biochemisch charakterisiert (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Malonyl-CoA Synthetase aus verschiedenen Organismen im Vergleich.

Organismus	K <sub>m</sub> (µM)	V <sub>max</sub> (U/mg)	Größe/Komposition	Referenz
<i>Rhizobium japonicum</i>	200	21,3	58 kDa, Monomer	Kim and Chae, 1991
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	380	0,117	98 kDa, Homodimer	Kim and Bang, 1984
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	260	22,7	-	Kim and Kang, 1994
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	110	18	49 kDa, Monomer	Crosby et al., 2012
<i>Arabidopsis thaliana</i>	530	24,0	60 kDa	Chet et al., 2011
Mammalian Mitochondrien	37	-	65 kDa,	Witkowski et al., 2011
Erbsenblatt Mitochondrien	5200	0,13 *10 <sup>-3</sup>	-	Gueguen et al., 2000

Kinetische Studien zeigten, dass die Enzymreaktion einem Bi-Uni-Uni-Bi-Ping-Pong-Ter-Ter-Mechanismus folgt (Abbildung 15); (Kim & Kang, 1994).

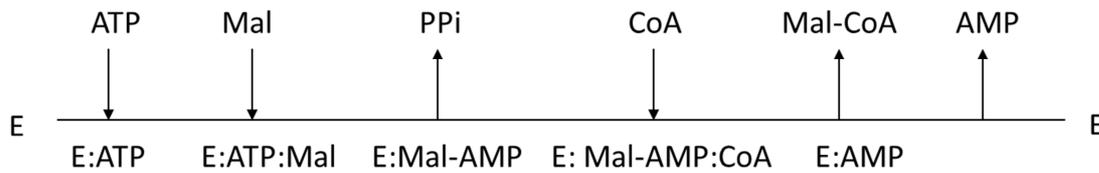


Abbildung 15: Bi-Uni-Uni-Bi-Ping-Pong-Ter-Ter-Reaktionsmechanismus der Malonyl-CoA Synthetase.

Die Kristallstruktur der Malonyl-CoA Synthetase aus *Rhodospseudomonas palustris* wurde bereits gelöst. Die Substratbindetasche ist in allen bisher gefundenen Malonyl-CoA Synthetasen konserviert und durch die Aminosäuresequenz  $Px_2HxHGx_nERYGMTETxMx_2SxPx_2GP$  definiert. Neben Malonat akzeptiert das Enzym auch Methylmalonat, Ethylmalonat und Butylmalonat als Substrate (Crosby et al., 2012).

Im Katabolismus wird Malonat zunächst je nach Malonat-abbauender Bakterienart entweder über Malonyl-CoA oder über Malonyl-ACP zu Acetyl-CoA umgesetzt, bevor es weiter über den Citratzyklus verstoffwechselt wird (Suvorova et al., 2012). Malonyl-CoA dient außerdem als Precursor zur Synthese von Fettsäuren, Polyketiden, Phytoalexinen und Flavonoiden. Daher wurde die Malonyl-CoA Synthetase bereits für verschiedene biotechnologische Anwendungen rekombinant überproduziert. So wurde ein rekombinanter *E. coli*-Stamm erzeugt, der durch Überproduktion der Malonyl-CoA Synthetase aus *R. trifolii* zusammen mit sieben weiteren Genprodukten direkt aus Glucose 2S-Pinocembrin produzierte, ein wichtiges Flavonoid z. B. zur Therapie von Blut-Hirn-Schäden (Wu et al., 2012). Ebenfalls zur Produktion von Flavonoiden wurde die Malonyl-CoA Synthetase zusammen mit dem Malonat-Carrier-Protein aus *Streptomyces coelicolor* in *S. venezuelae* produziert (Park, 2011), und zur Produktion von Polyketiden wurde eine Bibliothek aus neuen Precursoren erstellt, die durch Acyl-CoA Ligasen, wie der Malonyl-CoA Synthetase, synthetisiert werden (Go et al., 2012).

### 1.7. Ziel der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Konstruktion eines bakteriellen Produktionsstamms zur Synthese von (*R*)-Benzylsuccinat. Dazu sollen die Gene der  $\beta$ -Oxidation *bbsA-H* sowie das *benK*-Gen, dessen Genprodukt die Benzoataufnahme in der Zelle katalysiert, und ein Gen welches zur Synthese von Benzoyl-CoA dient, in *E. coli* kloniert und exprimiert werden. Die Aktivität der rekombinanten Enzyme soll für einen revers laufenden  $\beta$ -Oxidationsweg genutzt werden, sodass durch Zugabe von Benzoat zu den Zellen mit endogen produziertem Succinat unter anaeroben Bedingungen Benzylsuccinat produziert werden kann.

Ein weiterer synthetischer Stoffwechselweg soll zur Synthese von Biphenyl dienen. Dazu sollen vier Gene, die für Benzoataufnahme, Benzoyl- und Malonyl-CoA Synthese und Biphenylsynthese dienen, kloniert und in einen Wirtsorganismus transferiert werden, sodass das rekombinante Bakterium nach Zugabe von Benzoat (und evtl. Malonat) Biphenyl produziert.

Im *bbs*-Operon kodieren die Gene *bbsA* und *bbsB* für die Untereinheiten einer Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase, die Gene *bbsE* und *bbsF* für die Untereinheiten einer CoA-Transferase für Benzylsuccinat. Diese Enzyme sind biochemisch äußerst interessant und sollen mittels der entstandenen Konstrukte rekombinant produziert und aufgereinigt werden, sodass genug Protein für eine anschließende Kristallisation und die damit verbundene Strukturaufklärung erhalten wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien, Biochemikalien und Gase

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, in der größtmöglichen Reinheit von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Alpha Aesar (Karlsruhe) bezogen.

Polymerasen, T4-DNA-Ligasen und Restriktionsendonukleasen wurden von der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt) und Merck (Darmstadt) bezogen.

Stickstoff (99,999 %) wurde von den Firmen Airliquide (Düsseldorf) und Praxair (Düsseldorf) erhalten.

#### 2.1.2. Chromatographiematerial

Material und Ausrüstung für die Proteinreinigung stammten von den Firmen GE Healthcare (Freiburg), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), BioRad (München), Agilent Technologies GmbH (Böblingen) und Sykam (Eresing).

### 2.2. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Die verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 4 und 5 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Mikroorganismen

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Thauera aromatica</i> Stamm K172	Wildtyp (DSMZ-Nr. 6984)	(Tschech & Fuchs, 1987)
<i>Aromatoleum aromaticum</i> Stamm EbN1	Wildtyp (DSMZ-Nr. 9506)	(Dolfing et al., 1990)
<i>Geobacter metallireducens</i> Stamm GS-15	Wildtyp (DSMZ-Nr. 7210)	(Lovley & Lonergan, 1990)
<i>Shimwellia blattae</i>	Wildtyp (DSMZ-Nr. 4481)	(Burgess et al., 1973b)
<i>Paracoccus denitrificans</i> Typstamm	Wildtyp DSMZ-Nr. 413T	(Rainey et al., 1999)
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	$F^{\prime}$ $\phi$ 80 $\Delta$ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZ</i> YA- <i>argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>end</i>	Bioline GmbH (Luckenwalde)

	<i>A1, hsdR17(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), phoA, supE44, λ<sup>-</sup>, thi-1, gyrA96, relA1]</i> und α-kompetent	
<i>Escherichia coli</i> Top10	<i>hsdR, mcrA, lacZΔM15, endA1, recA1</i>	Invitrogen (Darmstadt)
<i>Escherichia coli</i> Rosetta (DE3) pLysS	<i>FompT hsdS<sub>E</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> pRARE (Cam <sup>R</sup> )	Novagen (Darmstadt)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B ; <i>F-hsdS gal λ</i> (DE3)	(Studier und Moffatt, 1986)

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

Name	Genotyp	Promotor	Referenz
pEntry	Kan <sup>R</sup>		IBA (Göttingen)
pCFUSE	Amp <sup>R</sup>		IBA (Göttingen)
pNFUSE	Amp <sup>R</sup>		IBA (Göttingen)
pASG-IBA5	Amp <sup>R</sup>	tet	IBA (Göttingen)
pPSG-IBA5	Amp <sup>R</sup>	T7	IBA (Göttingen)
pRSET B_BIS	Amp <sup>R</sup>	T7	Liu et al. 2007
pEKEx2_mscs_His_L09S	Kan <sup>R</sup>	tac	Schenkung Prof. Dr. Krämer, Universität Köln
pASK-IBA3C	Cm <sup>R</sup>	tet	IBA (Göttingen)
pASK-IBA3C_mcs	Cm <sup>R</sup>	tet	diese Arbeit
pASGcmR	Cm <sup>R</sup>	tet	diese Arbeit
pASG5_bct	Amp <sup>R</sup>	tet	diese Arbeit
pPSG5_bclA	Amp <sup>R</sup>	T7	diese Arbeit
pLigBen	Cm <sup>R</sup>	tet	diese Arbeit
pLigBenEx	Cm <sup>R</sup>	tet	diese Arbeit
pTransBen	Cm <sup>R</sup>	tet	diese Arbeit

---

pRSF-DUET	Kan <sup>R</sup>	T7	Novagen (Darmstadt)
pEF	Kan <sup>R</sup>	T7	diese Arbeit
pBBR1MCS-2	Kan <sup>R</sup>	Lac	Kovach et al., 1994
pBeta	Kan <sup>R</sup>	Lac	diese Arbeit
pASG5_mod	Amp <sup>R</sup>	tet	AG Heider
pEtfXGH	Amp <sup>R</sup>	tet	diese Arbeit
pASG5_mod-bclA-bis-benK	Amp <sup>R</sup>	tet	diese Arbeit
pASG5_mod-benK	Amp <sup>R</sup>	tet	diese Arbeit

---

### 2.3. Medien

*E. coli* und *S. blattae* wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium (Tabelle 6) oder M9 Minimal Medium (Tabelle 7) kultiviert. Zur anaeroben Anzucht wurden die Medien vor dem Autoklavieren für mindestens 15 Zyklen mit Stickstoff be- und entgast.

Zusätzlich wurde für die Anzucht das Autoinduktionsmedium ZYP-5052 (Studier, 2005) verwendet (Tabelle 8).

Die als Selektionsmarker notwendigen Antibiotika wurden den Medien abhängig von plasmidkodierten Resistenzen zugesetzt (Tabelle 13). Nährböden wurden durch Zugabe von 1,5 % Agar (w/v) hergestellt.

**Tabelle 6: Luria-Bertani-Medium**

<b>Luria-Bertani (LB)-Medium (Miller, 1972)</b>	<b>Einwaage</b>
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Natriumchlorid	5 g/l

Je nach Versuchszweck wurde dem Medium 10 mM Glucose, 10 mM Succinat, 2 mM Benzoat oder 5 mM Malonat zugesetzt. Für die Produktion der Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase BbsAB wurde das LB-Medium modifiziert, indem lediglich 0,5 g/l Hefeextrakt eingesetzt wurden.

**Tabelle 7: M9 Minimal-Medium**

<b>M9 Minimal-Medium</b>	<b>Einwaage</b>
di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat	12,8 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	3 g/l
Natriumchlorid	0,5 g/l
Ammoniumchlorid	1 g/l

Die Salze wurden in destilliertem Wasser gelöst und der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Nach dem Autoklavieren der Lösung wurden 2 mM Magnesiumsulfat und 0,1 mM Calciumchlorid sowie je nach Versuchszweck 10 mM Glucose, 10 mM Succinat, 5 mM Malonat, 20 mM Fumarat und 2 mM Benzoat zugesetzt.

Tabelle 8: Autoinduktionsmedium ZYP-5052

Komponenten	Anteil im Autoinduktionsmedium
ZY-Grundmedium	928 ml/l
1 M MgSO <sub>4</sub>	1 ml/l
20-fach NPS	50 ml/l
1000-fach Spurenelemente	0,4 ml/l
50-fach 5052 Lösung	20 ml/l

Tabelle 9: ZY-Grundmedium

Komponente	Einwaage
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l

Nach dem Autoklavieren wurde das ZY-Grundmedium unter sterilen Bedingungen supplementiert.

Tabelle 10: NPS (20 x)

Komponente	Einwaage
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	66 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	71 g/l

Tabelle 11: 5052-Lösung (50 x)

Komponente	Einwaage
Glycerin	250 g/l
Glucose	25 g/l
Lactose	100 g/l

Tabelle 12: Spurenelemente (1000 x)

Komponente	Einwaage	Volumen in 100 ml Spurenelementlösung
0,1 M FeCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	27 g/l	50 ml
1 M CaCl <sub>2</sub>	147 g/l	2 ml
1 M ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	288 g/l	1 ml

---

0,2 M $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	48 g/l	1 ml
0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	17 g/l	2 ml
0,2 M $\text{NiCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	48 g/l	1 ml
0,1 M $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	24 g/l	2 ml
0,1 M $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	17 g/l	2 ml
0,1 M $\text{H}_3\text{BO}_3$	6 g/l	2 ml
1 M $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	198 g/l	1 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$		36 ml

---

Das FeCl<sub>3</sub> wurde in 0,1 M HCl gelöst. Alle Komponenten wurden einzeln angesetzt und nach dem Zusammenfügen sterilfiltriert. Je nach Antibiotikaresistenzgen und Promotor des Expressionsplasmids wurden die in Tabelle 13 angegebenen Antibiotika und Supplemente eingesetzt.

**Tabelle 13: Antibiotika und Supplemente**

<b>Verbindung</b>	<b>Stocklösung</b>	<b>Endkonzentration</b>
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml	30 µg/ml
IPTG	0,5 M	0,5 mM
AHT	2 g/l	0,2 mg/l
X-Gal	40 mg/ml	40 µg/ml

#### **2.4. Kultivierung von Mikroorganismen, *in vivo* – Expression plasmidkodierter Gene, Herstellung von Zellextrakten und Benzylsuccinatproduktion**

**Kultivierung von Mikroorganismen.** Die Anzucht der in Tabelle 4 aufgeführten Mikroorganismen erfolgte in den unter 2.3 aufgeführten Medien bei 37 °C im Erlenmeyerkolben bei 180 rpm, bzw. im 5 l-Erlenmeyerkolben auf einem Rührer bei 900 rpm. Das Wachstum der Kulturen wurde durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm im Spektrophotometer (ThermoFisher, Braunschweig) verfolgt. Bei einer OD von 0,4–0,6 erfolgte die Induktion der Genexpression. Die Kulturen wurden anschließend bei 15°C oder Raumtemperatur inkubiert, um die Löslichkeit der rekombinanten Proteine zu erhöhen.

***In vivo*-Expression plasmidkodierter Gene.** Sollte die Kultivierung der Überproduktion von rekombinanten Enzymen dienen, wurden die Zellen nach der Induktion über Nacht bei 15 °C inkubiert und anschließend geerntet. Dazu wurden die Kulturen in 500 ml-Zentrifugenbecher überführt und 20 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert (Sorvall Discovery M120, Kendro). Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

**Herstellung von Zellextrakt.** Das geerntete Zellpellet wurde in einem Volumen (w/v) Aufschlusspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2mg DNase I) aufgenommen und auf Eis resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreifaches Passagieren durch eine FrenchPress-Zelle bei 1000 psi und 4 °C. Die Suspension wurde anschließend eine Stunde bei 35.000 rpm und 4 °C ultrazentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge, Ti 70 oder Ti 75 Festwinkelrotor). Der Überstand wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei -80 °C in 10 % Glycerin gelagert.

Zur Überprüfung der Produktion wurde vor der Induktion und nach Ernte der Zellen jeweils 1 ml der Kultur entnommen, sedimentiert (13000 rpm, 10 Minuten, 4 °C) und in SDS-Probenpuffer (Tabelle 23) resuspendiert. Nach Erhitzen der Proben auf 95 °C für 5 Minuten wurden 20–25 µg auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und analysiert.

**Benzylsuccinatproduktion.** Bei Verwendung der Kulturen zur Produktion von Benzylsuccinat wurden die Zellen nach der Induktion bei 15 °C für drei Tage inkubiert. Die Zellen wurden in einer Falcon-Zentrifuge bei 5000 rpm geerntet und der Kulturüberstand sowie das Zellpellet bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

## 2.5. Molekularbiologische und Genetische Methoden

### 2.5.1. Isolierung chromosomaler DNA

Chromosomale DNA aus verschiedenen Bakterienstämmen wurde mittels CTAB-Methode nach Murray und Thompson isoliert (Murray & Thompson, 1980).

### 2.5.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml Übernacht-Kulturen in LB/Antibiotika-Medium mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) isoliert.

### 2.5.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden amplifiziert durch PCR (Mullis K. et al., 1986) und mit Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen zur Klonierung in Plasmide versehen. Die Reaktionen wurden im Thermocycler (VWR) mit den in Tabelle 14 bzw. Tabelle 16 angegebenen Komponenten, denen in

Tabelle 15 bzw 17 angegebenen Zyklusprogrammen und den Oligonukleotiden in Tabelle 18 durchgeführt. Außer für die Amplifizierung des *bbs*-Operons aus *G. metallireducens* wurden alle PCR-Reaktionen mittels Phusion DNA-Polymerase durchgeführt.

**Tabelle 14: Zusammensetzung der PCR-Komponenten für die Phusion DNA Polymerase**

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration im Reaktionsansatz</b>
5x Phusion GC-Puffer (Finnzymes, Espoo, Finnland)	1x
dNTP-Mix (Fermentas, St. Leon-Rot)	Je 200 µM
Primer forward bzw. reverse (biomers, Ulm)	Je 0,2 µM
DMSO	3 %
chromosomale DNA	50 – 250 ng
Phusion High-Fidelity-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt)	0,02 U/µl

**Tabelle 15: Zyklusprogramm für die Phusion DNA-Polymerase**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
Denaturierung	98 °C	2 min
Denaturierung	98 °C	20 s
Annealing	50 – 72 °C	30 s
Elongation	72 °C	2 kb/min
Elongation	72 °C	5 min

Schritt 2 bis 4 wurden 30 Mal wiederholt.

**Tabelle 16: Zusammensetzung der PCR Komponenten für die KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase**

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration im Reaktionsansatz</b>
10x Puffer für KOD Hot Start DNA-Polymerase (Merck, Darmstadt)	1x
dNTP-Mix (Fermentas, St. Leon-Rot)	Je 200µM
MgSO <sub>4</sub>	1,5 mM
Primer forward bzw. Reverse (biomers, Ulm)	Je 0,3 µM
DMSO	3 %
chromosomale DNA	50 – 250 ng
KOD Hot Start DNA Polymerase (Merck, Darmstadt)	0,02 U/µl

Tabelle 17: Zyklusprogramm für die KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	9 °C	2 min
Denaturierung	98 °C	10 s
Annealing	50 – 72 °C	30 s
Elongation	68 °C	1min/kb

Tabelle 18: Verwendete Primer und zugehörige annealing-Temperaturen. Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen sind fett gedruckt, Start und Stop-Sequenzen unterstrichen.

Primer	Sequenz	Annealing Temperatur
bclA_Lgul for	AAGCTCTTCAATGCACACGCTCAGCGCGG	65 °C
bclA_Lgul rev	AAGCTCTTCACCCACGCCCGGCACCCTGC	65 °C
benK_Lgul for	AAGCTCTTCAATGCGAAAAATCGATGTTACGAGTTG	72 °C
benK_Lgul rev	AAGCTCTTCACCCCTCGGCGCGATGAACTGG	72 °C
bclA-BIS for	TGATTCTTAACCAAAGGCGCCATAGTCGCATCCTCCTTAACGCC CGG CACCCCTGC	65 °C
bclA-BIS rev	GCAGGGTGCCGGGCGTTAAGGAGGATGCGACTATGGCGCCTT TGGTTAAGAATCA	67 °C
BIS_Lgul rev	AAGCTCTTCACCCGCATGGAATAGATTCACT	67 °C
Mscs Lgul for	AAGCTCTTCAATGGAAGATTTGAATGTTGTC	51 °C
Mscs Lgul rev	AAGCTCTTCACCCCGCAGCTTTGTCTTCT	51 °C
yggB Lgul for	AAGCTCTTCAATGATTTTAGGCGTACCCATTCAATATTTG	60 °C
yggB Lgul rev	AAGCTCTTCACCCAGGGGTGGACGTCGG	60 °C
Gmet_bbsE_s	AAGCTCTTCAATGAGTAATACCGGATCG	51 °C
Gmet_bbsF_as	AAGCTCTTCACCCACAAGCACCTTTTCCT	51 °C
Gmet_bbsA_s	AAGCTCTTCAATGGCAAAGGAAGAGGTTAAG	55 °C
Gmet_bbsB_as	AAGCTCTTCACCCACCCCTTTACCAGC	55 °C
Gmet_bbsC_s	AAGCTCTTCAATGAAAGACAGAACAGCAC	53 °C
Gmet_bbsD_as	AAGCTCTTCACCCCTGCAAACAGACTTC	53 °C
Gmet_bbsG_s	AAGCTCTTCAATGGATTTTCAGCATACCCGAAGAATAC	61 °C
Gmet_bbsG_as	AAGCTCTTCACCCCTCCTCGTCGGCGGC	61 °C
Gmet_BbsH_s	AAGCTCTTCAATGGGAGTTGATTTGTAACAG	56 °C
Gmet_bbsH_as	AAGCTCTTCACCCCTCCTCCCGATACTGG	56 °C
Gmet_EtfB_s	AAGCTCTTCAATGCAGATAGTCGTCTTGG	55 °C
Gmet_EtfA_as	AAGCTCTTCACCCGGCGTTCTCCTTGAGG	55 °C
phosphoriliert bbsGmet for	ATGAGTAATACCGGATCGTTATCATATC	59 °C
phosphoriliert bbsGmet rev	TCACCCTGCAAACAGACTTCT	59 °C
pBBR for	ATCGAATTCCTGCAGCC	55 °C
pBBR rev	ATCAAGCTTATCGATACCGTC	55 °C
CmR for BspHI	AATCATGAGTTGATCGGCACGTAAGAG	57 °C
CmR rev BspHI	AATCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCAC	57 °C
Mcs for EcoRI	ATGGTAGAATTCATGAGTGACAATCTGTTGACC	59 °C
Mcs rev HindIII	ATGGTAAAGCTTCTAGTCGTAAAGCCCGGCG	59 °C
Gmet_E s BamHI	ATGGTAGGATCCATGAGTAATACCGGATCG	52 °C
Gmet F as HindIII	ATGGTAAAGCTTTCACACAAGCACCTTTTCCT	52 °C

Gmet_bct s Lgul	AAGCTCTTCAATGAACGTCGTCACAC	53 °C
Gmet_bct as Lgul	AAGCTCTTCA <u>CCCT</u> GTTCAGATTCTGTTTCATTCTC	53 °C

Alle PCR-Reaktionen wurden durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurden 3 µl Reaktionsprodukt mit 0,5 µl 6x Probenpuffer versetzt und auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Für die weitere Verwendung wurden die PCR-Produkte mit dem GeneJET™ PCR-Purification Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) aufgereinigt oder bei zusätzlichen unspezifischen Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mit dem GeneJET™ Gel-Extraction Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) aufgereinigt.

#### 2.5.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) verwendet. Die Proben wurden vor dem Lauf mit 6x DNA-Probenpuffer (50 % (w/v) Glycerin; 0,1 M EDTA; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) gemischt. Die DNA-Fragment-Größen wurden mittels FastRuler MiddleRange oder GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) bestimmt. Die Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte in einer Agarosegel-Laufkammer bei konstant 120 V für 20 bis 45 Minuten. Nach Färbung des Gels in Ethidiumbromid wurde die aufgetrennte DNA mittels UV-Licht bei 304 nm detektiert (Bachhofer, Reutlingen).

#### 2.5.5. Klonierungstechniken

##### 2.5.5.1. Kombinatorisches Klonieren

In dieser Arbeit hergestellte „pASG“-Plasmide wurden nach dem Prinzip des kombinatorischen Klonierens erstellt. Dazu wurde im ersten Schritt ein DNA-Fragment mit *Lgul*-Restriktionsschnittstelle amplifiziert. Restriktion und Ligation des Inserts und des pEntry-Vektors (pE-IBA20) erfolgten zeitgleich im selben Reaktionsgefäß. Ausgehend vom entstandenen Donorvektor konnte das DNA-Fragment anschließend entweder in einen Expressionsvektor (hier pASG\_mod oder pASGcmR) oder zur Fusionsklonierung in einen pCFUSE-IBA- oder pNFUSE-IBA-Vektor kloniert werden. Mit Hilfe der FUSE-Vektoren war es möglich, gezielt Gene hintereinander in einen Expressionsvektor zu klonieren.

**Klonierung von Donorvektoren.** Gereinigte PCR-Produkte wurden mittels *LguI*-Restriktionsendonuklease in den pEntryvektor inseriert. Der Reaktionsansatz (Tabelle 19) wurde mindestens eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Nach Transformation mit elektro- oder chemisch kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$ /Top10-Zellen wurden die Klone auf Kanamycinresistenz und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität durch Verwendung von Kanamycinsulfat bzw. X-Gal (Blau-Weiß-Test) selektioniert. Plasmide aus Klonen mit einer weißen Farbe wurden präpariert und eine Restriktions- sowie eine Sequenzanalyse wurden durchgeführt.

Tabelle 19: Klonierung der Donorvektoren

Komponente	Endkonzentration im Reaktionsansatz
pE-IBA20	25 ng
Insert	100 ng
„Tango“-Puffer 10 x (Fermentas, St. Leon-Rot)	1 x
DTT	1 mM
ATP	0,5 mM
<i>LguI</i>	5 U/ $\mu$ l
T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot)	2 U/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	auf 50 $\mu$ l auffüllen

**Klonierung von Expressionsvektoren.** Die Expressionsvektoren wurden analog zu den Donorvektoren kloniert. Statt der PCR-Fragmente wurden hier Donorvektoren mit dem gewünschten Insert eingesetzt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Klonierung von Expressionsvektoren

Komponente	Endkonzentration im Reaktionsansatz
Donorvektor	25 ng
Expressionsvektor	100 ng
„Tango“-Puffer 10 x	1 x
DTT	1 mM
ATP	0,5 mM
<i>Esp3I</i>	5 U/ $\mu$ l
T4-DNA-Ligase	2 U/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	auf 50 $\mu$ l auffüllen

Die transformierten *E. coli*-Zellen wurden auf Ampicillinresistenz und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität durch Verwendung von Ampicillin bzw. X-Gal selektioniert.

**Fusionsklonierung.** Gene wurden gezielt hintereinander kloniert, indem wie ausgehend vom Donorvektor entweder in einen pNFUSE-IBA- oder pCFUSE-IBA-Vektor kloniert wurden. Die Klonierung erfolgte analog zu jener der Expressionsvektoren. Statt des Expressionsvektors wurde der entsprechende pNFUSE- oder pCFUSE-Vektor eingesetzt. Ausgehend von den erhaltenen FUSE-Donorvektoren wurden die Inserts in den pEntryvektor transferiert. Die Klonierung erfolgte analog zu jener Klonierung von Donorvektoren. Statt des PCR-Fragments wurden hier die gewünschten pCFUSE und pNFUSE Plasmide eingesetzt. Die erhaltenen pEntry-Donorvektoren konnten nun entweder weiter zur Klonierung von Expressionsvektoren genutzt werden oder zur weiteren Fusionsklonierung. Die Plasmide pLigBen, pTransBen, pLigBenEx, pEtfXGH, pASGmod\_benK und pASG5\_bct wurden durch kombinatorisches Klonieren erhalten. Wie folgt beschrieben wurde das Plasmid pASGmod\_bclA\_bis\_benK etwas abweichend von dieser Methode erstellt.

**Fusionsklonierung des Benzoattransporters zusammen mit der Benzoat-CoA Ligase und der Biphenylsynthase.** Das PCR-Produkt aus den Genen der Benzoat-CoA Ligase aus *A. aromaticum* und der Biphenylsynthase aus *S. alicuparia* wurde zunächst durch eine Zwei-Schritt-Fusions-PCR mit den Primerpaaren bclA\_Lgul for/ bclA-BIS rev und bclA-BIS for/ BIS\_Lgul rev amplifiziert. Als Vorlage für *bclA* diene genomische DNA und für BIS diene Plasmid-DNA des pGEM-T-BIS (Liu et al., 2007). Beide PCR-Produkte dienten als Vorlage für die Amplifikation des Fusionsproduktes, welches mit Hilfe des Primerpaares bclA\_Lgul for/BIS\_Lgul rev erzeugt wurde. Das Plasmid pASG5\_mod\_ori\_bclA\_BIS\_benK wurde erzeugt, indem ausgehend von den pEntry Plasmiden pEntry\_bclA\_BIS und pEntry\_benK Fusionsklonierung angewendet wurde.

#### 2.5.5.2. Konstruktion von Expressionsplasmiden mittels klassischer Strategien

**pASK-IBA3C\_mcs.** Das Gen der Malonyl-CoA Synthetase *mcs* wurde aus *P. denitrificans* mit den Primern Mcs for *HindIII* und Mcs rev *EcoRI* (Tabelle 18) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *EcoRI* geschnitten. Das gereinigte Fragment wurde im nächsten Schritt mit dem ebenfalls mit *EcoRI* und *HindIII* restringierten Vektor pASK-IBA3C ligiert. Nach Transformation mit chemisch kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde auf Chloramphenicolresistenz selektioniert. Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung verifiziert.

**pRSF-DUET\_EF\_Gmet.** Die Gene der Benzylsuccinat CoA-Transferase *bbsEF* wurde aus *G. metallireducens* mit den Primern Gmet\_E s *BamHI* und Gmet\_F as *HindIII* (Tabelle 18) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *BamHI*

geschnitten. Das gereinigte Fragment wurde im nächsten Schritt mit dem ebenfalls mit *Bam*HI und *Hind*III restringierten Vektor pASK-IBA3C ligiert. Nach Transformation mit chemisch kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde auf Kanamycinresistenz selektioniert. Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung verifiziert.

**pBBR1mcs2\_bbs\_Gmet.** Die Gene des *bbs*-Operons aus *G. metallireducens* wurden mit den phosphorylierten Primern *bbsGmet* for/rev (Tabelle 18) mittels KOD Hot Start DNA-Polymerase amplifiziert. Das Plasmid pBBR1mcs2 wurde ausgehend von der *Kpn*I-Restriktionsstelle mit den Primern pBBR for und pBBR rev amplifiziert. Die gereinigten PCR-Produkte wurden *blunt end* ligiert. Nach Transformation mit chemisch kompetenten *E. coli* Top10 wurde auf Kanamycinresistenz und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (Blau-Weiß-Test) selektioniert. Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung verifiziert.

**pASGcmR.** Die Gene *tetA* und *cat*, die für die Tetracyclin- und Chloramphenicolresistenz kodieren wurden aus dem Vektor pASK-IBA3C mit den Primern CmR *Bsp*HI for/rev (Tabelle 18) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und mit der Restriktionsendonuklease *Bsp*HI geschnitten. Der pASG-IBA5-Vektor wurde ebenfalls mit *Bsp*HI verdaut und das größere der beiden erhaltenen Fragmente aus einem 1 %-igem Agarosegel eluiert. Beide Fragmente wurden ligiert. Nach Transformation mit chemisch kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde auf Chloramphenicolresistenz selektioniert. Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung verifiziert.

### 2.5.6. Herstellung chemisch- und elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

**Chemisch kompetente Zellen.** Eine 5 ml-Übernachtskultur wurde ausgehend von einer Einzelkolonie kultiviert und zum Beimpfen von 400 ml SOB-Medium (2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM MgSO<sub>4</sub>) verwendet. Diese wurde bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,4 bis 0,8 bei 18 °C und bei 200 rpm schüttelnd inkubiert und anschließend für 10 Minuten auf Eis abgekühlt. Dann wurden die Zellen bei 4 °C und 5000 rpm (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 25 ml kaltem Transformationspuffer (10 mM PIPES (pH 6,7), 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, und 55 mM MnCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis und erneutem Zentrifugieren bei 5000 rpm und 4 °C wurden die Zellen in 5 ml Transformationspuffer mit 7 % (v/v) sterilem DMSO aufgenommen und Aliquots zu je 50 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

**Elektrokompetente Zellen.** Eine 20 ml-Übernachtskultur wurde ausgehend von einer Einzelkolonie kultiviert und zum Beimpfen von 500 ml LB-Medium verwendet. Diese wurde bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,4 bis 0,8 bei 37 °C und bei 200 rpm schüttelnd inkubiert und anschließend für 30 Minuten auf Eis abgekühlt. Dann wurden die Zellen bei 4 °C und 5000 rpm (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 Volumen kaltem destillierten Wasser resuspendiert. Zentrifugations- und Resuspensionschritte wurden wiederholt. Dabei wurde das Volumen auf die Hälfte 1/50 und schließlich 1/500 des Ausgangsvolumens verkleinert. Ab einem Volumen wurde destilliertes Wasser mit 10 % Glycerin verwendet. Die Zellen wurden nach dem letzten Resuspensions-Schritt in Aliquots zu je 50 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.5.7. Transformation chemisch- und elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Ein Aliquot chemisch- oder elektrokompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA (10-100 ng) bzw. Ligationsansatz (5 µl) versetzt. Der Ansatz wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Bei chemisch kompetenten Zellen wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 bis 50 Sekunden durchgeführt. Elektrokompetente Zellen wurden in eine Elektrotransformationsküvette (Gene pulster Cuvette, 0,2 cm Elektrodenspalt, PeqLab, Erlangen) überführt und unter folgenden Bedingungen mit einem Gene pulster™ (BioRad, München) transformiert: Widerstand 200 Ω, Kapazität 25 µF, Spannung 2,5 kV. Nach der Transformation wurden die Zellen in 200 µl LB-Medium für 30 bis 60 Minuten bei 37 °C in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) bei 1000 rpm inkubiert.

Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 2.5.8. Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip des „Cycle Sequencing“ nach Sanger und wurde durch die Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Als Primer wurden synthetische Oligonukleotide (Tabelle 21) mit einer Konzentration von 20 ng/μl verwendet. Plasmid-DNA wurden in einer Menge von 600 ng eingesetzt. DNA-Sequenzen wurden mit Sequenzen aus der der DNA-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durch das Programm DNAMAN4.11 (Lynnon BioSoft, Vaudreuil-Dorion, Kanada) verglichen.

**Tabelle 21: Sequenzierprimer**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
pASG_sense	GAGCTTATTTTACCACTCCCCT
pASG_antisense	CGCAGTAGCGGTAAAC
bclA_mitte	GTGCTGATGGCCGAGCGGCCG
BIS_mitte	GATGCAAGTAACGCTTCC
E s hinten	CAACTGGATCAACGCGTCC
F s hinten	CTTGAACGGGAGCAGACC
G s hinten	CTGGCTGCTCTACTACGC
EtfB s hinten	CATAAGTCCTGACCTGAC
OrfX s hinten	CCGGATCAACCAGACCAG
B s hinten	CATGAGACCGGCGCCACC
D s hinten	CATCTGCAAAACCTCCGC

Alle verwendeten Primer wurden durch die Firma Biomers (Ulm) synthetisiert.

## 2.6. Biochemische Methoden

### 2.6.1. Reinigung von Enzymen

#### 2.6.1.1. Reinigung der Benzoat-CoA Ligase

Der Zellextrakt aus einer 2 l *E. coli* Kultur mit überproduzierter Benzoat-CoA Ligase (BclA) wurde ausgefällt mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung, pH 7,8 auf 33%. Nach Zentrifugieren bei 5000 rpm für 10 min wurde der Überstand auf 60 % Ammoniumsulfat Sättigung erhöht. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 2 ml Grundpuffer (10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT) resuspendiert und zur Entsalzung über eine PD10-Säule (GE Healthcare, Freiburg) gegeben. Die Säule wurde, wie vom Hersteller empfohlen, vor Benutzung mit Puffer equilibriert und mit Puffer eluiert. Die Proteinlösung wurde in 3 Aliquots zu je 1 ml Puffer aufgefangen. Anschließend wurden 2 ml der Proteinlösung auf eine UnoQ-Sepharose-Säule (Säulenvolumen: 6 ml; Biorad, München) aufgetragen, die zuvor in Grundpuffer equilibriert wurde. Nach Auftragen der Proteinlösung wurde die Säule mit 3 Säulenvolumina Grundpuffer bei einer Flußrate von 3 ml/min gewaschen und anschließend wurde über 20 Säulenvolumina mit einem linearen Gradienten von 50 - 500 mM Kaliumchlorid im Grundpuffer eluiert. Die gesammelten 2 ml-Fractionen wurden auf Benzoat-CoA Ligase Aktivität getestet und positive Fractionen wurden vereinigt.

#### 2.6.1.2. Reinigung der Biphenylsynthase zusammen mit der Benzoat-CoA Ligase

Die Biphenylsynthase wurde zusammen mit der Benzoat-CoA Ligase in *E.coli* überproduziert und gereinigt. Die Reinigung beider Proteine wurde analog zur Reinigung der Benzoat-CoA Ligase (siehe 2.6.1.1) durchgeführt. Jedoch wurde die Entsalzung statt über eine PD10-Säule durch Dialyse über Nacht und statt einer UnoQ-Sepharose-Säule die Proteinlösung mittels DEAE-Sepharose-Säule (Säulenvolumen: 50 ml, GE Healthcare, Freiburg) gereinigt. Die Biphenylsynthase eluierte bei einer Salzkonzentration von 190 - 210 mM KCl vor der Benzoat-CoA Ligase, die bei 170 - 190 mM KCl eluierte.

### **2.6.1.3. Reinigung Strep-getagter Proteine**

Die Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase, die Succinyl-CoA:Benzoate CoA-Transferase sowie die Malonyl-CoA Synthase wurden mittels 5 ml Streptactin-Säule wie vom Hersteller (IBA, Göttingen) angegeben gereinigt.

### **2.6.1.4. Reinigung der Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase**

Der Zellextrakt aus 4 l *E. coli*-Kultur mit überproduzierter Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase wurde zunächst wie unter 2.6.1.3 beschrieben mittels 5 ml Streptactin-Säule gereinigt. Das Eluat wurde anschließend auf eine 320 ml Gelfiltrationssäule (Superdex 200 pg; GE Helthcare, Freiburg) gegeben. Das Protein wurde mit 100 mM Tris/HCl (pH 8), 150 mM NaCl eluiert und anschließend mittels PD10-Säule, wie vom Hersteller angegeben, auf 10 mM Tris/HCl pH 8, 10 % Glycerin umgepuffert.

## **2.6.2. Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Die Kalibriergerade wurde standardmäßig mit Rinderserumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) erstellt.

## **2.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt nach ihrer apparenten Molekülmasse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Es wurden Gele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 15 % (v/v) hergestellt (Tabelle 22). Vor dem Auftragen der Proben wurden sie mit 5 x SDS-Auftragspuffer (Tabelle 23) für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Unlösliche Proteine aus dem zellfreien Extrakt wurden in einem bestimmten Volumen 5 x SDS-Auftragspuffer aufgenommen und ein definiertes Volumen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 200 V. Die aufgetragenen Proteinmengen betragen ca. 20 µg pro Tasche, bei anschließender Western-Blot-Analyse 50 µg Protein pro Tasche.

Tabelle 22: Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Gelen.

Reagenz	Trenngel	Sammelgel
Tris/HCl pH 8,8	1,95 ml	-
Tris/HCl pH 6,8	-	235 µl
H <sub>2</sub> O	275 µl	1,27 ml
Acrylamid/N, N'-Methylen-Bisacrylamid (37,5:1) 30 % (v/v)	2,41ml	480 µl
SDS 10 % (w/v)	54,5 µl	20 µl
TEMED 5 % (v/v)	54,5 µl	20 µl
APS 10 % (w/v)	78 µl	40 µl

Tabelle 23: SDS-Auftragspuffer (5 x)

Reagenz	Konzentration
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	20 % (v/v)
Glycerin	23 % (v/v)
10 % SDS	40 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)
Bromphenolblau	Spatelspitze
H <sub>2</sub> O	auf 10 ml auffüllen

Tabelle 24: SDS-Laufpuffer (1 x)

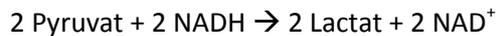
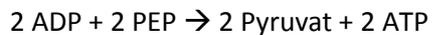
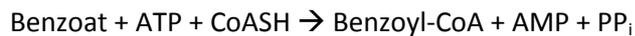
Reagenz	Konzentration
Tris/HCl pH 6,6	25 mM
Glycin	200 mM
SDS	0,1 %

Die Proteine in den SDS-Polyacrylamidgelen wurden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 detektiert (Zehr et al., 1989). Dazu wurden die Gele für 2 Stunden in Coomassie-Färbelösung (0,25 (w/v) Serva Blau G-250, 20 % Ethanol (v/v), 20 % Essigsäure (v/v) inkubiert und anschließend in Entfärbelösung (30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) bis zur Entfärbung des Hintergrundes inkubiert. Das Gel konnte anschließend eingescannt werden.

## 2.6.4. Enzymatische Tests

### 2.6.4.1. Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Benzoat-CoA Ligase

Zur Bestimmung der CoA Ligase Aktivität wurden zwei photometrische Enzymtests verwendet. Die spezifische Aktivität der CoA Ligase wurde indirekt mittels gekoppeltem Enzymassay spektrophotometrisch bei 37 °C bestimmt. Dazu wurde die Synthese von AMP durch die katalytische Aktivität Benzoat-CoA Ligase (1) enzymatisch gekoppelt an die Myokinase (2), Pyruvat Kinase (3) und Lactatdehydrogenase (4), was zu einer Oxidation von 2 mol NADH pro Mol umgesetztes Substrat führte. Dadurch fiel die Absorption bei 365 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}} 3400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), was im Photometer (Amersham Biosciences, Freiburg) über 10 Minuten verfolgt wurde. Der Testansatz mit einem Gesamtvolumen von 0,5 ml enthielt 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM ATP, 0,5 mM NADH, 2 mM Phosphoenolpyruvat, 0,4 mM CoA und 10  $\mu\text{l}$  gereinigtes Protein in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 mM Natriumbenzoat, Fluorobenzoat, 2-Hydroxybenzoat oder 4-Hydroxybenzoat gestartet.



Die 2-Aminobenzoat-CoA Ligase Aktivität wurde direkt bestimmt, da 2-Aminobenzoyl-CoA ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 365 nm ( $\epsilon 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) besitzt, im Gegensatz zu 2-Aminobenzoat (Ziegler et al., 1989). Im Test (1 ml) wurden 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 0,2 mM Dithioerythritol, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,4 mM CoA, 1 mM ATP und 10  $\mu\text{l}$  gereinigtes Protein eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 mM 2-Aminobenzoat gestartet.

### 2.6.4.2. Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Malonyl-CoA Synthase

Der Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Malonyl-CoA Synthase verlief analog zum Benzoat-CoA Ligase-Assay. Statt Benzoat wurde Malonat als Substrat verwendet.

#### 2.6.4.3. Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Succinyl-CoA: Benzoat CoA-Transferase

Die Aktivität der Succinyl-CoA: Benzoat CoA-Transferase wurde durch einen HPLC-basierten Assay gemessen. Dazu wurden in einem Reaktionsansatz von 200  $\mu$ l 1 mM Benzoat, 250 mM Succinyl-CoA und 30  $\mu$ g gereinigtes Enzym in MES Puffer (50 mM, pH 6,2, 5 mM  $MgCl_2$ ) für 10 Minuten bei 30 °C auf dem Thermocycler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 % (v/v) gesättigter  $NaHSO_4$ -Lösung gestoppt. Ausfallendes Protein wurde abzentrifugiert (13000 rpm, 10 Minuten, 4 °C) und die Überstände mittels RP-HPLC (Sykam, Fürstenfeldbruck) aufgetrennt und auf Produktbildung untersucht. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte über eine RP-18 Säule (Varian Microsorb 100-5, C18, 150x4,6 mm) über einen Acetonitrilgradienten von 3 bis 20 % in 50 mM MES (pH 6,2) über 20 Minuten bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels Dioden-Array-Detektor (DAD). Die Retentionszeiten für Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA lagen bei 2 und 10 Minuten.

#### 2.6.4.4. Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase

Die Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase katalysiert die Kondensation von Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA. Dabei wird Benzoylsuccinyl-CoA gebildet. Sowohl Substrate als auch das Produkt können per RP-HPLC detektiert werden.

Die Testansätze für die Messungen enthielten in 0,5 ml Gesamtvolumen jeweils 10  $\mu$ l zellfreien Extrakt aus überproduzierten *E. coli*-Bakterien (ca. 30 mg/ml), 250 mM Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA in 50 mM Tris/HCl (pH 7,4). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzym gestartet, nach verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 20 Minuten Proben von 0,1 bis 0,2 ml entnommen und die Reaktion zur Analyse der Reaktanten durch Zugabe von 10 % (v/v) einer gesättigten  $NaHSO_4$ -Lösung gestoppt. Ausfallendes Protein wurde abzentrifugiert (13000 rpm, 10 Minuten, 4 °C), die Überstände mittels RP-HPLC (Agilent, Böblingen) aufgetrennt und auf Produktbildung untersucht. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte über eine RP-18 Säule (Merck, LiChrospher C18 10  $\mu$ m, 250x10 mm) über einen Acetonitrilgradienten von 3 bis 50 % in 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat (pH 5,3) über 30 Minuten bei einer Flussrate von 2 ml/min. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels Dioden-Array-Detektor (DAD). Freies Benzoat wurde bei 230 nm detektiert. Die Retentionszeiten für Benzoyl-CoA, Succinyl-CoA, freies CoA und Benzoat lagen bei 17; 2,5; 4 und 7 Minuten.

#### 2.6.4.5. Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Biphenylsynthase

Die Aktivität der Biphenylsynthase wurde sowohl im zellfreien Extrakt aus einer Überproduktion in *E. coli* als auch in gereinigten Proteinfractionen gemessen. Dazu wurde in 250 µl Gesamtvolumen 10 µl zellfreier Extrakt (22 mg/ml) bzw. 1 µl gereinigtes Enzym (0,54 µg/ml), 7,4 µl Benzoyl-CoA (250 µM) und 10 µl Malonyl-CoA (56 µM) in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,5) pipettiert und der Ansatz für 10 Minuten bei 35 °C inkubiert. Anschließend wurde zweifach mit 250 µl Ethylacetat extrahiert und die organische Phase durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm separiert. Die organische Phase wurde für 20 Minuten in der Vakuumzentrifuge getrocknet (Speedvac Concentrator, Savant), das Pellet anschließend in 100 µl Methanol aufgenommen und mittels RP-HPLC auf Produktbildung untersucht (durch Dr. B. Liu, Institut für pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig). Dazu wurde die Probe über eine HPLC (Waters 616 HPLC Pumpe gekoppelt mit DAD und ausgestattet mit Millennium version 2.15, Eschborn) über eine C18-Säule (4,6 x 150 mm; 5 µm, Waters) getrennt. Puffer A enthielt Wasser, Puffer B Methanol. Nach Auftragen der Probe wurde für 2 Minuten mit 50 % Puffer B gespült, dann ein Gradient von 50 – 80 % Puffer B für 15 Minuten angelegt und anschließend für 3 Minuten von 80 auf 90 % Puffer B erhöht bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Retentionszeit für 3,5-Dihydroxybiphenyl betrug 14,6 Minuten.

#### 2.6.5. Chemische Synthese von CoA-Thioestern

Die CoA-Thioester Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA wurden über die jeweiligen Anhydride der freien Säuren nach Schachter und Taggart hergestellt (Schachter & Taggart, 1953). Die Anhydride zerfallen schnell bei Kontakt mit Wasser und wurden daher frisch aus den freien Säuren und Essigsäureanhydrid hergestellt. Dazu wurden 384 µmol Säure in 800 µl Essigsäure bei 80 gelöst und anschließend wurden 384 µmol (37 µl) Essigsäureanhydrid zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde auf 120 °C erhitzt und so lange inkubiert, bis das Lösungsmittel Essigsäure sowie die aus dem Essigsäureanhydrid freigesetzte Säure komplett verdampften. Man erhielt das Anhydrid der jeweiligen freien Säure, das beim Abkühlen auf Raumtemperatur fest wurde. Für die Synthese der CoA-Thioester wurden 50 mg CoA in 2 ml NaHCO<sub>3</sub> gelöst und 7 ml H<sub>2</sub>O zugegeben. Außerdem wurden 1,5 ml Acetonitril-Lösung mit dem jeweiligen Anhydrid im Verhältnis 1,2:1 (Anhydrid/CoA) vermischt und 1 ml von dieser Mischung zu der CoA-NaHCO<sub>3</sub> Lösung zugegeben. Um die Umsetzung von CoA zu überprüfen, wurde ein DTNB-Tropfen-Test durchgeführt. Dabei wurden 10 µl der Probe mit 10 µl DTNB-Lösung (20 mg/ml) versetzt und auf die Farbänderung von gelb nach farblos untersucht. Anschließend wurde die Probe mit 5 M HCl auf pH 1,5 – 2 angesäuert und an einer Vakuumpumpe

entgast. Schließlich wurde die Probe auf eine vorbereitete C18-Säule geladen. Bevor die Probe geladen wurde, wurde die Säule zunächst mit 2 Säulenvolumina 100 % Methanol, 2 Säulenvolumina 50 % Acetonitril/0,1 % TFA-Lösung und zuletzt mit weiteren 2 Säulenvolumina 100 % Methanol gewaschen. Die Säule wurde equilibriert mit 2 Säulenvolumina 0,1% TFA/ H<sub>2</sub>O-Lösung. Nach dem Laden der Probe auf die Säule wurde mit einem Säulenvolumen 0,1 % TFA/ H<sub>2</sub>O-Lösung gewaschen und der Durchfluss aufgefangen. Die Elution erfolgte mit einem Säulenvolumen 50 % Acetonitril/0,1 % TFA-Lösung. Der Umsatz wurde photometrisch überprüft. Dazu wurden 5 µl Probe mit 495 µl Wasser in einer Quarzküvette vermischt und die Extinktionsänderung bei 259 nm verfolgt. Die Konzentration wurde mittels Beer-Lambert-Gesetz berechnet. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  beträgt für Succinyl-CoA  $15,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und für Benzoyl-CoA  $21,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Der synthetisierte CoA-Ester wurde in Eppendorfgefäßen zu je 2 µmol aliquotiert, in der Speed Vac (SpeedVac concentrator, Savant) lyophilisiert und bei -80 °C eingefroren.

## 2.7. Analytische Methoden

### 2.7.1. Metallanalyse mittels ICP-OES

Der Zinkgehalt der kleinen Untereinheit BbsA wurde mittels ICP-OES in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Seubert gemessen. Zugunsten einer präzisen Analyse sollte die Probe kein Desthiobiotin enthalten. Darüber hinaus muss eine Puffer-Probe zur Normalisierung vorliegen. Daher wurde zunächst gereinigtes Protein mit N-terminalem Strep-Tag über eine PD10-Säule in 100 mM Tris/HCl, pH 8; 10 % Glycerin überführt und die Proteinkonzentration der Probe wurde anschließend mittels Bradford-Test bestimmt. Schlussendlich enthielt die Probe 12,8 mg/ml Protein BbsAB. Bei einer molekularen Masse von 57 kDa entspricht dies einer Konzentration von 224,56 nmol/ml.

### 2.7.2. Konzentrationsbestimmung von Benzylsuccinat

Benzylsuccinat wurde mittels LC-MS detektiert und quantifiziert. Dazu wurden der Kulturüberstand sowie die Kalibrierstandards mit 2 ml 0,1 mM Phenylsuccinat (interner Standard) versetzt und auf pH 2 mittels Trifluoressigsäure (TFA) angesäuert. Das Zellpellet wurde zunächst mit 1 ml 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) gewaschen, dann in 900 µl internen Standard (0,1 mM Phenylsuccinat) resuspendiert und nach Zugabe von TFA für 10 Minuten bei 60 °C erhitzt. Sowohl die Proben aus dem Kulturüberstand als auch die Proben aus dem Zellpellet wurden zweimal mit einem Volumen Ethyl-

acetat extrahiert. Anschließend wurde die organische Phase mittels Rotationsverdampfer (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz) und SpeedVac verdampft und der Rückstand im gleichen Volumen Laufmittel (20 % Acetonitril, 0,1 % TFA) gelöst, wie auch der interne Standard eingesetzt wurde. Die Proben wurden mittels LC-MS bei einer Flussrate von 0,5 ml isokratisch durch eine RP18 Säule (3 µm, 150 x 4,6 mm) aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgte über die Integrale der Massenpeaks von Phenylsuccinat und Benzylsuccinat.

### **2.7.3. Analyse von Biphenylen aus *in vivo* Proben**

Rekombinante *E. coli*- und *S. blattae*-Stämme wurden in LB-Medium, welches mit 1 mM Benzoat und 15 mM Malonat versetzt wurde, kultiviert. Nach der Induktion mit AHT wurde für drei weitere Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zellernte mittels Falcon-Zentrifuge wurden Zellpellet und Kulturüberstand zweimal mit einem Volumen Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend mittels SpeedVac verdampft und der Rückstand zur weiteren Analyse durch RP-HPLC in 20 % Methanol gelöst. Alle 30 Sekunden wurde während des Chromatographie-Schritts fraktioniert. Die gesammelten Fraktionen wurden dann nochmal mittels LC-MS (ESI und APCI), GC-MS (durch Dr. Uwe Linne, Massenspektrometrische Abteilung, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg) und NMR (durch Dr. Xiulan Xie, Leiterin der NMR-Abteilung, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg) analysiert. Zur Kontrolle wurde mit Wildtyp *E. coli* und *S. blattae*-Kulturen genauso verfahren.

### **2.7.4. Einsatz von <sup>14</sup>C Malonat und Chromatographie zur *in vivo* Analytik von Biphenylen**

Rekombinante *E. coli*- und *S. blattae*-Stämme, die zur Produktion von Biphenyl hergestellt worden waren, wurden analysiert, indem ihnen während der Kultivierung <sup>14</sup>C markiertes Malonat, welches als ein Substrat zur Biphenylsynthese dient, zugesetzt wurde. Der Kulturüberstand wurde nach Inkubation zweimal mit einem Volumen Ethylacetat extrahiert, die organische Phase mittels Speedvac verdampft und der Rückstand zur weiteren Analyse durch RP-HPLC in 20 % Methanol gelöst. Alle 30 Sekunden wurde während des Chromatographie-Schritts fraktioniert. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels Szintillationszählung ausgewertet und mit dem UV-Chromatogramm verglichen. Zur Kontrolle wurde mit Wildtyp *E. coli* und *S. blattae* -Kulturen genauso verfahren.

**<sup>14</sup>C -markierung während Kultivierung.** Bakterienkulturen wurden in Erlenmeyerkolben in 100 ml LB-Medium bis zu einer OD von 0,4 - 0,6 bei 37 °C kultiviert. Nach der Induktion wurde 1 ml Kultur entnommen und mit 0,8 µCi <sup>14</sup>C-Malonat versetzt. Nach 3 weiteren Stunden Inkubation bei 37 °C im Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) bei 1400 rpm wurde die Kultur zentrifugiert (1 Minute, 13000 rpm) und der Kulturüberstand zwei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mittels Speedvac verdampft und der Rückstand in 1 ml 20 % Methanol gelöst.

**Chromatographische Auftrennung mittels RP-HPLC.** Die Auftrennung der Substanzen erfolgte über RP-HPLC (Agilent, Böblingen) mittels RP-18 Säule (Microsorb 100-5, 150X4,6 mm, Varian) über einen Gradienten von 20 bis 80 % Methanol bei einer Flussrate von 1 ml/min über 25 Minuten. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 210 nm mittels Dioden-Array-Detektor (DAD). Fraktioniert wurde alle 30 Sekunden mittels Fraktionskollektor (Agilent, Böblingen).

**Szintillationszählung.** Die gesammelten Fraktionen wurden in Szintillationsröhrchen um- und mit 5 ml Szintillationscocktail Quicksafe A (Zinsser Analytik GmbH, Frankfurt/Main) aufgefüllt. Die Zerfälle pro Minute wurden mittels Flüssigszintillation im Szintillationszähler (Beckmann, USA) bestimmt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Biosynthetisches Modul zur Synthese von Benzoyl-CoA

Benzoyl-CoA ist ein wichtiges Intermediat in verschiedensten Stoffwechselwegen. So werden z. B. im anaeroben Kohlenwasserstoffabbau aromatische Verbindungen zunächst zu Benzoyl-CoA umgesetzt. Bei Pflanzen wird Benzoyl-CoA für den Aufbau von manchen Polyketiden und weiteren sekundären Pflanzenstoffen benötigt. In dieser Arbeit dient Benzoyl-CoA als Schlüsselintermediat für die Synthese von Benzylsuccinat und Biphenyl. Für die Bereitstellung von Benzoyl-CoA muss zunächst Benzoat von der Bakterienzelle über einen spezifischen Transporter aufgenommen und dann durch eine CoA Ligase oder CoA-Transferase aktiviert werden. Mögliche Bausteine für die Synthese von Benzoyl-CoA werden im Folgenden vorgestellt.

##### 3.1.1. Benzoataufnahme durch Expression des Benzoattransporter-Gens *benK*

Benzoat dient als Precursor zur Synthese von Benzoyl-CoA abhängigen Stoffwechselwegen. Um dieses Substrat nutzen zu können, muss es zunächst von der Bakterienzelle über die Membran aufgenommen werden. Dazu wurde das Gen, welches für den Benzoattransporter BenK kodiert, aus *A. aromaticum* über den pEntry Vektor in den Expressionsvektor pASG\_mod kloniert (Material und Methoden 2.5.5.1).

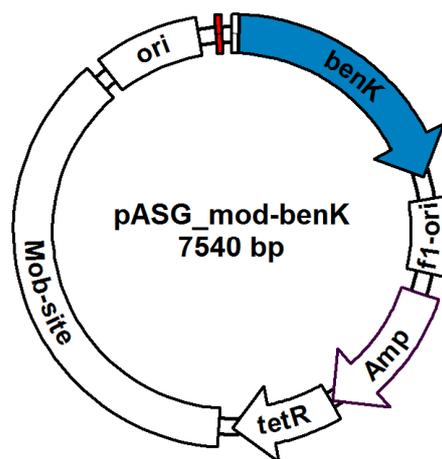


Abbildung 16: „pASG\_mod-benK“. AHT-induzierbarer Expressionsvektor mit *benK*-Gen.

Das Plasmid pASG\_mod-benK (Abbildung 16) wurde wie in Material und Methoden 2.4 beschrieben bei 37 °C im *E. coli* Expressionsstamm Rosetta (DE3) pLysS durch Induktion mit AHT (Endkonzen-

tration 0,2 mg/l) exprimiert. Nach der Zellernte wurden sowohl die Ganzzell-Lysate vor als auch nach Induktion mittels SDS-Gel analysiert. Jedoch konnte in den Proteinproben nach der Induktion kein eindeutig überproduziertes Protein detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Benzoat wird in der Lebensmittelindustrie als Konservierungsstoff E211 in sauren Lebensmitteln eingesetzt, da es auf Mikroorganismen wachstumshemmend wirkt (Krebs et al., 1983). Als Indiz für die Produktion eines aktiven Benzoattransporters wurden deshalb die antimikrobiellen Eigenschaften des Benzoats ausgenutzt. Rekombinante *E. coli*-Zellen mit eingeführtem *benK*-Gen und Kontrollansätze mit Wildtyp- *E. coli*-Zellen wurden dazu unter induzierenden Bedingungen in LB-Medium kultiviert, welches verschiedene Konzentrationen an Benzoat enthielt.

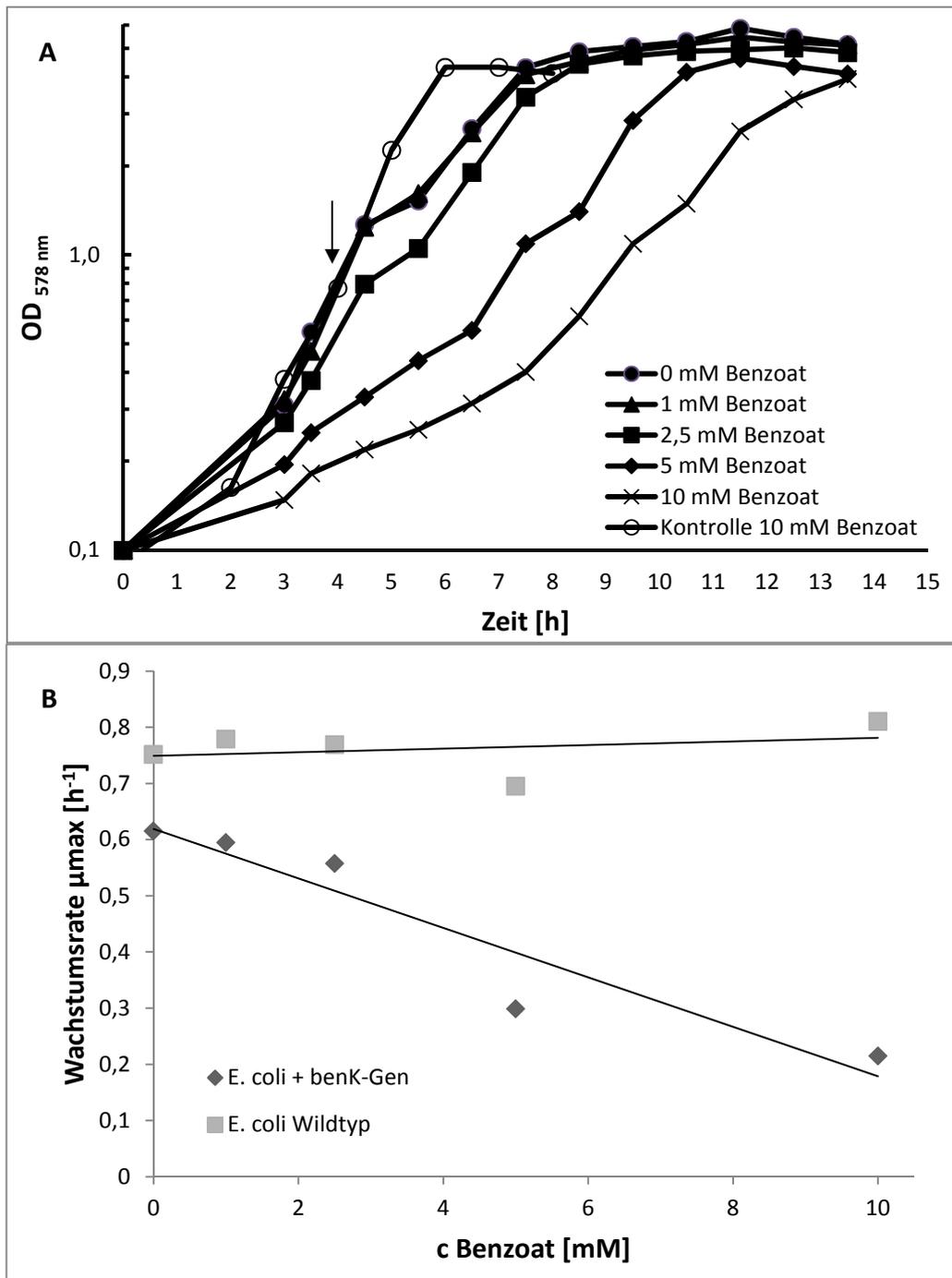


Abbildung 17 A: Wachstumskurven des Expressionsstamms *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS mit Expressionsplasmid pASG\_mod-benK im LB-Medium mit verschiedenen Benzoat-Konzentrationen. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Induktion an. Als Kontrolle diente der *E. coli*-Stamm ohne Plasmid. B: Wachstumsraten der *E. coli*-Stämme mit (schwarz) und ohne (grau) *benK*-Gen aufgetragen gegenüber der Benzoatkonzentration im LB-Medium.

Es zeigte sich ganz klar, dass die Wachstumsrate der *E. coli*-Zellen, die das *benK*-Gen enthielten, mit steigender Konzentration an Benzoat abnahm, während der Wildtyp-Stamm unbeeinflusst blieb (Abbildung 17). Die Benzoatkonzentration im Medium wurde zwischen 0 und 10 mM variiert. *E. coli*-Zellen ohne *benK*-Gen wuchsen unbeeinflusst von den eingesetzten Benzoatkonzentrationen bei einer maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\text{max}}$  von 0,69 - 0,81 h<sup>-1</sup>. Bei *E. coli*-Zellen mit eingeführtem *benK*-

Gen hingegen nahm die maximale Wachstumsrate mit steigender Konzentration an zugesetztem Benzoat von 0,61 auf 0,21 h<sup>-1</sup> konstant ab. Auch vor der Induktion des Expressionsplasmids wurde beobachtet, dass *E. coli*-Zellen mit *benK*-Gen sensitiv auf Benzoat reagierten. Dies lässt darauf schließen, dass das verwendete Plasmid nicht streng reguliert ist und eine basale Expression stattfindet.

Für die weitere Entwicklung des synthetischen Stoffwechselwegs zeigte die beobachtete Benzoatsensitivität der rekombinanten Zellen an, dass der Benzoattransporter BenK funktionell in *E. coli* produziert wird und für die Aufnahme von Benzoat genutzt werden kann.

### 3.1.2. Benzoyl-CoA Synthese durch Benzoat-CoA Ligase

Die Benzoat-CoA Ligase katalysiert die ATP-abhängige Ligation von Benzoat und Coenzym A (CoA) zu Benzoyl-CoA unter Bildung von AMP und PP<sub>i</sub>. Das Gen *bclA* aus *A. aromaticum*, welches für die Benzoat-CoA Ligase kodiert, wurde über den pEntry Vektor in den Expressionsvektor pPSG5 kloniert (Material und Methoden 2.5.5.1, Abbildung 18).

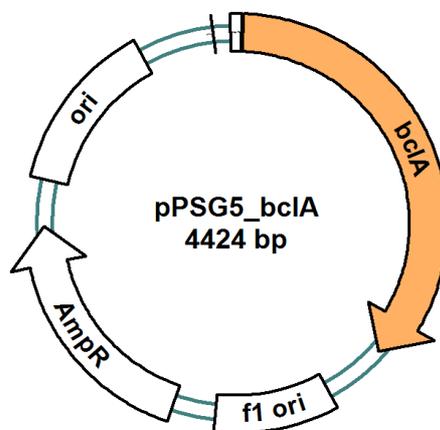


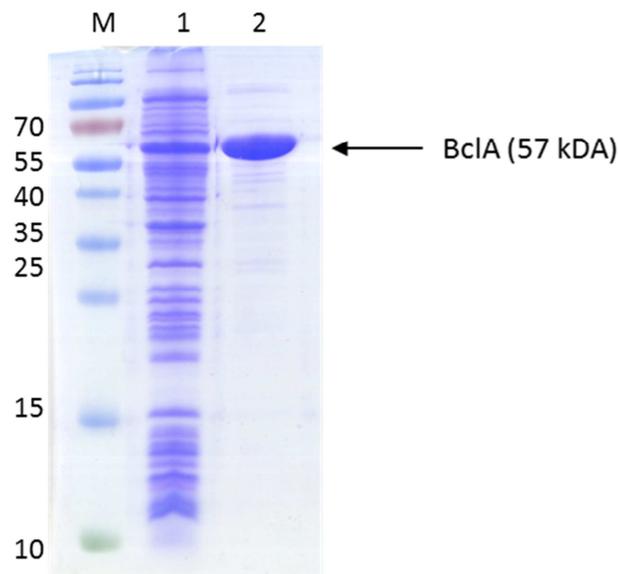
Abbildung 18: „pPSG5-bclA“. IPTG-induzierbarer Expressionsvektor mit *bclA*-Gen.

Das erhaltene Plasmid pPSG5-bclA (Abbildung 18) wurde wie in Material und Methoden 2.4 beschrieben im *E. coli*-Expressionsstamm Rosetta (DE3) pLysS durch Induktion mit AHT (Endkonzentration 0,2 mg/l) exprimiert. Da sich das Enzym nicht mittels Affinitätschromatographie über den N-terminalen Strep-Tag reinigen ließ, wurde eine alternative Reinigungsstrategie über Ionenaustauscherchromatographie verfolgt (Material und Methoden 2.6.1.1.). Das Protein wurde nach Anreicherung durch Ammoniumsulfatpräzipitation und Entsalzung durch eine PD10-Säule über Chromatographie an einer 6 ml UnoQ-Säule gereinigt und auf einem SDS-Gel analysiert (

Tabelle 25; Abbildung 19).

**Tabelle 25: Reinigungstabelle der rekombinanten Benzoat-CoA Ligase aus *A. aromaticum***

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Akt. (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellextrakt (nach Ultrazentrifugation)	12	365	2412	6,6	100	1
Ammoniumsulfatpräzipitation (60%)	2,5	80	1593	20	66	3
PD10	2	58	1124	19	47	3
UnoQ (Fraktion 16)	3	2,6	274	107	11	16



**Abbildung 19: SDS Gel mit produzierter Benzoat-CoA Ligase (BclA, 57 kDA). M: Proteinmarker PAGE Ruler Prestained™ (Fermentas, St. Leon-Rot); 1: Zellpellet nach Induktion; 2: Gereinigtes Protein nach UnoQ Säule.**

Die Benzoat-CoA Ligase eluierte von der UnoQ-Säule bei einer Salzkonzentration zwischen 100 – 120 mM KCl in einem Volumen von 3 ml und einer Konzentration von 0,86 mg/ml, sodass insgesamt 2,6 mg Protein erhalten wurden. Die Ligase wurde somit 16-fach angereichert und in einer hohen Reinheit erhalten. Die spezifische Aktivität der gereinigten Benzoat-CoA Ligase betrug  $107 \pm 2$  U/mg. Damit ist die spezifische Aktivität der hier untersuchten CoA Ligase im Vergleich zu den Aktivitäten bereits untersuchter Benzoat-CoA Ligasen höher (Einleitung 1.4.1). Beispielsweise beträgt der Unterschied den Faktor 6,5 verglichen zur Benzoat-CoA Ligase aus *T. aromatica*, welche die höchste Sequenzidentität zur hier untersuchten CoA Ligase aufweist (max. Identität 76 %). Neben Benzoat

akzeptiert die CoA Ligase auch 2-Fluorobenzoat als Substrat, mit vergleichbarer katalytischer Aktivität (Tabelle 26). Hingegen werden 2-Amino- sowie 2- und 4-Hydroxy-substituierte Benzoate sehr schlecht oder gar nicht umgesetzt. Ein ähnliches eingeschränktes Substratspektrum wurde auch bei anderen Benzoat-CoA Ligasen aus fakultativen und obligaten Anaerobiern festgestellt (Wischgoll et al., 2005; Peters et al., 2004; Schühle et al., 2003). Benzoat-CoA Ligasen sind bereits aus verschiedenen Organismen charakterisiert worden (Einleitung 1.6.2). Daher wurde in dieser Arbeit auf eine weitere Charakterisierung der Benzoat-CoA Ligase verzichtet.

**Tabelle 26: Substratpräferenz der heterolog Benzoat-CoA Ligase aus *A. aromaticum*.**

Substrat	Aktivität (%)
Benzoat	100
2-Fluorobenzoat	94
2-Aminobenzoat	1
4-Hydroxybenzoat	2
2-Hydroxybenzoat	0

Die Ergebnisse zeigen, dass die Benzoat-CoA Ligase für die weitere Entwicklung eines biosynthetischen Moduls zur Bildung von Benzoyl-CoA für den synthetischen Stoffwechselweg verwendet werden kann. Das Enzym ist bereits gut charakterisiert und die katalytische Aktivität lässt sich leicht nachweisen, was für spätere Optimierungsstrategien vorteilhaft ist.

### 3.1.3. Benzoyl-CoA Synthese durch Succinyl-CoA:Benzoat CoA-Transferase

Als alternatives Enzym zur Bildung von Benzoyl-CoA wurde die Succinyl-CoA:Benzoat CoA-Transferase aus *G. metallireducens* genutzt. Dieses Enzym benötigt zur Bildung von Benzoyl-CoA im Gegensatz zur Benzoat-CoA Ligase kein ATP, jedoch wird Succinyl-CoA als Substrat gebraucht.

Das Gen *bct*, welches für diese Transferase kodiert, wurde aus dem Genom von *G. metallireducens* amplifiziert und über den pEntry Vektor in den Expressionsvektor pASG5\_mod kloniert (Material und Methoden 2.5.5.1).

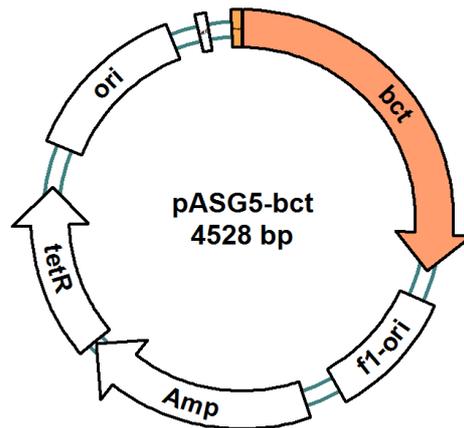


Abbildung 20: „pASG5-bct“. AHT-induzierbarer Expressionsvektor mit N-terminalem StrepTag am *bct*-Gen.

Das erhaltene Plasmid pASG5-bct (Abbildung 20) wurde wie in Material und Methoden 2.4 beschrieben im *E. coli*-Expressionsstamm Rosetta (DE3) pLysS durch Induktion mit AHT (Endkonzentration 0,2 mg/l) exprimiert. Nach der Reinigung durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie (Material und Methoden 2.6.1.3) wurde das Protein auf einem SDS-Gel analysiert (Abbildung 21). Die Succinyl-CoA:Benzoat CoA-Transferase eluierte ohne Verunreinigung durch andere Proteine von der Streptactin-Säule in einem Volumen von 3 ml und mit einer Proteinkonzentration von 0,4 mg/ml, sodass insgesamt 1,2 mg Protein aus einer 2 l *E. coli*-Kultur (2,5 g Zellnassgewicht) erhalten wurden.

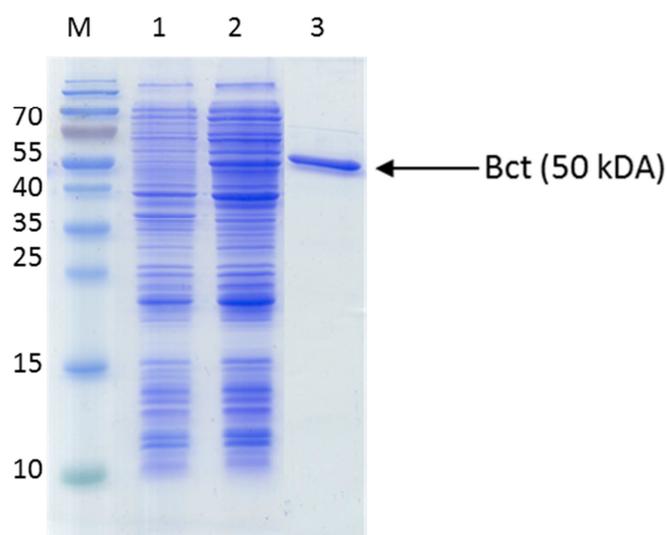
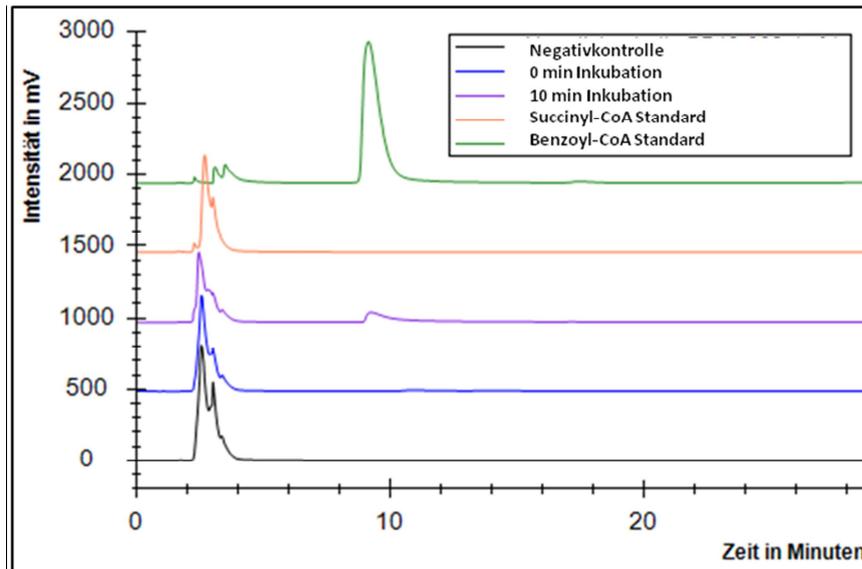


Abbildung 21: SDS Gel mit produzierter Succinyl-CoA: Benzoat CoA Transferase (Bct, 50 kDA). M: Proteinmarker PAGE Ruler Prestained™ (Fermentas, St. Leon-Rot); 1: Zellpellet vor Induktion 2: Zellpellet nach Induktion; 2: Gereinigtes Protein nach Streptactin-Säule.



**Abbildung 22:** HPLC-Chromatogramme zur Bildung von Benzoyl-CoA aus Succinyl-CoA und Benzoat durch Succinyl-CoA: Benzoat CoA-Transferase. Schwarz: Negativkontrolle ohne Enzym nach 10 Minuten, blau: Enzymreaktion sofort nach Zugabe von Enzym, lila: Enzymreaktion 10 Minuten nach Zugabe von Enzym, orange: Standard Succinyl-CoA (1 mM), grün: Standard Benzoyl-CoA (1 mM). Abgeschätzte Aktivität: 70 mU/mg.

Die Aktivität der Transferase wurde mittels HPLC-basiertem Assay nachgewiesen (Material und Methoden 2.6.4.3). Dazu wurden die Substrate Succinyl-CoA und Benzoat (je 1 mM) zusammen mit dem Enzym (40 µg) für 10 Minuten bei 30 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Substrate ohne Enzym inkubiert. Nach der Reaktion wurde das Protein ausgefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde chromatographisch über eine RP-18E Säule aufgetrennt. Durch diesen Enzymtest konnte die Bildung von Benzoyl-CoA nachgewiesen werden (Abbildung 22). Die Aktivität der Succinyl-CoA: Benzoat CoA-Transferase wurde hier nur qualitativ nachgewiesen. Aus der Integration des Benzoyl-CoA-Peaks und der Inkubationszeit lässt sich allerdings abschätzen, dass die spezifische Aktivität der Transferase mindestens 70 mU/mg beträgt. Die Transferase wurde bereits durch Oberender et al. heterolog in *E. coli* überproduziert und mittels Affinitätschromatographie über einen His-Tag gereinigt (Oberender et al., 2012). Das His-getaggte Protein hatte eine spezifische Aktivität von 265 mU/mg. Damit liegt die hier geschätzte Aktivität nur um den Faktor 4 vom tatsächlich gemessenen Wert entfernt.

Für die weitere Entwicklung des synthetischen Stoffwechselwegs kann die Succinyl-CoA:Benzoat CoA-Transferase also alternativ zur Benzoat-CoA Ligase zur Bildung von Benzoyl-CoA eingesetzt werden. Welches Enzym günstiger für die Produktion ist, muss im Einzelfall untersucht werden, da dies von verschiedenen Faktoren abhängig ist (Diskussion 4.3).

### 3.1.4. Klonierung des biosynthetischen Moduls zur Produktion von Benzoyl-CoA

Im nächsten Schritt wurde nun das *benK*-Gen zur Benzoataufnahme entweder mit dem Gen der Benzoat-CoA Ligase *bclA* oder dem Gen der Succinyl-CoA:Benzoat CoA-Transferase *bct* als Biosynthese-Modul zur Produktion von Benzoyl-CoA in ein Expressionsplasmid kloniert werden.

Dazu sollten die Gene *bclA* und *benK* über kombinatorisches Klonieren durch das StarGate System zusammengefügt werden (Material und Methoden 2.5.5.1). Überraschenderweise wurden keine positiven Klone erhalten. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der Bildung des stabilen Produktes Benzoyl-CoA liegen. Dies hat vermutlich eine Verringerung des endogenen CoA-Pools zur Folge, wodurch der Zellstoffwechsel gestört wurde und dadurch das Zellwachstum nicht mehr möglich war. Das Zusammenfügen der Gene *bclA* und *benK* wurde jedoch ermöglicht, wenn ein zusätzliches Gen für ein „Benzoyl-CoA-recycling“-Enzym dem Plasmid hinzugefügt wurde. Da es Benzoyl-CoA als Substrat verwendet und freies CoA als Produkt entsteht.

Zunächst wurde das *bis*-Gen, kodierend für die Biphenylsynthase der Vogelbeere, als CoA-recycling-Enzym, dem Expressionsplasmid zugefügt. So wurde gezeigt, dass die Benzoat-CoA Ligase und der Benzoattransporter aktiv ko-produziert werden (siehe Ergebnisse 3.3.1). Nachdem diese Klonierungsstrategie erfolgreich war und gezeigt werden konnte, dass alle Enzyme aktiv produziert wurden, wurde anschließend statt des Gens für die Biphenylsynthase jenes für die Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase als CoA-recycling Enzym, dem Benzoyl-CoA-Biosynthese-Modul zugefügt. Somit wurden die Plasmide pLigBen und pTransBen erhalten, die im Folgenden mit dem biosynthetischen Modul der  $\beta$ -Oxidation kombiniert wurden, sodass Benzoylsuccinat produziert werden kann (Abbildung 23).

### 3.2. Biosynthetisches Modul der Benzoylsuccinatproduktion

Die Produktion von Benzoylsuccinat soll über die Reversion des  $\beta$ -Oxidationszyklus von Benzoylsuccinat zu Benzoyl-CoA verlaufen. Dazu muss der Zelle nach Zufütterung von Benzoat zunächst Benzoyl-CoA zur Verfügung stehen, was durch Zusammenschalten der Gene der entsprechenden CoA Ligase oder CoA-Transferase mit einem Benzoat-Transporter erreicht wurde.

Als weiterer Schritt wurden die Gene des *bbs*-Operons aus *G. metallireducens*, welches für die Enzyme der  $\beta$ -Oxidation von Benzoylsuccinat kodiert, zusammen mit dem Benzoattransporter-Gen *benK* aus *A. aromaticum* und entweder *bclA* aus *A. aromaticum* (für Benzoat-CoA Ligase) oder *bct* aus *G. metallireducens* (für Succinyl-CoA:Benzoat CoA-Transferase) in verschiedenen Kombinationen in Expressionsplasmide kloniert.

In dieser Arbeit wurde das *bbs*-Operon aus *G. metallireducens* ausgewählt. Im Vergleich zu den *bbs*-Operons der fakultativ anaeroben Organismen von z. B. *T. aromatica* oder *A. aromaticum* sind im *bbs*-Operon des obligat anaeroben *G. metallireducens* drei zusätzliche Gene kodiert. Zwei der Gene kodieren für die zwei Untereinheiten des Elektronen-transferierenden Flavoproteins (ETF), welches die Elektronen, die durch die Oxidation von Benzylsuccinyl-CoA frei werden, über ein Membranprotein, das im dritten zusätzlichen Gen *orfX* kodiert ist, auf Menachinon überträgt. In den fakultativ anaeroben Organismen hingegen werden die Elektronen von ETF über die ETF:QO Oxidoreduktase auf Ubichinon übertragen. Im Unterschied zu Menachinon/Menachinol liegt das Redoxpotential für das Redoxpaar Ubichinon/Ubichinol höher (vgl. -80 mV zu +110 mV). Eine Umkehrung der Reaktion erscheint also günstiger, wenn die Elektronen vom Menachinonpool übertragen werden, statt vom Ubichinonpool. Da im *bbs*-Operon von *G. metallireducens* alle Gene für diese Reaktion kodiert sind, wurde dieses Operon in dieser Arbeit verwendet.

Zur Klonierung der *bbs*-Gene zusammen mit den Genen zur Benzoyl-CoA Produktion wurden verschiedene Klonierungsstrategien verfolgt. Eine Rolle bei der Auswahl der Klonierungsstrategien spielten dabei die Kompatibilität der Plasmide und ob zwischen den einzelnen Genen *E. coli*-Shine-Dalgarno-Sequenzen kloniert werden können. Da im *bbs*-Operon Anfang und Ende einiger Gene überlappen. Daher wurde als erste Klonierungsstrategie das kombinatorische Klonieren über das StarGate System ausgewählt (Material und Methoden 2.5.5.1). Vorteile dieser Klonierungsstrategie sind, dass die Reihenfolge der Gene beliebig geändert werden kann, neue Gene hinzugefügt werden können und zwischen jedem eingefügten Insert eine für *E. coli* optimale Shine-Dalgarno-Sequenz eingefügt wird. Leider konnten nicht alle 13 Gene, die zur Benzylsuccinatproduktion benötigt werden, zusammen in ein Expressionsplasmid kloniert werden. Mögliche Ursachen dafür könnten in der Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturen liegen, die die Ligation der Inserts verhinderten, oder in einer größenbedingten Instabilität des Plasmids. Daher wurden die Gene auf die drei Plasmide pEtfXGH, pEF und pLigBen bzw. pTransBen verteilt (Abbildung 23 A, B, C und D). Voraussetzung hierbei war, dass diese Plasmide kompatibel sind und zusammen in *E. coli* exprimiert werden können. Daher musste ein neuer Expressionsvektor kloniert werden. Dazu wurde im Expressionsvektor pASG5, das Antibiotikaresistenzgen *bla* für Ampicillin gegen das Chloramphenicolresistenzgen *cat* ausgetauscht (Material und Methoden 2.5.5.2). Somit wurde der neue Expressionsvektor pASGcm5 erhalten, welcher als Backbone für die Plasmide pLigBen und pTransBen diente.

Als zweite Klonierungsstrategie wurden die Plasmide pLigBen und pTransBen als Biosynthese-Module für Benzoyl-CoA verwendet. Diese wurden mit dem zweiten biosynthetischen Modul der  $\beta$ -Oxidation pBeta kombiniert (Abbildung 23 E, C und D). Dazu wurde das *bbs*-Operon mittels KOD-DNA-Polymerase mit den phosphorylierten Primern *bbsGmet* for/rev amplifiziert. Das „broad host range“

Plasmid pBBR1mcs2 (Kovach et al., 1995) wurde ebenfalls durch PCR amplifiziert mit den Primern pBBR for und pBBR rev. Beide PCR-Fragmente wurden nach Reinigung über ein PCR-Purification-Kit *blunt end* ligiert. Somit wurde das Plasmid pBeta erhalten. Der Vorteil dieser Klonierungsstrategie war, dass sie weniger aufwändig war und das Plasmid pBeta in verschiedenen Organismen exprimiert werden kann.

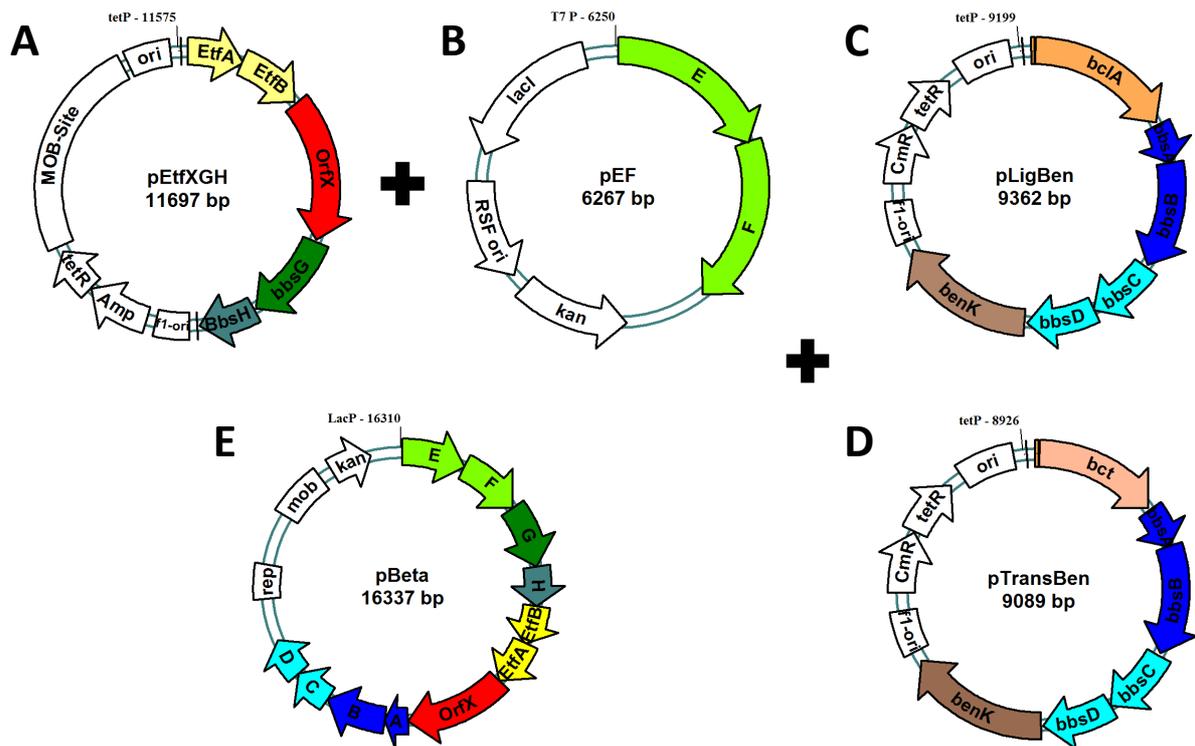


Abbildung 23: Expressionsplasmide, die in dieser Arbeit erzeugt wurden. A: Das Plasmid pEtfXGH enthält einen „*broad host range*“ (bhr)-Origin, trägt ein Resistenzgen für Ampicillin und kodiert die Gene *EtfB* und *A*, *bbsOrfX*, *G* und *H* unter einem tet Promotor. B: Das Plasmid pEF enthält einen RSF1030 Origin, trägt ein Resistenzgen für Kanamycin und enthält die Gene *bbsE* und *F* unter einem T7-Promotor. C: Das Plasmid pLigBen enthält einen ColE1-Origin, trägt ein Resistenzgen für Chloramphenicol und enthält die Gene *bctA*, *bbsA-D* und *benK* unter einem tet Promotor. D: Das Plasmid pTransBen enthält einen ColE1-Origin, trägt ein Resistenzgen für Chloramphenicol und enthält die Gene *bct*, *bbsA-D* und *benK* unter einem tet Promotor. E: Das Plasmid pBeta enthält einen bhr-Origin (Kovach et al., 1995), trägt ein Resistenzgen für Kanamycin und enthält die Gene des *bbs*-Operons *bbsA-H* unter einem Lac-Promotor. Die Plasmide wurden entweder in der Kombination A+B+C bzw. A+B+D oder E+C bzw. E+D in *E. coli*-Wirtstämmen eingesetzt, sodass jede Transformante Plasmide erhielt, die alle nötigen Gene zur Benzylsuccinatproduktion enthielten und die untereinander kompatibel waren.

*E. coli*-Zellen wurden mit den erhaltenen Plasmiden in folgenden Kombinationen transformiert:

- pEtfXGH + pEF + pLigBen,
- pEtfXGH + pEF + pTransBen,
- pBeta + pLigBen,
- pBeta + pTransBen,

sodass jede Transformante ein vollständiges Set aus Genen des *bbs*-Operons sowie den Benzoattransporter und entweder das Gen der Benzoat-CoA Ligase oder der Succinyl-CoA: Benzoat CoA-Transferase durch Kombination der jeweiligen kompatiblen Plasmide erhielt (Abbildung 23).

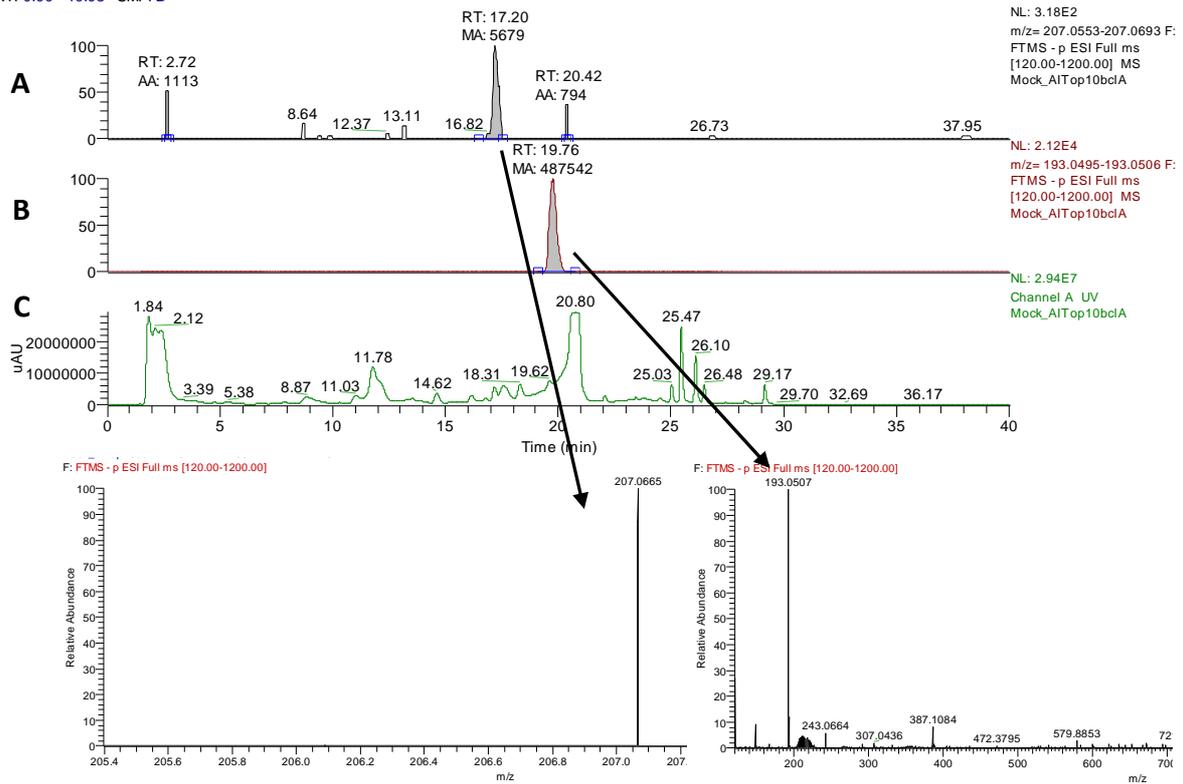
Im nächsten Schritt wurde unter aeroben Wachstumsbedingungen ein Screening der rekombinanten *E. coli*-Zellen in 50-ml Autoinduktions- oder M9-Minimalmedium mit 10 mM Glucose durchgeführt, welches jeweils mit 10 mM Succinat und 2 mM Benzoat supplementiert wurde. Nach drei Tagen Inkubation bei 15 °C wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand mit 2 ml 0,1 mM Phenylsuccinat als internem Standard versetzt, auf pH 2 angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde verdampft und der Rückstand in 2 ml 20 % Acetonitril, 0,1 % TFA gelöst. Die so erhaltenen Proben wurden durch LC-MS Analysen auf Benzylsuccinat-Bildung untersucht (Material und Methoden 2.7.2).

Beispielhaft ist in Abbildung 24 ein LC-MS Chromatogramm dargestellt. Benzylsuccinat eluierte bei einer Retentionszeit von 17,2 Minuten und mit deprotonierter Masse von 207,0665, während der interne Standard Phenylsuccinat bei 19,76 Minuten und mit deprotonierter Masse von 193,0507 eluierte. Aus den Flächen der Massenpeaks, die mittels des internen Standards normalisiert worden waren, und mithilfe einer Kalibriergerade für Benzylsuccinat, wurden die Benzylsuccinatkonzentrationen in den Proben berechnet. In einigen Chromatogrammen wurden Störsignale mit einer Masse von 207 detektiert (Abbildung 24A). War die Probe durch Überlagerung der Störsignale mit den Produktpeaks nicht eindeutig auswertbar, wurde die Messung wiederholt. Unterhalb einer Konzentration von 10 nM Benzylsuccinat wird die Quantifizierung ungenau, da hier die Detektionsgrenze erreicht wird. Da jedoch alle Proben aus Kulturüberständen um den Faktor 50 ankonzentriert waren, indem das komplette Kulturvolumen extrahiert und anschließend der Rückstand in einem Fünfzigstel des Volumens resuspendiert wurde, lagen die gemessenen Konzentrationen stets innerhalb des Messbereichs.

E:\2013\...\Mock\190113\Mock\_AITop10bcdA

1/19/2013 12:56:18 AM

RT: 0.00 - 40.03 SM: 7B



**Abbildung 24:** LC-MS-Chromatogramm der Probe: "Autoinduktionsmedium; *E. coli* Transformante mit den Plasmiden pBeta und pIigBen". A: Massenpeaks der Masse 207,0553 - 207,0693. Bei einer Retentionszeit von 17,2 Minuten wird Benzylsuccinat mit einer Masse von 207,0665 detektiert. B: Interner Standard Phenylsuccinat mit einem Massenpeak der Masse 193,0507 und einer Retentionszeit von 19,76 Minuten. C: UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 210 nm.

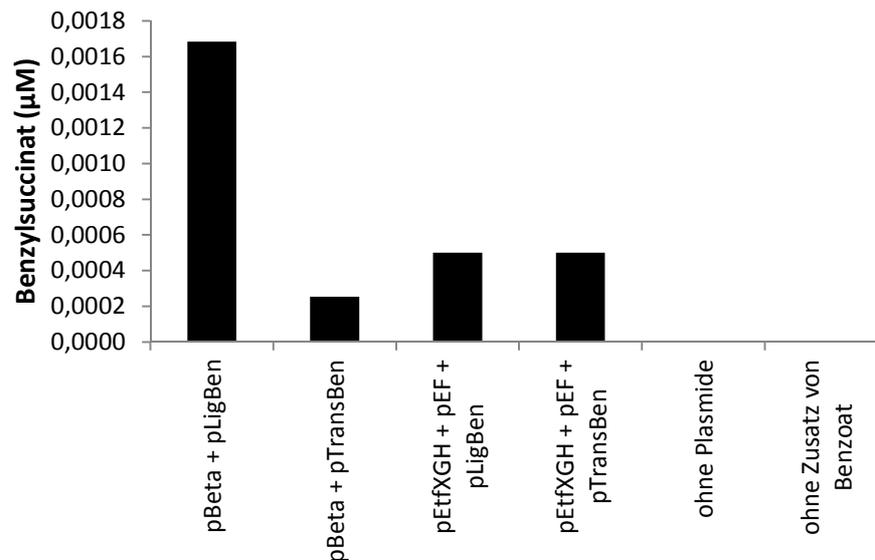


Abbildung 25: Benzylsuccinatkonzentration im Kulturüberständen rekombinanter *E. coli*-Zellen nach drei Tagen Inkubation bei 15 °C in Autoinduktionsmedium mit 2 mM Benzoat. Die Zellen enthielten die Gene zur Benzylsuccinatproduktion auf zwei oder drei Plasmide verteilt und entweder das Gen der Benzoat-CoA Ligase (*bclA*) oder der Transferase (*bct*). Zur Negativkontrollen wurden *E. coli*-Kulturen ohne diese Plasmide oder Kulturen ohne Zusatz von Benzoat analysiert.

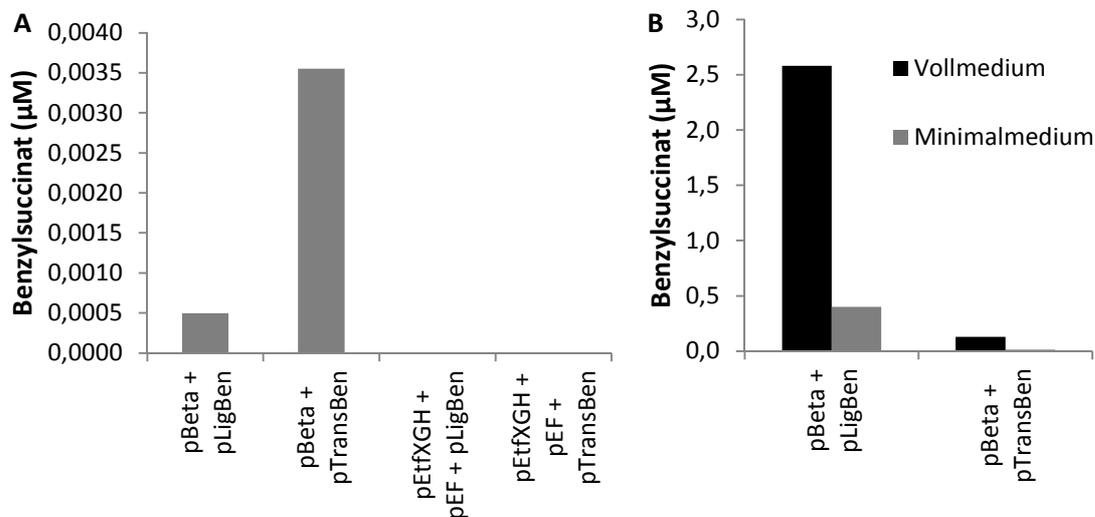
In Autoinduktionsmedium produzierten alle rekombinanten *E. coli*-Stämme Benzylsuccinat, wenn auch nur in sehr niedrigen Konzentrationen bis maximal 1,7 nM (Abbildung 25). In Proben aus Kontrollansätzen ohne Benzoat-Supplementation sowie in Kulturen des verwendeten *E. coli*-Stamms ohne Gene zur Bildung von Benzylsuccinat wurde erwartungsgemäß kein Benzylsuccinat detektiert.

Wurden die Zellen in Minimalmedium kultiviert und durch IPTG induziert, produzierten nur die Transformanten mit dem pBeta Plasmid nachweisbare Mengen Benzylsuccinat (Abbildung 26A). Hingegen produzierten die *E. coli*-Stämme mit den drei Plasmiden nach Induktion mit IPTG kein Benzylsuccinat. Der Grund dafür ist vermutlich, dass diese Stämme sehr milde Induktionsbedingungen benötigen, damit die Bbs-Proteine korrekt gefaltet und lösliche aktive Enzyme gebildet werden können. Da zur Produktion von Benzylsuccinat robuste und zuverlässige Stämme benötigt werden, wurde im Folgenden nur mit den rekombinanten *E. coli*-Stämmen weitergearbeitet, die ein Zwei-Plasmid-System mit dem pBeta-Modul und entweder dem pLigBen- oder dem pTransBen-Modul enthielten.

Deutliche Unterschiede wurden festgestellt zwischen den Zellen, die Benzoyl-CoA über die Benzoat-CoA Ligase statt über die CoA-Transferase bildeten (Abbildung 26A). Im Vergleich zu Zellen mit CoA Ligase war die Benzylsuccinatproduktion in Zellen mit CoA-Transferase um den Faktor 7 höher und erreichte maximal eine Konzentration von 3,6 nM. Dies kann durch den geringeren ATP-Verbrauch

durch die CoA-Transferase erklärt werden. Im Vergleich zur CoA Ligase kann ein Molekül ATP pro Molekül Benzoyl-CoA durch die CoA-Transferase „gespart“ werden.

Da Succinat als Precursor zur Synthese von Benzylsuccinat benötigt wird, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich die Produktausbeute ändert, wenn die Zellen unter anaeroben statt bisher aeroben Bedingungen kultiviert werden. Unter aeroben Bedingungen wurden dem Medium 10 mM Succinat zugesetzt, während unter anaeroben Bedingungen kein Succinat zugesetzt wurde, weil endogenes Succinat, welches als Endprodukt während der gemischten Säuregärung entsteht, in den synthetischen Stoffwechselweg einfließen sollte. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die Produktausbeute ändert, wenn für die Benzoyl-CoA Bildung statt der Benzoat-CoA Ligase die CoA-Transferase verwendet wird. Dazu wurden die beiden rekombinanten *E. coli*-Stämme mit den entsprechenden Plasmiden pBeta und pLigBen bzw. pBeta und pTransBen in 50 - 500 ml LB oder M9 Minimalmedium, aerob und anaerob kultiviert. Nach Extraktion der Kulturüberstände wurden die Proben für die LC-MS vorbereitet und quantifiziert. Die Produktkonzentrationen nach aerober und anaerober Produktion wurden anschließend verglichen (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Benzylsuccinatkonzentrationen im Kulturüberständen rekombinanter *E. coli*-Zellen nach drei Tagen Inkubation bei 15 °C in Autoinduktionsmedium oder M9-Minimalmedium mit 2 mM Benzoat und 10 mM Glucose unter aeroben (A) und anaeroben Bedingungen (B). Die Zellen enthielten die Gene zur Benzylsuccinatproduktion auf zwei oder drei Plasmide verteilt und entweder das Gen der Benzoat-CoA Ligase (*bclA*) oder der Transferase (*bct*) auf den Plasmiden pLigBen bzw. pTransBen verteilt.

Unter anaeroben Bedingungen war die Benzylsuccinatproduktion bereits um den Faktor 1000 gesteigert. Dies kann eventuell durch Induktion von Fumarat:Succinat-Antiportern und Succinat-Export-Proteinen erklärt werden, die in Enterobakterien nur unter anaeroben Bedingungen aktiv sind und für die Exkretion des Gärungsprodukts Succinats verantwortlich sind, eventuell aber auch durch

die Umstellung des Chinonpools von Ubi- auf Menachinon oder andere Effekte. Es ist möglich, dass Benzylsuccinat unspezifisch über die Succinat-Exkretionssysteme ins Medium ausgeschieden wird, sodass die im Cytoplasma ablaufenden Reaktionen in Richtung verstärkter Produktbildung verschoben werden.

Unter anaeroben Bedingungen konnten auch deutliche Unterschiede festgestellt werden zwischen den Zellen, die Benzoyl-CoA über die CoA Ligase statt über die CoA-Transferase bildeten (Abbildung 26). Im Vergleich zu Zellen mit CoA-Transferase war die Benzylsuccinatproduktion in Zellen mit CoA Ligase um den Faktor 20 - 30 höher und erreichte maximal eine Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  Benzylsuccinat (im Vollmedium). Daher wurde für die weiteren Versuche mit diesem Stamm weiter gearbeitet.

Im Folgenden wurde die Benzylsuccinat-Produktion von anaeroben Kulturen, die durch gemischte Säuregärung oder durch Fumaratatmung Energie konservierten, verglichen. Außerdem wurde untersucht, wie viel Produkt intrazellulär in den Zellen von rekombinanten *E. coli*-Kulturen akkumulierte.

Dazu wurde der rekombinante *E. coli*-Stamm mit den Modulen pLigBen und pBeta in 500 ml M9 Minimalmedium mit 10 mM Glucose, 2 mM Benzoat und optional 40 mM Fumarat unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Sowohl der Kulturüberstand als auch die abzentrifugierten und gewaschenen Zellen wurden nach Ansäuerung auf pH 2 mit Ethylacetat extrahiert und die erhaltenen Metabolite über LC-MS Analyse quantifiziert (Material und Methoden 2.4). Für die Berechnung der intrazellulären Benzylsuccinatkonzentration wurde angenommen, dass ein Zellvolumen von 2,4 ml einem Gramm Zelltrockengewicht (Djurdjevic et al., 2011) und eine Kultur bei einer OD 1 einem Zelltrockengewicht von  $0,3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  entspricht (Schlegel, 1992).

Die Benzylsuccinat-Produktion im Kulturüberstand war unter Bedingungen der Fumaratatmung wesentlich höher und wurde auf eine Konzentration von maximal  $4,8 \pm 1,6 \mu\text{M}$  gesteigert (Abbildung 28). Die intrazellulären Benzylsuccinatkonzentrationen lagen deutlich höher als die Konzentrationen im Medium (10-fach in Fumarat-atmenden und 50-fach in gärenden Zellen). Vermutlich wird also durch die verstärkte Induktion von Fumarat-Succinat-Antiportern und Succinat-Export-Proteinen in Fumarat-atmenden Zellen auch der Benzylsuccinat-Export etwas gesteigert.

Die Benzylsuccinat-Produktion sollte durch die zusätzliche Expression eines *mscS* Gens, das für einen modifizierten mechanosensitiven Kanal kodiert, der für eine ständige Exkretion niedermolekularer Metaboliten verantwortlich ist, weiter gesteigert werden. Das verwendete *mscS*-Gen hat eine Mutation im 9. Codon, sodass die Aminosäure Lysin durch Serin ausgetauscht wird. Dadurch kodiert dieses Gen für eine „gain-of-function“ Mutante, welche einen stets geöffneten Kanal ausbildet (erhalten von Prof. Dr. Krämer, Institut für Biochemie, Universität zu Köln).

Das *mcsS*-Gen wurde durch kombinatorisches Klonieren zu den bereits vorhandenen Genen des Plasmids pLigBen hinzugefügt.

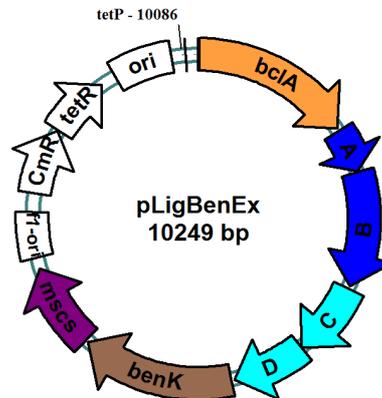


Abbildung 27: "pLigBenEx". AHT-induzierbarer Expressionsvektor mit den Genen *bclA*, *bbsABCD*, *benK* und *mcsS*.

Das erhaltene Plasmid pLigBenEx wurde zusammen mit dem Plasmid pBeta in *E. coli* Top10-Zellen transferiert, wodurch ein weiterer Benzylsuccinat-Produktionsstamm erzeugt wurde. Durch die verstärkte Exkretion von Benzylsuccinat sollten die ablaufenden Reaktionen in Richtung Produktbildung verschoben werden, um so eine höhere Ausbeute zu erzielen.

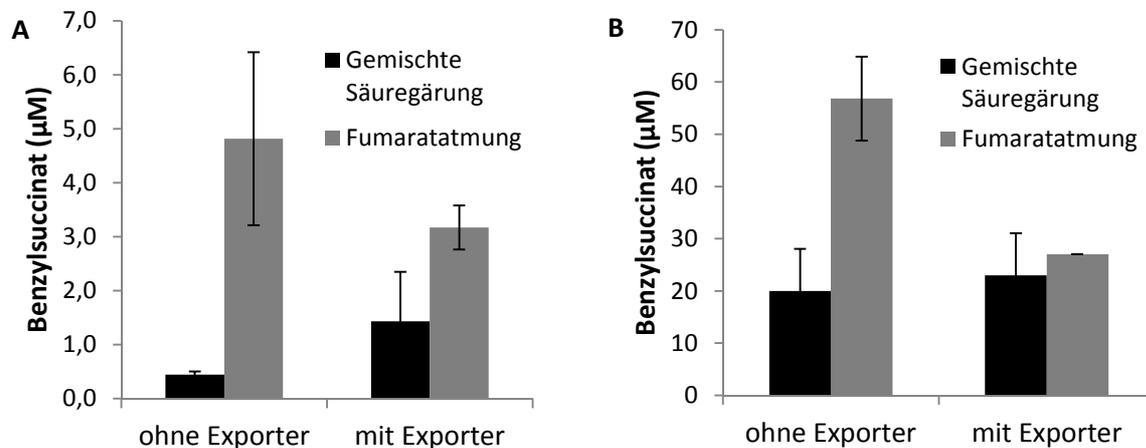


Abbildung 28: Benzylsuccinatkonzentration rekombinanter *E. coli* Zellen nach drei Tagen Inkubation bei 15 °C unter anaeroben Bedingungen, in M9 Minimalmedium mit 2 mM Benzoat, 10 mM Glucose und optional 40 mM Fumarat zur Fumaratatmung. A: Benzylsuccinat-Konzentrationen im Kulturüberstand und B: Benzylsuccinat-Konzentrationen in den Zellen. Die Zellen enthielten die Gene zur Benzylsuccinatproduktion auf die zwei Plasmide pBeta und pLigBen bzw. pLigBenEx verteilt, sodass optional das *mcsS*-Gen, welches für einen mutierten mechanosensitiven Kanal kodiert, exprimiert oder nicht exprimiert wurde.

Eine Produktionssteigerung durch die Synthese des mechanosensitiven Kanals wurde nur unter Gärungsbedingungen beobachtet (Faktor 3,5), während in den Fumarat-atmenden Zellen die Benzylsuccinatkonzentration im Überstand sogar um den Faktor 1,5 abnahm (Abbildung 26). Dies kann man

vielleicht damit erklären, dass der produzierte MscS-Exporter die Membran auch durchlässiger für Protonen macht und deshalb einen anaeroben Atmungs-Prozess stärker beeinträchtigen sollte als eine Gärung. Der beobachtete Rückgang der Benzylsuccinat-Produktion bei Fumarat-Atmung ist also wohl auf einen indirekten Effekt auf den Gesamtstoffwechsel zurückzuführen. In den Zellen mit überproduziertem MscS-Protein lagen die intrazellulären Benzylsuccinat-Konzentrationen in gärenden und Fumarat-atmenden Kulturen bei ähnlichen Werten von ca. 20  $\mu\text{M}$ , damit also etwa gleich wie bei gärenden Kulturen ohne MscS (1,2 fach höher) und etwa bei der Hälfte der Konzentrationen Fumarat-atmender Kulturen ohne MscS. Die ins Medium exkretierten Benzylsuccinat-Konzentrationen dieser Kulturen lagen bei 1,4  $\mu\text{M}$  (Gärung) bzw. 3,2  $\mu\text{M}$  (Fumarat-Atmung).

Daraus folgt, dass die Verwendung des MscS-Proteins nur dann vorteilhaft ist, wenn die Kulturen unter gärenden Bedingungen kultiviert werden. Unter Fumarat-Atmung wirkt sich der Einbau des MscS-Proteins eher negativ auf die Benzylsuccinatproduktion aus, da hier wahrscheinlich durch die Beeinträchtigung des Membranpotentials der Gesamtstoffwechsel der Zelle gestört wird.

### 3.3. Biosynthetisches Modul der Biphenylproduktion

#### 3.3.1. Koexpression des Biphenylsynthase-Gens mit dem Benzoyl-CoA Modul in *E. coli*

Für die Produktion von Biphenyl wird neben Malonyl-CoA auch Benzoyl-CoA als Substrat benötigt. Die Umsetzung der beiden Substrate zum Produkt 3,5-Dihydroxybiphenyl erfolgt über die Biphenylsynthase (BIS) welche z. B. im Genom der Vogelbeere (lat. *Sorbus aucuparia*) kodiert ist (Liu et al., 2007). Biphenyle sind Phytoalexine, die in Kernobstgewächsen (*Maloideae*) zum Schutz vor Mikroorganismen produziert werden. Diese toxische Wirkung wurde mit dem *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3)pLysS untersucht. Die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) von 3,5-Dihydroxybiphenyl in LB-Medium lag bei 1 mM .

Die Gene der Benzoat-CoA Ligase *bclA* und des Benzoattransporters *benK* aus *A. aromaticum* wurden zusammen mit dem Gen der Biphenylsynthase *bis* über kombinatorisches Klonieren in das Expressionsplasmid pASG5\_mod kloniert (Material und Methoden 2.5.5.1). Dazu wurden zunächst die Gene *bclA* und *bis* durch Fusions-PCR amplifiziert und das PCR-Produkt durch Nutzung der *Lgul*-Schnittstelle in den pEntry-Vektor kloniert. Die Fragmente *bclA-bis* und *benK* wurden durch Fusionsklonierung über pNFUSE und pCFUSE Vektoren miteinander verbunden, sodass zuletzt das Expressionsplasmid pASG\_mod-bclA-bis-benK erhalten wurde.

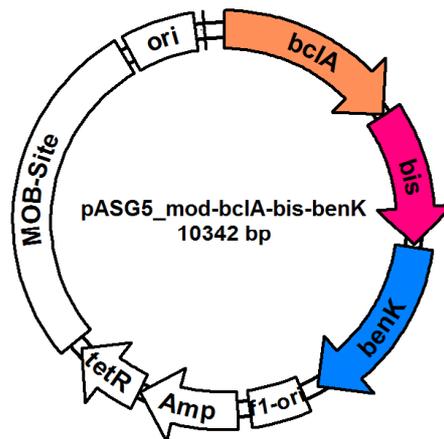
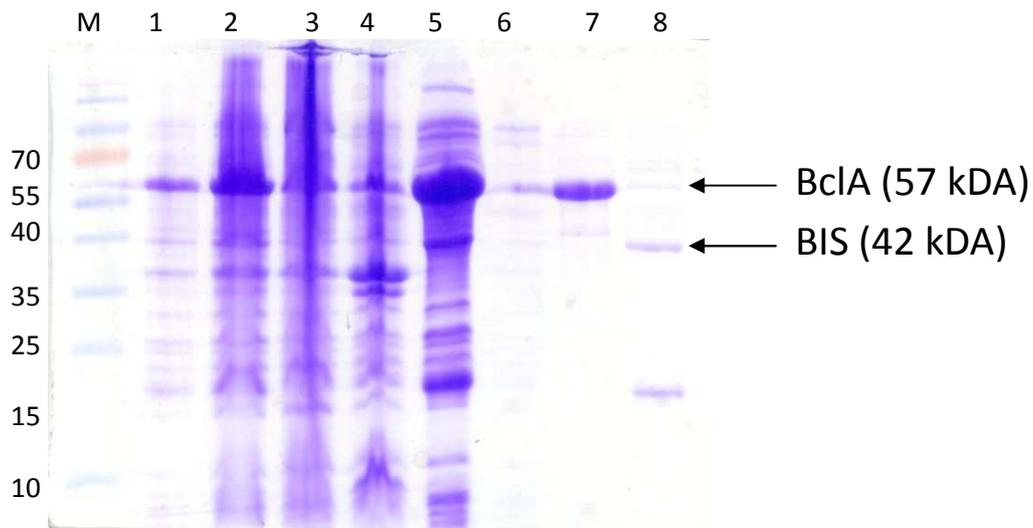


Abbildung 29: „pASG5\_mod bclA-bis-benK“. AHT-induzierbarer Expressionsvektor mit *bclA*, *bis* und *benK* –Genen.

Das Plasmid pASG\_mod-*bclA*-*BIS*-*benK* wurde wie in Material und Methoden 2.4 beschrieben im *E. coli*-Expressionsstamm Rosetta (DE3) pLysS durch Induktion mit AHT (Endkonzentration 0,2 mg/l) exprimiert. Drei Stunden nach Induktion wurden die Zellen geerntet, durch Passagieren durch eine FrenchPress-Zelle aufgeschlossen und mittels Ultrazentrifugation wurde der lösliche Zelleextrakt vom unlöslichem Zellpellet getrennt. Die Benzoat-CoA Ligase und die Biphenylsynthase wurden aus dem Zelleextrakt zunächst durch Ammoniumsulfatpräzipitation ausgefällt und nach Entsalzung durch Dialyse mittels Chromatographie über eine DEAE-Sepharosesäule gereinigt (Material und Methoden 2.6.1). Dies führte bereits zu einer weitgehenden Reinigung der Enzyme (apparente Homogenität der CoA Ligase und nur noch wenige kontaminierende Banden bei BIS; Abbildung 30). Die Benzoat-CoA Ligase eluierte von der DEAE-Sepharosesäule bei einer Salzkonzentration von 170 - 190 mM KCl, direkt vor der Biphenylsynthase, die bei 190 - 210 mM KCl eluierte. Aus einer 2 l Kultur (3,5 g Zellnassgewicht) wurden somit 33 mg BclA und 15 mg BIS in einem Volumen von je 16,5 ml erhalten (Tabelle 27).

Tabelle 27: Reinigungstabelle der rekombinanten Benzoat-CoA Ligase aus *A. aromaticum*

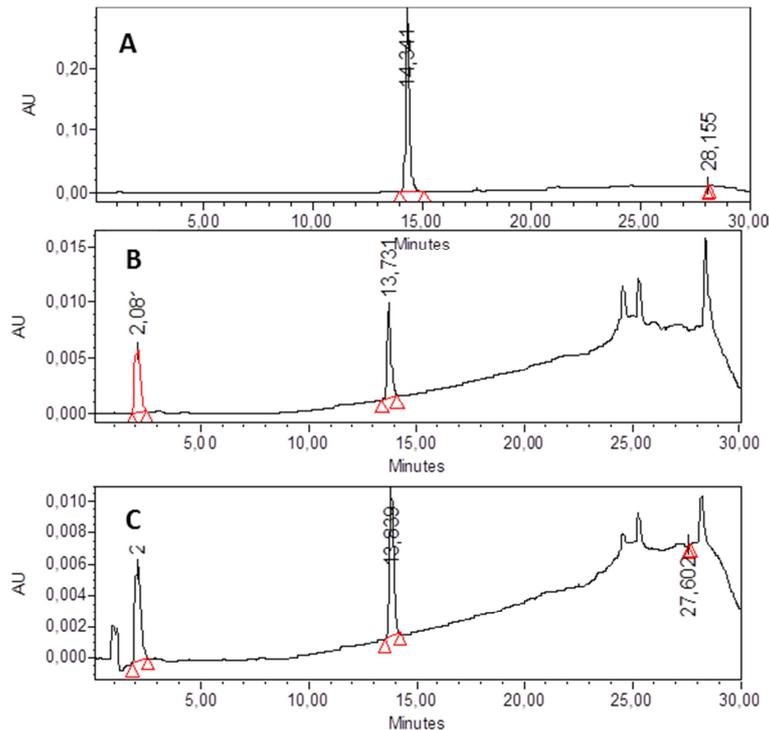
Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Aktivität (mU)	Spez. Akt. (mU/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (fach)
Zelleextrakt (nach Ultrazentrifugation)	15					
Ammoniumsulfatpräzipitation (60%)	6	90	33	11	100	1
Dialyse	10	88	18	10	56	1
DEAE BclA-Fraktion	16,5	33	6	47	17	4



**Abbildung 30:** SDS-Reinigungsgel der Benzoat-CoA Ligase und der Biphenylsynthase aus *E. coli* Rosetta(DE)pLysS mit pASGmod-*bclA-BIS-benK*. M: Molekülmassenstandard, 1: Ganze Zellen von *E. coli* nach Induktion mit 200  $\mu$ l AHT (2 mg/ml), 2: Zellextrakt, 3: Zellextrakt nach Ultrazentrifugation, 4: Zellextrakt - unlösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation, 5: 60 % Ammoniumsulfat-Pellet, 6: DEAE Durchfluss, 7: DEAE Benzoat-CoA Ligase – Fraktion, 8: Biphenylsynthase – Fraktion.

Die Aktivität der Benzoat-CoA Ligase wurde photometrisch mittels eines gekoppelten enzymatischen Assays bestimmt (Material und Methoden 2.6.4.1). Das gereinigte Protein hatte eine spezifische Aktivität von  $47 \pm 5$  mU/mg. Diese Aktivität ist um den Faktor 2000 geringer im Vergleich zur gleichen CoA Ligase, die durch *E. coli*-Zellen mit dem Plasmid pPSG5\_*bclA* produziert wurde. Dennoch können theoretisch insgesamt 33 nmol Biphenyl pro Minute in den Zellen gebildet werden. Somit kann drei Stunden nach Inkuktion eine Konzentration von 3  $\mu$ M Biphenyl erzeugt werden.

Die Aktivität der Biphenylsynthase wurde durch einen *in vitro* Assay untersucht (Material und Methoden 2.6.4.5), in dem das Enzym zusammen mit den beiden Substraten Malonyl-CoA und Benzoyl-CoA bei 35 °C inkubiert wurde. Das Reaktionsprodukt 3,5-Dihydroxybiphenyl wurde mittels RP-HPLC nachgewiesen.



**Abbildung 31: HPLC-Chromatogramme zum Nachweis von 3,5-Dihydroxybiphenyl. A: Standard 3,5-Dihydroxybiphenyl (1 mM); Der Produktpeak wurde durch RP-HPLC nachgewiesen, nachdem das Enzym für 10 Minuten zusammen mit den beiden der Substraten Malonyl-CoA und Benzoyl-CoA bei 35 °C inkubiert. B: Reaktion mit zellfreiem Extrakt; C: Produktpeak nach Reaktion mit Enzym, welches über eine DEAE-Sepharosesäule gereinigt wurde. Abgeschätzte spezifische Aktivität: 350 mU/mg.**

Sowohl mit zellfreiem Extrakt als auch mit dem gereinigten Enzym wurde nach Zugabe der beiden Substrate Malonyl-CoA und Benzoyl-CoA die Bildung von 3,5-Dihydroxybiphenyl gemessen (Abbildung 31). Die Aktivität der Biphenylsynthase wurde hier nur qualitativ gemessen, kann aber durch Integration der Peakflächen abgeschätzt werden. Die Größe des Produktpeaks nach Inkubation mit gereinigtem Enzym beträgt ca. 3 % des 1 mM Standards. Der Enzymtest enthielt 2,2 µg Enzym und wurde für 10 Minuten bei 35 °C inkubiert. Daraus ergibt sich eine minimale geschätzte spezifische Aktivität von 350 mU/mg und eine Wechselzahl von  $0,12 \text{ min}^{-1}$ . Verglichen mit dem Literaturwert von  $0,43 \text{ min}^{-1}$ , der ebenfalls durch heterolog in *E. coli* produziertes Enzym gemessen wurde (Liu et al., 2007), liegt dieser geschätzte Wert nur um den Faktor 3,6 niedriger. Somit können theoretisch insgesamt 5,3 µmol Biphenyl pro Minute in den Zellen gebildet werden und damit kann drei Stunden nach Inkubation bereits eine Biphenylkonzentration von 0,5 mM Biphenyl erreicht werden.

Die Benzoat-Sensitivität der Zellen durch die Aktivität des Benzoattransporters BenK wurde durch einen Wachstumstest in Benzoat haltigem LB-Medium überprüft. Dazu wurden die rekombinanten *E. coli*-Zellen mit eingeführtem *benK*-Gen und Kontrollansätze mit Wildtyp- *E. coli*-Zellen in LB-Medium kultiviert. Dieses enthielt Benzoat in Konzentrationen zwischen 0 und 10 mM.

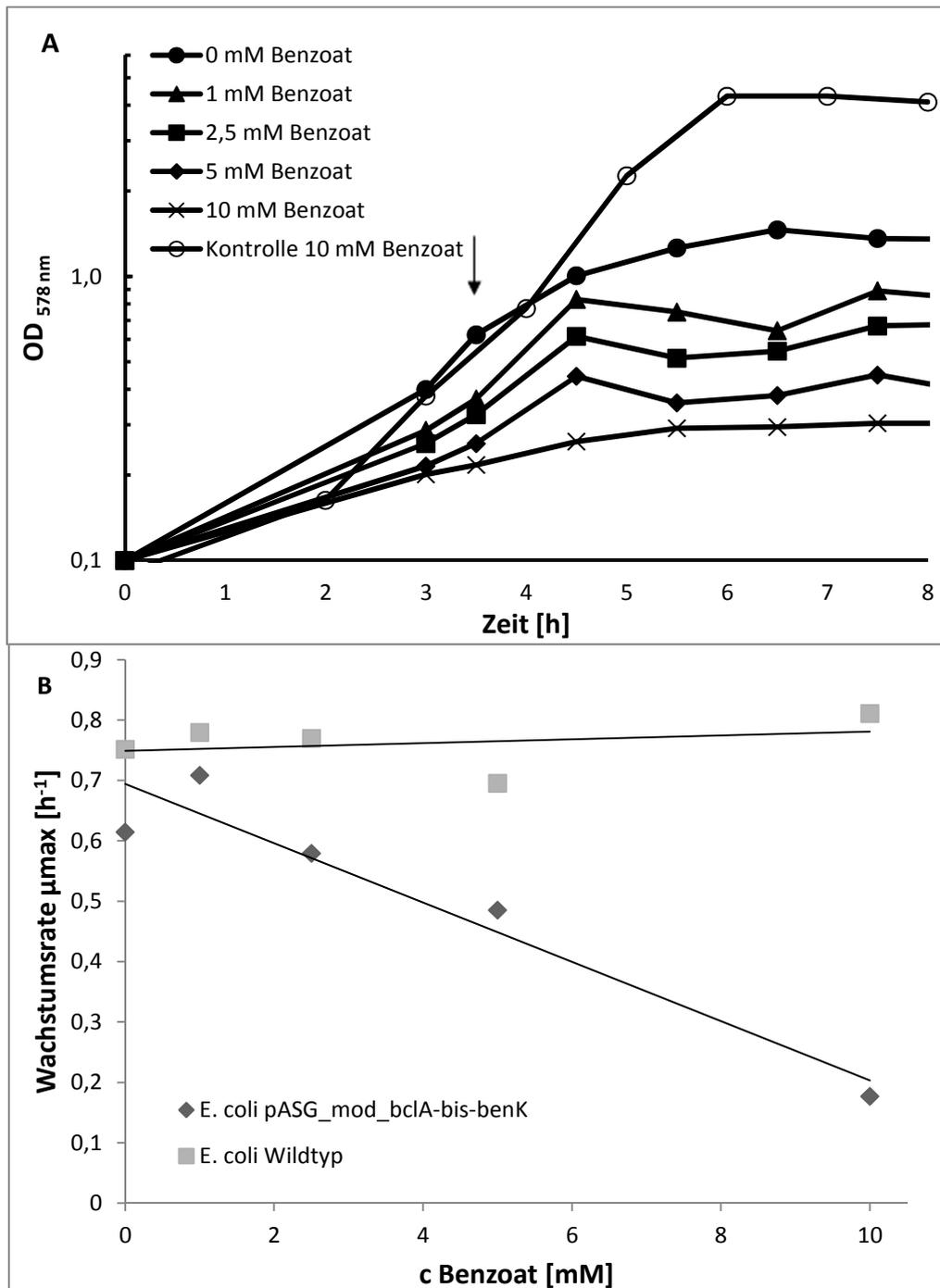


Abbildung 32 A: Wachstumskurven des Expressionsstamms *E. coli* Rosetta(DE3) pLyss mit Expressionsplasmid pASG\_mod-bclA-bis-benK, in LB-Medium mit verschiedenen Benzoat-Konzentrationen. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der AHT-Induktion an (Endkonzentration 0,2 mg/l). Als Kontrolle diente der *E. coli*-Stamm ohne Plasmid. B: Wachstumsraten der *E. coli*-Stämme mit (schwarz) und ohne (grau) *benK*-Gen, aufgetragen gegenüber der Benzoatkonzentration im LB-Medium.

*E. coli*-Zellen, die neben dem *benK*-Gen auch die Gene *bclA* und *bis* koexprimierten, zeigten ähnlich wie bereits Zellen, die nur das *benK*-Gen exprimierten (Abbildung 17), geringere Wachstumsraten mit steigender Konzentration an Benzoat, während der Wildtyp ohne *benK*-Gen unbeeinflusst blieb (Abbildung 32). *E. coli*-Zellen ohne *benK*-Gen wuchsen unbeeinflusst von der Benzoatkonzentration

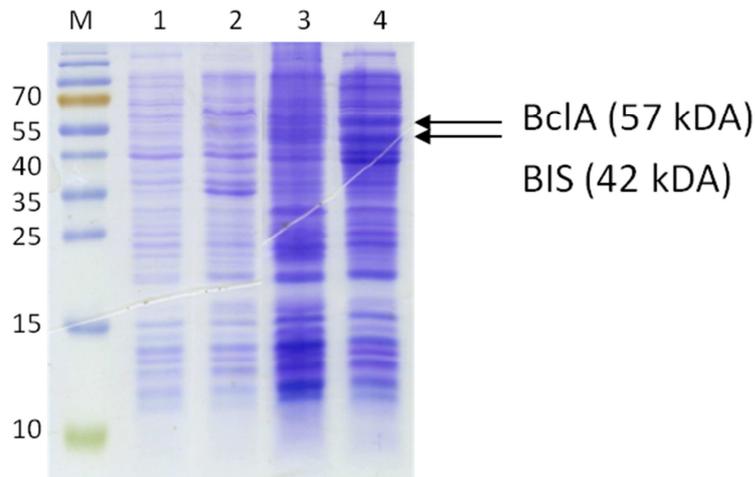
bei einer maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  von  $0,69 - 0,81 \text{ h}^{-1}$ . Bei *E. coli*-Zellen mit *benK*-Gen hingegen nahm die Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  mit steigender Konzentration an Benzoat von  $0,7$  auf  $0,18 \text{ h}^{-1}$  konstant ab. Auffällig war auch hier, dass schon vor der Induktion der Expression mit AHT die Zellen sensitiv auf das Benzoat im Medium reagierten. Dies lässt darauf schließen, dass das verwendete Plasmid nicht streng reguliert ist und eine basale Expression stattfindet.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Bestandteile des biosynthetischen Moduls zur Biphenylproduktion, BenK, BIS und BclA funktionell in rekombinanten *E. coli*-Zellen produziert werden. Dieser *E. coli*-Expressionstamm wurde folglich auch zur Überprüfung, ob eine Biphenylsynthese auch *in vivo* möglich ist, benutzt.

### **3.3.2. Koexpression des Biphenylsynthase-Gens mit dem Benzoyl-CoA Modul in *Shimwellia blattae***

Als alternativer Produktionsstamm wurden neben den rekombinanten *E. coli*-Zellen auch rekombinante *Shimwellia blattae* (früher *Escherichia blattae*) Zellen zur Produktion von Biphenyl verwendet. *S. blattae* gehört ebenfalls zu den Enterobakterien, kann jedoch im Unterschied zu *E. coli* Malonat abbauen. Diese Eigenschaft sollte in dieser Arbeit zur Produktion von Biphenyl ausgenutzt werden, da Malonat als Precursor für die Biphenylsynthese benötigt wird und bei dieser Art zugefüttert werden kann.

Das Plasmid pASG\_mod-*bclA-BIS-benK* (Abbildung 29) wurde wie in Material und Methoden 2.4 beschrieben in *S. blattae* exprimiert. Die Benzoat-CoA Ligase und die Biphenylsynthase wurden aus dem Zellextrakt zunächst durch Ammoniumsulfatpräzipitation ausgefällt, durch eine PD10-Säule entsalzt, und anschließend durch ein SDS-Gel analysiert (Material und Methoden 2.6.1).



**Abbildung 33: SDS-Gel der Benzoat-CoA Ligase und der Biphenylsynthase aus *S. blattae* mit pASGmod-*bclA-BIS-benK*. M: Molekülmassenstandard, 1: Ganze Zellen von *E. coli* vor und 2: nach Induktion mit 200  $\mu$ l AHT (2 mg/ml), 3: Zellextrakt nach Ultrazentrifugation, 4: Proteinlösung nach 60 % Ammoniumsulfatpräzipitation und Entsalzung durch PD10-Säule**

Die so ankonzentrierte Proteinlösung (Abbildung 33) wurde im Folgenden auf Benzoat-CoA Ligase und Biphenylsynthase Aktivität analysiert.

Die Aktivität der Benzoat-CoA Ligase wurde photometrisch mittels eines gekoppelten enzymatischen Assays bestimmt (Material und Methoden 2.6.4.1). Das ankonzentrierte Protein enthielt eine spezifische Aktivität von  $48 \pm 5$  mU/mg. Damit ist die Aktivität der Proteinlösung vergleichbar mit der Aktivität, die in rekombinanten *E. coli*-Zellen gemessen wurde, die das gleiche Plasmid exprimierten.

Die Aktivität der Biphenylsynthase wurde durch einen *in vitro* Assay untersucht (Material und Methoden 2.6.4.5) in dem die Proteinlösung zusammen mit den beiden Substraten Malonyl-CoA und Benzoyl-CoA bei 35 °C inkubiert wurde. Wie bei der gereinigten Biphenylsynthase aus den rekombinanten *E. coli*-Zellen wurde auch hier das Reaktionsprodukt 3,5-Dihydroxybiphenyl mittels RP-HPLC detektiert und die Biphenylaktivität somit nachgewiesen (Abbildung 34). Der Produktpeak eluierte wie auch der Standard bei einer Retentionszeit von 11,4 Minuten.

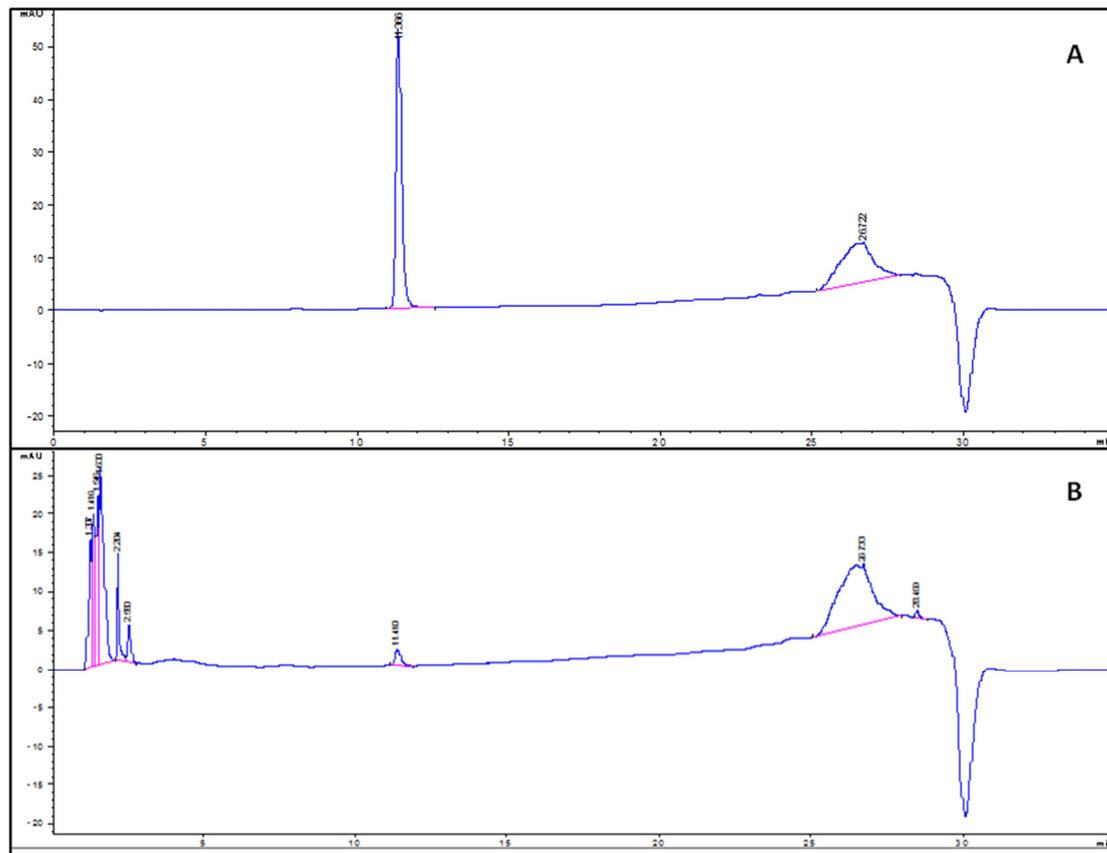


Abbildung 34: HPLC-Chromatogramme zum Nachweis von 3,5-Dihydroxybiphenyl. A: Standard 3,5-Dihydroxybiphenyl (1 mM); Der Produktpeak wurde durch RP-HPLC nachgewiesen, nachdem das Enzym für 10 Minuten zusammen mit den beiden Substraten Malonyl-CoA und Benzoyl-CoA bei 35 °C inkubierte. B: Reaktion angereicherter Proteinlösung nach Entsalzung durch PD10-Säule.

Die Benzoat-Sensitivität, bedingt durch den Einbau des Benzoattransportsers BenK in die Zellen, wurde durch einen Wachstumstest in Benzoat haltigem LB-Medium überprüft. Dazu wurden die rekombinanten *S. blattae*-Zellen mit eingeführtem *benK*-Gen und Kontrollansätze mit Wildtyp-*S. blattae*-Zellen in LB-Medium kultiviert, welches Benzoat in Konzentrationen zwischen 0 und 10 mM enthielt.

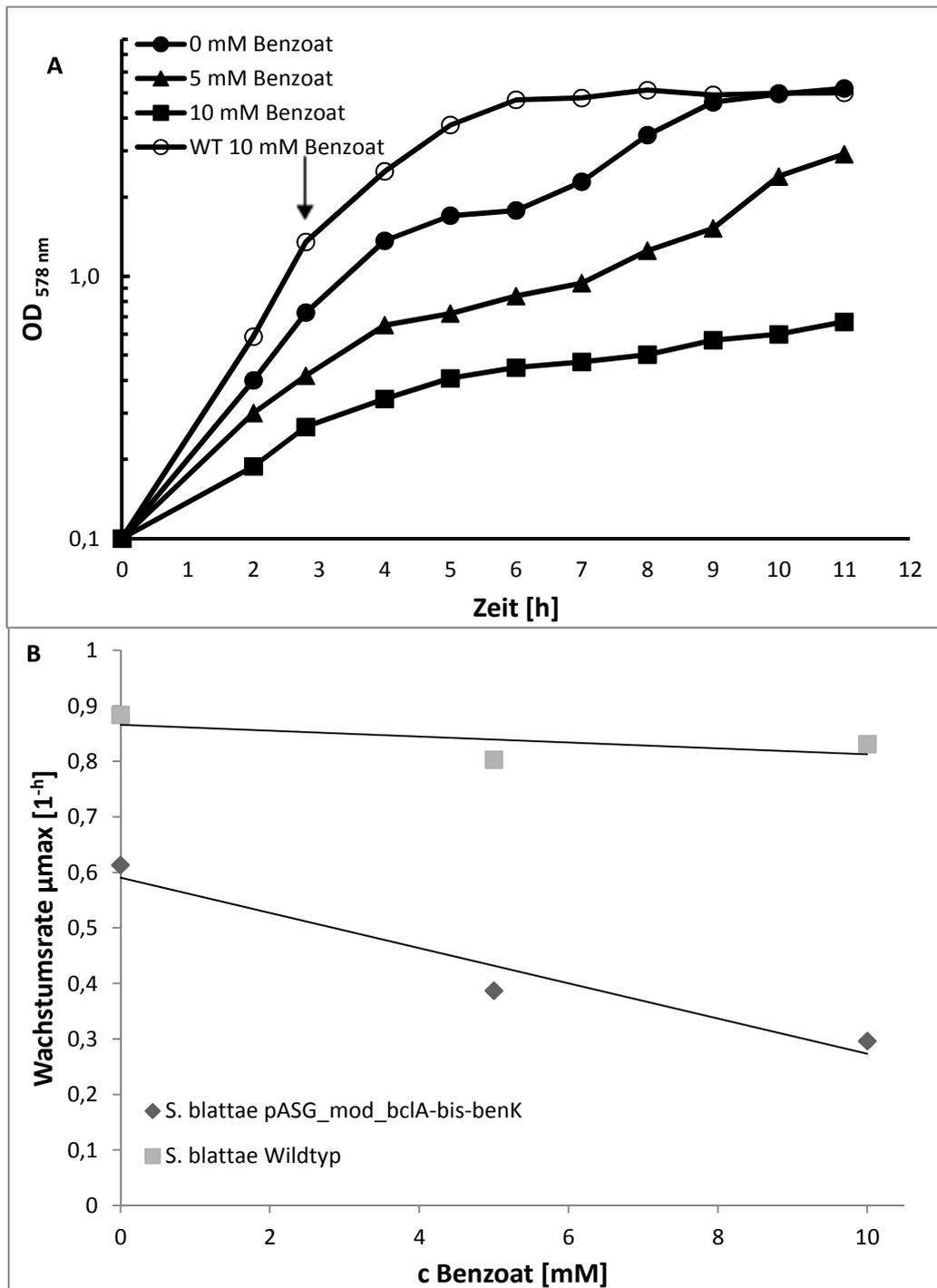


Abbildung 35: Wachstumskurven *S. blattae* mit dem Plasmid pASG\_mod-bclA-bis-benK, in LB-Medium mit verschiedenen Benzoat-Konzentrationen. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Induktion mit AHT an (0,2 mg/l Endkonzentration). Als Kontrolle diente der *S. blattae* Wildtyp-Stamm ohne Plasmid. B: Wachstumsraten der *S. blattae*-Zellen mit (schwarz) und ohne (grau) *benK*-Gen aufgetragen gegenüber der Benzoatkonzentration im LB-Medium.

Es zeigte sich auch hier ganz klar, dass die Wachstumsrate der *S. blattae*-Zellen, die das *benK*-Gen enthielten, mit steigender Konzentration an Benzoat abnahm, während der Wildtyp-Stamm unbeeinflusst blieb (Abbildung 35). *S. blattae*-Zellen ohne *benK*-Gen wuchsen unbeeinflusst von der Benzoatkonzentration bei einer maximalen Wachstumsrate  $\mu_{max}$  von 0,80 - 0,88  $h^{-1}$ . Bei *S. blattae* Zellen mit *benK*-Gen hingegen nahm die maximale Wachstumsrate mit steigender Konzentration an

Benzoat von 0,61 auf 0,29 h<sup>-1</sup> konstant ab. Auch dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem Ergebnis, das mit rekombinanten *E. coli*-Zellen erhalten wurde, die das gleiche Plasmid exprimierten. Auffällig war auch hier, dass schon vor der Induktion der Expression mit AHT die Zellen sensitiv auf das Benzoat im Medium reagierten.

Somit wurde gezeigt, dass sowohl der Benzoattransporter BenK, als auch die Benzoat-CoA Ligase BclA und die Biphenylsynthase BIS funktionell in rekombinanten *S. blattae*-Zellen mit dem Plasmid pASG\_mod-bclA-bis-benK produziert werden. Dieser *S. blattae*-Expressionstamm wurde folglich als zweiter Produktionsstamm verwendet, um eine Biphenylsynthese *in vivo* zu erreichen.

### 3.3.3. Die Malonyl-CoA Synthetase als zusätzliches biosynthetisches Modul

Für die Produktion von Biphenyl werden 3 Malonyl-CoA Moleküle als Substrate benötigt. Einer eventuellen Limitierung der Bereitstellung von Malonyl-CoA durch die Zelle sollte vorgebeugt werden, indem das kodierende Gen für die Malonyl-CoA Synthetase (*mcs*) aus *P. denitrificans* in das Expressionsplasmid pASK-IBA3C kloniert wurde (Material und Methoden 2.5.5.2, Abbildung 36).

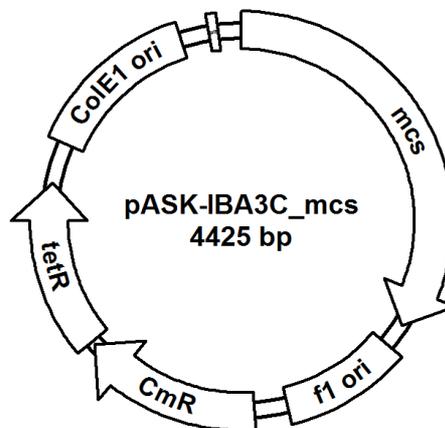
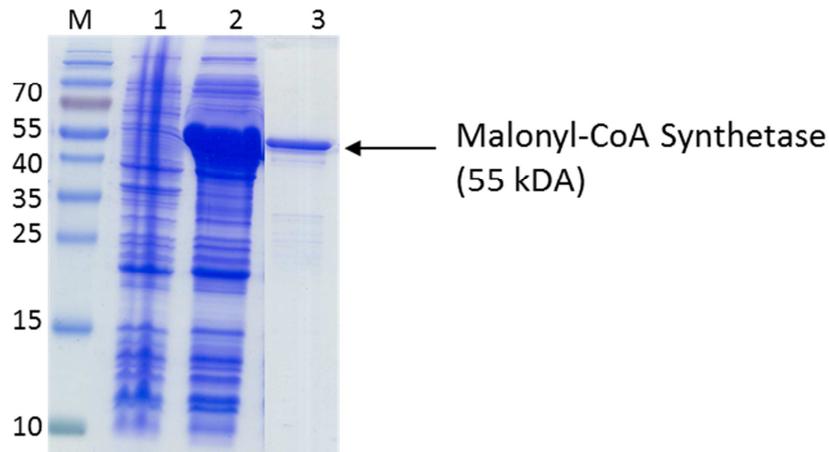


Abbildung 36: „pASK-IBA3C-mcs“. AHT-induzierbarer Expressionsvektor mit C-terminalem Strep-Tag an *mcs*.

Die Funktionalität des Plasmids pASK-IBA3C-mcs wurde überprüft, indem es wie in Material und Methoden 2.4 beschrieben im *E. coli*-Expressionsstamm Rosetta (DE3) pLysS durch Induktion mit AHT (Endkonzentration 0,2 mg/l) exprimiert wurde. Nach der Reinigung durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie wurde das Protein auf einem SDS-Gel analysiert und die Enzymaktivität mittels gekoppelten photometrischen Assays untersucht (Material und Methoden 2.6.1.3 und 2.6.4.2).



**Abbildung 37:** SDS Gel mit produzierter Malonyl-CoA Synthetase (mcs, 55 kDA). M: Proteinmarker; 1: Zellpellet vor Induktion; 2: Zellpellet nach Induktion; 3: Gereinigtes Protein nach Streptactin-Säule.

Die Malonyl-CoA Synthetase eluierte in sehr hoher Reinheit in einem Volumen von 4,5 ml und einer Konzentration von 0,35 mg/ml, sodass insgesamt 1,5 mg gereinigtes Protein aus einer 2 l Kultur (3,3 g Zellnassgewicht) erhalten wurden. Die spezifische Aktivität der gereinigten Malonyl-CoA Synthetase betrug  $4,0 \pm 0,3$  U/mg und ist damit um den Faktor 4,5 - 6 geringer als die spezifische Aktivität bisher charakterisierter Malonyl-CoA Synthetasen (vgl. Einleitung). Malonyl-CoA Synthetasen sind bereits aus verschiedenen Organismen charakterisiert worden (Einleitung 1.6.2). Daher wurde in dieser Arbeit auf weitere Untersuchungen verzichtet.

Die auf dem hergestellten Plasmid kodierte Malonyl-CoA Synthetase kann somit als Modul für die Malonyl-CoA-Bildung für die Biphenylproduktion verwendet werden.

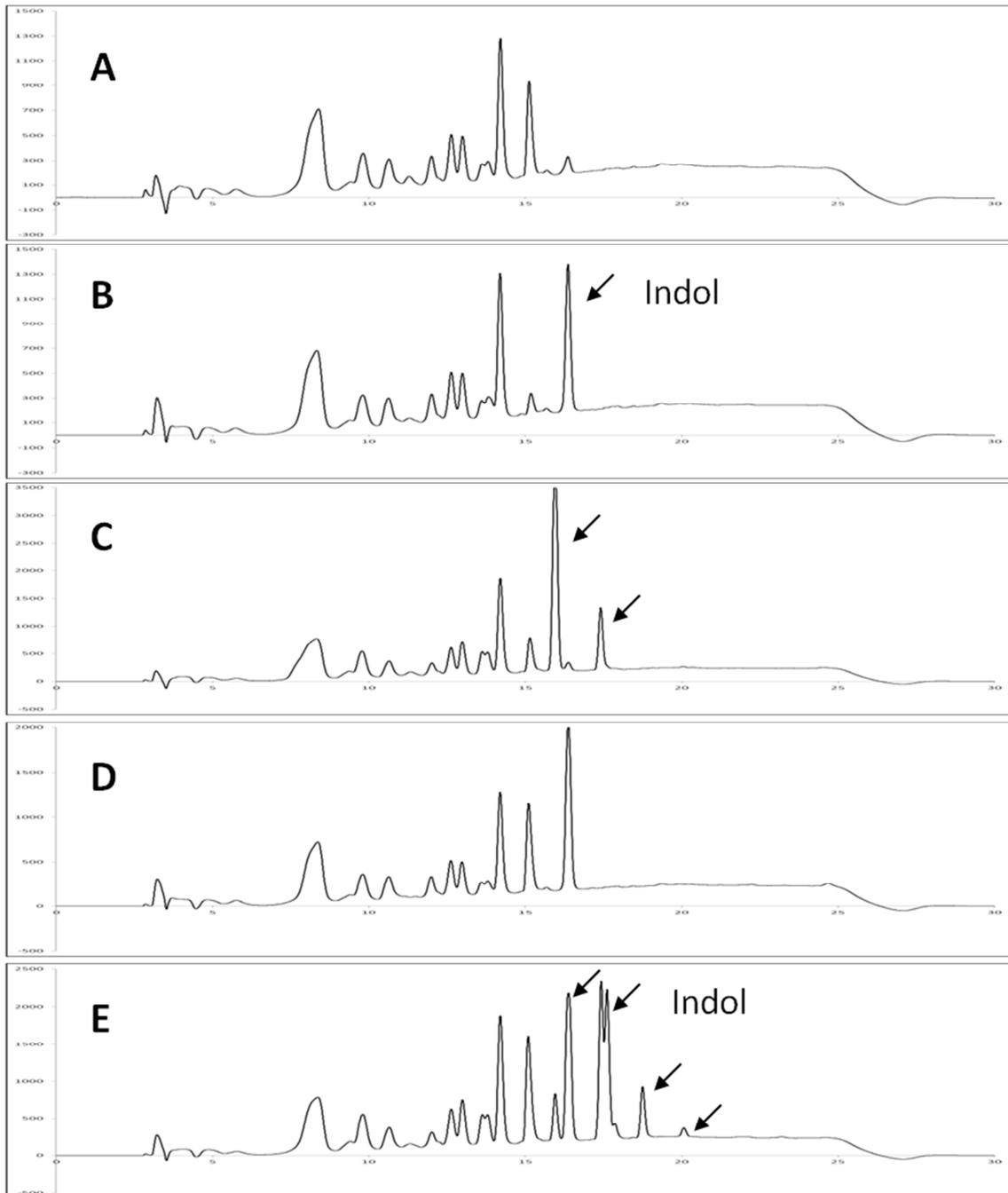
### 3.3.4. *In vivo* Produktion von Biphenyl

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die klonierten Plasmide pASK-IBA3C\_mcs und pASG\_mod-bclA-bis-benK funktionell sind, wurde im nächsten Schritt überprüft ob Zellen, die mit diesen Plasmiden transformiert wurden *in vivo* tatsächlich Biphenyl produzieren. Neben dem *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3) pLysS wurde auch das verwandte Malonat-abbauende Enterobakterium *S. blattae* mit dem Plasmid pASG\_mod-bclA-bis-benK transformiert. *S. blattae* nimmt Malonat zwar über einen spezifischen Transporter in die Zelle auf, baut es jedoch nicht über Malonyl-CoA sondern über Malonyl-ACP ab. Daher wurden optional beide Bakterienstämme zusätzlich mit dem Plasmid pASK-IBA3C\_mcs transformiert, sodass aufgenommenes Malonat durch die Malonyl-CoA Synthetase zu Malonyl-CoA aktiviert werden kann. Somit wurden vier rekombinante Bakterienstämme erhalten, die auf ihre Fähigkeit zur Biphenylproduktion untersucht wurden.

Dazu wurden die Zellen, wie in Material und Methoden 2.4 beschrieben, in 50 ml LB-Medium kultiviert, welchem 1 mM Benzoat und 5 mM Malonat zugesetzt wurden. Nach drei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen abzentrifugiert und sowohl der Kulturüberstand als auch das Zellpellet mit Ethylacetat extrahiert (Material und Methoden 2.7.4). Das Ethylacetat wurde abgedampft und der Rückstand in 20 % Methanol gelöst.

Die extrahierten Zellbestandteile wurden über LC-MS und GC-MS analysiert (Dr. Benye Liu, Institut für pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig und Dr. Linne, Abteilung Massenspektrometrie, FB Chemie Philipps-Universität Marburg). Es konnte jedoch keine Bildung von 3,5-Dihydroxybiphenyl nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die erhaltenen Kulturüberstände wurden ebenfalls über LC-MS und GC-MS analysiert. Auch hier wurde kein 3,5-Dihydroxybiphenyl detektiert. Die Kulturüberstände wurden daher nochmals mittels RP-HPLC untersucht. Zur Kontrolle wurde mit Kulturen von plasmidfreien Zellen von *E. coli* und *S. blattae* genauso verfahren.



**Abbildung 38:** HPLC-Chromatogramme zum Nachweis von Biphenyl. Aufgetrennte Extrakte aus Kulturüberstand. A: *S. blattae* Wildtyp; B: *S. blattae* pASG\_mod\_bclA-BIS-benK; C: *S. blattae* pASG\_mod\_bclA-BIS-benK pASK-IBA3C\_mcs; D: *E. coli* Wildtyp/*E. coli* pASG\_mod\_bclA-BIS-benK; E: *E. coli* pASG\_mod\_bclA-BIS-benK pASK-IBA3C\_mcs.

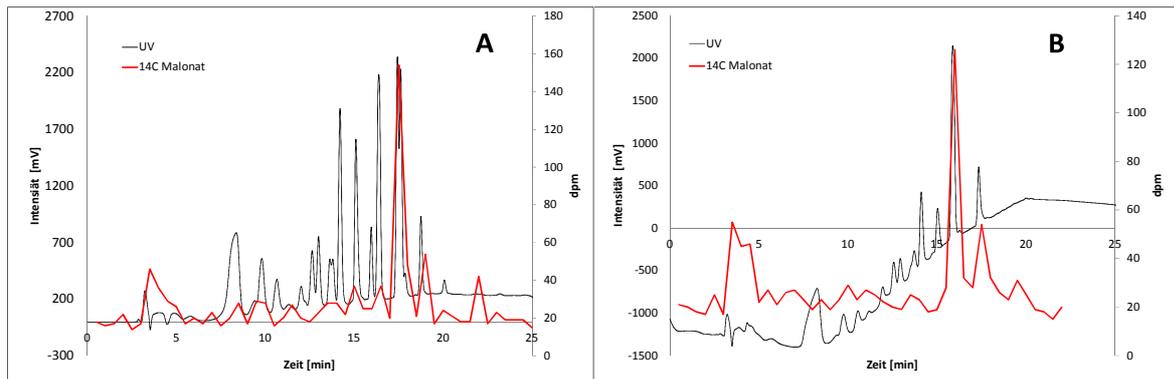
In den Proben aus den Kultur-Überständen rekombinanter Kulturen wurden im Vergleich zu den Kontrollen aus Kulturen plasmidfreier Zellen einige zusätzliche Peaks detektiert (Abbildung 38). Die zugehörigen Fraktionen wurden gesammelt und über LC-MS (ESI und APCI), GC-MS (Dr. Linne, Abteilung Massenspektrometrie, FB Chemie Philipps-Universität Marburg) und nochmals über NMR (Dr. Xi, NMR-Abteilung, Fachbereich Chemie, Phillipps-Universität Marburg) analysiert. Einer dieser Peaks wurde, durch GC-MS gezeigt, eindeutig von Indol hervorgerufen. Dieses wird von Bakterien-

zellen beispielsweise zur Steigerung der Resistenz bei Stress durch Antibiotika aus der Aminosäure Tryptophan gebildet (Lee & Lee, 2010) und hat somit wahrscheinlich nicht direkt etwas mit dem geplanten Stoffwechselweg zu tun.

Es war kein Unterschied zwischen den HPLC-Chromatogrammen der plasmidfreien *E. coli*-Proben und der Proben aus *E. coli*-Zellen mit dem Biphenylmodul erkennbar. Daher wurde das Ergebnis in einem Chromatogramm zusammengefasst (Abbildung 38D). Außerdem wurde in *S. blattae*-Zellen mit Biphenylmodul im Vergleich zur plasmidfreien Probe lediglich ein zusätzlicher Indol-Peak detektiert. Daraus lässt sich schließen, dass die rekombinanten Bakterienstämme, die nur das Biphenylmodul (pASG\_mod\_bclA-bis-benK) enthielten, ohne Malonyl-CoA Synthetase kein Biphenyl produzierten (Abbildung 38B und D).

In den HPLC-Chromatogrammen aus Kultur-Überständen, in denen beide Plasmide und damit alle Enzyme zur Biphenylsynthese produziert worden waren, wurden neben dem Peak von Indol noch einige weitere Peaks detektiert (Abbildung 38C und E). Diesen Peaks konnte jedoch keine Masse eindeutig zugeordnet werden und bei keiner dieser Proben wurden die Massensignaturen eines Biphenyl-Grundgerüsts detektiert. In der H-NMR Analyse zeigte nur die Fraktion bei 16 Minuten (Abbildung 38E) überhaupt ein Signal, alle anderen Fraktionen enthielten wahrscheinlich zu wenig Substanz. Diese Probe wurde durch Frau Dr. Xie über COSY-Analysen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass es sich zwar um eine aromatische Verbindung, jedoch nicht um ein Biphenyl handelt. Für eine genauere Identifizierung fehlten Informationen zur Masse und zur atomaren Zusammensetzung der Verbindung.

Um einen Hinweis zu bekommen, ob die zusätzlichen Peaks, die durch RP-HPLC detektiert wurden, im Zusammenhang mit dem synthetischen Stoffwechselweg zur Synthese von Biphenyl stehen, wurde das oben beschriebene Experiment mit  $^{14}\text{C}$ -markierter Malonsäure wiederholt (Material und Methoden 2.7.4) und die durch HPLC aufgetrennten Fraktionen nochmals durch Szintillationszählung untersucht.



**Abbildung 39:** HPLC-Chromatogramme (schwarz) und  $^{14}\text{C}$ -Szintillationssignal (rot). Aufgetrennte Extrakte aus Kulturüberständen. Den Kulturen wurde 1 mM Benzoesäure und 5 mM  $^{14}\text{C}$ -markierte Malonsäure zugesetzt. A: *E. coli* pASG\_mod-bclA-bis-benK pASK-IBA3C\_mcs; B: *S. blattae* pASG\_mod-bclA-bis-benK pASK-IBA3C\_mcs

Die Szintillationssignale, die durch  $^{14}\text{C}$ -markierte Malonsäure erzeugt worden waren, wurden anschließend mit dem HPLC-Chromatogramm verglichen (Abbildung 39). Die Szintillationssignale aus Proben von plasmidfreien Kulturen und von Proben aus Kulturen, die nur das Biphenylmodul (pASG\_mod\_bclA-bis-benK) enthielten, zeigten keine erhöhte Radioaktivität in den gesammelten Fraktionen (Daten nicht gezeigt). Jedoch wurde erhöhte Radioaktivität bei einer Retentionszeit von 17 Minuten detektiert, sowohl in Proben aus rekombinanten *E. coli*-Kulturen als auch in Proben aus rekombinanten *S. blattae*-Kulturen, die beide Plasmide enthielten. Dieses radioaktive Signal ist überlagert mit einem der zusätzlichen Peaks des HPLC-Chromatogramms. Dies lässt in beiden Fällen darauf schließen, dass es sich hierbei um eine Verbindung handelt, deren Synthese von Malonat abhängig ist.

Die markierte Verbindung wurde nur in den Proben detektiert, die aus Kulturen von Zellen mit beiden Plasmiden stammen. Daraus lässt sich folgern, dass diese Verbindung durch den synthetischen Stoffwechselweg erzeugt wurde. Zur Aufklärung der Identität der erzeugten Substanz sind allerdings weitere Analysen erforderlich.

### 3.4. Untersuchungen zur Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase

Die Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase wird durch die Gene *bbsA* und *bbsB* im *bbs*-Operon kodiert und katalysiert die Umsetzung von Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA zu Benzoylsuccinyl-CoA. Dies ist die erste Reaktion des reversen  $\beta$ -Oxidationswegs im geplanten Stoffwechselweg zur Synthese von (*R*)-Benzylsuccinat. Diese Thiolase aus Toluol-abbauenden Zellen von *T. aromatica* wurde bereits in einigen Master- und Doktorarbeiten biochemisch charakterisiert (Kölschbach, 2011; Lippert, 2009). In dieser Arbeit wurde erstmals versucht, die orthologe Thiolase von *G. metallireducens*, welche im *bbs*-

Operon dieses Bakteriums kodiert ist, rekombinant zu produzieren, zu reinigen und biochemisch zu charakterisieren. Insbesondere war hier eine Kristallisierung des Enzyms angestrebt (durch S. Weiden, MPI Frankfurt).

Dazu wurden die Gene *bbsA* und *bbsB* über den pEntry-Vektor in den Expressionsvektor pASG5\_mod kloniert (Material und Methoden 2.5.5.1).

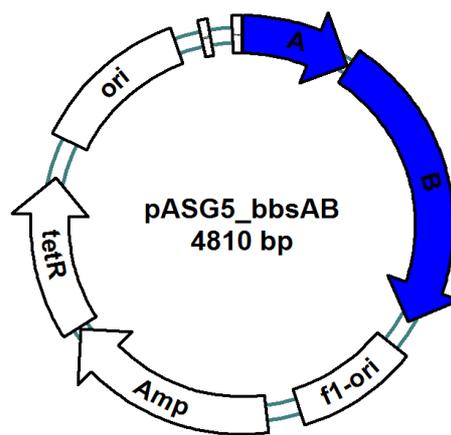


Abbildung 40: „pASG5\_bbsAB“. AHT-induzierbarer Expressionsvektor mit N-terminalem Strep-Tag an *bbsAB*.

Das erhaltene Plasmid pASG\_bbsAB (Abbildung 40) wurde, wie in Material und Methoden 2.4 beschrieben, im *E. coli*-Expressionsstamm Rosetta (DE3) pLysS in modifiziertem LB-Medium exprimiert. Nach der Reinigung durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie und Gelfiltration wurde das Protein über eine PD10-Säule auf 10 mM Tris Puffer (pH 8) mit 10 % Glycerin umgepuffert. Das Protein wurde anschließend auf einem SDS-Gel analysiert (Abbildung 41).

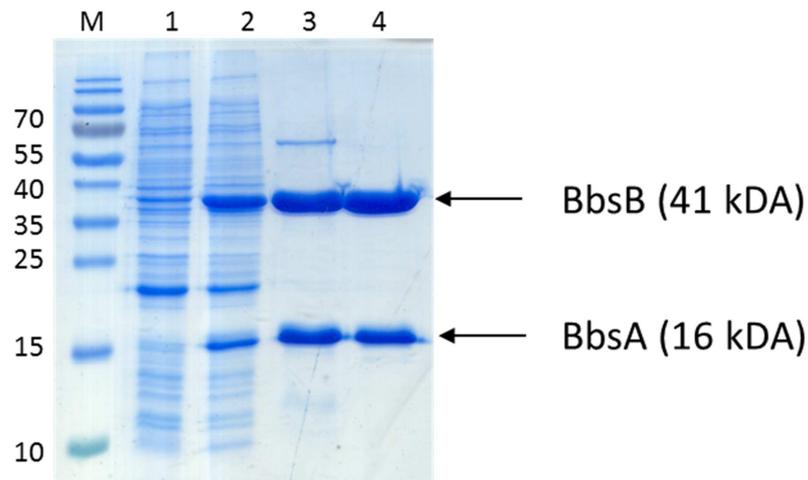


Abbildung 41: SDS-Reinigungsgel der Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase aus *E. coli* Rosetta(DE)pLysS mit pASG5\_bbsAB M: Proteinmarker; 1: Ganze Zellen von *E. coli* vor Induktion; 2: Ganze Zellen von *E. coli* nach Induktion mit 200 µl AHT (2 mg/ml); 3: Proteinfraction nach Reinigung durch Streptacin-Säule; 4: gereinigtes Protein nach Gelfiltration.

Insgesamt konnten 29 mg gereinigte Thiolase aus einer 4 l *E. coli*-Kultur gewonnen werden. Das gereinigte Enzym wurde nun für einen HPLC -basierten Enzymassay eingesetzt. Da das natürliche Substrat Benzoylsuccinyl-CoA weder kommerziell erhältlich noch leicht zu synthetisieren ist, wurden zunächst die beiden Produkte Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA chemisch synthetisiert (Material und Methoden 2.6.5) und es wurde die Rückreaktion gemessen.

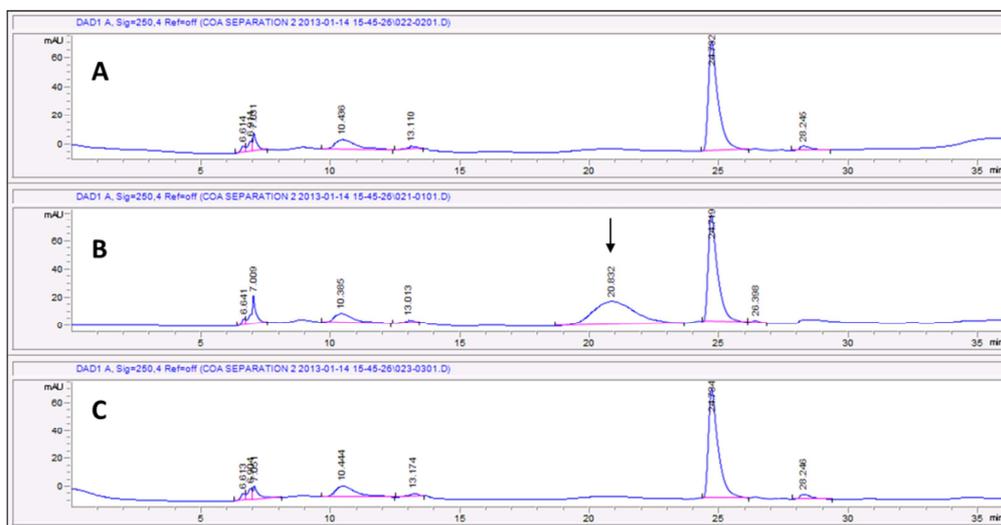


Abbildung 42: HPLC-Chromatogramme zum Nachweis der Aktivität der Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase. Enzymassay mit Succinyl-CoA (500 µM; RT 10 min) und Benzoyl-CoA (500 µM; RT 25 min) als Substrate. A: nach 0 Minuten; B: nach 10 Minuten; C: Kontrolle ohne Zugabe von Enzyme nach 10 Minuten Inkubation bei 30 °C.

Dabei sollte nach Zugabe der Substrate Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA das Reaktionsprodukt Benzoylsuccinyl-CoA entstehen. Nach 10 Minuten Inkubation mit dem Enzym wurde tatsächlich ein zusätzlicher Peak bei einer Retentionszeit von 10 Minuten im UV-Chromatogramm bei 260 nm detektiert (Abbildung 42B), bei dem es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Produkt Benzoyl-

succinyl-CoA handelt. Die Flächen der Peaks der beiden zugegebenen Substrate nahmen während der Reaktion ab (Tabelle 28). Unter Zugrundelegung der Annahme, dass die Peakflächen linear zur Konzentration der Substrate abnehmen, lassen sich die Konzentrationen der beiden Substrate nach der Reaktion durch Integration der Peaks abschätzen. Zudem wurde beobachtet, dass auch die Flächen der HPLC-Peaks der beiden Substrate in der Kontrolle abnahmen. Dies kann durch die Instabilität der CoA-Ester erklärt werden. Unter Berücksichtigung dieses spontanen Zerfalls der Substrate (nach 10 Minuten 4% bei Benzoyl-CoA und 14 % bei Succinyl-CoA) kann über die Peakflächen abgeschätzt werden, wieviel Substrat während der Reaktion verbraucht wurde. Für Succinyl-CoA ergibt sich ein Wert von 43  $\mu\text{M}$  und für Benzoyl-CoA ein Wert von 18  $\mu\text{M}$ . Da die beiden Substrate in einem Verhältnis von 1:1 in die Reaktion einfließen, können maximal 18  $\mu\text{M}$  des Produktes Benzoylsuccinyl-CoA während der Reaktion entstanden sein. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Enzymkonzentration lässt sich hieraus eine spezifische Aktivität von 15 mU/mg abschätzen.

**Tabelle 28: Flächen der Substrat- und Produktpeaks nach Auftrennung über RP-HPLC und die daraus abgeschätzten Konzentrationen. Die Substrate Succinyl-CoA und Benzoyl-CoA wurden in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  im Enzymtest eingesetzt.**

	Succinyl-CoA Peakfläche/Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Benzoyl-CoA Peakfläche/Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Benzoylsuccinyl-CoA Peakfläche
0 Minuten	435/500	2043/500	-
10 Minuten	361/414	1929/472	1923
Kontrolle	372/430	1973/482	-

**Zinkbestimmung mittels ICP-OES.** Die Aminosäuresequenz der kleinen Untereinheit der Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase BbsA enthält ein Zink-Finger-Motiv. Daher sollte das Protein Zink enthalten (Lippert 2009; Kölschbach, 2009). Aufgrund dieser Besonderheit wurde für die überproduzierte Thiolase mit einem Strep-Tag an BbsA untersucht, ob das Protein trotz des Tags gebundene Zink-Ionen enthält. Die gereinigte Thiolase BbsAB mit N-terminalem Strep-Tag wurde dazu mittels ICP-OES analysiert (Material und Methoden 2.7.1).

Es wurde ein Zinkgehalt von 0,9 Zink/BbsAB ermittelt. Das Ergebnis der ICP-OES-Analyse ist in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Ergebnis der ICP-OES-Analyse. Als Blindwert diente derselbe Puffer (100 mM Tris/HCl; pH 8; 10% Glycerin), in dem auch das Protein gelöst wurde. Die Proteinkonzentration der Probe lag bei 224,56 nmol/ml.

Element	Blindwert (ng/ml)	BbsAB (ng/ml)
Mg	32,2	57,9
V	5,3	6,4
Cr	4,5	7
Mn	1,4	3,4
Fe	36,9	735,4
Co	0,1	0,3
Ni	5,4	27,3
Zn	22,2	13560
Cu	9,1	79,3
Mo	0,8	3,7

**Kristallisation der Thiolase.** Mit der gereinigten Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase wurden anschließend in der AG von Ulrich Ermler (MPI Frankfurt) erste Kristallisationsversuche vorgenommen. Dabei wurden bereits Kristalle erhalten (Abbildung 43), die eine Auflösung von maximal 3,5 Å erzielten, was jedoch noch nicht zur Kristallstrukturaufklärung ausreicht.



Abbildung 43: Kristalle der Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase. Bedingungen: 20 % (w/v) PEG 3350, 0,1 M Bis-Tris-Propan; 200 mM Na/K-Phosphat, pH 7,5.

### 3.5. Reinigung der Succinyl-CoA: (R)-Benzylsuccinat CoA-Transferase

Die Succinyl-CoA: (R)-Benzylsuccinat CoA-Transferase wird durch die Gene *bbsE* und *bbsF* im *bbs*-Operon kodiert und katalysiert die Umsetzung von (R)-Benzylsuccinat und Succinyl-CoA zu (R)-Benzylsuccinyl-CoA. Dies ist die letzte Reaktion der reversen  $\beta$ -Oxidation im geplanten Stoffwechsel-

weg zur Synthese von (*R*)-Benzylsuccinat. Die orthologe CoA-Transferase aus *T. aromatica* wurde bereits biochemisch charakterisiert (Leutwein und Heider, 2001). In dieser Arbeit wurde erstmals versucht die CoA-Transferase von *G. metallireducens*, rekombinant zu produzieren, zu reinigen und weiter biochemisch zu charakterisieren. Besonders angestrebt ist hier eine Kristallisierung des Enzyms.

Dazu wurden die Gene *bbsE* und *bbsF* in das Plasmid pRSF-DUET kloniert (Abbildung 23B). Das erhaltene Plasmid pEF wurde wie in Material und Methoden 2.4 beschrieben im *E. coli*-Expressionsstamm Rosetta (DE3) pLysS exprimiert. Die Überproduktion des Proteins wurde durch SDS-Gel Analyse bestätigt (Abbildung 44).

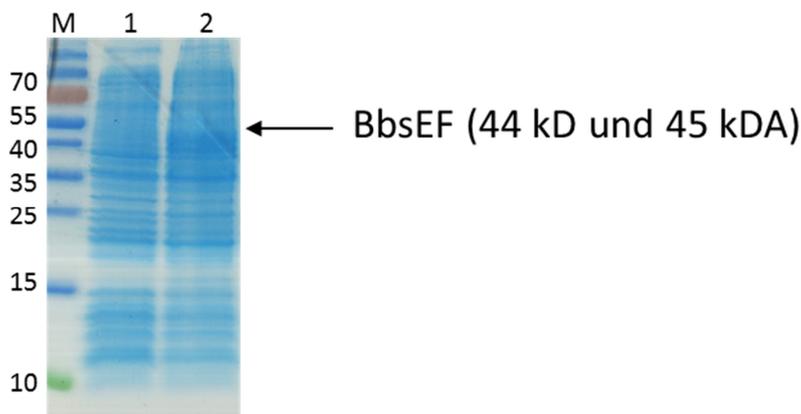


Abbildung 44: SDS-Gel der überproduzierten Succinyl-CoA: (*R*)-Benzylsuccinat-CoA-Transferase BbsEF. M: Proteinmarker; 1: Ganze Zellen von *E. coli* vor Induktion und 2: nach Induktion der Expression durch 1 mM IPTG.

Da sich das Enzym nicht mittels Affinitätschromatographie über den N-terminalen His-Tag reinigen ließ, wird derzeit eine alternative Reinigungsstrategie etabliert, die sich an Reinigungen der homolog exprimierten Transferase aus *T. aromatica* orientiert. Sobald das Protein in gereinigter Form vorliegt, können eine biochemische Charakterisierung und die Kristallisation des Proteins erfolgen.

---

## 4. Diskussion

### 4.1. Bausteine zur Synthese von Benzoyl-CoA

#### 4.1.1. Benzoataufnahme über den Benzoattransporter BenK

Der Benzoattransporter BenK aus *A. aromaticum* wurde aktiv in rekombinanten *E. coli*-Zellen produziert. Somit ist eine Aufnahme von Benzoat in die Zellen durch diesen Transporter möglich. Ähnlich wie bei Nishikawa et al. konnte gezeigt werden, dass Zellen, die das *benK*-Gen exprimieren, auf Benzoat im Medium sensitiv reagieren (Nishikawa et al., 2008).

#### 4.1.2. Benzoyl-CoA-Bildung durch Benzoat-CoA Ligase BclA oder Benzoat-CoA: Succinat CoA-Transferase

Für die Synthese von Benzoyl-CoA durch die Benzoat-CoA Ligase werden zwei Moleküle ATP pro Reaktion verbraucht, weil das Enzym ATP in AMP und Pyrophosphat spaltet. Die Succinyl-CoA: Benzoat CoA-Transferase hingegen benötigt selbst kein ATP, jedoch wird Succinyl-CoA als Substrat verwendet, was zunächst durch die Zelle unter ATP-Verbrauch bereitgestellt werden muss. Für die Synthese von Succinyl-CoA über die ADP-produzierende Succinyl-CoA Synthetase im Citratzyklus wird allerdings nur ein ATP benötigt.

Die Benzoat-CoA Ligase aus *A. aromaticum* wurde heterolog in *E. coli* produziert. Nach Reinigung durch eine UnoQ-Sepharosesäule wurde eine spezifische Aktivität von 107 U/mg gemessen. Die orthologe Benzoat-CoA Ligase aus *T. aromatica* hat eine sehr hohe Sequenzidentität von 76 % zu der hier untersuchten CoA Ligase (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). Im Vergleich dazu wurde für das Enzym aus *T. aromatica* nur eine spezifische Aktivität von 16,5 U/mg gemessen (Schühle et al., 2003). Damit liegt die spezifische Aktivität der orthologen Benzoat CoA Ligase um den Faktor 6,5 höher.

Die Aktivität der heterolog produzierten Benzoat-CoA: Succinat CoA-Transferase wurde durch einen HPLC-basierten Enzymassay nachgewiesen. Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms wurde in dieser Arbeit nur über die Fläche des Produktpeaks abgeschätzt auf mindestens 70 mU/mg. Das Enzym wurde bereits hinreichend durch Oberender und Co-Autoren charakterisiert (Oberender et al., 2012). Die spezifische Aktivität der heterolog exprimierten CoA-Transferase betrug in der Literatur 265 mU/mg. Damit liegt der geschätzte Wert nur um den Faktor 4 vom tatsächlich gemessenen Wert entfernt.

Sowohl die CoA-Ligase als auch die CoA-Transferase können rekombinant in *E. coli* zur Bildung von Benzoyl-CoA verwendet werden. Welche Reaktion energetisch günstiger ist, hängt nicht nur von den Enzymaktivitäten ab, sondern auch davon, unter welchen Wachstumsbedingungen Benzoyl-CoA produziert wird. Dies wird im Abschnitt 4.3 zusammen mit den erhaltenen Ergebnissen näher diskutiert.

#### **4.2. Biosynthetisches Modul zur Synthese von Benzoyl-CoA**

Die Funktionalität des biosynthetischen Moduls zur Synthese von Benzoyl-CoA wurde in dieser Arbeit nachgewiesen. Dieses Modul sollte in dieser Arbeit als Voraussetzung zur bakteriellen Produktion von Benzylsuccinat und Biphenyl dienen. Doch ist das Anwendungsspektrum für dieses Modul noch weitaus größer. Benzoyl-CoA wird nicht nur zur Biosynthese von manchen Polyketiden benötigt, sondern kann auch zur Herstellung von Taxol, einem Pharmazeutikum in der Krebstherapie, genutzt werden. Des Weiteren könnte durch Einbau von Benzoyl-CoA anstelle von Phenylacetyl-CoA z. B. Phenylpenicillin anstelle von Penicillin G (Benzylpenicillin) hergestellt werden. Auch in der Synthese von einigen Flavonoiden und Phenylpropanoiden, die ein weites pharmazeutisches Anwendungsspektrum bieten, wird Benzoyl-CoA als Ausgangsstoff benötigt (Moore et al., 2002). Außerdem ist Benzoyl-CoA nicht nur ein Intermediat des anaeroben Toluolabbaus, sondern kommt als Schlüsselintermediat in einer Vielzahl von anaeroben Abbauwegen aromatischer Verbindungen vor (Fuchs et al., 2011). Daher könnte Benzoyl-CoA auch als Precursor für die Synthese von weiteren Intermediaten dieser Aromaten-abhängigen Stoffwechselwege genutzt werden. Allgemein kann das Biosynthese-Modul für Benzoyl-CoA in jedem Stoffwechselweg eingesetzt werden, in dem Benzoyl-CoA als Intermediat benötigt wird.

#### **4.3. Benzylsuccinatproduktion**

Die Produktion von Benzylsuccinat kann theoretisch entweder durch Überproduktion der Benzylsuccinatsynthase (BSS) erfolgen oder durch Nutzung der Benzylsuccinat- $\beta$ -Oxidations-Enzyme in reverser Richtung. Die Benzylsuccinatsynthase ist ein sehr Sauerstoff-empfindliches Glycylradikal-Enzym, das aus drei Untereinheiten mit Eisen-Schwefel-Clustern als Kofaktoren aufgebaut ist und ein weiteres aktivierendes Enzym benötigt, um zur katalytisch aktiven Radikalform aktiviert zu werden. Bisher ist es nicht gelungen, dieses Enzym samt Aktivator rekombinant in aktiver Form zu produzieren, was vermutlich auf die Komplexität und Labilität des Enzyms zurückzuführen ist (Hilberg

et al., 2012; Lippert, 2009). Selbst wenn die heterologe Produktion durch Modifikation der Expressionsbedingungen künftig ermöglicht würde, stellen sich die Prozessbedingungen als schwer realisierbar dar. Toluol, das Substrat der Benzylsuccinatsynthase, ist nicht nur ein toxischer und nur in geringen Konzentrationen wasserlöslicher Aromat, sondern auch ein gutes organisches Lösungsmittel. So würden z. B. Fütterungsverfahren im FedBatch-Betrieb spezielle lösungsmittelbeständige Pumpensysteme erfordern. Daher wurde in dieser Arbeit die Produktion von Benzylsuccinat durch Nutzung der reversen Aktivität der *bbs*-Genprodukte eines Toluol-abbauenden Bakteriums angestrebt.

Dabei standen *bbs*-Operons aus fakultativ und obligat anaeroben Organismen zu Auswahl. Im Unterschied zu den fakultativ anaeroben denitrifizierenden Organismen *T. aromatica* und *A. aromaticum* werden die durch Oxidation von Benzylsuccinyl-CoA frei werdenden Elektronen bei den obligat anaeroben Eisen(III)- und Sulfatreduzierenden Organismen *G. metallireducens* und *D. toluolica* auf Menachinon (MK) statt auf Ubichinon (UQ) übertragen (Abbildung 45); (Lovley et al., 1993; Rabus et al., 2005). Das Redoxpotential für MK/MKH<sub>2</sub> (-80 mV) liegt dabei niedriger als das Redoxpotential von UQ/UQH<sub>2</sub> (+110 mV) (Unden & Bongaerts, 1997). Damit erscheint die Rückreaktion von Phenylitaconyl-CoA zu Benzylsuccinyl-CoA (Redoxpotential ca. 0 mV) eher möglich, wenn die Elektronen aus dem Menachinonpool bezogen werden. Der Elektronentransfer in den fakultativ anaeroben Organismen von ETF über die ETF:Quinon-Oxidoreduktase (ETF-QO) auf Ubichinon ist bereits gut untersucht und die Proteinstruktur der Oxidoreduktase bereits gelöst. Dabei weist ETF-QO eine Transmembranhelix als Membran-Anker auf und enthält ein [4Fe-4S]-Cluster und ein FAD zum Elektronentransfer zwischen ETF und dem Chinonpool (Watmough & Frerman, 2010). ETF-QO sind evolutionär sehr hoch konserviert und kommen daher sowohl in Säugetieren, Pflanzen, obligat aeroben und fakultativ anaeroben Mikroorganismen vor.

Im Gegensatz dazu ist der Elektronentransfer zwischen ETF und dem Menachinonpool in den obligat anaeroben Toluol-Abbauern noch nicht vollständig untersucht. Im *bbs*-Operon dieser Organismen sind drei zusätzliche Gene kodiert, im Unterschied zu den *bbs*-Operons aus den fakultativen Organismen (Abbildung 1). Zwei der Gene kodieren für die zwei Untereinheiten von ETF, während das dritte Gen für ein Membranprotein OrfX kodiert. *In silico* Analysen haben ergeben, dass OrfX aus *G. metallireducens* fünf oder sechs Transmembranhelices und zwei Motive für die Bindung von [4Fe-4S]-Clustern (CxxCxxCxxx) besitzt (Kölzer, 2012). Vermutlich spielt OrfX also eine wichtige Rolle bei der Energiekonservierung und ist damit ein alternatives Enzym zu ETF-QO. Vielleicht kann auch durch die Transmembran-Domäne ein elektrochemisches Potential in Form eines Ionengradienten erzeugt oder genutzt werden, je nach energetischen Erfordernissen unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen.

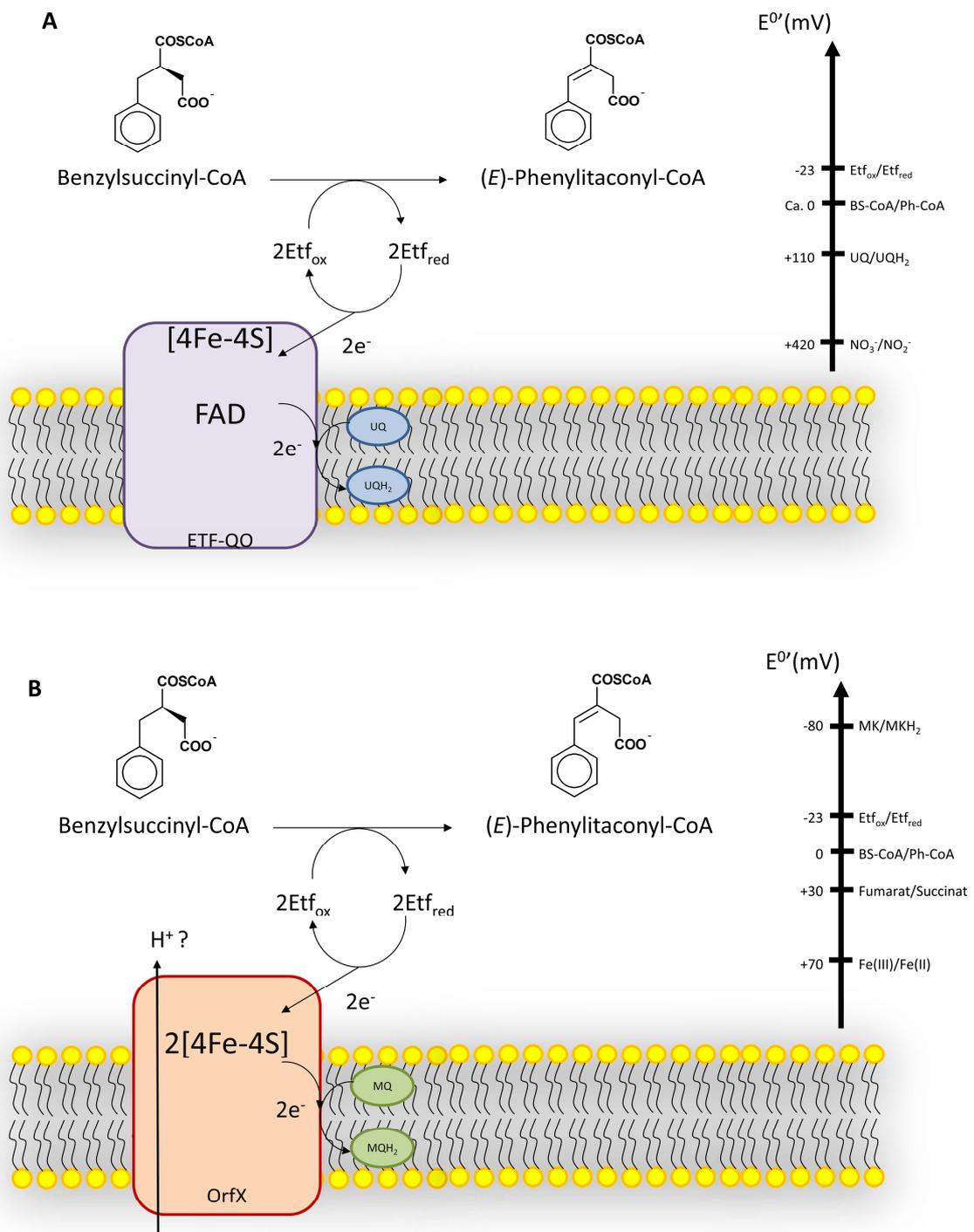


Abbildung 45: Elektronentransfer bei der Oxidation von Benzylsuccinyl-CoA. A: In fakultativ anaeroben Toluolabbauern werden die Elektronen über ETF und ETF-QO auf Ubichinon übertragen. Als terminaler Elektronenakzeptor dient Nitrat. B: In den obligat anaeroben Toluolabbauern werden die Elektronen über ETF und OrfX auf Menachinon übertragen. Als terminaler Elektronenakzeptor dient z. B. Eisen(III). Im synthetischen Stoffwechselweg in *E. coli* dient Fumarat als alternativer Elektronenakzeptor. Die Redoxpotentiale der beteiligten Komponenten wurden aus den Publikationen von ,Unden und Bongaerts' und ,Buckel und Thauer' entnommen (Buckel & Thauer, 2013; Unden & Bongaerts, 1997).

Sicher ist, dass die Elektronen auf Menachinon übertragen werden, da *G. metallireducens* neben Menachinon keine anderen Chinone bildet (Lovley et al., 1993). In *E. coli*, der in dieser Arbeit als Wirtsorganismus zur Benzylsuccinatproduktion verwendet wurde, kommen je nach Wachstumsbedingungen verschiedene Chinone in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Dabei tauscht *E. coli* seinen Chinonpool von Ubichinon bei Sauerstoffatmung auf Menachinon bei Fumatratatmung aus (Sharma et al., 2012; Uden & Bongaerts, 1997). Diese Eigenschaft wurde in dieser Arbeit als Vorteil für die Umkehrung der Reaktion von Phenylitaconyl-CoA zu Benzylsuccinyl-CoA genutzt.

Zur Produktion von Benzylsuccinat wurden die Gene des *bbs*-Operons aus *G. metallireducens* sowie die Gene *benK* und *bclA* für den Benzoattransporter bzw. die Benzoat-CoA Ligase aus *A. aromaticum* und das Gen *bct* für die Succinyl-CoA: Benzoat CoA-Transferase aus *G. metallireducens* so zusammen kloniert, dass zwei bzw. drei kompatible Plasmide erhalten wurden, die alle nötigen Gene zur Benzylsuccinatproduktion enthielten. Diese Biosynthese-Module wurden in *E. coli*-Zellen transferiert, sodass vier verschiedene Produktionsstämme erhalten wurden. Diese unterschieden sich in der Anzahl der Plasmide bzw. der Anwesenheit der Gene der Benzoat CoA Ligase oder CoA-Transferase. In einem ersten Screening unter aeroben Bedingungen in Autoinduktionsmedium konnte gezeigt werden, dass alle vier rekombinanten *E. coli*-Stämme tatsächlich fähig sind, Benzylsuccinat zu produzieren. Dabei wurden lediglich Benzylsuccinatkonzentrationen zwischen 0,3 und 1,7 nM erzielt. Die *E. coli*-Stämme mit drei Plasmiden produzierten allerdings nach Induktion mit IPTG kein Benzylsuccinat mehr. Der Grund dafür ist vermutlich, dass diese Stämme sehr milde Induktionsbedingungen benötigen, um die Bbs-Proteine korrekt zu falten und lösliche aktive Enzyme zu bilden werden. Ähnliches wurde für rekombinante Proteine aus *Geobacter* bereits in vorangegangenden Arbeiten beobachtet (Kölzer, 2012).

Da zur Produktion von Benzylsuccinat robuste und zuverlässige Stämme benötigt werden, wurde im Folgenden nur mit den rekombinanten *E. coli*-Stämmen weitergearbeitet, die die biosynthetischen Module in der Zwei-Plasmid-Version enthielten.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Benzylsuccinat-Produktion sich unterscheidet, mit Benzoat-CoA Ligase oder CoA-Transferase. Unter aeroben Bedingungen wurde eine gesteigerte Konzentration an Benzylsuccinat gemessen, wenn die CoA-Transferase anstelle der CoA Ligase verwendet wurde. Der Unterschied betrug hier den Faktor 7 und lässt sich auf den unterschiedlichen ATP-Verbrauch zurückführen. Bei der Verwendung der CoA-Transferase kann ein ATP pro Molekül Benzoyl-CoA gespart werden, da zur Synthese des Substrats Succinyl-CoA nur ein ATP benötigt wird, während bei der Transferase-Reaktion direkt kein ATP verbraucht wird. Bei der Benzoat-CoA Ligase werden im Gegensatz dazu insgesamt 2 Moleküle ATP pro gebildeten Benzoyl-CoA verbraucht.

Unter anaeroben Wachstumsbedingungen war hingegen die Benzylsuccinatproduktion bereits um den Faktor 1000 gesteigert. Maximal wurde mit *E.coli*-Zellen, die eine Benzoat-CoA Ligase besaßen, im Vollmedium eine Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  produziertem Benzylsuccinat erzielt.

Unabhängig davon, ob Vollmedium oder Minimalmedium verwendet wurde, war unter anaeroben Bedingungen die Produktion durch Zellen mit Benzoat-CoA: Succinat CoA-Transferase um den Faktor 20–30 geringer. Das bedeutet, dass dieses Enzym offenbar unter anaeroben Bedingungen Nachteile für die Benzylsuccinatproduktion bringt. Die Begründung hierfür lässt sich vielleicht in der Bereitstellung des Succinyl-CoA als Substrat der CoA-Transferase finden, welches in den *E. coli* -Zellen endogen bereitgestellt werden muss. Unter anaeroben Bedingungen wird die Aktivität der Succinyl-CoA Synthetase in *E. coli* auf ein schwaches konstitutives Level herunter reguliert (Park et al., 1997). Dadurch wird Succinyl-CoA limitierend. Würde die Succinyl-CoA Synthetase ebenfalls überproduziert, könnte die Succinyl-CoA Limitierung wahrscheinlich ausgeglichen werden.

Unter anaeroben Bedingungen wurde die Produktion um etwa das 1000-fache gesteigert. Ein Grund hierfür könnte in der Verfügbarkeit von Succinat liegen. Succinat wird unter anaeroben Bedingungen als Endprodukt der Gärung gebildet und von der Zelle nicht mehr gebraucht. Im Gegensatz dazu ist Succinat ein zentrales Intermediat im Citratzyklus, während aerober Wachstumsbedingungen (Fuchs, 2006).

Ein weiterer Grund für die gesteigerte Produktivität unter anaeroben Bedingungen könnte im Export von Benzylsuccinat durch  $\text{C}_4$ -Dicarbonsäuretransporter liegen. Die Reaktionen würden dann weiter in Richtung Benzylsuccinat-Produktion verschoben. In *E. coli* ist der Transport von  $\text{C}_4$ -Dicarbonsäuren durch Transporter reguliert, die entweder unter aeroben oder anaeroben Bedingungen aktiv sind (Janausch et al., 2002). Unter aeroben Bedingungen katalysieren Dicarboxylat-Transporter der DctA-Familie die Aufnahme von Succinat, welches für den Abbau in den TCA-Zyklus eingespeist wird.

Unter anaeroben Bedingungen hingegen entsteht Succinat als Endprodukt während der gemischten Säure-Fermentation und Fumarat fungiert als alternativer Elektronenakzeptor für eine anaerobe Atmung. Für den Transport der Dicarbonsäuren werden unter anaeroben Bedingungen Transporter der Dicarboxylat-Aufnahme-Familie benutzt, wobei hauptsächlich der Fumarat:Succinat-Antiporter (Dcu)AB und der Succinat-Efflux-Transporter DcuC bekannt sind (Janausch et al., 2002).

Eine maximale Benzylsuccinatkonzentration von  $4,8 \pm 1,6 \mu\text{M}$  wurde bei Anzucht unter Fumaratatemungs-Bedingungen erzielt. Im Unterschied zur gemischten Säuregärung kann während der Fumaratatemung mehr Energie konserviert werden, da das Fumarat aus dem Medium aufgenommen wird und nicht aus dem energiereichen Glykolyse-Intermediat Phosphoenolpyruvat gebildet werden muss (Fuchs, 2006). Das Succinat, welches als Endprodukt der Fumaratatemung entsteht, kann weiter in die Benzylsuccinatproduktion einfließen.

Möglich ist auch, dass die Produktion gesteigert wurde, da die Umkehrung der Reaktion von Phenylsuccinyl-CoA zu Benzylsuccinyl-CoA durch die Fumaratatmungsbedingungen begünstigt wurde. Denn *E. coli* lagert unter diesen Bedingungen Menachinon statt Ubichinon in seine Membran ein. Dieses besitzt ein geringeres Redoxpotential und begünstigt dadurch die Rückreaktion (Abbildung 45 B) (Unden 1997).

Eine weitere Produktionssteigerung durch Überproduktion des modifizierten mechanosensitiven Kanals MscS wurde nur unter gärenden Bedingungen beobachtet. Unter Fumarat-Atmungsbedingungen hingegen wirkte sich das MscS-Protein sogar negativ auf die Produktion aus, da hier vermutlich der Gesamtstoffwechsel durch Beeinträchtigung des Membranpotentials gestört wurde. Bisher wurde zwar die Kristallstruktur des Kanals gelöst und es wurden verschiedene Studien in Bezug auf Osmolarität durchgeführt, doch über die Substratspezifität des Exporters ist bisher wenig bekannt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch Protonen durch den Kanal aus der Zelle exkretiert werden und somit das Membranpotential, das bei der anaeroben Atmung besonders wichtig ist, teilweise zerstört wird (Becker et al., 2013; Perozo, 2006; Wang et al., 2008).

Zur weiteren Produktionssteigerung muss der rekombinante *E. coli*-Stamm weiter optimiert werden. Durch gezieltes „*Metabolic Engineering*“ unterstützt durch „*Metabolic Flux*“-Analysen konnten bereits aus verschiedenen Mikroorganismen maßgeschneiderte „Designer-Organismen“ für biotechnologische Anwendungen erzeugt werden (Lämmerhofer & Weckwerth, 2013). So wurde z.B. aus *C. glutamicum* durch nur 12 Genom-basierte Änderungen ein effizienter Lysin-Überproduzent hergestellt (Becker et al., 2011).

Für eine verbesserte Benzylsuccinatproduktion müssen zunächst die metabolischen „Flaschenhälse“ identifiziert werden, indem die Konzentrationen der Intermediate und die Enzymaktivitäten der beteiligten Enzyme bestimmt werden. Im nächsten Schritt können dann die Enzymaktivitäten verbessert werden, z.B. durch Änderung der Kopienzahl der Gene, durch Änderung ihrer Reihenfolge im rekombinanten Plasmid oder durch Änderung der Promotoren.

Eine gesteigerte Bereitstellung des wichtigen Precursors Succinat kann ebenfalls zu einer Steigerung der Produktion von Benzylsuccinat führen. Ausgehend von *E. coli* wurden bereits verschiedene Succinat-Überproduzenten erzeugt, die als Vorlage zum „*Metabolic Engineering*“ dienen können (Liu et al., 2012; Thakker et al., 2012b). Beispielsweise muss die Bildung unerwünschter Nebenprodukte wie z. B. Ethanol reduziert werden, indem gezielte Knockouts, z.B. von Alkoholdehydrogenasen im Genom durchgeführt werden. Möglich ist auch ein Wechsel des Wirtsorganismus, von *E. coli* zu einem anderen natürlichen Succinat-Produzenten, wie z. B. dem Enterobacterium *Basfia succiniciproducens* (Scholten et al., 2009).

Eine Reversion des  $\beta$ -Oxidationszyklus der Fettsäuren wurde vor kurzem als Synthesepattform für die Produktion von n-Alkoholen, Fettsäuren, 3-Hydroxy-, 3-Keto- und trans-Carbonsäuren etabliert (Dellomonaco et al., 2011). Als Precursor diente dabei Acetyl-CoA. Dieser reverse  $\beta$ -Oxidationszyklus wurde durch „*Metabolic Engineering*“ ebenfalls in *E. coli* etabliert. Dellomonaco et al. erzeugten dabei Produktionsstämme, indem sie „Initiator“- und „Terminator“-Enzyme in einem *E. coli*-Stamm überproduzierten. Dessen Regulation der  $\beta$ -Oxidation wurde so modifiziert, dass die Genprodukte der  $\beta$ -Oxidation konstitutiv produziert wurden. Doch waren hier neben der Expression von verschiedenen Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen einige Mutationen im Wirtsorganismus nötig, um die Produktion sicherzustellen.

Die Benzylsuccinatproduktion kann nicht nur durch Optimierungen auf genetischer Basis, sondern auch durch Änderung der Kultivierungsbedingungen weiter gesteigert werden. So könnte das toxisch wirkende Benzoat im FedBatch-Verfahren mit derselben Rate zugefüttert werden, mit der es verbraucht wird. Des Weiteren könnte durch Beibehaltung eines konstanten pH-Wertes die Benzylsuccinatproduktion weiter optimiert werden, da dann das Wachstum der Zellen nicht mehr durch Übersäuerung des Medium inhibiert würde.

#### 4.4. Biphenylproduktion

Biphenyle sind Phytoalexine, die in Kernobstgewächsen (*Malaioideae*) zum Schutz vor Mikroorganismen produziert werden (Liu et al., 2004). Ein Benzoyl-CoA-abhängiger synthetischer Stoffwechselweg zur Produktion von Biphenyl in *E. coli* wurde entworfen. Dazu wurden die Gene des Benzoattransporters, der Benzoat-CoA Ligase, der Biphenylsynthase und optional der Malonyl-CoA Synthetase heterolog im *E. coli*-Stamm Rosetta DE3 pLysS oder in *S. blattae* koexprimiert.

*S. blattae* wurde als zweiter Produktionsstamm ausgewählt, da dieser im Gegensatz zu *E. coli* auf Malonat als Kohlenstoffquelle wachsen kann (Priest & Barker, 2009), sodass bei Zusatz von Malonat dessen spezifische Aufnahme durch den MdclM Transporter sichergestellt ist (Suvorova et al., 2012).

*In vitro* wurden in beiden Arten sowohl die Aktivitäten der Benzoat-CoA Ligase als auch der Malonyl-CoA Synthetase und der Biphenylsynthase nachgewiesen. Die Aktivität des Benzoattransporters wurde indirekt durch Sensitivität der rekombinanten Zellen gegenüber Benzoat gezeigt.

*In vivo* wurde allerdings bisher keine Produktion von Biphenyl detektiert. Eine mögliche Ursache könnte in der Toxizität des Stoffes auf die produzierenden Bakterien liegen. Schon nach kurzzeitiger Inkubation mit 1 mM Dihydroxybiphenyl wird die Lebensfähigkeit von *E. coli*-Zellen beeinträchtigt. Die MIC von 3,5-Dihydroxybiphenyl für *E. coli*-Zellen liegt bei einer Konzentration von 1 mM im

Medium. Im Vergleich dazu liegt die MIC für das Feuerbrand-auslösende phytopathogene Enterobakterium *Erwinia amylovora* bereits bei 0,6 mM (Chizzali & Beerhues, 2012). Cámara et al. nutzten rekombinante *E. coli*-Zellen zur Transformation von 2-Chlorobiphenyl zu Dihydroxybiphenyl. Schon nach kurzer Zeit wurde dabei eine starke Abnahme von intakten Zellen und Zellyse beobachtet (Cámara et al., 2004). Wird das Biphenyl direkt in der Zelle produziert, ist eine letale Wirkung bei einer weit geringeren Konzentrationen als 1 mM anzunehmen. Aus diesem Grund ist durchaus zu erwarten, dass die Zellen die Biphenyl-Produktion herunter regulieren oder sogar ein alternatives weniger toxisches Produkt herstellen.

Extrakte aus rekombinanten Zellen von *S. blattae* und *E. coli* zeigten nach chromatographischer Auftrennung über HPLC einige zusätzliche Peaks im Vergleich zu Extrakten aus Wildtyp-Kulturüberständen. Einer dieser Peaks wurde eindeutig Indol zugeordnet. Dieser Metabolit wird von Bakterienzellen zur Steigerung der Resistenz bei Stress durch Antibiotika gebildet (Jermy, 2012; Lee & Lee, 2010) und hat wahrscheinlich nicht direkt etwas mit dem geplanten Stoffwechselweg zu tun. Indol fungiert dabei als Signal-Molekül und führt zur Ausbildung von ruhenden Zellen („*bacterial persisters*“), die eine unspezifische Toleranz bei Antibiotikabehandlung zeigen. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um zu klären, ob die Synthese von Indol durch die antimikrobielle Aktivität von Biphenyl induziert wird. Damit wäre die Indolproduktion der Zellen ein Indiz für die Synthese von Biphenyl und somit auch für die Funktionalität des synthetischen Stoffwechselwegs. Interessant ist, dass *S. blattae* zwar als Indol-negativ charakterisiert wurde, aber während der Expression des Plasmides pASG\_mod\_bclA-BIS-benK trotzdem Indol produziert wurde (Burgess et al., 1973a). Daher ist anzunehmen, dass *S. blattae* – genau wie *E. coli* – auch ein Gen, kodierend für die Tryptophanase TnaA, besitzt welche Tryptophan zu Indol umsetzt. Dieses Gen wird aber vermutlich anders reguliert als in *E. coli*. Genomanalysen konnten diesbezüglich noch nicht stattfinden, da ein Zugriff auf das Genom von *S. blattae* bisher nicht möglich ist.

Die weiteren Verbindungen, die in den rekombinanten Zellen gebildet wurden, konnten bisher nicht identifiziert werden. Jedoch wurde durch Inkubation der rekombinanten Zellen mit <sup>14</sup>C-Malonat gezeigt, dass einer der zusätzlichen HPLC-Peaks bei einer Retentionszeit von 17 Minuten einer Verbindung zugeordnet werden kann, deren Synthese Malonat-abhängig ist. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Zellen das Biphenyl durch Modifikation detoxifizieren. Ein solches modifiziertes Biphenyl ist jedoch schwer zu identifizieren, da eine nicht zielgerichtete Massenanalyse sehr aufwändig ist. Zudem wurde bei der LC-MS-Analyse der Malonat-abhängig gebildeten Verbindung bisher überhaupt kein Massenpeak detektiert, was bedeutet, dass eine andere Ionisierungstechnik erforderlich ist. Auch die NMR-Analyse brachte keine hinreichenden Ergebnisse, da eine Struktur-

aufklärung durch NMR nur mit Wissen über das Molekulargewicht und die atomaren Bestandteile möglich ist. Aus diesem Grund konnte diese Verbindung bisher nicht identifiziert werden.

LC-MS ist zwar eine der am weitesten verbreiteten Methoden in der Bioanalytik, doch hat die Methode Grenzen, die es zu beachten und gegebenenfalls durch geschickte Analysemethoden zu überwinden gilt (Lämmerhofer & Weckwerth, 2013). LC-MS-Analysen bieten zwar viele Einstellmöglichkeiten, wie die Wahl der mobilen und der stationären Phase während des Chromatographie oder die Wahl der Ionisierungsmethode (ESI, EI, APCI, ect.), doch bei der Analyse von unbekanntem Stoffen erhöht sich dadurch auch der Messaufwand bis die „richtige“ Methode etabliert ist. Außerdem werden leicht Substanzen übersehen, weil sie entweder mit anderen Stoffen ko-eluieren und es dadurch zu einer Matrix-abhängigen Signalsuppression kommt, sie nur in geringer Zahl vorkommen oder weil sie eine schlechte Ionisierungseffizienz haben und somit nicht detektiert oder „übersehen“ werden. Zudem kann nicht jede detektierte Masse eindeutig einer Verbindung zugeordnet werden. So gibt es zwar Datenbanken zur Bestimmung von Substanzen (z.B. Metlin), doch diese enthalten längst nicht alle bekannten Verbindungen (Smith et al., 2005).

So ist es unabdingbar, verschiedene Analysemethoden wie LC-MS, GC-MS und NMR in Kombination einzusetzen. NMR-Analysen bieten verschiedene Werkzeuge zur Identifizierung von Stoffen (*J*-resolved NMR, COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ), HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). Diese Analysen sind zwar nicht destruktiv, doch ist die Sensitivität der Analysemethoden sehr gering. Daher werden im Vergleich zu MS-Methoden relativ große Substanz-Mengen benötigt. Werden Substanzen nicht direkt durch GC-MS-Analysen detektiert, sind oft aufwändige Derivatisierungen nötig, was sich wiederum in einem hohen Messaufwand niederschlägt (Lämmerhofer & Weckwerth, 2013).

Zur Identifizierung der unbekanntem Peaks, die in den Versuchen zur Biphenylproduktion beobachtet worden waren (Abbildung 38), wurden zwar bereits LC-MS, GC-MS und NMR Analysen kombiniert, doch konnten die Substanzen bisher nicht identifiziert werden. Daher sind noch einige aufwändigere Analysen notwendig, um die Struktur der synthetisierten Verbindungen aufzuklären.

Vom synthetischen Stoffwechselweg zur Synthese von Biphenyl wurde ein mathematisches Modell erstellt (AG Kostina, FB Mathematik und Informatik, Philipps-Universität Marburg). Dieses mathematische Modell ist zwar in sich funktionell, doch fehlten bisher faktisch gemessene Daten, wie z. B. die Benzoat-Aufnahmerate oder die Konzentrationen der Intermediate Malonyl-CoA und Benzoyl-CoA in den Zellen. Ohne eine Anpassung des Modells durch Einspeisen von realen Daten können bisher keine Vorhersagen über den Stoffwechselweg getroffen werden.

Zwar sind diese mathematischen Modelle begrenzt, da sie nur die biologischen Störungen erkennen (z. B. Toxizitäts-bedingte Produktionsgrenzen), die zuvor programmiert wurden. Doch können diese mathematischen Modelle später genutzt werden, um metabolische Flaschenhälse zu identifizieren

und somit mögliche Optimierungspunkte aufzuzeigen. Ein ähnliches mathematisches Modell kann auch für den synthetischen Stoffwechselweg zur Synthese von Benzylsuccinat erstellt werden. Dieser Stoffwechselweg ist bereits funktionell und Daten über die Konzentrationen der Intermediate können leicht generiert werden. Damit kann in diesem Fall ein mathematisches Modell bei der Optimierung der Produktion hilfreich sein.

#### **4.5. Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase**

Die Genprodukte BbsA und BbsB, welche im *bbs*-Operon von *G. metallireducens* kodiert sind, zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit von 70 bzw. 73% zur Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase aus *T. aromatica*., welche bereits biochemisch charakterisiert wurde (Hermuth, 2002; Kölschbach, 2011; Leuthner & Heider, 2000; Lippert, 2009).

## A

```

Geobacter      MAKEEVKQKKTKEKEPDITFFHPDILEVPKDGGLPYLKGYRCKKCGQLDF-KTEMCTNW 59
Thauera        MS--EQKPNKKPEKKPDITFFHPDLLEAPADGRAPYLKGYRCKKCGQLDFPKLSPCPCW 58
                *: * * :*. **:*****:*** * * *****:***** * . . . *

Geobacter      SEEFEMVPLSRRGKVYSFSDIYIGQQGLATPYIFAYVDLPENLRVFAQLEGEVDTYRCE 119
Thauera        GEEFEVPLSRRGKLYSFSDFNFIGQAGMKT PYSFGYIDL PENLRIFAQLEGAPGSFRCDD 118
                .****:*****:***** :*** *: *** *.:*****:***** .:****:

Geobacter      EVELTLGPIRMNNDNLPIISYKFKKIA 146
Thauera        EVELTVGTVRDNRDGVPLISYKFRKI- 144
                *****:*.:* *.*.:*:*****:**

```

## B

```

Geobacter      MKLQREVYIAGVGETKFGKHTVDFDVLGREAALQAMNGSNIDRPDMIQSAYVGNGMNDMT 60
Thauera        MKLERKVYIAGVGETKFGRHEVDFDVLGRAAALEALKASNIDRPTMVQSAYVGNGTNGMV 60
                ***:*.*****:*. ***** ***:*.***** *:***** *.*,

Geobacter      TGQAVFRGLGMCGNLPIINVQSACSAGAMAVFCAIKDVAITGVTDLSIGVGTENHTMHRQ 120
Thauera        TGQTVLKDLGMCG-HLPIINVESACSAGGMAIHLAVRDVALGLADVAIGIGCENHTLHMA 119
                ***:*.***** :*****:***.***. . :*** *:***:*. *****:

Geobacter      SGAAFSAARSDIETMHGAVMTGKYAMRATRYMHETGATIEDLAMITVKNRKHATHNPYAW 180
Thauera        QGTAFATAMSDIETVHGAVMTGKYAMRAQRYMYETGATAEDLAMITVKNRRHATNNPYAW 179
                .*:***:*. *****:***** ***** ***:*****:*****:*****

Geobacter      FKGAITVEEVNSRMVAYPMTLQCCGIADGAAAVVVGSKEMMKLGIAKPVKVAGVVVE 240
Thauera        FKGEISIEEVNSRVVASPLTLQCCGIADGAGAVVVCSEEMVKLGIKPIRVAGSVVR 239
                *** *:***:*****:*. *****:*****.***** *:***:***** *:*** **

Geobacter      SGPYHNRPRDITGDDITETTSEKLYEESGIGPKEVNILELHDAFTIAELLYECMGLCKK 300
Thauera        SGPYHNRPRDITGDDITEETAHQLYEESGIGPEDVNIVELHDAFTIAELLYECLGLCPK 299
                *****:***** *:*.*****:***:*****:*****:*****:*** *

Geobacter      GDGLKFLRDGQSTYGGQCVVSPRGLLSYGHPIGASGAAQIAQNVKQLRGECGGYQVGPT 360
Thauera        GEGLKFLRDGNATHGGKCVVSPRGMLSYGHPIGASGAAQIAASVKQMRNQCPGYQVEPV 359
                *:*****:*.***:*****:***:***** ***** .***:*.:* ***** *.

Geobacter      PKVAMSHVTGGGLSGTEHAACTMHMLVKGW 390
Thauera        PRVAMTHVTGGGCR---ARNTRHARCTW 385
                *:***:***** * * * . *

```

Abbildung 46: Aminosäuresequenzvergleich der Proteine BbsA und BbsB aus *Geobacter metallireducens* mit den orthologen Proteinen aus *Thauera aromatica* K12. A. Sequenzvergleich der kleinen Untereinheit BbsA. Grün markiert wurde das Zinkfinger-Motiv. Für BbsA wurde eine Sequenzähnlichkeit von 70 % ermittelt. B. Sequenzvergleich der großen Untereinheit BbsB. Rot markiert wurde das konservierte Cystein der N-terminalen Domäne und ein C-terminal gelegenes konserviertes Histidin, welches in allen gut untersuchten Thiolasen zu finden ist. Für BbsB wurde eine Sequenzähnlichkeit von 73 % ermittelt. Die Alignments wurden mithilfe des Programmes „ClustalW2“ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) erstellt.

Interessant an diesem Enzym ist, dass in der Sequenz von BbsB nur eines von zwei Cysteinen (Cys85) enthalten ist, die bei anderen Thiolasen üblicherweise zusammen mit einem Histidin konserviert sind und bei der katalytischen Reaktion eine wichtige Rolle spielen (Mathieu et al., 1997).

Des Weiteren kodiert *bbsA* für ein hypothetisches Protein unbekannter Funktion mit einer konservierten Sequenzdomäne („DUF35“ für „domain of unknown function“). Zumeist liegen Gene für diese „DUF35“-Proteine in unmittelbarer Nähe zu einem Thiolase-Gen. *BbsA* weist in seiner Aminosäuresequenz ein Zinkfinger-Motiv auf und wurde auch bereits als Zink-haltiges Protein identifiziert (Kölschbach, 2011; Lippert, 2009).

Die Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase aus *G. metallireducens* wurde heterolog in *E. coli* produziert und gereinigt. Der Zinkgehalt von einem  $Zn^{2+}$ /BbsA Monomer wurde durch ICP-OES bestätigt und die katalytische Aktivität des Enzyms durch einen HPLC-basierten Enzymassay nachgewiesen. Die spezifische Aktivität wurde auf 15 mU/mg abgeschätzt. Diese geschätzte Aktivität ist ca. um den Faktor 500 kleiner als die in der Literatur angegebene spezifische Aktivität der nativ gereinigten Thiolase aus *T. aromatica*, die 8 U/mg beträgt (Lippert, 2009). Daher muss von großen Fehlern während der Abschätzung ausgegangen werden. Soll die spezifische Aktivität genauer bestimmt werden, muss der Enzymtest wiederholt und der Produktpeak quantifiziert werden.

Ein Reaktionsmechanismus für die Thiolase wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten postuliert (Kölschbach, 2011; Lippert, 2009). Momentan wird das Protein zur Strukturaufklärung kristallisiert, sodass der Reaktionsmechanismus der Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase weiter aufgeklärt werden kann.

#### 4.6. Struktur der Succinyl-CoA: (R)-Benzylsuccinat CoA-Transferase

In dieser Arbeit wurde versucht, die Succinyl-CoA: (R)-Benzylsuccinat CoA-Transferase *BbsEF* aus *G. metallireducens* heterolog in *E. coli* zu produzieren und über einen N-terminalen His-Tag mittels Affinitätschromatographie zu reinigen. Da das Enzym nicht an der Ni-NTA Säule band, lässt sich vermuten, dass der His-Tag am N-Terminus in das Innere der Proteinstruktur hinein ragt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Ergebnissen bisher gelöster Proteinstrukturen der Klasse III CoA-Transferase Enzymfamilie. Die meisten bisher gefundenen Enzyme dieser Familie haben ähnliche Massen und sind als Homo- oder Heterodimere aktiv. Die Proteinkristallstrukturen der Formyl-CoA Transferase aus *Oxalobacter formigenes* (AAC45298) und der Crotonobetainyl-CoA: Carnitine CoA-Transferase aus *E. coli* (CAA52112) wurden bereits gelöst. In beiden Fällen wurde gezeigt, dass die Monomere je eine Ringstruktur ausbilden, die sich mit dem zweiten Monomer zu einer Kette verbindet (Berthold et al., 2008; Jonsson et al., 2004; Rangarajan et al., 2005). Die Succinyl-CoA: (R)-Benzylsuccinat CoA-Transferase aus *T. aromatica* wurde als Heterodimer mit  $\alpha_2\beta_2$ -Komposition charakterisiert (Leutwein & Heider, 2001). Damit ist anzunehmen, dass das Protein eine Kristallstruktur aus vier ineinander verketteten Ringen ausbildet. Ebenfalls zur Klasse III Enzymfamilie

---

gehörig ist die Succinyl-CoA: L-Malat CoA Transferase aus *Chloroflexus aurantiacus*, die einen großen  $(\alpha\beta)_n$ -Komplex ausbildet (Friedmann et al., 2006). Die Aminosäuresequenzen der beiden Untereinheiten SmtA und SmtB weisen dabei eine sehr hohe Sequenz-Identität und Ähnlichkeit zu BbsF auf (30 % und 46 %). Der höhere Oligomer-Status dieses Enzyms soll dabei zu einer verbesserten strukturellen Stabilität des Enzyms beitragen. Eine ähnliche strukturbedingte Funktion ist daher auch für das Heterodimer BbsEF anzunehmen.

---

## Literatur

Aklujkar M, Krushkal J, DiBartolo G, Lapidus A, Land M, Lovley D (2009) The genome sequence of *Geobacter metallireducens*: features of metabolism, physiology and regulation common and dissimilar to *Geobacter sulfurreducens*. *BMC microbiology* **9**: 109

Anders H, Kaetzke A, Kämpfer P, Ludwig W, Fuchs G (1995) Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 327-333

Bains J, Boulanger M (2007) Biochemical and structural characterization of the paralogous benzoate CoA ligases from *Burkholderia xenovorans* LB400: defining the entry point into the novel benzoate oxidation (box) pathway. *Journal of Molecular Biology* **373**: 965-977

Bechthold I, Bretz K, Kabasci S, Kopitzky R, Springer A (2008) Succinic Acid: A New Platform Chemical for Biobased Polymers from Renewable Resources. *Chemical Engineering & Technology* **31**

Becker J, Zelder O, Häfner S, Schröder H, Wittmann C (2011) From zero to hero--design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metabolic engineering* **13**: 159-168

Becker M, Börngen K, Nomura T, Battle AR, Marin K, Martinac B, Krämer R (2013) Glutamate efflux mediated by *Corynebacterium glutamicum* MscCG, *Escherichia coli* MscS, and their derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1828**

Beller H, Spormann A, Sharma P, Cole J, Reinhard M (1996) Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 1188-1196

Berry A (1996) Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends in biotechnology* **14**: 250-256

Berthold C, Toyota C, Richards N, Lindqvist Y (2008) Reinvestigation of the catalytic mechanism of formyl-CoA transferase, a class III CoA-transferase. *The Journal of biological chemistry* **283**: 6519-6529

Boll M (2005) Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. *Biochimica et biophysica acta* **1707**: 34-50

Boll M, Fuchs G (1995) Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *European journal of biochemistry / FEBS* **234**: 921-933

Boll M, Fuchs G, Meier C, Trautwein A, Lowe D (2000) EPR and Mössbauer studies of benzoyl-CoA reductase. *The Journal of biological chemistry* **275**: 31857-31868

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254

Bright TV, Dalton F, Elder VL, Murphy CD, O'Connor NK, Sandford G (2013) A convenient chemical-microbial method for developing fluorinated pharmaceuticals. *Organic & Biomolecular Chemistry* **11**

Buckel W, Thauer R (2013) Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na(+) translocating ferredoxin oxidation. *Biochimica et biophysica acta* **1827**: 94-113

Burgess N, McDermott S, Whiting J (1973a) Aerobic bacteria occurring in the hind-gut of the cockroach, *Blatta orientalis*. *The Journal of hygiene* **71**: 1-7

Burgess N, McDermott S, Whiting J (1973b) Aerobic bacteria occurring in the hind-gut of the cockroach, *Blatta orientalis*. *J Hyg, Camb* **71**: 1-7

Burkovski A, Krämer R (2002) Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**: 265-274

Cámara B, Herrera C, González M, Couve E, Hofer B, Seeger M (2004) From PCBs to highly toxic metabolites by the biphenyl pathway. *Environmental Microbiology* **6**: 842-850

Chanprateep S (2010) Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of bioscience and bioengineering* **110**: 621-632

Chizzali C, Beerhues L (2012) Phytoalexins of the Pyrinae: Biphenyls and dibenzofurans. *Beilstein journal of organic chemistry* **8**: 613-620

Chizzali C, Khalil M, Beuerle T, Schuehly W, Richter K, Flachowsky H, Peil A, Hanke M-V, Liu B, Beerhues L (2012) Formation of biphenyl and dibenzofuran phytoalexins in the transition zones of fire blight-infected stems of *Malus domestica* cv. 'Holsteiner Cox' and *Pyrus communis* cv. 'Conference'. *Phytochemistry* **77**: 179-185

Collier L, Nichols N, Neidle E (1997) benK encodes a hydrophobic permease-like protein involved in benzoate degradation by *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Journal of bacteriology* **179**: 5943-5946

Crosby H, Rank K, Rayment I, Escalante-Semerena J (2012) Structure-guided expansion of the substrate range of methylmalonyl coenzyme A synthetase (MatB) of *Rhodospseudomonas palustris*. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 6619-6629

Dellomonaco C, Clomburg J, Miller E, Gonzalez R (2011) Engineered reversal of the  $\beta$ -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals. *Nature* **476**: 355-359

- Djordjevic I, Zelder O, Buckel W (2011) Production of glutamic acid in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 320-322
- Dodds D, Gross R (2007) Chemistry. Chemicals from biomass. *Science (New York, NY)* **318**: 1250-1251
- Dolfing J, Zeyer J, Bindereicher P, Schwarzenbach R (1990) Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular-oxygen. *Arch Microbiol* **154**: 336-341
- Doroshenko V, Airich L, Vitushkina M, Kolokolova A, Livshits V, Mashko S (2007) YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids. *FEMS Microbiology Letters* **275**: 312-318
- Farrell A, Plevin R, Turner B, Jones A, O'Hare M, Kammen D (2006) Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science (New York, NY)* **311**: 506-508
- Feil C (2006) Biochemie des anaeroben Toluol-Stoffwechsels von *Thauera aromatica*. *Dokorarbeit*
- Ferrer J, Jez J, Bowman M, Dixon R, Noel J (1999) Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature structural biology* **6**: 775-784
- Friedmann S, Alber B, Fuchs G (2006) Properties of succinyl-coenzyme A:D-citramalate coenzyme A transferase and its role in the autotrophic 3-hydroxypropionate cycle of *Chloroflexus aurantiacus*. *Journal of bacteriology* **188**: 6460-6468
- Fuchs G (2006) *Allgemeine Mikrobiologie*: Thieme Verlag KG.
- Fuchs G, Boll M, Heider J (2011) Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nature reviews Microbiology* **9**: 803-816
- Geissler J, Harwood C, Gibson J (1988) Purification and properties of benzoate-coenzyme A ligase, a *Rhodospseudomonas palustris* enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. *Journal of bacteriology*
- Go M, Chow J, Cheung V, Lim Y, Yew W (2012) Establishing a toolkit for precursor-directed polyketide biosynthesis: exploring substrate promiscuities of acid-CoA ligases. *Biochemistry* **51**: 4568-4579
- Gosset G (2009) Production of aromatic compounds in bacteria. *Current opinion in biotechnology* **20**: 651-658
- Guo B, Xu J (2010) Poly(butylene succinate) and its copolymers: research, development and industrialization. *Biotechnol J* **5**: 1149-1163
- Harwood CS, Burchhardt G, Herrmann H, Fuchs G (1998) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS microbiology reviews* **22**

- Hazelwood L, Tai S, Boer V, de Winde J, Pronk J, Daran J (2006) A new physiological role for Pdr12p in *Saccharomyces cerevisiae*: export of aromatic and branched-chain organic acids produced in amino acid catabolism. *FEMS yeast research* **6**: 937-945
- Heider J (2001) A new family of CoA-transferases. *FEBS letters* **509**: 345-349
- Hermann T (2003) Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of biotechnology* **104**: 155-172
- Hermuth K (2002) Untersuchungen zum anaeroben Abbau von Kohlenwasserstoffen in denitrifizierenden Bakterien., Doktorarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- Hilberg M, Pierik A, Bill E, Friedrich T, Lippert M-L, Heider J (2012) Identification of FeS clusters in the glycyl-radical enzyme benzylsuccinate synthase via EPR and Mössbauer spectroscopy. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **17**: 49-56
- Igarashi Y, Ukita T, Inoue H, Ishiguro J, Ogawa S, Satou M, Maetani I, Sakai Y (1999) Clinical evaluation of the peroral cholangioscopy using a new videoscope. *Diagnostic and therapeutic endoscopy* **5**: 231-237
- Janausch I, Zientz E, Tran Q, Kröger A, Uden G (2002) C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochimica et biophysica acta* **1553**: 39-56
- Jermy A (2012) Bacterial physiology: From indolence to persistence. *Nature reviews Microbiology* **10**: 310-311
- Jimenez A, Santos MA, Pompejus M, Revuelta JL (2005) Metabolic Engineering of the Purine Pathway for Riboflavin Production in *Ashbya gossypii*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**
- Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, Payette JN, Wang J, Bouchez LC, Meeusen S, Althage A, Cho CY, Wu X, Schultz PG (2012) A Stem Cell-Based Approach to Cartilage Repair. *Science* **336**
- Jonsson S, Ricagno S, Lindqvist Y, Richards N (2004) Kinetic and mechanistic characterization of the formyl-CoA transferase from *Oxalobacter formigenes*. *The Journal of biological chemistry* **279**: 36003-36012
- Jung Y, Lee S (2011) Efficient production of polylactic acid and its copolymers by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology* **151**: 94-101
- Kawaguchi K, Shinoda Y, Yurimoto H, Sakai Y, Kato N (2006) Purification and characterization of benzoate-CoA ligase from *Magnetospirillum* sp. strain TS-6 capable of aerobic and anaerobic degradation of aromatic compounds. *FEMS Microbiology Letters* **257**: 208-213
- Kim Y, Kang S (1994) Steady-state kinetics of malonyl-CoA synthetase from *Bradyrhizobium japonicum* and evidence for malonyl-AMP formation in the reaction. *Biochemical Journal*

- 
- Kölschbach J (2011) Untersuchung eines potentiell neuen Stickstofffixierungsweges in *Paracoccus denitrificans* und Biochemie der Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase., Masterarbeit,
- Kölzer S (2012) Untersuchungen zum anaeroben Toluol-Stoffwechsel in fakultativ und obligat anaeroben Bakterien. *Dokorarbeit*
- Kovach M, Elzer P, Hill D, Robertson G, Farris M, Roop R, Peterson K (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176
- Krebs H, Wiggins D, Stubbs M, Sols... A (1983) Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemical ...*
- Kube M, Heider J, Amann J, Hufnagel P, Kühner S, Beck A, Reinhardt R, Rabus R (2004) Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Archives of Microbiology* **181**: 182-194
- Kung J, Löffler C, Dörner K, Heintz D, Gallien S, Van Dorsseleer A, Friedrich T, Boll M (2009) Identification and characterization of the tungsten-containing class of benzoyl-coenzyme A reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 17687-17692
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**
- Lämmerhofer M, Weckwerth W (2013) *Metabolomics in Practice*: Wiley-VCH.
- Lee J-H, Lee J (2010) Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS microbiology reviews* **34**: 426-444
- Lee J, Kim H, Choi S, Yi J, Lee S (2011) Microbial production of building block chemicals and polymers. *Current opinion in biotechnology* **22**: 758-767
- Leuthner B, Heider J (1998) A two-component system involved in regulation of anaerobic toluene metabolism in *Thauera aromatica*. *FEMS Microbiology Letters* **166**: 35-41
- Leuthner B, Heider J (2000) Anaerobic Toluene Catabolism of *Thauera aromatica*: the bbs Operon Codes for Enzymes of beta Oxidation of the Intermediate Benzylsuccinate. *Journal of bacteriology* **182**
- Leutwein C, Heider J (1999) Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: activation and beta-oxidation of the first intermediate, (R)-(+)-benzylsuccinate. *Microbiology (Reading, England)* **145 ( Pt 11)**: 3265-3271

- Leutwein C, Heider J (2001) Succinyl-CoA:(R)-benzylsuccinate CoA-transferase: an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. *Journal of bacteriology* **183**: 4288-4295
- Lippert M-L (2009) Biochemie von Enzymen des anaeroben Stoffwechsels von Toluol in *Thauera aromatica*., Doktorarbeit, Technische Universität, Darmstadt
- Liu B, Beuerle T, Klundt T, Beerhues L (2004) Biphenyl synthase from yeast-extract-treated cell cultures of *Sorbus aucuparia*. *Planta* **218**: 492-496
- Liu B, Raeth T, Beuerle T, Beerhues L (2007) Biphenyl synthase, a novel type III polyketide synthase. *Planta* **225**: 1495-1503
- Liu R, Liang L, Cao W, Wu M, Chen K, Ma J, Jiang M, Wei P, Ouyang P (2012) Succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli* using sugarcane bagasse hydrolysate as the carbon source. *Bioresource Technology*
- López Barragán M, Carmona M, Zamorro M, Thiele B, Boll M, Fuchs G, García J, Díaz E (2004) The *bzd* gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB. *Journal of bacteriology* **186**: 5762-5774
- Lovley D, Giovannoni S, White D, Champine J, Phillips E, Gorby Y, Goodwin S (1993) *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives of Microbiology* **159**: 336-344
- Lovley D, Lonergan D (1990) Anaerobic Oxidation of Toluene, Phenol, and p-Cresol by the Dissimilatory Iron-Reducing Organism, GS-15. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1858-1864
- Mathieu M, Modis Y, Zeelen J, Engel C, Abagyan R, Ahlberg A, Rasmussen B, Lamzin V, Kunau W, Wierenga R (1997) The 1.8 Å crystal structure of the dimeric peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*: implications for substrate binding and reaction mechanism. *Journal of Molecular Biology* **273**: 714-728
- Miller S, Bartlett W, Chandrasekaran S, Simpson S, Edwards M, Booth I (2003) Domain organization of the MscS mechanosensitive channel of *Escherichia coli*. *The EMBO journal* **22**: 36-46
- Moore B, Hertweck C, Hopke J, Izumikawa M, Kalaitzis J, Nilsen G, O'Hare T, Piel J, Shipley P, Xiang L, Austin M, Noel J (2002) Plant-like biosynthetic pathways in bacteria: from benzoic acid to chalcone. *Journal of natural products* **65**: 1956-1962
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. a, H. E (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *CSH Symposia*: Pages 263-273
- Murray M, Thompson W (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research* **8**: 4321-4325

- Nakamura J, Hirano S, Ito H, Wachi M (2007) Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 4491-4498
- Neuwald A, Aravind L, Spouge J, Koonin E (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome research* **9**: 27-43
- Nishikawa Y, Yasumi Y, Noguchi S, Sakamoto H, Nikawa J-i (2008) Functional Analyses of *Pseudomonas putida* Benzoate Transporters Expressed in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **72**
- Oberender J, Kung J, Seifert J, von Bergen M, Boll M (2012) Identification and characterization of a succinyl-coenzyme A (CoA):benzoate CoA transferase in *Geobacter metallireducens*. *Journal of bacteriology* **194**: 2501-2508
- Palmer A, Ellis P, Wolfenden R (1982) Extreme state of ionization of benzy succinate bound by carboxypeptidase A. *Biochemistry* **21**: 5056-5059
- Park S, Chao G, Gunsalus R (1997) Aerobic regulation of the *sucABCD* genes of *Escherichia coli*, which encode alpha-ketoglutarate dehydrogenase and succinyl coenzyme A synthetase: roles of ArcA, Fnr, and the upstream *sdhCDAB* promoter. *Journal of bacteriology* **179**: 4138-4142
- Park SR (2011) Enhanced Flavonoid Production in *Streptomyces venezuelae* via Metabolic Engineering. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**
- Perozo E (2006) Gating prokaryotic mechanosensitive channels. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**: 109-119
- Peters F, Rother M, Boll M (2004) Selenocysteine-Containing Proteins in Anaerobic Benzoate Metabolism of *Desulfococcus multivorans*. *Journal of bacteriology* **186**
- Priest FG, Barker M (2009) Gram-negative bacteria associated with brewery yeasts: reclassification of *Obesumbacterium proteus* biogroup 2 as *Shimwellia pseudoproteus* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Escherichia blattae* to *Shimwellia blattae* comb. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* **60**
- Rabus R, Kube M, Heider J, Beck A, Heitmann K, Widdel F, Reinhardt R (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Archives of Microbiology* **183**: 27-36
- Rabus R, Widdel F (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology* **163**: 96-103
- Rainey FA, Kelly DP, Stakebrandt E, Jutta B~rghardtA kiHh, ~o ko Katayama5a nd Ann P. Wood6 (1999) A re-evaluation of the taxonomy of *Paracoccus denitrificans* and a proposal for the combination *Paracoccus pantotrophus* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 645-651

- Rangarajan E, Li Y, Iannuzzi P, Cygler M, Matte A (2005) Crystal structure of Escherichia coli crotonobetainyl-CoA: carnitine CoA-transferase (CaiB) and its complexes with CoA and carnitiny-CoA. *Biochemistry* **44**: 5728-5738
- Saschenbrecker S, Bracher A, Rao K, Rao B, Hartl F, Hayer-Hartl M (2007) Structure and function of RbcX, an assembly chaperone for hexadecameric Rubisco. *Cell* **129**: 1189-1200
- Schachter D, Taggart J (1953) Benzoyl coenzyme A and hippurate synthesis. *The Journal of biological chemistry* **203**: 925-934
- Scholten E, Renz T, Thomas J (2009) Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1. *Biotechnology Letters* **31**: 1947-1951
- Schühle K, Gescher J, Feil U, Paul M (2003) Benzoate-coenzyme A ligase from *Thauera aromatica*: an enzyme acting in anaerobic and aerobic pathways. *Journal of*
- Sharma P, Teixeira de Mattos M, Hellingwerf K, Bekker M (2012) On the function of the various quinone species in Escherichia coli. *The FEBS journal* **279**: 3364-3373
- Smith C, O'Maille G, Want E, Qin C, Trauger S, Brandon T, Custodio D, Abagyan R, Siuzdak G (2005) METLIN: a metabolite mass spectral database. *Therapeutic drug monitoring* **27**: 747-751
- Sofia M, Jin Z, Milko V, Wolfgang B, Albrecht M (2009) Crystal structure of 4-hydroxybutyrate CoA-transferase from *Clostridium aminobutyricum*. *Biological Chemistry* **390**
- Stahmann K, Revuelta J, Seulberger H (2000) Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**: 509-516
- Studier F (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein expression and purification* **41**: 207-234
- Suvorova IA, Ravcheev DA, Gelfand MS (2012) Regulation and Evolution of Malonate and Propionate Catabolism in Proteobacteria. *Journal of bacteriology* **194**
- Thakker C, Martínez I, San K-Y, Bennett GN (2012a) Succinate production in Escherichia coli. *Biotechnology Journal* **7**
- Thakker C, San K-Y, Bennett G (2012b) Production of succinic acid by engineered E. coli strains using soybean carbohydrates as feedstock under aerobic fermentation conditions. *Bioresource Technology* **130C**: 398-405
- Trautwein K, Lahme S, Wöhlbrand L, Feenders C, Mangelsdorf K, Harder J, Steinbüchel A, Blasius B, Reinhardt R, Rabus R (2012) Physiological and proteomic adaptation of "*Aromatoleum aromaticum*"

- EbN1 to low growth rates in benzoate-limited, anoxic chemostats. *Journal of bacteriology* **194**: 2165-2180
- Tschech A, Fuchs G (1987) Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Arch Microbiol* **148**: 213-217
- Uden G, Bongaerts J (1997) Alternative respiratory pathways of Escherichia coli: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et biophysica acta* **1320**: 217-234
- Vogel T, Grbić-Galić D (1986) Incorporation of Oxygen from Water into Toluene and Benzene during Anaerobic Fermentative Transformation. *Applied and Environmental Microbiology* **52**: 200-202
- Wang W, Black S, Edwards M, Miller S, Morrison E, Bartlett W, Dong C, Naismith J, Booth I (2008) The structure of an open form of an E. coli mechanosensitive channel at 3.45 Å resolution. *Science (New York, NY)* **321**: 1179-1183
- Watmough N, Frerman F (2010) The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica et biophysica acta* **1797**: 1910-1916
- Werpy T, Frye J, Wang Y, Zacher A. (2004) US Patent 6,632,951.
- Willke T, Vorlop KD (2004) Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**: 131-142
- Wischgoll S, Heintz D, Peters F, Erxleben A, Sarnighausen E, Reski R, Van Dorsselaer A, Boll M (2005) Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of Geobacter metallireducens. *Molecular microbiology* **58**: 1238-1252
- Wu J, Du G, Zhou J, Chen J (2012) Metabolic engineering of Escherichia coli for (2S)-pinocembrin production from glucose by a modular metabolic strategy. *Metabolic engineering* **16C**: 48-55
- Yim H, Haselbeck R, Niu W, Pujol-Baxley C, Burgard A, Boldt J, Khandurina J, Trawick J, Osterhout R, Stephen R, Estadilla J, Teisan S, Schreyer H, Andrae S, Yang T, Lee S, Burk M, Van Dien S (2011) Metabolic engineering of Escherichia coli for direct production of 1,4-butanediol. *Nature chemical biology* **7**: 445-452
- Zehr B, Savin T, Hall R (1989) A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* **182**: 157-159
- Zengler, Heider, Rossello M, Widdel (1999) Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of Blastochloris sulfoviridis. *Archives of Microbiology* **172**: 204-212

Zeyer J, Kuhn E, Schwarzenbach R (1986) Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Applied and Environmental Microbiology* **52**: 944-947

---

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Absorption
Å	Angström
AHT	Anhydrotetracyclin
APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bbs	$\beta$ -oxidation von (R)-Benzylsuccinat
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
bss	(R)-Benzylsuccinat-Synthase
c	Konzentration
°C	Grad-Celsius
CoA/CoASH	Coenzym A
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-Terminal	Carboxyterminal
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektor
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoesäure) (3,3'-6)
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETF	Elektronentransferierendes Flavoprotein
GC-MS	Gas Chromatography – Mass spectrometry
HPLC	high performance liquid chromatography
ICP-OES	inductively coupled plasma optical emission spectrometry (optische Emissions spektrometrie mittels induktiv gekoppelten Plasmas)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
Km	Michaelis-Menten Konstante
lac	Lactose
LB	Lysogeny broth/ Luria-Bertani
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass spectrometry
mAU	milli-absorbance unit
MCS	multiple cloning site
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MK	Menachinon
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NAD(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
N-Terminal	Aminoterminal
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
UQ	Ubichinon

RP	reversed-phase
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
tetP	Tetracyclin induzierbarer Promoter
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UV/Vis	ultra violet/visible
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

## Anhang

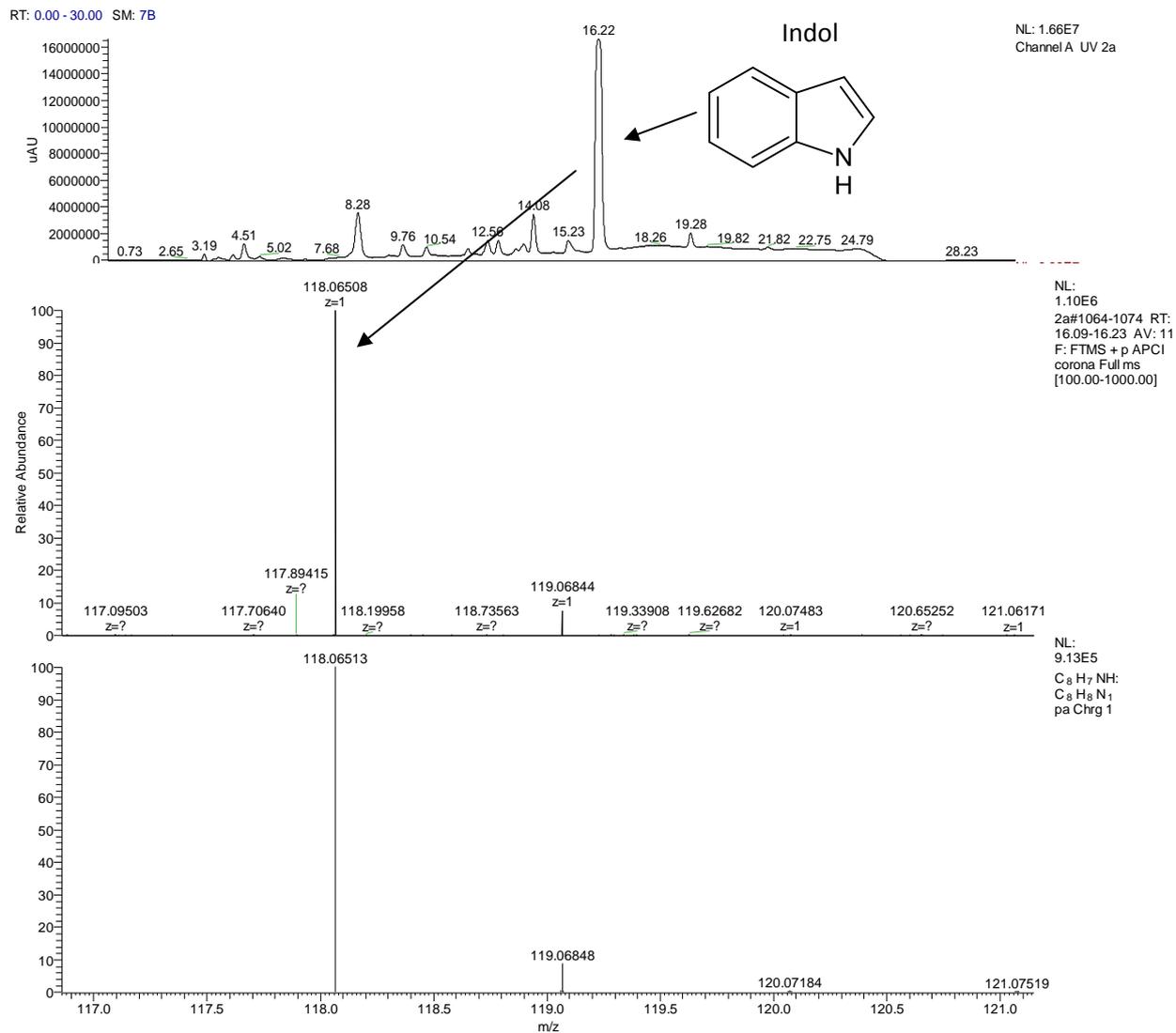


Abbildung 47: LC-MS Chromatogramm zum Nachweis von Indol. Aufgetrennter Extrakt aus Kulturüberstand von *S. blattae* pASG\_mod\_bclA-BIS-benK. Bei einer Retentionszeit von 16,22 Minuten eluiert Indol von der Säule.

1H

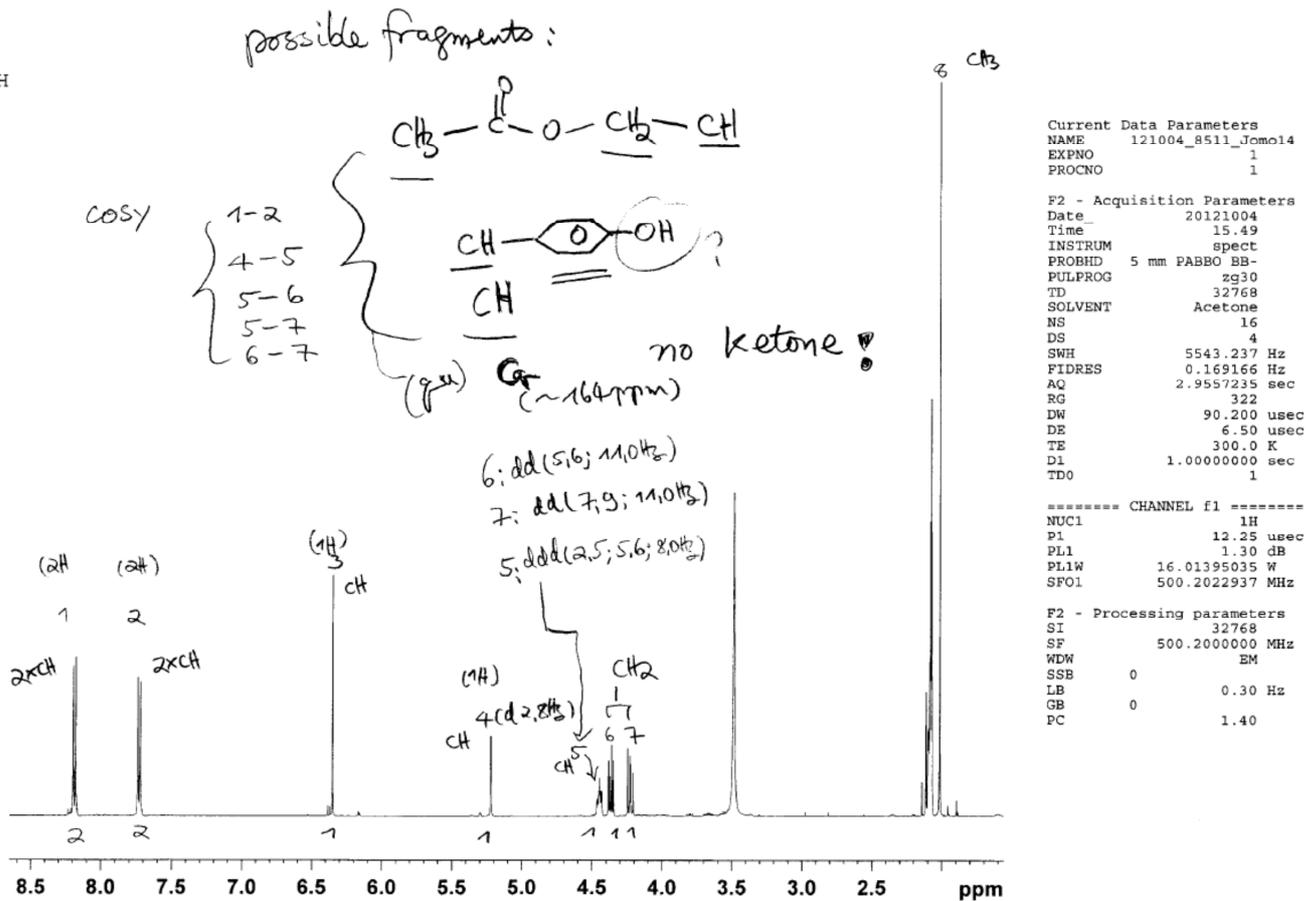


Abbildung 48: NMR-Analyse der Verbindung, die zuvor durch RP-HPLC aufgetrennt wurde und bei 16 Minuten eluierte. Eine eindeutige Identifizierung der Verbindung war nicht möglich, da das Molekulargewicht sowie die Atomare Zusammensetzung der Verbindung unbekannt sind.

## Danksagung

Zuerst danke ich meinem Doktorvater Prof. Johann Heider für die Bereitstellung des interessanten Themas, die wertvollen Ratschläge und die konstruktive Kritik, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Wolfgang Buckel für die Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens und für anregende Fragen und Diskussionen während der Seminarvorträge.

Bei Dr. Benye Liu und Prof. Ludger Beerhues von der TU Braunschweig möchte ich mich für die Bereitstellung der Biphenylsynthese und für die Analyse von Biphenylen bedanken. Weiterhin danke ich Prof. Reinhard Krämer von der Universität Köln für die Zurverfügungstellung von Plasmiden, die Gene für mechanosensitive Kanäle aus *E. coli* und *C. glutamicum* kodierten. Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Ekaterina Kostina und Alexandra Herzog für die Erstellung des mathematischen Modells zum synthetischen Stoffwechselweg für Biphenyl.

Ein großer Dank geht an Dr. Uwe Linne für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der massenspektroskopischen Analysen. Ebenfalls danke ich Dr. Xiulan Xie und Prof. Andreas Seubert für die Durchführung von NMR- und ICP-OES-Analysen.

Für die Kristallisierungsarbeiten der Thiolase möchte ich mich bei Sina Weiden bedanken.

Bei Dr. Karola Schühle möchte ich mich für ihre große Unterstützung besonders bei Fragen zu Klonierungstechniken bedanken. Ebenfalls bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Heider, Buckel und Bremer für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft.

Ich danke auch meinem Freund Marco Hornung für seine kollegiale Hilfe im Labor und sein Verständnis, wenn ich auch zu Hause noch gern über Proteinreinigungen und HPLC-Chromatogramme mit ihm fachsimpeln wollte.

Schlussendlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre unermüdliche Unterstützung, auch in schwierigen Phasen dieser Promotion.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Datum)

---

(Unterschrift)

---

## Lebenslauf

Name: Johanna Mock

Geburtsdatum: 10.01.1987

Geburtsort: Leinefelde

Familienstand: ledig

### Schulbildung

8/1993 – 6/1997 Grundschule Effelder

7/1997 – 6/2005 Käthe-Kollwitz-Gymnasium Lengenfeld/Stein mit dem Abschluss Abitur

### Hochschulbildung

9/2005 – 10/2009 Studium der Biotechnologie an der Fachhochschule Gießen-Friedberg mit dem Abschluss Dipl.-Ing. (FH) für Biotechnologie

10/2008 – 10/2009 Praxissemester/Diplomarbeit: am Fraunhofer UMSICHT in Oberhausen unter der Leitung von Prof. Dr. Andrea Springer und Prof. Dr. Jürgen Hemberger zum Thema: „Entwicklung eines Verfahrens zur enzymatischen Veresterung von Bernsteinsäure“

### Promotion

1/2010 – 4/2013 Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Mikrobiologie, unter der Leitung von Prof. Dr. J. Heider zum Thema: „Konstruktion synthetischer Stoffwechselwege zur Produktion von (*R*)-Benzylsuccinat und weiteren aromatischen Metaboliten“