

**Etablierung der Biosynthese von Gibberellinsäurederivaten in
Saccharomyces cerevisiae und Anwendung optogenetischer
Module in der Grundlagenforschung und Biotechnologie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Johannes Scheffer

aus Bad Kreuznach

Marburg,

Dezember 2020

Diese Arbeit wurde von September 2017 bis Dezember 2020 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lars-Oliver Essen unter Anleitung von Priv. Doz. Dr. Christof Taxis am Fachbereich Biologie im Fachgebiet Molekulare Genetik der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkenziffer 1180) als Dissertation angenommen am _____

Erstgutachter: Priv. Doz. Dr. Christof Taxis

Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der mündlichen Disputation:

In diesem Zeitraum angefertigte Publikationen:

Jonathan Trauth, Johannes Scheffer, Sophia Hasenjäger, Christof Taxis. (2020) Strategies to investigate protein turnover with fluorescent protein reporters in eukaryotic organisms. *AIMS Biophysics*, 7(2): 90-118.

Johannes Scheffer, Sophia Hasenjäger, and Christof Taxis. (2019) Degradation of integral membrane proteins modified with the photosensitive degron module requires the cytosolic endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 30:20, 2558-2570

Jonathan Trauth, Johannes Scheffer, Sophia Hasenjäger, and Christof Taxis (2019). Synthetic Control of Protein Degradation during Cell Proliferation and Developmental Processes. *ACS Omega*, 4 (2), 2766-2778

Sophia Hasenjäger, Johannes Scheffer, Jonathan Trauth., Christof Taxis (2019). Lichtsignale für die Hefe. *Biospektrum*, 25, 628–630

Eingereichte Patente:

Lars-Oliver Essen, Christof Taxis, Filipp Bezold, Johanne Scheffer. Verfahren zur verbesserten Herstellung eines Pflanzeninhaltsstoffes durch optogenetische Kontrolle von Zellzyklusregulatoren.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Etablierung der Biosynthese von Gibberellinsäurederivaten in *Saccharomyces cerevisiae* und Anwendung optogenetischer Module in der Grundlagenforschung und Biotechnologie“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei 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.

(Ort, Datum)

(Johannes Scheffer)

„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt“

-Marie Curie-

Zusammenfassung

Die Proteindegradation ist ein zentraler Bestandteil der Regulationsmechanismen in *Saccharomyces cerevisiae* zur Bewerkstelligung der Proteinhomöostase. Hierbei ist das Ubiquitin-Proteasom-System von fundamentaler Bedeutung und reguliert den Abbau von fehlerhaften Proteinen, sowie solchen, die aufgrund von Zellzyklussignalen oder weiteren Einflüssen für die Degradation bestimmt werden. Die Markierung der für den Abbau bestimmten Proteine geschieht dabei mittels Polyubiquitinierung über eine Kaskade aus drei Enzymen (E1-E2-E3). Das ERAD-System (ER-assoziierte Protein Degradation) ist Teil der Proteinqualitätskontrolle für Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und sekretorischer Proteine. Es sind drei ERAD-Wege bekannt, die je nach Lokalisation des Substrat-Proteins bzw. des beschädigten Teils involviert werden: ERAD-L für ER-luminale Proteine, ERAD-M für ER-Membranproteine und ERAD-C für ER-Membranproteine mit Abbau auslösenden Bestandteilen im Cytosol. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei ER-Membranproteine Sec61, Sec62 und Sec66 mit C-terminalen cytosolischen Domänen untersucht. Deren optogenetisch kontrollierter Abbau durch das C-terminal angehängte photosensitive Degron (psd) sollte näher charakterisiert werden, um zu überprüfen in wie weit die ERAD-C-Maschinerie an der Proteolyse beteiligt ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass der psd-abhängige Abbau von Sec61, Sec62 und Sec66 ubiquitinabhängig ist und neben der Ubiquitin-aktivierenden E1-Ligase Uba1, die dafür notwendigen ubiquitinkonjugierenden E2s Ubc6/ Ubc7 und die E3- Ubiquitinligase Ssm4 aus dem ERAD-C Weg stammen.

Der Zellzyklus von *S. cerevisiae* wird durch das Zusammenspiel unterschiedlicher regulatorischer Proteine gesteuert. In weiteren Untersuchungen dieser Arbeit konnte durch die optogenetische Kontrolle von Zellzyklusregulatoren die heterologe Produktion von sekundären Pflanzenstoffen gesteigert werden. Über den psd-bedingten Abbau der AAA-ATPase Cdc48 und der dominant negativen Mutanten Δ^N Sic1-psd³ und Clb ^{Δ DB}-psd³ konnte ein Zellzyklusarrest in der G1- bzw. G2-Phase induziert werden, der zu einer gesteigerten Produktionsrate von β -Carotin aus dem Mevalonat-Weg führte. Weiterhin konnte die Wirksamkeit dieser Module an der heterologen Produktion des pilzlichen Inhaltsstoffs Cordycepin gezeigt werden. Im Zuge dieser Arbeit wurde außerdem der komplexere Biosyntheseweg für das Pflanzenhormon Gibberellinsäure-4 in *S. cerevisiae* getestet und etabliert. Hierdurch ist eine einfachere Produktion von Gibberellinen als bisher möglich. Da der GA4-Biosyntheseweg ebenfalls aus dem Mevalonat-Weg abzweigt, sind die zuvor getesteten optogenetischen Module ebenfalls für die gesteigerte Produktion von Gibberellinsäure-4 anwendbar.

Summary

Protein degradation is a central component of the regulatory circuits in *Saccharomyces cerevisiae* to obtain protein homeostasis. The ubiquitin proteasome system is a crucial component within these regulatory circuits and controls the degradation of faulty proteins, as well as those which have been targeted for degradation through cell cycle signalling and other influences. The targeting of such proteins happens through polyubiquitination by a cascade of three enzymes (E1-E2-E3). The ERAD-system (ER associated degradation) is part of the protein quality control for proteins of the endoplasmatic reticulum (ER) and secretory proteins. There are three ERAD-pathways, whose involvement depends on the localisation of the substrate protein or the damaged domain. ERAD-L is responsible for ER-luminal proteins, ERAD-M for membrane integrated substrates and ERAD-C for membrane anchored proteins with domains in the cytosol. Three different ER-membrane bound proteins with C-terminal cytosolic domains (Sec61, Sec62, Sec66) were analysed in this thesis. The degradation of these proteins, mediated by the C-terminally fused photosensitive degron (psd) was to be examined closer, in order to check for a dependency of the proteolysis on the ERAD-C machinery. It could be demonstrated, that the psd-dependant degradation of Sec61, Sec62 and Sec66 required ubiquitination. The necessary ubiquitination enzymes were the ubiquitin activating E1 Uba1, the ubiquitin conjugating E2s Ubc6/Ubc7 and the E3 ubiquitin ligase Ssm4, which are all part of the ERAD-C pathway.

The cell cycle of *S. cerevisiae* is controlled by an interplay of several regulatory proteins. In additional investigations, the heterologous production of secondary plant metabolites was successfully increased through optogenetic control of several cell cycle regulators. By psd-dependent degradation of the AAA-ATPase Cdc48 and the dominant negative mutants Δ^N Sic1-psd³ and Clb ^{Δ DB}-psd³, cells were arrested in the G1- and G2-phase of the cell cycle, which led to elevated production rate of β -carotene from the mevalonate pathway. The effectiveness of the constructs was additionally demonstrated by the increased production of the fungal metabolite Cordycepin. In the course of this thesis the complex biosynthesis pathway of gibberellic-acid-4 (GA4) was established and tested in *S. cerevisiae*. This facilitates the production of gibberellins. Since the GA4-pathway is branching off the mevalonate pathway, the previously tested optogenetic modules are also applicable for the increased production of gibberellic-acid-4.

Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit wurden SI-Einheiten ("Système International d'unités") sowie deren Ableitungen verwendet. Aminosäuren wurden entweder ausgeschrieben, oder es wurden die gängigen drei- oder ein-Buchstabenabkürzungen verwendet.

<i>As</i>	<i>Avena sativa</i>
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
CDK	<i>Cycline dependant kinase</i>
CHX	Cycloheximid
<i>Cl</i>	<i>Citrus limon</i>
<i>Cm</i>	<i>Cucurbita maxima</i>
cODC	(C-Terminus der) Maus Ornithindecaboxylase
<i>Com</i>	<i>Cordyceps militaris</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
ddH ₂ O	vollentsalztes Wasser
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
<i>et al</i>	„und andere“
FPP	Farnesylpyrophosphat
GA	<i>gibberellic acid</i> / Gibberellinsäure
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
kDA	(Kilo)Dalton
LOV	<i>light oxygen voltage</i>
<i>Ma</i>	<i>Mentha aquatica</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>

N-Terminus	Aminoterminus
<i>Ob</i>	<i>Ocimum basilicum</i>
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i> / offener Leserahmen
<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
pH	„Potentia hydrogenii“
<i>Ps</i>	<i>Pisum sativum</i>
psd	<i>photo-sensitive degran</i>
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SORB	Sorbitol
taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Tri-Chloressigsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylen-diamin
ts	temperatursensitiv
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
<i>Xd</i>	<i>Xanthophyllomyces dendrohrous</i>
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivitätsprofile von Cyklinen und Zellzyklusregulatoren.....	1
Abbildung 2: Arretierung einzelner Zellzyklusphasen durch psd-Modul markierte Regulatoren	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom Systems und der am ERAD-C-Degradationsweg beteiligten Faktoren.....	5
Abbildung 4: Schematische Darstellungen optogenetischer Module.....	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer eukaryotischen Zelle mit möglichen Modifikationspunkten.....	12
Abbildung 6: Schema des Mevalonat-Stoffwechselwegs und der heterologen Synthesewege biotechnologisch interessanter Moleküle	16
Abbildung 7: Degradationsanalysen von Sec61-3myc-psd, Sec62-3myc-psd und Sec66- 3myc-psd.....	19
Abbildung 8: Degradations- und Funktionalitätsanalysen von Sec61-psd, Sec62-psd und Sec66-psd.....	21
Abbildung 9: Western-Blot- und Mikroskopie-Analyse der Degradation von Erg9- psd.....	23
Abbildung 10: Analyse der Ubiquitinierungsabhängigkeit der Proteindegradation.....	24
Abbildung 11: Mikroskopieuntersuchung der β -Carotin -Produzierenden ERAD-Mutanten und die Quantifizierung der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenz	29
Abbildung 12: Mikroskopieuntersuchung der β -Carotin -produzierenden Zellzyklusarrest- Mutanten und die Quantifizierung der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenz	30
Abbildung 13: Mikroskopieuntersuchung der β -Carotin-produzierenden Stämme mit dominant negativen Zellzyklusregulatoren.....	32
Abbildung 14: Quantifizierung der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenz in verschiedenen Stämmen mittels Durchflusszytometrie.....	34
Abbildung 15: Quantifizierung der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenz in verschiedenen Zellzyklus-Arrest-Mutanten mittels Durchflusszytometrie.....	35
Abbildung 16: Untersuchung der Auswirkungen verlängerter Blaulichtillumination auf Cdc48-psd ³	38
Abbildung 17: Untersuchung der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenzintensität in verschiedenen Stämmen nach 30 h und 54 h.....	40
Abbildung 18: Beispiel-Chromatogramme der HPLC-Messung von β -Carotin Standards und Zellextrakten.....	41
Abbildung 19: Quantifizierung des β -Carotin-Gehalts mittels HPLC im Sec61-psd-Stamm..	43
Abbildung 20: Quantifizierung des β -Carotin-Gehalts mittels HPLC in Zellzyklusarrest- Mutanten.....	44
Abbildung 21: Quantifizierung des β -Carotin-Gehalts mittels HPLC in Δ^N Sic1-psd ³ und C1b ^{ADB} -psd ³	45

Abbildung 22: Untersuchung der Schwankungen der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenzintensität in verschiedenen Stämmen nach 30 h.....	46
Abbildung 23: Charakterisierung der Cordycepin-Produktion in Hefe.....	48
Abbildung 24: Charakterisierung der Cordycepin-Produktion in Clb2 ^{ADB} - und ^{AN} Sic1- Stämmen.....	49
Abbildung 25: Terpensynthesewege und Western-Blot-Analyse der Stämme mit Terpen- Enzymen.....	50
Abbildung 26: Schematische Darstellungen der genetischen Komponenten des heterologen GA4-Synthesewegs.....	52
Abbildung 27: Expressionskontrollen der GA4-Syntheseweg Enzyme.....	54
Abbildung 28: Expressionstest der unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren.....	55
Abbildung 29: Analyse des GA4-produzierenden Stammes mittels Western-Blot und GA- Reporter-Fluoreszenz.....	57
Abbildung 30: Beispiel zur Auswertung der Durchflusszytometrie Daten zur Messung von YFP- und β -Carotin-Fluoreszenz.....	94

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	ii
Abkürzungsverzeichnis.....	iii
Abbildungsverzeichnis	v
Inhaltsverzeichnis.....	vii
1. Einleitung	1
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und der Zellzyklus	1
1.2 Die Proteindegradation in <i>S. cerevisiae</i>	5
1.3 Optogenetik und ihre Anwendung.....	8
1.4 Die Bedeutung von Hefen in der Biotechnologie und Metabolic Engineering ...	11
1.5 Produktion sekundärer Pilz- und Pflanzenstoffe.....	14
1.6 Ziele dieser Arbeit.....	17
2. Ergebnisse	18
2.1 <i>Analyse der Degradationsmechanismen von synthetischen ERAD-Substraten</i>	18
2.1.1 Sec61-psd, Sec62-psd und Sec/66-psd sind synthetische Substrate des ERAD-C Degradationswegs	18
2.1.2 Die Ubiquitin-Protein Ligase Ssm4 ist am Abbau von Erg9-psd beteiligt	21
2.1.3 Ubiquitinabhängigkeit der psd-induzierten Proteindegradation	23
2.2 <i>Der Einsatz von optogenetischen Modulen für die biotechnologische Nutzung</i>	25
2.2.1 Optogenetische Kontrolle von Zellzyklus-Regulatoren und ERAD Komponenten zur Steigerung der β -Carotin-Ausbeute.....	25
2.2.2 Durchflusszytometrieanalyse β -Carotin-produzierender Stämme	32
2.2.3 Analyse der β -Carotin-produzierenden Stämme mittels HPLC	39
2.3 <i>Steigerung der Produktion von Cordycepin in S. cerevisiae</i>	46
2.4 <i>Etablierung von Terpensynthesewegen in S. cerevisiae</i>	48
2.5 <i>Etablierung eines GA4-Synthesewegs in S. cerevisiae</i>	50
2.5.1 Konstruktion und Assemblierung des Ga-Synthesewegs.....	51
2.5.2 Analyse des GA4-Produktionsstamm YJS13.....	56
3. Diskussion	58
3.1 <i>Synthetische Substrate des ERAD-C</i>	58
3.2 <i>Die biotechnologische Anwendung von ERAD-Mutanten und optogenetischen Konstrukten zur Steigerung der β-Carotin-Produktion</i>	60

3.3	<i>Der Effekt von optogenetischer Kontrolle von Zellzyklusregulatoren auf die Ausbeute von heterolog produzierte Stoffe</i>	61
3.4	<i>Die optogenetische Kontrolle von Cdc48 und dessen biotechnologisches Potential</i>	63
3.5	<i>Die vielseitige Nutzbarkeit der getesteten optogenetischen Konstrukte</i>	65
3.6	<i>Die heterologe Terpensynthese in Hefe</i>	66
3.7	<i>Die heterologe Produktion von GA4 in S. cerevisiae</i>	66
3.8	<i>Ausblick</i>	68
4.	Material	71
4.1	<i>Chemikalien</i>	71
4.2	<i>Enzyme und Kits</i>	71
4.3	<i>Antibiotika</i>	71
4.4	<i>Nährmedien</i>	71
4.5	<i>Antikörper</i>	73
4.6	<i>Puffer und Lösungen</i>	74
4.7	<i>Stämme</i>	75
4.7.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	75
4.7.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	76
4.8	<i>Plasmide</i>	78
4.9	<i>Primer</i>	81
5.	Methoden	86
5.1	<i>Kultivierung von Mikroorganismen</i>	86
5.1.1	<i>Kultivierung von Escherichia coli</i>	86
5.1.2	<i>Kultivierung von Saccharomyces cerevisiae</i>	86
5.2	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	86
5.3	<i>Isolation der Gesamt-DNA aus S. cerevisiae mittels der LiOAc-SDS Methode (nach (Lööke et al. 2011))</i>	86
5.4	<i>Transformation von chemisch kompetenten E. coli (Mandel und Higa, 1970)</i> ...	87
5.5	<i>Transformation von E. coli mittels Elektroporation</i>	87
5.6	<i>Transformation von S. cerevisiae (Gietz et al. 1992)</i>	88
5.7	<i>Plasmidpräparation</i>	88
5.8	<i>DNA-Amplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	88
5.9	<i>Restriktionsverdau von Plasmiden</i>	89
5.10	<i>Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor</i>	90
5.11	<i>Immunopräzipitation</i>	90

5.12	<i>Proteinextraktion (abgewandelt nach Knop et al, 1999)</i>	90
5.13	<i>SDS-PAGE und Western-Blot</i>	91
5.14	<i>Durchflusszytometrie</i>	92
5.15	<i>Mikroskopie</i>	94
5.16	<i>β-Carotin-Extraktion</i>	94
5.17	<i>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i>	94
5.18	<i>Extraktion von Linalool, Geraniol und Limonen</i>	95
5.19	<i>Extraktion von GA4 aus <i>S. cerevisiae</i></i>	95
5.20	<i>Cas9-vermittelte Integration des GA4-Synthesewegs</i>	95
5.21	<i>Kreuzung von <i>S. cerevisiae</i> und Tetradendisektion</i>	96
	Literaturverzeichnis	98
	Danksagung	111
	Lebenslauf (entfernt)	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* und der Zellzyklus

Saccharomyces cerevisiae wird als Brau- und Bäckerhefe seit Jahrtausenden von Menschen zur Herstellung von Lebensmitteln verwendet und gewann im Laufe des letzten Jahrhunderts zunehmende Bedeutung als Modellorganismus in der Molekularbiologie. Zusätzlich wird *S. cerevisiae* im Bereich der Biotechnologie genutzt, z.B. für die heterologe Produktion einer Vielzahl von wertvollen Molekülen wie menschliches Insulin, Artemisinin oder Psilocibin.

Der Zellzyklus der Hefe von der Mutterzelle hin zu einer neuen Knospe durchläuft die Phasen G1 (*gap phase 1*), S (*synthesis phase*), G2 (*gap phase 2*) und die M-Phase (*mitotic phase*). Dabei werden je nach Phase spezifische Proteine benötigt, die bspw. die Replikation der DNA, die Organisation und Verteilung der Chromosomen und die Verteilung der unterschiedlichen Zellorganellen kontrollieren. Der Zellzyklus von *S. cerevisiae* wird von Kinasen gesteuert, wobei eine zentrale Rolle der CDK1 (*Cyclin dependant kinase 1, CDC28*) zufällt. Die Kontrolle wird dabei durch ein dicht abgestimmtes Zusammenspiel aus Transkriptionsaktivierung und Repression koordiniert. Diese Regulation ist ein dynamisches System aus der Aktivierung der Cyclin-Expression und der anschließenden Phosphorylierung und Dephosphorylierung weiterer Transkriptionsfaktoren durch den Cyclin-CDK1-Komplex. Auf diese Weise werden je nach Zellzyklus-Phase eine Gruppe von unterschiedlichen Genen aktiviert und reprimiert. Diese sind eingeteilt in ein G1/S-Cluster, ein S-Cluster, ein G2/M-Cluster und ein M/G1-Cluster. Die Expression und Aktivität der Cykline kontrolliert dabei das Erreichen wichtiger Kontrollpunkte, welche die Progression im Zellzyklus steuert (vgl. Abb.1).

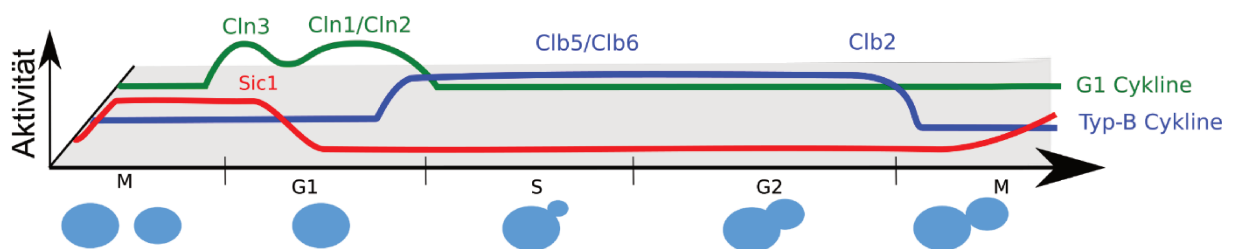


Abb. 1: Aktivitätsprofile von Cyclinen und Zellzyklusregulatoren. Abgebildet sind die Aktivitätsphasen der G1-Cykline Cln3, Cln1 und Cln2 (grün), der B-Cykline Clb5, Clb6 und Clb2 (blau) und dem Zellzyklusregulator Sic1 (rot) während der Zellzyklusphasen von *S. cerevisiae* (Abgeändert nach Jiménez et al. 2015).

Am Anfang der G1-Phase bindet CDK1 die Cykline Cln1, Cln2 und Cln3 über ein Adapter Cks1. Cln3 wird dabei von der Konzentration zellulärer Chaperone gesteuert und bindet erst dann Cdc28, sobald ein kritischer Punkt erreicht ist (Vergés et al. 2007). Cdc28-Cln3 inhibiert die Aktivität von Whi5, einem Transkriptionsrepressor des G1-Transkription-Clusters (Garí et

al. 2001), wodurch die Expression von *CLN1/CLN2* durch die aktiven Transkriptionsfaktor-Komplexe SBF (Swi4-Swi6) und MBF (Mbp1-Swi6) ermöglicht wird. Der CDK1-Cln1/CDK2-Cln2-Komplex aktiviert die Expression von Genen, die sowohl in der späten G1-Phase als auch in der anfänglich S-Phase notwendig sind, wodurch der Übergang dieser beiden Abschnitte gewährleistet wird. In dieser Phase werden vor allem Gene des Spindel-Pol Körpers und Gene für das polarisierte Wachstum benötigt. Während der G1-Phase inhibiert Sic1 die Bildung von Komplexen aus CDK1 Typ B Cyklinen, wobei Sic1 wiederum von CDK1-Cln1/Cln2 phosphoryliert und so für den Abbau durch den SCF-Komplex markiert wird (Schneider et al. 1996; Verma et al. 1997). Mit steigender Konzentration des MBF wird der G1-Repressor Nrm1 aktiviert (Bruin et al. 2006), welcher durch Bindung von Swi6 die eigene Expression und die von Cln1/2 deaktiviert. Zusätzlich wird die Expression der S-Phase Cyklone Clb5/Clb6 gefördert. Durch CDK1-Clb6 wird Swi6 phosphoryliert und akkumuliert im Cytoplasma (Geymonat et al. 2004, Geymonat et al. 2010), wodurch die weitere Aktivierung der G1-Transkription verhindert wird. CDK1-Clb5 aktiviert die Gene der DNA-Synthese. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor der S-Phase ist Hcm1, welcher sowohl durch SBF als auch MBF aktiviert wird (Iyer et al. 2001). Hcm1 treibt die Expression des S-Phase-Gen-Clusters der DNA-Synthese an (Pramila et al. 2006), sowie die weiteren regulatorischen Transkriptionsfaktoren Fkh1, Fkh2 und Ndd1 (Murakami et al. 2010; Kumar et al. 2000). Fkh2 und Ndd1 sind die Aktivatoren des G2-Genclusters und ihre Expression durch Hcm1 initiiert den Übergang von S- zu G2-Phase. Der Transkriptionsfaktor Mcm1 bindet gemeinsam mit Fkh2 und Ndd1 das *CLB2*-Cluster, was die Expression von *CLB2*, *CDC5* und *CDC20* zur Folge hat. Der Mcm1-Fkh2-Komplex alleine reprimiert die Expression von *CLB2* während des restlichen Zellzyklus. Durch CDK1-Clb2 werden weitere Faktoren der M-Phase aktiviert. Dabei wird der Inhibitor Pds1 phosphoryliert und, vermittelt durch den Cdc20 aktivierten *Anaphase-Promoting-Complex* APC, für den Abbau durch das Proteasom markiert (Farr und Cohen-Fix 1999; Harper et al. 2002; Nasmyth 2005). Durch den Abbau des Segregations-Inhibitors Securin (Pds1) wird in der Anaphase die Chromosomensegregation auf Mutter und Tochterzelle eingeleitet, Spindeln abgebaut und die Cytokinese damit abgeschlossen. Bevor eine neue G1-Phase beginnen kann, müssen die Cyklone der M-Phase abgebaut werden, was unter anderem durch Cdc20 kontrolliert wird (Irniger 2002). Weitere Aktivität der M-Phase Cyklone wird durch Sic1 inhibiert. Hierdurch kann der oben beschriebene Prozess der Akkumulation von Cln3/Cln2/Cln1 und damit eine neue G1-Phase beginnen. Es existieren mehrere Kontrollpunkte innerhalb des Zellzyklus, die passiert werden müssen, bevor die Progression ermöglicht wird. Hierdurch soll eine unkontrollierte Teilung bei unabgeschlossener

DNA-Replikation, Nährstoffmangel, Osmo- oder Hitze-Stress (Morano et al. 2012; Clotet und Posas 2007) oder bevorstehendem *Mating* verhindert werden (Mendenhall 1998). Ist das Niveau von Cln3-Molekülen während der G1 zu niedrig, wird der Fortschritt in die G1-Phase verhindert (Jiménez et al. 2015). Eine Kopplung des Zellzyklusfortschritts an Nährstoffverfügbarkeit geschieht unter anderem durch die Kinase Rim15, die die Zelle in den Ruhezustand G0 versetzt. Ihre Aktivität wird von der Proteinkinase A reprimiert, welche wiederum durch die Verfügbarkeit von Glucose aktiviert wird (Pedruzzi et al. 2003; Wanke et al. 2005). Wenn es zu einem Stocken der DNA-Replikation kommt, wird dieses durch Mec1 detektiert (Carr 1997), welche wiederum die Kinase Rad53 aktiviert (Jaehnig et al. 2013). Rad53 phosphoryliert Nrm1, wodurch der Repressor inaktiviert wird und MBF aktiv bleibt (Bastos de Oliveira et al. 2012). Während des *Mating*-Prozesses inhibieren Fus3 und Far1 die Progression des Zellzyklus und lösen einen Zellzyklus-Arrest zu Beginn von G1 aus, damit sich die beiden Zellen vor der Vereinigung in ihrem Zellzyklus synchronisieren können (Roberts et al. 2000). Fus3 wird bei Anwesenheit von Pheromonen aktiviert und phosphoryliert Far1, welches wiederum die CDK1 inhibiert. In Abwesenheit von Pheromonen wird Far1 von der CDK1-Cln für die Ubiquitinierung markiert und abgebaut (Henchoz et al. 1997).

Für molekularbiologische Arbeiten wird dieser Pheromon-induzierte Zellzyklus-Arrest häufig eingesetzt um Zellpopulationen zu synchronisieren. Hierzu wird das α -Faktor Pheromon direkt in die Kultur gegeben (Gartner et al. 1998; Campbell et al. 2020). Eine weitere Möglichkeit der künstlichen Zellzyklus-Kontrolle wurde von Hasenjäger et al. vorgestellt (Hasenjäger et al. 2019). Hierbei wurden die Zellzyklus-Regulatoren Sic1, Clb2 sowie Cdc48 (eine AAA-ATPase, die unter anderem für den Abbau der Mitosespindel verantwortlich ist (Cao et al. 2003) mit Hilfe eines photosensitiven Degrons unter Lichtkontrolle gebracht (Abb. 2). Durch den blaulichtabhängigen Abbau von Cdc48-psd³ konnte so der Zellzyklus erfolgreich arretiert werden (Abb. 2 A). Sic1 und Clb2 wurden jeweils so modifiziert, dass ein regulärer Abbau der Proteine im normalen Verlauf des Zellzyklus nicht mehr möglich ist (Abb. 2 B).

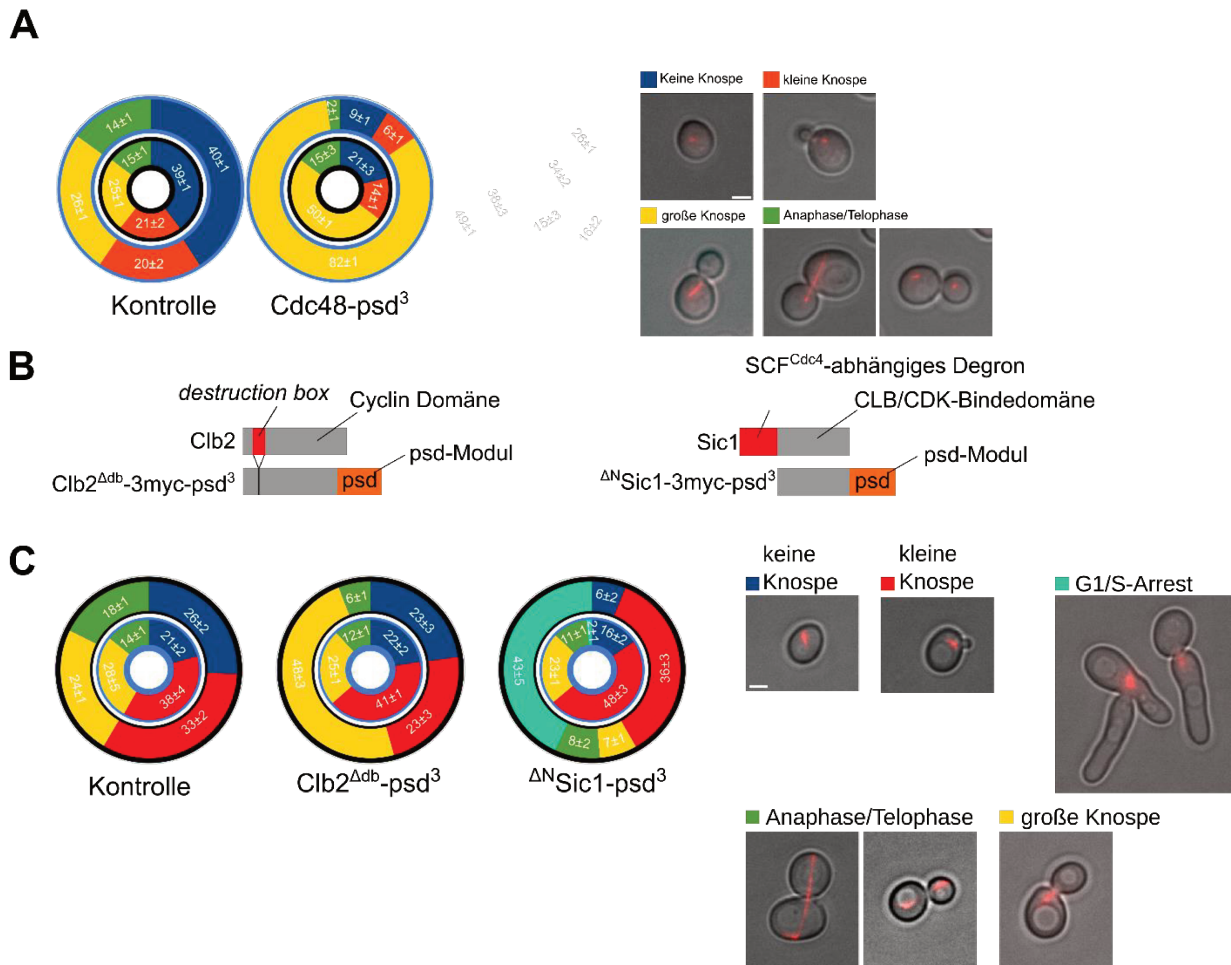


Abb. 2: Arretierung einzelner Zellzyklusphasen durch psd-Modul markierte Regulatoren (Hasenjäger et al. 2019). A) Durch psd³-bedingten Abbau von Cdc48 konnte ein Zellzyklusarrest der Zellen sowohl im Dunkeln, als auch extensiver nach Blaulichtinkubation beobachtet werden. B) Topologie der dominant negativen Allele von Sic1 und Clb2 im Vergleich zum WT. C) Analoge Analyse der Zellzyklusphasen wie in A) mit den dominant negativen Mutanten Δ^N Sic1-psd³ und Clb2^{ADB}-psd³.

So wurde für Sic1 das N-terminale Degron zur Erkennung durch den SCF-Komplex entfernt und ein psd³-Modul C-terminal angehängt. Für Clb2 wurde die *Destruction Box (DB)* entfernt und ebenfalls ein psd³-Modul angehängt. Die Mutanten Δ^N Sic1-psd³ und Clb2^{ADB}-psd³ waren nach wie vor funktional, konnten jedoch nicht mehr von den regulären Abbauprozessen des Zellzyklus beeinflusst werden und akkumulierten so im Dunkeln, wodurch die Zellen arretierten (Ghiara et al. 1991; Hodge und Mendenhall 1999; Dirick et al. 1995). Unter Blaulicht werden diese dominant negativen Allele konstant abgebaut und der Zellzyklus kann normal stattfinden (Abb. 2 C).

1.2 Die Proteindegradation in *S. cerevisiae*

Proteindegradation ist ein wichtiger Kontrollmechanismus der Zellen, der dazu dient, einen steten Proteinumsatz zu erreichen, beschädigte und missgefaltete Protein zu entfernen, sowie nicht mehr benötigte Protein zu degradieren, um ihre Aktivität zeitlich einzuschränken. In Eukaryoten werden für den Abbau bestimmte Proteine markiert und durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) prozessiert und abgebaut. Das UPS kommt in den unterschiedlichsten zellulären Prozessen zum Einsatz, z.B. dem Zellzyklus (s. 1.1) oder der Transkriptionskontrolle (Hershko und Ciechanover 1998). Ubiquitin (Ub) ist ein kleines, ca. 8,5 kDa großes Protein, welches ubiquitär im Cytosol vorhanden ist. Im Rahmen der UPS vermittelten Proteinabbaus kommt es zu einer Polyubiquitinierung des Ziel-Proteins. Hierzu werden die drei Enzyme E1, E2 und E3 benötigt. In einem ersten Schritt wird unter ATP Verbrauch ein Ubiquitin durch das Enzym E1 aktiviert und auf dieses über eine energetisch instabile Thioesterbindung übertragen (Abb.3A).

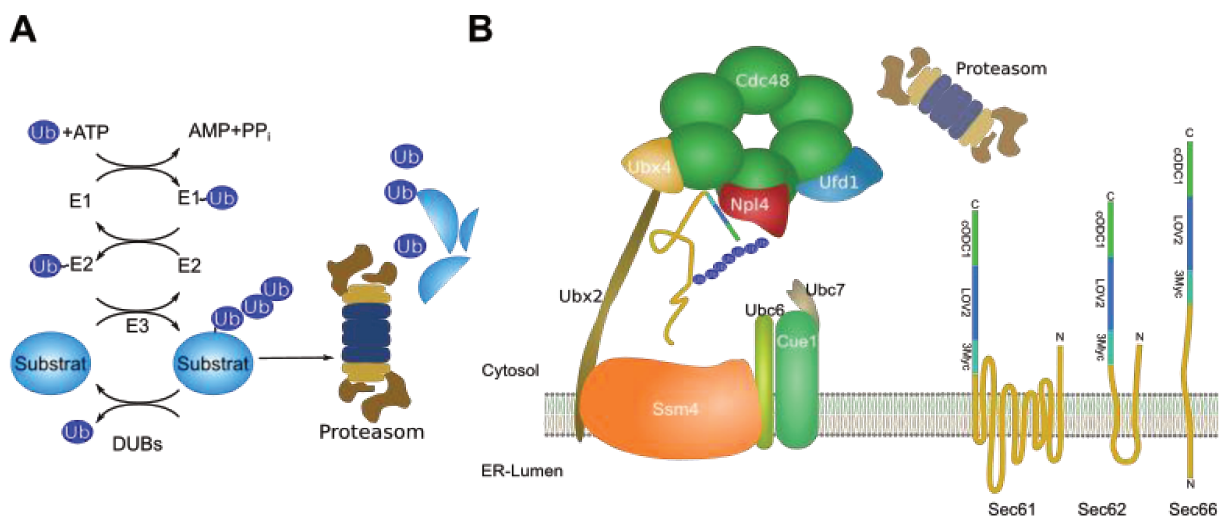


Abb. 3: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom Systems und der am ERAD-C-Degradationsweg beteiligten Faktoren. A) Das Ubiquitin wird zunächst von E1 unter ATP-Verbrauch aktiviert, anschließend auf ein E2-Ubiquitin-konjugierendes Enzym übertragen, welches wiederum das Ub zusammen mit einer E3 Ubiquitin-Protein-Ligase auf das Substrat überträgt. Durch das Übertragen weiterer Ubs wird eine Ub-Kette gebildet. Die Polyubiquitinkette wird vom Proteasom erkannt und das Protein abgebaut. (Abb. 3A abgewandelt von (Trauth et al. 2019)). B) Der Ssm4-Komplex besteht aus mehreren Proteinen, die sich sowohl in der ER-Membran als auch im Cytosol befinden: Die Ubiquitin-Protein-Ligase Ssm4, die beiden Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc6/7 (letzteres durch Cue1 an der Membran verankert) und der Cdc48-Npl4-Ufd1-Komplex, welcher Zielproteine aus der Membran extrahiert und weiter entfaltet. Der Cdc48-Komplex wiederum wird von Ubx2/4 an die ER-Membran rekrutiert. Die drei Membranproteine Sec61 / Sec62 / Sec66 sind Teil eines Translocon-Komplexes zur SRP-Erkennung und zum Protein Import ins ER. Sec61 / Sec62 / Sec66 besitzen eine unterschiedliche Anzahl an Transmembran-Domänen und reichen mit dem C-Terminus ins Cytosol. In dieser Arbeit wurden mit dem photosensitiven Degron C-terminal markierte Versionen der drei Membranproteine untersucht, was sie zu potentiellen Substraten des ERAD-C macht.

Das Ubiquitin wird anschließend über eine weitere Thioesterbindung auf ein Ub-konjugierendes Enzym E2 übertragen, welches gemeinsam mit der Ubiquitinligase E3, u.a.

zuständig für die Substraterkennung, das Ub auf das Ziel-Protein transferiert. Das Ziel-Protein wird anhand einer Signalsequenz (Degron) erkannt, welches bspw. durch falsche Faltung exponiert ist. Nach der Erkennung und Bindung durch die E3 Ubiquitinligase wird das Ub am Zielprotein an einem Lysin-Rest kovalent gebunden und anschließend ein weiteres Ub kovalent an eine Lysinseitenkette des ersten Ubs gebunden. Wiederholungen dieses Schritts führen zur Entstehung einer Polyubiquitin-Kette (Varshavsky 1991; Ravid und Hochstrasser 2008). Das polyubiquitinierte Ziel-Protein wird entweder direkt vom 26S-Proteasom erkannt oder über einen Adapter gebunden und unter ATP-Verbrauch abgebaut (Welchman et al. 2005; Ravid und Hochstrasser 2008). Dem Abbau wirken de-ubiquitinierende Enzyme, sogenannte DUBs, entgegen, welche Polyubiquitinketten auflösen und so weitere Möglichkeiten zur Regulation bereitstellen.

Das Proteasom besteht aus 33 Untereinheiten, aufgeteilt auf den tonnenförmigen 20S *core particle* und den zwei 19S *regulatory particles*, welche auf der 20S Untereinheit wie ein Deckel bzw. Boden aufliegen. Es kommt in allen eukaryotischen Lebensformen vor und seine Struktur und Funktion ist hoch konserviert (Finley et al. 2012). Die 19S Untereinheit (Deckel) erkennt die Substrate, die daraufhin entfaltet und im Innern der 20S Untereinheit abgebaut werden (Finley 2009). Proteine, die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisieren, werden über einen spezifischeren Mechanismus für den Abbau im Proteasom vorbereitet. Dies ist der sogenannte ER-assoziierte Degradationsweg, kurz ERAD, welcher ungefaltete Proteine im ER-Lumen oder der ER-Membran erkennt und zur Degradation vorbereitet. Je nach Lokalisation der ungefalteten Domäne kommen unterschiedliche Wege zum Einsatz: ERAD-L für luminaire ungefaltete Proteine, ERAD-M für membranintegrierte Proteine und ERAD-C für Membranproteine, deren ungefaltete Region im Cytosol lokalisiert, sowie einige cytosolische Proteine, wie der Matalpha2-Repressor (Mehrtash und Hochstrasser 2019).

Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt mit Uba1 nur ein einziges E1-Protein (McGrath et al. 1991), jedoch mehrere E2s und E3s (Pickart 2001; Finley et al. 2012). Während ERAD sind spezifische E2s und E3s aktiv: Die E3-Ligase Hrd1 für Substrate des ERAD-L und ERAD-M und die E3-Ligase Ssm4 für Substrate des ERAD-C. Diese gehören zur RING-Klasse der E3s und sind mit mehreren E2s in einem Komplex assoziiert. Die RING-Domäne interagiert mit dem E2-Partner über koordinierte Zink-Ionen und stimmt die Übertragung des Ub auf das Substrat ab (Weissman 2001). Ssm4 befindet sich mit den E2s Ubc6 und über Cue1 verankertes Ubc7 in einem Komplex eingebettet in der ER-Membran, gemeinsam mit mehreren Adapter-Proteinen (s. Abb. 2B) (Zattas und Hochstrasser 2015; Deng und Hochstrasser 2006). Hrd1 befindet sich ebenfalls in der ER-Membran in einem Komplex mit seinen Interaktionspartnern,

lokalisiert jedoch in anderen Bereichen als Ssm4 (Deng und Hochstrasser 2006). Beide interagieren mit dem E2 Ubc7, wobei Hrd1 zusätzlich noch mit dem E2 Ubc1 interagiert (Friedlander et al. 2000). Für die Extraktion von ERAD-Zielproteinen aus der ER-Membran wird der cytosolische Cdc48-Npl4-Ufd1-Komplex benötigt, welcher über Ubx2-Ubx4 an der ER-Membran verankert ist und zum jeweiligen ERAD-Komplex rekrutiert wird (Ye et al. 2001). Dieser AAA-ATPase-Komplex bindet das polyubiquitinierte Substrat über Ufd1/Npl4 und das Cdc48-Homohexamer extrahiert dieses nach teilweiser Entfaltung aus der ER-Membran bzw. aus membranintegrierten Komplexen (Ye et al. 2017).

Der Sec61-Komplex besteht aus drei Untereinheiten (Sec61, Ssh1, Sbh1) und formt das Translocon für den SRP-abhängigen Co-translationalen Protein-ER-Import, parallel zu einem weiteren ähnlichen aufgebauten Komplex aus Ssh1, Sbh2 und Sss1 (Robb und Brown 2001). Für den SRP-unabhängige postrationalen ER-Import bildet der Sec61 Komplex in Hefe einen größeren heptameren Sec-Komplex zusammen mit dem Sec62-Komplex bestehend aus Sec63, Sec62, Sec66 und Sec72 (Römisch 1999; Plath et al. 1998). Der Transport von Proteinen über die ER-Membran in das ER ist der erste Schritt des Protein-Sekretionswegs über den Golgi-Apparat (Römisch 1999; Delic et al. 2013).

Es wurde außerdem diskutiert, dass der Sec61-Komplex einen Bestandteil des ERAD darstellt, im Zusammenhang des retrograden Transports ungefalteter Proteine aus dem ER zurück ins Cytosol (Römisch 1999; Plemper et al. 1997). Sec61 bindet hierbei die 19S-Untereinheit des Proteasoms, welche durch die AAA-ATPase-Aktivität die ungefalteten Proteine aus dem Translocon extrahiert (Kalies et al. 2005). In einem weiteren Modell wurde die Notwendigkeit von Hrd1, Hrd3 und Der1 zur Entfaltung des Substrats für den Sec61-abhängigen Export vorgeschlagen (Römisch 2017; Kalies et al. 2005, 2005; Plemper et al. 1997; Römisch 1999). Dementgegen wurde auch ein Modell publiziert, in dem Der1 und Hrd1 für den Export von ungefalteten Proteinen aus dem ER für den proteasomalen Abbau verantwortlich sind (Bagola et al. 2011; Mehnert et al. 2014). Hierbei werden die Substrate im ER-Lumen von Der1 über Hrd3/Yos9 gebunden und so zur E3-Ubiquitin-Ligase Hrd1 rekrutiert. Das Substrat wird anschließend von Der1 in die Membran inseriert, durch Hrd1 polyubiquitiniert und letztendlich durch Cdc48 aus der ER-Membran extrahiert und proteasomal abgebaut (Mehnert et al. 2014). In einem *in vitro* Ansatz wurde außerdem Hrd1 als unabhängig agierender ubiquitinsteuert Proteinkanal beschrieben (Baldrige und Rapoport 2016). Eine Beteiligung einer weiteren ERAD-Komponente Ssm4 im retrograden Transport von Proteinen durch die ER-Membran wurde ebenfalls postuliert (Schmidt et al. 2020).

1.3 Optogenetik und ihre Anwendung

Die Optogenetik ist ein vergleichsweise junges Feld der Molekularbiologie und Zellbiologie. Genetisch codierte Photorezeptoren werden verwendet, um Effektoren in ihrer Aktivität zu steuern. Dies erlaubt, biologische Prozesse durch Licht einer bestimmter Wellenlängen zu beeinflussen. Ein Photorezeptor ist im Allgemeinen ein Protein mit einem organischen Chromophor (in manchen Fällen auch Tryptophan), dessen Absorptionsmaximum bestimmt, für welche Licht-Wellenlänge der Rezeptor sensitiv ist (Möglich et al. 2010; Tilbrook et al. 2013). Dieser Chromophor absorbiert Photonen und ändert im Zuge dessen seine Konformation bzw. sein Energieniveau. Dadurch wird dieses Potential an das umfassende Protein weitergeleitet und allosterische und biochemische Änderungen des Rezeptors entstehen. Hierbei ändert der Photorezeptor seinen Zustand vom Dunkel-Zustand zum Licht-Zustand, was einen Photozyklus darstellt. Dieser Vorgang ist reversibel, was ein „Ein“- und „Aus“-Schalten des Moleküls ermöglicht. Die Geschwindigkeit des Wechsels vom Dunkel- zum Licht-Zustand und die Reversion davon vom Licht- zu Dunkel-Zustand ist je nach Photorezeptor unterschiedlich und eine wichtige Kenngröße für die Entwicklung optogenetischer Werkzeuge. In manchen Fällen ist der Photorezeptor sowohl Licht-Sensor, als auch Effektor selbst (z.B. Channelrhodopsine (Zhang et al. 2011)). In anderen Fällen stellt er lediglich das photosensitive Modul dar, als Teil eines größeren Komplexes, in dem er den initialen Lichtreiz als Signal durch bspw. Konformationsänderungen an einen aktiven Partner, wie einer Kinase weitergibt (z.B. bei Phototropin (Matsuoka und Tokutomi 2005; Raghavan et al. 2020)). Dabei beinhaltet letzteres die Möglichkeit, den Effektor in einem synthetischen Rezeptor-Effektor-Konstrukt beliebig auszutauschen, um neue optogenetische Werkzeuge zu entwickeln, wohingegen bspw. Channelrhodopsine in ihrer Einsetzbarkeit beschränkt sind.

Optogenetik hat die Vorzüge, dass Licht als Signalgeber für physiologische Manipulationen reversibel, schnell, wahlweise hochaufgelöst oder global wirkt und einfach zu handhaben ist. In der Biotechnologie hat es außerdem den Vorteil, dass es vergleichsweise kostengünstig gegenüber etablierten Alternativen, wie der Zugabe von Chemikalien als Induktor ist, und weniger Zellstress verursacht, wie der Einsatz von erhöhten Temperaturen. Das Einsatzgebiet von optogenetischen Werkzeugen ist vielfältig: *Channelrhodopsine* zur Kontrolle des Ionenflusses über eine Membran (Zhang et al. 2011), lichtaktivierbare Transkriptionsfaktoren (Raghavan et al. 2020), lichtabhängige Proteindegradation (Renicke et al. 2013; Hasenjäger et al. 2019) oder lichtabhängige Kontrolle von CRISPR-CAS9 (Nihongaki et al. 2015).

Da im Zuge dieser Arbeit nur Blaulicht-abhängige Systeme zum Einsatz kamen, werden in diesem Abschnitt nur Blaulicht-Rezeptoren näher beschrieben. Die hier verwendeten

Photorezeptoren, die auf Blaulicht reagieren, sind *Light-Oxygen-Volgtage* (LOV)-Domänen (Christie et al. 1998) und Cryptochrome (Ahmad et al. 1995). Die LOV2-Domäne aus *Avena sativa* beinhaltet in ihrem Kern als Chromophor ein Flavomononukleotid (FMN), dessen Absorptionsmaximum bei ca. 450 nm liegt (Harper et al. 2003). Eine Beleuchtung durch Blaulicht sorgt für eine kovalente Bindung des angeregten FMNs an ein Cystein (C450), was eine allosterische Änderung der am C-terminus befindlichen J- α -Helix nach sich zieht (Harper et al. 2003). Diese entfaltet sich in einem reversiblen Prozess, ein Umstand der u.A. für die Entwicklung des *photosensitive degron*-Moduls (psd-Modul) genutzt wurde (Renicke et al. 2013). Der „Dunkel“-Zustand des Rezeptors und erneute Faltung der J- α -Helix geschieht, wenn das Photoaddukt des FMN zu seinem unangeregten Zustand zurückkehrt und die kovalente Bindung zum Rezeptor gelöst wurde. In optogenetischen Werkzeugen kam die *Arabidopsis thaliana* LOV2-Domäne unter anderem im psd-Modul zum Einsatz, in Kombination mit einer Sequenz aus dem C-Terminus der *Mus musculus* Ornithin-Decarboxylase (cODC) (Renicke et al. 2013). Diese Sequenz besitzt ein Degron, also eine kurze Peptidsequenz (37 AS), welche direkt vom Proteasom über Cystein-Alanin-Motiv erkannt wird und so zum Abbau des gesamten Proteins führt (Jariel-Encontre et al. 2008). Eine teilweise Abhängigkeit von Ubiquitinierung für den Abbau des Degrons wurde jedoch ebenfalls bereits festgestellt (Scheffer et al. 2019). Das psd-Modul kann genetisch C-terminal an ein Ziel-Protein angehängt werden, um dessen Stabilität zu beeinflussen. Im Dunkeln wird das cODC-Degron (gekürzt auf 23 AS) durch die eingeklappte J- α -Helix der LOV2-Domäne maskiert und das Protein bleibt stabil. Bei einer Beleuchtung mit Blaulicht (450 nm) entfaltet sich die J- α -Helix und das cODC-Degron kann vom Proteasom bzw. der Ubiquitinierungsmaschinerie erkannt werden und es kommt zum Abbau des Proteins (s. Abb. 4 A). Auf Basis dieses Moduls wurden weitere Varianten (psd², psd³) entwickelt, die eine schnellere Abbaurate unter Blaulicht und eine höhere Stabilität im Dunkeln aufwiesen (Hasenjäger et al. 2019; Usherenko et al. 2014). Diese höheren Schaltraten wurden durch das Koppeln des cODC-Degron an neue Photorezeptor-LOV2-Domänen erreicht. Außerdem konnten durch gezielte und zufällige Mutation in Schlüsselregionen wie der J- α -Helix die Schaltrate der LOV-Domänen zusätzlich beeinflusst werden (Jentzsch et al. 2009; Usherenko et al. 2014). Im Falle des psd² war dies die *At*LOV2^{K92R E132A E155G} und für psd³ die *As*LOViLID^{A146 Δ} , bestehend aus einer verbesserten *As*LOV Domäne des iLID-Konstrukts mit einer weiteren Mutation (Guntas et al. 2015).

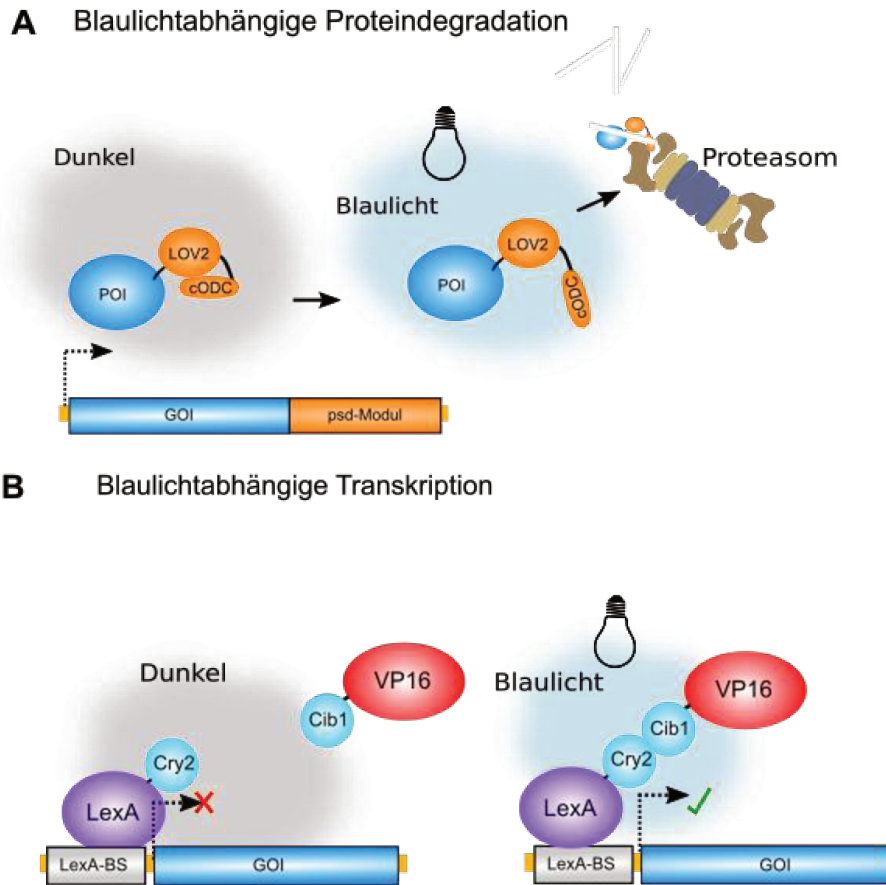


Abb. 4: Schematische Darstellungen optogenetischer Module. A) Abgebildet ist die Funktionsweise des photosensitiven degenon (psd)-Modul. Nach der Expression des Fusionsproteins liegt dieses im Dunkeln stabil vor. Unter Blaulicht entfaltet sich die J- α -Helix der LOV-Domäne und gibt das cODC Degron für die Erkennung durch das Proteasom frei und das Protein wird abgebaut. B) Funktionsweise des blaulichtabhängigen Transkriptionsfaktors LexA-Cry2 und VP16-Cib1. Im Dunkeln liegen die beiden Interaktionspartner unabhängig voneinander vor und die Transkription wird nicht aktiviert. Unter Blaulicht bilden Cry2-Cib1 ein Heterodimer, wodurch VP16-Cib1 an das dauerhaft an die DNA gebundene LexA-Cry2 am Promoter rekrutiert wird und so die Transkription einer *gene of interest* (GOI) aktiviert.

Cryptochrome sind eine sehr weit gefasste Gruppe von Photorezeptoren, die unterschiedliche Funktionen erfüllen. Ihnen allen gemein ist der strukturelle Aufbau aus zwei Domänen: Die *photolyase homology region* (PHR) am N-Terminus und die *cryptochrome c-terminal extension* (CCE) am C-Terminus (Liu et al. 2017). In der N-terminalen PHR-Domäne befindet sich der Chromophor Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) (Zoltowski und Gardner 2011). Diese C-terminalen Bereiche binden im angeregten Zustand aneinander und bilden so Homodimere. CRY2 aus *Arabidopsis thaliana* ist außerdem in der Lage ein Heterodimer mit dem „*cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix protein*“ CIB1 über diese Region zu bilden (Liu et al. 2008). Die Homo-Oligomerisierung von CRY2-CRY2 hängt dabei stark von positiv geladenen Aminosäure-Resten im C-Terminus ab, wohingegen die Hetero-Oligomerisierung von negativen Ladungen am N-Terminus abhängen (Duan et al. 2017). Die Eigenschaft der Licht-abhängigen Hetero-Dimerisierung von CRY2 und CIB1 wird als optogenetisches Tool

vielfach genutzt, um zwei Interaktionspartner, wie bspw. die zwei Hälften eines Split-GFPs, innerhalb der Zelle nach Blaulichtbeleuchtung zueinander zu bringen (Kennedy et al. 2010).

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein Blaulicht-aktivierbarer Transkriptionsfaktor verwendet, der aus zwei Teilen bestand. Zum einen aus einem Fusionsprotein aus der DNA-Bindedomäne des LexA-Repressors (LexA) und Cry2 und zum anderen aus dem Transkriptionsaktivator VP16, gekoppelt mit Cib1 (Masterarbeit Jonathan Trauth, 2019). LexA-Cry2 ist dabei dauerhaft an die LexA-Bindestelle im Promoter gebunden, während im Dunkeln VP16-Cib1 ungebunden vorliegt (Abb. 4B). Unter Blaulicht bilden LexA-Cry2-Cib1-VP16 ein Heterodimer, wodurch VP16 an den Promoter rekrutiert und die Transkription aktiviert wird.

1.4 Die Bedeutung von Hefen in der Biotechnologie und *Metabolic Engineering*

Neben der Herstellung von Lebensmitteln und Alkohol haben Hefen in den letzten Jahrzehnten für die Biotechnologie eine enorme Bedeutung gewonnen. Die Bandbreite der in Hefen produzierten Stoffe ist mannigfaltig, wie bspw. Lactat, Farnesen, Isobutanol, Succinat, Reseveratrol und Cephalosporin (Borodina und Nielsen 2014). Die Vorteile der biotechnologischen Produktion gegenüber chemischer sind ebenso vielfältig: So bedarf die Produktion in *S. cerevisiae* weniger Ressourcen, da einfach zusammengesetzte Medien mit Glukose als Kohlenstoffquelle und Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle ausreichen oder sogar Abfallprodukte wie Lignocellulose in manchen Hefespezies, wie *Scheffersomyces stipitis*, als Nährstoffe Verwendung finden (Mattanovich et al. 2014). Weitere Vorteile sind ein geringer Energieverbrauch durch vergleichsweise geringe Inkubationstemperaturen, keine Notwendigkeit von Hochdrucktanks oder organischen Lösungsmitteln (Johnson und Echavarrri-Erasun 2010). *S. cerevisiae*, aber auch andere Hefe-Spezies, wie *Yarrowia lipolytica*, haben gegenüber anderen biotechnologisch genutzten Organismen wie dem Bakterium *Escherichia coli* den Vorteil, dass sie als sicheres Lebensmittel bereits zugelassen sind, was eine zusätzliche Nutzung der produzierten Biomasse ermöglicht und die Zulassung von medizinischen Produkten erleichtert. Daneben hat *S. cerevisiae* gegenüber bakteriellen Produktionsorganismen noch die Vorteile, dass pflanzliche Enzyme auf Grund einer näheren Verwandtschaft besser exprimiert werden können, sie eine höhere pH-Toleranz, Salz-Toleranz, Kultur-Robustheit (keine Anfälligkeit durch Phagen) und auf Grund der Zellkompartimentierung eine höhere Toleranz gegenüber toxischen Verbindungen aufweisen (Nielsen 2019). Hinzu kommt die bessere Möglichkeit zur Produktion von rekombinanten Proteinen auf Grund der vorhandenen Proteinprozessierung, Glykolisierung und Sekretion

(Vieira Gomes et al. 2018). Je nach Anforderung kann es auch von Vorteil sein, andere Hefe-Spezies als Produktionsstamm auszuwählen, wie bspw. die stark lipidhaltige Hefe *Y. lipolytica* für die Produktion von lipophilen Verbindung, wie β -Carotin (Jacobsen et al. 2020).

Ist ein Ziel-Produkt und dessen Syntheseweg identifiziert, muss dieser an einen geeigneten zelleigenen Stoffwechselweg „angeschlossen“ werden. Zwei beliebte Synthesewege sind der Mevalonatweg für die Synthese von Terpenen und Sterole und der Syntheseweg von aromatischen Aminosäuren. Dieser kann für die Produktion von Flavonoiden und Opioiden genutzt werden (Nielsen 2015). Durch die einfache Handhabung von *S. cerevisiae* bei molekularbiologischen Arbeiten und das Aufkommen neuer Technologien wie CRISPR-Cas9 ist es zunehmend einfacher, komplexe Synthesewege in Hefe zu rekonstruieren und zu optimieren (s. Abb. 5).

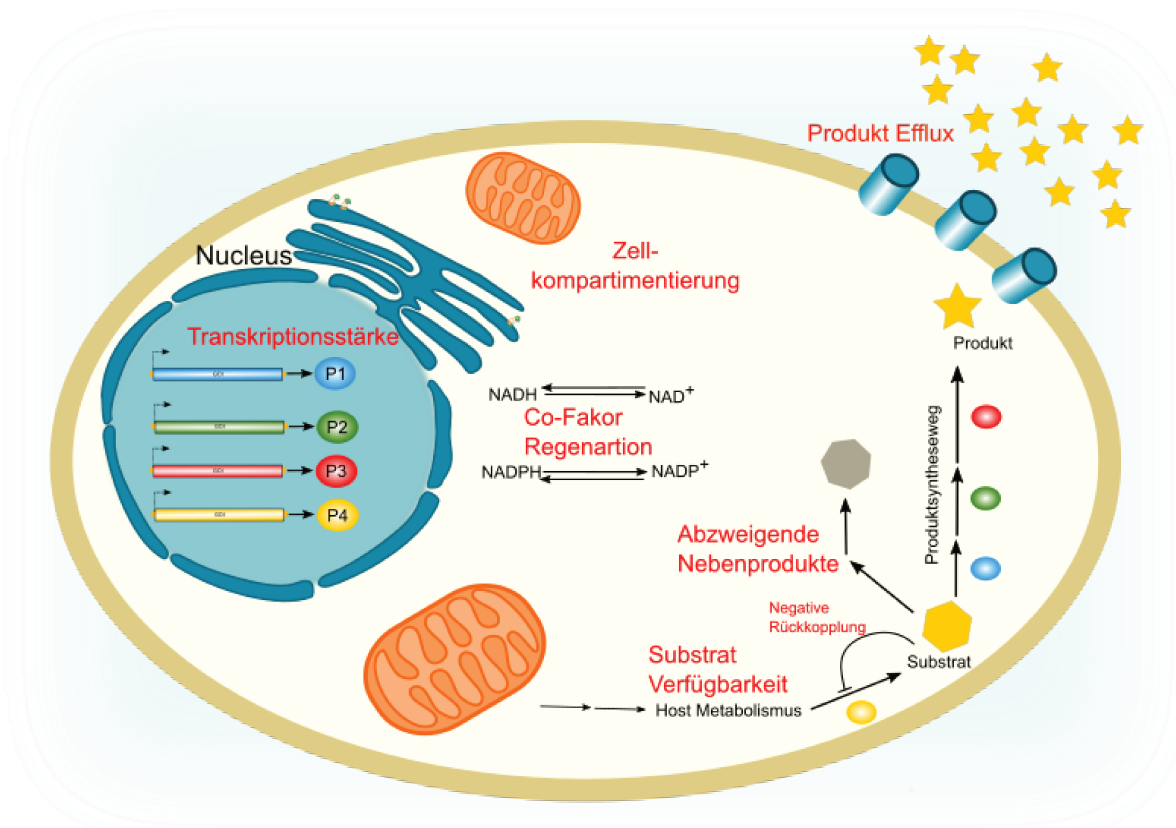


Abb. 5: Schematische Darstellung einer eukaryotischen Zelle mit möglichen Modifikationspunkten. Dargestellt ist eine schematische Zelle mit einem integrierten heterologen Produktionsweg für ein gewünschtes Endprodukt. Die Prozesse in Rot sind mögliche Ansatzpunkte für die Optimierung des Synthesewegs und allgemeinen Energieflux hin zum Endprodukt.

Gängige Mittel um den Energiefluss in diesen Syntheseweg und den abzweigenden heterologen Synthesewegen zu erhöhen ist, neben der Überexpression der heterologen Enzyme, eine Repression der Enzyme konkurrierender abzweigender biosynthetischer Wege. Der Metabolismus ist eng reguliert, weswegen es von Vorteil sein kann, die negative

Rückkopplungsregulation auszuschalten, um den Energiefluss ungehindert aufrecht zu erhalten (Lee und Kim 2015). Ein Beispiel hierfür ist die gekürzte tHmg1 in *S. cerevisiae*, deren regulatorische N-terminale Transmembran-Domänen entfernt wurde. Die Hmg1 kontrolliert einen limitierenden Schritt im Mevalonatweg von HMG-CoA zu Mevalonat und durch erhöhte Enzymmengen wird die Flussrate hin zu dem Produkt erhöht (Ignea et al. 2014; Polakowski et al. 1998). Neben direkten Substraten ist außerdem eine ausreichende Menge von Co-Faktoren für die Produktion des Endprodukts wichtig (van Rossum et al. 2016). Um dies zu gewährleisten ist sowohl die Manipulation nativer Enzyme möglich, als auch das Einbringen heterologer Enzyme. Zusätzlich ist es eventuell von Vorteil die Produktion konkurrierender Nebenprodukte, also abzweigender Stoffwechselwege, auszuschalten (Lee et al. 2012). Im Falle von β -Carotin, dessen Synthese in *S. cerevisiae* von Farnesylpyrophosphat (FPP) ausgeht, wäre dies die Produktion von Ergosterol (Beekwilder et al. 2014). Durch Repression des Schlüsselenzyms Erg9 kann hierbei der β -Carotin Titer deutlich erhöht werden, bei gleichzeitiger Hochregulation des Mevalonatwegs (Jennings et al. 1991; Duplus-Bottin et al. 2020). Es sollte jedoch bedacht werden, dass sich Zellen evolutionär so entwickelt haben, dass es einen Ausgleich zwischen Katabolismus und Anabolismus herrscht und Homeostasis erreicht werden kann. Ein zu starker Eingriff in den Metabolismus der Zelle kann eine starke Schwächung der Resilienz nach sich ziehen, wodurch die Wachstumsrate verringert wird, und damit die Produktionsrate des Ziel-Produkts. Es gilt also ein Gleichgewicht zu finden, zwischen maximaler Ausnutzung der zellulären Ressourcen für den heterologen Syntheseweg und Aufrechterhaltung der Resilienz gegen die Stress-Faktoren einer industriellen Fermentation, wie z.B. hohe Osmolarität, toxische Nebenprodukte, Hitze und pH.

Es kann daher notwendig sein, konditionelle Mutanten zu verwenden, bei denen die Expression von ungewünschten Proteinen reprimiert wird. Gängige Strategien hierfür sind Knock-down Techniken wie die synthetische Kontrolle der Proteindegradation (Trauth et al. 2019). Als Induktor hierfür kann Temperatur, kleine Moleküle oder Licht verwendet werden (Renicke et al. 2013; Dohmen und Varshavsky 2005; Beenukumar et al. 2015). Temperatur hat den Nachteil, dass die Wirkung sehr zeitverzögert ist, hohe Energiekosten erzeugt und mögliche Nebenwirkungen hat. Die Zugabe von Induktor-Molekülen wie Auxin oder Galaktose ist teuer und wirkt ebenfalls eher langsamer und nicht anhaltend (Nishimura et al. 2009; Jungbluth et al. 2010). Licht hingegen benötigt relativ wenig Energie, kann zeitlich beliebig begrenzt werden, wirkt schnell und ist minimal invasiv für den Produktionsorganismus. Neben der offensichtlich möglichst hohen Transkriptionsrate der notwendigen Enzyme des Ziel-Synthesewegs, ist eine Induzierbarkeit in manchen Fällen nötig. Wirkt das Endprodukt beispielsweise toxisch, hemmt

dies das Zellwachstum der Kultur, und eine ausreichende Zelldichte kann nicht erreicht werden. Für solche regulatorischen Eingriffe, bei denen die heterologen Enzyme nach Bedarf exprimiert werden, benötigt man einen geeigneten Induktor. Entsprechende Systeme sind gut etabliert und umfassen als Induktoren ebenfalls Temperatur (Fischer et al. 2016), kleine Moleküle wie Tetracyclin (Gossen und Bujard 1992) und Galactose (Choi et al. 1994), oder IPTG (McIsaac et al. 2011) und Licht (Pathak et al. 2014; Shimizu-Sato et al. 2002). Dabei gelten die gleichen Vor- und Nachteile wie im Falle der Proteindegradation.

Im Falle von Hefen ist zusätzlich noch die Zellkompartimentierung zu beachten, die sowohl einen limitierenden Faktor darstellen kann, da Enzyme und Substrate so räumlich voneinander getrennt sein können, als auch von Vorteil sein kann, um toxische Haupt- und Nebenprodukte zu isolieren (Roze et al. 2011; Siddiqui et al. 2012). Um eine Akkumulation eines toxischen Produkts zu verhindern und außerdem den Flux in Richtung Produkt aufrechtzuerhalten, ist weiterhin der Einsatz von Efflux-Pumpen vorteilhaft. Diese sondern das Produkt konstant ins Medium ab, und halten die Konzentration innerhalb der Zelle gering (Pfeifer und Khosla 2001; Lee et al. 2012). Außerdem ist eine Extraktion des Ziel-Produkts aus dem Medium einfacher, als eine Aufbereitung aus der produzierten Biomasse. Sollten keine nativen Transporter vorhanden sein, kann es notwendig werden diese einzubringen, wie etwa Cns4 für Cordycepin in *S. cerevisiae* oder verschiedene ABC-Transporter in *E. coli* für den Export von Amorphadien (Wu et al. 2014; Qian et al. 2011; Xia et al. 2017; Zhang et al. 2016).

Alles in allem ist die Produktion wertvoller Metaboliten in Hefe eine zukunftsweisende Technik. Mögliche Optimierungspunkte, ausgehend von einem ersten Konzeptstamm mit etabliertem enzymatischen Syntheseweg, hin zur fertigen, voll optimierten Zell-Fabrik, sind dabei zahlreich und greifen häufig ineinander.

1.5 Produktion sekundärer Pilz- und Pflanzenstoffe

Sekundäre Metaboliten aus Pflanzen und Pilzen sind von hoher Bedeutung in der Medizin und Lebensmittelindustrie. Dabei ist die Gewinnung aus den Ursprungsorganismen häufig sowohl zeit- als auch kostenintensiv durch geringe und variable Inhaltsstoffkonzentration und umständlichere Kultivierungsmethoden, wie bspw. Psilocibin aus *Psilocybe cubensis* oder Artemisinin aus *Artemisia annua* (Paddon et al. 2013; Milne et al. 2020). *S. cerevisiae* eignet sich, durch eine schnellere Biomasseproduktion und einfacherer Handhabung im Laborumfeld, besonders für die heterologe Produktion solcher sekundärer Metaboliten. Ein häufiger Anknüpfungspunkt an den nativen Metabolismus in Hefe für die Produktion von sekundären Metaboliten (wie z.B. Artemisinin) ist der Mevalonat-Syntheseweg.

Die Terpene Limonen, Linalool und Geraniol werden jeweils in einem einzigen enzymatischen Schritt aus Geranylpyrophosphat gebildet (Abb. 6). Sie werden industriell als Duft- und Aromastoffe verwendet. Um deren Titer in Hefe zu erhöhen wurden in der Vergangenheit u.a. sowohl die Enzyme *MaLIS* und *ObGS* selbst modifiziert als auch die der vorangehenden Schlüssel-Metaboliten (tHmg1 und FPP-Synthase^{*}) (Denby et al. 2018). Die tHmg1 ist ein verkürztes Enzym ohne Feedback-Inhibierung durch Zwischenprodukte des Mevalonatwegs und die Mutante FPP-Synthase^{*} besitzt eine verringerte Prozessivität von Geranylpyrophosphat (GPP) zu Farnesylpyrophosphat (FPP), wodurch der Pool nutzbarer Substrate für die Produktion von Limonen, Linalool und Geraniol erhöht wird (Ignea et al. 2014).

Das Terpen β -Carotin hat, neben seinem Wert als Lebensmittel-Inhaltsstoff, medizinisches Potential als Antioxidans und krebstherapeutisches Mittel (Palozza und Krinsky 1992; van Poppel und Goldbohm 1995; Machlin 1995). Es wird in vier enzymatisch katalysierten Schritten aus FPP gebildet (Abb. 6). Die hierzu verwendeten Enzyme stammen aus *Xanthophyllomyces dendrohrous* und werden über ein polycistronisches Konstrukt auf einem Plasmid in *S. cerevisiae* exprimiert (Beekwilder et al. 2014). Bisherige Versuche die Produktion von β -Carotin zu steigern umfassten bspw. Enzymfusionen (Rabeharindranto et al. 2019) und die optogenetische Kontrolle von Erg9, einer Squalen-Synthase die mit *XdCrtE* um FPP konkurriert (Duplus-Bottin et al. 2020).

Gibberellinsäure oder auch Gibberelline sind eine Gruppe von Pflanzenhormonen, die in diesen diverse zelluläre Prozesse kontrollieren, wie Streckungswachstum, Blüte, Fruchtbildung und Keimung (Hedden und Sponsel 2015). Es kommen unterschiedliche Formen von Gibberellinen vor, darunter sind die häufigsten und bioaktivsten GA1, GA3 und GA4 (Yamaguchi 2008). Der Syntheseweg der Gibberelline beginnt am Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat bzw. FPP und wird über sechs (GA4) bzw. sieben (GA1, GA3) enzymatische Schritte gebildet (Abb. 5). In der Pflanze werden die GAs vom Rezeptor *Gid1* erkannt, der daraufhin den Transkriptionsregulator *DELLA* bindet, welcher anschließend durch das UPS (s. 1.2) abgebaut wird (Sun 2010). Hierdurch wird die Expression verschiedener Gene der GA-Antwort (bspw. Streckungswachstum (Lucas et al. 2008) gestartet.

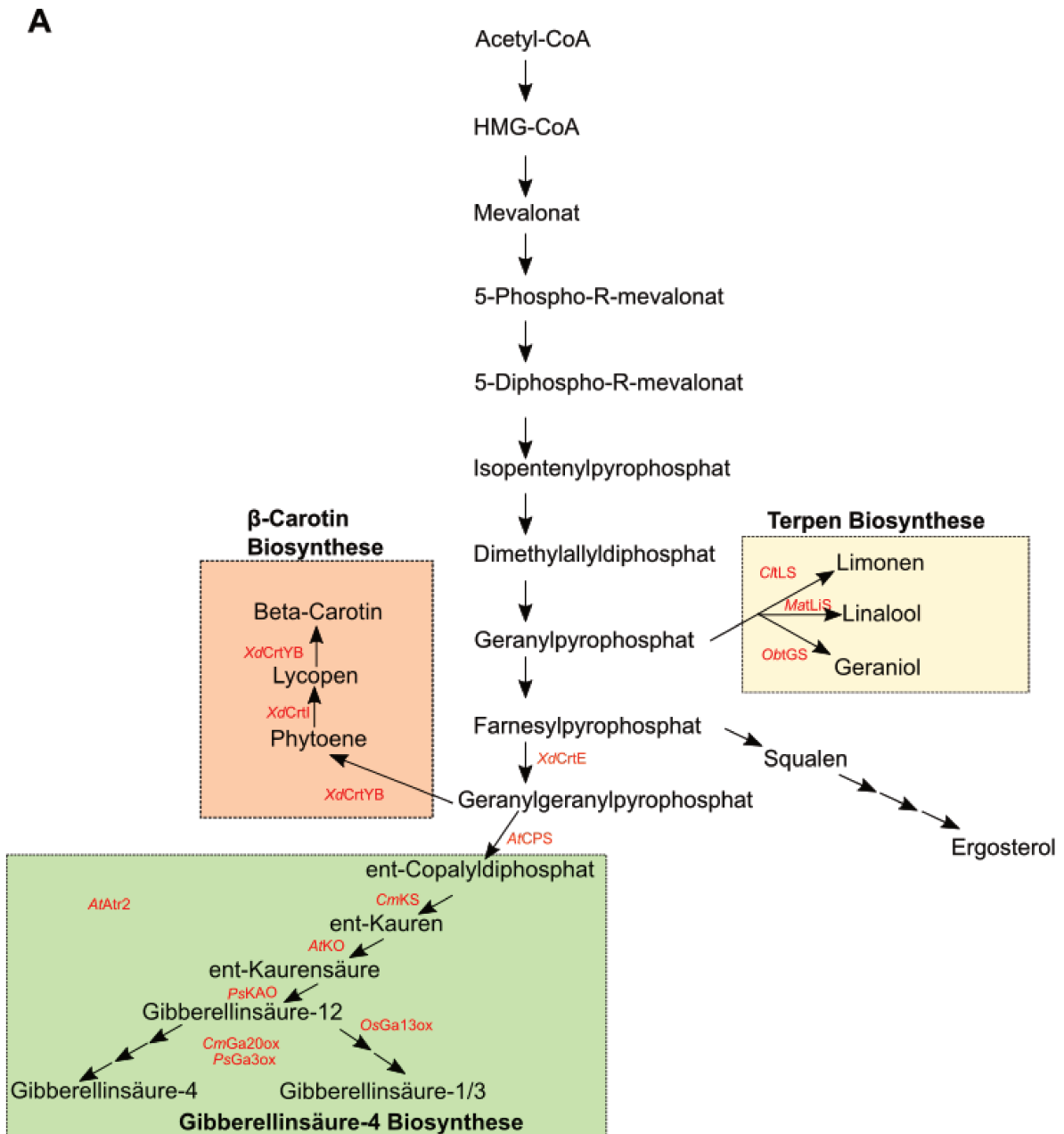


Abb. 6: Schema des Mevalonat-Stoffwechselwegs und der heterologen Synthesewege biotechnologisch interessanter Moleküle. A) Schematische Darstellung des Mevalonatwegs von Acetyl-CoA hin zu Ergosterol, sowie abzweigender heterologer Stoffwechselwege. Alle nicht für *S. cerevisiae* nativen Enzyme wurden hierbei in rot dargestellt. I B) Schematische Darstellung des Stoffwechselweges zu Cordycepin ausgehend von Adenosin. Dieses wird mit Hilfe von Cns3 in 3'-AMP umgewandelt, welches wiederum durch Cns2 in 2'-carbonyl-3'-deoxyadenosin weiter umgesetzt wird, bis in einem letzten Schritt Cns1 die Reaktion in Richtung das Endprodukt Cordycepin katalysiert. Eine Alternative Quelle von 3'-AMP bietet die RNA-Degradation.

Keine der Gibberellinsäuren wurde bisher in Hefe synthetisiert, wengleich einige Enzyme des Synthesewegs bereits einzeln exprimiert wurden. Gibberellinsäure kann primär aus

Pflanzenmaterial gewonnen werden, wird im industriellen Maßstab jedoch aus dem namensgebenden Pilz *Gibberella fujikuroi*, sowie dem verwandten Pilz *Fusarium moniliforme* gewonnen (Oliveira et al. 2017; Shukla et al. 2005). In der Landwirtschaft werden Gibberelline eingesetzt, um bspw. kernlose Trauben zu produzieren. Pflanzen, die auf Grund von Mutationen keine Gibberellinsäure synthetisieren können, weisen ein Zwergwachstum auf. Diese Sorten sind ebenfalls für die Landwirtschaft von Interesse, da so kompaktere Pflanzen entstehen, die weniger vegetative Masse und mehr Frucht bilden.

Cordycepin ist ein pilzlicher Inhaltsstoff, welcher unter anderem in *Cordyceps militaris* enthalten ist und aus diesem gewonnen werden kann (Cunningham et al. 1950; Lu et al. 2019). Auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Adenosin weist es zytotoxische Eigenschaften auf, da es in mRNA eingebaut werden kann und so zu einem Abbruch der Transkription führt (Kondrashov et al. 2012). Es wird über drei Gene aus Adenosin gebildet, in *S. cerevisiae* kann das erste Zwischenprodukt 3'-AMP auch beim Abbau von RNA entstehen (Abb. 6B) (Xia et al. 2017; Welter und Elazar 2015; Huang et al. 2015).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Die Mechanismen der Proteindegradation zur Proteinqualitätskontrolle und Regulation der Proteostasis ist ein wichtiger Bestandteil der Regulationsnetzwerks der eukaryotischen Zelle. Zentrale Bestandteile wie das UPS und ERAD sind essentiell für die Lebensfähigkeit der Zelle. Die Analyse dieser Prozesse ist daher von hoher Bedeutung. In dieser Arbeit sollte ermittelt werden, ob der Abbau von den drei ER-Membranproteine Sec61, Sec62 und Sec66, jeweils markiert mit einem psd-Modul, Komponenten des UPS und ERAD-C benötigt.

Bisherige Unternehmungen zur Steuerung der Zelle über Licht haben das enorme Potential von optogenetischen Werkzeugen in der Biotechnologie gezeigt. Deshalb wurde in dieser Arbeit weiterhin der Nutzen von optogenetischen Modulen zu Arretierung des Zellzyklus und Stopp der Proteinsekretion für die Biotechnologie untersucht. Ein potentieller Effekt dieser Module wurde anhand der erhaltenen Titer verschiedener heterolog produzierter sekundärer Pflanzenstoffen aus dem Mevalonatweg gemessen. Weiterhin wurden die Synthesewege dreier Terpene etabliert, um die Wirkung der optogenetischen Werkzeuge in einem erweiterten Kontext zu testen. Als ein weiteres Produkt sollte der Syntheseweg der drei Gibberellinsäuren GA1, GA3 und GA4 in Hefe etabliert werden. Hierzu sollten die benötigten Enzyme in geeignete Expressionsvektoren kloniert, ihre Expression getestet, und in einem finalen Produktionsstamm assembliert werden.

2. Ergebnisse

Im Zuge dieser Arbeit wurden unterschiedliche optogenetische Experimente durchgeführt, um zelluläre Prozesse besser analysieren und ihre Hintergründe beleuchten zu können. Dies beinhaltet zum einen die Untersuchung des Endoplasmatischen Reticulum assoziierten Degradationswegs (ERAD) im Abbau von Membranproteinen, und zum anderen der Nutzen des photosensitiven Degron im biotechnologischen Einsatz zur Ausbeutesteigerung eines biosynthetisch hergestellten Endprodukts.

2.1 Analyse der Degradationsmechanismen von synthetischen ERAD-Substraten

2.1.1 Sec61-psd, Sec62-psd und Sec66-psd sind synthetische Substrate des ERAD-C Degradationswegs

Die Proteine Sec61, Sec62 und Sec66 sind Teil unterschiedlicher ER-Membran Komplexe, welche für den Import von Proteinen in das ER verantwortlich sind. Sie selbst befinden sich in der ER-Membran und besitzen eine unterschiedliche Anzahl an Transmembranregionen: Sec61 besitzt mit zehn Transmembrandomänen die meisten, gefolgt von Sec62 mit zwei und Sec66 mit einer Einigen. Bei Sec61 und Sec62 befinden sich sowohl N- als auch C-Terminus der Proteine auf der cytosolischen Seite, wogegen der N-Terminus von Sec66 sich im ER-Lumen und der C-Terminus im Cytosol befindet. Um zu untersuchen, ob ein Abbau durch das photosensitive Degron (psd) möglich ist und eine mögliche Abhängigkeit von der Anzahl der Transmembranregionen beurteilen zu können, wurden die drei Proteine jeweils am C-Terminus mit dem psd-Modul und einem Myc-tag markiert. Nach Inkubation in Blaulicht und Zugabe von Cycloheximid konnte ein rascher Abbau der Proteine mit Halbwertszeiten von unter 1 min im Gegensatz zu über 18 min im Dunkeln (Abb. 7) festgestellt werden (Scheffer et al. 2019).

Da es sich bei Sec61 / Sec62 / Sec66 um ER-Membranproteine handelt und sich das Degron am C-Terminus, und damit im Cytosol befindet, war anzunehmen, dass beim Abbau die ERAD-C Degradationsmaschinerie zum Einsatz kommt. In weiteren Experimenten wurde die Abhängigkeit des blaulichtabhängigen Abbaus von Sec61-3myc-psd und Sec66-3myc-psd von der ERAD E3-Ubiquitinligase *Ssm4* untersucht. Hierzu wurde die Zellkultur mit Cycloheximid als Translationsinhibitor behandelt und anschließend Blaulicht ausgesetzt ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Ein Western-Blot ergab dabei eine deutliche Stabilisierung von Sec61-3myc-psd und Sec66-3myc-psd im *ssm4Δ*-Stammhintergrund über die gemessene Dauer von 30 min und ein rascher Abbau im Blaulicht im WT-Hintergrund (Abb. 8A/B).

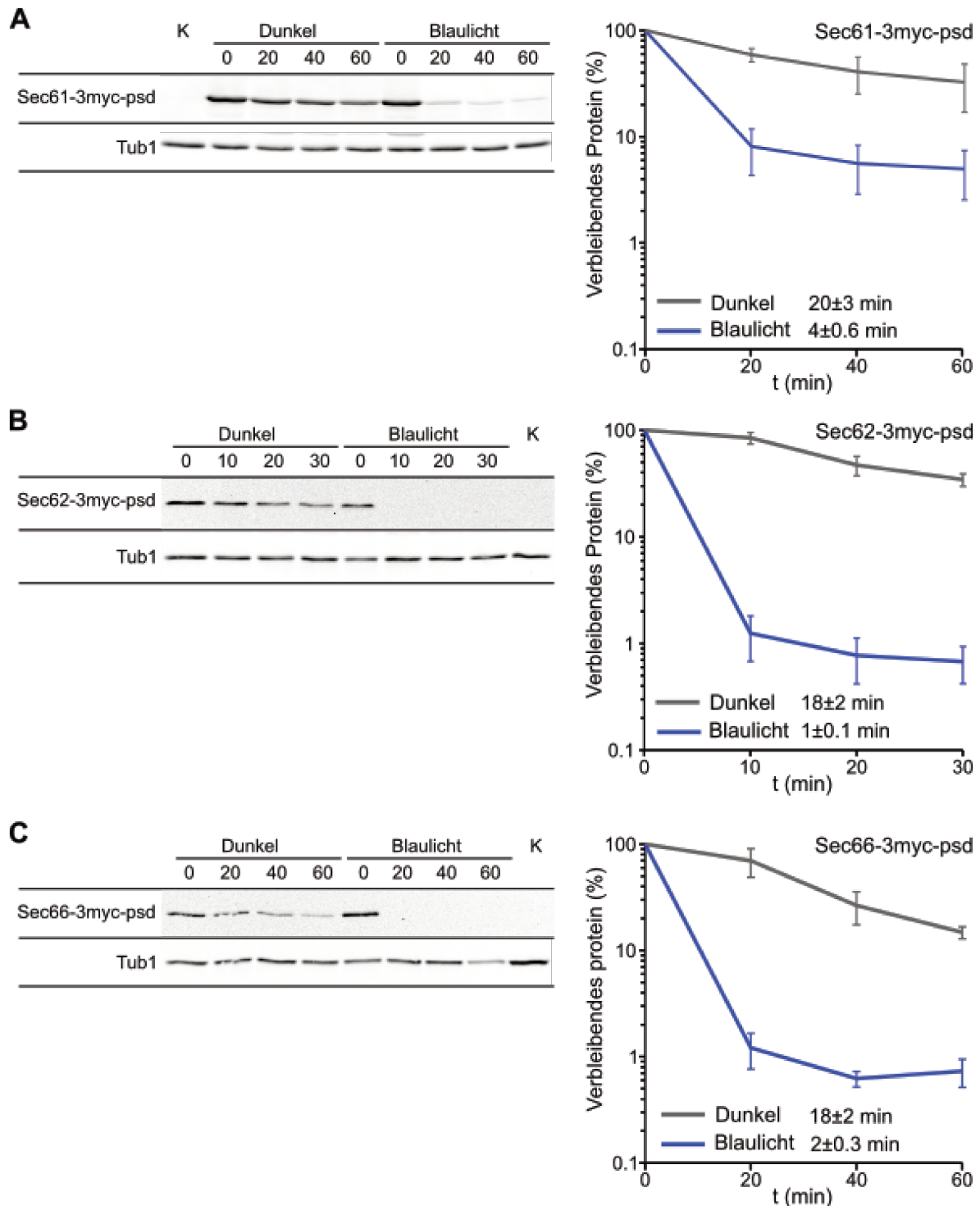


Abb. 7: Degradationsanalysen von Sec61-3myc-psd, Sec62-3myc-psd und Sec66-3myc-psd. (abgeändert nach Scheffer *et al.*, 2019, Arbeiten durchgeführt von Daniela Störmer) Verwendet wurden die Stämme K=Sub62 als Ladekontrolle, Sec61-3myc-psd=YDS462, Sec62-3myc-psd=YDS174, Sec66-3myc-psd=YDS189. In A) wird der Abbauverlauf des synthetischen Konstrukts Sec61-3myc-psd nach Dunkelinkubation/Blaulichtbeleuchtung (465nm, $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und Zugabe von 2 mg Cycloheximid zur Kultur dargestellt. Es wurde jeweils nach 0, 10, 20 und 30 min eine Probe entnommen, zur weiteren Analyse Proteine extrahiert und per SDS-Page und Western-Blot analysiert. Die Detektion von Sec61-3myc-psd erfolgte mittels eines Anti-Myc Antikörpers und zur Kontrolle der Proteinmenge mittels eines Anti-Tub1 Antikörper. Neben dem Graph ist ein Beispiel-Blot gezeigt, der Graph selbst zeigt das per „Fiji“ (Schindelin *et al.* 2012) quantifizierte Signal aus vier Blots (Fehlerbalken=Standardfehler). Abschnitt B) zeigt die Degradationskinetik von Sec62-3myc-psd im Dunkeln und im Blaulicht. Das Experiment wurde analog zu Abb.7A durchgeführt. Abschnitt C) zeigt die Degradationskinetik von Sec66-3myc-psd im Dunkeln und unter Blaulicht. Das Experiment wurde analog zu Abb.7A durchgeführt.

Dies weist auf eine Beteiligung der Ubiquitinligase Ssm4 beim psd-vermittelten Abbau hin. Gleiches konnte für Sec62-3myc-psd festgestellt werden (Scheffer et al. 2019). Um die Funktionsfähigkeit von Sec61-3myc-psd und Sec62-3myc-psd zu untersuchen, wurde die Prozessierung der Carboxypeptidase Y (CPY) näher betrachtet.

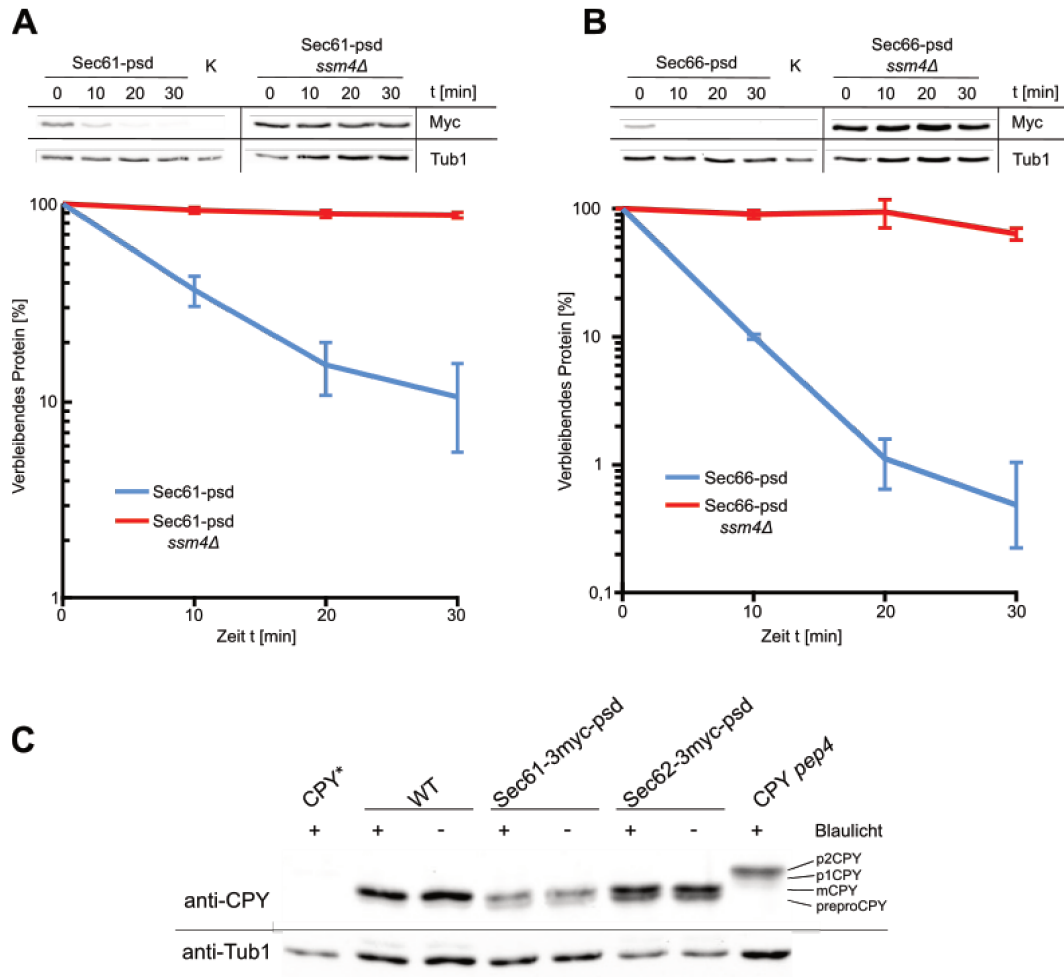


Abb. 8: Degradations- und Funktionalitätsanalysen von Sec61-psd, Sec62-psd und Sec66-psd. In A) wird der Abbauverlauf des synthetischen ERAD-C Substrats Sec61-psd im Wildtyp und *ssm4Δ*-Stammhintergrund nach Blaulichtbeleuchtung (465nm, $30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) und Zugabe von 2 mg Cycloheximid zur Kultur dargestellt, um die Abhängigkeit des Abbaus von Ssm4 zu analysieren. Verwendet wurden die Stämme K=MHY500 als Ladekontrolle, Sec61-psd=YDS462, Sec61-psd *ssm4Δ*=YJS1. Es wurde jeweils nach 0, 10, 20 und 30 min eine Probe entnommen, zur weiteren Analyse Proteine extrahiert und per SDS-Page und Western Blot analysiert. Die Detektion von Sec61-3myc-psd erfolgte mittels eines Anti-Myc Antikörpers und zur Kontrolle der Proteinmenge mittels eines Anti-Tub1 Antikörpers. Über dem Graph ist ein Beispiel-Blot gezeigt, der Graph selbst zeigt das per „Fiji“ quantifizierte Signal aus vier Blots (Fehlerbalken=Standardfehler). Abschnitt B) zeigt die Degradationskinetik von Sec66-psd im Wildtyp und *ssm4Δ*-Stammhintergrund. Verwendet wurden die Stämme K=MHY500, Sec66-psd=YDS189 und Sec66-psd *ssm4Δ*=YJS2. Das Experiment wurde analog wie in Abb.4A beschrieben durchgeführt. Abschnitt C) zeigt eine Western-Blot-Analyse zur Maturierung der Carboxypeptidase Y (CPY) im Sec61-3myc-psd und im Sec62-3myc-psd Stammhintergrund. Verwendet wurden die Stämme: CPY*=W303-1C, WT=MHY500, Sec61-3myc-psd=YDS462, Sec62-3myc-psd=YDS225 und CPY *pep4*=YFP338. Diese wurden, wie angegeben, entweder in Dunkelheit oder in Blaulicht inkubiert und anschließend Proteine extrahiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot mit Hilfe eines Anti-CPY-Antikörpers weiter analysiert. Markiert sind die verschiedenen Maturierungsstufen von CPY: p2CPY (69 kDA), p1CPY (67 kDA), mCPY (61 kDA) und preproCPY (60 kDA).

Hierzu wurde ebenfalls ein Western-Blot durchgeführt, in dem CPY mit seinen unterschiedlichen Prozessierungsformen mittels CPY-spezifischem Antikörper detektiert wurde. Die CPY wird zunächst im Cytosol als *preproCPY* (Molekulargewicht: 60 kDA) translatiert und anschließend posttranslational in das ER transportiert. Dort wird die Signalsequenz abgeschnitten und das gesamte Protein glykosyliert, wodurch die Vor-Form p1CPY (67 kDA) entsteht (Hirsch et al. 1988). In weiteren Schritten werden weiterhin im Golgi-Apparat diese Zuckerreste weiter modifiziert, dies führt zur p2CPY Form (69 kDA). Letztlich kommt es zur finalen Prozessierung in der Vakuole zum maturierten mCPY (61 kDA) durch die Proteolyse. Der Import ins ER ist hierbei u.a. vom Sec61-Komplex abhängig, wodurch eine mangelhafte Funktion durch das *psd*-Modul zu einer erhöhten Menge der frühen Prozessierungsform *preproCPY* führen müsste. In der Western-Blot-Analyse in Abb. 8 C erkennt man zunächst, dass im Stamm mit der fehlerhaften CPY* kein Signal gemessen werden kann, da diese sofort abgebaut wird. Der Wildtyp indessen, zeigt sowohl leichte Mengen *preproCPY*, als auch größere Mengen voll maturiertes mCPY im Dunkeln und im Blaulicht. Gleiches gilt für die Stämme mit Sec61-3myc-*psd* und Sec62-3myc-*psd*, wobei die Proteinmengen insgesamt geringer sind. Sowohl im Dunkeln als auch nach Blaulichtinkubation sind die Vorform *preproCPY* als auch die fertig prozessierte mCPY zu finden, wobei die Menge an *preproCPY* im Vergleich zum Wildtyp zugenommen hat. Im *pep4Δ* Kontrollstamm waren derweil erwartungsgemäß nur die beiden Formen p1CPY und p2CPY zu finden, da ohne die Protease eine weitere Verarbeitung zu mCPY nicht möglich war.

Der *psd*-abhängige Abbau von Sec61-3myc-*psd* und Sec62-3myc-*psd* scheint also nicht stark genug zu sein, um die Funktionalität des Proteins komplett aufzuheben bzw. scheint nur eine geringe Menge an Sec61-3myc-*psd* und Sec62-3myc-*psd* ausreichend für den ER-Import von *preproCPY* zu sein. Somit ist aber vor allem festzuhalten, dass Sec61-3myc-*psd* und Sec62-3myc-*psd* prinzipiell funktional zu sein scheinen, wenngleich ihre Funktionalität etwas eingeschränkt ist. Passend hierzu haben Tests zur Überlebensfähigkeit der Zellen unter Blaulichteinwirkungen und Dunkelheit ebenfalls gezeigt, dass die Zellen im Dunkeln Wachstum zeigten, wohingegen sie im Blaulicht dieses komplett eingestellt haben (Scheffer et al. 2019).

2.1.2 Die Ubiquitin-Protein Ligase Ssm4 ist am Abbau von Erg9-*psd* beteiligt

Neben den Membranproteinen Sec61/62/66-*psd* wurde weiterhin der Abbau von *Erg9-*psd** näher betrachtet. Erg9 ist die Squalen-Synthase der Bäckerhefe und als solche ein beliebtes Ziel für den gezielten Abbau, zur Verbesserung des Metabolitfluss durch die Akkumulation von FPP

(vgl. Abb. 6). Dadurch steht dieses zentrale Zwischenprodukt vermehrt den heterologen Synthesewegen zur Verfügung, die mit dem Ergosterolweg konkurrieren. Entsprechend wurde der Abbau von Erg9-psd unter Blaulichteinwirkung untersucht. Eine Reduktion der Erg9 Proteinmenge konnte ebenfalls festgestellt werden (Doktorarbeit Jonathan Trauth, 2021). In dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit der psd-bedingten Erg9-Proteindegradation von Ssm4 untersucht. Analog zum Versuch mit Sec61/66-psd wurde der Abbau von Erg9-psd im WT- und *ssm4Δ*-Stammhintergrund nach Zugabe von Cycloheximid mittels Western-Blot untersucht. Hierbei ergaben sich ähnliche Ergebnisse: So fiel die Proteinmenge bereits nach 10 min auf rund 30 % der Ausgangskonzentration, blieb jedoch auf diesem Niveau stabil (Abb. 9 A).

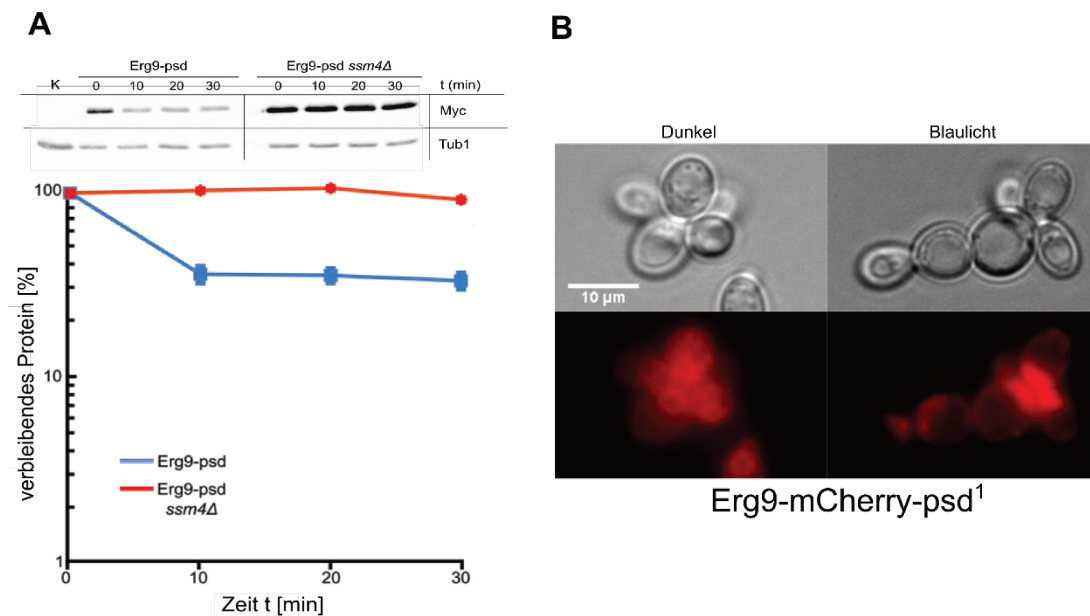


Abb. 9: Western-Blot- und Mikroskopie-Analyse der Degradation von Erg9- psd. Abschnitt A) zeigt die Degradationskinetik von Erg9-3myc-psd im Wildtyp und *ssm4Δ*-Stammhintergrund. Verwendet wurden die Stämme K=S288c, Erg9-psd= YSH3 und Erg9-psd *ssm4Δ*=YJS4. Das Experiment wurde analog zu Abb.6A durchgeführt (Fehlerbalken=Standardfehler, n=3). B) Mikroskopie-Analyse von Erg9-mCherry-psd (=YDS440). Die Zellen wurden hierfür zunächst in LFM angezogen und in der logarithmischen Phase in Blaulicht (465 nm, $30\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) bzw. Dunkelheit weitere 30 min inkubiert und anschließend im RFP- und Durchlichtkanal untersucht. Im RFP-Kanal wurde jeweils ein Bildstapel (12 Stück, Abstand $0,5\mu\text{m}$) des gleichen Ausschnitts angefertigt und anschließend mittels „Fiji“ in einem Z-Projektion miteinander vereint. Der Größenstandard entspricht $10\mu\text{m}$, Belichtungszeiten waren bei allen Aufnahmen je Kanal gleich und es wurde ein 40x Objektiv verwendet.

Im *ssm4Δ*-Stamm jedoch blieb die verbleibende Proteinmenge von Erg9-psd konstant über 30 min. Angesichts des unvollständigen Abbaus von Erg9-psd stellte sich die Frage, ob die restlichen 30 % des Proteins innerhalb der Zelle akkumulieren und wie ihr Abbau behindert wird. Um dies zu überprüfen, wurden der Stamm YDS440 (*ERG9-mCherry-psd*) ebenfalls nach Zugabe von Cycloheximid und 30 min Blaulichtinkubation bzw. Dunkelheit im Mikroskop analysiert. Wie man in Abb. 9 B) erkennt, lokalisierte Erg9-mCherry-psd im Dunkeln in der ER- und Nukleus-Membran. Nach der Beleuchtung war der meiste Teil davon abgebaut und

ein Rest verbleibt in der Membran. Demnach akkumuliert das Protein nicht, sondern ist weitestgehend in der Membran verteilt. Ein *psd*-abhängiger Abbau von *Erg9* ist demnach möglich, wenngleich unvollständig. Weiterhin konnte auch hier eine Abhängigkeit der Degradation von der ERAD-C E3-Ubiquitin-Protein Ligase Ssm4 beobachtet werden.

2.1.3 Ubiquitinabhängigkeit der *psd*-induzierten Proteindegradation

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Abbau von Sec62-3myc-*psd* maßgeblich von den Komponenten der Ubiquitlierungsmaschinerie des ERAD abhängt. So wird das Protein vollständig in Abwesenheit von UBC6/7, zwei mit Ssm4 interagierenden E2s, stabilisiert (Scheffer et al. 2019). Zum Vergleich zur Ubiquitinabhängigkeit der Degradation von löslichen *psd*-markierten Proteinen wurde ein weiterer *Cycloheximid Chase* durchgeführt. Hierzu wurde die Stabilität von tagRFP-*psd* nach erfolgtem Hitzeschock in einem *uba1^{ts}*- und im JD47-WT-Hintergrund überprüft. Uba1 ist ein E1-Ub-aktivierendes Enzym. Hierbei ergab sich eine leichte Stabilisierung von tagRFP-*psd* im *uba1^{ts}*-Stamm im Vergleich zum Wild-Typ (Abb 10A.).

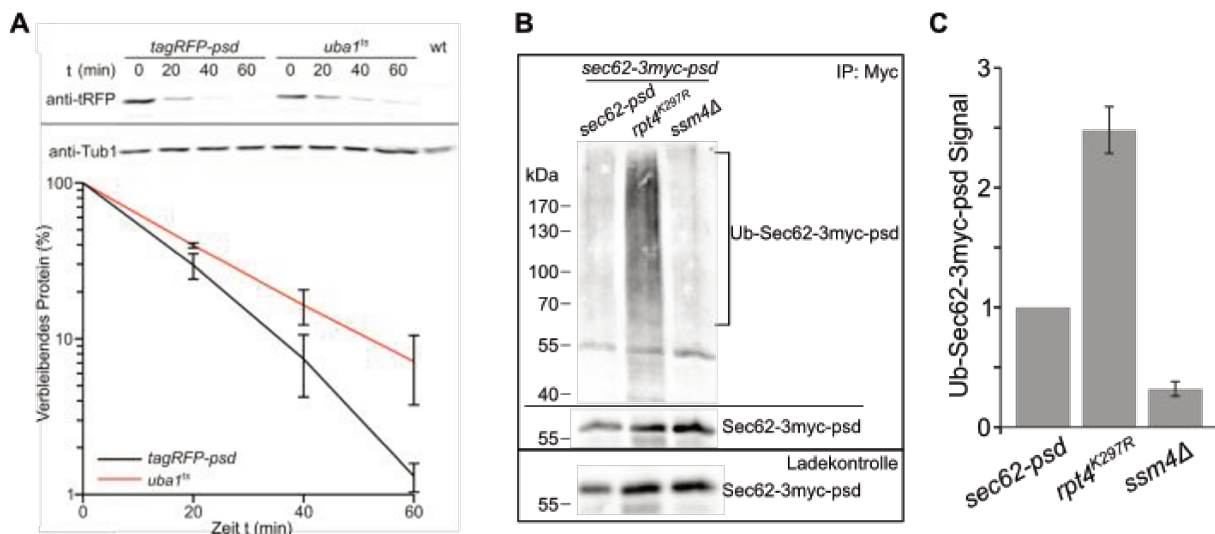


Abb. 10: Analyse der Ubiquitinierungsabhängigkeit der Proteindegradation. A) *Cycloheximid Chase* zur Untersuchung der Stabilität des löslichen *tagRFP-psd* in den Stämmen JD47 + pCT334 (*tagRFP-psd*), JD77 + pCT334 (*uba1^{ts}*) und wt (JD47). Diese wurden nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase für eine 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit Blaulicht beleuchtet, wobei nach 0, 20, 40 und 60 min Proben entnommen wurden. Anschließend wurde wie in Abb. 7 beschrieben weiterverfahren. Die gezeigten Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei Messungen, die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Über dem Graph ist ein Beispielblot mit dem Anti-tRFP-Signal und der Tub1-Ladekontrolle gezeigt. B) Dargestellt ist ein Western-Blot der Immunopräzipitation von Sec62-3myc-*psd* mittels Anti-Myc beschichteten Agaroseperlen nach einer kurzen Blaulichtbeleuchtung (465nm, 30 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) von 1 min aus den Stämmen *sec62-psd*=YDS232, *rpt4^{K297R}*=YDS230 und *ssm4Δ*=YDS249. Hierbei wurden zunächst die Proteine extrahiert, Sec62-3myc-*psd* mithilfe von Anti-Myc beschichteten Agaroseperlen aus dem Extrakt aufgereinigt und anschließend weiter mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Das Ubiquitin wurde durch einen Ub-Antikörper detektiert, das Myc-Signal durch einen Anti-Myc-Antikörper. Zur Referenz ist darunter ist der Immunoblot des Zelllysats vor der Aufreinigung mit dem Myc-Signal gezeigt. C) Quantifizierung des Ub-Signals aus B) mittels „Fiji“ normalisiert auf die extrahierte Menge Sec62-3myc-*psd*. Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert aus vier biologischen Replikaten und die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Zuvor wurde postuliert, dass das ODC-degron im psd-Modul ubiquitinunabhängig vom Proteasom erkannt und abgebaut wird (Renicke et al. 2013). Der Abbau eines löslichen, cytosolischen psd-Moduls ist jedoch wohl nicht komplett unabhängig von der Ubiquitinierungsmaschinerie. Jedoch fiel der Effekt geringer aus, als für das ERAD-Substrat Sec62-3myc-psd (Scheffer et al. 2019). Um zu prüfen ob Sec62-3myc-psd auch wirklich ubiquitiniert wird, oder ob die Ubiquitinierungsfaktoren andere, indirekte Funktionen erfüllen, wurde eine Immunopräzipitation des Proteins nach einer kurzen Blaulicht-Inkubation durchgeführt. Dabei konnte eine eindeutige Polyubiquitinierung des extrahierten Sec62-3myc-psd in allen drei getesteten Stämmen festgestellt werden (s. Abb. 10 B). Die stärkste Ubiquitinierung fand im *rpt4^{K297R}* Stamm statt, in dem der Abbau des Proteins durch die fehlerhafte ATPase gestört ist. Indes lag im Wildtyp-Stammhintergrund und in *ssm4Δ*-Zellen eine geringere Ubiquitinierung vor. Im Falle von Sec62-3myc-psd ist das vermutlich auf den raschen Abbau des Proteins zurückzuführen. Anhand der Quantifizierung der Ubiquitinierungsrate in Abb. 10 C) erkennt man, dass diese im *ssm4Δ* unter der des Wildtyps liegt. Dies weist auf eine tragende Rolle der E3-Ubiquitinligase bei der Degradation von Sec62-3myc-psd hin.

Weitere Analysen haben außerdem gezeigt, dass der Abbau von Sec62-3myc-psd von essentiellen Komponenten des Cdc48-Ufd1-Npl4-Komplexes abhängen. (Scheffer et al. 2019). Der Cdc48-Ufd1-Npl4-Komplex extrahiert ubiquitinierte Proteine aus der ER-Membran für den Abbau im Proteasom. In *ufd1*, *npl4* und *ubx2Δ* (dem ER-Membrananker des Komplex) Stämmen war die Stabilität von Sec62-3myc-psd jeweils signifikant erhöht.

Abschließend ist also festzustellen, dass mit Hilfe des psd-Moduls die ERAD-Membranproteine Sec61/62/66-psd und Erg9 blaulicht- und ubiquitinabhängig abgebaut werden können. Dies geschieht unter Einfluss der ERAD-C Ubiquitinierungsmaschinerie mit der E3-Ubiquitin-Protein Ligase *Ssm4* und weiteren Komponenten des Degradationswegs. Dabei kommt es zur direkten Ubiquitinierung von Sec62-psd und die Ubiquitinabhängigkeit des Abbaus ist für die Membranproteine stärker ausgeprägt als für das lösliche Protein tagRFP-psd. Dessen Abbau wies eine leichte Ubiquitinabhängigkeit auf, was der zuvor postulierten Ubiquitinunabhängigen direkten Erkennung durch das Proteasom widerspricht.

2.2 Der Einsatz von optogenetischen Modulen für die biotechnologische Nutzung

2.2.1 Optogenetische Kontrolle von Zellzyklus-Regulatoren und ERAD Komponenten zur Steigerung der β -Carotin-Ausbeute

Im Verlauf dieser Arbeit sollten verschiedene Modifikationen auf ihr Potential zur Verbesserung des metabolischen Energieflusses hin zu einem Zielprodukt aus dem Mevalonatsynthesewegs untersucht werden. Als Reporterprodukt diente hierbei β -Carotin, welches durch einen kurzen Syntheseweg und etablierte Nachweismethoden besonders geeignet ist, einen erhöhten Metabolitsfluss in den Mevalonatsynthesewegs messbar zu machen. Die für die Synthese notwendigen Enzyme aus *Xanthophyllomyces dendrohrous* (*XdCrtI*, *XdCrtYB*, *XdCrtE*) wurden in die jeweiligen Stämme von *S. cerevisiae* über das Plasmid pUDE269 (Beekwilder et al. 2014) als polycistronischer ORF eingebracht. Dabei kamen verschiedenen Stämme zum Einsatz, die zum einen Deletionen und zum anderen optogenetische Module enthielten, welche potentiell positive Auswirkungen auf die Produktion von β -Carotin haben, und damit auf den Metabolitfluss in den Mevalonatweg (s. Tab. 1).

Tab. 1: Verwendete Modifikationen und ihre potentiellen metabolischen Auswirkungen:

Teststamm	Proteinfunktion	Erwarteter Effekt
<i>hrd1Δ</i>	Ubiquitin-protein-Ligase, u.a. Abbau von Hmg2	Erhöhte FPP-Menge durch verringerten Hmg2-Abbau
<i>ubc6Δ /ubc7Δ</i>	Ubiquitin-konjugierendes Enzym, u.a. Abbau von Hmg2	Erhöhte FPP-Menge durch verringerten Hmg2-Abbau
<i>ssm4Δ</i>	E3-Ubiquitinligase, u.a. Abbau von Hmg2	Erhöhte FPP-Menge durch verringerten Hmg2-Abbau
Mcm1-psd	Transkriptionsaktivator und –Repressor, Zellzyklusregulator	Zellzyklusarrest M/G1.-Phase
Sec62-psd	Komponente des Sekretionswegs des ER	Stopp der Proteinsekretion, Zellzyklusarrest
Cdc14-psd	Proteinphosphatase, Zellzyklusregulator	Zellzyklusarrest M-Phase
Cdc48-psd	AAA-ATPase, Proteinabbau und Zellzyklusregulator	Zellzyklusarrest G2-Phase

Teststamm	Proteinfunktion	Erwarteter Effekt
Cdc28-psd	Cyclin-abhängige Kinase, Zellzyklusregulator	Zellzyklusarrest G1-/G2-Phase
Sic1 ^{4N} -psd	Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor, Zellzyklusregulator	Zellzyklusarrest G1-Phase
Clb2 ^{ADB-psd3}	Cyclin, Zellzyklusregulator	Zellzyklusarrest G2-Phase

Die 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA) Hmg2 (Paralog von Hmg1) aus Hefe ist eines der Schlüsselenzyme im Mevalonatweg und katalysiert die Reaktion von HMG-CoA zu Mevalonat, welches einer der Engpässe im Syntheseweg hin zum FPP darstellt. Die Regulation von Hmg2 geschieht über dessen Abbau durch diverse Komponenten des ERAD (Burg und Espenshade 2011), darunter die Ubiquitin-Protein-Ligase Hrd1, sowie die beiden Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc6 und Ubc7. Die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase *Ssm4* ist Teil des ERAD-C, und könnte an der Regulation von Hmg2 beteiligt sein. Daher sollte eine Deletion einer dieser Komponenten die Regulation und den Abbau von Hmg2 außer Kraft setzen und so zu einer erhöhten Umsatzrate von HMG-CoA führen, was wiederum den Fluss hin zum FPP verbessert. Einen vergleichbarer Effekt wurde bereits für eine gekürzte Version des Hmg2-Paralogs tHmg1 ohne regulatorische Domäne beobachtet und ist ein bewährtes Mittel in der Biotechnologie (Ignea et al. 2014).

Mit Hilfe optogenetischer Module sollten außerdem mehrere konditionelle Mutanten getestet werden. Hierbei wurden unterschiedliche Zellzyklusregulatoren mit dem psd-Modul markiert, wodurch diese blaulichtabhängig abgebaut werden konnten. Das Ziel dabei war, nach einer anfänglichen Wachstumsphase einen Zellzyklus-Stopp zu erreichen, wodurch eine erhöhte Menge Ressourcen für die heterologe Produktion von β -Carotin und anderen Stoffen bereitstehen könnte (Christof Taxis, interne Mitteilung). Die Ziele waren hierbei zunächst Mcm1, Cdc14, Cdc28 und Cdc48. Mcm1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher u.a. die Transkription während der G1- und M-Phase des Zellzyklus kontrolliert und für die Einleitung der DNA-Replikation benötigt wird. Sowohl Cdc14 als auch Cdc28 sind direkte Zellzyklusregulatoren und kontrollieren die Phosphorylierung verschiedener Cykline. Cdc14 ist eine Phosphatase, die Cykline der S- und M-Phase dephosphoryliert und damit inaktiviert. Dies ist eine essentielle Funktion, die bei der Einleitung des *mitotic exit network* (MEN) wichtig

ist. Der Abbau einer lichtensitive Variante von Cdc14 hat dementsprechend einen Arrest in der Anaphase zur Folge (Charles et al. 1998). Cdc28 assoziiert als die zentrale CDK während des Zellzyklus mit einer Vielzahl an Cyklinen, wodurch deren Wirken auf einzelne Zellzyklusphase beschränkt wird und der ordnungsgemäße Ablauf des Zellzyklus reguliert wird. Ein Abbau von Cdc28 führt zu einem Stopp in der jeweilig stattfindenden Zellzyklusphase (G1 oder G2) (Piggott et al. 1982; Surana et al. 1991). Cdc48 ist eine AAA-ATpase, welche in Interaktion eines größeren Komplexes die Extraktion ubiquitiniertes Proteine aus der Membran koordiniert und am Abbau unterschiedlicher Zellzyklusregulatoren, wie auch Clb2, beteiligt ist, weshalb ein psd-abhängiger Abbau einen Zellzyklusarrest in der G2 zur Folge hat (Renicke et al. 2013; Hasenjäger et al. 2019). Des Weiteren ist Cdc48 ein essentieller Bestandteil im ERAD, wodurch außerdem eine Erhöhung der Hmg1 Menge möglich ist.

Eine andere Variante dieses psd-Modul basierten Zellzyklusarrest kam im Zusammenhang mit den Zellzyklusregulatoren Sic1 und Clb2 zum Einsatz. Hierbei wurden dominant negative Allele dieser Proteine exprimiert, Δ^N Sic1-psd³ und Clb2 ^{Δ DB}-psd³, deren regulatorische Domänen entfernt wurden, weshalb sie über die WT-Abbaumechanismen nicht mehr degradiert werden können und so im Dunkeln den Zellzyklus stoppen (Renicke et al. 2013; Berset et al. 2002; Surana et al. 1993). Im Falle von Δ^N Sic1-psd³ geschieht dies in der G1-Phase und bei Clb2 ^{Δ DB}-psd³ in der G2-Phase. Im Blaulicht werden diese fehlerhaften Proteine konstant abgebaut und der Zellzyklus läuft weitgehend normal ab.

Die in Tab.1 genannten Stämme mit den oben erläuterten Modifikationen wurden mit dem Plasmid pUDE269 transformiert, was eine deutliche Orangefärbung der Kolonien bewirkte. Die Produktion von β -Carotin wurde anschließend mittels Mikroskopie, Durchflusszytometrie und HPLC analysiert.

2.2.2 Mikroskopieanalyse und Quantifizierung der β -Carotin-produzierenden Stämme

In einer ersten Untersuchung wurden die β -Carotin-produzierenden Stämme unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert und die gemessene Fluoreszenz quantifiziert. Dies diente vor allem einer Eingrenzung möglicher vorteilhafter Modifikationen für weitere Analysen. Eine genauere Quantifizierung sollte später mittels Durchflusszytometrie und HPLC geschehen. β -Carotin wurde bei 450 nm angeregt und die Emission bei 510 nm im GFP-Kanal gemessen. Untersucht wurden die Deletionsmutanten des ERAD auf einen möglichen Effekt auf die β -Carotin-Produktion. Dabei war zunächst zu erkennen, dass die β -Carotin-Fluoreszenz sehr schwach ausgeprägt war (s. Abb. 11 A).

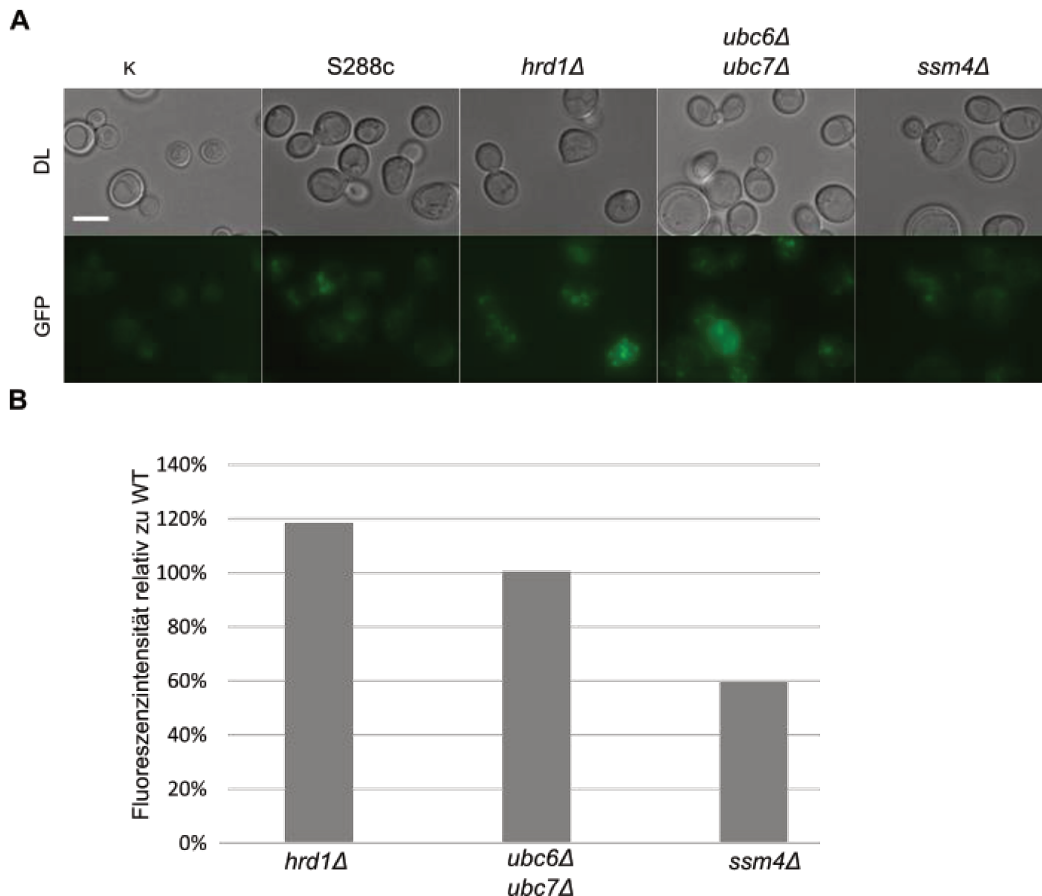


Abb. 11: Mikroskopieuntersuchung der β -Carotin-produzierenden ERAD-Mutanten und die Quantifizierung der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenz. A) Mikroskopieaufnahmen verschiedener z.T. β -Carotin-produzierender Stämme im Durchlicht- (DL) und GFP-Kanal (β -Carotin): K=S288c; S288c=S288c+pUDE269, *hrd1Δ*= YHUM1119+pUDE269, *ubc6/7Δ*= MHY552+pUDE269, *ssm4Δ*=MHY553+pUDE269. Diese wurden in LFM-Medium angezogen und anschließend bei gleicher Belichtungszeit im DL-Kanal betrachtet. Die β -Carotin-abhängige Fluoreszenz wurde im GFP-Kanal untersucht, indem je Bildausschnitt Bildstapel in einem Abstand von 0,5 μ m aufgenommen und anschließend in einer Z-Projektion miteinander fusioniert wurden. B) Quantifizierung der Fluoreszenzintensität der Stämme aus A) relativ zur β -Carotin-abhängigen Fluoreszenz im Wildtyp S288c.

Auf die Zellmorphologie im Allgemeinen hatte es jedoch keinen Einfluss, ebensowenig wie auf die Wachstumsrate der Zellen. Das β -Carotin akkumulierte innerhalb der Zelle in kleinen Tröpfchen. Eine Quantifizierung der Fluoreszenz mittels „Fiji“ ergab dabei eine leichte Erhöhung der Fluoreszenz um ~18% im *hrd1Δ* im Vergleich zum S288c Wildtyp-Stamm nach 5 h Inkubation (s. Abb.11 B). Die Doppel-Deletionsmutante *ubc6Δ / ubc7Δ* zeigte derweil keine Veränderung in der Fluoreszenzintensität und beim *ssm4Δ*-Stamm konnte eine Verringerung der Fluoreszenz gemessen werden. Dementsprechend wurde aus dieser Gruppe nur die *hrd1Δ* Mutante zur weiteren Analyse ausgewählt. Die Mutanten *ubc6Δ / ubc7Δ* und *ssm4Δ* hingegen wurden nicht weiter analysiert.

Die konditionellen Mutanten mit optogenetischen Modulen wurden für die Mikroskopieanalyse nach einer 5 h Wachstumsphase nochmals jeweils 5 h in Blaulicht (465nm, 30 μ mol*m⁻²* s⁻¹) bzw. Dunkelheit inkubiert, bevor sie im Fluoreszenzmikroskop analysiert wurden (Abb. 12 A).

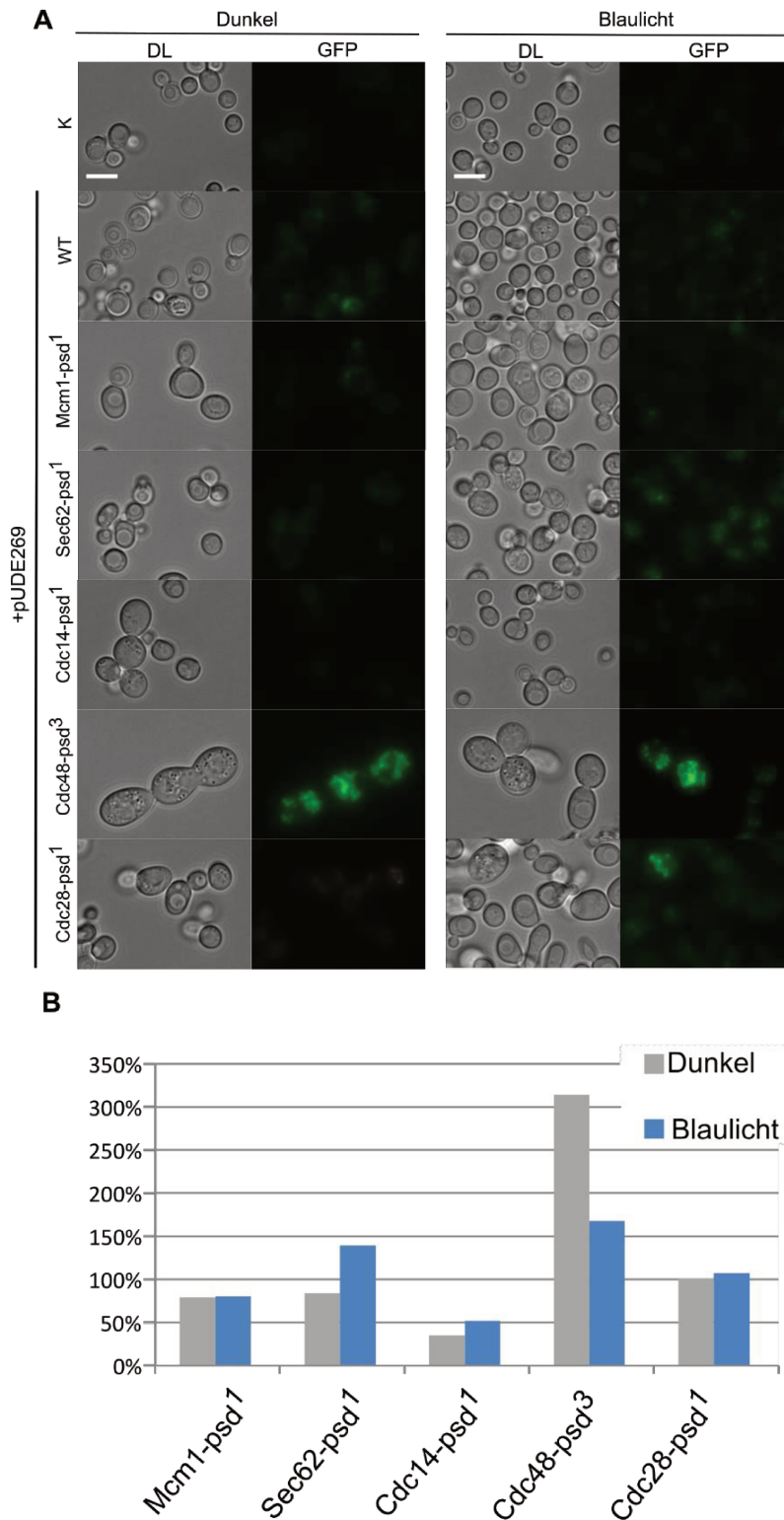


Abb.12: Mikroskopieuntersuchung der β -Carotin-produzierenden Zellzyklusarrest-Mutanten und die Quantifizierung der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenz. A) Mikroskopieaufnahmen verschiedener z.T. β -Carotin-produzierender Stämme im Durchlicht- (DL) und GFP-Kanal (β -Carotin): K=S288c; WT=S288c+pUDE269, Mcm1-psd= YDS171+pUDE269, Sec62-psd=YDS174+pUDE269, Cdc14-psd=YCR119+pUDE269, Cdc48-psd³=YDS175+pUDE269, Cdc28-psd=YDS275+pUDE269. Diese wurden in LFM-Medium angezogen und für 5 h im Dunkeln bzw. Blaulicht (465nm, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) inkubiert. In der Abbildung wurden alle DL-Bilder bei gleicher Belichtungszeit aufgenommen. Die Aufnahmen im GFP-Kanal sind eine Z-Projektion von mehreren Bildstapeln, welche in einem Abstand von 0,5 μm aufgenommen wurden. B) Quantifizierung der Fluoreszenzintensität der Stämme aus A) relativ zur β -Carotin-abhängigen Fluoreszenz im Wildtyp S288c anhand der Z-Projektionen mittels „Fiji“.

Dabei zeigte der Stamm Cdc48-psd³ eine prägnante Zellmorphologie, sowohl im Dunkeln, als nach Blaulichtinkubation (Abb. 12 A). Die Zellen waren stark vergrößert und die Knospen nicht komplett von der Mutterzelle getrennt. Mcm1-psd und Cdc28-psd zeigten ebenfalls vergrößerte Zellen nach Blaulichtinkubation, wobei der Mcm1-psd-Stamm bereits im Dunkeln diesen Phänotyp aufwies. Die Quantifizierung der Fluoreszenz, normiert auf den Wert des WT-Stamm unter den entsprechenden Lichtverhältnissen, ergab im Dunkeln eine geringere Fluoreszenzintensität in den Stämmen Mcm1-psd, Sec62-psd, Cdc14-psd. Die Stämme Mcm1-psd und Cdc14-psd zeigten in den Blaulichtproben eine geringere Fluoreszenzintensität als der WT-Stamm, wohingegen Sec62-psd einen leichten Anstieg auf rund 140 % des WT-Niveaus verzeichnete. Cdc48-psd³ derweil zeigte sowohl im Dunkeln als auch im Blaulicht eine stark erhöhte Fluoreszenz (D: ~300%; BL: 150%). Der starke Anstieg der Fluoreszenz bereits vor dem Abbau im Dunkeln ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf die grundsätzliche Instabilität der psd³-markierten Proteine zurückzuführen. Der Stamm Cdc28-psd zeigte keine nennenswerten Unterschiede in der Fluoreszenz und damit der β -Carotin-Produktion. Für weitere Analysen wurden aus diesen Kandidaten der Blaulicht-abhängigen Zellzyklus-Arrest-Mutanten nur die Stämme Cdc48-psd³ und Sec62-psd ausgewählt.

Mit Hilfe von Δ^N Sic1-psd³ und Clb2 ^{Δ DB}-psd³ können die Zellen im Dunkeln in einen Zellzyklusarrest überführt werden, während sie sich unter Blaulicht weitestgehend normal teilen können. Entsprechend wurden die Stämme zunächst für 5 h unter Blaulicht bis zum Beginn der exponentiellen Phase inkubiert und anschließend für 5 h in Dunkelheit überführt, bzw. weiter beleuchtet. Unter dem Mikroskop war zunächst die auffällige Morphologie zu erkennen (Abb. 13 A). So bildet ein Δ^N Sic1-psd³-Stamm im Dunkeln vergrößerte und langgezogene Zellen aus und Clb2 ^{Δ DB}-psd³ führt im Dunkeln zu stark vergrößerten Knospen, die nicht vollständig von der Mutterzelle getrennt werden. Sowohl im uninduzierten Zustand unter Blaulicht, als auch während des Dunkelheit-abhängigen Zellzyklus-Arrests kam es zu einer Erhöhung der β -Carotin-Produktion, relativ zum Wildtyp, wie man anhand der Fluoreszenzintensitäten erkennt (Abb. 12 B). So erreichte Δ^N Sic1-psd³ unter Blaulicht ~210% des WT-Niveaus und im Dunkeln ~167% der Fluoreszenzintensität der korrespondierenden WT-Kontrolle. Im Clb2 ^{Δ DB}-psd³-Stamm steigerte sich die Fluoreszenz nach Blaulichtinkubation auf ~310 % der Intensität des WT-Stamms und nach einem Zellzyklusarrest im Dunkeln auf 264%.

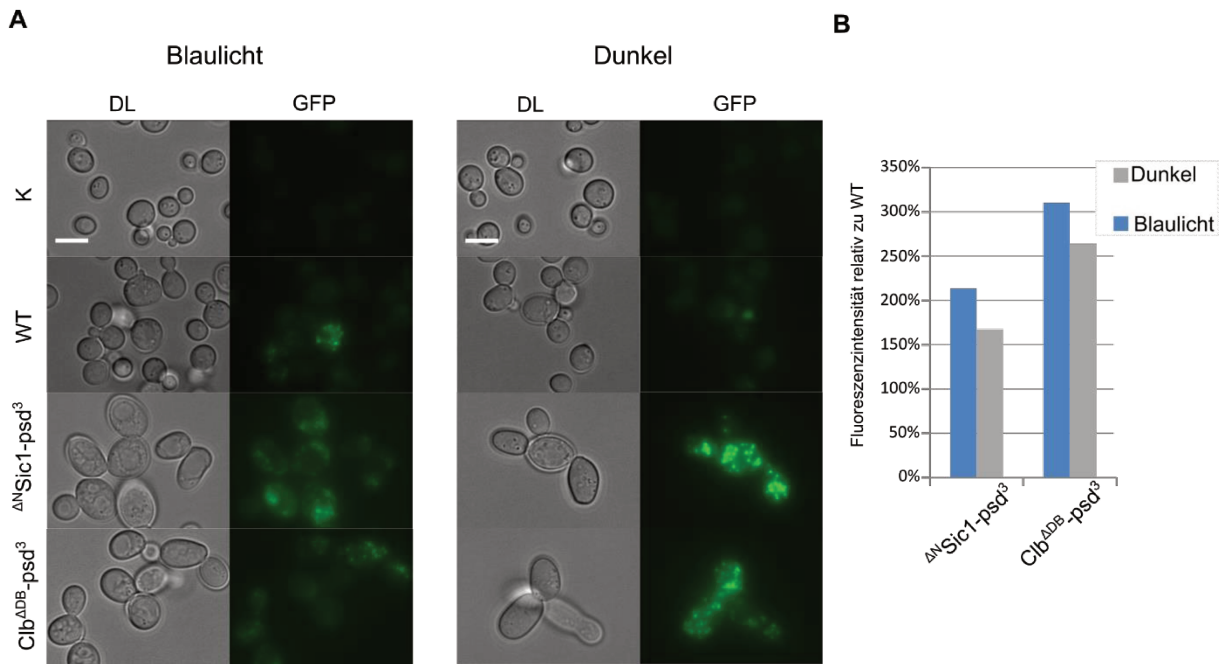


Abb.13: Mikroskopieuntersuchung der β -Carotin-produzierenden Stämme mit dominant negativen Zellzyklusregulatoren. A) Mikroskopieaufnahmen verschiedener z.T. β -Carotin-produzierender Stämme im Durchlicht- (DL) und GFP-Kanal (β -Carotin): K=S288c; WT=YDS28+pRS315+pUDE269, Δ^N Sic1-psd³=YDS28+pDS228+pUDE269, Clb^{ΔDB}-psd³= YDS28+pDS229+pUDE269. Diese wurden in LFM-Medium unter Blaulicht angezogen und für 5 h im Dunkeln bzw. unter Blaulicht (465nm, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) inkubiert. In der Abbildung wurden alle DL-Bilder bei gleicher Belichtungszeit aufgenommen. Die Aufnahmen im GFP-Kanal sind eine Z-Projektion von mehreren Bildstapeln, welche in einem Abstand von 0,5 μm aufgenommen wurden. B) Quantifizierung der Fluoreszenzintensität der Stämme aus A) relativ zur β -Carotin-abhängigen Fluoreszenz im Wildtyp S288c anhand der Z-Projektionen mittels „Fiji“.

Da sowohl Δ^N Sic1-psd³, als auch Clb2^{ΔDB}-psd³ kontinuierlich exprimiert werden und eine gewisse Restmenge auch nach Blaulichtillumination zurückbleibt, ist anzunehmen, dass die dominant negativen Allele teilweise auch unter Blaulicht die normale Zellzyklusprogression stören. Dies erklärt die stark erhöhten Fluoreszenzwerte bereits vor Einsetzen des Zellzyklusarrests.

In mehreren der untersuchten Stämme konnte eine erhöhte Fluoreszenz auf Grund von verstärkter β -Carotin-Produktion nachgewiesen werden. So führte eine Deletion von *HRD1* zu rund 20% mehr Fluoreszenz. Ebenso konnte gezeigt werden, dass ein kontrollierter Zellzyklus-Stopp bzw. Beeinflussung der Proteinsekretion durch den Abbau von Cdc48-psd³ und Sec62-psd zu erhöhten Mengen β -Carotin führt. Durch die Akkumulation der dominant-negativen Allele Δ^N Sic1-psd³ und Clb2^{ΔDB}-psd³ im Dunkeln konnte ebenfalls die Fluoreszenzintensität und somit die β -Carotin-Menge gesteigert werden. Es ist jedoch auch festzustellen, dass die konditionalen optogenetischen Mutanten bereits im uninduzierten Zustand Phänotypen aufweisen und eine teilweise starke Erhöhung der β -Carotin-Produktion hervorrufen.

2.2.2 Durchflusszytometrieanalyse β -Carotin-produzierender Stämme

Für eine genauere Analyse der ausgewählten Stämme wurden sie auf ihre Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer untersucht (Anregungslaser: 488 nm, Emissionsfilter: 530 nm). Die Analyse im Durchflusszytometer erlaubte es, deutlich mehr Zellen zu vermessen (>30000 Events) und ermöglichte außerdem eine schnellere Verarbeitung der Proben. Die gemessenen Fluoreszenzwerte waren dabei jedoch zu gering, als dass sich in einem Dot-Blot klar trennbare Populationen ausmachbar gewesen wären (vgl. 5.14, Abb. 30 C/D). Deswegen wurde die Gesamtfluoreszenz abzüglich der Fluoreszenz einer passenden Negativkontrolle, also der entsprechende Stamm ohne pUDE269, ausgewertet. Die Stämme wurden alle in *Low Fluorescent Medium* (LFM) kultiviert. Dabei wurde in LFM ein Produktionsmaximum nach 24h festgestellt (vgl. Abb. 14 A).

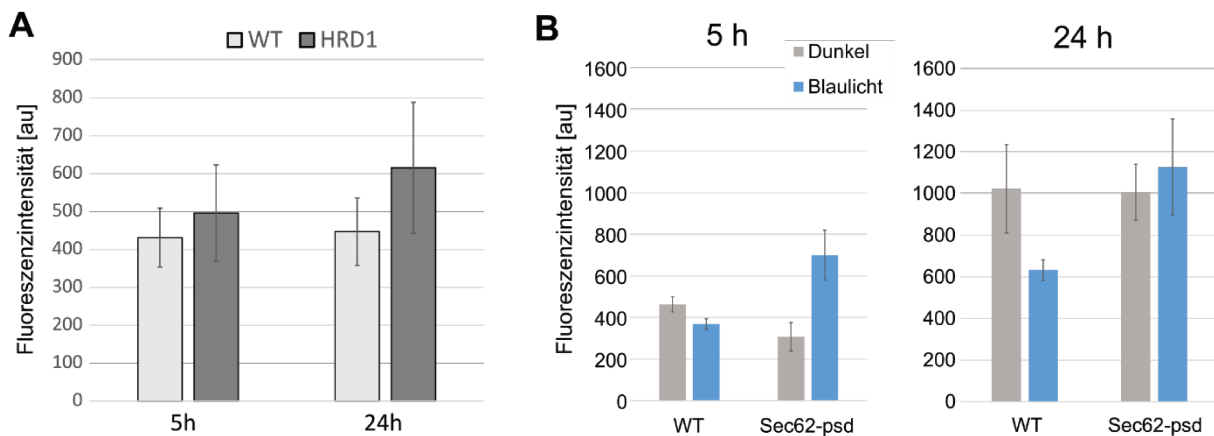


Abb. 14: Quantifizierung der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenz in verschiedenen Stämmen mittels Durchflusszytometrie. A) Quantifizierung der Fluoreszenz in den Stämmen WT= YHUM0971+pUDE269, hrd1 Δ = YHUM1119+pUDE269 nach je 5 h und 24h. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der absoluten Fluoreszenzintensität nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz, welche in einer korrespondierenden Negativkontrolle gemessen wurde. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (n=4). B) Messung der Fluoreszenzintensität analog zu B). Die verwendeten Stämme WT=S288c + pUDE269 und Sec62-psd= YDS174+pUDE269 wurden hierbei jeweils nach 5 h Wachstumsphase im Dunkeln für 5 h bzw. 24 h weiter im Dunkeln oder im Blaulicht (465nm, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) inkubiert. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (n=6).

Zunächst wurde der *hrd1Δ* Stamm im Durchflusszytometer untersucht. Nach 5 h betrug die Fluoreszenzintensität im Mittel ~500 au, also rund 20% höhere Werte als im WT-Stamm, jedoch lagen die Änderungen nicht in einem statistisch signifikanten Bereich. Nach einer weiteren Inkubation von insgesamt 24 h lag die Fluoreszenz des WT bei ~450 au und im *hrd1Δ*-Stamm bei ~610 au, was einem Anstieg von ca. 45% entsprach. Allerdings war auch hier die Streuung der Messwerte sehr groß, sodass dieser Unterschied nicht statistisch signifikant war. Die Ergebnisse der ersten Mikroskopieanalyse konnte entsprechend nicht direkt bestätigt werden, wenngleich Hinweise auf eine positive Wirkung von *hrd1Δ* gegeben sind.

Bei der Untersuchung von Sec62-psd und einer WT-Kontrolle im Durchflusszytometer fiel

zunächst auf, dass die WT-Kontrolle nach 5h in der Blaulicht-Probe eine verringerte Fluoreszenz aufwies (Abb. 14 B). Dies deutete auf einen Effekt von Blaulicht auf β -Carotin hin. Sec62-psd derweil zeigte eine deutlich höhere Fluoreszenz in der Blaulicht-Probe als in der Dunkel-Probe auf, was für einen positiven Effekt durch den Abbau von Sec62-psd sprach. Ebenso war die Fluoreszenzintensität im Vergleich zum WT (BL) deutlich um 100% erhöht ($p < 0,05$). Im Dunkeln schien der passive Effekt von Sec62-psd die Produktion von β -Carotin negativ zu beeinflussen. Diese nahm im Vergleich zum WT ab, was jedoch auch an Schwankungen der Messwerte gelegen haben könnte ($p = 0,08$). Nach 24 h stiegen die Fluoreszenzintensitäten in allen Stämmen nochmals deutlich. Dabei betrug der Fluoreszenzwert in der Blaulichtprobe des WT die Hälfte der korrespondierenden Dunkel-Probe. Im Sec62-psd Stamm zeigte die Dunkel-Probe keinen signifikanten Unterschied in der Fluoreszenz im Vergleich zum Kontroll-Stamm. Die Blaulicht-Probe hingegen zeigte im Mittel eine ähnliche Steigerung der Fluoreszenzintensität wie nach 5 h, jedoch bei stark schwankenden Werten, weswegen ein statistisch signifikanter Unterschied knapp nicht erreicht wurde ($p = 0,06$). Erneut wurde nach 24 h ein Maximal-Wert an β -Carotin-abhängiger Fluoreszenz erreicht.

Für eine genauere Analyse des Produktionsprozesses in den Stämmen Cdc48-psd, Δ^N Sic1-psd³ und Clb^{ADB}-psd³ wurde die Fluoreszenz jeweils nach 5 h, 10 h und 24 h im Dunkeln bzw. Blaulicht untersucht. Dabei wurde im Cdc48-psd³-Stamm unter Blaulicht ein Zellzyklus-Arrest durch den Abbau von Cdc48-psd³ induziert. Die Stämme Δ^N Sic1-psd³ und Clb^{ADB}-psd³ arretieren durch Akkumulation der negativ dominanten Allele der beiden Zellzyklusregulatoren hingegen im Dunkeln. Hierbei zeigte sich erneut im Cdc48-psd³-Stamm eine erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Wildtyp, sowohl nach 5 h, 10 h, als auch 24 h (Abb. 15 A). Die Fluoreszenzwerte blieben in beiden Stämmen über 10 h nahezu konstant. Im Dunkeln inkubierte Zellen zeigten nach 5 h und 10 h in beiden Stammhintergründen konstante Werte β -Carotin-abhängiger Fluoreszenz. Auffällig war die in beiden Stämmen stark reduzierte Fluoreszenz nach 24 h Blaulichtinkubation im Vergleich zu den korrespondierenden Zellen im Dunkeln. So sinkt die Fluoreszenzintensität des WT im Blaulicht auf nur noch ~50% der Intensität im Dunkeln. Eine ähnlich starke Veränderung war im Cdc48-psd³-Stamm ebenfalls zu beobachten, wenngleich nicht so stark (~ 60% des Dunkel-Niveaus) und bei hoher Varianz der Werte. Dies deutete auf einen möglichen Bleichungseffekt durch die Blaulichtinkubation hin, da auch die jeweiligen Negativkontrollen eine verringerte Autofluoreszenz aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

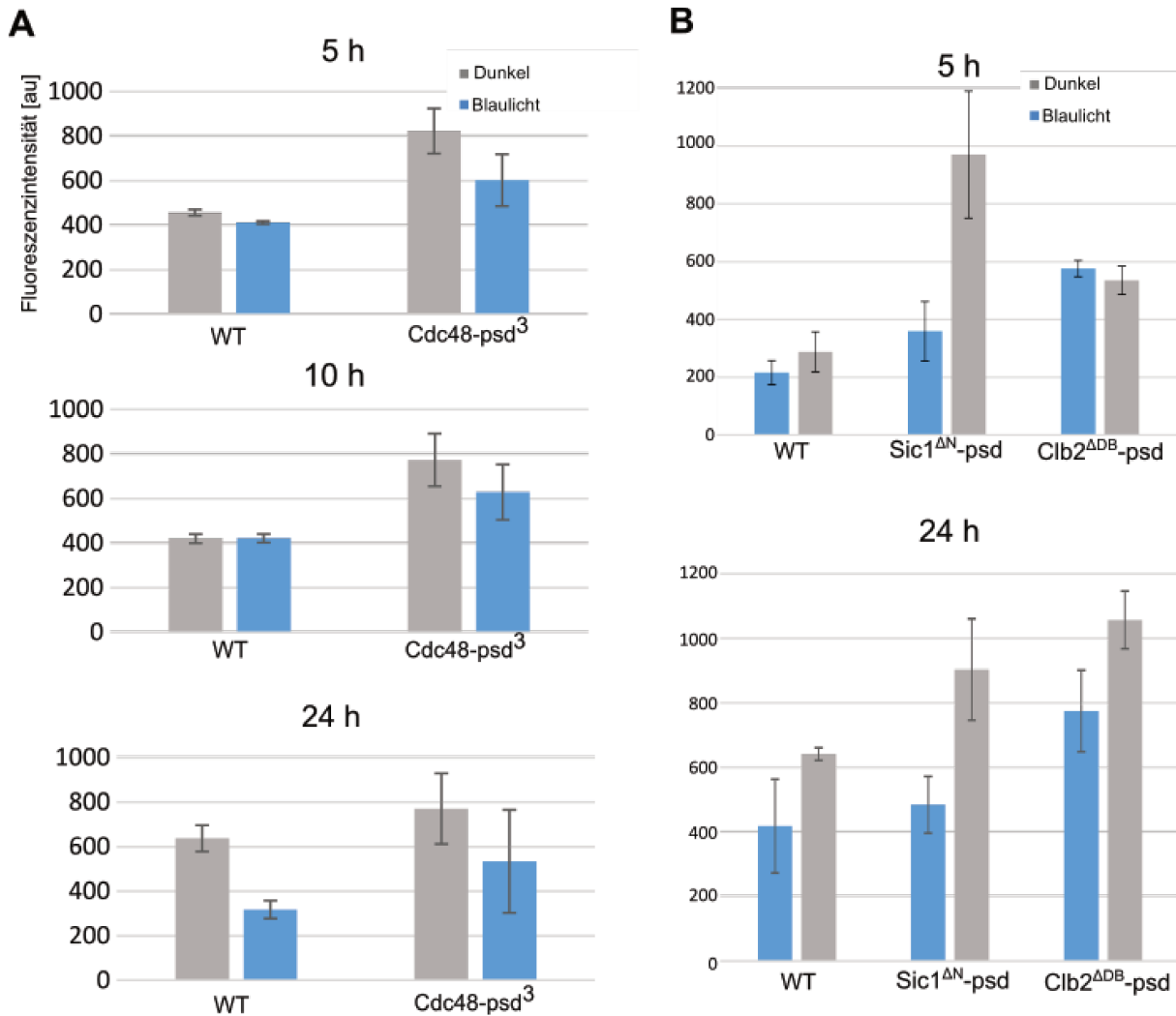


Abb. 15: Quantifizierung der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenz in verschiedenen Zellzyklus-Arrest-Mutanten mittels Durchflusszytometrie. A) Quantifizierung der Fluoreszenz in den Stämmen WT=ESM365+pUDE269, Cdc48-psd³=YSH1+pUDE269 nach je 5 h, 10 h und 24 h unter Dunkelheit bzw. Blaulicht. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der absoluten Fluoreszenzintensität nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz, welche in einer korrespondierenden Negativkontrolle gemessen wurde. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (n=4). B) Fluoreszenz-Quantifizierung analog zu A) in den Stämmen WT=YDS28+pRS315+pUDE269, Sic1^{ΔN}-psd=YDS28+pDS228+pUDE269, Clb2^{ΔDB}-psd³=YDS28+pDS229+pUDE269 nach einer 6 h Wachstumsphase unter Blaulicht (465nm, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) gefolgt von 5 h und 24 h Dunkel-Inkubation bzw. Blaulichtillumination. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (n=4; WT n=2).

Allein durch die Markierung von *CDC48* mit psd³ konnte bereits eine Steigerung der β -Carotin-Produktion, gemessen anhand der Fluoreszenz, im Dunkeln von ca. 100% sowohl nach 5 h, als auch 10 h erreicht werden. Im Blaulicht fiel die Steigerung geringer aus, mit rund 50%. Nach 24 h blieb die Fluoreszenzintensität im Cdc48-psd³-Stamm im Dunkeln konstant, wohingegen sie im WT weiter zunahm, wodurch sich der Unterschied auf ~30% verringerte. Wie bereits beschrieben, fiel die Fluoreszenzintensität in beiden Stämmen nach 24 h Blaulichtinkubation erheblich im Vergleich zum Dunkel-Wert, jedoch deutlich stärker im WT als im Mutanten-Stamm, was einen positiven metabolischen Effekt des blaulichtabhängigen Abbaus von Cdc48-psd unterstreicht. Für eine zuverlässige Quantifizierung der Steigerung war die Streuung der

Werte in *Cdc48-psd³* jedoch zu groß. Eine Steigerung der β -Carotin-Produktion durch *Cdc48-psd³* war also möglich, jedoch überwiegte der passive Effekt im Dunkeln den aktiven in Blaulicht.

Die Stämme Δ^N *Sic1-psd³* und *Clb^{ADB}-psd³* und der korrespondierende WT-Kontroll-Stamm wurden jeweils nur nach 5 h und 24 h im Durchflusszytometer untersucht. Dabei zeigte sich im WT- Stamm erneut eine Reduktion der Fluoreszenzintensität durch die Blaulichtinkubation um ca. 30% bereits nach 5 h, und weiterhin nach 24 h, im Vergleich zu den Werten nach Dunkelkultivierung (Abb. 15 B). Auch die Werte der WT Proben aus der Dunkelinkubation sind insgesamt deutlich niedriger als die WT-Werte aus Abb.15 A, was womöglich an der 5 h Blaulichtphase liegt, die im Verlauf dieses Experiments alle Stämme vor der eigentlichen Inkubation unterlaufen, damit Δ^N *Sic1-psd³* und *Clb^{ADB}-psd³* eine ausreichende Zellmenge erreichen können. Der Δ^N *Sic1-psd³*-Stamm wies im nicht induzierten Zustand im Blaulicht sowohl nach 5 h, als auch nach 24 h erhöhte Fluoreszenz auf. Nach induziertem Zellzyklus-Stopp im Dunkeln konnte die Fluoreszenzintensität nach 5 h auf ~350% des WT-Niveaus gesteigert werden. Dieser Unterschied verringerte sich nach 24 h auf noch ~140% des WT-Niveaus, da die Fluoreszenz im Wildtypstamm deutlich gestiegen war und im Δ^N *Sic1-psd³*-Stamm unverändert hoch blieb. Im *Clb^{ADB}-psd³* Stamm waren die Fluoreszenzwerte sowohl im Blaulicht als auch im Dunkeln auf dem gleichen Niveau, was in etwa ~188% der Intensität des WT entsprach. 24 h nach der Induktion stieg die Fluoreszenz weiterhin, wodurch eine Steigerung von ~60% im Vergleich zum WT im Dunkeln erhalten bleiben konnte. Auch im Blaulicht wirkte das Modul passiv vorteilhaft mit ca. 75% mehr Fluoreszenz im Vergleich zum WT im Blaulicht.

Ein durch Δ^N *Sic1-psd³* und *Clb^{ADB}-psd³* induzierter Zellzyklusarrest im Dunkeln wirkte sich also durchgehend verstärkend auf die β -Carotin-Produktion aus. Der Schaltfaktor zwischen Hell- und Dunkel-Proben wurde dabei vermutlich noch durch ein Bleichen der Zellen durch Blaulicht verstärkt. Auch im Blaulicht, also passiv vor der Induktion, konnte für beide Modifikationen bereits ein positiver Effekt festgestellt werden. Gleiches galt für *Cdc48-psd³*. So wurde sowohl passiv im Dunkeln, als auch aktiv unter Blaulichteinwirkung eine Steigerung der durch β -Carotin verursachten Fluoreszenz erzielt.

Auffällig bei den Messwerten war außerdem, dass Blaulicht selbst bereits einen negativen Effekt auf die Fluoreszenz aufwies. Weiterhin zeigte die Negativkontrolle von *Cdc48-psd³* (gleicher Stamm, ohne pUDE269) vor allem nach 24 h Blaulicht einen unerwartet hohen Fluoreszenzwert. Bei einer Analyse der Stämme unter dem Fluoreszenzmikroskop ergab sich, dass bei *Cdc48-psd³* eine große Anzahl der Zellen nach 24 h kontinuierlichem Blaulicht

($30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) eine erhöhte gleichmäßige Fluoreszenz in der ganzen Zelle aufwiesen, welche sich stark von der β -Carotin-spezifischen punktförmigen Fluoreszenz unterschied und auf tote, autofluoreszierende Zellen hinweist. Dem entgegen war bei den WT-Zellen keine nennenswerte Veränderung feststellbar (s. Abb.16 A). Die stark auto-fluoreszierenden Zellen verfälschten zum einen die Messwerte, und zum anderen verschlechterte der vermutete frühzeitige Zelltod die Produktion von β -Carotin. Hinzu kommt, dass kontinuierliches Blaulicht einen negativen Einfluss auf β -Carotin zu haben schien. Entsprechend wurde versucht die Licht-Dosis zu verringern und gleichzeitig einen vergleichbaren positiven Effekt durch die optogenetischen Module nach 24 h zu erreichen. Hierfür wurde anstatt 24 h kontinuierlicher Blaulichtinkubation eine Intervallbeleuchtung getestet, welche alternierend aus Blaulicht- und Dunkel-Phasen bestand. So wurde drei Mal in Folge zuerst 5 h Blaulicht ($30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) angeschaltet, gefolgt von einer 3 h Dunkelphase (3x 5 h Blaulicht; 3x 3 h Dunkel). Hierdurch sollte die Inkubation in eine Produktionsphase und eine „Erholungsphase“ aufgeteilt werden. Außerdem sollte auf diese Weise die Zellmasse erhöht werden, da die Zellen im Dunkeln den Zellzyklus ungestört vollenden können. Wie man in Abb. 16 B) an den Fluoreszenzwerten des WT erkennt, wurde hierdurch zunächst die Reduktion der Fluoreszenz durch Blaulicht extrem verringert. Diese sind nun im Dunkeln, wie auch nach Blaulichtintervallinkubation auf einem ähnlichen Niveau. Des Weiteren konnte der Effekt von Cdc48-psd³ auf die Fluoreszenz nochmals erheblich gesteigert werden, von zuvor ca. 200%, auf ca. 400% des WT-Niveaus der Fluoreszenzintensität in Blaulicht. Außerdem wiesen die Proben deutlich weniger Zellen auf, welche die zuvor unter kontinuierlichem Licht beobachtete gleichmäßige Fluoreszenz zeigten (Daten nicht gezeigt). In Folge dieser Erkenntnisse wurde für Cdc48-psd³ Experimenten, ab einer Inkubationsdauer von 24 h, Blaulichtintervalle verwendet. Auf Grund der vielversprechenden Ergebnisse wurden weitere Experimente mit Cdc48-psd und Npl4-psd durchgeführt. Cdc48-psd enthält eine weniger destabilisierende Variante des psd-Moduls und Npl4 ist ein essentieller Kooperationspartner von Cdc48, dessen Abbau einen ähnlichen Effekt wie der von Cdc48-psd³ zeigen sollte.

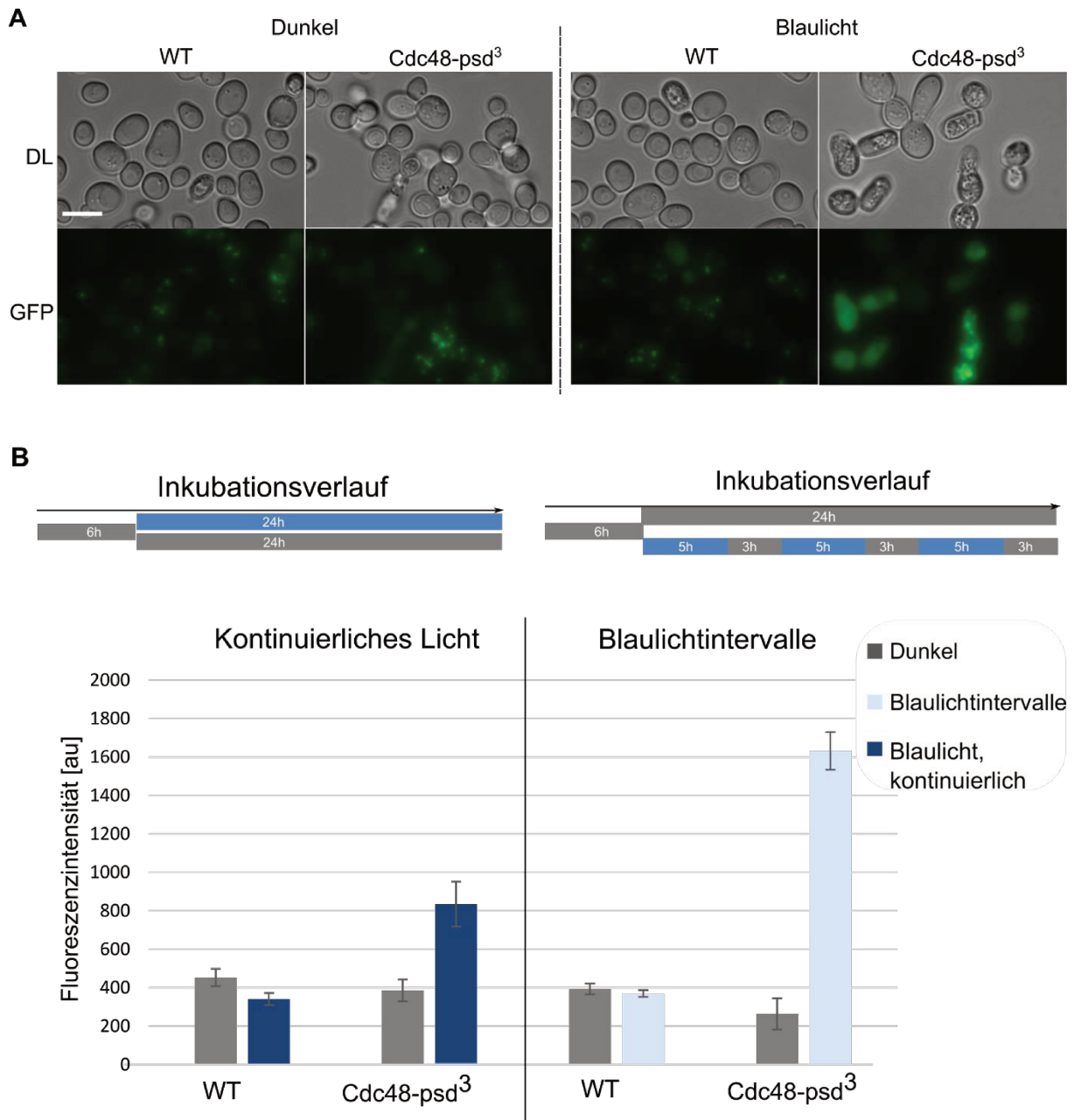


Abb. 16 Untersuchung der Auswirkungen verlängerter Blaulichillumination auf Cdc48-psd³. A) Mikroskopieaufnahmen der β -Carotin-produzierende Stämme WT=S288c+pUDE269 und Cdc48-psd³=YSH1+pUDE269 im Durchlicht- (DL) und GFP-Kanal (β -Carotin) nach 6 h Wachstumsphase und anschließender 24 h Inkubation im Dunkeln bzw. Blaulich (465nm, 30 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$). Die Aufnahmen wurden wie in Abb.11 A) beschrieben angefertigt. B) Quantifizierung der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenzintensität in den Stämmen WT=S288c+pUDE269 und Cdc48-psd³=YSH1+pUDE269 nach zwei unterschiedlichen Inkubationsverläufen. Links: 24 h Dunkel / kontinuierliches Blaulich; Rechts: 24 h Dunkel / 24 h Blaulichintervalle (3mal alternierend 5 h Blaulich (465nm, 30 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) und 3 h Dunkel). Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der absoluten Fluoreszenzintensität nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz, welche in einer korrespondierenden Negativkontrolle gemessen wurde. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (n=4).

Hierbei ergab sich für den Stamm Cdc48-psd ebenfalls eine gesteigerte Fluoreszenz nach 24 h Blaulichintervalle auf ~300% des WT-Niveaus und einer leichten Steigerung von ~40% mehr Fluoreszenz im Dunkeln (Abb. 17A).

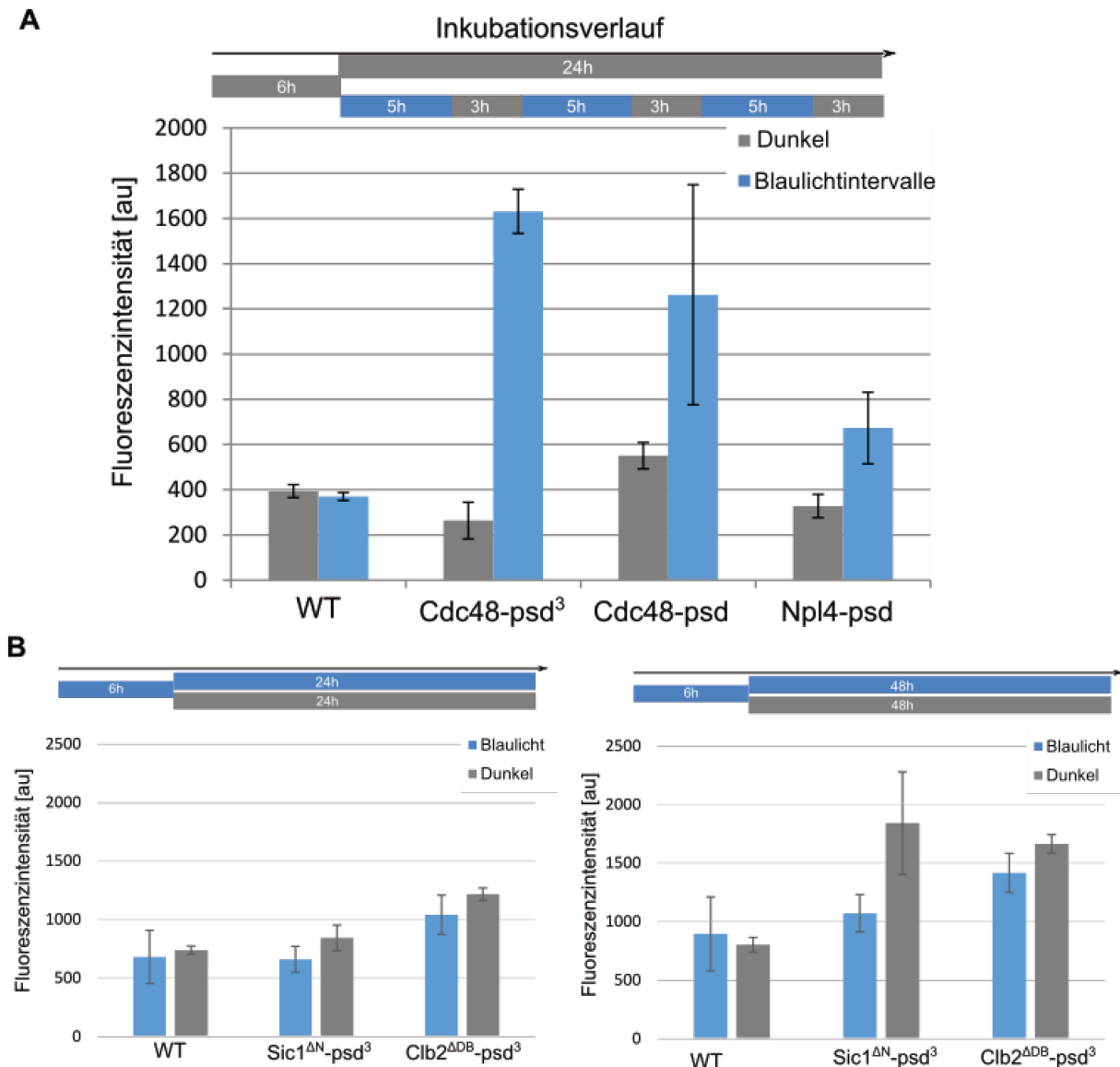


Abb. 17: Untersuchung der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenzintensität in verschiedenen Stämmen nach 30 h und 54 h. A) Quantifizierung der β -Caro-abhängigen Fluoreszenzintensität in den Stämmen WT=S288c+pUDE269; Cdc48-psd³=YSH1+pUDE269; Cdc48-psd= YDS175+pUDE269; Npl4-psd= YDS191+pUDE269 nach einer 6h Wachstumsphase im Dunkeln gefolgt von der Inkubation im Dunkeln für 24 h bzw. 24 h Blaublichtintervalle (3mal alternierend 5h Blaublicht (465nm, 30 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) und 3h Dunkel). Die angegebenen Werte entsprechen den jeweiligen Mittelwerten der gemessenen absoluten Fluoreszenzintensität in einem Durchflusszytometer im BL1-Kanal nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz, welche in einer korrespondierenden Negativkontrolle gemessen wurde. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (n=3). Für WT und Cdc48-psd³ sind die gleichen Werte wie in Abb. 16B gezeigt. B) Fluoreszenz-Quantifizierung analog zu A) in den Stämmen WT=YDS28+pRS315+pUDE269, ^{ΔN}Sic1-psd³=YDS28+pDS228+pUDE269, Clb^{ΔDB}-psd³= YDS28+pDS229+pUDE269 nach einer 6h Wachstumsphase unter Blaublicht (465nm, 30 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) gefolgt von 24h Dunkel-Inkubation bzw. Blaublichtillumination. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (n=4; WT: n=2)

Jedoch waren die Schwankungen zwischen den Werten der Blaublichtproben zu hoch, als dass eine statistisch signifikante Aussage getroffen werden konnte. Ebenso konnte nach dem Abbau von Npl4-psd im Blaublicht die Fluoreszenz auf ~180% des WT-Niveaus gesteigert werden, wohingegen das Niveau im Dunkeln dem des WT-Stamms ähnelte. Es bleibt also festzuhalten, dass ein psd-bedingten Abbau von Cdc48 und Npl4 nach der Inkubation mit Blaublichtintervallen einen positiven Effekt auf die β -Carotin-Produktion hat.

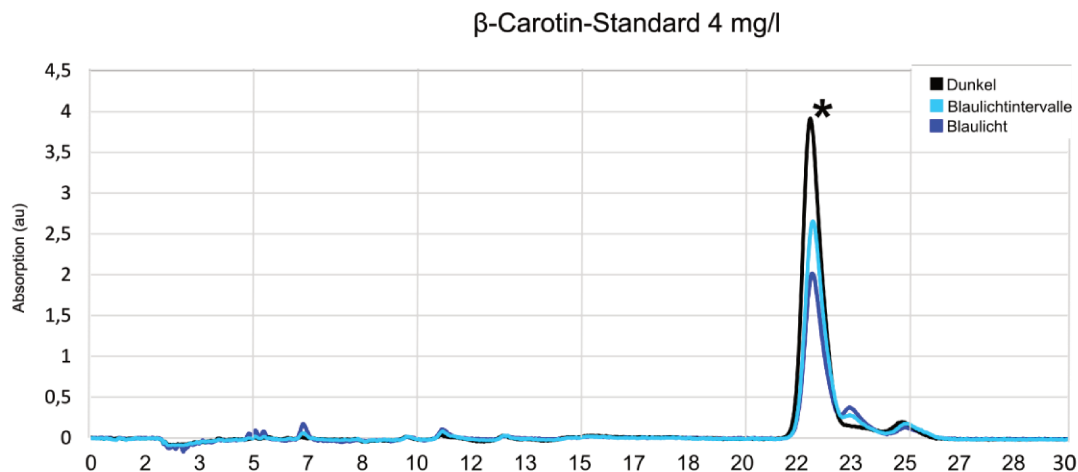
Zur weiteren Bestätigung des Effekts von Δ^N Sic1-psd³ und Clb2^{ADB}-psd³ wurde das in Abb. 15 beschriebene Experiment wiederholt und auf 48 h verlängert. Die daraus resultierenden Messwerte sind in Abb. 17 B zu sehen. Nach 24 Stunden zeigte Δ^N Sic1-psd³ keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Fluoreszenz im Vergleich zum WT. Hierbei konnten die vorigen Ergebnisse nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu wies Clb2^{ADB}-psd³ nach wie vor eine deutlich gesteigerte Fluoreszenzintensität im Vergleich zum WT auf. Während die Blaulicht-Proben in ihren Fluoreszenzwerten stark schwankten, konnte in der Dunkel-Probe eine stabile Steigerung von 60% im Vergleich zum WT festgestellt werden. Nach 48 h konnte diese Steigerung im Clb2^{ADB}-psd³-Stamm noch weiter auf ~100% gesteigert werden. In Δ^N Sic1-psd³ war im Dunkeln zwar im Mittel wieder eine Steigerung zu beobachten, welche jedoch statistisch nicht signifikant war. Dennoch ist auffällig, dass nach 48 h in der Zellzyklusmutante noch eine Steigerung der Fluoreszenz im Vergleich zu den Werten nach 24 h zu beobachten war. Dies bestätigt die Annahme, dass man mit diesen optogenetischen Konstrukten Ausbeutesteigerungen von β -Carotin erreichen kann.

Mit Hilfe optogenetischer Module konnte die Produktion von β -Carotin erheblich gesteigert werden. So führte ein Cdc48-psd³ abhängiger Zellzyklusarrest nach Inkubation unter Blaulichtintervallen zu bis zu 400% mehr Fluoreszenz im Vergleich zum WT. Eine psd-markierte Variante von Cdc48 und Npl4-psd zeigten jeweils ebenfalls eine erhöhte Fluoreszenzintensität nach Blaulichtintervallinkubation. Eine gesteigerte β -Carotin-Ausbeute konnte ebenfalls für Δ^N Sic1-psd³ und Clb2^{ADB}-psd³ detektiert werden.

2.2.3 Analyse der β -Carotin-produzierenden Stämme mittels HPLC

Aufgrund der unter 2.3.2 beschriebenen Effekte von Blaulicht auf β -Carotin wurde eine β -Carotin-Lösung von definierter Konzentration (4 mg/l) für 24 h im Dunkeln, bei Blaulicht (30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und bei Blaulichtintervallen (3x 5h BL /3h D) bei 30°C inkubiert und anschließend in einer *High performance liquid chromatography* (HPLC) analysiert. Hierbei konnte ein klares Signalmaximum bei ~22,5 min festgestellt und als primäres β -Carotin-Signal identifiziert werden (s. Abb. 18A). Dieses Signal war in allen drei Proben vorhanden, wurde in seiner Intensität jedoch deutlich in den beiden Proben unter Blaulicht-Einfluss geschwächt. Dabei war die Signalstärke in der Blaulicht-Probe ~50% und in der Blaulichtintervall-Probe ~35% schwächer als in der Dunkel-Probe.

A



B

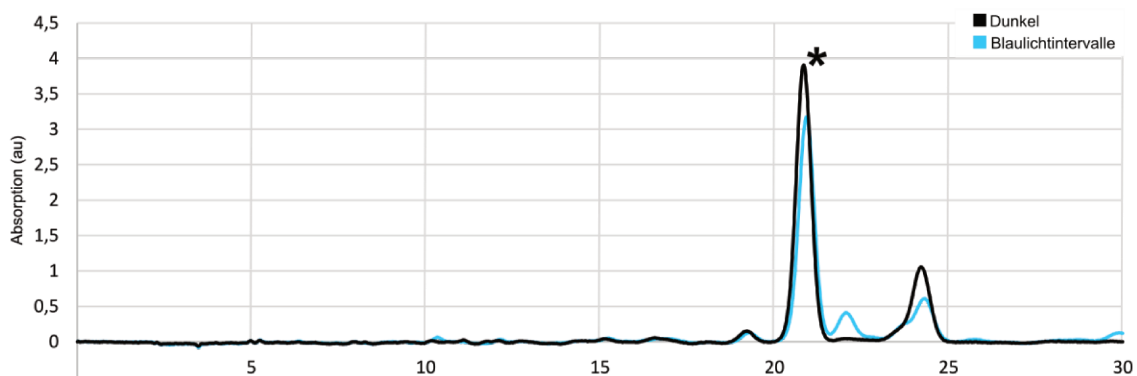


Abb.18: Beispiel-Chromatogramme der HPLC-Messung von β -Carotin Standards und Zellextrakten. A) Beispiel-Chromatogramm eines 4 mg/l β -Carotin Standards. Die drei Standards identischer Konzentrationen wurden jeweils 24 h in Dunkelheit inkubiert bzw. Blaulicht und Blaulichtintervallen ausgesetzt. Es wurde ein klares Signal bei ~22 min (*) erhalten. Die Blaulicht- (blau) und Blaulichtintervall-Probe (cyan) zeigen ein verringertes Signal bei ~22 min und ein kleineres sekundäres Signal bei ~23 min und bei ~24 min. B) Beispiel-Chromatogramm der HPLC-Messung eines WT-Zellextrakts aus einer Zellkultur im Dunkeln (schwarz) nach Inkubation im Blaulichtintervallen (465nm , $30\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) (cyan). Es finden sich hauptsächlich die in A) beschriebenen zwei Signale bei ~21 min (*), ~22 min und ~24 min.

Außerdem waren in den beiden Blaulicht-Proben zwei schwächere sekundäre Signale zu beobachten, bei rund 23 und 25 min, wobei letzteres auch in der Dunkel-Probe vorhanden war. Dabei könnte es sich um photooxidiertes β -Carotin handeln, bzw. mögliche Abbauprodukte (Scita 1992; Limbo et al. 2007). Es war jedenfalls klar ersichtlich, dass Blaulicht einen Einfluss auf β -Carotin hat, und die nachweisbare Menge reduziert.

Zur genauen Quantifizierung der produzierten Mengen β -Carotin, wurden aus den Stämmen Zellextrakte hergestellt, deren β -Carotin-Gehalt anschließend per HPLC analysiert wurde. Hierfür wurden die Stämme nach ihrer spezifischen Inkubation wie unter 2.3.1 beschrieben aufgeschlossen und β -Carotin extrahiert. Das resultierende Zellextrakt war dabei hell- bis dunkel-Gelb. In Abb. 18 B) ist ein beispielhaftes Chromatogramm eines WT-Zellextrakts aus Kulturen in Dunkelinkubation und Blaulichtintervallinkubation gezeigt. Dies zeigt ein fast identisches Profil wie der Standard (Abb. 18A), mit der Ausnahme, dass der zweite sekundäre

Signal-*Peak* bei ca. 24 min ebenfalls in der Dunkel-Probe vorhanden ist, was auf einen nicht ausreichenden Lichtschutz bei der Präparation und Lagerung des Extrakts zurückzuführen ist. Es ist dennoch festzuhalten, dass klar identifizierbares β -Carotin im Extrakt vorlag. Zur Quantifizierung wurde das Integral des primären Signals bei 22 min berechnet und anhand unterschiedlicher Standards in bekannten Konzentrationen eine Eichgerade ermittelt. Hiermit wurde anschließend die genaue β -Carotin-Menge im Extrakt bestimmt. Anschließend wurde diese auf die jeweilige zur Extraktion verwendeten Trockenmasse bzw. das Kulturvolumen normiert.

Zunächst wurden ein WT-Stamm und ein Sec61-psd-Stamm untersucht. Sec61 ist ebenfalls Teil des Proteinsekretionswegs und teilweise Interaktionspartner von Sec62. Daher waren ähnliche Steigerungen wie zuvor im Durchflusszytometer für Sec62-psd zu erwarten. Die untersuchten Stämme wurden zunächst für 24 h im Dunkeln und anschließend 24 h unter Blaulicht bzw. weiter im Dunkeln in LFM inkubiert und anschließend wie oben beschrieben verarbeitet. Die Wachstumsphase wurde auf 24 h verlängert, um eine für die Analyse des Zellextrakts ausreichende Zellmasse zu erreichen. Im WT wurden in der Dunkel-Probe β -Carotin-Mengen von 1,45 mg/g Zelltrockenmasse (s. Abb. 19A) und 1,75 mg/l Zellkultur (s. Abb. 19B) gemessen und erwartungsgemäß deutlich weniger in der Blaulicht-Probe (ca. 0,95 mg/g; 1,25 mg/l).

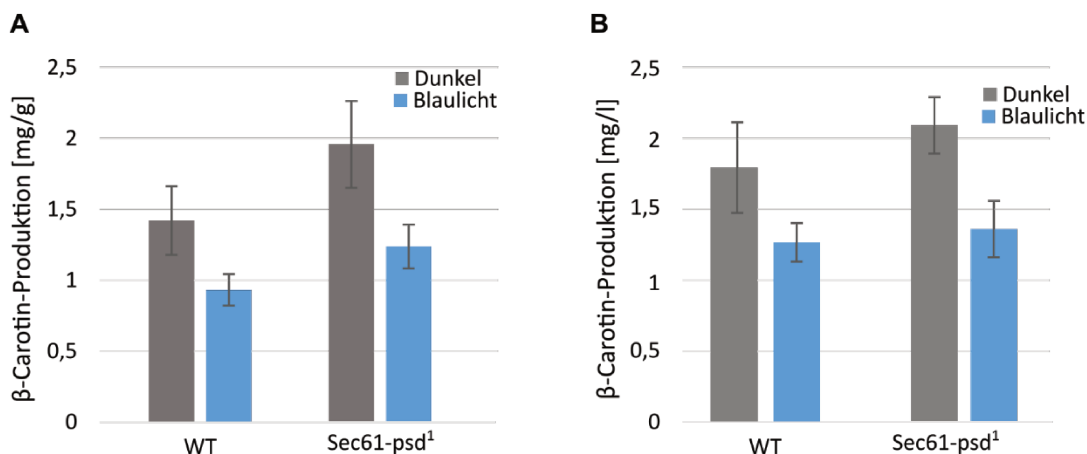


Abb. 19: Quantifizierung des β -Carotin-Gehalts mittels HPLC im Sec61-psd-Stamm. A) Die Stämme WT=S288c + pUDE269, Sec61-psd= YDS502 + pUDE269 wurden jeweils zunächst 24 h im Dunkeln in LFM-Ura inkubiert und anschließend weitere 24 h entweder im Dunkeln oder unter 24 h Blaulichtintervalle (3 Mal alternierend 5 h Blaulicht (465nm, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und 3 h Dunkel) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lyophilisiert und Zellextrakte angefertigt, die mittels HPLC analysiert wurden. Die Quantifizierung eines für β -Carotin spezifischen Signal-Maximums wurde anhand einer Eich-Geraden auf korrespondierende β -Carotin -Mengen umgerechnet und anschließend auf die jeweilige Zelltrockenmasse normalisiert. Die hier gezeigten Werte entsprechen dem Mittelwert mehrerer biologischer Replikate und die Fehlerbalken dem Standardfehler (WT: n=4; Sec61-psd: n=8). B) Quantifizierung der Proben aus A) normalisiert auf das Kulturvolumen.

Im Sec61-psd-Stamm wurden Titer von knapp 2 mg/g Trockenmasse im Dunkeln und 1,25 mg/g unter Blaulicht erreicht, sowie ähnliche Werte betrachtet auf das Kulturvolumen (Dunkel:

2 mg/l, Blaulichtintervalle: 1,4 mg/l). Die Schwankungen zwischen den einzelnen Klonen war jedoch sehr hoch und der Unterschied zwischen WT und Sec62-psd weder im Dunkeln noch unter Blaulichtintervallen statistisch signifikant. Die Messungen wurden mit den Stämmen Cdc48-psd und Cdc48-psd³ unter den gleichen Wachstumsbedingungen wie in Abb. 19 beschrieben durchgeführt. Jedoch konnte auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied mehr festgestellt werden. Ein Vorversuch im Durchflusszytometer mit verlängerter Wachstumsphase hatte einen Effekt gezeigt, war jedoch in seiner Replikatzahl zu gering um klar Aussagekräftig zu sein (Daten nicht gezeigt). Vermutlich hatten nach der 24 h Wachstumsphase zum einen die Zellen bereits die stationäre Phase erreicht und damit zum anderen die meisten Nährstoffe aufgebraucht. Ein kontrollierter Zellzyklusarrest stationärer Zellen ist kaum möglich und selbst dann ist ein etwaiger metabolischer Effekt mangels Nährstoffe nicht zu erwarten. Entsprechend wurde der Versuch für die Stämme Cdc48-psd und Cdc48-psd³ in WM8-Medium wiederholt. Dieses beinhaltet deutlich mehr Nährstoffe und Glukose (s. Tab. 6) und ist für Zellkultur-Inkubationen bis zu 72 h ausgelegt. Hierbei erreichte der WT-Stamm im Dunkeln 1,75mg/g Trockengewicht und in den Blaulichtproben im Durchschnitt 1,2 mg/g (Abb. 20 A).

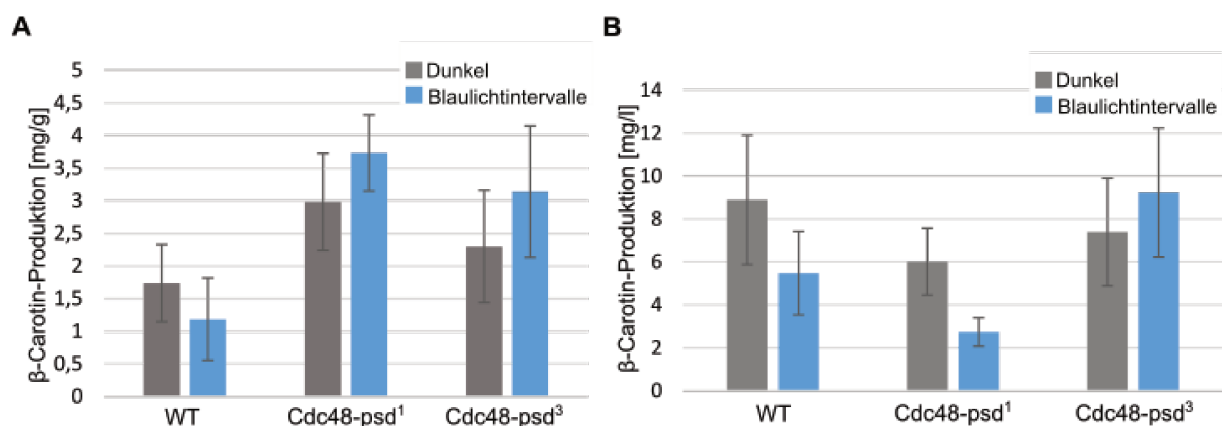


Abb. 20: Quantifizierung des β -Carotin-Gehalts mittels HPLC in Zellzyklusarrest-Mutanten. A) Die Stämme WT=S288c + pUDE269, Cdc48-psd= YDS175+pUDE269, Cdc48-psd³=YSH1+pUDE269 wurden jeweils zunächst 24h im Dunkeln in WM8-Ura inkubiert und anschließend weitere 24 h entweder im Dunkeln oder unter 24 h Blaulichtintervalle (3mal alternierend 5 h Blaulicht (465nm, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und 3 h Dunkel) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lyophilisiert und Zellextrakte angefertigt, die mittels HPLC analysiert wurden. Die Quantifizierung eines für β -Carotin spezifischen Signal-Maximums wurde anhand einer Eich-Geraden auf korrespondierende β -Carotin -Mengen umgerechnet und anschließend auf die jeweilige Zelltrockenmasse normalisiert. Die hier gezeigten Werte entsprechen dem Mittelwert mehrerer biologischer Replikate und die Fehlerbalken dem Standardfehler (n=4). B) Quantifizierung der Proben aus A) normalisiert auf das Kulturvolumen.

Dabei war die Streuung der Messwerte extrem hoch, was bereits anhand der Kolonien gesehen werden konnte die eine Reihe von unterschiedlich starken Orangefärbungen aufwiesen. Dies ist ein möglicher Effekt der Plasmid-basierten Expression der β -Carotin-Enzyme. Dennoch konnte für den Cdc48-psd-Stamm in sowohl Dunkel als auch Blaulichtintervall-Probe eine statistisch

signifikante Steigerung der β -Carotin-Produktion festgestellt werden. So erreichte der Stamm im Dunkeln im Mittel Konzentrationen von 3 mg/g Trockengewicht und im Blaulicht über 3,5 mg/g. Der Cdc48-psd³-Stamm zeigte im Dunkeln keine signifikanten Unterschiede zum WT, konnte jedoch in der Blaulichtintervall-Probe mit rund 3 mg/g die β -Carotin-Produktion auf rund 250% des WT-Niveaus steigern. Normiert man die gemessenen β -Carotin-Konzentrationen auf das Kulturvolumen, erkennt man jedoch, dass durch das stark verminderte Wachstum der Mutanten-Stämme die Produktion, insgesamt gesehen, geringer ausfiel (Abb. 20 B). Bei WT-Mengen von durchschnittlich 8,8 mg/l im Dunkeln und 5,5 mg/l nach Blaulichtinkubation wurde in dem Mutanten-Stamm Cdc48-psd, auf die Zellkultur bezogen, nur 60% dieser Mengen erreicht und im Cdc48-psd³ WT-ähnliche Werte.

Bei der Analyse der Zellextrakte aus den Stämmen Δ^N Sic1-psd³ und Clb^{ADB}-psd³ fiel zunächst auf, dass das allgemeine Niveau der β -Carotin -Konzentration in den Extrakten im Vergleich zur vorherigen Analyse (Abb. 20) deutlich gesunken war (Abb. 21 A).

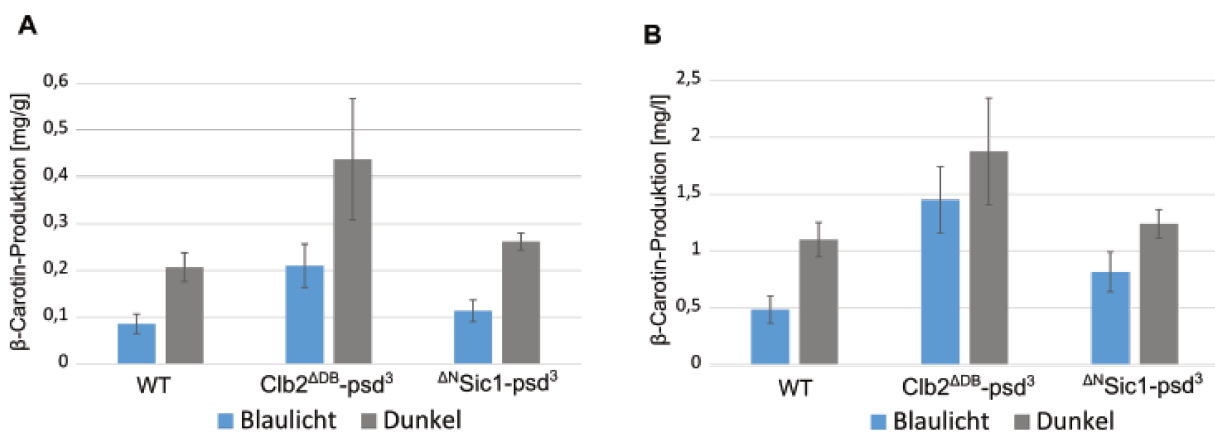


Abb. 21: Quantifizierung des β -Carotin-Gehalts mittels HPLC in Δ^N Sic1-psd³ und Clb^{ADB}-psd³. A) Die Stämme WT=YDS28+pRS315+pUDE269, Sic1 ^{Δ^N} -psd=YDS28+pDS228+pUDE269, Clb^{ADB}-psd³=YDS28+pDS229+pUDE269 wurden jeweils zunächst 12 h unter Blaulicht (465nm, 30 μ molm⁻²s⁻¹) in WM8-Ura inkubiert und anschließend weitere 24 h entweder unter Blaulicht oder Dunkeln kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lyophilisiert und Zellextrakte angefertigt, die mittels HPLC analysiert wurden. Die Quantifizierung eines für β -Carotin spezifischen Signal-Maximums wurde anhand einer Eich-Geraden auf korrespondierende β -Carotin-Mengen umgerechnet und anschließend, auf die jeweilige Zelltrochsenmasse normalisiert. Die hier gezeigten Werte entsprechen dem Mittelwert mehrerer biologischer Replikate und die Fehlerbalken dem Standardfehler (n=6). B) Quantifizierung der Proben aus A) normalisiert auf das Kulturvolumen.

Die Stämme wurden zwar unter vergleichbaren Bedingungen und ebenfalls in WM8 kultiviert, jedoch wiesen die Klone auf der Transformationsplatte bereits eine deutlich hellere Gelbfärbung auf, was neben der allgemeinen Schwankung zwischen einzelnen Klonen wahrscheinlich zu der Verringerung in den Messwerten führte. Relativ zum WT konnte man jedoch nach wie vor, sowohl nach Blaulicht- als auch Dunkel-Inkubation, eine deutliche Steigerung im Clb^{ADN}-psd³-Stamm auf durchschnittlich jeweils 245% und 211% des WT-

Niveaus beobachten. Bei stark voneinander abweichenden Werten ist eine genaue Aussage jedoch schwierig. Δ^N Sic1-psd³ zeigte derweil keinen signifikanten Unterschied zum WT-Stamm hinsichtlich der β -Carotin-Produktion pro produzierter Zelltrockenmasse. Auch auf das Zellkulturvolumen bezogen war keine signifikante Änderung der β -Carotin Menge im Vergleich zum WT erkennbar. Im Gegensatz zu Cdc48-psd/psd³, war nach wie vor im Durchschnitt eine deutliche Steigerung im Clb2 Δ^{DB} -psd³ pro Kulturvolumen im Vergleich zum WT-Stamm zu erkennen (Abb. 21 B). So betrug die β -Carotin-Produktion unter Blaulicht 300% des WT-Niveaus ($p=0,012$) und 170% im Dunkeln ($p=0,15$).

2.5.4 Extensive Durchflusszytometer-Analysen der Zellzyklus-Arrest-Mutanten

Angesichts der starken Schwankungen, die zwischen einzelnen Klonen bei der Messung der β -Carotin-Konzentration und der Fluoreszenz feststellbar war, wurde ein weiteres extensiveres Durchflusszytometer-Experiment mit den bisher untersuchten Stämmen Cdc48-psd, Cdc48-psd³, Δ^N Sic1-psd³ und Clb Δ^{DB} -psd³ durchgeführt. Hierbei wurden über 20 Kolonien einer Transformationsplatte zufällig ausgewählt und unter den jeweiligen Induktionsbedingungen der Zellzyklusarrestmutanten nach einer 5 h Wachstumsphase für 24 h kultiviert (LFM) und anschließend die Fluoreszenz der Klone im Durchflusszytometer gemessen. Die daraus resultierenden Ergebnisse zeigten die starke Streuung der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenz in allen Stämmen über einen Bereich von über 1500 au (Abb. 22). Im Cdc48-psd-Stamm war die Streuung insgesamt am größten (Abb. 22 A). Dabei lagen 50% der Messwerte zwischen einem Bereich von 1000 au bis ca. 1700 au. Der Mittelwert und Median lag zwar noch knapp über dem des WT, jedoch war der Unterschied nicht mehr in einem statistisch relevanten Bereich ($p=0,31$). Der Cdc48-psd³-Stamm lag im Mittel deutlich über dem WT-Stamm ($p=<0,005$) und 50% der Messwerte bewegten sich im Bereich von ~1300 au bis 2000 au. Wenngleich die Werte also stark schwankten, war für Cdc48-psd³ eine klare Steigerung der Fluoreszenz und damit der β -Carotin-Produktion beobachtbar. Cdc48-psd zeigte ebenfalls leicht gesteigerte Fluoreszenz, jedoch ergab sich kein eindeutig höherer Mittelwert. Bei der Messung von Δ^N Sic1-psd³ und Clb Δ^{DB} -psd³ zeigte der Kontroll-WT-Stamm keine so starke Streuung wie der WT-Stamm zuvor in Abb. 22A, der Mittelwert ist jedoch in einem ähnlichen Bereich (s. Abb. 22B). Im Δ^N Sic1-psd³-Stamm fiel zunächst auf, dass die Werte des unteren Quartils deutlich geringer streuten, als die des oberen.

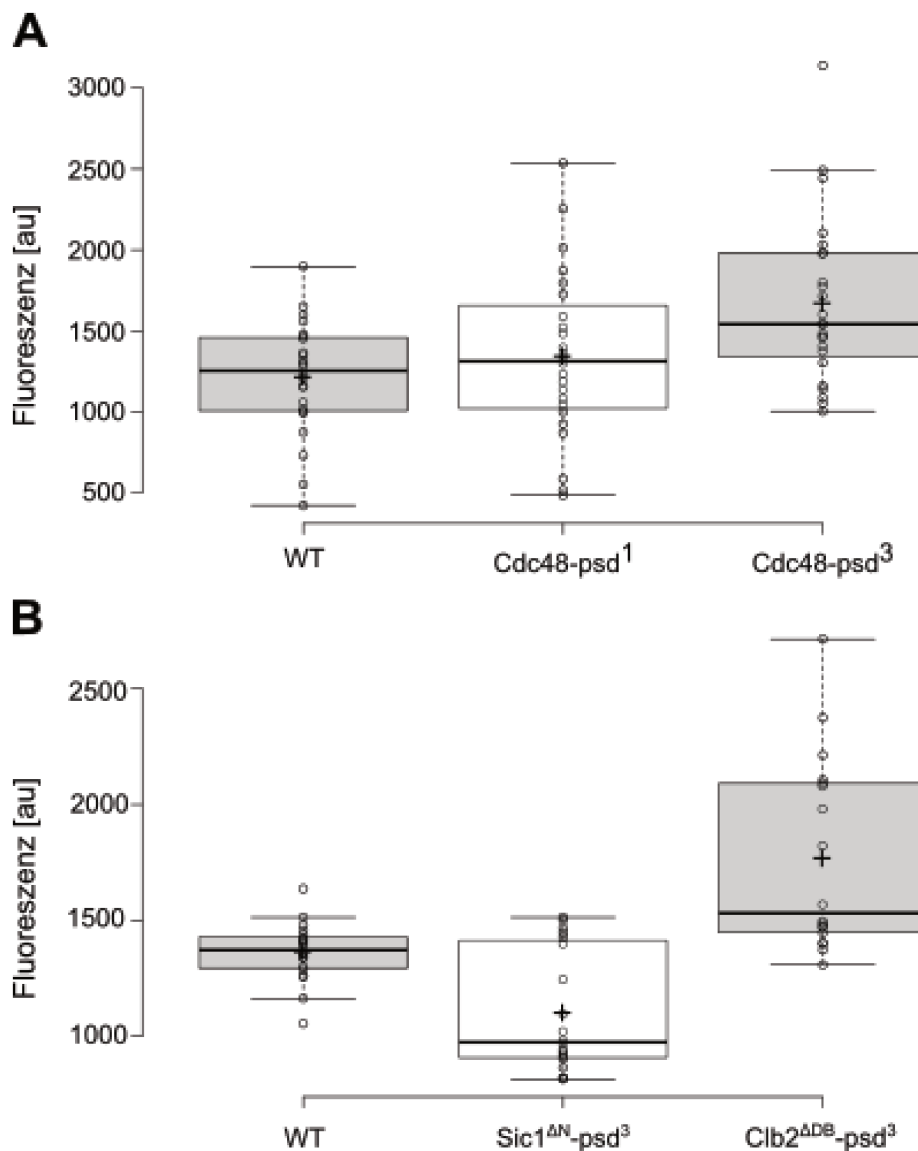


Abb. 22: Untersuchung der Schwankungen der β -Carotin-abhängigen Fluoreszenzintensität in verschiedenen Stämmen nach 30 h. A) Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität nach Blaulichtintervallen wurden zunächst je 24 zufällig ausgewählte Klone aus einer Transformationsplatte von WT=S288c+pUDE269; Cdc48-psd=YDS175+pUDE269; Cdc48-psd³=YSH1+pUDE269 ausgewählt und in LFM-Ura Flüssigmedium überführt. Mit diesen wurde anschließend eine Hauptkultur beimpft, die für 6 h im Dunkeln inkubiert wurde und anschließend für 24 h unter Blaulichtintervallen (3mal alternierend 5h Blaulicht (465nm, 30 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) und 3h Dunkelheit) weiter kultiviert wurde. Die Zellen wurden anschließend in einem Durchflusszytometer analysiert und die Fluoreszenzintensität im BL1-Kanal vermessen. In der Darstellung wird die Verteilung der gemessenen Fluoreszenzwerte abzüglich der Hintergrundfluoreszenz gezeigt. Das + markiert dabei den Mittelwert und die fettgedruckte Linie den jeweiligen Median (n=24). B) Messung der Fluoreszenz analog zu A mit den Stämmen WT=YDS28+pRS315+pUDE269, ^{ΔN}Sic1-psd³=YDS28+pDS228+pUDE269, Clb^{ΔDB}-psd³=YDS28+pDS229+pUDE269, welche ebenfalls für 30 h im Dunkeln inkubiert wurden.

Der Mittelwert und der Median lagen unter dem des WT-Kontrollstamms ($p < 0,0005$) und ein positiver Effekt von ^{ΔN}Sic1-psd³ für die β -Carotin-Produktion war damit auszuschließen. In Clb^{ΔDB}-psd³ war das untere Quartil ebenfalls deutlich kürzer als das obere, entsprechend lagen die Werte über dem Median deutlich breiter gestreut vor, als die unteren. Dieses Ungleichgewicht treibt Mittelwert und Median deutlich auseinander. Dennoch ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen WT und Clb^{ΔDB}-psd³ ($p < 0,0005$).

Zusammengefasst war also für die Stämme Sec62-psd, Cdc48-psd³, Npl4-psd und Cib2^{ADB}-psd³ eine gesteigerte β -Carotin-Produktion festzustellen. Dabei war teils schon im nichtinduzierten Zustand eine Steigerung zu beobachten. Cdc48-psd zeigte ebenfalls positive Tendenzen, die aufgrund zu starker Schwankungen der Messwerte jedoch häufig nicht signifikant waren. Der Stamm ^{AN}Sic1-psd³ konnte nur vereinzelt eine gesteigerte β -Carotin-Produktion aufweisen. Die Deletionsmutante *hrd1Δ* zeigte ebenfalls nur eine leichte, statistisch nicht signifikante Steigerung der β -Carotin-Menge. Auf Grund der Plasmid-basierten Expression der β -Carotin-Synthese-Enzyme kam es zu starken Schwankungen zwischen einzelnen Klonen, die womöglich mit der Plasmid-Dosis in den einzelnen Zellen zusammenhängt. Dies macht eine genaue Quantifizierung der Steigerungen schwierig. Jedoch sind Werte von bis zu 400% der Leistung des WT-Niveaus im Cdc48-psd³-Stamm möglich. Durch die optogenetische Kontrolle des Zellzyklus und der Proteinsekretion ist also eine Steigerung der Ressourcenallokation in den Mevalonatweg erreichbar.

2.3 Steigerung der Produktion von Cordycepin in *S. cerevisiae*

Um zu überprüfen, ob der positive Effekt von *CDC48-psd³* auch auf andere Produkte und Synthesewege anwendbar ist, wurde *CDC48-psd³* in einen Cordycepin-produzierenden Stamm (YBP3) eingebracht. Cordycepin kann in Hefe mit Hilfe von drei Enzymen Cns3/Cns2/Cns1 aus Adenosin hergestellt werden (Abb. 6B) (Xia et al. 2017). Alternativ kann das Zwischenprodukt 3'-AMP jedoch auch direkt aus der RNA-Degradation bereitgestellt werden, weswegen für die Produktion von Cordycepin Cns2 und Cns1 in Hefe ausreichen (Huang et al. 2015; Welter und Elazar 2015). Diese zwei Gene wurden in YBP3 (Doktorarbeit Bastian Pook, unveröffentlicht) unter Kontrolle des Blaulicht-aktivierbaren Transkriptionssystems LexA-Cry2/Cib1-VP16 (Masterarbeit Jonathan Trauth, 2017) gebracht. Dieser Stamm wurde in seiner Cordycepin-Produktion mit dem *CDC48-psd³* tragenden Stamm YJS6 verglichen. Cordycepin konnte in beiden Stämmen nach 12 h Wachstumsphase und 12 h Dunkelphase zwar nachgewiesen werden, war jedoch nicht ausreichend quantifizierbar. Nach 12 h Wachstumsphase und 12 h kontinuierlicher Blaulichtbeleuchtung konnten in YBP3 durchschnittlich rund 0,022 $\mu\text{mol/mg}$ Cordycepin pro Zelltrockenmasse in WM8 gemessen werden (Abb. 23 A). In YJS6 hingegen wurde diese Menge auf durchschnittlich 0,27 $\mu\text{mol/mg}$, also mehr als das 12fache, gesteigert. Normiert auf das Kulturvolumen ergab das in YBP3 $\sim 20 \mu\text{mol/l}$ Kultur und in YJS6 durchschnittlich 63 $\mu\text{mol/l}$ was einer Steigerung von über 300% entspricht (Abb. 23B). Durch einen blaulichtabhängigen Abbau von Cdc48-psd³ ist also eine deutliche Steigerung der Cordycepin-Produktion möglich, selbst bei rund $\frac{1}{4}$ der

Zelltrockenmasse relativ zu YBP3. Dies stärkt die Ergebnisse aus 2.3. bezüglich der gesteigerten Produktion von β -Carotin durch Cdc48-psd³ und deutet auf eine biotechnologisch vielseitig einsetzbare Anwendungsmöglichkeit der Cdc48 Depletion hin.

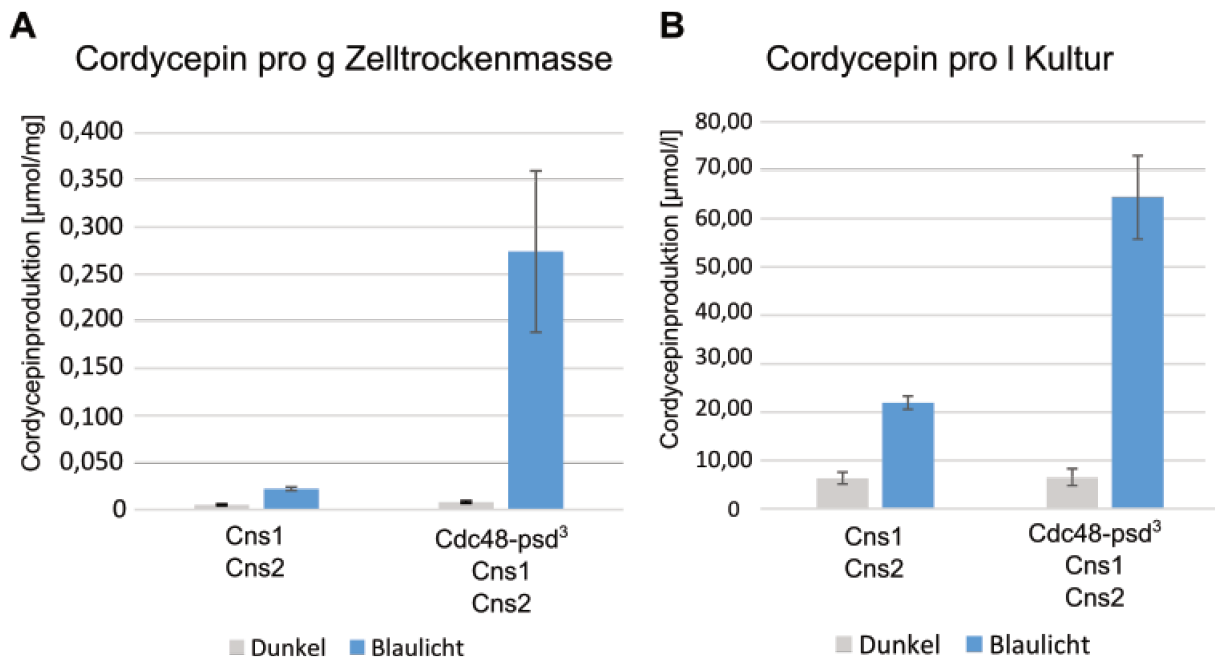


Abb. 23: Charakterisierung der Cordycepin-Produktion in Hefe. A) Quantifizierung der Cordycepin-Produktion nach 24 h in YBP3 (Cns1+Cns2) und Cdc48-psd³ (Cns1+Cns2). Die beiden Stämme wurden zunächst für 12 h in WM8 im Dunkeln inkubiert und anschließend weitere 12 h in Blaulicht überführt bzw. in Dunkelheit weiter inkubiert. Aus den so gewonnenen Ansätzen wurde anschließend eine Probe entnommen und an die Massenspektrometrie-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Universität Marburg zur weiteren Analyse übergeben. Die erhaltenen Werte wurden auf die Zelltrockenmasse normiert. Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert aus sechs biologischen Replikaten, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichungen. B) Quantifizierung der Proben aus A) mit der Normierung auf das Kulturvolumen (50 ml).

Weiterhin wurde der Effekt der dominant negativen Allele Δ^N Sic1 und Clb2^{ADB} auf die Produktion von Cordycepin untersucht. Die Expression dieser Mutanten wird durch einen Blaulicht-aktivierbaren Transkriptionsfaktor kontrolliert. Da diese Konstrukte nicht mit dem psd-Modul markiert sind, akkumulieren sie in der Zelle und es kommt zu einem Zellzyklus-Arrest unter Blaulicht, im Gegensatz zu dem dunkelheitinduzierten Zellzyklus-Arrest durch Δ^N Sic1-psd³ und Clb^{ADB}-psd³ (Bachelorarbeit Marco Bentele, 2018). So war zunächst auch hier zu beobachten, dass im Dunkeln nur Spuren von Cordycepin gemessen werden konnten. Unter Blaulicht hingegen konnte im Clb2^{ADB}-Stamm 0,018 µmol/mg Cordycepin pro Zelltrockenmasse erreicht werden und im Δ^N Sic1-Stamm bis zu 0,043 µmol/mg Cordycepin pro Zelltrockenmasse (Abb. 24A). Da die Zellen ungewöhnlich stark gewachsen waren, entsprach dies, auf die Kultur betrachtet, Mengen von 75 µmol/l und 152 µmol/l für Clb2^{ADB} und Δ^N Sic1 (Abb. 24B).

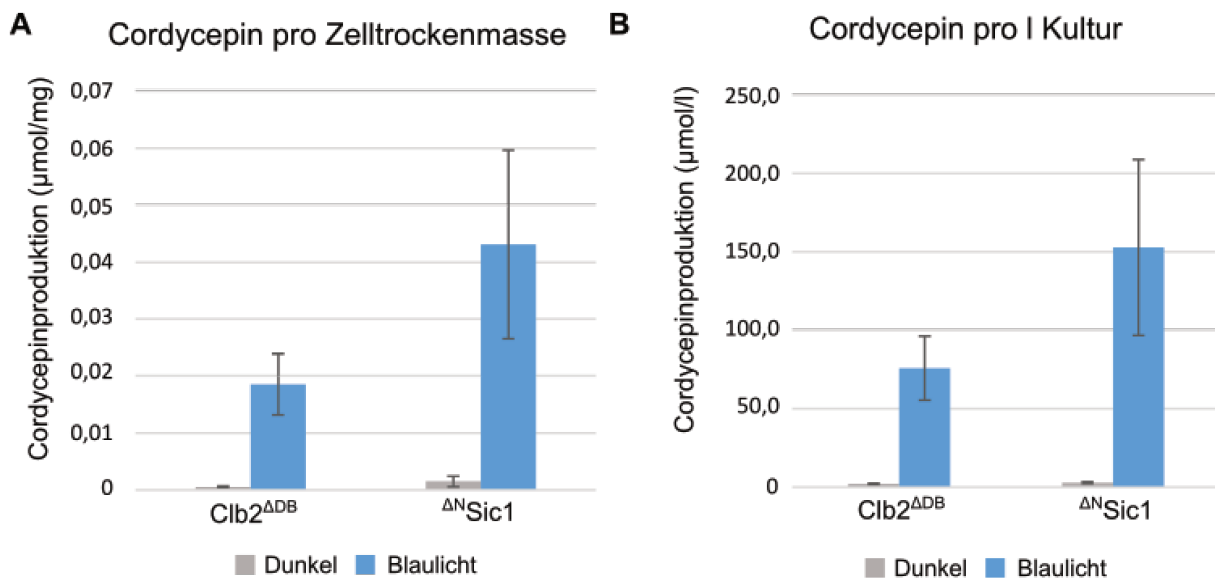


Abb. 24: Charakterisierung der Cordycepin-Produktion in Clb2^{ΔDB}- und Δ^NSic1-Stämmen. Quantifizierung der Cordycepin-Produktion nach 24 h in den Stämmen Clb2^{ΔDB} (YBP3 + pMB3) und Δ^NSic1 (YBP3 + pMB4). A) Die beiden Stämme wurden zunächst für 12 h in WM8 im Dunkeln inkubiert und anschließend weitere 12 h in Blaulicht überführt bzw. in Dunkelheit weiter inkubiert. Aus den so gewonnenen Ansätzen wurde anschließend eine Probe entnommen und an die Massenspektrometrie-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Universität Marburg zur weiteren Analyse übergeben. Die erhaltenen Werte wurden auf die Zelltrockenmasse normiert. Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert aus sechs biologischen Replikaten, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichungen. B) Quantifizierung der Proben aus A) mit der Normierung auf das Kulturvolumen (50 ml).

Es ist außerdem festzuhalten, dass die produzierte Cordycepin-Menge im Vergleich zum vorherigen Experiment in Abb. 23 deutlich erhöht waren, die Werte jedoch auch deutlichere Schwankungen aufwiesen.

Insgesamt betrachtet konnte eindrücklich gezeigt werden, dass die zuvor für β-Carotin getesteten optogenetischen Module auch eine positive Auswirkung auf die Cordycepin-Produktion hatten. Dabei waren die beobachteten positiven Effekte der Module auf die Produkt-Ausbeute nochmals stärker als bereits zuvor für β-Carotin beobachtet und es konnten z.T. Titer gemessen werden, die mehr als dem zehnfachen der WT-Niveaus entsprachen.

2.4 Etablierung von Terpensynthesewegen in *S. cerevisiae*

Um das System um Cdc48-psd³ und Clb2^{ΔDB}-psd³ weiter zu testen, wurden weitere Synthesewege für sekundäre Pflanzenstoffe aus dem Mevalonathsyntheseweg in Hefe etabliert. Als weitere heterologe Produkte wurden die Terpene D-Linalool, Geraniol und D-Limonen ausgesucht. Diese benötigen jeweils nur ein weiteres Enzym, welches in einem Schritt die Produkte aus Geranylpyrophosphat katalysiert (Abb. 25 A). Hierzu wurden die drei für *S. cerevisiae* Codon-optimierten synthetische Gene in eine Expressionskassette mit YFP kloniert und zusammen mit dem Blaulicht-abhängigen Transkriptionsfaktor aus 2.4 in einem geeigneten Hefestamm genomisch integriert (vgl. Tab. 2). Bei den Sequenzen handelte es sich

um gekürzte Versionen der WT-Enzyme, bei denen N-Terminal das Signal-Peptid entfernt wurde. Für diese gekürzten Varianten wurde bereits eine erhöhte Aktivität beschrieben (Denby et al. 2018).

Tab. 2: Verwendete Konstrukte der Enzyme für Terpensynthese

Konstruktname	Enzym	Herkunftsorganismus	Expressionsstamm
tMaLiS	Linaloolsynthase	<i>Mentha aquatica</i>	YJS14, YJS8
tObGS	Geraniolsynthase	<i>Ocimum basilicum</i>	YJS15, YJS9
tCILS	Limonensynthase	<i>Citrus limon</i>	YJS16

Die Expression erfolgte anschließend in LFM nach 6h Blaulichtbeleuchtung ($30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Die korrekte Expression der mit YFP-markierten Enzyme wurde durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Abb. 25 B).

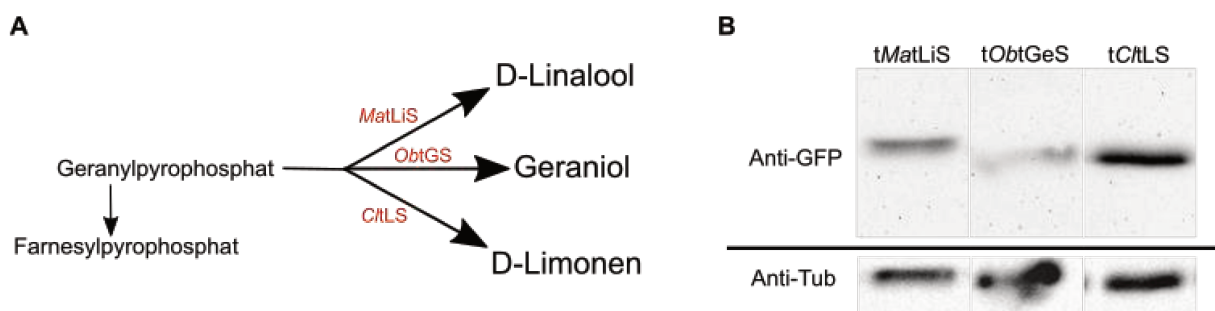


Abb. 25: Terpensynthesewege und Western-Blot-Analyse der Stämme mit Terpen-Enzymen. A) Schematische Darstellung des Terpensynthesewegs, ausgehend von GPP aus dem Mevalonatweg. D-Linalool, Geraniol und D-Limonen werden jeweils in einem einzigen Reaktionsschritt synthetisiert. B) Expressionstest der Terpen-Synthasen mittels Western-Blot-Analyse. Die Stämme YJS14, YJS15 und YJS16 wurden hierzu 6 h bei Blaulicht inkubiert und anschließend ein Proteinextrakt per Western-Blot analysiert. Die Enzyme wurden mittels Anti-GFP Antikörper detektiert. Die gezeigten Bänder (Anti-GFP) entsprechen in ihrem Laufverhalten der Masse der heterologen Enzyme: YFP-tLiS=90 kDA, YFP-tGiS=85kDA, YFP-tLS=85kDA. Als Ladekontrolle wurde das Tub1-Signal verwendet (Anti-Tub).

Zur Herstellung von Geraniol und D-Linalool wurden die Stämme YJS8 und YJS9 verwendet. Diese trugen die gleichen Expressionskassetten wie YJS14 und YJS15, allerdings unter der Kontrolle eines konstitutiven Transkriptionsfaktors (LexA-EDLL). Zusätzlich trugen die Stämme noch das Plasmid pJT22, welches die unregulierte tHMG1 exprimiert (s. 2.3), um die Menge des Ausgangsstoff GPP zu erhöhen. Die Stämme wurden wie unter 5.16 beschrieben kultiviert, wobei die flüchtigen Terpene in der organischen Phase während der Inkubation akkumulieren sollten. Diese wurde nach der 24 h Inkubation abgenommen und in der Massenspektrometrie-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps Universität Marburg

per GC/MS analysiert. Es konnte jedoch weder im Isopropylmyristat noch im Dodekan eines der Terpene nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ein Produktionsversuch von D-Limonen blieb aus Zeitgründen aus.

2.5 Etablierung eines GA4-Synthesewegs in *S. cerevisiae*

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Etablierung des Synthesewegs von Gibberellinsäure-4 (GA4), Gibberellinsäure-3 und Gibberellinsäure-1 in *S. cerevisiae*. Hierzu wurde eine Reihe von synthetischen Genen, die für Enzyme des GA-Wegs kodieren bestellt (s. Tab. 3).

Tab. 3: Verwendete Konstrukte des GA4-Synthesewegs

Konstrukt-name	Enzym	Herkunftsorganismus	Ziel-Peptid* Wahrscheinlichkeit <i>p</i>
<i>AtCPS</i>	Kopalyldosphosphatsynthetase	<i>Oryza sativa</i>	<0,1%
<i>CmKS</i>	Kaurensynthese	<i>Cucurbita maxima</i>	26%, mitochondriales Transitpeptid
<i>AtKO</i>	Kaurenoxidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	10% Signalpeptid (ER)
<i>CmKO</i>	Kaurenoxidase	<i>Cucurbita maxima</i>	<0,1%
<i>OsKO</i>	Kaurenoxidase	<i>Oryza sativa</i>	<0,1%
<i>PsKAO</i>	Kaurensäureoxidase	<i>Pisum sativum</i>	39,7%, Signalpeptid (ER)
<i>PsGA3ox</i>	Gibberellin 3-oxidase	<i>Pisum sativum</i>	<0,1%
<i>CmGA20ox</i>	Gibberellin 20-oxidase	<i>Cucurbita maxima</i>	<0,1%
<i>AtAtr2</i>	NADPH-p450-Reduktase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<0,1%
<i>OsGA13ox</i>	Gibberellin 13-oxidase	<i>Oryza sativa</i>	40,1%, Signalpeptid (ER)

*Beinhaltet Signalpeptide, Mitochondrium-Transitpeptide, Chlorplast-Transitpeptide und Thylakoidlumen-Transitpeptide

Die Sequenzen waren für die Expression in Hefe Codon-optimiert. Bei den verwendeten Enzymen handelt es sich um Proteine, die alle bereits in heterologen Systemen exprimiert wurden: *CmKO* und *PsKAO* in *S. cerevisiae* (Davidson et al. 2003; Helliwell et al. 2001), *OsGA13ox* in *Pichia pastoris* (Magome et al. 2013) und *AtCPS*, *CmKS*, *CmGA20ox*, *PsGA3ox* in *Escherichia coli* (Lange et al. 1994; Köksal et al. 2014; Lester et al. 1997; Yamaguchi et al.

1996). Obwohl für einige der Enzyme N-terminale Signalpeptide (SP) annotiert waren, konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei bioinformatischen Analysen niedrige oder nur mittlere Wahrscheinlichkeiten für mögliche ER-, Chloroplast- oder Mitochondrium-Zielpptide festgestellt werden (vgl. Tab. 3) (*TargetP-2.0*, Almagro Armenteros et al. 2019). Im Folgenden wird die Klonierung der Expressionskonstrukte, der Expressionskontrollen, sowie die Zusammenführung der einzelnen Enzyme zum vollen GA-Syntheseweg beschrieben.

2.5.1 Konstruktion und Assemblierung des Ga-Synthesewegs

Zur Expression in Hefe wurden die Gene in eine Expressionskassette kloniert, in welcher sie gleichzeitig N-Terminal mit einem YFP fusioniert wurden (vgl. Abb. 26 A). Die Transkription stand dabei unter Kontrolle eines *LexA-Promoters*, wodurch die Expression mit Hilfe des Blaulicht-abhängigen Transkriptionsfaktors (s. 2.5) gesteuert werden konnte. Weiterhin wurden konstitutive Transkriptionsfaktoren getestet, um die Expression der Gene dauerhaft anzuschalten. Diese bestanden ebenfalls aus der LexA-DNA-Bindedomäne, welche mit der Aktivierungsdomäne VP16 oder EDLL fusioniert wurde (Abb. 25 B).

Zur Assemblierung der Expressionskassette wurden die GA-Synthesegene jeweils einzeln in einen Expressionsvektor kloniert. Von den in Tabelle 3 aufgeführten Genen war lediglich die Klonierung von *OsGa13ox* nicht erfolgreich. Die GA13-Oxidase bestimmt das Verhältnis von GA4 zu GA1/GA3 durch die Katalyse von GA12 zu GA53 (Magome et al. 2013). Sie ist nicht für die Synthese von GA4 notwendig, wodurch der Syntheseweg hin zu GA4 weiterhin möglich war (Vgl. Abb. 6A). Zur Assemblierung des gesamten Synthesewegs sollten die Expressionskassetten im Tandem genomisch integriert werden (Abb. 26 C). Die jeweilige Transkriptionsrichtung war dabei wie in Abb. 26C angegeben gegenläufig zueinander, um mögliche homologe Rekombination innerhalb der Kassette zu vermeiden. Die Integration ins Genom erfolgte mittels Cas9 über Homologie-Bereiche am 5'- und 3'-Ende der Expressions-Kassette, angefügt per PCR. Dabei waren je Tandem-Paar die *up-stream* der Promotoren liegenden Sequenzen homolog zueinander und die Sequenzen *down-stream* der Terminatoren homolog zum gewählten genomischen Locus. An diesem wurde zuvor mittels einer passenden gRNA und durch Cas9 ein DNA-Doppelstrangbruch eingeführt, welcher anschließend durch die zwei Expressionskassetten repariert wurde. Auf diese Weise sollten vier Integrationen vorgenommen werden, welche jeweils aus einem Paar von zwei Genen des GA4-Synthesewegs bzw. dem Transkriptionsfaktor bestanden.

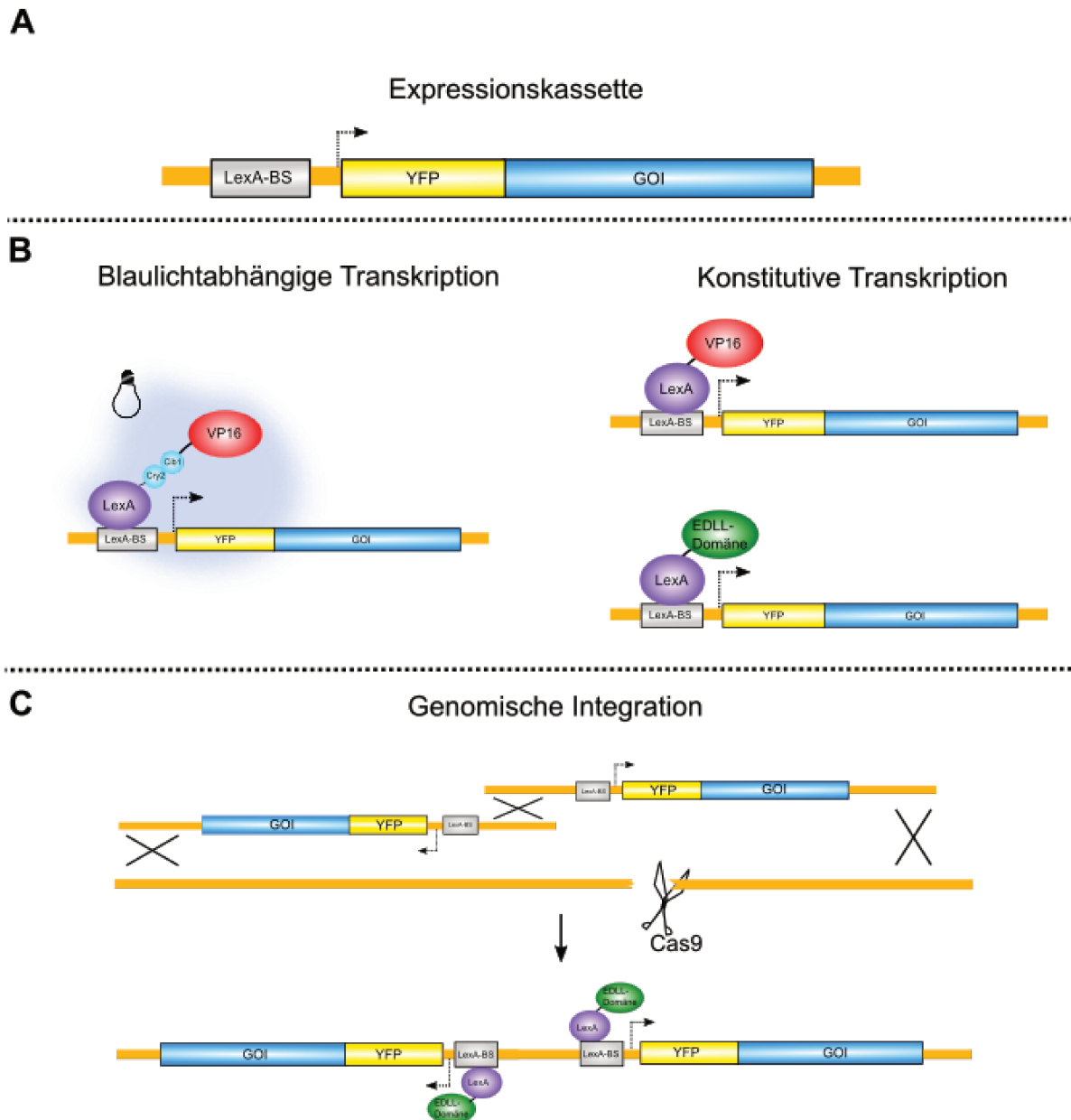


Abb. 26 Schematische Darstellungen der genetischen Komponenten des heterologen GA4-Synthesewegs. A) Schematische Darstellung der Expressionskassette der einzelnen Enzyme für den GA4-Syntheseweg. Dabei sind folgende Elemente in der 5'-3'-Richtung gegeben: LexA-BS=Bindestelle des LexA-Repressors, YFP=Yellow Fluorescent Protein, GOI=Gene of Interest (stellvertretend für einen ORF der Enzym-Gene). Dabei dient die LexA-BS als Bindepunkt für den Transkriptionsfaktor, welcher die Transkription an der mit dem Pfeil markierten Stelle startet. B) Schematische Darstellung der eingesetzten Transkriptionsfaktoren. Der blaulichtabhängige Transkriptionsfaktor besteht aus einem LexA-Repressor, der mit einer Cry2-Domäne fusioniert ist und VP16, welches wiederum mit Cib1 gekoppelt ist. Unter Blaulichtbeleuchtung binden Cry2 und Cib2 einander und die Aktivierungsdomäne VP16 wird am Promotor rekrutiert und die Transkription wird gestartet. Die beiden konstitutiven Transkriptionsfaktoren LexA-Vp16 und LexA-EDLL funktionieren analog, nur sind hier die DNA-Bindedomäne LexA und die jeweilige Aktivierungsdomäne VP16/EDLL miteinander verbunden, was eine dauerhafte Transkription bewirkt. C) Schematische Darstellung des Integrationsvorgangs der Gene für den GA4-Syntheseweg. Pro Locus werden jeweils zwei Expressionskassetten integriert, die jeweils per PCR am 5'- und 3'-Ende mit speziellen Sequenzen versehen wurden. Diese sind am Promotor nahen Ende homolog zueinander und am Terminator nahen Ende homolog zu einem bestimmten Locus im Genom. Nach einem von Cas9 vermittelten Doppelstrangbruch werden diese beiden Kassetten über homologe Rekombination ins Genom integriert.

Zunächst wurde die korrekte Expression der Enzyme in den Expressionskassetten über Plasmide getestet. Hierzu wurden diese jeweils einzeln in *S. cerevisiae* mittels dem Blaulichtabhängigen Transkriptionsfaktors exprimiert. Die jeweiligen Stämme wurden anschließend

unter dem Mikroskop auf YFP-Fluoreszenz untersucht. Wie man in Abb. 27A erkennt, zeigten dabei alle Stämme Fluoreszenz.

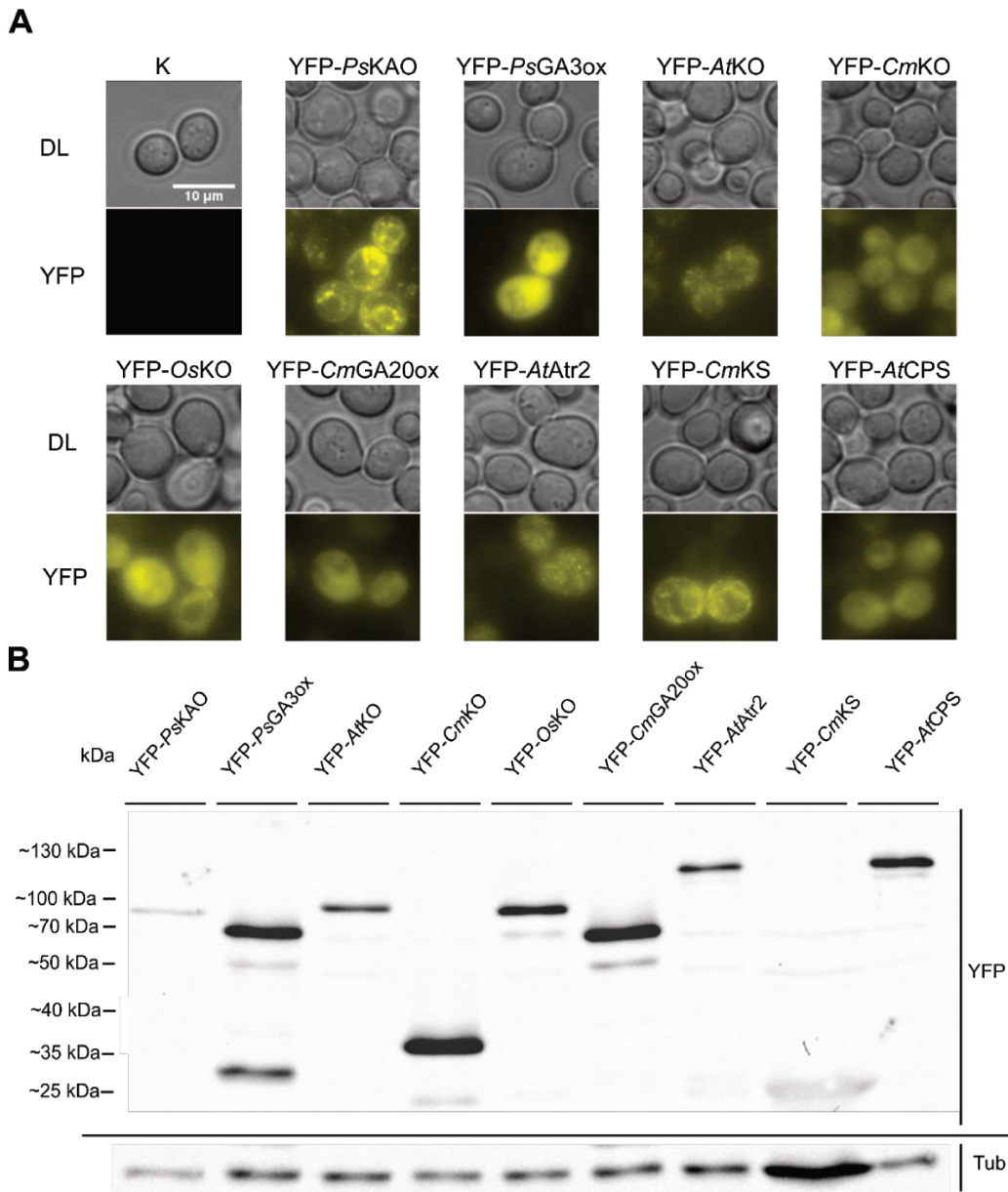


Abb.27: Expressionskontrollen der GA4-Syntheseweg Enzyme. A) Mikroskopieaufnahmen der Stämme mit den Plasmiden, die die Expressionskassetten der GA4-Enzyme tragen. Die Stämme YFP-*P_sKAO*=YDS495+pJS2, YFP-*P_sGA3ox*=YDS495+pJS3, YFP-*AtKO*=YDS495+pJS4, YFP-*CmKO*=YDS495+pJS5, YFP-*OsKO*=YDS495+pJS6, YFP-*CmGA20ox*=YDS495+pJS7, YFP-*AtAtr2*=YDS495+pJS8, YFP-*CmKS*=YDS495+pJS9, YFP-*AtCPS*=YDS495+pJS10 exprimieren nach Blaublicht-Inkubation jeweils eines der benötigten Enzyme in Fusion mit YFP. Die Aufnahmen wurden im Durchlicht- (DL) und YFP-Kanal nach einer 6 h Inkubation in Blaublicht (465nm, 30 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) aufgenommen. Die gezeigten Bilder wurden wie in Abb. 11 beschrieben mittels „Fiji“ bearbeitet. Der Größenstandard entspricht 10 μm und die Belichtungszeiten waren je Kanal gleich. B) Aus den Stämmen aus A) wurden Proteinextrakte hergestellt, die anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western-Blot auf eine Membran überführt wurden. Die Detektion der YFP-markierten Proteine erfolgte mit einem Anti-GFP Antikörper. Erwartete Protein-Masse: YFP-*P_sKAO*=83 kDa, YFP-*P_sGA3ox*=68 kDa, YFP-*AtKO*=85 kDa, YFP-*CmKO*=85 kDa, YFP-*OsKO*=85 kDa, YFP-*CmGA20ox*=70 kDa, YFP-*AtAtr2*=106 kDa, YFP-*CmKS*=116 kDa, YFP-*AtCPS*=120 kDa. Als Ladekontrolle diente das Anti-Tub1 Signal.

Diese war für die meisten Stämme diffus in der Zelle verteilt und ließ auf keine definierbare Lokalisation schließen. Für die Konstrukte YFP-*At*KO und YFP *At*ATR2 lagen punktförmige diffus verteilte Ansammlungen von Proteinen vor, welche auf eine Lokalisation im Mitochondrium hindeuten können, was aber ohne weitere Experimente nicht genau feststellbar war. Nur die Konstrukte YFP-*Ps*KAO und YFP-*Cm*KS zeigten eine mögliche Lokalisierung zur ER-Membran (im Falle von YFP-*Cm*KS auch Mitochondrium). Die Expressionsstärke, gemessen anhand der YFP-Fluoreszenzintensität, fiel je nach Enzym unterschiedlich stark aus. Die korrekte Expression der Enzyme wurde weiterhin mit Hilfe eines Western-Blots überprüft (Abb. 27 B). Dabei wiesen die meisten Konstrukte die korrekte molekulare Masse auf. Eine Ausnahme hierbei bildete YFP-*Cm*KO, welches ein Signal bei ca. 40 kDa (erwartete Masse: ~85 kDa) aufwies. Da die anderen beiden Kaurenoxidasen YFP-*At*KO und YFP-*Os*KO keine Auffälligkeiten aufwiesen, wurde mit der YFP-*At*KO weitergearbeitet. Für YFP-*Cm*KS konnte zwar schwach eine Bande auf der korrekten Höhe bei ~116 kDa detektiert werden, jedoch war eine dominantere bei ca. 30 kDa zu erkennen. Dies könnte auf eine Prozessierung des Konstrukts hinweisen. Dennoch wurde mit dem Konstrukt weiterverfahren.

Für eine maximale Expression der Enzyme im endgültigen Produktionsstamm wurde ein konstitutiver Transkriptionsfaktor (TF) konstruiert (Abb. 26 B). Hierzu wurde die VP16 Domäne, welche im Blaulicht-Transkriptionsfaktor indirekt über einen Photorezeptor an die LexA-DNA-Bindedomäne rekrutiert wird, direkt mit dieser über einen Linker fusioniert. Hierdurch sollte eine konstante Transkription gewährleistet werden. Weiterhin wurde eine weitere Aktivierungsdomäne getestet: Diese besaß ein sogenanntes EDLL-Motiv und wurde analog zum LexA-VP16-Konstrukt direkt mit der DNA-Bindedomäne fusioniert (Klonierung durchgeführt von Daniela Störmer). Anschließend wurde die Transkriptionsstärke der beiden konstitutiven TFs im Durchflusszytometer getestet. Der LexA-VP16-TF wurde über ein Plasmid (pJS12) zusammen mit vier unterschiedlichen Plasmiden zur Expression der GA4-Enzyme in Hefe transformiert. Die Stämme zeigten dabei nur schwache YFP-Fluoreszenzwerte, die erst bei hohen Spannungswerten des Anregungslasers B11 (V=500) klar oberhalb der Kontrolle (K) ohne TF lagen (Abb. 28 A). Im Gegensatz dazu zeigte der TF LexA-EDLL (pDS319) deutlich stärkere Fluoreszenz (Abb. 28 B), wobei der angesteuerte Promoter des exprimierten YFPs auf dem Plasmid selbst lag. Entsprechend wurde für die Expression der sieben ausgewählten Enzyme der GA4-Synthese der Transkriptionsfaktor LexA-EDLL verwendet und zusammen mit diesen in den Produktionsstamm integriert.

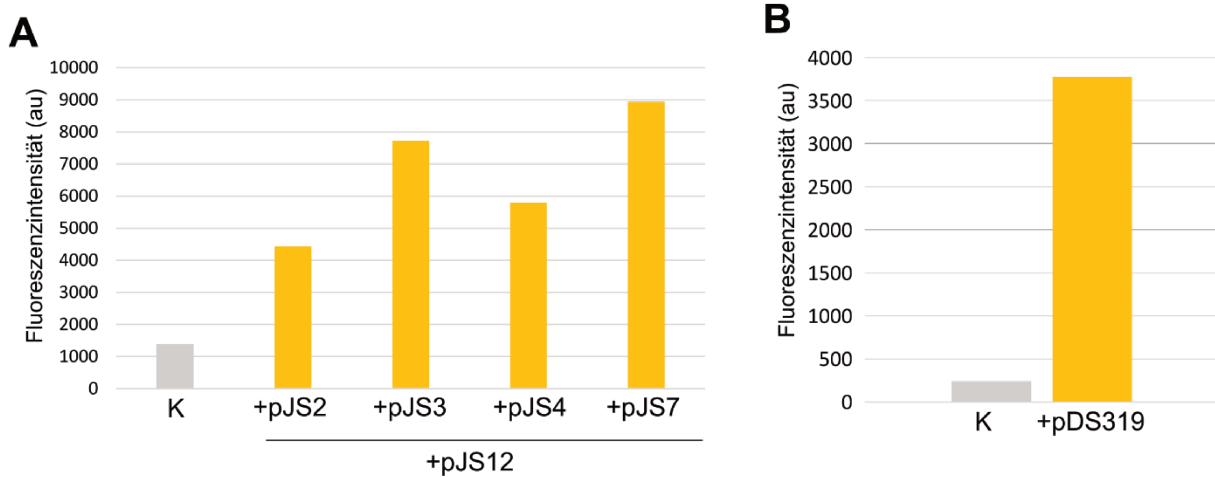


Abb. 28: Expressionstest der unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren: A) Quantifizierung der YFP-Fluoreszenz in Abhängigkeit von pJS12 (LexA-VP16) in Stämmen K=S288c; pJS2=S288c+pJS2+pJS12; pJS3=S288c+pJS2+pJS12; pJS4=S288c+pJS2+pJS12; pJS7=S288c+pJS2+pJS12 mittels Durchflusszytometer. Die Stämme wurden 6 h in LFM inkubiert und anschließend die YFP-Fluoreszenz im Durchflusszytometer im BL2 Kanal analysiert, die Spannung des Excitationslasers betrug 500 V. Die angegebene Werte entsprechen einer Messung. B) Analyse analog zu A) mit dem Stamm pDS319=S288c +pDS319 (LexA-EDLL; YFP-TEV) und K=S288c. Die Spannung des Excitationslasers betrug 350 V. Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert aus vier biologischen Replikaten.

Die genomische Integration erfolgte je Integrationspaar (PsKao::AtKO; PsGA3ox::CmGA20ox; AtATR2::LexA-EDLL; CmKS::AtCPS) einzeln in individuelle Stämme, die anschließend über Kreuzungen zusammengeführt wurden (s. Tab. 4).

Tab. 4: Kreuzungsschema zur Assemblierung des GA4-Synthesewegs

Kreuzungsschritt	Resultierender Stamm	Resultierender Genotyp
YJS7 x SK1	YJS10	<i>911b::Tdit1- PsGA3ox -YFP-Plexa :: PLEXA—YFP -CmGA20ox -Tdit1</i>
YJS10 x YJT30	YJS11	<i>911b::Tdit1- PsGA3ox -YFP-Plexa :: PLEXA—YFP -CmGA20ox -Tdit1</i> <i>leu2::Tdit1-AtATR2-YFP-PlexA::Padhl-LexA-EDLL</i>
YJS11 x YJT31	YJS12	<i>911b::Tdit1- PsGA3ox -YFP-Plexa :: PLEXA—YFP -CmGA20ox -Tdit1</i> <i>leu2::Tdit1-AtATR2-YFP-PlexA::Padhl-LexA-EDLL</i> <i>ura3::Tdit1- CmKS -YFP- Plexa::PLEXA-YFP-AtCPS -Tdit1</i>

Die Integration von AtATR2::LexA-EDLL und CmKS::AtCPS wurde von Jonathan Trauth durchgeführt. Um die Kreuzungen und anschließenden Tetradisdissektion zu erleichtern, wurde YJS7 (*911b:: Tdit1-PsGA3ox-YFP-Plexa :: PlexA—YFP-CmGA20ox-Tdit1*) zunächst mit einem SK1-Stamm gekreuzt, um eine höhere Sporulationsrate zu erreichen. Die aus der

Kreuzung resultierenden Sporen wurden mittels PCR auf die korrekte Integration überprüft und mit dem entsprechenden Stamm (YJS10) wurden weitere Kreuzungen durchgeführt. Er wurde mit YJT30 und YJT31 vereint, wobei nach jeder erfolgten Kreuzung und Tetradisdissektion die resultierenden Sporen per PCR auf die korrekten Integrationen überprüft wurden. Da bei jedem Kreuzungsschritt die Plasmide mit aktiver Cas9-Endonuclease und der jeweiliger gRNA durch den neu eingekreuzten Stamm wieder hinzugefügt wurden, waren die einzelnen Sporen häufig homozygot für die neu eingekreuzte Integration. Der endgültige Produktionsstamm YJS13 entstand durch die genomische Integration von *Tdit1-AtKO-YFP-PlexA* :: *PLexA-YFP-PsKAO-Tdit1* in YJS12 in den *CAN1* Locus mittels Cas9 vermittelter homologer Rekombination.

2.5.2 Analyse des GA4-Produktionsstamm YJS13

Im Produktionsstamm YJS13 wurde zunächst die korrekte Expression der Enzyme des voll assemblierten GA4-Synthesewegs anhand des jeweils angehängten YFPs überprüft. Hierzu wurde ein Proteinextrakt angefertigt und per SDS-PAGE und Western-Blot untersucht. Dabei konnten vier der sieben Enzyme eindeutig identifiziert werden (Abb. 29 A): YFP-*P_sKAO* (83 kDa), YFP-*AtKO* (85 kDa), YFP-*AtAtr2* (106 kDa) nur schwach erkennbar, YFP-*AtCPS* (120 kDa). Die Proteine YFP-*P_sGA3ox* (68 kDa) und YFP-*CmGA20ox* (70 kDa) gleichen sich stark in molekularer Masse und Laufverhalten, wodurch sie eine gemeinsame kräftige Bande bei ca. 70 kDa bilden könnten. Das Konstrukt YFP-*CmKS*(116 Kda) hatte bereits bei der Einzel-Expression nur ein sehr schwaches Signal gezeigt, wodurch eine Detektion neben den anderen Konstrukten nicht möglich war. Ob alle notwendigen Enzyme korrekt gefaltet und aktiv vorliegen, wurde über einen Nachweis von GA4 überprüft. Hierzu wurde in den Stamm ein zweiteiliger molekularer GA-Reporter über Plasmide (pMB1/2) eingebracht. Dieser bestand aus einem pflanzlichen DELLA-Protein, an das die eine Hälfte eines *split-mVenus* angehängt wurde und einem Gid1-Protein mit der anderen Hälfte des *split-mVenus*. DELLA und Gid1 bilden unter Anwesenheit von bioaktiven Gibberellinen ein Heterodimer, wodurch die *split-mVenus*-Hälften zusammengeführt werden und das komplettierte Protein maturiert und fluoresziert. Dieser Reporter wurde von Jonathan Trauth entwickelt und getestet (Doktorarbeit Jonathan Trauth, unveröffentlicht).

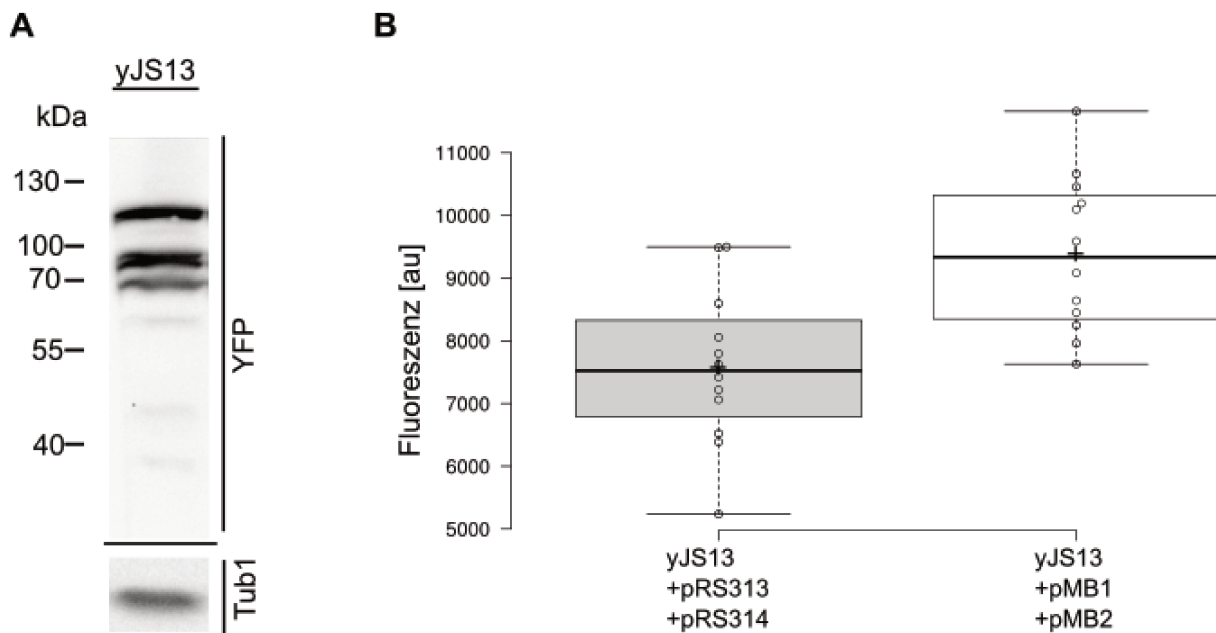


Abb. 29: Analyse des GA4-produzierenden Stammes mittels Western-Blot und GA-Reporter-Fluoreszenz. A) Western-Blot Analyse des Stamms yJS13. Der Stamm wurde für 6 h bei 30°C kultiviert und anschließend weiter wie in Abb.14 verfahren. Abgebildet ist das YFP Signal, detektiert durch Anti-GFP. Das Tub1-Signal diente als Ladekontrolle. Die erwarteten Massen der GA4-Enzyme sind wie in Abb. 26B beschrieben. B) Der Stamm yJS13 wurde mit den beiden Leerplasmiden pRS313/314 und mit den Plasmiden pMB1/2 (GA-Reporter) transformiert und für 8 h in LFM inkubiert. Anschließend wurde die YFP-Fluoreszenz im Durchflusszytometer analog, wie in Abb.27 beschrieben, gemessen und weiterverarbeitet. Die gezeigte Verteilung ergibt sich aus zwölf biologischen Replikaten. Das + markiert hierbei den Mittelwert und die fett-gezeichnete Linie den Median.

Die Fluoreszenz des Stammes wurde im Durchflusszytometer nach 8 h Inkubation gemessen. Als Kontrolle diente der gleiche Stamm mit zwei Leer-Plasmiden (pRS313/314). Da der Stamm durch die markierten Enzyme eine hohe YFP-Fluoreszenz aufwies und mVenus im gleichen Wellenlängenbereich fluoresziert, wurde die Gesamtfluoreszenzintensitäten der beiden Stämme miteinander verglichen. Wie man in Abb. 29B erkennt, zeigte YJS13 mit Reporter im Schnitt eine rund 25% stärkere Fluoreszenz. Dies spricht für eine Produktion von GA4 innerhalb der Zelle (und damit auch für eine zumindest teilweise korrekte Expression von *CmKS*). Eine Extraktion des GA4 aus den Zellen und dem Medium mit einer anschließenden Analyse der Extrakte für einen Nachweis von GA4 durch die Massenspektrometrie-Abteilung war jedoch erfolglos (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass ein Set aus acht Genen (sieben Enzyme und ein Transkriptionsfaktor) erfolgreich in einem *S. cerevisiae* Stamm eingebracht wurde und damit der vollständige enzymatische Stoffwechselweg vom Geranylgeranylphosphat (GGPP) hin zu Gibberellinsäure-4 etabliert wurde. Ein vorläufiger Nachweis mit Hilfe eines molekularen Fluoreszenzreporters war ebenfalls erfolgreich.

3. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Degradationsmechanismen von synthetischen Substraten des ERAD-C untersucht und es wurde mit Hilfe von optogenetischen Modulen ein erhöhter Metabolitenfluss in den Mevalonatweg erreicht. Hierdurch sollte die Produktion unterschiedlicher Stoffe wie β -Carotin, Linalool, Limonen und Geraniol gesteigert werden. Außerdem wurde der Effekt der getesteten optogenetischen Module auf die heterologe Produktion von Cordycepin analysiert. Für die heterologe Produktion von GA4 wurde der enzymatisch katalysierte Syntheseweg in *S. cerevisiae* assembliert und getestet.

3.1 Synthetische Substrate des ERAD-C

Die drei ER-Membranproteine Sec61, Sec62 und Sec66 wurden mit dem psd-Modul modifiziert und konnten erfolgreich unter Blaulichteinwirkung abgebaut werden (Scheffer et al. 2019; Renicke et al. 2013). Dabei wurde gezeigt, dass die Degradation dieser Proteine von den Komponenten des ERAD-C abhängig ist. Dabei war die Anzahl der Transmembran-Domänen nicht entscheidend für die Möglichkeit der konditionalen Degradation durch das psd-Modul. Jedoch besitzt Sec61 mit zehn Transmembranregionen (Wilkinson et al. 1996; Ferreira et al. 2002) die meisten von diesen drei Membranproteinen und zeigte eine leichte Verringerung der Degradationsgeschwindigkeit. Dass ER-Membranproteine mit cytosolischen Domänen vom Proteasom direkt erkannt werden, wurde bereits beschrieben. So wurden ER-gebundene Transkriptionsfaktoren direkt vom Proteasom gebunden, teilweise lysiert und so aus der Membran gelöst (Rape und Jentsch 2004). In Abwesenheit von Ssm4 und im Falle von Sec62-3myc-psd auch von Ubc6 und Ubc7 liegen die drei Proteine stabil und funktional vor. Entsprechend ist eine direkte Erkennung des C-Terminus von Sec62-3myc-psd, Sec61-3myc-psd und Sec66-3myc-psd durch das Proteasom unwahrscheinlich. Eine teilweise Degradation von Sec62-3myc-psd ist ebenfalls nicht zu beobachten. Das cODC-Degron ist im Falle von cytosolischen Proteinen direkt vom Proteasom erkennbar. Daher ist davon auszugehen, dass bei den untersuchten Membranproteinen das Degron maskiert oder unzugänglich vorliegt. Sterische Hinderungen an der Membran sind denkbar, ebenso wie die Maskierung durch Chaperone, die an die entfaltete J- α -Helix und den restlichen C-Terminus binden. Mehrere Chaperone sind während des ERAD-C beteiligt und sind für die korrekte Ubiquitinierung notwendig (Taxis et al. 2003; Zhang et al. 2001; Stolz und Wolf 2010). Da die Proteine Teil des größeren Translocon-Komplex sind, wäre dies als eine weitere Einschränkung für die direkte Erkennung

durch das Proteasom denkbar. Für Erg9-3myc-psd wurde jedoch ebenfalls im WT-Hintergrund nur eine unvollständige Degradation beobachtet, mit einer vollständigen Stabilisierung im *ssm4Δ*-Stamm (Abb.9). Daher ist die Organisation im Translocon-Komplex als Hindernis für Proteasom-Erkennung des cODC-Degrans eher unwahrscheinlich. Für eine Extraktion von Sec61/Sec62/Sec66 aus der ER-Membran kommt der Cdc48-Npl4-Ufd1-Komplex in Frage, wie es bereits für andere Proteine postuliert wurde (Ye et al. 2017). Diese Extraktion hängt von der Ubiquitinierung des Substrats ab, was eine weitere Erklärung für die starke Stabilisierung im *ssm4Δ*-Stamm ist. Untersuchungen im *ubx2Δ*, *npl4-1* und *ufd1-1* Stammhintergrund haben nur eine teilweise Stabilisierung von Sec62-3myc-psd gezeigt. Ein Grund dafür könnte eine nicht vollständige Inaktivierung der Funktion von *npl4-1* und *ufd1-1* sein, oder die redundante AAA-ATPase-Aktivität der Proteasom-19S-Untereinheit (Rpt1-6) sein (Finley et al. 2012).

Vergleicht man die Degradationsgeschwindigkeit vom löslichen Protein RFP-psd mit der von Sec62-3myc-psd, fällt auf, dass auch RFP-psd eine leichte Stabilisierung in der *uba1^{ts}* Mutante aufweist. Weiterhin konnte die teilweise Stabilisierung von rfp-psd in *ssm4Δ*-, *ubc6Δ*-, *ubc7Δ* Stämmen, sowie in *ubc6Δ/ubc7Δ*-Doppelmutanten gezeigt werden (Scheffer et al. 2019). Für lösliche Proteine mit psd-Modul wurde zuvor postuliert, dass sie direkt vom Proteasom erkannt werden (Renicke et al. 2013). Ein Wechsel der Degradationsmaschinerie im Zusammenhang mit ERAD-Substraten wurde bereits für das Fusionsprotein Deg1-Sec62 festgestellt. Lösliche Deg1-Fusionsproteine werden normalerweise ebenfalls Ssm4 abhängig abgebaut. Nach Assoziation mit dem Translocon wurde dieses Hrd1-abhängig abgebaut, der E3-Ligase des ERAD-L und ERAD-M. Durch Mutationen, die eine Verbindung mit dem Translocon verhinderten, wechselte Deg1-Sec62 wieder den Interaktionspartner zu Ssm4 (Rubenstein et al. 2012). Ein Wechsel auf eine mögliche Beteiligung der ERAD Ubiquitinierungsprozesse am Abbau löslicher Substrate ist in sofern denkbar. Möglicherweise hilft eine Ubiquitinierung bei der Erkennung und Entfaltung des RFP-psd. Da der Abbau von Sec62-3myc-psd komplett von der ERAD-C Ubiquitinierungsmaschinerie abhing, ist anzunehmen, dass ein Membran-gebundenes psd-Modul im nicht-ubiquitinierten Zustand komplett für das Proteasom maskiert ist. In einem *in vitro* ERAD-C-System konnte Hsp70 nur in der Mikrosomen-Fraktion gefunden werden, nicht aber im Wildtyp-Cytosol. Es wurde postuliert, dass die Chaperone einen membranassoziierten Komplex um das Substrat bilden und es so vor cytosolischen Elementen maskiert und sterisch abschirmt (Nakatsukasa et al. 2008). Da der Cdc48-Komplex als essentiell für den Abbau von Sec62-3myc-psd identifiziert wurde und dieser nur an ubiquitinierte Substrate bindet, ist eine Ubiquitinabhängigkeit auch hierdurch erklärbar. So wurde bereits

vermutet, dass das Proteasom erst durch den Cdc48-Komplex an die Membran rekrutiert wird (Nakatsukasa et al. 2013).

3.2 Die biotechnologische Anwendung von ERAD-Mutanten und optogenetischen Konstrukten zur Steigerung der β -Carotin-Produktion

Es wurde getestet, ob verschiedene ERAD-Mutanten sowie der Inhibition der Proteinsekretion durch psd-bedingten Abbau von Sec61/Sec62 zu einer gesteigerten Produktionsrate von β -Carotin führen. Dabei konnten sowohl für *hrd1 Δ* als auch für Sec61-psd und Sec62-psd Hinweise auf einen positiven Effekt festgestellt werden. Eine belastbare Aussage über den Effekt der Modifikationen konnte nur im Fall von Sec62-psd getroffen werden, da die Fluoreszenzintensitäten ansonsten stark zwischen den biologischen Replikaten schwankten. Diese enorme Streuung in den Fluoreszenzwerten konnte in allen Stämmen festgestellt werden, was auf die Expression des β -Carotin-Synthesewegs über ein Plasmid zurückzuführen ist. Dadurch werden Schwankungen zwischen Replikaten weiter verstärkt. Für Sec62-psd waren die Ergebnisse deutlich messbarer als für die restlichen Modifikationen. Die Analyse des *hrd1 Δ* -Stamm ergab dabei eine maximale Steigerung der β -Carotin-Fluoreszenz um 45% nach 24 h, jedoch bei großer Streuung. Hrd1 ist die E3-Ligase, die in Zusammenarbeit mit Ubc1 und Ubc7 für den Abbau von Hmg2 im Zuge des ERAD verantwortlich ist (Finley et al. 2012; Burg und Espenshade 2011; Garza et al. 2009). Auch eine Deregulation des Abbaus von Hmg1 in Form der gekürzten tHmg1, ist eine vielfach verwendete Modifikation zu Verbesserung des Ressourcenallokation in den Mevalonatweg (Ignea et al. 2014; Polakowski et al. 1998; Denby et al. 2018). Entsprechend ist eine Steigerung der β -Carotin-Produktion durch *hrd1 Δ* plausibel. Durch die starken plasmidbedingten Schwankungen ist es jedoch möglich, dass ein Effekt abgeschwächt wird. *Ssm4* ist nicht maßgeblich am Abbau von Hmg2 beteiligt, was erklärt, warum kein nennenswerter Effekt im *ssm4 Δ* -Stamm zu beobachten war. Die *ubc6 Δ / ubc7 Δ* Doppelmutante zeigte ebenfalls keinen positiven Effekt. Die beiden E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzyme sind in dieser Konstellation Teil des ERAD-C, welches nicht an der Degradation von Hmg2 beteiligt ist. Ubc7 ist zwar ein Interaktionspartner von Hrd1, eine Stabilisierung von ERAD-M/L Substraten kann jedoch erst in Abwesenheit der zweiten E2-Ubiquitinligase des ERAD-M/L Ubc1 beobachtet werden (Friedlander et al. 2000).

Einen positiven Effekt auf die β -Carotin-Produktion durch die Herabregulation von Sec61 oder Sec62 durch das psd-Modul konnte nur für Sec62 eindeutig bestätigt werden. Der Proteinsekretionsweg wurde zuvor durch bioinformatische Analysen als ein mögliches Ziel zur Verbesserung des Metabolitfluss in den Mevalonatweg ermittelt (Zoran Nikoloski, Zahra

Razaghi Moghadam, 2020 unveröffentlichte Daten). Da Sec61-psd bestenfalls passiv eine Steigerung des β -Carotin-Gehalts erzielen konnte, ist es möglich, dass ein psd-bedingter Abbau dieser zentralen Komponente des Translocon eine zu starke schädliche Wirkung für die Zelle hat. Sec62-psd konnte hingegen nach 5 h deutliche und nach 24 h noch leichte Verbesserungen der Ausbeute bewirken. Angesichts der beobachteten Verringerung der β -Carotin-Menge durch das „Bleichen“ durch Blaulicht, ist es jedoch möglich, dass der eigentliche Effekt von sowohl Sec61-psd als auch Sec62-psd deutlich stärker ausfallen würde. Im WT ist nach 24 h Blaulichtinkubation eine Reduktion der messbaren β -Carotin-Menge um die Hälfte detektierbar. Geht man von einer vergleichbaren Reduktion im Sec62-psd-Stamm aus, fiel der Effekt durch den Abbau von Sec62-psd auf die Produktionsrate von β -Carotin nach 24 h Blaulicht deutlich größer aus. Ob der Einfluss von Sec62-psd auf die Steigerung des Metabolitumsatzes im Mevalonatweg größer ist, als durch die Produktionsrate von β -Carotin messbar, könnte man durch alternative heterologe Produkte aus dem Mevalonatweg testen, die nicht auf Blaulicht reagieren (bspw. Linalool, GAs). Alternativ könnte der Effekt eines konditionellen Abbaus von Sec62 auf die β -Carotin-Produktion durch weitere, nicht blaulichtabhängige Konstrukte, wie z.B. ein TEV-Protease-abhängiges Degron getestet werden (Jungbluth et al. 2010).

3.3 Der Effekt von optogenetischer Kontrolle von Zellzyklusregulatoren auf die Ausbeute von heterolog produzierte Stoffe

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein durch Clb2^{ADB}-psd³-induzierter Zellzyklus-Arrest einen positiven Einfluss auf den Metabolitfluss in den Mevalonatweg hat. Demonstriert wurde dies durch die gesteigerte Produktionsrate von β -Carotin. Ein Zellzyklusarrest durch Δ^N Sic1-psd³ ergab ebenfalls Hinweise auf eine gesteigerte Ausbeute von β -Carotin, konnte jedoch auf Grund von starken Messwert-Schwankungen keinen eindeutigen Effekt zeigen.

Dass ein kontrollierter Zellzyklusarrest positive Effekte auf die heterologe Produktion von β -Carotin haben kann, konnte unter anderem mit Hilfe von Biomasse-Analysen (Filipp Bezold, unveröffentlichte Daten) gezeigt werden (s. Abb. 29). Hierbei wies der Clb2^{ADB}-psd³ nach induziertem Zellzyklus-Arrest in der G2-Phase verringerte Kohlenhydrat-Mengen und erhöhte Protein-Level auf. Dies weist auf eine gesteigerte Glykolyse hin, sowie einer gesteigerten Proteinbiosynthese während der G2-Phase. Gleichzeitig wurde bereits gezeigt, dass in *S. cerevisiae*, abhängig von der Zellzyklusphase und des Nahrungsangebots, speziell Ressourcen in der Zelle bereitgestellt und vermehrt Ribosomen produziert werden (Björkeröth et al. 2020; Campbell et al. 2020). Außerdem finden die meisten metabolischen Prozesse während der G2-Phase statt, wobei zusätzlich die Mitochondrienaktivität und damit die

Energieproduktion ebenfalls zunimmt (Campbell et al. 2020). Durch eine Arretierung in der G2-Phase durch $Clb2^{\Delta DB}$ - psd^3 (Hasenjäger et al. 2019) konnten diese zusätzlichen Ressourcen für die Produktion von β -Carotin genutzt werden.

Die starken Unterschiede im allgemeinen Produktionsniveau von β -Carotin in der HPLC-Analyse der Stämme aus Abb.20 und Abb. 21 (Kapitel 2.5.3) ist aller Wahrscheinlichkeit nach sowohl auf die bekannten Plasmid-bedingten Schwankungen des Enzymniveaus zurückzuführen als auch auf den unterschiedlichen Stammhintergrund. Weitere Hindernisse bei der Quantifizierung von β -Carotin ergaben sich durch einen instabilen Standard, dessen Konzentration durch ausfallendes β -Carotin Schwankungen unterlegen war. Weiterhin auffällig ist, dass trotz der möglichen Arretierung des Zellzyklus durch Δ^N Sic1- psd^3 (Hasenjäger et al. 2019), keine eindeutig erhöhten Titer von β -Carotin erreicht wurden. Mögliche Gründe dafür, neben der bereits erwähnten starken Schwankung durch Plasmid-basierte Produktion von β -Carotin, könnte eine nicht ausreichend rigide Arretierung des Zellzyklus durch Δ^N Sic1- psd^3 im Dunklen sein. Hinzu kommt, dass der Δ^N Sic1- psd^3 bedingte Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase stattfindet (vgl. Abb. 2), im Gegensatz zu dem G2-Arrest durch $Clb2^{\Delta DB}$ - psd^3 . Hinsichtlich metabolischer Aktivität ist, wie bereits erwähnt, die G2-Phase deutlich bevorzugt, wodurch ein G1-Zellzyklusarrest einen geringeren Effekt aufweisen müsste. Entsprechend fällt ein Effekt von Δ^N Sic1- psd^3 geringer aus und wird durch die Schwankungen der Messwerte maskiert. Eine genaue Aussage über die Wirksamkeit von Δ^N Sic1- psd^3 zur Steigerung der β -Carotin-Produktion bleibt offen. Durch die genomische Integration des β -Carotin-Synthesewegs, sollten jedoch die Schwankungen der Messwerte behebbar sein, wodurch eine genauere Untersuchung des Effekts von Δ^N Sic1- psd^3 möglich ist.

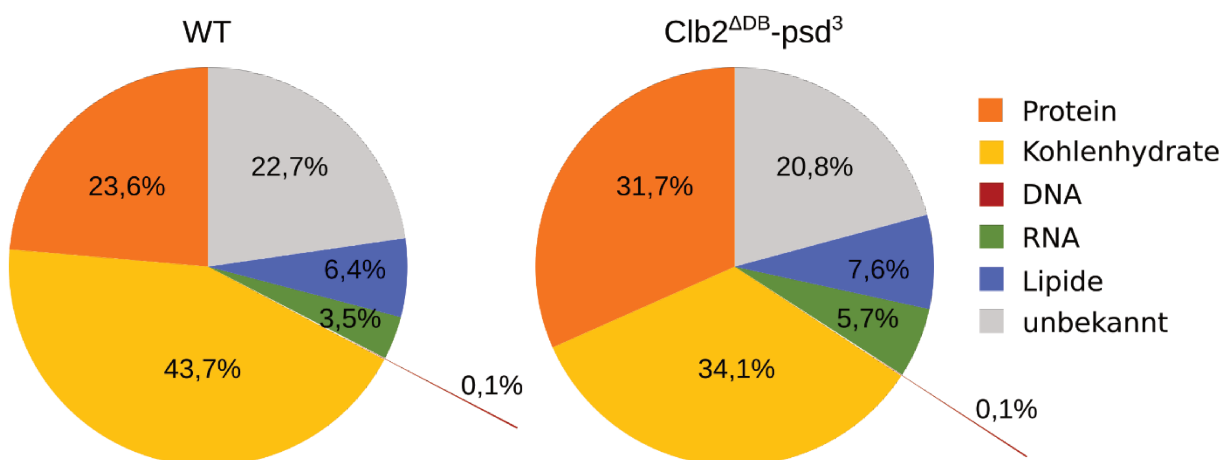


Abb. 29: Biomasseanalyse eines ESM365-Wildtyp-Stamms und eines $Clb2^{\Delta DB}$ - psd^3 -Stamms (Analyse durchgeführt von Philipp Bezold, 2018-2019). Aufgeführt sind die Biomasse-Anteile eines Wildtyp-Stamms (links) und eines $Clb2^{\Delta DB}$ - psd^3 -Stamms (rechts) nach Induktion eines Zellzyklusarrests im Dunkeln. Es wurden der Anteil an Proteinen, Kohlenhydraten, DNA, RNA und Lipiden in der Trockenmasse bestimmt (Filipp Bezold, unveröffentlichte Daten).

Eine Limitierung des Systems stellt die Reduktion der Zellmasse bei verlängerten Zellzyklusarrest dar. So kann zwar der metabolische Fluss in ein mögliches Ziel-Produkt verbessert werden, dieser Effekt wird dann aber möglicherweise durch die vielfach geringere Zellzahl verglichen mit einem WT übertroffen. Durch ein Anpassen der Wachstumsphasen sowie der Einsatz reichhaltigeren Mediums, kann dieses Problem jedoch z.T. gelöst werden. Da sowohl durch $\text{Clb2}^{\Delta\text{DB}}\text{-psd}^3$ als auch $\Delta^{\text{N}}\text{Sic1}\text{-psd}^3$ eine gesteigerte Produktionsrate von Cordycepin gezeigt haben, ist ein positiver metabolischer Effekt der beiden Konstrukte erwiesen.

3.4 Die optogenetische Kontrolle von Cdc48 und dessen biotechnologisches Potential

Durch einen psd-Bedingten Abbau von Cdc48 konnten die stärksten Effekte auf die heterologe Produktion von β -Carotin gezeigt werden. Eine Steigerung der Titer um bis zu 300% im Vergleich zum WT im $\text{Cdc48}\text{-psd}^3$ konnten eindeutig einen positiven Einfluss durch eine Destabilisierung des Cdc48-Komplexes zeigen. $\text{Cdc48}\text{-psd}^3$ sorgte ebenfalls wie Clb2 für eine Verlängerung der G2-Phase und zusätzlich auch der G1-Phase (Hasenjäger et al. 2019). Erste Biomasseanalysen zeigten dabei ähnliche Potentiale für Cdc48 als biotechnologisches Ziel wie zuvor für Clb2 (Filipp Bezold, persönliche Mitteilung). Die Zellzyklus-Kontrolle durch $\text{Cdc48}\text{-psd}^3$ wurde bereits beschrieben (Hasenjäger et al. 2019). Hierbei war im Vergleich zu $\text{Clb2}^{\Delta\text{DB}}\text{-psd}^3$ die intensivste Arretierung der Zellen in der G2-Phase zu beobachten. Dadurch können die zuvor unter 3.3 beschriebenen Effekte eines G2-Arrests, wie die gesteigerte Proteinbiosynthese und Glykolyse in der G2-Phase (Björkeroth et al. 2020; Campbell et al. 2020; Yu et al. 2020), noch effizienter ausgenutzt werden, wodurch es zu einer gesteigerten Ressourcenallokation hin zum Mevalonatweg und der deregulierten β -Carotin Biosynthese kommt. Neben $\text{Cdc48}\text{-psd}^3$ wurde noch Npl4-psd auf potentielle Effekte getestet. Als essentieller Co-Faktor des Cdc48-Komplexes hatte sich Npl4 als weiteres Ziel angeboten. Eine Steigerung der β -Carotin-Produktion waren zwar zu beobachten, jedoch fielen diese nicht so hoch aus wie im Falle von $\text{Cdc48}\text{-psd}^3$. Mögliche Gründe dafür sind eine teilweise Rettung des Phänotyps durch Ufd1 als Substrat-bindender Co-Faktor (Ye et al. 2017). Der Aufgabenbereich von Cdc48 als AAA-ATPase innerhalb der Zelle ist sehr breit, weswegen die Steigerung der β -Carotin-Produktion durch einen Blaulicht-abhängigen Abbau von Cdc48-psd bzw. -psd^3 nicht zwingend allein auf den verursachten Zellzyklusarrest zurückzuführen sein muss. Eine weitere Steigerung der Ressourcenallokation könnte auch durch eine Inhibierung des ERAD erzielt worden sein. Hier spielt der Cdc48-Komplex ebenfalls eine tragende Rolle, unter anderem im Abbau von Hmg2 (Wolf und Stolz 2012; Baek et al. 2013). Eine Verringerung der Abbaurate

von Hmg2 konnte bereits durch *hrd1Δ* leicht positive Effekte zeigen. Eine Steigerung der Flussrate in den Mevalonatweg durch eine erhöhte Hmg2 Aktivität mit verbesserter Prozessivität hin zu HMG-CoA in Verbindung mit einem kontrollierten Zellzyklusarrest könnten in der Kombination im Cdc48-psd3 Stamm eine besonders starke kumulative Wirkung entfalten. Dadurch würden die Effekte in einem *hrd1Δ*-Stamm und einer reinen Zellzyklusarrest-Mutante wie Clb2^{ΔDB}-psd³ addiert werden.

Ähnlich wie im Clb2^{ΔDB}-psd³-System ist auch für den Cdc48-psd³-Stamm eine Limitation die starke Reduzierung der Zellmasse nach Arretierung des Wachstums. So fällt die Produktion von β-Carotin pro Zelltrockenmasse nach Blaulichtinkubation zwar deutlich größer aus (ca. 300% des WT-Niveaus) gleichzeitig reduziert sich aber auch die Trockenmasse auf ~1/4 des WT-Niveaus. Dadurch werden Vorteile der gesteigerten Ressourcenverfügbarkeit im Mevalonatweg teilweise aufgehoben (vgl. Cdc48-psd Abb.20B). Eine mögliche Nutzung von Cdc48-psd/Cdc48-psd³ im Zusammenhang mit toxischen Produkten, die ein Zellwachstum ohnehin stören würden und deren Produktion entsprechend ebenfalls erst nach einer Wachstumsphase induziert wird, wäre daher von Vorteil. Weiterhin ist es möglich, die produzierte Zellmasse der Zellzyklusmutanten durch bspw. Intervall-Induktion oder angepasste Wachstumszeiten zu verbessern, bei gleichzeitigem Erhalt des metabolischen Effekts des Zellzyklusarrests (s. Blaulichtintervalle, Abb. 16).

Ein weiteres Problem im Zusammenhang mit β-Carotin, ist dessen „Bleichung“ durch Blaulicht. Während β-Carotin im Dunkeln relativ stabil bleibt, ist die nachweisbare Menge, je nach Lösungsmittel, schon bei normaler Zimmerbeleuchtung und Kontakt mit Sauerstoff nach 24 h zu 50% reduziert (Scita 1992). Dies steht im Einklang mit den hier gemachten Beobachtungen zur Reduktion der β-Carotin-Menge nach Blaulichtbeleuchtung. Eine Einsetzbarkeit von optogenetischen Modulen im Zusammenhang mit β-Carotin ist also mit Einschränkungen verbunden. Bei ausreichender Steigerung durch die eingesetzten optogenetischen Module und Reduzierung der Lichtdosis bei ähnlichem Wirkungsgrad, wie bspw. Blaulichtintervalle, erhält man trotzdem deutliche Ausbeutesteigerungen. Der positive Effekt von Cdc48-psd³ überwiegt also den negativen Effekt der Blaulichtinkubation.

Durch die Steigerung der β-Carotin-Produktion durch Cdc48-psd³ und Cdc48-psd konnte die Wirksamkeit von Cdc48-psd³ und Cdc48-psd zur Steigerung der Ressourcenallokation in den Mevalonatweg und angeschlossener heterologer Synthesewege eindeutig gezeigt werden.

3.5 Die vielseitige Nutzbarkeit der getesteten optogenetischen Konstrukte

Die Vielseitigkeit der verwendeten optogenetischen Konstrukte zur Verwendung in der Biotechnologie konnte durch die stark gesteigerte Produktion von Cordycepin gezeigt werden. Hierbei waren sowohl im Cdc48-psd³-Stamm als auch in einer blaulichtinduzierten Variante von Clb2^{ADB} und ^{ΔN}Sic1 stark erhöhte Mengen von Cordycepin feststellbar. Die Cordycepin-Synthese bezog dabei ihre Ausgangssubstrate 3'-AMP nicht über den Mevalonatweg, sondern über die Degradation von RNA in der Vakuole (Xia et al. 2017; Huang et al. 2015; Welter und Elazar 2015). Die Steigerung der Cordycepin-Produktion im Cdc48-psd³-Stamm im Vergleich zum WT fiel deutlich stärker aus, als zuvor bei β-Carotin. Betrachtet auf die Zelltrockenmasse wurde hier das bis zu 12fache des WT-Niveaus erreicht; für β-Carotin konnte maximal das dreifache beobachtet werden. Ein Grund dafür könnte in der Reduktion des messbaren β-Carotins unter Blaulicht liegen. Möglicherweise wurde eine exzessivere Steigerung der Syntheserate durch die Degradation des β-Carotin zumindest zum Teil aufgehoben. Angesichts der ebenso deutlich stärker gesteigerten Cordycepin-Produktion im Clb2^{ADB}- und ^{ΔN}Sic1-Stamm, im Vergleich zur Steigerung der β-Carotin Produktion im Dunkeln durch die Konstrukte ^{ΔN}Sic1-psd³ und Clb^{ADB}-psd³ ist dies jedoch eher unwahrscheinlich. Des Weiteren war die Synthese von Cordycepin nicht direkt an einen Syntheseweg von *S. cerevisiae* gekoppelt, sondern bezog ihr Ausgangssubstrat 3'-AMP aus der RNA-Degradation (Huang et al. 2015; Welter und Elazar 2015). Neben den unter 3.3 und 3.4 beschriebenen Effekten eines kontrollierten Zellzyklusarrests und dem damit verbundenen gesteigerten Proteinsynthese-Rate und Energienutzung, wäre außerdem die gesteigerte Konzentration von Ribosomen (also auch rRNA), deren Abbau wiederum mehr 3'-AMP bedeutet, ein möglicher Grund für die erhöhten Cordycepin-Mengen (Huang et al. 2015; Campbell et al. 2020; Björkeroth et al. 2020). Weiterhin ist der Cdc48-Komplex an der Degradation von Proteinen beteiligt, wodurch höhere Konzentrationen der heterolog exprimierten Enzyme Cns2 und Cns3 möglich sind.

Da die Analyse von Clb2^{ADB} und ^{ΔN}Sic1 ohne eine interne Wildtyp-Kontrolle stattgefunden hat, ist eine genaue Vergleichbarkeit und Quantifizierung etwaiger Effekte nicht möglich. Nichtsdestotrotz war die Produktivität von sowohl Clb2^{ADB} (75 μmol/l) und ^{ΔN}Sic1 (152 μmol/l) derart hoch, dass eine Steigerung im Vergleich zum WT (20 μmol/l) deutlich gegeben war.

Eine allgemeine Steigerung des metabolischen Potentials durch einen optogenetisch kontrollierten Zellzyklusarrest war zu beobachten und unterstützt die vorherigen Ergebnisse zur β-Carotin Synthese. Hinzu kommt, dass die Steigerung der Cordycepinproduktion durch die optogenetischen Module deutlich stärker ausfiel, als es zuvor für β-Carotin zu beobachten war.

Dies weist auf einen potentiell stärkeren Effekt der Konstrukte hin, als der, der durch β -Carotin messbar war, auf Grund der Blaulichtempfindlichkeit des Produkts.

3.6 Die heterologe Terpensynthese in Hefe

Die Expression der drei Terpen-Synthasen in *S. cerevisiae* war erfolgreich und die Synthese von Linalool, Geraniol und Limonen aus dem Mevalonatweg sollte prinzipiell in *S. cerevisiae* möglich sein (Fischer et al. 2011; Deng et al. 2016; Behrendorff et al. 2013; Jongedijk et al. 2015). Dennoch war ein erster Versuch zum Nachweis der Produktion von Geraniol und Linalool erfolglos. Neben dem Problem des konstanten Entweichens der flüchtigen Stoffe aus den Zellen und dem Medium, ist ein entscheidender Faktor die FPP-Synthase Erg20 (Jongedijk et al. 2015; Jongedijk et al. 2016). Zur heterologen Synthese von Linalool, Geraniol und Limonen wurde in der Vergangenheit meist eine mutierte Erg20^{K197E} bzw. Erg20^{K197G} mit einer verringerten Prozessivität eingesetzt (Fischer et al. 2011; Denby et al. 2018). Dadurch wurde der Pool an nutzbarem GPP enorm erhöht, da GPP sonst nur vorübergehend als Intermediat gebildet wird und direkt zu FPP umgesetzt wird (Jongedijk et al. 2015). Ohne die Erg20^{K197E} ist eine prinzipielle Produktion von Limonen, Geraniol und Linalool zwar möglich, jedoch sind nur basale Mengen der Produkte zu erwarten. Außerdem wäre eine Steigerung der Produktion vor der Beseitigung dieses Engpasses durch weitere metabolische Veränderungen wirkungslos. Die Kombination von Erg20^{K197E}, tHmg1 und einem der in dieser Arbeit getesteten optogenetischen Module (z.B. Cdc48-psd³, Sec62-psd, Clb2^{ADB}-psd³ etc.) sollte, wie zuvor für β -Carotin beobachtet, zu einer gesteigerten Produktion führen.

3.7 Die heterologe Produktion von GA4 in *S. cerevisiae*

Zur heterologen Produktion von Gibberellinsäure in *S. cerevisiae* wurde ein Set von zehn synthetischen Genen der benötigten Enzyme in Expressionvektoren kloniert und *in vivo* getestet. Hierbei ergab sich eine nähere Auswahl aus sieben Genen die den vollständigen Syntheseweg zur Gibberellinsäure-4 darstellen und in *S. cerevisiae* exprimierbar waren. Nach der genomischen Integration dieser sieben Gene und einem zusätzlichen konstitutiven Transkriptionsfaktor konnten mit Hilfe eines Fluoreszenz-Reporters zumindest Spuren der Produktion von GA4 detektiert werden.

Die korrekte und stabile Expression der Kaurensynthase aus *Cucurbita maxima* blieb weiterhin fragwürdig und ist der wahrscheinlichste Engpass des Synthesewegs. Eine heterologe Expression dieses Enzyms wurde bisher nur in *E. coli* gezeigt, nicht jedoch in Hefe (Yamaguchi et al. 1996). In einer Western-Blot Analyse konnte lediglich ein teilweise prozessiertes YFP

nachgewiesen werden. Da Mikroskopanalysen auf eine Lokalisation zum ER oder Mitochondrium hindeuten, besteht die Möglichkeit, dass das Fusionsprotein YFP-*CmKS* durch eine N-terminale Signalsequenz postranslational in eines der beiden Organellen transportiert wurde. Ein ER-Signalpeptid oder Prozessierungssequenz konnte zwar durch bioinformatische Analysen nicht festgestellt werden, es ist jedoch zumindest ein Chlorplast-Signalpeptid annotiert, wofür außerdem eine geringe Wahrscheinlichkeit gefunden wurde (vgl. Tab. 3, *CmKS*:26%). Eine Chlorplast-Signalpeptid kann in Hefe zu einem Import ins Mitochondrium führen (Hurt et al. 1986). In machen Fällen, wird beim Proteinimport ins Mitochondrium das Signalpeptid proteolytisch entfernt, bei einer solchen Prozessierung würde das ebenfalls am N-Terminus befindliche YFP abgeschnitten werden (Taylor et al. 2001; Mossmann et al. 2012). Eine solches YFP mit Resten der Kaurensynthase (>25 kDA) konnte im Western-Blot detektiert werden. Ob eine unmarkierte aber funktionale Kaurensynthase danach weiterhin in der Zelle vorhanden ist, ist nicht eindeutig nachgewiesen. Proteomics-Analysen konnten die Expression der restlichen Enzyme im Expressionsstamm yJS13 klar nachweisen, die Peptid-Sequenz Abdeckung für die KS war jedoch deutlich niedriger als die der anderen Enzyme (Filipp Bezdol, unveröffentlichte Daten, Daten nicht gezeigt). Eine Entfernung der N-terminalen Signalsequenz in der KS, könnte für eine bessere Expression sorgen. Vergleichbare Modulierungen, wie das Entfernen von Signalpeptiden wurden bereits für anderen pflanzliche Proteine zur besseren Expression in *S. cerevisiae* durchgeführt (Denby et al. 2018). Für die YFP-*PsGA3ox* war ebenfalls eine Prozessierung für einen geringen Anteil der Proteine zu beobachten. Eine komplett stabile Expression der YFP-markierten Enzyme ist entsprechend nicht garantiert. Weiterhin war die native Lokalisation der Enzyme im ER (KAO) bzw. Mitochondrium (KO, ATR2, CPS, KS) nicht sicher gegeben. Ob dies jedoch eine Auswirkung haben könnte, bleibt offen.

Da der Reporter, bestehend aus *Gid1-A-NmVenus* und *DELLA-CmVenus*, auf ein bioaktives Gibberellinsäurederivat in yJS13 anschluss, zeigt das, dass möglicherweise die KS in geringen Mengen in der Zelle exprimiert vorliegt. Diese geringe Menge reicht nicht für eine Detektion des Proteins durch den Western-Blot aus, da möglicherweise das YFP durch Prozessierung vom N-Terminus entfernt wird. Es ist jedoch für eine ausreichende Aktivität vorhanden, die zur Synthese von geringen Mengen Ent-Kauren ausreicht und damit zur weiteren Synthese von GA-4.

Bei der Charakterisierung des GA-Reporters durch direkte Zugabe von Gibberellinsäure-3 in Medium, ergaben sich eine Detektionsgrenze von maximal 0,1 μM (Jonathan Trauth, unveröffentlichte Daten). Hinzu kommt, dass nicht sicher ist, wie viele der Gibberelline auf

Grund der negativen Ladung, ohne Transporterproteine die Zellmembran passieren können, weswegen die effektive Konzentration innerhalb der Zellen nochmals geringer sein kann. Die sehr geringen Mengen an GA-4, die in Folge der vorübergehend exprimierten *CmKS* gebildet werden können, reichen für eine Reaktion des Reporters aus. Hinzu kommt die höhere Sensitivität des Reporters für GA4 (10fach) und der direkten Produktion in der Zelle, statt eines Transports über die Membran (Nakajima et al. 2006). Entsprechend geringe Mengen von unter $0,1 \mu\text{M}$ sind für massenspektrometrische Messungen jedoch nicht mehr detektierbar (persönliche Mitteilung, Filipp Bezold). Da *Gid1* und *Della* nur in Anwesenheit von bioaktiven Gibberellinen dimerisieren, ist eine falsch positive Reaktion des Reporters durch die nicht bioaktiven Zwischenprodukte des GA4-Synthesewegs ausgeschlossen (Ueguchi-Tanaka et al. 2006; Nakajima et al. 2006). Nichtsdestotrotz ist eine Aussage über die Menge von GA4 in der Zelle an Hand dieser Daten der Reporter-mVenus-Fluoreszenz nicht möglich. Um zumindest eine Näherung der produzierten GA-4-Mengen zu erreichen, müsste der Reporter durch die externe Zugabe von GA-4 weiter charakterisiert werden. Alle der sieben integrierten Enzyme waren mit YFP markiert, dessen Fluoreszenz im gleichen Wellenlängenbereich wie mVenus detektiert wird, wodurch die Hintergrundfluoreszenz extrem hoch war. Dadurch wird ein Anstieg in der Fluoreszenzintensität durch einen dimerisierenden Reporter, der auf die Präsenz von bioaktiven Gibberellinen anspricht, zusätzlich verdeckt.

Dennoch ist das Grundgerüst für eine heterologe Produktion von GA-4 (sowie GA-1 und GA-3 nach erfolgreicher Expression der GA13-Oxidase) in *S. cerevisiae* gegeben und geringe Mengen von GA-4 konnten bereits nachgewiesen werden. Durch die erstmalige heterologe Produktion von Gibberellinen in Hefe ist der Fundament für eine einfachere Produktion als bisher dieser sowohl wirtschaftlich als auch wissenschaftlich interessanten Pflanzenhormone gelegt.

3.8 Ausblick

Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die optogenetisch kontrollierte Degradation von *Sec61-3myc-psd*, *Sec62-3myc-psd* und *Sec66-3myc-psd* von ERAD-C abhängt und somit synthetische Substrate des ERAD erstellt werden konnten. Durch das blaulichtabhängige *psd*-Modul ist es so möglich, die Mechanismen hinter ERAD-C durch einfache, konditionelle Mutanten näher zu untersuchen.

Weiterhin wurde das Potential der optogenetischen Module zum Einsatz in der Biotechnologie untersucht. Hierbei ergaben sich enorme Steigerungen der β -Carotin-Produktion und damit des Metabolitfluss in den Mevalonatweg, durch einen optogenetisch induzierten Zellzyklusarrest

sowie der Kontrolle der Proteinsekretion. Um zu überprüfen, ob die mögliche Steigerung des Metabolitfluss in den Mevalonatweg durch Cdc48-psd³, Sec62-psd und Clb2^{ADB}-psd³ maximal ausgereizt wurde, wäre eine Kombination dieser Mutanten mit weiteren Modifikationen sowie neue Produkten notwendig. Durch einen zusätzlichen Einsatz der tHmg1 sowie von CrtE (einer zusätzlichen Geranylgeranyldiphosphat-Synthase, Teil des β -Carotin-Operons) wären Engpässe, die das Potential der Mutanten zu Beginn des Mevalonatwegs beschneiden, beseitigt (Polakowski et al. 1998; Ignea et al. 2014; Beenukumar et al. 2015; Alcaíno et al. 2014). Weiterhin können die unterschiedlichen getesteten System mit der Synthese von Linalool, Limonen und Geraniol getestet werden, um deren Produktion zu steigern und die Einsetzbarkeit für Produkte des Mevalonatweg weiter zu untersuchen. Hierfür ist jedoch zunächst als zusätzliche genetische Modifikation die Integration der Erg20^{K197E}-Mutante notwendig, um eine ausreichende Menge des Ausgangssubstrats GGPP sicherzustellen (Jongedijk et al. 2015).

Mit der Steigerung der Cordycepin-Produktion in Hefe durch Cdc48-psd³, Clb2^{ADB} und Δ^N Sic1 konnte eindrucksvoll die vielseitige Einsetzbarkeit der optogenetischen Module zur Verbesserung des Metabolit- und Energieflux gezeigt werden. Da der Syntheseweg hin zu Cordycepin noch nicht vollständig ist, besteht auch hier noch Potential zur weiteren Verbesserung. So wäre der heterologe Syntheseweg erst durch die Expression von Cns3 an den nativen Metabolismus angeschlossen. Cns3 katalysiert die Reaktion von Adenosin hin zu 3'-Amp. Ob dies vor allem die Produktivität eines WT-Stamms steigert oder auch das Potential der Mutanten weiter ausnutzt, bleibt eine zu klärende Frage. Da Cordycepin in der Kultur nach abgeschlossener Fermentation momentan bereits hauptsächlich im Medium vorzufinden ist, scheint eine Expression der Efflux-Pumpe Cns4 nicht notwendig (vgl Abb. 5).

Die Assemblierung eines heterologen Synthesewegs für GA4 war erfolgreich und geringe Mengen von GA4 konnte mittels eines molekularen Reporters detektiert werden. Bei der Charakterisierung des Expressionsstammes konnte CmKS als potentieller Flaschenhals bei der Synthese von GA4 identifiziert werden. Um dies zu beheben, wurden bereits vier weitere synthetische Gene (Uniprot IDs: *FfKS*= A0A1B1TG96, *FmKS*= A0A1L7U1J0, *OsKS*= Q0JA82, *AtKS*= Q9SAK2) von Kaurensynthasen bestellt und in Expressionsvektoren kloniert, darunter zwei pilzliche Enzyme aus *Fusarium fujikoro*i und *Fusarium mangiferae* (Niehaus et al. 2016; Hwang und Ahn 2016). Diese versprechen eine leichtere heterologe Expression durch einen engeren Verwandtschaftsgrad mit *S. cerevisiae*. Außerdem sind diese beiden Enzyme bifunktional und besitzen sowohl KS als auch CPS-Aktivität, wodurch sie die ersten beiden Schritte der GA-Synthese in sich vereinen und in räumliche Nähe zueinander bringen.

Möglicherweise ist ein Problem bei der Expression von YFP-*CmKS* das N-terminal angehängte YFP. Ein Set der gleichen Enzyme aus unmarkierten Proteinen wurde bereits im Zuge dieser Arbeit in Expressionsvektoren kloniert (pJS13-pJS19), Daten nicht gezeigt) und kann analog zu den markierten Varianten in einem Expressionsstamm final assembliert werden. Sollten mit Hilfe des GA-Reporters und massenspektrometrischen Analysemethoden die GA4-Level durch die neuen Kaurensynthesen signifikantere Mengen festgestellt werden, wäre eine Etablierung der oben genannten und in dieser Arbeit charakterisierten Modifikation wie Cdc48-psd³ sinnvoll. Dadurch ist, basierend auf den Ergebnissen der Experimente mit β -Carotin, eine weitere Steigerung der GA4-Produktion zu erwarten.

Die Synthese von GA1 und GA3 ist prinzipiell im Expressionstamm YJS13 ebenfalls möglich, es wird lediglich das Enzym GA13ox benötigt. Die Klonierung dessen in einen Expressionsvektor war im Zuge dieser Arbeit zunächst nicht möglich und konnte auf Grund von Zeitmangel nicht fertig gestellt werden. Das Testen weiterer GA13-Oxidasen aus anderen Organismen wäre hierbei ebenfalls hilfreich.

Für einen endgültigen Produktionsstamm müssten also einige Komponenten, die in dieser Arbeit etabliert wurden, kombiniert werden, um das volle Potential einer „*Cell Factory*“ zu entfalten. Neben den hier genannten Modulen, wurden weitere Verbesserungen des Mevalonatwegs, wie bspw. die Herabregulierung von Erg9 (Jonathan Trauth, Doktorarbeit, unveröffentlicht) bereits parallel entwickelt. Eine Kombination dieser Module mit den hier gezeigten würde letztendlich das volle Potential beider Modifikationen entfalten.

4. Material

4.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien zur Herstellung von Medien, Puffern und Lösungen wurden von CARL ROTH GMBH & CO. KG (Karlsruhe, D) bezogen. Für Gelelektrophoresen wurden der „GeneRuler™ DNA Ladder-Mix“ von THERMO FISHER SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) verwendet.

4.2 Enzyme und Kits

Die verwendeten Restriktionsenzyme und die geeigneten Puffer wurden von „New England Biolabs“ bezogen. Die Plasmid-Präparationskits stammten von Qiagen.

4.3 Antibiotika

Tab. 5: Verwendete Antibiotika

Name	Endkonzentration	Bezugsquelle
Ampicilin	100 µg / ml	CARL ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, D)
Kanamycin	100 µg / ml	CARL ROTH GMBH & CO KG(Karlsruhe, D)
ClonNAT	200 µg / ml	WERNER BIO AGENTS GMBH (Jena, D)
Hygromycin	300 µg / ml	CARL ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, D)
Canavanin	100 µg / ml	CARL ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, D)

4.4 Nährmedien

Tab. 6: Verwendete Nährmedien

Name	Zusammensetzung
LB (<i>Lysogeny Broth</i>)	1 % (w/v) Pepton aus tryptisch verdaulichem Casein 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl

Name	Zusammensetzung
YPD (<i>Yeast Extract, Peptone, Dextrose</i>)	2 % (w/v) Pepton aus tryptisch verdaulichem Casein 1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Glucose
LFM („ <i>Low Fluorescence Medium</i> “)	10 % (v/v) Salz-Stammlösung (LFM) 0,1 % (v/v) Spurenelemente-Stammlösung (LFM) 0,1 % (v/v) Vitamin-Stammlösung (LFM) 2 % (w/v) Glucose
WM8	10 % (v/v) Salz-Stammlösung (WM8) 0,1 % (v/v) Spurenelemente-Stammlösung (WM8) 0,1 % (v/v) Vitamin-Stammlösung (WM8) 5 % (w/v) Glucose
Sporulations Medium (SPO)	0,1% Kaliumacetat
Salz-Stammlösung (LFM)	5 % (w/v) Ammoniumsulfat 1 % (w/v) KH_2PO_4 0,5 % (w/v) MgSO_4 0,1 % (w/v) NaCl 0,1 % (w/v) Ca_2Cl
Spurenelemente-Stammlösung (LFM)	0,05 % (w/v) H_3BO_4 0,004 % (w/v) CuSO_4 0,01 % (w/v) KI 0,02 % (w/v) FeCl_3 0,04 % (w/v) MnSO_4
Vitamin-Stammlösung (LFM)	0,0002 % (w/v) Biotin 0,04 % (w/v) Calcium Pantothenat 0,2 % (w/v) Inositol 0,04 % (w/v) Niacin 0,02 % (w/v) Para-amino Benzoat 0,04 % (w/v) Pyridoxin HCl 0,04 % (w/v) Thiamin HCl
Aminosäure-Mix	20 g aller Standardaminosäuren +/- Uracil, Leucin, Tryptophan und Histidin (je Mix) 2 g p-Aminobenzoat 5 g Adenin
Salz-Stammlösung (WM8)	0,1 % (w/v) KH_2PO_4 0,025 % (w/v) MgCl_2 0,01 % (w/v) NaCl 0,01 % (w/v) CaCl_2 0,28 % (w/v) NH_4Cl
Spurenelemente-Stammlösung (WM8)	0,01 % (w/v) H_3BO_3 0,004 % (w/v) CuSO_4 0,003 % (w/v) CoCl_2 0,001 % (w/v) KI 0,035 % (w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot$ 0,02% (w/v) $\text{MnCl}_2 \cdot$ 0,005% (w/v) Na_2MoO_4 0,0625% (w/v) ZnSO_4

Name	Zusammensetzung
Spurenelemente-Stammlösung (WM8)	0,01 % (w/v) H ₃ BO ₃ 0,004 % (w/v) CuSO ₄ 0,003 % (w/v) CoCl ₂ 0,001 % (w/v) KI 0,035 % (w/v) FeSO ₄ · 0,02% (w/v) MnCl ₂ · 0,005% (w/v) Na ₂ MoO ₄ 0,0625% (w/v) ZnSO ₄
Vitamin-Stammlösung (WM8)	0,0255 % (w/v) Biotin 0,510 % (w/v) Calcium-pantothenat 1 % (w/v) Myo-inositol 0,11 % (w/v) Nicotinsäure 0,002 % (w/v) p-aminobenzoessäure 0,26 % (w/v) Pyridoxine-HCl 0,11 % (w/v) Thiamin-HCl
RF1-Lösung	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM KOAc 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerol pH6.8
RF2-Lösung	10 mM RbCl 10 mM MOPS pH6.8 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerol pH6.8

4.5 Antikörper

Tab. 7: Verwendete Antikörper

Name	Verdünnung	Herkunft
<i>Mouse anti-MYC</i>	1:5000	EVROGEN JOINT STOCK COMPANY (Moskau, RU)
<i>Rabbit anti-TUB1</i>	1:10.000	ABCAM (Cambridge, UK)
<i>Rabbit anti-tRFP</i>	1:2000	EVROGEN JOINT STOCK COMPANY (Moskau, RU)
<i>Rabbit anti-GFP</i>	1:10.000	ORIGene TECHNOLOGIES, INC. (Rockville, USA); originally produced by Torrey Pines Biolabs, Inc. (New Jersey, USA)
<i>Mouse anti-CYP</i>	1:2000	ABCAM (Cambridge, UK)
<i>Mouse anti-UB</i>	1:2000	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGIES (Santa Cruz, USA)

Name	Verdünnung	Herkunft
<i>Goat anti-rabbit</i>	1:10000	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGIES (Santa Cruz, USA)
<i>Goat anti-mouse</i>	1:5000	JACKSON IMMUNORESEARCH EUROPE LTD.(Newmarket, UK)

4.6 Puffer und Lösungen

Tab. 8: Verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
SORB-Puffer	100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris 1 mM EDTA 1 M Sorbitol
PEG-Puffer	100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris 1 mM EDTA 40 % PEG4000
SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 1 % (w/v) SDS
Sammelgel	125 mM Tris/HCL pH 6,8 13 % Rotiphorese gel 30 0,1 % (m/v) SDS 0,1 % (v/v) Ammoniumpersulfat 0,005 % (v/v)TEMED
Trenngel	375 mM Tris/HCL pH 8,8 27 % Rotiphorese gel 30 0,1 % (m/v) SDS 0,1 % (v/v) Ammoniumpersulfat 0,005 % (v/v)TEMED
Transfer-Puffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
TBST	0,14 M NaCl 20 mM Tris Base pH 7,6 0,1 % (v/v) Tween 20
Stripping Puffer	2 % SDS 100 mM Tris/HCl pH 6,8 0,1 M β -Mercaptoethano

Name	Zusammensetzung
Alkalischer Lysepuffer	1,85 M NaOH 0,75 % (v/v) beta-Mercaptoethanol
Stripping Puffer	2 % SDS 100 mM Tris/HCl pH 6,8 0,1 M β -Mercaptoethano
Alkalischer Lysepuffer	1,85 M NaOH 0,75 % (v/v) beta-Mercaptoethanol
8 M Harnstoffpuffer (HU-Puffer)	0,03 % (w/v) Bromphenolblau 1,5 % (w/v) Dithiothreitol 0,1 mM EDTA 8 M Harnstoff 200 mM Phosphat-Puffer pH 6,8 5 % (w/v) SDS
ECL	10 % Tris 1 % Luminol (250 mM) 0,5 % para-Cumarsäure (90mM) 0,00186 % H ₂ O ₂
IP –Aufschluss-Puffer	6 M urea 50 mM Tris (pH 7.5) 150 mM NaCl 1% SDS 1 mM PMSF 20 mM NEM Protease Inhibitor Mix (Roche)
IP-Verdünnungspuffer	55 mM Tris [pH 7.5] 165 mM NaCl 5.5 mM EDTA 1.1% Triton 1 mM PMSF 20 mM NEM Protease Inhibitor Mix (Roche)
Lysepuffer	100 mM LiOAc 1 %SDS

4.7 Stämme

4.7.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tab. 9: Verwendete *E. coli*-Stämme

Name	Genotyp	Referenz
TOP10	<i>F- mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <i>Φ80lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.

4.7.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Tab. 10: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Bezeichnung	Genotyp / Beschreibung	Referenz
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Stammsammlung C. Taxis
ESM356-1	S288C, MATa <i>ura3-53 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ6</i>	Pereira et al. 2001
ESM357-1	S288C, MATa <i>ura3-53 leu2Δ1 trp1Δ63</i>	Pereira et al. 2001
MHY500	MHY500, Mat a, <i>his3-delta200, leu2-3,112, ura3-52, lys2-801, trp1-1,</i>	Swanson et al., 2001
MHY552	MHY501, MATa <i>abc6::HIS3, abc7::LEU2</i>	Swanson et al., 2001
SUB62	MATa, <i>his3-Δ200, lys2-801 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i>	Stammsammlung C. Taxis
W303-1C	MATa <i>his3-11,-15, leu2-3,-112, trp1-1, ura3-1, ade2-1, can1-100 prc1-1</i>	Jarosch et al., 2002
YBP3	S288C, MATa <i>ura3-53, leu2Δ1, trp1Δ63, his3::hphNT1::Padh1-VP16-CIB1::his3, ura3::natNT2::Padh1-LexA-BD-Cry2::ura3, leu2::LexA-myCitrine-Cns2::leu2</i>	Stammsammlung C. Taxis
YCR119	YCT1315, <i>CDC14-tagRFP-LOV2-cODC1::kanMX, NET1-9myc::hphNT1</i>	Stammsammlung C. Taxis
YCR75	MATa <i>ho::LYS2 his3 leu2 trp1ΔFA ura3</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS171	YDS28, <i>MCM1-3myc-LOV2-cODC1::kanMX4, Phis3-mCherry-TUB1::TRP1</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS174	YDS28, <i>SEC62-3myc-LOV2-cODC1::kanMX4, Phis3-mCherry-TUB1::TRP1</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS175	YDS28, <i>CDC48-3myc-LOV2-cODC1::kanMX4, Phis3-mCherry-TUB1::TRP1</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS189	YDS28, <i>sec66-3myc-psd::kanMX</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS191	YDS28, <i>NPL4-3myc-LOV2-cODC1::kanMX, Phis3-mCherry-TUB1::TRP1</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS225	YTX87, <i>sec62-3myc-psd::kanMX</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS230	<i>sec62-3myc-LOV2-cODC1::kanMX, rpt4K297R</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS232	SUB62, <i>sec62-3myc-LOV2-cODC1::kanMX</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS249	BY4741, <i>sec62-3myc-LOV2-cODC1::kanMX, ssm4Δ::kanMX4</i>	Stammsammlung C. Taxis

Bezeichnung	Genotyp / Beschreibung	Referenz
YDS275	ESM356-1, <i>cdc28-psd(pDS135-17)::kanMX, Phis3-mCherry-TUB1::TRP1</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS28	ESM356-1, <i>MATa, Phis3-mCherry-TUB1::TRP1</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS284	W303-1C, <i>sec62-3myc-psd::kanMX</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS440-2	<i>Erg9-mcherry-psdASlov2-cODC</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS462	MHY500, <i>sec61-3myc-psd::kanMX</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS495	<i>his3::hphNT1::Padh1-VP16-CIB1::his3</i> <i>ura3::natNT2::Padh1-LexA-BD-Cry2::ura3</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS502	MHY501, <i>sec61-tagRFP-psd::kanMX</i>	Stammsammlung C. Taxis
YFP338	<i>mat alpha, leu2-3,-112, ura3-52, ade2-3, pep4-3 sec61-2</i>	Stammsammlung C. Taxis
YHUM0971	BY4741	Stammsammlung H.U. Mösch
YHUM1119	BY4741, <i>hrd1::kanMX4</i>	Stammsammlung H.U. Mösch
YJS1	ESM357, <i>MATa ura3-53 leu2Δ1 trp1Δ63, doa10::his3 sec61-3myc-psd::kanMX</i>	Diese Arbeit
YJS2	S288C, <i>MATa ura3-53 leu2Δ1 trp1Δ63, doa10::his3, sec66-psd::kanMX</i>	Diese Arbeit
YJS3	S288C, <i>MATa ura3-53 leu2Δ1 trp1Δ63, doa10::his3 Erg9-myc-AsLOV-cODC1::kanMX6</i>	Diese Arbeit
YJS4	S288C, <i>MATa ura3-53 leu2Δ1 trp1Δ63, Erg9-myc-iLIDΔA-cODC1::kanMX6, doa10::his3</i>	Diese Arbeit
YJS6	YBP3, <i>his3::hphNT1::Padh1-VP16-CIB1::his3, ura3::natNT2::Padh1-LexA-BD-Cry2::ura3, leu2::LexA-myCitrine-Cns2::leu2, cdc48-mCherry-iLIDΔA-cODC1::kanMX6, pDS261: LexA-myCitrine-Cns1, URA3</i>	Diese Arbeit
YJS7	ESM356, <i>911b::Tdit1-PsGA3ox-YFP-PlexA::PlexA—YFP-CmGA20ox-Tdit1</i>	Diese Arbeit
YJS8	ESM357, <i>leu2::Tdit-tLiS-YFP-PlexA—Padh1-LexA-EDLL::leu2</i>	Diese Arbeit
YJS9	ESM357, <i>leu2::Tdit-tGeS-YFP-PlexA—Padh1-LexA-EDLL::leu2</i>	Diese Arbeit
YJS10	ESM357/Sk1, <i>Mata, 911b::Tdit1-PsGA3ox-YFP-PlexA::PlexA—YFP-CmGA20ox-Tdit1</i>	Diese Arbeit
YJS11	ESM357/Sk1, <i>Mata, leu2::Tdit-AtATR2-YFP-PlexA::Padh1-LexA-EDLL, 911b::Tdit1-PsGA3ox-YFP-PlexA::PlexA—YFP-CmGA20ox-Tdit1</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Genotyp / Beschreibung	Referenz
YJS12	ESM357/Sk1, <i>Mata</i> , <i>leu2::Tdit-ATR2-YFP-PlexA::Padh1-LexA-EDLL::leu2</i> , <i>911b::Tdit1-PsGA3ox-YFP-PlexA::PlexA-YFP-CmGA20ox-Tdit1</i> , <i>ura3::Tdit1-CmKS-YFP-PlexA::PlexA-YFP-AtCPS-Tdit1</i>	Diese Arbeit
YJS13	ESM357/Sk1, <i>Mata</i> , <i>can1::Tdit1-PsKAO-YFP-PlexA::PlexA-YFP-AtKO-Tdit1</i> , <i>ura3::Tdit1-CmKS-YFP-PlexA::PlexA-YFP-AtCPS-Tdit1</i> , <i>leu2::Tdit-AtATR2-YFP-PlexA-Padh1-LexA-EDLL</i> , <i>911b::Tdit1-PsGA3ox-YFP-PlexA::PlexA-YFP-CmGA20ox-Tdit1</i>	Diese Arbeit
YJS14	<i>YDS495</i> , <i>911b::PlexA-tLiS-YFP-Tdit1</i> , <i>his3::hphNT1::Padh1-VP16-CIB1::his3</i> , <i>ura3::natNT2::Padh1-LexA-BD-Cry2::ura3</i>	Diese Arbeit
YJS15	<i>YDS495</i> , <i>911b::PlexA-tGeS-YFP-Tdit1</i> , <i>his3::hphNT1::Padh1-VP16-CIB1::his3</i> , <i>ura3::natNT2::Padh1-LexA-BD-Cry2::ura3</i>	Diese Arbeit
YJT30	ESM356, <i>leu2::Tdit-AtATR2-YFP-PlexA::Padh1-LexA-EDLL::leu2</i>	Jonathan Trauth
YJT31	ESM356, <i>ura3::Tdit1-CmKS-YFP-PlexA::PlexA-YFP-PsCPS-Tdit1</i>	Jonathan Trauth
YR312	<i>MATa his1</i>	Stammsammlung C. Taxis
YR320	<i>MATa his</i>	Stammsammlung C. Taxis
YSH1	<i>YDS28</i> , <i>Phis3-mCherry-TUB1::TRP1</i> , <i>cdc48-mCherry-iLIDdeltaA-cODC1::kanMX6</i>	Sophia Hasenjäger / Stammsammlung C. Taxis
YSH3-1	<i>Erg9-mcherry-iLIDlov2-cODC</i>	Sophia Hasenjäger / Stammsammlung C. Taxis
YTX87	<i>MATa his3-11,-15</i> , <i>leu2-3,-112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>can1-100</i>	(Finke et al., 1996)

4.8 Plasmide

Tab. 11: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Genotyp / Beschreibung	Referenz
Melicomo1	Synthetisches Gen: Kaurensäure-oxidase aus <i>Pisum sativum</i> , <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit / BioCat GmbH
Melicomo2	Synthetisches Gen: Gibberellin 3-beta-dioxygenase aus <i>Pisum sativum</i> , <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit/ BioCat GmbH
Melicomo3	Synthetisches Gen: Kaurenoxidase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit/ BioCat GmbH

Bezeichnung	Genotyp / Beschreibung	Referenz
Melicomo4	Synthetisches Gen: Kaurenoxidase <i>aus Cucurbita maxima, Kan^R</i>	Diese Arbeit/ BioCat GmbH
Melicomo5	Synthetisches Gen: Kaurenoxidase aus <i>Oryza Sativa, Kan^R</i>	Diese Arbeit/ BioCat GmbH
Melicomo6	Synthetisches Gen: Gibberellin-20-oxidase aus <i>Cucurbita maxima, Kan^R</i>	Diese Arbeit/ BioCat GmbH
Melicomo7	Synthetisches Gen: NADPH-p450-Reduktase (ATR2) aus <i>Arabidopsis thaliana, Kan^R</i>	Diese Arbeit/ BioCat GmbH
Melicomo8	Synthetisches Gen: Kaurensynthese aus <i>Cucurbita maxima, Kan^R</i>	Diese Arbeit/ BioCat GmbH
Melicomo9	Synthetisches Gen: Copalyldosphatsynthase aus <i>Arabidopsis thaliana, Kan^R</i>	Diese Arbeit/ BioCat GmbH
Melicomo10	Synthetisches Gen: Gibberellin-13-oxidase aus <i>Oryza sativa, Kan^R</i>	Diese Arbeit/ BioCat GmbH
Melicomo11	Synthetisches Gen: gekürzte Limonensynthase aus <i>Citrus limon, Kan^R</i>	Diese Arbeit/ BioCat GmbH
Melicomo12	Synthetisches Gen: gekürzte Linaloolsynthase aus <i>Mentha aquatica, Kan^R</i>	Diese Arbeit/ BioCat GmbH
Melicomo13	Synthetisches Gen: gekürzte Geraniolsynthase aus <i>Ocimum basilicum, Kan^R</i>	Diese Arbeit/ BioCat GmbH
p414	<i>Ptef1-Cas9-Tcyc1 TRP1, Amp^R</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS228	<i>Padh1-deltaN_sic1-3myc-iLIDdA-cODC1 LEU2 Amp^R</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS229	<i>Pclb2-clb2DB-3myc-iLIDdA-cODC1 LEU2, Amp^R</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS280	<i>gRNA-LEU2 KIURA3, Amp^R</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS302	<i>gRNA-911b/RPI1 HIS3, Amp^R</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS319	<i>PADH1-LexABD-EDLL PLexA-YFP-pTEV LEU, Amp^R 2</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pDS389	<i>CrtE; HIS3, Amp^R</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pJS2	<i>PLexA-YFP-KAO-Tdit1, URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS3	<i>PLexA-YFP-GA3ox-Tdit1, URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS4	<i>PLexA-YFP-KO-Tdit1, URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS5	<i>PLexA-YFP-KO-Tdit1, URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS6	<i>PLexA-YFP-KO-Tdit1, URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pJS7	<i>PLexA-YFP-GA20ox-Tdit1, URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS8	<i>PLexA-YFP-ATR2-Tdit1, URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS9	<i>PLexA-YFP-KS-Tdit1, URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS10	<i>PLexA-YFP-CPS-Tdit1, URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS11	<i>PLexA-YFP-GA13ox-Tdit1, URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS12	<i>PADH1-LexABD-VP16, PLexA-YFP-pTEV, LEU2, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS13	<i>PLexA-CPS-Tdit1URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS14	<i>PLexA-KS-Tdit1URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS15	<i>PLexA-KO-Tdit1URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS16	<i>PLexA-KAO-Tdit1URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS17	<i>PLexA-GA3ox-Tdit1URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS18	<i>PLexA-GA20ox-Tdit1URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS19	<i>PLexA-ATR2-Tdit1URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS20	<i>PLexA-YFP-tLiS-Tdit1URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS21	<i>PLexA-YFP-tGeS-Tdit1URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS22	<i>PLexA-YFP-tLS-Tdit1URA3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS23	<i>PLexA-YFP-KAO-Tdit1HIS3, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJS24	<i>PLexA-YFP-KAO-Tdit1Leu2, Amp^R</i>	Diese Arbeit
pJT5	<i>PLexA-myCitrine-p14-TEV, URA3, Amp^R</i>	Masterarbeit Jonathan Trauth (2017)
pMB1	<i>Padh1-AtDELLA-NVenus, Amp^R</i>	Dissertation, Jonathan Trauth (unveröffentlicht)
pMB2	<i>Padh1-AtGid1A-CVenus, Amp^R</i>	Bacheloararbeit Marco Bentele, 2018
pMB3	<i>Padh1-LexA-BD-Cry2 PLexA-Clb-DB-3myc, LEU2, Amp^R</i>	Bacheloararbeit Marco Bentele, 2018
pMB4	<i>Padh1-LexA-BD-Cry2 PLexA-deltaN_sic1-3myc, LEU2, Amp^R</i>	Bacheloararbeit Marco Bentele, 2018
pMEL10	<i>gRNA-CANI.Y; KIURA3, Amp^R</i>	Plasmidsammlung C. Taxis

Bezeichnung	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pRS313	<i>HIS3 CEN6 ARSH4</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pRS314	<i>TRP1 CEN6 ARSH4</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pRS315	<i>Leu2 CEN6 ARSH4</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pRS316	<i>URA3 CEN6 ARSH4</i>	Plasmidsammlung C. Taxis
pUDE269	<i>pTDH3-crtYB-T2A1-crtI-T2A2-crtE-tTEF URA3, Amp^R</i>	Plasmidsammlung C. Taxis

4.9 Primer

Tab. 12: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz
M1 fwd	ATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGGATCCATGGCTTCTTTATG
M1 rev	CAATGTAGCGCTCTTACTTTAGTCGACGGTGCTCGAATTCTTAAGCAGCtt
M2 fwd	ATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGGATCCATGCCATCTTTATCT
M2 rev	CAATGTAGCGCTCTTACTTTAGTCGACGGTGAGCTCGAATTCTTAACCAAC
M3 fwd	ATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGGATCCATGGCTTTCTTTTCT
M3 rev	CAATGTAGCGCTCTTACTTTAGTCGACGGTGAATTCTTAAGATCTTCTTGGG
M4 fwd	ATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGGATCCATGGCTGTTGCTA
M4 rev	CAATGTAGCGCTCTTACTTTAGTCGACGGTCGGAGCTCGAATTCTTAATTA A
M5 fwd	ATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGGATCCATGGAAGCTTTTGTT
M5 rev	CAATGTAGCGCTCTTACTTTAGTCGACGGTTCGAATTCTTACATTCTACCTC
M6 fwd	ATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGGATCCATGCATGTTGTTACT
M6 rev	CAATGTAGCGCTCTTACTTTAGTCGACGGTGTGACGGAGCTCGAATTC
M7 fwd	ATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGGATCCATGTCTTCTTCTC
M7 rev	CAATGTAGCGCTCTTACTTTAGTCGACGGTTCGAATTCTTACCAAACATCTCT

Bezeichnung	Sequenz
M8 fwd	ATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGGATCCATGTACTTGTCTAGA
M8 rev	CAATGTAGCGCTCTTACTTTAGTCGACGGTCGGAGCTCGAATTCTTACTTA
M9 fwd	ATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGGATCCATGTCTTTGCAATAC
M9 rev	CAATGTAGCGCTCTTACTTTAGTCGACGGTGGAGCTCGAATTCTTAAACCT
M10 fwd	ATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGGATCCATGGTTGTTGTTGTT
M10 rev	CAATGTAGCGCTCTTACTTTAGTCGACGGTGTGACGGAGCTCGAATTC
SeqFWD	GGTATGGATGAATTGTACAAAG
SeqRev	GGTAGACCAATGTAGCGCTC
pJS2int_fwd	CCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATGAGCTC ACAGGTTATCAGCA
pJS2int_rev	CTAGAGATTGTTTCTTTTCTACTCAACTTAAAGTATACATACGCTCGGCCGT TACTCCGCAAC
pJS3int_fwd	TAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGT GAGCTCACAGGTTATCAGCA
pJS3int_rev	GTCTTTTTTTTTTTTTTCTCATCTTTTATTACTGATATTTATAAA CGGCCGTACTCCGCAAC
pJS4int_fwd	ATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGGAGCTC ACAGGTTATCAGCA
pJS4int_rev	CGATCGTAGCTGATAATAAAAACGGTATGCCTACACATACAGCTCGGCCG TTACTCCGCAAC
pJS7int_fwd	AACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTAGAGCT CACAGGTTATCAGCA
pJS7int_rev	TTAAAGGGGTAGAAAATTTATGGTGGAGACTTCCCGATACATACTCGGCCG TTACTCCGCAAC
pJS8int_fwd	AACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTAGAGCT GAGCTCACAGGTTATCAGCA
pJS8int_rev	ATTTATAAAGTTTATGTACAAATATCATAAAAAAAGAGAATCTTTCGGCCG TTACTCCGCAAC
pJS9int_fwd	GTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAGAGCTC ACAGGTTATCAGCA
pJS9int_rev	AATTTGTGAGTTTGTAGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTTTCGGCCG TACTCCGCAAC

Bezeichnung	Sequenz
pJS10int_fwd	TATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCACAGCTCA CAGGTTATCAGCA
pJS10int_rev	AATTTGTGAGTTTAGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTTCGGCCGT TACTCCGCAAC
pDS319int_fwd	TAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTGATATC CTTTTGTGTTTCCGG
pDS319int_rev	ATTCAGCAATATATATATATATATTTCAAGGATATACCATTCTACGCCCGG AATTAGCTTGGC
pJS3int_rev2	ATGCTCATTTTCATTTCTGTTTTAAATTTTATGTCTGTTTTGTATGCGGCCGT ACTCCGCAAC
pJS7int_rev2	CTTATTTTATAGAAAAAATCGGATGTTGAATGGGCATAAATATACGGCCG TTACTCCGCAAC
RPIIseq_fwd	CCAGACTACAGTTCATGG
RPIIseq_rev	GGAAACAGGGAATGTGC
Clbint_fwd	TAACAACCATCATCGGAATTAGTTTATTAGAGGAAGTGCCAGGCCG GGAGCTCAATAATTACTTTTTGTA
SicINT_fwd	TAACAACCATCATCGGAATTAGTTTATTAGAGGAAGTGCCAGGCCG CGGATATCCTTTTGTGTTTCC
SICclbINT_rev	TCCTGCTTCGATTGAGTAAAATATTGTAGTGCAGAAGGTAACAGC CGCTCGAAGGCTTTAATTGC
tdit_down	CACAGTTCTTTTGGGATGAGA
lexA_rev	GTTGCTGATAACCTGTGAGC
Sic_rev	GGTATCTGTTCTATTGTATATCT
Clb_rev	CAAGGATACCGAAATGTCAGG
pLim_fwd	ATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAA GGATCCATGGATAGAAGATCT
pLim_rev	CAATGTAGCGCTCTTACTTTAGTCGACGGT GAATTCTTAACCTTTAGTACCAG
pLiS_fwd	ATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGGATCCATGAGAAGATCTGG
pLiS_rev	CAATGTAGCGCTCTTACTTTAGTCGACGGTGAATTCTTAAACGTAAGGCTT G
pGeS_fwd	ATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGGATCCATGCAACATATGGAA

Bezeichnung	Sequenz
pGeS_rev	CAATGTAGCGCTCTTACTTTAGTCGACGGTGAATTCTTATTGAGTGAAAA CAA
pJS2down	GCCACATACTAGACCATTGG
pJS3down	CTCTGTTCAAGTTGGTTAAGAA
pJS4down	TTGAATGGAAATTGAGAGATGG
pJS7down	CAAGAACAGCAAGAACAACAG
911bTESTrev	AAGGACATTTCTTGGTGACAG
308a_test_rev	CTTCCACCAGTAAACGTTTCa
pJS4int_308_rev	TTAGAGTTTAGCTACGCTGCAAGCTATTGAAACTATTGTGTAATACGGCCG TTACTCCGCAAC
pJS2int_308_rev	TTTTCAAAGATGACTAAAATAAGTGAAATTTCAACATTAACTTCGCGGCCG TTACTCCGCAAC
pJS2intsing_fwd	CGATCGTAGCTGATAATAAAAACGGTATGCCTACACATACGCTGAGCTC ACAGGTTATCAGCA
pJS4intsing_fwd	CTAGAGATTGTTTCTTTTCTACTCAACTTAAAGTATACATACGCTGAGCTCA CAGGTTATCAGCA
pjs2super_rev	CCAAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCGGCCG TTACTCCGCAAC
pjs4super_fwd	CTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGGAGCTCAC AGGTTATCAGCA
pjs4super_rev	GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCGGCCGT TACTCCGCAAC
pjs7super_fwd	AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAGCT CACAGGTTATCAGCA
pJS2_1611_fwd	TAACAACCATCATCGGAATTAGTTTATTAGAGGAAGTGCCAGGCGCGGCCG TTACTCCGCAAC
pJS4_1611_fwd	TCCTGCTTCGATTGAGTAAAATATTGTAGTGCAGAAGGTAACAGCCGGCCG TTACTCCGCAAC
pJS4super_fwd2	GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTGAGCTCA CAGGTTATCAGCA
pJS4super_rev2	CTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGGCCGT ACTCCGCAAC
Leu_super1 fwd	TAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTGAGCTC ACAGGTTATCAGCA

Bezeichnung	Sequenz
Leu_super2 rev	AGGCTGGCGGGGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATCGGCCG TTACTCCGCAAC
Leu_super3 fwd	CGCATGATCGTGCTCCTGTCGTTGAGGACCCGGCT GAGCTCACAGGTTATCAGCA
Leu_super4 rev	ATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTCGGCCG TTACTCCGCAAC
Leu_super5 fwd	AGCCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGGATATCCTTTTGTTGT TTCCGG
pJS4_intcan1_rev	GAACCCATAAATAAATATGATATAAGAGCGCCCACTGGGCCGGCG CGGCCGTTACTCCGCAAC

5. Methoden

5.1 Kultivierung von Mikroorganismen

5.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Escherichia coli-Stämme wurden in LB- oder dYT-Medium über Nacht bei 37 °C angezogen. Zur Selektion auf Plasmide wurde 100 µg/ml Ampicillin zugegeben, um den Selektionsdruck auf das Plasmid aufrecht zu erhalten. Das Wachstum der *E. coli*-Zellen wurde durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD600) gegen das verwendete Medium bestimmt. Eine OD600 von 1 entspricht einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen pro ml (Sherman et al., 1986).

5.1.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae-Kulturen wurden bei 30 °C entweder in YPD-Vollmedium, SC-Minimalmedium oder LFM-Medium über Nacht auf einem Rollinkubator oder im Falle von Festmedium für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Zur Überprüfung des Wachstums der Stämme wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm gemessen. Dabei entsprach eine OD600 von 1 einer Zelldichte von $1,5 \times 10^7$ Zellen pro ml (Sherman et al., 1986).

5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei wurden die einzelnen Proben mit Ladepuffer gemischt und auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Der angegebene DNA-Marker „GeneRuler™ DNA Ladder-Mix“ THERMO FISHER SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) diente als Längen- und Mengenstandard. Die Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 100 V für 45 min. Das fertige Gel wurde in einer GelRed-Lösung (1µg / ml) für 10-15 min gefärbt und anschließend in einem Wasserbad gewaschen. Zur Detektion wurde UV-Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm sowie die Geldokumentationsanlage „GelDoc XR“ (BIORAD, München, D) verwendet.

5.3 Isolation der Gesamt-DNA aus *S. cerevisiae* mittels der LiOAc-SDS Methode (nach (Lööke et al. 2011))

Eine Streichholz-große Menge an Hefezellen wurden in einem Reaktionsgefäß in 100 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf 70 °C, wurden 300 µl EtOH

zugegeben und die Lösungen durch Vortexen gemischt. Die DNA wurde abzentrifugiert (3 min, 13000 upm) und das Pellet mit 300 µl 70 % EtOH gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl ddH₂O gelöst.

5.4 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* (Mandel und Higa, 1970)

Die Herstellung von chemisch kompetenter *E. coli* wurde zunächst eine Übernachtskultur in LB-Medium angesetzt und damit eine Hauptkultur im Verhältnis 1/100 in LB beimpft. Diese wurde bei 37°C schüttelnd inkubiert, bis eine OD₆₀₀ ≈ 0,5 erreicht wurde. Anschließend wurde die Zellkultur für 15 min auf Eis inkubiert und die Zellen danach abzentrifugiert (4000 Upm, 15 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend mit kaltem RF1-Puffer resuspendiert, weitere 15 min auf Eis inkubiert, erneut abzentrifugiert (4000 Upm, 15 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden anschließend in RF2-Puffer resuspendiert, in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Für eine Transformation wurden 100 µl chemokompetenter *E. coli* TOP10-Zellen mit 5 µl (100 fM) DNA gemischt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 1 min wurden die Zellen erneut kurz auf Eis gekühlt und in 800 µl LB-Medium aufgenommen. Danach wurden die Zellen zur Erholung für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Selektionsmedium ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

5.5 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Für die Transformationen wurde der *E. coli*-Stamm TOP10 verwendet. Zunächst wurden die *E. coli*-Zellen kompetent gemacht. Dafür wurde 5 ml Vorkultur in 210 ml vorgewärmten LB-Medium zugegeben und 4 h inkubiert. Die Kulturen wurden 15-30 min auf Eis inkubiert. Die weiteren Schritte wurden ebenfalls auf Eis fortgesetzt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen geerntet (5 min bei 5000 rpm, 4 °C) und zunächst mit 50 ml und anschließend zweimal mit 30 ml sterilem Wasser und dann mit eiskalten 10 % Glycerin gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 400µl eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 50 µl Aliquots aufgeteilt und eingefroren. Anschließend wurden die Aliquots bei -80 °C gelagert. Eine Aliquot elektrokompeter Zellen wurde mit 1-2 µl Plasmid DNA gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Diese Zellsuspension wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und anschließend in die Elektroporationsmaschine gesetzt. Die Einstellung für die

Elektroporation waren wie folgt: Spannung 2,5 kV, Widerstand 200 Ω und Kapazität 25 μF . Die Zeitkonstante lag zwischen 4,8 bis 5,2 ms. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden danach bei 5000 rpm für 1 min abzentrifugiert und das Pellet in LB- Restmedium resuspendiert. Sie wurden anschließend auf LB+Amp- Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.6 Transformation von *S. cerevisiae* (Gietz et al. 1992)

Eine *S. cerevisiae* Übernachtskultur in YEPD wurde auf eine OD600= 0,3 eingestellt und bei 30 °C 4-6 h schüttelnd (150 Upm) inkubiert, bis eine OD600= 0,7-1 erreicht war. Anschließend wurden 10⁸ Zellen (10 ODs) bei 3000 g 3 min pelletiert, einmal mit sterilem Wasser und einmal mit SORB-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde dann mit 360 μl SORB-Puffer und 40 μl Heringssperma-DNA (10mg/ml) gemischt, in 50 μl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C weggefroren.

Zur Transformation wurde zu einem dieser Ansätze, je nach Bedarf, 10-15 μl PCR-Produkt bzw. 3 μl Plasmid (ca. 300 ng) sowie 300 μl PEG-Puffer hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen für 15 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Danach wurden die Zellen kurz abzentrifugiert (3000 Upm, 3 min), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml YPD gewaschen. Je nach Selektionsmarker wurden die Zellen im Falle einer Antibiotikaresistenz anschließend in YPD resuspendiert und ü.N. zur Regeneration bei 30°C inkubiert und danach auf Selektionsmedium ausgestrichen oder, im Falle eines Auxotrophiemarkers, direkt auf geeignetem Medium ausgebracht und 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Positive Transformanten wurden zur weiteren Analyse auf frisches Selektionsmedium umgestrichen.

5.7 Plasmidpräparation

Die verwendeten Plasmide wurden aus 5 ml einer E. coli ü.N.-Kultur extrahiert. Hierzu wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN GmbH, Hilden, D) nach Herstellerangaben verwendet. Die Plasmide wurden in 40 μl Elutionspuffer aufgenommen.

5.8 DNA-Amplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei PCR-Ansätze verwendet: Pym-PCR und eine Test-PCR. Pym-PCR zur Amplifizierung von Klonierungskassetten:

1 µl DNA
3,5 µl dNTPs (10 mM)
6,5 µl Primer 1(10 mM)
6,5 µl Primer 2(10 mM)
10 µl 10x Phusion Puffer (40 mM MgSO₄)
3 µl DMSO
68,5 µl dH₂O
2 µl Phusion-Polymerase 1:200 (hot start)

Protokoll:
98°C 3min
10 Zyklen:
98°C 45 sec
58°C 45 sec
68°C 1 min pro kB Amplicon
20 Zyklen:
98°C 45 sec
58°C 45 sec
68°C 1 min pro kB Amplicon +5 sec pro Zyklus

Test-PCR zur Bestätigung von genomischen Integrationen:

5 µl Quick-load Puffer (5x)
0,5 µl dNTPs (10 mM)
0,5 µl Primer 1
0,5 µl Primer 2
3 µl Templat
16 µl dH₂O
0,125 µl oneTaq Polymerase

Protokoll:
30 Zyklen:
94°C 30 sec
60°C 45 sec
68°C 1 min
1x:
68°C 5 min

5.9 Restriktionsverdau von Plasmiden

Für den analytischen Restriktionsverdau der verwendeten Plasmide wurden ca. 100-200 ng Plasmid mit je 5 U Restriktionsenzym (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA) und dem entsprechenden Puffer nach Herstellerangaben in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt und für 2-3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für einen präparativen Verdau wurden 5-7 µg Plasmid, 20 U Enzym und der entsprechenden Puffer (1/10 Gesamtvolumen) eingesetzt und das Gesamtvolumen auf 70 µl erhöht. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

5.10 Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Vektor wurden sowohl der Vektor als auch das Insert mit den gewünschten Restriktionsenzymen geschnitten und die Fragmente mit T4-DANN-Ligase (ROCHE, Basel, S) ligiert. Dabei wurden 1 μ l T4-DNA-Ligase (1 U / μ l), 20 fmol Vektor, 80 fmol Insert und der vom Hersteller vorgegebene Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 μ l verwendet. Der Ansatz wurde für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die anschließende Transformation in *E. coli* wurden 5 μ l des Ligationsansatzes verwendet.

5.11 Immunopräzipitation

Für eine Protein-Immunopräzipitation von myc-markierten Proteinen aus Hefe wurde zunächst aus einer Hefe-Kultur 80-100 ODs geerntet. Hierzu wurden entsprechende Mengen Kultur zentrifugiert (13000 UPM, 5 min), der Überstand verworfen und das Zell-Pellet mit 4 ml kaltem H₂O mit 1 mM PMSF und 20 mM NEM Protease Inhibitoren gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet mit Glassperlen und 1 ml Puffer gemischt und in einem „FastPrep-24 Tissue and Cell Homogenizer“ bei 6,5 m/s für 40 s aufgeschlossen. Das Lysat wurde mit 9 Volumina IP-Verdünnungspuffer verdünnt und bei 20,000 g, 10 min, 4°C Zelltrümmer abzentrifugiert. 75 μ l wurden für eine *Input*-Kontrolle diesem Ansatz entnommen und mit 25 μ l HU-Puffer gemischt. 1 ml des Ansatzes wurde mit 30 μ l ANTI-Myc Affinity Gel-Perlen (Sigma) gemischt und über Nacht in einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Die Probe wurde anschließend erneut kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Perlen mit gebundenen Proteinen wurden fünfmal mit IP-Verdünnungspuffer gewaschen, anschließend mit 100 μ l HU-Puffer ohne DTT versetzt und für 15 min bei 42°C inkubiert. Nach einer erneuten kurzen Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und DTT (Endkonzentration 25 mM) hinzugefügt. Die so erzeugten Proben konnten anschließend per SDS-Page und Western-Blot analysiert werden

5.12 Proteinextraktion (abgewandelt nach Knop et al, 1999)

Aus einer exponentiell wachsenden *S. cerevisiae*-Kultur wurden zunächst 1 OD entnommen und mit 150 μ l alkalischem Lysepuffer gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden weitere 150 μ l 55%-Tri-Chlor-Essigsäure hinzugegeben und das Gemisch erneut 10 min auf Eis inkubiert. Danach wird der gesamte Ansatz bei 13.000 Upm für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellett in 50 μ l HU-Puffer resuspendiert.

Zuletzt wurde dieser Ansatz nochmals auf 65°C für 10 min erhitzt, erneut abzentrifugiert (13.000 Upm, 3 min) und in der SDS-Page weiterverwendet.

5.13 SDS-PAGE und Western-Blot

Zur Analyse der Proteinextrakte wurden in der *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) SDS-Acrylamid-Trenngele (8-12%) auf die ein 4%-Acrylamid-SDS-Sammelgel mit Taschen aufgegossen wurde verwendet (Zusammensetzung s. Tab. 8 in 4.6). Auf das Gel wurden 10 µl Proteinextrakt geladen und 4 µl „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ von Thermo Fisher dienten als Größenstandard. Die Auftrennung geschah bei 200 V für 1 h in SDS-Elektrophorese-Puffer.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine im Gel per „Western-Blot“ auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dies geschah in einem „Tank Blot“ wobei SDS-Gel und Membran wie folgt mit weiteren Komponenten übereinandergeschichtet wurden:

Negativer Pol

Plastikpolster

Whatman-Papier

SDS-Gel

Nitrocellulose-Membran

Whatma-Papier

Plastikpolster

Positiver Pol

Der Transfer der Proteine geschah anschließend bei 20 V für 12 h in einem durch ein Kühlpack gekühltem Tank mit Transferpuffer (Tab. 8). Die so übertragenen Proteine wurden mit Hilfe von spezifisch bindenden Antikörpern detektiert. Hierfür wurde die Membran zunächst mit einer Lösung aus TBST und 5%-Milchpulver für 30 min inkubiert und so gesättigt. Nach einem Waschschrift in TBST wurde der primäre Antikörper (Tab. 5) in TBST und Milchpulver (3%) hinzugegeben und der Ansatz erneut schüttelnd für 1 h oder über Nacht bei 4°C inkubiert und die Lösung anschließend verworfen. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit TBST gewaschen und wie zuvor mit dem sekundären Antikörper für 1 h oder über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert und die Lösung anschließend verworfen. Nach drei weiteren TBST-Waschschriften geschah die Detektion des sekundären Antikörpers mit frisch zubereiteter 1 ml ECL-Lösung die zum Blot gegeben wurde. Die Chemolumineszenz konnte anschließend in einer *Chemostar professional imaging device* (INTAS, Göttingen, Germany) detektiert werden.

Belichtungszeiten wurden jeweils an die Signalstärke angepasst. Zur weiteren Analyse der Membran wurden alle Antikörper mit einem *Stripping*-Puffer entfernt. Hierzu wurde diese für 30 min bei 70°C inkubiert und anschließend ausgiebig (3-6mal) mit TBST gewaschen. Nach erneutem Sättigen der Membran war eine erneute Inkubation mit Antikörper möglich (s.o.).

5.14 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometer-Experimente wurden mit einem „*Attune NxT Flow Cytometer*“ von *Thermo Fisher Scientific* durchgeführt. Die grüne und gelbe Fluoreszenz wurde dabei im BL1-Kanal (Anregungslaser: 488 nm, Emissionsfilter: 530/30 nm) gemessen. Die Spannung der Anregungslaser wurde je nach Experiment individuell eingestellt, sodass sich die Fluoreszenzintensität zwischen 10^3 und 10^4 au befand. Die Kultur wurde für die Messung adäquat verdünnt, sodass Doppel-*Events* möglichst vermieden wurden. Der *forwards*- und *sidewards-scatter* gab Auskunft über Größe und Granulität der Zellen und wurde für ein weiteres Eingrenzen von Einzel-*Events* genutzt. Anhand der Auftragung von Höhe und Fläche des *forwards-scatter*-Signals konnte so zunächst durch die Auswahl der linear verlaufenden Events, ein *Gate* R1, also eine Engrenzung bestimmter Populationen, auf einzelne Zellen angepasst werden (Abb. 30). Nur die Zellen innerhalb dieses *Gates* wurden auf ihre Fluoreszenzintensität hin untersucht. Anhand einer Negativ-Kontrolle wurde anschließend ein weiteres *Gate* R2 gesetzt, welches alle Zellen der Negativ-Kontrolle in einem Dotplot bzw. Histogramm-Plot ausschließt (Abb. 30A). Die Fluoreszenzintensität wurde entweder innerhalb dieses *Gates* R2 gemessen, oder, sofern keine klar abgrenzbare Population messbar, war die Gesamtfluoreszenz im jeweiligen Kanal im *Gate* R3 notiert (Abb. 30 C/D). In diesem Fall wurde die in der Negativkontrolle gemessene Hintergrundfluoreszenz von den Messwerten der weiteren Proben abgezogen, um so die reine Fluoreszenz zu ermitteln.

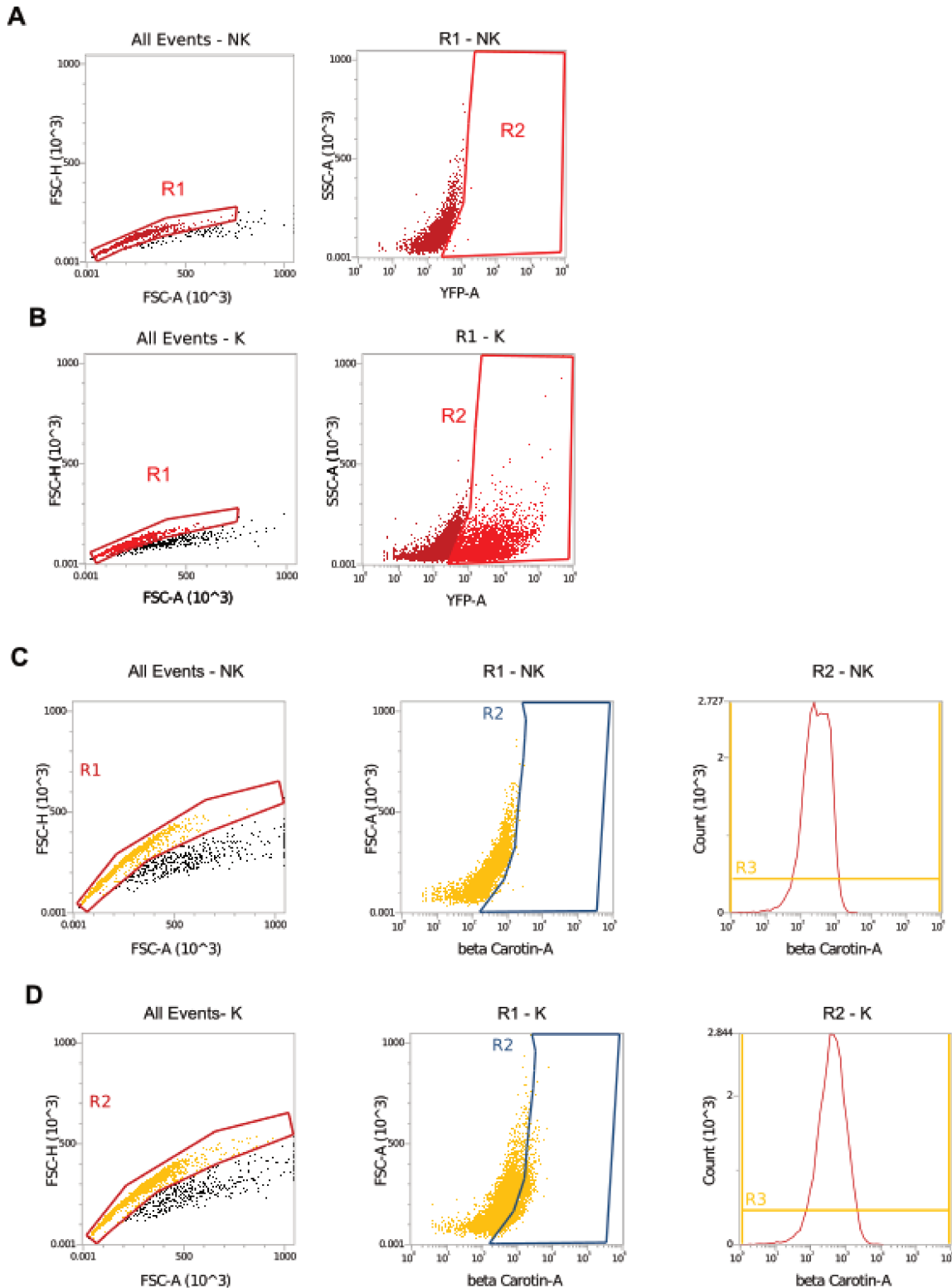


Abb. 30: Beispiel zur Auswertung der Durchflusszytometrie Daten zur Messung von YFP- und β -Carotin-Fluoreszenz. Gezeigt sind mehrere Plots, die zur Auswertung der Durchflusszytometrie verwendet wurden. A) Dotplots einer Negativkontrolle (NK=ESM356). Hierbei wurde zunächst innerhalb aller Events, anhand des linearen Verhältnis von FSC-H und FSC-A auf einzelne Events selektiert (Gate R1). Die Zellen innerhalb dieses Gates wurden anschließend auf ihre YFP-Fluoreszenz (BL1) analysiert und anhand dessen ein R2 Gate gesetzt. B) Gleiche Vorgehensweise wie unter A, mit einer Positivkontrolle (K= ESM356 + pDS319), deren YFP Fluoreszenz anhand des Gates aus A gemessen wurde. C) Analyse von β -Carotin-Fluoreszenz. Analog zu A wurde zunächst anhand einer Negativkontrolle ein entsprechendes β -Carotin-Gate R2 bestimmt, sowie die Gesamtfluoreszenz der Einzelevents anhand des Gates R3 ermittelt. D) Analyse der β -Carotin-Fluoreszenz einer positiven Kontrolle (K=ESM356 + pUDE269). Da keine klar abgrenzbare Population erkennbar war, wurde die Gesamtfluoreszenz verwendet.

5.15 Mikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopischen Analysen der untersuchten *S. cerevisiae*-Stämme geschah mit Hilfe des Mikroskops „Axiovert200 M“ unter Anwendung der Kamera „ORCA-ERA-1394“. Die Bilder wurden mit Hilfe des 63x-Öl-Objektivs angefertigt, unter Verwendung des Immersionsöls (Immersol™ 518F, ZEISS). Es wurden sowohl Bilder im Durchlicht- wie auch im GFP- (Anregung: 488 nm, Emission: 509 nm), YFP- (Anregung: 437 nm, Emission: 476 nm). und RFP-Kanal (Anregung: 551 nm, Emission: 573 nm) aufgenommen. Bildstapel in Z-Richtung wurden mit jeweils 0,5 µm Abstand zueinander angefertigt. Zur Bedienung des Mikroskops wurde die Software Velocity® verwendet. Belichtungszeit und Signalverstärkung in den jeweiligen Kanälen wurde individuell angepasst.

Für die Analyse der Zellen wurden entweder ein Deckgläschen oder ein Mikroskopie-Schälchen verwendet. Auf diese wurde zunächst eine 1,5 % Concanavanin A-Lösung getropft und nach ~1 min wieder abgenommen und mit sterilem dH₂O gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurde 5 µl einer Zellsuspension auf die Concanavanin A-beschichtete Glasoberfläche getropft und nach ~1 min wieder abgenommen und erneut mit sterilem H₂O gewaschen. Die Zellen im Mikroskopierschälchen wurden vor der Analyse im Mikroskop mit ca 1 ml LFM-Medium überschichtet.

5.16 β-Carotin-Extraktion

Für die Extraktion des Betacarotins aus den Zellen wurden diese in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Glasperlen (Ø 0,4 mm) und 1 ml Extraktionsmedium (50% v/v Methanol, 50% v/v Acetonitril) gemischt und in einem „FastPrep-24 Tissue and Cell Homogenizer“ bei 6,5 m/s für 40 s aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 13000 UPM für 5 min abzentrifugiert und der orangefarbene Überstand in ein neues Gefäß überführt. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis der Überstand und das Zellpellet keine Färbung mehr aufwiesen. Die so erhaltenen Extrakte wurden anschließend per HPLC analysiert.

5.17 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Für die Analyse der β-Carotin-Extrakte wurde ein Agilent 1260 HPLC-System (Agilent Technologies), bestehend aus Entgaser, binärer Pumpe, Säulenofen und MWD-Detektor eingesetzt und die Trennsäule EC 250/4 NUCLEOSIL 100-5 C18 (Macherey-Nagel) verwendet. Die Auftrennung der Probe erfolgte isokratisch mit 50% v/v Methanol, 50% v/v Acetonitril als Laufmittel bei einer Flussrate von 1 mL/min. Das Injektionsvolumen betrug

25 µL und die Trennsäule wurde während der Analyse auf 25°C temperiert. Die Proben wurden in Triplikaten vermessen, Betacarotin bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert und mittels Standards quantifiziert. Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit der Software OpenLab CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies) ausgewertet

5.18 Extraktion von Linalool, Geraniol und Limonen

Es wurden 50 ml Kultur in LFM angesetzt, jeweils sowohl einmal mit 5 ml Dodecan und einmal mit 5 ml Isopropylmyristat gemischt. Diese Ansätze wurden für 24 h schüttelnd bei 30°C inkubiert und anschließend bei 13.000 UPM für 5 min zentrifugiert. Der Dodecan- bzw. Isopropylmyristat-Überstand wurde anschließend abgenommen und zur weiteren Analyse gelagert.

5.19 Extraktion von GA4 aus *S. cerevisiae*

Für die Extraktion von Gibberellinsäure aus *S. cerevisiae* wurde zunächst 50 ml Kultur bei 13.000 UPM für 5 min zentrifugiert und Medium von Zellpellet getrennt. Der Überstand wurde zur weiteren Analyse gelagert. Die Zellen wurden anschließend mit ca. 200µl Glassperlen und 1 ml Methanol versetzt und in einem „FastPrep-24 Tissue and Cell Homogenizer“ bei 6,5 m/s für 40 s aufgeschlossen. Das Gemisch wurde erneut bei 13.000 UPM für 5 min zentrifugiert und der Überstand des Zellaufschlusses für die Analyse per Massenspektrometrie gelagert.

Für eine weitere Aufreinigung wurde der pH des Mediums auf pH=3 gesenkt und sowohl Medium als auch Zellextrakt in einem Verhältnis von 1:1 mit Ethylacetat gemischt. Diese Ansätze wurden anschließend 10 min schüttelnd inkubiert und anschließend bei 13.000 UPM für 5 min zentrifugiert. Danach wurde die obere Ethylacetat-Phase abgenommen und zur weiteren Verwendung gelagert.

5.20 Cas9-vermittelte Integration des GA4-Synthesewegs

Für die Integration der GA4-Synthese-Enzyme wurden für jeweils zwei Gene eine Tandem-Integrations-Kassette per PCR hergestellt. Die hierfür jeweils verwendeten Templat-Plasmide, Primer, ausgewählten Loci sowie gRNA-Plasmide sind in Tab. 11 X aufgeführt. Die Integrationskassetten wurden gemeinsam mit dem jeweiligen gRNA-Plasmid sowie dem Cas9-Expressionsplasmid p414 in den gewünschten *S. cerevisiae*-Stamm transformiert.

Tab. 13: Für die Integrationen verwendete Loci, Primer und gRNA-Plasmide

Integrierte Enzyme	Templat	Verwendete Primer	Locus	gRNA-Plasmid
<i>PsGA3ox</i>	pJS3	pJS3int_fwd pJS3int_rev2	<i>911b</i>	pDS302
<i>CmGA20ox</i>	pJS7	pJS7int_fwd pJS7int_rev2		
LexA-EDLL	pDS319	pDS319int_fwd pDS319int_rev	<i>LEU2</i>	pDS280
<i>AtAtr2</i>	pJS8	pJS8int_fwd pJS8int_rev		
<i>PsKAO</i>	pJS2	pJS2int_fwd pJS2_intcan1_rev	<i>CAN1</i>	pMEL10
<i>AtKO</i>	pJS4	pJS4int_fwd pJS4_intcan1_rev		
<i>CmKS</i>	pJS9	pJS9int_fwd pJS9int_rev	<i>URA3</i>	pDS275
<i>AtCPS</i>	pJS10	pJS10int_fwd pJS10int_rev		

5.21 Kreuzung von *S. cerevisiae* und Tetradendisektion

Für die Kreuzung zweier Hefestämme mit *Mating Type* MAT α und MAT a wurden diese auf YPD-Platten in ungefähr gleicher Menge gemischt und einen Tag bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden diese Zellen als „Patch“ auf eine Spo-Platte übertragen und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Eine kleine Menge dieser Zellen wurde unter dem Mikroskop auf sporulierende Zellen hin überprüft. Sofern nur eine unzureichende Sporulationsrate feststellbar war, wurde die Inkubation auf Spo-Medium verlängert. Bei ausreichend hoher Sporulationsrate wurde eine ausreichende Menge an Zellen in 20 μ l ddH₂O mit 20 μ l Lytikase (1 mg/ml) überführt und 20 min bei Raumtemperatur oder 30°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz adäquat verdünnt und auf einer YPD-Platte in einem dünnen Strich ausgestrichen. Die Platte wurde unter einem Tetradenmikroskop mit Mikromanipulator untersucht und die gebildeten Tetraden geteilt in einem Raster angeordnet. Die Platte wurde für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Zur Selektion gewünschter Klone wurde die Platte anschließend auf eine Platte mit passenden Selektionsmarker repliziert. Bei falscher Markersegregation oder nicht vollständigem Wachstum der vier Sporen auf YPD wurde die Tetrade nicht weiterverwendet. Bei der Kreuzung von Stämmen mit aktivem Cas9-Enzym kam es anstatt einer heterozygoten 2:2 Verteilung der Integrationen zu einer homozygoten Vereinheitlichung der vier Sporen durch

homologe Rekombination am WT-Lokus mit der Integration. zu der Der *Mating type* wurde durch Kreuzung mit den Testerstämmen YR312 (MAT α) und YR320 (MAT α)und anschließendem Selektionieren auf einer –His-Platte überprüft.

Literaturverzeichnis

Ahmad, M.; Lin, C.; Cashmore, A. R. (1995): Mutations throughout an Arabidopsis blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 8 (5), S. 653–658..

Alcaíno, Jennifer; Romero, Ignacio; Niklitschek, Mauricio; Sepúlveda, Dionisia; Rojas, María Cecilia; Baeza, Marcelo; Cifuentes, Víctor (2014): Functional characterization of the Xanthophyllomyces dendrorhous farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors. In: *PloS one* 9 (5), e96626.

Almagro Armenteros, Jose Juan; Salvatore, Marco; Emanuelsson, Olof; Winther, Ole; Heijne, Gunnar von; Elofsson, Arne; Nielsen, Henrik (2019): Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. In: *Life science alliance* 2 (5).

Baek, Guem Hee; Cheng, Haili; Choe, Vitnary; Bao, Xin; Shao, Jia; Luo, Shiwen; Rao, Hai (2013): Cdc48: a swiss army knife of cell biology. In: *Journal of amino acids* 2013, S. 183421.

Bagola, Katrin; Mehnert, Martin; Jarosch, Ernst; Sommer, Thomas (2011): Protein dislocation from the ER. In: *Biochimica et biophysica acta* 1808 (3), S. 925–936.

Baldrige, Ryan D.; Rapoport, Tom A. (2016): Autoubiquitination of the Hrd1 Ligase Triggers Protein Retrotranslocation in ERAD. In: *Cell* 166 (2), S. 394–407.

Bastos de Oliveira, Francisco M.; Harris, Michael R.; Brazauskas, Pijus; Bruin, Robertus A. M. de; Smolka, Marcus B. (2012): Linking DNA replication checkpoint to MBF cell-cycle transcription reveals a distinct class of G1/S genes. In: *The EMBO journal* 31 (7), S. 1798–1810.

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

Beenukumar, R. R.; Gödderz, Daniela; Palanimurugan, R.; Dohmen, R. J. (2015): Polyamines directly promote antizyme-mediated degradation of ornithine decarboxylase by the proteasome. In: *Microbial cell (Graz, Austria)* 2 (6), S. 197–207. DOI: 10.15698/mic2015.06.206.

Behrendorff, James Byh; Vickers, Claudia E.; Chrysanthopoulos, Panagiotis; Nielsen, Lars K. (2013): 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl as a screening tool for recombinant monoterpene biosynthesis. In: *Microbial Cell Factories* 12, S. 76.

Berset, Catherine; Griac, Peter; Tempel, Rebecca; La Rue, Janna; Wittenberg, Curt; Lanker, Stefan (2002): Transferable domain in the G(1) cyclin Cln2 sufficient to switch degradation of Sic1 from the E3 ubiquitin ligase SCF(Cdc4) to SCF(Grr1). In: *Molecular and cellular biology* 22 (13), S. 4463–4476.

Björkeröth, Johan; Campbell, Kate; Malina, Carl; Yu, Rosemary; Di Bartolomeo, Francesca; Nielsen, Jens (2020): Proteome reallocation from amino acid biosynthesis to ribosomes

enables yeast to grow faster in rich media. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (35), S. 21804–21812.

Borodina, Irina; Nielsen, Jens (2014): Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. In: *Biotechnology journal* 9 (5), S. 609–620.

Bruin, Robertus A. M. de; Kalashnikova, Tatyana I.; Chahwan, Charly; McDonald, W. Hayes; Wohlschlegel, James; Yates, John et al. (2006): Constraining G1-specific transcription to late G1 phase: the MBF-associated corepressor Nrm1 acts via negative feedback. In: *Molecular cell* 23 (4), S. 483–496.

Burg, John S.; Espenshade, Peter J. (2011): Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. In: *Progress in lipid research* 50 (4), S. 403–410.

Campbell, Kate; Westholm, Jakob; Kasvandik, Sergo; Di Bartolomeo, Francesca; Mormino, Maurizio; Nielsen, Jens (2020): Building blocks are synthesized on demand during the yeast cell cycle. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (14), S. 7575–7583.

Cao, Kan; Nakajima, Reiko; Meyer, Hemmo H.; Zheng, Yixian (2003): The AAA-ATPase Cdc48/p97 Regulates Spindle Disassembly at the End of Mitosis. In: *Cell* 115 (3), S. 355–367.

Carr, Antony M. (1997): Control of cell cycle arrest by the Mec1sc/Rad3sp DNA structure checkpoint pathway. In: *Current opinion in genetics & development* 7 (1), S. 93–98..

Charles, Julia F.; Jaspersen, Sue L.; Tinker-Kulberg, Rachel L.; Hwang, Lena; Szidon, Alex; Morgan, David O. (1998): The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*. In: *Current Biology* 8 (9), S. 497–507.

Choi, E. S.; Sohn, J. H.; Rhee, S. K. (1994): Optimization of the expression system using galactose-inducible promoter for the production of anticoagulant hirudin in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Applied microbiology and biotechnology* 42 (4), S. 587–594.

Christie, J. M.; Reymond, P.; Powell, G. K.; Bernasconi, P.; Raibekas, A. A.; Liscum, E.; Briggs, W. R. (1998): Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. In: *Science (New York, N.Y.)* 282 (5394), S. 1698–1701.

Clotet, J.; Posas, F. (2007): Control of Cell Cycle in Response to Osmostress: Lessons from Yeast. In: Dieter Häussinger und H. Sies (Hg.): *Methods in enzymology*, Bd. 428. Amsterdam, London: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 63–76.

Cunningham, K. G.; Manson, W.; Spring, F. S.; Hutchinson, S. A. (1950): Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. In: *Nature* 166 (4231), S. 949.

Davidson, Sandra E.; Elliott, Robert C.; Helliwell, Chris A.; Poole, Andrew T.; Reid, James B. (2003): The pea gene NA encodes ent-kaurenoic acid oxidase. In: *Plant physiology* 131 (1), S. 335–344.

Delic, Marizela; Valli, Minoska; Graf, Alexandra B.; Pfeffer, Martin; Mattanovich, Diethard; Gasser, Brigitte (2013): The secretory pathway: exploring yeast diversity. In: *FEMS microbiology reviews* 37 (6), S. 872–914..

Denby, Charles M.; Li, Rachel A.; van Vu, T.; Costello, Zak; Lin, Weiyin; Chan, Leanne Jade G. et al. (2018): Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor

determinants in hopped beer. In: *Nature communications* 9 (1), S. 965. DOI: 10.1038/s41467-018-03293-x.

Deng, Min; Hochstrasser, Mark (2006): Spatially regulated ubiquitin ligation by an ER/nuclear membrane ligase. In: *Nature* 443 (7113), S. 827–831. DOI: 10.1038/nature05170.

Deng, Yu; Sun, Mingxue; Xu, Sha; Zhou, Jingwen (2016): Enhanced (S)-linalool production by fusion expression of farnesyl diphosphate synthase and linalool synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Journal of applied microbiology* 121 (1), S. 187–195. DOI: 10.1111/jam.13105.

Dirick, L.; Böhm, T.; Nasmyth, K. (1995): Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The EMBO journal* 14 (19), S. 4803–4813.

Dohmen, R. Jürgen; Varshavsky, Alexander (2005): Heat-Inducible Degron and the Making of Conditional Mutants. In: *Ubiquitin and protein degradation*, Bd. 399. Online-ausg. Amsterdam: Elsevier (Methods in Enzymology, 399), S. 799–822.

Duan, Liting; Hope, Jen; Ong, Qunxiang; Lou, Hsin-Ya; Kim, Namdoo; McCarthy, Comfrey et al. (2017): Understanding CRY2 interactions for optical control of intracellular signaling. In: *Nature communications* 8 (1), S. 547. DOI: 10.1038/s41467-017-00648-8.

Duplus-Bottin, Hélène; Spichty, Martin; Triqueneaux, Gérard; Place, Christophe; Mangeot, Philippe Emmanuel; Ohlmann, Théophile et al. (2020): A monogenic and fast-responding Light-Inducible Cre recombinase as a novel optogenetic switch.

Farr, K. A.; Cohen-Fix, O. (1999): The metaphase to anaphase transition: a case of productive destruction. In: *European journal of biochemistry* 263 (1), S. 14–19..

Ferreira, Thierry; Mason, A. Brett; Pypaert, Marc; Allen, Kenneth E.; Slayman, Carolyn W. (2002): Quality control in the yeast secretory pathway: a misfolded PMA1 H⁺-ATPase reveals two checkpoints. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (23), S. 21027–21040.

Finley, Daniel (2009): Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. In: *Annual review of biochemistry* 78, S. 477–513.

Finley, Daniel; Ulrich, Helle D.; Sommer, Thomas; Kaiser, Peter (2012): The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genetics* 192 (2), S. 319–360.

Fischer, Marc J. C.; Meyer, Sophie; Claudel, Patricia; Bergdoll, Marc; Karst, Francis (2011): Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast. In: *Biotechnology and bioengineering* 108 (8), S. 1883–1892.

Fischer, S.; Engstler, C.; Procopio, S.; Becker, T. (2016): Induced gene expression in industrial *Saccharomyces pastorianus* var. *carlsbergensis* TUM 34/70: evaluation of temperature and ethanol inducible native promoters. In: *FEMS yeast research* 16 (3)..

Friedlander, R.; Jarosch, E.; Urban, J.; Volkwein, C.; Sommer, T. (2000): A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. In: *Nature cell biology* 2 (7), S. 379–384.

Garí, E.; Volpe, T.; Wang, H.; Gallego, C.; Futcher, B.; Aldea, M. (2001): Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. In: *Genes & development* 15 (21), S. 2803–2808.

- Gartner, A.; Jovanović, A.; Jeoung, D. I.; Bourlat, S.; Cross, F. R.; Ammerer, G. (1998): Pheromone-dependent G1 cell cycle arrest requires Far1 phosphorylation, but may not involve inhibition of Cdc28-Cln2 kinase, in vivo. In: *Molecular and cellular biology* 18 (7), S. 3681–3691.
- Garza, Renee M.; Sato, Brian K.; Hampton, Randolph Y. (2009): In vitro analysis of Hrd1p-mediated retrotranslocation of its multispinning membrane substrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (22), S. 14710–14722.
- Geymonat, Marco; Spanos, Ad; Wells, Glenn P.; Smerdon, Stephen J.; Sedgwick, Steven G. (2004): Clb6/Cdc28 and Cdc14 regulate phosphorylation status and cellular localization of Swi6. In: *Molecular and cellular biology* 24 (6), S. 2277–2285.
- Geymonat, Marco; Spanos, Adonis; Jensen, Sanne; Sedgwick, Steven G. (2010): Phosphorylation of Lte1 by Cdk prevents polarized growth during mitotic arrest in *S. cerevisiae*. In: *The Journal of cell biology* 191 (6), S. 1097–1112.
- Ghiara, Jayant B.; Richardson, Helena E.; Sugimoto, Katsunori; Henze, Martha; Lew, Daniel J.; Wittenberg, Curt; Reed, Steven I. (1991): A cyclin B homolog in *S. cerevisiae*: Chronic activation of the Cdc28 protein kinase by cyclin prevents exit from mitosis. In: *Cell* 65 (1), S. 163–174.
- Gietz, D.; St Jean, A.; Woods, R. A.; Schiestl, R. H. (1992): Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. In: *Nucleic Acids Research* 20 (6), S. 1425.
- Gossen, M.; Bujard, H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (12), S. 5547–5551.
- Guntas, Gurkan; Hallett, Ryan A.; Zimmerman, Seth P.; Williams, Tishan; Yumerefendi, Hayretin; Bear, James E.; Kuhlman, Brian (2015): Engineering an improved light-induced dimer (iLID) for controlling the localization and activity of signaling proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (1), S. 112–117.
- Harper, J. Wade; Burton, Janet L.; Solomon, Mark J. (2002): The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. In: *Genes & development* 16 (17), S. 2179–2206.
- Harper, Shannon M.; Neil, Lori C.; Gardner, Kevin H. (2003): Structural basis of a phototropin light switch. In: *Science (New York, N.Y.)* 301 (5639), S. 1541–1544. DOI: 10.1126/science.1086810.
- Hasenjäger, Sophia; Trauth, Jonathan; Hepp, Sebastian; Goenrich, Juri; Essen, Lars-Oliver; Taxis, Christof (2019): Optogenetic Downregulation of Protein Levels with an Ultrasensitive Switch. In: *ACS synthetic biology* 8 (5), S. 1026–1036.
- Hedden, Peter; Sponsel, Valerie (2015): A Century of Gibberellin Research. In: *Journal of plant growth regulation* 34 (4), S. 740–760.
- Helliwell, C. A.; Chandler, P. M.; Poole, A.; Dennis, E. S.; Peacock, W. J. (2001): The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (4), S. 2065–2070.

- Henchoz, S.; Chi, Y.; Catarin, B.; Herskowitz, I.; Deshaies, R. J.; Peter, M. (1997): Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast. In: *Genes & development* 11 (22), S. 3046–3060. DOI: 10.1101/gad.11.22.3046.
- Hershko, A.; Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin system. In: *Annual review of biochemistry* 67, S. 425–479.
- Hirsch, Hans H.; Suarez Rendueles, Paz; Achstetter, Tilman; Wolf, Dieter H. (1988): Aminopeptidase yscII of yeast. Isolation of mutants and their biochemical and genetic analysis. In: *FEBS* (173), S. 589–598.
- Hodge, A.; Mendenhall, M. (1999): The cyclin-dependent kinase inhibitory domain of the yeast Sic1 protein is contained within the C-terminal 70 amino acids. In: *Molecular & general genetics : MGG* 262 (1), S. 55–64.
- Huang, Hanghang; Kawamata, Tomoko; Horie, Tetsuro; Tsugawa, Hiroshi; Nakayama, Yasumune; Ohsumi, Yoshinori; Fukusaki, Eiichiro (2015): Bulk RNA degradation by nitrogen starvation-induced autophagy in yeast. In: *The EMBO journal* 34 (2), S. 154–168.
- Hurt, Eduard C.; Soltanifar, Nouchine; Goldschmidt-Clermont, Michel; Rochaix, Jean-David; Schatz, Gottfried (1986): The cleavable pre-sequence of an imported chloroplast protein directs attached polypeptides into yeast mitochondria. In: *The EMBO journal* 5 (6), S. 1343–1350.
- Hwang, In Sun; Ahn, Il-Pyung (2016): Multi-Homologous Recombination-Based Gene Manipulation in the Rice Pathogen *Fusarium fujikuroi*. In: *The plant pathology journal* 32 (3), S. 173–181.
- Ignea, Codruta; Pontini, Marianna; Maffei, Massimo E.; Makris, Antonios M.; Kampranis, Sotirios C. (2014): Engineering monoterpene production in yeast using a synthetic dominant negative geranyl diphosphate synthase. In: *ACS synthetic biology* 3 (5), S. 298–306.
- Irniger, Stefan (2002): Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. In: *FEBS letters* 532 (1-2), S. 7–11.
- Iyer, V. R.; Horak, C. E.; Scafe, C. S.; Botstein, D.; Snyder, M.; Brown, P. O. (2001): Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. In: *Nature* 409 (6819), S. 533–538.
- Jacobsen, Irene Hjorth; Ledesma-Amaro, Rodrigo; Martinez, José Luis (2020): Recombinant β -Carotene Production by *Yarrowia lipolytica* - Assessing the Potential of Micro-Scale Fermentation Analysis in Cell Factory Design and Bioreaction Optimization. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 8, S. 29.
- Jaehnig, Eric J.; Kuo, Dwight; Hombauer, Hans; Ideker, Trey G.; Kolodner, Richard D. (2013): Checkpoint kinases regulate a global network of transcription factors in response to DNA damage. In: *Cell Reports* 4 (1), S. 174–188.
- Jariel-Encontre, Isabelle; Bossis, Guillaume; Piechaczyk, Marc (2008): Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. In: *Biochimica et biophysica acta* 1786 (2), S. 153–177.

- Jennings, S. M.; Tsay, Y. H.; Fisch, T. M.; Robinson, G. W. (1991): Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (14), S. 6038–6042.
- Jentzsch, Katrin; Wirtz, Astrid; Circolone, Franco; Drepper, Thomas; Losi, Aba; Gärtner, Wolfgang et al. (2009): Mutual exchange of kinetic properties by extended mutagenesis in two short LOV domain proteins from *Pseudomonas putida*. In: *Biochemistry* 48 (43), S. 10321–10333.
- Jiménez, Javier; Bru, Samuel; Ribeiro, Mariana; Clotet, Josep (2015): Live fast, die soon: cell cycle progression and lifespan in yeast cells. In: *Microbial cell (Graz, Austria)* 2 (3), S. 62–67.
- Johnson, Eric A.; Echavarri-Erasun, Carlos (2010): Yeast Biotechnology. In: *The yeasts. A taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam, Oxford: Elsevier, S. 21–44.
- Jongedijk, Esmer; Cankar, Katarina; Buchhaupt, Markus; Schrader, Jens; Bouwmeester, Harro; Beekwilder, Jules (2016): Biotechnological production of limonene in microorganisms. In: *Applied microbiology and biotechnology* 100 (7), S. 2927–2938.
- Jongedijk, Esmer; Cankar, Katarina; Ranzijn, Jorn; van der Krol, Sander; Bouwmeester, Harro; Beekwilder, Jules (2015): Capturing of the monoterpene olefin limonene produced in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast* 32 (1), S. 159–171.
- Jungbluth, Marc; Renicke, Christian; Taxis, Christof (2010): Targeted protein depletion in *Saccharomyces cerevisiae* by activation of a bidirectional degron. In: *BMC systems biology* 4, S. 176.
- Kalies, Kai-Uwe; Allan, Susanne; Sergeyenko, Tatiana; Kröger, Heike; Römisch, Karin (2005): The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. In: *The EMBO journal* 24 (13), S. 2284–2293.
- Kennedy, Matthew J.; Hughes, Robert M.; Peteya, Leslie A.; Schwartz, Joel W.; Ehlers, Michael D.; Tucker, Chandra L. (2010): Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. In: *Nature methods* 7 (12), S. 973–975.
- Köksal, Mustafa; Potter, Kevin; Peters, Reuben J.; Christianson, David W. (2014): 1.55Å-resolution structure of ent-copalyl diphosphate synthase and exploration of general acid function by site-directed mutagenesis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1840 (1), S. 184–190.
- Kondrashov, Alexander; Meijer, Hedda A.; Barhet-Barateig, Adeline; Parker, Hannah N.; Khurshid, Asma; Tessier, Sarah et al. (2012): Inhibition of polyadenylation reduces inflammatory gene induction. In: *RNA (New York, N.Y.)* 18 (12), S. 2236–2250.
- Kumar, Anuj; Des Etages, Shelley Ann; Coelho, Paulo S.R.; Roeder, G. Shirleen; Snyder, Michael (2000): [33] High-throughput methods for the large-scale analysis of gene function by transposon tagging. In: *Methods in enzymology* 328, S. 550–574.
- Lange, T.; Hedden, P.; Graebe, J. E. (1994): Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (18), S. 8552–8556.

- Lee, Jeong Wook; Na, Dokyun; Park, Jong Myoung; Lee, Joungmin; Choi, Sol; Lee, Sang Yup (2012): Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. In: *Nature chemical biology* 8 (6), S. 536–546.
- Lee, Sang Yup; Kim, Hyun Uk (2015): Systems strategies for developing industrial microbial strains. In: *Nature biotechnology* 33 (10), S. 1061–1072.
- Lester, D. R.; Ross, J. J.; Davies, P. J.; Reid, J. B. (1997): Mendel's stem length gene (*Le*) encodes a gibberellin 3 beta-hydroxylase. In: *The Plant cell* 9 (8), S. 1435–1443.
- Limbo, Sara; Torri, Luisa; Piergiovanni, Luciano (2007): Light-induced changes in an aqueous beta-carotene system stored under halogen and fluorescent lamps, affected by two oxygen partial pressures. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (13), S. 5238–5245.
- Liu, Hongtao; Yu, Xuhong; Li, Kunwu; Klejnot, John; Yang, Hongyun; Lisiero, Dominique; Lin, Chentao (2008): Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in Arabidopsis. In: *Science (New York, N.Y.)* 322 (5907), S. 1535–1539.
- Liu, Qing; Wang, Qin; Deng, Weixian; Wang, Xu; Piao, Mingxin; Cai, Dawei et al. (2017): Molecular basis for blue light-dependent phosphorylation of Arabidopsis cryptochrome 2. In: *Nat Commun* 8 (1).
- Lõoke, Marko; Kristjuhan, Kersti; Kristjuhan, Arnold (2011): Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. In: *BioTechniques* 50 (5), S. 325–328.
- Lu, Yi; Zhi, Yuee; Miyakawa, Takuya; Tanokura, Masaru (2019): Metabolic profiling of natural and cultured *Cordyceps* by NMR spectroscopy. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 7735.
- Lucas, Miguel de; Davière, Jean-Michel; Rodríguez-Falcón, Mariana; Pontin, Mariela; Iglesias-Pedraz, Juan Manuel; Lorrain, Séverine et al. (2008): A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. In: *Nature* 451 (7177), S. 480–484.
- Machlin, L. J. (1995): Critical assessment of the epidemiological data concerning the impact of antioxidant nutrients on cancer and cardiovascular disease. In: *Critical reviews in food science and nutrition* 35 (1-2), S. 41–50.
- Magome, Hiroshi; Nomura, Takahito; Hanada, Atsushi; Takeda-Kamiya, Noriko; Ohnishi, Toshiyuki; Shinma, Yuko et al. (2013): CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (5), S. 1947–1952.
- Matsuoka, Daisuke; Tokutomi, Satoru (2005): Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (37), S. 13337–13342.
- Mattanovich, Diethard; Sauer, Michael; Gasser, Brigitte (2014): Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. In: *Microbial Cell Factories* 13 (1), S. 34.
- McGrath, J. P.; Jentsch, S.; Varshavsky, A. (1991): UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. In: *The EMBO journal* 10 (1), S. 227–236.
- McIsaac, R. Scott; Silverman, Sanford J.; McClean, Megan N.; Gibney, Patrick A.; Macinskas, Joanna; Hickman, Mark J. et al. (2011): Fast-acting and nearly gratuitous induction of gene expression and protein depletion in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular biology of the cell* 22 (22), S. 4447–4459.

- Mehnert, Martin; Sommer, Thomas; Jarosch, Ernst (2014): Der1 promotes movement of misfolded proteins through the endoplasmic reticulum membrane. In: *Nature cell biology* 16 (1), S. 77–86.
- Mehrtash, Adrian B.; Hochstrasser, Mark (2019): Ubiquitin-dependent protein degradation at the endoplasmic reticulum and nuclear envelope. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* 93, S. 111–124.
- Mendenhall, M. D. (1998): Cyclin-dependent kinase inhibitors of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. In: *Current topics in microbiology and immunology* 227, S. 1–24.
- Milne, N.; Thomsen, P.; Mølgaard Knudsen, N.; Rubaszka, P.; Kristensen, M.; Borodina, I. (2020): Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the de novo production of psilocybin and related tryptamine derivatives. In: *Metabolic engineering* 60, S. 25–36.
- Möglich, Andreas; Yang, Xiaojing; Ayers, Rebecca A.; Moffat, Keith (2010): Structure and function of plant photoreceptors. In: *Annual review of plant biology* 61, S. 21–47.
- Morano, Kevin A.; Grant, Chris M.; Moye-Rowley, W. Scott (2012): The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genetics* 190 (4), S. 1157–1195.
- Mossmann, Dirk; Meisinger, Chris; Vögtle, F-Nora (2012): Processing of mitochondrial presequences. In: *Biochimica et biophysica acta* 1819 (9-10), S. 1098–1106. D
- Murakami, Hiroshi; Aiba, Hirofumi; Nakanishi, Makoto; Murakami-Tonami, Yuko (2010): Regulation of yeast forkhead transcription factors and FoxM1 by cyclin-dependent and polo-like kinases. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (16), S. 3233–3242.
- Nakajima, Masatoshi; Shimada, Asako; Takashi, Yoshiyuki; Kim, Young-Cheon; Park, Seung-Hyun; Ueguchi-Tanaka, Miyako et al. (2006): Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 46 (5), S. 880–889.
- Nakatsukasa, Kunio; Brodsky, Jeffrey L.; Kamura, Takumi (2013): A stalled retrotranslocation complex reveals physical linkage between substrate recognition and proteasomal degradation during ER-associated degradation. In: *Molecular biology of the cell* 24 (11), 1765-75, S1-8.
- Nakatsukasa, Kunio; Hoyer, Gregory; Michaelis, Susan; Brodsky, Jeffrey L. (2008): Dissecting the ER-associated degradation of a misfolded polytopic membrane protein. In: *Cell* 132 (1), S. 101–112.
- Nasmyth, Kim (2005): How do so few control so many? In: *Cell* 120 (6), S. 739–746. DOI: 10.1016/j.cell.2005.03.006.
- Niehaus, Eva-Maria; Münsterkötter, Martin; Proctor, Robert H.; Brown, Daren W.; Sharon, Amir; Idan, Yifat et al. (2016): Comparative "Omics" of the *Fusarium fujikuroi* Species Complex Highlights Differences in Genetic Potential and Metabolite Synthesis. In: *Genome biology and evolution* 8 (11), S. 3574–3599.
- Nielsen, Jens (2015): BIOENGINEERING. Yeast cell factories on the horizon. In: *Science* 349 (6252), S. 1050–1051.
- Nielsen, Jens (2019): Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. In: *Biotechnology journal* 14 (9), e1800421.

- Nihongaki, Yuta; Kawano, Fuun; Nakajima, Takahiro; Sato, Moritoshi (2015): Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. In: *Nature biotechnology* 33 (7), S. 755–760.
- Nishimura, Kohei; Fukagawa, Tatsuo; Takisawa, Haruhiko; Kakimoto, Tatsuo; Kanemaki, Masato (2009): An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. In: *Nature methods* 6 (12), S. 917–922.
- Oliveira, Juliana de; Rodrigues, Cristine; Vandenberghe, Luciana P. S.; Câmara, Marcela C.; Libardi, Nelson; Soccol, Carlos R. (2017): Gibberellic Acid Production by Different Fermentation Systems Using Citric Pulp as Substrate/Support. In: *BioMed Research International* 2017, S. 5191046.
- Paddon, C. J.; Westfall, P. J.; Pitera, D. J.; Benjamin, K.; Fisher, K.; McPhee, D. et al. (2013): High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. In: *Nature* 496 (7446), S. 528–532.
- Palozza, Paola; Krinsky, Norman I. (1992): [38] Antioxidant effects of carotenoids in Vivo and in Vitro: An overview. In: *Methods in Enzymology : Carotenoids Part A: Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation*, Bd. 213: Academic Press, S. 403–420..
- Pathak, Gopal P.; Strickland, Devin; Vrana, Justin D.; Tucker, Chandra L. (2014): Benchmarking of optical dimerizer systems. In: *ACS synthetic biology* 3 (11), S. 832–838.
- Pedruzzi, Ivo; Dubouloz, Frédérique; Cameroni, Elisabetta; Wanke, Valeria; Roosen, Johnny; Winderickx, Joris; Virgilio, Claudio de (2003): TOR and PKA Signaling Pathways Converge on the Protein Kinase Rim15 to Control Entry into G0. In: *Molecular cell* 12 (6), S. 1607–1613.
- Pfeifer, B. A.; Khosla, C. (2001): Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 65 (1), S. 106–118..
- Pickart, C. M. (2001): Mechanisms underlying ubiquitination. In: *Annual review of biochemistry* 70, S. 503–533.
- Piggott, J. R.; Rai, R.; Carter, B. L. (1982): A bifunctional gene product involved in two phases of the yeast cell cycle. In: *Nature* 298 (5872), S. 391–393.
- Plath, Kathrin; Mothes, Walther; Wilkinson, Barrie M.; Stirling, Colin J.; Rapoport, Tom A. (1998): Signal Sequence Recognition in Posttranslational Protein Transport across the Yeast ER Membrane. In: *Cell* 94 (6), S. 795–807.
- Plempner, R. K.; Böhmeler, S.; Bordallo, J.; Sommer, T.; Wolf, D. H. (1997): Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. In: *Nature* 388 (6645), S. 891–895.
- Polakowski, T.; Stahl, U.; Lang, C. (1998): Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. In: *Applied microbiology and biotechnology* 49 (1), S. 66–71.
- Pramila, Tata; Wu, Wei; Miles, Shawna; Noble, William Stafford; Breeden, Linda L. (2006): The Forkhead transcription factor Hcm1 regulates chromosome segregation genes and fills the S-phase gap in the transcriptional circuitry of the cell cycle. In: *Genes & development* 20 (16), S. 2266–2278.

- Qian, Zhi-Gang; Xia, Xiao-Xia; Lee, Sang Yup (2011): Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cadaverine: a five carbon diamine. In: *Biotechnology and bioengineering* 108 (1), S. 93–103.
- Rabeharindranto, Hery; Castaño-Cerezo, Sara; Lautier, Thomas; Garcia-Alles, Luis F.; Treitz, Christian; Tholey, Andreas; Truan, Gilles (2019): Enzyme-fusion strategies for redirecting and improving carotenoid synthesis in *S. cerevisiae*. In: *Metabolic engineering communications* 8, e00086.
- Raghavan, Adhithi R.; Salim, Kevin; Yadav, Vikramaditya G. (2020): Optogenetic Control of Heterologous Metabolism in *E. coli*. In: *ACS synthetic biology* 9 (9), S. 2291–2300.
- Rape, Michael; Jentsch, Stefan (2004): Productive RUpture: activation of transcription factors by proteasomal processing. In: *Biochimica et biophysica acta* 1695 (1-3), S. 209–213.
- Ravid, Tommer; Hochstrasser, Mark (2008): Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (9), S. 679–690.
- Renicke, Christian; Schuster, Daniel; Usherenko, Svetlana; Essen, Lars-Oliver; Taxis, Christof (2013): A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function. In: *Chemistry & biology* 20 (4), S. 619–626.
- Robb, Allison; Brown, Jeremy D. (2001): Protein Transport. In: *Molecular cell* 8 (3), S. 484–486. DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00339-2.
- Roberts, C. J.; Nelson, B.; Marton, M. J.; Stoughton, R.; Meyer, M. R.; Bennett, H. A. et al. (2000): Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. In: *Science (New York, N.Y.)* 287 (5454), S. 873–880.
- Römisch, K. (1999): Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. In: *Journal of cell science* 112 (Pt 23), S. 4185–4191.
- Römisch, Karin (2017): A Case for Sec61 Channel Involvement in ERAD. In: *Trends in Biochemical Sciences* 42 (3), S. 171–179.
- Roze, Ludmila V.; Chanda, Anindya; Linz, John E. (2011): Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. In: *Fungal genetics and biology : FG & B* 48 (1), S. 35–48.
- Rubenstein, Eric M.; Kreft, Stefan G.; Greenblatt, Wesley; Swanson, Robert; Hochstrasser, Mark (2012): Aberrant substrate engagement of the ER translocon triggers degradation by the Hrd1 ubiquitin ligase. In: *The Journal of cell biology* 197 (6), S. 761–773.
- Scheffer, Johannes; Hasenjäger, Sophia; Taxis, Christof (2019): Degradation of integral membrane proteins modified with the photosensitive degron module requires the cytosolic endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. In: *Molecular biology of the cell* 30 (20), S. 2558–2570.
- Schindelin, Johannes; Arganda-Carreras, Ignacio; Frise, Erwin; Kaynig, Verena; Longair, Mark; Pietzsch, Tobias et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. In: *Nature methods* 9 (7), S. 676–682.
- Schmidt, Claudia C.; Vasic, Vedran; Stein, Alexander (2020): Doa10 is a membrane protein retrotranslocase in ER-associated protein degradation. In: *eLife* 9.
- Schneider, B. L.; Yang, Q. H.; Futcher, A. B. (1996): Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1. In: *Science (New York, N.Y.)* 272 (5261), S. 560–562.

- Scita, G. (1992): The stability of β -carotene under different laboratory conditions. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry* 3 (3), S. 124–128. DOI: 10.1016/0955-2863(92)90104-Q.
- Shimizu-Sato, Sae; Huq, Enamul; Tepperman, James M.; Quail, Peter H. (2002): A light-switchable gene promoter system. In: *Nature biotechnology* 20 (10), S. 1041–1044. DOI: 10.1038/nbt734.
- Shukla, Ruchi; Chand, Subhash; Srivastava, Ashok K. (2005): Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*. In: *Enzyme and Microbial Technology* 36 (4), S. 492–497.
- Siddiqui, Michael S.; Thodey, Kate; Trenchard, Isis; Smolke, Christina D. (2012): Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. In: *FEMS yeast research* 12 (2), S. 144–170.
- Stolz, Alexandra; Wolf, Dieter H. (2010): Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. In: *Biochimica et biophysica acta* 1803 (6), S. 694–705.
- Sun, Tai-ping (2010): Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. In: *Plant physiology* 154 (2), S. 567–570.
- Surana, U.; Amon, A.; Dowzer, C.; McGrew, J.; Byers, B.; Nasmyth, K. (1993): Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. In: *The EMBO journal* 12 (5), S. 1969–1978.
- Surana, Uttam; Robitsch, Helmut; Price, Clive; Schuster, Tillman; Fitch, Ian; Futcher, A. Bruce; Nasmyth, Kim (1991): The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. In: *Cell* 65 (1), S. 145–161.
- Taxis, Christof; Hitt, Reiner; Park, Sae-Hun; Deak, Peter M.; Kostova, Zlatka; Wolf, Dieter H. (2003): Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (38), S. 35903–35913.
- Taylor, Alexander B.; Smith, Barbara S.; Kitada, Sakae; Kojima, Katsuhiko; Miyaura, Hideki; Otwinowski, Zbyszek et al. (2001): Crystal Structures of Mitochondrial Processing Peptidase Reveal the Mode for Specific Cleavage of Import Signal Sequences. In: *Structure* 9 (7), S. 615–625.
- Tilbrook, Kimberley; Arongaus, Adriana B.; Binkert, Melanie; Heijde, Marc; Yin, Ruohe; Ulm, Roman (2013): The UVR8 UV-B Photoreceptor: Perception, Signaling and Response. In: *The arabidopsis book* 11, e0164.
- Trauth, Jonathan; Entwicklung und Charakterisierung von optogenetischen Modulen in *Saccharomyces cerevisiae*. Masterarbeit (2017)
- Trauth, Jonathan; Scheffer, Johannes; Hasenjäger, Sophia; Taxis, Christof (2019): Synthetic Control of Protein Degradation during Cell Proliferation and Developmental Processes. In: *ACS Omega* 4 (2), S. 2766–2778.
- Trauth, Jonathan; Dissertation (unveröffentlicht)
- Ueguchi-Tanaka, Miyako; Ashikari, Motoyuki; Nakajima, Masatoshi; Matsuoka, Makoto (2006): Gid1 encodes a soluble receptor for gibberellin. In: *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme* 51 (15), S. 2312–2320.

- Usherenko, Svetlana; Stibbe, Hilke; Muscò, Massimiliano; Essen, Lars-Oliver; Kostina, Ekaterina A.; Taxis, Christof (2014): Photo-sensitive degron variants for tuning protein stability by light. In: *BMC systems biology* 8, S. 128.
- van Poppel, G.; Goldbohm, R. A. (1995): Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention. In: *The American journal of clinical nutrition* 62 (6 Suppl), 1393S-1402S.
- van Rossum, Harmen M.; Kozak, Barbara U.; Pronk, Jack T.; van Maris, Antonius J. A. (2016): Engineering cytosolic acetyl-coenzyme A supply in *Saccharomyces cerevisiae*: Pathway stoichiometry, free-energy conservation and redox-cofactor balancing. In: *Metabolic engineering* 36, S. 99–115.
- Varshavsky, Alexander (1991): Naming a targeting signal. In: *Cell* 64 (1), S. 13–15. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90202-a.
- Vergés, Emili; Colomina, Neus; Garí, Eloi; Gallego, Carme; Aldea, Martí (2007): Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. In: *Molecular cell* 26 (5), S. 649–662.
- Verma, R.; Annan, R. S.; Huddleston, M. J.; Carr, S. A.; Reynard, G.; Deshaies, R. J. (1997): Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. In: *Science (New York, N.Y.)* 278 (5337), S. 455–460. DOI: 10.1126/science.278.5337.455.
- Vieira Gomes, Antonio Milton; Souza Carmo, Talita; Silva Carvalho, Lucas; Mendonça Bahia, Frederico; Parachin, Nádia Skorupa (2018): Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. In: *Microorganisms* 6 (2).
- Wanke, Valeria; Pedruzzi, Ivo; Camerini, Elisabetta; Dubouloz, Frédérique; Virgilio, Claudio de (2005): Regulation of G0 entry by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex. In: *The EMBO journal* 24 (24), S. 4271–4278.
- Weissman, A. M. (2001): Themes and variations on ubiquitylation. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (3), S. 169–178.
- Welchman, Rebecca L.; Gordon, Colin; Mayer, R. John (2005): Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (8), S. 599–609.
- Welter, Evelyn; Elazar, Zvulun (2015): Autophagy mediates nonselective RNA degradation in starving yeast. In: *The EMBO journal* 34 (2), S. 131–133.
- Wilkinson, B. M.; Critchley, A. J.; Stirling, C. J. (1996): Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (41), S. 25590–25597.
- Wolf, Dieter H.; Stolz, Alexandra (2012): The Cdc48 machine in endoplasmic reticulum associated protein degradation. In: *Biochimica et biophysica acta* 1823 (1), S. 117–124. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.09.002.
- Wu, Junjun; Du, Guocheng; Zhou, Jingwen; Chen, Jian (2014): Systems metabolic engineering of microorganisms to achieve large-scale production of flavonoid scaffolds. In: *Journal of biotechnology* 188, S. 72–80.
- Xia, Yongliang; Luo, Feifei; Shang, Yanfang; Chen, Peilin; Lu, Yuzhen; Wang, Chengshu (2017): Fungal Cordycepin Biosynthesis Is Coupled with the Production of the Safeguard Molecule Pentostatin. In: *Cell chemical biology* 24 (12), 1479-1489.e4.

- Yamaguchi, S.; Saito, T.; Abe, H.; Yamane, H.; Murofushi, N.; Kamiya, Y. (1996): Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme entkaurene synthase B from pumpkin (*Cucurbita maxima* L.). In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 10 (2), S. 203–213.
- Yamaguchi, Shinjiro (2008): Gibberellin metabolism and its regulation. In: *Annual review of plant biology* 59, S. 225–251. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804.
- Ye, Y.; Meyer, H. H.; Rapoport, T. A. (2001): The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. In: *Nature* 414 (6864), S. 652–656.
- Ye, Yihong; Tang, Wai Kwan; Zhang, Ting; Di Xia (2017): A Mighty "Protein Extractor" of the Cell: Structure and Function of the p97/CDC48 ATPase. In: *Frontiers in molecular biosciences* 4, S. 39.
- Yu, Rosemary; Campbell, Kate; Pereira, Rui; Björkeröth, Johan; Qi, Qi; Vorontsov, Egor et al. (2020): Nitrogen limitation reveals large reserves in metabolic and translational capacities of yeast. In: *Nat Commun* 11 (1), S. 1881.
- Zattas, Dimitrios; Hochstrasser, Mark (2015): Ubiquitin-dependent protein degradation at the yeast endoplasmic reticulum and nuclear envelope. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 50 (1), S. 1–17.
- Zhang, Congqiang; Chen, Xixian; Stephanopoulos, Gregory; Too, Heng-Phon (2016): Efflux transporter engineering markedly improves amorphadiene production in *Escherichia coli*. In: *Biotechnol. Bioeng.* 113 (8), S. 1755–1763.
- Zhang, Feng; Vierock, Johannes; Yizhar, Ofer; Fenno, Lief E.; Tsunoda, Satoshi; Kianianmomeni, Arash et al. (2011): The microbial opsin family of optogenetic tools. In: *Cell* 147 (7), S. 1446–1457.
- Zhang, Y.; Nijbroek, G.; Sullivan, M. L.; McCracken, A. A.; Watkins, S. C.; Michaelis, S.; Brodsky, J. L. (2001): Hsp70 molecular chaperone facilitates endoplasmic reticulum-associated protein degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. In: *Molecular biology of the cell* 12 (5), S. 1303–1314.
- Zoltowski, Brian D.; Gardner, Kevin H. (2011): Tripping the Light Fantastic: Blue-Light Photoreceptors as Examples of Environmentally Modulated Protein–Protein Interactions. In: *Biochemistry* 50 (1), S. 4–16.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Lars-Oliver Essen für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen und für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Ebenso möchte ich mich bei Priv. Doz. Dr. Cristof Taxis für die Übernahme der Erstkorrektur und vor allem für die Betreuung während der Arbeiten an dieser Promotion herzlichst bedanken.

Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch und Prof. Dr. Alfred Batschauer möchte ich für die Bereitschaft, meiner Prüfungskommission anzugehören, danken. Weiterhin danke ich ihnen für die Bereitstellung essentieller Gerätschaften aus ihren eigenen AGs, ohne die ich diese Arbeit nicht hätte anfertigen können.

Christof möchte ich als meinem Betreuer nochmals gesondert danken, für die tollen Ratschläge und Unterstützung im Labor, die er mir während meiner Promotion gegeben hat. Vor allem dafür, dass er währenddessen die menschlichen Aspekte der Labor-Arbeit nicht vergessen hat. Durch seine Beiträge hat er mir definitiv dabei entscheidend geholfen, diese Promotion zu Ende zu bringen.

Weiterhin möchte ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der AG Essen für die schöne Arbeitsatmosphäre, grandiose Ausflüge in das Kleinwalsertal und diverse „Memo-Mittwoche“ danken. Ein besonderer Dank gilt nochmals der „Bio-Crew“, die auf ihre anarchische Weise das Arbeiten nicht zwingend leichter, aber lustiger gestaltet hat.

Den ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der AG Mösch danke ich für die Hilfe und Zusammenarbeit in den letzten 3,5 Jahren, sowie in der Zeit meiner Bachelor- und Master-Arbeit, die meine Arbeitsweise enorm geprägt haben.

Außerdem danke ich meinen Eltern, ohne deren konstante Unterstützung und Rückhalt während meines Studiums bis hin zur Promotion das alles nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt möchte ich Anne für den Zuspruch, die Ratschläge, die geteilte Freude und der Hilfe, nicht nur bei den letzten Schritten dieser Promotion, danken.

Vielen Dank

